

Σχολή Επιστημών Υγείας
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ
ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Β' ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής ΜΑΝΟΥΣΟΣ Μ.
ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

“Πειραματική μελέτη βασικών μηχανισμών δράσης της
κροκετίνης στην πρόληψη της νεφρικής βλάβης λόγω του
συνδρόμου ισχαιμίας - επαναιμάτωσης”

«ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Π. ΜΙΧΑΗΛ
ΠΛΑΣΤΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

Αθήνα/ Μάρτιος 2020

Επιβλέπον καθηγητής:
Γεώργιος Π. Φραγκουλίδης
Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Γεώργιος Π. Φραγκουλίδης,
Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ
2. Πολυδώρου Ανδρέας,
Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ
3. Βεζάκης Αντώνιος,
Αν. Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

- ημερομηνία αιτήσεως ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής :11 ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΥ 2013
- ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 24 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2013
- μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:
 1. Γεώργιος Π. Φραγκουλίδης,
Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ
 2. Πολυδώρου Ανδρέας,
Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ
 3. Βεζάκης Αντώνιος,
Αν. Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ
- ημερομηνία ορισμού του Θέματος της διδακτορικής διατριβής : 5 ΙΟΥΛΙΟΥ 2013
- Η τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή υπέβαλε στο Δ.Σ. της Ιατρικής Σχολής τις εκθέσεις προόδου:
 1. 10 ΜΑΡΤΙΟΥ 2014
 2. 12 ΙΟΥΝΙΟΥ 2015
 3. 17 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2016
- ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 15 ΜΑΡΤΙΟΥ 2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών
Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Επιβλέπον καθηγητής:

Γεώργιος Π. Φραγκουλίδης

Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

7μελης Εξεταστική Επιτροπή:

1. Γεώργιος Π. Φραγκουλίδης,

Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

2. Κωνσταντουλάκης Μ. Μανούσος,

Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ-

Διευθυντής Β' Χειρουργικής Κλινικής

3. Πολυδώρου Ανδρέας,

Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

4. Ισμήνη-Νίκη Α. Δοντά

Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Αθηνών

5. Βεζάκης Αντώνιος,

Αν. Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ


6. Νικόλαος Δανιάς, MD, PhD

7. Παντελής Βασιλείου, MD, PhD, FACS, FASCRS

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή:

ΑΡΙΣΤΑ "10"

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΗ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἤΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ἸΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ἸΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ἸΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ἸΡ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ἈΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
 ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΤΟΝ ΔΩΣΩ. ἈΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ἸΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ἈΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ἈΝ ΕΣΩ
 ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ἈΛΛΗΣ ΚΑΙ ἈΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ἈΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Ἀ Δ' ἈΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
 Η ἸΔΩ, Η ἈΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ἈΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ἈΝΘΡΩΠΩΝ, Ἀ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ἈΡΡΗΤΑ ἤΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Ἀ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ἈΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ἸΠΑΡΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Αφιερώνεται στη Σύζυγο μου Φάνη που με υπομονή, αγάπη και δυναμισμό με στηρίζει σε κάθε πρωτοβουλία, στα παιδιά μου, τους γονείς μου που με έφεραν έως εδώ με κόπους και θυσίες, τους δάσκαλους της ζωής μου και ειδικά τον Καθηγητή μου Χειρουργικής Ε.Κ.Π.Α και διευθυντή Δρ. Γεώργιο Π. Φραγκουλίδη, που με την βοήθεια του κατάφερα να εκπονήσω την Διατριβή μου, καθώς και τον φίλο και συνάδελφο Χειρουργό, Δέρπαπα Μιχάλη και πολλούς άλλους. Για ένα καλύτερο μέλλον...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	9
Κεφάλαιο 1 ^ο :.....	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
I. Το Ουροποιητικό Σύστημα. Οι Νεφροί. Δομή και φυσιολογία των Νεφρών.	10
(α) Το Ουροποιητικό Σύστημα.....	10
(β) Νεφρώνας: Η θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού.	15
(γ) Σπειραματική Διήθηση, Σωληναριακή Επαναρρόφηση και Σωληναριακή Έκκριση: οι τρεις σπουδαιότερες νεφρικές διεργασίες.	17
Κροκετίνη: Χημική δομή και ιδιότητες.....	26
(α) Κροκετίνη: Προέλευση και Χημική Δομή	26
(β) Κροκετίνη: Βιοσύνθεση και Ιδιότητες.....	30
III. Κροκετίνη και καρδιαγγειακή-νεφρική λειτουργία, μία αδρή ανασκόπηση.	34
IV. Ο ρόλος των miRNAs ως προγνωστικών/διαγνωστικών δεικτών για το Σύνδρομο Ισχαιμίας-Επαναιμάτωσης.....	38
Κεφάλαιο 2 ^ο :.....	49
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
Πειραματόζωα και μοντέλο τεχνητής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (I/E).....	49
Ποσοτικοποίηση της νεφρικής δυσλειτουργίας με βάση βιοχημικές παραμέτρους.....	50
Ιστολογική παρατήρηση της νεφρικής βλάβης	50
Ανίχνευση της έκφρασης miRNAs	51
Στατιστική ανάλυση	51
Κεφάλαιο 3 ^ο :.....	52
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥ	52
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ	56
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ miRNAs.....	59
Κεφάλαιο 4 ^ο :.....	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
Κεφάλαιο 5 ^ο :.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	73

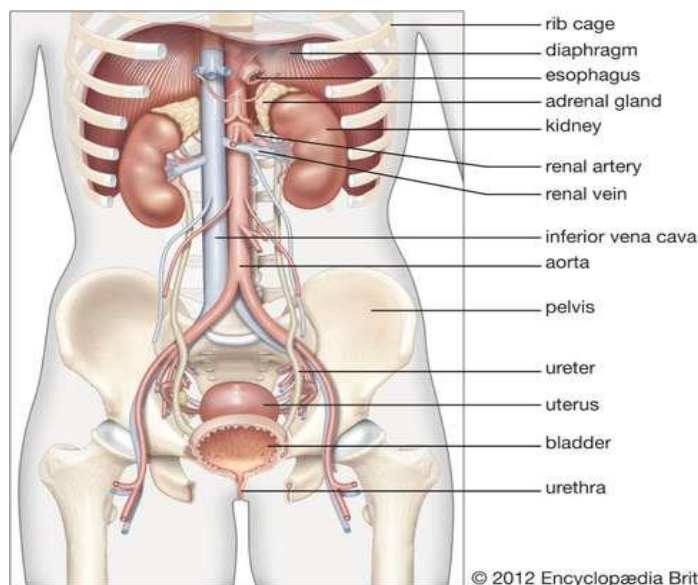
Κεφάλαιο 1^ο:

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Το Ουροποιητικό Σύστημα. Οι Νεφροί. Δομή και φυσιολογία των Νεφρών.

(α) Το Ουροποιητικό Σύστημα

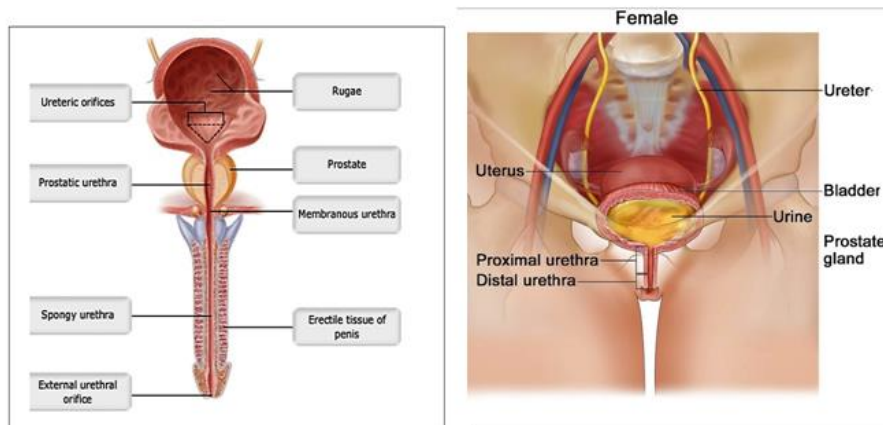
Το ανθρώπινο Ουροποιητικό Σύστημα αποτελεί, μαζί με την τελευταία μοίρα του Πεπτικού, ένα από τα σπουδαιότερα απεκκριτικά και ρυθμιστικά συστήματα του οργανισμού, με σημαντικότερες λειτουργίες για τη διατήρηση της ζωής. Δομικά, συνίσταται από τέσσερα βασικά όργανα, όλα εξωπεριτοναϊκά, και ειδικότερα στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο: τους δύο Νεφρούς, τους δύο Ουρητήρες (ένας εκβαλλόμενος από τον κάθε νεφρό), την Ουροδόχο κύστη και την Ουρήθρα (Εικόνα 1). Η ουροδόχος κύστη και η ουρήθρα δεν είναι οπισθοπεριτοναϊκά όργανα, αλλά υποπεριτοναϊκά, λόγω του ότι εντοπίζονται τοποθετημένα χαμηλά, στο κάτω μέρος της κοιλιακής χώρας, στο ύψος της ηβικής σύμφυσης.



Εικόνα 1: Η γεωγραφική εντόπιση του ανθρώπινου Ουροποιητικού Συστήματος μέσα στο σώμα και τα βασικά δομικά ανατομικά στοιχεία που το αποτελούν. (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.britannica.com/science/human-renal-system>).

Ξεκινώντας την ανατομική επισκόπηση από κάτω προς τα πάνω, η Ουρήθρα συνθέτει το τελευταίο, σωληνοειδές τμήμα της ουροδόχου κύστης που αναλαμβάνει την τελική έξοδο των ούρων από το σώμα. Έχει μεγάλη διαφορά σε ό,τι αφορά το μήκος της στα δύο φύλα, με τις γυναίκες να έχουν κατά μέσο όρο μήκος ουρήθρας περί τα 4.5 έως 5.5 cm, και τους άνδρες περί τα 18 έως 20 cm. Άλλη σημαντική (λειτουργική, αυτή τη φορά) διαφορά είναι πως στους άνδρες η ουρήθρα ακολουθεί καμπύλη πορεία (ενώ στις γυναίκες ακολουθεί ευθεία) και εξυπηρετεί εκτός από την αποβολή των ούρων και ρόλο αναπαραγωγικό (την έξοδο του σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση),

χωρίζεται δε σε τέσσερις μοίρες ανάλογα με τη γεωγραφική της εντόπιση και το είδος των ιστών που την αποτελούν: την προστατική μοίρα, την υμενώδη μοίρα, την σφραγγώδη μοίρα (που είναι και η μεγαλύτερη) και τον σκαφοειδή βόθρο που απαρτίζει και το τελικό της τμήμα. Αντίθετα, στη γυναίκα η ουρήθρα χωρίζεται σε δύο τμήματα: την εγγύς ουρήθρα και την άπω ουρήθρα. Μία γενική επισκόπηση της ανατομικής δομής της ουρήθρας στο ανδρικό και το γυναικείο ουροποιητικό σύστημα περιλαμβάνεται στην Εικόνα 2.

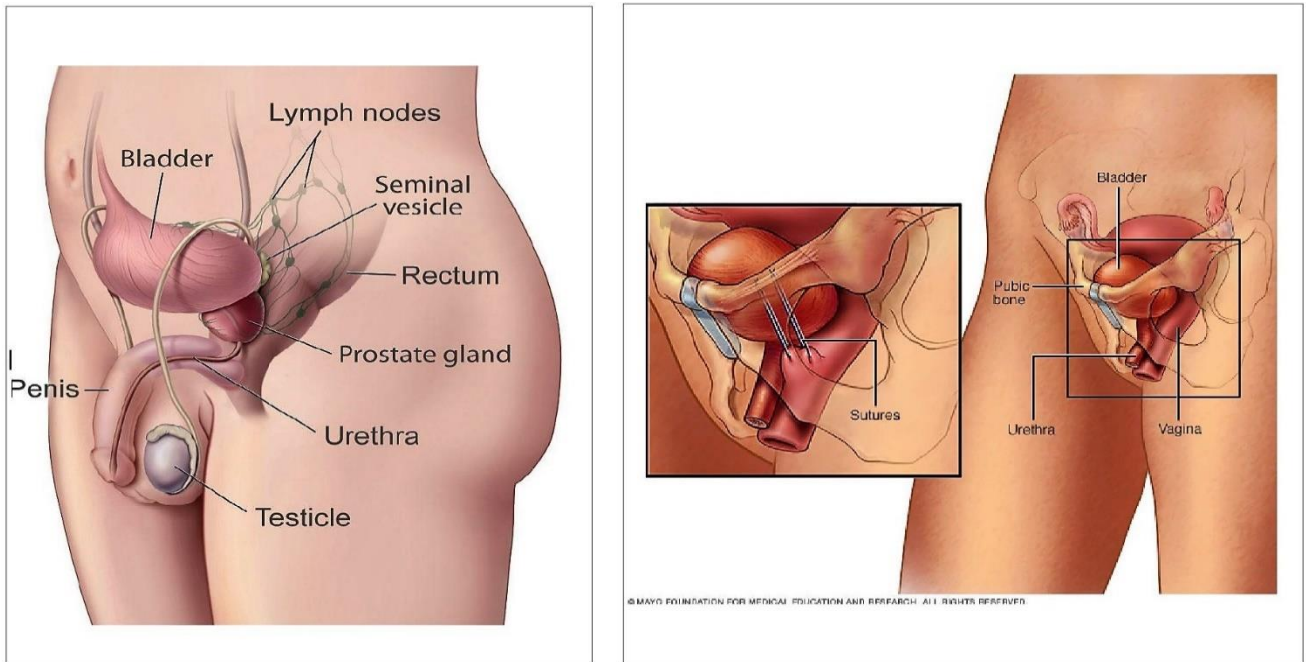


Εικόνα 2: Ανατομική περιγραφή ανδρική (αριστερά) και γυναικείας (δεξιά) ουρήθρας, σε σχήματα.

(Πηγή φωτογραφιών: Αριστερά:

[https://ranzcrpart1.fandom.com/wiki/Viscera:Bladder_and_urethra_\(male_and_female\)?file=53022d86_13d85ffda7d_8000_00002984.png](https://ranzcrpart1.fandom.com/wiki/Viscera:Bladder_and_urethra_(male_and_female)?file=53022d86_13d85ffda7d_8000_00002984.png) και Δεξιά: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR747935.jpg>).

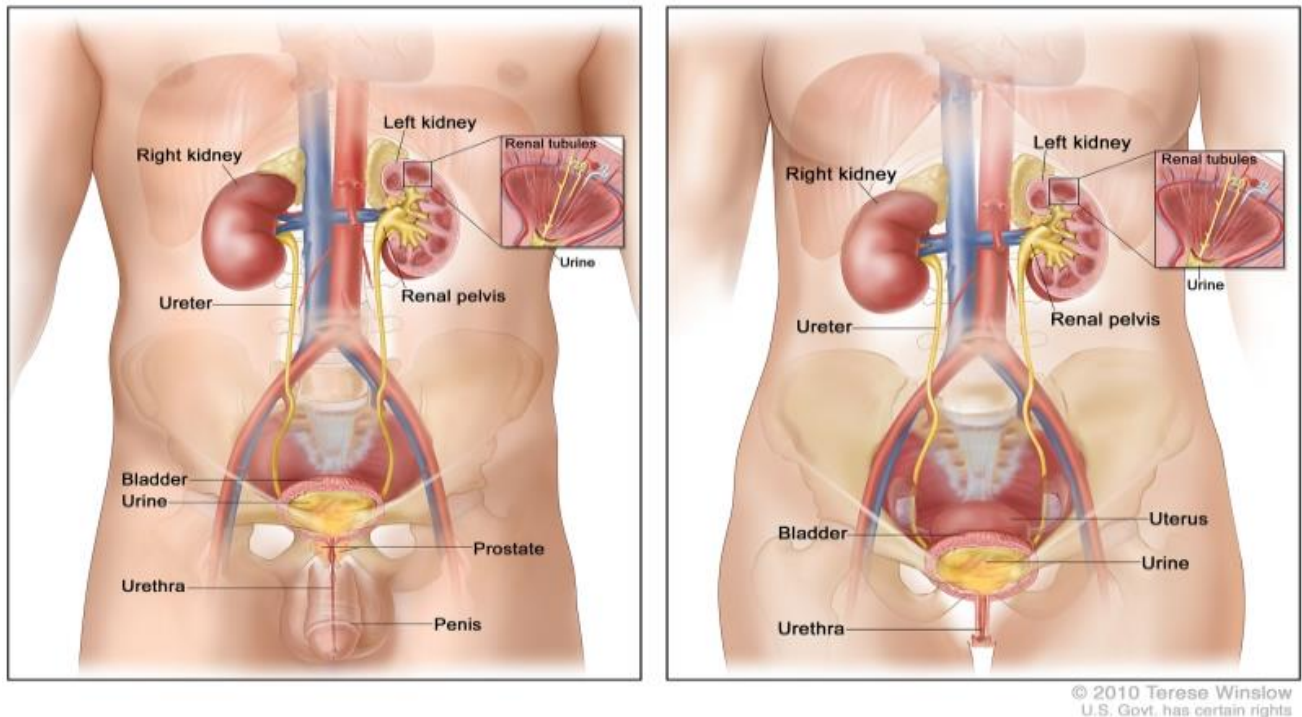
Συνεχίζοντας με την Ουροδόχο Κύστη, είναι ένα κοίλο μυώδες και πολύ εκτατό (ελαστικό) όργανο που βρίσκεται επί του εδάφους της πυέλου (στο πρόσθιο και κατώτερο τμήμα της) και χρησιμεύει στη αποθήκευση των ούρων: τα ούρα εισέρχονται σ' αυτήν -φυσιολογικά- από τους δύο ουρητήρες και εξέρχονται μέσω της ουρήθρας. Η χωρητικότητά της κυμαίνεται περί τα 500 ml, αλλά μπορεί να φτάσει και πολύ περισσότερο (2-3 λίτρα) -λόγω της μεγάλης ενδοτικότητας των τοιχωμάτων της. Και εδώ, υπάρχουν διαφορές στην ανατομία μεταξύ των δύο φύλων καθώς στις γυναίκες η ουρήθρα βρίσκεται μπροστά από το πρόσθιο τμήμα του κόλπου και της μήτρας, ενώ στους άνδρες βρίσκεται μπροστά από το ορθό (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ανατομικής θέσης της ουροδόχου κύστεως, αριστερά στον άνδρα και δεξιά στη γυναίκα. (Πηγή φωτογραφιών: Αριστερά: https://en.wikipedia.org/wiki/Urinary_bladder ,και Δεξιά: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/urinary-incontinence/in-depth/urinary-incontinence-surgery/art-20046858>)

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης αποτελείται ιστολογικά από τρία στρώματα: το έσω στρώμα που καλύπτεται από μεταβατικό επιθήλιο, το μεσαίο στρώμα που καλύπτεται από λείες μυϊκές ίνες (εξωστήρας μυς της ουροδόχου κύστης) και το έξω στρώμα που αποτελείται από σπλαχνικό περιτόναιο. Η λειτουργία του οργάνου επειδή παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα, (ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ- ΕΞΩΘΗΣΗ ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ) υποστηρίζεται από πολλούς συνδέσμους αλλά και από ιδιαίτερα πλούσια αιμάτωση και νεύρωση.

Οι Ουρητήρες είναι δύο αγωγοί που συνδέουν το κάθε έναν από τους δύο νεφρούς με την ουροδόχο κύστη. Έχουν μήκος περί τα 25-30 cm και διάμετρο περί τα 3-4mm, αποτελούνται κυρίως από λείο μυϊκό ιστό, και είναι δομημένοι με τέτοιο τρόπο ώστε στο σημείο εισόδου τους στο τοίχωμα της κύστης να δημιουργούν έναν



© 2010 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Εικόνα 4: Η πορεία των Ουρητήρων οπισθοπεριτοναϊκά, αριστερά στον άνδρα και δεξιά στη γυναίκα. Πρόσθια όψη. Οι Ουρητήρες αναπαρίστανται ως μακρά σωληναριακά όργανα με κίτρινο χρώμα. (Πηγή φωτογραφίας: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65775/figure/CDR0000304478__224/).

εξειδικευμένο βαλβιδικό μηχανισμό που αποτρέπει την επάνοδο των ούρων πίσω στους νεφρούς. Κατά την προς τα κάτω πορεία τους μέσα στο σώμα οι ουρητήρες διέρχονται μπροστά από τα άκρα των εγκάρσιων αποφύσεων των οσφυϊκών σπονδύλων, μπροστά από την ιερολαγόνια άρθρωση και μόλις φτάσουν στο ύψος της ισχιακής άκανθας, στρέφονται προς τα έσω με πορεία την ουροδόχο κύστη. Από εκεί και μετά, στους άνδρες διασταυρώνονται (και στις δύο πλευρές) με τον σπερματικό πόρο που διέρχεται μπροστά από τον ουρητήρα ακριβώς πίσω από την ουροδόχο κύστη και στις γυναίκες με τη μητριαία αρτηρία στα πλάγια του τραχήλου της μήτρας (Εικόνα 4).

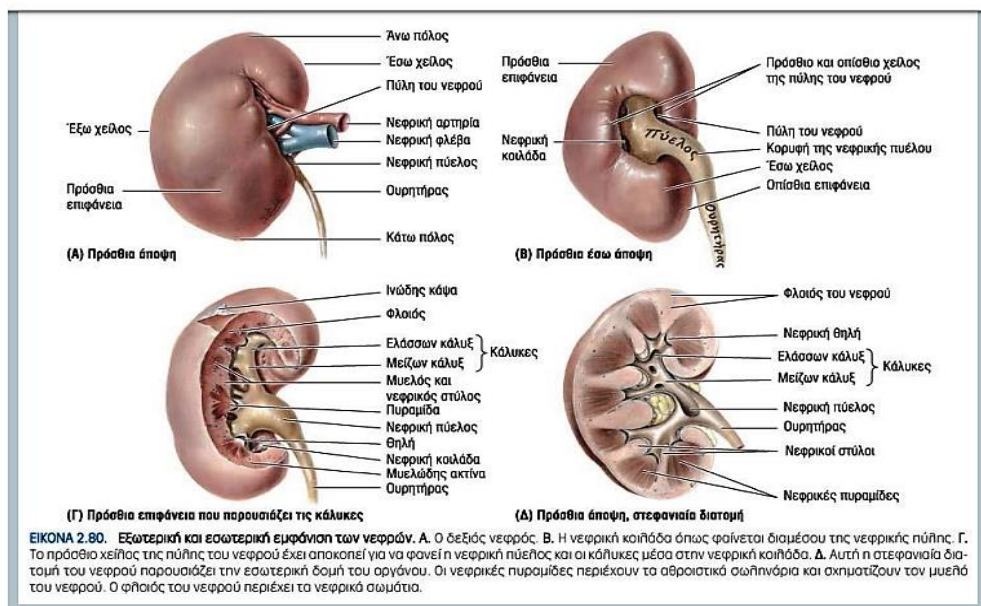
Τέλος και σημαντικότερο, οι Νεφροί. Πρόκειται για οπισθοπεριτοναϊκά όργανα, με μήκος περί τα 11cm ,πλάτος 6 cm, πάχος 3 cm και μάζα 120-170 gr. στον ενήλικα. Η ακριβής γεωγραφική τους εντόπιση μέσα στο σώμα είναι στο ύψος των σπονδύλων Θ12 και Ο3 δίπλα στον Μείζονα Ψοίτη μυ, ενώ οι κορυφές τους προστατεύονται από το 11° και του 12° ζεύγος πλευρών. Φυσιολογικά, ο δεξιός νεφρός βρίσκεται λίγο χαμηλότερα από τον αριστερό, λόγω της πίεσης που δέχεται από την παρουσία του ήπατος. **ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ** όπως άνω και κάτω πόλος, έσω και έξω χείλος, και πύλη του νεφρού. Κάθε νεφρός αποτελείται από περίπου 1 εκατομμύριο μικροσκοπικές λειτουργικές μονάδες που ονομάζονται Νεφρώνες. Κάθε νεφρώνας

αποτελείται από ένα Αγγειακό τμήμα και από ένα Σωληναριακό, και τα δύο αυτά τμήματα συνδέονται μεταξύ τους, τόσο ανατομικά όσο και λειτουργικά. Οι νεφρώνες συνδέονται μεταξύ τους με τον συνδετικό ιστό των νεφρών και η διάταξή τους μέσα στο νεφρικό παρέγχυμα χωρίζει τον νεφρό στον Νεφρικό Φλοιό (renal cortex) και στον Νεφρικό Μυελό (renal modula). Ο τελευταίος δομείται από μικρά ραβδωτά τρίγωνα που ονομάζονται Νεφρικές Πυραμίδες (renal pyramids). Η Εικόνα 5 δείχνει παραστατικά τα βασικά δομικά στοιχεία ενός τυπικού νεφρού.

Βασικές λειτουργίες που επιτελούν οι νεφροί στο σώμα.

