

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Βερούτη Σοφία

ΧΗΜΙΚΟΣ

**Μελέτη των δράσεων της βιταμίνης D₃ σε φυσιολογικά και
παθολογικά κύτταρα**



ΑΘΗΝΑ 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη των δράσεων της βιταμίνης D₃ σε φυσιολογικά και
παθολογικά κύτταρα**

Βερούτη Σοφία

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

Ιανουάριος 2013

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των δράσεων της βιταμίνης D3 σε φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα

Βερούτη Σοφία

A.M.: 62629

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κ.Α. Δημόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Κ.Α. Δημόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Σμ. Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ.Α. Δημόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δ. Κλέτσας, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ
«Δημόκριτος»

Σμ. Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ε. Τσιλιμπάρη, Ερευνήτρια Α΄ και Διευθύντρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και
Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Π. Κίτσιου, Ερευνήτρια Γ΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ
«Δημόκριτος»

Α. Σιαφάκα - Καπάδα , Καθηγήτρια και Διευθύντρια του τομέα της Βιοχημείας,
Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ν. Γαλανοπούλου , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη των δράσεων της βιταμίνης D₃ σε φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα

Η βιταμίνη D₃ και το ανάλογο της παρικαλσιτόλη έχουν ευεργετικές δράσεις στην χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ), μια από τις κυριότερες αιτίες της οποίας είναι η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ). Εκτός από τη ευρεία αποδεκτή αποτελεσματικότητα της βιταμίνης D και των αναλόγων της στη θεραπεία του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού γνωρίζουμε επίσης ότι σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση η χορήγηση της βελτιώνει τη φλεγμονώδη κατατομή και την πρωτεϊνουρία. Μελετήσαμε την επίδραση της παρικαλσιτόλης στο μεταβολισμό του PAF (Platelet Activating Factor) και στα επίπεδα άλλων φλεγμονωδών παραγόντων που εμπλέκονται στη ΧΝΝ. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε αθανатоποιημένα ανθρώπινα ποδοκύτταρα (HGEC) για την αξιολογηση της δράσεως της βιταμίνης D (καλσιτριόλη) και της παρικαλσιτόλης στην έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών όπως η ποδοκαλυκίνη και η νεφρίνη.

Η παρικαλσιτόλη ανέστειλε *in vitro* την προκαλούμενη από τον PAF ή την θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, η παρικαλσιτόλη ανέστειλε *in vitro* το βιοσυνθετικό ένζυμο της *de novo* πορείας βιοσύνθεσης-PAF-CPT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και αύξησε το αποικοδομητικό ένζυμο PAF-AH των λευκοκυττάρων, ενώ πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρικαλσιτόλης ήταν αναγκαίες για να μειωθεί η δραστηριότητα του βιοσυνθετικού ενζύμου της πορείας του ανασχηματισμού, λύσο-PAF-AT. Ομοίως, *in vivo*, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, η χορήγηση παρικαλσιτόλη για ένα μήνα μείωσε την PAF-CPT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και αύξησε την PAF-AH των λευκοκυττάρων, ενώ δεν επηρέασε την λύσο-PAF-AT. Επιπλέον η παρικαλσιτόλη μείωσε την συγκέντρωση των κυτταροκινών IL-8, IL-1β και TNF-α και αύξησε τον VEGF. Τα παραπάνω αποτελέσματα επεκτείνουν τις γνώσεις μας όσον αφορά τις ευεργετικές επιδράσεις της παρικαλσιτόλης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, αναδεικνύοντας νέα δεδομένα για τις δράσεις της παρικαλσιτόλης ως προς δράσεις του PAF και της θρομβίνης, τον

μεταβολισμό του PAF και άλλες κυτταροκίνες όπως η IL-8, η IL-1β, ο TNF-α και ο VEGF.

Τα ποδοκύτταρα που εκτίθενται σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση ποδοκαλυκίνης και νεφρίνης. Η μείωση αυτή έχει συνδεθεί με την καταστροφή των ποδοειδών προεκβολών και συσχετίζεται με απώλεια της εκλεκτικής διήθησης στους νεφρούς και πρωτεϊνουρία. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη επαναφέρουν τα μειωμένα επίπεδα της νεφρίνης και ενισχύουν σημαντικά την έκφραση της ποδοκαλυκίνης στα HGEC. Τα ποδοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος X (RXR). Η παρουσία καλσιτριόλης και παρικαλσιτόλης προκαλεί την μετακίνηση του VDR στον πυρήνα και τον συνεντοπισμό του με τον RXR. Η σημασία του VDR στην ρύθμιση των επιπέδων της ποδοκαλυκίνης μελετήθηκε μέσω αποσιώπησης του γονιδίου του VDR με τη χρήση siRNA. Η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μείωσε την επαγόμενη από την καλσιτριόλη και παρικαλσιτόλη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλυκίνης φανερώνοντας ότι η ενεργοποίηση της έκφρασης της εν μέρει οφείλεται στην διαμεσολάβηση του VDR. Ενώ μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρημνισής DNA δείξαμε ότι ο VDR προσκολλάται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου της ποδοκαλυκίνης επηρεάζοντας την έκφραση της.

Συνεπώς, η χρήση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης ενεργοποιεί την έκφραση ειδικών σημαντικών ποδοκυττάρικων πρωτεϊνών και δρα προστατευτικά κατά της απώλειας της εκλεκτικής διήθησης στους νεφρούς στη ΧΝΝ.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοχημεία/Κυτταρική βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: βιταμίνη D₃, παρικαλσιτόλη, αιμοκαθαρόμενοι ασθενείς, ποδοκύτταρα, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

ABSTRACT

Study of vitamin D₃ actions in physiological and pathological conditions

Vitamin D₃ and its analog paricalcitol, are beneficial in human and experimental chronic kidney disease (CKD), the leading cause of which is diabetic nephropathy (DN). Apart from their general efficacy to the treatment of secondary hyperparathyroidism in haemodialysis patients these two molecules also improve the inflammatory status and proteinuria in these patients. In one approach to study the beneficial role of paricalcitol we studied its effects on PAF biosynthesis as well as other inflammatory mediators implicated in CKD. In a separate approach, we used immortalized human podocytes (HGEC) to assess the expression profile of the podocytic-associated proteins podocalyxin and nephrin after treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) and its analogue paricalcitol.

In vitro paricalcitol inhibited PAF/thrombin-induced platelet aggregation and the inhibitory effect was comparable with that of PAF/thrombin antagonists. In addition, paricalcitol inhibited *in vitro* the PAF-CPT activity in platelets and leukocytes and increased PAF-AH activity in leukocytes. However, much higher concentrations of paricalcitol were needed to inhibit λύσο-PAF-AT activity. Similarly, in haemodialysis patients, paricalcitol treatment reduced PAF-CPT activity in platelets and leukocytes and increased PAF-AH activity in leukocytes, while λύσο-PAF-AT activity remained unaltered. On the other hand paricalcitol therapy reduced the expression levels of IL-8, IL-1b, and TNF-a and increased VEGF levels. These results further support the beneficial effects of vitamin D treatment in haemodialysis patients, since it strongly affects PAF/thrombin activities, PAF-metabolism and IL-8, IL-1b, TNF-a and VEGF circulating levels.

HGEC exhibit high-glucose-mediated downregulation of podocalyxin and nephrin, loss of which has been linked with loss of the permselective renal barrier and proteinuria. Calcitriol and paricalcitol reversed high glucose-induced decrease of nephrin and significantly enhanced podocalyxin expression in podocytes cultured in high glucose. HGEC express VDR and retinoid X receptor (RXR). In the

presence of calcitriol and paricalcitol VDR expression was up-regulated and VDR co-localized with RXR in the nucleus. VDR knock-down abolished the protective action of calcitriol and paricalcitol on podocalyxin expression indicating that podocalyxin activation of expression is partly mediated by VDR. Furthermore VDR specifically regulates podocalyxin expression by bounding to a site upstream of the podocalyxin promoter.

Vitamin D analogues maintain and furthermore, re-activate the expression of specialized components of podocytes including podocalyxin, hence they provide protection against loss of the permselective renal barrier, with molecular mechanisms elucidated herein.

SUBJECT AREA: Biochemistry/Cell biology

KEYWORDS: vitamin D₃, paricalcitol, heamodialysis patients, podocytes, platelet activating factor

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στην οικογένεια μου και τον Δημήτρη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε την περίοδο 2009-2013 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοχημείας/Παθολογίας κυττάρων και εξωκυττάριου χώρου του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της εργασίας είχε ο Καθηγητής κ. Κ.Α. Δημόπουλος, για τον οποίο επιθυμώ να εκφράσω την ειλικρινή μου εκτίμηση και ευγνωμοσύνη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση στη διεξαγωγή και τη συγγραφή της εργασίας αυτής και για το συνεχές επιστημονικό και ανθρώπινο ενδιαφέρον που μου έδειξε κατά τη διάρκεια αυτών των ετών.

Επιθυμώ επίσης να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς και επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Την Καθηγήτρια βιοχημείας κ. Σ. Αντωνοπούλου Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής και πρώην Αντιπρύτανη του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Τον κ. Δημήτριο Κλέτσα, Ερευνητή Α΄ βαθμίδας στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Την κ. Ε. Τσιλιμπάρη, Ερευνήτρια Α΄ βαθμίδας και Διευθύντρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την δυνατότητα που μου παρείχε να δουλέψω στο εργαστήριο Βιοχημείας/Παθολογίας κυττάρων και εξωκυττάριου χώρου αλλά και το ανθρώπινο ενδιαφέρον της.

Την κ. Π. Κίτσιου ερευνήτρια Γ΄ βαθμίδας στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Την κ. Α. Σιαφάκα – Καπάδαη Καθηγήτρια του Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ και Διευθύντρια του τομέα της Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

Την κ. Ν. Γαλανοπούλου , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Ιατρού, Διευθυντή του Νεφρολογικού Τμήματος του Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας, για την πραγματική και ουσιαστική συμβολή του στην παρούσα εργασία τόσο ως προς τα ερευνητικά ερεθίσματα όσο και για την οικονομική ενίσχυση της εργασίας. Την κ. Γ. Δροσσοπούλου, Ερευνήτρια Γ΄ βαθμίδας στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την υποστηρίξη της και την βοήθεια της στο πειραματικό μέρος. Και την κ. Ε. Φραγκοπουλου, Επικ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για το συνεχές ανθρώπινο ενδιαφέρον όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες σε όλα τα μέλη ΔΕΠ, το προσωπικό, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών αλλά και του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθολογίας κυττάρων και εξωκυττάρου χώρου στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ερευνητικού κέντρου ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την όμορφη συνεργασία όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ειλικρινά την οικογένεια μου και τον Δημήτρη, για την συνεχή ηθική και οικονομική συμπαράσταση κατά τη διάρκεια αυτών των ετών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Η ΒΙΤΑΜΙΝΗ D₃.....	31
1.1 Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D ₃	32
1.1.1. Η πρόδρομη μορφή της βιταμίνης D ₃	32
1.1.2. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της βιταμίνης D ₃	33
1.1.3. Μεταφορά της βιταμίνης D ₃	36
1.2 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D ₃	37
1.2.1. Ο υποδοχέας της βιταμίνης D ₃	37
1.2.2 Τρόπος δράσης του VDR.....	40
Μη μεταγραφική ρύθμιση.....	40
Μεταγραφική ρύθμιση – ετεροδιμερές VDR-RXR	42
1.3 Ανάλογα της βιταμίνης D ₃ - παρिकाλσιτόλη.	45
1.4 Στόχοι της βιταμίνης D ₃	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Η ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΝΕΦΡΟΥ	50
2.1. Ανατομία και φυσιολογία του νεφρού	50
2.1.1 Ανατομία του νεφρού	50
2.1.2. Τα ποδοκύτταρα.....	52
Δομή των ποδοκυττάρων.....	52
Πρωτεΐνες του διαφράγματος διήθησης.....	53
Νεφρίνη	54
CD2AP	54
Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες για τα ποδοκύτταρα	55
Ποδοκαλκίνη.....	55
WT1	55
2.1.3. Λειτουργία του νεφρού	56
2.2. Παθολογία του νεφρού	56
2.2.1. Χρόνια νεφρική νόσος	56
2.2.2. Αίτια νεφρικής δυσλειτουργίας	58
Διαβητική νεφροπάθεια	59

Παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας	60
Τα ποδοκύτταρα στην διαβητική νεφροπάθεια.....	61
2.2.3 Επιπτώσεις της χρόνιας νεφρικής νόσου στην υγεία των ασθενών	62
2.3. Ο ρόλος της βιταμίνης D στα ποδοκύτταρα	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΝΕΦΡΟ	66
3.1. Εισαγωγή	66
3.2. Δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων.....	66
3.3. Μεταβολισμός του PAF	67
3.3.1. De novo πορεία βιοσύνθεσης	68
Περιγραφή της πορείας.....	68
DTT–ανεξάρτητη CDP–χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση.....	69
3.3.2. Remodeling πορεία (Πορεία ανασχηματισμού)	71
Περιγραφή της πορείας.....	71
Ακετυλο-CoA:λυσω-PAF ακετυλοτρανσφεράση (EC 2.3.1.67).....	72
3.3.3. Η αποικοδόμηση του PAF	75
Περιγραφή της πορείας.....	75
PAF-ακετυλοϋδρολάση	75
3.4. Κύτταρα που συνθέτουν PAF	76
3.5. Δράσεις του PAF στα κύτταρα.....	76
3.6. Μηχανισμός δράσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	77
3.7. Η σημασία του PAF στην χρόνια νεφρική νόσο	78
3.9. Αναστολείς του PAF	80
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΚΟΠΟΣ	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83

5.1. Σχεδιασμός κλινικής μελέτης.....	83
5.2. Παραλαβή δειγμάτων αίματος και κυτταρική κλασμάτωση αίματος.....	83
5.3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	85
5.4. Ενζυμικές δοκιμασίες	86
5.4.1. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηριότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινοτρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT)	86
5.4.2. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηριότητας της 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (Λυσο-PAF AT).	88
5.4.3. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηριότητας της PAF ακετολουϊδρολάσης (PAF-AH).	89
5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός επιπέδων PAF	90
5.5.1. Εκχύλιση του PAF.....	90
5.5.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) λιποειδών	91
5.5.3. Μέτρηση της συγκέντρωσης του PAF με βιολογική δοκιμασία σε πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού- Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης <i>in vitro</i>	92
5.6. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών	96
5.7. Μέτρηση κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής	97
5.8. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της αδιπονεκτίνης	100
5.9. Καλλιέργεια και αναδιασπορά των ποδοκυττάρων	102
5.10. Κρυοκατάψυξη των κυττάρων.....	104
5.11. Διέγερση των κυττάρων	104
5.12. Λύση κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών.....	105
5.13. Κυτταρική κλασμάτωση	105
5.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανοσοαποτύπωση (αποτύπωση western).....	106
5.15. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	112

5.16.	Χρώση ακτίνης με φαλαντοΐνη	113
5.17.	Κυτταρομετρία ροής	114
5.18.	Πειραματόζωα	115
5.19.	Ανοσοϊστοχημική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.	115
5.20.	Ανοφθορισμός με φθορίζων αντίσωμα σε τομές ιστών	116
5.21.	Απομόνωση ολικού RNA.....	117
5.22.	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT)	119
5.23.	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	121
5.24.	Αντίδραση αποσιώπησης γονιδίου με διαμόλυνση των κυττάρων με παρεμβαλλόμενο RNA (Si-RNA-transfection)	124
5.25.	Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP).....	125
5.26.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	126
5.27.	Στατιστική ανάλυση	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 129

6.1.	In vitro μελέτη της αντιθρομβωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης.	129
6.2.	In vitro μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων του PAF.	130
6.2.1.	<i>In vitro</i> μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF.....	130
6.2.2.	<i>In vitro</i> μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην δραστικότητα του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF.	132
6.3.	In vivo μελέτη της δράσης της χορηγούμενης παρικαλσιτόλης σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς ως προς τη φλεγμονώδη κατατομή.....	133

6.3.1. Βιοχημική και λιπιδαιμική κατατομή αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης.....	133
6.3.2. Δραστικότητες των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF σε αιμοκαθαρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης.....	134
6.3.2.1. <i>In vivo</i> μελέτη της δράσης της παρिकाλσιτόλης ως προς ως την δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF.	134
6.3.2.2. <i>In vivo</i> μελέτη της δράσης της παρिकाλσιτόλης ως προς ως την δραστικότητα της PAF-AH	137
6.3.3. <i>In vivo</i> μελέτη των επιπέδων άλλων φλεγμονωδών παραγόντων.	138
6.4. <i>In vitro</i> μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος (HGEC).....	141
6.4.1. Φαινοτυπική παρατήρηση των HGEC σε οπτικό μικροσκόπιο.....	141
6.4.2. <i>In vitro</i> μελέτη της πιθανής τοξικότητας της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα HGEC.	142
6.5. <i>In vitro</i> μελέτη της δράσης του PAF ως προς την έκφραση της νεφρίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	143
6.6. <i>In vitro</i> μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης ως προς την έκφραση πρωτεϊνών του ηθμού διήθησης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.	144
6.6.1. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	144
6.6.2. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της CD2AP σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.	147
6.7. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.	148
6.8. Μελέτη της δράσης της παρिकाλσιτόλης στην οργάνωση της F-ακτίνης (πολυμερισμός) των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του σπειράματος....	153
6.9. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του WT1 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	154
6.10. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του VDR σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	155

6.11. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του RXR σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	160
6.12. In vitro μελέτη της σημασίας του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	163
6.12.1. In vitro μελέτη του ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη.....	163
6.12.2. In vitro μελέτη του ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη.	167
6.13. In vitro μελέτη της πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου της ποδοκαλκίνης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.....	172
6.13.1. Κατακερματισμός χρωματινής.....	172
6.13.2. In vitro μελέτη της πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου της ποδοκαλκίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη.....	173
6.14. In vivo μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος επίμυων.....	175
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	177
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	186
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	188
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	190

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 <i>In vitro</i> ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία της παρικαλσιτόλης.....	131
Σχήμα 2 <i>In vitro</i> ειδική δραστικότητα της λυσο-PAF-AT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία της παρικαλσιτόλης.....	131
Σχήμα 3 <i>In vitro</i> ειδική δραστικότητα της PAF-AH των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης.....	132
Σχήμα 4 <i>In vitro</i> ειδική δραστικότητα της PAF-AH των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης.	133
Σχήμα 5 <i>In vivo</i> ειδική δραστικότητα της PAF-CPT σε ομογενοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα.	135
Σχήμα 6 <i>In vivo</i> ειδική δραστικότητα της λυσο-PAF-AT σε ομογενοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα	136
Σχήμα 7 <i>In vivo</i> ειδική δραστικότητα της PAF-AH σε ομογενοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα	137
Σχήμα 8 <i>In vivo</i> ειδική δραστικότητα της PAF-AH σε ομογενοποίηση ερυθροκυττάρων και πλάσμα σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα	138

Σχήμα 9 Επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα αίματος φυσιολογικών μαρτύρων και αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα.....	139
Σχήμα 10 Συγκέντρωση IL-8, IL-1β και TNF-α στο πλάσμα αίματος αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα.....	140
Σχήμα 11 Συγκέντρωση IL-6 ΚΑΙ TNF-α στο πλάσμα αίματος φυσιολογικών μαρτύρων και αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα.....	141
Σχήμα 12 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης	143
Σχήμα 13 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης εκφρασμένα ως σχετική μεταβολή σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.....	144
Σχήμα 14 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης	146
Σχήμα 15 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα CD2AP	148
Σχήμα 16 Ολικά επίπεδα ποδοκαλκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη.....	149
Σχήμα 17 Ολικά επίπεδα ποδοκαλκίνης σε ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη	150
Σχήμα 18 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης	152
Σχήμα 19 Ολικά επίπεδα WT1 στα ποδοκύτταρα	155
Σχήμα 20 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR	157
Σχήμα 21 Κυτταροπλασματικά επίπεδα VDR.....	158

Σχήμα 22 Πυρηνικά επίπεδα VDR	159
Σχήμα 23 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RXR).....	162
Σχήμα 24 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	164
Σχήμα 25 Επίπεδα έκφρασης του mRNA του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	165
Σχήμα 26 Ολικά επίπεδα πρωτεΐνης της ποδοκαλκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	166
Σχήμα 27 Επίπεδα έκφρασης του mRNA της ποδοκαλκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.	167
Σχήμα 28 Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	168
Σχήμα 29 Επίπεδα έκφρασης του mRNA του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.	169
Σχήμα 30 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης.....	171
Σχήμα 31 Επίπεδα έκφρασης του mRNA της ποδοκαλκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.	172

Σχήμα 32 Επίπεδα έκφρασης mRNA του VDR, του DRIP, της ακετυλιωμένης ιστόνης (H4K8AC) και της πολυμεράσης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης 300nM εκφρασμένα ως επι τοις εκατό της ολικής χρωματίνης..... 174

Σχήμα 33 Επίπεδα έκφρασης mRNA του VDR, του DRIP, της ακετυλιωμένης ιστόνης (H4K8AC) και της πολυμεράσης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM λυκόζη απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης 300nM εκφρασμένα ως επι τοις εκατό της ολικής χρωματίνης..... 175

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Φωτοχημικά γεγονότα τα οποία οδηγούν στην παραγωγή και την ρύθμιση της βιταμίνης D ₃ στην επιδερμίδα.....	32
Εικόνα 2 Μονοπάτι ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της βιταμίνης D ₃	34
Εικόνα 3 Το γονίδιο και η πρωτεΐνης του ανθρώπινου VDR	38
Εικόνα 4 Ισομορφές του VDR	40
Εικόνα 5 Στερεοδιάταξη της 1α,25(OH) ₂ D ₃	41
Εικόνα 6 Μηχανισμός δράσης της βιταμίνης D ₃	44
Εικόνα 7 Παρικαλσιτόλη.....	46
Εικόνα 8 Θέση ανθρώπινων νεφρών και τα βασικά μέρη του νεφρού	50
Εικόνα 9 Νεφρώνας	51
Εικόνα 10 Σπείραμα και ποδοκύτταρα	52
Εικόνα 11 Ποδοκύτταρα και φραγμός διήθησης.....	53
Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων.	53
Εικόνα 13 Σχηματική αναπαράσταση ανάπτυξης διαβητικής νεφροπάθειας.....	60
Εικόνα 14 Χημική δομή του PAF	66
Εικόνα 15 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του PAF	68
Εικόνα 16 Αντίδραση που καταλύεται απο την PAF-CPT	69

Εικόνα 17 Αντίδραση που καταλύεται από την PAF-AT	72
Εικόνα 18 Αποικοδόμηση του PAF μέσω της δράσης της PAF-AH.....	75
Εικόνα 19 Σηματοδοτικά μονοπάτια του PAF	78
Εικόνα 20 Χρωματογραφική συμπεριφορά και τιμές RF προτύπων διαλυμάτων φωσφολιποειδών (PC, ΛΥΣΟ-PC, SM, PE), AAG και CDP-χολίνης σε silica G και σύστημα ανάπτυξης CHCl ₃ :MeOH:ACOH:H ₂ O (100:57:16:8, V/V/V/V)	92
Εικόνα 21 Αρχή μεθόδου βιολογικής μεθόδου προσδιορισμού του PAF.....	96
Εικόνα 22 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανάλυσης κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής.....	100
Εικόνα 23 Καμπύλη ενίσχυσης (φθορισμός ως προς αριθμό κύκλων) των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων.....	124
Εικόνα 24 Αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάλυσης της ειδικότητας του προϊόντος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (φθορισμός ως προς θερμοκρασία).124	
Εικόνα 25 Φωτογραφίες HGEC σε οπτικό μικροσκόπιο.....	142
Εικόνα 26 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά western της PARP και της τουμπουλίνης	143
Εικόνα 27 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της νεφρίνης.	145
Εικόνα 28 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης της νεφρίνης με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού.	147

Εικόνα 29 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western της CD2AP και της τουμπουλίνης.....	148
Εικόνα 30 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western της ποδοκαλυκίνης και της τουμπουλίνης	149
Εικόνα 31 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλυκίνης.....	151
Εικόνα 32 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης της ποδοκαλυκίνης με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	153
Εικόνα 33 Χρώση με φαλλοϊδίνη των νηματίων της ακτίνης (F-ακτίνη) στα HGEC αντιπροσωπευτικές εικόνες.....	154
Εικόνα 34 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western του WT1 και της τουμπουλίνης.....	155
Εικόνα 35 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western του VDR και της τουμπουλίνης.....	156
Εικόνα 36 Κυτταρική κατανομή VDR παρουσία και απουσία παρικαλσιπόλης ..	157
Εικόνα 37 Κυτταρική κατανομή VDR παρουσία και απουσία καλσιτριόλης	158
Εικόνα 38 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης του VDR με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	160
Εικόνα 39 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western του RXR και της τουμπουλίνης.....	161
Εικόνα 40 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης του RXR και του VDR με την τεχνική του διπλού έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	162

Εικόνα 41 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western της ποδοκαλυκίνης, του VDR και της τουμπουλίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	164
Εικόνα 42 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατα western του VDR και της τουμπουλίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR.....	168
Εικόνα 43 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλυκίνης.....	169
Εικόνα 44 Κατακερματισμένη χρωματίνη	173
Εικόνα 45 Χρώση με αιματοξυλίνη – ηωσίνη των νεφρικών τομών απο φυσιολογικούς επίμυς (Α) και απο διαβητικούς επίμυς (Β).....	176
Εικόνα 46 Χρώση με αιματοξυλίνη – ηωσίνη των νεφρικών τομών απο φυσιολογικούς επίμυς (Α) και απο διαβητικούς επίμυς (Β).....	176
Εικόνα 47 Ανοσοϊστοχημική χρώση νεφρικών τομών για τον υποδοχέα της βιταμίνης D (πράσινο) και του μεταγραφικού παράγοντα WT1(κόκκινο).	176

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Κύρια μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D ₃	35
Πίνακας 2 Ιστοί/ κύτταρα και γονίδια στόχοι της βιταμίνης D ₃	48
Πίνακας 3 Στάδια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας	57
Πίνακας 4 Ενεργοποιητές και αναστολείς του ενζύμου Λύσο-PAF-AT	74
Πίνακας 5 Κύτταρα και ιστοί που παράγουν PAF	76
Πίνακας 6 Βιολογικές δράσεις PAF	77
Πίνακας 7 Συγκεντρώσεις προτύπων καμπύλης αναφοράς για μέτρηση κυτταροκινών με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.....	98
Πίνακας 8 Αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων	121
Πίνακας 9 Συνθήκες αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου	123
Πίνακας 10 Επίδραση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στην επαγόμενη από PAF και θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.	130
Πίνακας 11 Βιοχημική και λιπιδαιμική κατατομή αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση 2 μg/μέρα παρικαλσιτόλης για ένα μήνα	134
Πίνακας 12 Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων ορων	186

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κ.Α. Δημόπουλου και στο Ινστιτούτο Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Α' κ. Ε. Τσιλιμπάρη. Επιπλέον χρηματοδοτήθηκε από τον ειδικό λογαριασμό κονδυλίων έρευνας (ΕΛΚΕ) και την Abbott Ελλάς (νυν AbbVie).

A. Θεωρητικό Μέρος

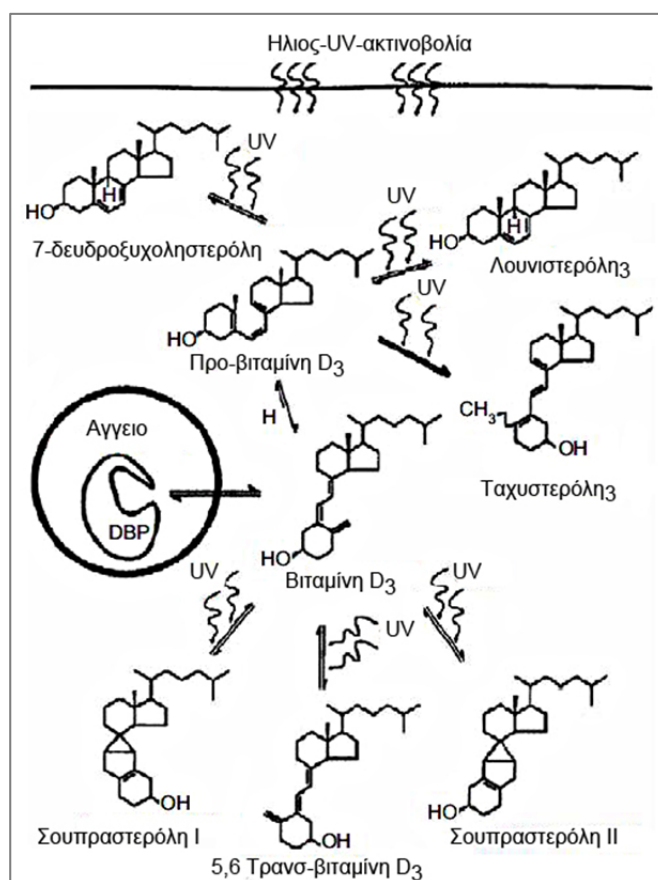
A. Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1 Η βιταμίνη D₃

1.1 Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D₃

1.1.1. Η πρόδρομη μορφή της βιταμίνης D₃

Η φωτο-σύνθεση της βιταμίνης D₃ ξεκινά με την φωτόλυση της 7-δευδροξυχοληστερόλης (προ-προ-βιταμίνη D₃- άμεσος πρόδρομος της χοληστερόλης). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στα ανώτερα στρώματα της ανθρώπινης επιδερμίδας κατά την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.



Εικόνα 1 Φωτοχημικά γεγονότα τα οποία οδηγούν στην παραγωγή και την ρύθμιση της βιταμίνης D₃ στην επιδερμίδα.^[1]

Αναλυτικότερα τα φωτόνια της υπέρυθρης ακτινοβολίας με μήκος κύματος 290-315 nm καταλύουν την φωτόλυση σχηματίζοντας την πρόδρομη μορφή της βιταμίνης D₃ [2]. Η φωτοχημική αυτή αντίδραση πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη των επιδερμικών κυττάρων και είναι αποτέλεσμα της θερμοδυναμικής αστάθειας των cis ισομορφών. Οι cis ισομορφές της προ-βιταμίνης D₃ μετασχηματίζονται γρήγορα αναδιοργανώνοντας τους διπλούς

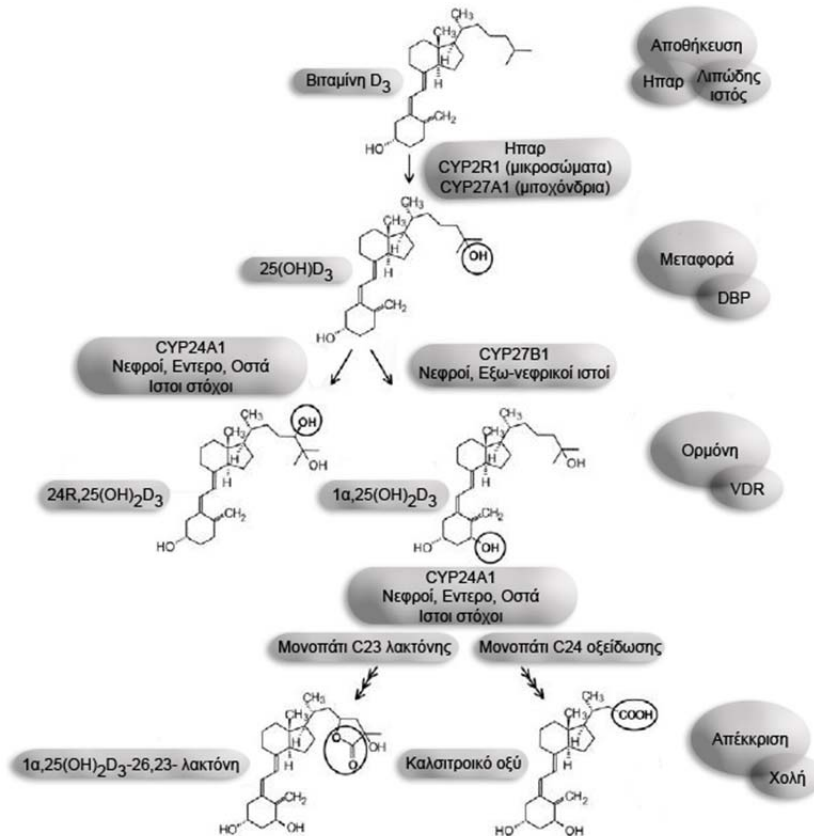
δεσμούς τους έτσι ώστε να σχηματίσουν την βιταμίνη D₃ [3]. Περίπου το 50% της προ-βιταμίνης D₃ μετασχηματίζεται σε βιταμίνη D₃ εντός δυο ωρών. Μετά τον σχηματισμό της βιταμίνης D₃ λόγω της ανοιχτής και ευέλικτης δομής της είναι πιθανό να αποχωριστεί από την πλασματική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο.

Μόλις η βιταμίνη D₃ εισέρθει στο χώρο του εξωκυττάρου υγρού, έλκεται από την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D₃ (vitamin D binding protein-DBP) η οποία βρίσκεται στην κυκλοφορία με την οποία προσδένεται και έτσι μπαίνει στα τριχοειδή του δέρματος. Επιπλέον, μετά τον σχηματισμό της η βιταμίνη D₃ είτε μπαίνει στην κυκλοφορία ή μπορεί να απορροφήσει επιπλέον φωτόνια της υπέρυθρης ακτινοβολίας και να ισομερειωθεί προς τουλάχιστον άλλα τρία φωτοπαράγωγα: σουπρασστερόλη I, II (suprasterol) και 5,6-τρανς-βιταμίνη D₃ [4]. Συνεπώς η ηλιακή ακτινοβολία μέσω της φωτοαποικοδόμησης της προ-βιταμίνης D₃ και της βιταμίνης D₃ αποτελεί ρυθμιστή της συνολικής παραγωγής της βιταμίνης D₃ στην επιδερμίδα. Ο ρυθμιστικός αυτός μηχανισμός ευθύνεται για το γεγονός ότι δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δηλητηρίασης από υπερασβεσταιμία εξαιτίας της βιταμίνης D₃ λόγω χρόνια έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

1.1.2. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της βιταμίνης D₃

Η βιταμίνη D₃ που συντίθεται στην επιδερμίδα χάρις την υπεριώδη ακτινοβολία ή λαμβάνεται μέσω της διατροφής αποθηκεύεται στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό. Το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης είναι η 25-υδροξυλίωση η οποία πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και καταλύεται από την 25-υδροξυλάση. Σύμφωνα με μελέτες των τελευταίων τεσσάρων δεκαετιών τόσο σε ανθρώπους όσο και σε διάφορα είδη ζώων, ως 25-υδροξυλάση της βιταμίνης D₃ αναφέρονται ορισμένα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYPs): CYP2R1, CYP27A1, CYP3A4, CYP2D25 τα οποία προκαλούν 25-υδροξυλίωση της βιταμίνης D₃ ή συναφών ενώσεων. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 κατηγοριοποιούνται σε μικροσωματικά ή μιτοχονδριακά. Η υδροξυλίωση του άνθρακα 25 στο ήπαρ πραγματοποιείται [5] με την διαμεσολάβηση της μικροσωματιδικής CYP2R1 (υψηλή εξιδίκευση, χαμηλή δραστηριότητα) ή με την διαμεσολάβηση της μιτοχονδριακής CYP27A1 (υψηλή δραστηριότητα, χαμηλή

εξιδίκευση). Ωστόσο η CYP2R1 αποτελεί το κυριότερο φυσιολογικά σχετιζόμενο ένζυμο [6]. Η 25(OH)D₃ μεταφέρεται από το ήπαρ στους νεφρούς από την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D (DBP, γνωστή και ως Gc πρωτεΐνη) όπου ενδοκυττώνεται από τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου μέσω της κουμπιλίνης η οποία είναι εξαρτώμενη από την μεγαλίνη [7].



Εικόνα 2 Μονοπάτι ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της βιταμίνης D₃.

Η ενεργοποίηση ολοκληρώνεται κυρίως στα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου μέσω της 1α-υδροξυλάσης, η οποία παράγει την ενεργή seco-στεροειδής ορμόνη, 1α,25(OH)₂D₃ [8]. Ωστόσο αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα και σε άλλους ιστούς όπως ο μαστός, τα οστά, η επιδερμίδα κ.α. [9-11]. Η 1α-υδροξυλίωση επιτυγχάνεται χάρις στην ενζυμική δράση της 25(OH)D₃-1α-υδροξυλάσης η οποία υπάρχει στο κυτόχρωμα P450 και ονομάζεται CYP27B1 [12,13]. Η 1α-υδροξυλάση αποτελεί ρυθμιστή των επιπέδων της 1α,25(OH)₂D₃.

Η απενεργοποίηση της 1α,25(OH)₂D₃ πραγματοποιείται κυρίως από την 24-υδροξυλάση, CYP24A1. Το CYP24A1 είναι ένα μιτοχονδριακό ενδομεμβρανικό κυτοχρωμικό P450 ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί την αδρενοδοξίνη ένα σιδηρο-

θειουχο διαλυτό ένζυμο και την αναγωγή της αδρενοδοξίνης για την μεταφορά ηλεκτρονίων στο κέντρο της αίμης μέσω NADPH.

Ο καταβολισμός της 1,25(OH)₂D₃ που πραγματοποιείται μέσω της CYP24A1 περιλαμβάνει τροποποιήσεις στις αλειφατικές πλευρικής αλυσίδες των στεροειδών. Η απενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς διαδοχικών υδροξυλίσεων και αντιδράσεων οξείδωσης οπότε τελικά σχηματίζεται είτε το καλσιτροϊκό οξύ, το οποίο απεκκρίνεται δια του χολικού οξέος είτε η 1α,25(OH)₂D₃-26,23-λακτόνη, η οποία είναι ένας ασθενής ανταγωνιστής του VDR. Ωστόσο τα κύρια υποστρώματα για την CYP24A1 είναι η 25(OH)D₃ και η 1,25(OH)₂D₃. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζεται ο μεταβολίτης 24,25(OH)₂D₃ που κυκλοφορεί στο αίμα. Στην δεύτερη περίπτωση το αρχικό ενζυμικό προϊόν είναι η 1,24,25(OH)₃D₃, το οποίο ωστόσο έχει μικρό χρόνο ζωής. Η CYP24A1 μπορεί να υδροξυλιώνει τόσο τον άνθρακα C-23 όσο και τον άνθρακα C-24 των 25(OH)D₃ και 1,25(OH)₂D₃. Η υδροξυλίωση στον άνθρακα C-24 οδηγεί σε διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας και οξείδωση προς καρβοξυλικό οξύ, ενώ η υδροξυλίωση στον άνθρακα C-23 οδηγεί στον σχηματισμό λακτόνης στην πλευρική αλυσίδα.

Η ενεργή βιταμίνη D₃ (1,25(OH)₂D₃) στους ιστούς στόχους προκαλεί την αύξηση της έκφρασης του ενζύμου CYP24A1. Η αύξηση των επιπέδων αυτού του ενζύμου αποτελεί ένα κλασσικό παράδειγμα ενδοκρινούς αρνητικής ρύθμισης μέσω μεταγραφής από τον υποδοχέα της βιταμίνης D₃. Η αύξηση των επιπέδων του ενζύμου CYP24A1 μειώνει την συγκέντρωση της 1,25(OH)₂D₃, οδηγώντας έτσι στην εξασθένηση των βιολογικών δράσεων της εντός των κυττάρων στόχων.

Στον πίνακα 1 φαίνονται τα ένζυμα ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της βιταμίνης D₃.

Πίνακας 1 Κύρια μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D₃^[14-18]

P450	Είδος	Ιστός	Υποκυτταρική θέση	Δραστητικότητα
CYP2R1	Άνθρωπος	Ήπαρ	Μικροσώματα	25-υδροξυλάση D ₃
CYP27A1	Άνθρωπος	Ήπαρ Μακροφάγα	Μιτοχόνδρια	25-υδροξυλάση D ₃
CYP2C11	Επίμυς	Ήπαρ	Μικροσώματα	25-υδροξυλάση D ₃
CYP2D25	Χοίρος	Ήπαρ	Μικροσώματα	25-υδροξυλάση D ₃

CYP3A4	Άνθρωπος	Ήπαρ	Μικροσώματα	25-υδροξυλάση D ₂
CYP27B1	Άνθρωπος	Νεφροί	Μικροσώματα	1α-υδροξυλάση D ₃
CYP24A1	Άνθρωπος		Μιτοχόνδρια	23- ή 24-υδροξυλάση του 25(OH)D ₃ /1,25(OH) ₂ D ₃

1.1.3. Μεταφορά της βιταμίνης D₃

Η βιταμίνη D₃ μπορεί να μεταφερθεί μέσα στα κύτταρα με δυο τρόπους είτε διαπερνά τις μεμβράνες ως λιποδιαλυτή ένωση είτε περνά μέσα στα κύτταρα διαμέσου της DBP πρωτεΐνης [19].

Η DBP είναι μια άλφα 1-σφαιρίνη η οποία δρα ως πρωτεΐνη μεταφοράς για όλους τους μεταβολίτες της βιταμίνης D₃ και βρίσκεται στον ορό. Η παρουσία της DBP περιορίζει την άμεση πρόσβαση της 25(OH)D₃ και 1,25(OH)₂D₃ σε κύτταρα και παρατείνει το χρόνο ημίσειας ζωής αυτών των μεταβολιτών στον ορό. Η DBP λειτουργεί ως αποθήκη αποτρέποντας την αποικοδόμηση τους. Η παρουσία του υποδοχέα της DBP στα κύτταρα του εσπειραμένου σωληναρίου διευκολύνει την πρόσβαση της 25(OH)D₃ στους νεφρούς, ωστόσο είναι ακόμα ασαφής ο ρόλος της DBP στην μεταφορά της 25(OH)D₃ σε άλλους ιστούς. Η πλειονότητα των δεδομένων υποστηρίζουν όμως ότι μόνο η ελεύθερη 25(OH)D₃ και 1,25(OH)₂D₃, έχουν άμεση πρόσβαση στο πυρηνικό υποδοχέα.

Η DBP που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς καθώς μεταφέρει πάνω από 95% και πιθανώς ακόμη και το 99% της 25(OH)D₃. Εκτός από την DBP, η αλβουμίνη και οι λιποπρωτεΐνες έχουν μικρή μεταφορική ικανότητα των μεταβολιτών της βιταμίνης D₃ παρόλο που βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ορό σε σχέση με την DBP. Με βάση τα πειράματα για την ανταγωνιστική πρόσδεση και την κρυσταλλική δομή της ολο-πρωτεΐνης (DBP μαζί με 25(OH)D₃ ή τα ανάλογά της) είναι σαφές ότι υπάρχει μόνο ένα σημείο σύνδεσης στην DBP για όλους τους μεταβολίτες της βιταμίνης D₃.

Η συγγένεια της DBP για αυτούς τους μεταβολίτες όμως είναι αρκετά διαφορετική. Την υψηλότερη συγγένεια την εμφανίζει για τις 25(OH)D₃ λακτόνες, ακολουθούμενη από την 25(OH)D₃ και τους μεταβολίτες του καταβολισμού, όπως 24,25- και 25,26-διυδροξυβιταμίνη D₃, ενώ η 1,25(OH)₂D₃ έχει περίπου 10-100 φορές χαμηλότερη συγγένεια για την DBP από ότι η 25(OH)D₃. Αυτές οι διαφορές

στην συγγένεια μπορούν να εξηγηθούν εάν εξεταστεί προσεκτικά η δομή της περιοχής πρόσδεσης πάνω στην DBP πρωτεΐνη.

Η μεταφορά της 25(OH)D₃ και 1α,25(OH)₂D₃ στον ορό είναι παρόμοια με αυτή άλλων στεροειδών ή θυρεοειδικών ορμονών. Η κυτταρική είσοδος της 25(OH)D₃ στους περισσότερους ιστούς-στόχους μειώνεται με την παρουσία του ορού ή της DBP πρωτεΐνης. Αυτό έχει αποδειχθεί σαφώς σε *in vitro* πειράματα με μονοκύτταρα και στα κερατινοκύτταρα. Η βιολογική δράση ήταν πολύ μεγαλύτερη όταν τα μονοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού από DBP-null ποντίκια σε σχέση με την παρουσία φυσιολογικού ορού ή DBP-εμπλουτισμένου υλικού καλλιέργειας [20]. Στα μονοκύτταρα πρόσληψη των DBP δεν μεσολαβείτε από την μεγαλίνη. Στα καλλιεργημένα κύτταρα των νεφρών η παρουσία της DBP μειώνει την παραγωγή της 1,25(OH)₂D₃. Αυτό το φαινόμενο μπορεί εύκολα να εξηγηθεί λόγω της υψηλής συγγένειας της 25(OH)D₃ για την εξωκυττάρια DBP και της πολύ χαμηλότερης συγγένειας για τον ενδοκυττάριο VDR, με αποτέλεσμα την αργή εισαγωγή της 25(OH)D στα κύτταρα. Ο παραπάνω μηχανισμός επιβεβαιώνεται και από *in vivo* μελέτες. Η εξήγηση της πρόσδεσης της 1,25(OH)₂D₃ είναι πιο περίπλοκη σε σχέση με την 25(OH)D₃. Η προσθήκη πρωτεϊνών ορού ή καθαρού DBP σε κυτταροκαλλιέργειες μειώνει σαφώς τις βιολογικές δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ όπως την μεταγραφή των γονιδίων ή τις κυτταρικές λειτουργίες. Ωστόσο, η συγγένεια του ενδοκυτταρικού VDR για την 1,25(OH)₂D₃ μορφή υπερβαίνει κατά πολύ τη συγγένεια της DBP για την 1,25(OH)₂D₃, οπότε με την πάροδο του χρόνου είναι πιθανό να πραγματοποιείται μια ευνοϊκή μεταφορά από τον εξωκυττάριο προς τον ενδοκυττάριο χώρο. Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί και μια πιθανή εξήγηση της διαφορετικής κατανομή της 1α,25(OH)₂D₃ και της 25(OH)D₃.

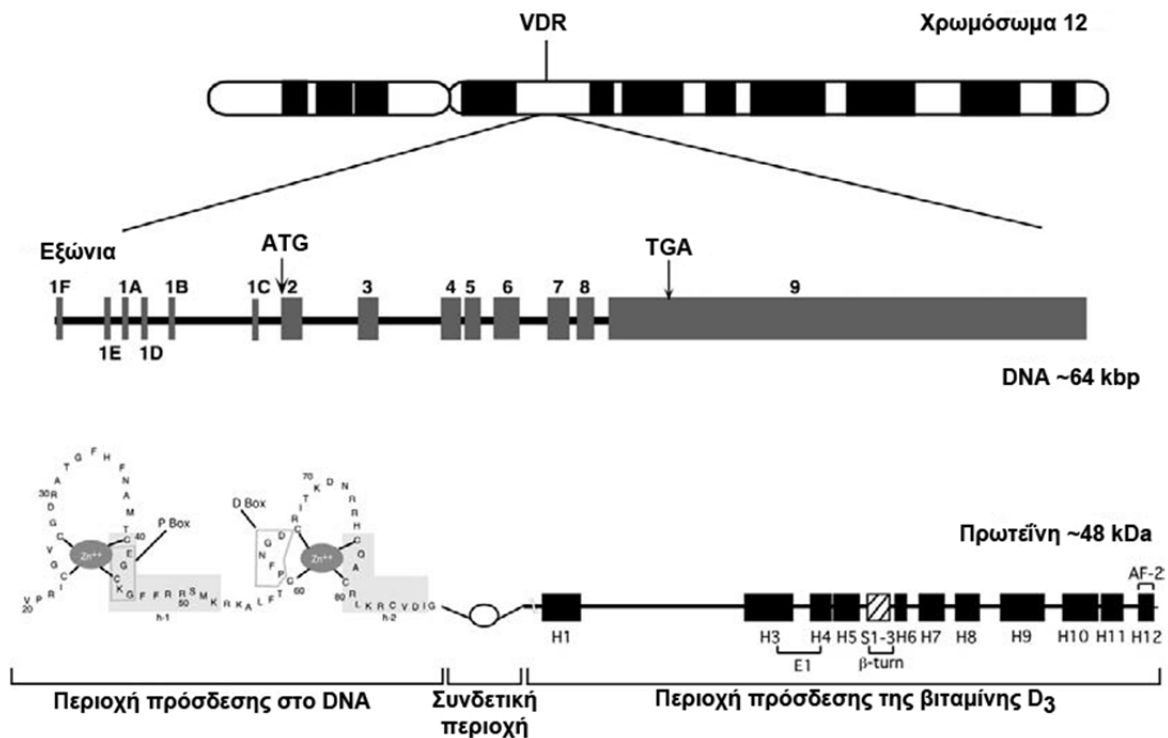
1.2 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D₃

1.2.1. Ο υποδοχέας της βιταμίνης D₃

Η ενεργή βιταμίνη D₃ (1,25(OH)₂D₃) μεταφέρεται στους νεφρούς, το έντερο, τα οστά και σε άλλους ιστούς οι οποίοι αποτελούν στόχους της βιταμίνης D₃ (1,25(OH)₂D₃). Έπειτα η 1,25(OH)₂D₃ στα κύτταρα στόχους συνδέεται με τον υποδοχέα της – VDR (vitamin D receptor). Ο υποδοχέας της 1,25(OH)₂D₃ είναι μέλος της υπερικογένειας των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, της

οποίας μέλη είναι οι υποδοχείς των ορμονών του θυρεοειδούς, του all-trans ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor –RAR), των οιστρογόνων, των γλυκοκορτικοειδών, του 9-cis ρετινοϊκού οξέος (retinoid X receptor – RXR) και άλλοι [21]. Ο VDR ασκεί τις εξαρτώμενες από την 1α,25(OH)₂D₃ ενδοπυρηνικές δράσεις του ως ενεργοποιημένος μεταγραφικός παράγοντας [21]. Επιπλέον, ο υποδοχέας της βιταμίνης D₃ ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων με τρόπο που εξαρτάται από τον προσδέτη [22] (εικόνα 4). Πέραν όμως από τις γενωμικές δράσεις του οι οποίες είναι σχετικά αργές (ώρες έως μέρες), η 1α,25(OH)₂D₃ μπορεί να έχει και πιο γρήγορες δράσεις (λεπτά έως ώρες). Πολλές από αυτές τις γρήγορες δράσεις προκύπτουν από την πρόσδεση της 1α,25(OH)₂D₃ στον υποδοχέα ο οποίος είναι προσδεδεμένος στην μεμβράνη [23-25].

Το ανθρώπινο γονίδιο του VDR (εικόνα 3) υπάρχει στο χρωμόσωμα 12q και αποτελείται από τον υποκινητή και τις ρυθμιστικές περιοχές. Τα εξώνια 2–9 του VDR κωδικοποιούν τις 6 δομικές περιοχές της πρωτεΐνης του [26]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι διαφοροποιήσεις στο N-τελικό άκρο του VDR σχετίζονται με την εξειδικευμένη έκφραση του στους διάφορους ιστούς [27,28]. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορετική ρύθμιση.

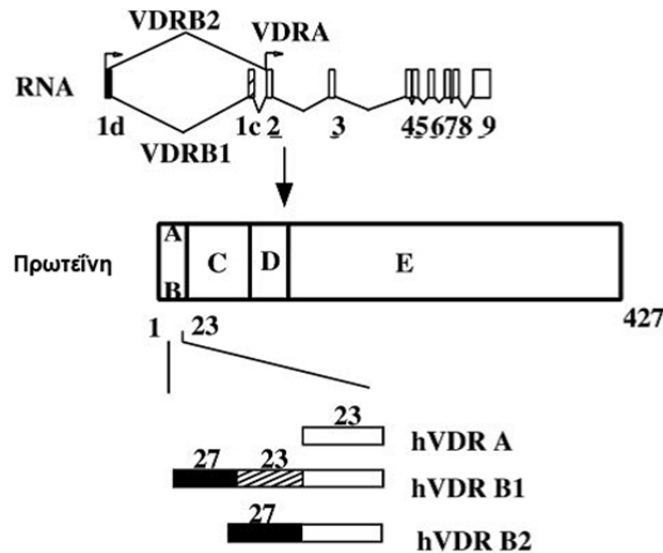


Εικόνα 3 Το γονίδιο και η πρωτεΐνη του ανθρώπινου VDR^[29]

Η επισήμανση της 1,25(OH)₂D₃ σε συνδυασμό με την βιοδιαθεσιμότητα της βοήθησαν στην ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα της σε διάφορους ιστούς. Η έκφραση του VDR είναι ιδιαίτερα υψηλή στο έντερο [30] αλλά εκφράζεται και σε μεγάλη ποσότητα στα οστά, στους νεφρούς και στα κύτταρα των παραθυρεοειδών αδένων [31-36]. Επιπλέον, ο υποδοχέας της βιταμίνης D₃ εκφράζεται στο πάγκρεας [32,37], τον πλακούντα [32], τον βλεννογόνο ιστό [32,38], τις ωοθήκες [39], τους όρχεις [40], τον μαστικό αδένα [41,42], την καρδιά [43] αλλά και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα T κύτταρα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης των κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) [44].

Πρόσφατα, με την χρήση αντισωμάτων υψηλής εξειδίκευσης και ευαισθησίας για τον VDR μελετήθηκε η παρουσία και κατανομή του VDR στους νεφρούς ποντικού. Τα αποτελέσματά αυτής της μελέτης έδειξαν ότι ο VDR εκτός από τα άπω εσπειραμένα σωληνάρια βρίσκεται επίσης στα εγγύς σωληνάρια, ωστόσο η έκφρασή του είναι περίπου 24 φορές χαμηλότερη. Ο VDR βρέθηκε επίσης στην macula densa του εξω-σπειραματικού χώρου, στα parietal σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα. Ο VDR όμως είναι σε μικρή ποσότητα ή είναι ανύπαρκτος στους ενδιάμεσους ινοβλάστες, στα μεσαγγειακά κύτταρα και στα juxtaglomerular κύτταρα. Έτσι, ο προσδιορισμός του VDR στο εγγύς σωληνάριο, στα macula densa του εξω-σπειραματικού χώρου και τα ποδοκύτταρα δείχνει ότι η 1,25(OH)₂D₃ παίζει άμεσο ρόλο σε αυτά τα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες [45].

Ο VDR έχει πολύ μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης (περίπου 100 φορές) με την 1,25(OH)₂D₃ σε σχέση με την 25(OH)D₃ στους ανθρώπους, τα τρωκτικά και τα πτηνά. Κατά συνέπεια, ο VDR εμφανίζει μια σταθερά δέσμευσης περίπου 10⁻¹⁰ M για την ενεργή βιταμίνη D (1,25(OH)₂D₃) ενώ δεσμεύει πρόδρομες μορφές της ενεργής βιταμίνης D₃ καθώς και λιγότερο ενεργούς μεταβολίτες με σημαντικά χαμηλότερη ικανότητα [46,47].



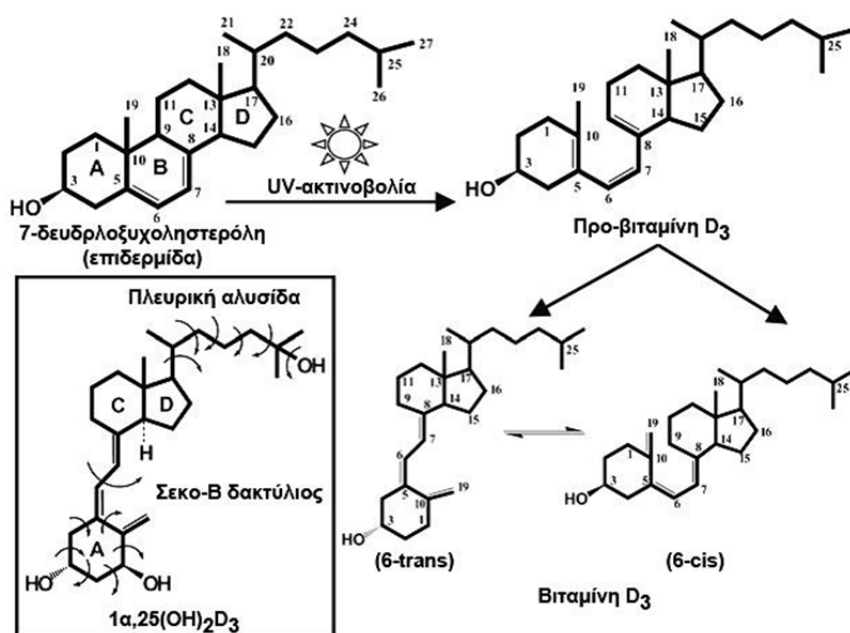
Εικόνα 4 Ισομορφές του VDR^[28]

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ανθρώπινος VDR μπορεί να αποτελείται από τρεις ισομορφές. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη του VDR περιέχει 427 ή 424 αμινοξέα, ανάλογα με την παρουσία του πολυμορφισμού T ή C (ATG αντι ACG), σε ένα σημείο έναρξης της μετάφρασης [48,49]. Ωστόσο με εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 1D οδηγεί στον σχηματισμό μεγαλύτερων ισομορφών 450 και 477 αμινοξέων [27,28,50].

1.2.2 Τρόπος δράσης του VDR.

Μη μεταγραφική ρύθμιση

Οι δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ μπορεί να περιλαμβάνουν την μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων ή την ενεργοποίηση μη μεταγραφικών μονοπατιών. Σαφής εξήγηση για την ενεργοποίηση του ενός ή του άλλου μονοπατιού δεν υπάρχει. Είναι γνωστό ότι η 1α,25(OH)₂D₃ μπορεί να υπάρχει με δυο διαφορετικές στερεοειδικές διαμορφώσεις. Το 6-s-cis διαμορφωμερές του υποδοχέα ευνοεί την ενεργοποίηση του μη γενωμικού μονοπατιού, ενώ το 6-trans διαμορφωμερές ευνοεί κατά προτίμηση την ενεργοποίηση του γενωμικού μονοπατιού [51]. Ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν η ενεργοποίηση των διαφορετικών μονοπατιών οφείλεται στην δέσμευση της 1α,25(OH)₂D₃ σε δομικά διαφορετικούς VDR που εντοπίζεται στον πυρήνα και την κυτταρική μεμβράνη, ή στην δέσμευση της 1α,25(OH)₂D₃ σε διαφορετικά σημεία πρόσδεσης στο ίδιο μόριο VDR.



