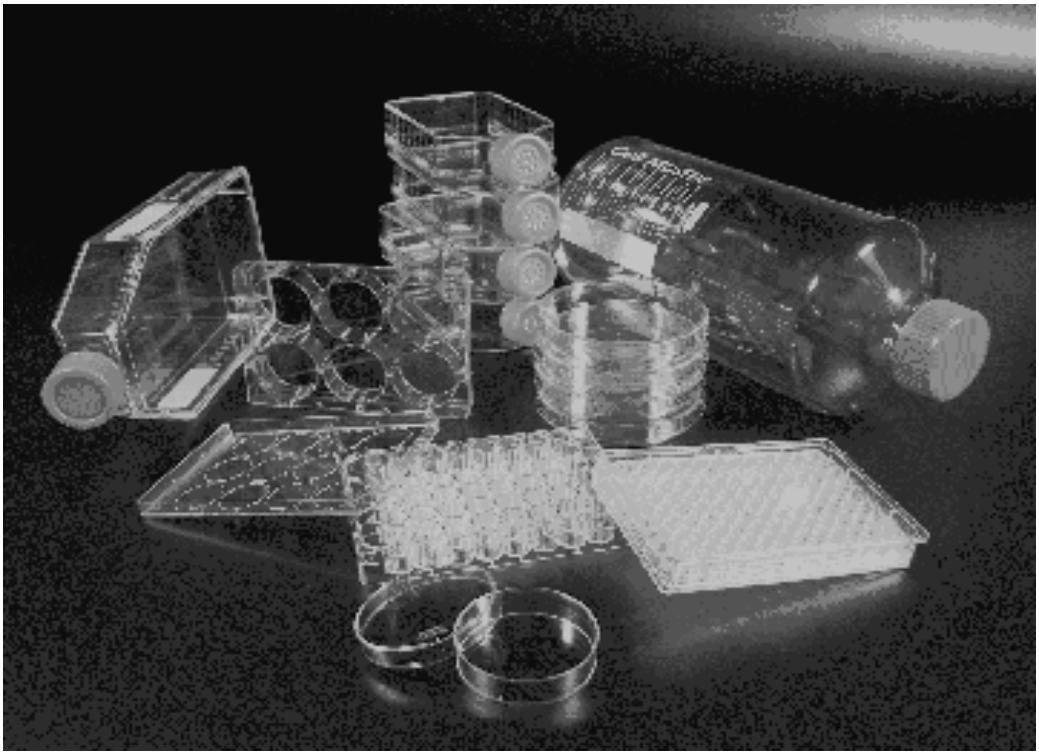
ΓΙΩΡΓΟΣ Θ. ΜΙΛΕΣΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στην έκκριση κυτταροκινών και στην έκφραση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα



ΑΘΗΝΑ 2006

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
Π.Μ.Σ. ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στην έκκριση κυτταροκινών και στην έκφραση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, *Αναπληρώτρια Καθηγήτρια*

Μέλη

Νομικός Τζώρτζης, *Λέκτορας*

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, *PhD Επιστημονικός Συνεργάτης*

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 2005-2006 στο εργαστήριο Χημείας και Βιοχημείας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών. Την επίβλεψη της εργασίας είχε η καθηγήτρια κα. Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, την οποία ευχαριστώ θερμά για τις επιστημονικές συμβουλές, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς την κα Ελισάβετ Φραγκοπούλου, επιστημονικό συνεργάτη του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για τις πολύτιμες υποδείξεις, την αμέριστη στήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους κ.κ. Τζώρτζη Νομικό, Λέκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και Χαράλαμπο Καραντώνη, επιστημονικό συνεργάτη του πανεπιστημίου, για τις επιστημονικές συμβουλές και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Η παρούσα μελέτη αφιερώνεται στους γονείς και στον αδερφό μου, που στήριξαν κάθε προσπάθειά μου.

Συντμήσεις

AA	*αραχιδονικό οξύ*
ACTH	*φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη*
AGEP	*προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης*
AngII	*αγγειοτενσίνη ΙΙ*
ANSA	*αμινο-ναφθολο-σουλφουνικό οξύ*
AP-1	*πρωτεϊνη ενεργοποιήσης-1*
APCs	*αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα*
APRF	*παράγοντας απάντησης οξείας φάσης*
ATRA	*all trans ρετινοϊκό οξύ*
bFGF	*αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών*
BSA	*βοδινή αλβουμίνη ορού*
CCR2	*υποδοχέας CC χημειοκινών-2*
COX-2	*κυκλο-οξυγενάση-2*
CREBP	*μεταγραφικός παράγοντας απόκρισης στο cAMP*
CRF	*παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης*
CRP	*C-αντιδρώσα πρωτεϊνη*
DARC	*υποδοχέας αντιγόνου Duffy για χημειοκίνες*
DHA	*δοκοσαεξανοϊκό οξύ*
EDCF	*ενδοθηλιακός συσταλτικός παράγοντας*
EFA	*απαραίτητα λιπαρά οξέα*
ELISA	*ανοσοενζυμική μέθοδος*
EPA	*εικοσαπεντανοϊκό οξύ*
ET-1	*ενδοθηλίνη-1*
FCS	*ορός νεογνού από μόσχο*
G-CSF	*παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων*
GM-CFS	*παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων*
HMCL	*σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων*
HRP	*υπεροξειδάση χρένου*
HT	*υδροξυ-τυροσόλη*
HUVEC	*ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλιαίας φλέβας*
ICAM-1	*διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης-1*
IGF-1	*αυξητικός παράγοντας-1 όμοιος της ινσουλίνης*
IL-	*ιντερλευκίνη*
IL-1ra	*ανταγωνιστής υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1*

INF-γ	*ιντερφερόνη-γ*
IRF-1	*ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης-1*
ITS	*ανθρώπινη μεταφοράση για την ινσουλίνη με σεληνιώδες νάτριο*
Jak	*κινάσες Janus*
LCAT	*ακυλο-τρανσφεράση λεκιθίνης χοληστερόλης*
LCT	*μακράς αλύσου λιπαρά οξέα*
LDL	*χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη*
LIF	*ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας*
LNA	*α-λινολενικό οξύ*
LPS	*λιποπολυσακχαρίτης*
LT-	*λευκοτριένιο*
M-CFS	*παράγοντας διέγερσης μακροφάγων*
MCP-1	*χημειοτακτική πρωτεϊνη μονοκυττάρων-1*
MCT	*μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα*
MFA	*μονοακόρεστα λιπαρά οξέα*
MIF	*ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων*
MIP-	*φλεγμονώδης πρωτεϊνη μακροφάγων*
MMP-9	*μεταλλοπρωτεϊνάση-9*
NF-IL6	*μεταγραφικός παράγοντας για την έκφραση της IL-6*
NF-κB	*μεταγραφικός παράγοντας-κB*
OE	*ελευροπαϊνη*
OVW	*απόνερο κατεργασίας ελιάς*
oxLDL	*οξειδωμένη LDL*
ΟΠΛ	*ολικά πολικά λιποειδή*
PAF	*παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων*
PAF-AH	*ακέτυλο-υδρολάση του παράγιντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων*
PAI-1	*αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου*
PBS	*ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών*
PCR	*αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης*
PDGF	*αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων*
PG-	*προσταγλαδίνη*
PKC	*πρωτεϊνική κινάση C*
PL-	*φωσφολιπάση*
RANTES	*χημειοκίνη εκφραζόμενη και παραγώμενη από Τ κύτταρα μετά από ενεργοποίηση*
RD	*αραιωτικό αντιδραστήριο*
ROS	*δραστικές ενώσεις οξυγόνου*
RT	*αντίστροφη μεταγραφή*

SFM	*θρεπτικό μέσο χωρίς ορό*
sIL-6R	*διαλυτός υποδοχέας ιντερλευκίνης-6*
SOCS3	*καταστολέας μεταγωγής σήματος κυτταροκινών-3*
STAT-	*μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής*
TF	*ιστικός παράγοντας*
TGF-β	*αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού*
TIMP-	*ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνάσης*
TNF-α	*παράγοντας νέκρωσης όγκων-α*
TPCK	*1-χλωρο-3-(4-τοσυλάμιδο)-4-φαινυλο-2-βουτανόνη*
Tx-	*θρομβοξάνη*
VCAM-1	*μόρια προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1*
VEGF	*αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου*
VLDL	*πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ

1.1 Περί Μεσογειακής Δίαιτας..... 1

1.2 Ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Διατροφής στα καρδιαγγειακά νοσήματα..... 2

1.3 Συστατικά της Μεσογειακής δίαιτας και οι βιολογικές τους δράσεις..... 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

2.1 Χημική σύσταση του ελαιολάδου..... 9

2.2 Βιολογικές δράσεις συστατικών του ελαιολάδου..... 14

2.2.1 Επιδημιολογικές μελέτες..... 14

2.2.2 In vitro μελέτες..... 15

2.2.3 In vivo και ex vivo μελέτες..... 18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΝΕΦΡΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

3.1 Δομή και φυσιολογία νεφρού..... 22

3.1.1 Νεφρώνας..... 23

3.1.2 Σύστημα αθροιστικών σωληναρίων..... 26

3.1.3 Παρασπειραματική συσκευή..... 27

3.2 Φυσιολογικές λειτουργίες του νεφρού..... 27

3.3 Χαρακτηριστικά νεφρικών παθήσεων..... 28

3.4 Φλεγμονή του σπειράματος..... 30

3.4.1 Η φλεγμονώδης διαδικασία..... 30

3.4.2 Κύτταρα και παράγοντες της φλεγμονώδους διαδικασίας..... 32

3.4.3 Ιντερλευκίνη 1..... 35

3.4.4 Ιντερλευκίνη 6..... 39

3.4.5 Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (MCP-1)..... 45

3.5 Προτεινόμενοι μηχανισμοί σπειραματικής βλάβης..... 51

3.6 Ελαιόλαδο και νεφρικός ιστός..... 57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΣΚΟΠΟΣ..... 60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων..... 61

5.2 Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων..... 63

5.3 Διέγερση των κυττάρων με IL-1β..... 65

5.4 Εκχύλιση πολικών λιποειδών ελαιολάδου…….. 66
5.4.1 Τροποποιημένη κατανομή κατά αντιρροή……... 66
5.4.2 Προσδιορισμός φωσφόρου στα λιποειδή…… 67
5.4.3 Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή……. 68
5.4.4 Προσδιορισμός φαινολικών……. 69
5.5 Επίδραση πολικών λιποειδών ελαιολάδου στην έκκριση κυτταροκινών……. 70
5.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης κυτταροκίνης IL-6…….. 71
5.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χημειοκίνης MCP-1…… 74
5.8 Παραλαβή πρωτεϊνών από τα κύτταρα……. 77
5.9 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford…….. 78
5.10 Απομόνωση RNA……. 79
5.11 Ηλεκτροφόρηση RNA…….. 81
5.12 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης mRNA του LDL υποδοχέα…….. 82
5.12.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA……. 82
5.12.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) –Αλυσιδωτή αντίδραση (PCR) πολυμεράσης…… 82
5.12.3 Ηλεκτροφόρηση DNA……. 85
5.12.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων RT-PCR……... 86
5.13 Στατιστική…… 86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{ο}: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Μελέτη της επίδρασης παραγόντων διέγερσης στα μεσαγγειακά κύτταρα…… 87
6.1.1 Επίδραση της BSA στην έκκριση των βασικών επιπέδων της κυτταροκίνης IL-6……. 88
6.1.2 Επιλογή του διεγέρτη για την έκκριση της κυτταροκίνης IL-6…… 89
6.1.3 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκκριση της IL-6…….. 93
6.1.4 Επίδραση του χρόνου στην έκκριση της IL-6…….. 94
6.2 Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στην έκκριση MCP-1……. 95
6.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης IL-1β στην έκκριση του MCP-1…… 95
6.2.2 Επίδραση του χρόνου στην έκκριση του MCP-1…….. 97
6.3 Μελέτη επίδρασης ολικών πολικών λιποειδών…….. 98
6.3.1 Εκχύλιση πολικών λιποειδών ελαιολάδου…… 99
6.3.2 Επίδραση Ολικών Πολικών Λιποειδών στην έκκριση IL-6……. 99
6.3.3 Επίδραση της συνεπώασης των ολικών πολικών λιποειδών στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6…… 101
6.3.4 Επίδραση της προεπώασης των ολικών πολικών λιποειδών στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6……. 102

6.3.5 Επίδραση της προεπώασης των ολικών πολικών λιποειδών στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση MCP-1……. 105

6.4 Μελέτη του υποδοχέα της λιποπρωτεϊνης LDL στα μεσαγγειακά κύτταρα……. 108

6.4.1 Ηλεκτροφόρηση RNA…… 109

6.4.2 Επίδραση της συγκέντρωσης IL-1β στην έκφραση του mRNA του n LDL υποδοχέα……. 110

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ……. 113

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……... 123

SUMMARY…… 124

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ…….. 125

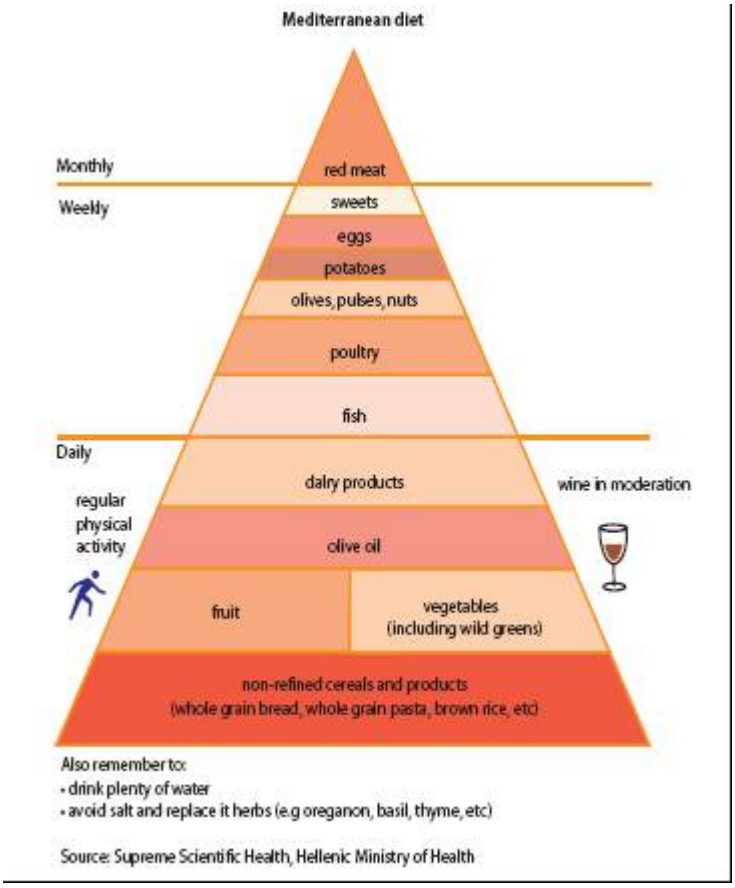
Κεφάλαιο 1ο
Συστατικά Μεσογειακής Δίαιτας

1.1 Περί Μεσογειακής Δίαιτας

Πρόσφατα στοιχεία που αφορούν τα διατροφικά πρότυπα και την κατάσταση υγείας των πληθυσμών που κατοικούν στην λεκάνη της Μεσογείου, υποδεικνύουν σαφείς διαφορές τόσο στη διατροφική πρόσληψη όσο και στη κατάσταση υγείας τους. Για το λόγο αυτό, ο όρος της «Μεσογειακής δίαιτας» είναι μη κυριολεκτικός. Δεν υπάρχει μία Μεσογειακή δίαιτα, αλλά στην πραγματικότητα πολλά πρότυπα Μεσογειακής διατροφής, επειδή οι χώρες κατά μήκος της Μεσογειακής λεκάνης έχουν διαφορετικά θρησκεύματα, οικονομικά δεδομένα, παραδόσεις και διαιτητικές συνήθειες. Η διατροφική πρόσληψη επηρεάζεται σημαντικά από τις θρησκευτικές συνήθειες: οι μουσουλμάνοι δεν καταναλώνουν χοιρινό, κρασί ή άλλα αλκοολούχα ποτά, ενώ ο ελληνικός ορθόδοξος πληθυσμός συνήθως δεν καταναλώνει κρέας την Τετάρτη και Πέμπτη, αλλά πίνει κρασί κτλ.

Η παραδοσιακή Μεσογειακή δίαιτα και ειδικότερα η ελληνική εκδοχή αυτής, χαρακτηρίζεται από: (α) υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, οσπρίων, δημητριακών, φρούτων και λαχανικών, (β) μέτρια προς υψηλή κατανάλωση ψαριού, (γ) μέτρια κατανάλωση κρασιού, γαλακτοκομικών προϊόντων (*κυρίως ως τυρί και γιαούρτι*) και (δ) μικρή κατανάλωση κρέατος και των προϊόντων αυτού [1-3]. Πιο συγκεκριμένα, το διατροφικό αυτό πρότυπο συμπεριλαμβάνει (*εικόνα 1*): (α) καθημερινή κατανάλωση μη επεξεργασμένων δημητριακών και των προϊόντων τους (*ολικής άλεσης ψωμί, ζυμαρικά, μαύρο ρύζι, κ.α.*), λαχανικών (*2-3 μερίδες/ μέρα*), φρούτων (*4-6 μερίδες/ μέρα*), ελαιολάδου (*ως κυρίως προστιθέμενο λίπος*), (β) εβδομαδιαία κατανάλωση πατάτας (*4-5 μερίδες/ εβδομάδα*), ελιών, οσπρίων και καρπών *(>4 μερίδες/ εβδομάδα*), πιο σπάνια πουλερικών (*1-3 μερίδες/ εβδομάδα*), αυγών και γλυκισμάτων (*1-3 μερίδες/ εβδομάδα*) και τέλος (γ) μηνιαία κατανάλωση κόκκινου κρέατος και των προϊόντων αυτού (*4-5 μερίδες/ μήνα*) [1, 2].

Στα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής δίαιτας εντάσσονται τόσο η μέτρια κατανάλωση κρασιού (1-2 ποτήρια/ μέρα) και ο υψηλός λόγος μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα (>2) [1]. Επιπλέον, παρότι η κατανάλωση γάλακτος είναι αναλογικά μέτρια, η κατανάλωση γιαουρτιού και τυριού είναι υψηλή, καθώς προστίθεται τυρί (*φέτα κυρίως*) σε σαλάτες και συνοδεύει μαγειρεμένα λαχανικά. Το κρασί καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες και σχεδόν πάντα κατά τη διάρκεια των γευμάτων. Το υψηλό περιεχόμενο της δίαιτας σε λαχανικά, φρέσκα φρούτα, δημητριακά και ελαιόλαδο διασφαλίζει επαρκή πρόσληψη μεταξύ άλλων β-καροτένιου, βιταμίνης C, τοκοφερολών, α-λινολενικού οξέος, διαφόρων σημαντικών μετάλλων και μερικών πιθανά ευεργετικών – μη θρεπτικών – ουσιών, όπως είναι οι πολυφαινόλες και οι ανθοκυανίνες. Η δίαιτα αυτή είναι φτωχή σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (*<9% της ενεργειακής πρόσληψης*), με τη συνολική πρόσληψη λίπους να κυμαίνεται ανάλογα με την περιοχή από <30% μέχρι και λίγο >40% της ενεργειακής πρόσληψης [1].



Εικόνα 1.1 Η πυραμίδα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής. Από Panagiotakos et al. Med Sci Monit, 2004; 10(8): RA193-8

Τα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής θεωρείται ότι είναι υπεύθυνα για την ευεργετική επίδραση της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία και ειδικότερα στο καρδιαγγειακό σύστημα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων πολλοί ερευνητές έχουν συσχετίσει τη Μεσογειακή διατροφή με βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ (*LDL-C και τριγλυκερίδια*), με μειωμένο κίνδυνο θρόμβωσης, με βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη, με μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και την καρδιακή κοιλιακή ερεθιστικότητα [1] (*άρθρο ανασκόπησης*).

1.2 Ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής Διατροφής στα καρδιαγγειακά νοσήματα

Το ενδιαφέρον για τη Μεσογειακή δίαιτα προήλθε στην πραγματικότητα από τη μελέτη των Επτά χωρών. Ο Keys και οι συνεργάτες του ήταν αυτοί που έδειξαν ότι ο ρυθμός θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο μετά από 5-15 χρόνια παρακολούθησης (follow-up) στη Νότια Ευρώπη ήταν τρεις φορές μικρότερος από τη Βόρεια Ευρώπη ή τις Ηνωμένες Πολιτείες [4]. Στη μελέτη αυτή, η ολική θνησιμότητα (all causes) και η θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο στην Κρήτη ήταν πολύ μικρότερη από των άλλων χωρών της νότιας Ευρώπης. Επιπλέον, μετά από 25 χρόνια, ο μικρότερος ρυθμός θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο, καρκίνο και από όλες τις αιτίες αντιστοιχούσε στην Κρήτη [5]. Στη μελέτη Zutphen Elderly Study, ο ρυθμός θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο ήταν 4 φορές μεγαλύτερος,

από καρκίνο 2 φορές μεγαλύτερος και από όλες τις αιτίες 50% υψηλότερος από τον αντίστοιχο ρυθμό στην Κρήτη [5]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι ο Κρητικός πληθυσμός μπορούσε να θεωρηθεί ότι είχε μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης από τις χώρες του Δυτικού κόσμου, παρότι ο μέσος όρος των επιπέδων χοληστερόλης ορού του κρητικού πληθυσμού ήταν παρόμοιος με αυτόν άλλων μεσογειακών χωρών [5].

Οι ερευνητές της μελέτης Cardio 2000 χρησιμοποίησαν 661 μεσήλικες ασθενείς με ένα πρώτο έμφραγμα μυοκαρδίου ή ασταθή στηθάγχη και 661 άτομα (παρόμοιας ηλικίας και φύλου) ως ομάδα ελέγχου, από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Αναφέρουν λοιπόν, ότι η υιοθέτηση της Μεσογειακής δίαιτας σχετίστηκε με προσαρμοσμένη μείωση κατά 16% του κινδύνου εμφάνισης πρώτου επεισοδίου οξέου στεφανιαίου συνδρόμου [6], με μείωση 12% του κινδύνου στεφανιαίου επεισοδίου – ανεξαρτήτως επιπέδων χοληστερόλης και άλλων καρδιαγγειακών παραγόντων – στην υποκατηγορία των υπερχοληστερολαιμικών ατόμων [1] και με μείωση κατά 35% στην υποκατηγορία των ατόμων με μεταβολικό σύνδρομο (μετά από προσαρμογή για ηλικία, φύλο, εκπαιδευτικό και οικονομικό επίπεδο, καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου) [1].

Σε μια πρόσφατη μεγάλη προοπτική έρευνα που περιελάμβανε 22.043 μεσήλικες και ηλικιωμένους από την Ελλάδα (*από το ελληνικό κομμάτι της μελέτης EPIC*), η Τριχοπούλου και οι συνεργάτες της [7], αναφέρουν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του μεγαλύτερου βαθμού προσκόλλησης στη Μεσογειακή δίαιτα με τη θνησιμότητα από τη στεφανιαία νόσο. Μια αύξηση κατά 2/9 του διατροφικού αποτελέσματος *(diet score)* Μεσογειακής διατροφής συσχετίστηκε με 25% μείωση στην ολική θνησιμότητα και 33% μείωση στη θνησιμότητα από τη στεφανιαία νόσο. Οι συσχετίσεις αυτές ήταν ανεξάρτητες του φύλου, της παρουσίας καπνίσματος, του μορφωτικού επιπέδου, του δείκτη μάζας σώματος και του επιπέδου φυσικής δραστηριότητας [7].

Οι Martinez-Gonzalez et al. [8] σε μια case-control μελέτη συμπεριλαμβάνοντας 171 ασθενείς και 171 άτομα για την ομάδα ελέγχου, αναφέρουν ότι όσο πιο μεγάλος είναι ο δείκτης συμμόρφωσης *(diet score)* Μεσογειακής διατροφής, τόσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επίσης, με προσαρμογή για τους κυριότερους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του διατροφικού αποτελέσματος Μεσογειακής διατροφής και του κινδύνου για έμφραγμα μυοκαρδίου [8].

Ο Renaud και οι συνεργάτες του [9], στη μελέτη Lyon Heart Study**,** έλεγξαν την υπόθεση ότι μια κρητική Μεσογειακή δίαιτα εμπλουτισμένη με α-λινολενικό οξύ (18:3 ω-3, LNA), όπως αυτή που καταναλωνόταν στις αρχές του 1960, θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική έναντι της στεφανιαίας νόσου από τη συνηθισμένη δίαιτα που συστήνεται σε αυτούς τους ασθενείς. Στη μελέτη που συμμετείχαν τυχαιοποιημένα μέρος 605 καρδιοπαθείς για 27 μήνες, και εκτιμήθηκε η επίδραση της κρητικής Μεσογειακής δίαιτας στην ολική θνησιμότητα και από στεφανιαία νόσο, σε σύγκριση με τη συνηθισμένη δίαιτα των ασθενών αυτών. Και τα δυο διατροφικά σχήματα περιείχαν μέτριες ποσότητες ολικού λίπους (*31-33% της ενεργειακής πρόσληψης*) και κορεσμένου λίπους (*8,3% της ενεργειακής πρόσληψης στην ομάδα παρέμβασης και 11,8% στην ομάδα ελέγχου*). Η μεγαλύτερη διαφορά τους ήταν η πρόσληψη α-λινολενικού οξέος (*1,8 g/μέρα στην ομάδα παρέμβασης και 0,79 g/μέρα στην ομάδα ελέγχου*) και στην

πρόσληψη βιταμίνης C (*η ομάδα παρέμβασης κατανάλωνε περισσότερα φρούτα και λαχανικά*). Αυτές οι διαφορές συσχετίστηκαν με 70% μικρότερη ολική θνησιμότητα και από καρδιοπάθειες [9]. Κάτι που υποδεικνύει ότι η κρητική Μεσογειακή Δίαιτα είναι πιο αποτελεσματική στην πρόληψη καρδιοπαθειών από τη συνηθισμένη δίαιτα.

Οι έρευνες αυτές υποστηρίζουν την υπόθεση ότι μια Μεσογειακή δίαιτα που δίνει έμφαση στο ελαιόλαδο, τα φρούτα, τα λαχανικά, το ψάρι και το κρασί, ενώ περιορίζει το κόκκινο κρέας και τα προϊόντα αυτού, μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό μέτρο για τη μείωση του κινδύνου από καρδιαγγειακές παθήσεις.

1.3 Συστατικά της Μεσογειακής δίαιτας και οι βιολογικές τους δράσεις

Η Μεσογειακή δίαιτα είναι φτωχή σε κορεσμένο λίπος, πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (*κυρίως από το ελαιόλαδο*), πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες (*από τα όσπρια*) και φυτικές ίνες (*κυρίως από λαχανικά και φρούτα*). Μπορεί η περιεκτικότητά της σε ολικά λιπαρά να είναι υψηλή (*~40% της ενεργειακής πρόσληψης*), αλλά ο λόγος των μονοακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι περίπου 2. Η κρητικού τύπου Μεσογειακή δίαιτα είναι πλούσια σε LNA από φρούτα και λαχανικά, εικοσαπεντανοϊκό οξύ [*EPA, 20:5(ω-3)*] και δοκοσαεξανοϊκό οξύ [*DHA, 22:6(ω-3)*] από τα ψάρια. Στα χαρακτηριστικά της περιλαμβάνεται επίσης ο ισορροπημένος λόγος ω-6 προς ω-3 λιπαρά οξέα [2]. Το πλούσιο περιεχόμενο της δίαιτας σε λαχανικά (*μεταξύ των οποίων και άγρια χόρτα*), φρέσκα φρούτα, δημητριακά, κρασί και ελαιόλαδο διασφαλίζουν υψηλή πρόσληψη φυλλικού οξέος, ρεσβερατρόλης, γλουταθιόνης, β-καροτένιου, λυκοπένιου, βιταμινών C και E, πολυφαινολών και άλλων αντιοξειδωτικών (*πίνακας 1.1*). Εξαιτίας της κατανάλωσης άγριων χόρτων (*που αποτελούν καλές πηγές LNA, βιταμινών C και E και γλουταθιόνης*) το περιεχόμενο αυτής σε αντιοξειδωτικά, φυτοοιστρογόνα και άλλα φυτοχημικά, είναι υψηλότερο από τις δίαιτες των πληθυσμών στην υπόλοιπη Μεσόγειο [2].

Η Μεσογειακή διατροφή εκμαιεύει ένα λιγότερο προθρομβωτικό περιβάλλον με τροποποίηση διαφόρων αιμοστατικών παραγόντων, όπως το ινωδογόνο, ο παράγοντας Von Willebrand, τα επίπεδα στο πλάσμα του παράγοντα πήξης VII και του αναστολέα ενεργοποίησης πλασμινογόνου PAI-1, αλλά και διαδικασιών όπως η συσσώρευση αιμοπεταλίων [10]. Βελτίωση της εξαρτώμενης του ενδοθηλίου αγγειοδιαστολής και της απόκρισης στους φλεγμονώδεις παράγοντες του πλάσματος έχει αναφερθεί σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία [11]. Επιπρόσθετα, στα αντιοξειδωτικά (*π.χ. φλαβονοειδή από εδώδιμα χόρτα*) – που αποτελούν κοινό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής – αποδίδεται μέρος της προστατευτικής δράσης αυτής [1](*άρθρο ανασκόπησης*).

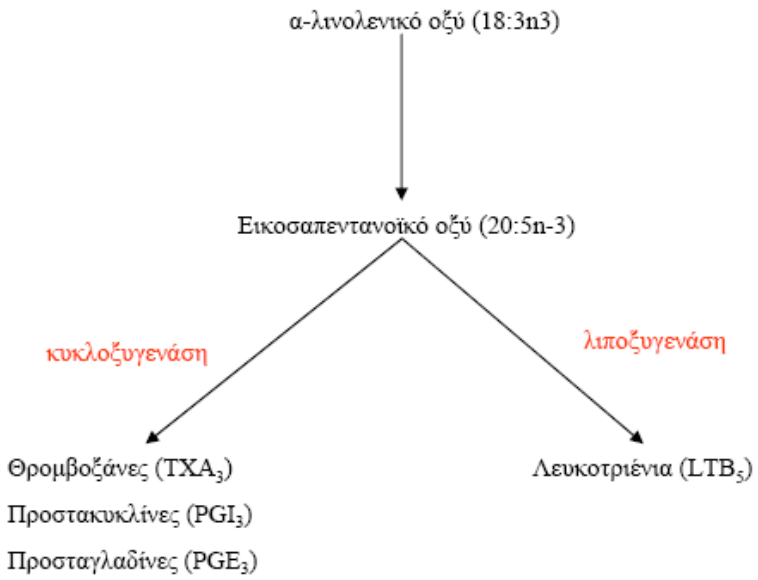
Πίνακας 1.1 Δραστικές ουσίες σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, καρπούς, έλαια και κρασί [2, 12]**.**

Τρόφιμο	Δραστικά συστατικά
Φρούτα και λαχανικά	
Μήλα	Κερκετίνη, επικατεχίνη, χλωρογενικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ
Εσπεριδοειδή φρούτα	Ναρινγενίνη, εσπερετίνη, εσπεριδίνη, εριοκιτρίνη, ναρινγίνη, μεριοκιτρίνη, νατριτουίνη, p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, ασκορβικό οξύ, β-καροτένιο
Σταφύλια	Ταννικό οξύ, κουερκετίνη, προκυανιδίνες, άλλα φαινολικά
Κρεμμύδι	Κερκετίνη, μυρισετίνη
Καρότα	Κερκετίνη, λυκοπένιο, ρουτίνη, προυνίνη
Σκόρδο	Ενώσεις θείου
Τομάτα	Λυκοπένιο
Δημητριακά	
Ρύζι	Οριζανόλη, ισοβιτεξίνη, πινορεσινόλη, άλλα φαινολικά
Άγριο ρύζι	Φυτικό οξύ, γλυκοζίτης λουτεολίνης, γλυκοζίτης p-υδροξυακετοφαινόνης, 3,4,5 τριμεθοξυκιναμινικό οξύ
Όσπρια	Φλαβονοειδή, ισοφλαβόνες, φαινολικά οξέα, τανίνες
Κριθάρι	2-ο-γλυκοζυλισοβιτεξίνη, πηκτίνη, β-γλυκάνη
Βρώμη	Εστέρες καφεϊκού και φερουλικού οξέος, πηκτίνη, β-γλυκάνη
Καρποί και έλαια	
Ελαιόλαδο	Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, τοκοφερόλη, καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ
Κακάο	Κατεχίνη, επικατεχίνη, χλωρογενικό οξύ
Σουσάμι	Σεσαμόλη, σεσαμινόλη, τοκοφερόλη, σεσαμολινόλη
Αράπικο φιστίκι	Ταξιφολίνη, ρεσβερατρόλη
Κρασί	
Κρασί	Φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, τανίνες, μονομερείς κατεχίνες, πολυμερείς ανθοκυανίδινες, ρεσβερατρόλη

Από τις δραστικές ουσίες των τροφίμων που απαντώνται σε αφθονία στα πλαίσια της Μεσογειακής διατροφής, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ω-3 λιπαρά οξέα, οι διαλυτές φυτικές ίνες, τα λιποειδή, οι φαινολικές ενώσεις, τα φυτοοιστρογόνα, οι βιταμίνες C, E, β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η γλουταθιόνη, οι ενώσεις οργανικού θείου και το σελήνιο.

Υπάρχουν δυο κατηγορίες απαραίτητων λιπαρών οξέων (*essential fatty acids, EFA*) τα ω-6 και τα ω-3. Η κρητικού τύπου Μεσογειακή δίαιτα είναι πλούσια LNA από φρούτα και λαχανικά, EPA και DHA από τα ψάρια. Από τις κυριότερες λειτουργίες των απαραίτητων λιπαρών οξέων στο σώμα είναι η δράση τους ως πρόδρομα μόρια των εικοσανοειδών, που αποτελούν μεσολαβητές της φλεγμονώδους

διεργασίας και της κυτταρικής ανάπτυξης. Τα EFA μετατρέπονται σε προσταγλαδίνες με τη δράση της κυκλοοξυγενάσης και σε λευκοτριένια με τη δράση της λιποξυγενάσης (*εικόνα 1.2*). Το αραχιδονικό οξύ [*AA; 20:4(ω-6)*] και το EPA ανταγωνίζονται για τα δυο αυτά ένζυμα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό εικοσανοειδών με αντίθετες επιδράσεις. Σε γενικές γραμμές, τα εικοσανοειδή που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ έχουν προφλεγμονώδη δράση ενώ όσα προέρχονται από το εικοσαπεντανοϊκό οξύ έχουν αντιφλεγμονώδη δράση.



Εικόνα 1.2 Βιοσύνθεση τριενοϊκών εικοσανοειδών. Από Alarcon de la Lastra et al. Curr Pharm Des 2001;7(10) :933-50

Για το λόγο αυτό δίνεται μεγάλη σημασία στο λόγο ω-6/ ω-3 λιπαρά οξέα. Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν επιβεβαιωμένη ερευνητικά υποτριγλυκεριδαιμική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση (*μειώνοντας την συσσώρευση των αιμοπεταλίων*) [1, 2] (*άρθρα ανασκόπησης*). Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν ανοσορυθμιστική επίδραση, όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στο πηλίκο Τ-βοηθητικών κυττάρων προς Τ-κατασταλτικών κυττάρων [2].