Οι λειτουργίες αυτές είναι:

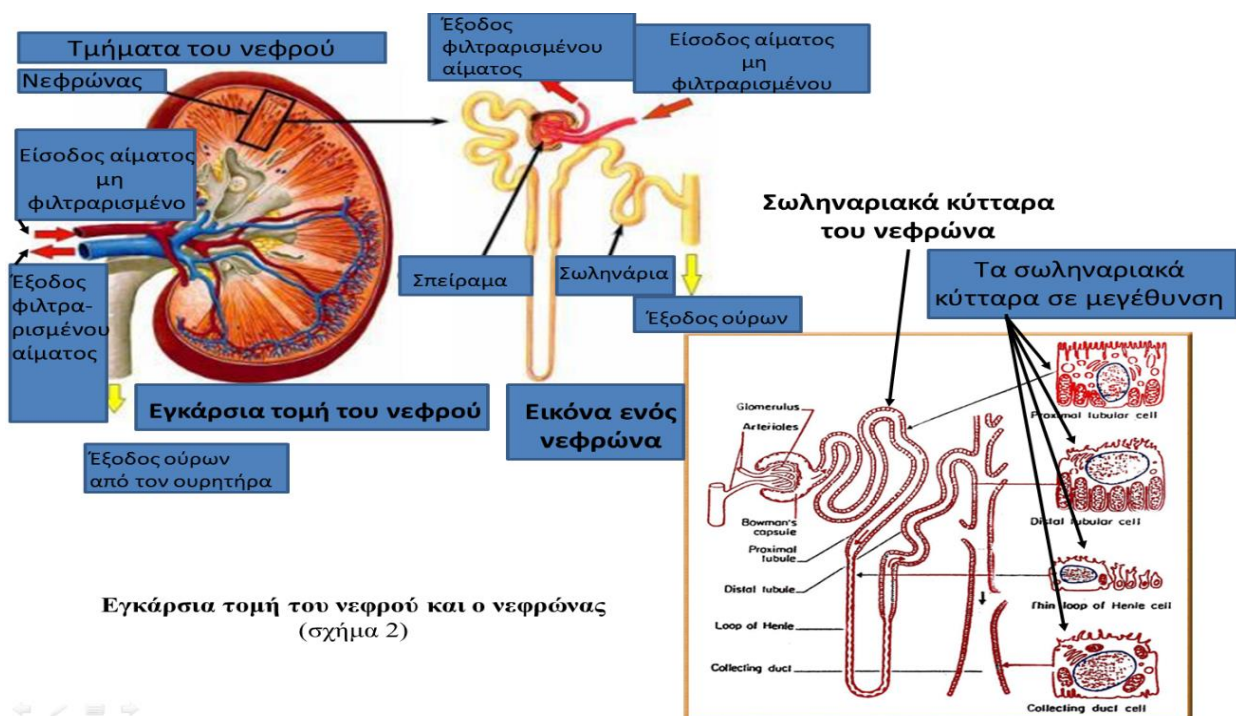
1. Ρύθμιση του υδατικού ισοζυγίου του οργανισμού.
2. Ρύθμιση της σύστασης του Εξωκυττάριου Υγρού (ECF).
3. Ρύθμιση της Αρτηριακής Πίεσης.
4. Ρύθμιση της ηλεκτρολυτικής (Na^+ , K^+ , PO_4^{2-} , HCO_3^-) και ως -εκ τούτου- και της οξεοβασικής ισορροπίας του αίματος εντός στενών φυσιολογικών ορίων.
5. Απέκκριση των μεταβολικών προϊόντων (Ουρία, Ουρικό οξύ, Κρεατινίνη, προϊόντα καταβολισμού της Αιμοσφαιρίνης, μεταβολίτες διαφόρων φαρμάκων και ορμονών)
6. Παραγωγή ορμονών (π.χ. Ρενίνης, Ερυθροποιητίνης, Προσταγλανδινών)
7. Ενεργοποίησης της Βιταμίνης D₃ (συμμετοχή στον μεταβολισμό του Ασβεστίου).
8. Σε συνθήκες μεταβολικής ένδειας ασιτία παραγωγή γλυκόζης για τα κύτταρα μέσω Γλυκονεογένεσης.



Εικόνα 5: Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση των επιμέρους δομικών συστατικών στοιχείων ενός φυσιολογικού νεφρού ενήλικα. (α) Πρόσθια όψη, (β) Πρόσθια έσω όψη, (γ) Πρόσθια επιφάνεια με τους νεφρικούς κάλυκες και (δ) Πρόσθια όψη, μετά από στεφανιαία διατομή, κατά την οποία είναι διακριτές οι νεφρικές πυραμίδες. (Πηγή φωτογραφίας: <https://e-class.teilar.gr/modules/document/file.php/NO162/%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BC%CE%B9%CE%B1%20%CE%99%20%CE%BF%CF%85%CF%81%CE%BF%CF%80%CE%BF%CE%B9%CE%B7%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF.pdf>).

(β) Νεφρώνας: Η θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού.

Προχωρώντας τώρα στην ανάλυση των επιμέρους λειτουργιών ενός τυπικού νεφρώνα, κρίνεται απαραίτητο να δούμε πρώτα, πιο προσεκτικά τη δομή του (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Η δομή και η θέση ενός τυπικού νεφρώνα μέσα στον φυσιολογικό, υγιή νεφρό ενήλικα. (Πηγή φωτογραφίας: <https://biologydictionary.net/urinary-system/>).

Διαιρείται λοιπόν ο νεφρώνας, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε δύο τμήματα¹: το Αγγειώδες και το Σωληναριακό.

Έτσι, το Αγγειώδες Τμήμα του νεφρώνα αποτελείται από:

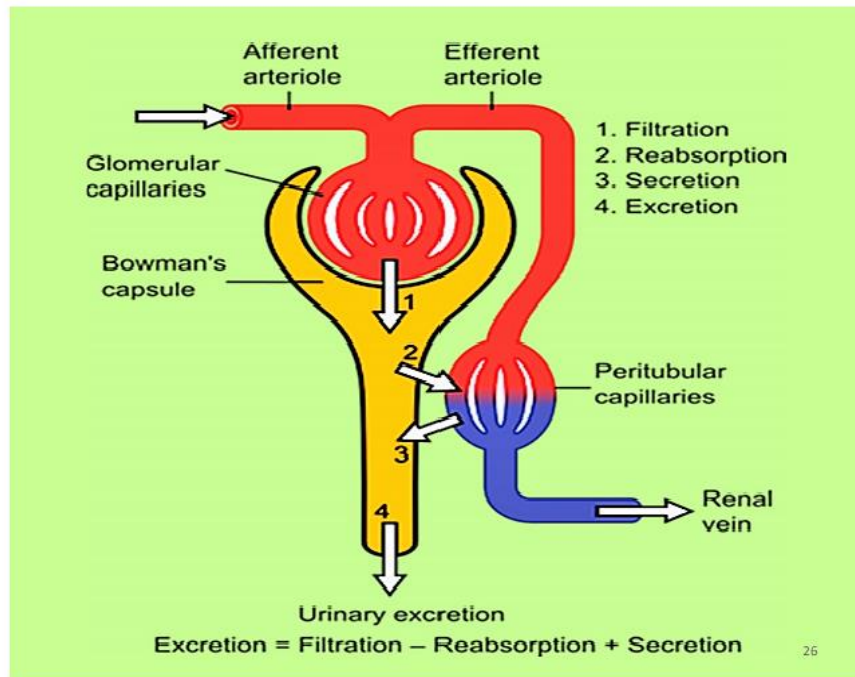
- το Προσαγωγό Αρτηρίδιο (Afferent Arteriole) (που μεταφέρει το αίμα μέσα στο σπείραμα),
- το Νεφρικό Σπείραμα (Glomerulus) (που αποτελείται από πολλά μικρά τριχοειδή στα οποία διηθούνται όλα τα συστατικά του πλάσματος εκτός από τις πρωτεΐνες),
- το Απαγωγό Αρτηρίδιο (Efferent Arteriole) (που απομακρύνει το διήθημα απ' το σπείραμα), και
- τα Περισωληναριακά Τριχοειδή (Peritubular Capillaries) (που τροφοδοτούν τον νεφρικό ιστό με τα απαραίτητα για τη λειτουργία τους θρεπτικά συστατικά, και εμπλέκονται στην ανταλλαγή ουσιών με το υγρό που βρίσκεται στον σωληναριακό αυλό).

Το **Σωληναριακό Τμήμα**, από την άλλη πλευρά, αποτελείται από:

- την Κάψα του Bowman (Bowman's Capsule) (που συλλέγει το σπειραματικό διήθημα),
- το Εγγύς Σωληνάριο (που αναλαμβάνει την μη ελεγχόμενη επαναρρόφηση και απέκκριση κάποιων συγκεκριμένων ουσιών),
- την Αγκύλη του Henle (Henle's Loop) (που δημιουργεί ωσμωτική διαβάθμιση στον νεφρικό μυελό, έτσι ώστε ο νεφρός να μπορεί να παράγει ούρα διαφορετικών συγκεντρώσεων, ανάλογα με την ωσμωμοριακότητα του πλάσματος και το ισοζύγιο ύδατος του οργανισμού), και
- το Άπω και το Αθροιστικό Σωληνάριο (που αναλαμβάνουν την ελεγχόμενη επαναρρόφηση Na^+ και νερού, αλλά και την απέκκριση K και H^+).

Υπάρχει, τέλος, και το Μεικτό Αγγειακό/Σωληναριακό τμήμα του νεφρώνα, με την Παρασπειραματική Συσκευή, η οποία παράγει ουσίες εμπλεκόμενες στον έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας.

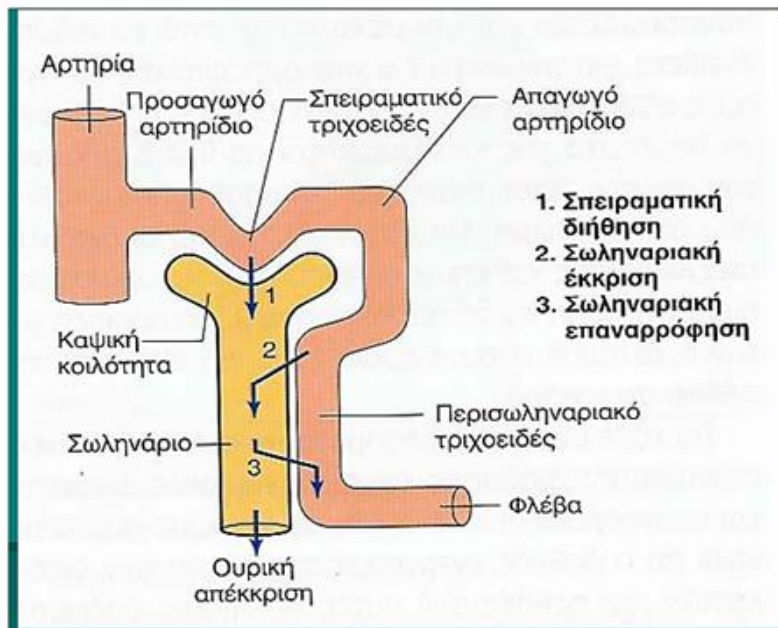
Η πορεία των υγρών μέσα στον νεφρώνα λοιπόν είναι η εξής: ξεκινάει από την Κάψα του Bowman, και από εκεί περνάει στο Ουροφόρο Σωληνάριο, στο Εγγύς Εσπειραμένο Σωληνάριο, στην Αγκύλη του Henle, στο Ανιόν, στο Άπω, και τελικά στο Αθροιστικό Σωληνάριο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός τυπικού νεφρώνα. Τα βέλη (1-4) δείχνουν την πορεία των υγρών μέσα στον νεφρώνα. (Πηγή φωτογραφίας: <https://eclass.teicrete.gr/modules/document/file.php/YD233/10.%20%CE%91%CE%9D%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%9C%CE%99%CE%91-%CE%99%CE%A3%CE%A4%CE%9F%CE%9B%CE%9F%CE%93%CE%99%CE%91%20%CE%91%CE%9D%CE%98%CE%A1.%2010-2017.pdf>).

(γ) Σπειραματική Διήθηση, Σωληναριακή Επαναρρόφηση και Σωληναριακή Έκκριση: οι τρεις σπουδαιότερες νεφρικές διεργασίες.

Εξετάζοντας αναλυτικότερα την ικανότητα των νεφρών να παράγουν ούρα, ξεχωρίζει κανείς τρεις θεμελιώδεις νεφρικές λειτουργίες: τη Σπειραματική Διήθηση, την Σωληναριακή Επαναρρόφηση και την Σωληναριακή Έκκριση. Οι λειτουργίες αυτές συνδέονται μεταξύ τους όπως φαίνεται αναλυτικά και σχηματικά στην Εικόνα 8: οποιαδήποτε ουσία διηθείται ή εκκρίνεται μέσω των ούρων και δεν επαναροφάται, καταλήγει να αποβάλλεται εντελώς από τον οργανισμό. Αντίθετα, οι ουσίες που δεν διηθούνται, ή διηθούνται και μετά επαναροφώνται, μπαίνουν στη Συστηματική Κυκλοφορία (φλεβικό σύστημα) κι έτσι παρακρατούνται μέσα στον οργανισμό¹.



Βασικά χαρακτηριστικά της νεφρικής λειτουργίας

- Η ουσία X διηθείται και εκκρίνεται (δεν επαναρροφάται)
- Η ουσία Y διηθείται και ένα ποσοστό της επαναρροφάται
- Η ουσία Z διηθείται και επαναρροφάται

Labels in the diagrams: Σπειραματικό τριχοειδές (Glomerular capillary), Ουσία X, Ουσία Y, Ουσία Z, Καψική κοιλότητα (Bowman's capsule), Ούρα (Urine).

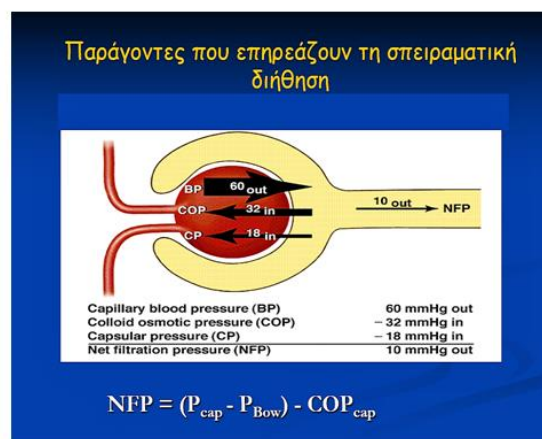
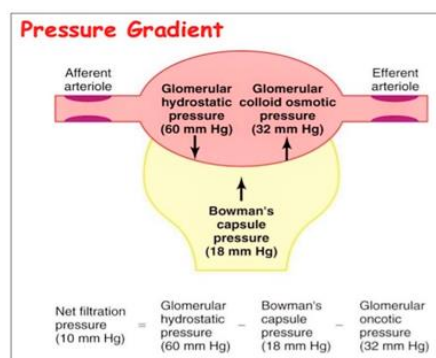
- $\text{Απεκκρινόμενη} = \text{διηθμένη} + \text{εκκρινόμενη} - \text{επαναρροφόμενη}$
- $\text{ποσότητα} \quad \text{ποσότητα} \quad \text{ποσότητα} \quad \text{ποσότητα}$

Εικόνα 8: Η Σπειραματική Διήθηση, Σωληναριακή Επαναρρόφηση και Σωληναριακή Έκκριση: γραφική απεικόνιση και οι μεταξύ τους σχέσεις στην παρακράτηση ή στη αποβολή μιας ουσίας από τον οργανισμό. (Πηγή φωτογραφιών: Vander, M.D., Sherman, Ph.D., Luciano, Ph.D., M. Τσακόπουλος, Φυσιολογία, 8-η έκδοση).

Ειδικότερα τώρα, η Σπειραματική Διήθηση είναι η διαδικασία διήθησης του πλάσματος (από το περιφερικό αίμα) μέσω των σπειραματικών τριχοειδών στην Κάψα του Bowman. Φυσιολογικά, διηθείται ένα ποσοστό περί του 20% από το πλάσμα που εισέρχεται στο σπείραμα. Το πλάσμα που διηθείται έχει την ίδια σύσταση με το πλάσμα του αίματος με τη διαφορά ότι δεν περιέχει πρωτεΐνες (αφού οι πρωτεΐνες του πλάσματος είναι δυνατόν να περάσουν τα τριχοειδή αγγεία του νεφρικού σπειράματος)¹. Η σπειραματική διήθηση αποτελεί το πρώτο βήμα για την παραγωγή των ούρων και ισχύει ότι κατά μέσο όρο σε φυσιολογικές συνθήκες τα

σπειράματα δύο υγιών νεφρών σχηματίζουν περί τα 125 ml διηθήματος ανά λεπτό (ρυθμός που αντιστοιχεί σε 180 ml διηθήματος ημερησίως).

Να αναφερθεί, στο σημείο αυτό, ότι η βασική κινητήρια δύναμη για την σπειραματική διήθηση είναι η πίεση που ασκείται στα σπειραματικά τριχοειδή. Η σπειραματική διήθηση είναι μια παθητική διαδικασία. Επειδή το σπείραμα είναι-στην πραγματικότητα- μια συνάθροιση τριχοειδών αγγείων, ισχύουν οι ίδιες Αρχές Υδροδυναμικής που ισχύουν και σε όλα τα υπόλοιπα τριχοειδή του σώματος, με δύο σημαντικές όμως διαφορές: πρώτον, τα σπειραματικά τριχοειδή είναι περισσότερο διαπερατά σε σχέση με τα υπόλοιπα κοινά τριχοειδή του οργανισμού, κι έτσι διηθούν μεγαλύτερες ποσότητες για συγκεκριμένη πίεση διήθησης, και δεύτερον, η ισορροπία των δυνάμεων στη σπειραματική μεμβράνη είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει τη σπειραματική διήθηση σε όλο το μήκος των τριχοειδών (σε αντίθεση με τα κοινά τριχοειδή του σώματος, που η ισορροπία των δυνάμεων αυτών αλλάζει κατά μήκος τους). Οι δυνάμεις αυτές που εμπλέκονται στη σπειραματική διήθηση είναι: (α) η Υδροστατική Πίεση, που ασκείται από το αίμα στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων, (β) η Κολλοειδοσμοτική Πίεση, που οφείλεται στην άνιση κατανομή των πρωτεϊνών του πλάσματος στις δύο πλευρές της μεμβράνης του σπειράματος και (γ) η Υδροστατική Πίεση στην Κάψα του Bowman, που ασκείται από το διήθημα στα τοιχώματα της Κάψας και τείνει να μετακινεί το υγρό έξω από την κάψα του Bowman, σε κατεύθυνση αντίθετη από την κατεύθυνση που φυσιολογικά έχει η σπειραματική διήθηση (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Η πειραματική διήθηση είναι το πρώτο βήμα για την παραγωγή των ούρων σε έναν τυπικό, υγιή νεφρόνα, και είναι η συνισταμένη της δράσης τριών διαφορετικών δυνάμεων: της Υδροστατικής Πίεσης, της Κολλοειδοσμωτικής Πίεσης, και της Υδροστατικής Πίεσης στην Κάψα του Bowman. (Πηγή φωτογραφιών: Πάνω: <https://i2.wp.com/imescholar.com/wp-content/uploads/2018/05/GFR-fig-1.jpg?ssl=1> και Κάτω: Δήμου Παναγιώτα, ΓΚΠ Νίκαιας, Διάλεξη πάνω στη Φυσιολογία του Νεφρού).

Προκύπτει έτσι η (σημαντικότερη για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας στην Ιατρική) έννοια του Ρυθμού Σπειραματικής Διήθησης (GFR=Glomerular Filtration Rate) ο οποίος εξαρτάται πρώτον, από τη Δραστική Πίεση Διήθησης (Net Filtration Pressure) που αντιπροσωπεύει την καθαρή διαφορά πίεσης που ευνοεί τη διήθηση (και αντιστοιχεί σε 10mmHg) και δεύτερον, από την έκταση της διαθέσιμης πειραματικής επιφάνειας και τη διαπερατότητα της πειραματικής μεμβράνης, παράγοντες που εκφράζονται μαζί με τη μορφή του Συντελεστή Διήθησης, Kf, οπότε και προκύπτει η σχέση: $GFR = Kf \times \text{Δραστική Πίεση Διήθησης}$ (Εικόνα 10). Από το σύνολο των πειραμάτων, παράγονται για τους άνδρες 180 λίτρα διηθήματος καθημερινά, με μέσο όρο GFR= 125 ml και για τις γυναίκες 160 λίτρα διηθήματος με μέσο όρο GFR= 115 ml

Ο συντελεστής διήθησης K_f εκφράζει τη διαπερατότητα και τη συνολική επιφάνεια της μεμβράνης
(12.5 ml/min/mm Hg)

$$GFR = K_f \cdot NFP$$

Η GFR κυμαίνεται στα 125 ml/min ή 180 lt/day.

Τα τριχοειδή του σπειράματος είναι αποτελεσματικότερα συγκριτικά με τα συστηματικά τριχοειδή γιατί:

1. Παρότι η μεμβράνη τους έχει σχετικά μικρή συνολική επιφάνεια, είναι πολύ πιο διαπερατή (μεγαλύτερος K_f)
2. Έχουν μεγαλύτερη υδροστατική πίεση
3. Έχουν μεγαλύτερη NFP

$$FF = GFR / RPF$$

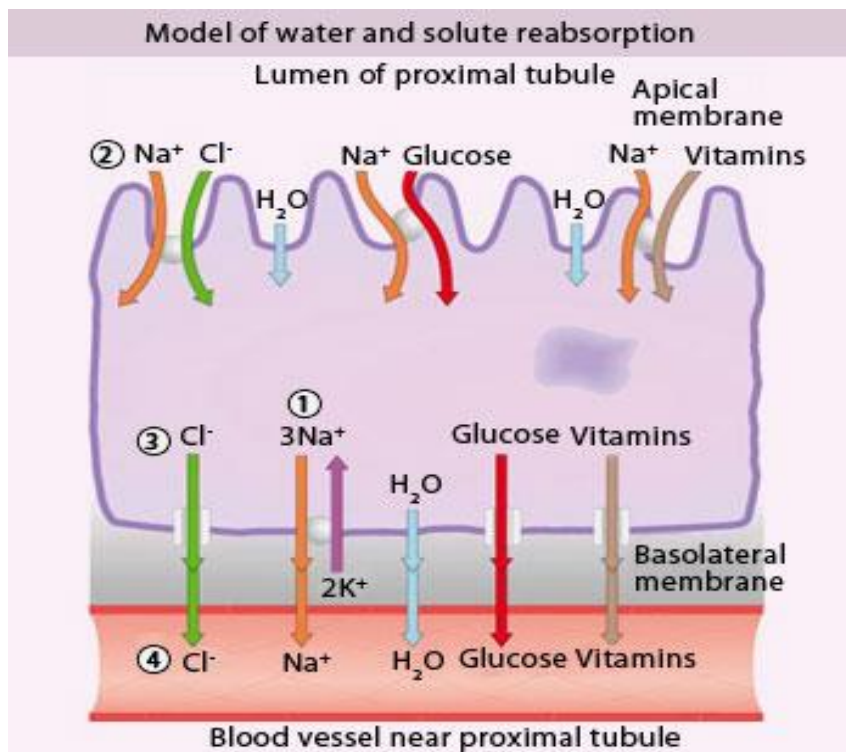
Το κλάσμα διήθησης FF κυμαίνεται στο 20 % της νεφρικής αιματικής ροής.

Εικόνα 10: Η σπειραματική διήθηση είναι το πρώτο βήμα για την παραγωγή των ούρων σε έναν τυπικό, υγιή νεφρό, και είναι η συνισταμένη της δράσης τριών διαφορετικών δυνάμεων: της Υδροστατικής Πίεσης, της Κολλοειδοσμοωτικής Πίεσης, και της Υδροστατικής Πίεσης στην Κάψα του Bowman. (Πηγή φωτογραφιών: Πάνω: <https://i2.wp.com/imedscholar.com/wp-content/uploads/2018/05/GFR-fig-1.jpg?ssl=1> και Κάτω: Δήμου Παναγιώτα, ΓΚΠ Νίκαιας, Διάλεξη πάνω στη Φυσιολογία του Νεφρού).

Στη συνέχεια, θα εξεταστεί με συντομία η έννοια της Σωληναριακής Επαναρρόφησης: είναι η διαδικασία επιλεκτικής πρόσληψης και μεταφοράς συγκεκριμένων απαραίτητων ουσιών από το υγρό των νεφρικών σωληναρίων πίσω στο αίμα. Η διαδικασία αφορά κυρίως ηλεκτρολύτες και σημαντικά θρεπτικά συστατικά που ο οργανισμός χρειάζεται και επομένως δεν είναι πρώτη του προτεραιότητα να τις αποβάλλει με τα ούρα. Η Σωληναριακή Επαναρρόφηση ακολουθεί πολύ εξειδικευμένους μηχανισμούς που μάλιστα παρουσιάζουν και υψηλή μεταβλητότητα-ανάλογα με τις εκάστοτε μεταβολικές συνθήκες στις οποίες βρίσκεται ο οργανισμός, και τις ανάγκες που πρέπει να καλύψει προκειμένου να διατηρήσει την ομοιόσταση του.

Γενικά, τα νεφρικά σωληνάκια έχουν μεγάλη επαναροφητική ικανότητα για τις ουσίες που είναι χρήσιμες και αναγκαίες για το σώμα (γλυκόζη, αμινοξέα, νερό, NaCl) και καθόλου επαναροφητική ικανότητα για τις άχρηστες και τις τοξικές ουσίες (π.χ. ουρία, φαινόλες και άλλα). Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι από τα 125ml υγρού που διηθούνται ανά λεπτό, τυπικά τα 124ml επαναροφώνται¹: η επαναρρόφηση αφορά το 99% του νερού, το 100% της γλυκόζης (πλην των

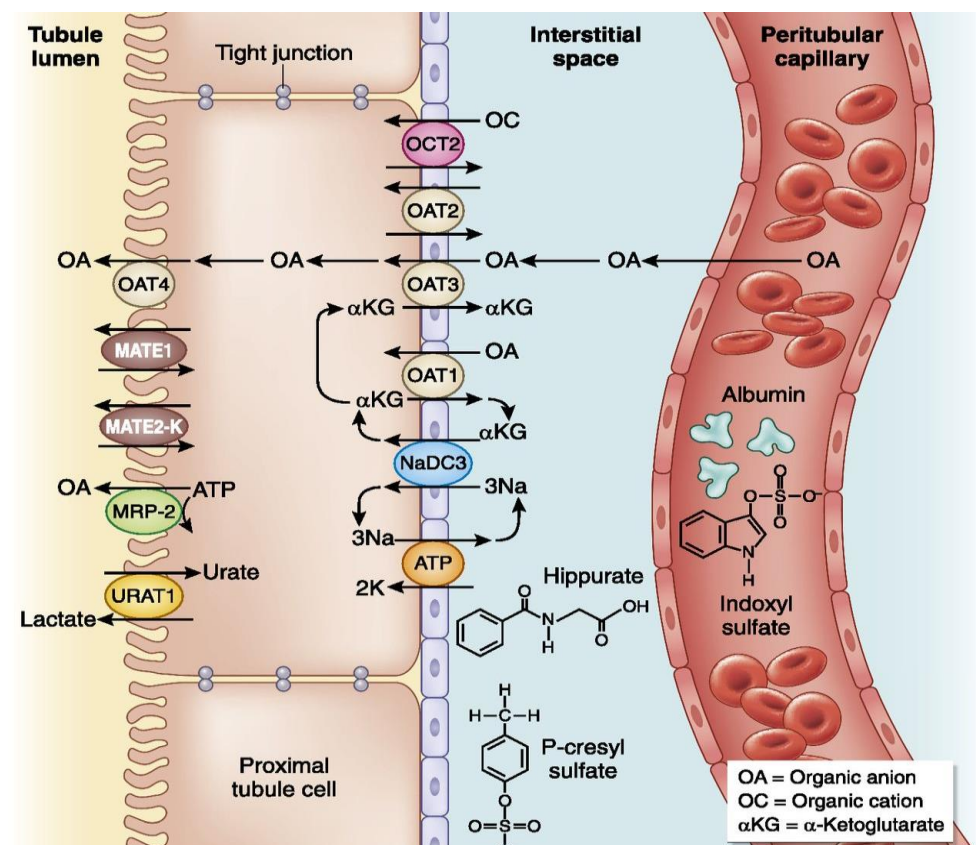
περιπτώσεων στον αρρυθμιστου σακχαρώδους διαβήτη), και το 99,5% του NaCl. (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μία πολύ απλή, αδρή απεικόνιση του μοντέλου της επαναρρόφησης συγκεκριμένων μορίων και ηλεκτρολυτών από τους νεφρούς. Η επαναρρόφηση αυτή παρουσιάζει εκλεκτικότητα, τόσο ανάλογα με το ποιες ουσίες μπορούν να επαναρροφηθούν, όσο και με το ποιες μεταβολικές συνθήκες ευνοούν αυτή την επαναρρόφηση. Να τονιστεί εδώ ότι κάθε είδος μορίου/ηλεκτρολύτη επαναρροφάται με διαφορετικούς μοριακούς διαμεσολαβητές, με διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς και κάτω από διαφορετικές χημικές και ιοντικές συνθήκες. (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.simply.science/kidneys>).