Εικόνα 5 Στερεοδιάταξη της 1α,25(OH)₂D₃

Οι μη μεταγραφικές δράσεις της βιταμίνης D₃ είναι γρήγορες και δεν συμπεριλαμβάνουν την άμεση εμπλοκή της μεταγραφικής ρύθμισης. Ωστόσο η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να επηρεάσει την μεταγραφή δια μέσου συνομιλούντων μονοπατιών [52,53]. Παρόλο που δεν υπάρχει μια κοινά αποδεκτή άποψη για το πώς ξεκινάνε οι μη μεταγραφικές δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ υπάρχουν δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι ξεκινούν από την κυτταρική μεμβράνη. Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν ο μεμβρανικός υποδοχέας του VDR [54] και μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με στεροειδή ορμόνες και είναι υπεύθυνη για τις γρήγορες αποκρίσεις τους (membrane-associated rapidresponse steroid binding protein- MARRS) [55]. Το αρχικό σήμα στην συνέχεια ενισχύεται από την παραγωγή δευτερογενών αγγελιαφόρων μορίων συμπεριλαμβανομένων της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και διακυλογλυκερόλης στην πλασματική μεμβράνη από φωσφολιπάση C, την 3-κινάση της φωσφοινοσιτόλης [56], την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, την παραγωγή του cAMP [57] και η ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAPK [58-60]. Οι μη μεταγραφικές δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ περιλαμβάνουν την απορρόφηση ασβεστίου στο έντερο [51,61], την αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β- κύτταρα [62,63], την διαμόρφωση της ανάπτυξης του χόνδρου [64], την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των λείων μυϊκών

κυττάρων των αγγείων [56] και των κερατινοκυττάρων [65], την διάνοιξη των καναλιών ασβεστίου και χλωρίου στους οστεοβλάστες [66].

Μεταγραφική ρύθμιση – ετεροδιμερές VDR-RXR

Παρόλα αυτά πιο καλά μελετημένο σύστημα είναι η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων διαμέσου του VDR. Η 1,25(OH)₂D₃ στα κύτταρα στόχους συνδέεται με τον VDR ο οποίος ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RXR) και ρυθμίζουν την έκφραση 200-800 γονιδίων.

Ο RXR ενεργοποιείται με την πρόσδεση του ρετινοϊκού οξέος δηλαδή του μεταβολίτη της βιταμίνης A (9-cis-retinoic acid – 9cRA). Στην περίπτωση απουσίας του συνδέτη, ο RXR σχηματίζει υψηλής πρόσδεσης ομοτετραμερή. Τα ομοτετραμερή δεν επάγουν την μεταγραφή αλλά γρήγορα διασπώνται μετά την πρόσδεση του ρετινοϊκού οξέος [67-69]. Ως εκ τούτου, τα ομοτετραμερή φαίνεται να λειτουργούν ως ένα τρόπος αποθήκευσης του ανενεργού RXR, ο οποίος απελευθερώνεται και ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του ρετινοϊκού οξέος. Ωστόσο πρόσφατα έχει προταθεί μια ακόμα σημασία για αυτά τα ομοτετραμερή παρατηρήθηκε ότι πιθανόν να ενεργούν ως αρχιτεκτονικά στοιχεία του DNA. Έχει λοιπόν προταθεί ότι η πρόσδεση των ομοτετραμερών του RXR σε υποκινητή, που περιέχει δύο περιοχές πρόσδεσης του RXR, οδηγεί σε μια δραματική αναδίπλωση του DNA, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφική ρύθμιση από παράγοντες που βρίσκονται μακριά από την περιοχή των γονιδίων-στόχων [70]. Ως εκ τούτου, μέσω της διαφοροποίησης της στερεοδιάταξης του DNA, τα τετραμερή του RXR μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων με τρόπο που να εξαρτάται από το ρετινοϊκό οξύ αλλά είναι ανεξάρτητος από τον ενδογενή μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα του [70]. Ενώ ο RXR ως ομοδιμερές μπορεί να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας [71,72], αυτός ο υποδοχέας αποτελεί επίσης έναν σημαντικό συνεργάτη για τον διμερισμό με πολλούς άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας των θυρεοειδικών ορμονών και ο υποδοχέας της βιταμίνης D₃. Αναφέρθηκε επίσης ότι η σύνδεση τους προσδέτη στον RXR σταθεροποιεί τα ομοδιμερή και αναστέλλει τη σύνδεση του με τους άλλους υποδοχείς όπως RAR και VDR εμποδίζοντας τον σχηματισμό ετεροδιμερών [71,73]. Όμως βρέθηκε ότι μετά την σύνδεση των προσδετών του RAR ή του VDR αντίστοιχα μπορεί να ξεπεραστεί αυτή η παρεμπόδιση των

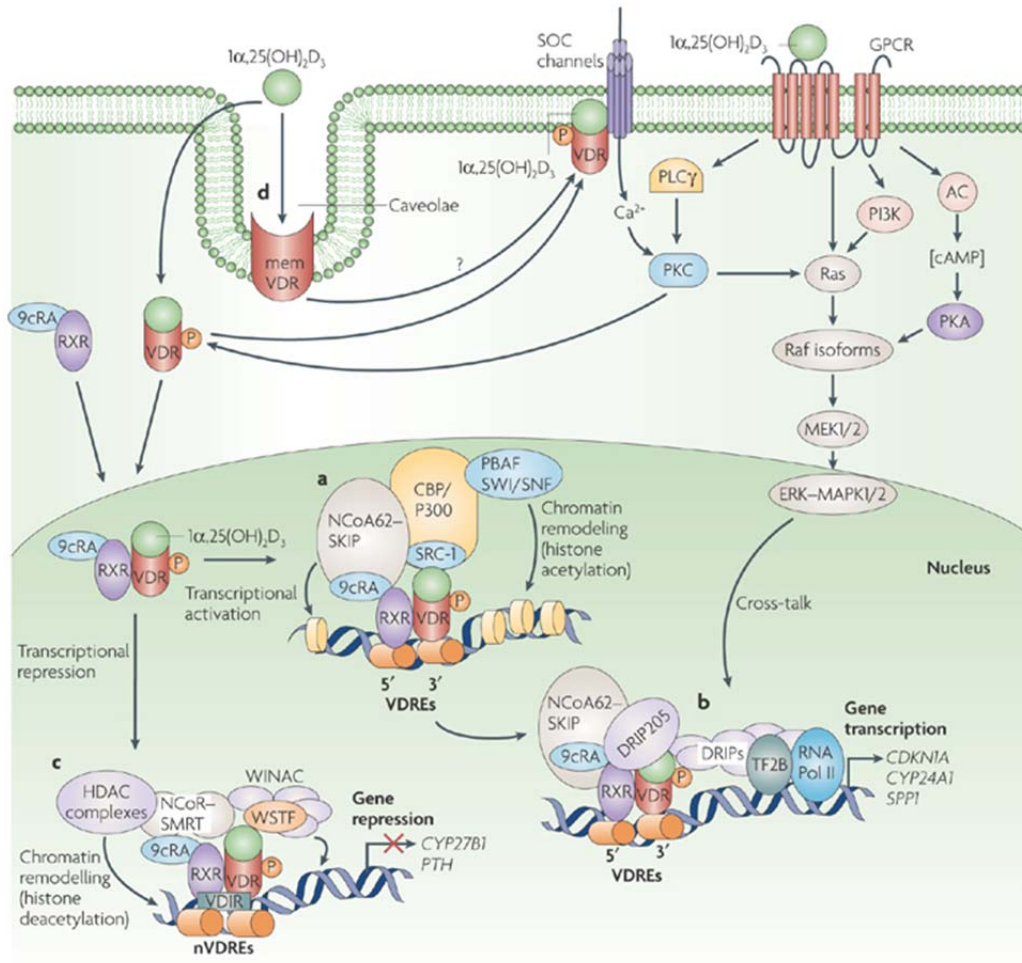
ετεροδιμερών και τελικά να σταθεροποιηθούν τα αντίστοιχα ετεροδιμερή ακόμη και υπό την παρουσία του ρετινοϊκού οξέος. Οπότε η ύπαρξη των ετεροδιμερών είναι μέγιστη όταν υπάρχει ταυτόχρονη παρουσία τόσο του ρετινοϊκού οξέος, το οποίο βοηθά στο να διαχωριστούν τα τετραμερή του RXR, όσο και παρουσία του υποκαταστάτη για τον έτερο πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος σταθεροποιεί τελικά το ετεροδιμερές [73,74]. Έτσι η μεταγραφική ικανότητα του συμπλέγματος του VDR διαμορφώνεται από την παράλληλη δέσμευση της ενεργής βιταμίνης D και τον διμερισμό του με τον RXR. Το ετεροδιμερές VDR-RXR είναι υπεύθυνο για την μεταγραφή, στο ετεροδιμερές αυτό ο RXR προσδένεται στο 5-άκρο και ο VDR στο 3-άκρο των στοιχείων απόκρισης της βιταμίνης D (VDREs) στην αλυσίδα του DNA.

Έχει αναφερθεί ότι ορισμένοι υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των RXR και RAR, είναι συνήθως πυρηνικοί [75,76]. Από την άλλη πλευρά, η πυρηνική μετατόπιση άλλων υποδοχέων φαίνεται να είναι ένα ρυθμιζόμενο γεγονός. Ο VDR φαίνεται να κατανέμεται μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα απουσία του προσδέτη του, και να υφίστανται πυρηνική μετατόπιση μετά την δέσμευση του προσδέτη [77,78]. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η πυρηνική μετατόπιση του VDR, προωθείται από την παρουσία του RXR, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία περιλαμβάνει ετεροδιμερή RXR-VDR [78,79].

Έχει φανεί ότι ο RXR και ο VDR μετατοπίζονται στον πυρήνα μέσω διαφορετικών οδών, ο RXR επιλεκτικά συνδέεται με την ιμφορτίνη-β, ενώ ο VDR συνδέεται με την ιμφορτίνη-α. Ωστόσο, όταν απουσιάζει η 1,25(OH)₂D₃, τότε ο VDR αλληλεπιδρά ασθενώς με την ιμφορτίνη-α, και η αλληλεπίδραση αυτή ενισχύεται σημαντικά με την παρουσία της 1,25(OH)₂D₃. Σε αντίθεση, ο RXR συνδέεται δυνατά με την ιμφορτίνη-β και είναι κυρίως πυρηνικός ακόμη και εν απουσία του προσδέτη. Η πρόσδεση στην ιμφορτίνη-β και η εισαγωγή του RXR στον πυρήνα ενισχύεται ελαφρώς από την προσθήκη του 9cRA. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι η μετακίνηση του ετεροδιμερούς RXR-VDR ελέγχεται από τον VDR και τον προσδέτη του.

Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν τρεις ισομορφές του RXR (α, β, και γ). Η ισομορφή του RXR που εκφράζεται μπορεί να εξαρτάται και από το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Είναι ασαφές όμως κατά πόσον η χρήση των

διαφορετικών ισομορφών του RXR μπορεί να επηρεάσει την επιλογή των γονιδίων-στόχων ή ακόμα και να οδηγήσει σε διαφορετική ρύθμιση και αποτέλεσμα.



Εικόνα 6 Μηχανισμός δράσης της βιταμίνης D₃^[80]

Η ενεργή βιταμίνη D₃ μπορεί να προκαλεί την μεταγραφική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των γονιδίων μέσω του υποδοχέα της. Αυτό επιτυγχάνεται όταν το ενεργό σύμπλοκο 1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR συνδέεται ειδικά στα στοιχεία απόκρισης στην βιταμίνη D₃ (VDREs). Τα VDREs αποτελούνται από δύο επαναλαμβανόμενες δομές από έξη νουκλεοτίδια όπου ανάμεσά τους περιλαμβάνουν διαφορετικό αριθμό των νουκλεοτιδίων (για παράδειγμα, GGTCCA-NNN-GGTCCA, όπου N είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο αυτό συμβολίζεται ως DR3), στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων-στόχων [81]. Για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων ο VDR προσδένεται στην 3' περιοχή ενώ ο RXR προσδένεται στην 5' περιοχή των VDREs [82]. Άλλες πρωτεΐνες οι οποίες δρουν ως συμπράγοντες έχουν επίσης την ικανότητα να

διαμορφώνουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων του VDR. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα η οποία συμμετέχει στην τροποποίηση της χρωματίνης, λειτουργούν επίσης ως μια πλατφόρμα για την προσέλκυση στην περιοχή του υποκινητή τόσο και άλλων τέτοιων πρωτεϊνών όσο και απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων [13]. Η δέσμευση της 1α,25(OH)₂D₃ προκαλεί φωσφορυλίωση και αλλαγές στην διαμόρφωση του VDR, το οποίο προκαλεί την απελευθέρωση των συν-καταστολέων (όπως οι συν-καταστολείς των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear receptor Co-Repressors- NCoRs) και των μεσολαβητών αποσιώπησης των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος και του θυρεοειδούς (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-SMRT), το σύμπλοκο αποακετυλίωσης ιστόνων (Histone DeAcetylase Complex-HDAC)) οι οποίοι διατηρούν την χρωματίνη σε μια μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση [83]. Μόλις η χρωματίνη είναι διαθέσιμη για μεταγραφή, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (vitamin D Receptor-Interacting Proteins-DRIPs) σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που συνδέεται με συγκεκριμένη περιοχή του VDR (AF2) και αλληλεπιδρά με την μεταγραφική μηχανή, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας TF2B (transcription factor 2B- TF2B) και την RNA πολυμεράση II, και ξεκινάει η μεταγραφή [80].

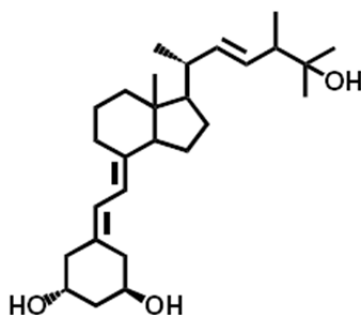
Όμως η 1α,25(OH)₂D₃ δρα και ως αρνητικός ρυθμιστής. Ο μηχανισμός με τον οποίο η 1α,25(OH)₂D₃ καταστέλλει την έκφραση γονιδίων μέσω της πρόσδεσης του VDR σε αρνητικά VDREs (DR3 τύπου), τοποθετώντας VDR στην 5' περιοχή των VDRE [84,85], όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ρύθμισης της ανθρώπινης PTH [86].

1.3 Ανάλογα της βιταμίνης D₃- παρिकाλσιτόλη.

Ένας βασικός στόχος στην έρευνα που σχετίζεται με την βιταμίνη D₃ ως μέσω θεραπείας είναι η σύνθεση αναλόγων της βιταμίνης D₃ που διατηρούν τις κλινικά χρήσιμες δράσεις της αλλά έχουν ελάχιστες ή ανεκτές υπερασβεσταιμικές και φωσφατιδικές δράσεις [87]. Από τα ανάλογα της βιταμίνης D₃ τα οποία συντέθηκαν τα πιο επιτυχημένα προκαλούν υψηλή διαφοροποίηση και έχουν αντιπολλαπλασιαστική δράση *in vitro*, αλλά βρέθηκε επίσης ότι έχουν χαμηλή υπερασβεσταιμική δράση *in vivo* [87,88]. Ωστόσο, ορισμένα από αυτά τα

ανάλογα είναι γενικά λιγότερο δραστικά από την 1,25(OH)₂D₃ *in vivo*, λόγω της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας.

Ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αντιμετωπιζόταν με 1,25(OH)₂D₃ ή με το συνθετικό του ανάλογο 1α(OH)D₃ για χρόνια, ωστόσο οι υπερασβεστιαϊκές δράσεις αυτών συχνά προκαλούσε υπερασβεσταιμία. Από τότε αρκετά ανάλογα αναπτύχθηκαν έτσι ώστε να διατηρούν την κατασταλτική δράση της 1,25(OH)₂D₃ ως προς την παραθορμόνη έχοντας χαμηλότερη υπερασβεστιαϊκή δράση. Ευρέως στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται τέσσερα τέτοια ανάλογα: 19-nor-1α,25(OH)₂-D₂ (παρικαλσιτόλη) και 1α(OH)D₂ (doxercalciferol) στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και 22-oxa- 1,25(OH)₂D₃ (maxacalcitol) και 1,25(OH)₂-26,27-F₆-D₃ (falecalcitriol) στην Ιαπωνία [89]. Η παρικαλσιτόλη είναι παράγωγο της ενεργής εργοστερόλης (βιταμίνη D₂) (εικόνα 5).



Εικόνα 7 Παρικαλσιτόλη

Η παρικαλσιτόλη έχει βρεθεί ότι είναι τρεις φορές λιγότερο δραστική σε σχέση με την 1,25(OH)₂D₃ ως προς την καταστολή της παραθορμόνης στους ασθενείς, αλλά είναι περίπου δέκα φορές λιγότερο υπερασβεστιαϊκή και φωσφατιδική δράση [90-95]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρικαλσιτόλη μείωσε την συγκέντρωση της παραθορμόνης πιο γρήγορα και με λιγότερη εμφάνιση υπερασβεσταιμίας και αύξησε το γινόμενο ασβαστίου*φωσφόρου σε σχέση με την 1,25(OH)₂D [96]. Επιπλέον, η ικανότητα πρόσδεσης με τον VDR αλλά και με την DBP είναι μικρότερη στην περίπτωση της παρικαλσιτόλης.

Έχει δειχθεί ότι η παρικαλσιτόλη επανέφερε την προκαλούμενη από την ακετυλοχολίνη χαλάρωση των αιμοφόρων αγγείων σε αρουραίους οι οποίοι έχουν υποστεί νεφρεκτομή κατά τα 5/6. Η βελτίωση αυτή δεν υπήρχε όταν χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς των eNOS, συμπεραίνοντας έτσι ότι η

παρिकाλσιτόλη δρα ρυθμίζοντας την παραγωγή των οξιδίων αζώτου [97]. Παρόλα αυτά αυτό το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε από αντίστοιχη μελέτη στα ίδια ζώα [98], μια διαφορά που θα μπορούσαν να σχετίζεται με το επίπεδο και τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου. Από την σύγκριση των δυο μελετών γίνεται κατανοητό ότι η θεραπεία με την παρिकाλσιτόλη σε αυτή την περίπτωση γίνεται πιο αποτελεσματική όταν ξεκινά στα αρχικά στάδια της νόσου, πριν ακόμα εμφανιστή χρονιά νεφρική ανεπάρκεια.

1.4 Στόχοι της βιταμίνης D₃

Τα γονίδια και τα δίκτυα γονιδίων που γνωρίζουμε σήμερα τα οποία ρυθμίζονται από τις βιολογικές δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ είναι εκτεταμένα. Πολλά από αυτά τα δίκτυα γονιδίων ρυθμίζονται από την ενεργή βιταμίνη D₃ με διαφορετικό αλλά συγκεκριμένο τρόπο για κάθε είδος ιστού. Οι πιο σημαντικοί στόχοι της βιταμίνης D αναφέρονται στον πίνακα 2. Μετά την ανακάλυψη της παρουσίας του VDR και της 1-α-υδροξυλάσης (CYP27B1) σε πολλούς ιστούς πέραν των νεφρών έγινε κατανοητό η ύπαρξη πολύ ευρύτερου φάσματος φυσιολογικών δράσεων της ενεργής βιταμίνης D₃ [10,99-101]. Αυτοί οι ιστοί είναι ικανοί να παράγουν την ενεργή μορφή της βιταμίνης D₃ η οποία στην συνέχεια μπορεί να δρα αυτοκρινώς ή παρακρινώς σε εξωνεφρικούς στόχους. Ο VDR έχει βρεθεί στα όργανα τα οποία αποτελούν κλασικούς στόχους της βιταμίνης D στα οποία παίζει καθοριστικό ρόλο όπως δηλώθηκε πιο πάνω, δηλαδή, στο έντερο, τα οστά, τους νεφρούς και τους παραθυρεοειδείς αδένες. Όμως ο VDR έχει ανιχνευτή και σε άλλους ιστούς-στόχους που δεν συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου, όπως το δέρμα, οι μύες, το πάγκρεας, τα αναπαραγωγικά όργανα, τα αιμοποιητικά κύτταρα, το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα [41,102].

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο ρόλος του ενεργοποιημένου VDR είναι να κατευθύνει τον κυτταρικό μηχανισμό μεταγραφής σε συγκεκριμένες θέσεις στο γονιδίωμα επηρεάζοντας την έκφραση πρωτεϊνών. Κατά αυτόν τον τρόπο η 1,25(OH)₂D₃ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των ανόργανων στοιχείων, μέσω των δράσεων της στα κύτταρα του εντέρου, τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα και σε συγκεκριμένα κύτταρα των οστών. Παρόλο που έχουν εντοπιστεί πολλά γονίδια-στόχοι της βιταμίνης D τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του

φώσφορου, ανακαλύπτονται και νέοι σημαντικοί στόχοι για αυτές τις διαδικασίες. Παράδειγμα τέτοιων γονιδίων είναι αυτά των μεταφορέων του ασβεστίου και του φώσφορου και των σχετιζόμενων αντλιών ιόντων στο έντερο και τους νεφρούς [103,104], και του RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) που συντίθεται από τους οστεοβλάστες [105]. Η 1,25(OH)₂D₃ ρυθμίζει επίσης δίκτυα γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των χολικών οξέων στο παχύ έντερο [106], στην αποικοδόμηση των ξενοβιοτικών ενώσεων σε διάφορους ιστούς [103], στην διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων στο δέρμα [107], στην ανάπτυξη και η ανακύκλωση των δερματικών θυλάκων των τριχών [108], και στις λειτουργίες των βασικών κυτταρικών τύπων που εμπλέκονται στην ανοσία.

Πίνακας 2 Ιστοί/ κύτταρα και γονίδια στόχοι της ενεργής βιταμίνης D₃

Ιστός / Είδος κυττάρου	Γονίδιο	Βιβλιογραφική αναφορά
Διαφοροι ιστοί	CYP24A1	[109,110]
	p21	
	Calbindin D9k	
	Calbindin D28k	
	VDR	[111,112]
Έντερο	CYP3A4	[113]
Κερατινοκύτταρα	Involucrin	
Νεφροί	NPT2	
	Cyp27b1	[109]
Ποδοκύτταρα	Νεφρίνη	[114]
Οστεοβλάστες	Osteocalcin	[115]
	Osteopontin	
Πρόδρομοι οστεοκλάστες/ μακροφάγα	Carbonic anhydrase	
	Ιντεγκρίνη β3	
Παραθυρεοειδής αδένας	Παραθυρεοειδής ορμόνη	
Χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες	Σχετιζόμενο πεπτιδίο με την παραθυρεοειδή ορμόνη	

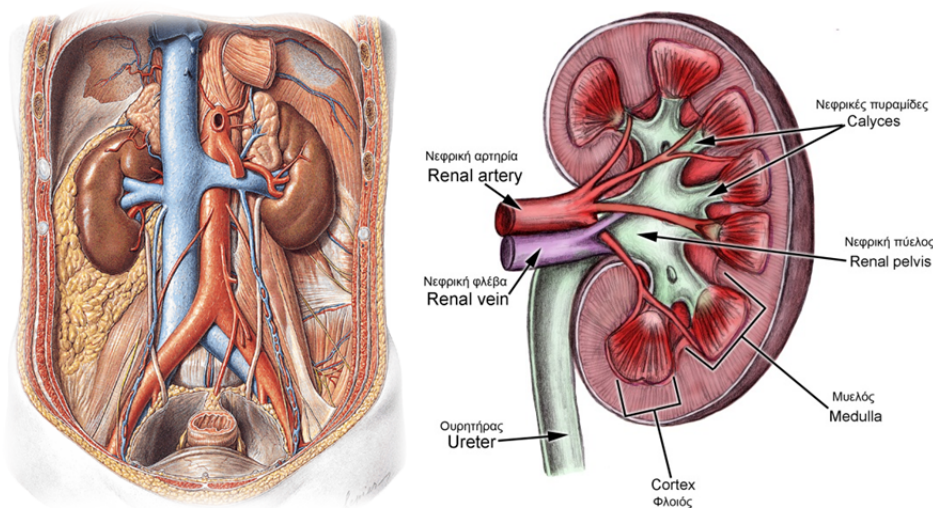
	Ιντερλευκίνη-2	
	Ιντερλευκίνη-12	
Κύτταρα του ανοσοποιητικού	Granulocyte colony-stimulating factor	
	Ιντερφερόνη-γ	
	relB	
	Ιντερλευκίνη-2	[116]
	Ιντερλευκίνη-10	[116]
	Ιντερλευκίνη-12β	[116]

Κεφάλαιο 2 Η παθοφυσιολογία του ανθρώπινου νεφρού

2.1. Ανατομία και φυσιολογία του νεφρού

2.1.1 Ανατομία του νεφρού

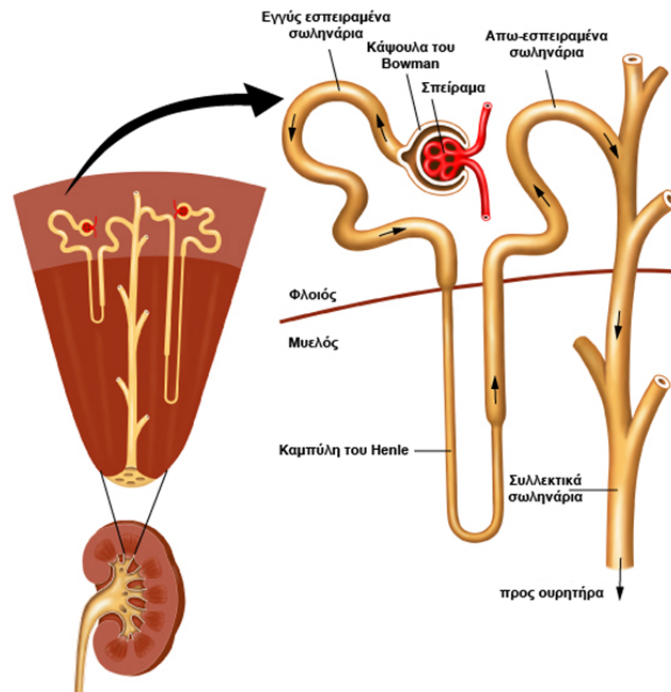
Οι δυο νεφροί, βρίσκονται στα πλάγια της σπονδυλικής στήλης, στο ύψος της οσφυϊκής μοίρας και πίσω από το περιτόναιο. Ο δεξιός νεφρός, βρίσκεται κατά 1,5 εκ. χαμηλότερα από τον αριστερό. Κάθε νεφρός έχει σχήμα φασολιού και φαιοκόκκινο χρώμα. Επίσης έχει μήκος περίπου 10-12,5 εκ., πλάτος 5-7 εκ. και βάρος 150–160g. Οι δύο νεφροί μαζί με τα επινεφρίδια καλύπτονται από περινεφρικό λίπος και την περινεφρική περιτονία.



Εικόνα 8 Θέση ανθρώπινων νεφρών και τα βασικά μέρη του νεφρού

Κάθε νεφρός αποτελείται από τον φλοιό που αποτελεί το εξωτερικό τμήμα του και τον μυελό ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικό τμήμα. Ο φλοιός περιβάλλει τον μυελό και έχει κοκκιώδη όψη, περιλαμβάνει τα σπειράματα και τα εσπειραμένα τμήματα των σωληναρίων. Ο μυελός βρίσκεται εσωτερικά του φλοιού έχει γραμμωτή όψη και σχηματίζει 8-12 κωνοειδής περιοχές τις νεφρικές πυραμίδες. Ο νεφρός αποτελείται από τους νεφρώνες οι οποίοι αποτελούν την βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού, τα αθροιστικά σωληνάκια και το δίκτυο των μικροαγγείων. Ο ανθρώπινος νεφρός περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες οι οποίοι ελαττώνονται με την ηλικία.

Ο κάθε νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωματίο το οποίο περιλαμβάνει το σπείραμα και την κάψα του Bowman και ένα σύστημα σωληναρίων. Το σύστημα σωληναρίων του νεφρώνα αποτελείται από το εγγύς σωληνάριο, την καμπύλη του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο.



Εικόνα 9 Νεφρώνας

Το σπείραμα το οποίο αποτελείται από ένα σύνολο τριχοειδών τα οποία περιβάλλονται από την κάψα του Bowman καθίσταται το πρώτο βήμα στην διήθηση του πλάσματος του αίματος. Για την διήθηση του πλάσματος το αίμα εισέρχεται στο σπείραμα από το προσαγωγό αρτηρίδιο και εξέρχεται από το απαγωγό αρτηρίδιο με αποτέλεσμα την ανάπτυξη υψηλής πίεσης εντός του σπειράματος. Η υψηλή πίεση που δημιουργείται βοηθάει την διαδικασία της υπερδιήθησης όπου τα υγρά και διαλυτά μόρια αναγκάζεται να περάσουν από τα τριχοειδή αγγεία προς την κάψα του Bowman.

Έτσι μια ουσία έχει δυο δυνατές περιπτώσεις. Η μία είναι να περάσει μέσα από τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος, την σπειραματική βασική μεμβράνη (glomerular basement membrane, GBM) και τα ποδοκύτταρα και τελικά να οδηγηθεί προς τον αυλό του σωληναρίου· η πορεία αυτή είναι γνωστή ως σπειραματική διήθηση. Ο ρυθμός διήθησης του αίματος μέσω των σπειραμάτων ονομάζεται ρυθμός σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration

rate-GFR) και αποτελεί δείκτη της νεφρικής λειτουργίας. Εναλλακτικά μια ουσία μπορεί να βγει από το σπείραμα μέσω του απαγωγού αρτηριδίου και να συνεχίσει στην κυκλοφορία του αίματος.

Ο σπειραματικός ηθμός (ή φραγμός διήθησης) αποτελείται από το θυριδωτό ενδοθήλιο των σπειραματικών τριχοειδών (μέγεθος πόρου 50-100nm), το οποίο ακολουθείται από τη σπειραματική βασική μεμβράνη ως δεύτερο επίπεδο και το έσω πέταλο του ελύτρου Bowman στον ουροφόρο πόλο του νεφρικού σωματίου. Το έσω πέταλο (περισπλάγχνιο) του ελύτρου Bowman αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα.

2.1.2. Τα ποδοκύτταρα

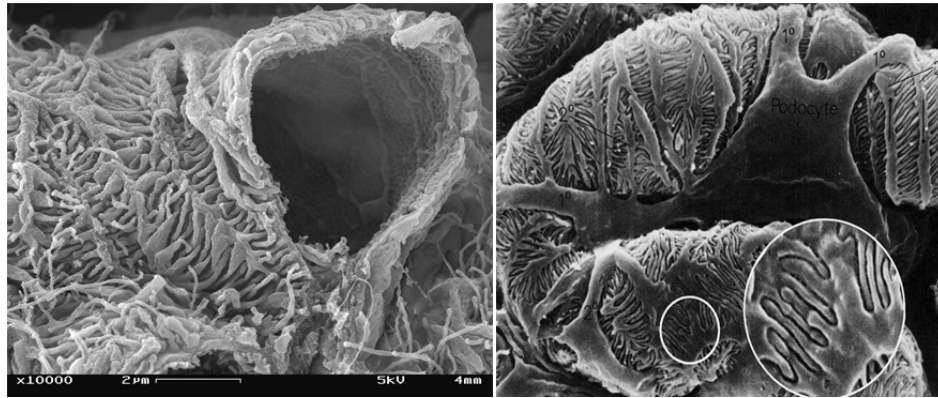
Δομή των ποδοκυττάρων



Εικόνα 10 Σπείραμα και ποδοκύτταρα^[117]

Τα ποδοκύτταρα είναι κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης τα οποία δεν διαθέτουν ικανότητα πολλαπλασιασμού ωστόσο είναι δυναμικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν ικανότητα μετακίνησης [118,119]. Τα ποδοκύτταρα εμφανίζουν επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, διαθέτουν φαινοτυπικούς δείκτες όπως αυτοί των νευρώνες [120,121] και των λείων μυϊκών κυττάρων ενώ έχουν λειτουργικές ομοιότητες με τα τριχοειδή περικύτταρα [122,123].

Τα ποδοκύτταρα έχουν ένα μεγάλο, σφαιρικό κυτταρικό σώμα από το οποίο εκτείνονται μακριές κυτταροπλασματικές προεκβολές, οι λεγόμενες ποδοειδείς προεκβολές. Οι ποδοειδείς προεκβολές καλύπτουν τη βασική μεμβράνη με τη

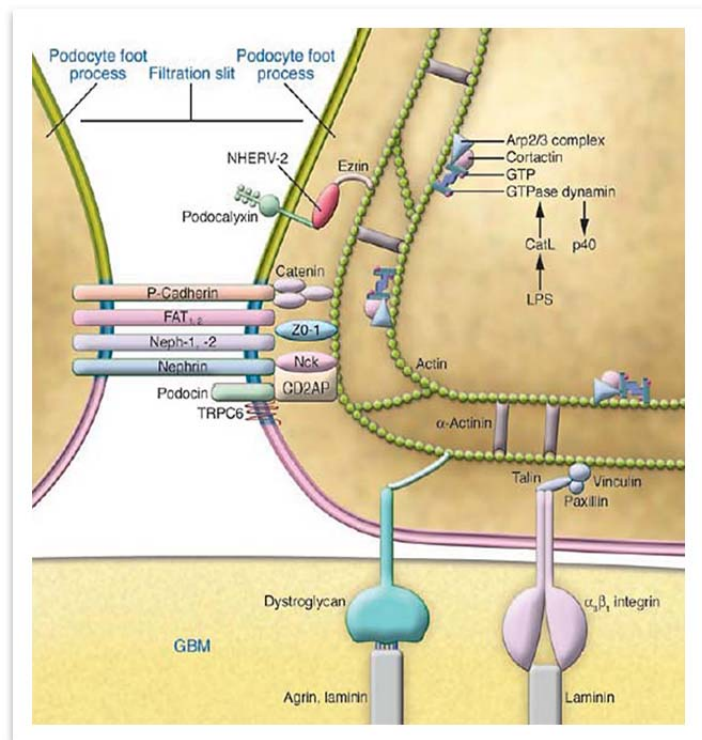


Εικόνα 11 Ποδοκύτταρα και φραγμός διήθησης. Φωτογραφίες από μικροσκοπία SEM.

μορφή συμπλεκόμενων δακτύλων που διαχωρίζονται από ανοίγματα που ονομάζονται σχισμές διήθησης. Κάθε σχισμή διήθησης γεφυρώνεται από ένα λεπτό διάφραγμα που περιέχει πόρους διαστάσεων 40 nm [124]. Έτσι οι σχισμές διήθησης επιβραδύνουν τη διήθηση ορισμένων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων τα οποία διαπερνούν το ενδοθήλιο και τη βασική μεμβράνη.

Πρωτεΐνες του διαφράγματος διήθησης

Το διάφραγμα διήθησης αποτελείται από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρίσκεται στην επιφάνεια των ποδοειδών προεκβολών. Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες νεφρίνη [125,126], ποδοκίνη [127], νεφρίνη [128] και P-καδερίνη [124] και τις ενδοκυττάρειες ZO-1 [129], α -, β - και γ -κατενίνες [124] και τη CD2AP [130]. Ωστόσο ο αριθμός των μορίων που φαίνεται ότι συμμετέχουν σε αυτό το σύμπλοκο συνεχώς αυξάνεται [131].



Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων.

Νεφρίνη

Η νεφρίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη προσκόλλησης 1.241 αμινοξέων και μοριακού βάρους 185 kDa που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Κωδικοποιείται από το γονίδιο NPHS1 [132] και εντοπίζεται στο διάφραγμα διήθησης [125,126]. Το ενδοκυττάριο καρβοξυλο-τελικό άκρο της νεφρίνης περιέχει 9 θέσεις τυροσίνης, μερικές από τις οποίες φωσφορυλιώνονται όταν προσδεθεί ένας προσδέτης στη νεφρίνη. Αυτό το ενδοκυττάριο άκρο συνδέεται με τις διασυνδετικές πρωτεΐνες CD2AP, Nck2 και densin [133], οι οποίες είναι σε επαφή με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Έτσι, η νεφρίνη επιτρέπει την μεταγωγή εξωκυττάρων σημάτων στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, λειτουργώντας ως ο σηματοδοτικός κόμβος του σχισμοειδούς διαφράγματος.

Μετάλλαξη στο γονίδιο NPHS1 σχετίζεται με την εμφάνιση συγγενούς νεφρωτικού συνδρόμου φινλανδικού τύπου [132]. Στον άνθρωπο, το mRNA για τη νεφρίνη έχει ανιχνευθεί με *in situ* υβριδοποίηση την 13η-23η εβδομάδα κύησης κατά το στάδιο S της νεφρογένεσης και φαίνεται ότι το γεγονός αυτό είναι απαραίτητο για την διαμόρφωση της διακυττάριας σύνδεσης σε δομή που προσομοιάζει με φερμουάρ (zipper-like) του σχισμοειδούς διαφράγματος. Η ακριβής λειτουργία της νεφρίνης δεν είναι πολύ καλά καθορισμένη, αλλά φαίνεται πως συμμετέχει στη μεταγωγή σημάτων που φτάνουν μέχρι τον πυρήνα [134], ενώ θεωρείται και σημαντικό δομικό στοιχείο του διαφράγματος διήθησης [135].

CD2AP

Η πρωτεΐνη CD2AP (CD2-associated protein) είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 80 kDa με περιοχές SH3 (Src homology 3). Ποντίκια CD2AP^{-/-} αναπτύσσουν νεφρωτικό σύνδρομο και πεθαίνουν από νεφρική ανεπάρκεια περίπου 6 εβδομάδες μετά τη γέννησή τους [136]. Στον νεφρό εκφράζεται κυρίως στα ποδοκύτταρα, όπου αλληλεπιδρά με τη νεφρίνη [130,137]. Πιστεύεται ότι η CD2AP είναι ένα μόριο που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες στο διάφραγμα διήθησης και με την ακτίνη, παίζοντας έτσι κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του διαφράγματος διήθησης και του κυτταροσκελετού [138].

Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες για τα ποδοκύτταρα

Ποδοκαλυκίνη

Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής του ποδοκυττάρου και του ηθμού διήθησης φαίνεται ότι παίζει η αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των ποδοειδών προεκβολών. Αυτό το τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης φέρει έναν καλά αναπτυγμένο γλυκοκάλυκα, ο οποίος φέρει πρωτεΐνες υποκαταστημένες με μόρια σιαλικού οξέος [139] καιθειικές ομάδες. Αυτός ο επιφανειακός κάλυκας είναι υπεύθυνος για το αρνητικό φορτίο του κορυφαίου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης των ποδοκυττάρων. Η βασικότερη πρωτεΐνη στο γλυκοκάλυκα είναι η ποδοκαλυκίνη [140,141]. Η ποδοκαλυκίνη είναι εξαιρετικής σημασίας για το σχηματισμό και τη διατήρηση της χαρακτηριστικής κυτταρικής αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων [142,143]. Σε δύο πειραματικά μοντέλα σπειραματικής βλάβης (puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate perfusion) παρατηρήθηκε ότι το αρνητικό φορτίο της ποδοκαλυκίνης εξουδετερώνεται, η δομή των ποδοειδών προεκβολών καταστρέφεται και οι ηθμοί διήθησης διαταράσσονται και δημιουργούνται διαρροές και ασυνεχείς διασυνδέσεις [140,144,145]. Η σημασία της ποδοκαλυκίνης ωστόσο αναδείχθηκε σε ποντίκια που τους λείπει το γονίδιο της ποδοκαλυκίνης όπου βρέθηκε ότι σε αυτά τα ζώα τα ποδοκύτταρα έχουν λιγότερες ποδοειδείς προεκβολές και δεν σχηματίζουν ηθμούς διήθησης [146,147].

WT1

Σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογικής λειτουργίας των ποδοκυττάρων είναι ο WT1 (Wilms' Tumor 1), μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο WT1. Ο WT1 μπορεί να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, μεταγραφικός συμπαράγοντας ή μετα-μεταφραστικός τροποποιητής. Ο ρόλος του εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον και από την εκάστοτε ισομορφή της πρωτεΐνης. Υπάρχουν 4 βασικές ισομορφές του WT1 που είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος [148]. Στα ενήλικα άτομα, ο WT1 εκφράζεται αποκλειστικά στα ποδοκύτταρα, όπου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο,

αφού αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα των γονιδίων της νεφρίνης [149,150] και της ποδοκαλυκίνης[151].

2.1.3. Λειτουργία του νεφρού

Στις φυσιολογικές λειτουργίες του νεφρού είναι η απομάκρυνση από την κυκλοφορία του αίματος άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού, η διατήρηση της ισορροπίας των υγρών (νερού) και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών (νατρίου, καλίου, ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου). Αποτέλεσμα της ρύθμισης του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών είναι και η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας γεγονός το οποίο σημαίνει διατηρεί το pH του οργανισμού σε φυσιολογικά επίπεδα.

Ο νεφρός είναι υπεύθυνος για την κατακράτηση συστατικών χρήσιμων για τον οργανισμό όπως οι πρωτεΐνες και η γλυκόζη και την απέκκριση άχρηστων ουσιών όπως τα αζωτούχα προϊόντα του καταβολισμού των πρωτεϊνών. Η απέκκριση αυτών των παραγώγων πραγματοποιείται μέσω της σπειραματικής διήθησης ωστόσο διάφορα άλλα παράγωγα όπως το ουρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και η κρεατινίνη αποβάλλονται μέσω του νεφρικού σωληναρίου. Επιπλέον μέσω του νεφρικού σωληναρίου απομακρύνονται από την κυκλοφορία πολλά φάρμακα όπως τα διουρητικά και τα αντιβιοτικά.

Ο νεφρός κατέχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και της ρύθμισης του νατρίου. Επιπλέον ο νεφρός συμμετέχει στην ρύθμιση ορμονών όπως η ερυθροποιητίνη η οποία επιδρά στον μυελό των οστών και ελέγχει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η καλσιτριόλη η οποία ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου.

Ο νεφρός κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης του πλάσματος μέσω σύνθεση γλυκόζης με γλυκονεογένεση. Σε ασθενείς με βαριά νεφρική δυσλειτουργία στην ανάπτυξη υπογλυκαιμίας συντελεί και η απουσία της οδού της γλυκονεογένεσης.

2.2. Παθολογία του νεφρού

2.2.1. Χρόνια νεφρική νόσος

Ο όρος χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) γενικά περιλαμβάνει ένα ετερογενές σύνολο ασθενειών που εμφανίζουν δυσμορφία και δυσλειτουργία των νεφρών. Η ανομοιομορφία στην έκφραση της νόσου σχετίζεται εν μέρει με τις αιτίες, την παθολογία, την σοβαρότητα και τον ρυθμό εξέλιξης της νόσου. Τα πρώτα στάδια της ασθένειας είναι συχνά ασυμπτωματικά και η ασθένεια σε αυτό το στάδιο μπορεί να είναι αναστρέψιμη. Ωστόσο, ορισμένες ταχέως εξελισσόμενες ασθένειες μπορούν να οδηγήσουν σε νεφρική ανεπάρκεια μέσα σε λίγους μήνες.

Ο καθορισμός των σταδίων της χρόνιας νεφρικής νόσου βασίζεται στην ύπαρξη νεφρικής βλάβης (πρωτεϊνουρία) ή στην μειωμένη νεφρική λειτουργία (ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR)) για 3 μήνες ή περισσότερο, ανεξάρτητα από την κλινική διάγνωση [152,153].

Λόγω του κεντρικού ρόλου του GFR στην παθοφυσιολογία των επιπλοκών που προκύπτουν, η νόσος έχει ταξινομηθεί σε πέντε διαφορετικά στάδια βάσει του GFR (πίνακας 3).

Πίνακας 3 Στάδια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας

Στάδιο νόσου	GFR (ml/min ανά 1,73 m²)
1	>90
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	15

Ωστόσο, διάφορες πειραματικές και κλινικές μελέτες δηλώνουν τον σημαντικό ρόλο της πρωτεϊνουρίας στην παθογένεια της εξέλιξης της νόσου [154]. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια διαβαθμισμένη σχέση ανάμεσα στην αυξημένη θνησιμότητα, την πρωτεϊνουρία και τις επιπτώσεις στους νεφρούς σε διαφορετικούς πληθυσμούς η οποία είναι ανεξάρτητη από το χαμηλό GFR και τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά προβλήματα [155-159]. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι οι νεφροί να μην λειτουργούν σωστά έτσι ώστε να σχηματίσουν τα ούρα οπότε οι άχρηστες ουσίες συσσωρεύονται στο αίμα και δημιουργούν προβλήματα στην υγεία. Επιπλέον, πολλές ορμόνες δεν παράγονται και οι ορμονικές διαταραχές έχουν δυσάρεστες

επιπτώσεις σε πολλά συστήματα του οργανισμού. Η ΧΝΝ ξεκινάει ήπια και μπορεί να φτάσει μέχρι και τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, μια διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει από 2 έως 10 χρόνια. Στο τελικό στάδιο της νόσου χρειάζεται άμεση υποστήριξη της νεφρικής λειτουργίας, με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση ή μεταμόσχευση.

Αιμοκάθαρση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, οι τοξίνες και η περίσσεια ύδατος περνούν, μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης, από το αίμα προς το διάλυμα της αιμοκάθαρσης, με το οποίο και απομακρύνονται. Επίσης, συστατικά απαραίτητα περνούν από το διάλυμα στο αίμα. Η μεταφορά αυτή γίνεται με διάχυση ή με διήθηση. Ο μηχανισμός της διάχυσης είναι αποτέλεσμα της τυχαίας μοριακής κίνησης και της διαφοράς της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών εκατέρωθεν της μεμβράνης. Εξαρτάται από το μοριακό βάρος των ουσιών και από το εύρος των πόρων της μεμβράνης. Είναι η αρχή στην οποία βασίζεται η κλασική αιμοκάθαρση. Η διαφορά της υδροστατικής πίεσης μεταξύ αίματος και διαλύματος αντιστοιχεί στο φαινόμενο της υδροστατικής υπερδιήθησης και καθορίζει τη μετακίνηση του ύδατος από το αίμα προς το διάλυμα (αφυδάτωση κατά την αιμοκάθαρση). Η διαφορά της ωσμωτικής πίεσης μεταξύ δύο διαλυμάτων που χωρίζονται από ημιδιαπερατή μεμβράνη αντιστοιχεί στην ωσμωτική υπερδιήθηση και είναι η αρχή στην οποία βασίζεται η περιτοναϊκή κάθαρση.

2.2.2. Αίτια νεφρικής δυσλειτουργίας

Στις ανεπτυγμένες χώρες, η ΧΝΝ συνήθως συνδέεται με την ηλικία, τον διαβήτη, την υπέρταση, την παχυσαρκία και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, με αποτέλεσμα οι πιο συχνές παθολογικές καταστάσεις να είναι η διαβητική σπειραματοσκλήρυνση και η υπερτασική νεφροσκλήρυνση. Ωστόσο, η ακριβής διάγνωση είναι συχνά δύσκολη [160]. Η υπερτασική νεφροσκλήρυνση οφείλεται στην μεγάλη πίεση που ασκεί το αίμα στα αγγεία με αποτέλεσμα την καταστροφή των αγγείων που αιματώνουν τα νεφρά και άρα μειωμένη λειτουργία των νεφρών. Άλλες αιτίες μπορεί να είναι διάφορες νεφροπάθειες, όπως η σπειραματονεφρίτιδα, η οποία είναι φλεγμονή στα νεφρά και μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας ή η πολυκυστική νόσος των νεφρών, που είναι κληρονομική ασθένεια. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, κοινές

αιτίες της χρόνιας νεφρικής νόσου περιλαμβάνουν, επίσης, σπειραματικές ασθένειες και ασθένειες που επηρεάζουν τα σωληνάκια οι παθήσεις αυτές προκύπτουν από λοιμώξεις ή έκθεση σε τοξίνες ή φάρμακα.[161]

Διαβητική νεφροπάθεια

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία. Η υπεργλυκαιμία οφείλεται στο γεγονός ότι το πάγκρεας είτε δεν μπορεί να παράγει ινσουλίνη (τύπου I) είτε η ινσουλίνη που παράγει δεν αρκεί και δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά (τύπου II). Οπότε χωρίς την επίδραση της ινσουλίνης, η γλυκόζη συσσωρεύεται στο αίμα, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης του αίματος.

Ο σακχαρώδης διαβήτης ως χρόνιο νόσημα συχνά οδηγεί σε πολυάριθμες μικροαγγειακές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της νεφροπάθειας. Η αδυναμία γλυκαιμικού ελέγχου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη δημιουργεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στους νεφρούς, όπως η πάχυνση της βασικής σπειραματικής μεμβράνης, η υπερτροφία του σπειράματος, σπειραματοσκλήρυνση, διαστολή του μεσάγγειου, απώλεια των ποδοκυττάρων, ατροφία των σωληναρίων, σωληναριακή ίνωση και φλεγμονή [162-164].

Η συχνότητα εμφάνισης της διαβητικής νεφροπάθειας συνεχίζει να αυξάνεται όλο και πιο γρήγορα σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη πρωτογενής διάγνωση της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου, αυτό οφείλεται στην αυξανόμενη εμφάνιση του διαβήτη, κυρίως του διαβήτη τύπου 2. Η νεφρική νόσος τελικού σταδίου συνδέεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και μεταξύ αυτών των ασθενών οι ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια έχουν τα υψηλότερα ποσοστά. Γνωρίζουμε ότι ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στους αιμοκαθαρούμενους διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με μη αιμοκαθαρούμενους διαβητικούς ασθενείς είναι 1,69 [165].

Η ενεργή βιταμίνη D₃ μεταβάλλει το μεταβολισμό της γλυκόζης με διάφορους μηχανισμούς, ενισχύοντας έτσι την σημασία της στους ασθενείς με διαβήτη [166]. Η 1,25(OH)₂D₃ είναι γνωστό ότι έχει αντι-φλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές δράσεις [167]. Αυτές οι δράσεις θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αυτοάνοση παθολογία του διαβήτη τύπου 1, ενώ θα μπορούσε να βελτιώσουν την μικρή αλλά χρόνια φλεγμονή που διαδραματίζει ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη

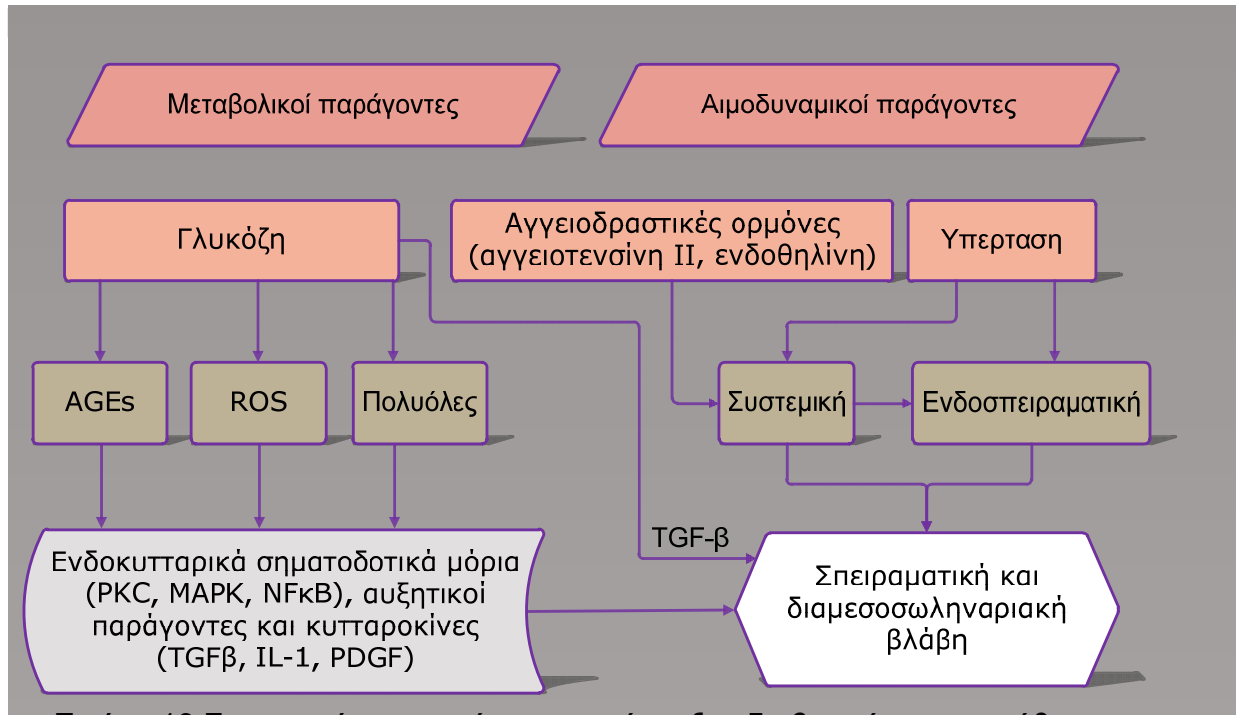
στο διαβήτη τύπου 2. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μπορεί να οδηγήσει επίσης την απελευθέρωση της ινσουλίνης από παγκρεατικά β -κύτταρα [168]. Αυξημένα επίπεδα παραθυρεοειδούς ορμόνης, που είναι αποτέλεσμα των χαμηλών επιπέδων $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, έχουν επίσης εμπλακεί στην μειωμένη έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β -κύτταρα [169].

Παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας

Η διαβητική νεφροπάθεια εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διαφόρων αιμοδυναμικών και μεταβολικών παραγόντων [170,171] (εικόνα 13). Οι αιμοδυναμικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της διαβητικής νεφροπάθειας είναι η αυξημένη συστηματική και ενδοσπειραματική πίεση, καθώς και η ενεργοποίηση του μονοπατιού της αγγειοδραστικής ορμόνης, συμπεριλαμβανομένου του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης [172] και της ενδοθηλίνης [173]. Αυτά τα αιμοδυναμικά μονοπάτια ενεργοποιούν ταχύτατα ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) [174], η MAP κινάση [175,176], ή μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF- κ B [177] και διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGF- β και την αύξηση της διαπερατότητας των αυξητικών παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF [178]. Στην διαβητική νεφροπάθεια ενεργοποιούνται και μονοπάτια τα οποία εξαρτώνται από την ίδια την γλυκόζη και οδηγούν σε αύξηση του οξειδωτικού στρες, τον σχηματισμό της νεφρικής πολυόλης [179] και την συσσώρευση των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) [180].

Η διαβητική νεφροπάθεια έχει πολλές διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης. Πριν ακόμα από την ανίχνευση κλινικά μετρήσιμων αλλαγών συμβαίνουν διάφορες λειτουργικές αλλαγές στον νεφρώνα σε επίπεδο σπείραματος, συμπεριλαμβανομένων της σπειραματικής υπερδιήθησης και της υπεραιμάτωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πάχυνση της σπειραματικής βασικής μεμβράνης, υπερτροφία του σπειράματος, και διαστολή του μεσάγγειακου. Μελέτες φανερώνουν ότι ανεξάρτητα ο διαβήτης τύπου 1 και η μικροπρωτεϊνουρία, οι οποίοι προκαλούν ιστολογικές αλλοιώσεις οδηγούν στην εκδήλωση νεφροπάθειας [162,181]. Η εξέλιξη της μικροπρωτεϊνουρία σε πρωτεϊνουρία (>300 mg/ημέρα) δεν είναι προβλέψιμη και δεν οδηγεί πάντα στην ανάπτυξη της νεφροπάθειας [181]. Επιπλέον, ο ρυθμός μείωσης της νεφρικής

λειτουργίας μετά την ανάπτυξη της νεφροπάθειας είναι εξαιρετικά διαφορετικός μεταξύ των ασθενών και επηρεάζεται από άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης και του γλυκαιμικού έλεγχου



Εικόνα 13 Σχηματική αναπαράσταση ανάπτυξης διαβητικής νεφροπάθειας.

Τα ποδοκύτταρα στην διαβητική νεφροπάθεια

Οι αλλαγές στην δομή και την λειτουργία των ποδοκυττάρων συνδέονται στενά με την αύξηση της πρωτεϊνουρίας σε διάφορες νεφρικές διαταραχές, περιλαμβανομένης της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι αιμοδυναμικοί και μεταβολικοί παράγοντες οι οποίοι όπως αναλύθηκαν πιο πάνω διαδραματίζουν ρόλο στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας οδηγούν επιπλέον σε παθολογικές αλλοιώσεις των ποδοκυττάρων. Οι πρώτες ενδείξεις της βλάβης των ποδοκυττάρων περιλαμβάνουν απώλεια της φυσιολογικής μορφολογίας των ποδοειδών προεκβολών η οποία οδηγεί αρχικά σε αύξηση των διάκενων μεταξύ των ποδοκυττάρων και τελικά στη μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων. Οι διαδικασίες αυτές λαμβάνουν χώρα μέσω της απόπτωσης, της αποκόλλησης των ποδοκυττάρων από την βασική μεμβράνη του σπειράματος, καθώς μέσω των αλλαγών των ενδοκυτταρίων μικροϊνιδίων σε συνδυασμό με την αύξηση της παραγωγής των ενεργών μορίων του οξυγόνου (ROS). Τα ποδοκύτταρα είναι δυναμικά λειτουργικά κύτταρα που βρίσκονται υπό την επήρεια αγγειοδραστικών

πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένων της αγγειοτενσίνης, παραγόντων ανάπτυξης όπως ο VEGF και ο TGF- β αλλά ακόμα και άλλων παραγόντων που καθορίζουν τελικά την ενδοκυτταρική κατανομή της νεφρίνης. Η νεφρίνη των ποδοκυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού διήθησης. Σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια η έκφραση της νεφρίνης φαίνεται να είναι αισθητά μειωμένη σε σύγκριση με μη διαβητικούς νεφροπαθείς ή σε σχέση με ομάδα ελέγχου [184]. Επιπλέον, η απέκκριση νεφρίνης στα ούρα αυξάνεται κατά 17-30% σε ασθενείς με διαβήτη (με και χωρίς πρωτεϊνουρία) σε σύγκριση με μη διαβητικούς. Οπότε η απέκκριση νεφρίνης θα μπορούσε να είναι ένα πρώιμος δείκτης του τραυματισμού των ποδοκυττάρων, ακόμη και πριν από την έναρξη της πρωτεϊνουρίας [185,186]. Αντίθετα, η έκφραση των δύο άλλων σημαντικών ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στον φραγμό διήθησης, η ποδοκίνη και η CD2AP, ήταν παρόμοια και στις τρεις ομάδες. Επιπλέον μείωση της έκφρασης της νεφρίνης έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες για την διαβητική νεφροπάθεια [187,188]. Ως συνέπεια του ρόλου των ποδοκυττάρων στο φιλτράρισμα και την επεξεργασία των πρωτεϊνών, τα ποδοκύτταρα συμβάλλουν σημαντικά στην βλάβη του σπειράματος, έτσι ώστε η απώλεια των ποδοκυττάρων να αποτελεί σημαντικό σημείο στην έναρξη του τραυματισμού του σπειράματος [189,190].