Η πηκτίνη και η β-γλυκάνη είναι διαλυτές φυτικές ίνες που φαίνεται ότι μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL-χοληστερόλης. Η β-γλυκάνη απαντάται στη βρώμη, το κριθάρι και στη μαγιά, ενώ η πηκτίνη στα φρούτα και τα λαχανικά. Μια μετανάλυση 8 μελετών έδειξε ότι περίπου 10 g/μέρα psyllium (*που ανήκει στις διαλυτές φυτικές ίνες και προστίθεται τελευταία σε κάποια δημητριακά*) μειώνει την ολική χοληστερόλη κατά 4% και την LDL-χοληστερόλη κατά 7% [13]. Μια άλλη μετανάλυση έδειξε ότι η β-γλυκάνη, το psyllium και η πηκτίνη έχουν συγκρίσιμες υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις [14]. Εκτός από την υποχοληστερολαιμική δράση, η υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών αποτρέπει ή αμβλύνει την υπερτριγλυκεριδαιμική ανταπόκριση σε μια δίαιτα υψηλή σε υδατάνθρακες, όπως είναι η Μεσογειακή [12] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Τα φαινολικά παράγωγα – κοινώς πολυφαινόλες – απαντώνται σε όλα τα φυτά, άρα και στη διατροφή. Υπάρχουν περισσότερες από 10 τάξεις πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν με βάση τη χημική τους δομή. Οι πιο κοινές πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή, στα οποία κατατάσσονται οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους. Σημαντικές πηγές πολυφαινολών είναι το κόκκινο κρασί, οι χυμοί μήλου και πορτοκαλιού, το τσάι και τα όσπρια. Πλήθος επιδημιολογικών στοιχείων υποστηρίζει ότι τα φλαβονοειδή έχουν προστατευτική επίδραση έναντι της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο [12] (*άρθρο ανασκόπησης*). Οι πιθανοί μηχανισμοί για αυτήν την προστατευτική δράση συμπεριλαμβάνουν αναστολή της οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης (*in vitro*), αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και της προσκόλλησής τους στο ενδοθηλιακό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, μειωμένη σύνθεση προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών μεσολαβητών, μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και ρύθμιση της ενδοθηλιακής παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου [12] (*άρθρο ανασκόπησης*). Τα φλαβονοειδή βέβαια, μπορούν να εκδηλώνουν την αντιοξειδωτική τους δράση με αρκετούς τρόπους: (α) με εκκαθάριση ελευθέρων ριζών, (β) με ανακύκλωση άλλων αντιοξειδωτικών (*όπως η α-τοκοφερόλη*) μειώνοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων, (γ) με σχηματισμό χηλικής ένωσης με ιόντα μετάλλων (*όπως ο σίδηρος και ο χαλκός*) αποτρέποντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, (δ) με προστασία του DNA από οξειδωτική βλάβη και (ε) με προαγωγή αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών [12] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Στις πολυφαινόλες ανήκει και η *ρεσβερατρόλη* που απαντάται στο κρασί και στα φαρμακευτικά φυτά του είδους Polygonum. Η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη λιπογένεση από το παλμιτικό οξύ στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό [15], το σχηματισμό των προϊόντων λιποξυγενάσης (*λευκοτριένια LTB_4 και LTC_4*) και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με αναστολή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (*platelet activating factor, PAF*) [16, 17]. Η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγα έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν ισχυρά την αποκοκκιωμάτωση των πολυμορφοπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων [16].

Τα φυτοοιστρογόνα χωρίζονται σε 3 κύριες κατηγορίες: ισοφλαβονόνες, κουμεστάνες και λιγνάνες. Δομικά, είναι διφαινολικά μίγματα παρόμοια οιστρογόνων, μπορούν να προσδεθούν στους υποδοχείς τους, αλλά δρουν είτε ως μερικοί αγωνιστές οιστρογόνων είτε ως ανταγωνιστές. Οι ισοφλαβόνες απαντώνται κυρίως σε όσπρια (*ειδικά σε σόγια*), η κουμεστρόλη σε μικρές συγκεντρώσεις στα φασόλια και τον αρακά, ενώ οι λιγνάνες σε διάφορες συγκεντρώσεις στη σόγια, φύκια, μη επεξεργασμένα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά [12]. Θεωρούνται ότι μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και LDL-χοληστερόλη, να μειώσουν την οξείδωση της LDL και τα θρομβωτικά επεισόδια [12] (*άρθρο ανασκόπησης*). Η παραδοσιακή κρητική διατροφή περιέχει περισσότερα φυτοοιστρογόνα από τις αντίστοιχες των άλλων Μεσογειακών χωρών εξαιτίας της κατανάλωσης άγριων χόρτων [2].

Στα πλαίσια των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων του μεταβολισμού, λαμβάνει χώρα συνεχής παραγωγή ελευθέρων ριζών που εκκαθαρίζονται – εν μέρει – από αντιοξειδωτικά, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό τις οξειδωτικές βλάβες. Διάφορες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (*με διαφορετική διαλυτότητα*) μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά. Μεταξύ αυτών, το ασκορβικό οξύ και η γλουταθιόνη δρουν ως υδρόφιλοι εκκαθαριστές, ενώ τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες και τα

φλαβονοειδή αποτελούν τους κύριους λιπόφιλους εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών [18]. Πλήθος επιδημιολογικών ερευνών υποδεικνύει ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών – που αποτελούν καλές πηγές αντιοξειδωτικών – δρα προστατευτικά έναντι την καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου [19].

Η γλουταθιόνη που προέρχεται από τα αμινοξέα γλυκίνη, γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη, μπορεί να θεωρηθεί ως οξειδοαναγωγικός ρυθμιστής. Συντίθεται στο ήπαρ, τα νεφρά και σε άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, η εδώδιμη γλουταθιόνη απαντάται στο φρέσκο κρέας και σε μέτριες ποσότητες σε κάποια φρούτα και λαχανικά. Ο προστατευτικός ρόλος της ως αντιοξειδωτικό και ως αποτοξινωτικός παράγοντας έχουν υποδειχθεί από διάφορες κλινικές έρευνες [2] (*άρθρο ανασκόπησης*). Η γλουταθιόνη βοηθά στη διατήρηση των σουλφυδριλικών ομάδων των πρωτεϊνών στη αναγωγική μορφή και του σιδήρου της αίμης στη δισθενή κατάσταση. Εκτός αυτού όμως, προστατεύει από οξείδωση άλλες ενώσεις, όπως οι βιταμίνες Ε, C και το β-καροτένιο, εμπλέκεται στη σύνθεση και επισκευή του DNA, ενώ προάγει και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού [2] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Το σελήνιο δρα ως πιθανό αντιοξειδωτικό και απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε θαλασσινά προϊόντα. Για παράδειγμα, το χταπόδι – που αποτελεί κοινό ελληνικό ορεκτικό – περιέχει 90 μg σεληνίου/100 g [2] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Τέλος, το λυκοπένιο είναι ακυκλικό καροτενοειδές που απαντάται κυρίως στις τομάτες και τα προϊόντα της, ενώ σε μικρές ποσότητες στα βερίκοκα, το γκρέιπφρουτ και το πεπόνι. Η βιοδιαθεσιμότητά του αυξάνεται με το μαγείρεμα, ειδικά παρουσία ελαίων ή λιπών [12, 20]. Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα ότι η χορήγηση συμπληρώματος που περιέχει λυκοπένιο μειώνει τα επίπεδα LDL-χοληστερόλης κατά 14% περίπου [12] (*άρθρο ανασκόπησης*), πιθανότατα λόγω αναστολής της σύνθεσης χοληστερόλης και αυξημένης αποδόμησης της LDL [20].

Οι περισσότερες καρδιολογικές έρευνες που συντάχθηκαν με τροφικές πηγές ενώσεων οργανικού θείου, αφορούν εκτίμηση των επιδράσεων του σκόρδου ή του ελαίου αυτού. Διάφορες έρευνες υποδεικνύουν ότι το σκόρδο επιδρά ευεργετικά σε ασθενείς υπό κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, μειώνοντας την ολική και LDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια [12] (*άρθρο ανασκόπησης*). Στους πιθανούς μηχανισμούς δράσης συμπεριλαμβάνονται: (α) μείωση σύνθεσης λιπαρών οξέων και χοληστερόλης, (β) μείωση απορρόφησης χοληστερόλης, (γ) αντιθρομβωτική δράση, (δ) αντιοξειδωτική δράση S-αλλυλ-κυστεΐνης και S-αλλυλ-μερκαπτοκυστεΐνης και (ε) μείωση της πίεσης του αίματος [12] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Κεφάλαιο 2ο
Σύσταση και Βιολογικές Δράσεις Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους στη διατροφή των Μεσογειακών λαών. Η υψηλή πρόσληψη ελαιολάδου στα πλαίσια της Μεσογειακής διατροφής συνεισφέρει στη μειωμένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων στους πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης και συσχετίζεται με μικρή επίπτωση στεφανιαίας νόσου και κάποιων τύπων καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί πολύ οι αναφορές που αφορούν ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου. Το πλήθος των αναφορών για τις πιθανές προστατευτικές δράσεις ενός αναλόγου διατροφικού προτύπου, έχει υποκινήσει τη μελέτη των συστατικών της Μεσογειακής δίαιτας, μεταξύ των οποίων και των συστατικών του ελαιολάδου. Στη συνέχεια παρατίθεται η χημική σύσταση του ελαιολάδου και οι βιολογικές δράσεις αυτού.

2.1 Χημική σύσταση του ελαιολάδου

Τα εδώδιμα συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να διακριθούν στα σαπωνοποιήσιμα, που αντιπροσωπεύουν το 98,5-99,5% του ελαίου, και τα μη, που αντιπροσωπεύουν το 0,5-1,5% του ελαίου. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το πιο σημαντικό μέρος των σαπωνοποιήσιμων συστατικών. Το υπόλοιπο αποτελείται από ελεύθερα λιπαρά οξέα και μικρότερης συγκέντρωσης συστατικά που προέρχονται από τα λιπαρά οξέα, όπως π.χ. οι μόνο/ διακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιποειδή, οι κηροί και οι εστέρες των στερολών [21] (*άρθρο ανασκόπησης*). Τα μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά περιλαμβάνουν μη πτητικές ενώσεις που λαμβάνονται μετά από σαπωνοποίηση του ελαίου και επακόλουθη εκχύλιση με συγκεκριμένο διαλύτη. Συμπεριλαμβάνονται λιποειδή όπως οι στερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, οι χρωστικές και οι υδρογονάνθρακες, καθώς και οργανικές ενώσεις μη πτητικές σε 103°C [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Τριγλυκερίδια

Τα περισσότερα λιπαρά οξέα του εδώδιμου ελαίου, απαντώνται ως τριγλυκερίδια. Η σύστασή τους συνίσταται σε παρουσία ακόρεστου λιπαρού οξέος, συνήθως ελαϊκού οξέος, στο κέντρο ή στη θέση-2 του μορίου γλυκερόλης. Τα τριγλυκερίδια που βρίσκονται σε σημαντικές αναλογίες είναι τα[1]: OOO (40-59%), POO (15-22%), OOL (12-20%), POL (5,5-7%), SOO (3-7%), PLO (4-5%) και POP (2-4%) [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

[1] Όπου O ελαϊκό οξύ, P παλμιτικό οξύ, L λινελαϊκό οξύ, S στεαρικό οξύ.

Μονο-Διακυλογλυκερόλες

Η ύπαρξη μόνο- και δι-ακυλογλυκερολών στο ελαιόλαδο οφείλεται είτε στην ατελή βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων, είτε σε μερική υδρόλυση των τελευταίων. Στο παρθένο ελαιόλαδο, η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων κυμαίνεται από 1-2,8%. Στο κλάσμα των διγλυκεριδίων επικρατούν αυτά με 34 και 36 άτομα άνθρακα. Στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων κυριαρχούν η μονοελαϊλογλυκερόλη, η μονολινολεϊλογλυκερόλη και η μονοπαλμιτοϋλογλυκερόλη [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

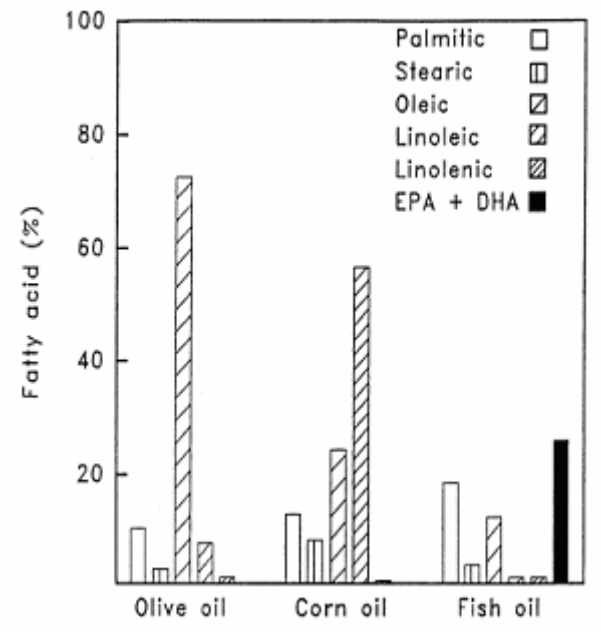
Λιπαρά οξέα

Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε ελαϊκό οξύ, ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ (18:1 ω-9) που αντιπροσωπεύει το 56-84% των ολικών λιπαρών οξέων, ενώ περιέχει μέτριες ποσότητες παλμιτικού και στεαρικού οξέος [22]. Το λινελαϊκό (18:2 ω-6) και το LNA απαντώνται σε μικρές ποσότητες (*βλ. πίνακα 2.1*) [22, 23]. Η σύσταση των λιπαρών οξέων διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, ανάλογα με την περιοχή παραγωγής. Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση των λιπαρών οξέων είναι το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, η ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του ελαιολάδου [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Όνομα	Συμβολισμός	Ποσοστό%
Μυριστικό	14:0	0,0-0,5
Παλμιτικό	16:0	7,5-20,0
Παλμιτελαϊκό	16:1n7	0,3-3,5
Μαργαρικό	17:0	0,0-0,3
Επταδεκανοϊκό	17:1	0,0-0,30
Στεαρικό	18:0	0,5-5,0
Ελαϊκό	18:1n9	55,0-83,0
Λινελαϊκό	18:2n6	3,5-21,0
α-Λινολενικό	18:3n3	0,0-0,9
Αραχιδικό	20:0	0,0-0,6
Εικοσαενοϊκό	20:1n9	0,0-0,4
Βεχενικό	22:0	0,0-0,2
Λιγνοκερικό	24:0	0,0-0,2

Πίνακας 2.1 Ποσοστό των λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο. Από Alarcon de la Lastra C et al. Curr Pharmac Design 2001;7:933-50

Τα πηλίκα ακόρεστων/ κορεσμένων λιπαρών οξέων και ελαϊκού/ λινελαϊκού οξέος στο ελαιόλαδο αυξάνουν με το γεωγραφικό πλάτος. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε παράταση του κύκλου ωρίμανσης, οπότε υψηλότερος βαθμός ωρίμανσης επιτυγχάνεται σε μικρότερο γεωγραφικό πλάτος [21] (*άρθρο ανασκόπησης*). Στην *εικόνα 2.1* φαίνεται συγκριτικά το περιεχόμενο του ελαιολάδου, του καλαμποκελαίου και των ιχθυελαίων στα ανωτέρω λιπαρά οξέα.



Εικόνα 2.1 Σύγκριση σύνθεσης μακράς αλύσου λιπαρών οξέων σε ελαιόλαδο, καλαμποκέλαιο και ιχθυέλαια. Από Moreno JJ and MT Mitjavila, J Nutr Biochem 2003;14:182-95.

Κήροι

Οι κήροι είναι εστέρες των ανωτέρων λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε κήρους είναι πολύ μικρή και δεν ξεπερνά τα 35 mg/100 g. Οι κυριότεροι από τους κήρους που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο είναι εστέρες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα που κυμαίνεται από 36-46 [24].

Φωσφολιπίδια

Το πρόσφατα παραγόμενο παρθένο ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες φωσφολιποειδών, ενώ το πεπαλαιωμένο ελαιόλαδο περιέχει πολύ μικρότερες. Μερικά από τα φωσφολιποειδή που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και η φωσφατιδυλοσερίνη [21, 25].

Στερόλες

Το ελαιόλαδο περιέχει στερόλες σε συγκέντρωση 100-220 mg/100g ελαιολάδου. Οι στερόλες στο ελαιόλαδο απαντούν είτε σε ελεύθερη μορφή είτε εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα. Οι κυριότερες στερόλες στο ελαιόλαδο είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ-5-αβεναστερόλη, και η καμπεστερόλη. Βέβαια, σε μικρότερες ποσότητες απαντώνται και οι στιγμαστερόλη, χοληστερόλη, 24-μεθυλενοχοληστερόλη κ.α. [21, 26]. Οι τριτερπενικές διαλκοόλες, κυρίως η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη, απαντώνται επίσης στο ελαιόλαδο σε συγκέντρωση 1-20 mg/100 g ελαίου [21].

Υδρογονάνθρακες

Το μη σαπωνοποιήσιμο μέρος του ελαιολάδου αποτελείται κατά 30-50% από υδρογονάθρακες. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται το σκουαλένιο και τα καροτενοειδή. Το σκουαλένιο είναι πρόδρομο μόριο των στερολών και απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ελαιόλαδο (2500-9250 μg/g) έναντι των άλλων φυτικών ελαίων (16-370 μg/g). Τα καροτενοειδή με συγκέντρωση 0,5-1 mg/100g ελαιολάδου, αποτελούνται από λουτεΐνη (30-60%), β-καροτένιο (5-15%) και αρκετές ξανθίνες. Τα καροτενοειδή ανήκουν και στην κατηγορία των χρωστικών [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Τοκοφερόλες

Κύρια τοκοφερόλη στο ελαιόλαδο είναι η α- (52-87%), ενώ οι β- και γ- απαντώνται σε μικρότερες ποσότητες (*15-20% και 7-23%, αντίστοιχα*) [21, 26].

Τερπενικές αλκοόλες

Στο ελαιόλαδο, οι τερπενικές αλκόολες αποτελούν το 20-26% του κλάσματος των υδρογονανθράκων. Από το ελαιόλαδο έχουν απομονωθεί δύο άκυκλα διτερπενοειδή: η φυτόλη (*που πιθανώς προέρχεται από τη χλωροφύλλη*) και η γερανυλογερανιόλη [24].

Χρωστικές

Στο ελαιόλαδο απαντούν δύο τάξεις φυσικών χρωστικών: (α) οι χλωροφύλλες και φαιοφυτίνες και (β) τα καροτενοειδή (*βλ. ανωτέρω*). Οι χλωροφύλλες α και β, καθώς και οι φαιοφυτίνες α και β είναι υπεύθυνες για το χρώμα. Η συγκέντρωση τους στο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 1 και 20 ppm. Η φαιοφυτίνη α αποτελεί το 70-80% των ολικών χρωστικών και πρακτικά είναι η μόνη που λαμβάνεται από ελαιόκαρπο μαύρου χρώματος, χαρακτηριστικού της προχωρημένης ωρίμανσης [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Λιπαρές αλκοόλες

Στο ελαιόλαδο απαντώνται κορεσμένες, ευθείας αλυσίδας, αλειφατικές αλυσίδες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα (C_{18}-C_{28}). Οι κυριότερες αλειφατικές αλκοόλες είναι η εξακοσανόλη, οκτακοσανόλη και η τετρακοσανόλη σε συγκέντρωση 10-70 mg/100 g ελαιολάδου [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

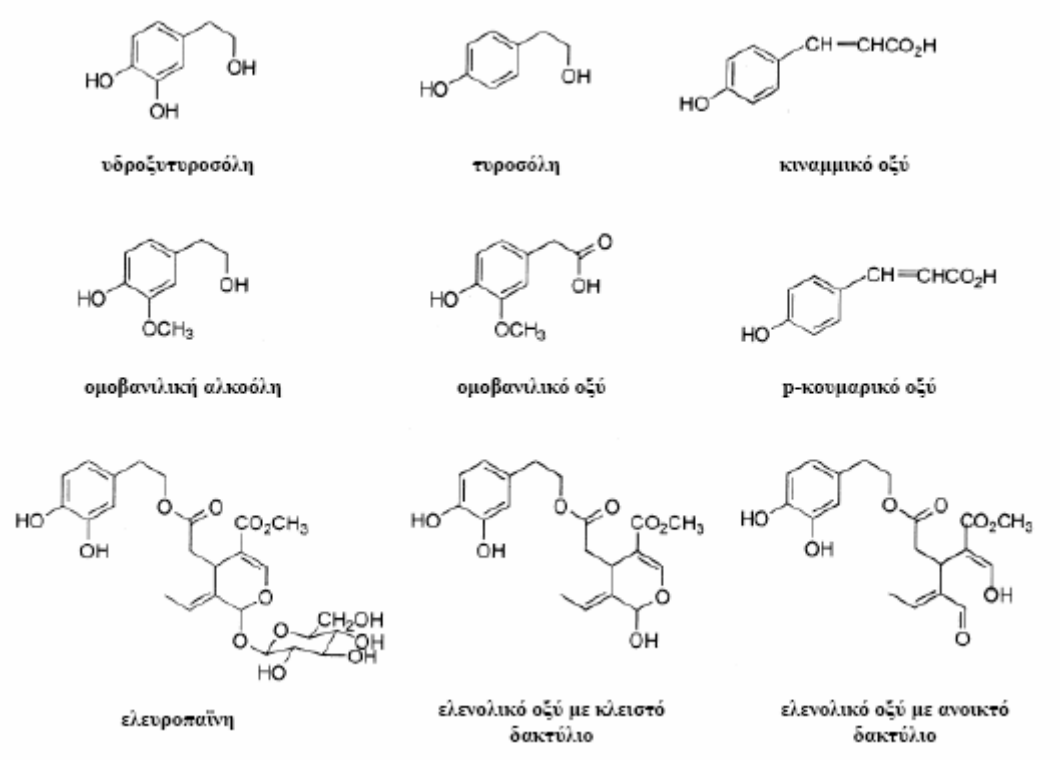
Πτητικά συστατικά

Το άρωμα και η γεύση του ελαιολάδου είναι πιο χαρακτηριστικά από τα υπόλοιπα εδώδιμα έλαια. Η ιδιότητά του αυτή οφείλεται στην παρουσία πτητικών συστατικών σε πολύ μικρές

συγκεντρώσεις. Τα αρωματικά συστατικά στο ελαιόλαδο ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του ελαιοκάρπου, το κλίμα καλλιέργειας και την ποιότητα του ελαιολάδου [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Φαινολικά παράγωγα

Τα κυριότερα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου είναι η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη (HT), η ελευροπαΐνη (OE), το καφεϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, το συριγκικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ, το προτοκατεχικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ και 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ [21, 26]. Από τα φαινολικά παράγωγα, η απλή φαινόλη HT και το πολύπλοκο παράγωγο OE (*που προκύπτει από εστεροποίηση HT με ελενολικό οξύ*) φαίνονται να είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, όσον αφορά τη δραστικότητα και τη φαρμακολογική τους δράση [23]. Στην εικόνα 2.2 φαίνονται τα κυριότερα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου.



Εικόνα 2.2 Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου. Από Tuck KE and PJ Hayball, J Nutr Biochem 2002;13:636-44

Η ποσότητα φαινολικών παραγώγων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, μεταξύ των οποίων το κλίμα, η συνθήκες καλλιέργειας, ο βαθμός ωρίμανσης και η πιθανή επιμόλυνση της ελιάς από τη μύγα Dacus olea [23]. Όσο ο καρπός της ελιάς ωριμάζει, μειώνεται η συγκέντρωση OE και HT, ενώ αυξάνουν τα προϊόντα υδρόλυσης της OE [27]. Παρότι αποτελούν μικροσυστατικά του ελαιολάδου, συμμετέχουν στους μηχανισμούς που προσδίδουν τις χαρακτηριστικές οργανοληπτικές ιδιότητες (γεύση και άρωμα). Οι περισσότερες φαινόλες προσδίδουν μια πικρή και πικάντικη γεύση

στο λάδι. Βέβαια, εκδηλώνουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ συνεισφέρουν στην τάγγη του ελαιολάδου [21].

2.2 Βιολογικές δράσεις συστατικών του ελαιολάδου

Από τη διεθνή συνδιάσκεψη του 2004 στην Ισπανία για τις ευεργετικές επιδράσεις του παρθένου ελαιολάδου στην υγεία και επιλεγμένες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, προκύπτει ότι:

i. Επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η Μεσογειακή δίαιτα, που είναι πλούσια σε παρθένο ελαιόλαδο, μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [28-30].

ii. Η Μεσογειακή δίαιτα, πλούσια σε ελαιόλαδο, βελτιώνει τους κύριους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, όπως το λιποπρωτεϊνικό προφίλ, τη συστηματική πίεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης και το αντιθρομβωτικό προφίλ. Βελτιώνεται επίσης η ενδοθηλιακή λειτουργία και μειώνεται η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Κάποιες από αυτές τις επιδράσεις αποδίδονται σε μικροσυστατικά του παρθένου ελαιολάδου. Για το λόγο αυτό, ο ορισμός της Μεσογειακής δίαιτας θα πρέπει να περιλαμβάνει το παρθένο ελαιόλαδο [28-32].

iii. Διάφορες μελέτες παρατήρησης σε ανθρώπους υποστηρίζουν ότι η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πηγή των οποίων αποτελεί το ελαιόλαδο, μπορεί να είναι προστατευτική έναντι της γεροντικής άνοιας και της νόσου του Alzheimer [30].

iv. Τα μικροσυστατικά του παρθένου ελαιολάδου στον άνθρωπο φαίνεται να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και την ικανότητα να βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία. Επιπλέον, μπορούν να ρυθμίσουν τη διαδικασία της αιμόστασης, έχοντας αντιθρομβωτική δράση [30, 33].

v. Σε χώρες της νότιας Ευρώπης, όπου το ελαιόλαδο αποτελεί την κύρια πηγή λίπους, όπως η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα, η επίπτωση των διαφόρων μορφών καρκίνου είναι μικρότερη από αυτήν των Βορειοευρωπαϊκών κρατών [30, 34-36].

vi. Η προστατευτική δράση του παρθένου ελαιολάδου μπορεί να είναι πολύ σημαντική τις πρώτες δεκαετίες ζωής, για το λόγο αυτό η διαιτητική πρόσληψη ελαιολάδου θα πρέπει να ξεκινά τουλάχιστον στην εφηβεία και να διατηρείται για την υπόλοιπη διάρκεια ζωής [30].

vii. Οι πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η Μεσογειακή δίαιτα, που βασίζεται στο ελαιόλαδο, συσχετίζεται με πιο υγιή γήρανση και μακροζωία [30].

2.2.1 Επιδημιολογικές μελέτες

Το ελαιόλαδο αποτελεί την κυριότερη διατροφική πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (*monounsaturated fatty acids, MFA*). Οι ευεργετικές επιδράσεις τους στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορούν να αποδοθούν κυρίως στην αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων της δίαιτας από το ελαϊκό οξύ [37]. Ωστόσο, έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη άμεσης, παρότι μέτριας

υποχοληστερολαιμικής επίδρασης των MFA, όταν αντικαταστήσουν σε ισοθερμιδική ποσότητα υδατάνθρακες [38]. Επιπρόσθετα, τα MFA αυξάνουν την HDL περισσότερο από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όταν αντικαθιστούν υδατάνθρακες [38]. Ωστόσο, είναι προφανές ότι δεν ευθύνεται αποκλειστικά το ελαϊκό οξύ για τις ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου στην υγεία.

Αρκετές δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι οι LDL λιποπρωτεΐνες ατόμων που καταναλώνουν δίαιτα πλούσια σε ελαιόλαδο είναι λιγότερο ευαίσθητες σε οξείδωση, από αυτές ατόμων που καταναλώνουν δίαιτα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή υδατάνθρακες [27].

Μελέτες υποστηρίζουν ότι δίαιτα πλούσια σε MFA δεν έχει ανεπιθύμητες ενέργειες στις αιμοστατικές παραμέτρους σε περιόδους νηστείας και μειώνει τη μεταγευματική ενεργοποίηση του παράγοντα πήξης VII [10, 39]. Οι ευεργετικές επιδράσεις δίαιτας πλούσιας σε MFA στην αθηροσκλήρυνση μπορεί να οφείλονται εν μέρει σε αλλαγές που προστατεύουν από θρομβογένεση. (*αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, μείωση ινωδογόνου, Von Willebrand factor, παράγοντα πήξης VII κ.α.*).

2.2.2 In vitro μελέτες

Ο Καραντώνης και οι συνεργάτες του [40] χρησιμοποίησε πολικά λιποειδή από ελαιόλαδο, σογιέλαιο, ηλιέλαιο ή σησαμέλαιο και εξέτασε *in vitro* την ικανότητά τους να αναστέλλουν την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση εκπλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πολικά λιποειδή ελαιολάδου είναι πιο ισχυροί αναστολείς του PAF, μειώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων.

Ο Reimund και οι συνεργάτες του [41] χρησιμοποίησαν περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα ή καλλιέργεια ολικού αίματος από υγιείς εθελοντές, και επώασαν με τρία διαφορετικά γαλακτώματα λίπους, που χρησιμοποιούνται για παρεντερική σίτιση ασθενών (*συγκέντρωσης 0,001%, 0,01%, 0,1% και 1%*) για 24 ώρες με ενεργοποίηση ή μη από βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και φυτοαιμογλουτινίνη. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι *in vitro* επιδράσεις τριών γαλακτωμάτων λίπους, που θεωρείται ότι κατέχουν κάποιου βαθμού ανοσοκατασταλτική δράση στην παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών: Intralipide που περιέχει 100% μακράς αλύσου τριγλυκερίδια (LCT), Medialipide που περιέχει 50% LCT – 50% μέσης αλύσου τριγλυκερίδια (MCT) και του ClinOleic με 80% ελαιόλαδο. Και τα τρία γαλακτώματα λίπους μείωσαν την βασική παραγωγή του TNF-α και της IL-1β, αλλά το ClinOleic ήταν σημαντικά λιγότερο ισχυρό στην αναστολή των κυτταροκινών αυτών έναντι των άλλων δυο γαλακτωμάτων. Αντίθετα, τα επίπεδα IL-6 και IL-8 δεν επηρεάστηκαν. Μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων με LPS ωστόσο, τα γαλακτώματα λίπους δεν εκδήλωσαν κάποια επίδραση στην παραγωγή κυτταροκινών.

Ο Martin και οι συνεργάτες του [42] σε μια πολύ πρόσφατη εργασία, χρησιμοποίησαν ποντίκια για απομονώσουν περιτοναϊκά μακροφάγα, τα οποία καλλιέργησαν και ενεργοποίησαν με 10 μg/ml LPS για 24 ώρες. Τα κύτταρα επωάστηκαν ταυτόχρονα με μασλινικό οξύ (25,50 και 100

μM), μεθυλικό εστέρα L-G-νιτροαργινίνης (50 μM) ή δεξαμεθαζόνη (10 μM) και μετρήθηκαν, μεταξύ άλλων, η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο νεκρωτικός παράγοντας όγκων – α (TNF-α) στο υπερκείμενο των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι το μασλινικό οξύ είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο που προέρχεται από το pomace ελαιόλαδο, που αποτελεί μίγμα ραφιναρισμένου ελαίου από ξηρό υπόλειμμα μήλου και παρθένου ελαιολάδου. Φάνηκε λοιπόν ότι τα 50 και 100 μM μασλινικού οξέος μείωσαν στατιστικά σημαντικά ($p<0,05$ *και* $0,01$) την έκκριση IL-6 και TNF-α αντίστοιχα. Βέβαια, το μασλινικό οξύ φάνηκε αποτελεσματικό και στη μείωση του οξειδωτικού στρες, ρυθμίζοντας την απελευθέρωση δραστικών μορίων οξυγόνου (π.χ. NO και H_2O_2).

Η κατανάλωση ενός ελαιολάδου πλούσιου σε φαινολικά παράγωγα μπορεί να συνεισφέρει στην πρόσληψη βιολογικά δραστικών συστατικών, που έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιοπαθειών. Οι βιολογικές δράσεις των φαινολικών συστατικών συνοψίζονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Βιολογικές δράσεις φαινολικών παραγώγων ελαιολάδου. Από Visioli F et al., Med Res Rev 2002 ; 22(1):65-75

Δράσεις φαινολικών παραγώγων ελαιολάδου
Αναστολή της οξείδωσης της LDL, τόσο in vitro όσο και ex vivo
Αναστολή παραγωγής αποπρωτεϊνών
Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων
Αναστολή παραγωγής TXB_2 και LTB_4 ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα
Εκκαθάριση υπεροξειδίου και άλλων δραστικών μορίων οξυγόνου
Αναστολή της προκαλούμενης από υπεροξυνιτρώδες άλας βλάβης του DNA
Αναστολή της προκαλούμενης από υπεροξυνιτρώδες άλας νίτρωσης της τυροσίνης
Εκκαθάριση υποχλωρικού οξέος
Αυξημένη παραγωγή NO από μακροφάγα που έχουν διεγερθεί με LPS
Αναστολή ραγδαίας αύξησης του αριθμού των ουδετερόφιλων αναπνευστικού
Αναστολή της βακτηριακής δράσης και ανάπτυξης
Κυτταρόσταση
Υποτασική δράση
Μειωμένη απέκκριση ισοπροστάνιου σε ανθρώπους και σε ποντίκια εκτεθειμένα σε καπνό
Αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος

Τόσο η HT όσο και η OE αναστέλλουν την προκαλούμενη από θειικό χαλκό οξείδωση της LDL, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε συγκεντρώσεις 10^{-6} έως 10^{-4} M. Η προστατευτική τους δράση

διαφαίνεται από τη μείωση σχηματισμού αλδεύδων βραχείας αλυσίδας, τη μείωση υπεροξείδωσης των λιπιδίων, το μειωμένο σχηματισμό μηλονικής διαλδεϋδης της λυσίνης, υποδεικνύοντας προστασία της αποπρωτεΐνης [43]. Επιπλέον, εκδήλωσαν και οι δυο φαινολικές ουσίες ισχυρή δέσμευση μετάλλων και δράση εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών [43, 44]. Η εκκαθαριστική δράση της ΗΤ και της ΟΕ οφείλεται εν μέρει σε μείωση του υποχλωρικού οξέος (*πιθανός οξειδωτικός παράγοντας που παράγεται in vivo στην εστία της φλεγμονής*) και επομένως σε μειωμένο σχηματισμό χλωραμινών και χλωριωμένης apo-B (*που θεωρείται εναρκτήριος παράγοντας υπεροξείδωσης λιποειδών*) [45].

Ο Manna και οι συνεργάτες του, περιέγραψαν προστατευτική δράση της ΗΤ έναντι βλάβης προκαλούμενης από υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα [46]. Μικρές συγκεντρώσεις ΗΤ, ήταν ικανές να εκκαθαρίσουν υπεροξυνιτρώδη άλατα και να αναστείλουν την οξειδωτική βλάβη του DNA [47].

Η ΗΤ έχει βρεθεί *in vitro* να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη λιποξυγενάση του ΑΑ, εμποδίζοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών λευκοτριενών από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα [23] (*άρθρο ανασκόπησης*). Επιπλέον, η ΗΤ που απομονώθηκε από ελαιόλαδο με χρωματογραφία HPLC, φάνηκε να αναστέλλει την παραγωγή LTB_4 από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή εικοσανοειδών [48]. Η προσθήκη ΟΕ μαζί με LPS σε μακροφάγα ποντικού, αυξάνει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) [49]. Το NO μεταξύ άλλων αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, διατηρεί αυξημένη αγγειοδιαστολή και ασκεί επιπλέον προστατευτική δράση στην πρόληψη της οξειδωτικής τροποποίησης της LDL [23] (*άρθρο ανασκόπησης*). Η πιθανή ανασταλτική επίδραση της ΗΤ στις ανωτέρω παραμέτρους, φανερώνει βιολογικές δράσεις των φαινολικών του ελαιολάδου πέραν των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων.

Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφαλιαία φλέβα έγινε προεπώαση για 30 min με φυτοχημικές ουσίες ελαιολάδου και κρασιού (*συμπεριλαμβανομένων ΟΕ, ΗΤ, τυροσόλη, ελενολικό οξύ και ρεσβερατρόλη*) και στη συνέχεια έγινε διέγερσή τους με LPS, IL-1β ή TNF-α, και μετρήθηκε η έκφραση των μορίων προσκόλλησης. Εντός διατροφικά σχετικών συγκεντρώσεων, μόνο η ΟΕ, η ΗΤ και η ρεσβερατρόλη μείωσαν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων VCAM-1, σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν μ' αυτές που προσλαμβάνονται από τη διατροφή [50].

Ο Miles και οι συνεργάτες του [51] χρησιμοποίησαν καλλιέργειες ολικού ανθρώπινου αίματος, που είχαν διεγερθεί από LPS, παρουσία φαινολικών συστατικών έξτρα παρθένου ελαιολάδου (*βανιλικό, p-κουμαρικό, ομοβανιλικό και καφεϊκό οξύ, καμφερόλη, γλυκοζίτης ελαιοπαΐνης, τυροσόλη*) σε συγκεντρώσεις από 10^{-7} έως 10^{-4} Μ. Φάνηκε ότι ο γλυκοζίτης της ελαιοπαΐνης και το καφεϊκό οξύ μείωσαν την παραγωγή της IL-1β. Σε συγκέντρωση 10^{-4} Μ, ο γλυκοζίτης της ελαιοπαΐνης κατέστειλε την παραγωγή IL-1β κατά 80%, ενώ το καφεϊκό οξύ κατά 40%. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές αλλαγές στην παραγωγή είτε της IL-6, είτε του TNF-α από κάποιο από τα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου. Επειδή όμως η συγκέντρωση των

φαινολικών στο πλάσμα δεν υπερβαίνει τα 10^{-6} M, οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν στην εργασία αυτή είναι απίθανο να επιτευχθούν *in vivo*.

Ο Turner και οι συνεργάτες του [52], έδειξαν σε καλλιέργειες αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ότι τα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου (*ελαιοπαΐνη, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και ομοβανιλική αλκοόλη*) μειώνουν αφενός σημαντικά την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1, αφετέρου δε μειώνουν την έκκριση της χημειοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων MCP-1. Επιπλέον, φαίνεται ότι μπορούν να προστατεύσουν έναντι του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της οξειδωμένης LDL.