Γενικά, ισχύει ότι για την επαναρρόφηση του Νατρίου (Na^+) σημαντικό ρόλο παίζει η αντλία Na^+-K^+ ($\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPάση}$) της πλαγιοβασικής μεμβράνης των σωληναριακών κυττάρων, η ενεργοποίηση του Συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης, αλλά και η δράση των Νατριουρητικών Πεπτιδίων, ANP και BNP (τα τελευταία δρουν ανασταλτικά).

Η τρίτη και σημαντική παράμετρος της νεφρικής λειτουργίας είναι η Σωληναριακή Έκκριση, δηλαδή η εκλεκτική μετακίνηση ουσιών από τα περισωληναριακά τριχοειδή στον σωληναριακό αυλό. Γενικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ισχύει ότι οποιαδήποτε ουσία περνάει στο σωληναριακό υγρό (είτε μέσω σπειραματικής διήθησης, είτε μέσω σωληναριακής έκκρισης) και δεν επαναρροφάται, καταλήγει να αποβληθεί από το σώμα μέσω των ούρων. Οι σπουδαιότερες ουσίες που εκκρίνονται από τα νεφρικά σωληνάκια είναι τα υδρογονοκατιόντα (H^+), τα ιόντα Καλίου (K^+), καθώς και διάφορα οργανικά ανιόντα και κατιόντα τα οποία δεν απαρτίζουν φυσιολογικά συστατικά του ανθρώπινου σώματος (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Η Σωληναριακή Έκκριση αφορά πολλά διαφορετικά μόρια και ουσίες και γίνεται με κατεύθυνση από τα περισωληναριακά τριχοειδή προς στον σωληναριακό αυλό. Συμβολισμοί εικόνας: OA, organic anion; OC, organic cation; K, potassium; αKG, α-ketoglutarate; Na, sodium; NaDC3, renal sodium-dependent dicarboxylate transporter. (Πηγή φωτογραφίας: <https://cjasn.asnjournals.org/content/13/8/1291>).

Ετσι λοιπόν, η σωληναριακή έκκριση των υδρογονοκατιόντων (H^+) είναι διαδικασία πολύ σημαντική για τη διατήρηση του pH του αίματος σε φυσιολογικά όρια, επομένως και για τη διατήρηση της ζωής. Ιόντα Υδρογόνου μπορούν να εκκριθούν από πολλά σημεία του νεφρώνα όπως είναι το Εγγύς, το Άπω και το Αθροιστικό Σωληνάριο, και ο ρυθμός έκκρισής τους αυξάνεται -γενικά- όταν η συγκέντρωσή τους στα σωματικά υγρά και στο αίμα είναι πολύ υψηλή (χαμηλό pH).

Η σωληναριακή έκκριση των ιόντων Καλίου (K^+) εξαρτάται από ορμονικό έλεγχο, την Άλδοστερόνη. Επειδή μόνο μία σχετικά μικρή ποσότητα Καλίου βρίσκεται στο εξωκυττάριο υγρό, μικρές αλλαγές στο φορτίο του μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση Καλίου στο πλάσμα του αίματος, επηρεάζοντας αντίστοιχα και τη διεγερσιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Αλλαγές σ' αυτή τη διεγερσιμότητα μπορεί να είναι πολύ σοβαρές γιατί επενεργούν στη λειτουργία των νευρικών, των μυϊκών και (το σπουδαιότερο) των καρδιακών μυϊκών κυττάρων. Ο έλεγχος λοιπόν θα πρέπει να είναι αυστηρός. Η έκκρισή του Καλίου από τα κύτταρα του Άπω και του Αθροιστικού Σωληναρίου είναι συζευγμένη με την επαναρρόφηση του Νατρίου από την αντλία Na^+-K^+ ($Na^+-K^+-ATPάση$) της πλαγιοβασικής μεμβράνης.

Τέλος, η σωληναριακή έκκριση διαφόρων οργανικών ανιόντων και κατιόντων που δεν αποτελούν φυσιολογικά συστατικά του ανθρώπινου σώματος γίνεται με δύο τρόπους στο Εγγύς Σωληνάριο: ο ένας τρόπος αφορά την έκκριση των ανιόντων και ο άλλος των κατιόντων. Γενικά, ισχύει ότι το εκκριτικό σύστημα αυτών των οργανικών ιόντων επιτελεί τρεις σημαντικές λειτουργίες: πρώτον, προσθέτοντας επιπλέον ποσά των διαφόρων τύπων οργανικών ιόντων στα ήδη υπάρχοντα διευκολύνεται η απέκκρισή τους μέσω της σπειραματικής διήθησης, δεύτερον τα ιόντα που είναι αδιάλυτα (ή ελάχιστα διαλυτά) στο νερό για να μετακινηθούν στο αίμα προσδένονται πάνω σε πρωτεΐνες του πλάσματος με αντιστρεπτό τρόπο, και τρίτον ο σπουδαιότερος ρόλος της σωληναριακής έκκρισης των οργανικών ιόντων είναι η επίσπευση της απομάκρυνσης πολλών εξωγενών ουσιών από τον οργανισμό (παρασιτοκτόνων, φαρμάκων κτλ).

Νεφρική βλάβη λόγω ισχαιμίας / επαναιμάτωσης

Η νεφρική βλάβη λόγω ισχαιμίας και επαναιμάτωσης (IRI: Ischemia Reperfusion Injury) είναι ένας μηχανισμός πρόκλησης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ONA), ο οποίος στην κλινική πράξη συναντάται πολύ τακτικά.

Ο μηχανισμός αυτός αφορά βλάβες του νεφρικού παρεγχύματος που προκαλούνται από υποξία, η οποία με τη σειρά της προκαλείται από ελλιπή αιματική ροή στον νεφρικό ιστό. Νεφρική υποξία μπορεί να εμφανιστεί σε ποικίλες κλινικές καταστάσεις όπου υπάρχει είτε μείωση της αιματικής παροχής στο νεφρό όπως η υποογκαιμία (μαζική αιμορραγία, αφυδάτωση) και το σοκ (σηπτικό, καρδιαγγειακό) είτε πλήρη διακοπή της νεφρικής αιμάτωσης όπως σε μια σειρά χειρουργικών επεμβάσεων που απαιτούν την πλήρη παύση της αιματικής κυκλοφορίας στις νεφρικές αρτηρίες (μεταμοσχεύσεις, νεφρεκτομή, ανευρύσματα κοιλιακής αορτής κ.α.). Η νεφρική ισχαιμία προκαλεί βλάβες τόσο στο νεφρικό παρέγχυμα όσο και

στα νεφρικά αγγεία οι οποίες συνοδεύονται από οξεία φλεγμονώδη αντίδραση η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε νέα κυτταρική καταστροφή.

Κατά την επαναιμάτωση ο ιστός συνεχίζει να υφίσταται αλλοιώσεις πέραν από αυτές που προκλήθηκαν από την ισχαιμία που προηγήθηκε. Η συνέπεια των αλλοιώσεων αυτών είναι η επαγωγή απόπτωσης και κυτταρικής νέκρωσης σε νεφρικά κύτταρα. Η έκταση της προκαλούμενης νεφρικής καταστροφής καθορίζει και τον βαθμό της καταστροφής της νεφρικής λειτουργίας και άρα το βαθμό της νεφρικής ανεπάρκειας.

Παρά το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης της νεφρικής βλάβης δεν έχει απολύτως διαλευκανθεί, μέσα στις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάστηκαν πολλές μελέτες που έριξαν φως σε κάποια από τα εμπλεκόμενα παθοφυσιολογικά μονοπάτια

Τρεις θεωρείται ότι είναι οι βασικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται. Ο πρώτος αφορά την αντίδραση του αγγειακού σκέλους του νεφρού στην ισχαιμία και περιέχει την παρατεταμένη αγγειοσύσπαση και την απορρυθμισμένη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Ο δεύτερος μηχανισμός εμπλέκει τα κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα που φράσσουν τα νεφρικά σωληνάρια και προκαλούν ανάδρομη ροή του διηθήματος από τα σωληνάρια πίσω στην αιματική κυκλοφορία. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά την βλάβη που προκαλείται όταν αποκαθίσταται η αιματική ροή και το οξυγόνο στο νεφρικό παρέγχυμα κατά την επαναιμάτωση

Κροκετίνη: Χημική δομή και ιδιότητες.

(α) Κροκετίνη: Προέλευση και Χημική Δομή

Η Κροκετίνη (Crocetin) είναι ένα αποκαροτενοειδές δικαρβοξυλικό οξύ, που προέρχεται από το φυτό Κρόκος ο ήμερος (*Crocus sativus* L.), καθώς και από το φυτό Γαρδένια η ιασμινοειδής (*Gardenia jasminoides*) (Εικόνα 13). Έχει επίσης αναφερθεί παραγωγή Κροκετίνης³ και από τα taxa *Buddleja*, *Jacquinia angustifolia* και *Coleus forskolii*.



Εικόνα 13: Τα δύο φυτικά είδη από τα οποία παράγεται η Κροκετίνη. Πάνω, το φυτό Κρόκος ο ήμερος (*Crocus sativus* L.). (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.thespruce.com/planting-and-caring-for-crocus-1402246>). Κάτω, το φυτό Γαρδένια η ιασμινοειδής (*Gardenia jasminoides*). (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.gardenia.net/plant/Gardenia-jasminoides>).

Το φυτό Κρόκος ο ήμερος (Crocus sativus L.) ένα από τα σπάνια φαρμακευτικά, αρτυματικά και με μεγάλη χρωστική ικανότητα φυτά, που απαντάται στη χώρα μας, αλλά και σε λίγες άλλες χώρες του κόσμου (Ινδία, Ιράν, Κίνα, Ισπανία, κτλ). Το γένος του φυτού *Crocus* εξαπλώνεται στην περιοχή από την Πορτογαλία και το Μαρόκο μέχρι και τη Δυτική Κίνα, και περιλαμβάνει περίπου 80 διαφορετικά είδη, τα περισσότερα από τα οποία συναντώνται στη βαλκανική χερσόνησο και στην Τουρκία.

Το φυτό ανήκει στην οικογένεια των Ιριδοειδών (*Iridaceae*) και είναι φυτό μονοκοτυλήδοιο και τριπλοειδές, γεγονός που σημαίνει πως δεν μπορεί να αναπαραχθεί εγγενώς (με σπόρους), αλλά μόνο μέσω της διάσπασης και της σποράς των βολβών του. Πιθανότατα, αυτός ο ιδιαίτερος τρόπος αναπαραγωγής του -αλλά και οι ακραίες κλιματολογικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται (ξηρό και θερμό κλίμα το καλοκαίρι, και κρύο το χειμώνα), μαζί με την ελάχιστη ποσότητα ενεργού, βιοδιαθέσιμου κρόκου που παράγει κάθε φυτό- να είναι ένας τα βασικά αίτια για τα οποία το φυτό αυτό θεωρείται σήμερα ότι παράγει ένα από τα ακριβότερα μπαχαρικά του κόσμου. Το έδαφος πάνω στο οποίο θα καλλιεργηθεί το φυτό θα πρέπει επίσης να πληροί ορισμένες προδιαγραφές: να είναι ξηρό, ασβεστώδες, επίπεδο, χωρίς πολλά δένδρα τριγύρω και καλά στραγγιζόμενο έτσι ώστε να μειώνεται η πιθανότητα να προσβληθούν οι ρίζες του από μύκητες με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους (σήψη). Η σπορά του γίνεται φυσιολογικά τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο, και η συγκομιδή του στα τέλη Οκτωβρίου με αρχές Νοεμβρίου.

Η δρόγη του φυτού² (δηλαδή το μόνο μέρος του με θεραπευτική δράση) είναι το υπέργειο μέρος του στύλου του άνθους, το οποίο διαχωρίζεται αμέσως μετά από τη συγκομιδή, ξηραίνεται και φυλάσσεται σε ειδικές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτεινότητας. Ενδεικτικά, έχει υπολογισθεί ότι απαιτούνται περί τα 85.000 άνθη για να συγκομισθεί ένα κιλό από φρέσκα στίγματα κρόκου, και έχει βρεθεί ότι οι δρόγες της ξηράς -κατά την αποξήρανσή τους-, χάνουν το 75-85% του βάρους τους, ενώ της θάλασσας χάνουν μέχρι και το 90%. Ακολουθεί η σταθεροποίηση (απενεργοποίηση των ενζύμων της δρόγης), η παραλαβή των δραστικών συστατικών (π.χ. με εκχύλιση ή απόσταξη), και τέλος η απομόνωση και ο καθαρισμός των ουσιών που μας ενδιαφέρουν (στην προκειμένη περίπτωση, της Κροκετίνης).

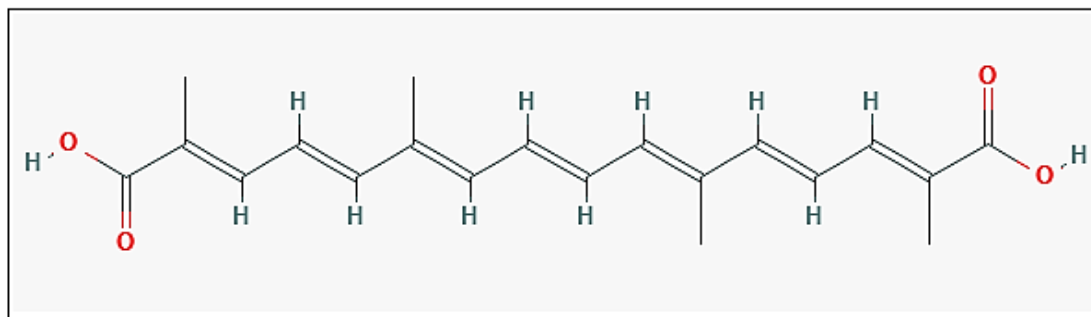
Επειδή τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονος προβληματισμός για τη νοθεία των προϊόντων του, είναι σημαντικό να μπορεί κανείς να προσδιορίσει με σχετική ασφάλεια τα διαφορετικά είδη του φυτού. Έτσι, μερικά σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που μας επιτρέπουν να το ταυτοποιήσουμε είναι η ύπαρξη τριών πεπλατυσμένων στιγμάτων (ακέραιων, οδοντωτών, δισχιδών ή πολυσχιδών), η εαρινή ή φθινοπωρινή περίοδος άνθισης, ο χρόνος εμφάνισης των φύλλων (πριν, συγχρόνως ή μετά από την εμφάνιση του άνθους), καθώς επίσης και ένα πλήθος από άλλα ιδιαίτερα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ των οποίων είναι: η

υφή των βολβών, το μήκος και η ποσότητα των στιγμάτων, το περιεχόμενο υγρασίας στους 40°C και 103°C καθώς και το ποσοστό των πτητικών συστατικών τους².

Το δεύτερο φυτό από το οποίο μπορεί κανείς να παραλάβει την Κροκετίνη είναι-όπως αναφέρθηκε και παραπάνω- η Γαρδένια η ιασιμνοειδής ή κοινή γαρδένια (*Gardenia jasminoides*). Πρόκειται για ένα αιθαλής, δικοτυλήδοно φυτό της οικογένειας των Ερυθροδανοειδών (*Rubiaceae*) που προέρχεται από χώρες της Αφρικής και της Ασίας. Θεωρείται καλλωπιστικός κυρίως θάμνος, με ύψος έως 1.5 m., πλούσια, στρογγυλά ή λογχοειδή λαμπερά πράσινα φύλλα και μεγάλα διπλά, λευκά άνθη με απαλό άρωμα. Η περίοδος ανθοφορίας της είναι το χρονικό διάστημα Ιούνιος-Αύγουστος και η αναπαραγωγή της γίνεται με ειδικά φυλλώδη μοσχεύματα που έχουν τέσσερα φύλλα και προκύπτουν από σκληραγωγημένες γαρδένιες (που λέγονται *μάνες*). Για να ευδοκιμήσει, απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες τη μέρα και χαμηλές τη νύχτα, καθώς επίσης και απάνεμα μέρη, αλλά καλό είναι να αποφεύγεται η απευθείας επαφή με το ηλιακό φως και το πότισμα με πολύ σκληρό νερό (γιατί προκαλεί χλώρωση του φυτού). Τέλος, το έδαφος που θα φυτευτεί η κοινή γαρδένια είναι σημαντικό να είναι όξινο (με βέλτιστη περιοχή pH=5 μέχρι 6,5).

Σχετικά τώρα με την Κροκετίνη (αλλιώς και 8,8' διαποκαροτενιο8,8'- διοικό οξύ (*diapocarotene-8,8'-dioic acid*), με μοριακό τύπο $C_{20}H_{24}O_4$, έχει βρεθεί ότι τα σπουδαιότερα συστατικά των στύλων του *C. sativus* είναι οι *cis*- και *trans*-κροκίνες οι οποίες είναι γλυκοζιτικοί εστέρες της Κροκετίνης³.

Η Κροκετίνη -ως μόριο- αποτελείται από 20 άτομα Άνθρακα, και στις θέσεις C-2, C-6, C-11 και C-15 υπάρχουν διακλαδώσεις με μεθυλομάδες ($-CH_3$). Ανάλογα με την στερεοδιάταξη στη θέση C-6, απαντάται σε *cis*- ή σε *trans*- διάταξη ενώ η εστεροποίηση της γίνεται με μονάδες β-D-γλυκόζης και β-D-γεντιοβιόζης. (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Απεικόνιση της χημικής δομής του μορίου της Κροκετίνης (αλλιώς και 8,8' διαποκαροτενιο8,8'- διοικού οξέος). Το μόριο αποτελείται από 20 άτομα Άνθρακα, στις θέσεις C-2, C-6, C-11 και C-15 υπάρχουν διακλαδώσεις με μεθυλομάδες ($-CH_3$). (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461363/>).

Η επικρατέστερη ποσοτικά Κροκίνη είναι η *trans*-κροκίνη-4, που αποτελεί τον διγεντιοβιοζυλεστέρα της Κροκετίνης³.

Να αναφερθεί, τέλος, ότι η Κροκετίνη ανήκει³ στα Αποκαροτεοειδή, που είναι μια σημαντική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών των Καροτενοειδών και τους συναντά

κανείς στους καρπούς και σε άλλα μέρη των φυτών, ως γλυκοζίτες. Τα Αποκαροτενοειδή του σαφράν (Κροκίνη, Κροκετίνη και Πικροκροκίνη) σχηματίζονται από την αποικοδόμηση της Ζεαξανθίνης, και μάλιστα πρόσφατα απομονώθηκαν και δύο ιδιαίτερα ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό αυτό: η διοξυγενάση κατάτμισης της ζεαξανθίνης του *Crocus* στις θέσεις 7,8(7',8') (crocus zeaxanthin 7,8(7',8')-cleavage dioxygenase, CsZCD), και η UDP-γλυκοζυλοτρανσφεράση (glucosyl transferase from *Crocus sativus* 2, UGTCs2).

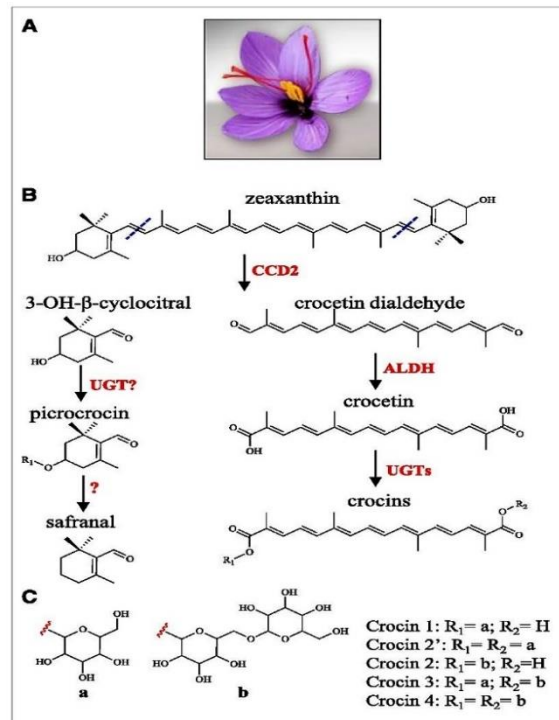
(β) Κροκετίνη: Βιοσύνθεση και Ιδιότητες

Η σπανιότητα του προϊόντος της δρόγης των φυτών Κρόκος ο ήμερος (*Crocus sativus* L.) και Γαρδένια η ιασμινοειδής (*Gardenia jasminoides*), αλλά και το σύνολο των ευεργετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει η Κροκετίνη και οι συγγενείς με αυτή ουσίες για τον ανθρώπινο οργανισμό οδήγησαν πολλούς ερευνητές στο να προσπαθήσουν να βρουν τρόπους για να παράξουν τις ουσίες αυτές, στις ελεγχόμενες συνθήκες ενός εργαστηρίου (in vitro). Σχετικά με τη σπανιότητα του σαφράν, να αναφερθεί ενδεικτικά⁴ ότι για ένα gr σαφράν απαιτούνται περί τα 150 άνθη Κρόκου, και πως το σαφράν σήμερα θεωρείται το ακριβότερο καρύκευμα ή μπαχαρικό (HEPB OR SPICE)

στον κόσμο με τιμή που κυμαίνεται στο εύρος: 2 έως 10 euros ανά gr στην ελεύθερη αγορά.

Υπάρχει λοιπόν πολλή -σύγχρονη κυρίως- βιβλιογραφία που μιλά για υποψήφια ένζυμα βιοσύνθεσης της Κροκετίνης και των συγγενών με αυτήν ουσιών. Οι προσπάθειες αυτές των μελετητών οδήγησαν στο να διευκρινιστούν τα βιοχημικά μονοπάτια που οδηγούν στη βιοσύνθεση της Κροκετίνης μέσα στους φυτικούς ιστούς, θέμα το οποίο κρίνεται αναγκαίο να αναλυθεί παρακάτω.

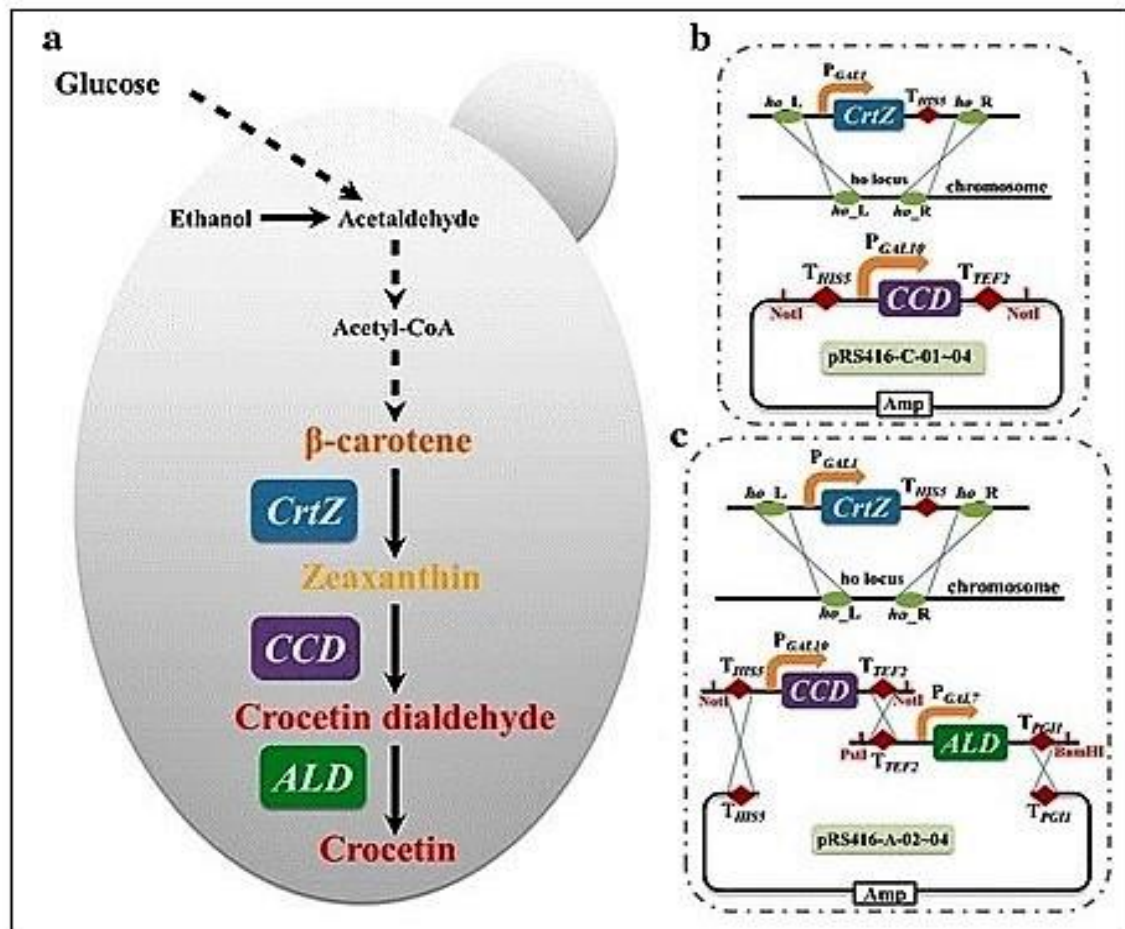
Ένα από τα επικρατέστερα βιοσυνθετικά μοντέλα⁴ περιγράφεται στην Εικόνα 15. Ειδικότερα, μέσα στους στύλους του άνθους του φυτού Κρόκος, ξεκινάει η βιοσύνθεση της Κροκίνης (πρόδρομης ουσίας της Κροκετίνης) με το συμμετρικό, οξειδωτικό κόψιμο των διπλών δεσμών των ανθράκων C7,C8 και C7',C8' πάνω στο μόριο της Ζεαξανθίνης: η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο Cleavage Dioxygenase 2 (CsCCD2) και το κύριο παράγωγο προϊόν είναι η Διαλδεϋδη της Κροκετίνης. Το προϊόν αυτό-όπως και πολλές άλλες αλδεϋδες- είναι υψηλά ασταθές σε εργαστηριακές συνθήκες με αποτέλεσμα να μετατρέπεται τάχιστα σε Διοξική Κροκετίνη, από μία ομάδα ενζύμων που δεν είναι ακόμα πλήρως καθορισμένα και ονομάζονται ένζυμα ALDH (Aldehyde Dehydrogenases). Τα ένζυμα αυτά -χημικά- έχουν συμπεριφορά NAD(P)⁺-εξαρτώμενης οξειδορεντουκτάσης έχει βρεθεί βιβλιογραφικά πως συμμετέχουν σε ένα πλήθος διεργασιών των φυτών, όπως είναι η υποστήριξη της άμυνας και η απάντηση στο αβιοτικό stress που μπορεί να καταπονεί το φυτό σε κάθε χρονική περίοδο, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν εκεί που είναι φυτεμένο. Το τελικό βήμα αυτής της βιοσυνθετικής πορείας θεωρείται πως είναι η γλυκοζυλίωση της Κροκετίνης, ένα βήμα που καταλύεται από Ουριδινο-διφωσφορικές Γλυκοζυλτρανσφεράσες (UGTs). Από 'και πέρα, έχουν γίνει κάποιες περαιτέρω έρευνες για τον προσδιορισμό αυτών των Ουριδινο-διφωσφορικών Γλυκοζυλτρανσφερασών (UGTs), και έχουν ταυτοποιηθεί σήμερα δύο που υπάρχουν στη Γαρδένια: η UGT75L6 (που είναι υπεύθυνη για την πρωτογενή γλυκοζυλίωση της Κροκετίνης, προς παραγωγή Μονογλυκοζυλικής Κροκετίνης και Διγλυκοζυλικών Εστέρων) και η UGT94E5 (που είναι υπεύθυνη για τη δευτερογενή γλυκοζυλίωση των ομάδων Glc, προς σχηματισμό ενός ή δύο ομάδων Γεντιοβιόζης).