2.2.3 Επιπτώσεις της χρόνιας νεφρικής νόσου στην υγεία των ασθενών

Η χρόνια νεφρική νόσος είναι συχνή: 1 στους 10 ενήλικες παγκοσμίως φαίνεται ότι έχει κάποιας μορφής νεφρική ανεπάρκεια χωρίς να το γνωρίζει κι αυτό γιατί η ΧΝΝ είναι μια σιωπηρή νόσος. Η ΧΝΝ δεν έχει σαφή συμπτώματα αλλά γίνεται αντιληπτή από τον ασθενή μέσω των επιπλοκών της όπως: η αναιμία, οι επιπτώσεις στα οστά, η αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης, η υπέρταση, οι βλάβες στο ανοσοποιητικό, ο κίνδυνος υποθρεψίας, τα καρδιαγγειακά προβλήματα και ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός. Οι επιπτώσεις αυτές αναλύονται παρακάτω.

Η νεφρική βλάβη οδηγεί σε ανεπαρκή παραγωγή της ερυθροποιητίνης, του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα την πρόκληση αναιμίας. Η αναιμία επιτείνεται όταν υπάρχει και ταυτόχρονη έλλειψη σιδήρου, φυλλικού

οξέος ή βιταμίνης B12. Ενώ, στην αναιμία των χρόνιων νεφροπαθών μπορούν να συμβάλλουν τυχόν απώλειες από το πεπτικό σύστημα, η αραίωση του αίματος από την κατακράτηση νερού που οδηγεί σε χαμηλό αιματοκρίτη και οι συχνές αιμοληψίες. Επίσης, όταν οι νεφροί δεν λειτουργούν σωστά δεν μπορεί να διατηρηθεί η ισορροπία ασβεστίου και φωσφόρου στο αίμα στα σωστά επίπεδα οπότε τα επίπεδα φωσφόρου στο αίμα αυξάνονται. Η αύξηση αυτή οδηγεί αυτόματα στην αύξηση της μείωσης της πυκνότητας των οστών. Αυτό σημαίνει ότι το ασβέστιο που βρίσκεται αποθηκευμένο στα οστά, αποσπάται και εισέρχεται στην κυκλοφορία για να αναπληρώσει τις ανάγκες και να επανέλθει η επιθυμητή ισορροπία μεταξύ φωσφόρου και ασβεστίου. Η μεταβολή αυτή στα οστά λέγεται νεφρική οστεοδυστροφία.

Η ΧΝΑ επιδρά αρνητικά και στην παραγωγή ινσουλίνης και προκαλεί αντίσταση των κυττάρων στην δράση της ινσουλίνης με αποτέλεσμα το πάγκρεας να αναγκάζεται να παράγει περισσότερη ινσουλίνη. Η αυξημένη ινσουλίνη οδηγεί σε υπερινσουλιναιμία. Σε προχωρημένη ΧΝΑ οι ασθενείς μπορούν να εμφανίσουν σημάδια πολύ χαμηλού σωματικού βάρους, πρωτεϊνοθερμιδικού υποσιτισμού και ανεπάρκειες θρεπτικών συστατικών, όπως σίδηρο, ψευδάργυρο, βιταμίνη B6, βιταμίνη C, φυλλικό οξύ και βιταμίνη D₃. Αίτια συνήθως είναι η απώλεια της γεύσης και της όρεξης, η μείωση της πρόσληψης φαγητού, ο διαταραγμένος μεταβολισμός και πέψη των θρεπτικών συστατικών, και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Η κατακράτηση νερού και νατρίου από τους νεφρούς, αυξάνει την πίεση στα αγγεία. Στη ΧΝΑ βλάπτονται επίσης τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κάνοντας το άτομο πιο ευάλωτο στις λοιμώξεις.

Οι διαταραχές που αφορούν στον μεταβολισμό του ασβεστίου, των λιπιδίων και των υδατανθράκων, μαζί με την υπέρταση αλλά και την φλεγμονή που αναπτύσσεται, αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου [191-193]. Σημαντικά στοιχεία σε ασθενείς με ΧΝΝ δείχνουν ότι υπάρχει στενή σχέση ανάμεσα στην προοδευτική νεφρική δυσλειτουργία και τα καρδιαγγειακά νοσήματα και την θνησιμότητα [194]. Ο επιπολασμός της ανεπάρκειας της 1,25(OH)₂D₃ στους ασθενείς με ΧΝΝ και η σύνδεσή του με τα καρδιαγγειακά νοσήματα και την θνησιμότητα 2, 3,8 προτείνει μια δυνητικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων της ενεργής βιταμίνης D₃ και τους κινδύνους για

εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε αυτόν την κατηγορία ασθενών [195,196]. Συνοπτικά η ενεργοποίηση του VDR μπορεί να μειώσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο με τους τρόπους που αναφέρονται πιο κάτω. Η ενεργή βιταμίνη D_3 καταστέλλει την νεφρική και καρδιακή παραγωγή ρενίνης-αγγειοτασίνης με αποτέλεσμα την μείωση της συστηματικής αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής υπερτροφίας. Ως εκ τούτου στον καρδιακό ιστό εμφανίζεται μείωση της ίνωσης. Αυξάνει την ομοιάσταση της γλυκόζης λόγω αύξησης της απελευθέρωσης της ινσουλίνης από το πάγκρεας ή λόγω καταστολής της φλεγμονής. Η μείωση της φλεγμονής μπορεί επίσης να είναι ωφέλιμη και για την αγγείωση και την ενδοθηλιακή λειτουργία. Η πρωτεϊνουρία είναι ένας ακόμα γνωστός καρδιαγγειακός παράγοντας που βελτιώνεται από την ενεργή βιταμίνη D_3 είτε επειδή επηρεάζεται στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης, είτε λόγω βελτίωσης της λειτουργίας των ποδοκυττάρων και των μεσαγγειακών κυττάρων. Επιπλέον η ενεργή βιταμίνη D_3 μπορεί να αναστέλλει την αθηρωμάτωση των αγγείων. [197]

2.3. Ο ρόλος της βιταμίνης D_3 στα ποδοκύτταρα

Η $1,25(OH)_2D_3$ στους νεφρούς πρωτίστως ρυθμίζει την αναρρόφηση του ασβεστίου στα άπω και εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια του νεφρού [198] και καταστέλλει την παραγωγή της ρενίνης ρυθμίζοντας έτσι την αρτηριακή πίεση [199]. Επιπλέον, διάφορες μελέτες με πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η $1,25(OH)_2D_3$ ασκεί νεφροπροστατευτική δράση σε διάφορες χρόνιες παθήσεις των νεφρών προστατεύοντας τα ποδοκύτταρα και προλαμβάνοντας την πρωτεϊνουρία.

Από πειράματα σε ζώα τα οποία υπέστη μερική νεφρεκτομή και χορηγήθηκε $1,25(OH)_2D_3$ έγινε κατανοητό ότι τα ποδοκύτταρα αποτελούν έναν σημαντικό κυτταρικό στόχο των νεφροπροστατευτικών δράσεων της $1,25(OH)_2D_3$. Στο παραπάνω συμπέρασμα οδηγηθήκαμε από το γεγονός ότι η $1,25(OH)_2D_3$ προκαλεί μείωση της βλάβης των ποδοκυττάρων, μειώνει την απώλεια τους και την υπερτροφία τους οπότε μπορεί κατά αυτό τον τρόπο να εξηγηθεί και η μείωση της πρωτεϊνουρίας και της σπειραματοσκλήρυνσης [200]. Και άλλα πειραματικά μοντέλα δείχνουν παρόμοια αποτελέσματα της δράσης της ενεργής βιταμίνης D_3 όπως οι αρουραίοι Wistar ύστερα από χορήγηση anti-Thy 1.1 όπου

μείωθηκε η βλάβη των ποδοκυττάρων όπως αυτή μετρήθηκε ως προς την έκφραση της δεσμίνης, την απώλεια της νεφρίνης και της ZO-1 και του αρνητικού φορτίου των ποδοκυττάρων [201]. Σε αρουραίους με νεφρική βλάβη (ύστερα από την έγχυση PAN) η χορήγηση ενεργής βιταμίνης D₃ μείωσε την απόπτωση των ποδοκυττάρων και την απώλεια της νεφρίνης. Οι δράσεις αυτές οφείλονται τουλάχιστον μερικώς στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt [202] ή του μονοπατιού TGF-beta1/BMP-7 [203].

Επίσης σε ποδοκύτταρα ποντικού *in vitro* η 1,25(OH)₂D₃ δρα προστατευτικά έναντι της υψηλής γλυκόζης μειώνοντας την παραγωγή ινονεκτίνης και κολλαγόνου [204]. Σε ανθρώπινα ποδοκύτταρα βρέθηκε ότι η 1,25(OH)₂D₃ μπορεί να τα προστατεύει από την νεφρική βλάβη που προκαλείται από την νόσο Fabry. Η μελέτη αυτών των ποδοκυττάρων έδειξε ότι η 1,25(OH)₂D₃ μειώνει την παραγωγή ινονεκτίνης, κολλαγόνου CD74 και TGF-β1 [205]. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την έκφραση της νεφρίνης στα ποδοκύτταρα όπου βρέθηκε ότι το γονίδιο της νεφρίνης ελέγχεται από την μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα της βιταμίνης D₃ [114,206-209].

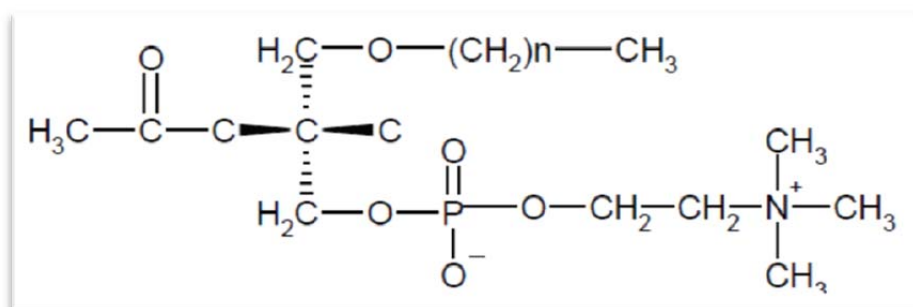
Κεφάλαιο 3 Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και ο ρόλος του στο νεφρό

3.1. Εισαγωγή

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) είναι ένα φωσφολιποειδικής φύσεως μόριο [210], το οποίο αποτελεί τον πιο σημαντικό εκπρόσωπο των γλυκεριναιθερικών λιποειδών. Πληθώρα εργασιών πλέον αναφέρονται τόσο στην δομή και τις λειτουργίες του όσο και στον μεταβολισμό του σε διάφορα κύτταρα, ιστούς και οργανισμούς.

3.2. Δομή του παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Η συστηματική ονομασία του PAF είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη και η δομή του απεικονίζεται στην εικόνα 14 [210]. Υπάρχουν διάφορα είδη ανάλογα με τη σύσταση της λιπαρής αλυσίδας στη θέση *sn*-1. Ο 16:0-PAF φαίνεται να κυριαρχεί έχουν όμως ανιχνευτεί και 17:0, 18:0 και 18:1 PAF [211,212]. Παρότι η φυσιολογική σημασία της ετερογένειας που παρατηρείται στην ανθρακική αλυσίδα δεν είναι γνωστή ο 16:0-PAF παρουσιάζει τη μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα. Στην δεύτερη θέση του γλυκερινικού σκελετού, βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ, το οποίο είναι υπεύθυνο κατά κύριο λόγο για την βιολογική δράση που παρουσιάζει ο PAF. Τέλος, στην τρίτη θέση του σκελετού του PAF υπάρχει η ομάδα της φωσφοχολίνης.



Εικόνα 14 Χημική δομή του PAF

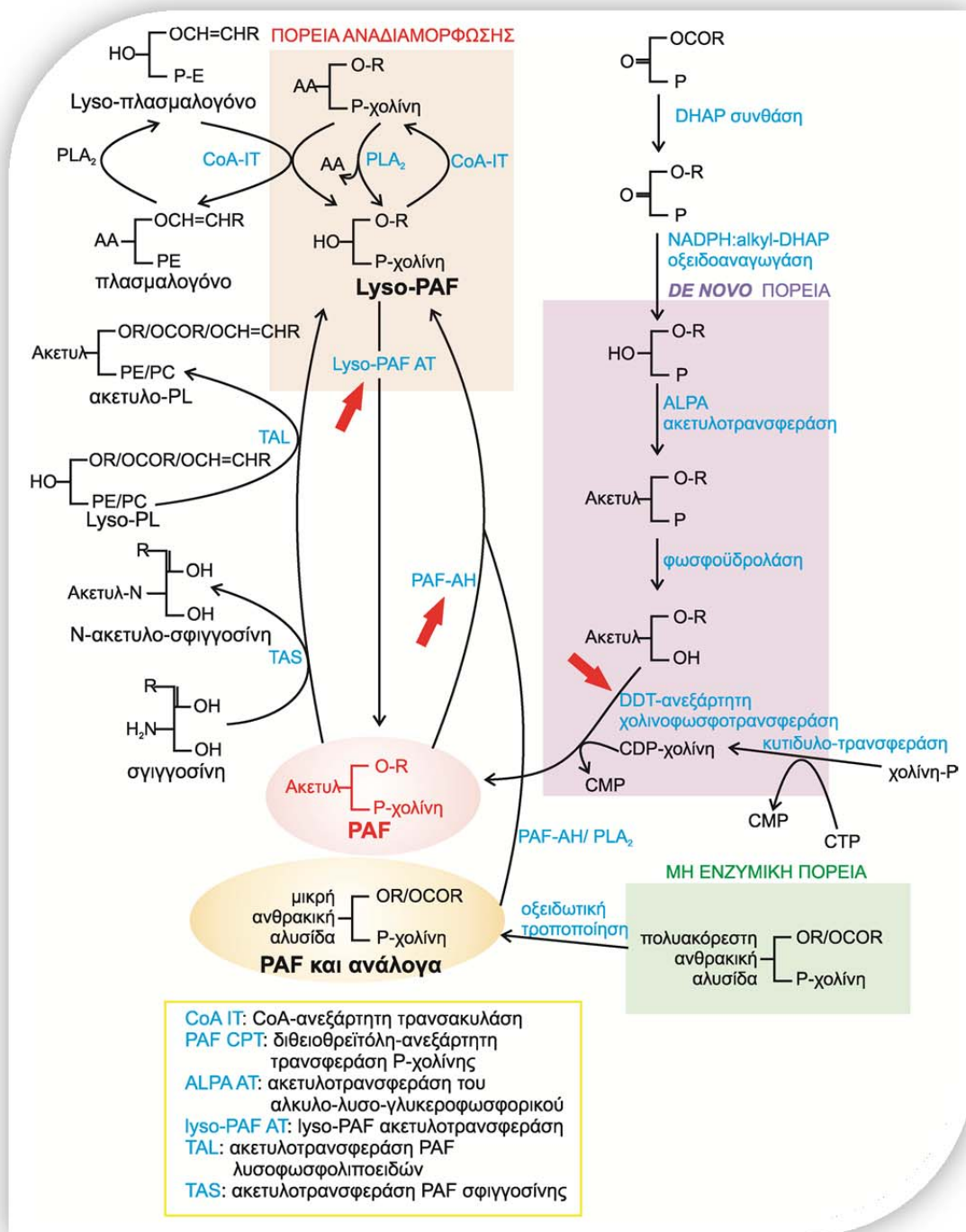
Επιπλέον, στην οικογένεια του PAF ανήκουν και μόρια τα οποία δρουν μέσω υποδοχέων PAF και ονομάζονται PAF-like. Αυτά τα μόρια έχουν είτε ένα

διαφορετικό κορμό, ή διαφορετική πολική ομάδα, ή δεν έχουν αλειφατικές αλυσίδες άνθρακα στην sn-1 θέση, ή έχουν εντελώς διαφορετική χημική δομή.

3.3. Μεταβολισμός του PAF

Η βιοσύνθεση του PAF περιλαμβάνει δυο πορείες: α) την πορεία ανασχηματισμού (remodeling) όπου γίνεται απαλκυλίωση του προδρόμου 1-Ο-αλκυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνης (αλκυλο-PC) και ακετυλίωση του παραγόμενου λυσο-PAF β) την εξ' υπαρχής πορεία (de novo) με μεταφορά φωσφατιδυλοχολίνης σε 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλης. Και οι δυο αυτές πορείες φαίνονται στην εικόνα 15 [213]. Επιπλέον είναι γνωστή και η μη ενζυμική παραγωγή PAF και αναλόγων του μέσω οξειδωτικών καταστάσεων. Ενώ το κυριότερο αποικοδομητικό ένζυμο είναι η ακετυλοϋδρολάση του PAF.

Η σχετική δραστηριότητα των βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων του PAF καθορίζει τόσο τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα όσο και τα επίπεδα του στο πλάσμα. Έχοντας κατά νου την σημασία του PAF σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, η ρύθμιση των μεταβολικών ενζύμων του παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες ή σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι πολλοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως κυτταροκίνες, νευροδιαβιβαστές, ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τον μεταβολισμό του PAF [213].



Εικόνα 15 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του PAF^[213]

3.3.1. *De novo* πορεία βιοσύνθεσης

Περιγραφή της πορείας

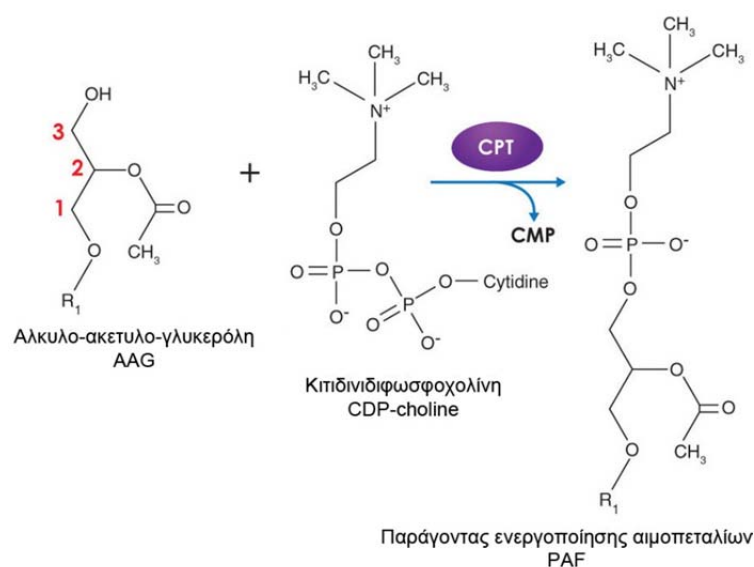
Η κλασική *de novo* πορεία βιοσύνθεσης των γλυκεριναιθερικών αναλόγων ξεκινά με την ακετυλίωση και έπειτα την αποφωσφορυλίωση του 1-αλκυλο-2-λυσσο-sn-

γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος. Αυτές οι αντιδράσεις καταλύονται από ακετυλοτρανσφεράση του ακετυλο-CoA και την φωσφουδρολάση του 1-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος. Στο τέλος της *de novo* πορεία βιοσύνθεσης με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφοχολινοτρανσφεράση του PAF (PAF-CPT) μεταφέρεται η ομάδα της φωσφοχολίνης στη θέση 3 και έτσι ολοκληρώνεται η *de novo* βιοσύνθεση του PAF. Η ενεργοποίηση της PAF-CPT είναι το καθοριστικό στάδιο της πορείας αυτής. Όλα τα ένζυμα της *de novo* βιοσύνθεσης του PAF εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ο PAF δε που παράγεται μέσω αυτής της πορείας μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη, πιθανότατα για να προστατευθεί από τη δράση της PAF ακετυλοϋδρολάσης. Ο PAF παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη και μόνο μετά από κατάλληλα κυτταρικά μηνύματα ελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο.

DTT–ανεξάρτητη

CDP–χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη

φωσφοχολινοτρανσφεράση



Εικόνα 16 Αντίδραση που καταλύεται από την PAF-CPT

Η PAF-CPT υπάρχει σε διάφορους ιστούς θηλαστικών και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου [214]. Το γεγονός ότι η δραστηριότητα της PAF-CPT υφίσταται στον οργανισμό θετική και αρνητική ρύθμιση υποδηλώνει ότι το τελικό στάδιο της *de novo* πορείας μπορεί να είναι σημαντικό στον καθορισμό των ενδογενών επιπέδων PAF. Η PAF-CPT έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ιστούς αρουραίου [214-217] με τον σπλήνα, τον

πνεύμονα, το ήπαρ και το νεφρό να επιδεικνύουν τις υψηλότερες δραστηριότητες της PAF-CPT σε αυτούς τους ιστούς. Το μοριακό βάρος του διαλυτοποιημένου ενζύμου από μικροσώματα σπλήνας χοίρου εκτιμήθηκε με χρωματογραφία στήλης - διηθήσεως μέσω πηκτής στα 440 KDa, τιμή που υποδεικνύει ότι το ένζυμο αυτό σχηματίζει σύμπλοκο με άλλα πρωτεϊνικά σωματίδια και μεμβρανικά φωσφολιποειδή.

Κρίσιμο βοηθητικό ένζυμο, που συνεισφέρει ένα συνυπόστρωμα για την PAF-CPT στην σύνθεση του PAF, είναι η κυτιδιλοτρανσφεράση η οποία σχηματίζει την CDP-χολίνη και σε αντιστοιχία έχει παρόμοιο ρόλο στην κατάλυση μιας καθοριστικής για την ταχύτητα αντίδρασης στην βιοσύνθεση των PC [214]. Η PAF-CPT δεν επηρεάζεται από την θρομβίνη ή από το ιονοφόρο ασβεστίου A23187, ενώ τα ιόντα Ca^{2+} αναστέλλουν τόσο την PAF-CPT όσο και τα υπόλοιπα ένζυμα της *de novo* πορείας [214]. Η PAF-CPT φαίνεται ότι αποτελεί ένα σημαντικό σημείο ελέγχου στην *de novo* βιοσυνθετική πορεία του PAF [214-219]. Επιπλέον, οι νευροδιαβιβαστές ακετυλοχολίνη και ντοπαμίνη καθώς και οι ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ο φορβολικός εστέρας του μυριστικού οξέος (PMA) και η ελαϊλοακετυλογλυκερόλη (OAG) (μόρια που εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις) διεγείρουν την PAF-CPT, ενώ από την άλλη δεν επηρεάζουν τα βιοσυνθετικά ένζυμα της πορείας αναδόμησης [214,218,220,221]. Το ένζυμο αυτό έχει χαρακτηριστεί επίσης *in vitro* στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Παρόλο λοιπόν που η βιοσυνθετική πορεία αναδόμησης του PAF πιστεύεται ότι ενεργοποιείται κάτω από φλεγμονώδεις καταστάσεις, φαίνεται ότι η *de novo* πορεία και συγκεκριμένα το βασικό ρυθμιστικό της ένζυμο PAF-CPT μπορεί να συμβάλουν σε χρόνιες και συστηματικές ασθένειες όπως ο καρκίνος [222] και σχετιζόμενες με την ηλικία βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος [216], μέσω μιας ελαφριάς αλλά μακροχρόνιας ενεργοποίησης της PAF-CPT η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σταθερά αυξανόμενα επίπεδα PAF, τα οποία με την σειρά τους εμπλέκονται σε διάφορες συστηματικές παθολογικές καταστάσεις. Σε αυτό το σημείο είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι αυτού του είδους οι παθολογικές καταστάσεις ίσως είναι δυνατόν να αναστραφούν μέσω μιας ανασταλτικής επίδρασης έναντι της PAF-CPT, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του

PAF. Αυτού του είδους η προσέγγιση έχει ήδη δοκιμαστεί επιτυχώς στην περιπτώση όπου χορηγήθηκε CDP-χολίνη στην αύλακα εγκεφάλου ηλικιωμένων αρουραίων (ένα μόριο που παρουσιάζει ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορες ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος και ειδικά στην ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη) και οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα PAF και κατά συνέπεια σε αναστολή της προόδου του όγκου αλλά και διαφόρων επιπλοκών του κεντρικού νευρικού συστήματος αντίστοιχα [216,222].

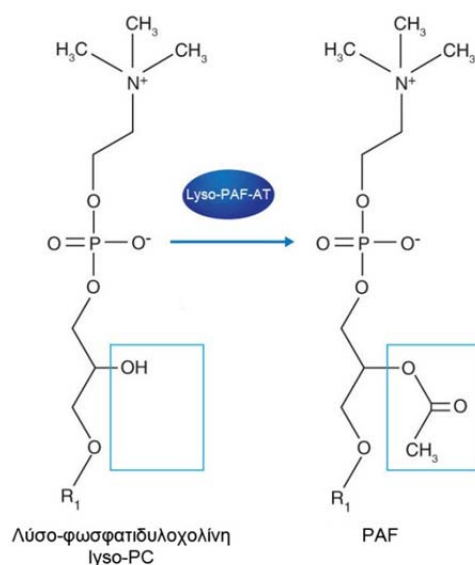
3.3.2. Remodeling πορεία (Πορεία ανασχηματισμού)

Περιγραφή της πορείας

Η remodeling βιοσύνθεση του PAF από αλκυλο-ακυλο-GEPC με διαδοχικές δράσεις της PLA₂ και μιας ακετυλοτρανσφεράσης (λυσο-PAF-AT) αποτελεί το ήμισυ του κύκλου απακυλίωσης - επανακυλίωσης του PAF. Η remodeling βιοσύνθεση του PAF περιλαμβάνει δομικές μεταβολές των προϋπαρχουσών γλυκεριναιθερικών αναλόγων της φωσφατιδυλο-χολίνης τα οποία αποτελούν δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η βιοσυνθετική αυτή πορεία εξαρτάται από τη διέγερση του κυττάρου. Κατά την διέγερση, η κυτταροπλασματική φωσφολιπάση A₂ (cPLA₂) ενεργοποιείται και συνδέεται με την μεμβράνη, στη συνέχεια απακυλώνει (sn-2 θέση) την αλκυλο-ακυλο-GEPC και την μετατρέπει σε 1-O-αλκυλο-2-λυσο-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (λυσο-PAF). Στη συνέχεια, μεταφέρει την ακετυλομάδα ενεργοποιημένη σαν ακετυλο-CoA στον λυσο-PAF παράγοντας PAF. Το τελευταίο στάδιο θεωρείται σημαντικό για την ταχύτητα βιοσύνθεσης του PAF. Όσον αφορά τον χημικό δεσμό στην θέση 1 (sn-1), τα δύο ένζυμα της πορείας (cPLA₂, λυσο-PAF-AT) αναγνωρίζουν τρεις τάξεις υποστρωμάτων την φωσφατιδυλοχολίνη (PC), την ακυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (acyl-PC (εστερικός δεσμός)), την αλκυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (alkyl-PC (αιθερικός δεσμός)) και την αλκενυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (alkenyl-PC (βινυλαιθερικός δεσμός)). Επιπλέον, κάθε τάξη υποστρωμάτων περιέχει πολλά μέλη όποτε κατά αυτόν τον τρόπο εξηγείται και η ποικιλία των μοριακών ειδών του PAF. Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι το αραχιδονικό οξύ (AA), σύμφωνα με τις μέχρι τώρα ενδείξεις, είναι ένα από τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται εστεροποιημένα στη θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού της αλκυλο-ακυλο-GEPC κατά τον κύκλο απακυλίωσης - επανακυλίωσης. Έτσι η αλκυλο-ακυλο-GEPC είναι και πρόδρομη

ένωση για το σχηματισμό του PAF αλλά και σπουδαία πηγή για το αραχιδονικό οξύ και τους μεταβολίτες του. Εκτός από την άμεση απακυλίωση των μεμβρανικών γλυκεροφωσfolιπιδίων, υπάρχει και ένα ακόμα μονοπάτι παραγωγής των 2-λυσσο-φωσfolιπιδίων. Στην περίπτωση αυτή ο λύσο-PAF μπορεί να παραχθεί από μια αντίδραση τρانشακετυλίωσης ανεξάρτητη από το συνένζυμο A ανάμεσα στην αλκυλ-ακυλ-γλυκεροφωσφοχολίνη και ένα δέκτη λυσοφωσfolιπιδίων μέσω της PLA₂ [223-225].

Ακετυλο-CoA:λυσσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (EC 2.3.1.67)



Εικόνα 17 Αντίδραση που καταλύεται από την PAF-AT

Το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσσο-PAF-AT) μεταφέροντας μια ακετυλο-ομάδα από το ακετυλο-CoA στον λυσο-PAF καταλύει την τελευταία αντίδραση για το σχηματισμό του PAF στην πορεία ανασχεδιασμού. Η λυσο-PAF-AT είναι μεμβρανική πρωτεΐνη και η μεγαλύτερη δραστηριότητα της εντοπίζεται στο κλάσμα των μικροσωμάτων διαφόρων ιστών και κυττάρων του αίματος που παράγουν PAF [226-228]. Επιπλέον το ένζυμο αυτό έχει χαρακτηριστεί σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα όπου βρέθηκε ότι έχει μοριακό βάρος 45 kD [229] αλλά και βρέθηκε και σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό [230]. Μελέτες υποκυτταρικής κατανομής καταδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη, τα τριτοταγή κοκκία στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα και σε ενδοκυτταρικά κοκκία ύστερα από διέγερση με A23187 [231]. Περαιτέρω

μελέτες έδειξαν ότι η κατανομή της δραστηριότητας του ενζύμου είναι ίδια και στα κύτταρα HL-60 όπου εντοπίστηκε κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο [232]. Το ένζυμο εμφανίζει ευρεία εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα. Ως υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν η 1-ακυλο-2-λυσο-PC, 1-ακυλο-1-ενυλο-2-λυσο-PE, 1-ακυλο-2-λυσο-PE, 1-ακυλο-2-λυσο-γλυκερομονομεθυλοαιθανολαμίνη και 1-ακυλο-2-λυσο-γλυκερο-3-N',N'διμεθυλοαιθανολαμίνη [226,227,233-235]. Ωστόσο το 3-O-ακυλο-2-λυσο-sn-γλυκερο-1-φωσφοχολίνη δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου φανερώνοντας τη στερεοειδικότητά του. Το ένζυμο έχει υψηλότερη δραστηριότητα για τα C₁₆ λυσο-φωσφολιπίδια παρά για τα C₁₈ ανάλογα [236]. Μικρής αλυσίδας ακυλο-CoA, από 2 ως 6 άτομα άνθρακα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα της ακετυλοτρανσφεράσης [237]. Το κλωνοποιημένο ένζυμο της λυσο-PAF-AT καταλύει όχι μόνο την βιοσύνθεση του PAF αλλά επίσης και την μεταφορά των AA από το αραχιδοנוύλο-CoA για να παράγει τελικά PAF από πρόδρομα μεμβρανικά γλυκεροφωσφολιπίδια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ένζυμο προτιμά το αραχιδοנוύλο-CoA και συμβάλλει κατά αυτόν τον τρόπο στη βιογένεση της μεμβράνης. Σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής η διέγερση με λιποσακχαρίτες (LPS) οδηγεί στην ενεργοποίηση του ενζύμου έτσι ώστε να χρησιμοποιεί πιο αποτελεσματικά το ακετυλο-CoA και να παράγει PAF [238]. Η λυσο-PAF-AT εμφανίζει δραστηριότητα εξαρτώμενη από τα επίπεδα ασβεστίου, με βέλτιστο pH δράσης περίπου 7,4 και αναστέλλεται η δράση της από χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA, EGTA, Mn²⁺, Mg²⁺, p-βρωμο-φαινυλο-ακυλοβρωμίδιο, δι-ισοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό, N-αιθυλαμίδιο [230,239,240]. Μελέτες που έχουν γίνει σε σπλήνα αρουραίου, σε ανθρώπινα ουδερόφιλα, σε παρωτίδες αδένες ινδικού χοιριδίου και σε μαστοκύτταρα ποντικού δείχνουν ότι η λυσο-PAF-AT ενεργοποιείται και απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης /αποφωσφορυλίωσης [241-244]. Ορισμένοι από τους ενεργοποιητές της λυσο-PAF-AT φαίνονται στον πίνακα ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι και ο ίδιος ο PAF έχει αναφερθεί να ενεργοποιεί την λυσο-PAF-AT και επομένως τη παραγωγή του σε PMN ανθρώπου και αρουραίου [245]. Ενώ μια σειρά φυσικών και συνθετικών ενώσεων αναστέλλουν τη δραστηριότητα της λυσο-PAF-AT οι κυριότερες φαίνονται στον πίνακα. Τα παλμιτοϋλο-CoA, ελαϋλο-CoA και αραχιδοנוύλο-CoA, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και 1-παλμιτοϋλο-2-λυσο-γλυκεροφωσφοχολίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς της ακετυλοτρανσφεράσης [226,233,246]. Τα

στεροειδή όπως το δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) και η μεδροξυπρογεστερόνη (medroxyprogesterone) αναστέλλουν την λυσο-PAF-AT ενώ η 17a-ethynylestradiol δεν την επηρεάζει [247].

Πίνακας 4 Ενεργοποιητές και αναστολείς του ενζύμου λυσο-PAF-AT

		Κύτταρα
Ενεργοποιητές	Ανθρώπινα PMN	
	Αντιγόνο	Μαστοκύτταρα ποντικού
	Άσθμα	Ουδετρόφιλα ασθματικών ασθενών
	Ανθρώπινα ουδετερόφιλα	
	Ηωσινοφιλία	Ανθρώπινα ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα
	fMLP	Ανθρώπινα ηωσινόφιλα,
	IL-8	Ανθρώπινα PMN
	Ινομυκίνη	Κύτταρα σιελογόνου αδένα σκύλου
	A23187	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα
	IL1	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα
	LPS	Ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα
	PAF	Ανθρώπινα ουδετερόφιλα και ουδετερόφιλα ποντικού, LRP ανθρώπινο
	Φαγοκύτωση	Ανθρώπινα PMN
	Πορίνες	Ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα
	Ανθρώπινα PMN	
	Θρομβίνη	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα
	TNF	Ανθρώπινα ουδετερόφιλα
	Κουνέλι	
	Οξειδωτικό στρες (έλλειψη Se)	Βόειος ενδοθηλιακά κύτταρα
	Ανεπάρκεια βιταμίνης E	PMN λευκοκύτταρα ποντικού
Αναστολείς	Αραχιδονικό οξύ, ελαϊκό οξύ και αραχιδονυλο- CoA	Διεγερμένα με A23187 ουδετερόφιλα βοδιού
	ελαΰλο- CoA	Μακροφάγα ποντικού
	παλμιτοϋλο- CoA	Σπλήνα αρουραίου
	ZG-1494 alpha	HL-60
	Ταννίνες, πολυφαινόλες	Λεμφαδένια
	MgATP	190
	Manololol, honokiol	Μικροσώματα σπλήνας αρουραίου, Ανθρώπινα PMN
	Δεξαμεθαζόνη, μεδροξυπρογεστερόνη	Ιστοί αρουραίου

στον εξωκυτταρικό χώρο (LpPLA₂), καθώς εκκρίνεται π.χ. στο πλάσμα σαν εξωένζυμο συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες [248,249]. Δραστικότητα λοιπόν, ακετυλοϋδρολάσης έχει βρεθεί σε διαλυτά κλάσματα πολλών ιστών, κυττάρων αλλά και στο πλάσμα του αίματος.

3.4. Κύτταρα που συνθέτουν PAF

Πολλά κύτταρα και ιστοί παράγουν PAF ως απόκριση σε εξωγενή ερεθίσματα. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται τα κύτταρα και οι ιστοί που παράγουν PAF

Πίνακας 5 Κύτταρα και ιστοί που παράγουν PAF^[250]

Κύτταρα / Ιστός	Είδος	Διεγέρτης
Ουδετερόφιλα		A23187, f-Met-Leu-Phe, LPS, GM-CSF, zymosan
	Άνθρωπος	IL-6, GM-CSF
PMN	Άνθρωπος	zymosan
Ηωσινόφιλα		A23187, f-Met-Leu-Phe, IgE, zymosan
	Άνθρωπος	IgG, IL-5, PMA
Αιμοπετάλια		Θρομβίνη, A23187
Μακροφάγα	Ποντίκι	HGF, TNF
	Αρουραίος	Zymosan,
		A23187, LPS
Μονοκύτταρα		IL-1, IFN-γ, TNF
	Άνθρωπος	LPS
Ενδοθηλιακά		Θρομβίνη, TNF, IL-1, LTC ₄ /D ₄ , ισταμίνη, ATP, ενδοτοξίνη
	Άνθρωπος	LPS
	Βόδι	VEGF
Μεσαγγειακά	Άνθρωπος	IL-12, LPS
Απομονωθέντα σπειράματα		A23187
Νεφρικός φλοιός και μυελός	Αρουραίος	Τομή νεφρού

3.5. Δράσεις του PAF στα κύτταρα

Εκτός από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων έχουν αποδοθεί στον PAF, στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι κύριες δράσεις του PAF στα κύτταρα.

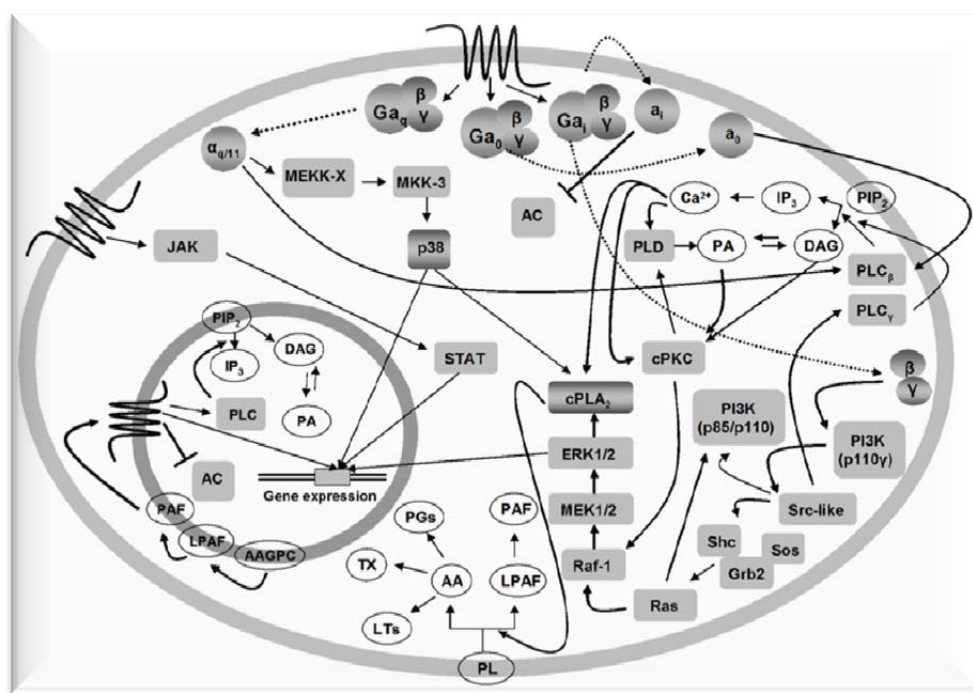
Πίνακας 6 Βιολογικές δράσεις PAF

Κύτταρα	Είδος	Δράση
Πολυμορφοπύρηνα		Συσσώρευση, αποκοκκίωση, χημειοτακτισμός
Αιμοπετάλια	Άνθρωπος, κουνέλι	Συσσώρευση, αποκοκκίωση
		Αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{+2}
		Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών
Ηωσινίφιλα	Άνθρωπος	Χημειοτακτισμό
	Άνθρωπος	Σχηματισμός υπεροξειδίων και LTC ₄
	Ινδικό χοιρίδιο	Συσσωμάτωση
	Ινδικό χοιρίδιο	Αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+}
	Άνθρωπος	Μετανάστευση μέσω επιθηλιακών κυττάρων
	Άνθρωπος	Αποκοκκίωση, πολυμερισμός ακτίνης θετική ρύθμιση Mac-1 L-σελεκτίνη, έκκριση IL-8
	Ινδικό χοιρίδιο	Σχηματισμός υπεροξειδίων και LTC ₄ , TXB ₂
Ουδετερόφιλα	Άνθρωπος	Σχηματισμός υπεροξειδίου
Λεμφοκύτταρα	Άνθρωπος	Μετανάστευση
Μακροφάγα	Ανθρώπινα	cAMP
	Άλογο (περιτονιακά)	TXB ₂
	Άνθρωπος (περιτονιακά)	PGI ₂
	Ποντίκι (J774A)	Ενεργοποίηση NF-κB
Μονοκύτταρα	Άνθρωπος	Σχηματισμός IP ₃ , ενεργοποίηση Ca^{2+} , LT
Ενδοθηλιακά	Άνθρωπος	Αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+}
	Άνθρωπος	Αλλαγή σχήματος, μετανάστευση
Επιθηλιακά	Άνθρωπος	Αύξηση της διαπερατότητας σε ηωσινόφιλα
	Ινδικό χοιρίδιο	Έκκριση GM-CFS
	Γάτα	Έκκριση αραχιδονικού
	Άνθρωπος	Ενεργοποίηση AP-1

3.6. Μηχανισμός δράσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Ο PAF δρα μέσω ειδικού μεμβρανικού υποδοχέα (PAFR), ο οποίος συνδέεται με G πρωτεΐνες. Μέσω αυτής της δέσμευσης μπορεί να ενεργοποιεί μια ποικιλία δεύτερων μηνυμάτων, συμπεριλαμβανομένων του ασβεστίου, του cAMP, της διακυλογλυκερόλης (DAG), 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλης (IP₃). Επίσης έχει

βρεθεί ότι ενεργοποιεί αρκετές κινάσες και ειδικότερα τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPK, τις πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PKT), την κινάση της 3-φωσφατιδυλο ινοσιτόλης (PI3K) και τις κινάσες των G πρωτεϊνών αλλά και φωσφολιπάσες και ειδικότερα τη φωσφολιπάση C (PLCβ, PLCγ), τη PLD και τη κυτοπλασματική PLA₂, επιπλέον έχει αναφερθεί καταστολή της αδενυλικής κυκλάσης από τον PAF. Στην εικόνα 19 δίνονται οι δρόμοι μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα του PAF.



Εικόνα 19 Σηματοδοτικά μονοπάτια του PAF

3.7. Η σημασία του PAF στην χρόνια νεφρική νόσο

Μεγάλο μέρος των μελετών για τις δράσεις του PAF στους νεφρούς έχει επικεντρωθεί στο ρόλο του PAF στην νεφρική αγγείωση και την σπειραματική λειτουργία. Αυτό είναι κατανοητό, δεδομένου ότι οι ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF έχουν ευεργετικές δράσεις σε πολλές νεφρικές παθήσεις λόγω βελτίωσης της αγγειακής και σπειραματικής λειτουργίας [251,252]. Ο PAF είναι πιθανό να δρα και στα σωληναριακά κύτταρα, επειδή το mRNA του υποδοχέα του PAF υπάρχει σε όλα τα τμήματα του νεφρώνα, ωστόσο εκφράζεται περισσότερο στο εγγύς σωληνάριο και η έκφραση αυτή είναι συγκρίσιμη με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται στο σπείραμα [253]. Είναι γνωστό ότι τα σπειραματικά και τα νεφρικά διάμεσα κύτταρα του μυελού μπορούν

να παράγουν PAF [254]. Επιπλέον, ο PAF του πλάσματος μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα, μέσω της σπειραματικής διήθησης και/ή να συντεθεί και δυνητικά να απελευθερωθεί από φλεγμονώδη κύτταρα του αίματος τα οποία διεισδύουν στο νεφρό σε παθολογικές καταστάσεις. Μελέτες σε σκύλους και αρουραίους έχουν δείξει ότι γενικά η χορήγηση PAF συνδέεται με μείωση της ουρικής έκκρισης του νερού και των ηλεκτρολυτών, που είναι αποτέλεσμα της προκαλούμενης από PAF πτώσης της συστηματικής αρτηριακής πίεσης, του όγκο των εξωκυτταρικών υγρών και της καρδιακής παροχής (cardiac output) και/ή της προκαλούμενης από PAF πτώσης του νεφρικού ρυθμός ροής του αίματος (RBF) και του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης [251,254-257].

Επιπλέον σε αιμοκαθαρούμενους ασθενείς συντίθεται PAF και παράλληλα αυξάνει το οξειδωτικό στρες από τα πρώτα λεπτά της επαφής του αίματος με τις μεμβράνες αιμοκάθαρσης όπως η κουπροφάνη [258] ή η AN69 [259]. Επίσης ο PAF έχει επιπτώσεις στις δράσεις των ουδετερόφιλων [258,260,261].

Παρόλο το μεγάλο αριθμό μελετών για την εμπλοκή του PAF στη νεφρική βλάβη ελάχιστες μελέτες υπάρχουν σε ανθρώπους. Μια πρώτη αναφορά έγινε από τον Sanchez-Crespo σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και σπειραματοπάθεια που ανιχνεύτηκαν μεγαλύτερα ποσά PAF δραστηριότητας στα ούρα σε σχέση με τους φυσιολογικούς [262]. Αργότερα βρέθηκε ότι σε ασθενείς με μεμβρανοειδή νεφροπάθεια τα επίπεδα του PAF ήταν αυξημένα στα ούρα των ασθενών ενώ η δραστηριότητα της PAF-AH στα ούρα ήταν παρόμοια στους ασθενείς και υγιείς αποκλείοντας το ενδεχόμενο η αύξηση να οφείλεται σε μειωμένη αποικοδόμηση [263]. Στην ίδια μελέτη βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα PAF στο αίμα των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς υποδηλώνοντας ότι οι νεφροί οφείλεται για τα αυξημένα επίπεδα PAF. Παρόμοια μελέτη έγινε και από την ερευνητική μας ομάδα σε ασθενείς με πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα όπου τα αποτελέσματα έδειξαν το αντίθετο αποτέλεσμα αφού ανιχνεύτηκαν χαμηλά επίπεδα PAF στα ούρα και υψηλά στο αίμα [264]. Σε ασθενείς με ιδιοπαθές νεφρωτικό σύνδρομο βρέθηκαν υψηλά επίπεδα PAF στα ούρα [265], ενώ σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια βρέθηκαν υψηλά επίπεδα PAF και χαμηλή δραστηριότητα PAF-AH στο αίμα [266]. Η ιδιαίτερη σημασία της μελέτης του PAF σε αυτούς τους ασθενείς εντοπίζεται επιπλέον στο γεγονός ότι οι ασθενείς αυτοί

εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων στα οποία ο PAF διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο.

3.9. Αναστολείς του PAF

Πάρα πολλά μόρια έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση του PAF, είτε δρώντας άμεσα ανταγωνιστικά ή συναγωνιστικά καθώς συνδέονται με τον υποδοχέα του PAF, είτε μέσω άλλων μηχανισμών πολλοί από τους οποίους δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως αλλά φαίνεται ότι σχετίζονται τόσο με αλλαγές στο μεμβρανικό μικροπεριβάλλον του υποδοχέα του PAF όσο και με τη γενική αντιοξειδωτική δράση αυτών των μορίων.

Οι ανταγωνιστές διαχωρίζονται αρχικά στους ειδικούς και μη ειδικούς για PAF. Στους ειδικούς εντάσσονται οι φυσικοί ανταγωνιστές, οι συνθετικοί ανταγωνιστές/δομικά ανάλογα του PAF και άλλοι συνθετικοί ανταγωνιστές. Οι πιο ευρύς διαδεδομένοι φυσικοί ανταγωνιστές του PAF είναι τα γκινγκολίδια, έχουν απομονωθεί από τα φύλλα του φυτού *Ginkgo Biloba*. Το πιο δραστικό μέλος της είναι το γκινγκολίδιο B (BN52021). Ενώ στη κατηγορία συνθετικών αναστολέων ανήκουν οι ετεροκυκλικές ενώσεις με άτομα αζώτου (sp^2), οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα μέσω δεσμών υδρογόνου. Κύρια δομικά χαρακτηριστικά της ομάδας αυτής είναι η ύπαρξη θείου και καρβονυλικής ομάδας. Η άλλη μεγάλη κατηγορία αναστολέων είναι οι μη ειδικοί ανταγωνιστές οι οποίοι είναι ενώσεις που επηρεάζουν τις δράσεις του τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συστήματα. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να επιδρούν στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου είτε άμεσα μπλοκάροντας τα κανάλια ασβεστίου (nifedipine), και αναστέλλοντας την καλμοδουλίνη (W-7), είτε έμμεσα αλλάζοντας τα επίπεδα του cAMP (PGI₂, PGE₁ και β 2-ανταγωνιστές) και του cGMP. Οι δράσεις του PAF ανταγωνίζονται επίσης από αναστολείς της σύνθεσης των λευκοτρενίων και των θρομβοξανίων και από διάφορες ενώσεις όπως η ατροπίνη, ναλοξόνη.

B. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των δράσεων της ενεργής βιταμίνης D₃ (1,25(OH)₂D₃) και του αναλόγου της -παρικαλσιτόλη- σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού σπειράματος. Το θέμα προσεγγίστηκε αρχικά μελετώντας τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ και της παρικαλσιτόλης *in vitro* ως προς την συσσώρευση αιμοπεταλίων. Επιπλέον η αντιφλεγμονώδης δράση της παρικαλσιτόλης μελετήθηκε *in vitro* ως προς τα ένζυμα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF). Η δράση της παρικαλσιτόλης μελετήθηκε *in vivo* σε αιμοκαθαρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης ως προς τα ένζυμα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του PAF αλλά και ως προς άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες. Ωστόσο προκειμένου να μελετηθούν και οι μοριακοί μηχανισμοί της νεφροπροστατευτικής δράσης της 1,25(OH)₂D₃ και της παρικαλσιτόλης χρησιμοποιήθηκαν αθανатоποιημένα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού σπειράματος όπου μελετήθηκε η έκφραση πρωτεϊνών η οποίες είναι απαραίτητες για την φυσιολογική μορφολογία και λειτουργία αυτών των κυττάρων.

Κεφάλαιο 5 Μέθοδοι

5.1. Σχεδιασμός κλινικής μελέτης

Φαινομενικά υγιείς εθελοντές

Επιλέχθηκαν 17 φαινομενικά υγιείς εθελοντές (5 άνδρες, 12 γυναίκες) για την ομάδα ελέγχου με μέση ηλικία τα 63 έτη. Οι εθελοντές ήταν ενήμεροι για την μελέτη και συμφώνησαν για την πραγματοποίηση της ενώ όλη η μελέτη ήταν σύμφωνη με την επιτροπή βιοηθικής. Κριτήρια αποκλεισμού ήταν η λήψη αντιβιοτικών ή αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

Αιμοκαθαιρούμενοι ασθενείς

Επιλέχθηκαν 7 αιμοκαθαιρούμενοι ασθενείς (4 άνδρες, 3 γυναίκες) με μέσω δείκτη μάζας σώματος (BMI) $22,3 \text{ kg/m}^2$ και μέση ηλικία τα 53,4 έτη. Οι αιμοκαθαιρούμενοι έλαβαν δια του στόματος $2 \mu\text{g}/\text{ημέρα}$ παρικαλσιτόλη για ένα μήνα. Κατά την διάρκεια αυτού του μήνα δεν διαπιστώθηκε κάποιου είδους μόλυνση. Δείγματα αίματος από αυτούς τους ασθενείς ελήφθησαν πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα. Όλοι οι ασθενείς δεν έπαιρναν νωρίτερα παρικαλσιτόλη ή κάποιο άλλο είδος βιταμίνης D_3 εκτός από ερυθροποιητίνη και όξινο ανθρακικό ασβέστιο (calcium bicarbonate) κατά την διάρκεια των τελευταίων τριών μηνών πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου. Οι συνθήκες αιμοκάθαρσης παρέμειναν σταθερές κατά την διάρκεια της χορήγησης της παρικαλσιτόλης. Οι ασθενείς ήταν ενήμεροι για την μελέτη και συμφώνησαν για την πραγματοποιησή της ενώ όλη η μελέτη ήταν σύμφωνη με την επιτροπή βιοηθικής.

5.2. Παραλαβή δειγμάτων αίματος και κυτταρική κλασμάτωση αίματος.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών: $0,1365 \text{ g/ml}$ κιτρικό οξύ και $2,5 \text{ g/ml}$ κιτρικό νάτριο
- Διάλυμα δεξτράνης: 3% δεξτράνη σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου $0,15 \text{ M}$
- Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων: 155 mM χλωριούχο αμμώνιο, 10 mM ανθρακικό κάλιο και $0,1 \text{ mM}$ διάλυμα EDTA

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris: 50 mM Tris με τελικό pH 7,4

Αναλυτική πορεία

Παρελήφθησαν 9 ml αίματος από κάθε ασθενή (μετά από ολονύχτια νηστεία) σε 1 ml αντιπηκτικού διαλύματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 194 x g για 10 λεπτά στους 25°C. Έπειτα ακολούθησαν τα εξής:

A) Απομόνωση πλάσματος

Το υπερκείμενο των 194 x g (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια) φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 1400 x g για 20 λεπτά στους 25°C. Το υπερκείμενο (πλάσμα) φυγοκεντρήθηκε στα 20,000 x g για 1 ώρα στους 4°C. Το υπερκείμενο αυτό αποθηκεύτηκε στους -80°C.

B) Απομόνωση αιμοπεταλίων

Το ίζημα της δεύτερης φυγοκέντρησης αναδιαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό και φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 1400 x g για 20 λεπτά στους 25°C έτσι ώστε να απομακρυνθεί τυχόν παραμένουσα ποσότητα πλάσματος. Το ίζημα αυτής της φυγοκέντρησης (αιμοπετάλια) αναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος αναδιάλυσης και τα κύτταρα λύθηκαν με την χρήση υπερήχων στους 4°C (4x15s). Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 500 x g για 10 λεπτά στους 4°C, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα, οι πυρήνες και τα συσσωματώματα, ενώ το υπερκείμενο (ομογενοποίημα αιμοπεταλίων) μετά τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Γ) Απομόνωση λευκοκυττάρων

Το ίζημα της πρώτης φυγοκέντρησης (λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα) αναδιαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό μέχρι τελικού όγκου 10 ml και μετά από ήπια ανάδευση μοιράστηκε σε δυο ίσα μέρη των 5 ml όπου πραγματοποιήθηκε απομόνωση των λευκοκυττάρων από τα ερυθροκύτταρα με καθίζηση. Για να επιτευχθεί αυτός ο διαχωρισμός προστέθηκαν 1,7 ml διαλύματος δεξτράνης και το δείγμα παρέμεινε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δύο υπερκείμενα τα οποία ήταν πλούσια σε λευκοκύτταρα μετά την ένωση τους φυγοκεντρήθηκαν στα 500 x g για 10 λεπτά στους 25°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα τα εναπομείναντα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με την προσθήκη 5 ml του διαλύματος λύσης και απομακρύνθηκαν

με φυγοκέντρηση στα 300 x g για 10 λεπτά στους 25°C. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκαν σε 1 ml διαλύματος Tris και τα κύτταρα έσπασαν με την χρήση υπερήχων στους 4°C (4x15s). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 500 x g για 10 λεπτά στους 4°C, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα, οι πυρήνες και τα συσσωματώματα, ενώ το υπερκείμενο (ομογενοποίημα λευκοκυττάρων) μετά τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Δ) Απομόνωση ερυθροκυττάρων

Μετά την προσθήκη δεξτράνης και την απομάκρυνση του υπερκειμένου που είναι πλούσιο σε λευκοκύτταρα, παρελήφθησαν 0,5 ml από το ίζημα (ερυθροκύτταρα) και αναδιαλύθηκε σε 2,5 ml φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 200 x g για 10 λεπτά στους 25°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο καθαρό πλέον ίζημα των ερυθροκυττάρων προστέθηκε 2,5 ml διαλύματος αναδιάλυσης και ακολούθησε ομογενοποίηση ύστερα από ισχυρή ανάδευση για ένα λεπτό. Το ομογενοποίημα των ερυθροκυττάρων φυγοκεντρήθηκε στα 20.000 x g για 1 ώρα στους 4°C. Το υπερκείμενο μετά τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης αποθηκεύτηκε στους -80°C.

5.3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) 2 mg/ml
- Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce)
- Απεσταγμένο νερό
- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών για φωτομέτρηση των δειγμάτων από τις κυτταρο-καλλιέργειες
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φωτόμετρο Microplate Reader (Tecan, Infinite M200)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford είναι μια από τις μεθόδους προσδιορισμού που χρησιμοποιείται συχνά για την μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα [267]. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική ανάλογα με τις συνθήκες υπάρχει σε τρεις μορφές σε ισχυρά όξινο περιβάλλον είναι πιο σταθερή στην διπλά πρωτονιωμένη μορφή της η οποία εμφανίζει κόκκινο χρώμα, όταν όμως συνδέεται με πρωτεΐνη πιο σταθερή είναι στην μη πρωτονιωμένη μπλέ μορφή.

Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm (καφέ χρώμα) στα 595 nm (μπλε χρώμα). Τόσο οι υδροφοβικές όσο και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν στην ανιοντική μορφή της χρωστικής, προκαλώντας ορατή αλλαγή χρώματος. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιείται σε 5 λεπτά και είναι σταθερό για 45 λεπτά. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό ώστε η τελική του συγκέντρωση να βρίσκεται στην περιοχή από 0,045-0,356 µg/ml. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 1 ml. Προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αναδεύονται έντονα στο κυκλοαναδευτήρα και μετά από παραμονή 5 λεπτών μετράται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.4. Ενζυμικές δοκιμασίες

5.4.1. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηρότητας της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινοτρανσφεράσης του PAF (PAF-CPT)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αιθανολικό διάλυμα 1-O-αλκυλο-2-*sn*-ακετυλο-γλυκερόλη (AAG) 10mM (BIOMOL Int. L.P)

- Διάλυμα CDP-Χολίνης: Διάλυμα φύλαξης CDP-Χολίνης 100 mM και διάλυμα εργασίας CDP-Χολίνης 4mM σε αποσταγμένο νερό.
- Διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT): 0,2 M (Sigma) σε αποσταγμένο νερό.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 100 mM σε νερό με τελικό pH 8,0.
- Διάλυμα EDTA 20 mM σε Tris-HCl 100 mM pH 8,0.
- Διάλυμα χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) (Sigma): διάλυμα φύλαξης $MgCl_2$ 2,1 M και διάλυμα εργασίας $MgCl_2$ 0,4 M σε Tris-HCl.
- Οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA): διάλυμα φύλαξης BSA 100 mg/ml και διάλυμα εργασίας BSA 40 mg/ml σε φυσιολογικό ορό.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου (PAF-CPT) βασίζεται στην μέτρηση των επιπέδων του παραγομένου PAF. Ο PAF σχηματίζεται ως προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης με μεταφορά της ομάδας της φωσφοχολίνης από την CDP-Χολίνη στην AAG. Μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με AAG και CDP-Χολίνη, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται 10 μl διαλύματος εργασίας $MgCl_2$, 5 μl διαλύματος EDTA (τελική συγκέντρωση 0,5 mM), 15 μl διαλύματος DTT (τελική συγκέντρωση 15 mM), 5 μl διαλύματος εργασίας BSA (τελική συγκέντρωση 1 mg/mL) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης Tris-HCl. Ακολουθεί κυκλοανάδευση με χρήση του vortex και το όλο μίγμα επωάζεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Στο μίγμα αυτό προστίθενται 10 μg ενζυμικό παρασκεύασμα με ανάδευση και μετά από 30 δευτερόλεπτα προστίθενται 2 μl αιθανολικού διαλύματος AAG (τελική συγκέντρωση 100 mM) με ανάδευση, ενώ μετά από άλλα 30 sec προστίθεται 5 μl διαλύματος εργασίας CDP-Χολίνης (τελική συγκέντρωση 100 mM) με ανάδευση, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Ο τελικός όγκος της ενζυμικής αντίδρασης είναι 200 μl. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοστατούμενο

υδρόλουτρο στους 37°C για 20 λεπτά και σταματά με την προσθήκη 0,5 ml διαλύματος μεθανόλης που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζύμου.

5.4.2. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηρότητας της 1-O-ακυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (Λυσο-PAF AT).

Αντιδραστήρια-όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris-HCl 50 mM pH 7,4
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA) (Sigma): Διάλυμα φύλαξης BSA 100 mg/ml και διάλυμα εργασίας BSA 12,5 mg/ml σε φυσιολογικό ορό.
- Διάλυμα λύσο-PAF(Sigma): Διάλυμα φύλαξης λύσο-PAF 4,11mM σε μεθανόλη και διάλυμα εργασίας λύσο-PAF 1000 μM σε BSA 12.5 mg/mL όπου η τελική συγκέντρωση του λύσο-PAF και της BSA στην ενζυμική δοκιμασία είναι 20 μM και 0,25 mg/mL αντίστοιχα.
- Διάλυμα ακετυλο-συνεζύμου A (Sigma): Διάλυμα φύλαξης 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της δραστηρότητας του ενζύμου (PAF-AT) βασίζεται στην μέτρηση των επιπέδων του παραγομένου PAF. Ο PAF σχηματίζεται ως προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης με μεταφορά της ακετυλο-ομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο A στο λυσο-PAF. Μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται 4 μl διαλύματος εργασίας λύσο-PAF, 2 μl διαλύματος ακετυλο-συνεζύμου A και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης Tris-HCl έτσι ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να έχουν τελικό όγκο 200 μL. Ακολουθεί κυκλοανάδευση με χρήση του vortex και το όλο μίγμα επωάζεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Στο μίγμα αυτό προστίθενται 25 μg ενζυμικό παρασκεύασμα με ανάδευση οπότε και ξεκινά η

αντίδραση. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 0,5 ml διαλύματος μεθανόλης 2% που προκαλεί απενεργοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

5.4.3. Ενζυμική δοκιμασία της δραστηριότητας της PAF ακετολοϋδρολάσης (PAF-AH).

Αντιδραστήρια – Όργανα

- PAF (16:0)(Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Tris-HCl 50 mM pH 7,4
- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF σε χλωροφορμίο: μεθανόλη (1:1), 10^{-4} M
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA) (Sigma): Διάλυμα φύλαξης BSA 100 mg/ml και διάλυμα εργασίας BSA 10 mg/ml σε φυσιολογικό ορό.
- Διάλυμα PAF σε BSA (10 mg/ml) συγκέντρωσης 800 μ M και ειδικής δραστηριότητας 1000 cpm/nmol (διάλυμα εργασίας): Προσθήκη 5 μ L από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20 μ M ($\approx$ 20.000 cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0.25 mg / mL.
- Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 40% (w/v) σε νερό.
- Οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη)

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-AH βασίζεται στη μέτρηση της ραδιενέργειας του ραδιενεργού προϊόντος ($[^3\text{H}]\text{-CH}_3\text{OOOH}$) που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με $[^3\text{H}]\text{-PAF}$, παρουσία BSA και την καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA. Το επισημασμένο οξικό οξύ διαχωρίζεται από τον μη αντιδρών $[^3\text{H}]\text{-PAF}$ αφού αυτός καταβυθίζεται ως σύμπλοκο με την BSA.

Αναλυτική πορεία

Σε σωλήνα τύπου erpedorf φέρονται 5 μl διαλύματος εργασίας [³H]-PAF/PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM, ≈20000 cpm) και κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης έτσι ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να έχουν τελικό όγκο 200 μL και η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 50 μg ενζυμικού παρασκευάσματος. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 °C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης προσθέτονται 2 μl διαλύματος BSA 100 mg/ml για να εξασφαλιστεί η ποσοτική δέσμευση των προϊόντων από την BSA και μετά από 0,5 λεπτά προσθέτονται 64 μl διαλύματος TCA (τελική συγκέντρωση TCA 9.7% w./v.). Το μίγμα αφήνεται σε πάγο για 30 λεπτά ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά. Παραλαμβάνονται 100 μl από το υπερκείμενο για την μέτρηση της ραδιενέργειας. Γίνεται επίσης και δείγμα αναφοράς, το οποίο δεν περιέχει ενζυμικό παρασκεύασμα.

5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός επιπέδων PAF

5.5.1. Εκχύλιση του PAF

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο)

Αρχή μεθόδου

Με την μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer αρχικά δημιουργείται μονοφασικό σύστημα διαλυτών με το οποίο επιτυγχάνεται εκχύλιση όλων των λιποειδών και μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως άλατα και αμινοξέα κ.α. Με την μετέπειτα μετατροπή του μονοφασικού διαλύματος σε διφασικό, στην χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή ενώ στην υδατική μένουν τα υδατοδιαλυτά συστατικά

Αναλυτική πορεία

Για την εκχύλιση του παραγομένου PAF από τις ενζυμικές δοκιμασίες προστίθενται 0,25 ml χλωροφορμίου για να προκύψει διάλυμα μίας φάσης χλωροφορμίου:μεθανόλης:νερού με αναλογία 1:2:0,8 και μετά από έντονη ανάδευση σε vortex προστίθενται 0,24 ml χλωροφορμίου και 0,24 ml νερού για να προκύψει διφασικό διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης:νερού με

αναλογία 1:1:0,9 σύμφωνα με την μέθοδο εκχύλισης Bligh-Dyer. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση, εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 και αναδυσαλύεται σε διάλυμα Χλωροφορμίου:Μεθανόλης με αναλογία 1:1 και φυλάσσεται στους $-20^{\circ}C$.

5.5.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) λιποειδών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (οξικό οξύ, μεθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: μίγμα φωσφολιποειδών αυγού (Sigma)
- Προσροφητικό υλικό : πηκτή SiO_2 (Silica Gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20cm.
- Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofug 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10cm.

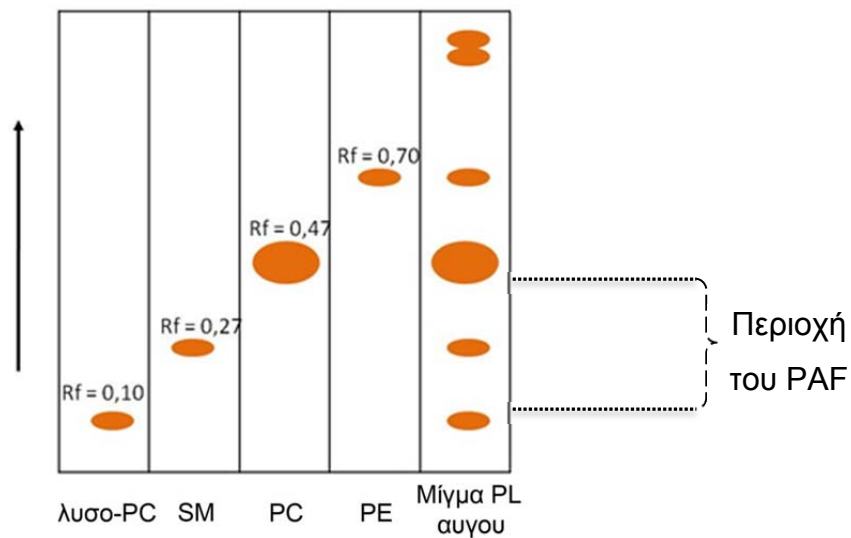
Αναλυτική πορεία

Το πυριτικό οξύ αναμιγνύεται με νερό σε αναλογία 1:2 (w/v), αναδεύεται έντονα για 2 min και επιστρώνεται στις πλάκες με τη συσκευή Desaga. Οι πλάκες παραμένουν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ενεργοποιούνται σε πυριαντήριο $100^{\circ}C$ για 1h.

Το δείγμα ή οι πρότυπες ουσίες διαλυμένες σε μικρό όγκο χλωροφορμίου:μεθανόλης (1:1) τοποθετούνται στις πλάκες (σε ύψος 2cm περίπου) σε προκεκορεσμένο θάλαμο με το σύστημα ανάπτυξης (Χλωροφόρμιο:Μεθανόλη:οξικό οξύ:νερό σε αναλογία 100:57:16:8, v/v/v/v). Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Παροδική εμφάνιση όλων των λιποειδών επιτυγχάνεται με ατμούς ιωδίου με τοποθέτηση της πλάκας σε γυάλινο κλειστό θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου ενώ τα φωσφολιποειδικά κλάσματα ταυτοποιούνται με συγχρωματογράφιση προτύπων.

Ακολουθεί απόξυση της ζώνης που περιέχει τον PAF ο οποίος εκχυλίζεται από την Silica με την μέθοδο Bligh-Dyer. Η χλωροφορμική φάση εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 , αναδυσαλύεται σε διάλυμα BSA 2,5 mg/ml φυσιολογικού ορού και

τα επίπεδα του παραγομένου PAF προσδιορίζονται με την *in vitro* βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.



Εικόνα 20 Χρωματογραφική συμπεριφορά και τιμές R_f προτύπων διαλυμάτων φωσφολιποειδών (PC, λυσο-PC, SM, PE), AAG και CDP-χολίνης σε Silica G και σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (100:57:16:8, v/v/v/v)

5.5.3. Μέτρηση της συγκέντρωσης του PAF με βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού- Βιολογική δοκιμασία συσώρευσης *in vitro*

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα 10x Tyrodes stock: 80gr/l NaCl, 1,95gr/l KCl, 2,13gr/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10g/l γλυκόζη.
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock: 0,01911g/ml CaCl_2 .
- Διάλυμα EGTA 0,2M.
- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό.
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5): Σε 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203gr NaHCO_3 σε 10ml

- H₂O) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του H₂O στο NaHCO₃. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50ml. Στο ένα από τα δύο προστίθενται 25μl 0,2M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με Parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5ml Tyrodes 10x stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθεται 0,5ml 100x CaCl₂ stock. Κατόπιν προστίθενται 2,5ml διαλύματος NaHCO₃ (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
 - Αντιδραστήριο ACD: 13,65gr/lit κιτρικό οξύ, 25gr/lit κιτρικό νάτριο και 20gr/lit δεξτρόζη.
 - Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (BSA) (Sigma): Διάλυμα φύλαξης BSA 100 mg/ml η οποία φυλάσσεται στους -20 °C και διάλυμα εργασίας BSA 2,5 mg/ml σε φυσιολογικό ορό.
 - Διάλυμα θρομβίνης σε φυσιολογικό ορό.
 - Ficoll-Paque (Pharmacia).
 - Συσσωρευματομέτρο Chronolog-400, Havertown, PA, USA, συνδεδεμένο με καταγραφέα Chrono-Log, Havertown, PA, USA, θερμοστατημένο στους 37°C υπό συνεχήs ανάδευση στις 1200 rpm.
 - Φωτόμετρο Helios B, Unicam, Mercers Row, Cambridge CB5 8HY, UK.
 - Υδρόλουτρο 37°C.
 - Ψυχόμενες φυγόκεντροι Heraeus Labofug 400R.
 - PAF
 - Θρομβίνη

Αναλυτική πορεία

A) Απομόνωση πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια PRP

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50ml. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 11min στους 25°C στα 500g. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2ml Ficoll Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 15ml. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια PRP) και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml.

B) Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Στη συνέχεια το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια PRP τοποθετείται στους πλαστικούς σωλήνες των 15ml που περιέχουν Ficoll-Paque (6-7ml δείγμα σε 2ml Ficoll-Paque) και φυγοκεντρούνται για 20min στους 25°C στα 750g. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και το Ficoll-Paque. Στους σωλήνες αυτούς προστίθεται στη συνέχεια διάλυμα Tg-EGTA pH 6,5 και αναδυσταλίζεται ήπια το στρώμα των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 2ml Ficoll-Paque (8ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και φυγοκεντρούνται για 15min στους 25 °C στις 2400rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και το Ficoll-Paque όπως αναφέρεται παραπάνω. Στη συνέχεια προστίθενται 8ml Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται και μεταφέρονται σε καθαρούς πλαστικούς σωλήνες. Φυγοκεντρούνται για 15min στους 25°C στις 2400rpm. Αποχύνεται το υπερκείμενο, το δε ίζημα αναδιασπείρεται με κατάλληλη κάθε φορά ποσότητα Tg pH 6,5. Ενώνονται όλα τα αιμοπετάλια σε πλαστικό σωλήνα. Από αυτόν παραλαμβάνονται 10μl τα οποία τοποθετούνται σε πλαστική κυψελίδα μαζί με 990μl Tg pH 6,5 και φωτομετρούνται στα 530nm. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \cdot 10^9$ αιμοπετάλια /ml.

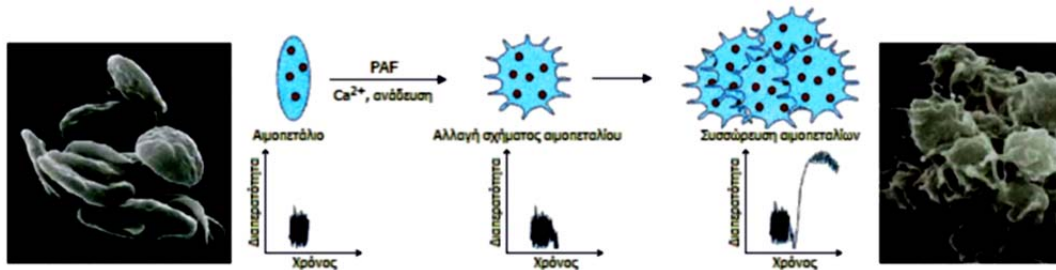
B) Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε ειδικές πλαστικές κυψελίδες προστίθενται 50 μl από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 200 μl Tg-Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός

αναδευτήρας. Επωάζονται για 30min σε υδρόλουτρο 37 °C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του aggregometer με Tg-Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg-Ca pH 7,2. Στη συνέχεια τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer και προστίθενται διάφορες συγκεντρώσεις PAF διαλυτοποιημένου σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης ή προστίθενται το εκάστοτε δείγμα που είναι διαλυτοποιημένο επίσης σε BSA 2,5mg/ml. Σαν 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί τη μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Γ) Υπολογισμός ανασταλτικής ικανότητας

Η τιμή IC_{50} αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τη θρομβίνη. Οι διάφορες προς μελέτη ουσίες διαλυτοποιούνται όπως ο PAF σε 2,5 mg/mL BSA και εξετάζονται ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων ή/και ως προς την ικανότητα τους να προκαλούν τα ίδια συσσώρευση σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Σε ειδική κυψελίδα του aggregometer στην οποία περιέχεται εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού υπό ανάδευση προστίθενται διάφορες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων των δειγμάτων 1 λεπτό πριν την προσθήκη PAF γνωστής συγκέντρωσης. Η προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπολογίζονταν πριν (λαμβάνεται ως το 0% αναστολής έναντι του PAF) και μετά την προσθήκη των προς εξέταση δειγμάτων. Η γραφική παράσταση του ποσοστού αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων είναι γραμμική μεταξύ των σημείων 20-80% αναστολή, απ' όπου και υπολογίζουμε την συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί το 50 % της αναστολής στην προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αυτή η τιμή καθορίζεται ως η τιμή IC_{50} κάθε ουσίας. Η ποσότητα της αιθανόλης του φαρμακευτικού σκευάσματος το οποίο περιείχε την παρικαλσιτόλη εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου καθώς βρέθηκε ότι η αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 21 Αρχή μεθόδου βιολογικής μεθόδου προσδιορισμού του PAF. Στις φωτογραφίες δείχνεται η μορφή αιματοπεταλίων στη φυσιολογική τους κατάσταση (αριστερά) και των αιμοπεταλίων μετά την επίδραση του PAF.

5.6. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών

Αντιδραστήρια – Όργανα

- 2,5-Διφαινυλοξαζόλιο (PPO), BDH, Chemicals
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (POPOP), BDH, Chemicals
- Ναφθαλίνιο (Sigma)
- Διοξάνη (Merck)
- Υγρά σπινθηρισμού :

α) Dioxane Base : Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7 gr PPO, 0.3 gr POPOP και 100 gr ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 mL νερό.

β) Toluene Base : Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 5 gr PPO και 0.3 gr POPOP σε 1 L τολουολίου.

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης όγκου 20 mL.
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100.

Αρχή μεθόδου

Το ραδιενεργό δείγμα αναμιγνύεται με το διάλυμα σπινθηρισμού που περιέχει ένα διαλύτη και μία ή περισσότερες ουσίες που φθορίζουν. Στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων τα εκπεμπόμενα από το ραδιενεργό δείγμα (^3H) β σωματίδια διεγείρουν αρχικά το διαλύτη (διοξάνη) ο οποίος με τη σειρά του διεγείρει το ναφθαλίνιο. Το διεγερμένο ναφθαλίνιο στη συνέχεια διεγείρει την

πρωτεύουσα φθορίζουσα ουσία PPO που εκπέμπει φωτόνια (ακτινοβολία), τα οποία απορροφά η δευτερεύουσα φθορίζουσα ουσία POPOP και εκπέμπει ακτινοβολία σε μεγαλύτερο μήκος κύματος που τελικά ανιχνεύετε από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Το σύνολο των φωτονίων, που εκπέμπονται μετά από κάθε εκπομπή β σωματιδίων, ανιχνεύονται ως ένας παλμός, ο οποίος μεταβιβάζεται σε ένα σύστημα μέτρησης το οποίο καταγράφει τους παλμούς ως ξεχωριστές κρούσεις.

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα όγκου μέχρι 0,1 ml φέρονται στα πλαστικά φιαλίδια στα οποία έχουν προστεθεί 5 mL υγρού σπινθηρισμού και κλείνονται ερμητικά με τα πώματα των φιαλιδίων. Αναδεύονται ισχυρά με κυκλοαναδευτήρα, και τοποθετούνται με ειδικές υποδοχές (racks) στον μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Μετρώνται οι κρούσεις του ραδιενεργού δείγματος για 1 λεπτό και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm) αφού αφαιρεθούν οι κρούσεις ανά λεπτό του τυφλού προσδιορισμού που περιέχει μόνο το υγρό σπινθηρισμού.

5.7. Μέτρηση κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής

Αντιδραστήρια-όργανα

Cytometric Bead Array System (CBA) για IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α και IL-12p70:

- Σφαιρίδια πρόσδεσης: Ανθρώπινη IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IL-12p70
- Ειδικά πλαστικά σωληνάκια διαστάσεων 12 × 75 mm για κυτταρομετρία ροής
- Ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου (Assay Diluent)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ορού (Serum Enhancement Buffer)
- Διάλυμα έκπλυσης (wash buffer)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση διαλυτών πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γνωστού μεγέθους και φθορισμού έτσι ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση των υπο-ανάλυση πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής. Με την μέθοδο των μικροσφαιριδίων επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλαπλών

παραγόντων σε βιολογικά δείγματα όπου οι συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα μικρές. Για την μέτρηση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια πρόσδεσης που είναι συζευγμένα με ειδικά αντισώματα και αντισώματα συνδεδεμένα με φυκοερυθρίνη τα οποία εκπέμπουν σήμα φθορισμού ανάλογα με την ποσότητα της μετρούμενης πρωτεΐνης. Όταν τα σφαιρίδια επωστούν με το δείγμα προς μέτρηση και τα αντισώματα δημιουργείται ένα σύμπλοκο τύπου σάντουιτς. Τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να μετρηθούν με κυτταρομετρία ροής βασιζόμενα στο μέγεθος του σφαιριδίου και τα χαρακτηριστικά της φθορίζουσας χρωστικής.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά έγινε προετοιμασία, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, των εξής διαλυμάτων: α) λυόφιλα διαλύματα αναφοράς (ένα για κάθε κυτταροκίνη προς ανίχνευση) και β) διάλυμα μικροσφαιριδίων.

Α) Προετοιμασία διαλυμάτων αναφοράς για κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Αναδιαλύθηκαν καθένα από τα φιαλίδια με τα λυοφιλοποιημένα αντισώματα με 2ml ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου. Το διάλυμα αυτό αφού αναδεύθηκε ήπια παρέμεινε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος επισημάνθηκε ως Σ₁₀. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε η σειρά των πρότυπων διαλυμάτων με διαδοχικές 1:2 αραιώσεις του αρχικού διαλύματος.

Πίνακας 7 Συγκεντρώσεις προτύπων καμπύλης αναφοράς για μέτρηση κυτταροκινών με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής

	Συγκέντρωση (pg/ml)	Αραίωση
Σ ₁	0	Τυφλό
Σ ₂	20	1:256
Σ ₃	40	1:128
Σ ₄	80	1:64
Σ ₅	156	1:32
Σ ₆	312,5	1:16
Σ ₇	625	1:8
Σ ₈	1250	1:4

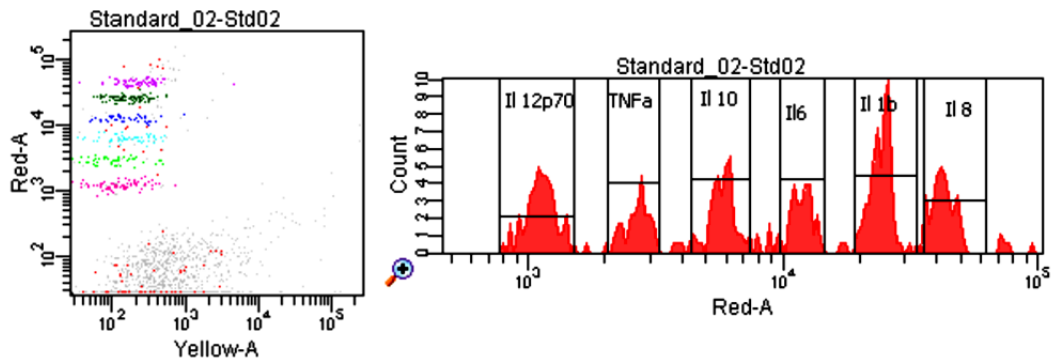
Σ_9	2500	1:2
Σ_{10}	5000	πυκνό

Β) Προετοιμασία διαλυμάτων μικροσφαιριδίων.

Προκειμένου να μειωθεί το θετικό σφάλμα από τη μη ειδική σύνδεση λόγω των πρωτεϊνών του ορού τα μικροσφαιρίδια υφίστανται επαναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα ορού. Αναλυτικότερα, το διάλυμα των μικροσφαιριδίων φυγοκεντρώνεται στα 200g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια προστίθεται ίση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ορού με την ποσότητα του απομακρυθέντος υπερκειμένου και τα μικροσφαιρίδια επωάζονται για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αφού αναδευτούν ισχυρά λαμβάνεται σε ένα κοινό δοκιμαστικό σωλήνα 10μl από κάθε διάλυμα μικροσφαιριδίων διαφορετικής κυτταροκίνης για κάθε δοκιμασία και αναδεύονται ισχυρά ώστε να προκύψει ομοιογενές δείγμα. Κατά την διάρκεια της προετοιμασίας τα μικροσφαιρίδια θα πρέπει να προστατεύονται από το φως.

Γ) Δοκιμασία δημιουργίας ανοσοσυμπλέγματος.

Λαμβάνονται σε σωλήνα τύπου erpendroff 50μl από το μίγμα των μικροσφαιριδίων και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 ώρα και προστατευμένα από το φως παρουσία 50μl από τα πρότυπα διαλύματα ή τα προς ανάλυση δείγματα. Μετά την επώαση προστίθεται 1ml διαλύματος έκλυσης και φυγοκεντρώνεται τα δείγματα στα 200g για 5 λεπτά. Αφαιρείται η μεγαλύτερη ποσότητα του υπερκειμένου αφήνοντας μόνο 100μl ενώ προστίθεται 50μl διαλύματος στρεπταβιδίνης-φυκοερυθρίνης και αναδεύεται ήπια. Τα διαλύματα αυτά επωάζονται για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένα από το φως. Στη συνέχεια ακολουθεί και πάλι έκπλυση με 1ml διαλύματος έκλυσης και φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 200g για 5 λεπτά. Αφαιρείται η μεγαλύτερη ποσότητα του υπερκειμένου και το ίζημα των μικροσφαιριδίων αναδιασπείρεται σε 300μl διαλύματος έκλυσης. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται σε κυτταρομετρητή ροής.



Εικόνα 22 Αντιπροσωπευτική εικόνα ανάλυσης κυτταροκινών με κυτταρομετρία ροής

5.8. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της αδιπονεκτίνης

Αντιδραστήρια-όργανα

- DuoSet Elisa kit για ανθρώπινη αδιπονεκτίνη (DY1065), που περιλαμβάνει:

Αντίσωμα δέσμησης (capture antibody) – 1 vial – 360 µg mouse anti-human adiponectin, αναδιαλύεται σε 1 ml PBS. Αραιώνεται με προσθήκη PBS σε συγκέντρωση εργασίας 2,0 µg/ml. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 60 μέρες εναλλακτικά μπορεί να χωριστεί και να αποθηκευτεί στους -20°C έως -70°C για πάνω από 6 μήνες.

Αντίσωμα ανίχνευσης (detection antibody) – 1 vial – 360 µg βιοτινυλιωμένο mouse anti-human adiponectin, αναδιαλύεται σε 1 ml αραιωτικού αντιδραστηρίου (Reagent diluent-RD). Αραιώνεται με προσθήκη RD σε συγκέντρωση εργασίας 2,0 µg/ml.

Πρότυπο διάλυμα αδιπονεκτίνης – 1 vial – 35 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αδιπονεκτίνης, αναδιαλύεται σε 0,5 ml RD. Αραιώνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση εργασίας 4.000 pg/ml. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 60 μέρες, ωστόσο δεν πρέπει να καταψύχεται.

Streptavidin-HRP – 1 vial – 1 ml στρεπταβιδίνη δεσμευμένη σε υπεροξειδάση ραπανάκιου. Αποθηκεύεται στους 2-8°C για πάνω από 6 μήνες.

Substrate solution – αντιδραστήρια A (H_2O_2) και B (τετραμεθυλοβενζινιδίνη) που αναμιγνύονται με αναλογία 1:1, για να αντιδράσουν με HRP και να δώσουν μπλε χρώμα στα δείγματα.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): 0.9076 gr/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 gr/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr/l NaCl, με τελικό pH στο 7.4. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C .
- Διάλυμα έκπλυσης – απορρυπαντικό 0,05% Tween 20 σε διάλυμα PBS με pH 7,2-7,4.
- Αντιδραστήριο αραίωσης – 1% BSA σε PBS, pH 7,2-7,4
- Μέσο οξίνισης – 2N H_2SO_4 .
- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών
- Πολυκάναλη πιπέτα
- Φωτόμετρο Elisa reader

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος sandwich ELISA χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει τα αντιγόνα που έχουν τουλάχιστον δυο αντιγονικούς επίτοπους. Συνήθως το μικρο-πιάτο επικαλύπτεται με ένα αντίσωμα Ig-G ειδικό για τον ένα επίτοπο και οποιοσδήποτε άλλος μπλοκάρεται. Επειτα, προστίθεται το πρότυπο που είναι το αντιγόνο ή το δείγμα και επωάζεται, ακολουθεί μετά το αντισωμα δέσμευσης -συνδεδεμένο με ένζυμο- το οποίο είναι ειδικό για τον δεύτερο επιτοπο. Η παρουσία του ενζύμου που είναι συνδεδεμένη στο αντίσωμα ανιχνεύεται με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος και μέτρηση του σήματος που δημιουργείται στα 630 nm με microplate reader. Υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στο παραγώμενο σήμα (y, μονάδες απορρόφησης) και στην συγκέντρωση του αναλύτη (x). [268]

Αναλυτική πορεία

Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μl /πηγάδι διαλύματος capture antibody σε PBS και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου και τη διάρκεια της νύχτας. Το

επόμενο πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl διάλυμα έκπλυσης *4 φορές και εναποθέτουμε 300 ml αντιδραστήριο αραίωσης/πηγάδι για 1 ώρα.

Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl διάλυμα έκπλυσης *4 φορές. Από stock διάλυμα αδιπονεκτίνης 70 ng/ml, φτιάχνουμε 7 πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 15,625 – 1000 pg/ml αδιπονεκτίνη, από τα οποία θέτουμε στα κατάλληλα πηγάδια 100 μl/πηγάδι και συνιστούν την πρότυπη καμπύλη. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης από τους -80°C , θέτουμε 100 μl στα αντίστοιχα πηγάδια και τα αφήνουμε να επωαστούν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl διάλυμα έκπλυσης *4 φορές, προσθέτουμε 100 μl/πηγάδι διαλύματος αντισώματος ανίχνευσης σε αντιδραστήριο αραίωσης και τα αφήνουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl διάλυμα έκπλυσης *4 φορές, προσθέτουμε 100 μl/πηγάδι διαλύματος HRP-Streptavidin σε αντιδραστήριο αραίωσης και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl διάλυμα έκπλυσης *4 φορές, αναμιγνύουμε με αναλογία 1:1 τα χρωμοφόρα A και B θέτουμε 100 μl/πηγάδι δείγματος. Αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 50 μl/πηγάδι μέσο οξίνισης ανακινώ καλά για να εξασφαλίσω καλή μίξη. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 450 nm και στα 620 nm. Η διαφορά τους είναι η απορρόφηση του δείγματος που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης.

5.9. Καλλιέργεια και αναδιασπορά των ποδοκυττάρων

Αντιδραστήρια-όργανα

- DMEM (Biochrom)
- HAM's F12 (Biochrom)
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (Biochrom): Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες. και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ορός εμβρύων μοσχού (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- L-Γλουταμίνη (Biochrom): Το διάλυμα συγκέντρωσης 200mM χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .

- Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom): Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ανθρώπινη τρανσφερίνη
- Ινσουλίνη
- Σεληνιώδες νάτριο
- Δεξαμεθαζόνη
- Αμφοτερικίνη
- Γλυκόζη
- Διάλυμα PBS pH 7,4
- Θρυψίνης-EDTA (Biochrom)

Αναλυτική πορεία

Τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος αθανатоποιημένα με τον ιό TSV-40 (Human glomerular epithelial cells-HGEC) καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε DMEM/HAM's F12, 15mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, 1% FCS, 2 mM γλουταμίνη, 100U/ml πενικιλίνη, 100mg/ml στρεπτομυκίνη, 5 mg/ml ανθρώπινη τρανσφερίνη, 5 mg/ml ινσουλίνη, 5 mg/ml σεληνιώδες νάτριο, 50 nM δεξαμεθαζόνη, 25mg/ml αμφοτερικίνη, 5mM ή 25mM γλυκόζη σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm². Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τους εξής ποδοκυτταρικούς δείκτες: νεφρίνη, ποδοκαλυκίνη, WT1, CD10 (CALLA).

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή του υλικού καλλιέργειας ενώ γίνονταν ανακαλλιέργεια των κύτταρων όταν η επικάλυψη της επιφάνειας του δοχείου καλλιέργειας από τα κύτταρα ήταν περίπου 80%. Για την ανακαλλιέργεια, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη θρυψίνης-EDTA (0.05% και 0.02% αντίστοιχα) και τα κύτταρα επωάζονταν για 3 λεπτά στους 37°C. Η αποκόλληση των κυττάρων ελεγχόταν με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύονταν με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας.

Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματιζόταν με προσθήκη ίσης ποσότητας ορού και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γινόταν με φυγογκέντρωση στα 1200 xg για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρονταν σε

φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετούνταν 300.000-200.000 κύτταρα σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm².

5.10. Κρυοκατάψυξη των κυττάρων

Αντιδραστήρια-όργανα

- DMSO
- Ορός εμβρύων μοσχου (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C.
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Labofuge 400R Heraeus.

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια του δοχείου ανακαλλιέργειας όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρονταν σε 10% DMSO σε FCS και τοποθετείται σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια για αποθήκευση στους -80°C για 24 ώρες και στην συνέχεια για μακρόχρονη αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Η απόψυξη των κυττάρων γινόταν με τοποθέτησή τους κατευθείαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C. Αμέσως μετά την υγροποίηση του διαλύματος συντήρησης των κυττάρων ακολουθούσε μεταφορά τους σε σωλήνα των 15 mL που περιείχε 2 mL θρεπτικό υλικό γινόταν φυγογκέντρωση στα 1200 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρονταν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm² και στον επωαστικό θάλαμο.

5.11. Διέγερση των κυττάρων

Αντιδραστήρια-όργανα

- Καλσιτριόλη: φαρμακευτικό σκεύασμα Calcijex (Abbott) το οποίο είναι ενέσιμη μορφή της δραστικής βιταμίνης D.
- Παρικαλσιτόλη: φαρμακευτικό σκεύασμα Zemplar (Abbott) το οποίο είναι ενέσιμη μορφή της παρικαλσιτόλης η οποία είναι ανάλογο της δραστικής βιταμίνης D.

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα, HGEC, καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε πιο πάνω ανακαλλιεργήθηκαν και τοποθετούνταν 300.000 κύτταρα σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm² ή 2.000 κύτταρα σε 24-well plates. Αφού τα κύτταρα

παρέμειναν στο υλικό καλλιέργειας για 24 ώρες, στη συνέχεια απομακρύνονταν το μέσο και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Ακολουθούσε προσθήκη είτε φρέσκου υλικού καλλιέργειας είτε φρέσκου υλικού καλλιέργειας που περιείχε καλσιτριόλη είτε φρέσκου υλικού καλλιέργειας που περιείχε παρικαλσιτόλη. Η επώαση με τους διεγέρτες διήρκεσε 4 μέρες με καθημερινή ανανέωση του υλικού καλλιέργειας.

Μετά από επώασή ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με PBS και παραλαβή των κυττάρων όπως αυτή περιγράφηκε πιο πάνω.

5.12. Λύση κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια-όργανα

- Triton X-100 (Merck).
- Τρις-υδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (Tris), (Applichem).
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS).
- Διάλυμα λύσης: Tris-HCL 100mM pH 8, 1% Triton X-100, 1μl Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών/ml διαλύματος λύσης.
- Μίγμα αναστολέων πρωτεασών
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5417R.

Αναλυτική πορεία

Μετά την παραλαβή των κυττάρων με θρυψίνη, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και φυγοκεντρούνται στα 1200 x g για 10 λεπτά, δυο φορές. Στη συνέχεια μετρώνται με αιματοκυτόμετρο και υπολογίζεται ο αριθμός τους. Έπειτα στο ίζημα των κυττάρων προσθέτω 100 μl διαλύματος λύσης/ $1,5 \cdot 10^6$ κύτταρα. Ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα στον τροχό σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία 4°C. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση 9279g για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και τοποθετείται αμέσως στους 4°C ή αποθηκεύεται για λίγες ημέρες στου -20°C ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -80°C.

5.13. Κυτταρική κλασμάτωση

Αντιδραστήρια-όργανα

- Triton X-100 (Merck).
- Τρις-υδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (Tris), (Applichem).

- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS).
- Μίγμα αναστολέων πρωτεασών
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5417R.
- Διαλύμα κυταροπλασματικής κλασμάτωσης (CSK buffer) τελικού pH 6,8 : 100 mM NaCl, 0,3 M σουκρόζη, 10 mM Pipes, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,5% Triton X-100
- Διαλύμα πέψης (digestion buffer) τελικού pH 6,8 : 50 mM NaCl, 0,3 M σουκρόζη, 10 mM Pipes, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,5% Triton X-100
- DNaseI
- Θεικό αμμώνιο

Αναλυτική πορεία [269]

Μετά την παραλαβή των κυττάρων με θρυψίνη, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και φυγοκεντρούνται στα 1200 x g για 10 λεπτά, δυο φορές. Στη συνέχεια μετρώνται με αιματοκυτόμετρο και υπολογίζεται ο αριθμός τους. Έπειτα στο ίζημα των κυττάρων προσθέτω 100 μl διαλύματος κυταροπλασματικής κλασμάτωσης /1,5 *10⁶ κύτταρα για 10 λεπτά στον πάγο. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση 10000g για 30 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες συλλέγεται. Στο ίζημα των πυρήνων προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος πέψης παρουσία DNaseI (Roche) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η δραστηριότητα της DNaseI σταματά με την προσθήκη 2M θειικού αμμωνίου σε τελική συγκέντρωση 250mM για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση 10000g για 30 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις υδατοδιαλυτές πυρηνικές πρωτεΐνες συλλέγεται. Τα παραληφθείσα δείγματα αποθηκεύονται για λίγες ημέρες στο -20°C ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -80°C.

5.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση (αποτύπωση western).

Αντιδραστήρια-όργανα

- Συσκευές ηλεκτροφόρησης
- Πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel): Ακρυλαμίδιο 30%, Tris-HCL 1M pH 6,8, SDS (δωδέκυλο θειικό νάτριο) 10%, APS (ammonium persulfate) υπερθειικό αμμώνιο 10%, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine) 1%
- Πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel): Ακρυλαμίδιο 30%, Tris-HCL 1,5M pH 8,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED 1%
- Μερκαπτοαιθανόλη
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 18,8 g/ml γλυκίνη, 3,02 g/ml Tris, 1 g/ml SDS
- Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς: 14,4 g/L γλυκίνη, 3,03 g/L Tris, 20% αιθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα-TBS: 2,4 g/L Tris και 8 g/L NaCl.
- Tween 20%
- Blocking buffer: 5% γάλα σε TBS-Tween 0,1%
- Διάλυμα επώασης αντισωμάτων:
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης Hybond-ECL (Amersham Biosciences)
- Re-Blot Plus Western Blot Stripping Solution (Chemicon)
- H₂O₂ και λουμινόλη
- Πρώτα αντισώματα: αντι-VDR, αντι-ποδοκαλυκίνη, αντι-τουμπουλίνη, αντι-CD2AP, αντι-WT1, αντι-RXR, αντι-PARP
- Δεύτερα αντισώματα: αντι-ποντικίσιο, αντι-κουνελίσιο

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης από δείγματα κυτταρικής λύσης, υπερκειμένου καλλιιεργειών κτλ. με την βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Οι πρωτεΐνες του μίγματος διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και στην συνέχεια μεταφέρονται και ακινητοποιούνται επάνω σε φύλλα νιτροκυτταρίνης, επιτρέποντας στις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες να διατηρούν όλες τους τις ιδιότητες. Κατ' αυτό το τρόπο όταν επωαστούν με ειδικά αντισώματα που τις αναγνωρίζουν, αυτά προσδένονται στις πρωτεΐνες και ο εντοπισμός τους είναι δυνατός με την χρήση κατάλληλων ιχνηθετών.

Αναλυτική πορεία

Ολική πρωτεΐνη από λύματα κυττάρων αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης/N,N methylene bisacrylamide παρουσία του απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου που διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του N,N'-methylenebisacrylamide. Ο πολυμερισμός γίνεται με την παρουσία APS, το οποίο περιέχει ελεύθερες ρίζες και επιταχύνεται με την προσθήκη TEMED, που καταλύει το σχηματισμό τους. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πόρων στο πήκτωμα. Η τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης/N, N methylene bisacrylamide στο πήκτωμα καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που αναλύονται με ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές υπομονάδες έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός τους βάσει μοριακού βάρους και όχι βάσει τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το SDS, ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό. Το SDS σε συνδυασμό με το βρασμό προωθεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το αρνητικά φορτισμένο SDS προσδένεται στις αποδιαταγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε αναλογία μάζας 4:1, προσδίδοντας τους αρνητικό φορτίο. Η παρουσία της μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικός παράγοντας) βοηθάει στην αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης καταστρέφοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι φορτισμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες κινούνται μέσα στους πόρους του πηκτώματος προς την κάθοδο με διαφορετική κινητικότητα που καθορίζεται από το μοριακό τους βάρος.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε πήκτωμα μεγάλων πόρων, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) το οποίο πολυμερίζεται πάνω σε πήκτωμα μικρότερων πόρων, το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel). Συγκεκριμένα, ισόποσα πρωτεϊνικά δείγματα κυτταρικών λυμάτων (200 µg), αναδιαλύθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης Laemmli (Laemmli sample buffer) παρουσία 5% β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης). Εκτός των αποδιατακτικών παραγόντων που αναφέρονται παραπάνω, το διάλυμα φόρτωσης περιέχει την χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης ως δείκτη κατά

την διαδικασία φόρτωσης των πρωτεϊνών και ως ένδειξη της πορείας τους καθώς το μέτωπο της χρωστικής προπορεύεται των πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει επίσης γλυκερόλη με σκοπό την αύξηση της πυκνότητας του δείγματος, έτσι ώστε αυτό να επικάθεται στην βάση του πηγαδιού φόρτωσης και να ελαχιστοποιείται η απώλεια πρωτεϊνών μέσω διάχυσης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοίβαξης 5% έπειτα από βρασμό για 5 min στους 90-100°C. Τα δείγματα των πρωτεϊνικών διαλυμάτων αναλύθηκαν σε πήκτωμα διαχωρισμού περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 7,5%. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, με σταθερή εφαρμοζόμενη τάση 80V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, απομακρύνθηκε το πήκτωμα επιστοίβαξης και το πήκτωμα

διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την ταυτοποίηση του μεγέθους της ζώνης της πρωτεΐνης που εντοπίζεται μετά την ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιήθηκε μίγμα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών και ποσότητας το οποίο αναλύεται παράλληλα στο ίδιο πήκτωμα. Με σκοπό την αύξηση προσβασιμότητας των διαχωρισμένων πρωτεϊνών στα ειδικά αντισώματα κατά την διαδικασία ανίχνευσής τους, είναι απαραίτητη η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε ειδική μεμβράνη ή φίλτρο νιτροκυτταρίνης το οποίο έχει την ιδιότητα να δεσμεύει πρωτεΐνες με μη-ειδικό τρόπο. Η δέσμευση των πρωτεϊνών επάνω στην μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης και της νιτροκυτταρίνης. Μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, γίνεται με επίδραση ηλεκτρικού πεδίου αφού προηγουμένως απομακρυνθεί το SDS από το πήκτωμα. Η απομάκρυνση του SDS από το πήκτωμα γίνεται με επώαση του τελευταίου σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που περιέχει μεθανόλη. Η παραμονή του αρνητικά φορτισμένου SDS στις πρωτεϊνικές ζώνες του πηκτώματος, ενώ διευκολύνει την μεταφορά τους, μετριάζει ωστόσο την ικανότητα πρόσδεσης στο φίλτρο. Η μεθανόλη απομακρύνει το SDS από το πήκτωμα και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πολυπεπτιδικών

αλυσίδων. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς είναι αρκετά αλκαλικό (~8.3) και έτσι το φορτίο των πρωτεϊνών παραμένει αρνητικό αφού γενικά το pI των πρωτεϊνών είναι < 8,3. Η επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την κίνηση των ζωνών προς την κάθοδο (θέση στην οποία έχει τοποθετηθεί το φίλτρο νιτροκυτταρίνης). Συγκεκριμένα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα και το φίλτρο νιτροκυτταρίνης παρέμειναν για 20 min στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης για μια νύχτα με εφαρμοζόμενο ρεύμα έντασης 30V στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού της AMERSHAM BIOSCIENCES (Pittsburgh, Pennsylvania, US) και της BIO-RAD (Hercules, California, US) που δίνονται συμπληρωματικά με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς αντίστοιχα. Ο εντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, γίνεται έμμεσα με μονοκλωνικό/πολυκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με την πρωτεΐνη-αντιγόνο και με δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στο Fc τμήμα (fragment crystallizable region) της σταθερής περιοχής του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase). Η HRP οξειδώνεται παρουσία του H_2O_2 και η αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπόστρωμα λουμινόλη (luminol) προκαλεί την εκπομπή φωτονίων που αποτυπώνεται σαν μαύρη ζώνη. Η θέση αποτύπωσης της ζώνης, αντιστοιχεί στη θέση του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος στη μεμβράνη. Η πυκνότητα της ζώνης επηρεάζεται από τη ποσότητα του αντιγόνου. Έτσι, μεταβολές της πυκνότητας των ζωνών που αντιστοιχούν στο ίδιο αντιγόνο, ανάμεσα σε δυο ισόποσα δείγματα ολικής πρωτεΐνης που αναλύονται με ανοσοαποτύπωση, αντιστοιχούν σε σχετική μεταβολή της ποσότητας του αντιγόνου. Επειδή το φίλτρο νιτροκυτταρίνης έχει την ιδιότητα να δεσμεύει αδιακρίτως όλα τα είδη πρωτεϊνών για να αποφευχθεί η μη ειδική διασύνδεση του αντισώματος πάνω στο φίλτρο, πριν την επώαση του με το πρώτο αντίσωμα, γίνεται επώαση με αραιό διάλυμα άπαχου γάλα παρουσία μικρής ποσότητας ενός ήπιου απορρυπαντικού όπως το Tween 20 (Polysorbate 20 ή

Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) παράγοντες που αποκλείουν αυτή την πρόσδεση μέσω κορεσμού όλων των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης της μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή (Blocking) έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του “θορύβου” στο τελικό προϊόν της ανοσοοτύπωσης όπως επίσης και την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Παρουσία άπαχου γάλακτος γίνονται επίσης όλες οι επωάσεις με τα αντισώματα. Ο ανοσοεντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού της PIERCE που δίνεται συμπληρωματικά με τη σειρά έτοιμων αντιδραστηρίων χημιοφωταύγειας.

Συγκεκριμένα, μετά την μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, το φίλτρο νιτροκυτταρίνης επωάστηκε για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα κορεσμού. Η μεμβράνη πλύθηκε 1 φορά για 15 min και 2 φορές για 5 min με το διάλυμα πλύσης. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε για μια νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση, με το διάλυμα επώασης στο οποίο προστέθηκε, σε κατάλληλη αραιώση, το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Μετά το τέλος της επώασης ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με το διάλυμα πλύσης. Η μεμβράνη επωάστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση με το διάλυμα επώασης στο οποίο προστέθηκε σε αραιώση το δεύτερο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα ήταν συζευγμένο με το ένζυμο HRP. Ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με το διάλυμα πλύσης και επώαση για 5 min με το μίγμα έτοιμων αντιδραστηρίων χημιοφωταύγειας που περιέχουν H_2O_2 και λουμινόλη. Η HRP οξειδώνεται παρουσία H_2O_2 , αντιδρά με την λουμινόλη (προκαλώντας την οξείδωσή της) και προκαλεί την εκπομπή φωτονίων, η διάρκεια της οποίας ενισχύεται με την παρουσία κάποιου ενισχυτή αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευαισθησία του συστήματος. Προκειμένου να έλθει το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, μετά την πρώτη εμφάνιση, η μεμβράνη επωάστηκε για 20 min με έτοιμο αντιδραστήριο απομάκρυνσης αντισωμάτων (RE-BLOT PLUS Western Blot Stripping Solution, MILLIPORE, Billerica, Massachusetts, US) και ανοσοοτυπώθηκε με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης με την ίδια διαδικασία ξεκινώντας από το στάδιο του κορεσμού. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο

φيلم αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα δείγματα που αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western φωτογραφήθηκαν με τη χρήση κάμερας και λογισμικού (BioCapt Vilber Loumart) και οι πυκνότητες των ζωνών χημειοφωταύγειας αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού επεξεργασίας εικόνας (Photoshop-Adobe).

5.15. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Αντιδραστήρια-όργανα

- Παραφορμαλδεΰδη
- D-σουκρόζη
- Ειδικό αντίσωμα έναντι της νεφρίνης (C-17, Santa Cruz Biotechnology, 1:50)
- Ειδικό αντίσωμα έναντι της ποδοκαλκίνη (3D3, Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
- Ειδικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της βιταμίνης D (D-6, Santa Cruz Biotechnology, 1:200)
- Καλυπτρίδες
- Αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού.
- Αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών της κατσίκας.
- Ιωδιούχο προπίδιο

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με την βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται και εφόσον επωαστούν με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, αυτά προσδένονται στις πρωτεΐνες και ο εντοπισμός τους είναι δυνατός με την χρήση κατάλληλων δεύτερων αντισωμάτων που φέρουν φθορίζουσα χρωστική.

Αναλυτική πορεία

Συνοπτικά, HGEC προσκολλημένα σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 3,6% παραφορμαλδεΰδης που περιείχε 2% D-σουκρόζη για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν με PBS. Στα πειράματα που έγιναν

για τον εντοπισμό της νεφρίνης και της ποδοκαλυκίνης δεν πραγματοποιήθηκε διάνοιξη των μεμβρανών. Ωστόσο στην περίπτωση του υποδοχέα της βιταμίνης D οι μεμβράνες των κυττάρων έγιναν διαπερατές με τη χρήση διαλύματος 0,2% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά στους 0° C. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα ορού αλόγου (για την νεφρίνη) ή βοδίσιου ορού (για την ποδοκαλυκίνη ή των υποδοχέα της βιταμίνη D) έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάστηκαν για μια νύχτα στους 4°C με τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα. Μετά από ξεπλύματα οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τη χρωστική Alexa Fluor για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ξεπλύματα τα κύτταρα επωάζονται με ιωδιούχο προπύδιο 20 µg/ml για 5 λεπτά. Οι καλυπτρίδες σταθεροποιήθηκαν με το Vectashield® mounting medium (Vector Laboratories) πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες και εξετάστηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο επιφθορισμού Carl Zeiss, ενώ οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας.

5.16. Χρωση ακτίνης με φαλαντοΐνη

Αντιδραστήρια-όργανα

- Παραφορμαλδεΰδη
- D-σουκρόζη
- Ειδικό αντίσωμα έναντι της F-ακτίνης (PHDR1, Cytoskeleton, 1:50)
- Καλυπτρίδες

Αρχή μεθόδου

Η φαλαντοΐνη είναι ένα πεπτίδιο επτά αμινοξέων τοξίνη, που δεσμεύεται ειδικά και με υψηλή συγγένεια (Kd 20 nM) στην πολυμερισμένη μορφή της ακτίνης (F-ακτίνη). Η φαλαντοΐνη έχει επισημανθεί με ισοθειοκυανική τετραμεθυλοροδαμίνη B και χρησιμοποιείται ευρέως ως εναλλακτική λύση σε αντισώματα ακτίνης ειδικώς για την επισήμανση των νηματίων ακτίνης σε τομές ιστών, κύτταρα σε καλλιέργειας και χωρίς κυτταρικά λύματα.

Αναλυτική πορεία

Συνοπτικά, HGEC προσκολλημένα σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 3,6% παραφορμαλδεΰδης που περιείχε 2% D-σουκρόζη για 15 λεπτά

σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν με PBS. Οι μεμβράνες των κυττάρων έγιναν διαπερατές με τη χρήση διαλύματος 0,5% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά στους 0° C. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα ορού αλόγου έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4°C με 100 nM φαλαντοΐνη. Μετά οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και σταθεροποιήθηκαν με το Dako® mounting medium (Vector Laboratories) πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες και εξετάστηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο επιφθορισμού Carl Zeiss, ενώ οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας.

5.17. Κυτταρομετρία ροής

Αντιδραστήρια-όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα: 2% μη απενεργοποιημένος FCS σε PBS
- Ειδικό αντίσωμα έναντι της ποδοκαλκίνη (3D3, Santa Cruz Biotechnology, 1:50)
- Ειδικό αντίσωμα έναντι της νεφρίνης (C-17, Santa Cruz Biotechnology, 1:50)
- Φορμαλδεΰδη 1%
- Ειδικό αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού
- Ειδικό αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών της κατσίκας
- Ειδικά πλαστικά σωληνάκια διαστάσεων 12 × 75 mm για κυτταρομετρία ροής
- Becton Dickinson FACSCalibur

Αρχή μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που εκμεταλλεύεται την μέτρηση ορισμένων βιοχημικών και βιοφυσικών παραμέτρων των κυττάρων μεμονωμένα, όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρημα εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή. Κυτταρικά επιφανειακά μόρια μπορούν ευκρινώς να ανιχνευθούν με ανοσοφθορισμό με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η ανίχνευση αυτών των παραμέτρων επιτυγχάνεται με την μέτρηση της σκέδασης του φωτός, με την ανίχνευση του όγκου των κυττάρων και με τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω και ανασηκώθηκαν από τα τρυβλία καλλιέργειας με τη χρήση θρυψίνης. Ακολούθησε ξεπλύμα με PBS και μέτρηση των κυττάρων. Και εφόσον τα κύτταρα επαναδιαλήθηκαν PBS, φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές στους 4°C. Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2500 g στους 4°C για 5 λεπτά. Έπειτα μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου τα κύτταρα επωάστηκαν για μια νύχτα στους 4°C με την κατάλληλη συγκέντρωση αντισώματος έναντι της ποδοκαλκίνης ή της νεφρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ή επωάστηκαν με σκέτο ρυθμιστικό διάλυμα. Την επόμενη μέρα προστέθηκε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 2500 g στους 4°C για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 4°C με κατάλληλο αντίσωμα συζευγμένο με φλουορεσκεΐνη στην ισοθειοκυανική της μορφή (1:1000). Ακολούθησε ξεπλύμα με 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκέντρηση στα 2500 g στους 4°C για 5 λεπτά. Έπειτα μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με 1% φορμαλδεΰδη σε PBS. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού Cell Quest του FACScan (Becton Dickinson). Ο φθορισμός καθορίστηκε σε μια λογαριθμική κλίμακα 4 τάξεων μεγέθους και το ποσοστό των θετικών κυττάρων από το σύνολο των 10.000 μετρήσεων υπολογίστηκε από την περιοχή του ιστογράμματος που επιλέχθηκε με τη βοήθεια του δείκτη M1.

5.18. Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι Sprague-Dawley κατέστησαν διαβητικοί με ενδοφλέβια χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (STZ), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως [270]. Επτά μήνες μετά την επαγωγή του διαβήτη, οκτώ αρουραίους (τέσσερα ως ομάδα ελέγχου, τέσσερις διαβητικοί) θυσιάστηκαν και τα νεφρά τους υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την ανοσοϊστοχημεία. Ιστοί από την ομάδα ελέγχου και διαβητικοί μονιμοποιήθηκαν σε παραφίνη.

5.19. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

Αντιδραστήρια-όργανα

- Ξυλόλη

- Αιθανόλη
- Διάλυμα αιματοξυλίνης (GILL II hematoxylin)
- Διάλυμα ηωσίνης (Eosin-phloxine B solution)

Αρχή μεθόδου

Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης είναι μια ιστολογική μέθοδος η οποία μας επιτρέπει την παρατήρηση της δομής του ιστού χρωματίζοντας τον σε μωβ-ροζ αποχρώσεις. Οι διαφορές στο χρώμα βασίζονται στο γεγονός ότι ο πυρήνας είναι πιο βασεόφιλος οπότε εμφανίζει μεγαλύτερη πρόσδεση με την αιματοξυλίνη η οποία έχει μπλε χρώμα. Ενώ οι πρωτεΐνες προσδένονται, μη ειδικά, κυρίως με την ηωσίνη η οποία έχει ροζ απόχρωση. Επιπλέον οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται με ηωσίνη.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά οι τομές αποπαραφινοποιήθηκαν δυο φορές με την χρήση ξυλόλη για 10 λεπτά. Ακολουθεί ενυδάτωση του ιστού σε κλίση αιθανόλης δηλαδή οι τομές εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε διαλύματα αιθανόλης 100%, 90%, 70%, 50% και 30% για 5 λεπτά κάθε φορά. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε διάλυμα αιθανόλης 95% και 70% για 2 λεπτά. Μετά την έκπλυση των τομών με καθαρό νερό ακολούθησε χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης για 8 λεπτά. Ακολούθως ξεπλύθηκαν οι τομές με τρεχούμενο νερό βρύσης και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 95%. Και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρώση με ηωσίνη για περίπου ένα λεπτό. Ενώ στη συνέχεια αφυδατώθηκε ο ιστός μέσω διαλύματος αιθανόλης 95% και απόλυτης αιθανόλης με εμβάπτιση σε αυτά τα διαλύματα για περίπου 5 λεπτά στο καθένα. Τέλος αφού οι ιστοί εμβαπτίστηκαν 2 φορές σε διάλυμα ξυλόλης για 5 λεπτά, καλύφτηκαν με καλυπτρίδα.