Για να ερευνήσουν τις πιθανές αντιφλεγμονώδεις δράσεις των αντιοξειδωτικών συστατικών του ελαιολάδου, οι Bitler και συνεργάτες [53], χρησιμοποίησαν υδρολυμένο απόνερο κατεργασίας ελιάς (*hydrolyzed olive vegetation water, OVW*) τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Συγκεκριμένα, προεπώασαν για 1 ώρα κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκύτταρων *THP-1* με OVW ή HT, και στη συνέχεια τα ενεργοποίησαν με 10 μg/ml LPS για 3 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το OVW μείωσε στατιστικώς σημαντικά την έκκριση TNF-α από τα THP-1 κύτταρα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ η υδροξυτυροσόλη δεν επηρέασε την έκκριση του TNF-α.

2.2.3 In vivo και ex vivo μελέτες

Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η χορήγηση ελαιολάδου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τριενοϊκών προσταγλαδινών, σε σχέση με αντίστοιχη χορήγηση ηλιελαίου [21] (*άρθρο ανασκόπησης*). Στον άνθρωπο, κυριαρχούν διενοϊκές προσταγλαδίνες που προέρχονται από το AA, ενώ οι τριενοϊκές προσταγλαδίνες που προέρχονται από EPA είναι ανάλογες του ποσού των ω-3 λιπαρών οξέων στη δίαιτα. Η αύξηση σχηματισμού τριενοϊκών προσταγλαδινών θεωρείται ευεργετική καθώς συνεπάγεται βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ (*μείωση τριγλυκεριδαιμίας και αύξηση των HDL-λιποπρωτεϊνών*) και μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων καθώς η θρομβοξάνη TxA_3 είναι λιγότερο δραστική από την TxA_2 [21]. Όπως προαναφέρθηκε, τόσο το λιπιδαιμικό προφίλ όσο και ο σχηματισμός θρόμβων, έχουν συμμετοχή στους πιθανούς μηχανισμός πρόκλησης σπειραματικής νεφροπάθειας. Για το λόγο αυτό, μια σωστή αναλογία παρεχόμενων λιποειδών θα πρέπει να περιέχει επαρκή ποσότητα LNA, ποσό που απαντάται επαρκώς στο ελαιόλαδο [21] (*άρθρο ανασκόπησης*).

Οι Καραντώνης και συνεργάτες [54], σιτίζοντας υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια με ελαιόλαδο, πολικά ή ουδέτερα λιποειδή ελαιολάδου για 45 μέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κουνέλια που τράφηκαν με τροφή εμπλουτισμένη σε ελαιόλαδο και πολικά λιποειδή ελαιολάδου εμφάνισαν μικρότερος πάχος αθηρωματικής πλάκας που σχετίστηκε με μειωμένη ικανότητα των αιμοπεταλίων να συσσωρεύονται έναντι του PAF.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, σιτίστηκαν C57BI/6J ποντίκια για 6 εβδομάδες είτε με συμβατική τροφή εμπορίου εμπλουτισμένη με κραμβέλαιο (*Purina*), είτε με μια από τις 4 πειραματικές δίαιτες

που περιείχαν 7% κ.β κραμβέλαιο, σησαμέλαιο, σογιέλαιο, ή παρθένο ελαιόλαδο. Μετά τις 6 εβδομάδες, προκλήθηκε στα ποντίκια ενδοτοξικό σοκ με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 400 μg/cavity LPS και έγινε λήψη ενδοπεριτοναικού υγρού 90 min ή 6 ώρες μετά. Τα ποντίκια που τράφηκαν με δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο, σε αντίθεση με τις άλλες δίαιτες, εμφάνισαν μικρότερη συσσώρευση ουδετερόφιλων και εμφάνιση λιπαρών λωρίδων, ενώ είχαν και μειωμένα επίπεδα PGE_2, LTB_4, IL-6, MCP-1 και TNF-α. Τα ποντίκια που τράφηκαν με τροφή εμπορίου ή δίαιτα εμπλουτισμένη με κραμβέλαιο, σησαμέλαιο ή σογιέλαιο απεβίωσαν εντός 48-72 ωρών μετά την ένεση, ενώ όσα τράφηκαν με δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο εκδήλωσαν αυξημένη αντίσταση στο ενδοτοξικό σοκ κατά 60% και απεβίωσαν 168 ώρες μετά την ένεση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα ποντίκια που σιτίστηκαν με ελαιόλαδο είχαν βελτιωμένη αντοχή στο ενδοτοξικό σοκ, ενώ ο προστατευτικός μηχανισμός μπορεί να περιλαμβάνει ρύθμιση σχηματισμού λιπωδών λωρίδων και μειωμένη παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Από τη στιγμή που η κατανάλωση ελαιολάδου για 6 εβδομάδες μείωσε τα επίπεδα IL-6 και TNF-α, θεωρείται ότι δίαιτα πλούσια σε ελαϊκό οξύ μπορεί να ρυθμίσει την προκαλούμενη από LPS σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επειδή όμως μόνο σε ποντίκια που τράφηκαν με ελαιόλαδο αναστάλθηκε σχεδόν πλήρως η παραγωγή του MCP-1, οι συγγραφείς υποθέτουν ότι και άλλα συστατικά του ελαιολάδου (π.χ. φαινολικά παράγωγα) συμμετέχουν στη ρύθμιση παραγωγής κυτταροκινών [55].

Με παρόμοιο του προαναφερθέντος πρωτόκολλο, οι Sadeghi και συνεργάτες [56] σίτισαν για 5 εβδομάδες ποντίκια, στα οποία χορήγησαν 100 μg LPS/20 g σωματικού βάρους ζώου μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος. Τα ποντίκια θανατώθηκαν με υπερδόση CO_2 σε 30, 60, 90, 120 και 240 min μετά την ένεση. Όπως αποδείχθηκε, το έλαιο καρύδας και το ιχθυέλαιο μείωσαν τις συγκεντρώσεις IL-1, IL-6 και TNF-α στα δείγματα αίματος, σε σχέση με το ελαιόλαδο.

Οι El Seweidy και συνεργάτες [57] όμως, σίτισαν αρσενικά Wistar ποντίκια με αθηρογόνο δίαιτα για 4 μήνες και στη συνέχεια η δίαιτά τους εμπλουτίσθηκε με 10% κατά βάρος παρθένο ελαιόλαδο, ηλιέλαιο ή ιχθυέλαιο για 4 και 8 εβδομάδες. Έγινε λήψη αίματος πριν την έναρξη του πειράματος, μετά την αθηρογόνο δίαιτα και κατά την διάρκεια του διατροφικού προγράμματος (*4η και 8η εβδομάδα*). Η διατροφική παρέμβαση με ελαιόλαδο περιόρισε την ευαισθησία των λιποπρωτεϊνών στην οξείδωση και μείωσε σημαντικά τις δραστικότητες της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της γλουταθιόνης στην αορτή. Φάνηκε επίσης, ότι το ιχθυέλαιο μείωσε τους χημειοτακτικούς παράγοντες MCP-1 και RANTES περισσότερο από το ελαιόλαδο.

Αφετέρου, σε στείρα BALB/c ποντίκια, που παρέμειναν νηστικά για 24 ώρες πριν το πείραμα, χορηγήθηκε από το στόμα (*σε διάφορες δόσεις*) έκπλυμα κατεργασίας ελιάς OVW ή γλυκοζαμίνη ή συνδυασμός των δυο [53]. Έπειτα από 12 ώρες, τους χορηγήθηκε δεύτερη δόση, ενώ μια ώρα αργότερα έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 50 μg LPS σε νερό. Τα ποντίκια θανατώθηκαν δυο ώρες μετά και έγινε αιμοληψία. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της προκαλούμενης από LPS παραγωγής TNF-α από 1,4 g/kg OVW, ενώ στα ζώα που χορηγήθηκαν 5 g/kg OVW μειώθηκε η παραγωγή του κατά >90%, χωρίς τοξικές επιδράσεις. Επιπλέον, στα ζώα που χορηγήθηκε ο

συνδυασμός 35 mg OVW +12,5 mg γλυκοζαμίνης, έδειξε συνεργιστική δράση στην αναστολή της έκκρισης του TNF-α.

Ο Mata και οι συνεργάτες του [58], καλλιέργησαν αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα παρουσία ορού από εθελοντές που είχαν τραφεί με ελαιόλαδο, ηλιέλαιο ή ιχθυέλαια. Η δίαιτα πλούσια σε μονοακόρεστα ή ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του DNA, όπως φάνηκε από την ενσωμάτωση της [^{3}H]-θυμιδίνης στο DNA.

Το ποσό πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στις LDL μπορεί να παρέχει αρκετές πληροφορίες για την ευαισθησία των LDL στην οξείδωση. Η Ramirez – Tortosa και οι συνεργάτες της [59], μελέτησαν την επίδραση 2 κουταλιών της σούπας έξτρα – παρθένου ελαιολάδου για 3 μήνες σε άντρες με περιφερικές αγγειοπάθειες. Το ελαιόλαδο φάνηκε σημαντικά πιο αποτελεσματικό στη μείωση της οξείδωσης των LDL, παρουσία ιόντων χαλκού *ex vivo*. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι και η παρουσία αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο μπορεί να συνεισφέρει σε αυτήν την κατεύθυνση [59].

Ο Yaqoob και οι συνεργάτες του [60] έδειξαν ότι δίαιτα πλούσια σε MFA (*πλούσια δηλαδή σε ελαιόλαδο*) μείωσε σημαντικά την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 σε ανθρώπινα μονοπύρηνα κύτταρα αίματος και παρουσίασε τάση μείωσης των μορίων προσκόλλησης που σχετίζονται με τα μακροφάγα.

Οι Tappia και Grimble [61] χρησιμοποίησαν 36 αρσενικά Wistar ποντίκια, τα οποία έλαβαν για είτε 4 ή 8 εβδομάδες μια από τις 5 συνθετικές δίαιτες που περιείχαν βούτυρο, έλαιο καρύδας, καλαμποκέλαιο, ιχθυέλαιο και ελαιόλαδο αντίστοιχα. Σε όλες τις δίαιτες, το 10 % του λίπους προερχόταν από καλαμποκέλαιο για να προληφθεί η ανεπάρκεια απαραίτητων λιπαρών οξέων. Έγινε λήψη και καλλιέργεια περιτοναϊκών μακροφάγων. Μετά από 4 εβδομάδες σίτισης, το ιχθυέλαιο και το ελαιόλαδο προκάλεσε αύξηση παραγωγής της IL-6 και LTB_4 από τα μακροφάγα, ενώ μετά από 8 εβδομάδες σίτισης, το ελαιόλαδο και το καλαμποκέλαιο αύξησαν την παραγωγή IL-1 από τα μακροφάγα. Στο ίδιο χρονικό διάστημα το καλαμποκέλαιο αύξησε την παραγωγή PGE_2 και το ελαιόλαδο την παραγωγή LTB_4.

Οι Yaqoob και Calder [62] σε ποντίκια Weanling χορήγησαν μια από τις 5 παρακάτω δίαιτες: χαμηλού λίπους (*2,5% του βάρους*), με υδρογονωμένο λάδι καρύδας, ελαιόλαδο, ηλιέλαιο ή menhaden ιχθυέλαιο (*οι 4 τελευταίες δίαιτες με 20% του βάρους λίπη*) για 8 εβδομάδες. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, προκάλεσαν μετανάστευση μακροφάγων στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα και στη συνέχεια, απομονώθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα, που καλλιεργήθηκαν και έπειτα ενεργοποιήθηκαν παρουσία LPS. Τα μακροφάγα από τα ποντίκια που τράφηκαν με ελαιόλαδο, ηλιέλαιο ή ιχθυέλαιο παρήγαγαν μικρότερη ποσότητα TNF-α σε σχέση με τις άλλες δίαιτες, ενώ δεν επηρεάστηκε η παραγωγή IL-1. Φάνηκε ότι μόνο το ιχθυέλαιο μείωσε την εκκρινόμενη IL-6, ενώ το ελαιόλαδο, το ηλιέλαιο και το ιχθυέλαιο αύξησαν την παραγωγή NO. Υποστηρίζεται λοιπόν, ότι το ιχθυέλαιο έχει την πιο αποδοτική επίδραση στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντηση.

Σε αρσενικά C57B16 ποντίκια δόθηκε για 6 εβδομάδες δίαιτα είτε μειωμένου λίπους (*25 g/kg καλαμποκέλαιο*) είτε δίαιτα αυξημένου λίπους 200 g/kg ελαίου καρύδας, ελαιολάδου, ηλιελαίου ή ιχθυελαίου ως κύρια πηγή λίπους. Απομονώθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από τα ποντίκια, τα οποία καλλιεργήθηκαν και ενεργοποιήθηκαν με 10 μg LPS. Μετά από 24 ώρες συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων και αναλύθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Φάνηκε λοιπόν, ότι το ιχθυέλαιο μείωσε σημαντικά την παραγωγή TNF-α και IL-1 από τα φλεγμονώδη μακροφάγα σε σχέση με τα υπόλοιπα έλαια, ενώ αύξηση παραγωγής των κυτταροκινών αυτών παρατηρήθηκε στα ιστικά μακροφάγα. Γεγονός, που πιθανότατα υποδεικνύει διαφορετική ανταπόκριση των ιστικών από τα κυκλοφορούντα μακροφάγα στα ανωτέρω έλαια [63].

Ο Visioli και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα φαινολικά του ελαιολάδου απορροφούνται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο από τους ανθρώπους και αποβάλλονται στα ούρα συζευγμένα με γλυκουρονίδιο, ενώ τα αυξανόμενα ποσά φαινολικών από το ελαιόλαδο διεγείρουν το ρυθμό σύζευξής τους με το γλυκουρονικό οξύ [64] (*άρθρο ανασκόπησης*). Έχει αποδειχθεί ότι η HT, χορηγούμενη σε ποντίκια ως το μοναδικό δραστικό συστατικό του απόβλητου κατεργασίας της ελιάς (*waste water*), μπορεί να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος [64] (*άρθρο ανασκόπησης*).

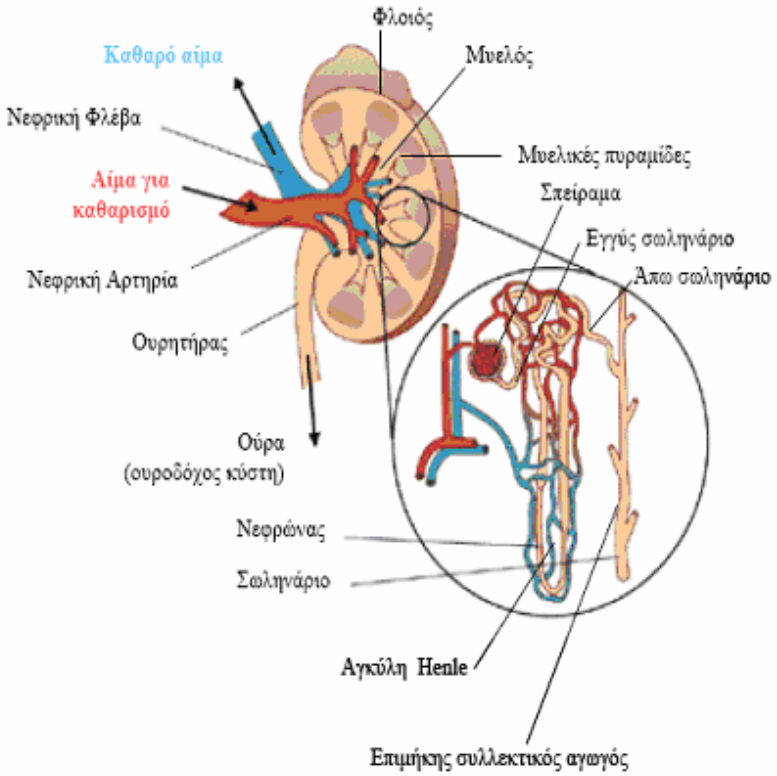
Μια μικρή δόση HT ήταν ικανή να αναστείλει οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από παθητικό κάπνισμα σε ποντίκια, όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη αποβολή 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα [65]. Επίσης, παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού αποβολής 8-iso-PGF_{2a} στα ούρα και του αυξανόμενου ποσού φαινολικών από το ελαιόλαδου σε ανθρώπους εθελοντές [66]. Επιπλέον, ελέγχθηκε η υπόθεση ότι τόσο η HT όσο και η OE εκδηλώνουν οιστρογονικές ή ανδρογονικές δράσεις in vivo, αν και δεν επιβεβαιώθηκε [64]. Μεταξύ των συστατικών του ελαιολάδου, τριτερπένια όπως η ερυθροδιόλη και το ελαιανολικό οξύ φαίνεται πως έχουν σε *in vivo* μελέτες και αγγειοδιασταλτική δράση σε πειραματόζωα [67].

Κεφάλαιο 3ο
Νεφρικές Παθήσεις

3.1 **Δομή και φυσιολογία νεφρού** [68-71]

Οι νεφροί βρίσκονται οπισθοπεριτοναϊκά στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, κάθε νεφρός εμφανίζει περίπου 11 εκατοστά μήκος, 6 εκατοστά μήκος και 4 εκατοστά πάχος. Οι νεφροί κείνται σε ένα άφθονο λιπώδες προσκεφάλαιο (*περινεφρικό λίπος*), το οποίο περιέχεται μεταξύ των πετάλων της περιτονίας. Ο νεφρός έχει στην πραγματικότητα 3 κάψες: (α) την κάψα της νεφρικής περιτονίας, (β) τη λιπώδη (περινεφρικό λίπος) και (γ) τη γνήσια ινώδη κάψα, η οποία συνάπτεται χαλαρά με την επιφάνεια του φυσιολογικού νεφρού αλλά προσκολλάται στερεά σε ένα όργανο υπό συνθήκες φλεγμονής.

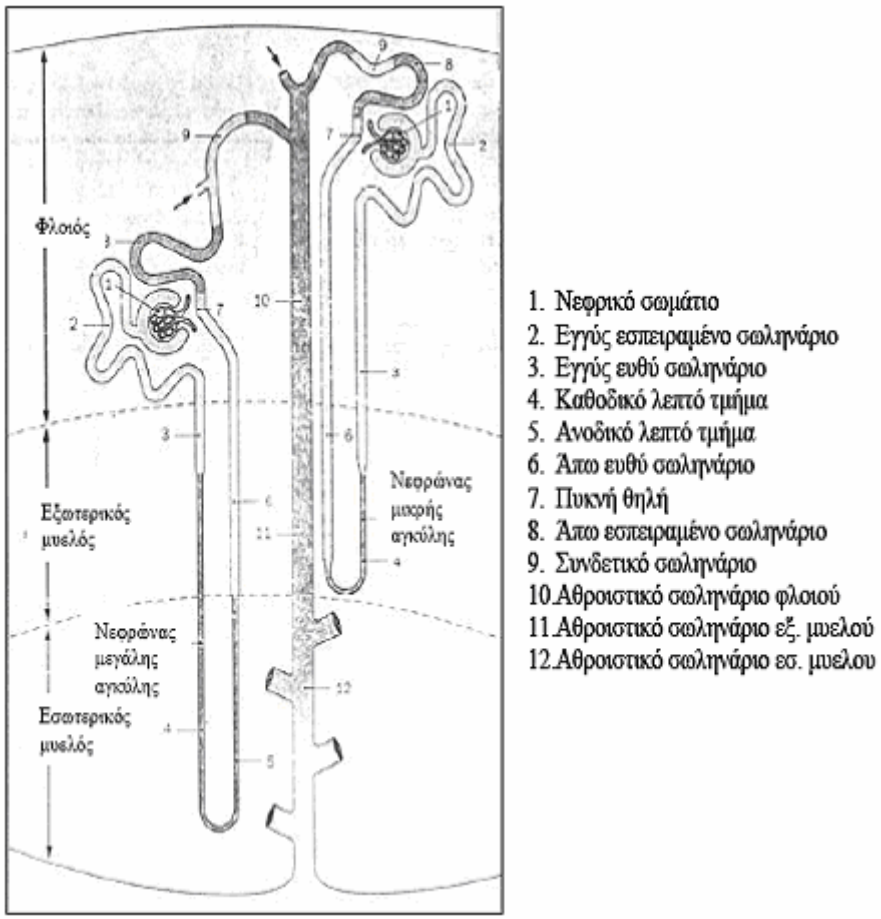
Η αιμάτωση των νεφρών περιλαμβάνει τη νεφρική αρτηρία εκφύεται απευθείας από την αορτή, τη νεφρική φλέβα αποχετεύεται απευθείας στην κάτω κοίλη φλέβα, τη αριστερή νεφρική φλέβα διέρχεται μπροστά από την αορτή αμέσως κάτω από την έκφυση της άνω μεσεντέριας αρτηρίας, ενώ η δεξιά αρτηρία διέρχεται πίσω από την κάτω κοίλη φλέβα. Επιπλέον, τα λεμφαγγεία παροχετεύονται απευθείας από στους παραορτικούς λεμφαδένες.



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση δομής του νεφρού.

3.1.1 Νεφρώνας

Κάθε νεφρός περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο όμοιες μονάδες που ονομάζονται **νεφρώνες**. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από: **(α)** ένα αρχικό διηθητικό οργανίδιο το οποίο ονομάζεται νεφρικό σωμάτιο και **(β)** ένα σωληνάριο το οποίο αποτελεί φυσική προέκταση του νεφρικού σωματίου. Το νεφρικό σωμάτιο σχηματίζει, από το αίμα, ένα διήθημα το οποίο δεν περιέχει ούτε κύτταρα ούτε πρωτεΐνες. Το διήθημα αυτό εγκαταλείπει το νεφρικό σωμάτιο και εισέρχεται στο σωληνάριο. Το σύστημα των σωληναρίων του νεφρώνα αποτελείται από το εγγύς σωληνάριο, το λεπτό και παχύ τμήμα της καμπύλης του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, τα οποία σκεπάζονται από μια βασική μεμβράνη που είναι συνέχεια του περιορισμένου συνδετικού ιστού. Καθώς αυτό ρέει μέσα στο σωληνάριο διάφορες ουσίες προστίθενται ή αφαιρούνται. Τελικά, το υγρό από όλους τους νεφρώνες συλλέγεται και εξέρχεται ως ούρα.

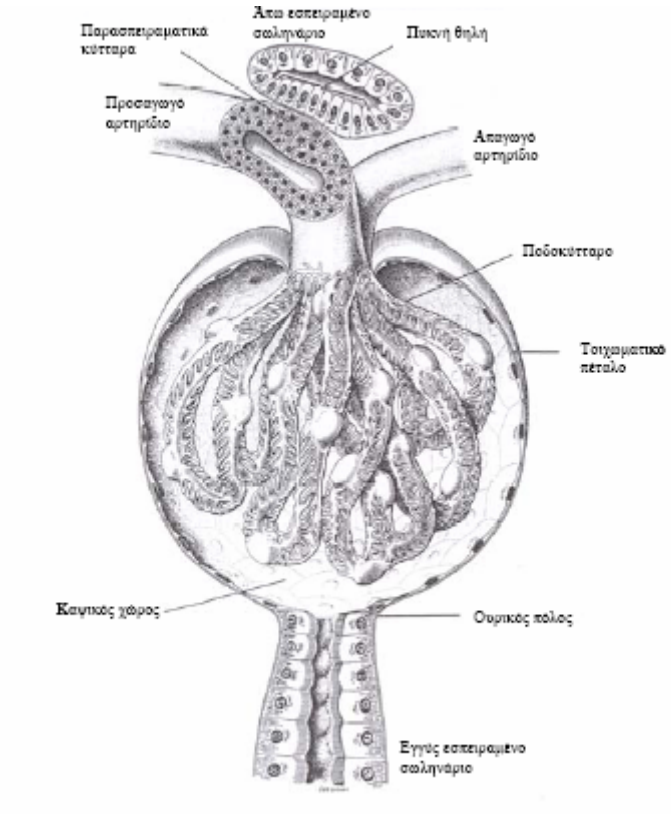


Εικόνα 3.2 Σχηματική αναπαράσταση του νεφρώνα και του συστήματος των αθροιστικών σωληναρίων.

Νεφρικό σωμάτιο

Κάθε νεφρικό σωμάτιο περιέχει ένα θύσανο αλληλοσυνδεδεμένων τριχοειδών βρόχων ο οποίος ονομάζεται νεφρικό σπείραμα ή σπειραματικά τριχοειδή. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο. Το νεφρικό σπείραμα θηλυκώνει μέσα σε μια κάψουλα γεμάτη

υγρό, γνωστή ως κάψα του Bowman. Ο συνδυασμός ενός σπειράματος και μίας κάψας αποτελεί το νεφρικό σωμάτιο. Καθώς το αίμα ρέει μέσα στο σπείραμα, ένα μέρος του πλάσματος διηθείται μέσα στην κάψα του Bowman. Το υπόλοιπο του αίματος εξέρχεται από το σπείραμα με ένα άλλο αρτηρίδιο, το απαγωγό αρτηρίδιο.



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση του νεφρικού σωματίου

Βασική μεμβράνη σπειράματος

Το αίμα του σπειράματος διαχωρίζεται από το χώρο του Bowman από ένα φραγμό διήθησης ο οποίος αποτελείται από τρεις στιβάδες: (α) του μονοστιβαδικού ενδοθηλίου των τριχοειδών αγγείων, (β) της ακυτταρικής πρωτεϊνικής βασικής μεμβράνης, η οποία κείται ανάμεσα στο ενδοθήλιο και την επόμενη στιβάδα, δηλαδή (γ) τον μονοστιβαδικό επιθηλιακό υμένα της κάψας του Bowman.

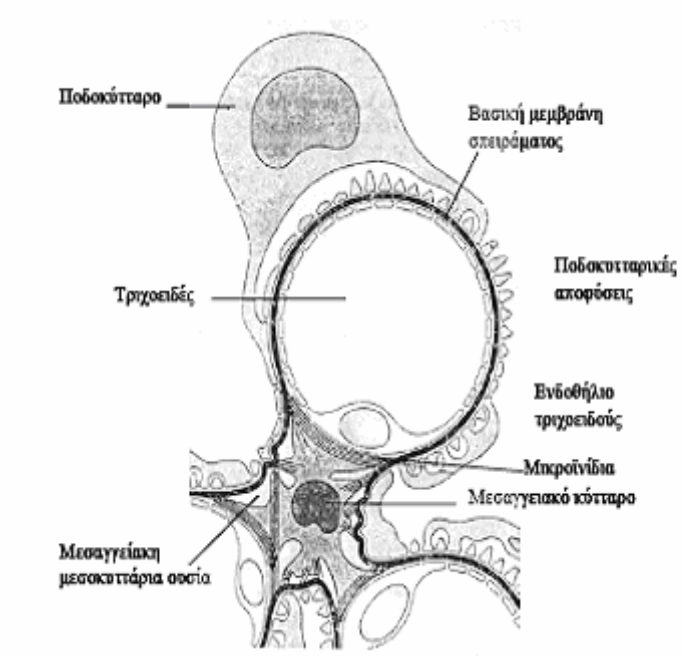
Τα επιθηλιακά κύτταρα του υμένα κάψας του Bowman είναι διαφορετικά από τα απλά επίπεδα κύτταρα που πλαισιώνουν το υπόλοιπο της κάψας του Bowman και ονομάζονται *ποδοκύτταρα*. Τα κύτταρα αυτά έχουν μια χταποειδή δομή, αφού παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό προεκτάσεων. Τα υγρά διηθούνται πρώτα μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ακολούθως στη βασική μεμβράνη και τελικά ανάμεσα στις προεξοχές, διηθητικές σχισμές των ποδοκυττάρων.

Μεσάγγειο

Εκτός από τα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και ποδοκύτταρα, υπάρχει και ένας τρίτος τύπος κυττάρων, τα *μεσαγγειακά κύτταρα*, τα οποία αποτελούν κύτταρα τροποποιημένου λείου μυός, που βρίσκονται στο εσωτερικό των τριχοειδικών αγγείων του σπειράματος, χωρίς όμως να ανήκουν στη διηθητική οδό. Η βασική μεμβράνη με 2 ή 3 τριχοειδή δημιουργεί σχηματισμούς (*σπειραματικός λοβός*) στον κενό χώρο των οποίων βρίσκεται το *μεσάγγειο*, που αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσαγγειακή εξώκυττάρια ουσία. Τα μεσαγγειακά κύτταρα αφετέρου, έχουν πολλές προεκβολές που εκτείνονται στη βασική μεμβράνη του σπειράματος, ενώ ο χώρος που δεν καλύπτεται από τα μεσαγγειακά κύτταρα περιέχει τη μεσαγγειακή εξώκυττάρια ουσία που περιέχει πυκνό δίκτυο από ελαστικά μικροϊνίδια. Μεταξύ των βασικών δράσεων των μεσαγγειακών κυττάρων συμπεριλαμβάνεται το ότι [72]:

- Στηρίζουν δομικά το σπείραμα και το σπειραματικό λοβό.
- Αναγεννούν και αλλάζουν τη σύσταση της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας.
- Αποτελούν στόχο αγγειοσυσταλτικών παραγόντων (*π.χ. αγγειοτενσίνη ΙΙ, ενδοθηλίνη, βασοπρεσσίνη, νορεπινεφρίνη*) και αγγειοδιασταλτικών (*π.χ. NO, προσταγλαδίνες* PGE_2, PGI_2, *ντοπαμίνη*).
- Αποτελούν στόχο φλεγμονωδών παραγόντων, παραγόντων ανάπτυξης και κυτταροκινών με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την αλλαγή της σύστασης της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας.
- Αποτελούν πηγή αγγειοδραστικών παραγόντων, προσταγλαδινών, θρομβοξανών, λευκοτριενών, PAF, NO, χυμοκινών και παραγόντων ανάπτυξης.
- Αποτελούν τόπο παραγωγής ενεργοποιητών και αναστολέων πλασμινογόνου.
- Χειρίζονται μακρομόρια όπως λιποειδή, ανοσοσυμπλέγματα και τα προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης.

Πρόσφατα, ένα ανοσολογικό μοντέλο μεσαγγειόλυσης και γενετικών *in vivo* knock-outs για τον αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλίων (*platelet derived growth factor, PDGF*) ή τους υποδοχείς αυτού, υπέδειξε ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση και τη διατήρηση των σπειραματικών τριχοειδικών βρόχων [72]. Η απώλεια των μεσαγγειακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδοσπειραματικών αγγειακών θυλάκων, αντί για το φυσιολογικό δίκτυο των τριχοειδών [73]. Έχει προταθεί ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορούν ακόμα και να επηρεάσουν την αιματική ροή στους σπειραματικούς λοβούς και να τροποποιήσουν την αποτελεσματική διηθητική επιφάνεια των τριχοειδών [72].



Εικόνα 3.4 Σχηματική αναπαράσταση του σπειραματικού λοβού. Διακρίνεται ένα τριχοειδές και η τοποθεσία του μεσάγγειου (μεσαγγειακό κύτταρο και μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία).

3.1.2 Σύστημα αθροιστικών σωληναρίων

Το νεφρικό σωληνάριο αποτελεί συνέχεια του έξω πετάλου της κάψας του Bowman και είναι ένας στενός κοιλώδης κύλινδρος φτιαγμένος από μια στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων τα οποία στηρίζονται πάνω σε μια βασική μεμβράνη. Το τμήμα του σωληναρίου στο οποίο εισρέει το υγρό από την κάψα του Bowman ονομάζεται εγγύς σωληνάριο και αποτελείται από τα σωληνάρια, *εγγύς εσπειραμένο* και το *εγγύς ευθύ*. Το επόμενο τμήμα του σωληναρίου είναι η αγκύλη του Henle, η οποία είναι μια οξεία φουρκετοειδής καμπύλη από ένα κατιόν σκέλος (*που προέρχεται από το εγγύς σωληνάριο*) και ένα ανιόν σκέλος το οποίο οδηγεί στο επόμενο μέρος του νεφρώνα, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Από το άπω εσπειραμένο σωληνάριο τα ενδοσωληναριακά υγρά ρέουν μέσα στο σύστημα των αθροιστικών πόρων, το πρώτο μέρος των οποίων αποτελεί το συνδετικό σωληνάριο, ακολουθούμενο από το φλοιώδη και το μυελώδη αθροιστικό πόρο.

Από την κάψα του Bowman μέχρι το σύστημα των αθροιστικών πόρων, ο κάθε νεφρώνας είναι εντελώς ξεχωριστός από τον άλλο. Ο διαχωρισμός αυτός τερματίζεται όταν συγχωνεύονται οι πολλαπλοί φλοιώδεις αθροιστικοί πόροι. Από το σημείο αυτό και μετά, επέρχονται επιπρόσθετες συγχωνεύσεις έτσι ώστε τα σχηματιζόμενα ούρα να διοχετεύονται μέσα στην κεντρική νεφρική κοιλότητα, τη νεφρική πύελο, μέσω αρκετών εκατοντάδων μυελωδών πόρων αθροιστικών πόρων. Ο αποχευτικός ουρητήρας του νεφρού θεωρείται φυσική συνέχεια της νεφρικής πυέλου.

3.1.3 Παρασπειραματική συσκευή

Το ανιόν σκέλος κάθε μιας αγκύλης του Henle έρχεται σε επαφή με το προσαγωγό και το απαγωγό αρτηρίδιο του δικού του νεφρώνα, καθώς διέρχεται ανάμεσα τους. Σε αυτό το σημείο επαφής του ανιόντος σκέλους υπάρχει μια πλάκα κυττάρων η οποία ονομάζεται πυκνή κηλίδα. Το τοίχωμα των προσαγωγών αρτηριδίων στο σημείο αυτό περιέχει εκκριτικά κύτταρα, γνωστά ως παρασπειραματικά κύτταρα (*τα οποία εκκρίνουν την ορμόνη ρενίνη*). Η ενότητα πυκνής κηλίδας και παρασπειραματικών κυττάρων αποτελεί την παρασπειραματική συσκευή. Πιστεύεται ότι η πυκνή θηλή δίνει πληροφορίες στο σπείραμα για τη σύσταση του υγρού που είναι στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο και έτσι ρυθμίζεται ο τόνος του απαγωγού αρτηριδίου αλλάζοντας τη ροή του αίματος και τη ροή φιλτραρίσματος.

3.2 **Φυσιολογικές λειτουργίες του νεφρού** [68, 69, 71, 74]

Οι τρεις βασικές νεφρικές διεργασίες είναι η σπειραματική διήθηση, η σωληναριακή επαναρρόφηση και η σωληναριακή έκκριση. Επιπρόσθετα οι νεφροί συνθέτουν ή καταβολίζουν συγκεκριμένες ουσίες. Στις ομοιοστατικές λειτουργίες των νεφρών συμπεριλαμβάνονται:

1. Ρύθμιση του νερού, της οξεοβασικής ισορροπίας και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών: επηρεάζει των όγκο των υγρών και το ωσμωτικό ισοζύγιο με σωληναριακή απορρόφηση NaCl, τη συγκέντρωση καλίου με σωληναριακή έκκριση K^+, την οξεοβασική ισορροπία με σωληναριακή έκκριση H^+, το ωσμωτικό ισοζύγιο με σωληναριακή επαναρρόφηση νερού, και την ομοιόσταση Ca, P, Mg με σωληναριακή μεταφορά αυτών.
2. Απέκκριση άχρηστων ουσιών: αποβάλλεται ουρία και κρεατινίνη με σπειραματική διήθηση, ουρικό οξύ – γαλακτικό οξύ – φάρμακα (*διουρητικά*) με σωληναριακή έκκριση, ενώ οι ορμόνες της υπόφυσης και η ινσουλίνη καταβολίζονται στα σωληνάρια .
3. Ρύθμιση της πίεσης του αίματος: μεταβάλλουν των εξωκυττάριο όγκο μέσω μεταβολής της απέκκρισης του νατρίου και τις αγγειακές αντιστάσεις μέσω παραγωγής ρενίνης (*συνεπάγεται παραγωγή αγγειοτενσίνης ΙΙ*) από τα παρασπειραματικά κύτταρα.
4. Νεφρική ορμονική ρύθμιση: παράγεται αφενός ερυθροποιητίνη από κύτταρα του περισωληναριακού τριχοειδούς ή από περισωληναριακούς ινοβλάστες, η οποία διεγείρει το μυελό των οστών για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αφετέρου, στους νεφρούς λαμβάνει η υδροξυλίωση της 25- υδροξυ-χοληκαλσιφερόλης (*παράγεται στο ήπαρ*) στη θέση 1 ή 24, ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου. Τη δραστηριότητα αυτή – ενεργοποίηση της βιταμίνης D – μπορεί να διεγείρει η παραθορμόνη. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε τα παρασπειραματικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν ρενίνη, η οποία προάγει το σχηματισμό αγγειοτενσίνης ΙΙ που αποτελεί ισχυρή

αγγειοσυσταλτική ουσία και διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη διεγείρει τη νεφρική απορρόφηση νατρίου και απέκκριση καλίου και ιόντων υδρογόνου.

5. Ομοιόσταση της γλυκόζης: παράγεται γλυκόζη μέσω της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης από γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ και αμινοξέα, ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα γλυκόζης στα πλάσμα.