Εικόνα 15: Ένα από τα επικρατέστερα μοντέλα της σύγχρονης βιβλιογραφίας που περιγράφει σε βήματα τη βιοσυνθετική πορεία της Κροκετίνης, μέσα στους φυτικούς ιστούς του Κρόκου. Με κόκκινο χρώμα, σημαίνονται τα ένζυμα των αντιδράσεων. (Πηγή φωτογραφίας: Olivia Costantina Demurtas et al, May 2018, Plant Physiology, Candidate Enzymes for Saffron Crocin Biosynthesis Are Localized in Multiple Cellular Compartments).

Γονιδιακές μελέτες που συνεχίζονται να γίνονται ακόμα και σήμερα, έδειξαν πως για καθένα από τα βήματα της παραπάνω βιοσυνθετικής πορείας μπορεί να εμπλέκονται περισσότερα του ενός γονίδια του φυτού: παραδείγματος χάριν, για την παραγωγή των ενζύμων ALDH, έχει διαπιστωθεί πως συμμετέχουν έξι διαφορετικά γονίδια⁴.

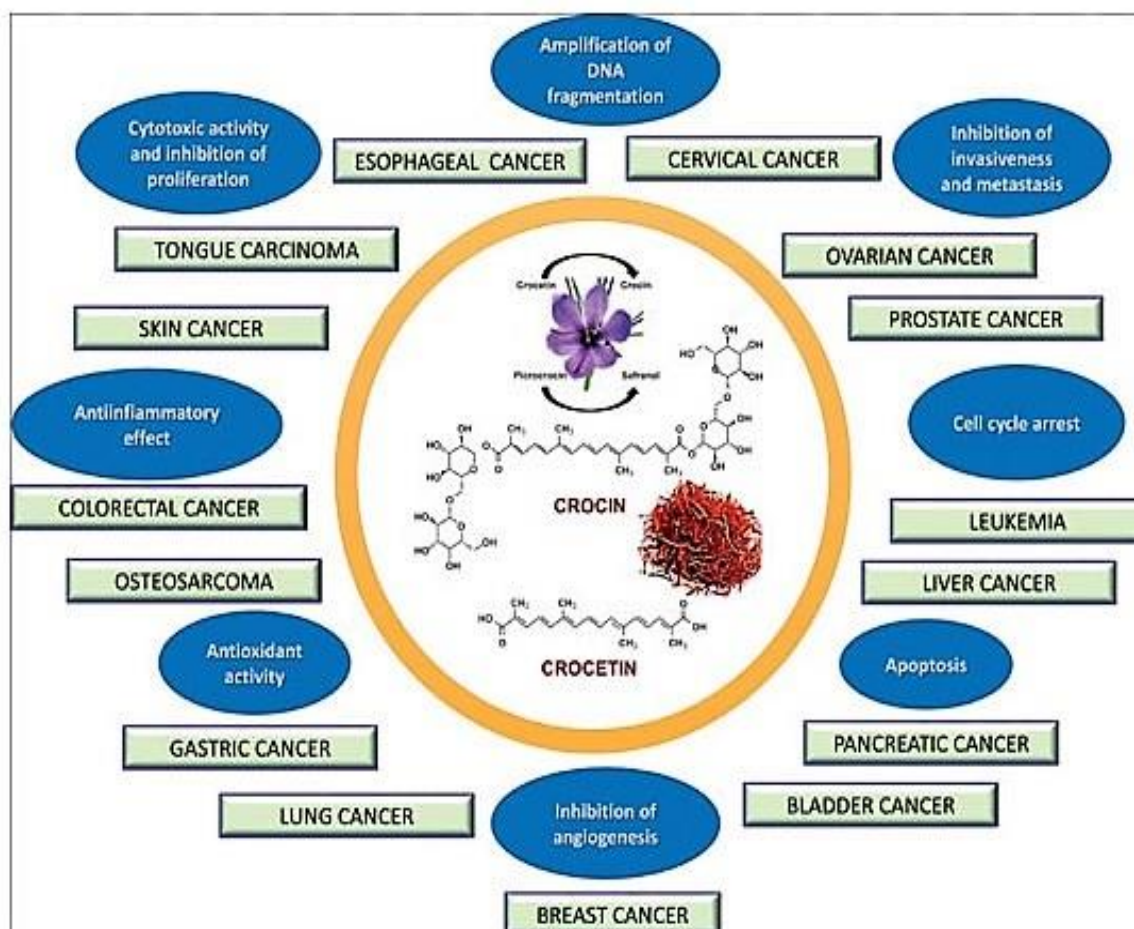
Οι μελέτες αυτές γίνονται με εξειδικευμένα τεχνικά και τεχνολογικά μέσα της Γονιδιωματικής και της Γενετικής Μηχανικής και είναι δυνατόν να φέρουν στο φως πολλές άλλες λεπτομέρειες αυτής τη βιοσυνθετικής πορείας στο μέλλον, λεπτομέρειες που σήμερα αγνοούμε. Για παράδειγμα, η Εικόνα 16 περιγράφει με περισσότερη λεπτομέρεια τα παραπάνω βήματα⁵, σε ένα συχνά χρησιμοποιούμενο βέκτορα, τον *S. cerevisiae*. Να αναφερθεί εδώ, πως -πλην της Γαρδένιας και του Κρόκου- προσπάθειες απομόνωσης ειδικά των γονιδίων ALDH έχουν γίνει⁵ και από τα φυτά *Bixa orellana* και *Synechocystis sp.*



Εικόνα 16: (a) Μία ενδεικτική, λεπτομερέστερη γραφική απεικόνιση της βιοσυνθετικής πορείας της Κροκετίνης μέσα στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. (b) και (c): δύο προτεινόμενες διαφορετικές τοποθέτησης των αντίστοιχων γονιδίων επάνω στον βέκτορα, για την παραγωγή Κροκετίνης *in vitro*. (Πηγή φωτογραφίας: Fenghua Chai et al, Microb Cell Fact. Mar 2017, Heterologous biosynthesis and manipulation of crocetin in *Saccharomyces cerevisiae*.)

Σε ό,τι αφορά τώρα, τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της Κροκετίνης, να αναφερθεί κατ' αρχάς πως πρόκειται για ένα μόριο με Μοριακό Βάρος 328.4 gr/mol, Σημείο Τήξης περί τους 286 °C και Σημείο Βρασμού περί τους 585 °C. Θεωρείται σήμερα ως μία κατεξοχήν αντιοξειδωτική ουσία που αντιστρέφει τη λειτουργία των Περοξινών και των Διοξυγενασών. Είναι επίσης σημαντικός δευτερογενής διαμεσολαβητής σε διάφορες αντιδράσεις του φυτικού μεταβολισμού.

Στον ιατρικό χώρο, υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες ενδείκνυται η χορήγηση του σαφράν, μερικές από τις οποίες είναι ενδεικτικά: οι οξείες αναπνευστικές δυσχέρειες, η αμηνόρροια, οι αγγώδεις διαταραχές, οι κράμπες, η υπερχοληστερολαιμία, διάφορα οφθαλμολογικά προβλήματα, οι διαταραχές μνήμης και διάφοροι εγκεφαλικοί τραυματισμοί, διάφοροι τύποι καρκίνου⁷, οι πεπτικές διαταραχές, διάφορες αγγειολογικές διαταραχές⁶ (αθηροσκλήρυνση, μυοκαρδιακή ισχαιμία) αλλά και το αιμορραγικό σοκ⁶. Η Εικόνα 17 δίνει μία ωραία, συνοπτική αναπαράσταση μερικών από τις σπουδαιότερες ευεργετικές για τον ανθρώπινο οργανισμό ιδιότητες της Κροκετίνης (αντικαρκινική δράση).



Εικόνα 17: Η αντικαρκινική δράση της Κροκετίνης. (Πηγή φωτογραφίας: Alessandro Colapietro et al, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2019, Crocetin and Crocin from Saffron in Cancer Chemotherapy and Chemoprevention).

III. Κροκετίνη και καρδιαγγειακή-νεφρική λειτουργία, μία αδρή ανασκόπηση.

Υπάρχει αρκετή σύγχρονη κυρίως βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση που έχει η Κροκετίνη στη λειτουργία των νεφρών, και ειδικότερα στην αναστολή των αιμορραγικών καταστάσεων και τη ρύθμιση του ενδοαγγειακού όγκου.

Φαρμακοκινητικές μελέτες έχουν δείξει⁶ ότι η Κροκίνη εμφανίζει μεγάλη δυσκολία απορρόφησης, τόσο στα πειραματόζωα όσο και σε υγιείς εθελοντές. Αντίθετα, η Κροκετίνη απορροφάται και κατανέμεται τάχιστα στους βιολογικούς ιστούς ζώων και ανθρώπου, δίνοντας γρήγορα στο πλάσμα του αίματος τους μεταβολίτες Μονογλυκουρονικά και Διγλυκουρονικά συζευγμένα παράγωγα. Η κατανομή της Κροκετίνης στους διάφορους ιστούς αφορά κυρίως τους πνεύμονες, την καρδιά, το ήπαρ, τους νεφρούς, τον σπλήνα και τον λιπώδη ιστό. Η Εικόνα 18 δείχνει μία ανασκόπηση των βασικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της Κροκετίνης, όταν χορηγηθεί από του στόματος σε πειραματόζωα και σε δόσεις των 20, 40 και 80 mg/kg βάρους σώματος αντίστοιχα.

Table 1: The pharmacokinetic parameters of crocetin after oral administration in rats [8].

Pharmacokinetic parameters	Dose (mg/kg)		
	20	40	80
C_{max} (μg/ml)	4.49±1.24	9.13±1.66	11.23±2.63
t_{max} (min)	52.1±9.7	57.0±8.0	59.0±8.2
$t_{1/2}$ (min)	54.6±7.0	66.3±9.2	70.0±8.0
AUC (μg/ml·min)	680±35	1244±115	1723±103
Cl (ml/min/kg)	36.85±1.84	20.1±0.49	14.52±0.46
V_d (L/kg)	2.89±0.38	1.92±0.42	1.46±0.54

Εικόνα 18: Η Κροκετίνη είναι ένα μόριο με ταχεία απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα στους βιολογικούς ιστούς ανθρώπου και πειραματόζωων. Εδώ οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι για δοσολογία 20, 40 και 80 mg/kg βάρους σώματος αντίστοιχα. (Πηγή φωτογραφίας: Liang Xi et al, Natural product communications, January 2006, Pharmacological properties of crocetin and crocin (digentiobiosyl ester of crocetin) from saffron).

Επίσης, παρακάτω ακολουθεί πίνακας με τις σημαντικότερες δράσεις της Κροκίνης και της Κροκετίνης έναντι συγκεκριμένων παθολογικών καταστάσεων σε ζωικά μοντέλα (Εικόνα 19).

Table 2: Brief information on the experimental targets, modes of application and doses of crocetin and crocin involved in the core studies.

Disease	Agent	Experimental target	Mode of application	Effective dose	References
Atherosclerosis	Crocetin	Animals	Chronic administration (p.o.)	15-100 mg/kg/d	13, 15
	Crocin	Animals	Chronic administration (p.o.)	25-100 mg/kg/d	16
Myocardial ischemia	Crocetin	Animals	Preventive administration (p.o.)	25-100 mg/kg/d	19, 20
		Cultured myocardial cells	Pre-incubation	0.1-50 μ M	21-24
Hemorrhagic shock	Crocetin/TSC	Animals	Acute treatment (i.v.)	2 mg/kg(crocetin); 0.05-0.418 mg/kg (TSC)	11, 32, 33, 40
Cancer	Crocetin	Animals (AFB1-induced hepatotoxicity)	Preventive administration (p.o.)	2-6 mg/kg/d	48
		Animals (TPA-induced skin tumors)	Preventive administration(topical application)	0.2-3.0 μ mol	52, 54
		HL-60 cells	Incubation	2 μ M(IC ₅₀)	46
		BP-treated C3H10T1/2 cells	Pre-incubation	0.01-0.10 mM	51
	Crocin	TPA-treated NIH/3T3 cells	Pre-incubation	0.03-0.12 mM	53
		DHD/K12-PROb-inoculated animals	Chronic administration (s.c.)	400 mg/kg/wk	62
		HT-29;DHD/K12-PROb;Hela; HL-60 cells	Incubation	0.4 mM, 1.0 mM, 3mM, 2 μ M (IC ₅₀), respectively	46, 59, 62
Cerebral disorders	Crocetin	Animals	Preventive administration (i.p.)	25-75 μ g/kg/d	72
		Animals	Preventive administration (intracerebroventricular injection)	51.2 nmol	64
	Crocin	Hippocampal slices	Pre-incubation	10-30 μ M	65
		PC-12 cells	Pre-incubation	10 μ M	69

Εικόνα 19: Σημαντικές εργαστηριακές παράμετροι που προκύπτουν από τη χορήγηση Κροκίνης και Κροκετίνης σε ζωικά μοντέλα. Οι παράμετροι αφορούν τον τρόπο λήψης της ουσίας και τη δοσολογία/συχνότητα, και τα αποτελέσματα ομαδοποιούνται ανά νοσολογική οντότητα. (Πηγή φωτογραφίας: Liang Xi et al, Natural product communications, January 2006, Pharmacological properties of crocetin and crocin (digentiobiosyl ester of crocetin) from saffron).

Για τη διερεύνηση του τρόπου λειτουργίας της Κροκετίνης στην αντιμετώπιση του αιμορραγικού σοκ, απαιτείται να εξετάσει κανείς το πώς η ουσία αυτή αλληλεπιδρά τόσο με το αγγειακό σύστημα, όσο και με τους νεφρούς.

Έρευνες λοιπόν δείχνουν πως η Κροκετίνη δρα στο μηχανισμό πρόσληψης του Οξυγόνου, καθώς αυτό μεταφέρεται από την μεμβράνη των ερυθροκυττάρων προς τα μιτοχόνδρια των περιφερικών ιστών⁶. Οι μελέτες που απέδειξαν αυτή τη σημαντική για την κατανόηση της δράσης της Κροκετίνης- λεπτομέρεια χρησιμοποίησαν Κροκετίνη και ένα άλλο συναφές μόριο, το *trans-Sodium Κροκετινικό (trans-sodium crocetinate, TSC)*, μιας και το μεγαλύτερο μέρος της Κροκετίνης στους φυτικούς ιστούς υπάρχει στην *trans* μορφή του. Αποδείχθηκε λοιπόν πως η Κροκετίνη βελτιώνει την οξυγόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων *in vivo* και παράλληλα συμμετέχει και στη βελτίωση της ελαστικότητας των ερυθροκυττάρων⁶, πράγμα πολύ σπουδαίο κυρίως όταν τα ερυθροκύτταρα χρειάζεται να μετακινηθούν μέσα σε πολύ στενά τριχοειδή αγγεία με κίνδυνο να διαρραγούν (και έτσι να μειωθεί η μεταφορά του Οξυγόνου σε απομακρυσμένους ιστούς).

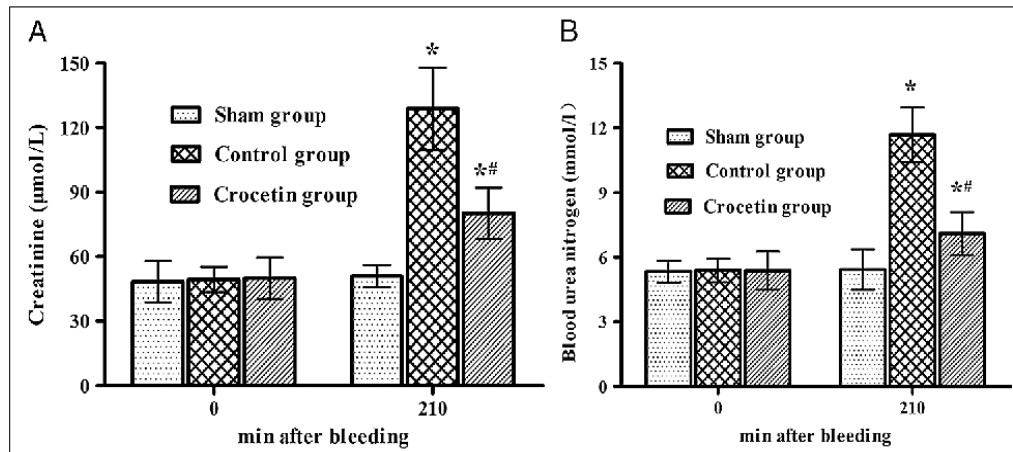
Όσο για το *trans-Sodium Κροκετινικό (trans-sodium crocetinate, TSC)* αυτό έχει βρεθεί πως αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης σε πειραματόζωα που έχουν υποστεί αιμορραγία^{6,8} με τους εξής μηχανισμούς:

- ✓ Αποκατάσταση της αρτηριακής πίεσης
- ✓ Μείωση της ταχυκαρδίας
- ✓ Μείωση των επιπέδων γαλακτικού στο πλάσμα του αίματος
- ✓ Μείωση της ανάγκης για χορήγηση ηλεκτρολυτών (αφού μειώνεται η αιμορραγία, χάνονται και λιγότεροι ηλεκτρολύτες άρα μειώνεται η ανάγκη για αποκατάσταση αυτών)
- ✓ Μακροχρόνια προστασία από τις επιπτώσεις της βαριάς αιμορραγίας, ακόμα και αφού περάσει η οξεία φάση της απώλειας αίματος

Ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά τον τελευταίο μηχανισμό, έχει βρεθεί ότι οι θεραπευτικές επιπτώσεις της χορήγησης 100% Οξυγόνου και της χορήγησης TSC είναι παρόμοιες, απλά το TSC λειτουργεί πιο μακροπρόθεσμα, γιατί ακόμα κι αν χορηγηθεί αφού ξεπεραστεί η μεγάλη αιμορραγία (και σε 4-5 δόσεις), παρατηρείται καλύτερη ανταπόκριση του αγγειακού συστήματος, και βελτιωμένη ανάρρωση -ακόμα και με νέα αιμορραγία- σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες⁶.

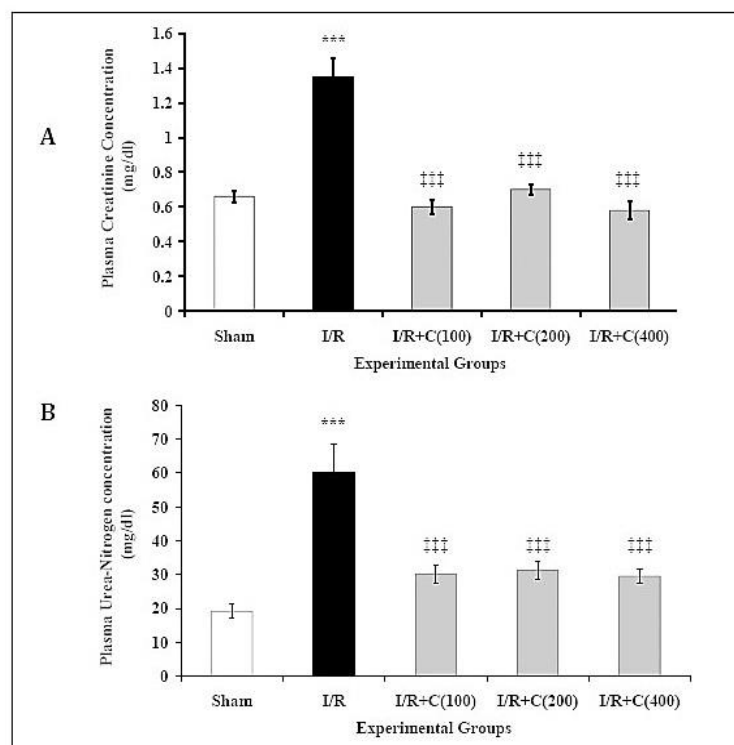
Μοριακά, έχει βρεθεί πως αυτή η αντι-αιμορραγική δράση του TSC οφείλεται στην ικανότητά του να μειώνει τα επίπεδα του TNF-a στο ήπαρ και στον σπλήνα σε ποντικούς που αιμορραγούν, προετοιμάζοντας έτσι ανάλογα τις μεταβολικές και αιμοποιητικές αποθήκες του οργανισμού τους για να αντιμετωπίσουν αυτή την οξεία κατάσταση. Και φυσικά, εξυπακούεται πως ένα μοντέλο συνχορήγησης Κροκετίνης/TSC θεωρείται το ιδανικό για την αντιμετώπιση οξέων αιμορραγικών

καταστάσεων, διότι συνδυάζει τη δράση και των δύο δραστικών ουσιών για καλύτερα και ταχύτερα αποτελέσματα⁶. Άλλα πάλι πειράματα που αφορούσαν επίσης ποντικούς, η επιβεβαίωση της επιτυχούς ανάνηψης⁸ από την αιμορραγία έγινε με τη διαπίστωση ότι τα επίπεδα Κρεατινίνης και Αζώτου Ουρίας στο πλάσμα του αίματος βρίσκονταν σημαντικά ελαττωμένα στα ζώα που είχε γίνει χορήγηση Κροκετίνης¹⁰ (Εικόνα 20) -και ειδικά σε ζώα που είχαν υποστεί νεφρική ισχαιμία/επαναιμάτωση



Εικόνα 20: Οι επιδράσεις της Κροκετίνης στη νεφρική βλάβη, σε ποντικούς που υπέστησαν αιμορραγικό σοκ. Τα επίπεδα Κρεατινίνης (A) και Αζώτου Ουρίας (B) στο πλάσμα του αίματος στο χρόνο T0 (πριν την αιμορραγία) και στο χρόνο T210 (2 ώρες μετά από την ανάνηψη από την αιμορραγία). (Πηγή φωτογραφίας: Wang Y et al, Shock. 2012 Jul., Protective effect of crocetin on hemorrhagic shock-induced acute renal failure in rats).

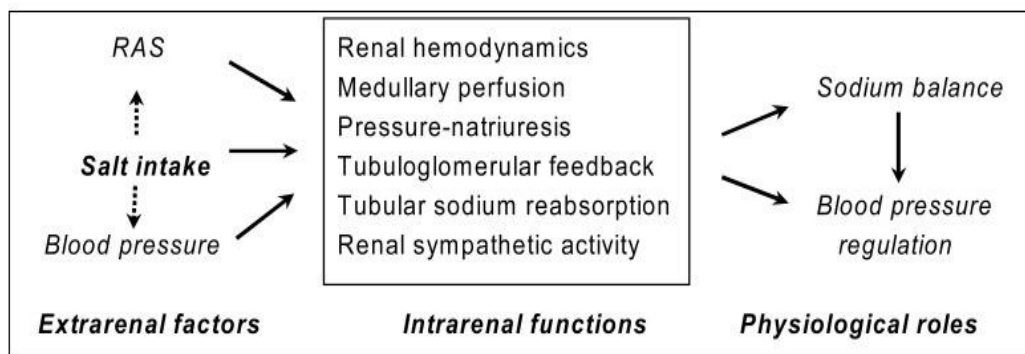
(Εικόνα 21).



Εικόνα 21: (A) Επίπεδα Κρεατινίνης και (B) Επίπεδα Αζώτου Ουρίας στο πλάσμα του αίματος

στο τέλος της περιόδου ανάνηψης, σε ποντικούς που υπέστησαν νεφρική ισχαιμία/επαναιμάτωση και τους χορηγήθηκε Κροκεΐνη (συγγενής ουσία της Κροκεΐνης) στα μηδέν (I/R), 100, 200 και 400 mg/kg (I/R + C) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (sham group). (Πηγή φωτογραφίας: Zeynab Mohamadi Yarijani et al, Iran J Basic Med Sci. 2017 Jul., Crocin has anti-inflammatory and protective effects in ischemia-reperfusion induced renal injuries).

Τέλος, να αναφερθεί ότι εκτός από τον TNF- α , κι άλλες κυτταροκίνες βρέθηκαν επίσης αυξημένες στα ζώα που είχαν λάβει Κροκεΐνη: συγκεκριμένα αυτές ήταν η IL-6 και το NO που εκκρίνεται από τους νεφρούς (*renal NO*), με το τελευταίο να αποτελεί σημαντικότατο ρυθμιστή της νεφρικής λειτουργίας και κάθαρσης αφού επιδρά στο Σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης Αλδοστερόνης⁹ (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Τα πειραματόζωα που λαμβάνουν Κροκεΐνη, ως θεραπευτική αντιμετώπιση οξέων αιμορραγικών καταστάσεων παρουσιάζουν μεταξύ άλλων και αύξηση στο NO που εκκρίνεται από τους νεφρούς (*renal NO*). Εδώ, αριστερά και κέντρο, οι σπουδαιότερες εξωνεφρικές (*extrarenal*) και ενδονεφρικές (*intrarenal*) δράσεις του NO που εκκρίνεται από τους νεφρούς (*renal NO*) και δεξιά οι φυσιολογικές αποκρίσεις που δίνουν οι δράσεις αυτές ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του Συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης Αλδοστερόνης. (Πηγή φωτογραφίας: JongUn Lee et al, Electrolyte Blood Press. 2008 Jun., Nitric Oxide in the Kidney : Its Physiological Role and Pathophysiological Implications.)