5.20. Ανοφθορισμός με φθορίζων αντίσωμα σε τομές ιστών

Αντιδραστήρια-όργανα

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ξυλόλη
- Αιθανόλη
- PBS pH 7,4
- Κιτρικό νάτριο 10mM pH 6

- Blocking: 10% Horse serum, 1% BSA, 0,4% Triton in PBS for an hour
- Ειδικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της βιταμίνης D (D-6, Santa Cruz Biotechnology, 1:50)
- Ειδικό αντίσωμα έναντι του WT1 (C-19 X, TransCruz antibody 1:2000)
- Ειδικό αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού
- Ειδικό αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών της κατσίκας
- Dako

Αρχή μεθόδου

Η τεχνική συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον είναι παρόν.

Αναλυτική πορεία

Τομές από ιστούς σε παραφίνη τοποθετημένες σε πλακίδια θερμαίνονται σε φούρνο στους 60°C για 80 λεπτά έτσι ώστε να τηχθεί η παραφίνη. Έπειτα τα πλακίδια τοποθετούνται απευθείας σε διάλυμα ξυλόλης για 10 λεπτά. Ακολουθεί ενυδάτωση του ιστού σε κλίση αιθανόλης δηλαδή οι τομές εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε διαλύματα αιθανόλης 100% (5 λεπτά), 90% (5 λεπτά), 70% (10 λεπτά), 50% (5 λεπτά) και 30% (5 λεπτά). Στην συνέχεια οι τομές παρέμειναν για 5 λεπτά σε νερό και για ακόμα 5 λεπτά σε PBS pH 7,4. Ακλούθησε διάνοιξη των επιτόπων των τομών μέσω βρασμού σε διάλυμα κιτρικού νατρίου σε φούρνο μικροκυμάτων για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε τρεχούμενο νερό για 8 λεπτά και μετά καλύπτηκαν με PBS pH 7,4. Ακολούθησε επώαση για μια νύχτα των τομών με διάλυμα ειδικών αντισωμάτων για τον υποδοχέα της βιταμίνης D αλλά και για τον WT1 που είναι ποδοκυτταρικός δείκτης. Την επόμενη μέρα οι τομές εκπλύθηκαν με PBS pH 7,4 και προστέθηκε διάλυμα ειδικών δευτέρων αντισωμάτων για 1 ώρα. Στην συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν και με την βοήθεια του Dako καλύφθηκαν με καλυπτρίδα.

5.21. Απομόνωση ολικού RNA

Αντιδραστήρια-όργανα

- TRIzol® (Invitrogen)

- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη (Sigma, Dorset, UK)
- Παγωμένη αιθανόλη, 75%, Rnase-free (Sigma, Dorset, UK)
- Καθαρό νερό
- Nanodrop ND-1000

Αρχή μεθόδου

Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol. Το ολικό RNA απομονώνεται από κύτταρα καλλιέργειας, HGEC, με τη μέθοδο ενός σταδίου[271]. Σε αυτή τη μέθοδο το αντιδραστηρίο TRIzol, το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικού άλατος (HSCN) γουανιδίνης ((H₂N)₂CNH), αναστέλει ισχυρά τη δράση των RNAασων, επίσης δρα στη διάσπαση των συμπλόκων που σχηματίζουν οι νουκλεϊνικές πρωτεΐνες αφήνοντας άθικτο το RNA επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την απελευθέρωση του στο διάλυμα. Το άθικτο RNA καθαρίζεται περαιτέρω από τις προσμίξεις με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Το RNA εκλεκτικά πηγαίνει στην υδατική φάση, ελεύθερο από το DNA και τις πρωτεΐνες και στη συνέχεια καταβυθίζεται εύκολα με ισοπροπανόλη [272]. Η καθαρότητα του RNA (απαλλαγμένου από πρωτεΐνες) καθορίζεται από το λόγο που απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260nm και στα 280nm (A_{260}/A_{280}). Ο λόγος A_{260}/A_{280} επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Η ελάτωση του pH οδηγεί σε χαμηλότερο λόγο A_{260}/A_{280} . Ένα δείγμα RNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) όταν ο παραπάνω λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,6-2,2, ενώ υψηλή τιμή απορρόφησης στα 280nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εμποδίζουν τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA και παρεμποδίζουν την RT-PCR.

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλακίδιο 6 πηγαδιών . Πριν την εκχύλιση του RNA τα κύτταρα εκπλένονται μια φορά με παγωμένο ρυθμιστικό φωσφορικών (PBS). Προστίθεται 1ml trizol σε κάθε πηγαδάκι και το ίζημα των κυττάρων συλλέγεται και περνά από σύριγγα ινσουλίνης περίπου 10 φορές ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200 μl χλωροφόρμιο και αναδεύουμε για 30 δευτερόλεπτα. Αφήνουμε τα δείγματα για 3 λεπτά στον πάγκο εργασίας και επείτα τα φυγοκεντρούμε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις

10.000 στροφές για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί και το 60% του συνολικού είναι η υδατική φάση και συλλέγεται. Προστίθεται 0,5 ml ισοπροπανόλη και το μίγμα μετά την προσθήκη αναδεύεται ήπια και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30-40 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο στο ίζημα προστίθεται 75% κρύα αιθανόλη και το δείγμα αποθηκεύεται για μια νύχτα στους -20°C. Την επόμενη ημέρα το δείγμα φυγοκεντρείται στα 7.500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα παραμένει για 2-3 λεπτά προκειμένου να στεγνώσει και μετά προστίθεται 20 μl καθαρό νερό. Η συγκέντρωση του RNA καθορίζεται με μέτρηση στα 260 nm ενώ γίνεται και πιστοποίηση της καθαρότητας του με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 και 280 nm και υπολογισμός του λόγου A_{260}/A_{280} ο οποίος σε όλα τα πειράματα ήταν μεγαλύτερος του 1.9.

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με το Nanodrop ND-1000 απαιτείται 1μl δείγματος το οποίο και φορτώνεται στο άκρο ενός ινώδους οπτικού καλωδίου (ινώδες λήψης). Ένα δεύτερο ινώδες οπτικό καλώδιο έρχεται τότε σε επαφή με το υγρό δείγμα και το υγρό δημιουργεί έτσι μια γέφυρα μεταξύ των άκρων των δυο ινωδών οπτικών καλωδίων. Το κενό ρυθμίζεται στο 1mm. Το μηχάνημα ελέγχεται από το λειτουργικό πρόγραμμα ND-1000 V3.1.0 ενός υπολογιστή, με τον οποίο είναι συνδεδεμένο και τα δεδομένα αποθηκεύονται στον υπολογιστή. Πριν τη μέτρηση του δείγματος το όργανο μηδενίζεται με 1μl ίδιου διαλύματος με αυτό στο οποίο βρίσκεται το RNA (τυφλό).

5.22. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT)

Αντιδραστήρια-όργανα

- ImProm-II™ reverse transcriptase system (Promega):
 - Διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (ImProm-II™ Reverse Transcriptase)
 - 5xPuθμιστικό διάλυμα αντιστροφής μεταγραφής (ImProm-II™ 5X Reaction Buffer)
 - Διάλυμα $MgCl_2$ (25mM)

- Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTP Mix) 10mM (το καθένα)
- Διάλυμα εναρκτηρίων ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης (oligo-dTs) 500μg/mL.
- H₂O απαλλαγμένο από RNάσες.
- Διάλυμα 40U/μL του ανασυνδυασμένου αναστολέα των RNασών
- Αποστειρωμένοι, θερμοανθεκτικοί σωλήνες PCR.
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών με φίλτρο, αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από DNάσες, RNάσες και γονιδιακό DNA (Greiner Bio-one).
- Συσκευή PCR TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 Ver 300

Αρχή μεθόδου

Η θερμοσταθερή πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην βασική διαδικασία PCR χρειάζεται σαν εκμαγείο DNA. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η μεθοδολογία της τεχνικής PCR στην μελέτη του RNA πρέπει πρώτα αυτό να μετατραπεί σε cDNA για να παρέχει το κατάλληλο εκμαγείο για την πολυμεράση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) και ως εκ τούτου και η ονομασία RT-PCR [273]. Η αντίδραση σύνθεσης πρώτου κλώνου cDNA (first-strand cDNA) καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση, παρουσία εναρκτηρίων ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης και τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων. Η απόδοση της σύνθεσης του cDNA αυξάνει με την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης του ανασυνδυασμένου αναστολέα των RNασών RNasin.

Αναλυτική πορεία

Έγινε αντίστροφη μεταγραφή 1μg ολικού RNA με τη χρήση του ImProm-II™ reverse transcriptase system (Promega). Η αντίδραση της RT ξεκινάει με θέρμανση στους 70°C για 5 λεπτά του αρχικού μίγματος τελικού όγκου 11,1μl το οποίο περιέχει το RNA και τα Oligo(dT). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά και μετά από μια γρήγορη φυγοκέντρηση προστίθεται στο μίγμα επιπλέον dNTPs (τελική συγκέντρωση κάθε dNTP να είναι 0,5mM), ImProm-II™ 5X Reaction Buffer (τελική αραίωση να είναι 1X), MgCl₂, αναστολέα RNασών (20u) και 1 μl ImProm-II™ αντίστροφη μεταγραφάση οπότε έχουμε τελικό όγκο 20 μl. Ακολουθεί η

επώαση για 5 λεπτά στους 25°C, ακολούθως 60 λεπτά στους 42°C και 15 λεπτά στους 70°C.

5.23. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Αντιδραστήρια-όργανα

- Διαλύματα εναρκτήριων μορίων 500 μM το καθένα συμπληρωματικά του γονιδίου της ποδοκαλκίνης, του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και της GAPDH. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C. Οι αλληλουχίες των βάσεων είναι οι εξής :

Πίνακας 8 Αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων

cDNA	Πρόσθιο εναρκτήριο μόριο	Ανάστροφο εναρκτήριο μόριο
Ποδοκαλκίνη	5'-AATTCCTTTCCCAGTTGT-3'	5'-TTCTCAGTAAATCCAGTGTA-3'
VDR	5'- GACATCGGCATGATGAAGGAG -3'	5'-GCGTCCAGCAGTATGGCAA-3'
GAPDH	5'- CCAAAATCAAGTGGGGCGATG -3'	5'- AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCTG-3'

- Ρύγξη αυτόματων πιπेटών με φίλτρο, αποστειρωμένα και απαλλαγμένα από DNάσες, RNάσες και γονιδιακό DNA (Greiner Bio-one).
- Συσκευή PCR: MX3000P® cyclor (Stratagene)
- Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix system (Stratagene)
- Διάλυμα της χρωστική αναφοράς Rox (1/200)
- Συστοιχίες σωλήνων PCR με καπάκια που επιτρέπουν την ανίχνευση ακτινοβολίας φθορισμού (επίπεδα) (Bioplastics).

Αρχή μεθόδου

Με την PCR είναι επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μιας περιοχής DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο τμήματα γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Χρησιμοποιούνται δυο εναρκτήρια μόρια γνωστής αλληλουχίας βάσεων, τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα άκρα της περιοχής DNA που

θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Διαχωρίζονται οι δυο κλώνοι του DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο με θέρμανση και συνδέονται τα εναρκτήρια μόρια στις συμπληρωματικές περιοχές υπό ψύξη. Στη συνέχεια παρουσία των τριφωσφορικών δεοξυνουκεοτιδίων και μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμερασής του DNA βιοσυντίθενται νέες αλυσίδες DNA. Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται για πολλές φορές και αποτελεί έναν κύκλο της PCR. Από τον τρίτο κύκλο σχηματίζονται διπλές αλυσίδες DNA με μήκος αντίστοιχο της απόστασής μεταξύ των δυο εννακτήριων μορίων. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) χρησιμοποιεί μόρια χρωστικής επισημασμένα με φθορισμό για να ελέγξει την παραγωγή των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR αντίδρασης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του προϊόντος είναι η Syber Green I. Η Syber Green I είναι μια χρωστική που παρεισφρύει μέσα σε δίκλωνο DNA (όπως συμβαίνει και με το βρωμιούχο αιθίδιο). Μόνο τα μόρια της χρωστικής που είναι δεσμευμένα σε δίκλωνο DNA εκπέμπουν ακτινοβολία (φθορίζουν) όταν διεγερθούν από μια πηγή φωτός. Η χρωστική δεσμεύεται σε κάθε νεοσυντιθέμενο δίκλωνο μόριο DNA και έτσι σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, θεωρητικά, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά το ποσοστό αύξησης του προϊόντος δηλ. υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ έντασης φθορισμού και ποσότητας δίκλωνου DNA.

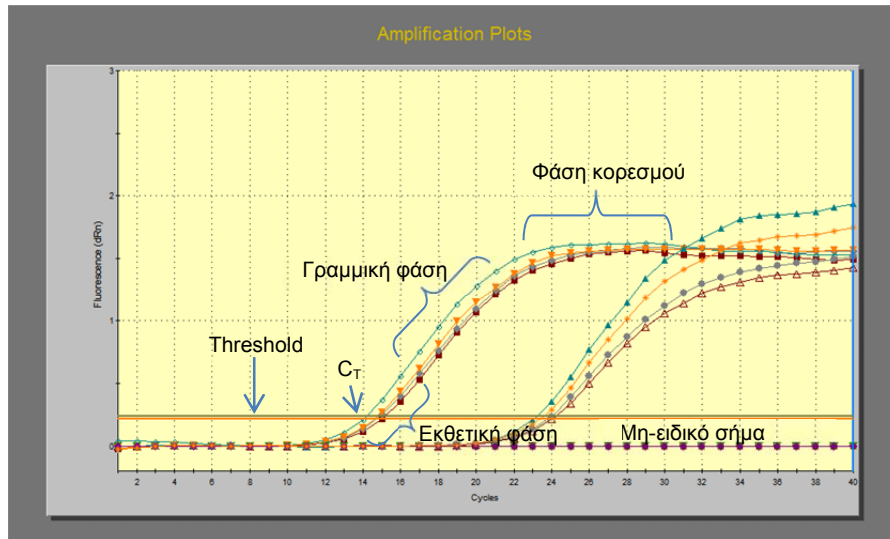
Αναλυτική πορεία

Τα cDNA που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την αντίδραση πολυμεράσης (2 μ l, 1:5 αραίωση). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Beacon Designer (version 7.01). Οι τελικές συγκεντρώσεις των ζευγών εκκινητών ήταν 100 nM. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) ακολούθησε με τη χρήση Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix system (Stratagene) σε ένα MX3000P® cycler (Stratagene) με τις συνθήκες που φαίνονται στον πίνακα 3 για 40 κύκλους. Τα γονίδια της GAPDH χρησιμοποιήθηκαν σαν ιδιοσυστατικά γονίδια αναφοράς (μάρτυρες). Τα επίπεδα του mRNA υπολογίστηκαν με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της εφαρμογής συγκριτικής ποσοτικοποίησης του λογισμικού MxPro™ (Stratagene).

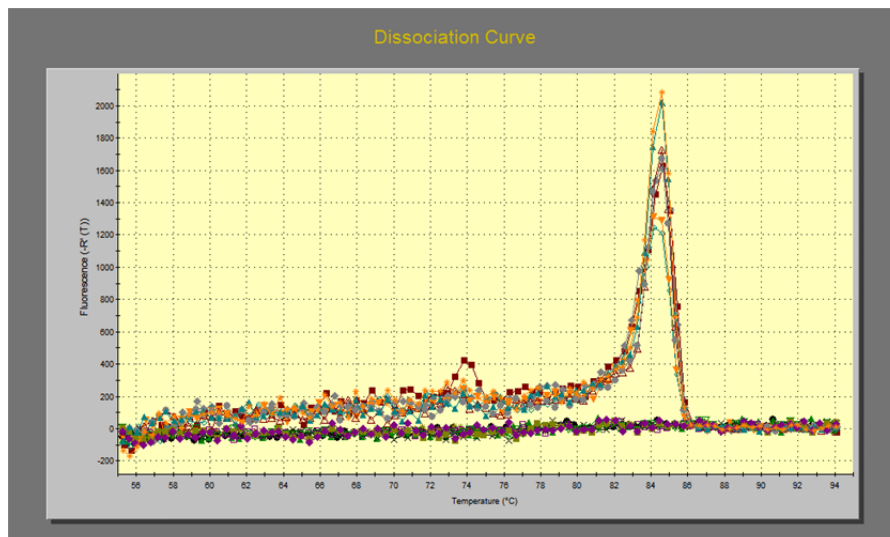
Αρχικά υπολογίζεται η ποσότητα του κάθε εκκινητή που απαιτείται από το διάλυμα των 5μM ώστε η τελική συγκέντρωση του εκκινητή στην αντίδραση να είναι 100nM. Τα ζεύγη των πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 σε σωλήνες eppendorf και τα μίγματα μεταφέρονται σε πάγο. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται 2 μl, 1:5 αραίωση από την ποσότητα του cDNA, κάθε δείγματος. Σε σωλήνες PCR προστίθεται κατάλληλη ποσότητα H₂O (η ποσότητα H₂O που προστίθεται σε κάθε αντίδραση υπολογίζεται από τη διαφορά του τελικού όγκου της αντίδρασης (20μL) από το άθροισμα του όγκου των υπόλοιπων προστιθέμενων αντιδραστηρίων). Στους σωλήνες επιπλέον προστίθενται το μίγμα των εκκινητών, 2μl του αραιωμένου cDNA, 30μl διαλύματος SYBR FAST qPCR MIX και 0,9μl διαλύματος της χρωστικής ROX. Οι σωλήνες προστατευμένοι από το φως μεταφέρονται σε πάγο. Οι σωλήνες μεταφέρονται στη συσκευή PCR και ξεκινά το πρόγραμμα PCR. Το προγράμμα που εφαρμόστηκε περιγράφεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 9 Συνθήκες αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Στάδια		Θερμοκρασία / Χρόνος	
1	Αρχικό στάδιο	95 °C	10 min
2	Στάδιο διαχωρισμού των κλώνων	95 °C	30 sec
3	Στάδιο σύνδεσης εναρκτηρίων μορίων	57 °C	40 sec
4	Στάδιο επέκτασης εναρκτηρίων μορίων	72 °C	40 sec
5	Επανάληψη σταδίων 2, 3, 4 για	40	
6	Τελικό στάδιο	95 °C	60 sec
7	Στάδιο προετοιμασίας	55 °C	30 sec
8	Στάδιο υπολογισμού Tm	95 °C	30 sec



Εικόνα 23 Καμπύλη ενίσχυσης (φθορισμός ως προς αριθμό κύκλων) των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο, για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων. Στο σχήμα διακρίνονται η γραμμική, η εκθετική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής C_T , ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το μη-ειδικό σήμα και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Η εικόνα του σχήματος παρατίθεται όπως προέκυψε από το λογισμικό του μηχανήματος ποσοτικής PCR MxPro-Mx3000P της Stratagene.



Εικόνα 24 Αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάλυσης της ειδικότητας του προϊόντος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (φθορισμός ως προς θερμοκρασία).

5.24. Αντίδραση αποσιώπησης γονιδίου με διαμόλυνση των κυττάρων με παρεμβαλλόμενο RNA (Si-RNA-transfection)

Αντιδραστήρια-όργανα

- DMEM (Biochrom)
- HAM's F12 (Biochrom)
- OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO)
- Λιποφακταμίνη (Lipofectamine 2000 (Invitrogen))
- Si-RNA VDR
- Control si-RNA

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αποσιώπηση γονιδίων με διαμόλυνση των κυττάρων με παρεμβαλλόμενο RNA βασίζεται στην καταστροφή του mRNA. Συνοπτικά, το dsRNA πέπτει μέσω της Dicer δίνοντας siRNA. Τα siRNA θα συνδεθούν με το RISC (RNA-Induced Silencing Complex – Σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται από το RNA). Τα siRNA θα γίνουν μονόκλωνα. Η μία αλυσίδα-κλώνος που μένει είναι ένα antisense RNA καθώς είναι συμπληρωματικό με το κατάλληλο mRNA. Το antisense RNA, ενωμένο πάντα με το RISC, θα συνδεθεί με το συμπληρωματικό mRNA. Το mRNA θα κοπεί και θα αποικοδομηθεί

Αναλυτική πορεία

Σε πλάκα 6 πηγαδιών τοποθετήθηκαν 150.000 κύτταρα/πηγάδι και καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα αφαιρέθηκε το υλικό καλλιέργειας και εφόσον τα κύτταρα εκλυθούν με διάλυμα PBS pH 7,4, τα επωάζονται με 80-100 μl διαλύματος DMEM/HAM's που περιείχε 0,1μM (hVDR)-si-RNA ή (-)-si-RNA και λιποφεκταμίνη για 8 ώρες. Μετά την αποσιώπηση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι την επόμενη μέρα στο σύνηθες υλικό καλλιέργειας. Το επόμενο πρωινό το υλικό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με νέο το οποίο περιείχε την επιθυμητή συγκέντρωση καλσιτριόλης ή παρικαλσιπόλης. Ύστερα από δυο μέρες επαναλήφθηκε η αποσιώπηση του γονιδίου και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία των διεγερτών για ακόμα δυο μέρες έτσι ώστε να συμπληρωθεί συνολικός χρόνος τεσσάρων ημερών επώασης με τους διεγέρτες.

5.25. Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- ChIP kit

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP, Chromatin immunoprecipitation) είναι μια τεχνική ανίχνευσης των αλληλεπιδράσεων συγκεκριμένων πρωτεϊνών με ειδικές γενωμικές αλληλουχίες *in vivo*. Στην τεχνική αυτή, τα κύτταρα κατεργάζονται με φορμαλδεΰδη για τη δημιουργία σταυροσυνδέσεων μεταξύ μορίων (πρωτεΐνες-πρωτεΐνες και DNA-πρωτεΐνες) που βρίσκονται *in vivo* σε εγγύτητα με τη χρωματίνη. Ακολουθεί κατακερματισμός της χρωματίνης με την χρήση υπερήχων και ανοσοκατακρήνιση με ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος. Με τον τρόπο αυτό οι DNA ακολουθίες που σταυροσυνδέονται άμεσα ή έμμεσα με συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμπλουτίζουν το ανοσοκατακρητισμένο δείγμα. Η αντιστροφή των σταυροσυνδέσεων με θέρμανση επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση του ανοσοκατακρητισμένου DNA. Η ποσότητα των ειδικών DNA αλληλουχιών στο δείγμα μάρτυρα και στο ανοσοκατακρητισμένο δείγμα προσδιορίζεται με τη μέθοδο PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτές αγαρόζης ή πηκτές πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η σύγκριση των ζωνών μεταξύ του δείγματος μάρτυρα και του ανοσοκατακρητισμένου δείγματος παρέχει πληροφορίες σχετικά με το επίπεδο της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος και τις διαφορετικές γενωμικές περιοχές.

Αναλυτική πορεία

Αναλυτικά η πορεία περιγράφεται στις οδηγίες που περιέχονται στο kit.

5.26. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζηςΑντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη
- 1X TBE (0,5 mM Na₂EDTA, 44,5 mM βορικό οξύ, 44,5 mM Tris, pH 8,0)
- DNA Ladder

- Διάλυμα επιστοίβαξης: 5% γλυκερόλη, 0,01% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0,01% κυανούν του ξυλενίου

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό των νουκλεϊνικών οξέων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται προς την άνοδο λόγω του αρνητικού τους φορτίου που τους προέρχεται από τις φωσφορικές ομάδες που περιέχονται στο μόριό τους. Εντοπισμός των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με τη βοήθεια ειδικής χρωστικής που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Η χρωστική αυτή είναι ένα κυκλικό μόριο που συνδέεται ανάμεσα στις βάσεις του δίκλωνου μορίου DNA (intercalator) με αποτέλεσμα να συγκεντρώνεται στις περιοχές όπου υπάρχουν οι ζώνες του DNA.

Αναλυτική πορεία

Η αγαρόζη προστίθεται αργά και υπό συνεχή ανάδευση σε διάλυμα 1X TBE και στη συνέχεια θερμαίνεται υπό ανάδευση έως ότου διαλυθεί πλήρως. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να ψυχθεί και όταν η θερμοκρασία του γίνει μικρότερη των 60°C προστίθεται 0,5 µg/ml EtBr, αποχύνεται σε ειδικό καλούπι στο οποίο έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί τα χτενάκια προκειμένου να σχηματισθούν οι θέσεις επιστοίβαξης. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 45 περίπου λεπτά και αφού σχηματισθεί η πηκτή αφαιρούνται τα χτενάκια και προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X TBE). Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν διαλύονται σε διάλυμα επιστοίβαξης.

5.27. Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό λογισμικό, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση είναι το SPSS for Windows, 17.0.1, SPSS Inc. Chicago, IL. Η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των ασθενών είναι η Pair T-test (ANOVA). Ενώ την σύγκριση των φυσιολογικών με τους αιμοκαθαρούμενους ασθενείς που έλαβαν ή δεν έλαβαν παρικαλσιτόλη καθώς και για τα πειράματα με την

κυτταρική σειρά η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η One-way (ANOVA). Η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των πειραμάτων με την κυτταρική σειρά είναι η One way (ANOVA)-LSD. Η στατιστική σημαντικότητα σε κάθε ανάλυση δηλωνόταν με το αντίστοιχο p-value, ωστόσο στατιστικώς σημαντικές θεωρούνται οι διαφορές με $p < 0,05$.

Κεφάλαιο 6 Αποτελέσματα

6.1. *In vitro* μελέτη της αντιθρομβωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης.

Προκειμένου να μελετηθεί *in vitro* η αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης μετρήθηκε η ικανότητα τους να αναστέλλουν την επαγόμενη από θρομβίνη και PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αρχικά παρελήφθη ολικό αίμα από υγιή κουνέλια από το οποίο απομονώθηκαν το πλάσμα εμπλουτισμένο σε αιμοπετάλια, ενώ στη συνέχεια απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με διαδοχικές πλύσεις μόνο τα αιμοπετάλια. Διαπιστώθηκε ότι η καλσιτριόλη αλλά και η παρικαλσιτόλη μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1mM, δεν προκαλούν συσσώρευση ούτε των πλυμένων αιμοπεταλίων ούτε των αιμοπεταλίων του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η επαγόμενη από PAF ($4,4 \times 10^{-11}$ M) ή θρομβίνη (0,1 mIU/ml) συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία ή απουσία διαφόρων συγκεντρώσεων καλσιτριόλης και παρικαλσιτόλης σε BSA. Από την μετρούμενη συσσώρευση υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} η οποία εκφράζει την παρεμποδιστική ικανότητα της καλσιτριόλης ή της παρικαλσιτόλης έναντι του παράγοντα συσσώρευσης, οπότε μικρή τιμή IC_{50} δηλώνει ισχυρή αντισυσσωρευτική δράση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφρασμένα ως IC_{50} παρατίθενται στον πίνακα 10 όπου φαίνεται ότι τόσο η καλσιτριόλη όσο και η παρικαλσιτόλη εμπόδισαν την επαγόμενη από PAF συσσώρευση τόσο των πλυμένων αιμοπεταλίων αλλά και των αιμοπεταλίων του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια. Επιπλέον η ικανότητα αναστολής – ως προς την επαγόμενη από PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων – της καλσιτριόλης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη της παρικαλσιτόλης. Ενώ η διαφορά αυτή φαίνεται να είναι μικρότερη στην περίπτωση των αιμοπεταλίων του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια.

Επίσης η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη εμπόδισαν την επαγόμενη από θρομβίνη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων και η αντισυσσωρευτική

ικανότητα τους είναι παρόμοια με εκείνη που μετρήθηκε στην περίπτωση του PAF. Ωστόσο και στην περίπτωση της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που προκαλείται από την θρομβίνη, η καλσιτριόλη φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αντισυσσωρευτική ικανότητα σε σχέση με την παρικαλσιτόλη.

Πίνακας 10 Επίδραση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στην επαγόμενη από PAF και θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Ουσία προς μελέτη	IC ₅₀ ¹ (nM) PAF σε WRPs	IC ₅₀ ¹ (nM) PAF σε PRP	IC ₅₀ ¹ (U/μl) θρομβίνης σε WRPs
Καλσιτριόλη	0,18 ± 0,08	43,5 ± 28,0	0,05 ± 0,03
Παρικαλσιτόλη	338,2 ± 58,1	1067,3 ± 132,0	675,4 ± 74,7

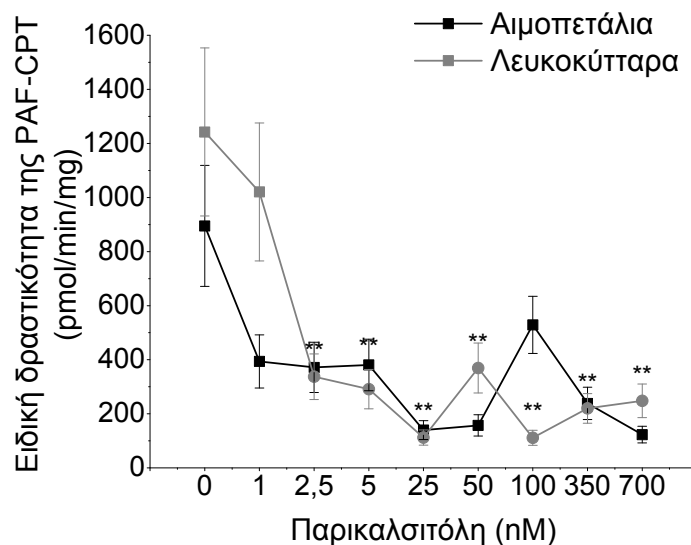
¹IC₅₀-τιμές εκφράζουν την συγκέντρωση (nM) της προς μελέτης ένωσης η οποία προκαλεί 50% αναστολή της επαγόμενης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τον εκάστοτε διεγέρτη.

6.2. *In vitro* μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων του PAF.

6.2.1. *In vitro* μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF.

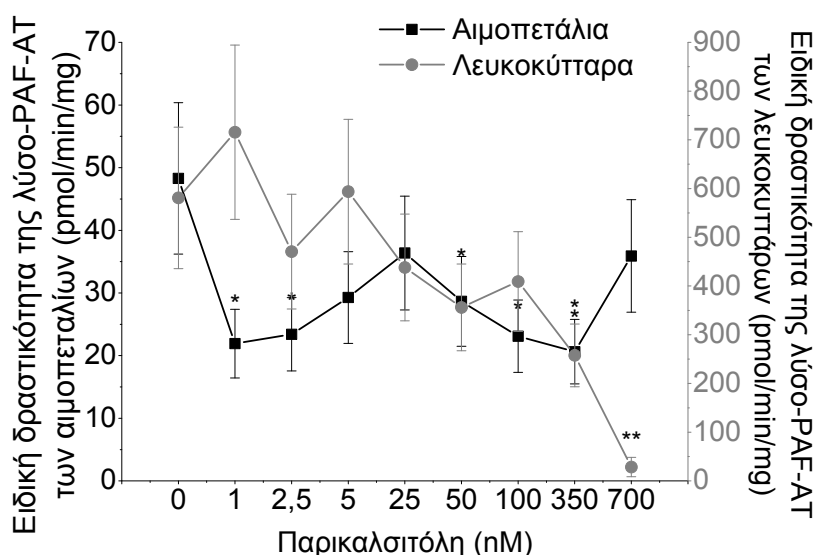
Τα δυο βασικά βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF είναι η PAF-CPT και η λύσο-PAF-AT τα οποία αντιστοιχούν στην επ' εξαρχής πορεία και την πορεία αναδιαμόρφωσης. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της παρικαλσιτόλης στην ενζυμική δραστικότητα αυτών των δύο ενζύμων *in vitro*.

Η παρουσία μικρών συγκεντρώσεων παρικαλσιτόλης δηλαδή 1 nM στην ενζυμική δοκιμασία της PAF-CPT των αιμοπεταλίων κουνελιού και αντίστοιχα 2,5 nM παρικαλσιτόλης στην ενζυμική δοκιμασία της PAF-CPT των λευκοκυττάρων κουνελιού όπως φαίνεται στο σχήμα 1 προκάλεσαν αντίστοιχα περίπου 50% (**p<0,05) και 65% (**p<0,05) μείωση της ενζυμικής δραστικότητας.



Σχήμα 1 *In vitro* ειδική δραστικότητα της PAF-CPT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία της παρικαλσιτόλης. (* $p < 0,10$ ** $p < 0,05$: σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς παρικαλσιτόλη)

Ενώ η παρουσία 1 nM παρικαλσιτόλης στην ενζυμική δοκιμασία της λύσο-PAF-AT των αιμοπεταλίων και αντίστοιχα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δηλαδή 50 nM παρικαλσιτόλης στην ενζυμική δοκιμασία της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων όπως φαίνεται στο σχήμα 2 προκάλεσαν περίπου 50% (* $p < 0,10$) μείωση της ενζυμικής δραστικότητας.

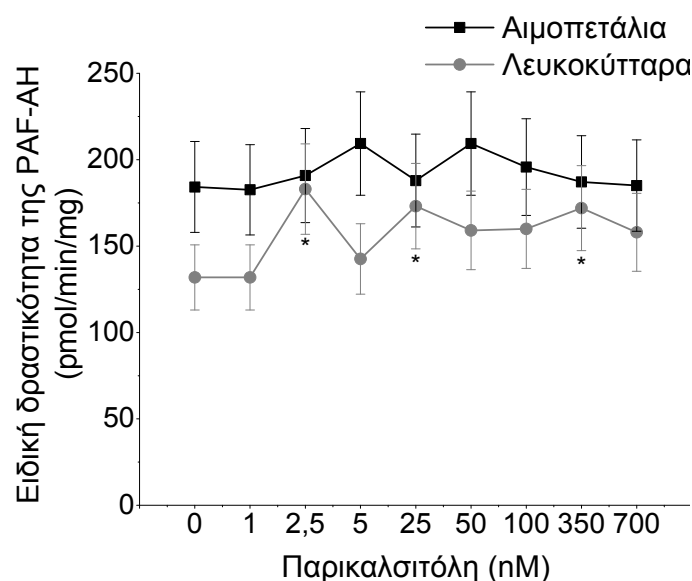


Σχήμα 2 *In vitro* ειδική δραστικότητα της λύσο-PAF-AT των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία της παρικαλσιτόλης. (* $p < 0,10$ ** $p < 0,05$: σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς παρικαλσιτόλη)

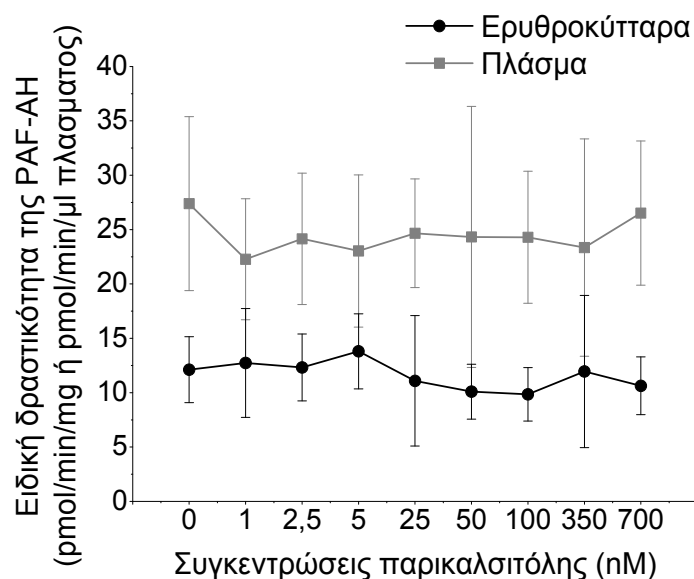
6.2.2. *In vitro* μελέτη της δράσης της παρिकाλσιτόλης στην δραστικότητα του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF.

Επιπλέον πέραν της βιοσυνθετικής πορείας του PAF και η πορεία αποικοδόμησης είναι εξέχουσας σημασίας στην ρύθμιση των επιπέδων του. Προκειμένου να μελετηθεί η *in vitro* δράση της παρिकाλσιτόλης ως προς την πορεία αποικοδόμησης του PAF μετρήθηκε η ενζυμική δραστικότητα της PAF-AH.

Η παρिकाλσιτόλη σε τελική συγκέντρωση 2,5 nM στην ενζυμική δοκιμασία της PAF-AH των λευκοκυττάρων (σχήμα 3) προκάλεσε περίπου 40% (* $p < 0,10$) αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας. Ωστόσο, η παρिकाλσιτόλη στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρέασε τα επίπεδα της PAF-AH των αιμοπεταλίων (σχήμα 3), των ερυθροκυττάρων (σχήμα 4) και του πλάσματος (Lp-PLA₂) (σχήμα 4).



Σχήμα 3 *In vitro* ειδική δραστικότητα της PAF-AH των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων απουσία και παρουσία παρिकाλσιτόλης. (* $p < 0,10$ ** $p < 0,05$: σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς παρिकाλσιτόλη)



Σχήμα 4 *In vitro* ειδική δραστηριότητα της PAF-AH των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος απουσία και παρουσία παρिकाλσιτόλης.

6.3. *In vivo* μελέτη της δράσης της χορηγούμενης παρिकाλσιτόλης σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς ως προς τη φλεγμονώδη κατατομή.

6.3.1. Βιοχημική και λιπιδαιμική κατατομή αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η κλινική κατάσταση των επτά αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν αλλά και μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης μετρήθηκαν οι βασικοί δείκτες βιοχημικής και λιπιδαιμικής κατατομής των ασθενών.

Η βιοχημική και λιπιδαιμική κατατομή των ασθενών προσδιορίστηκε μέσω των σύνηθων εξετάσεων στα πλαίσια παρακολούθησης της πορείας της υγείας των ασθενών με εξετάσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο νοσοκομείο. Οι σπουδαιότεροι παράμετροι πριν και μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης φαίνονται στον πίνακα 11. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων χωρίς όμως μεταβολή του αθηρωματικού δείκτη. Επιπλέον από την βιοχημική ανάλυση φάνηκε τάση μείωσης μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης της κρεατινικής κινάσης (* $p < 0,1$), της AST (* $p < 0,1$) και της ουρίας (* $p < 0,1$) ενώ βρέθηκε τάση αύξησης των επιπέδων του νατρίου (* $p < 0,1$).

Πίνακας 11 Βιοχημική και λιπιδαιμική κατατομή αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση 2 μg/μέρα παρικαλσιτόλης για ένα μήνα

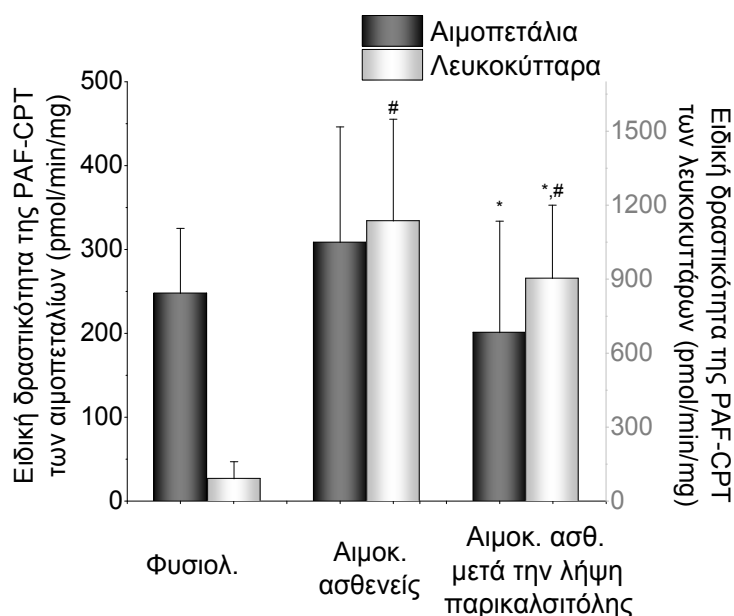
	Κλινικοί παράμετροι	Πριν την χορήγηση	Μετά την χορήγηση
Λιπιδαιμική ανάλυση	Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	170.57 ± 53.22	171.00 ± 58.09
	HDL (mg/dL)	42.71 ± 8.98	42.14 ± 10.33
	LDL (mg/dL)	101.43 ± 38.33	98.00 ± 39.08
	Τριγλυκερίδια (mg/dL)	133.29 ± 94.08	155.29 ± 97.78*
	Αθηρωματικός δείκτης	4.03 ± 0.97	4.04 ± 0.98
Βιοχημική ανάλυση	Γλυκόζη (mg/dL)	82.00 ± 16.12	81.71 ± 14.01
	Κρεατινική κινάση (CK) (IU/L)	44.14 ± 21.93	39.00 ± 16.54*
	Lactate Dehydrogonase (LDH) (IU/L)	159.29 ± 33.39	143.43 ± 37.20
	Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) (IU/L)	11.00 ± 4.00	7.85 ± 4.18*
	Pyruvic transaminase (ALT/GPT) (IU/L)	26.57 ± 4.65	23.43 ± 4.83
	Alkaline phosphatase (ALP) (IU/L)	123.71 ± 60.71	119.43 ± 59.91
	γ-Glutamyltransferase (γ-GT) (IU/L)	17.14 ± 6.04	16.86 ± 7.84
	Χολερυθρίνη (mg/dL)	0.371 ± 0.076	0.386 ± 0.107
	Αμυλάση (IU/L)	104.00 ± 54.03	101.86 ± 66.71
	Αλβουμίνη ορού (SA) (g/dL)	3.451 ± 0.35	3.451 ± 0.34
	Ουρικό οξύ (mg/dL)	6.60 ± 1.49	5.34 ± 2.17
	Ουρία (mg/dL)	171.00 ± 26.36	151.00 ± 23.81*
	Κρεατινίνη (mg/dL)	8.03 ± 1.09	8.47 ± 1.95
	Na (mmol/L)	136.29 ± 1.50	138.71 ± 2.36*
	K (mmol/L)	5.17 ± 0.89	5.30 ± 0.93
	P (mg/dL)	4.27 ± 0.53	5.00 ± 1.10
	Ca (mg/dL)	8.61 ± 0.86	8.51 ± 0.80
	Mg (mg/dL)	2.54 ± 0.27	2.67 ± 0.30*
	CRP (mg/L)	1.77 ± 1.03	1.44 ± 0.74

6.3.2. Δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF σε αιμοκαθαρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης

6.3.2.1. *In vivo* μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης ως προς ως την δραστικότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF.

Η δραστικότητα των δυο βασικών βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF (PAF-CPT, λύσο-PAF-AT) εξετάστηκε τόσο σε φυσιολογικούς μάρτυρες όσο και σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί η κατάσταση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες αλλά και η δράση της παρिकाλσιτόλης.

Η δραστικότητα της PAF-CPT των αιμοπεταλίων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης δεν διαφέρουν από εκείνη των φυσιολογικών. Ωστόσο, η δραστικότητα του ενζύμου PAF-CPT των λευκοκυττάρων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν την χορήγηση παρिकाλσιτόλης είναι περίπου 10 φορές υψηλότερη από εκείνη των φυσιολογικών ($p < 0,001$) (σχήμα 5).



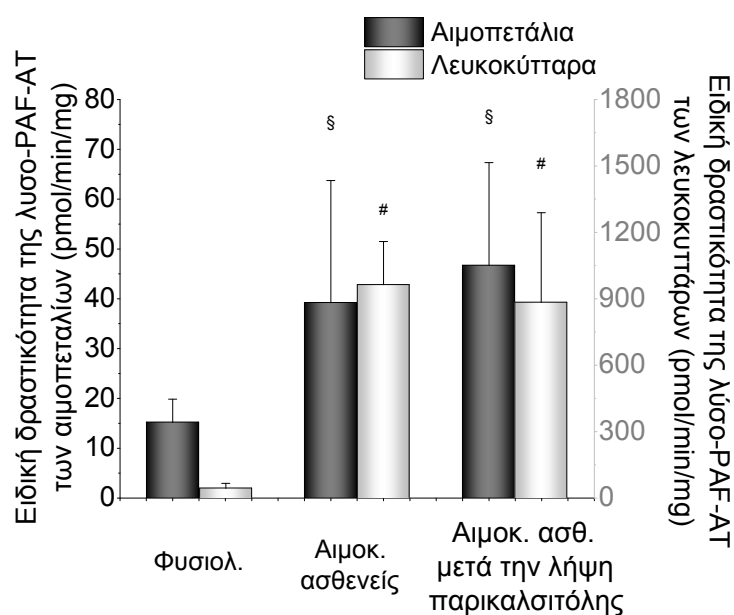
Σχήμα 5 *In vivo* ειδική δραστικότητα της PAF-CPT σε ομογενοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα. ($\#p < 0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς, $*p < 0,05$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης)

Μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης η δραστικότητα του ενζύμου της PAF-CPT των αιμοπεταλίων των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών φαίνεται να μειώνεται κατά 28% ($*p < 0,05$) (σχήμα 5). Επιπλέον, μετά την χορήγηση

παρिकाλσιτόλης η δραστικότητα του ενζύμου της PAF-CPT των λευκοκυττάρων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών εμφάνισε τάση μείωσης κατά 20% (* $p<0,1$) (σχήμα 5).

Η δραστικότητα του ενζύμου της λύσο-PAF-AT των αιμοπεταλίων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης είναι περίπου 60% (§ $p<0,03$) μεγαλύτερη από εκείνη των φυσιολογικών μαρτύρων. Ωστόσο, η δραστικότητα του ενζύμου της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης είναι περίπου 20 φορές υψηλότερη από εκείνη των φυσιολογικών (# $p<0,001$) (σχήμα 6).

Ενώ, μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης η δραστικότητα της λύσο-PAF-AT σε ομογενοποίημα αιμοπεταλίων και σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων των αιμοκαθαρούμενων ασθενών δεν μεταβλήθηκε (σχήμα 6).



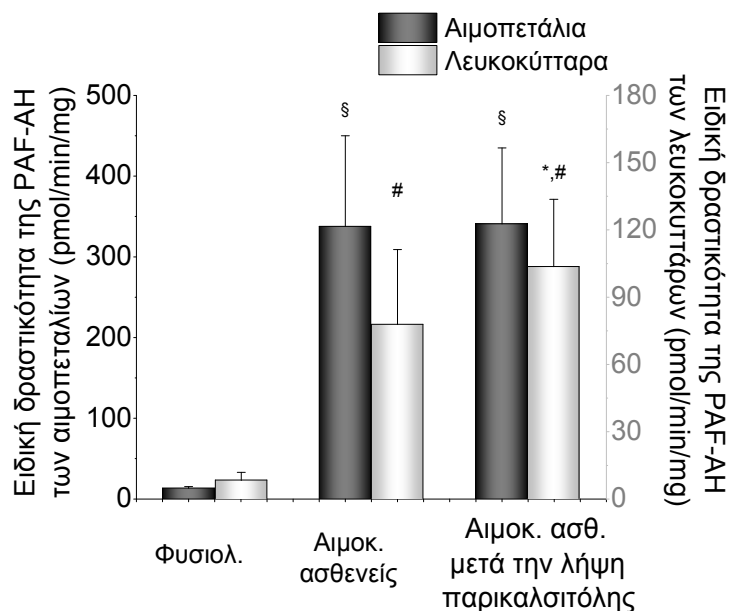
Σχήμα 6 *In vivo* ειδική δραστικότητα της λύσο-PAF-AT σε ομογενοποίημα αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα (§ $p<0,03$, # $p<0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς)

6.3.2.2. *In vivo* μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης ως προς ως την δραστικότητα της PAF-AH

Η δραστικότητα της PAF-AH εξετάστηκε τόσο σε φυσιολογικούς μάρτυρες όσο και σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης. Με σκοπό να αξιολογηθεί η κατάσταση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες αλλά και η δράση της παρικαλσιτόλης.

Η δραστικότητα της PAF-AH των αιμοπεταλίων αλλά και των λευκοκυττάρων των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών είναι αντίστοιχα περίπου 26 φορές ($\S p < 0,001$) και 11 φορές ($\# p < 0,001$) μεγαλύτερη από εκείνη των φυσιολογικών (σχήμα 7).

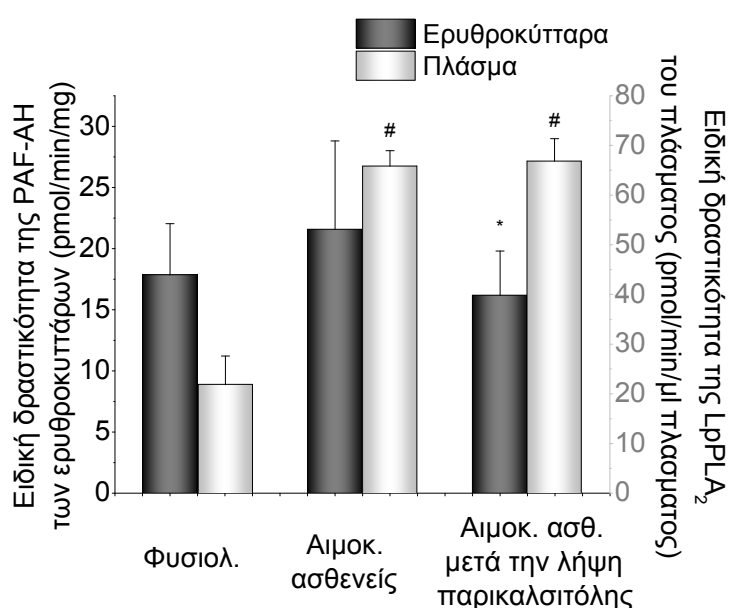
Μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης η δραστικότητα της PAF-AH των αιμοπεταλίων των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών δεν μεταβλήθηκε (σχήμα 7). Ενώ η δραστικότητα της PAF-AH των λευκοκυττάρων μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς αυξήθηκε κατά 33% ($*p < 0,01$) (σχήμα 7).



Σχήμα 7 *In vivo* ειδική δραστικότητα της PAF-AH σε ομογενοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα ($\S p < 0,001$, $\# p < 0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς, $*p < 0,01$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης)

Η δραστικότητα του ενζύμου της PAF-AH των ερυθροκυττάρων των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών δεν διαφέρει από εκείνη των φυσιολογικών μαρτύρων (σχήμα 8). Ωστόσο η χορήγηση της παρικαλσιτόλης στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς οδήγησε σε τάση μείωσης της δραστικότητας της PAF-AH των ερυθροκυττάρων κατά 25% (* $p<0,05$) (σχήμα 8).

Ενώ η δραστικότητα του ενζύμου της LpPLA₂ του πλάσματος των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης είναι σχεδόν 3 φορές μεγαλύτερη (# $p<0,001$) από εκείνη των φυσιολογικών και δεν μεταβλήθηκε μετά την χορήγηση της παρικαλσιτόλης (σχήμα 8).



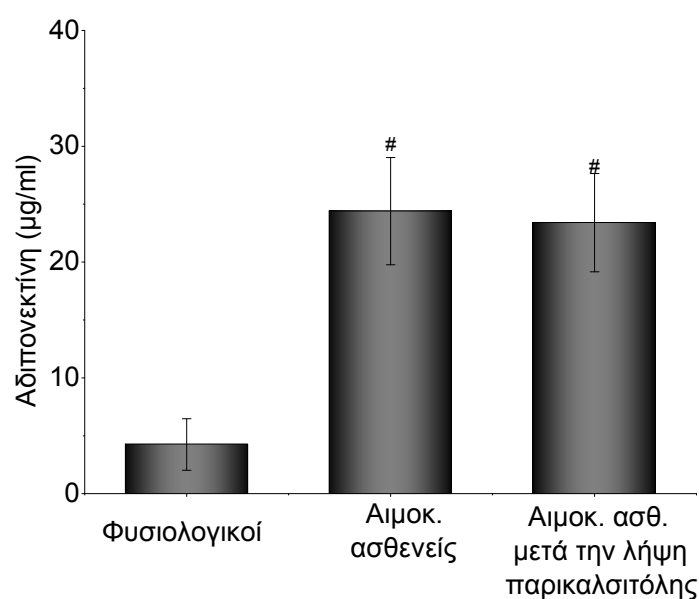
Σχήμα 8 *In vivo* ειδική δραστικότητα της PAF-AH σε ομογενοποίηση ερυθροκυττάρων και πλάσμα σε φυσιολογικούς μάρτυρες και αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα (# $p<0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς, * $p<0,05$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης)

6.3.3. *In vivo* μελέτη των επιπέδων άλλων φλεγμονωδών παραγόντων.

Επιπροσθέτως μελετήθηκε η δράση της παρικαλσιτόλης και ως προς άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες. Μετρήθηκαν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης με ELISA και τα επίπεδα των IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α και VEGF με κυτταρομετρία ροής στο πλάσμα αίματος των φυσιολογικών μαρτύρων και

των αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης.

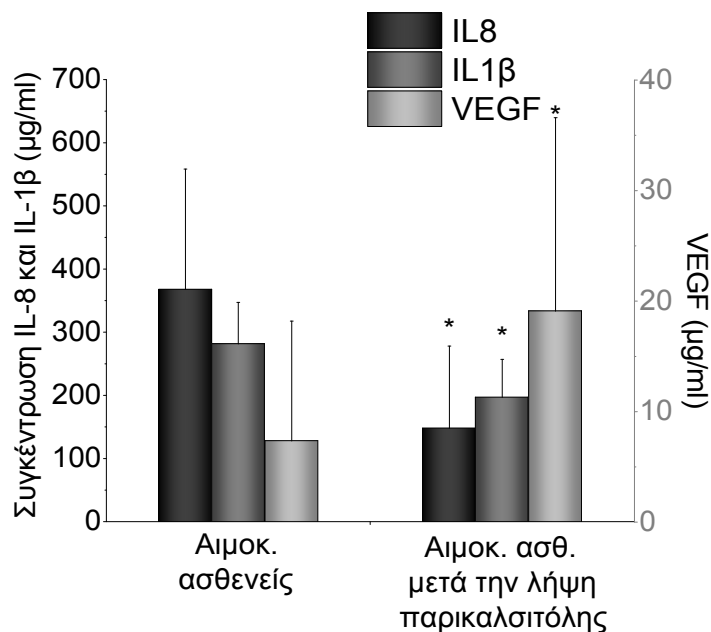
Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης των αιμοκαθαρούμενων ασθενών αλλά και των αιμοκαθαρούμενων ασθενών που έλαβαν παρिकाλσιτόλη είναι 3 φορές υψηλότερα ($\#p<0,001$) από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών μαρτύρων (σχήμα 9). Παρόλα αυτά τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης των αιμοκαθαρούμενων ασθενών δεν μεταβλήθηκαν μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης (σχήμα 9).



Σχήμα 9 Επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα αίματος φυσιολογικών μαρτύρων και αιμοκαθαρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης για ένα μήνα ($\#p<0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς)

Όσον αφορά τα επίπεδα της IL-12p70 δεν κατέσται δυνατό να ανιχνευτούν με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον τα επίπεδα των IL-1β, IL-8 και VEGF δεν ήταν ανιχνεύσιμα στους φυσιολογικούς ασθενείς.

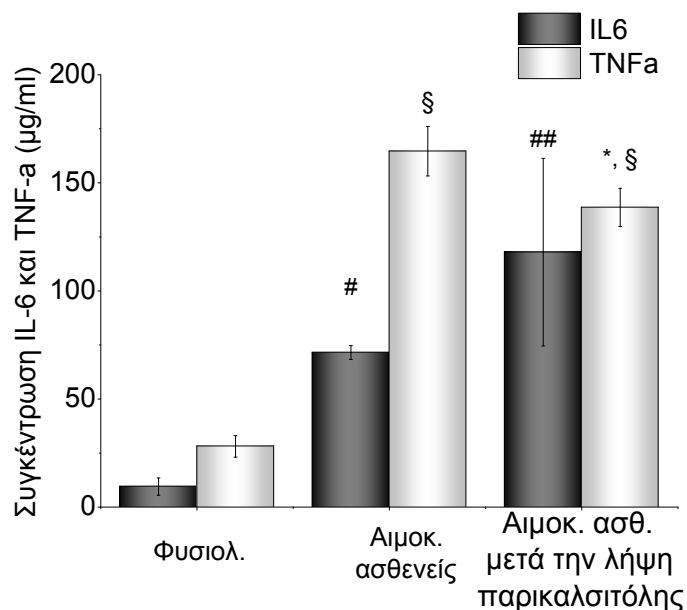
Η IL-8 μειώθηκε κατά 60% ($*p<0,05$) ενώ η IL-1β μειώθηκε κατά 30% ($*p<0,1$) στους αιμοκαθαρούμενους ασθενείς μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης (σχήμα 10). Επιπλέον, ο VEGF αυξήθηκε κατά 2,6 φορές ($*p<0,05$) στους αιμοκαθαρούμενους ασθενείς μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης (σχήμα 10).



Σχήμα 10 Συγκέντρωση IL-8, IL-1β και TNF-α στο πλάσμα αίματος αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης (* $p < 0,05$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης)

Η συγκέντρωση της IL-6 στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς και στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς μετά την χορήγηση της παρικαλσιτόλης είναι περίπου 7 ($\#p < 0,02$) και 10 φορές ($\#\#p < 0,001$) μεγαλύτερη αντίστοιχα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η δε συγκέντρωση του TNF-α είναι περίπου 15 φορές μεγαλύτερη ($\S p < 0,001$) στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς και στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς μετά την χορήγηση της παρικαλσιτόλης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ασθενείς (σχήμα 11).

Μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς παρατηρήθηκε μια τάση αύξηση συγκέντρωσης της IL-6 η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Επιπλέον μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρήθηκε μείωση του TNF-α κατά 15% (* $p < 0,02$) (σχήμα 11).