Οι νεφροί δέχονται το 20%, περίπου, της καρδιακής παροχής, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ρυθμό ροής αίματος περίπου 1200 ml/min ή ρυθμό νεφρικής ροής πλάσματος περίπου 600 ml/min. Η αιμάτωση του νεφρού δεν είναι ανάλογη προς την κατανάλωση οξυγόνου, δηλαδή μόνο το 15% του αίματος κατευθύνεται στη μυελώδη μοίρα – μια περιοχή με μεγάλη κατανάλωση οξυγόνου λόγω της ενεργητικής μεταφοράς νατρίου από το ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle.

Ο συνηθισμένος ημερήσιος όγκος ούρων είναι περίπου 1,5 L. Αυτό σημαίνει ότι με φυσιολογικό ρυθμό σπειραματικής διήθησης περίπου 180 L/ημέρα, μετά τη διήθηση επαναρροφούνται 178,5 L υγρού. Έτσι, η αύξηση της πίεσης αιμάτωσης των νεφρών κατά 25% θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης κατά 45 l με αποτέλεσμα την παραγωγή 46,5 L ούρων την ημέρα.

3.3 **Χαρακτηριστικά Νεφρικών Παθήσεων**

Οι παθήσεις των νεφρών μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την εστία της βλάβης: (α) σπειραματικές, (β) σωληναριακές, (γ) διάμεσες και (δ) αγγειακές. Οι πιο κοινές παθήσεις αφορούν το σπείραμα και αποτελούν το πιο σύνηθες αίτιο νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου. Οι διάφορες – φλεγμονώδεις ή μη ασθένειες – που επηρεάζουν το νεφρικό σπείραμα, έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της σπειραματικής δομής, διαπερατότητας και λειτουργίας. Οι σπειραματοπάθειες διακρίνονται σε πρωτογενείς (*με εκδηλώσεις μόνο στο νεφρό*) και σε δευτερογενείς, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, εάν αποτελούν κομμάτι συστηματικής νόσου [75, 76].

Η νεφρική βλάβη μπορεί να προκληθεί από ποικίλα αίτια: αιμοδυναμικά, τοξικά, μεταβολικά, ανοσολογικά κτλ. Η βλάβη αυτή συνεπάγεται απώλεια νεφρώνων και μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Ανεξάρτητα όμως από το αίτιο της νεφρικής βλάβης, ο οργανισμός προσπαθεί να αντισταθμίσει τη μειωμένη νεφρική λειτουργία, προκαλώντας υπερτροφία και υπερλειτουργία των εναπομεινάντων νεφρώνων. Με τον τρόπο αυτό, για μικρά χρονικά διαστήματα ο οργανισμός εξισορροπεί τις βιοχημικές παραμέτρους και εξασφαλίζει ικανοποιητική νεφρική λειτουργία [75].

Μακροπρόθεσμα όμως, λαμβάνουν χώρα περαιτέρω αλλαγές, δομικές ή μεταβολικές, που οδηγούν σε μακροχρόνια βλάβη. Στις δομικές αυτές αλλαγές συμπεριλαμβάνονται ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων, η ατροφία των νεφρικών

σωληναρίων, η συσσωμάτωση του εξωκυττάριου υγρού, η διήθηση κυττάρων και ο σχηματισμός μυοινοβλαστών. Αφετέρου, οι μεταβολικές επιπλοκές περιλαμβάνουν τη συστηματική και ενδοσπειραματική υπέρταση, την ινσουλινοαντίσταση, την υπερλιπιδαιμία, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το οξειδωτικό στρες, την ανισορροπία κυτταροκινών και λιποειδικών μεσολαβητών, την πρωτεϊνουρία και την καταστολή έκφρασης προστατευτικών γονιδίων. Η συνεχής και μακρόχρονη ενίσχυση των παραγόντων που συμμετέχουν στις αντισταθμιστικές αλλαγές έναντι της σπειραματικής και σωληναριακής βλάβης, οδηγεί σε δομική καταστροφή του νεφρού (*σπειραματοσκλήρυνση*) και σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου [75-77].

Βασικό χαρακτηριστικό των περισσοτέρων τύπων νεφρικής βλάβης αποτελεί η υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας και η μεταβολή της σύστασης αυτής. Στην ρύθμιση των γεγονότων αυτών φαίνεται πως έχει βασικό ρόλο ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF-β, διεγείροντας τη σύνθεση κολλαγόνου, ινωδονεκτίνης και πρωτεογλυκανών σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων. Εμπλέκονται επίσης ο PDGF, ο PAF, οι ιντερλευκίνες IL-1 και IL-6. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι μετά από μια περίοδο προσαρμοστικών αλλαγών, η σπειραματοσκλήρυνση και η σωληναριακή ατροφία μειώνουν τον αριθμό των νεφρώνων, πυροδοτώντας τη συνεχόμενη αυτοκαταστροφή αυτών με αποκορύφωμα την ίνωση, την ουλοποίηση και την ουραιμία [78, 79].

Οι περισσότεροι τύποι σπειραματονεφρίτιδας χαρακτηρίζονται από κυτταρική υπερπλασία, που είτε προκαλείται από διείσδυση των φλεγμονωδών κυττάρων της αιματικής κυκλοφορίας (π.χ. ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, αιμοπετάλια), είτε αφορά υπερπλασία σπειραματικών κυττάρων, ιδιαίτερα των μεσαγγειακών κυττάρων [80]. Τα φλεγμονώδη κύτταρα της κυκλοφορίας και τα σπειραματικά κύτταρα συμμετέχουν στον τραυματισμό του σπειράματος ελευθερώνοντας πρωτεάσες, χημειοτακτικές ουσίες, δραστικά λιποειδή, οξειδωτικές ουσίες και μόρια αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης [81].

Υπό συνθήκες χρόνιας φλεγμονής, το φαινόμενο ενισχύεται από την έκκριση τόσο κυτταροκινών (π.χ. IL-1, IL-6, TNF-α), χημειοκινών [*π.χ. MCP-1, φλεγμονώδης πρωτεϊνη μακροφάγων (MIP), χημειοκίνη εκφραζόμενη και παραγόμενη από Τ κύτταρα μετά από ενεργοποίηση RANTES, IL-8*] και παραγόντων ανάπτυξης [*π.χ. TGF-β, PDGF, αυξητικός παράγοντας όμοιος ινσουλίνης-1 (IGF-1), βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF)*] όσο και προφλεγμονωδών λιποειδών (*π.χ. PAF, εικοσανοειδή που προκύπτουν από τη δράση των φωσφολιπασών PLA_2 και PLC*), έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη απόθεση εξωκυττάριου υγρού που οδηγεί τελικά σε σκλήρυνση. Ο *πίνακας 3.1* συνοψίζει τους παράγοντες που –με τον ένα ή τον άλλο τρόπο εμπλέκονται στη διαδικασία της σπειραματικής βλάβης [79, 81].

Πίνακας 3.1 Παράγοντες που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της σπειραματικής βλάβης [77, 79, 81, 82]

Συμπλήρωμα
Χημειοτακτικοί παράγοντες κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων C5a και C5a χωρίς Arg
Παράγοντες αγγειακής διαπερατότητας C3b και iC3b
Οσπονίνες, που ενεργοποιούν φαγοκυττάρωση
Κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως το σύμπλεγμα C5b-9
Λιποειδικής φάσης μεσολαβητές
Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)
Προσταγλαδίνες (PGE_2 και PGI_2 προκαλούν χαλάρωση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και σπειραματικών μεσαγγειακών κυττάρων)
Λευκοτριένια (LTC_4 προκαλούν αγγειοσυστολή)
Κυτταροκίνες
Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, TNF-a, IL-6, GM-CFS, M-CFS, INF-γ)
Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, INF-a, TGF-β)
Χημειοκίνες
MCP-1, RANTES, MIP
Μόρια Προσκόλλησης
Σελεκτίνες (L-, P- και E-σελεκτίνη σε λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων αντίστοιχα)
Ιντεργκρίνες (ICAM, VCAM, PECAM)
Μόρια που ελέγχουν τον αγγειακό τόνο
Αγγειοδιασταλτικά (NO, προσταγλαδίνες, artial natriuretic peptide ANP)
Αγγειοσυσταλτικά (IL-1, θρομβίνη, ενδοθηλίνη, AngII, TXA_2, ενδοθηλιακός συσταλτικός παράγοντας EDCF)
Ενεργές μορφές οξυγόνου
ROS προκαλούν νέκρωση και απόπτωση μεσαγγειακών κυττάρων και αυξάνουν τη διαπερατότητα του σπειράματος στη λευκωματίνη

3.4 **Φλεγμονή του σπειράματος**

3.4.1 Η φλεγμονώδης διαδικασία

Η φλεγμονή αναπτύσσεται για να ελέγξει τη λοίμωξη και άλλους τύπους τραυματισμών και για να επηρεάσει την ιστική αποκατάσταση, είτε μέσω διατήρησης της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας του είτε μέσω ουλοποίησης. Η ακούσια ενεργοποίηση της διαδικασίας της φλεγμονής ή η έλλειψη ενός κατάλληλου σήματος τερματισμού αυτής μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καταστρέφοντας τους περιβάλλοντες ιστούς. Η μη φυσιολογική ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης θεωρείται ότι ευθύνεται για τον τραυματισμό ιστών που συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τελικός στόχος της φλεγμονής είναι να απαλλαγεί ο οργανισμός

από την αρχική αιτία του τραυματισμού των κυττάρων και από νεκρά κύτταρα και ιστούς που αποτελούν τις συνέπειες του τραυματισμού.

Η φλεγμονώδης απόκριση συνίσταται από τις εγγενείς αποκρίσεις, που δεν έχουν καμιά ανοσολογική βάση, και από τις ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Τα κύρια κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα Κ-λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (*Antigen Presenting Cells, APCs*). Οι ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις στα αντιγόνα γίνονται μέσω των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων [83].

Η φλεγμονή μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Οι αγγειακές και κυτταρικές αποκρίσεις, τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας φλεγμονής, γίνονται μέσω χημικών παραγόντων του πλάσματος ή από κύτταρα που ενεργοποιούνται από το φλεγμονώδες ερέθισμα. Τέτοιοι μεσολαβητές, ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και επηρεάζουν την εξέλιξη της. Οι μεσολαβητές του πλάσματος περιλαμβάνουν τα συστατικά τεσσάρων ενζυμικών καταρρακτών: (**α**) το σύστημα του συμπληρώματος, (**β**) το σύστημα της κινίνης, (**γ**) το σύστημα πήξης και (**δ**) το ινωδολυτικό σύστημα. Όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ή υπόκεινται σε βλάβες, παράγονται ο PAF, τα εικοσανοειδή, η ισταμίνη και οι κυτταροκίνες [84].

Η οξεία φλεγμονή είναι σχετικά σύντομης χρονικής διάρκειας, με κύρια χαρακτηριστικά την έκκριση υγρών και πρωτεϊνών του πλάσματος (*οίδημα*) και η μετανάστευση λευκοκυττάρων, κυρίως ουδετερόφιλων. Λαμβάνουν χώρα λοιπόν (**α**) αγγειοδιαστολή που οδηγεί στην αυξημένη τοπική ροή του αίματος, (**β**) δομικές αλλαγές των μικροαγγείων που επιτρέπουν στις πρωτεΐνες του πλάσματος και στα λευκοκύτταρα να φύγουν από την κυκλοφορία του αίματος, ώστε (**γ**) να μεταναστεύσουν και να συσσωρευτούν στην περιοχή του τραυματισμού [85].

Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από (**α**) μετανάστευση μονοπύρηνων κυττάρων (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, και άλλα κύτταρα πλάσματος), (**β**) καταστροφή ιστού και (**γ**) προσπάθειες επιδιόρθωσης της βλάβης με αντικατάσταση του συνδετικού ιστού, αγγειογένεση και ίνωση [85].

Η φλεγμονώδης απόκριση εμπλέκεται με τη διαδικασία της επιδιόρθωσης. Η φλεγμονή χρησιμεύει στο να καταστρέψει, να μετριάσει, ή να απαλλαγεί από τον επιβλαβή παράγοντα και στη συνέχεια, προκαλεί μια σειρά γεγονότων που, θεραπεύουν και ανασυγκροτούν τον κατεστραμμένο ιστό. Η επιδιόρθωση αρχίζει κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της φλεγμονής αλλά φθάνει στην ολοκλήρωση συνήθως αφότου έχει εξουδετερωθεί η επιβλαβής επιρροή. Κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης, ο τραυματισμένος ιστός αντικαθίσταται με αναγέννηση των εγγενών παρεγχυματικών κυττάρων, ή με την πλήρωση της βλάβης με ινοβλαστικό ιστό, ή συνηθέστερα με συνδυασμό αυτών των δύο διαδικασιών [85].

3.4.2 Κύτταρα και παράγοντες της φλεγμονώδους διαδικασίας

Η φλεγμονή εξελίσσεται αρχικά με ιστικό τραυματισμό, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδογενών φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως είναι οι παράγοντες του συμπληρώματος, τα προφλεγμονώδη λιποειδή και συγκεκριμένες χημειοτακτικές κυτταροκίνες που προσελκύουν ουδετερόφιλα. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα μετανάστευση μονοκυττάρων κατά μήκος του ενδοθηλίου και η ωρίμανση τους εντός του ιστού σε μακροφάγα (*πρώιμη φάση φλεγμονής*) [86].

Ανάλογα με το μικροπεριβάλλον, τα μακροφάγα ενεργοποιούν μεταξύ άλλων κυτταροτοξικούς παράγοντες, απελευθερώνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, κυτταροκίνες και χημειοκίνες ή/ και προχωρούν σε φαγοκυττάρωση [86]. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη φλεγμονώδη διεργασία. Τα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν πως, μεταξύ αυτών, τη συμμετοχή των TNF-α, IL-1β, IL-8 στην πρόκληση και του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (*IL-1ra ή IL-1γ*) στην αναστολή των διαδικασιών της φλεγμονής [87].

Οι μεταναστευτικές ιδιότητες των λευκοκυττάρων επιτρέπουν τη ραγδαία συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στις εστίες της φλεγμονής. Οι χημειοκίνες και τα μόρια προσκόλλησης – μαζί με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους – ευθύνονται για τον περιορισμό της φλεγμονής σε συγκεκριμένο χώρο-ιστό. Οι χημειοκίνες προσδένονται στους G-υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και προκαλούν αλλαγές στο σχήμα και τη λειτουργία του κυττάρου και έκφραση των μορίων που συμμετέχουν στην προσκόλληση. Τα λευκοκύτταρα που προσδένονται μέσω σελεκτινών, ενεργοποιούνται από μεσολαβητές που παράγονται από το ενεργοποιημένο επιθήλιο, όπως ο PAF και η IL-8 [88]. Λαμβάνει χώρα αύξηση παραγωγής ιντεγκρινών, που βοηθούν στη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων, πριν αυτά μεταναστεύσουν εντός του ιστού [89].

Καθώς τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν εντός του φλεγμαίνοντος ιστού, υφίστανται την επίδραση διαφόρων παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των κυτταροκινών. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (*tumor necrosis factor-α, TNF-α*) και η ιντερλευκίνη-1 β (*IL-1β*) παράγονται από τα διηθούμενα φλεγμονώδη κύτταρα, συγκεκριμένα από τα μακροφάγα, δρουν ενισχύοντας την αντίδραση του οργανισμού στη φλεγμονή. Οι κυτταροκίνες αυτές ενεργοποιούν το ενδοθήλιο και προάγουν τις προφλεγμονώδεις δράσεις των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων [90]. Επιπλέον, τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα παράγουν τις ιντερλευκίνες 6, 8, 10, 12, τις ιντερφερόνες α και γ (*INF-α ,γ*), τις MCP-1 και MCP-3, τον ανασταλτικό παράγοντα μετανάστευσης μακροφάγων MIF, τους διεγερτικούς παράγοντες αποικιών μακροφάγων ή/ και κοκκιοκυττάρων (M-CSF/ G-CSF/ GM-CSF), τις MIP-1 και MIP-2, τον παράγοντα αναστολής λευκαιμίας (LIF), την ογκοστατίνη Μ και τον TGF-β [91].

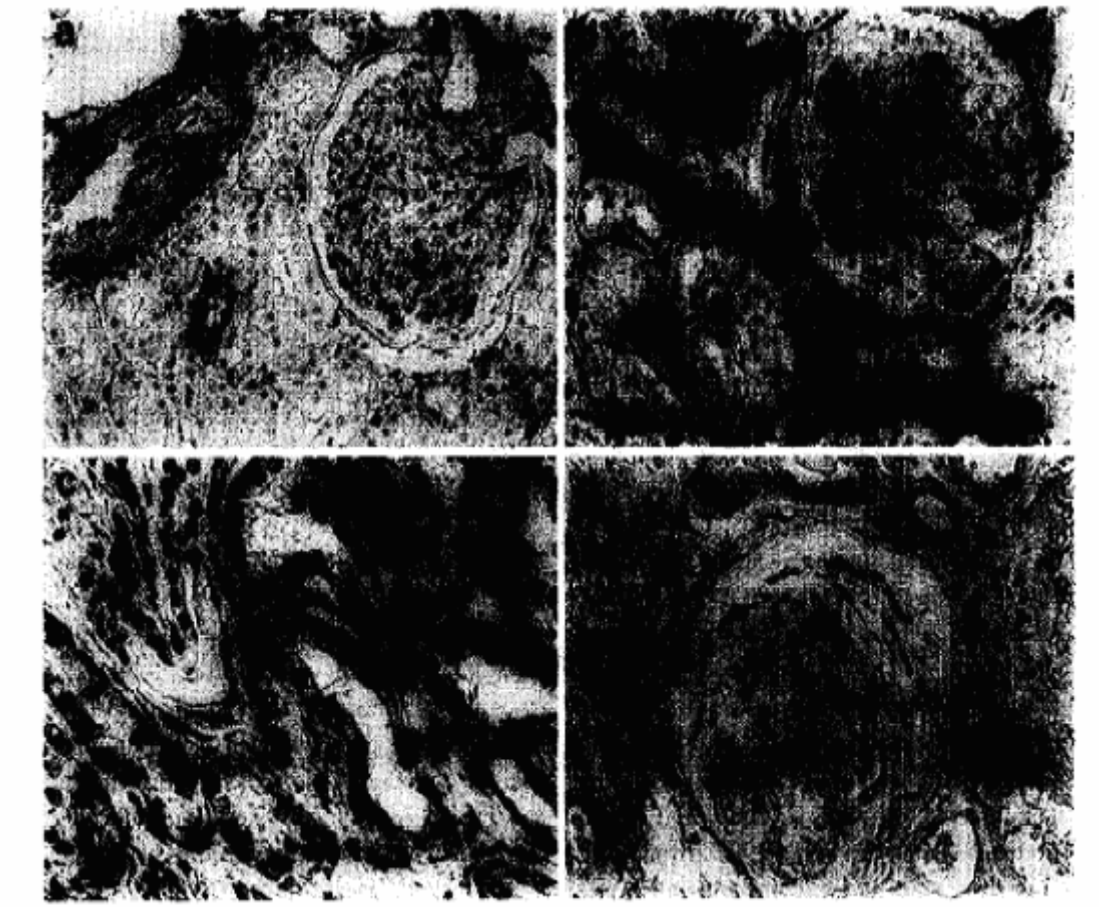
Σε επίπεδο νεφρού, οι λειτουργικές αλλαγές περιλαμβάνουν την έκφραση συγκολλητικών χαρακτηριστικών, κάτι που πιθανόν συνεισφέρει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων και τη συσσωμάτωσή τους εντός των σπειραματικών τριχοειδών. Τα σπειραματικά συσσωματώματα αιμοπεταλίων και οι μικροθρόμβοι ανιχνεύονται στην πειραματική και κλινική σπειραματοσκλήρυνση [79, 81, 92].

Οι φαινοτυπικές αλλαγές του τραυματισμένου ενδοθηλίου περιλαμβάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης, που διευκολύνουν την προσκόλληση λευκοκυττάρων στα σπειραματικά τριχοειδή και την επακόλουθη είσοδό τους στον υποενδοθηλιακό χώρο. Η διήθηση των μονοκύτταρων και μακροφάγων απαντάται στην κλινική και σπειραματική βλάβη, ανοσολογικής ή μη αιτιολογίας. Η απελευθέρωση χημειοκινών (IL-8, MCP-1, MIP-2, οστεοποντίνη), κυτταροκινών (IL-1, TNF-α) και αυξητικών παραγόντων (PDGF, TGF-β) από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια, έχει σαν αποτέλεσμα την περαιτέρω προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων στο σπείραμα και την ενεργοποίηση των μεσαγγειακών κυττάρων. Κάτι που οδηγεί σε υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων, φαινοτυπικές μεταβολές και αυξημένη παραγωγή συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Κάποιοι από αυτούς τους μεσολαβητές, συγκεκριμένα η IL-1 και ο TNF-α, έχουν επιπλέον προθρομβωτικές ιδιότητες και έτσι συνεισφέρουν στο σχηματισμό των σπειραματικών θρόμβων. Με τον τρόπο αυτό, οι αλληλεπιδράσεις των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων με τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα, είναι πιθανόν να προκαλέσουν σπειραματοσκλήρυνση. [79, 81, 92].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος, συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης. Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι ειδικά εξειδικευμένα σπειραματικά κύτταρα που ομοιάζουν των λείων μυϊκών κυττάρων και έχουν την ικανότητα σύνθεσης και απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων. Τα μεσαγγειακά κύτταρα απαντούν στον τραυματισμό με πολλαπλασιασμό, φαινοτυπικές αλλαγές και απελευθέρωση συστατικών της σπειραματικής εξωκυττάριας ουσίας. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να πυροδοτηθούν από την απελευθέρωση μεγάλου εύρους προφλεγμονωδών, μιτογόνων και θρομβογόνων παραγόντων, από τη διήθηση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων ή από τον τραυματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων συχνά προβλέπει την έναρξη μεσαγγειοσκλήρυνσης και σπειραματοσκλήρυνσης [79, 92].

Θεωρείται ότι ο PDGF και ο TGF-β παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών και στην εμφάνιση σκλήρυνσης [72, 92]. Ο PDGF που εκκρίνεται από τα μεσαγγειακά σε απάντηση διαφόρων κυτταροκινών, έχει βρεθεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και να υπερεκφράζεται σε πειραματικά μοντέλα και σε IgA νεφροπάθεια σε ανθρώπους [93]. Ο TGF-β με τη σειρά του, έχει διττό ρόλο, ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών σε μικρές δόσεις και αναστέλλοντας αυτόν σε μεγάλες δόσεις [92]. Οι αυξητικοί παράγοντες μετασχηματισμού, ενεργοποιούν πιθανότατα τη σύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας κολλαγονώδους θεμέλιας ουσίας από τα μεσαγγειακά και τα επιθηλιακά κύτταρα [92]. Κατά την εμφάνιση της υπερπλασίας, τα μεσαγγειακά κύτταρα υπό την επίδραση του TGF-β, εκφράζουν α-ακτίνη λείων μυϊκών ινών και αποκτούν ιδιότητες μυοϊνοβλαστών (*βλ. εικόνα 3.5*). Οι μυοϊνοβλάστες είναι κύτταρα με μικτές ιδιότητες λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών, που έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν και να παράγουν σημαντικές ποσότητες των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός στη διαδικασία επούλωσης των διάφορων ιστικών βλαβών.

Έχει βρεθεί ότι η έκφραση α-ακτίνης λείων μυϊκών κυττάρων από τα μεσαγγειακά σε πειραματική σπειραματονεφρίτιδα, αποτελεί προγνωστικό δείκτη εκδήλωσης σπειραματοσκλήρυνσης [79, 92, 94].



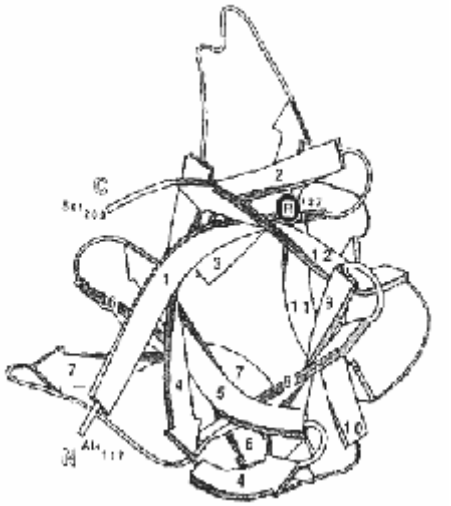
Εικόνα 3.5 (a) Φυσιολογικός ανθρώπινος νεφρός όπου φαίνεται η κατανομή των θετικών σε α-ακτίνη λείων μυϊκών κυττάρων. (b) Μυοϊνοβλάστης που απαντάται εντός του μεσάγγειου, σε περισπειραματικές και διάμεσες περιοχές του τραυματισμένου ανθρώπινου νεφρού. (c) Ανοσοχρωστική για βιμεντίνη εντός τραυματισμένων σωληναριακών κυττάρων ανθρώπινου νεφρού με προοδευτική διάμεση σωληναριακή βλάβη. (d) Διήθηση από μυοϊνοβλάστες στο χώρο του Bowman, τραυματισμένου ανθρώπινου σπειράματος. **Από El Nahas AM et al, Int J Biochem Cell Biol 1997;29(1):55-62**

Ο bFGF που μπορεί να διεγείρει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων, φαίνεται να επάγει την παραγωγή του PDGF από αυτά [95]. Αφετέρου, τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων φαίνεται να επάγουν – τουλάχιστον *in vitro* – κυτταροκίνες (*IL-1,6*) και αγγειοδραστικές ουσίες (*αγγειοτενσίνη ΙΙ, ενδοθηλίνη, μονοξείδιο του αζώτου, προσταγλαδίνες, αδενοσίνη και σεροτονίνη*) [96]. Σε ποικίλα μοντέλα σπειραματονεφρίτιδας, οι ουσίες αυτές έχουν βρεθεί εκφρασμένες, συνοδευόμενες βέβαια από υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων [96]. Στην αλληλουχία των μεταβολών αυτών ενέχονται κυτταροκίνες (IL-1, TNF-α και IL-6) και αυξητικοί παράγοντες (π.χ. TGF-β, PDGF, IGF-1, bFGF), που απελευθερώνονται από μονοκύτταρα και αιμοπετάλια που εισέρχονται στο σπείραμα [79, 94]. Από το σύνολο των προφλεγμονωδών

παραγόντων, γίνεται αναφορά στις ιντερλευκίνες 1 και 6 και στη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων MCP-1.

3.4.3 Ιντερλευκίνη 1

Η ιντερλευκίνη 1 είναι στην πραγματικότητα μια οικογένεια τριών πρωτεϊνών, της IL-1α, της IL-1β και του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (*IL-1ra ή IL-γ*). Τόσο η IL-1α όσο και η IL-1β συντίθενται ως πρόδρομα μόρια (31-kd) από τα οποία στη συνέχεια προκύπτουν οι ώριμες πρωτεΐνες (17 kd) και έχουν παρόμοιες βιολογικές δράσεις. Η τρισδιάστατη αναπαράσταση του μορίου της ώριμης IL-1 περιλαμβάνει 12 αλυσίδες β-διαμόρφωσης (12 β-strands) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου (*βλ. εικόνα 3.6*) [97].



Εικόνα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της IL-β. Από Gehrke L et al. J Biol Chem 1990;265:5922-5

Και οι τρεις πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με παρόμοια χημική συγγένεια με τους δύο υποδοχείς τύπου Ι και ΙΙ που έχουν βρεθεί για την IL-1. Οι υποδοχείς τύπου Ι απαντώνται στα Τ κύτταρα, στους ινοβλάστες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα ηπατοκύτταρα, και σε αρκετά άλλα κύτταρα. Οι υποδοχείς αυτοί απαντώνται σε μεγάλη έκταση στην κυτοπλασμική μεμβράνη και είναι υπεύθυνοι για τη μεταγωγή σήματος, μετά τη δέσμευση του υποκαταστάτη [97]. Η ικανότητα του IL-1ra να δεσμεύεται στους υποδοχείς τύπου Ι, χωρίς όμως περαιτέρω μεταγωγή σήματος, είναι η βάση της ιδιότητας του να δρα ως ανταγωνιστής κυτταροκινών [97]. Οι υποδοχείς τύπου ΙΙ, που έχουν ανιχνευθεί στα Β κύτταρα, στα ουδετερόφιλα και στα κύτταρα του μυελού των οστών, εντοπίζονται σε μικρή έκταση ενδοκυτταρικά [98]. Η δέσμευση και η απομάκρυνση της IL-1 από τους ανενεργούς υποδοχείς τύπου ΙΙ, μπορεί να εξυπηρετεί μια αντιφλεγμονώδη λειτουργία, οπότε αναφέρονται ως υποδοχείς – παγίδες (*decoy receptors*), αφού δεν οδηγούν σε μεταγωγή σήματος [97].

Όσον αφορά το νεφρικό σπείραμα, υποστηρίζεται ότι η IL-1 εκδηλώνει τις πλειοτροπικές της δράσεις στα μεσαγγειακά κύτταρα μέσω της σύνδεσης με τους υποδοχείς τύπου Ι, που εκφράζονται βασικά σε αυτά [99, 100]. Ο ανασυνδυασμένος ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (*recombinant IL-1ra*) μπλόκαρε την παραγωγή mRNA της IL-1 σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων [100].

Η IL-1 παράγεται κυρίως φαγοκύτταρα, αλλά και από ενδοθηλιακά κύτταρα, κερατινοκύτταρα, αρθρικά κύτταρα, αστροκύτταρα, οστεοβλάστες, ουδετερόφιλα, νευρογλοία και αρκετά άλλα κύτταρα. Η παραγωγή της IL-1 μπορεί να διεγερθεί από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ενδοτοξινών, άλλων κυτταροκινών, μικροοργανισμών άλλα και αντιγόνων [97]. Η IL-1 παράγεται στην εστία της μόλυνσης/ φλεγμονής και διεγείρει τα παρακείμενα κύτταρα να συνθέσουν και να απελευθερώσουν χημειοκίνες (που προσελκύουν πολυμορφοπύρηνα, μονοκύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα), κυτταροκίνες (IL-2, IL-4, IL-6) και ενεργοποιεί διάφορους ιστούς [90, 101]. Με τον τρόπο αυτό, η IL-1 προκαλεί την έναρξη μη ειδικών αμυντικών μηχανισμών (*φλεγμονώδης απόκριση*), διεγείρει και ενισχύει εξειδικευμένες ανοσολογικές αντιδράσεις. Η παραγωγή και η δραστικότητα της IL-1, λόγω της αποτελεσματικότητάς της, πρέπει να τίθεται υπό αυστηρό έλεγχο. Σε περίπτωση κακής ρύθμισης είτε της παραγωγής είτε της δραστικότητά της, μπορεί να προκληθεί παρατεταμένη φλεγμονή και μη φυσιολογικές ανοσολογικές απαντήσεις [90, 101].

Η παραγωγή της IL-1 κατά την ανοσολογική απάντηση παράγει πλήθος αλλαγών που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Επίδραση της IL-1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση πυρετού, λήθαργου, ύπνου βραδέων κυμάτων, ανορεξίας και για την έκκριση του παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (*corticotrophin releasing factor, CRF*) [97]. Η αλληλεπίδραση ηπατοκυττάρων με την IL-1 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή παραγωγής βασικών πρωτεϊνών (*π.χ. αλβουμίνη*) και την ενεργοποίηση της σύνθεσης πεπτιδίων της απάντησης οξείας φάσης (*π.χ. αμυλοειδές, CRP, πρωτεΐνες συμπληρώματος*) [97]. Για να αυξηθεί η παροχή αμινοξέων για πρωτεϊνοσύνθεση, η IL-1 διεγείρει τον καταβολισμό των μυϊκών πρωτεϊνών. Η δράση της IL-1 στις αρθρώσεις συνίσταται σε ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των αρθρικών κυττάρων, επαναρρόφηση χόνδρου και οστού και εναπόθεση κολλαγόνου. Οι επιδράσεις αυτές της IL-1 στους μύες και τις αρθρώσεις συνεισφέρουν σε μυαλγίες και αρθραλγίες, που σχετίζονται με ασθένεια [97].

Στον αντίποδα, ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (*IL-1ra ή IL-1γ*) παράγεται φυσικά κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία. Η παραγωγή του αυξάνει από διάφορες κυτταροκίνες, όπως οι IL-4, IL-13, TGF-β και IL-1. Η παραγωγή του IL-1ra θεωρείται ότι ρυθμίζει τις πιθανά επιβλαβείς επιδράσεις της IL-1 στη φυσική πορεία της φλεγμονής [97]

Η IL-1 διεγείρει την προσκόλληση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της αύξησης παραγωγής των μορίων προσκόλλησης. Η αύξηση των μορίων προσκόλλησης θεωρείται πολύ σημαντική για τη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στην εστία της βλάβης, ενώ η συνεπαγόμενη αύξηση των ουδετερόφιλων και των ηωσινόφιλων αποδίδεται στις δράσεις της IL-1.

Επιπλέον, δρα στα αιμοφόρα αγγεία προκαλώντας αγγειοδιαστολή, που συνεισφέρει στην υπόταση του σηπτικού σοκ [97]. Η υπόταση, η καταστολή λειτουργίας του μυοκαρδίου, το σηπτικό σοκ και ο θάνατος, μπορούν όλα να είναι φυσιολογικές απαντήσεις στην υπερέκφραση της IL-1.

Πολλές από τις προφλεγμονώδεις δράσεις της IL-1 σχετίζονται με την ικανότητά της να διεγείρει τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, προς εικοσανοειδή, όπως η προσταγλαδίνη E_2 και το λευκοτριένιο B_4, να δρουν ως δεύτερα μηνύματα. Η IL-1 διεγείρει τη σύνθεση επιπρόσθετων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των TNF, IL-6, GM-CSF και ως μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης, την έκκριση επιπλέον IL-1. [97].

Οι βιολογικές δράσεις της IL-1 περιλαμβάνουν συστηματικές και τοπικές επιδράσεις, όπως ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της IL-2, συνεργιστική δράση με IL-6 για τη σύνθεση της IL-2 και άλλων αυξητικών παραγόντων των Τ κυττάρων, ενεργοποίηση των Β κυττάρων με αύξηση της IL-4 και συνέργεια με άλλες κυτοκίνες διεγείρουσες τα Β κύτταρα (*π.χ. IL-4 και IFN*) [97].

Πίνακας 3.2 Βιολογικές επιδράσεις της IL-1. Από Rosenwasser LJ. J Allergy Clin Immunol 1998;102:344-50

Βιολογικές δράσεις της ιντερλευκίνης –1
Συστηματικές επιδράσεις
Πυρετός, υπόταση, ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφριδίων, ουδετεροφιλία, υποσιδηραιμία, υπερλιπιδαιμία, υποαλβουμινουρία
Τοπικές επιδράσεις
Αγγειογένεση, ίνωση, εισροή ουδετερόφιλων, παραγωγή χημειοκινών
Ανοσολογικές επιδράσεις
Ενισχύει διέγερση Τ και Β λεμφοκυττάρων, παραγωγή λεμφοκινών και αντισωμάτων
Φλεγμονώδεις επιδράσεις
Συμμετέχει στην εμφάνιση σοκ, αρθρίτιδας, υπερινσουλινισμού, θυρεοειδίτιδας κατά τη φλεγμονώδη νόσο, αυξάνει τα μόρια προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ενισχύει την απελευθέρωση των προϊόντων του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος

Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, η IL-1β αναστέλλει τη ροή [^{3}H]-χοληστερόλης [102, 103], αυξάνει την παραγωγή της μεταλοπρωτεϊνάσης-9 της θεμέλιας ουσίας [104, 105] και αυξάνει τη δραστικότητα του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF) [106] που θεωρείται ότι προάγει την φλεγμονή [107]. Επιπλέον, η IL-1β προκαλεί την αύξηση παραγωγής του bFGF, που μεσολαβεί τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων σε απάντηση φλεγμονωδών παραγόντων [108]. Σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, η IL-1 αυξάνει την παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) [109], την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 [110, 111], διεγείρει τη φωσφολιπάση PLA_2 [112], προκαλεί την έκφραση συνθάσης του NO [113] και αυξάνει

τη σύνθεση TxB_2 και PGE_2 μέσω αύξησης της δραστικότητας της κυκλοοξυγενάσης –1 (COX-1) [114].

Η IL-1 φαίνεται ότι προκαλεί την παραγωγή IL-6 [100, 115-118] και MCP-1 [110, 115, 119, 120] από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα από κυτταροκίνες ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εμφανίζουν τις ακόλουθες αλλαγές: (**α**) αυξάνουν σε μέγεθος, διαστέλλονται το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, αυξάνονται τα ελεύθερα ριβοσώματα και πολυσώματα, (**β**) αυξάνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, (**γ**) αυξάνεται η έκφραση του mRNA της IL-6 μετά από διέγερση με IL-6 ή IL-1 μαζί με IL-6, αλλά και (**δ**) απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες PAF, TxB_2 και ανιόντος υπεροξειδίου [121]. Οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές προσομοιάζουν το ρόλο των μεσαγγειακών σε συνθήκες σπειραματοσκλήρυνσης.