IV. Ο ρόλος των miRNAs ως προγνωστικών/διαγνωστικών δεικτών για το Σύνδρομο Ισχαιμίας-Επαναιμάτωσης

Ο όρος *miRNA* (συντομογραφία του όρου *micro-RNA*) χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια ευρύτατα στο χώρο της Βιολογίας, της Ιατρικής αλλά και πολλών ακόμα Επιστημών Ζωής, για να περιγράψει μία ομάδα μικρών μη-κωδικών μορίων RNA. Η ανακάλυψη του πρώτου miRNA έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 αλλά άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην πράξη από τα τέλη του 2000 και ύστερα. Το σύνηθες μήκος ενός miRNA που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία αλλά και στα εργαστηριακά πρακτικά είναι περί τα 18-28 νουκλεοτίδια¹¹ (22 νουκλεοτίδια, κατά μέσο όρο), αν και μικρές αποκλίσεις μπορεί να υπάρχουν ανάλογα με τον τύπο και τις ιδιαιτερότητες του κάθε πειράματος. Η βασικές πηγές miRNAs για τα περισσότερα πειράματα ή/και εργαστηριακά πρωτόκολλα είναι οι

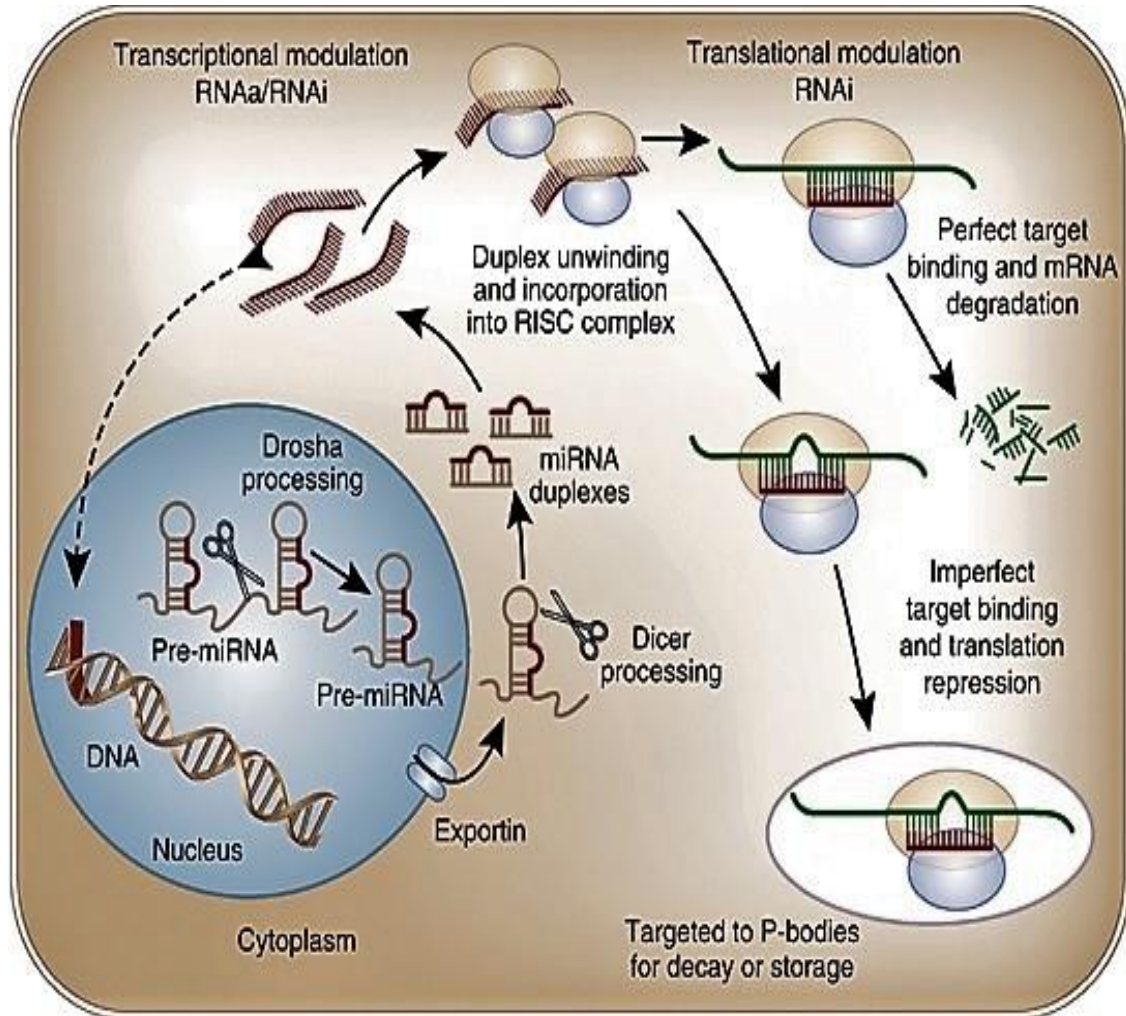
ιστοί διαφόρων φυτών και ζώων, διάφοροι ιοί καθώς και ορισμένοι μονοκύτταροι ευκαρυώτες¹². Κύριος ρόλος ενός miRNA είναι η διαμεσολάβηση στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, πολύ συχνά μάλιστα και στο RNA-silencing (αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων). Η διαμεσολάβηση αυτή πραγματοποιείται μέσα από την -κεντρική για την Μοριακή Βιολογία- Αρχή της Συμπληρωματικότητας των Βάσεων και κυριολεκτικά έλυσε τα χέρια σε πολλούς επιστήμονες ανά τον κόσμο, στην προσπάθειά τους να κατευθύνουν την μετα-μεταγραφική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (συχνά μάλιστα, γονιδίων που ήταν υπεύθυνα για την εκδήλωση σοβαρών ή/και νοσημάτων για τον άνθρωπο). Ενδεικτικά, έχει βρεθεί ότι χάρις στην παρουσία των miRNAs, οι ερευνητές κατάφεραν να κάνουν τροποποίηση ή αποσιώπηση σε γονίδια υπεύθυνα¹² για τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, διαφόρων μαλακών μορίων της κεφαλής και του τραχήλου αλλά και για κάποιες σημαντικές νευρολογικές παθήσεις όπως είναι το Alzheimer, η Πολλαπλή Σκλήρυνση και η Σχιζοφρένεια. Είναι λοιπόν εμφανές το πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος των μορίων αυτών στην θεραπεία συγκεκριμένων νοσημάτων αλλά-όπως θα δούμε παρακάτω- και ως θεραπευτικοί-διαγνωστικοί δείκτες στον ιατρικό χώρο.

Η Ονοματολογία των διαφόρων miRNAs ακολουθεί κάποιους διεθνείς κανόνες, που σε γενικές γραμμές στόχο έχουν την διευκόλυνση της επικοινωνίας των επιστημόνων μεταξύ τους. Έτσι, το όνομα ενός τυπικού miRNA ξεκινά με το πρόθεμα *miR*, ακολουθεί παύλα κι ένας αριθμός ο οποίος είναι για κάθε τύπο miRNA κάτι σαν δακτυλικό αποτύπωμα: δηλαδή το προσδιορίζει και το χαρακτηρίζει. Απ' την άλλη πάλι πλευρά, mRNAs που μοιάζουν μεταξύ τους ως προς τη δομή -και διαφέρουν κατά λίγα μόνον νουκλεοτίδια- διαχωρίζονται μεταξύ τους με την επιπλέον προσθήκη ενός αγγλικού μικρού γράμματος, διαδοχικού σε σειρά από το επόμενο ή/και το προηγούμενό του: έτσι για παράδειγμα, αν ένας ερευνητής δει τους όρους miR-124a και miR-124b, ξέρει πως τα δύο αυτά μόρια είναι δομικά παρόμοια.

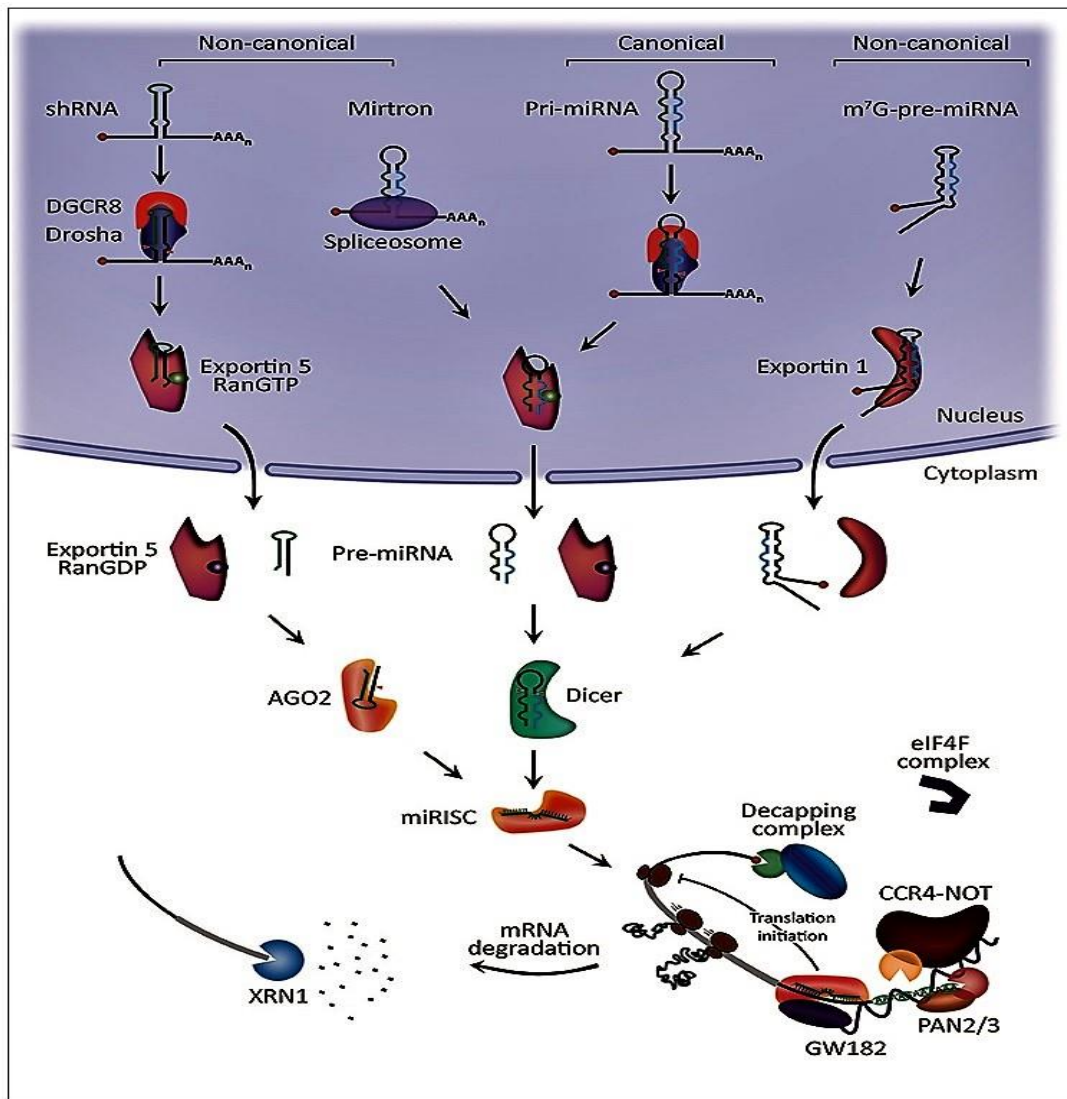
Η βιοσυνθετική πορεία ενός miRNA είναι μια καλά μελετημένη διαδικασία. Η Εικόνα 22 δίνει περιληπτικά και σχηματικά τα βήματα που ακολουθούνται σε ένα τυπικό εργαστήριο για την παραγωγή ενός μορίου miRNA, όταν είναι φυσικά γνωστό το γονίδιο στο οποίο ο ερευνητής επιθυμεί να παρέμβει. Αδρά, η διαδικασία περιλαμβάνει¹³ πρώτα την μεταγραφή από συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA σε πρωτογενή miRNAs (pri-miRNAs), στη συνέχεια την κατεργασία σε πρόδρομα miRNAs (pre-miRNAs) και στο τέλος την ωρίμανση στα τελικά, ώριμα miRNAs. Η αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης¹³ γίνεται συνήθως όταν τα ώριμα miRNAs αλληλεπιδρούν με τις 3' αμετάφραστες περιοχές (*Three Prime Untranslated regions, 3' UTRs*) του mRNA του DNA-στόχου.

Να αναφερθεί ωστόσο πως υπάρχει η δυνατότητα το miRNA να αλληλεπιδράσει και με άλλες περιοχές -πλην των 3' UTRs- όπως για παράδειγμα με τις 5' UTRs, με κάποια κωδική αλληλουχία, καθώς και με τους υποκινητές διαφόρων γονιδίων. Οι Εικόνες 23 και 24 που ακολουθούν περιγράφουν βήμα-βήμα αυτή τη βιοσυνθετική

πορεία, που μπορεί να διαχωριστεί αδρά σε Κανονική και Μη-Κανονική (βλ. Λεζάντα Εικόνας 24).



Εικόνα 23: Αδρή ανασκόπηση των βημάτων που ακολουθούνται σε ένα τυπικό εργαστήριο για την παραγωγή ενός μορίου miRNA, καθώς και των κυτταρικών διαμερισμάτων στα οποία λαμβάνει χώρα το κάθε βήμα. Pre-miRNA: precursor miRNA, RISC, RNA-induced silencing complex, RNAa: RNA activation. (Πηγή φωτογραφίας: https://www.researchgate.net/figure/MicroRNA-miRNA-biogenesis-and-function-The-biosynthesis-of-miRNAs-as-well-as-their_fig3_221740929).



Στο πλαίσιο τώρα της συγκεκριμένης Διδακτορικής Διατριβής, τα miRNAs χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες για την πρόγνωση των πειραματόζωων που έλαβαν Κροκετίνη σε σχέση τα πειραματόζωα που δεν έλαβαν. Για να γίνει αυτό, ακολουθήθηκε ειδικό εργαστηριακό πρωτόκολλο, με το οποίο:

- 1) Απομονώθηκε το miRNA από τους νεφρικούς ιστούς.
- 2) Το miRNA του βήματος 1 χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση cDNA.
- 3) Το cDNA του βήματος 2 χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου με τη χρήση ειδικών probes για επιλεγμένα miRNAs (και ειδικότερα, για τα miRNAs: miR-21, miR-127 και miR-132, καθώς και το miRNA U-16 (που αποτελεί δείκτη αναφοράς)).

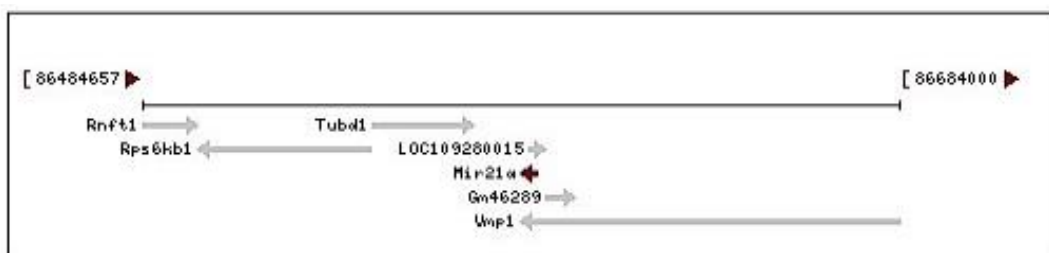
Πριν πάμε λοιπόν να δούμε, συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης μας, κρίνεται σκόπιμο να γίνει μια αδρή πρώτη ανασκόπηση της ελληνικής και της διεθνούς βιβλιογραφίας σε ό,τι αφορά τα συγκεκριμένα μόρια miRNAs.

Έτσι, λοιπόν, ξεκινώντας από το miR-21 σύμφωνα με ευρωπαϊκές αλλά και παγκόσμιες βάσεις καταχώρησης βιολογικών δεδομένων, είναι ένα μικρό (20-24 νουκλεοτίδια) μη-κωδικό μόριο mRNA που κωδικοποιείται: στον άνθρωπο από γονίδιο που εδράζεται στον μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (θέση 17q23.1), και μάλιστα εντός του γονιδιακού τόπου του κωδικού γονιδίου TMEM49. Το γονίδιο για το miR-21 (στον άνθρωπο) διαθέτει δικές του αυτόνομες περιοχές κωδικοποίησης των υποκινητών και παρέχει την απαραίτητη γενετική πληροφορία για την παραγωγή ενός pri-miR-21 μεταγράφου μήκους περί τα~3433 νουκλεοτίδια που μεταγράφεται αυτόνομα. Στον ποντικό, πάλι, αυτή η κωδικοποίηση γίνεται από γονίδιο που

Εικόνα 24: Λεπτομερής ανασκόπηση του βιοσυνθετικού κύκλου παραγωγής ενός τυπικού mRNA. Η διαδικασία ξεκινάει με την παραγωγή του pri-miRNA μεταγράφου. Το σύμπλεγμα μικροκατεργασίας (microprocessor complex), αποτελούμενο από την κρίσιμη περιοχή που θέλουμε να τροποποιήσουμε την έκφρασή της (εδώ, έστω η περιοχή: Drosha and DiGeorge Syndrome Critical Region 8, DGCR8) κόβει το pri-miRNA προς παραγωγή ενός μορίου pre-miRNA. Το pre-miRNA που θα παραχθεί βγαίνει στο κυτταρόπλασμα, με μοριακό μηχανισμό που εξαρτάται από την Exportin5/RanGTP, και υφίσταται κατάλληλη επεξεργασία ώστε να παραχθεί το ώριμο δίπολο μόριο του miRNA. Τέλος, είτε η 5' αλυσίδα, είτε η 3' αλυσίδα του ώριμου δίπολου μορίου του miRNA φορτώνεται απάνω στον πρωτεϊνικό υποδοχέα τύπου Argonaute (AGO) για να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο επαγωγής της γονιδιακής αποσιώπησης του miRNA (miRNA-induced silencing complex, miRISC). Η πορεία αυτή ακολουθείται κατά την Κανονική (Canonical pathway) πορεία βιοσύνθεσης του miRNA. Κατά τη Μη-Κανονική πορεία (Non-Canonical pathway) απ' την άλλη πλευρά, ακολουθείται εντελώς άλλη οδός που ξεκινάει με το αρχικό κόψιμο του small hairpin RNA (shRNA) από το σύμπλεγμα μικροκατεργασίας (microprocessor complex) και την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα πάλι με Exportin5/RanGTP-εξαρτώμενο τρόπο, και λήγει με την αποαδενυλίωση του mRNA-στόχου (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402/full>).

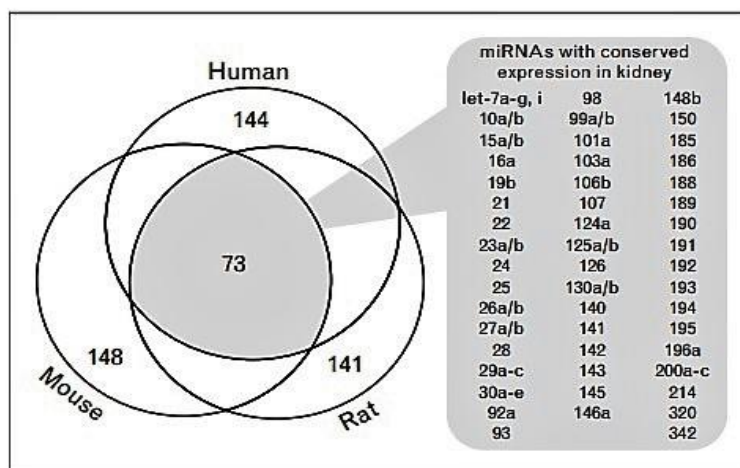
εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 (θέση 11; 11 C). Η Εικόνα 24 παριστάνει γραφικά τη θέση του γονιδίου για το miR-21 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (που μας ενδιαφέρει για τη μελέτη μας):

Chromosome 11 - NC_000077.6



Εικόνα 25: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR-21 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 11; 11 C). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/387140>).

Σε ό,τι αφορά τώρα τη σχέση που έχει η επιλογή του miR-21 ως δείκτη για τη μελέτη μας, υπάρχει αρκετή (ξένη κυρίως βιβλιογραφία) που αναφέρει αυτό το mRNA ως έναν από τους πιο συχνά εκφραζόμενους μοριακούς δείκτες στον ώριμο νεφρό ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου¹⁴ (Εικόνα 26), αλλά και στις περισσότερες παθολογικές καταστάσεις των νεφρών όπου διαταράσσεται η δομή και η μορφολογία του επιθηλίου¹⁴ (Εικόνα 27).



Εικόνα 26: Ο δείκτης miR-21 ανήκει σε μία ευρεία γκάμα ανοσολογικών δεικτών που εκφράζονται ταυτόχρονα στον νεφρό του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου. Η επιλογή τέτοιων δεικτών στα πειράματα μελέτης, μάς δίνει τη δυνατότητα να βγάλουμε συμπεράσματα που δεν θα αφορούν μόνο τους νεφρούς των πειραματόζωων, αλλά που θα έχουν πιθανότατα εφαρμογή και στον άνθρωπο. (Πηγή φωτογραφίας

: *Samuel Saal et al, Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2009,*

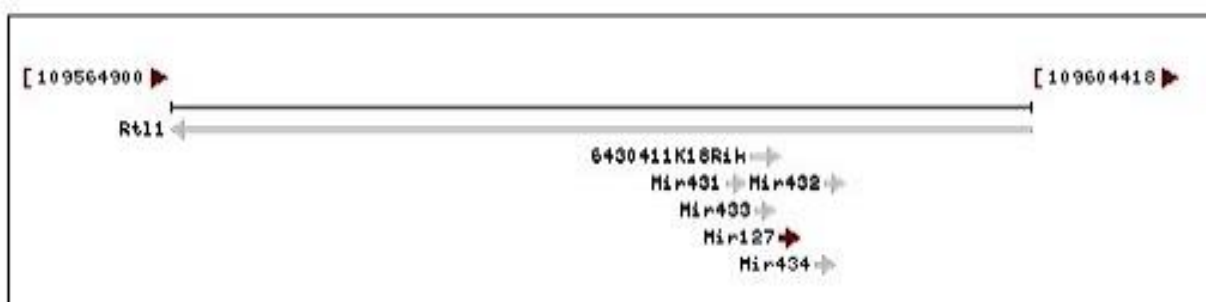
Table 1 MicroRNAs linked to kidney disease and cancer				
miRNA	Renal expression	Direct targets	Functional role	References
Polycystic kidney disease				
mir-15a	Not yet determined	Cdc25A	Proliferation	[45]
Diabetic nephropathy				
miR-21	Glomeruli and interstitium	Not defined in this study	Inhibition of apoptosis	[46]
miR-23b	Podocytes and tubules	Not defined in this study	Modulation of TGF-β1 signaling	[47]
miR-192	Mesangium	SIP1	Collagen synthesis	[48]
miR-216	Mesangium	YB-1	Modulation of TGF-β1 signaling	[49]
miR-377	Mesangium	PAK1, SOD1 and SOD2	Fibronectin synthesis	[50**]
Kidney cancer				
miR-34a	Tumor cells	Sirt1	Apoptosis	[51]

Εικόνα 27: Ο δείκτης miR-21 ανήκει επίσης σε μία γκάμα ανοσολογικών δεικτών που εκφράζονται στη διαβητική νεφροπάθεια. Είναι πιθανόν να εκφράζεται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις των νεφρών, απαιτείται όμως στο κομμάτι αυτό περισσότερη έρευνα. (Πηγή φωτογραφίας: *Samuel Saal et al, Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2009,* MicroRNAs and the kidney: coming of age).

MicroRNAs and the kidney: coming of age).

Συνεχίζοντας με το miR-127 και πάλι σύμφωνα με ευρωπαϊκές αλλά και παγκόσμιες βάσεις καταχώρησης βιολογικών δεδομένων, είναι επίσης ένα μικρό (20-24 νουκλεοτίδια) μη-κωδικό μόριο mRNA που κωδικοποιείται: στον άνθρωπο από γονίδιο που εδράζεται στον μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 14 (θέση 14q32.2). Η ακριβής θέση του γονιδίου επάνω στον βραχίονα του χρωμοσώματος είναι ένα ξεχωριστό -αλλά υψηλά συντηρημένο και επικαλυπτόμενο- γονιδιακό σύμπλεγμα που κωδικοποιεί το μετάγραφο miR-433/127. Με άλλα λόγια, τα γονίδια για τα μετάγραφα miR-127 και miR-433 επικαλύπτονται πάνω στο χρωμόσωμα και μάλιστα προς την κατεύθυνση 5'-3'. Η ενεργοποίηση των υποκινητών των miR-127 και miR-433 γίνεται μέσω ενός υποδοχέα ενεργοποιούμενου από τα Οιστρογόνα, του NR3B3 (Estrogen-related receptor gamma, ERRgamma,) και η αναστολή τους από το ετεροδιμερές SHP (Inhibition is regulated by Small heterodimer partner).

Στον ποντικό, πάλι, αυτή η κωδικοποίηση γίνεται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 (θέση 12; 12 F1). Η Εικόνα 27 παριστάνει γραφικά τη θέση του γονιδίου για το miR-127 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (που μας ενδιαφέρει για τη μελέτη μας):



Εικόνα 28: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR127 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 12; 12 F1). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=MIR127+mouse>).

Chromosome 12 - NC_000078.6

Σε ό,τι αφορά τώρα τη σχέση που έχει η επιλογή του miR-127 ως δείκτη για τη μελέτη μας, υπάρχει πολλή και εξειδικευμένη βιβλιογραφία που συσχετίζει την έκφραση του miR-127 ως δείκτη αντιδραστικότητας του νεφρικού ιστού σε πειραματόζωα που υπέστησαν Υποξία/Επανοξυγόνωση και Ισχαιμία/Επαναιμάτωση¹⁵ (Εικόνες 29 και 30).