Σχήμα 11 Συγκέντρωση IL-6 και TNF-α στο πλάσμα αίματος φυσιολογικών μαρτύρων και αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης για ένα μήνα (# $p<0,02$, ## $p<0,001$, § $p<0,001$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών με τους φυσιολογικούς, * $p<0,02$: σύγκριση των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών πριν και μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης)

6.4. *In vitro* μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος (HGEC).

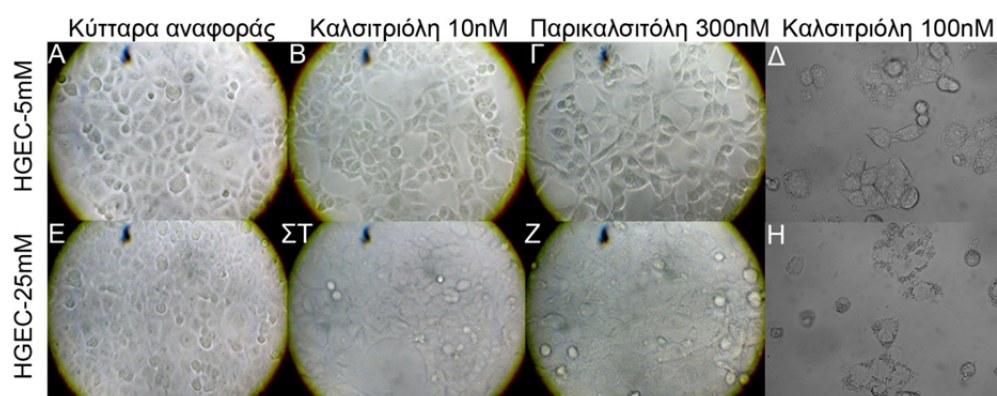
6.4.1. Φαινοτυπική παρατήρηση των HGEC σε οπτικό μικροσκόπιο

Η κυτταρική αυτή σειρά καλλιεργείται συνήθως σε τελική συγκέντρωση γλυκόζης 5mM ωστόσο καλλιεργήθηκαν και σε 25mM γλυκόζη προκειμένου να προσομοιάσουμε τις συνθήκες της διαβητικής νεφροπάθειας [274,275]. Στην συνέχεια θέλοντας να μελετήσουμε την πιθανή προστατευτική δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ημέρες παρουσία καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των HGEC που καλλιεργούνται σε πλαστικά δοχεία καλλιέργειας παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφου φάσεως. Στην εικόνα 25 φαίνονται τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM (εικόνα 25Α-Δ) και 25mM (εικόνα 25Ε-Η) γλυκόζη. Ωστόσο τα

ποδοκύτταρα στην εικόνα 25Α και 25Ε καλλιεργήθηκαν απουσία διεγέρτη, ενώ τα ποδοκύτταρα στην εικόνα 25Β και 25ΣΤ καλλιεργήθηκαν για τέσσερις ημέρες παρουσία καλσιτριόλης τελικής συγκέντρωσης 10nM.

Ενώ τα ποδοκύτταρα στην εικόνα 25Γ και 25Ζ καλλιεργήθηκαν για 4 ημέρες παρουσία παρικαλσιτόλης 300 nM και στις εικόνες 25Δ και 25Η τα ποδοκύτταρα καλλιεργήθηκαν για 3 ημέρες παρουσία καλσιτριόλης 100 nM ωστόσο τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν σημάδια νέκρωσης.



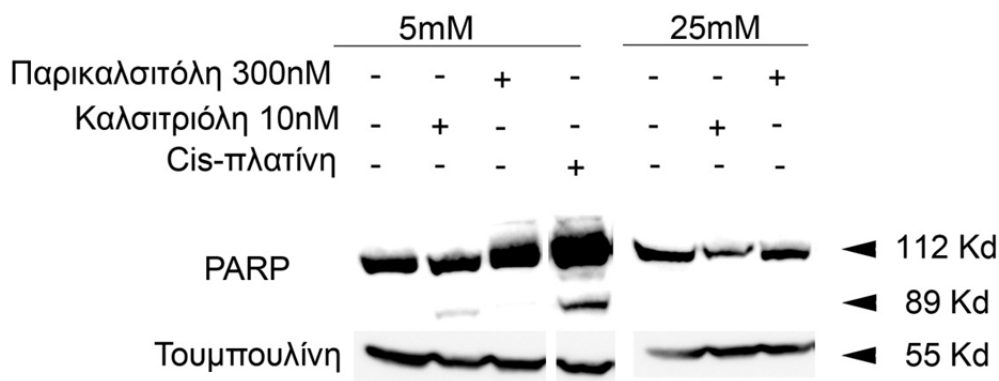
Εικόνα 25 Φωτογραφίες HGEC σε οπτικό μικροσκόπιο

6.4.2. *In vitro* μελέτη της πιθανής τοξικότητας της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα HGEC.

Η πρωτεΐνη PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) (112 Kd) είναι μια πυρηνική πολυμεράση, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες [276]. Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να διασπαστεί από πολλές ICE κασπάσες *in vitro* [277,278] και είναι ένας από τους κύριους στόχους διάσπαση της κασπάσης-3 *in vivo* [279,280]. Στην ανθρώπινη PARP, η διάσπαση συμβαίνει μεταξύ Asp214 και Gly215, χωρίζει την PARP στην αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης του DNA (24 Kd) από την καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή (89 Kd) [277,279]. Η πρωτεΐνη PARP βοηθά τα κύτταρα να διατηρήσουν τη βιωσιμότητά τους, διάσπαση της διευκολύνει την κυτταρική αποσυναρμολόγηση και χρησιμεύει ως δείκτης των κυττάρων που είναι αποπτωτικά [281].

Φάνηκε ότι ούτε τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αλλά ούτε και τα φαρμακευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν προκαλούν απόπτωση των HGEC

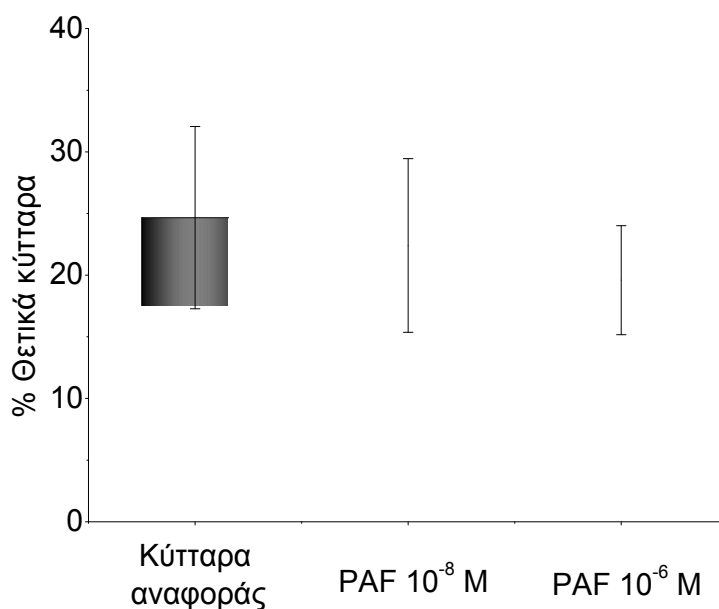
όπως φαίνεται από την σύγκριση της διασπασμένης μορφής σε σχέση τα κύτταρα που επωάστηκαν με *cis*-πλατίνη η οποία προκαλεί απόπτωση των κυττάρων (εικόνα 26).



Εικόνα 26 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της PARP και της τουμπουλίνης

6.5. *In vitro* μελέτη της δράσης του PAF ως προς την έκφραση της νεφρίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

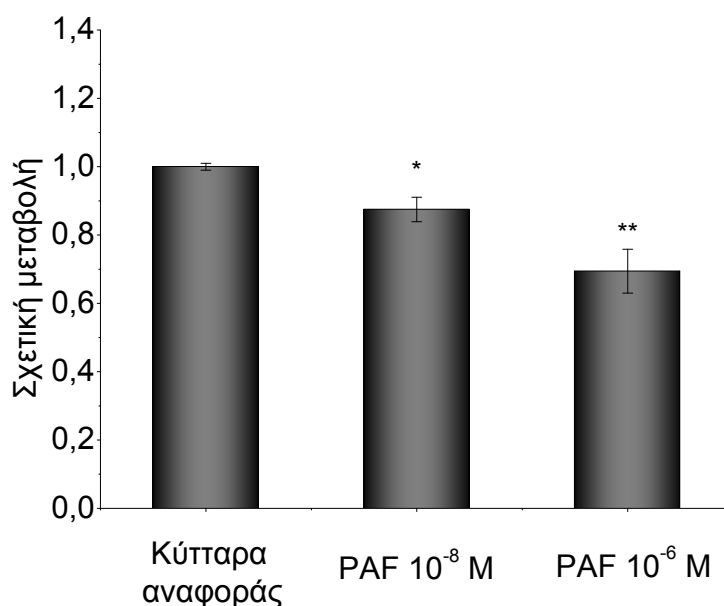
Ποδοκύτταρα καλλιεργούμενα σε συγκεντρώσεις γλυκόζης 5mM εκτέθηκαν για τέσσερις ώρες σε PAF 10^{-8} M και 10^{-6} M (σχήμα 12).



Σχήμα 12 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης

Παρατηρήθηκε μείωση επιφανειακών επιπέδων νεφρίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης. Η μείωση των

επιφανειακών επιπέδων νεφρίνης όταν επωάστηκαν με PAF 10^{-8} M και 10^{-6} M ήταν 10% (* $p < 0,1$) και 30% (** $p < 0,05$) αντίστοιχα (σχήμα 13).



Σχήμα 13 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης εκφρασμένα ως σχετική μεταβολή σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (* $p < 0,1$, ** $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη)

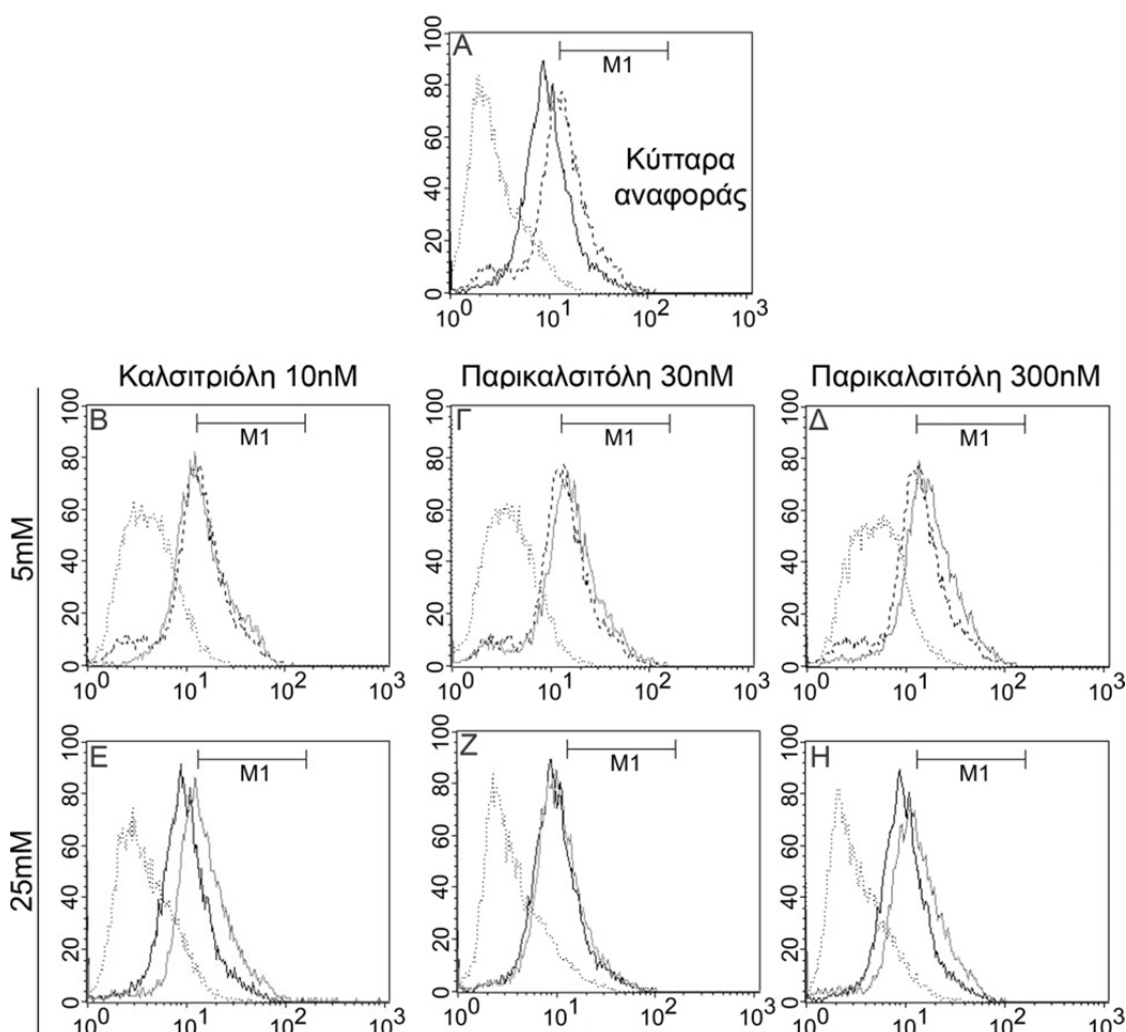
6.6. *In vitro* μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης ως προς την έκφραση πρωτεϊνών του ηθμού διήθησης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

Η κυτταρική αυτή σειρά καλλιεργείται συνήθως 5mM γλυκόζη ωστόσο καλλιεργήθηκαν σε 25mM γλυκόζη προκειμένου να προσομοιάσουμε την διαβητική νεφροπάθεια. Στην συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή προστατευτική δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης ως προς τις πρωτεΐνες που μετέχουν στην αρχιτεκτονική του ηθμού διήθησης όπως η νεφρίνη και η CD2AP.

6.6.1. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

Ποδοκύτταρα καλλιεργούμενα σε συγκεντρώσεις γλυκόζης 5mM ή 25mM εκτέθηκαν για τέσσερις ημέρες είτε σε καλσιτριόλη 10nM είτε σε παρικαλσιτόλη με τελική συγκέντρωση 30 ή 300nM. Στην συνέχεια

μετρήθηκαν τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης με κυτταρομετρία ροής. (εικόνα 27)

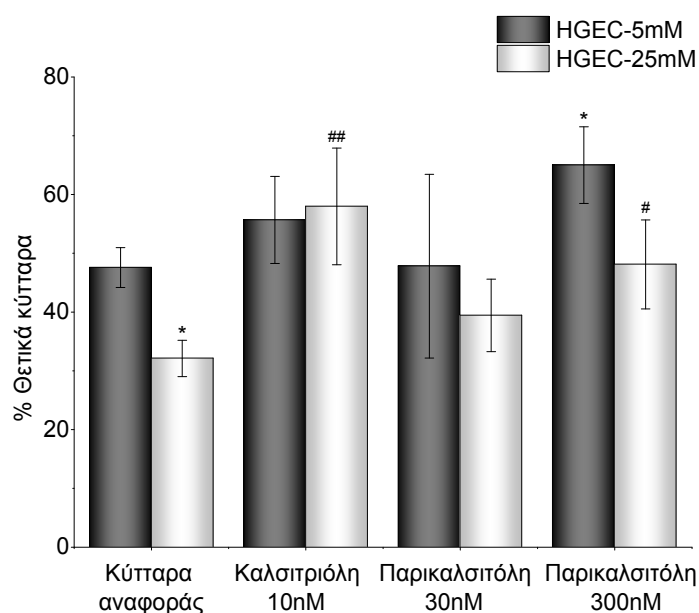


Εικόνα 27 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της νεφρίνης. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε τελική συγκέντρωση γλυκόζης 5mM (Α-Δ) είτε σε 25mM (Α,Ε-Η) επωάστηκαν για 4 ημέρες σε καλσιτριόλη 10nM (Β,Ε) ή παρικαλσιτόλη 30nM (Γ,Ζ) ή παρικαλσιτόλη 300nM (Δ,Η). Οι στικτές γραμμές αφορούν κύτταρα που επωάστηκαν με IgG, η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε συγκέντρωση γλυκόζης 25mM, η διακεκομμένη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε συγκέντρωση γλυκόζης 5mM ενώ η συνεχόμενη γκρι γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης των ποδοκυττάρων παρουσία του εκάστοτε διεγέρτη.

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης η επιφανειακή έκφραση της νεφρίνης εμφανίζεται μειωμένη κατά 30% σε σχέση με εκείνα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζης. (* $p < 0,05$) (εικόνα 24Α, σχήμα 14)

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης μόνο η παρικαλσιτόλη-300nM αύξησε τα επιφανειακά επίπεδα της νεφρίνης κατά 30% σε σχέση με τα βασικά επίπεδά της. (* $p < 0,05$) (εικόνα 27Δ, σχήμα 14)

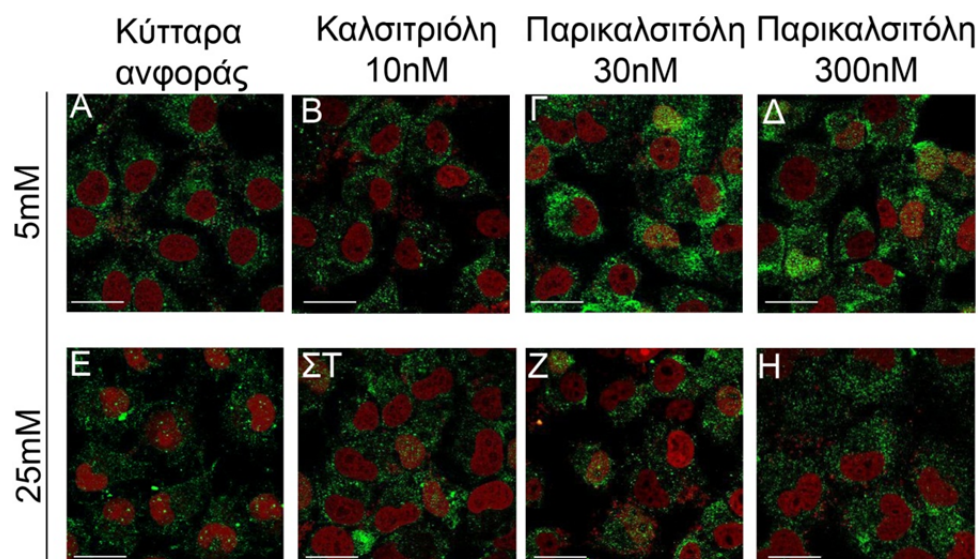
Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης τόσο η καλσιτριόλη-10nM όσο και η παρικαλσιτόλη-300nM οδήγησαν σε αύξηση των επιφανειακών επιπέδων της νεφρίνης κατά 50% ($##p < 0,005$) και 40% ($#p < 0,05$) αντίστοιχα σε σχέση με τα επίπεδα της νεφρίνης σε αυτά τα κύτταρα. (εικόνα 27Ε,Η, σχήμα 14)



Σχήμα 14 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της νεφρίνης (* $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, $#p < 0,05$, $##p < 0,005$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη)

Η κατανομή της νεφρίνης στα HGEc αποτυπώθηκε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού όπως φαίνεται στην εικόνα 28. Παρατηρήθηκε ότι στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης η παρικαλσιτόλη-30nM ή -300nM αύξησαν τα επιφανειακά επίπεδα της νεφρίνης (εικόνα 28Γ,Δ). Ενώ στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται

παρουσία 25mM γλυκόζης τόσο η καλσιτριόλη-10nM όσο και η παρικαλσιτόλη-300nM αύξησαν τα επιφανειακά επίπεδα της νεφρίνης (εικόνα 28ΣΤ,Η).

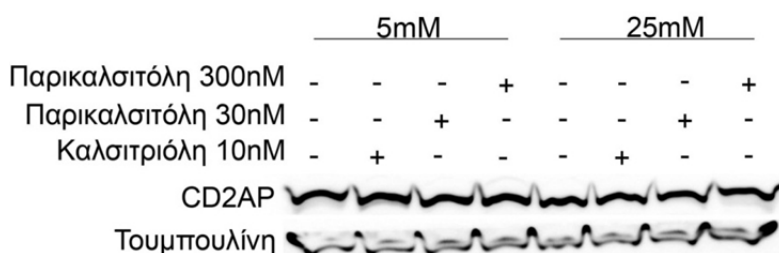


Εικόνα 28 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης της νεφρίνης με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα HGEC που καλλιεργούνται είτε σε γλυκόζη 5mM (Α-Δ) είτε σε γλυκόζη 25mM (Ε-Η) επωάστηκαν για 4 μέρες με καλσιτριόλη 10nM (Β,ΣΤ) ή παρικαλσιτόλη 30nM (Γ,Ζ) ή παρικαλσιτόλη 300nM (Δ,Η) . Η κόκκινη χρωστική είναι ιωδιούχο προπίδιο το οποίο προσδένεται στο DNA ενώ η νεφρίνη ανιχνεύεται με πράσινο φθορίζων αντίσωμα.

6.6.2. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της CD2AP σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

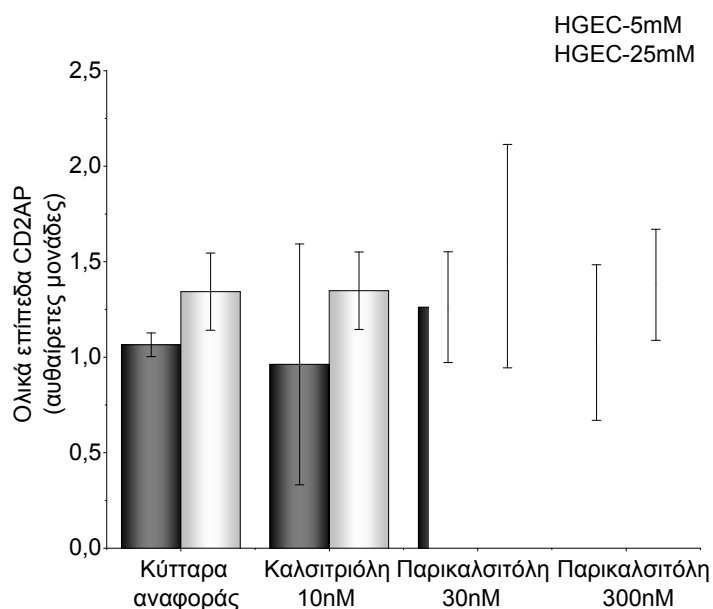
Έχοντας υπόψη ότι η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη αυξάνουν τα επίπεδα της νεφρίνης, μελετήθηκαν οι δράσεις αυτών και στα επίπεδα της CD2AP η οποία συνδέεται ενδοκυτταρικά με την νεφρίνη.

Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5 mM ή 25mM γλυκόζης εκτέθηκαν για τέσσερις ημέρες συνεχώς είτε σε καλσιτριόλη-10nM είτε σε παρικαλσιτόλη-30 ή -300nM. Στην συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης CD2AP με ανοσοαποτύπωση κατά Western. (εικόνα 29)



Εικόνα 29 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της CD2AP και της τουμπουλίνης

Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή των επιπέδων της CD2AP ούτε στα HGEC εκτεθειμένα σε 25mM γλυκόζη ούτε παρουσία των δυο φαρμακευτικών σκευασμάτων όπως φαίνεται και από την ανάλυση στο σχήμα 15.



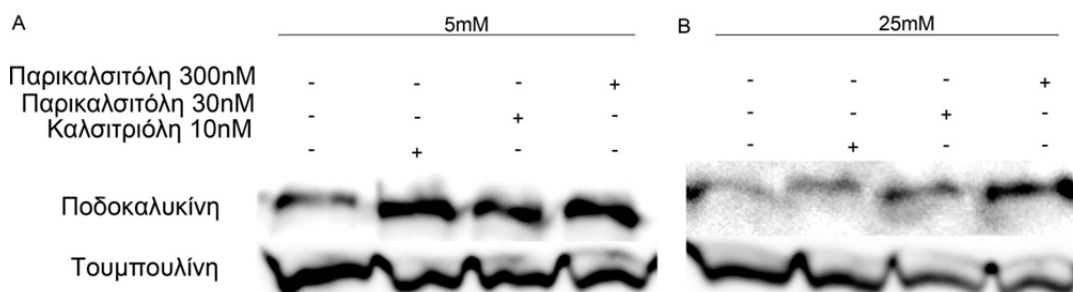
Σχήμα 15 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα CD2AP

6.7. Μελέτη της δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπείράματος.

Πέραν των πρωτεϊνών του ηθμού διήθησης, είναι γνωστό ότι ιδιαίτερης σπουδαιότητας για την διατήρηση του φαινοτύπου και κατ' επέκταση της λειτουργικότητας των ποδοκυττάρων είναι η ποδοκαλυκίνη.

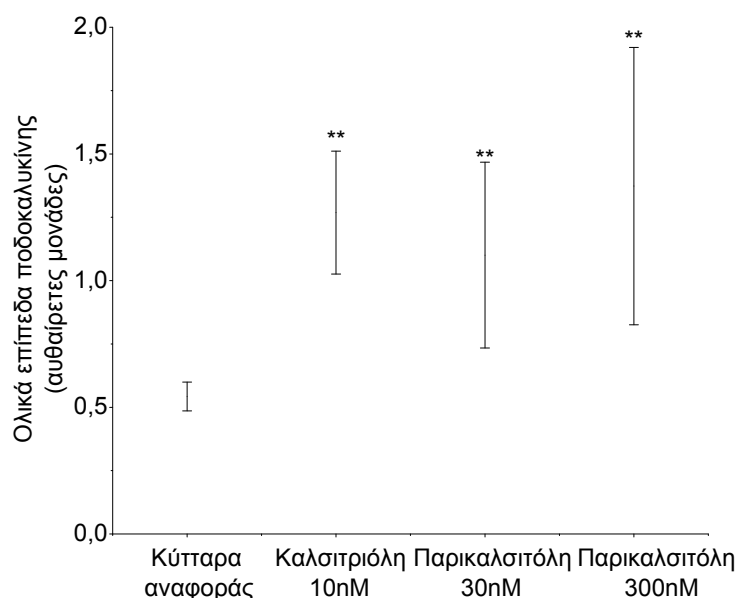
Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε 5mM είτε σε 25mM γλυκόζη εκτέθηκαν για τέσσερις μέρες συνεχώς είτε σε καλσιτριόλη-10nM είτε σε

παρिकाλσιτόλη-30nM ή -300nM. Στην συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά επίπεδα πρωτεΐνης της ποδοκαλκίνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 30), τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 31) και τέλος η κατανομή της με έμμεσο ανοσοφθορισμό (εικόνα 32).



Εικόνα 30 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της ποδοκαλκίνης και της τουμπουλίνης

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη τόσο η καλσιτριόλη όσο και η παρिकाλσιτόλη αύξησαν κατά 2,5 φορές τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης της ποδοκαλκίνης σε σχέση με τα βασικά επίπεδα της (** $p < 0,001$) (σχήμα 16).

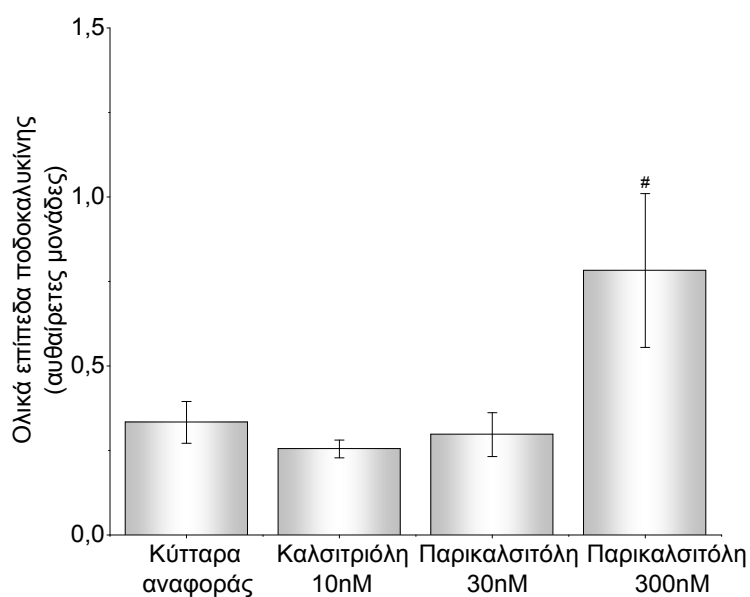


Σχήμα 16 Ολικά επίπεδα ποδοκαλκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη ($p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς)**

Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη εκφράζουν πολύ λιγότερα ολικά επίπεδα ποδοκαλκίνης σε σχέση με εκείνα που

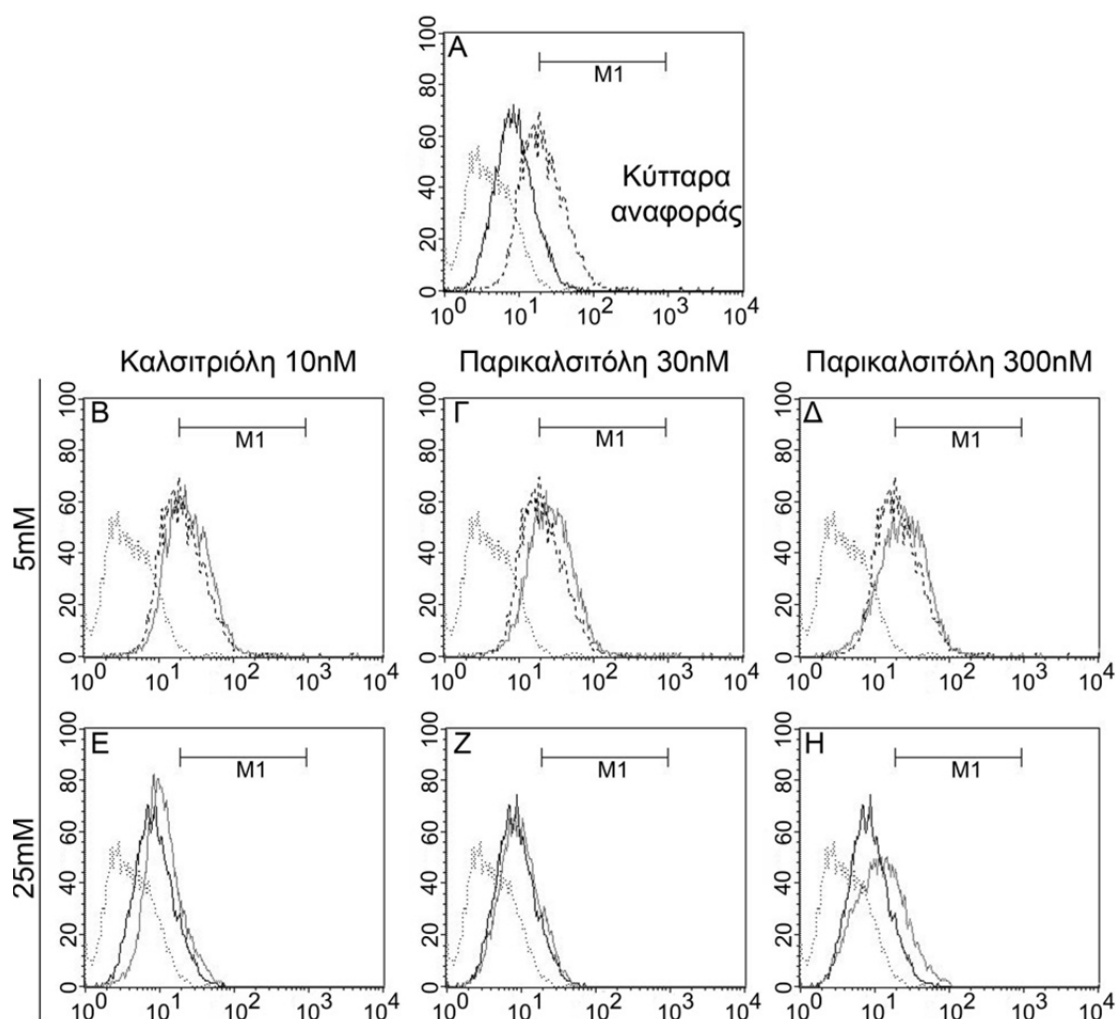
καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη. Για αυτό το λόγο απαιτήθηκε η υπερ-έκθεση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης ώστε να μπορέσουν να αποτυπωθούν τα επίπεδά της (εικόνα 30B).

Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη μόνο η παρικαλσιτόλη-300nM αύξησε τα ολικά επίπεδα της ποδοκαλκίνης κατά 50% ($\#p<0,05$) σε σχέση με τα επίπεδα της ποδοκαλκίνης σε αυτά τα κύτταρα (σχήμα 17).



Σχήμα 17 Ολικά επίπεδα ποδοκαλκίνης σε ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη ($\#p<0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς)

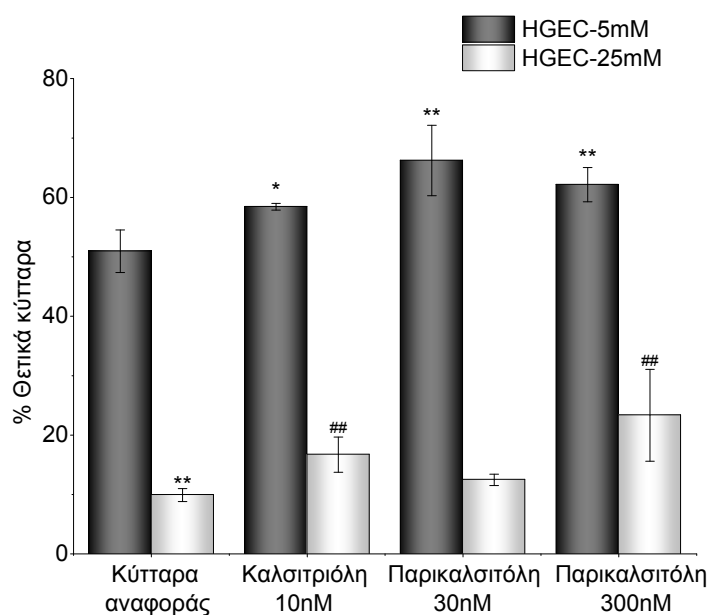
Ωστόσο ιδιαίτερη σημασία έχουν τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης τα οποία και αντιπροσωπεύουν την λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 31 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλυκίνης. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε γλυκόζη 5mM (Α-Δ) είτε σε γλυκόζη 25mM (Α, Ε-Η) επωάστηκαν για 4 μέρες σε καλσιτριόλη 10nM (Β,Ε) ή παρικαλσιτόλη 30nM (Γ,Ζ) ή παρικαλσιτόλη 300nM (Δ,Η). Οι στικτές γραμμές αφορούν τα κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με IgG, η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη, η διακεκομμένη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη ενώ η συνεχόμενη γκρι γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης των ποδοκυττάρων παρουσία του εκάστοτε διεγέρτη.

Η ανάλυση των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλυκίνης επιβεβαίωσε την ήδη παρατηρούμενη μειωμένη έκφραση της ποδοκαλυκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης κατά 5

φορές σε σχέση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης (** $p < 0,001$) (εικόνα 31A, σχήμα 18).

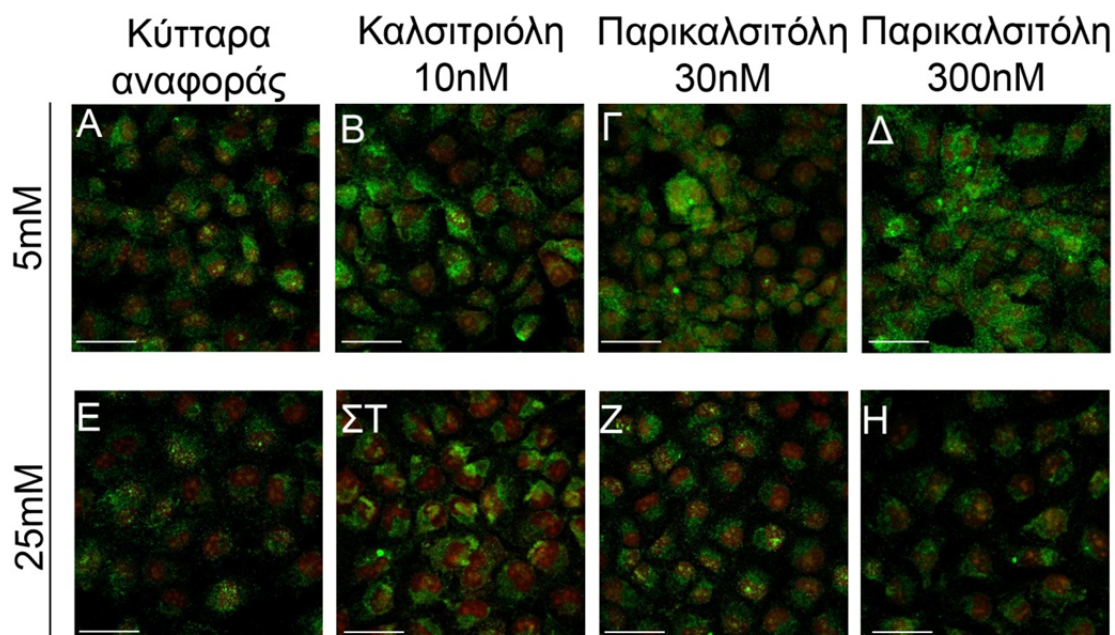


Σχήμα 18 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, ## $p < 0,005$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη)

Επιπλέον στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης τόσο η καλσιτριόλη κατά 16% (** $p < 0,05$) όσο και η παρικαλσιτόλη κατά 28% (** $p < 0,001$) αύξησαν τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης σε σχέση με τα βασικά επίπεδα της (σχήμα 18).

Επιπλέον στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης τόσο η καλσιτριόλη κατά 56% όσο και η παρικαλσιτόλη-300nM κατά 230% αύξησαν κατά τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης σε σχέση με τα επίπεδα της (## $p < 0,005$) (σχήμα 18).

Επιπλέον η κατανομή της ποδοκαλυκίνης απεικονίστηκε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού όπου επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα (εικόνα 32).



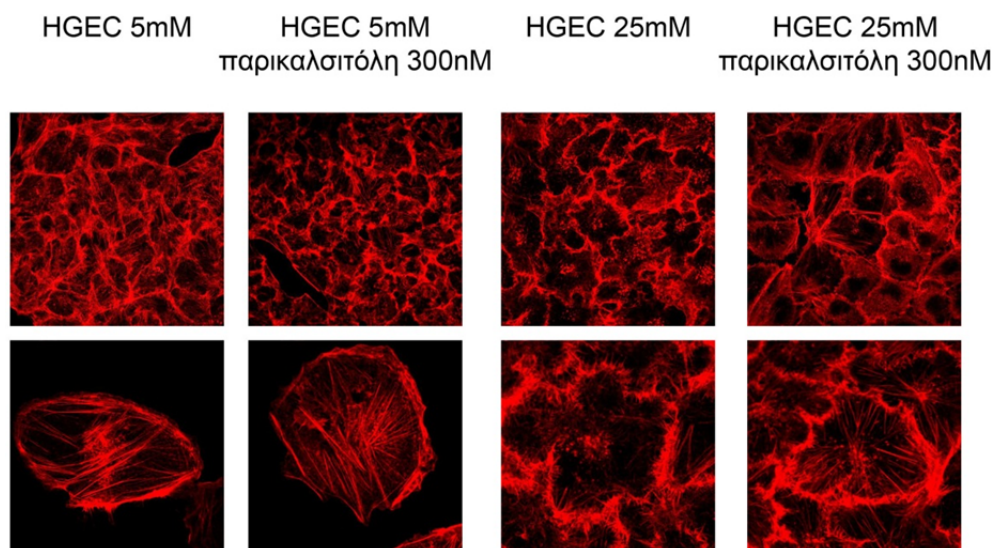
Εικόνα 32 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης της ποδοκαλυκίνης με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης (Α-Δ) είτε παρουσία 25mM γλυκόζης (Ε-Η) επώαστηκαν για 4 μέρες σε καλσιτριόλη 10nM (Β,ΣΤ) ή παρικαλσιτόλη 30nM (Γ,Ζ) ή παρικαλσιτόλη 300nM (Δ,Η) . Η κόκκινη χρωστική είναι ιωδιούχο προτπίδιο το οποίο προσδένεται στο DNA ενώ η ποδοκαλυκίνη ανιχνεύεται με πράσινο φθορίζων αντίσωμα.

6.8. Μελέτη της δράσης της παρικαλσιτόλης στην οργάνωση της F-ακτίνης (πολυμερισμός) των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του σπειράματος.

Γνωρίζοντας ότι νεφρίνη και η ποδοκαλυκίνη συνδέονται έμμεσα με την ακτίνη η οποία είναι σημαντική για την διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων, μελετήσαμε την αλλαγές στην οργάνωση της ακτίνης.

Παρατηρούμε ότι τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης (σχήμα 33) παρουσιάζουν περισσότερα μεγάλα ινίδια ακτίνης στο εσωτερικό τους τα οποία είναι σε σαφώς ορισμένες συστοιχίες σε αντίθεση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης. Επιπλέον στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης η περιφερική κατανομή της ακτίνης φαίνεται να διαταραγμένη σε σχέση με την ομαλή περιφερική κατανομή των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται παρουσία 5mM γλυκόζης. Όσον αφορά την δράση της παρικαλσιτόλης παρατηρήθηκε ότι στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 5mM

γλυκόζης η παρικαλσιτόλη δεν προκαλεί κάποια ιδιαίτερη αλλαγή ωστόσο στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία 25mM γλυκόζης η παρικαλσιτόλη οδήγησε στην αύξηση των ινιδίων ακτίνης.

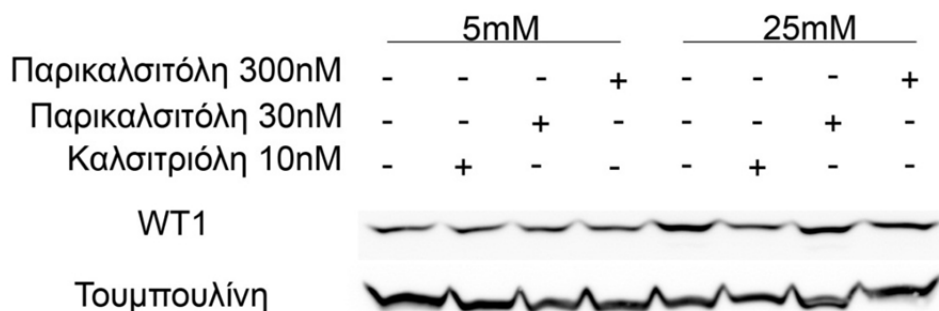


Εικόνα 33 Χρώση με φαλλοϊδίνη των νηματίων της ακτίνης (F-ακτινη) στα HGEC αντιπροσωπευτικές εικόνες.

6.9. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του WT1 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

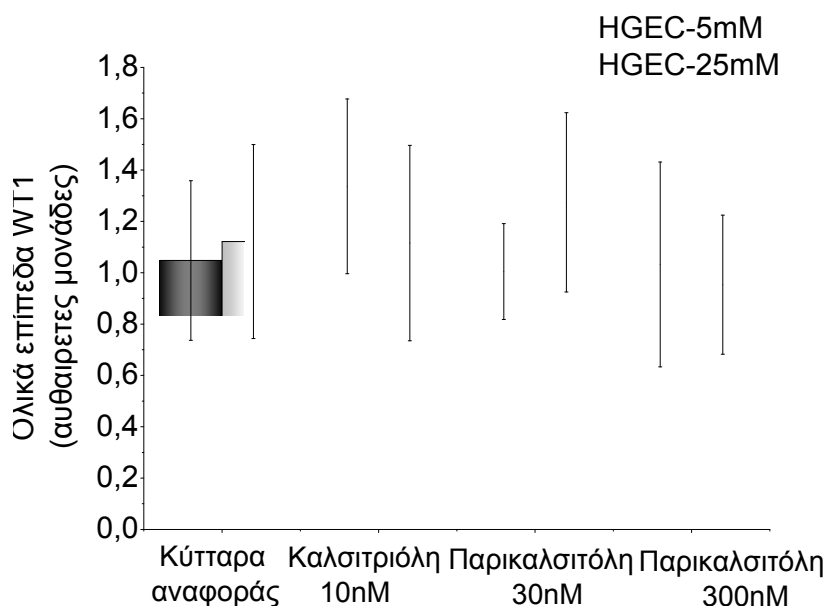
Ο WT1 είναι ο πιο γνωστός μεταγραφικός ρυθμιστής της νεφρίνης και της ποδοκαλυκίνης. Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του WT1 πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Τα επίπεδα του WT1 μετρήθηκαν στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM ή σε 25mM γλυκόζη εφόσον εκτέθηκαν για τέσσερις μέρες συνεχώς είτε σε καλσιτριόλη-10nM είτε σε παρικαλσιτόλη-30nM ή -300nM.



Εικόνα 34 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του WT1 και της τουμπουλίνης

Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του WT1 ούτε στα HGEC εκτεθειμένα σε 25mM γλυκόζη ούτε παρουσία των δυο φαρμακευτικών σκευασμάτων όπως φαίνεται και από την ανάλυση στο σχήμα 19.



Σχήμα 19 Ολικά επίπεδα WT1 στα HGEC

6.10. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του VDR σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

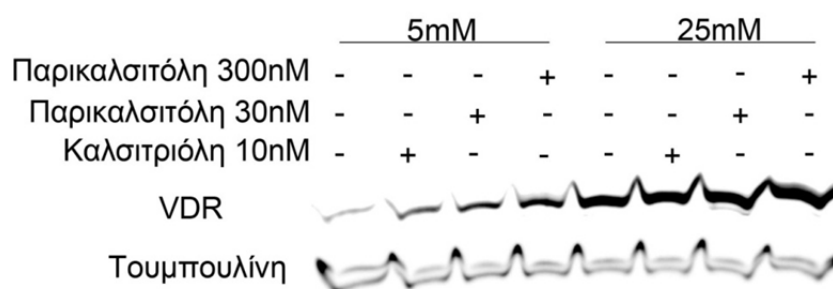
Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της βιταμίνης D-VDR πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων του και

μελέτη της κυτταρικής κατανομής του. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε 5mM είτε σε 25mM γλυκόζη εκτέθηκαν για τέσσερις μέρες συνεχώς είτε σε καλσιτριόλη-10nM είτε σε παρικαλσιτόλη-30nM ή -300nM. Στην συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά επίπεδα πρωτεΐνης του VDR με ανοσοαποτύπωση κατά western (εικόνα 35) ενώ η κατανομή του μελετήθηκε τόσο με ανοσοαποτύπωση κατά western των επιπέδων του στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα (εικόνα 36) όσο και με έμμεσο ανοσοφθορισμό (εικόνα 37).

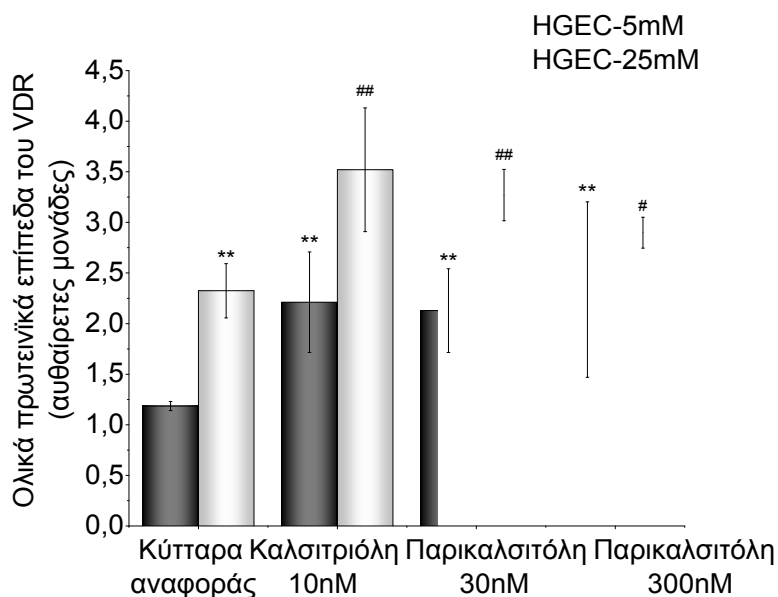
Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη τόσο η καλσιτριόλη όσο και η παρικαλσιτόλη αύξησαν κατά 2 φορές τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR σε σχέση με τα βασικά επίπεδα του (**p<0,001) (σχήμα 20).

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη εκφράσουν διπλάσια ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR σε σχέση με εκείνα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη (εικόνα 34, σχήμα 20).

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη τόσο η καλσιτριόλη όσο και η παρικαλσιτόλη αύξησαν κατά 50% περίπου τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR σε σχέση με τα επίπεδα του σε αυτά τα κύτταρα (^{##}p<0,001) (σχήμα 20).

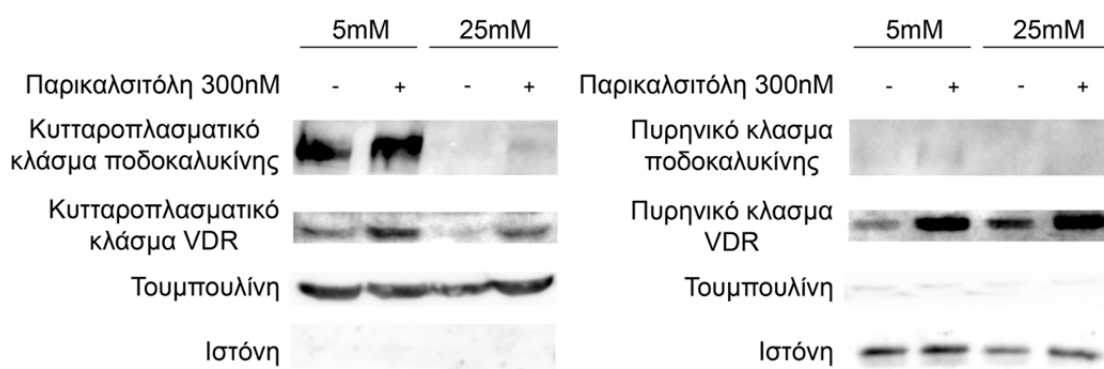


Εικόνα 35 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του VDR και της τουμπουλίνης.

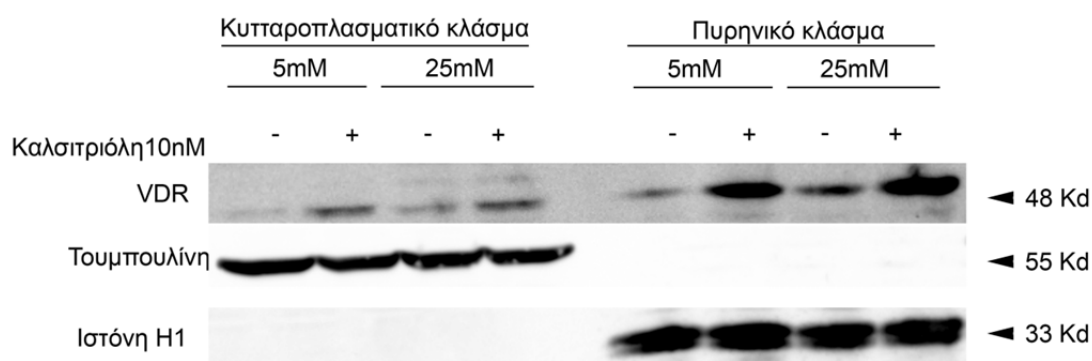


Σχήμα 20 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR (** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, ## $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη)

Επιπλέον μελετήθηκε η κατανομή του VDR στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα. Η ορθότητα της κλασμάτωσης επιβεβαιώθηκε από της απουσία τουμπουλίνης και ποδοκαλυκίνης στο πυρηνικό κλάσμα αλλά και την απουσία ιστόνης στο κυτταρικό κλάσμα.

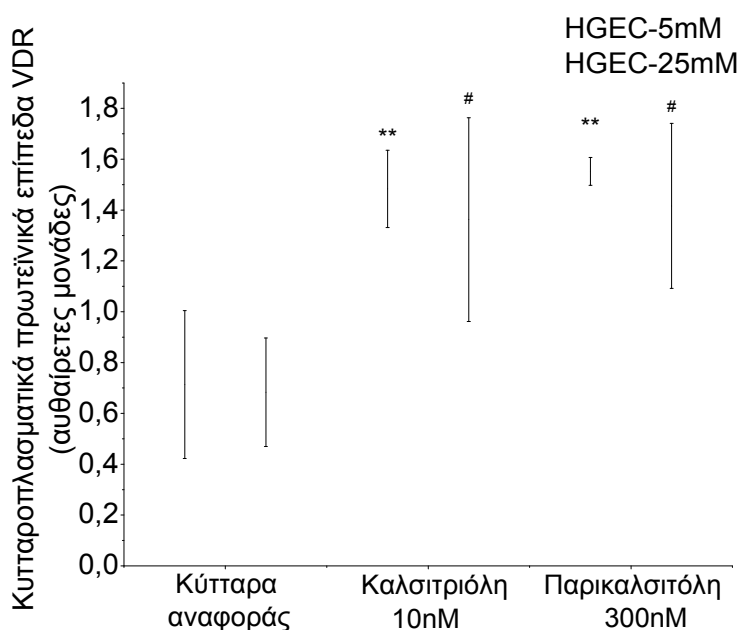


Εικόνα 36 Κυτταρική κατανομή VDR παρουσία και απουσία παρικαλσιτόλης



Εικόνα 37 Κυτταρική κατανομή VDR παρουσία και απουσία καλσιτριόλης

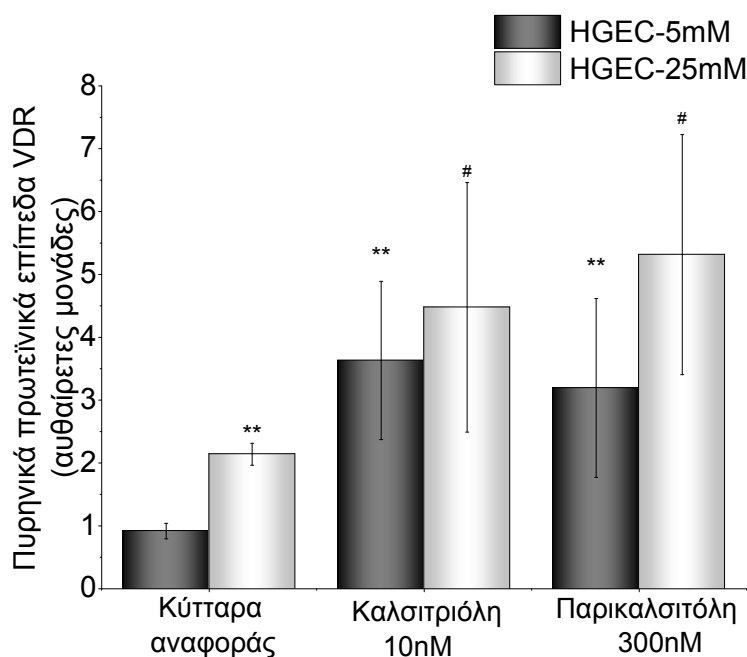
Όσον αφορά τα κυτταροπλασματικά επίπεδα τόσο στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη όσο και στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη αυτά διπλασιάστηκαν παρουσία καλσιτριόλης ή παρικαλσιτόλης.



Σχήμα 21 Κυτταροπλασματικά επίπεδα VDR

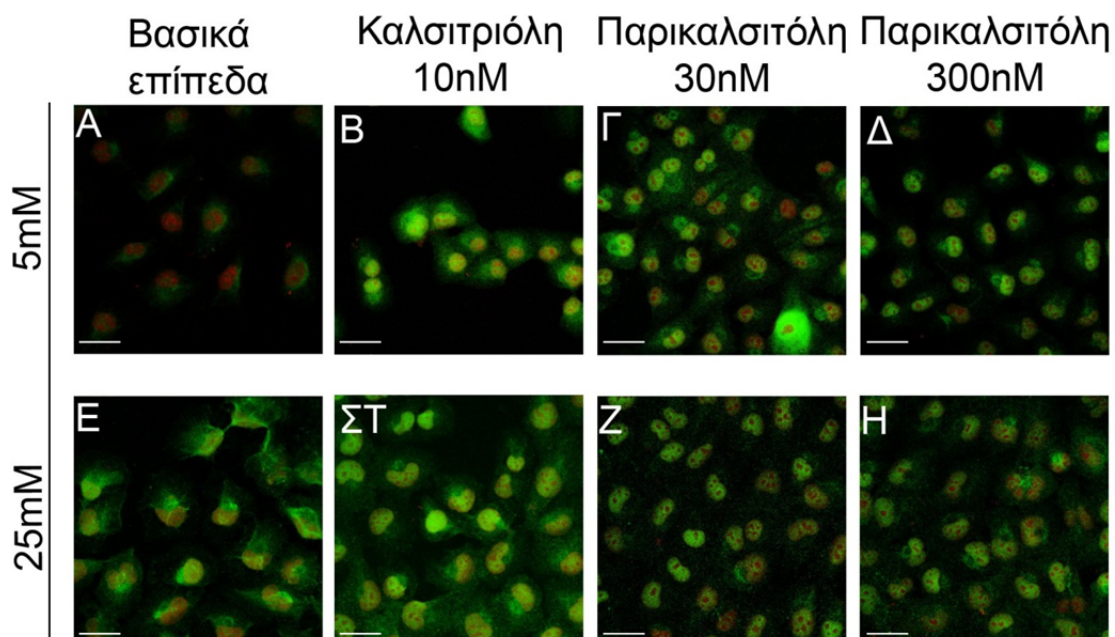
Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη έχουν περίπου διπλάσια ποσότητα VDR στον πυρήνα τους σε σχέση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη. Επιπλέον η καλσιτριόλη ή η παρικαλσιτόλη σε τελική συγκέντρωση 300nM οδηγεί σε τριπλασιασμό του VDR στον πυρήνα στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται

σε 5mM γλυκόζη ενώ στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη η αύξηση του πυρηνικού VDR είναι περίπου τέσσερις φορές.