Η έκκρισης της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα διεγερμένα με IL-1 (*ή LPS*), αποδόθηκε σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA) εξαρτώμενης από το cAMP, εφόσον και ο αναστολέας της PKA μείωσε την παραγωγή IL-6. Η απόσπαση και η μεταφορά των καταλυτικών υπομονάδων της PKA στον κυτταρικό πυρήνα, έχει αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα απόκρισης στο cAMP (*cAMP response element binding protein, CREB*) [122]. Ωστόσο, φαίνεται πως η ικανότητα του cAMP να διεγείρει την έκκριση IL-6 διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο κυττάρου. Αν και σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες το cAMP αναστέλλει την έκκριση της IL-6, διεγείρει την έκκριση της από μεσαγγειακά, μονοκύτταρα/ μακροφάγα, οστεοβλάστες και κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης [123]. Μελέτες σπειραματικής φλεγμονής υποστηρίζουν ότι η ενδοκυτταρική αύξηση του cAMP σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, ασκεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους [124] και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως αυτά που παράγουν TNF-α, CSF-1, MCP-1 [125], RANTES και ICAM-1 [126]. Στη διαδικασία διέγερσης της έκκρισης της IL-6 φαίνεται να εμπλέκονται και ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB [127], ο πυρηνικός παράγοντας για την έκφραση της IL-6 (*nuclear factor for IL-6 expression, NF-IL6*) [118, 127], η πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1 (*activator protein–1, AP-1*) [128] και ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης-1 (*interferron regulatory factor–1, IRF-1*) [129].

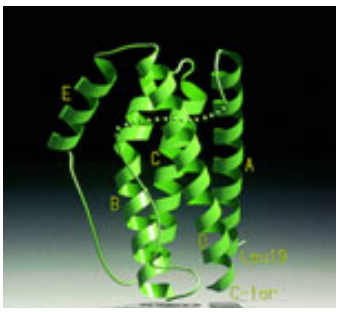
Η διέγερση έκκρισης του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-1 θεωρείται ότι οφείλεται στην οικογένεια των NF-κB πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων [130-136]. Στην πιο απλή του μορφή, ο NF-κB συνίσταται σε ένα ετεροδιμερές, που αποτελείται από τις πρωτεΐνες p50/NF-κB1 και p65/RelA [137]. Η IL-1 μπορεί να προκαλέσει ραγδαία αύξηση του NF-κB μέσω των υποδοχέων IL-1 τύπου Ι σε λεμφοκύτταρα [138]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το NO [139], η κερκετίνη [140] σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα και τα στεροειδή φάρμακα σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού [141], φαίνεται πως αναστέλλουν την παραγωγή NF-κB, οπότε εμποδίζουν την έκφραση του MCP-1.

Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι συγκεκριμένοι διμερικοί συνδυασμοί των NF-κB πρωτεϊνών ελέγχουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Οι Στυλιανού και οι συνεργάτες της

έδειξαν ότι η IL-1 υπεραυξάνουν τη μεταγραφή του γονιδίου του MCP-1 σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, μέσω ενός διμερούς συμπλέγματος των p65/RelA και ογκογονιδίου c-Rel [142].

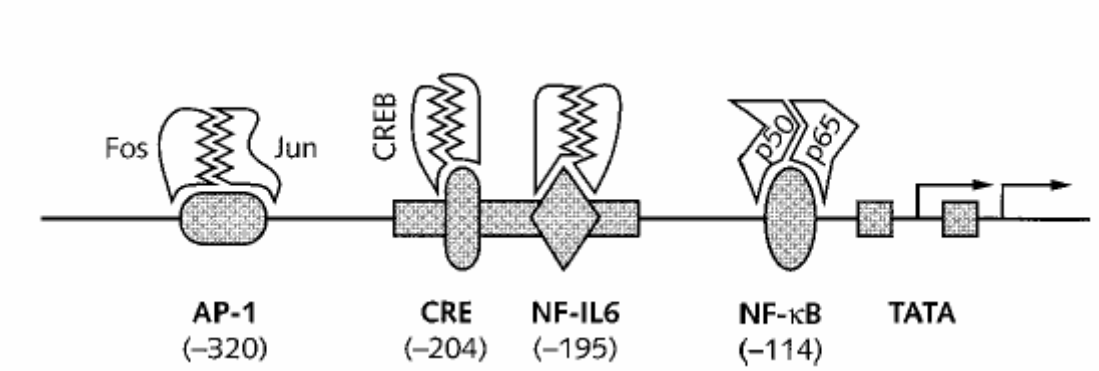
3.4.4 Ιντερλευκίνη 6

Η ιντερλευκίνη 6 ανήκει σε μια οικογένεια κυτταροκινών με ευρύ φάσμα δράσεων, επηρεάζοντας όχι μόνο το ανοσοποιητικό, αλλά και το νευροενδοκρινικό σύστημα και τις ομοιοστατικές λειτουργίες. Η ανθρώπινη IL-6 κατατάσσεται στην κατηγορία των γλυκοπρωτεϊνών και αποτελείται από μια αλυσίδα 212 αμινοξέων, μεγέθους 26 kDa, με δυο πιθανές εστίες Ν-γλυκοζυλίωσης. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη IL-6, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 [143].



Εικόνα 3.7 Η δομή της IL-6

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της IL-6 σε μεταγραφικό επίπεδο ρυθμίζεται από ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες, που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή της IL-6 για να ξεκινήσει η σύνθεση του mRNA. Στο σχήμα 3.8 φαίνεται ο υποκινητής της IL-6 [122].



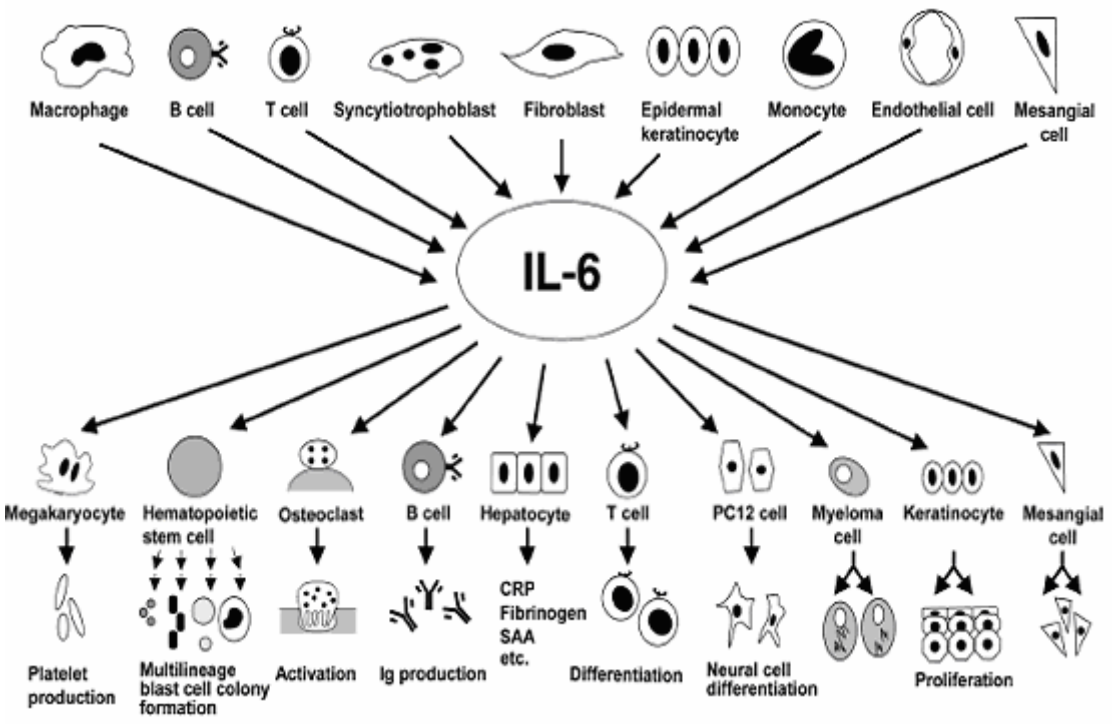
Εικόνα 3.8 Ο υποκινητής της IL-6. Στην ενεργοποίηση του γονιδίου που εκφράζει την IL-6 συμμετέχουν η AP-1, η CREBP, ο NF-IL6 και ο NF-κB. Από Grassl C et al. J Am Soc Nephrol 1999;10: 1466–1477

Ο υποδοχέας της IL-6 αποτελείται από δυο πεπτιδικές αλυσίδες, που ονομάζονται α και β υπομονάδες. Η α υπομονάδα είναι η αλυσίδα στην οποία δεσμεύεται ο υποκατάστατης και έχει μοριακό βάρος περίπου 80 kDa, γνωστή και ως gp80 ή IL-6R. Η δεύτερη υπομονάδα είναι μια πεπτιδική αλυσίδα μεγέθους 130 kDa, που ονομάζεται gp130. Η αλυσίδα αυτή μεταφέρει το σήμα του συμπλόκου υποδοχέα [143]. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp130 απαντάται σε σχεδόν όλα τα όργανα, συμπεριλαμβανόμενων της καρδιάς, των νεφρών, της σπλήνας, του ήπατος, των πνευμόνων, του πλακούντα και του εγκεφάλου [144]. Ο υποδοχέας της IL-6 απαντάται σε ετερογενείς τύπους κυττάρων, όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα αγγειακά ενδοθηλιακά

κύτταρα, τα κύτταρα της υπόφυσης, κύτταρα καρδιακού μυξώματος κ.α. Η δέσμευση της IL-6 στον υποδοχέα της, είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος [143, 145].

Εκτός από τη δέσμευσή της στον υποδοχέα IL-6R, η IL-6 ενεργοποιεί και ένα διαλυτό IL-6R, τον sIL-6R. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IL-6/sIL-6R λειτουργεί ως προαγωγός, που δεσμεύει το gp130 με υψηλή χημική συγγένεια. Με τον τρόπο αυτό, η IL-6 θεωρείται ότι μπορεί να εκδηλώσει τις βιολογικές της δράσεις και σε κύτταρα που στερούνται του υποδοχέα της IL-6 [146]. Στην κατεύθυνση αυτή, το σύμπλοκο IL-6/sIL-6R έχει βρεθεί ότι προκαλεί προσέλκυση λευκοκυττάρων και ότι προάγει φλεγμονώδεις απαντήσεις από ενδοθηλιακά κύτταρα [147]. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο sIL-6R συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στη ρύθμιση προφλεγμονωδών μεσολαβητών [146].

Η μεταγωγή του σήματος της IL-6 γίνεται με επιπλέον κυτταροπλασματικές κινάσες των κυττάρων που φέρουν τον IL-6R. Η οικογένεια των μορίων IL-6R χρησιμοποιεί συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των Jak-Tyk κινασών. Από πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι ο μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής $STAT_3$ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος της IL-6 [143].



Εικόνα 3.9 Κύτταρα που παράγουν IL-6 και βιολογικές δράσεις αυτής. Από Naka T. et al. Arthitis Res 2002;4(suppl 3):S233-42

Η IL-6, που συνιστά μια πλειοτρόπο κυτταροκίνη με μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων, παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων – λεμφικών και μη – όπως τα Β κύτταρα και Τ κύτταρα,

τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα, οι ινοβλάστες, τα λιποκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μεσαγγειακά κύτταρα και αρκετά καρκινικά κύτταρα (*εικόνα 3.9*) [148].

Προφλεγμονώδεις δράσεις

Η IL-6 αποτελεί ένα σημαντικό φλεγμονώδη παράγοντα που έχει εμπλακεί στην παθογένεση και την κλινική πορεία της αθηροσκλήρυνσης [149], της σπειραματοσκλήρυνσης, της οστεοπενίας/ οστεοπόρωσης [143], της καχεξίας [150] και του πολλαπλού μυελώματος [143]. Η IL-6 φαίνεται ότι μεταξύ άλλων [143, 148]:

- προκαλεί ανάπτυξη των Τ κυττάρων και τη διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων με αύξηση έκφρασης του υποδοχέα της IL-2 και παραγωγής αυτής ,
- προκαλεί παραγωγή ανοσοσφαιρινών από Β λεμφοκύτταρα,
- προκαλεί διαφοροποίηση μακροφάγων σε αφρώδη,
- προκαλεί διαφοροποίηση μεγακαρυοκυττάρων προς παραγωγή αιμοπεταλίων,
- προκαλεί διαφοροποίηση οστεοβλαστών προς ενεργοποίησή τους,
- δρα συνεργιστικά με την IL-3 για το σχηματισμό βλαστοκυττάρων κατά την αιμοποίηση,
- διεγείρει την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από τα ηπατοκύτταρα όπως η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C reactive protein, CRP), το ινωδογόνο, η α_1-αντιθρυψίνη και αμυλοειδές Α ορού, ενώ παράλληλα αναστέλλει την παραγωγή αλβουμίνης,
- προκαλεί λευκοκυττάρωση και πυρετό όταν χορηγείται *in vivo*,
- δρα ως αυξητικός παράγοντας για τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα, τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα, διαφόρων τύπων καρκινικά κύτταρα (*π.χ. σε πλασματοκύττωμα, πολλαπλό μυέλωμα, καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων*).

Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Σε αντιδιαστολή με τις πλειοτροπικές και διεγερτικές της ανοσολογικής απάντησης δράσεις, η IL-6 έχει και σαφείς αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, ειδικά στα μακροφάγα και τους ινοβλάστες. Η IL-6, αλλά και η IL-11, φαίνεται να έχουν διαφορετικές δράσεις σε διαφόρους τύπους κυττάρων και δρουν είτε προάγοντας είτε αναστέλλοντας την φλεγμονώδη διεργασία [86, 151-156].

Αντίθετα με την IL-1 και τον TNF, η IL-6 δεν αυξάνει φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, όπως οι προσταγλαδίνες, το NO ή οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, ενώ δεν προκαλεί σύνθεση μορίων προσκόλλησης που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απάντηση, όπως τα ICAM-1 [143] (*άρθρο ανασκόπησης*). Παρότι ακόμα και μικρές δόσεις IL-1 και TNF δεν είναι πολύ ανεκτές από τα θηλαστικά – οδηγώντας σε σοκ – αρκετά υψηλές δόσεις IL-6 μπορούν να είναι καλά ανεκτές και να μην προκαλέσουν σοκ σε ποντίκια, σκυλιά ή πρωτεύοντα [143] (*άρθρο ανασκόπησης*). Στην κατεύθυνση αυτή, υποστηρίζεται ότι η IL-6 μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση IL-1 και TNF, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [86, 153, 155-157]. Επιπλέον, η IL-6 μπορεί να προκαλέσει την έκκριση της

φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (*adrenal corticotropic hormone, ACTH*) ώστε να αυξηθούν τα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών [143]. Υποστηρίζεται πως η IL-6 διεγείρει την έκφραση της *ανεξίνης-1*, που μεσολαβεί αρκετές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων αδενοκαρκινικών κυττάρων [158].

Ειδικότερα, η IL-6 στα πλαίσια των αντιφλεγμονωδών επιδράσεών της εμφανίζεται [143, 153, 156]:

- να έχει ανασταλτικές επιδράσεις σε μακροφάγα και αρθρικούς ινοβλάστες (*που είναι σημαντικοί παράγοντες παθογένεσης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας*),
- να προάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (*όπως ο IL-1ra, IL-10*),
- να προκαλεί την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών,
- να αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (*IL-1, TNF, IL-12*),
- να αναστέλλει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης,
- να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αρθρικών ινοβλαστών σε συνθήκες ρευματοειδούς αρθρίτιδας,
- να αναστέλλει την έκφραση πρωτεασών και να προάγει την παραγωγή των αναστολέων αυτών, όπως ο ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεινάσης-1 (TIMP-1) σε αρθρικούς ινοβλάστες υπό ρευματοειδή αρθρίτιδα, μπλοκάροντας την προκαλούμενη από την IL-1 κολλαγονολυτική δράση, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της καταστροφής του χόνδρου,
- να βελτιώνει τις εκδηλώσεις της φλεγμονής σε διάφορα πειραματικά μοντέλα με ζώα, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους πνευμονικής νόσου και της αρθρίτιδας προκαλούμενης από zymosan.

Ο Eitner και οι συνεργάτες του [159] αναφέρουν πως η IL-6 δεν αποτελεί τον πιο σημαντικό *in vivo* μεσολαβητή του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων και της υπερπαραγωγής θεμέλιας ουσίας καθώς: (**α**) ποντίκια χωρίς το γονίδιο της IL-6 (*IL-6 knock out mice*) έχουν φυσιολογική σπειραματική αρχιτεκτονική, (**β**) η μεσαγγειακή σπειραματονεφρίτιδα προκαλούμενη από δηλητήριο του φιδιού *Habu* είναι εξίσου σοβαρή σε ποντίκια με ή χωρίς το γονίδιο της IL-6, (**γ**) συνεχής επί 7 ημέρου ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 50 mg ανθρώπινης ανασυνδυασμένης IL-6 σε ποντίκια με προγενέστερο τραυματισμό μεσαγγειακών κυττάρων δεν προκαλεί ενεργοποίηση σπειραματικών κυττάρων, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παραγωγή συστατικών θεμέλιας ουσίας, εισροή λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων ή πρωτεϊνουρία, και (**δ**) συνεχής επί 7 ημέρου έγχυση IL-6 σε ποντίκια με μεσαγγειακή νεφρίτιδα αυξάνει τη μεταγραφή των πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας χωρίς ανιχνεύσιμες επιπλοκές. Σε NTN ποντίκια, η IL-6 μειώνει τη διήθηση από ουδετερόφιλα, τη σπειραματική έκκριση IL-1 και την πρωτεϊνουρία [160].

Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της IL-6 είναι η αναστολή του NF-κB [153]. Οι IL-6 και IL-11 ανταγωνίζονται την έκφραση των διεγειρομένων μορίων από IL-1, TNF-α ή LPS μορίων προσκόλλησης, TIMP-3, IL-8 μέσω ενός μηχανισμού που

περιλαμβάνει αναστολή του NF-κΒ [153, 155]. Η IL-6 μπορεί να αυξήσει την έκκριση κορτιζόλης από τα επινεφρίδια, να προκαλέσει απάντηση οξείας φάσης, τα προϊόντα της οποίας περιλαμβάνουν τον TIMP και άλλες πρωτεΐνες με αντιφλεγμονώδεις δράσεις, περιορίζοντας έτσι την έκταση της φλεγμονής [143]. Οι Derfalvi και συνεργάτες, βρήκαν ότι η IL-6 προκαλεί ταχεία ενεργοποίηση του κυτοπλασματικού μεταγραφικού παράγοντα (*acute phase response factor, APRF*), που δεσμεύεται στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες οξείας φάσης τύπου ΙΙ (*ινωδογόνο, α2-μακροσφαιρίνη, απτοσφαιρίνη*) [161]. Εκτός αυτού, η IL-1, πέρα από το να διεγείρει την έκκριση της IL-6, αναστέλλει και τα γονίδια που κωδικοποιούν τον αναστολέα της μεταγωγής σήματος κυτταροκινών (*suppressor of cytokine signaling 3, $SOCS_3$*) και τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης (*IFN regulatory factor, IRF-1*), εμποδίζοντας την περαιτέρω έκκριση IL-6 [153, 155]. Το πρότυπο ελέγχου έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τους IRF-1 και $SOCS_3$ συνιστά ένα μοντέλο αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Επειδή οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τις κυτταρικές αποκρίσεις στις κυτταροκίνες και τις ιντερφερόνες, ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης είναι πολύ σημαντικός για την πορεία της φλεγμονής.

IL-6 και νεφρός

Στο επίπεδο του νεφρού, η πρώτη αναφορά έγινε από τον Horrii και τους συνεργάτες του [162], που έδειξαν το 1989 ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι ικανά να εκφράσουν την IL-6 και ανίχνευσαν IL-6 στις βιοψίες και τα ούρα ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα.

Η IL-6 θεωρείται ένας αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για τα σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα [163-166] και η ενδοσπειραματική παραγωγή της θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεση της μεσαγγειακής σπειραματονεφρίτιδας στον άνθρωπο [166-168]. Για το λόγο αυτό, υποστηρίζεται πως τα επίπεδα της IL-6 στα ούρα αποτελούν ένα καλό δείκτη πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων [165], αλλά και της διαβητικής νεφροπάθειας [169]. Σε αρκετούς τύπους ανθρώπινης μεσαγγειακής νεφρίτιδας τα επίπεδα της IL-6 είναι υψηλά, ενώ η συγκέντρωση της IL-6 στα ούρα έχει συσχετιστεί με δραστηριότητα της νόσου [170]. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε αν αυτό είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της φλεγμονής. Οι Ihm και συνεργάτες [168] έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη ΙΙ, που εμπλέκεται στην πρόοδο νεφρικών νόσων συμπεριλαμβανομένης και της διαβητικής νεφροπάθειας, αυξάνει την παραγωγή IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, μετά από επώαση 48 ωρών. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (450 mg/dl) μείωσε την παραγωγή της IL-6. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορεί να είναι περίπλοκη και να εξαρτάται από τις τοπικές επιδράσεις της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης ή/ και της αγγειοτενσίνης ΙΙ.

Προσομοιάζοντας τη σπειραματική φλεγμονή, οι Massy και συνεργάτες [171], έδειξαν ότι η LDL και η οξειδωμένη LDL προκαλεί αύξηση της παραγωγής IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, η οποία αναστέλλεται από το υποχοληστερολαιμικό φάρμακο λοβαστατίνη. Η χρήση του υποχοληστερολαιμικού φαρμάκου λοβαστατίνη [172] και του αντιδιαβητικού φάρμακου

τρογλιδαζόνη [173], φαίνεται να περιορίζει την παραγωγή της IL-6 από τα ενεργοποιημένα με IL-1 ή LPS ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Η επίδραση αυτή θεωρείται πως πραγματοποιείται μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του NF-κB [172].

Αύξηση παραγωγής της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει και ο PDGF, ο οποίος εμπλέκεται και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών [174, 175]. Επιπλέον, μια πληθώρα παραγόντων όπως οι κυτταροκίνες (TNF-α [176, 177], IL-4 μαζί με IL-1 [118], INF-γ [178]), λιποπρωτεΐνες (VLDL, IDL, LDL, HDL) [171, 179], ανοσοσυμπλέγματα (IgA, IgG) [180-183] και η φιμπρονεκτίνη [184] διεγείρουν την παραγωγή IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Χορήγηση του all-trans-ρετινοϊκού οξέος (ATRA), ενός παραγώγου της βιταμίνης Α, σε διαγονιδιακά ποντίκια με μεσαγγειακή σπειραματονεφρίτιδα, μείωσε *in vivo* την πρωτεϊνουρία, την αιματουρία και τη συγκέντρωση IL-6 στον ορό. *In vitro* πειράματα σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, έδειξαν ότι το ATRA ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη, δράση που εξουδετερώθηκε με προσθήκη IL-6 [185]. Σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, ο Moriyama και οι συνεργάτες του [186], έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη ΙΙ διεγείρει την έκκριση IL-6, συμμετέχοντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Τέλος, η 48ωρη επώαση με IL-1 και IL-6 μεσαγγειακών κυττάρων ποντικού, ενεργοποιημένων με όρο, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εν μέρει λόγω της ενδογενούς παραγωγής προσταγλαδινών [164]. Ο πίνακας 3.3 συνοψίζει τους αναστολείς και τους διεγέρτες της έκκρισης της IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού.

Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η IL-6 προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους και ότι φαινολικά εκχυλίσματα από κινέζικα βότανα είναι ικανά να αναστείλουν τη δράση της [187]. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι η IL-6 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων ποντικού [164]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-6 διεγείρει την παραγωγή ROS, H_2O_2 [188] και της χημειοκίνης MCP-1 [189]. Σε μεταγραφικό επίπεδο, έχει βρεθεί ότι η IL-6 αυξάνει τα επίπεδα mRNA των πρωτεϊνών c-fos και Jun-B [190] και την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα AP-2 [191] στα μεσαγγειακά κύτταρα. Οι Coletta και συνεργάτες [140] έδειξαν ότι η IL-6 δεν είναι ικανή από μόνη της να διεγείρει την παραγωγή χημειοκινών (MCP-1, RANTES, IL-8, MIP) από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Η συνεπώαση όμως των κυττάρων με IL-6 και sIL-6R είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής των χημειοκινών. Η μελέτη έκφρασης των δυο υπομονάδων του υποδοχέα της IL-6 έδειξε ότι τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εκφράζουν μόνο την υπομονάδα gp130, εξηγώντας το παραπάνω αποτέλεσμα. Επίσης, η IL-6 φαίνεται να αυξάνει τον υποδοχέα της IgA, Fc-aR, σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα [192].

Πίνακας 3.3 Διεγέρτες και αναστολείς της έκκρισης της IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα.

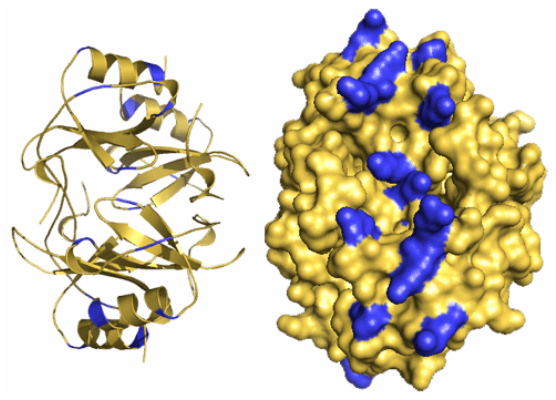
Μελέτες σε μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού			
Διεγέρτες	**Παραπομπές**	**Αναστολείς**	**Παραπομπές**
IL-1β	[115-117, 167, 177]	LXA_4	[193]
TNF-α	[175-177, 193]	Ανταγωνιστές PPAR-γ	[117, 173]
LPS	[167, 177, 194, 195]	Λοβαστατίνη	[172]
INF-γ	[178]	Γλυκόζη	[168]
AngII	[168, 186]	Dilapez HCl	[194]
PDGF	[174, 175]	Ηπαρίνη	[196]
MSP	[197]		
IgA, IgG	[180-183]		
OxLDL/ LDL	[171, 179]		
VLDL/IDL/HDL	[179]		
IL-4 μαζί με IL-1β	[118]		
Φιμπρονεκτίνη	[184]		
Μονοκύτταρα σε απόπτωση	[198]		
Μονοκύτταρα CD40L	[199]		
FK506	[200]		
Τοξίνη (ETB) στρεπτόκοκκου	[201]		

3.4.5 Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων-1 (MCP-1)

Οι χημειοκίνες αντιπροσωπεύουν μια ομάδα χημειοτακτικών κυτταροκινών που προκαλούν κυτταρική μετακίνηση. Οι 40 διαφορετικές χημειοκίνες που έχουν περιγραφεί κατατάσσονται σε 2 κύριες ομάδες: (**α**) τις CXC χημειοκίνες που χαρακτηρίζονται από το ότι οι δυο πρώτες ομάδες κυστεΐνης χωρίζονται από ένα αμινοξύ και περιλαμβάνουν την ιντερλευκίνη 8 (*IL-8*) και (**β**) τις CC χημειοκίνες που αποτελούν την μεγαλύτερη τάξη. Στην τάξη αυτή μεταξύ άλλων ανήκουν η MIP-1 και ο MCP-1 [86, 202]. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν δυο νέες οικογένειες χημειοκινών με καινούρια δομή: η λεμφοτακτίνη (*lymphotactin*) που έχει δυο και όχι τέσσερις ομάδες κυστεΐνης και η φρακταλκίνη (*fractalkine*) που έχει τρία αμινοξέα μεταξύ των πρώτων δυο ομάδων κυστεΐνης (*CX3C*) [86, 202].

Ο υποδοχέας του MCP-1, CCR2 έχει ανιχνευθεί μεταξύ άλλων σε βασεόφιλα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα [202]. Πρόσφατα, ανιχνεύθηκε ο υποδοχέας CCR2 και σε σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα [203].Οι δράσεις του MCP-1 μεσολαβούνται από την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα CCR2 στα κύτταρα αυτά.[204]. Βέβαια, οι CC (κυρίως MCP-1, RANTES) και CXC χημειοκίνες δεσμεύονται και στον υποδοχέα χημειοκινών Duffy αντιγόνου (*Duffy antigen receptor for chemokines, DARC*) που ανιχνεύεται σε ερυθροκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του νεφρού. Θεωρείται ότι ο DARC μπορεί να δράσει ως εκκαθαριστής χημειοκινών από την κυκλοφορία και ως αντιγόνο για τις χημειοκίνες στα νεφρικά τριχοειδή [205].Τα μονοκύτταρα εκφράζουν μονίμως τον υποδοχέα CCR2, ενώ τα Τ λεμφοκύτταρα μόνο όταν έχουν ενεργοποιηθεί [202]. Ο LPS μειώνει την πυκνότητα του

CCR2 υποδοχέα στα μονοκύτταρα, μετατρέποντας τα κύτταρα αυτά μη ευαίσθητα στον MCP-1 [206].



Εικόνα 3.10 Η δομή της χημειοτακτικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων-1

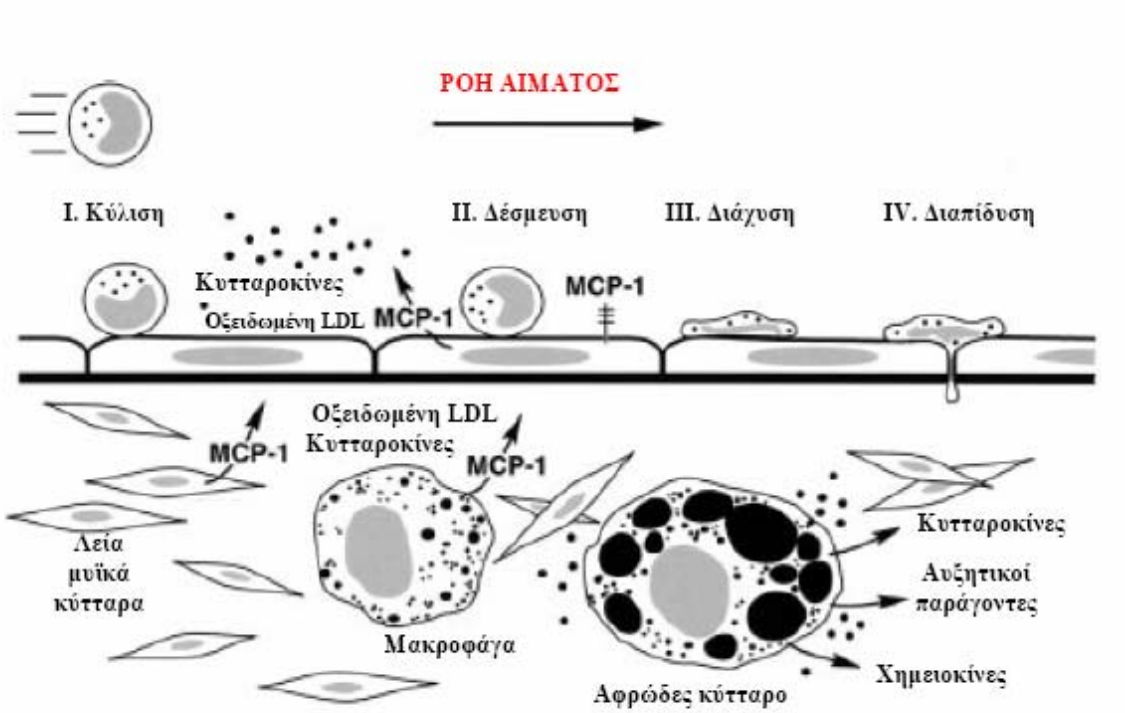
Η δέσμευση των CC χημειοκινών στον υποδοχέα τους ενεργοποιεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί σε ενεργοποίηση των φωσφολιπασών C-α_1 και -α_2 και την παραγωγή 1,4,5-τριφωσφο-ινοσιτόλης και διακυλογλυκερόλης [207]. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ραγδαία αύξηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Στη μεταγωγή του σήματος εμπλέκονται διάφορες κινάσες, μεταξύ των οποίων οι κινάσες σερίνης/ θρεονίνης και τυροσίνης [207]. Η έκφραση του MCP-1 ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB, πρωτεΐνη δεσμεύουσα του ενισχυτή CCAAT (*CCAAT enhancer binding protein isoforms*) και AP-1 [130, 135, 208, 209]. Η ενεργοποίησή τους απαιτεί μεταξύ άλλων φωσφορυλίωση από πολλαπλές κινάσες και φωσφατάσες, αποδόμηση μεταγραφικών αναστολέων και μεταφορά μεταγραφικών παραγόντων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Οι χημειοκίνες παράγονται από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των νεφρών (*μεσαγγειακών, επιθηλιακών, ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και του σπειράματος κ.α.*) [210].

Από τη στιγμή που η μετακίνηση των λευκοκυττάρων σε ένα συγκεκριμένο ιστό είναι απαραίτητο συστατικό της φλεγμονώδους διαδικασίας και της απάντησης του ξενιστή σε μόλυνση, θεωρείται ότι οι χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των διαδικασιών αυτών. Η διαπίδυση των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία στο εσωτερικό του ιστού, στη συνέχεια, απαιτεί συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των λευκών αιμοσφαιρίων και του ενδοθηλίου [202].

Η κυριότερη βιολογική δράση του MCP-1 φαίνεται να είναι η προσέλκυση των μονοκυττάρων και άλλων μονοπύρηνων κυττάρων στην εστία της φλεγμονής. Μαζί με την IL-8, πυροδοτεί τη σταθερή προσκόλληση των μονοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Αφού εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα (*εικόνα 3.11*). Η

συνεχιζόμενη εισροή λίπους οδηγεί σε σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, ενώ τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα συνεχίζουν να παράγουν αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες, προσελκύοντας και ενεργοποιώντας επιπλέον μονοκύτταρα [211]**.** Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρείται και στα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος. Τα ενδογενή σπειραματικά κύτταρα ενεργοποιούνται από κάποια παθολογική εισβολή (*ανοσολογική, τοξική, ισχαιμική, μηχανική κ.α.*) και παράγουν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές. Η παραγωγή χημειοκινών και των υποδοχέων τους, μαζί με την τοπική έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών (*IL-1, TNF-α, IFN-γ, PAF, ROS κ.α.*) προωθεί την ενεργοποίηση σελεκτινών και ιντεγκρινών στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε να λαμβάνει χώρα προσκόλληση των πρώτων, μετανάστευση στον υποενδοθηλιακό χώρο [212].



Εικόνα 3.11 Αλληλεπίδραση μονοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα μονοκύτταρα της αιματικής κυκλοφορίας προσδένονται στο ενδοθήλιο με μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει κύλιση μεσολαβούμενη από τη σελεκτίνη, ισχυρή πρόσδεση μεσολαβούμενη από την ιντεργκρίνη, διάχυση και διαπίδυση. Ο MCP-1 και άλλες χημειοκίνες παράγονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα σε απάντηση σε οξειδωμένα λιπίδια. Αφού εισέλθουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρείται και στα τριχοειδή αγγεία του σπειράματος. **Από Charo IF and MB Taubman. Circ Res 2004;95:858-866**

Ο MCP-1, εκτός από των μονοκυττάρων, λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας και για τα Τ λεμφοκύτταρα και τα βασεόφιλα [202, 213]. Τα Τ κύτταρα εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που είναι ικανές να προκαλέσουν έκφραση μεταλλοπρωτεϊνασών από τα μακροφάγα πράγμα που εμπλέκει τα κύτταρα αυτά με την ανάπτυξη ασταθούς αθηρωματικής πλάκας [213]. Ο MCP-1, σε συνεργεία με τον υποδοχέα του CCR2, μπορεί να προάγει την ανάπτυξη των Τ

βοηθητικών κυττάρων T_H2, είτε μέσω μείωσης της παραγωγής IL-12 από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, είτε μέσω ενίσχυσης παραγωγής της IL-4 από ενεργοποιημένα Τ κύτταρα. Αφετέρου, ο MCP-1 μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών έμμεσα, επηρεάζοντας τον αριθμό ή τον τύπο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που προσελκύονται στον φλεγμαίνοντα ιστό. Στη συνέχεια, κάποια από τα APCs μεταναστεύουν εντός των λεμφικών οζιδίων για να προκαλέσουν απάντηση των Τ κυττάρων [213].

Στα μαστοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα, οι επιδράσεις του MCP-1 συμπεριλαμβάνουν συμμετοχή στη σύνθεση λευκοτριενών, έκκριση ισταμίνης και χημειοτακτισμό [202, 214]. Τα μαστοκύτταρα είναι στρατηγικά τοποθετημένα κατά μήκος των αγγείων, σε ιστούς κοντά στο εξωτερικό περιβάλλον, όπως το δέρμα, οι πνεύμονες και το έντερο. Εκκρίνοντας ένα ευρύ φάσμα προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες, τα μαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να συντονίζουν τη μετακίνηση των λευκοκυττάρων [214]. Η προσέλκυση λοιπόν των ουδετερόφιλων από χημειοκίνες έχει αποδειχθεί ότι περιλαμβάνει τη συμμετοχή των μαστοκυττάρων in vivo. Οι CC χημειοκίνες, MCP-1 και MIP-1, προκαλούν ξεκάθαρη απάντηση ουδετερόφιλων, μέσω ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων και επακόλουθης έκκρισης TNF-α [215].