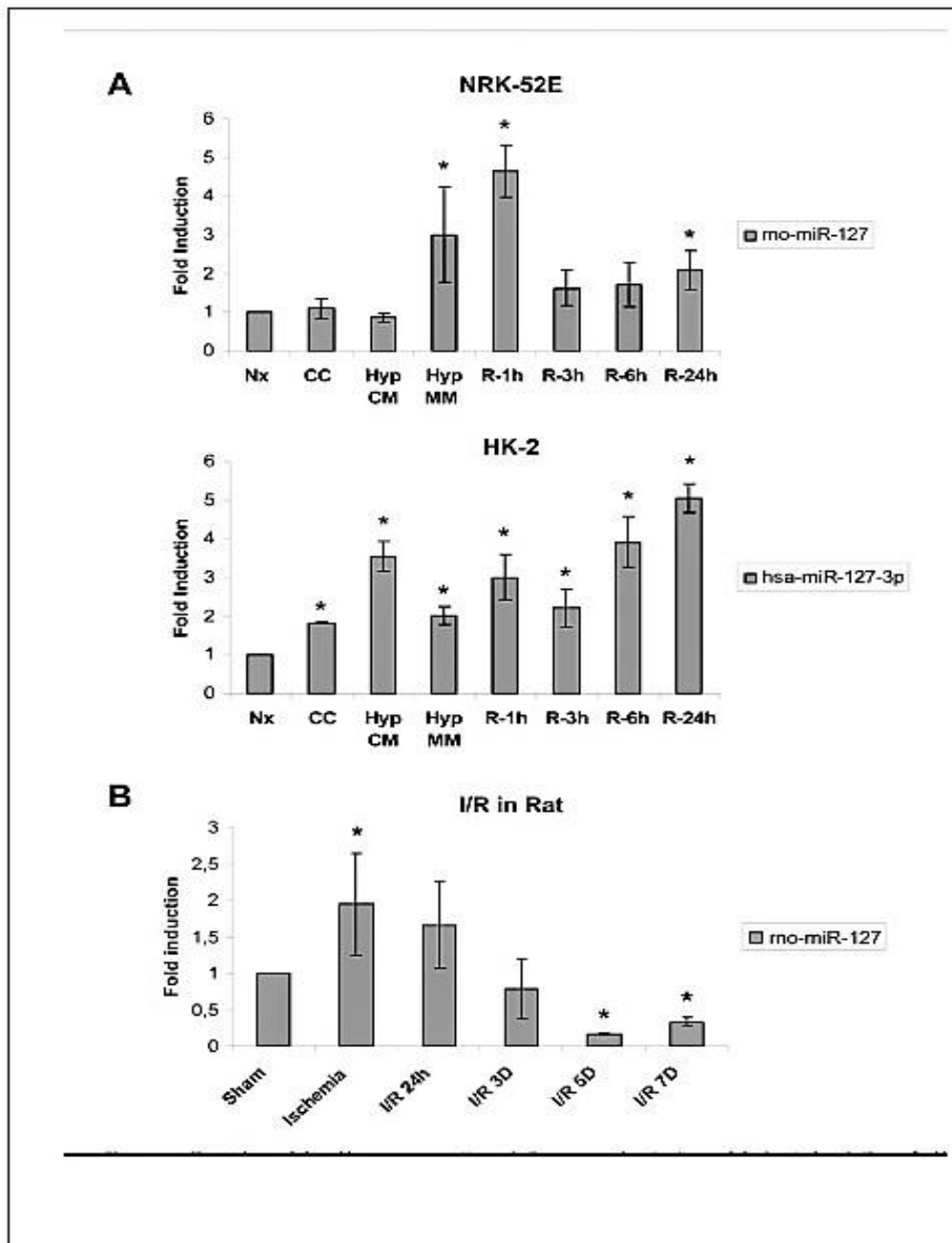
Table 1. Differentially expressed miRNAs in NRK-52E cells submitted to H/R.

Control vs Hypoxia		Hypoxia vs Reoxygenation	
miRNA	Fold change	miRNA	Fold change
rno-miR-101a	1	mo-miR-101a	2,63
rno-miR-127	1,16	mo-miR-127	2,46
rno-miR-129*	1	mo-miR-129*	2,13
rno-miR-154	1	mo-miR-154	8,03
rno-miR-28	1,27	mo-miR-28	1,90
rno-miR-376b	1,33	mo-miR-376b	6,70
rno-miR-223	1	mo-miR-223	-1,91

microRNA profiling was performed by hybridization array experiments. Comparisons between hypoxia vs control condition as well as hypoxia vs reoxygenation were done. Only miRNAs with statistical significance ($P < 0.05$) in at least one analysis are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0044305.t001

Εικόνα 29: Πίνακας με τα miRNAs που έχει βρεθεί πως εκφράζονται σε NRK-52E θετικά κύτταρα πειραματόζωων που υποβλήθηκαν σε συνθήκες H/R, δηλαδή Υποξίας/Επανοξυγόνωσης (Hypoxia/Reoxygenation). Οι συνθήκες αυτές μας ενδιαφέρουν στη μελέτη μας, γιατί και κατά την Ισχαμία/Επαναιμάτωση (το σύνδρομο που μελετά η παρούσα Διδακτορική Διατριβή) ουσιαστικά τα κύτταρα του νεφρικού παρεκχύματος υπόκεινται σε Υποξία (κατά την αιμορραγική φάση) και σε Επαναιμάτωση (κατά την φάση της ανάνηψης από την αιμορραγία). Βλέπουμε λοιπόν πως ανάμεσα στους εκφραζόμενους δείκτες είναι και το miR-127, που επιλέξαμε για μελέτη στην παρούσα Διατριβή. (Πηγή φωτογραφίας: Elia Aguado-Fraile et al, The Chinese University of Hong Kong, September 4, 2012, miR-127 Protects Proximal Tubule Cells against Ischemia/Reperfusion: Identification of Kinesin Family Member 3B as miR-127 Target).

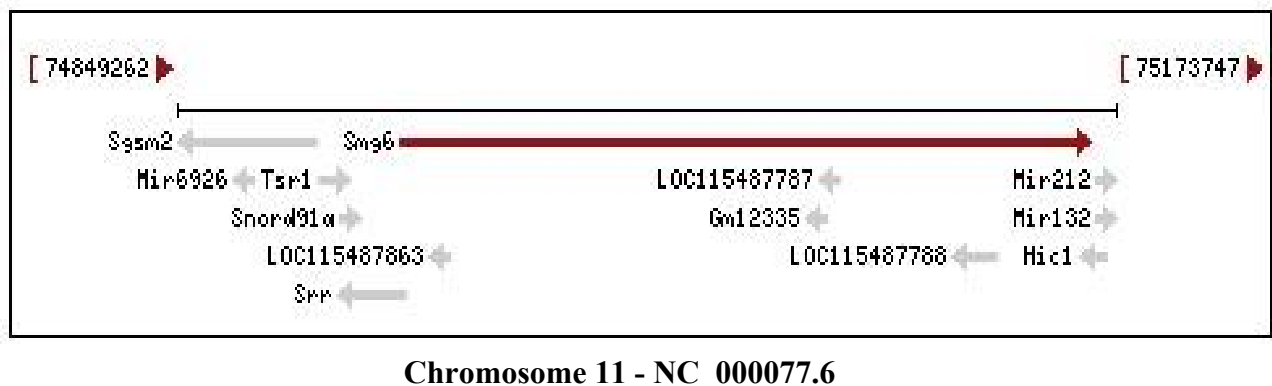


Εικόνα 30: Τα γραφήματα παριστάνουν την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του δείκτη miR-127, τόσο κατά την Υποξία/Επανοξυγόνωση (in vitro) όσο και κατά την Ισχαιμία/Επαναιμάτωση (in vivo). (A) Η χρονική διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του mo-miR-127: πάνω: σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων αρουραίου που είναι NRK-52E θετικά, και κάτω: σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων ανθρώπου που είναι HK-2 θετικά. Τα πειραματόζωα (αρουραίοι, άνθρωποι) υποβλήθηκαν σε συνθήκες Υποξίας/Επανοξυγόνωσης σύμφωνα με ειδικά εργαστηριακά πρωτόκολλα. (B) Η χρονική διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του mo-miR-127 σε κύτταρα νεφρικού παρεγχύματος αρουραίου που υποβλήθηκε σε συνθήκες Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης. (Πηγή φωτογραφίας: Elia Aguado-Fraile et al, The Chinese University of Hong Kong, September 4, 2012, miR-127 Protects Proximal Tubule Cells against Ischemia/Reperfusion: Identification of Kinesin Family Member 3B as miR-127 Target).

Σε ό,τι αφορά τώρα το *miR-132* σύμφωνα και πάλι με ευρωπαϊκές αλλά και παγκόσμιες βάσεις καταχώρησης βιολογικών δεδομένων, είναι επίσης ένα μικρό (20-24 νουκλεοτίδια) μη-κωδικό μόριο mRNA που κωδικοποιείται: στον άνθρωπο από γονίδιο που εδράζεται στον βραχύ (κοντό) βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (θέση

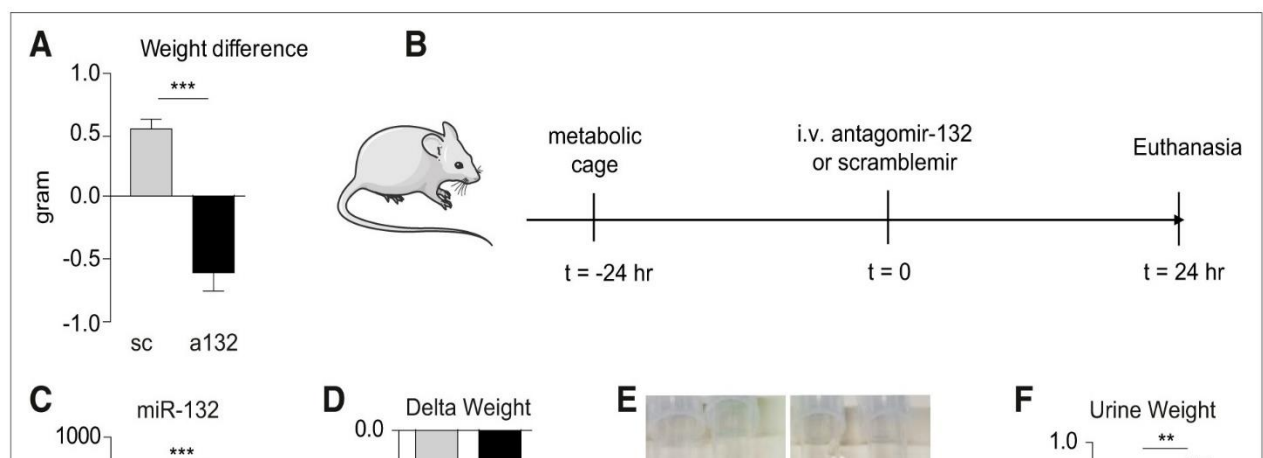
17p13.3). Στον ποντικό, απ' την άλλη πλευρά, αυτή η κωδικοποίηση γίνεται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 (θέση 11; 11 B5). Ειδικότερα (και πάντα σε χρωμόσωμα ποντικού) έχει βρεθεί πως το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του miR-132 εδράζεται σε ένα εσώνιο αυτού του βραχίονα, και μάλιστα όχι μόνο του αλλά ως ένα γονιδιακό σύμπλεγμα που κωδικοποιεί το μετάγραφο miR-212/132. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του συμπλέγματος αυτού έχει βρεθεί πως ενεργοποιείται από τον Μεταγραφικό Παράγοντα CREB (*cAMP-response element binding protein*).

Η Εικόνα 31 παριστάνει γραφικά τη θέση του γονιδίου για το miR-132 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (που μας ενδιαφέρει για τη μελέτη μας):



Εικόνα 31: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR32 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 11; 11 B5). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. (Πηγή φωτογραφίας: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/103677>).

Σε ό,τι αφορά τώρα τη σχέση που έχει η επιλογή του miR-132 ως δείκτη για τη

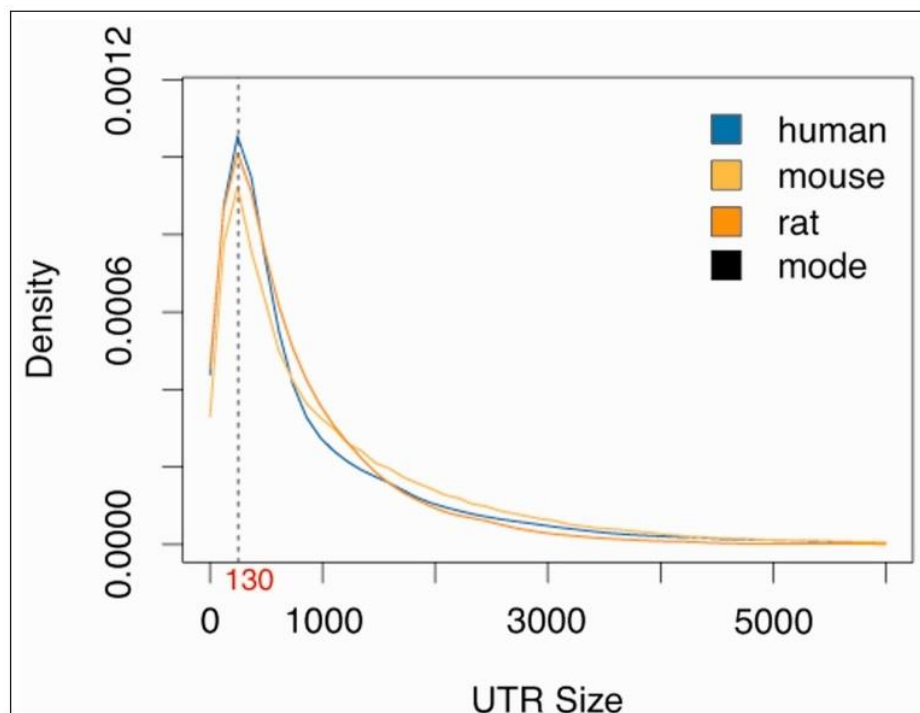


Εικόνα 32: Η αποσιώπηση του miR-132 επάγει τη διούρηση σε πειραματόζωα. (A) Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για το miR-132, σε απώλεια βάρους, 24 ώρες μετά από ενδοφλέβια έγχυση του antagomir-132. Τα πειραματόζωα ήταν σε κανονικά κλουβιά. (B) Τα πειραματόζωα κλειστήκαν μέσα σε μεταβολικά κλουβιά (για τον πλήρη διαχωρισμό των ούρων από τα κόπρανα) 24 ώρες πριν την ενδοφλέβια έγχυση και 24 ώρες μετά από την έγχυση, θανατώθηκαν. (C) Η έκφραση του miR-132 στους νεφρούς μετά την έγχυση του antagomir-132 (προσδιορισμός με RT-PCR), (D) Τα αποτελέσματα της απώλειας βάρους (λόγω διούρησης) σε ποντικούς που έγινε αποσιώπηση του γονιδίου miR-132, 24 ώρες μετά την έγχυση. (E και F): 24 ώρες μετά από την έγχυση του antagomir-132, η έκκριση των ούρων είναι υψηλότερη, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. (Πηγή φωτογραφίας: Roel Bijkerk et al, the American Physiological Society, 2018, MicroRNA-132 controls water homeostasis through regulating MECP2-mediated vasopressin synthesis).

μελέτη μας, υπάρχει διαθέσιμη αρκετή ξένη βιβλιογραφία σχετικά με την συμβολή του συγκεκριμένου ανοσολογικού δείκτη στη ρύθμιση της Ομοιόστασης του ισοζυγίου νερού¹⁶ : ειδικότερα, έχει βρεθεί πως αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της Βασοπρεσίνης που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες MECP2 (methyl-CpG-binding protein-2), με αποτέλεσμα την αύξηση της διούρησης σε ποντικούς (Εικόνα 32).

Υπάρχει επίσης σχετική και πρόσφατη (2016) βιβλιογραφία¹⁷ που συσχετίζει την αποσιώπηση του γονιδίου του miR-132 με τη μείωση της νεφρικής ίνωσης, μέσω επιλεκτικού αποκλεισμού του πολλαπλασιασμού των μυο-ινο-βλαστών.

Τέλος, όσον αφορά το miRNA U-16 που χρησιμοποιήθηκε ως μόριο μάρτυρας στην παρούσα εργασία, σύμφωνα και πάλι με ευρωπαϊκές αλλά και παγκόσμιες βάσεις καταχώρησης βιολογικών δεδομένων, είναι επίσης ένα μικρό (20-24 νουκλεοτίδια) μη-κωδικό μόριο mRNA που κωδικοποιείται: στον άνθρωπο από γονίδιο που εδράζεται στον μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (θέση 13q14.2) και παράγεται από μία Οικογένεια πρόδρομων μορίων mRNA (τα miR-16, miR-15, mir-195 και miR-457 που αποτελούν την mir-15 Οικογένεια γονιδίων), ενώ στον ποντικό φαίνεται να υπάρχει κάποιος παρόμοιος γονιδιακός τύπος χωρίς ακόμα να έχει πλήρως ταυτοποιηθεί. Το σημαντικό πάντως¹⁸ είναι για τα πειράματά μας, και μέχρι να ταυτοποιηθεί ο αντίστοιχος γονιδιακός τόπος και για τον ποντικό είναι πως οι γονιδιακοί τόποι για το miRNA U-16 φαίνεται να μοιάζουν πολύ ανάμεσα στα διαφορετικά ζωικά είδη, όπως δείχνει άλλωστε και η Εικόνα 33 της παρούσας Διατριβής:



Εικόνα 33: Η κατανομή του μεγέθους των 3' αμετάφραστων περιοχών (3'-UTRs) για τον άνθρωπο, τον ποντικό και τον αρουραίο. Άνθρωπος: 142bp, Ποντικός: 131bp, Αρουραίος: 122bp. (Πηγή φωτογραφίας: 18. Eduardo Andrés-León et al, Database (Oxford). 2015; 2015: bav035., Published online 2015 Apr 8, miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets).

Κεφάλαιο 2^ο:

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα και μοντέλο τεχνητής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (I/E)

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες C57BL/6, 10-12 περίπου εβδομάδων και όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Επιτροπής Ηθικής του Αρεταίειου Νοσοκομείου με αριθμό άδειας 5486/23-12-2011 και άδεια από την Επιτροπή δεοντολογία M-52/26-05-2011. Τα ζώα διατηρούνταν σε συνθήκες ελεύθερες από παθογόνα, υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία (22°C) και κάτω από ένα φυσικό κύκλο φωτός (12h)-σκότους (12h). Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό βρύσης (*ad libitum*). Ο χειρισμός και ευθανασία των ζώων γίνεται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία για τα ζωϊκά πειράματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε.

Μετά τη χορήγηση ενδομυϊκά κεταμίνης (90 mg/kg σωματικού βάρους) και ξυλαζίνης (7,5mg/kg σωματικού βάρους) τα ζώα κατανεμήθηκαν σε 3 ομάδες (n=5/ομάδα):

1. Ομάδα Sham: Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε μέση λαπαροτομία και παρέμειναν χωρίς περαιτέρω χειρισμούς για 45 min.

2. Ομάδα Control: Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε μέση λαπαροτομία. Ακολούθησε αγγειακός αποκλεισμός του αριστερού νεφρού για 45 min και στη συνέχεια επαναιμάτωση του η οποία επιβεβαιώθηκε κλινικά.
3. Ομάδα Crocetin: Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στην ίδια πειραματική διαδικασία με την ομάδα Control με τη διαφορά ότι τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά κροκετίνη σε δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους.

Το πείραμα ολοκληρώθηκε μετά το πέρας των 24 ωρών, οπότε πραγματοποιήθηκε αιμοληψία, αφαίρεση των νεφρών για περεταίρω μελέτη τους, τόσο σε επίπεδο μορφολογίας ιστού (με ανοσοϊστοχημεία), όσο και σε επίπεδο μοριακών μεταβολών (αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης μορίων με qRT-PCR). Τα πειραματόζωα θανατώθηκαν με τη χορήγηση υψηλής δόσης πεντοβαρβιτάλης (200 mg/kg σωματικού βάρους) ενδοπεριτοναϊκά.

Ποσοτικοποίηση της νεφρικής δυσλειτουργίας με βάση βιοχημικές παραμέτρους

Για να εκτιμηθεί η νεφρική λειτουργία, δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από τα ζώα των ομάδων 2 και 3. Έγινε διαχωρισμός του ορού με τη χρήση φυγοκέντρου και αναλύθηκαν σε αυτόν με τη χρήση αυτόματου αναλυτή ακριβείας (Olympus 600) τα επίπεδα βασικών παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας. Ελέγχθηκαν συγκεκριμένα τα επίπεδα της ουρίας, κρεατινίνης, ουρικού οξέος καθώς και ιόντων νατρίου, καλίου, χλωρίου, φωσφόρου, μαγνησίου και ασβεστίου.

Ιστολογική παρατήρηση της νεφρικής βλάβης

Με μικροσκοπική παρατήρηση αρκετών τομών από κάθε νεφρό ποντικού έγινε προσπάθεια προσδιορισμού βασικών παραμέτρων της παθοφυσιολογίας του νεφρικού

ιστού, όπως η διατομή των πειραματικών σωληναρίων και ο βαθμός τραυματισμού των μικροσωληναρίων που αντικατοπτρίζεται στην έκταση της καταστροφής της βασικής τους μεμβράνης. Νεφρικοί ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε παραφίνη και σειριακές τομές κατάλληλου πάχους 5μm ελήφθησαν με τη χρήση μικροτόπου και βάφτηκαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και παρατηρήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο.

Ανίχνευση της έκφρασης miRNAs

Για την απομόνωση miRNAs από νεφρικό ιστό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο κιτ απομόνωσης mirVana miRNA isolation Kit (Ambion, Life Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο κιτ αντίστροφης μεταγραφάσης TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου με τη χρήση ειδικού TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) και ειδικών TaqMan probes για επιλεγμένα miRNAs (miR-132, miR-21 και miR-127). Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το U6-RNA ενώ η μέθοδος $\Delta\Delta Ct$ χρησιμοποιήθηκε για την σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης με ένα δείγμα προερχόμενο από την καρδιά.

Στατιστική ανάλυση

Το GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Όλα τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των 5 ζώων ανά ομάδα. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αναλύθηκαν με ανάλυση one-way και το Student-Newman-Keuls test

πραγματοποιήθηκε για την σύγκριση δύο ομάδων. οι τιμές $P \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Κεφάλαιο 3^ο:

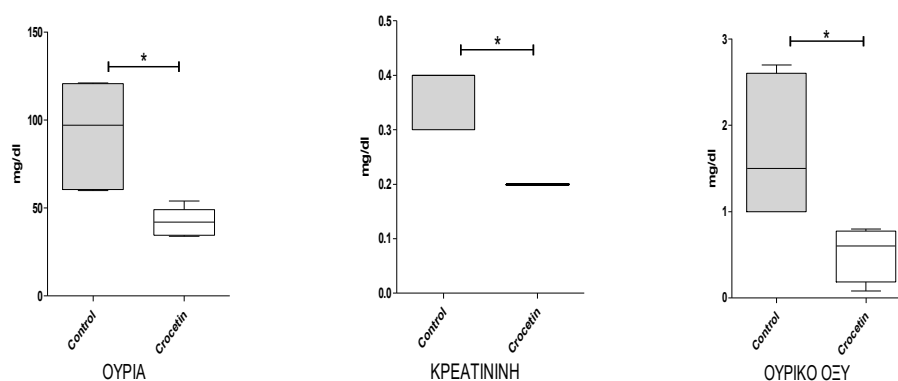
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥ

Στις Εικόνες 34, 35 & 36 παρουσιάζονται οι βιοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματόζων, 24 ώρες μετά την τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E) και χορήγηση της κροκετίνης.

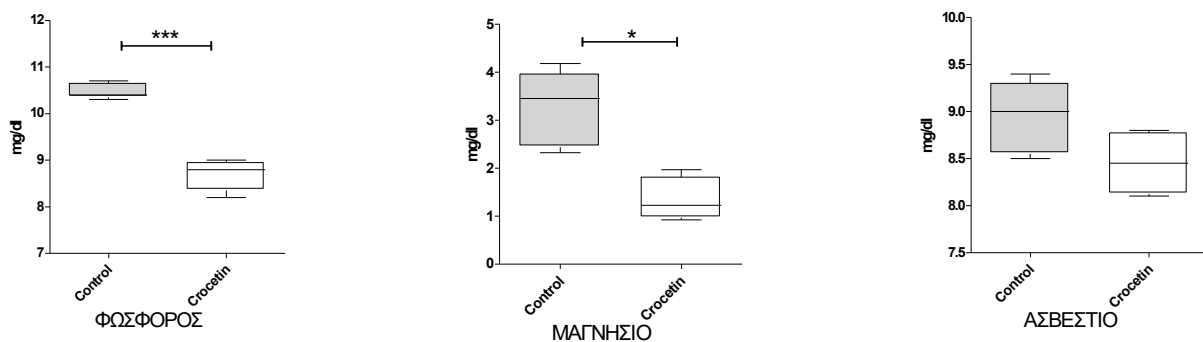
Στην Εικόνα 34 παρατίθενται τα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνης και ουρικού οξέος.

Και στις τρεις περιπτώσεις είναι σημαντικά στατιστικά χαμηλότερα τα επίπεδα στην ομάδα των ζών που χορηγήθηκε η κροκετίνη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



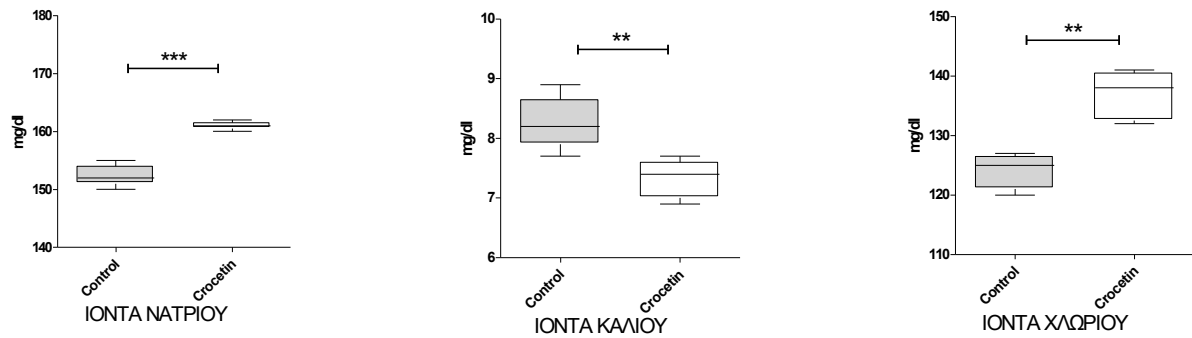
Εικόνα 34: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματοζών, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control), ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζών μετά την επίδραση της κροκετίνης.

Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν τα επίπεδα φωσφόρου, μαγνησίου και ασβεστίου στο περιφερικό αίμα των ζώων του πειράματος. Τα επίπεδα και των τριών παραμέτρων ήταν υψηλότερα στην ομάδα ελέγχου συγκριτικά με την ομάδα ζώων στην οποία χορηγήθηκε η κροκετίνη (Εικόνα 35). Αξίζει να σημειώσουμε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά υπάρχει στα επίπεδα του μαγνησίου ενώ πολύ ισχυρή στατιστική εμφανίζεται όσον αφορά στα επίπεδα του φωσφόρου.



Εικόνα 35: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματόζωων, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control), ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζώων μετά την επίδραση της κροκετίνης.