Σχήμα 22 Πυρηνικά επίπεδα VDR

Επιπλέον η κατανομή του VDR αποτυπώθηκε και με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Όπου επιβεβαιώθηκε η αύξηση της πρωτεΐνης η οποία είχε δειχθεί και με ανοσοαποτύπωση κατά Western των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη σε σχέση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη. Επιπλέον, τόσο στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη όσο και σε εκείνα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη μετά την επώαση για 4 μέρες με καλσιτριόλη ή παρικαλσιτόλη παρατηρήθηκε μετατόπιση του VDR στον πυρήνα των κυττάρων. Παρόλα αυτά δεν εντοπίστηκε ο υποδοχέα της βιταμίνη D στους πυρηνίσκους (εικόνα 38).

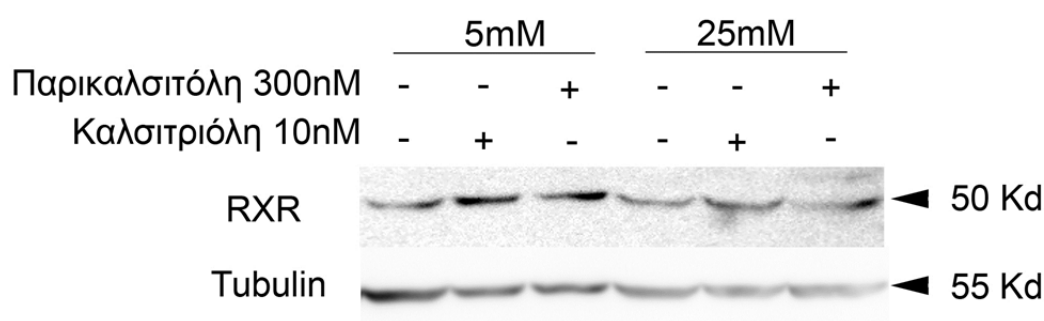


Εικόνα 38 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης του VDR με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε 5mM γλυκόζη (Α-Δ) είτε σε 25mM γλυκόζη (Ε-Η) επωάστηκαν για 4 μέρες σε καλσιτριόλη-10nM (Β,ΣΤ) ή παρικαλσιτόλη-30nM (Γ,Ζ) ή παρικαλσιτόλη-300nM (Δ,Η) . Η κόκκινη χρωστική είναι ιωδιούχο προπύδιο το οποίο προσδένεται στο DNA ενώ ο VDR ανιχνεύεται με πράσινο φθορίζων αντίσωμα.

6.11. Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα επίπεδα έκφρασης του RXR σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπείράματος.

Ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος-RXR είναι συμπαραγόντας δράσης του VDR και αποτελεί βασικό στοιχείο για την ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων από τον VDR.

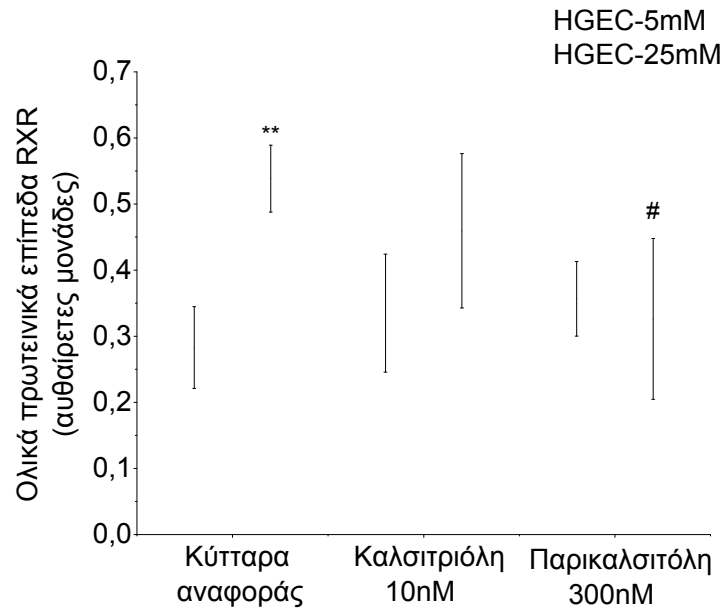
Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στην έκφραση του RXR πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων του και μελέτη της κυτταρικής κατανομής του. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε 5mM είτε σε 25mM γλυκόζη εκτέθηκαν για τέσσερις μέρες συνεχώς είτε σε καλσιτριόλη-10nM είτε σε παρικαλσιτόλη-30nM ή -300nM. Στην συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά επίπεδα πρωτεΐνης του RXR με ανοσοαποτύπωση κατά western (εικόνα 38) ενώ η κατανομή του μελετήθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό (εικόνα 39).



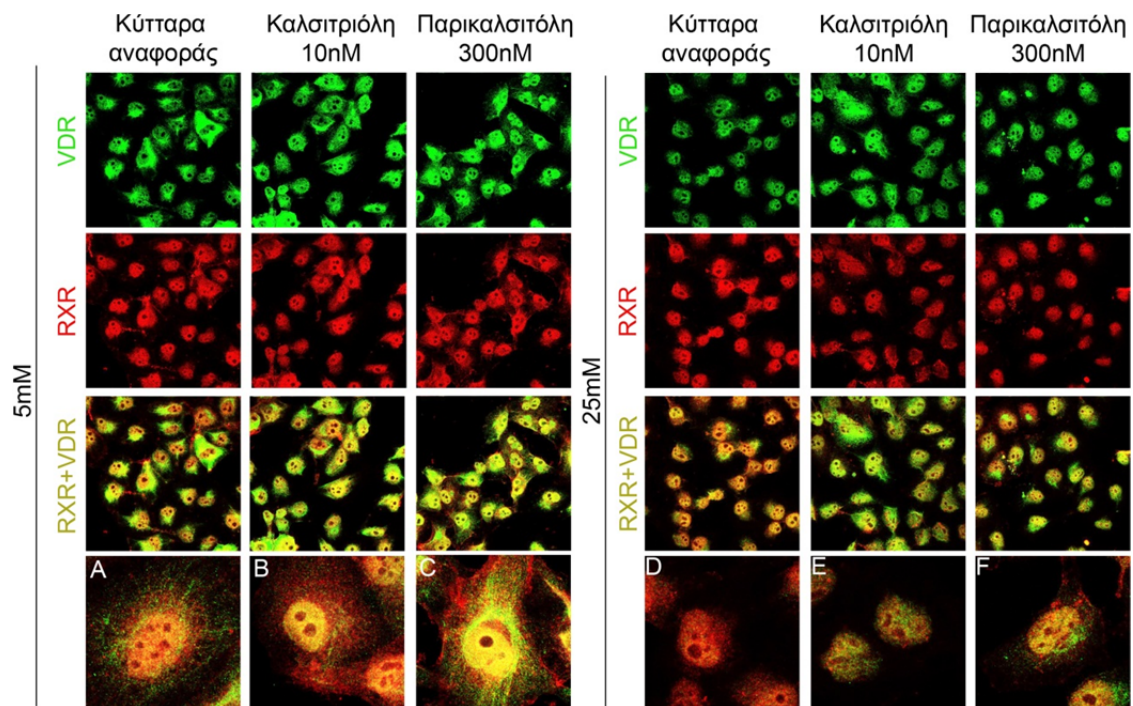
Εικόνα 39 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του RXR και της τουμπουλίνης

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη δεν μετέβαλλαν τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του RXR σε σχέση με τα βασικά επίπεδα του (σχήμα 23).

Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη έχουν αυξημένα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα RXR σε σχέση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη, όπως και στην περίπτωση του VDR (** $p < 0,001$). Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη η χορήγηση καλσιτριόλης και παρικαλσιτόλης δεν επηρεάζει τα επίπεδα του RXR. Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη η καλσιτριόλη εμφανίζει τάση μείωσης του RXR. Ωστόσο η παρικαλσιτόλη μειώνει στατιστικώς σημαντικά κατά 36% περίπου τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του RXR σε σχέση με τα επίπεδα του σε αυτά τα κύτταρα (# $p < 0,05$) (σχήμα 23). Επιπλέον με έμμεσο διπλό ανοσοφθορισμό ανιχνεύτηκε ο συνεντοπισμός του RXR με τον VDR. Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη όσο και σε εκείνα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη μετά την επώαση για 4 μέρες με καλσιτριόλη ή παρικαλσιτόλη αυξάνει ο συνεντοπισμός του RXR με τον VDR ιδιαίτερα στον πυρήνα των κυττάρων (εικόνα 37).



Σχήμα 23 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RXR) (** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη)



Εικόνα 40 Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης του RXR και του VDR με την τεχνική του διπλού έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε 5mM γλυκόζη είτε σε 25mM γλυκόζη επωάστηκαν για 4 μέρες σε καλσιτριόλη-10nM ή παρικαλσιτόλη-300nM. Ο RXR ανιχνεύεται με κόκκινο φθορίζων αντίσωμα ενώ ο VDR ανιχνεύεται με πράσινο φθορίζων αντίσωμα.

6.12. *In vitro* μελέτη της σημασίας του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

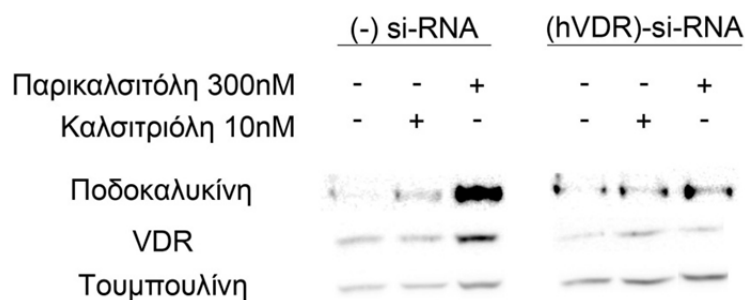
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα τα οποία αφορούν τα επίπεδα έκφρασης των WT1, RXR και VDR φάνηκε πιθανό η αύξηση των επιπέδων της νεφρίνης και της ποδοκαλυκίνης να οφείλεται στην μεταγραφική ικανότητα του VDR.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του VDR στις παραπάνω δράσεις της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης ως προς την ρύθμιση της έκφρασης της ποδοκαλυκίνης πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. Η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR πραγματοποιήθηκε στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM ή 25mM γλυκόζη.

6.12.1. *In vitro* μελέτη του ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρिकाλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη.

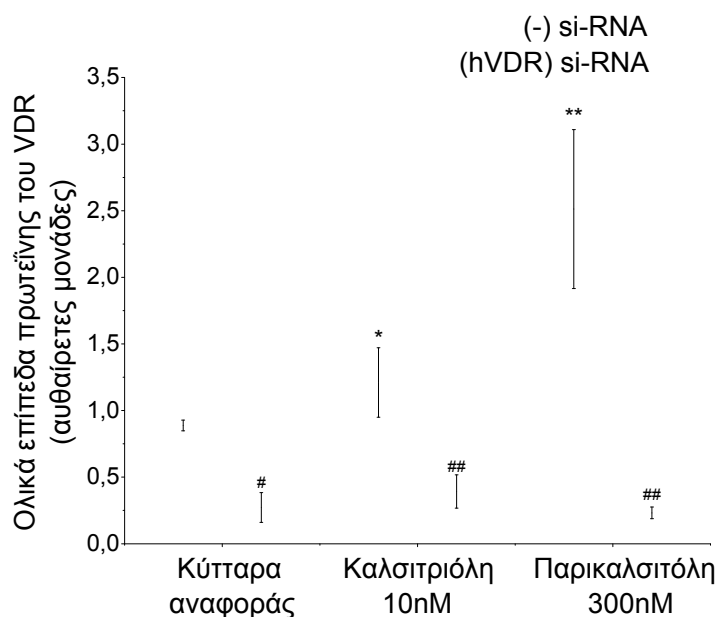
Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη όταν αυτά είχαν υποστεί ή όχι αποσιώπηση του γονιδίου του.

Η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR προκάλεσε την μείωση των βασικών επιπέδων της πρωτεΐνης του κατά 75% ($^{\#}p<0,01$) (σχήμα 24) και μείωση των επιπέδων του γονιδίου του κατά 80% ($^{##}p<0,001$) (σχήμα 25).



Εικόνα 41 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της ποδοκαλυκίνης, του VDR και της τουμπουλίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR

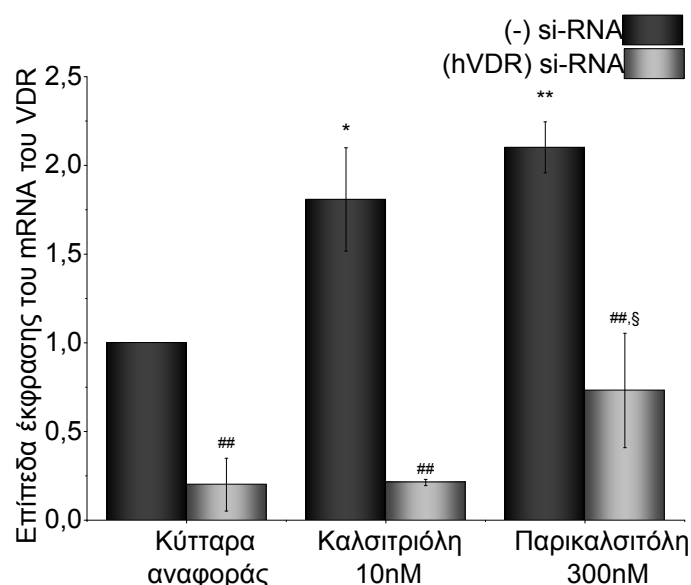
Ενώ στα κύτταρα τα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μετά την επώαση για 4 μέρες με καλσιτριόλη σε τελική συγκέντρωση 10nM και παρικαλσιτόλη σε τελική συγκέντρωση 300nM δεν παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεΐνης του VDR (σχήμα 24).



Σχήμα 24 Ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, # $p < 0,01$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

Επιπλέον στα ποδοκύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, επωαστούν για 4 ημέρες με καλσιτριόλη-10nM και παρικαλσιτόλη-300nM παρατηρείται σχεδόν διπλασιασμός του mRNA του VDR (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$) (σχήμα 25).

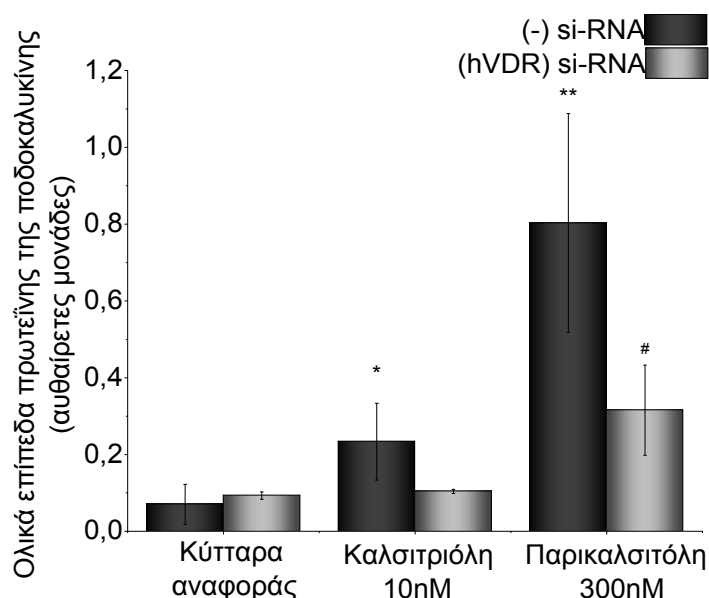
Ωστόσο μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, δεν παρατηρείται αύξηση του mRNA του VDR όταν τα ποδοκύτταρα επωάζονται με καλσιτριόλη. Ενώ παρατηρείται μια μικρή αύξηση του mRNA του VDR όταν τα ποδοκύτταρα επωάζονται με παρικαλσιτόλη ($^{\S}p < 0,05$) ωστόσο τα επίπεδα παραμένουν μειωμένα σε σχέση με τα φυσιολογικά ($^{##}p < 0,001$) (σχήμα 25).



Σχήμα 25 Επίπεδα έκφρασης του mRNA του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, $^{##}p < 0,001$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, $^{\S}p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

Στη συνέχεια αφού μελετήθηκε η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR στα κύτταρα αυτά, εξετάστηκε περαιτέρω η σημασία της αποσιώπησης αυτής στην έκφραση των βασικών επιπέδων αλλά και την αύξηση της ποδοκαλυκίνης παρουσία της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης.

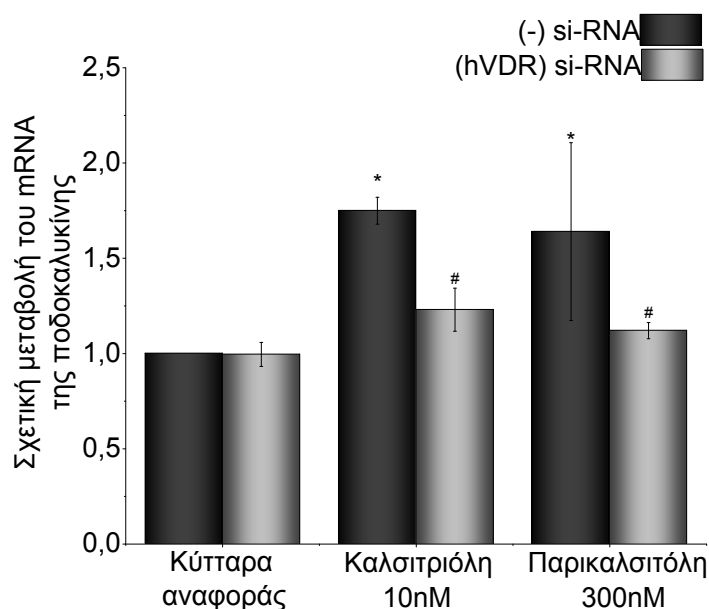
Παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη δεν επηρέασε τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης (σχήμα 24) αλλά ούτε και του mRNA της ποδοκαλυκίνης (σχήμα 24).



Σχήμα 26 Ολικά επίπεδα πρωτεΐνης της ποδοκαλυκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, # $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

Επιπλέον στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μετά την επώαση για 4 μέρες με καλσιτριόλη-10nM δεν παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεΐνης της ποδοκαλυκίνης. Ενώ μετά την επώαση με παρικαλσιτόλη-300nM παρατηρήθηκε σημαντική μείωση (68%) της πρωθύστερης παρατηρούμενης αύξησης των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης της ποδοκαλυκίνης (# $p < 0,05$). Επιπλέον όταν ποδοκύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, επωαστούν για 4 μέρες με καλσιτριόλη-10nM και παρικαλσιτόλη-300nM παρατηρείται 70% αύξηση περίπου του mRNA της ποδοκαλυκίνης (* $p < 0,01$). Ωστόσο μετά την αποσιώπηση του

γονιδίου του VDR η αύξηση αυτή είναι πολύ μικρότερη, δηλαδή παρατηρείται μόλις 17% αύξηση του mRNA της ποδοκαλυκίνης ($^{\#}p<0,05$).

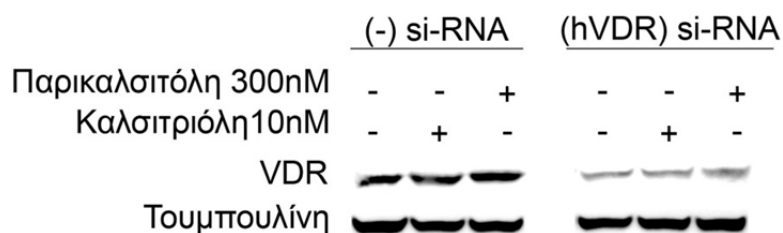


Σχήμα 27 Επίπεδα έκφρασης του mRNA της ποδοκαλυκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (* $p<0,01$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, $^{\#}p<0,05$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

6.12.2. *In vitro* μελέτη του ρόλου του υποδοχέα της βιταμίνης D στις δράσεις της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη.

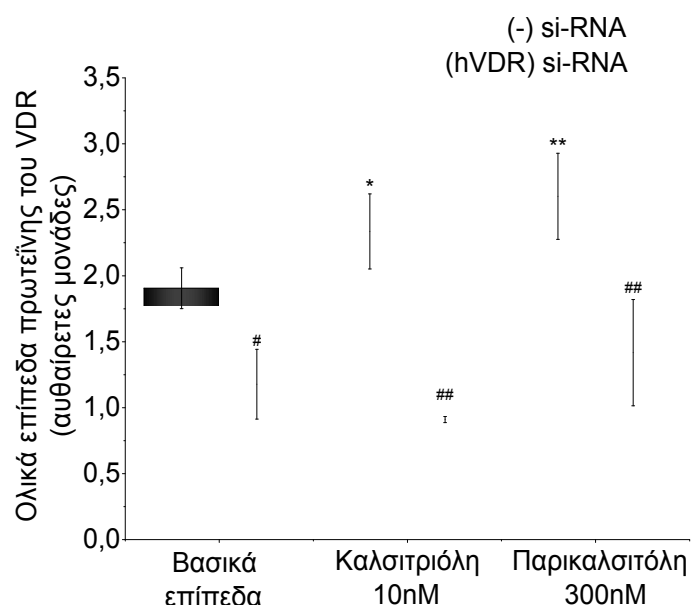
Αρχικά, όπως και στην περίπτωση των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη, μελετήθηκε η έκφραση του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη όταν αυτά είχαν υποστεί ή όχι αποσιώπηση του γονιδίου του.

Η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR προκάλεσε την μείωση των βασικών επιπέδων της πρωτεΐνης του κατά 40% ($^{\#}p<0,01$) (σχήμα 26) και μείωση των επιπέδων του mRNA του κατά 50% ($^{\#}p<0,05$) (σχήμα 27).



Εικόνα 42 Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του VDR και της τουμπουλίνης των ποδοκυττάρων που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR

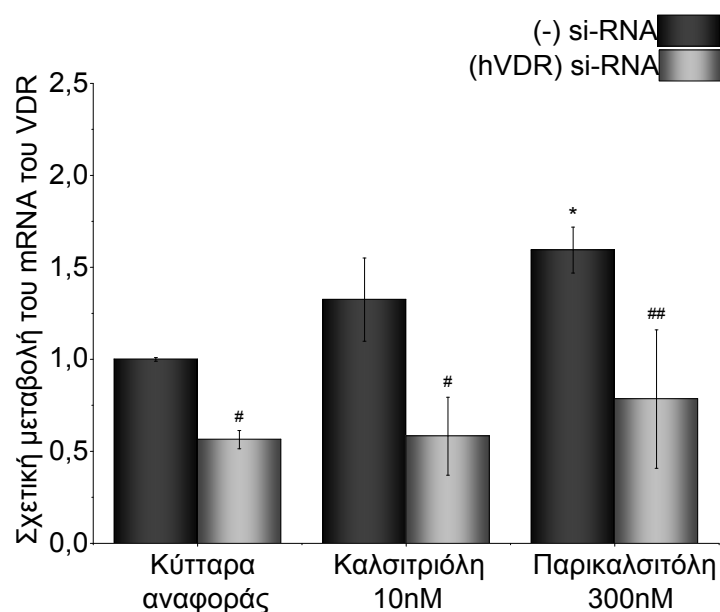
Ενώ στα κύτταρα τα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μετά την επώαση για 4 ημέρες με καλσιτριόλη-10nM και παρικαλσιτόλη-300nM δεν παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεΐνης του VDR (σχήμα 26).



Σχήμα 28 Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D. (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

Επιπλέον όταν τα ποδοκύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, επωαστούν για 4 ημέρες με καλσιτριόλη-10nM παρατηρείται αύξηση κατά 20% του mRNA του VDR. Ωστόσο όταν πραγματοποιηθεί επώαση με

παρικαλσιτόλη-300nM η αύξηση του γονιδίου του VDR ανέρχεται στο 50% (* $p < 0,05$). Ωστόσο μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR δεν παρατηρείται η παραπάνω αύξηση σε καμία από τις δυο περιπτώσεις (σχήμα 27).



Σχήμα 29 Επίπεδα έκφρασης του mRNA του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (* $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

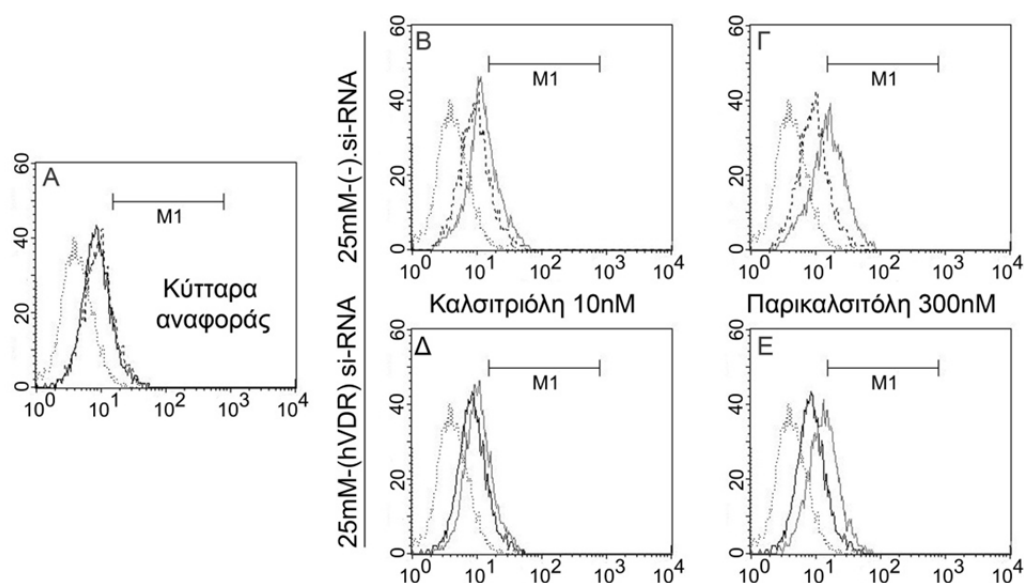
Στη συνέχεια αφού μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης του γονιδίου του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη, εξετάστηκε περαιτέρω η σημασία της αποσιώπησης αυτής στην έκφραση της ποδοκαλκίνης σε αυτά τα κύτταρα.

Παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση του γονιδίου του VDR στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη δεν επηρέασε τα βασικά επίπεδα ούτε της επιφανειακής έκφρασης της ποδοκαλκίνης (σχήμα 27) αλλά ούτε και του γονιδίου της (σχήμα 29).

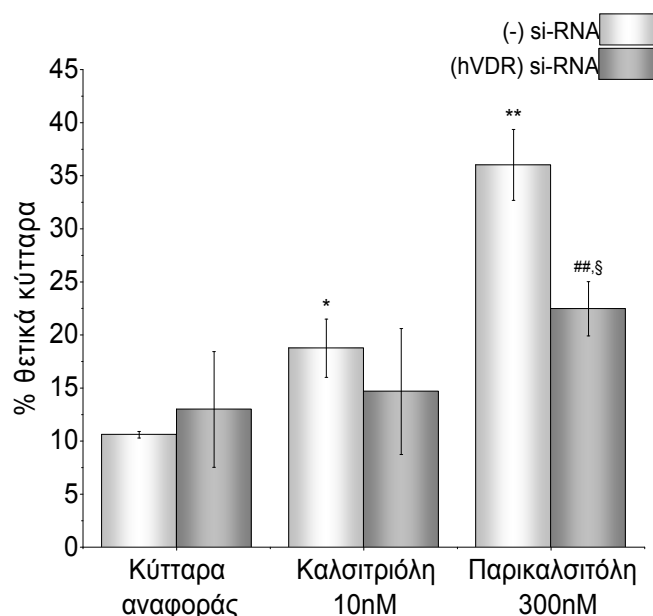
Ενώ στα κύτταρα τα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μετά την επώαση για 4 ημέρες με καλσιτριόλη-10nM δεν παρατηρήθηκε

αύξηση των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλκίνης (σχήμα 28).

Παρόλα αυτά στα κύτταρα τα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR μετά την επώαση για 4 ημέρες με παρικαλσιτόλη-300nM παρατηρείται μικρότερη αύξηση των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλκίνης (2 φορές) σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση (3,5 φορές) ($p < 0,05$).

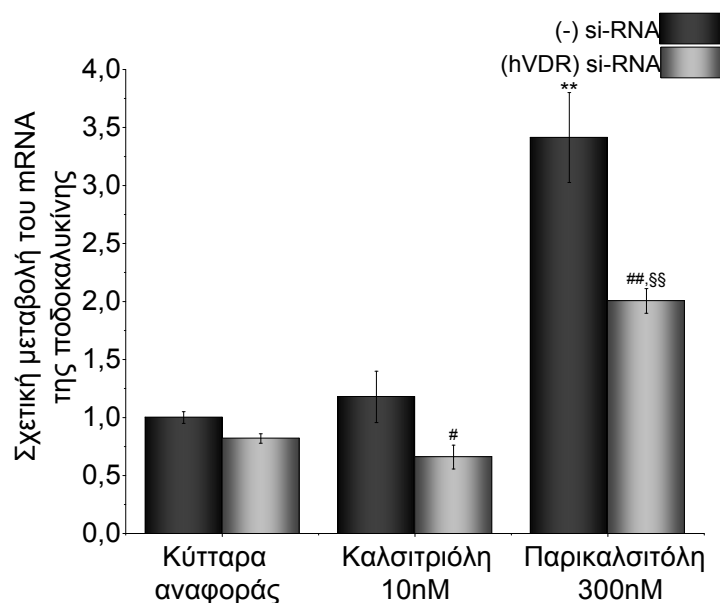


Εικόνα 43 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα ανάλυσης με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής των επιφανειακών επιπέδων έκφρασης της ποδοκαλκίνης. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και στα οποία πραγματοποιήθηκε ή δεν πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR επώαστηκαν για 4 ημέρες με καλσιτριόλη-10nM (B, Δ) ή παρικαλσιτόλη-300nM (Γ,Ε). Οι στικτές γραμμές αφορούν κύτταρα που επώαστηκαν με IgG, η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης των ποδοκυττάρων στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του VDR, η διακεκομμένη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης των ποδοκυττάρων στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του VDR ενώ η συνεχόμενη γκρι γραμμή αντιπροσωπεύει τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης παρουσία του εκάστοτε διεγέρτη.



Σχήμα 30 Επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, §§ $p < 0,05$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

Επιπλέον όταν τα ποδοκύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, επωαστούν για 4 ημέρες με παρικαλσιτόλη-300nM παρατηρείται 3,5 φορές αύξηση του mRNA της ποδοκαλυκίνης, η οποία είναι σαφώς μειωμένη (2 φορές αύξηση) στα κύτταρα όπου πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου του VDR (§§ $p < 0.001$) (σχήμα 29).

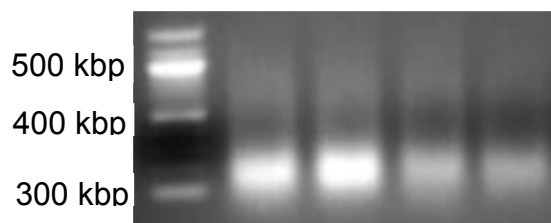


Σχήμα 31 Επίπεδα έκφρασης του mRNA της ποδοκαλυκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη και τα οποία έχουν υποστεί ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR. (** $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, # $p < 0,05$, ## $p < 0,05$: σύγκριση των κύτταρων πριν και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου του VDR, §§ $p < 0,001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του γονιδίου του VDR)

6.13. *In vitro* μελέτη της πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου της ποδοκαλυκίνης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.

6.13.1. Κατακερματισμός χρωματινής

Η *in vitro* μελέτη της πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D απαιτούσε πρωτίστως τον κατακερματισμό της απομονωθείσας χρωματίνης με την χρήση υπερήχων. Με την μέθοδο αυτή θα πρέπει η χρωματίνη κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της να γίνει σε κομμάτια κάτω των 500 kbp. Η ορθότητα αυτής διαδικασίας ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αгарόζης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 44 παρατηρήθηκε ο αποτελεσματικός κατακερματισμός της χρωματίνης σε κομμάτια των 300 kbp περίπου.

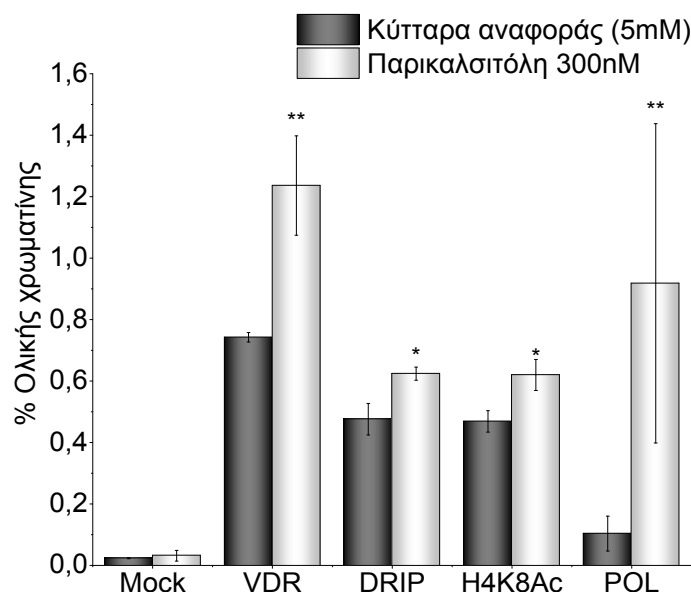


Εικόνα 44 Κατακερματισμένη χρωματίνη

6.13.2. *In vitro* μελέτη της πρόσδεσης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου της ποδοκαλκίνης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη.

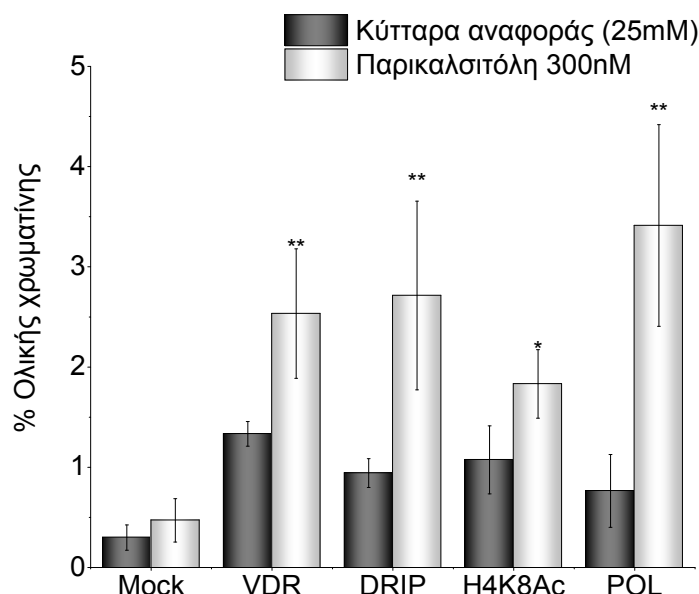
Η πιθανή περιοχή πρόσδεσης του VDR στο γονιδίωμα της ποδοκαλκίνης επιλέχθηκε βάση βιοπληροφορικής ανάλυση του γονιδιώματος. Δεδομένου ότι ο VDR είναι προφανώς σημαντικός τόσο για την δράση της καλσιτριόλης όσο και της παρικαλσιτόλης για την αύξηση της ποδοκαλκίνης και επιπλέον ότι η παρικαλσιτόλη έχει λιγότερες παρενέργειες, επιλέξαμε να μελετήσουμε τις αλλαγές της πρόσδεσης του VDR στην συγκεκριμένη περιοχή του DNA στα ποδοκύτταρα στα οποία χορηγήθηκε παρικαλσιτόλη. Σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι προσδένονται στην περιοχή-στόχο αλλά και εκκινητές που προσδένονται στην θέση έναρξης μεταγραφής της ποδοκαλκίνης.

Μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της πρόσδεσης του VDR (70%, $^{**}p<0,001$) και του DRIP205 (20%, $^{*}p<0,05$) στην περιοχή-στόχο και της RNA πολυμεράση II (900%, $^{**}p<0,001$) στη θέση έναρξης καθώς της ακετυλίωσης της ιστόνης H4 (20%, $^{*}p<0,05$) (σχήμα 32). Ο DRIP205 είναι συν-παράγοντας που προσδένεται στον VDR σχηματίζοντας το μεταγραφικό σύμπλοκο ενεργοποίησης [282]. Η δε ακετυλίωση της ιστόνης H4 έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται μετά την πρόσδεση του VDR στις ρυθμιστικές περιοχές (VDRE) [283]. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παρικαλσιτόλη προκαλεί αύξηση της πρόσδεσης του VDR στην συγκεκριμένη περιοχή του DNA οδηγώντας στον σχηματισμό ενός συμπλόκου όπου συμμετέχει και ο DRIP ενώ ταυτόχρονα η RNA πολυμεράση II προωθεί την μεταγραφή της ποδοκαλκίνης.



Σχήμα 32 Επίπεδα έκφρασης mRNA του VDR, του DRIP, της ακετυλιωμένης ιστόνης (H4K8Ac) και της πολυμεράσης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 5mM γλυκόζη απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης 300nM εκφρασμένα ως επί τοις εκατό της ολικής χρωματίνης. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς)

Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη. Μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης σε αυτά τα κυτταρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της πρόσδεσης του VDR (85%, ** $p < 0,001$) και του DRIP205 (337%, ** $p < 0,001$) στην περιοχή-στόχο και της RNA πολυμεράση II (412%, ** $p < 0,001$) στη θέση έναρξης καθώς της ακετυλίωσης της ιστόνης H4 (40%, * $p < 0,05$) (σχήμα 33).



Σχήμα 33 Επίπεδα έκφρασης mRNA του VDR, του DRIP, της ακετυλιωμένης ιστόνης (H4K8Ac) και της πολυμεράσης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε 25mM γλυκόζη απουσία και παρουσία παρικαλσιτόλης 300nM εκφρασμένα ως επί τοις εκατό της ολικής χρωματίνης. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$: σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς)

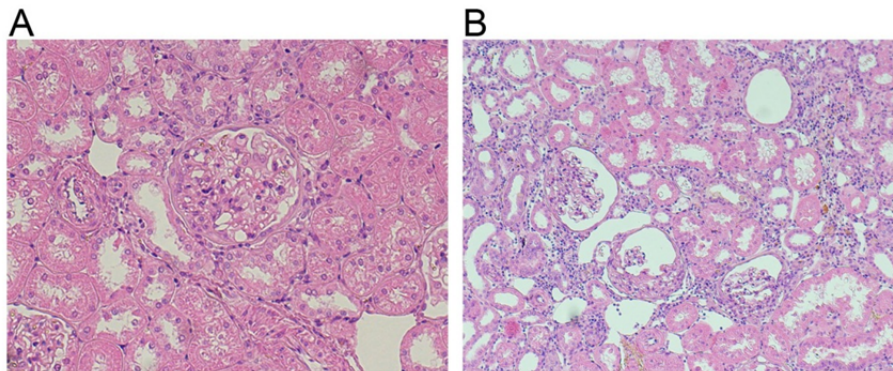
6.14. *In vivo* μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα της βιταμίνης D σε επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος επίμυων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη του υποδοχέα της βιταμίνης D στα ποδοκύτταρα *in vivo* πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε νεφρικές τομές. Οι νεφρικές τομές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από φυσιολογικούς επίμυες αλλά και από διαβητικούς επίμυες. Οι επίμυες κατέστησαν διαβητικοί ύστερα από την χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης.

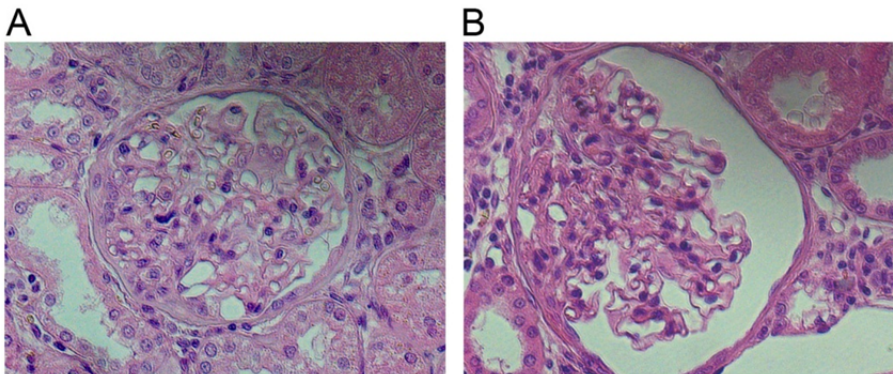
Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη για την ανίχνευση της μορφολογίας του ιστού (εικόνα 45,46). Με μπλε-μωβ χρώμα εντοπίζεται η αιματοξυλίνη η οποία βάφει τους πυρήνες, ενώ οι πρωτεΐνες χρωματίζονται ροζ χάρις την ηωσίνη. Παρατηρείται ότι τα σπειράματα στα διαβητικά ζώα (εικόνα 46B) είναι κατεστραμμένα σε σχέση με τα σπειράματα από τα φυσιολογικά ζώα (εικόνα 46A).

Ενώ η ανοσοϊστοχημική συν-χρώση με WT1 (κόκκινο) και VDR (πράσινο) έδειξε ότι τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον WT1 (που είναι μια ειδική πρωτεΐνη των ποδοκυττάρων) συνεκφράζουν και τον υποδοχέα της βιταμίνης

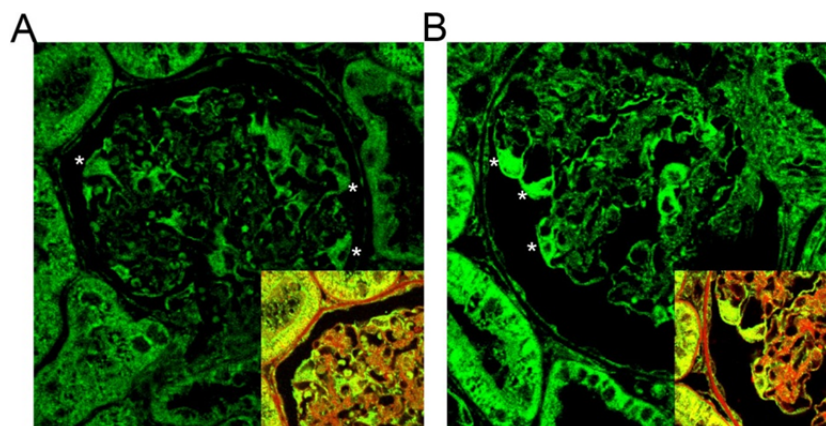
D. Επιπλέον εντοπίστηκε εντονότερη έκφραση του υποδοχέα της βιταμίνης D στα ποδοκύτταρα των διαβητικών ζώων (εικόνα 47).



Εικόνα 45 Χρώση με αιματοξυλίνη – ηωσίνη των νεφρικών τομών από φυσιολογικούς επίμυς (A) και από διαβητικούς επίμυς (B)



Εικόνα 46 Χρώση με αιματοξυλίνη – ηωσίνη των νεφρικών τομών από φυσιολογικούς επίμυς (A) και από διαβητικούς επίμυς (B)



Εικόνα 47Ανοσοϊστοχημική χρώση νεφρικών τομών για τον υποδοχέα της βιταμίνης D (πράσινο) και του μεταγραφικού παράγοντα WT1(κόκκινο).

Κεφάλαιο 7 Συζήτηση

Η βιταμίνη D₃ και τα ανάλογά της έχουν ισχυρές και πολλαπλές ευεργετικές δράσεις σε ασθενείς με ΧΝΝ [284]. Αρχικά μελετήσαμε τις δράσεις της παρικαλσιτόλης σε αιμοκαθαρούμενους ασθενείς αξιολογώντας τις *in vivo* επιδράσεις της παρικαλσιτόλης στον μεταβολισμό του PAF και τα επίπεδα αρκετών άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Η παρικαλσιτόλη ανέστειλε την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ανάλογες συγκεντρώσεις με εκείνες ορισμένων από τους πιο ισχυρούς και εξειδικευμένους ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF [285-287]. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει την αντι-φλεγμονώδη δράση της παρικαλσιτόλης ως προς τους φλεγμονώδεις μηχανισμούς όπου εμπλέκεται ο PAF. Η παρικαλσιτόλη επίσης ανέστειλε την *in vitro* προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση των WRP, δηλώνοντας έτσι τις αντιθρομβωτικές ικανότητες της. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντιστοιχία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι η έλλειψη βιταμίνης D συνδέεται με την κλινική εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [288] ενώ άλλη μελέτη δείχνει επίσης ότι η θεραπεία των καρκινοπαθών με υψηλή δόση καλσιτριόλη φάνηκε να μειώνει τα θρομβωτικά επεισόδια [289]. Ωστόσο, απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση παρικαλσιτόλης προκειμένου να εμποδιστεί η προκαλούμενη από τη θρομβίνη συνάθροιση των WRP σε σχέση με την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση. Εφόσον η θρομβίνη και ο PAF προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω διαφορετικών οδών, η παρικαλσιτόλη φαίνεται να παρουσιάζουν μια γενικότερη αντι-φλεγμονώδη δράση κυρίως επηρεάζοντας περισσότερο το μονοπάτι του PAF. Επιπλέον φαίνεται ότι δράση της παρικαλσιτόλης είναι αυξημένη στα αιμοπετάλια παρουσία πλάσματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος, πιθανόν στην ύπαρξη της DBP που όπως ξέρουμε μπορεί να αυξάνει την δραστικότητα της βιταμίνης D *in vitro* [290]. Την υπόθεση αυτή ενισχύει το γεγονός ότι η ύπαρξη των πρωτεϊνών του πλάσματος φαίνεται να επηρεάζει λιγότερο τις δράσεις της παρικαλσιτόλης παρά της καλσιτριόλης καθώς όπως γνωρίζουμε η παρικαλσιτόλη έχει

μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης με την DBP πρωτεΐνη σε σχέση με την καλσιτριόλη παρόλο που και οι δυο έχουν παρόμοια φαρμακοκινητική [91].

Είναι γνωστό ότι πολλές ουσίες που αναστέλλουν τις βιολογικές δράσεις του PAF επηρεάζουν επίσης και τις δραστηριότητες των ενζύμων του μεταβολισμού του PAF [291]. Ως εκ τούτου, παρατηρήσαμε ότι η παρικαλσιτόλη προκαλεί *in vitro* αύξηση της δραστικότητας της PAF-AH των λευκοκυττάρων, ενώ ανέστειλε την δραστικότητα της PAF-CPT τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των αιμοπεταλίων σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρικαλσιτόλης απαιτούνται για την αναστολή της δραστικότητας της λύσο-PAF-AT αυτών των κυττάρων.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης έδειξαν ότι τα βασικά επίπεδα της δραστικότητας της PAF-CPT και της λύσο-PAF-AT είναι υψηλότερα στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση σε σύγκριση με υγιή άτομα. Πιο συγκεκριμένα τα βασικά επίπεδα των δραστικότητων της PAF-CPT και της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων σε αυτούς τους ασθενείς ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες δραστικότητες σε υγιή άτομα [291] ή με ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [292]. Οι δραστικότητες των ενζύμων βιοσύνθεσης του PAF στα λευκοκύτταρα ήταν πολύ υψηλότερες σε σχέση με τους φυσιολογικούς ενώ στα αιμοπετάλια η διαφορά αυτή είναι μικρότερη. Ενώ παρατηρούμε επίσης ότι η διαφορά της PAF-CPT των λευκοκυττάρων ανάμεσα σε φυσιολογικούς και αυτοκαθαιρούμενους είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη διάφορα της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων. Αυτό πιθανόν να δηλώνει ότι η PAF-CPT των λευκοκυττάρων είναι η κύρια πηγή της αυξημένης βιοσύνθεσης του PAF στους αυτοκαθαιρούμενους ασθενείς. Επιπλέον, *in vivo*, η παρικαλσιτόλη μείωσε την δραστικότητα της PAF-CPT, αλλά δεν επηρέασε την δραστικότητα της λύσο-PAF-AT (παρέμεινε σταθερή) τόσο στα λευκοκύτταρα όσο και στα αιμοπετάλια. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η *de novo* πορεία σύνθεσης του PAF είναι υπεύθυνη για την συστηματική παραγωγή του PAF, διατηρώντας έτσι τα βασικά επίπεδα της σε διάφορους ιστούς και τα κύτταρα του αίματος. Ωστόσο, το βασικό ένζυμο αυτής της πορείας, η PAF-CPT, φαίνεται να εμπλέκεται στις περιπτώσεις εκδήλωσης συστηματικής φλεγμονής, όπως ο καρκίνος [293] και οι βλάβες του κεντρικού

νευρικού σύστημα [216]. Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται μια ευεργετική δράση της παρικαλσιτόλης προς την κατεύθυνση της μειορρύθμισης της βιοσύνθεσης του PAF στο αίμα των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών μέσω της PAF-CPT.

Όσον αφορά την αποικοδόμηση του PAF, η δραστικότητα της PAF-AH του πλάσματος παρέμεινε σταθερή μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης. Ωστόσο, η δραστικότητα της PAF-AH του πλάσματος στους αυτοκαθαιρούμενους ήταν τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερη από ότι στο πλάσμα ασθενών με πρώιμη ή προχωρημένη HIV-λοίμωξη οι οποίοι δεν υφίστανται θεραπεία, στους οποίους η χρόνια φλεγμονή είναι δεδομένη [294]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η δραστικότητα της PAF-AH του πλάσματος συνήθως αυξάνεται προκειμένου να μειωθούν τα αυξημένα επίπεδα του PAF ειδικά σε ασθενείς με νεφρική νόσο [264], φαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα του ενζύμου αυτού στην συγκεκριμένη μελέτη αντανάκλα την αυξημένη βιοσύνθεση του PAF όπως παρατηρήθηκε στο αίμα των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών. Εφόσον η δραστικότητα της PAF-CPT των λευκοκυττάρων μειώθηκε, ενώ η αυξημένη δραστικότητα της λύσο-PAF-AT παρέμεινε σταθερή, υποδηλώνει ότι τα αυξημένα σταθερά επίπεδα της δραστικότητας της PAF-AH του πλάσματος φαίνεται να είναι μια απόκριση κυρίως στην remodeling βιοσυνθετική πορεία του PAF.

Αντίθετα, η δραστικότητα της PAF-AH των λευκοκυττάρων αυξήθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης *in vivo* ενώ τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα και με τα *in vitro* αποτελέσματα μας. Η ενζυμική δραστικότητα αυτού του ενζύμου στα ερυθροκύτταρα μειώθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση παρικαλσιτόλης, ίσως μέσω της θετικής ρύθμισης του αντιοξειδωτικού συστήματος [295]. Ωστόσο, η δραστικότητα της PAF-AH, τόσο στα λευκοκύτταρα όσο και στα αιμοπετάλια πριν και μετά τη χορήγηση παρικαλσιτόλης ήταν υψηλότερη σε σχέση με εκείνη των ερυθροκυττάρων. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η δραστικότητα της PAF-AH των λευκοκυττάρων φαίνεται να αποτελεί έναν ευαίσθητο ομοιοστατικό μηχανισμό και μπορεί να αντανάκλα τις ευεργετικές επιδράσεις της παρικαλσιτόλης προς την κατεύθυνση της μείωσης των επιπέδων του PAF. Η πρόταση αυτή

ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι η κύρια πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι τα λευκοκύτταρα [296] και αυτό μπορεί να εξηγήσει περαιτέρω τα αυξημένα σταθερά επίπεδα της PAF-AH του πλάσματος που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς.

Επίσης στην μελέτη μας τα βασικά επίπεδα της IL-8, IL-1β και του TNF-α βρέθηκαν αυξημένα στο πλάσμα των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών, γεγονός το οποίο έχει δηχθεί και από προηγούμενες μελέτες [297,298]. Ωστόσο μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης αυτές οι κυτταροκίνες μειώθηκαν σημαντικά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν επίσης ότι τόσο η IL-8 όσο και ο TNF-α στα PBMC μειώθηκαν μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης σε υγιείς [299] αλλά και σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς μετά την χορήγηση καλσιτριόλης [300]. Ομοίως, τόσο η IL-1β όσο και ο TNF-α μειώνονται μετά την χορήγηση παρिकाλσιτόλης σε αρουραίους με νεφρική βλάβη [301] και μετά την χορήγηση καλσιτριόλης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση [300,302]. Ειδικότερα, είναι γνωστό ότι η αύξηση των επιπέδων του TNF-α σχετίζεται με αυξημένες πιθανότητες προβλέψεις θανάτου σε αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς [303]. Επίσης, διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων του VEGF γεγονός το οποίο θεωρείται αναμενόμενο καθώς είναι γνωστό ότι η βιταμίνη D ρυθμίζει την έκφραση της [304].

Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι η IL-1β συσχετίζεται θετικά με την δραστηριότητα της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων πριν την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης, ωστόσο αυτή η συσχέτιση ήταν απύσχα μετά την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης. Έχει βρεθεί ότι η IL-1β και ο TNF-α μπορούν να προκαλέσουν την σύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού και αντίστροφα ο PAF μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αυτών των κυτταροκινών [305,306]. Ωστόσο, η δραστηριότητα της λύσο-PAF-AT σε αυτά τα κύτταρα δεν μεταβλήθηκε από την χορήγηση της παρिकाλσιτόλης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε στην δοσολογία της παρिकाλσιτόλης, δεδομένου ότι *in vitro* μόνο οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις παρिकाλσιτόλης προκάλεσαν μείωση της δραστηριότητας της λύσο-PAF-AT είτε στη χρονική διάρκεια της μελέτης αυτής. Τέλος, η μείωση αυτών των κυτταροκινών μπορεί να

αντικατοπτρίζει τη σταθεροποίηση της λύσο-PAF-AT, εμποδίζοντας κατά κάποιον τρόπο την περαιτέρω αύξηση της.

Συμπερασματικά στο πρώτο μέρος της παρούσα μελέτη, η οποία αφορά μια μικρή κλινική μελέτη, αναφέρθηκε ότι η παρικαλσιτόλη αποτελεί πιθανό αναστολέα των δράσεων του PAF και της θρομβίνης. Επιπλέον, η παρικαλσιτόλη μείωσε *in vitro* την δραστηριότητα της PAF-CPT των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και προκάλεσε αύξηση *in vitro* της PAF-AH των λευκοκυττάρων, ενώ μόνο υψηλότερες συγκεντρώσεις παρικαλσιτόλης προκάλεσαν αναστολή της δραστηριότητας της λύσο-PAF-AT των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη βιοσύνθεση του PAF ενώ η χορήγηση της παρικαλσιτόλης φαίνεται να καταστέλλει μόνο την *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF χωρίς να επηρεάσει την πορεία ανασχηματισμού ωστόσο την διατήρησε σε σταθερά επίπεδα. Επιπλέον, η αποικοδόμηση του PAF φαίνεται να ακολουθεί την ίδια κατεύθυνση με την καταστολή της βιοσύνθεσης του PAF. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1β, IL-8 και TNF-α είχαν επίσης μειωθεί σημαντικά, ενώ τα επίπεδα της CRP του ορού και της IL-6 του πλάσματος παρέμειναν σχετικά σταθερά ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα του VEGF. Είναι γνωστό ότι η αυξημένη σύνθεση PAF εμπλέκεται στην εκδήλωση φλεγμονής στους αιμοκαθαιρούμενους ασθενείς η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση καρδιαγγειακών προβλημάτων τα οποία αποτελούν και την κύρια αιτία θανάτου σε αυτούς τους ασθενείς. Οπότε τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να φανερώνουν την βελτίωση της φλεγμονώδους κατάστασης αυτών των ασθενών μέσω των ευεργετικών δράσεων της παρικαλσιτόλης τόσο ως προς τις δράσεις και τον μεταβολισμό του PAF αλλά όσο και ως προς τις σχετιζόμενες με τον PAF φλεγμονώδεις κυτταροκίνες.

Ωστόσο η βιταμίνη D πέραν των αντιφλεγμονωδών δράσεών της φαίνεται να είναι σημαντική και για την βελτίωση της χρόνιας νεφρικής νόσου μειώνοντας την πρωτεϊνουρία. Είναι γνωστό ότι η βιταμίνη D ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μέσω πρόσδεσης του υποδοχέα της, VDR, στα στοιχεία ανταπόκρισης (VDRE) που βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων.

Ο VDR έχει ανιχνευθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ποδοκύτταρα ποντικών καθώς σε ποδοκύτταρα αρουραίων *in vivo* [45,204,307,308]. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο VDR εκφράζεται και σε ανθρώπινα ποδοκύτταρα *in vitro*. Επιπλέον, η έκφραση του αυξήθηκε μετά την επώαση με την καλσιτριόλη ή την παρικαλσιπόλη ενώ παρατηρήθηκε ότι ο VDR μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνεντοπίζεται με τον RXR.

Στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, παρατηρήθηκε αύξηση του VDR που υπάρχει στον πυρήνα, σε σύγκριση με τα ποδοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης. Η αύξηση του VDR παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης έχει επίσης αναφερθεί *in vitro* σε ποδοκύτταρα ποντικού [308]. Η γλυκόζη έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τον VDR και παρεμποδίζει την πρόσδεσή του στο DNA και κατά επέκταση την σηματοδοτική δράση του εντός των κυττάρων [114,309]. Ως εκ τούτου, η επαγόμενη αύξηση του VDR από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στα ποδοκύτταρα θα μπορούσε να αποτελεί ένα αντιρροπιστικό μηχανισμό κατά της υπεργλυκαιμίας που προκαλεί παρεμπόδιση της πρόσδεσης του VDR στα VDRE. Μια ακόμα εξήγηση θα μπορούσε να είναι η εξής: τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται υπό την παρουσία δεξαμεθαζόνης η οποία γνωρίζουμε ότι στα SCC κύτταρα (squamous cell carcinoma VII) αυξάνει την έκφραση του VDR [310]. Επιπλέον, από πειράματα σε κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος φάνηκε ότι οι δράσεις της δεξαμεθαζόνης εξαρτώνται από την γλυκόζη [311]. Οπότε θα μπορούσα να πούμε ότι πιθανόν στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αυτή ενισχύει την δράση της δεξαμεθαζόνης και κατ' επέκταση την αύξηση του VDR.