Ο MCP-1 προκαλεί την έκκριση του TF σε λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης αορτής και THP-1 μονοκύτταρα [202]. Ο ιστικός παράγοντας, που σηματοδοτεί έναρξη της διαδικασίας πήξης, απαντάται σε αθηροσκληρυντικές πλάκες, μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης αορτής. Η έκθεση του ιστικού παράγοντα κατά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, θεωρείται ότι προκαλεί οξεία θρόμβωση, που χαρακτηρίζει τα οξέα ισχαιμικά επεισόδια. Ο MCP-1 πυροδοτεί τη συσσώρευση του mRNA του ιστικού παράγοντα σε λεία μυϊκά κύτταρα και των THP-1 μονοκυττάρων σε λευχαιμικά κύτταρα [202]. Τα ανωτέρω δεδομένα υποστηρίζουν τις προθρομβωτικές ιδιότητες του MCP-1.

Από πλειάδα εργασιών προκύπτει ότι ο MCP-1 συσχετίζεται με τη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης [202, 216-218]. Η ενζυμική, μη οξειδωτική τροποποίηση της LDL, μετατρέπει τη λιποπρωτεΐνη σε πιθανό αθηρογενετικό παράγοντα, ο οποίος προκαλεί μαζική απελευθέρωση MCP-1 από τα μακροφάγα, μέσω ενεργοποίησης της τυροσινικής κινάσης και της *de novo* πρωτεϊνοσύνθεσης [202, 216]. Η απάλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον MCP-1 σε ποντίκια με ανενεργό LDL υποδοχέα εξασθένησε την διατροφικά προκαλούμενη αθηρωμάτωση [219]. Υποστηρίζεται ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα CCR2, κυρίως από τον MCP-1, συνεισφέρει στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, που συνιστά πρώιμες αθηροσκληρυντικές βλάβες [211]. Επιπλέον, η απάλειψη του CCR2 σε ποντίκια με έλλειψη apoE, παρείχε σημαντική προστασία από τη συσσώρευση των μακροφάγων και τις αθηρωματικές βλάβες, όταν τους χορηγήθηκε δίαιτα πλούσια σε λίπος [220].

Θεωρείται ότι ο MCP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ανθρώπινων νεφρικών παθήσεων. Τα επίπεδα του MCP-1 στα ούρα είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με προχωρημένη πάθηση των νεφρών και συσχετίζονται με δείκτες προόδου της νόσου, όπως ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων [221]. Ο MCP-1 πιθανότατα συμμετέχει στην

παθογένεση των φλεγμονωδών νεφρικών νόσων, μέσω προσέλκυσης και ενεργοποίησης των μονοκυττάρων.

Επιπλέον, μεσολαβεί την εναπόθεση κολλαγόνου στην πειραματική σπειραματονεφρίτιδα προκαλούμενη από TGF-β, οπότε η έκκρισή του σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει σε σκλήρυνση [222]. Στην κατεύθυνση αυτή, η χορήγηση αντισωμάτων anti-MCP-1 απέτρεψε την εμφάνιση σπειραματοσκλήρυνσης και διήθησης των λευκοκύτταρων [223]. Η υπερέκκριση του MCP-1 και άλλων κυτταροκινών, όπως ο PDGF και ο TGF-β, συσχετίστηκαν με συσσώρευση μονοκυττάρων και αύξηση της δραστηριότητας των μυοϊνοβλαστών σε ασθενείς με μη φλεγμονώδες νεφρωσικό σύνδρομο [224]. Από *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, προκύπτει ότι η αλληλεπίδρασή τους με αιμοπετάλια οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του MCP-1 από αυτά [225]. Εξάλλου οι Wada και οι συνεργάτες του [226], υποστηρίζουν ότι η υπερέκκριση του MCP-1 μπορεί να αποτελεί ένα κοινό ρυθμιστικό μονοπάτι που συμμετέχει στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης, ανεξάρτητα από την αιτία που οδηγεί σε σπειραματοσκλήρυνση και επακόλουθη ανεπαρκή νεφρική λειτουργία.

Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο του MCP-1 με τον υποδοχέα του CCR2 αλλά και η εφαρμογή μηχανικής πίεσης αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, που συμμετέχουν και στη διαδικασία της αθηροσκλήρυνσης [203]. Μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού που επωάστηκαν για 6 ώρες με VLDL παρουσίασαν αυξημένη έκκριση MCP-1, λόγω της ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από ιόντα ασβεστίου PKC [227]. Παρόμοια, η LDL φαίνεται να αυξάνει τόσο την έκκριση MCP-1 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, όσο και τη σύνθεση DNA, αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό τους [228].

Προσομοιάζοντας τη σπειραματική τριχοειδική υπέρταση, οι Gruden και συνεργάτες [229], έδειξαν ότι η πρόκληση μηχανικής διάτασης σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση παραγωγής του MCP-1, μέσω ενεργοποίησης του NF-κB. Η επίδραση αυτή ενισχύθηκε με συνδυασμό της μηχανικής διάτασης με επώαση των κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (450mg/dl). Παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση της έκκρισης του MCP-1 και σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, παρουσία συμπιεσμένου αέριου ήλιου στα δοχεία καλλιέργειας, όποτε αυξήθηκε η μερική πίεση σε αυτά [230].

Παρόμοια επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, προσομοιάζοντας την διαβητική νεφροπάθεια, έδειξαν και άλλες έρευνες [231, 232]. Ωστόσο, οι Janssen και συνεργάτες υποστηρίζουν ότι η υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση γλυκόζης δεν επηρεάζει την έκκριση MCP-1 από μη διεγερμένα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα και μειώνει την έκφραση του CCR2 υποδοχέα. Παρουσία όμως προφλεγμονώδους ερεθίσματος οι επιδράσεις της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης αντιστρέφονται, ενώ ο MCP-1 λειτουργεί ως αυτοκρινής παράγοντας για τα μεσαγγειακά κύτταρα [233]. Οι Banba και συνεργάτες [234] υποστηρίζουν ότι ο MCP-1 πιθανώς συνεισφέρει στην έναρξη και την πρόοδο της διαβητικής νεφροπάθειας. Τα επίπεδα του MCP-1 στα ούρα 54 διαβητικών ατόμων μετά από ολονύκτια νηστεία συσχετίστηκαν με τη

συγκέντρωση αλβουμίνης ούρων και γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης. Επιπλέον, η καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων έδειξε ότι η γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη αύξησε την έκκριση MCP-1, ενώ η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης διέγειρε λίγο την έκκρισή του. Ο συνδυασμός γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης και υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης αύξησε συνεργιστικά την παραγωγή του MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Επιπλέον, τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (*advanced glycation end products, AGEP*), που έχουν εμπλακεί στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης σε έδαφος σακχαρώδους διαβήτη, φαίνεται να επηρεάζουν την έκκριση του MCP-1. Συγκεκριμένα, οι Yamagishi και συνεργάτες [235] έδειξαν ότι τα AGE προϊόντα διαταράσσουν τη σπειραματική ομοιόσταση, προκαλούν κυτταρική απόπτωση των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και διεγείρουν την έκκριση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) και του MCP-1, προκαλώντας υπερδιήθηση και μικροαλβουμινουρία.

Στον πίνακα 3.4 που ακολουθεί συνοψίζονται οι διεγέρτες και οι αναστολείς έκκρισης MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού. Η σχετική αναλογία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών καθορίζει το βαθμό έκκρισης του MCP-1 κατά συνέπεια την έκταση των επιδράσεων στους ιστούς.

Πίνακας 3.4 Διεγέρτες και αναστολείς έκκρισης του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού.

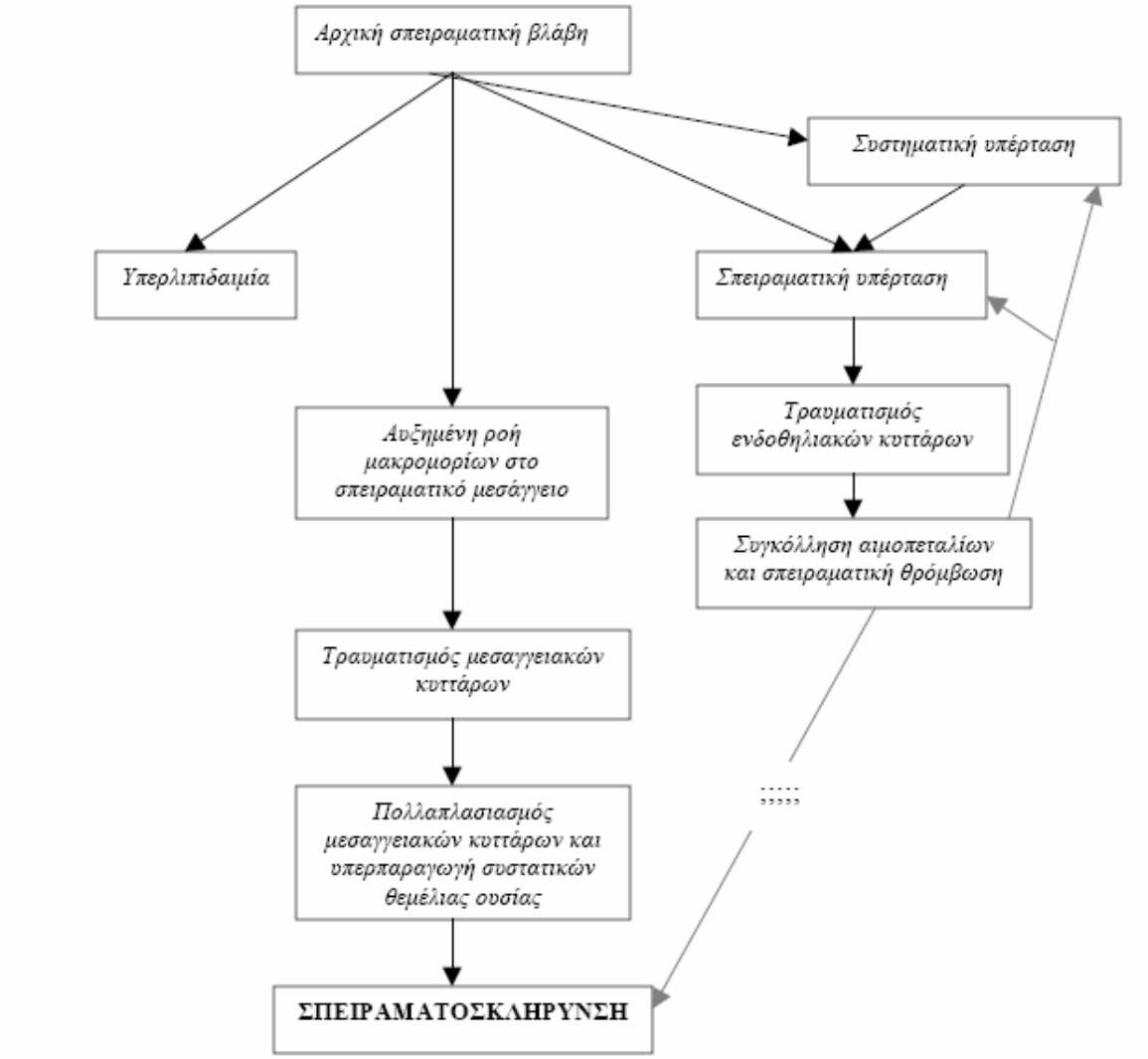
Μελέτες σε μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού			
Διεγέρτες	**Παραπομπές**	**Αναστολείς**	**Παραπομπές**
IL-1α	[236]	IL-1ra	[236]
IL-1β	[110, 130]	TGF-β_1	[237]
TNF-α	[130, 208]	PGE_2	[238]
LPS	[110]	BMP-7	[132]
IL-6	[189]	Εξωγενές NO	[139]
CRP	[239]	Εικοσαπεντανοϊκό οξύ	[240]
PDGF	[241, 242]	All trans ρετινοϊκό οξύ	[136]
PMA	[243]	Αδρενομεδουλίνη	[244, 245]
Συστατικά θεμέλιας ουσίας	[246]	Σπειρονολακτόνη	[247]
Διακυλογλυκερόλη	[120]	Τρογλιταζόνη	[248]
Υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης	[231, 232]	Λοβαστατίνη	[172]
Ιντεργκρίνη	[241, 249]		
Αγγειοτενσίνη ΙΙ	[229, 250]		
Αγγειοτενσίνη ΙΙΙ	[251]		
Ιντερφερόνη-γ	[178, 252]		
Θρομβίνη	[253]		
Σεροτονίνη	[242]		
LIF	[189]		

3.5 Προτεινόμενοι μηχανισμοί σπειραματικής βλάβης

Η σπειραματοσκλήρυνση είναι το αποτέλεσμα της προοδευτικής απώλειας της αρχιτεκτονικής του σπειράματος, ως επακόλουθο της συνεχούς ή κατά ώσεις δράσης ερεθισμάτων ή παραγόντων που ευθύνονται για την πρόκληση σπειραματικής βλάβης [79, 92]. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση συστατικών θεμέλιας ουσίας και προοδευτική απώλεια εγγενών κυττάρων του σπειράματος, με συνέπεια την αντικατάσταση των σπειραμάτων από ινώδη ιστό. Η ανάπτυξη σκλήρυνσης στα σπειράματα συνοδεύεται από παρουσία σημαντικών αλλοιώσεων στο διάμεσο ιστό, στα ουροφόρα σωληνάρια και στα αγγεία. Επομένως, συνυπάρχει φλεγμονώδης διήθηση και ίνωση του διάμεσου χώρου, ατροφία των σωληναρίων και υαλίνωση του τοιχώματος των αρτηριδίων [79].

Η σπειραματοσκλήρυνση θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα σε μεγάλο εύρος νεφροπαθειών, άσχετα με το αν η αρχική βλάβη – μεταβολικής, ανοσολογικής ή υπερτασικής αιτιολογίας – αφορά το σπείραμα, τα ενδιάμεσα σωληνάρια ή τα αιμοφόρα αγγεία. Ανεξάρτητα από την αρχική αιτία της βλάβης, η εξέλιξη αυτής προς σκλήρυνση συνδέεται με μεταβολή των χαρακτηριστικών των ενδοθηλιακών κυττάρων [92].

Η σπειραματική βλάβη, που μπορεί να εξελιχθεί σε σκλήρυνση, μπορεί να προέλθει από συστηματική υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, διήθηση μακρομορίων και κυττάρων στο χώρου του σπειράματος που μεσολαβείται από χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, από συγκόλληση αιμοπεταλίων και θρόμβωση (*βλ. εικόνα 3.12*).



Εικόνα 3. 12 Πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη σπειραματοσκλήρυνσης μετά από σπειραματικό τραυματισμό. Προσαρμογή από Diamond JR and MJ Karnovsky. Kidney Int 1988;33:917-924

Αιμοδυναμικά μεσολαβούμενη σπειραματική βλάβη

Οι Brener και συνεργάτες [254], υποστήριξαν το ρόλο της αιμοδυναμικά μεσοβαλούμενης σπειραματικής βλάβης στην παθογένεση της προοδευτικής σπειραματοσκλήρυνσης. Η αυξημένη ενδονεφρική πίεση και αιματική ροή παρατηρείται σε μοντέλα πειραματικής σπειραματικής νόσου. Το σπείραμα που υπερλειτουργεί, υπόκειται προοδευτικά σε ιστολογικές βλάβες που περιλαμβάνουν επέκταση της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας, εστιακή απογύμνωση περιοχών της σπειραματικής βασικής μεμβράνης και τελικά σπειραματική υαλίνωση/ σκλήρυνση. Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές προκαλούν με τη σειρά τους προοδευτική αζωθαιμία, υπέρταση και πρωτεΐνουρία, που αποτελούν στοιχεία της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου.

Ειδικότερα, η σπειραματική υπέρταση προκαλεί διαστολή των σπειραματικών τριχοειδών, ενδοθηλιακό τραυματισμό και αυξημένη διήθηση πρωτεϊνών, γεγονότα που επηρεάζουν τα

μεσαγγειακά και τα εγγύς σωληναριακά κύτταρα. Ακολούθως, τα κύτταρα αυτά γίνονται ανοσολογικά ενεργά, απελευθερώνοντας κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, που τελικά επιφέρουν αντικατάσταση του ενεργού νεφρικού ιστού από συνδετικό ιστό [255]. Όπως αποδεικνύεται, η ενεργοποίηση της αγγειοτενσίνης ΙΙ προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και την επέκταση της θεμέλιας ουσίας [255]. Με τον τρόπο αυτό, η αγγειοτενσίνη ΙΙ ενεργοποιεί ενεργά μόρια οξυγόνου (ROS), που με τη σειρά τους εμποδίζουν την ενδοθηλιακή παραγωγή NO και αυξάνουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων [256]. Μέσω της ενεργοποίησης του NF-kB σε λεία μυϊκά και μεσαγγειακά κύτταρα, ελέγχονται τα γονίδια για τη σύνθεση συγκεκριμένων κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης, NO, TGF-β, κυκλοοξυγενάσης 2 και αγγειοτενσινογόνου, που εμπλέκονται στην παθογένεση της αγγειακής βλάβης. Όπως προαναφέρθηκε, ο TGF-β εμπλέκεται στην ανάπτυξη ίνωσης, στη διέγερση της σύνθεσης των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αναστέλλει την αποδόμηση των αναστολέων των πρωτεασών της θεμέλιας ουσίας, ενεργοποιεί την παραγωγή ενδοθηλίνης-1 (ET-1), που δρα ως αγγειοσυσταλτικός παράγοντας και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών και αναστέλλει την ενδοθηλιακή παραγωγή NO [257].

Θεωρείται ότι η μακροχρόνια αύξηση των ενδοσπειραματικών πιέσεων και ροών, που ευνοεί την υπερδιήθηση και επηρεάζει την ικανότητα εκλεκτικής διήθησης του σπειράματος, οδηγεί σε προοδευτική νεφρική ανεπάρκεια. Η αυξημένη ροή των μακρομορίων κατά μήκος της βασικής σπειραματικής μεμβράνης και η επακόλουθη συσσώρευσή τους εντός του σπειράματος, ακολουθούν αυτές τις σπειραματικές αιμοδυναμικές διαταραχές και τη μειωμένη διηθητική ικανότητα του σπειράματος. Παράλληλα, μπορούν να λειτουργούν και ως ερεθίσματα για τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων και την υπερπαραγωγή της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε σπειραματοσκλήρυνση. Αφετέρου, η αυξημένη συστηματική υπέρταση, μπορεί να μεταφερθεί στην σπειραματική μικροκυκλοφορία, έχοντας ως αποτέλεσμα αύξηση της σπειραματικής τριχοειδικής υδροστατικής πίεσης, που οδηγεί σε περαιτέρω αιμοδυναμικά μεσολαβούμενο τραυματισμό [258]. Έλλειψη όμως της συσχέτισης των αιμοδυναμικών χαρακτηριστικών και του βαθμού σκλήρυνσης, ενισχύει την άποψη ότι και άλλοι μη αιμοδυναμικοί παράγοντες συμμετέχουν στους μηχανισμούς πρόκλησης της σπειραματοσκλήρυνσης.

Διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων

Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ νεφρικής βλάβης και υπερλιπιδαιμίας έγινε από τον Virchow το 1860 [259]. Αργότερα, οι Moorhead και συνεργάτες [260] παρατήρησαν ότι οι διαταραχές στο μεταβολισμό λιπιδίων μπορεί να παίζουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της αρχικής σπειραματικής βλάβης σε σπειραματοσκλήρυνση. Το 1982 ο Moorhead και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η αντισταθμιστική σύνθεση λιποπρωτεϊνών στο ήπαρ ως απόκριση στην απώλεια λευκωματίνη μέσω των ούρων μπορεί να προκαλέσει σταδιακά νεφρική βλάβη [261]. Με δεδομένο τον μειωμένο καταβολισμό των πρόδρομων μορίων των λιποπρωτεϊνών, οι de Mendoza και συνεργάτες [262]

επισήμαναν αυξημένη HDL και in vitro ενεργοποιημένη λιποπρωτεϊνική λιπάση στα ούρα ποντικών με πειραματικά προκαλούμενη νέφρωση. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι η απώλεια ενεργοποιητή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα ούρα, όπως η απολιποπρωτεΐνη C-II, μπορεί να οδηγήσει σε επίμονη υπερλιπιδαιμία, λόγω μειωμένης εκκαθάρισης των χυλομικρών και τριγλυκεριδίων από την κυκλοφορία.

Τα αυξημένα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών στην κυκλοφορία μπορούν να είναι πιθανότατα νεφροτοξικά με δυο τρόπους. *Πρώτον*, σε φυσιολογικό pH, οι VLDL και LDL προσδένονται με τις πολυανιονικές γλυκοζαμινογλυκάνες, αλλάζοντας με αυτό τον τρόπο το φορτίο της βασικής μεμβράνης του σπειράματος και αυξάνοντας τη διαπερατότητα των μακρομορίων εντός του μεσάγγειου. *Δεύτερον*, λαμβάνει χώρα διήθηση της τραυματισμένης σπειραματικής βασικής μεμβράνης, αφού ακόμα και οι συγκριτικά μεγάλες σε μέγεθος LDL διέρχονται αυτήν. Από τη στιγμή που οι λιποπρωτεΐνες εισέρχονται στο σπειραματικό μεσάγγειο, μπορούν να προσληφθούν από τα μεσαγγειακά κύτταρα και να συσσωρευτούν ενδοκυτταρικά. Εφόσον, τα μεσαγγειακά κύτταρα ομοιάζουν των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, μπορούν να απαντούν με πολλαπλασιασμό και υπερπαραγωγή εξωκυττάριας ουσίας (*που αποτελούν προάγγελους σπειραματοσκλήρυνσης*) στην αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση λιποειδών [263].

Παρότι πολλά πειραματικά μοντέλα υπερλιπιδαιμίας προκαλούμενης από δίαιτα σε ζώα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι ανωμαλίες του μεταβολισμού λιποειδών συνεισφέρουν στην νεφρική βλάβη, υφίστανται και κάποιες εξαιρέσεις στον κανόνα αυτό [103]. Σε κουνέλια *Wanatabe* με κληρονομική υπερλιπιδαιμία και ανεπάρκεια LDL υποδοχέων, φάνηκε ότι υφίσταται η περίπτωση εκδήλωσης αθηροσκλήρυνσης χωρίς το σχηματισμό νεφρικών βλαβών [264]. Επίσης, δεν φαίνεται να υπάρχουν στοιχεία νεφρικής νόσου σε μοντέλο υποαλβουμιναιμικών Nagase ποντικών, που είναι υπερχοληστερολαιμικά [265]. Στον άνθρωπο, η οικογενής υπερχοληστερολαιμία δεν σχετίζεται συνήθως με νεφρική ανεπάρκεια, ενώ η νεφρική νόσος σπάνια λαμβάνει χώρα σε ασθενείς με πρωτογενείς υπερλιπιδαιμίες. Εξαίρεση αποτελούν η νοσογόνος παχυσαρκία στον άνθρωπο [266] και η κληρονομική ανεπάρκεια ακυλτρανσφεράσης λεκιθίνης:χοληστερόλης (*LCAT*) με μη φυσιολογική LDL, που προκαλούν νεφρική ανεπάρκεια σε κάποιες περιπτώσεις [267]. Ακόμα και τα υποχοληστερολαιμικά φάρμακα δεν μπορούν να προλάβουν την πρόοδο της αθηροσκλήρυνσης ή της νεφρικής βλάβης σε άτομα σε υψηλό κίνδυνο. Φαίνεται λοιπόν ότι η υπερλιπιδαιμία από μόνη της δεν προκαλεί νεφρική βλάβη, αλλά πιθανότατα εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες στην πρόκληση και την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης.

Απάντηση στον τραυματισμό

Τα τελευταία χρόνια μια σειρά μελετών επισημαίνουν ότι η αθηροσκλήρυνση και η σπειραματοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρωση» [263, 268]. Στις ομοιότητες της αθηροσκλήρυνσης και της σπειραματοσκλήρυνσης συγκαταλέγονται ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός των λιποειδών, ο

συνεχόμενος πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ή μεσαγγειακών κυττάρων που ακολουθεί τον αρχικό τραυματισμό του ενδοθηλίου, ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, η υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η νέκρωση του ιστού και τελικά η σκλήρυνση. Όπως προαναφέρθηκε, η ομοιότητα των εκδηλώσεων των δυο παθήσεων οφείλεται πιθανότατα στο ότι: (**α**) το σπείραμα έχει κύτταρα που ανταποκρίνονται στον τραυματισμό της αρτηρίας (*ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα*), (**β**) στο γεγονός ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα ομοιάζουν των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε επίπεδο προέλευσης, ανατομίας, ιστοχημείας και λειτουργικότητας (*δηλ. συσταλτικότητας*) και (γ) στο ότι η βασική σπειραματική μεμβράνη έχει ικανότητα δέσμευσης των λιποπρωτεϊνών πλάσματος [269, 270]. Όποτε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης της αθηροσκλήρυνσης (*ως φλεγμονώδης διαδικασία*) μπορεί να βρει εφαρμογή και στην περίπτωση της σπειραματοσκλήρυνσης.

Η σπειραματική αθηροσκλήρυνση χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυττάρων γεμάτων με λιποειδή, που προέρχονται από μακροφάγα και μεσαγγειακά κύτταρα. Τα τελευταία, που έχουν πολλές κοινές ιδιότητες με τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και προσλαμβάνουν τροποποιημένη ή μη LDL, θεωρούνται κομμάτι της νεφρικής βλάβης που μεσολαβείται από λιποειδή. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να επηρεάσουν την πρόσληψη λιπιδίων και φαίνεται ότι μπορούν να μετατρέψουν τα κύτταρα σε αφρώδη. Ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα που προεπωάστηκαν με ET-1 και PDGF διπλασίασαν την πρόσληψη LDL [271]. Επιπλέον, οι κυτταροκίνες IL-1β και TNF-α επιτάχυναν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων προκαλούμενων από VLDL. Επιπλέον, ο PAF έχει βρεθεί ότι προκαλεί το σχηματισμό ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη [272].

Επειδή η φλεγμονώδης απάντηση είναι πολύπλοκη, είναι δύσκολο να περιγραφεί η αλληλουχία των γεγονότων. Πιθανότατα, η LDL έχει την ικανότητα να διεγείρει προφλεγμονώδη μηνύματα που ενεργοποιούν έναν καταρράκτη συμβάντων: τα οξειδωμένα παράγωγα της LDL, συμπεριλαμβανομένων των apoB, λιπαρών οξέων, οξυστερολών και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, μπορεί να δρουν ως προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όταν παγιδευτούν στον εσωτερικό χιτώνα των αγγείων [273]. Παρότι όμως υπάρχουν ισχυρά στοιχεία που αποδίδουν στην οξειδωτική τροποποίηση την μετατροπή της LDL σε προφλεγμονώδη μεσολαβητή, οι Bhakdi και συνεργάτες [274] πρότειναν ότι η μη οξειδωτική, ενζυμική τροποποίηση της LDL ευθύνεται για τη μετατροπή της σε αθηρογενετικό μόριο. Η ενζυμικά τροποποιημένη LDL ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, αναγνωρίζεται από τους εκκαθαριστές υποδοχείς και προκαλεί την παραγωγή του MCP-1.

Σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οι LDL, VLDL και IDL μπορούν να διεγείρουν την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-6, ο PDGF, ο TGF-β από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, ενώ η οξειδωμένη LDL προκάλεσε την παραγωγή TNF-α [179]. Οι Ruan και συνεργάτες έδειξαν ότι ελάχιστα τροποποιημένη LDL οδήγησε σε παραγωγή TNF-α από μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού [275]. Οι Grone και συνεργάτες έδειξαν επίσης ότι η έκθεση των μεσαγγειακών κυττάρων σε LDL είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του mRNA του PDGF [271].

Μελέτες έχουν επίσης εξετάσει το ρόλο των σπειραματικών μακροφάγων μαζί με την υπερλιπιδαιμία στην εμφάνιση σπειραματοσκλήρυνσης μετά από σπειραματικό τραυματισμό. Εκτός από την προσέλκυση μονοκυττάρων της κυκλοφορίας [276], η τροποποιημένη LDL προκαλεί παραγωγή χημειοτακτικών και φλεγμονωδών παραγόντων, όπως ο MCP-1 [277] και ο m-CSF [278], η IL-1β [279] και μόρια προσκόλλησης από ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα.

Διάφορες κυτταροκίνες έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ορού, λόγω είτε αυξημένης ηπατικής έκκρισης VLDL είτε καθυστερημένης εκκαθάρισής τους από το πλάσμα μετά από μείωση στη δραστικότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ή/ και στα επίπεδα της apoE στις VLDL [103]. Οι κυτταροκίνες αυξάνουν την ηπατική σύνθεση χοληστερόλης με διέγερση της έκφρασης του γονιδίου της ρεδουκτάσης του β-υδροξυ-β-μεθυλο-γλουταρυλοσυνενζύμου Α (HMG-CoA) και μειώνουν τον ηπατικό καταβολισμό της με αναστολή της 7-α-υδροξυλάσης της χοληστερόλης [280]. Με τον τρόπο αυτό, οι κυτταροκίνες προκαλούν αξιοσημείωτες αλλαγές στο μεταβολισμό των λιποειδών, που οδηγούν στην υπερλιπιδαιμία [103]. Να σημειωθεί ότι οι οξειδωμένες LDL προσδένονται επιλεκτικά στο σπείραμα όταν χορηγηθούν ενδοαρτηριακά στα ποντίκια [281].

Ο ρόλος του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Η διείσδυση μακρομορίων και κυττάρων του αίματος στο μεσάγγειο πιστεύεται πως είναι το αρχικό βήμα στην πρόκληση της σπειραματικής βλάβης. Ο PAF φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας του σπειράματος, πιθανώς λόγω συσσώρευσης αιμοπεταλίων και πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων στον αυλό των τριχοειδών και απόθεσης των παραγόμενων από αυτά κατιονικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την απώλεια του αρνητικού φορτίου της σπειραματικής μεμβράνης [282]. Επίσης, ο PAF έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητος για την αναστολή της κυλιόμενης κίνησης των κυττάρων στο ενδοθήλιο και τη διείσδυση αυτών στον υποενδοθηλιακό χώρο [283]. Τα μακρομόρια που διεισδύουν στο μεσάγγειο περιλαμβάνουν παράγοντες όπως λιποπρωτεΐνες, ανοσοσυμπλέγματα και τα τελικά προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης, ενώ στα διηθούντα κύτταρα συγκαταλέγονται τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Τα διηθούντα αυτά μόρια και κύτταρα έχουν την δυνατότητα να απομακρυνθούν από το μεσάγγειο και μέσω των καναλιών του μεσαγγείου να κατευθυνθούν προς τον σπειραματικό πόλο, να παραληφθούν από τα μεσαγγειακά κύτταρα, ή να μείνουν παγιδευμένα στη μεσοκυττάρια ουσία. Η μοίρα τους εξαρτάται από το μέγεθος τους, το φορτίο τους, τη συγκέντρωση τους και τη συγγένεια που έχουν με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των μεσαγγειακών κυττάρων ή με τα συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο PAF προάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι επάγει την έκφραση του MCP-1 [284-286]. Η αναστολή της σύνθεσης του NO από τον PAF φαίνεται να ενισχύει την προσκόλληση των πολυμορφοπύρηνων και των μονοκυττάρων στα μεσαγγειακά κύτταρα [287]. Επιπλέον, ο PAF φαίνεται να διεγείρει, μέσω παραγωγής TGF-β, την παραγωγή πρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας (*ινωδονεκτίνη και κολλαγόνο*

IV) [288]. Η απώλεια των ενδογενών αντιοξειδωτικών και η παραγωγή ROS στην περιοχή του μεσαγγείου από τα μακροφάγα, ενδοθηλιακά και μεσαγγειακά κύτταρα προκαλεί την παρατεταμένη οξείδωση της LDL. Ο PAF έχει βρεθεί να επάγει την παραγωγή ROS τόσο από μεσαγγειακά κύτταρα [284] όσο και από τα κύτταρα του αίματος.

Οι Λιαπίκος και συνεργάτες έδειξαν ότι κατά την οξείδωση της LDL παράγεται PAF [289] ενώ άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν πιστοποιήσει την ύπαρξη λιποειδών με δράση PAF στη oxLDL [290]. Οι δράσεις της οξειδωμένης LDL έχουν αποδοθεί κυρίως στην ύπαρξη των οξειδωμένων λιποειδών που είναι δομικά ανάλογα του PAF. Η απώλεια δραστικότητας ακετυλο-υδρολάσης του PAF (PAF-AH) της oxLDL έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του PAF. Ο PAF έχει βρεθεί να προάγει την παραγωγή αρκετών παραγόντων από τα κύτταρα του αίματος ενώ, αρκετές κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, ανοσοσυμπλέγματα, αγγειοδραστικά μόρια και το H_2O_2 προάγουν την παραγωγή PAF από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Φαίνεται επομένως ότι δημιουργείται ένα δίκτυο δράσεων με τελικό αποτέλεσμα την επιδείνωση της βλάβης. Τόσο τα μεσαγγειακά όσο και τα μακροφάγα προσλαμβάνουν χοληστερόλη και εστέρες της χοληστερόλης και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Αν και αρχικά είχε αποδοθεί η δημιουργία των αφρωδών κυττάρων στην πρόσληψη λιποειδών, μέσω των εκκαθαριστών υποδοχέων, τελευταίες μελέτες δείχνουν τη συμμετοχή και άλλων υποδοχέων όπως των υποδοχέων LDL αλλά και των υποδοχέων VLDL [291-293]. Ο PAF έχει βρεθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του LDL-r , SR-AI, σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, αυξάνοντας μ' αυτόν τον τρόπο την εισροή των LDL λιποπρωτεινών και της τροποποιημένης LDL στο εσωτερικό των κυττάρων και οδηγώντας στον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [272]. Ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η επέκταση της μεσαγγειακής διάμεσης ουσίας οδηγούν σταδιακά σε απόθεση άμορφου υλικού, νέκρωση κυττάρων και τελικά σκλήρυνση.

3.6 Ελαιόλαδο και νεφρικός ιστός

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φανερώνει την απουσία εργασιών παρέμβασης με ελαιόλαδο σε νεφροπαθείς. Το ελαιόλαδο έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία ελέγχου ή εικονικό φάρμακο (*placebo treatment*) σε διάφορες μελέτες [294-299] που εξετάζουν την επίδραση των ιχθυελαίων στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς τα μονοακόρεστα θεωρούνται ουδέτερα λιπαρά οξέα. Δυο από αυτές τις έρευνες [296, 297] βέβαια, αναφέρουν σφάλματα τύπου II λόγω πιθανών placebo επιδράσεων του ελαιολάδου. Ωστόσο, βρέθηκαν ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου – εξίσου ισχυρές με αυτές των ιχθυελαίων – σε φλεγμονώδεις νόσους [300].

Η σύγκριση των επιδράσεων στις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος από την κατανάλωση ελαιολάδου (*πλούσιου σε ελαϊκό οξύ*), καρδαμελαίου (*πλούσιου σε*

λινελαϊκό οξύ) ή ενός ηλιελαίου πλούσιου σε ελαϊκό οξύ, φανέρωσε ότι οι επιδράσεις αυτές οφείλονται περισσότερο στο ελαϊκό οξύ, από τα μη λιποειδικά συστατικά του ελαιολάδου [301]. Συγκεκριμένα, ποντίκια Weanling σιτίστηκαν για 6 εβδομάδες με 20% κ.β. ζώου ελαιόλαδο, καρδαμέλαιο ή πλούσιο σε ελαικό οξύ ηλιέλαιο, ενώ δίαιτα χαμηλού λίπους (2,5% κ.β) χρησιμοποιήθηκε ως συνθήκη ελέγχου. Οι παρεμβάσεις με ελαιόλαδο και με ηλιέλαιο μείωσαν τον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων και τη δραστηριότητα των φονικών κυττάρων, περισσότερο από τις άλλες δυο δίαιτες.

Οι Cano και συνεργάτες [302] εκτίμησαν την ανοχή και αποτελεσματικότητα γαλακτωμάτων λίπους με βάση το ελαιόλαδο ή το σογιέλαιο στην παρεντερική διατροφή ασθενών με αιμοκάθαρση (*intradialytic parenteral nutrition*), με μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή μελέτη διάρκειας 5 εβδομάδων. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και τα δυο γαλακτώματα βελτίωσαν τη διατροφική κατάσταση, επηρέασαν το λιπιδαιμικό προφίλ (*αυξήθηκαν οι LDL, apo-B, C-II, C-III και το πηλίκο apo A-I/A-II*), τις οξειδωτικές (*μειώθηκε η μηλονική διαλδεϋδη*) και φλεγμονώδεις (*αυξήθηκε η IL-2*) παραμέτρους.