Ακολούθησε η ανάλυση των επιπέδων νατρίου, καλίου και χλωρίου (Εικόνα 36). Τα επίπεδα νατρίου και χλωρίου εμφανίζονται αυξημένα στην ομάδα που χορηγήθηκε η κροκετίνη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά στα επίπεδα καλίου, 24 ώρες μετά την χορήγηση της κροκετίνης βρέθηκαν μειωμένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



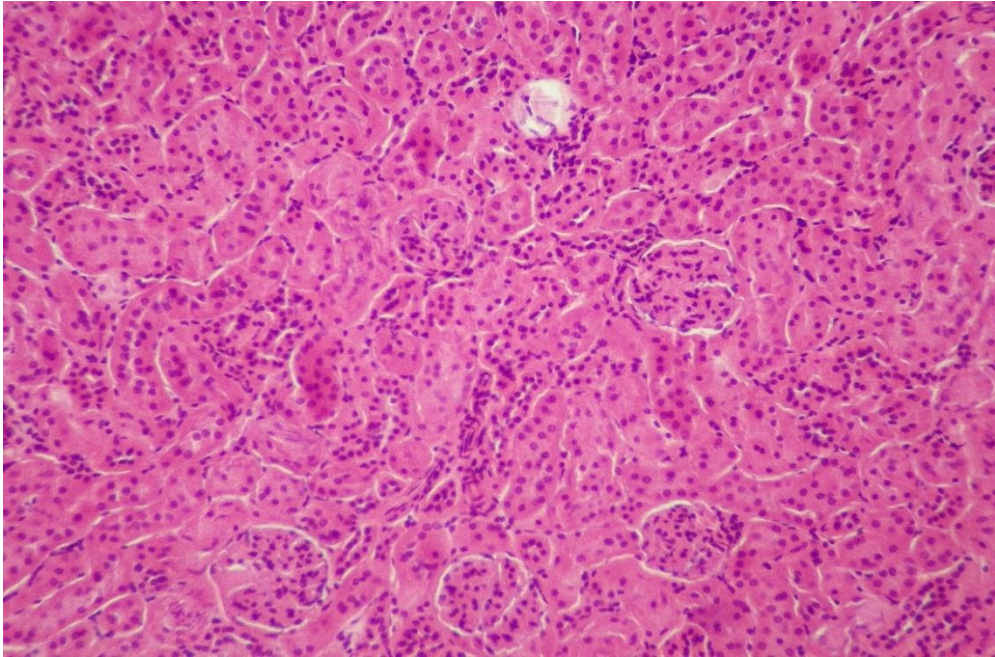
Εικόνα 36: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματόζωων, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control), ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζώων μετά την επίδραση της κροκετίνης.

Συμπερασματικά όσον αφορά στα αποτελεσμάτων βιοχημικών παραμέτρων μελετήθηκαν τα επίπεδα της ουρίας, της κρεατινίνης, του ουρικού οξέος, του φωσφόρου, του μαγνησίου, του ασβεστίου, του νατρίου, του καλίου και του χλωρίου στο περιφερικό αίμα ζώων 24 ώρες μετά την χορήγηση κροκετίνης. Σε όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν, εκτός από τα επίπεδα του ασβεστίου. Στην ομάδα των ζώων που έλαβαν την κροκετίνη ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνη, ουρικού οξέος, φωσφόρου και μαγνησίου, ενώ υψηλότερα επίπεδα νατρίου και χλωρίου.

Οι τιμές που μετρήθηκαν αντανακλούν πράγματι την ανεπαρκή λειτουργία των νεφρών. Είναι εμφανές ότι η χορήγηση της κροκετίνης, παρά τη σύντομη παρουσία της ουσίας μέσα στον οργανισμό, επιδρά σημαντικά στις τιμές αυτές και προκαλεί τη μείωση τους και σε κάποιες περιπτώσεις αύξηση τους.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ

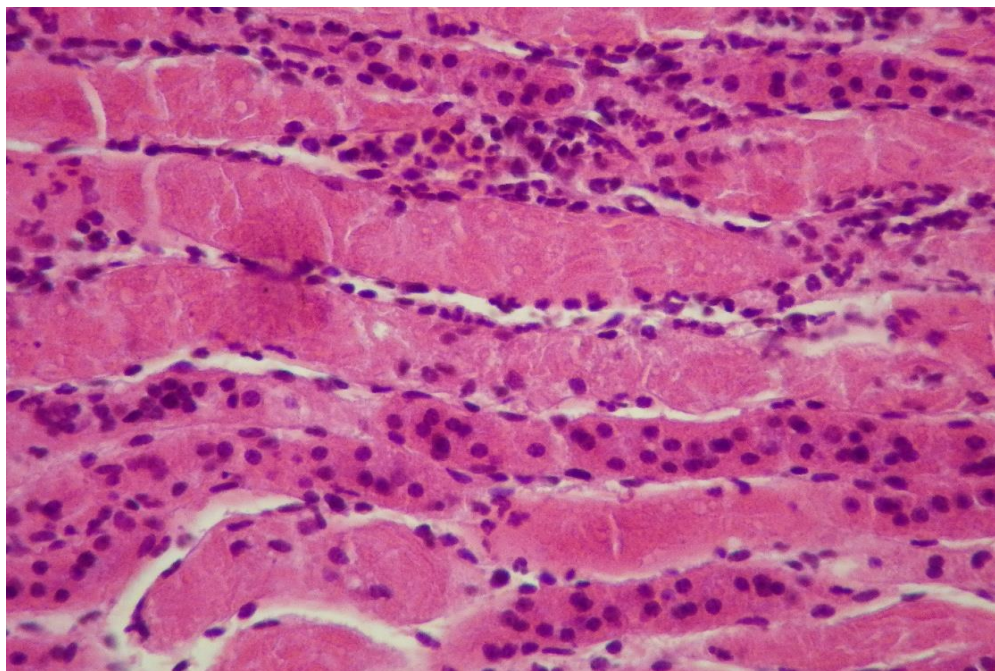
Στην συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της κροκετίνης στην ιστολογική δομή του νεφρού, παρατίθενται αντιπροσωπευτικές εικόνες. Στην Εικόνα 37 παρουσιάζεται φυσιολογικό νεφρικός ιστός.



Σ **Εικόνα 37:** Φυσιολογικός νεφρικός ιστός.

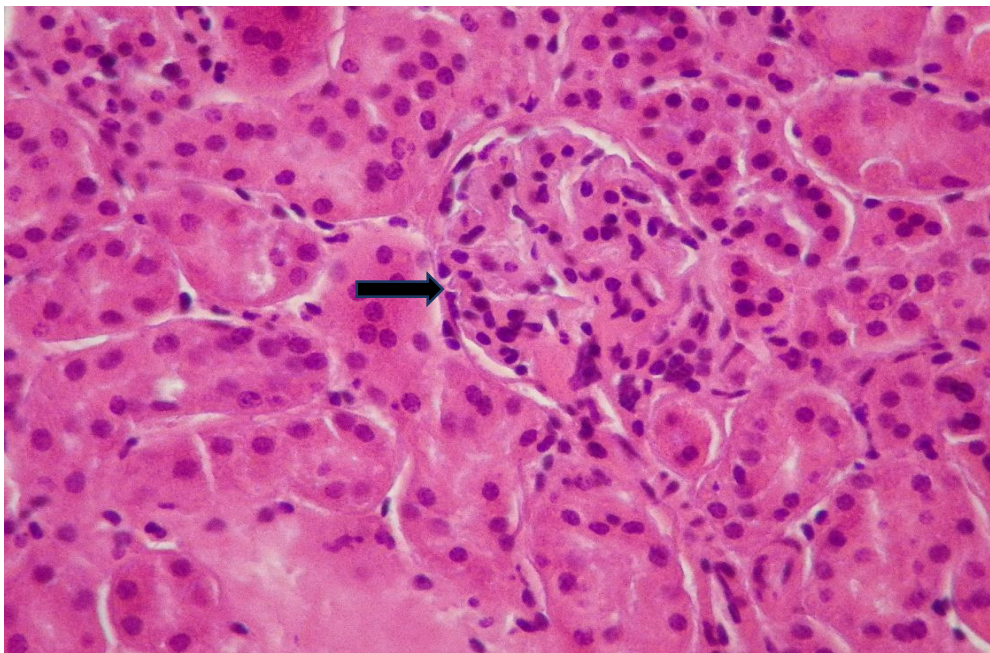
την

Εικόνα 38 απεικονίζεται ο νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E).



Εικόνα 38: Νεφρικός ιστός ύστερα από ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E).

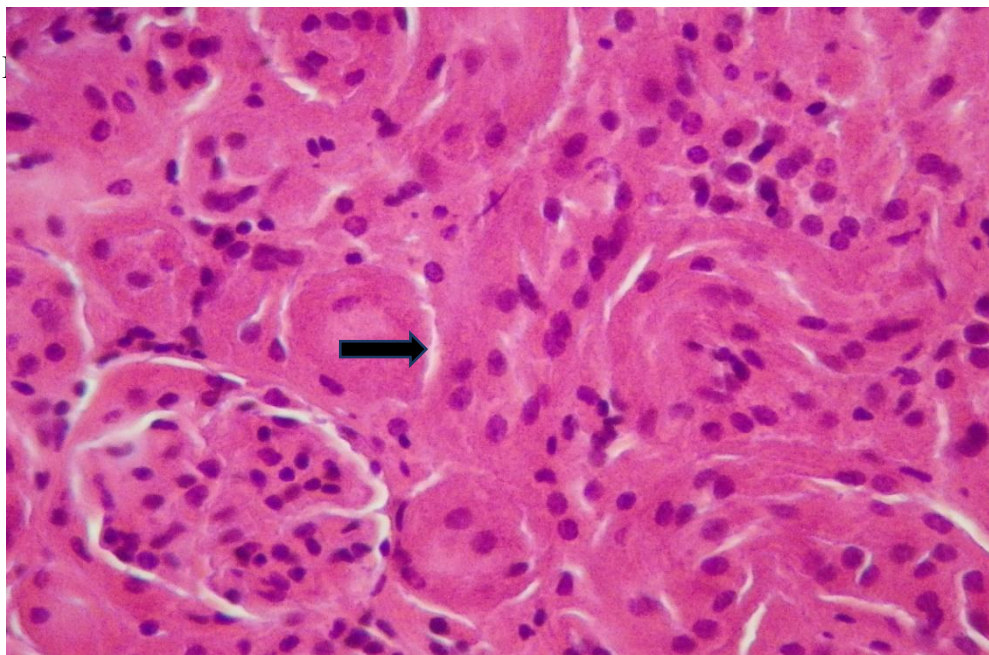
Στη συνέχεια απεικονίζεται ο νεφρικός ιστός ύστερα από ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 45 λεπτά μετά την χορήγηση κροκετίνης (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 45 λεπτά μετά τη χορήγηση κροκετίνης.

Στην συνέχεια παρουσιάζεται ο νεφρικός ιστός από ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 24 ώρες μετά την χορήγηση κροκετίνης (Εικόνα 40).

ατά
τη
μικρο
σκοπι
κή
παρα
τήρη

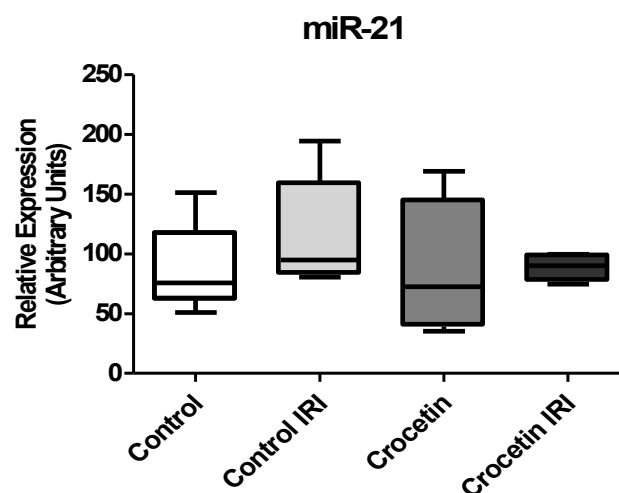


Εικόνα 40: Νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης.

ση των τομών των νεφρών διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις αντιπροσωπευτικές του ισχαιμικού τραύματος. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται σοβαρές βλάβες της πυραμιδικής δομής, εστιακή διάταση αυλού και σημεία φλεγμονής. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υπερ-κυτταρικότητα, αυξημένη διάμεση ίωση και βλάβες στα περισωληναριακά τριχοειδή. Οι βλάβες αυτές οφείλονται στον αυξημένο αριθμό νεκρωτικών/αποπτωτικών κυττάρων, σχηματίζοντας τη χαρακτηριστική δομή του «κουρελιασμένου» (shread) επιθηλίου λόγω του ισχαιμικού σοκ. Οι γενικευμένες αυτές βλάβες παρατηρούνται στους ιστούς και των δύο ομάδων. Είναι όμως εμφανής στην ομάδα της κροκετίνης περιορισμός των στοιχείων φλεγμονής και του βαθμού καταστροφής του επιθηλίου

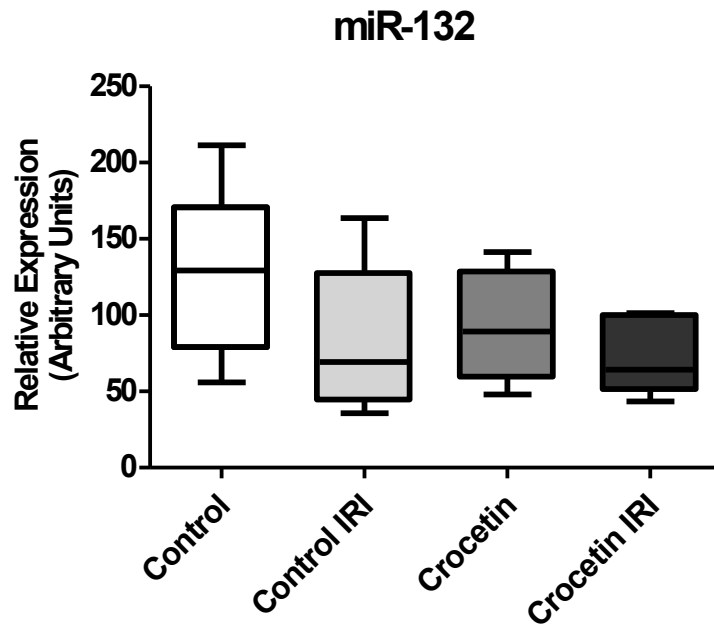
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ miRNAs

Τμήμα του νεφρικού ιστού χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων miRNAs. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα miR-21, miR-127 & miR-132 στις τέσσερις ομάδες πειραματόζων. Μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε η κροκετίνη και στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη ύστερα από το από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά την χορήγηση της κροκετίνης. Στην Εικόνα 41 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε όλες τις ομάδες. Όσον αφορά στο miR-21 δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του στις 4 ομάδες πειραματόζων.



Εικόνα 41: Επίπεδα έκφρασης miR-21 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

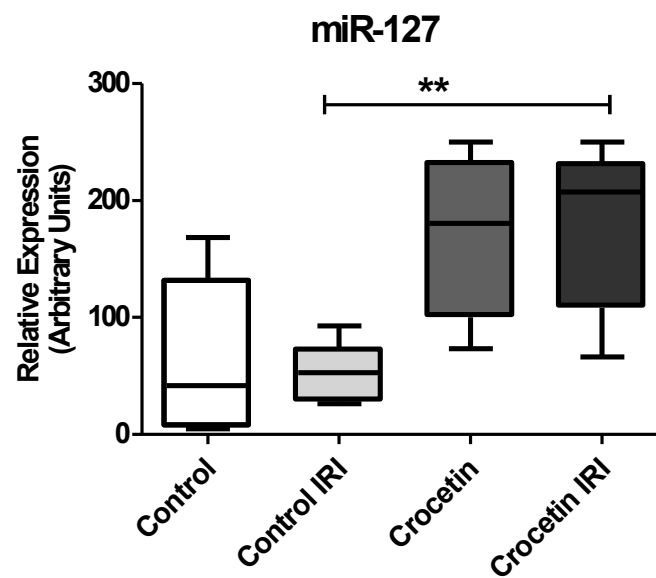
Στην συνέχεια μελετήθηκε το miR-132. Τα επίπεδα έκφρασης του παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 42).



Εικόνα 42: Επίπεδα έκφρασης miR-132 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

Όσον αφορά στο miR-132 δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του στις 4 ομάδες πειραματόζωων.

Στην συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-127 (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Επίπεδα έκφρασης miR-21 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα επίπεδα του miR-127, τα οποία παρουσίασαν σημαντική άνοδο στους νεφρικούς ιστούς που έχουν υποστεί τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E) της ομάδας που έλαβε κροκετίνη, παρά το γεγονός της σύντομης παρουσίας της αντιοξειδωτικής ουσίας μέσα στον οργανισμό των πειραματόζωων.

Συμπερασματικά όπως φαίνεται, τα επίπεδα τόσο του miR-21 όσο και του miR-132 δεν φαίνονται να επηρεάζονται από την χορήγηση κροκετίνης. Αντίθετα, η χορήγηση της κροκετίνης (παρά τη σύντομη παρουσία της στον οργανισμό) φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα του miR-127. Συγκεκριμένα στην ομάδα ζώων που είχε προκληθεί τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E) και έλαβε κροκετίνη τα επίπεδα του miR-127 στον νεφρικό ιστό ήταν στατιστικά υψηλότερα συγκριτικά με την ομάδα που είχε προκληθεί ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E) χωρίς να χορηγηθεί κροκετίνη.

Κεφάλαιο 4^ο:

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της κροκετίνης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Έχει διερευνηθεί από παλιά η προστατευτική δράση καθώς και ο μηχανισμός δράσης της κροκετίνης ενάντια στη γενοτοξικότητα και τις νεοπλαστικές μεταλλάξεις που προκαλούνται από το βενζο(α)πυρένιο (B(a)P). Επεξεργασία της κυτταρικής σειράς C3H10T1/2 με κροκετίνη προκάλεσε αναστολή στη δημιουργία μεταλλάξεων προερχόμενων από το B(a)P, καθώς παρατηρήθηκε ότι όταν η καλλιέργεια περιείχε, οι συχνότητες μετάλλαξης ήταν αρκετά χαμηλότερες από εκείνες σε καλλιέργειες χωρίς κροκετίνη¹⁹. Πειράματα έχουν αποδείξει ότι δεν επάγει την γενοτοξικότητα^{20,21}.

Η κροκετίνη φαίνεται να έχει και αντιτοξική δράση, καθώς φαίνεται να αναστρέφει τοξικότητα που προκαλεί το κυκλοφωσφαμίδιο στην ουροδόχο κύστη²². Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για να διαλευκάνουν το πιθανό ρόλο της κροκετίνης στον καρκίνο²³. Η κροκετίνη έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα ως αντικαρκινικός παράγοντας σε ζωικά μοντέλα και συστήματα κυτταροκαλλιέργειας²⁴. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί να αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7, καρκίνου του μαστού. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί να αναστέλλει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231 και τον πολλαπλασιασμό τους, μέσω ρύθμισης της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο^{25,26}. Η χορήγηση κροκετίνης προκάλεσε αναστολή του πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς AGS (κύτταρα γαστρικού αδενοκαρκινώματος), μέσω απόπτωσης. Ειδικότερα, βρέθηκε καταστολή του

παράγοντα Bcl-2 και αύξηση της έκφρασης του Bax, παραγόντων που ρυθμίζουν την απόπτωση, στα κύτταρα AGS παρουσία κροκετίνης. Στην ίδια έρευνα, δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της εξέλιξης του καρκινικού όγκου παρατηρήθηκε και σε ζωικό μοντέλο με την χορήγηση της κροκετίνης²⁷. Παρόμοια αποτελέσματα και για την κυτταρική σειρά KYSE-150, που αποτελούν πλακώδη κύτταρα καρκινώματος του οισοφάγου. Χορήγηση κροκετίνης για 48 ώρες οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών²⁸.

Σε πρόσφατες μελέτες, η κροκετίνη έχει βρεθεί να βελτιώνει, την επαγόμενη από συσσώρευση β-αμυλοειδούς, έλλειψη εκμάθησης και μνήμης σε διαγονιδιακούς ποντικούς για το Alzheimer, πιθανώς λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντι-αποπτωτικών λειτουργιών της²⁹.

Στην βιβλιογραφία επίσης, αναφέρεται ο ευεργετικός ρόλος του *Crocus Sativus L* και των συστατικών του, ανάμεσα σε αυτά και η κροκετίνη, ως καρδιαγγειακού προστατευτικού παράγοντα στην ισχαιμία-επαναιμάτωση (I/E), υπέρταση, υπερλιπιδαιμία και στον διαβήτη³⁰. Ενώ η επίδραση της κροκίνης στην ισχαιμία / επαναιμάτωση έχει μελετηθεί σε διάφορα όργανα όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, οι νεφροί, το στομάχι και το ήπαρ, περιορισμένες είναι οι αντίστοιχες μελέτες για την κροκετίνη^{31,32}. Το πρωταρχικό παθοφυσιολογικό γεγονός που συμβαίνει σε κυτταρικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής βλάβης είναι η δραματική πτώση στα επίπεδα της ATP. Αυτό με τη σειρά του επιφέρει μια σειρά μορφολογικών, βιοχημικών και φυσιολογικών αναδιαρθρώσεων. Η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο προκαλούνται βλάβες σε μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένων μεμβρανικών λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Μια σειρά από ένζυμα (όπως καταλάσες, υπεροξειδάση δισμουτάσης και υπεροξειδάση γλουταθειόνης) καθώς και

άλλα μόρια (όπως τοκοφερόλες, βιταμίνη c, γλουταθειόνη κλπ.) έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν μικρή προστασία στο κύτταρο. Με βάση αυτό το εύρημα, οι σύγχρονες προσπάθειες επιστημόνων έχουν στραφεί στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων ως εναλλακτικών θεραπειών για τον περιορισμό των ελεύθερων ριζών στον νεφρικό ιστό που έχει τραυματιστεί από τον I / E. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές στην ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του σαφράν και της κροκετίνης - ενός από τα τρία βασικά συστατικά του. Η αντιοξειδωτική δράση της κροκετίνης έχει διερευνηθεί τόσο σε σχέση με χημική τοξικότητα όσο και σε παθολογικές καταστάσεις σε ασθένειες όπως ο καρκίνος ή εκφυλιστικές νόσους, όπως το Alzheimer και ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας.

Μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που διερευνούν την επίδραση αυτής της ουσίας στη νεφρική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμικό σοκ. Αυτές οι μελέτες έχουν γίνει σε αρουραίους και τα αποτελέσματά τους υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της κροκετίνης³³. Με βάση αυτές τις μελέτες, η παρούσα μελέτη χρησιμοποίησε το μοντέλο ισχαιμίας / επαναιμάτωσης σε ποντίκια και προχώρησε στη χορήγηση κροκετίνης και στην συνέχεια αναλύθηκαν βιοχημικές, ιστολογικές και μοριακές παράμετροι ώστε να διαλευκανθεί ο προστατευτικός αυτός ρόλος. Πράγματι, τα αποτελέσματα που παρουσιάζουμε δείχνουν ότι η χορήγηση κροκετίνης άλλαξε σημαντικά τις κλασικές βιοχημικές παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν για την κλινική παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας, όπως τα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνης και ουρικού οξέος στο αίμα.

Οι νεφροί ελέγχουν την ποσότητα και την ποιότητα των υγρών μέσα στον οργανισμό. Παράγουν επίσης ορμόνες και βιταμίνες που είναι απαραίτητες για τις κυτταρικές δραστηριότητες πολλών οργάνων. Όταν οι νεφροί δεν λειτουργούν σωστά, άχρηστα προϊόντα και υγρά συσσωρεύονται στον οργανισμό σε επικίνδυνα

επίπεδα. Τα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνης, ουρικού οξέος και ηλεκτρολυτών στον ορό αποτελούν δείκτες νεφρικής λειτουργίας³⁴. Τα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνης και ουρικού οξέος είναι αυξημένα σε περιπτώσεις νεφρικής βλάβης. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και στο δικό μας μοντέλο, όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα τους 24 ώρες μετά την τεχνητή (I/E) που προκλήθηκε. Η χορήγηση της κροκετίνης μείωσε τα αυξημένα επίπεδα των δεικτών αυτών, καθώς φαίνεται πως αποκαθιστά εν μέρει την νεφρική λειτουργία. Μεταξύ των σημαντικών ουσιών που οι νεφροί συμβάλουν στον έλεγχό τους είναι το νάτριο, το κάλιο, το χλώριο, το ασβέστιο, το φώσφορο και το μαγνήσιο, με την ισορροπία των επιπέδων όλων αυτών να είναι τόσο λεπτή και αλληλεξαρτώμενη που μεταβολές κάποιων, επηρεάζουν και τα επίπεδα των υπολοίπων^{35,36,37,38}. Αποκλίσεις (αυξήσεις ή μειώσεις) των επιπέδων από τις φυσιολογικές τιμές έχουν συσχετισθεί με νεφρικές δυσλειτουργίες. Όσον αφορά στο νάτριο και στο χλώριο, η χορήγηση της κροκετίνης φάνηκε να αυξάνει τα επίπεδα τους, ενώ όσον αφορά στο κάλιο, φώσφορο και μαγνήσιο μείωσε τα επίπεδα τους. Είναι φανερό πως τα επίπεδα όλων των ουσιών που σχετίζονται με την νεφρική λειτουργία μεταβάλλονται σε περιπτώσεις νεφρικής βλάβης και η αυξο-μείωση κάποιας επηρεάζει τα επίπεδα των υπολοίπων με αποτέλεσμα μια γενικότερη απορρύθμιση. Η χορήγηση κροκετίνης φαίνεται να επαναφέρει τα επίπεδα των ουσιών αυτών.

Επιπλέον, με την μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών των νεφρών, διαπιστώσαμε ότι η παρουσία κροκετίνης ήταν σε θέση να αναστείλει σημαντικά την επιθηλιακή καταστροφή και να περιορίσει τον αριθμό νεκρών / αποπτωτικών κυττάρων. Προφανώς, αυτή η αναστροφή της ιστολογικής εικόνας οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση της κροκετίνης που έχει προστατεύσει έναν μεγάλο αριθμό επιθηλιακών κυττάρων (I/E) από νέκρωση / απόπτωση.