Είναι γνωστό ότι ο VDR και ο RXR σχηματίζουν ετεροδιμερή απουσία των ενεργοποιητών του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDRA) ρυθμίζοντας έτσι την μεταγραφή των βασικών επιπέδων των γονιδίων στόχων [83]. Η προσθήκη VDRA σταθεροποιεί το ετεροδιμερές VDR-RXR και προωθεί έτσι την πρόσδεσή του στις VDRE περιοχές [312,313]. Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα και με άλλες μελέτες όπου έχουν επίσης δείξει ότι ο VDR βρίσκεται εν μέρει στον πυρήνα, ακόμη και απουσία καλσιτριόλης και υπάρχει έντονη

συγκέντρωσή του στον πυρήνα μετά την προσθήκη του προσδέτη [314]. Παρατηρήσαμε επίσης *in vitro* στα ποδοκύτταρα συνεντοπισμό του VDR και RXR απουσία καλσιτριόλης ή παρικαλσιτόλης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα τις διπλής σύγχρονης χρώσης έδειξαν ότι μετά την προσθήκη της καλσιτριόλης ή της παρικαλσιτόλης αυξηθήκαν τα επίπεδα του συνεντοπισμού στον πυρήνα.

Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η έκφραση της νεφρίνης αυξήθηκε μετά την προσθήκη παρικαλσιτόλης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης. Τα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης έχουν μειωμένη συνολική και επιφανειακή έκφραση νεφρίνης, και ακόμη και αν η συγκέντρωση της γλυκόζης επανέρθει σε φυσιολογικά επίπεδα, τα επίπεδα της νεφρίνης παραμένουν σημαντικά μειωμένα [275]. Ωστόσο, η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη επανέφεραν την έκφραση της νεφρίνης σε αυτά τα ποδοκύτταρα σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η βιταμίνη D προκαλεί αύξηση της έκφρασης της νεφρίνης *in vitro* σε ποδοκύτταρα ποντικού [207-209] και σε αρουραίους με νεφρωτικό σύνδρομο που προκαλείται από puromycin aminonucleoside [201-203,308]. Επιπλέον, η παρικαλσιτόλη αύξησε την έκφραση της νεφρίνης *in vivo*, σε νεφροπάθεια προκαλούμενη από αδριαμικίνη [315].

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η χορήγηση καλσιτριόλης σε καλλιεργούμενα ποδοκύτταρα ποντικού επαναφέρει τα προκαλούμενα από την γλυκόζη μειωμένα επίπεδα της νεφρίνης [114]. Η αύξηση της έκφρασης της νεφρίνης αποδείχθηκε ότι διαμεσολαβείται από τις δράσεις της βιταμίνης D σε VDRE στοιχεία στον υποκινητή της νεφρίνης. Αυτή η μελέτη ανέφερε ότι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης μειώνουν την πρόσδεση του VDR στα VDRE των ποδοκυττάρων, μια επίδραση η οποία αναστρέφεται μετά την χορήγηση καλσιτριόλης [114].

Εκτός από την νεφρίνη μια ακόμα σημαντική πρωτεΐνη για την διατήρηση της μορφολογίας και κατά επέκταση της λειτουργίας των ποδοκυττάρων είναι η ποδοκαλυκίνη [143]. Η έκφραση της ποδοκαλυκίνης είναι σαφώς μειωμένη στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Τα

επίπεδα της ποδοκαλυκίνης δεν επανέρχονται στα φυσιολογικά ακόμα και μετά την παρατεταμένη καλλιέργεια των κυττάρων αυτών σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης [274,275]. Τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα και τα επιφανειακά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης αυξήθηκαν παρουσία της καλσιτριόλης ή της παρικαλσιτόλης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν είτε σε φυσιολογικά είτε σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Ως εκ τούτου, για πρώτη φορά αναφέρεται ότι οι ενεργοποιητές του υποδοχέα της βιταμίνης D κατόρθωσαν να επαναφέρουν μερικά την μειωμένη έκφραση της ποδοκαλυκίνης. Δεδομένου ότι η επιφανειακή έκφραση της ποδοκαλυκίνης είναι απαραίτητη για το σχηματισμό και τη συντήρηση του ποδοειδών προεκβολών [316], οι ενεργοποιητές του υποδοχέα της βιταμίνης D φαίνεται να ασκούν μια σημαντική ευεργετική δράση διατηρώντας και αποκαθιστώντας τον διαφοροποιημένο ποδοκυτταρικό φαινότυπο. Η νεφρίνη και η ποδοκαλυκίνη αποτελούν δείκτες για τον ποδοκυτταρικό φαινότυπο και η παρατεταμένη έλλειψή τους μπορεί να υποδηλώνει αποδιαφοροποίηση η οποία όμως φαίνεται να άρετε χάρις την βιταμίνη D₃ αλλά και το ανάλογο της.

Τα πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου του VDR έδειξαν ότι η προκαλούμενη από καλσιτριόλη και παρικαλσιτόλη αύξηση της ποδοκαλυκίνης στα ποδοκύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε φυσιολογικά είτε σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, δεν ανιχνεύθηκε ή ήταν σημαντικά μειωμένη μετά την αποσιώπηση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο VDR τουλάχιστον εν μέρει εμπλέκεται στην αύξηση της ποδοκαλυκίνης, πιθανώς με έναν παρόμοιο μηχανισμό όπως και για την νεφρίνη. Ενδιαφέρον επίσης είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει καμία επίδραση στα βασικά επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλυκίνης όπως αυτό φαίνεται από τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου του VDR. Γνωρίζοντας ότι ο WT1 εμπλέκεται στη διατήρηση της έκφρασης της ποδοκαλυκίνης στα διαφοροποιημένα ποδοκύτταρα [150] τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας προτείνουν ότι ο VDR δεν συνδέεται απαραίτητα με τη διατήρηση της έκφρασης της ποδοκαλυκίνης σε κανονικές συνθήκες. Ωστόσο, ο VDR φαίνεται να γίνεται καίριας σημασίας για την επανέναρξη της έκφρασης της ποδοκαλυκίνης που έχει ήδη μειωθεί εξαιτίας των υψηλών επιπέδων γλυκόζης. Αυτό σημαίνει ότι το αποτέλεσμα θα μπορούσε άμεσα να διαμεσολαβείται από τον VDR ή από

ένα μεταγραφικό σύμπλοκο του οποίου ο VDR είναι ένα μέρος. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με πειράματα μελέτης της πρόσδεσης του VDR σε ειδική περιοχή πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της ποδοκαλκίνης. Επίσης είδαμε ότι στο μεταγραφικό σύμπλοκο εμπλέκεται και ο DRIP.

Έχει επίσης προταθεί ότι τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGEs), συμμετέχουν εν μέρει στην προκαλούμενη από τη γλυκόζη μειορρύθμιση της ποδοκαλκίνης, δεδομένου ότι η αμινογουανιδίνη (η οποία αποτρέπει το σχηματισμό AGEs), προστατεύει τα επίπεδα της ποδοκαλκίνης [275]. Είναι επίσης γνωστό ότι η βιταμίνη D μετριάξει τις αρνητικές επιπτώσεις των AGEs στα ενδοθηλιακά κύτταρα, εμποδίζοντας την προκαλούμενη από τα AGEs αύξηση της δέσμευσης του NF-κB-p65-DNA [317]. Οπότε μια πρόσθετη προστατευτική δράση των ενεργοποιητών του υποδοχέα της βιταμίνης D στα ποδοκύτταρα θα μπορούσε να είναι μέσω της αναστολής των προκαλούμενων από AGEs ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων ή μέσω αναστολής του σχηματισμού των AGEs.

Συμπερασματικά, η χορήγηση της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης στα ποδοκύτταρα επανέφερε ολικά τα επίπεδα της νεφρίνης και εν μέρει τα επίπεδα έκφρασης της ποδοκαλκίνης. Δεδομένου ότι η δομική ακεραιότητα των ποδοκυττάρων αλλοιώνεται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* στην διαβητική νεφροπάθεια, είναι πιθανό ότι η προκαλούμενη από την γλυκόζη απώλεια των δομικών και λειτουργικών στοιχείων των διαφοροποιημένων ποδοκυττάρων και η συνεπακόλουθη βλάβη μπορεί να οφείλεται σε μια διαδικασία αποδιαφοροποίησης [275]. Συνεπώς η βιταμίνη D και το ανάλογό της η παρικαλσιτόλη, το οποίο έχει λιγότερες παρενέργειες και θα μπορούσε να είναι κλινικά πιο πολύτιμο, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των ποδοκυττάρων. Οπότε η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη θα μπορούσαν τουλάχιστον εν μέρει μέσω του VDR να διασώζουν τα ποδοκύτταρα από βλάβες και ενδεχομένως από την επακόλουθη απόπτωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 12: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Assay Diluent	Ρυθμιστικό διάλυμα
Calcium bicarbonate	Όξινο ανθρακικό ασβέστιο
Glomerular basement membrane	Σπειραματική βασική μεμβράνη
Glomerular filtration rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
Retinoic acid receptor	Υποδοχέας του all-trans ρετινοϊκού οξέος
Retinoid X receptor	Υποδοχέας του 9-cis ρετινοϊκού οξέος
Serum Enhancement Buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα ορού
Vitamin D receptor	Υποδοχέας της βιταμίνης D
Vortex	Κυκλοαναδευτήρας
Wash buffer	Διάλυμα έκπλυσης
Platelet activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AAG	1-Ο-αλκυλο-2-ση-ακετυλο-γλυκερόλη
BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
DBP	Πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D ₃
DTT	Διάλυμα διθειοθρεϊτόλης
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
GBM	Glomerular basement membrane
GFR	Glomerular filtration rate
Lp-PLA ₂	Lipoprotein-associated phospholipase A ₂
PAF	Platelet activating factor
PAF-AH	PAF ακετολοϋδρολάση
PAF-CPT	Ανεξάρτητη διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινοτρανσφεράση του PAF
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
TCA	Διάλυμα τριχλωροξικού οξέος
Tris	Τρι-υδοξυλαμινομεθάνιο

VDR	Vitamin D receptor
WT1	Wilms' Tumor 1
Λυσο-PAF-AT	1-Ο-αλκυλο-2-λυσο-ση-γλυκερο-3- φωσφοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης
XNN	Χρόνια νεφρική νόσος

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1 Holick MF: Mccollum award lecture, 1994: Vitamin d--new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994;60:619-630.
- 2 MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF: Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin d3 and its photoisomers in human skin. *Science* 1982;216:1001-1003.
- 3 Holick MF, Tian XQ, Allen M: Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin d3 in the skin of poikilothermic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3124-3126.
- 4 Webb AR, DeCosta BR, Holick MF: Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin d3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:882-887.
- 5 Ponchon G, DeLuca HF: The role of the liver in the metabolism of vitamin d. *J Clin Invest* 1969;48:1273-1279.
- 6 !!! INVALID CITATION !!!
- 7 Ramos-Lopez E, Lange B, Penna-Martinez M, Bruck P, Swiech K, Mauf S, Kahles H, Badenhop K: The role of cubilin gene polymorphisms and their influence on 25(oh)d3 and 1,25(oh)2d3 plasma levels in type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:442-444.
- 8 DeLuca HF: Vitamin d: The vitamin and the hormone. *Fed Proc* 1974;33:2211-2219.
- 9 Fraser DR, Kodicek E: Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin d metabolite. *Nature* 1970;228:764-766.
- 10 Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M: Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:888-894.
- 11 Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS: Extra-renal 25-hydroxyvitamin d3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:316-321.
- 12 St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH: The 25-hydroxyvitamin d 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin d-deficiency rickets (pddr) disease locus. *J Bone Miner Res* 1997;12:1552-1559.
- 13 Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S: 25-hydroxyvitamin d3 1alpha-hydroxylase and vitamin d synthesis. *Science* 1997;277:1827-1830.
- 14 Gupta RP, Hollis BW, Patel SB, Patrick KS, Bell NH: Cyp3a4 is a human microsomal vitamin d 25-hydroxylase. *J Bone Miner Res* 2004;19:680-688.
- 15 Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, Shinki T, Anazawa H, Deluca HF, Suda T, Hayashi M, Saruta T: Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin d3 1 alpha-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:527-533.
- 16 Shinkyo R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K: Metabolism of vitamin d by human microsomal cyp2r1. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:451-457.
- 17 Fu GK, Portale AA, Miller WL: Complete structure of the human gene for the vitamin d 1alpha-hydroxylase, p450c1alpha. *DNA Cell Biol* 1997;16:1499-1507.
- 18 Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K: Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin d3 24-hydroxylase. *FEBS Lett* 1991;278:195-198.
- 19 Jones G: Pharmacokinetics of vitamin d toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008;88:582S-586S.
- 20 Chun RF, Lauridsen AL, Suon L, Zella LA, Pike JW, Modlin RL, Martineau AR, Wilkinson RJ, Adams J, Hewison M: Vitamin d-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin d. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3368-3376.
- 21 Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995;83:835-839.

- 22 Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-895.
- 23 Schwartz Z, Sylvia VL, Larsson D, Nemere I, Casasola D, Dean DD, Boyan BD: 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase c (pkc) directly via g-protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of pkc during matrix vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:11828-11837.
- 24 Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW: Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin d $_3$ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 1994;269:23750-23756.
- 25 Berry DM, Antochi R, Bhatia M, Meckling-Gill KA: 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ stimulates expression and translocation of protein kinase calpha and cdelta via a nongenomic mechanism and rapidly induces phosphorylation of a 33-kda protein in acute promyelocytic nb4 cells. *J Biol Chem* 1996;271:16090-16096.
- 26 Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: The nuclear vitamin d receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13:325-349.
- 27 Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA: Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel n-terminal variant human vitamin d receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10529-10534.
- 28 Sunn KL, Cock TA, Crofts LA, Eisman JA, Gardiner EM: Novel n-terminal variant of human vdr. *Mol Endocrinol* 2001;15:1599-1609.
- 29 Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML: Genetics of osteoporosis: Role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81:1-24.
- 30 Dame MC, Pierce EA, DeLuca HF: Identification of the porcine intestinal 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ receptor on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels by renaturation and immunoblotting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7825-7829.
- 31 Brumbaugh PF, Hughes MR, Haussler MR: Cytoplasmic and nuclear binding components for 1 α ,25-dihydroxyvitamin d $_3$ in chick parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:4871-4875.
- 32 Pike JW, Gooze LL, Haussler MR: Biochemical evidence for 1,25-dihydroxyvitamin d receptor macromolecules in parathyroid, pancreatic, pituitary, and placental tissues. *Life Sci* 1980;26:407-414.
- 33 Kream BE, Jose M, Yamada S, DeLuca HF: A specific high-affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ in fetal bone. *Science* 1977;197:1086-1088.
- 34 Chandler JS, Pike JW, Haussler MR: 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ receptors in rat kidney cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;90:1057-1063.
- 35 Colston K, Feldman D: Nuclear translocation of the 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor in mouse kidney. *J Biol Chem* 1980;255:7510-7513.
- 36 Kream BE, Yamada S, Schnoes HK, DeLuca HF: Specific cytosol-binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ in rat intestine. *J Biol Chem* 1977;252:4501-4505.
- 37 Bar-Shavit Z, Teitelbaum SL, Reitsma P, Hall A, Pegg LE, Trial J, Kahn AJ: Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:5907-5911.
- 38 Haussler MR, Manolagas SC, Deftos LJ: Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$ receptor-like macromolecule in rat pituitary. *J Biol Chem* 1980;255:5007-5010.
- 39 Dokoh S, Donaldson CA, Marion SL, Pike JW, Haussler MR: The ovary: A target organ for 1,25-dihydroxyvitamin d $_3$. *Endocrinology* 1983;112:200-206.

- 40 Merke J, Kreusser W, Bier B, Ritz E: Demonstration and characterisation of a testicular receptor for 1,25-dihydroxycholecalciferol in the rat. *Eur J Biochem* 1983;130:303-308.
- 41 Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC: Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptor in breast cancer. *Cancer Res* 1987;47:6793-6799.
- 42 Colston K, Hirt M, Feldman D: Organ distribution of the cytoplasmic 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor in various mouse tissues. *Endocrinology* 1980;107:1916-1922.
- 43 Walters MR, Wicker DC, Riggle PC: 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptors identified in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:67-72.
- 44 Alroy I, Towers TL, Freedman LP: Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin d3: Direct inhibition of nfatp/ap-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995;15:5789-5799.
- 45 Wang Y, Borchert ML, Deluca HF: Identification of the vitamin d receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012
- 46 Kream BE, Jose MJ, DeLuca HF: The chick intestinal cytosol binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin d3: A study of analog binding. *Arch Biochem Biophys* 1977;179:462-468.
- 47 Weckslar WR, Okamura WH, Norman AW: Studies on the mode of action of vitamin d--xiv. Quantitative assessment of the structural requirements for the interaction of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin d3 with its chick intestinal mucosa receptor system. *J Steroid Biochem* 1978;9:929-937.
- 48 Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, Sone T, Pike JW, Kuroda Y: A unique mutation in the vitamin d receptor gene in three japanese patients with vitamin d-dependent rickets type ii: Utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am J Hum Genet* 1991;49:668-673.
- 49 Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D: The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin d receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal mexican-american women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1850-1855.
- 50 Gardiner EM, Esteban LM, Fong C, Allison SJ, Flanagan JL, Kouzmenko AP, Eisman JA: Vitamin d receptor b1 and exon 1d: Functional and evolutionary analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:233-238.
- 51 Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, van Baelen H, Ridall AL, Daane E, Khoury R, Farach-Carson MC: Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin d3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol Endocrinol* 1997;11:1518-1531.
- 52 Losel R, Wehling M: Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature reviews Molecular cell biology* 2003;4:46-56.
- 53 Norman AW: Minireview: Vitamin d receptor: New assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006;147:5542-5548.
- 54 Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW: The vitamin d receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(oh)2-vitamin d3 in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004;18:2660-2671.
- 55 Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE: Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(oh)2d3 membrane binding protein (1,25d3-marrs) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7392-7397.

- 56 Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK: 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 2002;91:17-24.
- 57 Massheimer V, Boland R, de Boland AR: Rapid 1,25(oh)2-vitamin d3 stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive camp-dependent pathway. *Cell Signal* 1994;6:299-304.
- 58 Beno DW, Brady LM, Bissonnette M, Davis BH: Protein kinase c and mitogen-activated protein kinase are required for 1,25-dihydroxyvitamin d3-stimulated egr induction. *J Biol Chem* 1995;270:3642-3647.
- 59 Song X, Bishop JE, Okamura WH, Norman AW: Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3 in promyelocytic nb4 leukemia cells: A structure-function study. *Endocrinology* 1998;139:457-465.
- 60 Buitrago CG, Pardo VG, de Boland AR, Boland R: Activation of raf-1 through ras and protein kinase calpha mediates 1 α ,25(oh)2-vitamin d3 regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *J Biol Chem* 2003;278:2199-2205.
- 61 Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW: Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: Enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin d3. *Endocrinology* 1984;115:1476-1483.
- 62 Kadowaki S, Norman AW: Time course study of insulin secretion after 1,25-dihydroxyvitamin d3 administration. *Endocrinology* 1985;117:1765-1771.
- 63 Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, Mukai E, Nishimura M, Fujita J, Tsuura Y, Okamoto Y, Norman AW, Seino Y: An insulinotropic effect of vitamin d analog with increasing intracellular ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology* 1999;140:4706-4712.
- 64 Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, Lopez D, Dean DD, Boyan BD: 1 α ,25-dihydroxyvitamin d(3) and 24r,25-dihydroxyvitamin d(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase c-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2002;143:2775-2786.
- 65 Gniadecki R: Activation of raf-mitogen-activated protein kinase signaling pathway by 1,25-dihydroxyvitamin d3 in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996;106:1212-1217.
- 66 Zanello LP, Norman AW: Stimulation by 1 α ,25(oh)2-vitamin d3 of whole cell chloride currents in osteoblastic ros 17/2.8 cells. A structure-function study. *J Biol Chem* 1997;272:22617-22622.
- 67 Kersten S, Kelleher D, Chambon P, Gronemeyer H, Noy N: Retinoid x receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8645-8649.
- 68 Kersten S, Gronemeyer H, Noy N: The DNA binding pattern of the retinoid x receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J Biol Chem* 1997;272:12771-12777.
- 69 Kersten S, Dong D, Lee W, Reczek PR, Noy N: Auto-silencing by the retinoid x receptor. *J Mol Biol* 1998;284:21-32.
- 70 Yasmin R, Yeung KT, Chung RH, Gaczynska ME, Osmulski PA, Noy N: DNA-looping by rrx tetramers permits transcriptional regulation "at a distance". *J Mol Biol* 2004;343:327-338.
- 71 Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson MI, Cameron J, Graupner G, Hermann T, Tran P, Pfahl M: Homodimer formation of retinoid x receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 1992;358:587-591.
- 72 Brelivet Y, Kammerer S, Rochel N, Poch O, Moras D: Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep* 2004;5:423-429.

- 73 Dong D, Noy N: Heterodimer formation by retinoid x receptor: Regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. *Biochemistry* 1998;37:10691-10700.
- 74 Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR: Heterodimeric DNA binding by the vitamin d receptor and retinoid x receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin d3 and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J Biol Chem* 1998;273:8483-8491.
- 75 Dong S, Stenoien DL, Qiu J, Mancini MA, Tweardy DJ: Reduced intranuclear mobility of apl fusion proteins accompanies their mislocalization and results in sequestration and decreased mobility of retinoid x receptor alpha. *Mol Cell Biol* 2004;24:4465-4475.
- 76 Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM: Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 2003;278:12425-12432.
- 77 Hsieh JC, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Haussler CA, Jurutka PW, Haussler MR: Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin d receptor. *J Cell Biochem* 1998;70:94-109.
- 78 Prufer K, Racz A, Lin GC, Barsony J: Dimerization with retinoid x receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin d receptors. *J Biol Chem* 2000;275:41114-41123.
- 79 Prufer K, Barsony J: Retinoid x receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin d receptor. *Mol Endocrinol* 2002;16:1738-1751.
- 80 Kristin K. Deeb DLTaCSJ: **Vitamin d signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics**. *Nature* 2007;7:684-700.
- 81 Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W: Two nuclear signalling pathways for vitamin d. *Nature* 1993;361:657-660.
- 82 Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK: Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 1993;7:1423-1435.
- 83 Tagami T, Lutz WH, Kumar R, Jameson JL: The interaction of the vitamin d receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:358-363.
- 84 Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM: Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin d3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8097-8101.
- 85 Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bhlh activator through co-regulator switching. *EMBO J* 2004;23:1598-1608.
- 86 Kim MS, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamaoka K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K, Kato S: 1alpha,25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin d receptor through e-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 2007;21:334-342.
- 87 Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin d analogs: Therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Aspects Med* 2008;29:433-452.
- 88 Pike JW, Yamamoto H, Shevde NK: Vitamin d receptor-mediated gene regulation mechanisms and current concepts of vitamin d analog selectivity. *Adv Ren Replace Ther* 2002;9:168-174.
- 89 Brown AJ, Slatopolsky E: Drug insight: Vitamin d analogs in the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:134-144.

- 90 Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Denda M, Morrissey J, Brown A, DeLuca H: A new analog of calcitriol, 19-nor-1,25-(oh)₂d₂, suppresses parathyroid hormone secretion in uremic rats in the absence of hypercalcemia. *Am J Kidney Dis* 1995;26:852-860.
- 91 Brown AJ, Finch J, Takahashi F, Slatopolsky E: Calcemic activity of 19-nor-1,25(oh)₂d₂ decreases with duration of treatment. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2088-2094.
- 92 Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E: Differential effects of 1,25-dihydroxy-vitamin d₃ and 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin d₂ on calcium and phosphorus resorption in bone. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:980-985.
- 93 Brown AJ, Finch J, Slatopolsky E: Differential effects of 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin d₂ and 1,25-dihydroxyvitamin d₃ on intestinal calcium and phosphate transport. *J Lab Clin Med* 2002;139:279-284.
- 94 Coyne DW, Grieff M, Ahya SN, Giles K, Norwood K, Slatopolsky E: Differential effects of acute administration of 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin d₂ and 1,25-dihydroxy-vitamin d₃ on serum calcium and phosphorus in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40:1283-1288.
- 95 Llach F, Yudd M: Paricalcitol in dialysis patients with calcitriol-resistant secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 2001;38:S45-50.
- 96 Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Battle D: Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2003;63:1483-1490.
- 97 Wu-Wong JR, Noonan W, Nakane M, Brooks KA, Segreti JA, Polakowski JS, Cox B: Vitamin d receptor activation mitigates the impact of uremia on endothelial function in the 5/6 nephrectomized rats. *Int J Endocrinol* 2010;2010:625852.
- 98 Karavalakis E, Eraranta A, Vehmas TI, Koskela JK, Koobi P, Mustonen J, Niemela O, Rysa J, Ruskoaho H, Porsti I: Paricalcitol treatment and arterial tone in experimental renal insufficiency. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109:e84-93.
- 99 Gottfried E, Rehli M, Hahn J, Holler E, Andreesen R, Kreutz M: Monocyte-derived cells express cyp27a1 and convert vitamin d₃ into its active metabolite. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:209-213.
- 100 van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP: Evidence for auto/paracrine actions of vitamin d in bone: 1α-hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J* 2006;20:2417-2419.
- 101 Segersten U, Correa P, Hewison M, Hellman P, Dralle H, Carling T, Akerstrom G, Westin G: 25-hydroxyvitamin d₃-1α-hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2967-2972.
- 102 Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW: Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin d₃ receptor in target cells. *Endocrinology* 1988;122:1224-1230.
- 103 Bouillon R, Bischoff-Ferrari H, Willett W: Vitamin d and health: Perspectives from mice and man. *J Bone Miner Res* 2008;23:974-979.
- 104 Benn BS, Ajibade D, Porta A, Dhawan P, Hediger M, Peng JB, Jiang Y, Oh GT, Jeung EB, Lieben L, Bouillon R, Carmeliet G, Christakos S: Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-d_{9k}. *Endocrinology* 2008;149:3196-3205.
- 105 Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999;163:434-442.
- 106 Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ: Vitamin d receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;296:1313-1316.
- 107 Bikle DD: Vitamin d regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* 2004;92:436-444.

- 108 Demay MB, MacDonald PN, Skorija K, Dowd DR, Cianferotti L, Cox M: Role of the vitamin d receptor in hair follicle biology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:344-346.
- 109 Prosser DE, Jones G: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin d. *Trends Biochem Sci* 2004;29:664-673.
- 110 Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF: Two vitamin d response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin d 24-hydroxylase promoter. *J Biol Chem* 1995;270:1675-1678.
- 111 Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW: Enhancers located within two introns of the vitamin d receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin d3. *Mol Endocrinol* 2006;20:1231-1247.
- 112 Costa EM, Hirst MA, Feldman D: Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptors by vitamin d analogs in cultured mammalian cells. *Endocrinology* 1985;117:2203-2210.
- 113 Pavsek P, Pospechova K, Svecova L, Syrova Z, Stejskalova L, Blazkova J, Dvorak Z, Blahos J: Intestinal cell-specific vitamin d receptor (vdr)-mediated transcriptional regulation of cyp3a4 gene. *Biochem Pharmacol* 2010;79:277-287.
- 114 Deb DK, Wang Y, Zhang Z, Nie H, Huang X, Yuan Z, Chen Y, Zhao Q, Li YC: Molecular mechanism underlying 1,25-dihydroxyvitamin d regulation of nephrin gene expression. *J Biol Chem* 2011
- 115 Maruotti N, Corrado A, Grano M, Colucci S, Cantatore FP: Normal and osteoporotic human osteoblast behaviour after 1,25-dihydroxy-vitamin d(3) stimulation. *Rheumatol Int* 2009;29:667-672.
- 116 Matilainen JM, Rasanen A, Gynther P, Vaisanen S: The genes encoding cytokines il-2, il-10 and il-12b are primary 1alpha,25(oh)2d3 target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:142-145.
- 117 Welsh GI, Saleem MA: The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:14-21.
- 118 Babayeva S, Zilber Y, Torban E: Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F549-560.
- 119 Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
- 120 Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, Tourrel F, Ikehata M, Li M, Berra S, Carraro M, Messa P, Rastaldi MP: Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1929-1940.
- 121 Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, Li M, Wang GQ, Fornasieri A, Villa A, Heikkila E, Soliymani R, Boucherot A, Cohen CD, Kretzler M, Nitsche A, Ripamonti M, Malgaroli A, Pesaresi M, Forloni GL, Schlondorff D, Holthofer H, D'Amico G: Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J* 2006;20:976-978.
- 122 Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, Hsu H, Sanday J, Satchell SC, Lennon R, Ni L, Bottinger EP, Mundel P, Mathieson PW: The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F959-970.
- 123 Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P: Actin up: Regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007;17:428-437.
- 124 Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1-8.
- 125 Holthofer H, Ahola H, Solin ML, Wang S, Palmen T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D: Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 1999;155:1681-1687.

- 126 Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR: Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999;56:1481-1491.
- 127 Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with cd2ap and nephrin. *J Clin Invest* 2001;108:1621-1629.
- 128 Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez-Solis R, Zambrowicz BP, Powell DR: Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking nephrin, a novel protein with homology to nephrin. *Mol Cell Biol* 2001;21:4829-4836.
- 129 Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG: The tight junction protein zo-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990;111:1255-1263.
- 130 Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH: Cd2ap is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F785-792.
- 131 Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG: Cell junction-associated proteins iqgap1, magi-2, cask, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9814-9819.
- 132 Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582.
- 133 Patrakka J, Tryggvason K: Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med* 2007;13:396-403.
- 134 Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T: Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 2001;276:41543-41546.
- 135 Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K: Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 2004;114:1475-1483.
- 136 Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking cd2-associated protein. *Science* 1999;286:312-315.
- 137 Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS: Cd2ap localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel c-terminal domain. *Am J Pathol* 2001;159:2303-2308.
- 138 Zhang C, Jiang HJ, Chang Y, Fang Z, Sun XF, Liu JS, Deng AG, Zhu ZH: Downregulation of cd2-associated protein impaired the physiological functions of podocytes. *Cell Biol Int* 2009;33:632-639.
- 139 Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, Darvish D, Starost MF, Zervas PM, Hoffmann VJ, Hoogstraten-Miller S, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M: Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by n-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 2007;117:1585-1594.
- 140 Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG: Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984;98:1591-1596.
- 141 Kershaw DB, Beck SG, Wharram BL, Wiggins JE, Goyal M, Thomas PE, Wiggins RC: Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit pclp1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem* 1997;272:15708-15714.

- 142 Orlando RA, Takeda T, Zak B, Schmieder S, Benoit VM, McQuistan T, Furthmayr H, Farquhar MG: The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1589-1598.
- 143 Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG: Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001;108:289-301.
- 144 Gao F, Maiti S, Sun G, Ordonez NG, Udtha M, Deng JM, Behringer RR, Huff V: The wt1+/r394w mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human denys-drash syndrome. *Mol Cell Biol* 2004;24:9899-9910.
- 145 Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG: The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein zo-1. *Am J Pathol* 1992;141:805-816.
- 146 Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merckens H, Chelliah S, Graf T, McNagny KM: Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the cd34-related protein podocalyxin. *J Exp Med* 2001;194:13-27.
- 147 Nielsen JS, McNagny KM: The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1669-1676.
- 148 Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE: Alternative splicing and genomic structure of the wilms tumor gene wt1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9618-9622.
- 149 Guo G, Morrison DJ, Licht JD, Quaggin SE: Wt1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2851-2856.
- 150 Wagner N, Wagner KD, Xing Y, Scholz H, Schedl A: The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the wilms' tumor suppressor wt1. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3044-3051.
- 151 Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA: Wt1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein podocalyxin. *Curr Biol* 2001;11:1805-1809.
- 152 K/doi clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
- 153 Vassalotti JA, Stevens LA, Levey AS: Testing for chronic kidney disease: A position statement from the national kidney foundation. *Am J Kidney Dis* 2007;50:169-180.
- 154 Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:288-296.
- 155 de Jong PE, Curhan GC: Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: Public health perspectives. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2120-2126.
- 156 Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, Wiebe N, Tonelli M: Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* 2010;303:423-429.
- 157 van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A, de Jong P, Gansevoort RT, Levey AS, de Jong PE, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Ninomiya T, Chalmers J, Macmahon S, Tonelli M, Hemmelgarn B, Sacks F, Curhan G, Collins AJ, Li S, Chen SC, Hawaii Cohort KP, Lee BJ, Ishani A, Neaton J, Svendsen K, Mann JF, Yusuf S, Teo KK, Gao P, Nelson RG, Knowler WC, Bilo HJ, Joosten H, Kleefstra N, Groenier KH, Auguste P, Veldhuis K, Wang Y, Camarata L, Thomas B, Manley T: Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-1352.
- 158 Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J: Lower estimated gfr and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;80:93-104.

- 159 Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, van der Velde M, Woodward M, Levey AS, Jong PE, Coresh J, de Jong PE, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Wright J, Appel L, Greene T, Levin A, Djurdjev O, Wheeler DC, Landray MJ, Townsend JN, Emberson J, Clark LE, Macleod A, Marks A, Ali T, Fluck N, Prescott G, Smith DH, Weinstein JR, Johnson ES, Thorp ML, Wetzels JF, Blankestijn PJ, van Zuilen AD, Menon V, Sarnak M, Beck G, Kronenberg F, Kollerits B, Froissart M, Stengel B, Metzger M, Remuzzi G, Ruggenenti P, Perna A, Heerspink HJ, Brenner B, de Zeeuw D, Rossing P, Parving HH, Auguste P, Veldhuis K, Wang Y, Camarata L, Thomas B, Manley T: Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1331-1340.
- 160 Hailpern SM, Melamed ML, Cohen HW, Hostetter TH: Moderate chronic kidney disease and cognitive function in adults 20 to 59 years of age: Third national health and nutrition examination survey (nhanes iii). *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2205-2213.
- 161 Levey AS, Coresh J: Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379:165-180.
- 162 Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984;74:1143-1155.
- 163 Fioretto P, Mauer M: Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007;27:195-207.
- 164 Balakumar P, Arora MK, Ganti SS, Reddy J, Singh M: Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: Current perspectives and future directions. *Pharmacol Res* 2009;60:24-32.
- 165 Fenton SS, Schaubel DE, Desmeules M, Morrison HI, Mao Y, Copleston P, Jeffery JR, Kjellstrand CM: Hemodialysis versus peritoneal dialysis: A comparison of adjusted mortality rates. *Am J Kidney Dis* 1997;30:334-342.
- 166 George PS, Pearson ER, Witham MD: Effect of vitamin d supplementation on glycaemic control and insulin resistance: A systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2012
- 167 Hewison M: Vitamin d and the immune system: New perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:365-379, table of contents.
- 168 Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R: The effect of vitamin d3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract* 2003;57:258-261.
- 169 Fadda GZ, Akmal M, Lipson LG, Massry SG: Direct effect of parathyroid hormone on insulin secretion from pancreatic islets. *Am J Physiol* 1990;258:E975-984.
- 170 Cooper ME: Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44:1957-1972.
- 171 Soldatos G, Cooper ME: Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82 Suppl 1:S75-79.
- 172 Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986;77:1925-1930.
- 173 Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA, Wong NC: Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int* 2000;58:1534-1545.
- 174 Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL: Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase c pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994;43:1122-1129.
- 175 Dunlop ME, Muggli EE: Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney Int* 2000;57:464-475.

- 176 Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R: Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 1997;46:847-853.
- 177 Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071.
- 178 Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, Casley DJ, Bach LA, Kelly DJ, Gilbert RE: Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (vegfr) and its receptor vegfr-2 in experimental diabetes. *Diabetes* 1999;48:2229-2239.
- 179 Dunlop M: Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S3-12.
- 180 Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G: Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991;40:1328-1334.
- 181 Steinke JM, Sinaiko AR, Kramer MS, Suissa S, Chavers BM, Mauer M: The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: Iii. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients. *Diabetes* 2005;54:2164-2171.
- 182 Dronavalli S, Duka I, Bakris GL: The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:444-452.
- 183 van Dijk C, Berl T: Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:237-248.
- 184 Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, Abbate M, Ruggerenti P, Kalluri R, Remuzzi G: Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004;65:2193-2200.
- 185 Wolf G, Ziyadeh FN: Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999;56:393-405.
- 186 Wolf G, Ziyadeh FN: Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:p26-31.
- 187 Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui P, Pinel N, Cordonnier DJ, Gilbert RE: Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: Effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002;45:1572-1576.
- 188 Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G: Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: Evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin ii. *Diabetes* 2003;52:1023-1030.
- 189 Kriz W, Gretz N, Lemley KV: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998;54:687-697.
- 190 Reddy GR, Kotlyarevskaya K, Ransom RF, Menon RK: The podocyte and diabetes mellitus: Is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:32-36.
- 191 Hsu CY, Ordonez JD, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Go AS: The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;74:101-107.
- 192 James MT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, Pannu N, Manns BJ, Klarenbach SW, Tonelli M: Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: A cohort study. *Lancet* 2010;376:2096-2103.
- 193 James MT, Quan H, Tonelli M, Manns BJ, Faris P, Laupland KB, Hemmelgarn BR: CKD and risk of hospitalization and death with pneumonia. *Am J Kidney Dis* 2009;54:24-32.
- 194 Kramer H, Toto R, Peshock R, Cooper R, Victor R: Association between chronic kidney disease and coronary artery calcification: The Dallas Heart Study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:507-513.
- 195 Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W: Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and

- 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. Arch Intern Med 2008;168:1340-1349.
- 196 Cozzolino M, Ketteler M, Zehnder D: The vitamin d system: A crosstalk between the heart and kidney. Eur J Heart Fail 2010;12:1031-1041.
- 197 Petchey WG, Johnson DW, Isbel NM: Shining d' light on chronic kidney disease: Mechanisms that may underpin the cardiovascular benefit of vitamin d. Nephrology (Carlton) 2011;16:351-367.
- 198 DeLuca HF: Overview of general physiologic features and functions of vitamin d. Am J Clin Nutr 2004;80:1689S-1696S.
- 199 Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP: 1,25-dihydroxyvitamin d(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. J Clin Invest 2002;110:229-238.
- 200 Kuhlmann Alexander CSH, Marie-Luise Gross, Udo Reulbach, Marc Holzinger, Ute Schwarz, Eberhard Ritz, and Kerstin Amann: **1,25-dihydroxyvitamin d3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat.** Am J Physiol Renal Physiol 2004;286:F526-F533.
- 201 Migliori M, Giovannini L, Panichi V, Filippi C, Taccola D, Origlia N, Mannari C, Camussi G: Treatment with 1,25-dihydroxyvitamin d3 preserves glomerular slit diaphragm-associated protein expression in experimental glomerulonephritis. Int J Immunopathol Pharmacol 2005;18:779-790.
- 202 Xiao H, Shi W, Liu S, Wang W, Zhang B, Zhang Y, Xu L, Liang X, Liang Y: 1,25-dihydroxyvitamin d(3) prevents puromycin aminonucleoside-induced apoptosis of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/akt-signaling pathway. Am J Nephrol 2009;30:34-43.
- 203 Xiao HQ, Shi W, Liu SX, Zhang B, Xu LX, Liang XL, Liang YZ: Podocyte injury is suppressed by 1,25-dihydroxyvitamin d via modulation of transforming growth factor-beta 1/bone morphogenetic protein-7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2009;36:682-689.
- 204 Wang Y, Zhou J, Minto AW, Hack BK, Alexander JJ, Haas M, Li YC, Heilig CW, Quigg RJ: Altered vitamin d metabolism in type ii diabetic mouse glomeruli may provide protection from diabetic nephropathy. Kidney Int 2006;70:882-891.
- 205 Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A: Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: Implications for fabry nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2011;26:1797-1802.
- 206 Takano Yosuke KY, Nobuhiko Hiramatsu, Ayumi Kasai, Kunihiro Hayakawa, Makiko Yokouchi, Jian Yao, and Masanori Kitamura: **Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of hgf as a repressor of nephrin.** Am J Physiol Renal Physiol 2007;292: F1573-F1582.
- 207 Takano Y, Yamauchi K, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Yokouchi M, Yao J, Kitamura M: Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of hgf as a repressor of nephrin. Am J Physiol Renal Physiol 2007;292:F1573-1582.
- 208 Okamura M, Takano Y, Saito Y, Yao J, Kitamura M: Induction of nephrin gene expression by selective cooperation of the retinoic acid receptor and the vitamin d receptor. Nephrol Dial Transplant 2009;24:3006-3012.
- 209 Saito Y, Okamura M, Nakajima S, Hayakawa K, Huang T, Yao J, Kitamura M: Suppression of nephrin expression by tnfr-alpha via interfering with the camp-retinoic acid receptor pathway. Am J Physiol Renal Physiol 2010;298:F1436-1444.
- 210 Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ: Platelet-activating factor. Evidence for 1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J Biol Chem 1979;254:9355-9358.

- 211 Oda M, Satouchi K, Yasunaga K, Saito K: Molecular species of platelet-activating factor generated by human neutrophils challenged with ionophore a23187. *J Immunol* 1985;134:1090-1093.
- 212 Weintraub ST, Ludwig JC, Mott GE, McManus LM, Lear C, Pinckard RN: Fast atom bombardment-mass spectrometric identification of molecular species of platelet-activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;129:868-876.
- 213 Smaragdi Antonopoulou TN, Haralabos C. Karantonis, Elizabeth Fragopoulou and Constantinos A. Demopoulos. : Paf, a potent lipid mediator,
- 214 Snyder F: Cdp-choline:Alkylacetyl-glycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1348:111-116.
- 215 Francescangeli E, Boila A, Goracci G: Properties and regulation of microsomal paf-synthesizing enzymes in rat brain cortex. *Neurochem Res* 2000;25:705-713.
- 216 Gimenez R, Aguilar J: Cytidine (5') diphosphocholine-induced decrease in cerebral platelet activating factor is due to inactivation of its synthesizing enzyme cholinephosphotransferase in aged rats. *Neurosci Lett* 2001;299:209-212.
- 217 Renooij W, Snyder F: Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1981;663:545-556.
- 218 Muguruma K, Johnston JM: Metabolism of platelet-activating factor in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;56:529-536.
- 219 Ibe BO, Portugal AM, Usha Raj J: Metabolism of platelet activating factor by intrapulmonary vascular smooth muscle cells. Effect of oxygen on phospholipase a2 protein expression and activities of acetyl-coa acetyltransferase and cholinephosphotransferase. *Mol Genet Metab* 2002;77:237-248.
- 220 Bussolino F, Pescarmona G, Camussi G, Gremo F: Acetylcholine and dopamine promote the production of platelet activating factor in immature cells of chick embryonic retina. *J Neurochem* 1988;51:1755-1759.
- 221 Heller R, Bussolino F, Ghigo D, Garbarino G, Pescarmona G, Till U, Bosia A: Stimulation of platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells by activation of the de novo pathway. Phorbol 12-myristate 13-acetate activates 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate:Acetyl-coa acetyltransferase and dithiothreitol-insensitive 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol:Cdp-choline cholinephosphotransferase. *J Biol Chem* 1991;266:21358-21361.
- 222 Imagawa M, Mimata H, Takahashi S, Nakagawa M, Nomura Y, Ogata J: Modulation of platelet-activating factor synthesis by recombinant interferon-alpha in human renal cell carcinoma. *Urol Int* 1996;57:11-16.
- 223 Ninio E, Breton M, Bidault J, Colard O: Biosynthesis of paf-acether. Xvii. Regulation by the coa-independent transacylase in human neutrophils. *FEBS Lett* 1991;289:138-140.
- 224 Snyder F, Lee TC, Blank ML: The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog Lipid Res* 1992;31:65-86.
- 225 Winkler JD, Sung CM, Hubbard WC, Chilton FH: Influence of arachidonic acid on indices of phospholipase a2 activity in the human neutrophil. *Biochem J* 1993;291 (Pt 3):825-831.
- 226 Burg M, Ostendorf T, Mooney A, Koch KM, Floege J: Treatment of experimental mesangioproliferative glomerulonephritis with non-anticoagulant heparin: Therapeutic efficacy and safety. *Lab Invest* 1997;76:505-516.
- 227 Lee TC: Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:Acetyl-coa acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 1985;260:10952-10955.

- 228 Ribbes G, Ninio E, Fontan P, Record M, Chap H, Benveniste J, Douste-Blazy L: Evidence that biosynthesis of platelet-activating factor (paf-acether) by human neutrophils occurs in an intracellular membrane. *FEBS Lett* 1985;191:195-199.
- 229 Fragopoulou E, Iatrou C, Demopoulos CA: Characterization of acetyl-coa: Lyso-paf acetyltransferase of human mesangial cells. *Mediators Inflamm* 2005;2005:263-272.
- 230 Nomikos TN, Iatrou C, Demopoulos CA: Acetyl-coa:1-o-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-paf at) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur J Biochem* 2003;270:2992-3000.
- 231 Mollinedo F, Gomez-Cambronero J, Cano E, Sanchez-Crespo M: Intracellular localization of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:1232-1239.
- 232 Record M, Snyder F: Intracellular location of acetyltransferase in the remodeling pathway of paf biosynthesis in undifferentiated human leukemic cells (hl-60). *J Lipid Mediat* 1990;2:1-8.
- 233 Ninio E, Mencia-Huerta JM, Heymans F, Benveniste J: Biosynthesis of platelet-activating factor. I. Evidence for an acetyl-transferase activity in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1982;710:23-31.
- 234 Lee TC, Vallari DS, Snyder F: 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase. *Methods Enzymol* 1992;209:396-401.
- 235 Tessner TG, Wykle RL: Stimulated neutrophils produce an ethanolamine plasmalogen analog of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;262:12660-12664.
- 236 Baker RR: Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor. *Neurochem Res* 2000;25:677-683.
- 237 Snyder F: Platelet-activating factor: The biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* 1995;305 (Pt 3):689-705.
- 238 Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T: A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-coa:Lyso-paf acetyltransferase. *J Biol Chem* 2007;282:6532-6539.
- 239 Seyama K: [studies on acetyl-coa:Lyso platelet activating factor acetyltransferase of rat spleen microsomes--solubilization and substrate specificity]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1986;61:766-775.
- 240 Gomez-Cambronero J, Velasco S, Sanchez-Crespo M, Vivanco F, Mato JM: Partial purification and characterization of 1-o-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:Acetyl-coa acetyltransferase from rat spleen. *Biochem J* 1986;237:439-445.
- 241 Gomez-Cambronero J, Velasco S, Mato JM, Sanchez-Crespo M: Modulation of lyso-platelet activating factor: Acetyl-coa acetyltransferase from rat splenic microsomes. The role of cyclic amp-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:516-519.
- 242 Gomez-Cambronero J, Inarrea P, Alonso F, Sanchez Crespo M: The role of calcium ions in the process of acetyltransferase activation during the formation of platelet-activating factor (paf-acether). *Biochem J* 1984;219:419-424.
- 243 Lenihan DJ, Lee TC: Regulation of platelet activating factor synthesis: Modulation of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:Acetyl-coa acetyltransferase by phosphorylation and dephosphorylation in rat spleen microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:834-839.
- 244 Nieto ML, Velasco S, Sanchez Crespo M: Modulation of acetyl-coa:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-paf) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic amp-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1988;263:4607-4611.

- 245 Doeber TW, Wu MS: Platelet-activating factor (paf) stimulates the paf-synthesizing enzyme acetyl-coa:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine o2-acetyltransferase and paf synthesis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7557-7561.
- 246 Remy E, Lenoir G, Houben A, Vandesteene C, Remacle J: Inhibition of platelet-activating factor biosynthesis via the acetyltransferase by arachidonic and oleic acids in ionophore a23187-stimulated bovine neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1989;1005:87-92.
- 247 Ihara Y, Frenkel RA, Johnston JM: Hormonal regulation of platelet-activating factor-acetyltransferase activity in rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 1993;304:503-507.
- 248 Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE: Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Fed Proc* 1983;42:3120-3122.
- 249 Blank ML, Cress EA, Whittle T, Snyder F: In vivo metabolism of a new class of biologically active phospholipids: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a platelet activating-hypotensive phospholipid. *Life Sci* 1981;29:769-775.
- 250 Φραγκοπούλου EN: Μελέτη του μεταβολισμού και της δράσης του παραγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο νεφρικό ιστο και νεφρικά κυττάρα., 2004,
- 251 Lopez-Novoa JM: Potential role of platelet activating factor in acute renal failure. *Kidney Int* 1999;55:1672-1682.
- 252 Ortiz A, Gomez-Chiarri M, Lerma JL, Gonzalez E, Egido J: The role of platelet-activating factor (paf) in experimental glomerular injury. *Lipids* 1991;26:1310-1315.
- 253 Asano K, Taniguchi S, Nakao A, Watanabe T, Kurokawa K: Distribution of platelet activating factor receptor mrna along the rat nephron segments. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:352-357.
- 254 Schlondorff D, Neuwirth R: Platelet-activating factor and the kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F1-11.
- 255 Scherf H, Nies AS, Schwertschlag U, Hughes M, Gerber JG: Hemodynamic effects of platelet activating factor in the dog kidney in vivo. *Hypertension* 1986;8:737-741.
- 256 Vemulapalli S, Chiu PJ, Barnett A: Cardiovascular and renal action of platelet-activating factor in anesthetized dogs. *Hypertension* 1984;6:489-493.
- 257 Yoo J, Schlondorff D, Neugarten J: Thromboxane mediates the renal hemodynamic effects of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:743-748.
- 258 Tetta C, Segoloni G, Pacitti A, Regis G, Salomone M, Turello E, Camussi G, Vercellone A: The production of platelet-activating factor during hemodialysis. *Int J Artif Organs* 1989;12:766-772.
- 259 Guastoni C, Tetta C, Hoenich NA, Gervasio R, Sereni L, Tessore E, Wratten ML, Civati G: Mechanisms and kinetics of the synthesis and release of platelet-activating factor (paf) by polyacrylonitrile membranes. *Clin Nephrol* 1996;46:132-138.
- 260 Tetta C, David S, Biancone L, Canino F, Cambi V, Camussi G: Role of platelet activating factor in hemodialysis. *Kidney Int Suppl* 1993;39:S154-157.
- 261 Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C: Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1638-1646.
- 262 Sanchez-Crespo M, Inarrea P, Alvarez V, Alonso F, Egido J, Hernando L: Presence in normal human urine of a hypotensive and platelet-activating phospholipid. *Am J Physiol* 1983;244:F706-711.
- 263 Noris M, Benigni A, Boccardo P, Gotti E, Benfenati E, Aiello S, Todeschini M, Remuzzi G: Urinary excretion of platelet activating factor in patients with immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993;43:426-429.
- 264 Iatrou C, Moustakas G, Antonopoulou S, Demopoulos CA, Ziroyiannis P: Platelet-activating factor levels and paf acetylhydrolase activities in patients with primary glomerulonephritis. *Nephron* 1996;72:611-616.

- 265 Bustos C, Gonzalez E, Gonzalez-Cuadrado S, Ortiz A, Muley R, de Nicolas R, Plaza JJ, Egido J: Urinary excretion of platelet-activating factor in human and experimental nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:282-286.
- 266 Denizot Y, Aupetit C, Bridoux F, Alphonse JC, Cogne M, Aldigier JC: Deregulated platelet-activating factor levels and acetylhydrolase activity in patients with idiopathic iga nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1344-1347.
- 267 Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- 268 Mitchell DSaRA: How to obtain reproducible quantitative elisa results,
- 269 Zaidi SK, Javed A, Choi JY, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS: A specific targeting signal directs runx2/cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci* 2001;114:3093-3102.
- 270 Wu K, Setty S, Mauer SM, Killen P, Nagase H, Michael AF, Tsilibary EC: Altered kidney matrix gene expression in early stages of experimental diabetes. *Acta Anat (Basel)* 1997;158:155-165.
- 271 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- 272 Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299.
- 273 Becker-Andre M, Hahlbrock K: Absolute mrna quantification using the polymerase chain reaction (pcr). A novel approach by a pcr aided transcript titration assay (patty). *Nucleic Acids Res* 1989;17:9437-9446.
- 274 Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, Panagopoulou E, Marinos E, Kershaw DB, Kerjaschki D, Tsilibary EC: Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci* 2004;117:3281-3294.
- 275 Drossopoulou GI, Tsotakos NE, Tsilibary EC: Impaired transcription factor interplay in addition to advanced glycation end products suppress podocalyxin expression in high glucose-treated human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F594-603.
- 276 Satoh MS, Lindahl T: Role of poly(adp-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 1992;356:356-358.
- 277 Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC: Cleavage of poly(adp-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ice. *Nature* 1994;371:346-347.
- 278 Cohen GM: Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.
- 279 Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al.: Identification and inhibition of the ice/ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
- 280 Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM: Yama/cpp32 beta, a mammalian homolog of ced-3, is a crma-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(adp-ribose) polymerase. *Cell* 1995;81:801-809.
- 281 Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM: Importance of poly(adp-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 1998;273:33533-33539.
- 282 Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP: Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the drip complex. *Nature* 1999;398:824-828.

- 283 Meyer MB, Zella LA, Nerenz RD, Pike JW: Characterizing early events associated with the activation of target genes by 1,25-dihydroxyvitamin d3 in mouse kidney and intestine in vivo. *J Biol Chem* 2007;282:22344-22352.
- 284 Cheng S, Coyne D: Vitamin d and outcomes in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16:77-82.
- 285 Heuer HO: Involvement of platelet-activating factor (paf) in septic shock and priming as indicated by the effect of hetrazepinoic paf antagonists. *Lipids* 1991;26:1369-1373.
- 286 Fletcher JR, DiSimone AG, Earnest MA: Platelet activating factor receptor antagonist improves survival and attenuates eicosanoid release in severe endotoxemia. *Ann Surg* 1990;211:312-316.
- 287 Izquierdo I, Merlos M, Garcia-Rafanell J: Rupatadine: A new selective histamine h1 receptor and platelet-activating factor (paf) antagonist. A review of pharmacological profile and clinical management of allergic rhinitis. *Drugs Today (Barc)* 2003;39:451-468.
- 288 Agmon-Levin N, Blank M, Zandman-Goddard G, Orbach H, Meroni PL, Tincani A, Doria A, Cervera R, Miesbach W, Stojanovich L, Barak V, Porat-Katz BS, Amital H, Shoenfeld Y: Vitamin d: An instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann Rheum Dis* 2011;70:145-150.
- 289 Beer TM, Venner PM, Ryan CW, Petrylak DP, Chatta G, Dean Ruether J, Chi KN, Curd JG, DeLoughery TG: High dose calcitriol may reduce thrombosis in cancer patients. *Br J Haematol* 2006;135:392-394.
- 290 Bouillon R, Allewaert K, Xiang DZ, Tan BK, van Baelen H: Vitamin d analogs with low affinity for the vitamin d binding protein: Enhanced in vitro and decreased in vivo activity. *J Bone Miner Res* 1991;6:1051-1057.
- 291 Tsantila N, Tsoupras AB, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Iatrou C, Demopoulos CA: In vitro and in vivo effects of statins on platelet-activating factor and its metabolism. *Angiology* 2011;62:209-218.
- 292 Detopoulou P, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Kotroyiannis I, Vassiliadou C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C: Platelet activating factor (paf) and activity of its biosynthetic and catabolic enzymes in blood and leukocytes of male patients with newly diagnosed heart failure. *Clin Biochem* 2009;42:44-49.
- 293 Tsoupras AB, Iatrou C, Frangia C, Demopoulos CA: The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: Potent beneficial role of paf-inhibitors and antioxidants. *Infectious disorders drug targets* 2009;9:390-399.
- 294 Khovidhunkit W, Memon RA, Shigenaga JK, Pang M, Schambelan M, Mulligan K, Feingold KR, Grunfeld C: Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1999;48:1524-1531.
- 295 Papavasiliou EC, Gouva C, Siamopoulos KC, Tselepis AD: Erythrocyte paf-acetylhydrolase activity in various stages of chronic kidney disease: Effect of long-term therapy with erythropoietin. *Kidney Int* 2005;68:246-255.
- 296 Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, Ikeda Y, Yamaguchi K: Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:511-514.
- 297 Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L, Schena FP: Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int Suppl* 2000;76:S104-111.
- 298 Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA: Plasma levels of il-1 beta, tnfr alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, capd and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994;45:890-896.
- 299 Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I, Galaktidou G: Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (lps) tnfr-alpha and il-8 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int Urol Nephrol* 2010;42:181-185.

- 300 Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD: Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in esrd. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:353-361.
- 301 Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, Kim SW: Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F301-313.
- 302 Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, Migliori M, Taccola D, Giovannini L, Tetta C, Palla R: Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: A role for intracellular calcium. *Kidney Int* 1998;54:1463-1469.
- 303 Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, Rubin AL: Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998;32:107-114.
- 304 Cardus A, Panizo S, Encinas M, Dolcet X, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM: 1,25-dihydroxyvitamin d3 regulates vegf production through a vitamin d response element in the vegf promoter. *Atherosclerosis* 2009;204:85-89.
- 305 Bussolino F, Sironi M, Bocchietto E, Mantovani A: Synthesis of platelet-activating factor by polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-8. *J Biol Chem* 1992;267:14598-14603.
- 306 Bussolino F, Camussi G, Tetta C, Garbarino G, Bosia A, Baglioni C: Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: Comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1. *J Lipid Mediat* 1990;2 Suppl:S15-22.
- 307 Li YC: Podocytes as target of vitamin d. *Curr Diabetes Rev* 2011;7:35-40.
- 308 Matsui I, Hamano T, Tomida K, Inoue K, Takabatake Y, Nagasawa Y, Kawada N, Ito T, Kawachi H, Rakugi H, Imai E, Isaka Y: Active vitamin d and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2354-2361.
- 309 Patel SR, Xu Y, Koenig RJ, Hsu CH: Effect of glucose on the function of the calcitriol receptor and vitamin d metabolism. *Kidney Int* 1997;52:79-86.
- 310 Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS: Glucocorticoid regulation of the vitamin d receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:372-375.
- 311 Friday E, Ledet J, Turturro F: Response to dexamethasone is glucose-sensitive in multiple myeloma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:81.
- 312 Carlberg C, Saurat JH: Vitamin d-retinoid association: Molecular basis and clinical applications. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;1:82-86.
- 313 Yasmin R, Williams RM, Xu M, Noy N: Nuclear import of the retinoid x receptor, the vitamin d receptor, and their mutual heterodimer. *J Biol Chem* 2005;280:40152-40160.
- 314 Milde P, Merke J, Ritz E, Haussler MR, Rauterberg EW: Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: Comparison of four immunoperoxidase methods. *J Histochem Cytochem* 1989;37:1609-1617.
- 315 He W, Kang YS, Dai C, Liu Y: Blockade of wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:90-103.
- 316 Andrews PM: Glomerular epithelial alterations resulting from sialic acid surface coat removal. *Kidney Int* 1979;15:376-385.
- 317 Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, Bernheim J, Klein O, Green J, Rashid G: Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F1059-1064.