Στα διαγνωστικά κριτήρια του μεταβολικού συνδρόμου, προστέθηκε πρόσφατα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και η ενδεχόμενη εμφάνιση μικροαλβουμινουρίας [303]. Σε μια προοπτική έρευνα 180 ασθενών με το σύνδρομο αυτό, οι Esposito και συνεργάτες [304] έδωσαν οδηγίες για την εφαρμογή διατροφικού προγράμματος μεσογειακού τύπου στην ομάδα παρέμβασης (*n=90*), ενώ η ομάδα ελέγχου ακολούθησε δίαιτα χαμηλού λίπους. Μετά από 2 χρόνια, η ομάδα παρέμβασης κατανάλωσε περισσότερα τρόφιμα που περιείχαν μονοακόρεστα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και φυτικές ίνες, ενώ είχαν και μικρότερο πηλίκο ω-6/ω-3 λιπαρών οξέων. Σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η ομάδα που ακολούθησε μεσογειακού τύπου διατροφή για 2 χρόνια είχε μεταξύ άλλων μειωμένες συγκεντρώσεις ορού για τις hs-CRP (*p=0,01*), IL-6 (*p=0,04*), IL-18 (*p=0,3*) και IL-7 (*p=0,4*). Μετά από 2 χρόνια παρακολούθησης, 40 άτομα από την ομάδα παρέμβασης είχαν ακόμα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, σε σύγκριση με τα 78 άτομα της ομάδας ελέγχου.

Δεδομένου του ότι το ελαιόλαδο αποτελεί μεταξύ άλλων πηγή ελαϊκού οξέος και βιταμίνης Ε απαντάται στη βιβλιογραφία μια σειρά πειραμάτων, όπου δοκιμάζονται τα συστατικά αυτά του ελαιολάδου.

Οι Mishra και συνεργάτες [305] έδειξαν σε μικροαγγειακά μεσαγγειακά κύτταρα ότι τα ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα ελαϊκό και λινελαϊκό δεν προκαλούν απόπτωση των κυττάρων, σε αντίθεση με τα κορεσμένα παλμιτικό και στεαρικό οξύ σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Επίσης, παρατήθηκε ότι το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ απέτρεψαν την προκαλούμενη από παλμιτικό οξύ μιτοχονδριακή έκκριση κυτοχρώματος C και ενδονουκλεάσης G, οπότε προστάτεψαν τα κύτταρα από την προκαλούμενη από παλμιτικό οξύ κυτταρική απόπτωση. Οι Carluzzio και συνεργάτες [306] επωάζοντας ενδοθηλιακά κύτταρα από ανθρώπινη ομφαλιαία φλέβα με ελαϊκό οξύ και 1 μg/ml LPS, παρατηρήσανε ότι το ελαϊκό οξύ μείωσε κατά 40% την έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1. Παρόμοια μείωση προκάλεσε το ελαϊκό οξύ και στα επίπεδα του mRNA των VCAM-1. Οι

συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η επιλεκτική εκτόπιση των κορεσμένων λιπαρών οξέων από το ελαϊκό οξύ στα κυτταρικά μεμβρανικά φωσφολιποειδή και η γονιδιακή ρύθμιση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, λειτουργούν προστατευτικά έναντι της αθηροσκλήρυνσης.

Η βιταμίνη Ε φαίνεται πως έχει σημαντικά προστατευτικό ρόλο έναντι της σπειραματοσκλήρυνσης. Στα περισσότερα ζωικά μοντέλα διαβητικής σπειραματοσκλήρυνσης, οι υψηλές δόσεις βιταμίνης Ε αποδεικνύονται προστατευτικές [307-309]. Η επίδραση αυτή αποδίδεται σε μείωση της περιεχόμενης στο μεσάγγειο διακυλογλυκερόλης, που μεσολαβεί την υπερδιέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης PKC [308, 309]. Η βιταμίνη Ε αυξάνει τη δραστικότητα της σπειραματικής κινάσης της διακυλογλυκερόλης σε διαβητικά ποντίκια, κάτι που εν μέρει ευθύνεται για την επίδραση της βιταμίνης Ε στα επίπεδα της διακυλογλυκερόλης [308, 309]. Παρόμοια επίδραση έχει και στην κινάσης της διακυλογλυκερόλης σε λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων που εκτέθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης [310]. Η παρέμβαση με βιταμίνη Ε επίσης μειώνει την ανοσοδραστικότητα του TGF-β σε διαβητικά ποντίκια [311], ενώ μειώνει την αλβουμινουρία και τη σπειραματική υπερδιήθηση σε κάποιες μελέτες, φανερώνοντας ότι επιδρά στα σπειραματικά μεσαγγειακά και αγγειακά κύτταρα [307-309].

Σε σπείραμα ανθρώπου ή ποντικού, η παρέμβαση με βιταμίνη Ε έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων [312-314], της παραγωγής διάφορων τύπων (α-I, III, IV) κολλαγόνου [315-317], των επιδράσεων της οξειδωμένης LDL σε αυτά [315, 318, 319] και την αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων [307, 316].

Τέλος, δυο κλινικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση υψηλών δόσεων βιταμίνης Ε σε διαβητικούς ασθενείς με μικροαλβουμινουρία [320, 321]. Και οι δυο μελέτες αναφέρουν μέτρια αλλά σημαντική μείωση (20-30%) στην αποβολή αλβουμίνης με τα ούρα, κατά την παρέμβαση. Η παρατηρούμενη μείωση της αλβουμινουρίας πιθανότατα υποδεικνύει τη μείωση ενεργοποίησης της PKC στο σπείραμα.

Κεφάλαιο 4ο
Σκοπός

Η σπειραματοσκλήρυνση είναι το κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό στις περισσότερες νεφρικές παθήσεις και σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη αυτών σε νεφρική ανεπάρκεια. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι η σπειραματοσκλήρυνση και η αρτηριοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρυνση». Τα μεσαγγειακά αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος και εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της βλάβης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (PAF, IL-1, TNF-α) μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην εξέλιξη της βλάβης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των ολικών πολικών λιποειδών (ΟΠΛ) ελαιολάδου στις λειτουργίες κυτταρικής σειράς ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων. Στο πλαίσιο αυτό τέθηκαν οι εξής στόχοι: (**α**) ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών, συγκέντρωσης και χρόνου επώασης, διέγερσης των κυττάρων με την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-1β ώστε να επιτευχθεί η έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1 (**β**) η εκχύλιση των ΟΠΛ του ελαιολάδου και η πραγματοποίηση χημικών προσδιορισμών στο εκχύλισμα (**γ**) η μελέτη της επίδρασης των ΟΠΛ στην έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα (**δ**) η μελέτη της επίδρασης των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα (**ε**) η μελέτη της επίδρασης της IL-1β στα επίπεδα mRNA του υποδοχέα της LDL στα μεσαγγειακά κύτταρα.

Κεφάλαιο 5ο

Πειραματικές μέθοδοι

5.1 Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε μια εξακριβωμένη σταθερή κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (*Human mesangial cell line, HMCL*). Τα κύτταρα έγιναν αθάνατα με την προσθήκη (*transfection*) των ογκογονιδίων SV40 και H-ras. Τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων διατηρήθηκαν και στη κυτταρική σειρά (*Κλώνος C2M12*) όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.1 [322].

Πίνακας 5.4 Μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων και της κυτταρικής σειράς αυτών. Από Sraer JD et al. Kidney Int 1996;49: 267-70

	Ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα	**Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων.**
Μορφολογία		
Αστεροειδής σχήμα	+	+
Κυτοπλασμικές προεκτάσεις	+	+
Μικρολαχνές	+	+
Αντιγονικοί δείκτες		
α-ακτίνη	+	+
T-SV 40	-	+
Συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας		
Κολλαγόνο I	+	+
Κολλαγόνο IV	+	+
Λαμίνη	+	+
Φιμπρονεκτίνη	+	+
Βιοσύνθεση		
IL-6	+	+
Ρενίνη	+	+
t-PA	+	+
u-PA	+	+
PAI1	+	+

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Δοχεία καλλιέργειας (flask) 75 cm^2 και 25 cm^2
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.

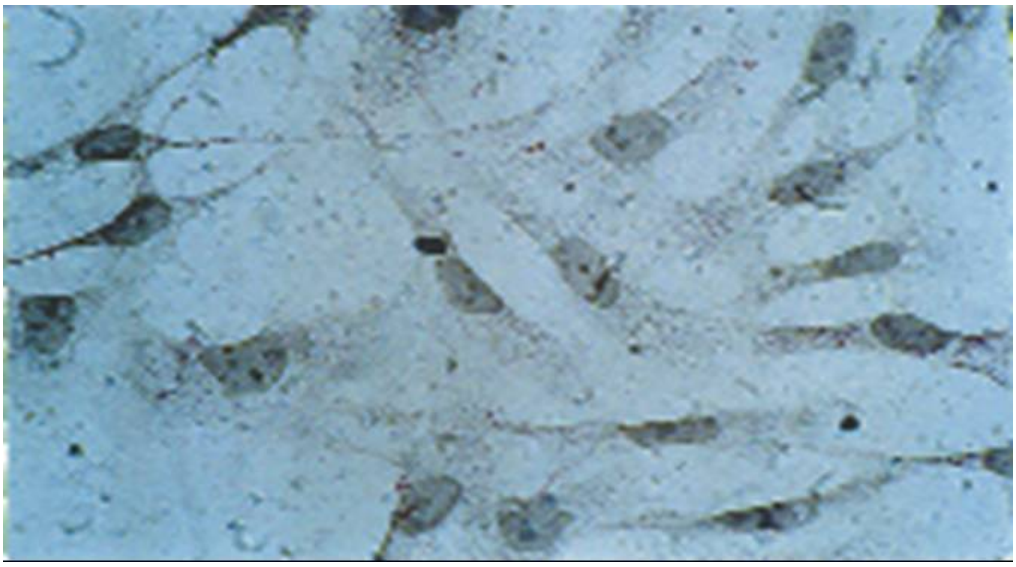
- Αποστειρωμένα δοχεία
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Ορός νεογνού μόσχου (Foetal calf serum, FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη-και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Αμφοτερικίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Ανθρώπινη μεταφοράση, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4.1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7.66 mg / mL τρανσφερίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0.2408 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα, HMCL, καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε RPMI1640, 5% FCS, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10^5 unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5 x 10^{-3} g / L αμφοτερικίνη, 5 x 10^{-3}g/L ινσουλίνη, 5 x 10^{-3} g/ L ανθρώπινη τρανσφερρίνη και 5 x 10^{-3} g/ L σεληνιώδες νάτριο (*sodium selenite*) σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm^2 .

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας ενώ γίνονταν ανακαλλιέργεια στα κύτταρα σε διαστήματα 6-7 μέρων. Όταν γινόταν πλήρης ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη θρυψίνης και το κύτταρα επωάζονταν για 2 λεπτά στους 37°C. Η αποκόλληση των κυττάρων ελεγχόταν με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύονταν με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας.

Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματίζονταν με προσθήκη μέσου ανάπτυξης που περιείχε 5% FCS και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γινόταν με φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρονταν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας σε αναλογία 1:3.



Εικόνα 5.3 Χαρακτηριστική εικόνα καλλιεργούμενων ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο.

5.2 Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Δοχεία καλλιέργειας (*flask*) 75 cm^2 και 25 cm^2
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένα δοχεία
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur

- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Ορός νεογνού μόσχου (Foetal calf serum, FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη-και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Αμφοτερικίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Ανθρώπινη μεταφοράση, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4,1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7,66 mg / mL τρανσφερρίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Θρυψίνη (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους –20°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0,9076 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,2408 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Αμπούλες DMSO
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).
- Διάλυμα συντήρησης : διάλυμα FCS 20% σε DMSO.

Αναλυτική πορεία

Όταν γινόταν πλήρης ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη θρυψίνης και το κύτταρα επωάζονταν για 2 λεπτά στους 37°C. Η αποκόλληση των κυττάρων ελεγχόταν με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύονταν με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας.

Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματίζονταν με προσθήκη μέσου ανάπτυξης που περιείχε 5% FCS και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γινόταν με φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρονταν σε 0,9 mL FCS, ακολουθούσε προσθήκη 0,9 mL διαλύματος συντήρησης και τοποθέτηση σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες για αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Το DMSO προστίθεται για την αποφυγή κρυστάλλων και επομένως την προστασία των κυττάρων κατά τη ψύξη. Η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας είναι σημαντική για την ομαλή ψύξη τον κυττάρων και την βιωσιμότητα τους για αυτό το λόγο οι σωλήνες αρχικά τοποθετούνταν στο δοχείο ισοπροπανόλης στους –20ºC για σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας και μετά από διάστημα 1 μέρας σε δοχείο υγρού αζώτου.

Η απόψυξη των κυττάρων γινόταν με τοποθέτησή τους κατευθείαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37ºC. Αμέσως μετά την υγροποίηση του διαλύματος διασποράς των κυττάρων ακολουθούσε τοποθέτηση τους σε σωλήνα των 50 mL που περιείχε 20 mL RPMI1640 γινόταν φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρονταν σε 20 mL RPMI1640 και γινόταν φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν ποσότητα του DMSO. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρονταν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας 75 cm^2 και στον επωαστικό θάλαμο.

5.3 Διέγερση των κυττάρων με IL-1β

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37°C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντροι Eppendorf centrifuge 5810R και Eppendorf centrifuge 5417C.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Φρέσκο μέσο ανάπτυξής RPMI1640.
- Διάλυμα BSA 10% w.v. ελεύθερης λιπαρών οξέων και χαμηλής ενδοτοξίνης (Sigma): 1 g BSA αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm.
- Φρέσκο μέσο χωρίς ορό (SFM: περιέχει 0,2 % BSA, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10^5 unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5 x 10^{-3} g / L αμφοτερικίνη).
- Διάλυμα IL-1β: 5μg IL-1β αναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA-FFA ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1 μg/mL IL-1β.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0,9076 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,2408 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα HMCL καλλιεργήθηκαν σε μέσο ανάπτυξής RPMI1640 σε δοχεία καλλιέργειας 12 πηγαδιών με βάση τη μεθοδολογία που αναλύθηκε στις παραγράφους 6.1 και 6.2.

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα έφθαναν στο 80% της συμβολής στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη φρέσκου μέσου χωρίς ορό που περιείχε 0,2 % BSA (SFM) και ακολουθούσε παραμονή σε αυτό το μέσο για 24 ώρες ώστε να επέλθει συγχρονισμός των κυττάρων. Μετά τις 24 ώρες απομακρύνονταν το μέσο και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Ακολουθούσε προσθήκη φρέσκου μέσου SFM που περιείχε είτε το διαλύτη του κάθε προστιθέμενου παράγοντα (δείγμα αναφοράς) είτε διαλύματα IL-1β κατάλληλης συγκέντρωσής σε PBS 0,1% BSA, είτε κάποιον άλλο παράγοντα ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος.

5.4 Εκχύλιση πολικών λιποειδών ελαιολάδου

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο που προέρχεται από ελαιόλαδο Κορωνεϊκής ποικιλίας. Απομονώθηκαν από αυτό τα ολικά πολικά λιποειδή (ΟΠΛ) με τροποποιημένη κατανομή κατ΄ αντιρροή και τα δείγματα φυλάχτηκαν στους -20°C, σε αέριο άζωτο, μέχρι τη χρήση τους. Πριν την προσθήκη τους στα κύτταρα εξατμίζονταν σε αέριο άζωτο και αναδιαλύθηκαν σε DMSO.

5.4.1. Τροποποιημένη κατανομή κατά αντιρροή

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, CH_3CH_2OH, H_2O) αναλυτικής καθαρότητας.
- Αέριο άζωτο.
- 2 διαχωριστικές χοάνες του 1L.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 και 500 mL.
- 2 σφαιρικές φιάλες των 500 mL.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur.

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά λιποειδή αναμιγνύονται με προεξισορροπημένους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και CH_3CH_2OH 87 %, σε αναλογία 4/1. Δημιουργείται διφασικό σύστημα διαλυτών, όπου τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της CH_3CH_2OH, τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα.

Αναλυτική πορεία

Σε διαχωριστική χοάνη, γίνεται εξισορρόπηση των διαλυτών του πετρελαϊκού αιθέρα με την αιθανόλη 87%. Σχηματίζονται δύο φάσεις, οπότε παραλαμβάνεται χωριστά η κάτω φάση που είναι η εξισορροπημένη CH_3CH_2OH 87% και στη συνέχεια η άνω φάση που είναι ο εξισορροπημένος πετρελαϊκός αιθέρας, για να ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία των λιποειδών. Στη συνέχεια, ορισμένη ποσότητα ελαιολάδου όγκου V(mL), μεταφέρονται στην πρώτη διαχωριστική χοάνη όπου προστίθενται 4 V(mL) προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολούθως γίνεται έκπλυση με προσθήκη V(mL) προεξισορροπημένης CH_3CH_2OH 87% και ισχυρή ανάδευση. Αφού ξεχωρίσουν οι δύο φάσεις, παραλαμβάνεται η κάτω φάση που είναι η αιθανολική φάση, η οποία τοποθετείται στη δεύτερη διαχωριστική χοάνη. Η έκπλυση με την προεξισορροπημένης CH_3CH_2OH 87% επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και οι ενωμένες αιθανολικές φάσεις στη δεύτερη διαχωριστική φιάλη, εκπλένονται δύο φορές με 3 V(mL) προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Ο πετρελαϊκός αιθέρας των δύο εκπλύσεων, εκπλένεται στη συνέχεια με 3 V(mL) προεξισορροπημένης CH_3CH_2OH 87%.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση που περιέχει τα πολικά λιποειδή, εξατμίζεται σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση έως μικρού όγκου και στη συνέχεια μεταφέρεται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη $CHCl_3$/MeOH 1/1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα που περιέχούν τα ουδέτερα λιποειδή, συμπυκνώνονται σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και αποθηκεύονται σε υάλινο δοχείο.

5.4.2 Προσδιορισμός φωσφόρου στα λιποειδή

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Υπερχλωρικό οξύ ($HClO_4$) 70%.
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4% : Ζυγίζονται 2.21 g Μολυβδαινικό αμμωνίου και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml.
- Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ): Διαλύονται 30 g $NaHSO_3$ και 6 g Na_2SO_3 σε 250 mL νερό. Στο διάλυμα αυτό διαλύονται 0,5 g 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος. Αν μετά από τρεις ώρες σχηματιστεί ίζημα, διηθείται και το αντιδραστήριο

φυλάσσεται υπό ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του.

- Αντιδραστήριο ANSA: Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού με ανάμιξη 4 mL διαλύματος ANSA και 6 mL απεσταγμένου νερού.
- Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 4 μg P/mL.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες από θερμοανθεκτική βοριοπυριτική ύαλο (pyrex)
- Σιφώνιο των 10 mL.
- Αυτόματη πιπέτα των 1000 mL.
- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180ºC
- Φωτόμετρο Novaspec II (Pharmacia Biotech)

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή με καύση, παρουσία υπερχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο, το οποίο παρουσία του ANSA ως αναγωγικού μέσου και με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον ανάγεται προς κυανούν του μολυβδαινίου.

Αναλυτική πορεία

Δοκιμαστικοί σωλήνες pyrex πλένονται με χρωμοθειικό οξύ και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό. Το δείγμα, που περιέχει 0,5-5 μg P, φέρεται στο δοκιμαστικό σωλήνα pyrex, εξατμίζεται ο διαλύτης, προσθέτονται 0,5 mL υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 170-180ºC για 1 h. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προσθέτονται 1 mL απεσταγμένου νερού, 3 mL μολυβδαινικού αμμωνίου και 0,5 mL αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα, οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 100ºC για 10 min. Αφήνονται να ψυχθούν για 20 min και φωτομετρούνται στα 820 nm. Παράλληλα, γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα δισόξινου φωσφορικού καλίου που περιέχουν 0,5 έως 5 μg φωσφόρου.

5.4.3 Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL
- Σιφώνια των 10 mL.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
- Πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4)

- Διάλυμα φαινόλης 5%
- Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης

Αρχή μεθόδου

Οι εξόζες με την επίδραση πυκνού θειικού οξέος σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη, που με φαινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται και οι πεντόζες.

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα το οποίο περιέχει 20-150 μg σακχάρου φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mL νερού, 1mL διαλύματος φαινόλης και 2,5 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος. Ύστερα από παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 490 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με δείγματα που περιέχουν 20-150 μg γλυκόζης.

5.4.4 Προσδιορισμός φαινολικών

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu : Διαλύονται 10 g βολφραμικού νατρίου και 2.5g μολυβαινικό νάτριο σε 70 mL νερό. Προστίθενται 5 mL φωσφορικού οξέος (H_3PO4) 85% και 10 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το όλο μίγμα αφήνεται σε επαναρροή για 10 h. Στη συνέχεια προστίθενται 16g θειικού λιθίου, 5 mL νερό και μια σταγόνα βρωμίου και ακολουθεί επαναρροή για 15 min. Αφήνεται προς ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και φέρεται σε όγκό 100 mL συμπληρώνοντας με νερό. Εξασθενή σύμπλοκα των φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέων με τις ακόλουθες μορφές σχηματίζονται στο διάλυμα:

  $3H_2O.\ P_2O_5.\ 13WO_3.\ 5MoO_3.\ 10H_2O$

  $3H_2O.\ P_2O_5.\ 14WO_3.\ 4MoO_3.\ 10H_2O$
- Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος και τυροσόλης
- Διάλυμα Na_2CO_3 35% (w/v)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL
- Σιφώνια των 20 mL.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου του Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος το οποίο και φωτομετρείται στα 725 nm.

Αναλυτική πορεία

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται διαδοχικά 3,5 mL νερό, 0,1 mL Folin-Ciocalteu και αναδεύουμε ισχυρά. Μετά από παραμονή 3 min προστίθενται 0,4 mL Na_2CO_3 35% (w/v) και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα, αφήνεται προς αντίδραση για μια ώρα και φωτομετρείται στα 725 nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα που περιέχουν από 1 έως 60 μg γαλλικό οξύ και τυροσόλη.

5.5 **Επίδραση πολικών λιποειδών ελαιολάδου στην έκκριση κυτταροκινών**

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Ειδικά σωληνάκια (*cluster tubes*) για τη φύλαξη των υπερκείμενων των κυττάρων.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37ºC.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής.
- Φυγόκεντρος.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Φρέσκο μέσο ανάπτυξής RPMI1640.
- Διάλυμα BSA 10% w.v. ελεύθερης λιπαρών οξέων και χαμηλής ενδοτοξίνης (Sigma): 1 g BSA αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm. Φυλάσσεται στους 4^oC.
- Φρέσκο μέσο χωρίς ορό (**SFM**: περιέχει 0,2 % w.v BSA, 2 mmol / L γλουταμίνη, 10^5 unit / L πενικιλίνη, 0,1g / L στρεπτομυκίνη, 2,5 x 10^{-3} g / L αμφοτερικίνη).

- Διάλυμα IL-1β: 5μg IL-1β αναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA-FFA ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1 μg/mL IL-1β.
- Πολικά λιποειδή ελαιολάδου (ΟΠΛ): εξατμίζονται σε αέριο άζωτο και στη συνέχεια αναδιαλύονται σε 50 μL DMSO, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 22,4 μg ΟΠΛ /mL.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

Αναλυτική πορεία

Τα HMCL κύτταρα καλλιεργούνται σε δοχεία 12 πηγαδιών όπως περιγράφηκε ανωτέρω στις παραγράφους *6.1-6.3*. Αφού τα κύτταρα συγχρονιστούν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για 24 ώρες, στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα εκπλένονται με PBS. Προστίθενται σε διάλυμα SFM, κατάλληλες ποσότητες είτε τ ων διαλυτών *PBS 0,1% BSA-FFA* και *DMSO* για IL-1β και πολικά λιποειδή ελαιολάδου αντίστοιχα (δείγματα αναφοράς), είτε IL-1β, είτε πολικά λιποειδή ελαιολάδου (*διαφορετικές ποσότητες*), είτε IL-1β και πολικά λιποειδή ελαιολάδου (*διαφορετικές ποσότητες*). Επιπλέον, δοκιμάστηκε και η διαδικασία της προεπώασης, όπου τα πολικά λιποειδή τέθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα πριν από διέγερση των κυττάρων με IL-1β. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού ανά πηγάδι καλλιέργειας ήταν 1 mL. Μετά από συγκεκριμένο χρόνο επώασης στον επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασίας 37°C, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g για να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα, χωρίστηκαν σε 3 μέρη σε ειδικά σωληνάκια και φυλάχτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους, όποτε και μετρήθηκε η συγκέντρωση IL-6 και MCP-1 με ανοσοενζυμικο προσδιορισμό (ELISA).

5.6 **Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της κυτταροκίνης IL-6**

Αντιδραστήρια – όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0.2408 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,05% v.v. σε Tween 20 Σε τελικό όγκο 500mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 250 μL Tween 20.
- Διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (reagent diluent): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1% w.v. σε BSA Σε τελικό όγκο 100 mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 1 g

BSA ειδικής καθαρότητας για ELISA και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm. Φυλάσσεται στους 4°C.

- Διάλυμα πυκνού θειικού οξέος: 37, 5N
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): Διάλυμα 2N H_2SO_4. Προστίθενται 26,6 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος σε 474 mL νερού.
- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών ειδική για ELISA
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml
- Σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml
- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5417C
- Φωτόμετρο Elisa reader Tecan Sunrise Remote F039300

Duoset Elisa kit (R-D systems) για ανθρώπινη IL-6, που περιλαμβάνει:

- Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος δέσμευσης (capture antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 360 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα IL-6 ποντικού. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 200 μg/ml.
- Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 36 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα IL-6 αίγας. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Συγκέντρωση 20 μg/ml.
- Διάλυμα αποθήκευσης πρότυπης IL-6: 1 φιαλίδιο περιέχει 15 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-6. Αναδιαλύεται σε 0,5 ml απεσταγμένο νερό. Συγκέντρωση 30 ng/ml.
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): 1 φιαλίδιο περιέχει 1 ml στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (*HRP, horseradish peroxidase*).
- Διάλυμα αντιδραστηρίου A: περιέχει διάλυμα H_2O_2
- Διάλυμα αντιδραστηρίου B: περιέχει διάλυμα τετραμεθυλοβενζινιδίνης
- Διάλυμα εργασίας αντισώματος δέσμευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml PBS προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος δέσμευσης.
- Διάλυμα εργασίας αντισώματος ανίχνευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος ανίχνευσης.
- Διάλυμα εργασίας στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/200 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,95 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 50 μL από το διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP).

- Πρότυπα διαλύματα IL-6: Προστίθενται 10 μL διαλύματος αποθήκευσης πρότυπης IL-6 σε 490 μL διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 600 pg/mL. Από το διάλυμα αυτό προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις 1:1 με τα εξής διαλύματα 300 – 150- 75 – 37,5 – 18,75 pg/mL.
- Διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution): Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλύματος αντιδραστηρίου Α και Β λίγο πριν την χρήση.

Αρχή της μεθόδου

Πραγματοποιείται δέσμευση του αντισώματος δέσμευσης για IL-6στα πηγάδια της πλάκας (96 well plate). Στις ειδικές για IL-6 θέσεις του αντισώματος δέσμευσης προσδένεται η περιεχόμενη IL-6 του δείγματος (υπερκείμενα κυττάρων), αλλά και η ανασυνδυασμένη IL-6 των πρότυπων διαλυμάτων. Στη συνέχεια το αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται στη δεσμευμένη με το αντίσωμα δέσμευσης IL-6. Στο αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται η υπεροξειδάση HRP για να καταλύσει την αντίδραση του H_2O_2 με την τετραμεθυλοβενζινιδίνη, που μας δίνει έγχρωμο προϊόν. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την 2N H_2SO_4 στα πηγάδια οπότε αποδίδει ένα τελικό κίτρινο χρωματισμό, η ένταση του οποίου φωτομετράται στα 450 nm. Παράλληλα πραγματοποιείται φωτομέτρηση και στα 620 nm όπου αφαιρείται από τη φωτομέτρηση στα 450 nm ώστε να διορθωθούν οι παρεμποδίσεις που προκύπτουν στην οπτική απορρόφηση από το υλικό της πλάκας. Η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που προκύπτει από τη φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων IL-6.

Αναλυτική πορεία

1. Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μl / πηγάδι διαλύματος εργασίας του αντισώματος δέσμευσης και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου και τη διάρκεια της νύχτας.
2. Το επόμενο πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
3. Προστίθενται 300 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης / πηγάδι για 1 ώρα.
4. Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
5. Προστίθενται 100 μl είτε από το διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (*τυφλός προσδιορισμός*) είτε από τα πρότυπα διαλύματα IL-6 είτε από τα δείγματα (*υπερκείμενα κυττάρων*) στα αντίστοιχα πηγάδια. Η τοποθέτηση των προτύπων και των δειγμάτων γίνεται εις διπλούν. Πραγματοποιείται επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
7. Προστίθενται 100 μl διαλύματος εργασίας αντισώματος ανίχνευσης ανά πηγάδι και επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
9. Προστίθενται 100 μl διαλύματος στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP) ανά πηγάδι και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
10. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
11. Προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος ανά πηγάδι και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος.
12. Προστίθενται 50 μl διαλύματος τερματισμού ανά πηγάδι, Πραγματοποιείται ανάδευση και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 450 nm και στα 620 nm.

5.7 **Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) της χημειοκίνης MCP-1**

Αντιδραστήρια – όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0.2408 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,05% v.v. σε Tween 20 Σε τελικό όγκο 500mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 250 μL Tween 20.
- Διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (reagent diluent): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1% w.v. σε BSA Σε τελικό όγκο 100 mL διαλύματος PBS με pH 7,4 προστίθενται 1 g BSA ειδικής καθαρότητας για ELISA και αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρων 0,2 μm. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα πυκνού θειικού οξέος: 37, 5N
- Διάλυμα τερματισμού (stop solution): Διάλυμα 2N H_2SO_4. Προστίθενται 26,6 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος σε 474 mL νερού.

- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών ειδική για ELISA
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml
- Σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml
- Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5417C
- Φωτόμετρο Elisa reader Tecan Sunrise Remote F039300

Duoset Elisa kit (R-D systems) για ανθρώπινη MCP-1, που περιλαμβάνει:

- Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος δέσμευσης (capture antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 180 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα MCP-1 ποντικού. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20^{o}C. Συγκέντρωση 100 μg/ml.
- Διάλυμα αποθήκευσης αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody): 1 φιαλίδιο περιέχει 18 μg μονοκλωνικό αντί-ανθρώπινο αντίσωμα MCP-1 αίγας. Αναδιαλύεται σε 1,8 ml PBS, χωρίζεται και φυλάσσεται στους -20^{o}C. Συγκέντρωση 10 μg/ml.
- Διάλυμα αποθήκευσης πρότυπου MCP-1: 1 φιαλίδιο περιέχει 35 ng ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IL-6. Αναδιαλύεται σε 0,5 ml απεσταγμένο νερό. Συγκέντρωση 70 ng/ml.
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): 1 φιαλίδιο περιέχει 1 ml στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (*HRP, horseradish peroxidase*).
- Διάλυμα αντιδραστηρίου Α: περιέχει διάλυμα H_2O_2
- Διάλυμα αντιδραστηρίου Β: περιέχει διάλυμα τετραμεθυλοβενζινιδίνης
- Διάλυμα εργασίας αντισώματος δέσμευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml PBS προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος δέσμευσης.
- Διάλυμα εργασίας αντισώματος ανίχνευσης: Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/100 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,9 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 100 μL από το διάλυμα αποθήκευσης του αντισώματος ανίχνευσης.
- Διάλυμα εργασίας στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP): Παρασκευάζεται διάλυμα αραίωσης 1/200 από το διάλυμα αποθήκευσης. Σε 9,95 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης προστίθενται 50 μL από το διάλυμα στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP).
- Πρότυπα διαλύματα IL-6: Προστίθενται 50 μL διαλύματος αποθήκευσης πρότυπου MCP-1 σε 450 μL διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1000 pg/mL. Από το διάλυμα αυτό προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις 1:1 με τα εξής διαλύματα 500 – 250 – 125 – 72,5 – 36,25 pg/mL.
- Διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution): Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι διαλύματος αντιδραστηρίου Α και Β λίγο πριν την χρήση.

Αρχή της μεθόδου

Πραγματοποιείται δέσμευση του αντισώματος δέσμευσης για MCP-1 στα πηγάδια της πλάκας (96 well plate). Στις ειδικές για MCP-1 θέσεις του αντισώματος δέσμευσης προσδένεται ο περιεχόμενος MCP-1 του δείγματος (υπερκείμενα κυττάρων), αλλά και ο ανασυνδυασμένος MCP-1 των πρότυπων διαλυμάτων. Στη συνέχεια το αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται στη δεσμευμένη με το αντίσωμα δέσμευσης MCP-1. Στο αντίσωμα ανίχνευσης δεσμεύεται η υπεροξειδάση HRP για να καταλύσει την αντίδραση του H_2O_2 με την τετραμεθυλοβενζινιδίνη, που μας δίνει έγχρωμο προϊόν. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την 2N H_2SO_4 στα πηγάδια οπότε αποδίδει ένα τελικό κίτρινο χρωματισμό, η ένταση του οποίου φωτομετράται στα 450 nm. Παράλληλα πραγματοποιείται φωτομέτρηση και στα 620 nm όπου αφαιρείται από τη φωτομέτρηση στα 450 nm ώστε να διορθωθούν οι παρεμποδίσεις που προκύπτουν στην οπτική απορρόφηση από το υλικό της πλάκας. Η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα προσδιορίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που προκύπτει από τη φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων MCP-1.

Αναλυτική πορεία

1. Προετοιμάζεται η πλάκα των 96 πηγαδιών για την υποδοχή των δειγμάτων, με προσθήκη 100 μl / πηγάδι διαλύματος εργασίας του αντισώματος δέσμευσης και αφήνεται σκεπασμένο σε θερμοκρασία δωματίου και τη διάρκεια της νύχτας.
2. Το επόμενο πρωί ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
3. Προστίθενται 300 ml διαλύματος αντιδραστηρίου αραίωσης / πηγάδι για 1 ώρα.
4. Μετά από 1 ώρα, ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
5. Προστίθενται 100 μl είτε από το διάλυμα αντιδραστηρίου αραίωσης (*τυφλός προσδιορισμός*) είτε από τα πρότυπα διαλύματα MCP-1 είτε από τα δείγματα (*υπερκείμενα κυττάρων*) στα αντίστοιχα πηγάδια. Η τοποθέτηση των προτύπων και των δειγμάτων γίνεται εις διπλούν. Πραγματοποιείται επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
7. Προστίθενται 100 μl διαλύματος εργασίας αντισώματος ανίχνευσης ανά πηγάδι και επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.

9. Προστίθενται 100 μl διαλύματος στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση χρένου (HRP) ανά πηγάδι και τα αφήνουμε να επωαστούν για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος.
10. Ξεπλένουμε τα πηγάδια με 200 μl wash buffer ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Απομακρύνουμε τυχόν εναπομένον διάλυμα από τα πηγάδια αναποδογυρίζοντας την πλάκα πάνω σε χαρτί.
11. Προστίθενται 100 μl διαλύματος υποστρώματος ανά πηγάδι και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό μέρος.
12. Προστίθενται 50 μl διαλύματος τερματισμού ανά πηγάδι, Πραγματοποιείται ανάδευση και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 450 nm και στα 620 nm.

5.8 **Παραλαβή πρωτεϊνών από τα κύτταρα**

Αντιδραστήρια – όργανα

- Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 12 πηγαδιών (12 well plates)
- Πιπέτες 200, 1000 ml
- Αποστειρωμένα tips μπλε και κίτρινα
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37^{o}C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής Bio Air aura A4.
- Φυγόκεντροι Eppendorf Centrifuge 5417C και Eppendorf Centrifuge 5810R.
- Διάλυμα NaOH 0,5N σε νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

Αναλυτική πορεία

Αφού γίνει συλλογή των υπερκειμένων των κυττάρων μετά το πέρας του χρόνου επώασης στις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος, ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS. Προστίθεται 1 ml διαλύματος NaOH 0,5N/ πηγάδι για λύση των κυττάρων και την παραλαβή των πρωτεϊνών. Τα κύτταρα τίθενται στον επωαστικό θάλαμο για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, παραλαμβάνεται το περιεχόμενο των πηγαδιών, το οποίο και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να προσδιοριστεί η περιεχόμενη πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford.