Τα miRNAs είναι ενδογενή μικρά μη κωδικά (nc)RNAs, με μόλις 22 νουκλεοτίδια μήκος, κατά μέσο όρο, που είναι κρίσιμα για τη ρύθμιση γονιδίων σε μια ευρεία ποικιλία ευκαρυωτικών ειδών από φυτά μέχρι ζώα³⁹. Τα miRNAs lin-4 και let-7 ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και βρέθηκαν να ενεργοποιούν έναν καταρράκτη γονιδιακής έκφρασης μέσω αρνητικής ρύθμισης στα αναπτυξιακά στάδια στον *Caenorabditis elegans*⁴⁰. Η ανάλυση του γονιδιώματος των θηλαστικών έδειξε ότι τα miRNAs αντιπροσωπεύουν μία από τις πιο άφθονες ομάδες ρυθμιστικών μορίων. Στον άνθρωπο περισσότερα από δύο χιλιάδες miRNAs έχουν εντοπιστεί έως τώρα και υπάρχουν καταγεγραμμένα στη βάση δεδομένων miRBase⁴¹. Τα miRNAs ασκούν τη δράση τους μέσω αλληλεπίδρασης με τους mRNA στόχους τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προφίλ έκφρασης των miRNAs. Αναφερόμαστε σε μια οικογένεια μικρομοριακών RNA που δεν κωδικοποιούνται αλλά εμπλέκονται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Τα τελευταία χρόνια, οι μελέτες συνεχώς αυξάνονται, υποδεικνύοντας πόσο σημαντικό είναι ο ρόλος αυτών των μικρών μορίων στη ρύθμιση όλων των κυτταρικών λειτουργιών. Πράγματι, ένα πλήθος μελετών συσχετίζει τα επίπεδα έκφρασης ενός miRNA με μια ειδική παθολογική κατάσταση. Μεταξύ αυτών, μελέτες αναφέρουν την αλλοιωμένη έκφραση των miR-21, miR-127 και miR-132, τα οποία επελέγησαν να εξερευνηθούν στο μοντέλο μας^{42,43,44}. Από αυτά, το miR-127 ήταν το πιο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR-127, έδειξαν σημαντική αύξηση στον ιστό των νεφρών που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με την ομάδα I / E της ομάδας που έλαβε θεραπεία με κροκετίνη. Μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι αυτό το miRNA προωθεί το σχηματισμό συμπλοκών εστιακής προσκόλλησης και ενισχύει τις διασυνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Κατά συνέπεια, παρεμποδίζεται η ενδοκύτωση, η οποία δρα προφυλακτικά για τα επιθηλιακά κύτταρα⁴⁵.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία παρουσιάζει αποτελέσματα που υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της κροκετίνης στη νεφρική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία / επαναιμάτωσης. Επιπλέον, φαίνεται ότι αυτή η δράση περιλαμβάνει την επαγωγή έκφρασης miR-127⁴⁶. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διερευνηθεί το ενδεχόμενο προληπτικής δράσης αυτής της ουσίας (δηλαδή η χορήγηση κροκετίνης πριν από την πρόκληση σοκ I / E) και η επανειλημμένη χορήγησή της μετά το σοκ για να καθοριστεί σε ποιο βαθμό αυτή η ουσία είναι ικανή να αναστέλλει τις βλάβες που προκαλούνται. Ωστόσο, αυτές οι προτάσεις μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για μελλοντικές εργασίες για να αποδειχθεί ότι τα miRNAs έχουν τη δυνατότητα να είναι αποτελεσματικοί βιοδείκτες και θεραπευτικοί στόχοι για μεταγενέστερη θεραπεία. Ως εκ τούτου, τα miRNAs αντιπροσωπεύουν νέους θεραπευτικούς στόχους για μια εξουθενωτική ασθένεια που συνεχίζει να αυξάνεται σε παγκόσμιο επίπεδο και για την οποία λείπουν πλήρως αποτελεσματικές θεραπείες. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από πρόσφατες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί θα μπορούσε πιθανά η κροκετίνη σε συνδυασμό με επιλεγμένα miRNAs να χορηγείται με την τεχνολογία των νανοσωματιδίων⁴⁷ σε περιπτώσεις νεφρικής δυσλειτουργίας/ βλάβης.

Με την παρούσα μελέτη προκαλώντας τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E) σε μύες και έπειτα από χορήγηση της κροκετίνης, είδαμε περιορισμό των στοιχείων φλεγμονής και του βαθμού καταστροφής του επιθηλίου, αλλαγή βιοχημικών παραμέτρων και μοριακού προφίλ. Μελλοντικές μελέτες μένει να διαλευκάνουν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η κροκετίνη δρα ευεργετικά επηρεάζοντας όλα τα επίπεδα (μοριακά, ιστολογικά & βιοχημικά).

Κεφάλαιο 5^ο:

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lauralee Sherwood, Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου, από τα κύτταρα στα συστήματα, 8^η έκδοση, Κεφάλαιο 14, «Το Ουροποιητικό Σύστημα», σελ. 637-692.
2. Κουλακιώτης Ν.Σ. et al, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής, 2009, Μεταπτυχιακή Διατριβή με θέμα: Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό βιοδραστικών συστατικών του *Crocus sativus* L. και άλλων ενδημικών taxa.
3. Δήμητρα Χ. et al, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής, 2010, Διδακτορική Διατριβή με θέμα: Συμβολή στον χαρακτηρισμό και στη διερεύνηση βιολογικών ιδιοτήτων των στύλων των ειδών του γένους *Crocus*.
4. Olivia Costantina Demurtas et al, May 2018, *Plant Physiology*, Candidate Enzymes for Saffron Crocin Biosynthesis Are Localized in Multiple Cellular Compartments.
5. Fenghua Chai et al, *Microb Cell Fact.* Mar 2017, Heterologous biosynthesis and manipulation of crocetin in *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Liang Xi et al, *Natural product communications*, January 2006, Pharmacological properties of crocetin and crocin (digentiobiosyl ester of crocetin) from saffron.
7. William G. Gutheil et al, *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jan, Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer.
8. Wang Y et al, *Shock.* 2012 Jul., Protective effect of crocetin on hemorrhagic shock-induced acute renal failure in rats.
9. JongUn Lee et al, *Electrolyte Blood Press.* 2008 Jun., Nitric Oxide in the Kidney : Its Physiological Role and Pathophysiological Implications.
10. Zeynab Mohamadi Yarijani et al, *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Jul., Crocin has anti-inflammatory and protective effects in ischemia-reperfusion induced renal injuries.
11. Cristiana PistolTanase et al, *Molecular Pathology of Pituitary Adenomas* 2012, Pages 91-96, MicroRNAs.
12. Bing Liu et al, *Brief Bioinform.* 2014 Jan, Identifying miRNAs, targets and functions.

13. Jacob O'Brien et al, *Front. Endocrinol.*, 03 August 2018, Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.
14. Samuel Saal et al, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2009, MicroRNAs and the kidney: coming of age.
15. Elia Aguado-Fraile et al, The Chinese University of Hong Kong, September 4, 2012, miR-127 Protects Proximal Tubule Cells against Ischemia/ Reperfusion: Identification of Kinesin Family Member 3B as miR-127 Target.
16. Roel Bijkerk et al, the American Physiological Society, 2018, MicroRNA-132 controls water homeostasis through regulating MECP2-mediated vasopressin synthesis.
17. Roel Bijkerk et al, *Official Journal of the International Society of Nephrology*, June 2016 Volume 89, Issue 6, Pages 1268–1280, Silencing of microRNA-132 reduces renal fibrosis by selectively inhibiting myofibroblast proliferation.
18. Eduardo Andrés-León et al, *Database (Oxford)*. 2015; 2015: bav035., Published online 2015 Apr 8, miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA–mRNA targets.
19. Chang, W.C., et al., Inhibitory effect of crocetin on benzo(a)pyrene genotoxicity and neoplastic transformation in C3H10T1/2 cells. *Anticancer Res*, 1996. 16(6B): p. 3603-8.
20. Bostan, H.B., S. Mehri, and H. Hosseinzadeh, Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2017. 20(2): p. 110-121.
21. Ozaki, A., et al., Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food Chem Toxicol*, 2002. 40(11): p. 1603-10.
22. Nair, S.C., K.R. Panikkar, and R.K. Parthod, Protective effects of crocetin on the bladder toxicity induced by cyclophosphamide. *Cancer Biother*, 1993. 8(4): p. 339-43.
23. Gutheil, W.G., et al., Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012. 13(1): p. 173-9.
24. Moradzadeh, M., et al., Anti-tumor effects of crocetin and related molecular targets. *J Cell Physiol*, 2018. 233(3): p. 2170-2182.

25. Chryssanthi, D.G., et al., Crocetin inhibits invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells via downregulation of matrix metalloproteinases. *Planta Med*, 2011. 77(2): p. 146-51.
26. Chryssanthi, D.G., et al., Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. *Anticancer Res*, 2007. 27(1A): p. 357-62.
27. Bathaie, S.Z., et al., Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. *Biochem Cell Biol*, 2013. 91(6): p. 397-403.
28. Li, S., et al., Anticancer effects of crocetin in human esophageal squamous cell carcinoma KYSE-150 cells. *Oncol Lett*, 2015. 9(3): p. 1254-1260.
29. Zhang, J., et al., Crocetin attenuates inflammation and amyloid- β accumulation in APPsw transgenic mice. *Immunity & ageing : I & A*, 2018. 15: p. 24-24.
30. Hatzigiapiou, K. and G.I. Lambrou, The Protective Role of *Crocus Sativus* L. (Saffron) Against Ischemia- Reperfusion Injury, Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Nature Opposing Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rev*, 2018. 14(4): p. 272-289.
31. Akbari, G., S. Ali Mard, and A. Veisi, A comprehensive review on regulatory effects of crocin on ischemia/reperfusion injury in multiple organs. *Biomed Pharmacother*, 2018. 99: p. 664-670.
32. Hosseinzadeh, H., et al., Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci*, 2005. 8(3): p. 387-93.
33. Wang, Y., et al., Protective effect of crocetin on hemorrhagic shock-induced acute renal failure in rats. *Shock*, 2012. 38(1): p. 63-7.
34. Gowda, S., et al., Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci*, 2010. 2(4): p. 170-3.
35. Ostermann, M.E., et al., Metabolic alkalosis in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18(11): p. 2442-8.
36. Palmer, B.F. and D.J. Clegg, Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Adv Physiol Educ*, 2016. 40(4): p. 480-490.
37. Suki, W.N. and L.W. Moore, Phosphorus Regulation in Chronic Kidney Disease. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*, 2016. 12(4 Suppl): p. 6-9.
38. Curry, J.N. and A.S.L. Yu, Magnesium Handling in the Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018. 25(3): p. 236-243.

39. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009. 136(4): p. 642-55.
40. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-54.
41. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(Database issue): p. D152-7.
42. Hou, J. and D. Zhao, MicroRNA regulation in renal pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(7): p. 13078-92.
43. Saal, S. and S.J. Harvey, MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. 18(4): p. 317-23.
44. Aguado-Fraile, E., et al., MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury. *Nefrologia*, 2013. 33(6): p. 826-34.
45. Aguado-Fraile, E., et al., miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e44305.
46. Ichii, O. and T. Horino, MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. *J Toxicol Pathol*, 2018. 31(1): p. 23-34.
47. 29. Yang, X., Design and optimization of crocetin loaded PLGA nanoparticles against diabetic nephropathy via suppression of inflammatory biomarkers: a formulation approach to preclinical study. *Drug Deliv*, 2019. 26(1): p. 849-859.
48. Abuelo J. G. Normotensive ischemic acute renal failure. *The New England Journal of Medicine* 2007;357(8):797–805.
49. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *American Journal of Kidney Diseases* 2003;41(5):1074–1087.
50. O'Connor P. M. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006;33(10):961–967.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Η γεωγραφική εντόπιση του ανθρώπινου Ουροποιητικού Συστήματος μέσα στο σώμα και τα βασικά δομικά ανατομικά στοιχεία που το αποτελούν. _____ 4
- Εικόνα 2: Ανατομική περιγραφή ανδρική (αριστερά) και γυναικείας (δεξιά) ουρήθρας, σε σχήματα. _____ 5
- Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ανατομικής θέσης της ουροδόχου κύστεως, αριστερά στον άνδρα και δεξιά στη γυναίκα. _____ 6
- Εικόνα 4: Η πορεία των Ουρητήρων οπισθοπεριτοναϊκά, αριστερά στον άνδρα και δεξιά στη γυναίκα. Πρόσθια όψη. Οι Ουρητήρες αναπαρίστανται ως μακρά σωληναρικά όργανα με κίτρινο χρώμα. _____ 7
- Εικόνα 5: Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση των επιμέρους δομικών συστατικών στοιχείων ενός φυσιολογικού νεφρού ενήλικα. (α) Πρόσθια όψη, (β) Πρόσθια έσω όψη, (γ) Πρόσθια επιφάνεια με τους νεφρικούς κάλυκες και (δ) Πρόσθια όψη, μετά από στεφανιαία διατομή, κατά την οποία είναι διακριτές οι νεφρικές πυραμίδες. _____ 8
- Εικόνα 6: Η δομή και η θέση ενός τυπικού νεφρώνα μέσα στον φυσιολογικό, υγιή νεφρό ενήλικα. _____ 9
- Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός τυπικού νεφρώνα. Τα βέλη (1-4) δείχνουν την πορεία των υγρών μέσα στον νεφρώνα. _____ 11
- Εικόνα 8: Η Πειραματική Διήθηση, Σωληναριακή Επαναρρόφηση και Σωληναριακή Έκκριση: γραφική απεικόνιση και οι μεταξύ τους σχέση στην παρακράτηση ή στη αποβολή μιας ουσίας από τον οργανισμό. _____ 12
- Εικόνα 9: Η πειραματική διήθηση είναι το πρώτο βήμα για την παραγωγή των ούρων σε έναν τυπικό, υγιή νεφρώνα, και είναι η συνισταμένη της δράσης τριών διαφορετικών δυνάμεων: της Υδροστατικής Πίεσης, της Κολλοειδοσμοτικής Πίεσης, και της Υδροστατικής Πίεσης στην Κάψα του Bowman. _____ 13
- Εικόνα 10: Η πειραματική διήθηση είναι το πρώτο βήμα για την παραγωγή των ούρων σε έναν τυπικό, υγιή νεφρώνα, και είναι η συνισταμένη της δράσης τριών διαφορετικών δυνάμεων: της Υδροστατικής Πίεσης, της Κολλοειδοσμοτικής Πίεσης, και της Υδροστατικής Πίεσης στην Κάψα του Bowman. _____ 14
- Εικόνα 11: Μία πολύ απλή, αδρή απεικόνιση του μοντέλου της επαναρρόφησης συγκεκριμένων μορίων και ηλεκτρολυτών από τους νεφρούς. Η επαναρρόφηση αυτή παρουσιάζει εκλεκτικότητα, τόσο ανάλογα με το ποιες ουσίες μπορούν να επαναρροφηθούν, όσο και με το ποιες μεταβολικές συνθήκες ευνοούν αυτή την επαναρρόφηση. Να τονιστεί εδώ ότι κάθε είδος μορίου/ηλεκτρολύτη επαναρροφάται με διαφορετικούς μοριακούς διαμεσολαβητές, με διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς και κάτω από διαφορετικές χημικές και ιοντικές συνθήκες. _____ 15
- Εικόνα 12: Η Σωληναριακή Έκκριση αφορά πολλά διαφορετικά μόρια και ουσίες και γίνεται με κατεύθυνση από τα περισωληναριακά τριχοειδή προς στον σωληναριακό αυλό. Συμβολισμοί εικόνας: OA, organic anion; OC, organic cation; K, potassium; αKG, α-ketoglutarate; Na, sodium; NaDC3, renal sodium-dependent dicarboxylate transporter. _____ 17
- Εικόνα 13: Τα δύο φυτικά είδη από τα οποία παράγεται η Κροκετίνη. Πάνω, το φυτό Κρόκος ο ήμερος (*Crocus sativus* L.) _____ 19
- Εικόνα 14: Απεικόνιση της χημικής δομής του μορίου της Κροκετίνης (αλλιώς και 8,8'- διαποκαροτενιο8,8'- διοικού οξέος). Το μόριο αποτελείται από 20 άτομα Άνθρακα, στις θέσεις C-2, C-6, C-11 και C-15 υπάρχουν διακλαδώσεις με μεθυλομάδες (- CH₃). _____ 21
- Εικόνα 15: Ένα από τα επικρατέστερα μοντέλα της σύγχρονης βιβλιογραφίας που περιγράφει σε βήματα τη βιοσυνθετική πορεία της Κροκετίνης, μέσα στους φυτικούς ιστούς του Κρόκου. Με κόκκινο χρώμα, σημαίνονται τα ένζυμα των αντιδράσεων. _____ 24
- Εικόνα 16: (a) Μία ενδεικτική, λεπτομερέστερη γραφική απεικόνιση της βιοσυνθετικής πορείας της Κροκετίνης μέσα στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. (b) και (c): δύο

- προτεινόμενες διαφορετικές σειρές τοποθέτησης των αντίστοιχων γονιδίων επάνω στον βέκτορα, για την παραγωγή Κροκετίνης *in vitro*. _____ 25
- Εικόνα 17: Η αντικαρκινική δράση της Κροκετίνης. _____ 26
- Εικόνα 18: Η Κροκετίνη είναι ένα μόριο με ταχεία απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα στους βιολογικούς ιστούς ανθρώπου και πειραματόζωων. Εδώ οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι για δοσολογία 20, 40 και 80 mg/kg βάρους σώματος αντίστοιχα. _____ 27
- Εικόνα 19: Σημαντικές εργαστηριακές παράμετροι που προκύπτουν από τη χορήγηση Κροκίνης και Κροκετίνης σε ζωικά μοντέλα. Οι παράμετροι αφορούν τον τρόπο λήψης της ουσίας και τη δοσολογία/συχνότητα, και τα αποτελέσματα ομαδοποιούνται ανά νοσολογική οντότητα. _____ 28
- Εικόνα 21: (Α) Επίπεδα Κρεατινίνης και (Β) Επίπεδα Αζώτου Ουρίας στο πλάσμα του αίματος στο τέλος της περιόδου ανάνηψης, σε ποντικούς που υπέστησαν νεφρική ισχαιμία/επαισιμότητα και τούς χορηγήθηκε Κροκίνη (συγγενής ουσία της Κροκετίνης) στα μηδέν (I/R), 100, 200 και 400 mg/kg (I/R + C) σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (sham group). _____ 30
- Εικόνα 20: Οι επιδράσεις της Κροκετίνης στη νεφρική βλάβη, σε ποντικούς που υπέστησαν αιμορραγικό σοκ. Τα επίπεδα Κρεατινίνης (Α) και Αζώτου Ουρίας (Β) στο πλάσμα του αίματος στο χρόνο T0 (πριν την αιμορραγία) και στο χρόνο T210 (2 ώρες μετά από την ανάνηψη από την αιμορραγία). _____ 30
- Εικόνα 22: Τα πειραματόζωα που λαμβάνουν Κροκετίνη, ως θεραπευτική αντιμετώπιση οξέων αιμορραγικών καταστάσεων παρουσιάζουν μεταξύ άλλων και αύξηση στο NO που εκκρίνεται από τους νεφρούς (renal NO). Εδώ, αριστερά και κέντρο, οι σπουδαιότερες εξωνεφρικές (extrarenal) και ενδονεφρικές (intrarenal) δράσεις του NO που εκκρίνεται από τους νεφρούς (renal NO) και δεξιά οι φυσιολογικές αποκρίσεις που δίνουν οι δράσεις αυτές ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του Συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης Αλδοστερόνης. _____ 31
- Εικόνα 23: Αδρή ανασκόπηση των βημάτων που ακολουθούνται σε ένα τυπικό εργαστήριο για την παραγωγή ενός μορίου miRNA, καθώς και των κυτταρικών διαμερισμάτων στα οποία λαμβάνει χώρα το κάθε βήμα. Pre-miRNA: precursor miRNA, RISC, RNA-induced silencing complex, RNAa: RNA activation. _____ 33
- Εικόνα 24: Λεπτομερής ανασκόπηση του βιοσυνθετικού κύκλου παραγωγής ενός τυπικού mRNA. Η διαδικασία ξεκινάει με την παραγωγή του pri-miRNA μετάγραφου. Το σύμπλεγμα μικροκατεργασίας (microprocessor complex), αποτελούμενο από την κρίσιμη περιοχή που θέλουμε να τροποποιήσουμε την έκφρασή της (εδώ, έστω η περιοχή: Droscha and DiGeorge Syndrome Critical Region 8, DGCR8) κόβει το pri-miRNA προς παραγωγή ενός μορίου pre-miRNA. Το pre-miRNA που θα παραχθεί βγαίνει στο κυτταρόπλασμα, με μοριακό μηχανισμό που εξαρτάται από την Exportin5/RanGTP, και υφίσταται κατάλληλη επεξεργασία ώστε να παραχθεί το ώριμο δίπολο μόριο του miRNA. Τέλος, είτε η 5' αλυσίδα, είτε η 3' αλυσίδα του ώριμου δίπολου μορίου του miRNA φορτώνεται απάνω στον πρωτεϊνικό υποδοχέα τύπου Argonaute (AGO) για να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο επαγωγής της γονιδιακής αποσίωσης του miRNA (miRNA-induced silencing complex, miRISC). Η πορεία αυτή ακολουθείται κατά την Κανονική (Canonical pathway) πορεία βιοσύνθεσης του miRNA. Κατά τη Μη-Κανονική πορεία (Non-Canonical pathway) απ' την άλλη πλευρά, ακολουθείται εντελώς άλλη οδός που ξεκινάει με το αρχικό κόψιμο του small hairpin RNA (shRNA) από το σύμπλεγμα μικροκατεργασίας (microprocessor complex) και την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα πάλι με Exportin5/RanGTP-εξαρτώμενο τρόπο, και λήγει με την αποαδενυλίωση του mRNA-στόχου _____ 34
- Εικόνα 25: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR-21 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 11; 11 C). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. _____ 35

Εικόνα 26: Ο δείκτης miR-21 ανήκει σε μία ευρεία γκάμα ανοσολογικών δεικτών που εκφράζονται ταυτόχρονα στον νεφρό του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου. Η επιλογή τέτοιων δεικτών στα πειράματα μελέτης, μάς δίνει τη δυνατότητα να βγάλουμε συμπεράσματα που δεν θα αφορούν μόνο τους νεφρούς των πειραματόζωων, αλλά που θα έχουν πιθανότατα εφαρμογή και στον άνθρωπο. _____ 36

Εικόνα 27: Ο δείκτης miR-21 ανήκει επίσης σε μία γκάμα ανοσολογικών δεικτών που εκφράζονται στη διαβητική νεφροπάθεια. Είναι πιθανόν να εκφράζεται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις των νεφρών, απαιτείται όμως στο κομμάτι αυτό περισσότερη έρευνα. _____ 36

Εικόνα 28: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR-127 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 12; 12 F1). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. _____ 37

Εικόνα 29: Πίνακας με τα miRNAs που έχει βρεθεί πως εκφράζονται σε NRK-52E θητικά κύτταρα πειραματόζωων που υποβλήθηκαν σε συνθήκες H/R, δηλαδή Υποξία/Επανοξυγόνωσης (Hypoxia/Reoxygenation). Οι συνθήκες αυτές μας ενδιαφέρουν στη μελέτη μας, γιατί και κατά την Ισχαιμία/Επαναιμάτωση (το σύνδρομο που μελετά η παρούσα Διδακτορική Διατριβή) ουσιαστικά τα κύτταρα του νεφρικού παρεκχύματος υπόκεινται σε Υποξία (κατά την αιμορραγική φάση) και σε Επαναιμάτωση (κατά την φάση της ανάνηψης από την αιμορραγία). Βλέπουμε λοιπόν πως ανάμεσα στους εκφραζόμενους δείκτες είναι και το miR-127, που επιλέξαμε για μελέτη στην παρούσα Διατριβή. _____ 38

Εικόνα 30: Τα γραφήματα παριστάνουν την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του δείκτη miR-127, τόσο κατά την Υποξία/Επανοξυγόνωση (in vitro) όσο και κατά την Ισχαιμία/Επαναιμάτωση (in vivo). (A) Η χρονική διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του mo-miR-127: πάνω: σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων αρουραίου που είναι NRK-52E θητικά, και κάτω: σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων ανθρώπου που είναι HK-2 θητικά. Τα πειραματόζωα (αρουραίοι, άνθρωποι) υποβλήθηκαν σε συνθήκες Υποξία/Επανοξυγόνωσης σύμφωνα με ειδικά εργαστηριακά πρωτόκολλα. (B) Η χρονική διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του mo-miR-127 σε κύτταρα νεφρικού παρεκχύματος αρουραίου που υποβλήθηκε σε συνθήκες Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης. _____ 39

Εικόνα 31: Αναπαράσταση της ακριβούς θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR32 πάνω σε χρωμόσωμα ποντικού (θέση 11; 11 B5). Η απεικόνιση αφορά χρωμόσωμα ποντικού και όχι ανθρώπου, γιατί σε ποντικό έγιναν και οι μετρήσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. _____ 40

Εικόνα 32: Η αποσιώπηση του miR-132 επάγει τη διούρηση σε πειραματόζωα. (A) Τα αποτελέσματα της αποσιώπησης του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για το miR-132, σε απώλεια βάρους, 24 ώρες μετά από ενδοφλέβια έγχυση του antagomir-132. Τα πειραματόζωα ήταν σε κανονικά κλουβιά. (B) Τα πειραματόζωα κλείστηκαν μέσα σε μεταβολικά κλουβιά (για τον πλήρη διαχωρισμό των ούρων από τα κόπρανα) 24 ώρες πριν την ενδοφλέβια έγχυση και 24 ώρες μετά από την έγχυση, θανατώθηκαν. (C) Η έκφραση του miR-132 στους νεφρούς μετά την έγχυση του antagomir-132 (προσδιορισμός με RT-PCR), (D) Τα αποτελέσματα της απώλειας βάρους (λόγω διούρησης) σε ποντικούς που έγινε αποσιώπηση του γονιδίου miR-132, 24 ώρες μετά την έγχυση. (E και F): 24 ώρες μετά από την έγχυση του antagomir-132, η έκκριση των ούρων είναι υψηλότερη, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. _____ 41

Εικόνα 33: Η κατανομή του μεγέθους των 3' αμετάφραστων περιοχών (3'-UTRs) για τον άνθρωπο, τον ποντικό και τον αρουραίο. Άνθρωπος: 142bp, Ποντικός: 131bp, Αρουραίος: 122bp. _____ 42

Εικόνα 34: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματοζώων, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control),

ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζώων μετά την επίδραση της κροκετίνης.	46
Εικόνα 35: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματοζώων, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control), ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζώων μετά την επίδραση της κροκετίνης.	47
Εικόνα 36: Βιοχημικές παράμετροι που αναλύθηκαν στο περιφερικό αίμα των πειραματοζώων, 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι τιμές για την ομάδα ελέγχου (control), ενώ με λευκό χρώμα η ομάδα των ζώων μετά την επίδραση της κροκετίνης.	48
Εικόνα 37: Φυσιολογικός νεφρικός ιστός.	49
Εικόνα 38: Νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E).	49
Εικόνα 39: Νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 45 λεπτά μετά τη χορήγηση κροκετίνης.	50
Εικόνα 40: Νεφρικός ιστός ύστερα από τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/E), 24 ώρες μετά τη χορήγηση κροκετίνης.	50
Εικόνα 41: Επίπεδα έκφρασης miR-21 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.	52
Εικόνα 42: Επίπεδα έκφρασης miR-132 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.	53
Εικόνα 43: Επίπεδα έκφρασης miR-21 σε νεφρικό ιστό στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ζώων που προκλήθηκε τεχνητή ισχαιμία/επαναιμάτωση, στην ομάδα που χορηγήθηκε κροκετίνη και στην ομάδα ζώων που χορηγήθηκε κροκετίνη μετά την πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.	54