5.9 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα αποθήκευσης: αλβουμίνη βοδινού ορού (*BSA*) 100 μg/ml : αραιώνεται σε νερό με αναλογία ¼, οπότε προκύπτει διάλυμα 25 μg/ml BSA
- Προκατασκευασμένο αντιδραστήριο Bradford (*Sigma*) το οποίο είναι διάλυμα Brilliant Blue G και φωσφορικού οξέος σε μεθανόλη.
- Απεσταγμένο νερό
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλάκα (plate) 96 πηγαδιών για φωτομέτρηση των δειγμάτων
- Φωτόμετρο Elisa Reader Tecan Sunrise Remote F039300

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford περιλαμβάνει την τοποθέτηση της όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G στο διάλυμα των πρωτεϊνών. Η χρωστική συμπλέκεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465, καφέ χρώμα, σε 595 nm, μπλε χρώμα. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιείται σε 5 λεπτά και είναι σταθερό για 45 λεπτά. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 μg σε 10 gr πρωτεΐνης, ως προς BSA.

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 2,5-25 μg / mL. Παρασκευάζεται διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό, με προσθήκη 10 μl δείγματος (*προηγείται έντονη ανάδευση στον κυκλοαναδευτήρα*) σε 190 μl απεσταγμένου νερού ανά πηγάδι. Τα διαλύματα των προτύπων και των αγνώστων δειγμάτων πρέπει να έχουν τελικό όγκο 0,2 mL. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την πρότυπη καμπύλη αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

μg/ml	**μl (25 μg/ml)**	**H_2O**
0	-	200
2,5	20	180
5	40	160
7,5	60	140
10	80	120
15	120	80
20	160	40
25	200	-

Προστίθεται 50 μl ανά πηγάδι αντιδραστηρίου Bradford και μετά από παραμονή 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, μετράται η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων στα 630 nm. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.10 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το *GenElute Mammalian Total RNA Kit* της Sigma.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Διάλυμα λύσης των κυττάρων* (*Lysis solution*)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη*
- Διάλυμα έκπλυσης 1*(*Wash 1*)
- Διάλυμα έκπλυσης 2 συμπυκνωμένο* (*Wash 2*)
- Διάλυμα έκλουσης* (*Elution solution*)
- Στήλες σιλικόνης φιλτραρίσματος σε σωληνάκις των 2ml RNA free (*μπλε στήλη*)*
- Στήλες σιλικόνης δέσμευσης RNA σε σωληνάκις 2ml RNA free (*κόκκινη στήλη*)*
- Σωληνάκια συλλογής, RNA free 2 ml*
- Αιθανόλη 70%
- Σύριγγες μικρές (10ml) και βελόνες
- Universal των 15ml, αποστειρωμένο
- Φυγόκεντρος Beckman Avanti 30 Centrifuge
- Φυγόκεντρος για μικρούς χρόνους Eppendorf Centrifuge 5417C
- Πάγος

Αναλυτική πορεία

Η απομόνωση RNA γινόταν σε κύτταρα που καλλιεργούνταν σε flask των 75cm^2 ή των 25cm^2 με ή χωρίς την παρουσία παραγόντων, ενώ τα κύτταρα κάλυπταν το 100% της επιφάνειας του flask. Πριν την έναρξη της απομόνωσης RNA, έγινε η προετοιμασία του διαλύματος αποδιάταξης των κυττάρων. Για την κάθε απομόνωση RNA αναμίχθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα universal των 15 ml, 500 μl Lysis solution/ 5 μl 2-μερκαπτοαιθανόλη. Η παρασκευή του αποδιατακτικού διαλύματος γινόταν σε απαγωγό αερίων, λόγω της τοξικότητας της 2-μερκαπτοαιθανόλης και ακολουθούσε ανάδευση του διαλύματος σε vortex. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του flask και την παραλαβή τους σαν ίζημα με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min,

* περιέχονταν στο kit

στους 25ο C προστίθονταν στο ίζημα των κυττάρων 500 ml αποδιατακτικού διαλύματος (*Lysis solution/ 2-μερκαπτοαιθανόλης*). Η δράση του θειοκυανικού άλατος, που περιέχεται στο Lysis solution προκαλεί το σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ η μερκαπτοαιθανόλη συνεργεί στη δράση του και τα δύο απενεργοποιούν τις RNAάσες.

Οι RNAάσες είναι άφθονες και πολύ σταθερές πρωτεΐνες, που μπορούν να διασπάσουν το RNA και είναι δύσκολο να απενεργοποιηθούν. Γι΄ αυτό το λόγο, πρέπει να δοθεί προσοχή στο να αποφευχθεί ακούσια εισαγωγή RNAάσες καθ΄ όλη τη διαδικασία. Η πιο κοινή πηγή μόλυνσης είναι τα χέρια του ερευνητή καθώς και τα βακτήρια και οι μύκητες (*μούχλα*) που μπορεί να είναι παρόντα στα σωματίδια σκόνης του αέρα. Γι' αυτό, πέρα από τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων των RNAασών, είναι πολύ σημαντικό η απομόνωση του RNA να γίνεται σε καθαρό και κλειστό περιβάλλον και να γίνεται συχνή αλλαγή γαντιών. Το δέρμα πρέπει να είναι καλυμμένο και δεν θα πρέπει ο ερευνητής δεν θα πρέπει να φυσάει πάνω από το RNA. Επίσης, θα πρέπει τα καπάκια των σωληνακίων και των σωλήνων να ανοίγονται στιγμιαία και να κλείνονται όταν δεν χρησιμοποιούνται.

Το ίζημα των κυττάρων με το αποδιατακτικό διάλυμα αναμιγνύονταν με τη βοήθεια μικρής σύριγγας, έτσι ώστε να διαχωριστούν τα συσσωματώματα των κυττάρων και να δράσει πιο αποτελεσματικά το αποδιατακτικό διάλυμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρονταν σε στήλη φιλτραρίσματος (*μπλε*) μέσα σε σωληνάκια και φυγοκεντρούνταν για 2 min στις 13.000 στροφές στους 4οC. Οι στήλες θα δεσμεύσουν τα κυτταρικά υπολείμματα, το DNA και το RNA με διάφορες προσμίξεις πρωτεϊνών και DNA, που δεν έχουν απομακρυνθεί ακόμα θα περάσουν μέσα στο σωληνάκι.

Μετά το τέλος της πρώτης φυγοκέντρησης πετάμε τις στήλες. Προσθέτουμε στο διήθημα 500 μl, 70% αιθανόλης και αναδεύουμε πολύ καλά με συσκευή vortex. Η αιθανόλη βοηθά στην αποδιάταξη προσμίξεων του RNA. Μεταφέρεται το διάλυμα αιθανόλης σε στήλες δέσμευσης του RNA (κόκκινες στήλες) μέσα σε σωληνάκια και φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα 14.000 στροφές για 15 sec. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση συγκρατείται η στήλη και αποβάλλεται το διήθημα. Το RNA έχει δεσμευτεί πάνω στη στήλη.

Για να απομακρυνθεί οποιαδήποτε μόριο βρίσκεται πάνω στη στήλη πλην του RNA, ξεπλένεται με το Wash 1 διάλυμα. Προστίθενται 500μl διάλυμα έκπλησης Wash 1 και φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές για 15 sec. Μετά την τρίτη φυγοκέντρηση συγκρατείται η στήλη και τοποθετείται σε νέα σωληνάκια RNA free.

Προσθέτουμε στη στήλη 500 μl Wash 2 διάλυμα και φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 15 sec. Επειδή το Wash 2 διάλυμα είναι συμπυκνωμένο, πριν χρησιμοποιηθεί, αραιώνεται με προσθήκη αιθανόλης. Κατά τη χρήση του Wash 2 κλείνουμε το καπάκι γρήγορα για να μην εξατμιστεί η περιεχόμενη αιθανόλη. Μετά την τέταρτη φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το διήθημα, προσθέτουμε στη στήλη εκ νέου 500 μl Wash 2 διάλυμα και φυγοκεντρούμε στις 13.000 στροφές για 2 min.

Μετά την πέμπτη φυγοκέντρηση πετάμε το διήθημα και προσθέτουμε στις στήλες 40 –50 μl διάλυμα έκλουσης (*elution solution*) και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13.000 στροφές, αναλόγως με το πόσο πυκνό θέλουμε να προκύψει το διάλυμα RNA σε RNA free νερό ή DEPC νερό, που θα παραλάβουμε στο τέλος. Το διήθημα αποτελεί το RNA που θα αποθηκευθεί. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο αυτό, για να καθαρίσουμε τη στήλη από όλο το RNA έχει συγκρατήσει, προσθέτοντας αυτή τη φορά 30 μl διαλύματος έκλουσης (*elution solution*). Στο τέλος της έβδομης φυγοκέντρησης, πετάμε την στήλη και αποθηκεύουμε το RNA στους –80^{o} C.

Ιδιαίτερα σημαντικό στην όλη διαδικασία είναι ο σύντομος χρόνος απομόνωσης και η διατήρηση του RNA σε χαμηλή θερμοκρασία, έτσι ώστε να περιοριστεί όσο το δυνατό περισσότερο η δράση των RNAασών και η διάσπαση του RNA, λόγω αύξησης της ενέργειας των δεσμών του, το οποίο αναστέλλεται με τη χαμηλή θερμοκρασία. Η διατήρηση και μεταφορά του RNA μέσα σε πάγο, η φυγοκέντρηση του σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, που βρίσκεται στους 4^{o} C, σε συνδυασμό με την γρήγορο χειρισμό συμβάλουν στη ακεραιότητα του RNA, που θα παραλάβουμε τελικά.

5.11. Ηλεκτροφόρηση του RNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (Gibco).
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50xTAE.(0,04 M Tris, 0,02 M βορικό οξύ, 0,5 M EDTA pH 8,5) Διαλύονται 242 gr Tris, 57,1 gr βορικό οξύ και 100 ml EDTA σε αποσταγμένο νερό και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L σε ογκομετρική φιάλη.
- Φορμαλδεΰδη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma) 10 mg/mL.
- Συσκευές ηλεκτροφόρησης EC 135 Apparatus Corporation
- Συσκευές παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσκευές εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδεδεμένες με κάμερα UVP High Perfomance ultra violet transilluminator UVP

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 2 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE, 3% φορμαλδεΰδη, που περιέχει 5 μg / mL βρωμιούχο αιθίδιο. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE. υπό σταθερή τάση 100 V για περίπου 40 λεπτά.. Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο και είναι δυνατό κατά την παραμονή του στην πηκτή να σχηματίσει ενδομοριακά ζευγάρια βάσεων. Με σκοπό να αποφευχθεί ο σχηματισμός ζευγαριών βάσεων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης του RNA είναι απαραίτητη η παρουσία ενός αποδιατακτικού

παράγοντα, όπως η φορμαλδεΰδη, που θα κρατήσει το RNA μονόκλωνο. Οι ζώνες του RNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα μόρια του DNA, ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πηκτή καταγράφεται σε αρχείο στον υπολογιστή και τυπώνεται σε φιλμ.

5.12 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης mRNA του LDL υποδοχέα

5.12.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA

Υλικά-Αντιδραστήρια

- DEPC νερό : 1000ml H_2O + 1ml DEPC
- Φωτόμετρο

Αναλυτική πορεία

1. Αναμειγνύω 500ml DEPC νερό με 2μl δείγματος RNA (αναλογία 1:250)
2. Φωτομετρούμε το RNA στα 260nm
3. Φωτομετρούμε και στα 280nm, στα οποία ανιχνεύω τις πρωτεΐνες και το DNA.
4. Υπολογίζουμε το λόγο $A_{260}/A_{280,}$ ο οποίος πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5 για να θεωρήσω ότι το RNA που έχω απομονώσει είναι καθαρό.
5. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του RNA από τον τύπο:

$$C= A_{260}x40x250$$ (40: ο συντελεστής για το RNA)

5.12.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Αλυσιδωτή αντίδραση (PCR) πολυμεράσης

Αντιδραστήρια – Όργανα

Όλα τα υλικά προμηθεύονται από την Roche Molecular systems Inc. (*Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey USA*)

GeneAmp RNA PCR

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 x PCR 500 mmol / L KCl, 100 mmol / L Tris/HCl. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- Διάλυμα $MgCl_2$ 25 mmol / L. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- Σειρά διαλυμάτων τριφωσφορικών δεόξυνουκεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mmol / L. Φυλάσσονται στους – 20°C.

- Διάλυμα εξαμερών εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων (Random hexamers) 50 μmol / L. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- Διάλυμα αναστολέα RNAασών 20 Unit / μL. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- MuLV αντίστροφη μεταγραφάση, 50 Unit / μL. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- AmpliTaq DNA πολυμεράση 5 U/μl. Φυλάσσεται στους – 20°C.
- Διαλύματα εναρκτήριων μορίων 100 μM το καθένα συμπληρωματικά του γονιδίου του υποδοχέα της LDL, του εκκαθαριστή υποδοχέα (SCrA), και της β-ακτίνης. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους –20°C. Οι αλληλουχίες των βάσεων είναι οι εξής :

cDNA	Πρόσθιο εναρκτήριο μόριο	Ανάστροφο εναρκτήριο μόριο
LDLr	5' CAATGTCTCACCAAGCTCTG	3' TCTGTCTCGAGGGGTAGCTG
β-ακτίνη	5'ATGGATGATGATATGGCCGCG	3'CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGA

- Διαιθυλοπυροανθρακικό οξύ (DEPC).
- Νερό ελεύθερο RNAase: απεσταγμένο νερό επεξεργάζεται με 0.1% DEPC στους 37°C όλη τη νύχτα και μετά αποστειρώνεται.
- Tips αποστειρωμένα και ελεύθερα από RNάσες και DNάσες.
- Θερμοανθεκτικοί σωλήνες τύπου eppedorf.
- Συσκευή PCR Applied Biosystems 2720 Thermal cycle

Αρχή μεθόδου.

Η θερμοσταθερή πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην βασική διαδικασία PCR χρειάζεται σαν εκμαγείο DNA. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η μεθοδολογία της τεχνικής PCR στην μελέτη του RNA πρέπει πρώτα αυτό να μετατραπεί σε cDNA για να παρέχει το κατάλληλο εκμαγείο για την πολυμεράση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (*reverse transcription, RT*) και ως εκ τούτου και η ονομασία RT-PCR. Με την PCR επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μιας περιοχής DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο τμήματα γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Χρησιμοποιούνται δυο εναρκτήρια μόρια γνωστής αλληλουχίας βάσεων (*primers*), τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα άκρα της περιοχής DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Διαχωρίζονται οι δυο κλώνοι του DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο με θέρμανση και συνδέονται τα εναρκτήρια μόρια στις συμπληρωματικές περιοχές υπό ψύξη. Στη συνέχεια, παρουσία των τριφωσφορικών δεοξυνουκεοτιδίων και μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμερασής του DNA βιοσυντίθενται νέες αλυσίδες DNA. Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται για πολλές φορές και αποτελεί έναν κύκλο της PCR. Από τον τρίτο κύκλο σχηματίζονται διπλές αλυσίδες DNA με μήκος αντίστοιχο της απόστασής μεταξύ των δυο εναρκτήριων μορίων.

Αναλυτική πορεία

Ολικό RNA (1μg) χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για RT-PCR. Η αντίδραση της RT γίνεται σε μίγμα με τελικό όγκο 20 μL που περιέχει 50 mmol / L KCl, 10mmol / L Tris/HCl, 5 mmol / L $MgCl_2$, dNTPs: 1 mmol / L, 2.5 μmol / L Random hexamers, 20 U αναστολέα RNAασών, 50 U MuLV αντίστροφη μεταγραφάση και DEPC νερό. Η αντίδραση γίνεται για 30 λεπτά στους 42°C και έπειτα 5 λεπτά στους 99 °C. Οι ακριβείς ποσότητες για την παρασκευή του μίγματος για το RT δίνονται παρακάτω:

Αντιδραστήρια	**Ποσότητα / σωλήνα**
5mM $MgCl_2$	4μl
10 x Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	2μl
dATP	2μl
dCTP	2μl
dGTP	2μl
dTTP	2μl
Διάλυμα εξαμερών εναρκτήριων μορίων (*Random hexamers*)	1μl
Διάλυμα αναστολέα RNAασών	1μl
MuLV αντίστροφη μεταγραφάση	1μl
DEPC H_20	1μl
Δείγμα ολικού RNA	2μl

Μετά την αντίδρασή της RT, το μίγμα χρησιμοποιήθηκε για πολλαπλασιασμό με PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Οι ακριβείς ποσότητες και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στους πίνακες :

Αντιδραστήριο	**LDLr**	**β-ακτίνη**
Ρυθμιστικό διάλυμα 10xPCR	2 μL	2 μL
Διάλυμα $MgCl_2$	1 μL	1 μL
dH_2O	16.375 μL	16.375 μL
Πρόσθιο εναρκτήριο μόριο	0.25 μL	0.25 μL
Ανάστροφο εναρκτήριο μόριο	0.25 μL	0.25 μL
Taq DNA πολυμεράση	0.125 μL	0.125 μL

Στάδια		LDLr	β-ακτίνη
1	*Αρχικό στάδιο*	1,5min, 95°C	1,3 min, 95°C
2	*Στάδιο διαχωρισμού των κλώνων*	30 sec, 95°C,	30 sec, 95°C
3	*Στάδιο σύνδεσης εναρκτήριων μορίων*	30 sec, 55°C,	60 sec, 55°C
4	*Στάδιο επέκτασης εναρκτήριων μορίων*	30 sec, 72°C	60 sec, 72°C.
5	*Επανάληψη σταδίων 2, 3,4 για*	25 φορές	25 φορές
6	*Τελικό στάδιο*	7 min, 72°C	7 min, 72°C
7	*Παραμονή*	4°C	4°C

5.12.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αγαρόζη (Gibco).
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 x TBE.(0.89 M Tris, 0.89 M βορικό οξύ, 20 mM EDTA pH 8.3) Διαλύονται 108 gr Tris, 55 gr βορικό οξύ και 20 mM EDTA σε αποσταγμένο νερό και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L σε ογκομετρική φιάλη.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma) 10 mg/mL.
- Διάλυμα δείκτη μεγεθών DNA
- Συσκευές ηλεκτροφόρησης EC 135 Apparatus Corporation
- Συσκευές παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσκευές εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδεδεμένες με κάμερα UVP High Perfomance ultra violet transilluminator UVP

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 2 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 x TBE που περιέχει 5 μg / mL βρωμιούχο αιθίδιο. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 0,5 x TBE. υπό σταθερή τάση 100 V για περίπου 40 λεπτά.. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση διαλύματος δείκτη μεγεθών DNA για των υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα μόρια του DNA, ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πηκτή καταγράφεται σε αρχείο στον υπολογιστή και τυπώνεται σε φιλμ.

5.12.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων RT-PCR.

Η μεταβολή στα επίπεδα του cDNA των γονιδίων, μετά τη διέγερση των κυττάρων με IL-1β μπορεί να υπολογιστεί ημιποσοτικά. Γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης και η εικόνα της πηκτής γίνεται εμφανής με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Καταγράφεται η εικόνα της πηκτής σε αρχείο υπολογιστή και οι ταινίες υπόκεινται σε πυκνομετρική σάρωση με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Gel-pro 3.1. Η τιμή της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάμε συγκρίνεται με την τιμή της έντασης των ταινιών ενός γονιδίου βασικής λειτουργίας, όπως της β-ακτίνης. Η έκφραση των γονιδίων βασικής λειτουργίας παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα και συνεπώς αυτά χρησιμοποιούνται για να κανονικοποιηθούν οι τιμές της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάμε, εξαλείφοντας έτσι σφάλματα στους υπολογισμούς λόγω της διαφορετικής απόδοσης σε cDNA κατά την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής από δείγμα σε δείγμα. Τελικά, γίνεται σύγκριση του λόγου της τιμής της έντασης της ταινίας του γονιδίου που μελετάμε προς την τιμή της έντασης της ταινίας της β-ακτίνης για τα δείγματα διεγερμένων κυττάρων με τον αντίστοιχο λόγο νια το δείγμα μη διεγερμένων κυττάρων (*δείγμα αναφοράς*).

5.13 Στατιστική

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με εφαρμογή t-test για ανεξάρτητα δείγματα (Independent Samples t-test) με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS 13.0. Όλα τα ζεύγη των μεταβλητών εξετάστηκαν με την υπόθεση ίσων διακυμάνσεων για μη βιολογικό δείγμα. Διαφορές μεταξύ των δεδομένων θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0,05$).

Κεφάλαιο 6ο

Αποτελέσματα

Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στις λειτουργίες των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων

Στα πειράματα που παρατίθενται χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κύτταρων. Ο ρόλος τους, μεταξύ άλλων, είναι να στηρίζουν δομικά το σπείραμα και το νεφρικό λοβό, να αναγεννούν και να αλλάζουν τη σύσταση της μεσαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας, να χειρίζονται μακρομόρια όπως λιποειδή, ανοσοσυμπλέγματα και τα προϊόντα αυξημένης γλυκοζυλίωσης, αλλά και να αποτελούν πηγή αγγειοδραστικών παραγόντων, προσταγλαδινών, θρομβοξανών, λευκοτριενών, PAF, NO, χημειοκινών και παραγόντων ανάπτυξης [72].

Όπως προαναφέρθηκε, η IL-1β διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς πρόκλησης νεφρικής βλάβης. Σε συνθήκες σπειραματονεφρίτιδας, ενισχύει αφενός τη διαδικασία τραυματισμού του σπειράματος από τα φλεγμονώδη κύτταρα της κυκλοφορίας και τα κύτταρα του σπειράματος, που απελευθερώνουν πρωτεάσες, χημειοτακτικές ουσίες, δραστικά λιποειδή, οξειδωτικές ουσίες και μόρια αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης [79-81]. Αφετέρου, συμμετέχει στην ενεργοποίηση των σπειραματικών κυττάρων, οπότε οδηγεί σε υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων, φαινοτυπικές μεταβολές αυτών και υπερπαραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας [79-81]. Δεδομένου του ότι κατέχει και προθρομβωτικές ιδιότητες, συνεισφέρει στο σχηματισμό σπειραματικών θρόμβων. Η απελευθέρωση IL-1 ή TNF-α, χημειοκινών (π.χ. MCP-1) και αυξητικών παραγόντων από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του σπειράματος, ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια, έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων στο σπείραμα και την ενεργοποίηση των μεσαγγειακών κυττάρων [81, 92]. Τελικό στάδιο της φλεγμονώδους διαδικασίας αυτής αποτελεί η σκλήρυνση του σπειράματος και η απώλεια διηθητικής επιφάνειας.

Μελέτες υποδεικνύουν πως οι κυτταροκίνες IL-1 και IL-6 αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους κατά τη φλεγμονώδη εξεργασία. Η IL-1 φαίνεται να διεγείρει την έκκριση της IL-6, η οποία έχει τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ενώ δρα και ως αυξητικός παράγοντας για τα νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα [153, 155]. Αφετέρου, τα μεσαγγειακά κύτταρα εκκρίνουν MCP-1 σε απάντηση της διέγερσής τους με παράγοντες όπως η IL-1, η IL-6, και η IL-8. Η κυριότερη βιολογική δράση του MCP-1 φαίνεται να είναι η προσέλκυση των μονοκυττάρων και άλλων μονοπύρηνων κυττάρων στην εστία της φλεγμονής [202]. Οι επιδράσεις του MCP-1 στα μονοκύτταρα περιλαμβάνουν χημειοτακτισμό, προσκόλληση, φαγοκύτωση και ενδοκυτταρική εκκαθάριση.

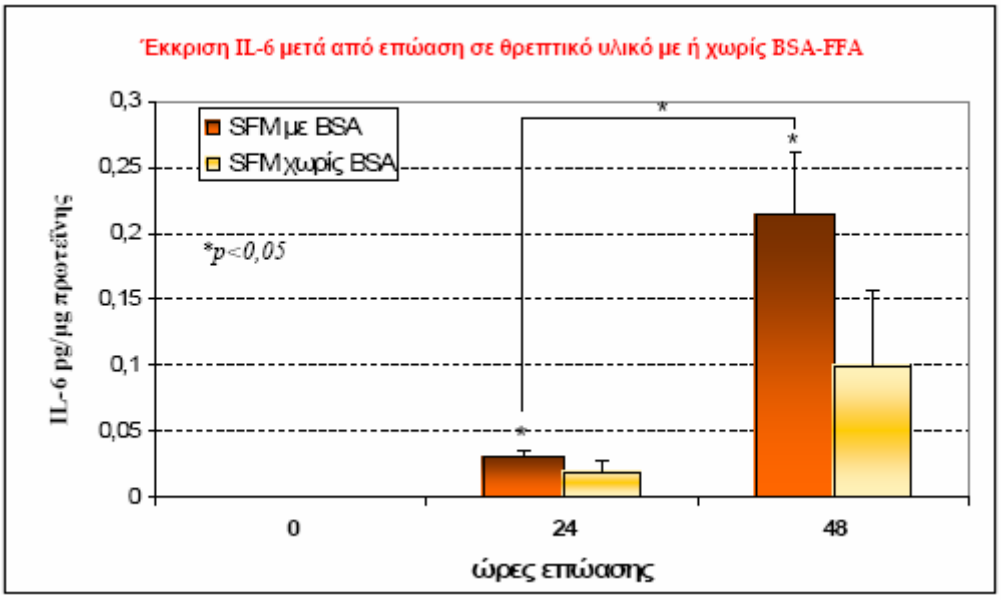
Δεδομένης της ευεργετικής επίδρασης του ελαιολάδου στον περιορισμό της προόδου της αθηρωματικής διαδικασίας, αλλά και της ομοιότητας της αθηροσκλήρυνσης με τη σπειραματοσκλήρυνση, εξετάστηκε η επίδραση εκχυλίσματος πολικών λιποειδών ελαιολάδου στην

έκκριση IL-6 και MCP-1 από κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων, ενεργοποιημένων από κατάλληλη ποσότητα IL-1β.

6.1 Μελέτη της επίδρασης παραγόντων διέγερσης στα μεσαγγειακά κύτταρα

6.1.1 Επίδραση της BSA-FFA στην έκκριση των βασικών επιπέδων της κυτταροκίνης IL-6

Το θρεπτικό υλικό με το οποίο συνήθως πραγματοποιείται το πείραμα, είναι θρεπτικό χωρίς ορό (SFM), που περιέχει BSA-FFA 0,2% w.v. Με σκοπό να μελετήσουμε εάν η παρουσία της BSA-FFA επηρεάζει τα βασικά επίπεδα της έκκρισής της κυτταροκίνης IL-6, επωάστηκαν τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό SFM με ή χωρίς BSA-FFA. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM), το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM, για 24 ώρες τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM που είτε περιέχει BSA-FFA είτε όχι, και επωάζονται για διαφορετικές χρονικές στιγμές (0-24-48 ώρες). Στο τέλος του κάθε χρόνου επώασης συλλέγεται το υπερκείμενο των κύτταρων και φυγοκεντρείται για 5 min, στα 500xg. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης φυλάγεται στους –80°C. Στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.



Διάγραμμα 6.1 Επίδραση της BSA-FFA στη βασική έκκριση της IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα.

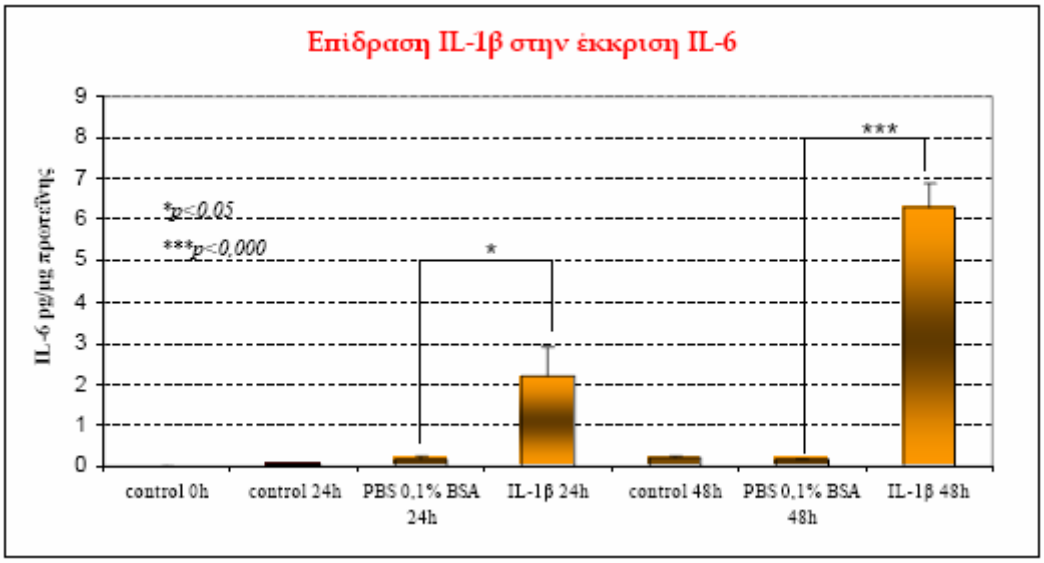
Τα κύτταρα μετά το συγχρονισμό τους με SFM με BSA-FFA για 24 ώρες, επωάζονται σε SFM με ή χωρίς 0,2% w/v BSA-FFA για 0, 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης). **p*<0,05 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (0 ώρες επώασης).

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.1 υποδεικνύουν πως η επώαση των κυττάρων με SFM παρουσία BSA αυξάνει στατιστικά σημαντικά την εκκρινόμενη IL-6 στις 24 (p=0,009) και στις 48 ώρες (p=0,024), σε αντίθεση με την αντίστοιχη με SFM χωρίς BSA. Δεν παρουσιάζεται στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των SFM με/ χωρίς BSA τόσο στις 24 (p=0,218) όσο και στις 48 ώρες (p=0,161). Επιλέγεται τελικά η χρήση BSA-FFA στο SFM, επειδή συνεισφέρει στη σταθερότητα της κυτταροκαλλιέργειας.

6.1.2 Επιλογή του διεγέρτη για την έκκριση της κυτταροκίνης IL-6

Με σκοπό να βρεθεί ο κατάλληλος διεγέρτης για την πρόκληση της παραγωγής της κυτταροκίνης IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, εξετάσθηκε η επίδραση των προφλεγμονωδών παραγόντων IL-1β, LPS, και PAF. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία κάποιου διεγέρτη (*IL-1 ή LPS ή PAF*). Συγκεκριμένα, χρημοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση διαλύματα: (**α**) 10 ng/ml IL-1β διαλυμένη σε *P*BS 0,1% BSA-FFA, (**β**) 0,1 mg/ml L*P*S διαλυμένος σε νερό ή (**γ**) *P*AF 10^{-6} M διαλυμένος σε BSA-FFA 2,5 mg/ml και επωάζονται για διαφορετικές χρονικές στιγμές (*0-24-48 ώρες*). Σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναφοράς παρουσία μόνο του διαλύτη του κάθε διεγέρτη στην έκκριση της κυτταροκίνης IL-6. Στο τέλος κάθε χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

Τα αποτελέσματα της έκκρισης της IL-6 μετά από διέγερση με IL-1β φαίνονται στο διάγραμμα 6.2.

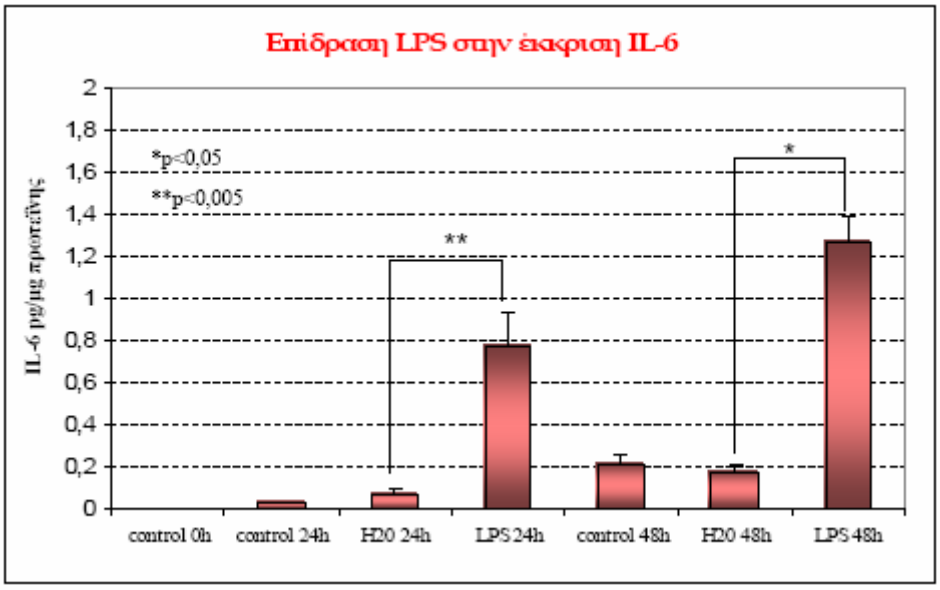


Διάγραμμα 6.2 Επίδραση της IL-1β στην έκκριση της IL-6 σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS παρουσία ή απουσία 10 ng/ml IL-1β για 0, 24 και 48 ώρες. Συγκεκριμένα (α) χωρίς προσθήκη IL-1β ή του διαλύτη της, (β) με προσθήκη του διαλύτη της *P*BS 0,1% BSA-FFA και (γ) με προσθήκη IL-1β. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης).

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.2 υποδεικνύουν ότι ο διαλύτης *P*BS 0,1% BSA-FFA δεν επηρεάζει την έκκριση της IL-6 τόσο στις 24 ώρες (p=0,138), όσο και στις 48 ώρες (p=0,276). Η αύξηση της έκκρισης της IL-6 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (περιέχει το διαλύτη της IL-1β) ύστερα από ενεργοποίηση με IL-1β, τόσο στις 24 ώρες (p=0,017) όσο και στις 48 ώρες (p=0,000) είναι στατιστικώς σημαντική. Επιπλέον, φαίνεται πως τα κύτταρα που έχουν διεγερθεί με IL-1β, η αύξηση στην έκκριση της IL-6 είναι χρονοεξαρτώμενη. Η διαφορά στην έκκριση της IL-6 στις 24 και 48 ώρες είναι στατιστικώς σημαντική (p=0,000).

Τα αποτελέσματα της έκκρισης της IL-6 μετά από διέγερση με L*P*S, φαίνονται στο διάγραμμα 6.3.

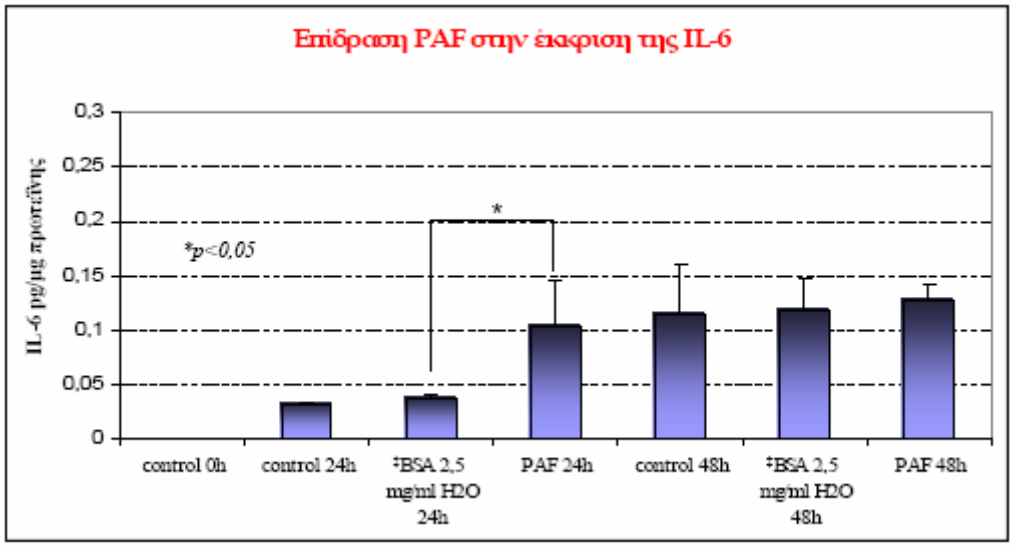


Διάγραμμα 6.3 Επίδραση του LPS στην έκκριση της IL-6 σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS παρουσία ή απουσία 0,1 mg/ml L*P*S για 0, 24 και 48 ώρες. Συγκεκριμένα (α) χωρίς προσθήκη L*P*S ή του διαλύτη του, (β) με προσθήκη του διαλύτη του H_2O και (γ) με προσθήκη L*P*S. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης).

Από το διάγραμμα 6.3 φαίνεται πως η παρουσία του διαλύτη του L*P*S (H_2O) όπως ήταν αναμενόμενο δεν επηρεάζει την έκκριση της IL-6, καθώς η αύξηση έκκρισής της είναι μη στατιστικώς σημαντική τόσο στις 24 (p=0,210) όσο και στις 48 ώρες (p=0,450). Η αύξηση της έκκρισης της IL-6 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (περιέχει το διαλύτη του L*P*S) ύστερα από ενεργοποίηση με L*P*S, τόσο στις 24 ώρες (p=0,004) όσο και στις 48 ώρες (p=0,007), είναι στατιστικώς σημαντική. Η αύξηση στην έκκριση της IL-6 είναι χρονοεξαρτώμενη, καθώς η διαφορά στην εκκρινόμενη IL-6 στο χρονικό διάστημα 24 με 48 ώρες είναι στατιστικώς σημαντική (p=0,018).

Τα αποτελέσματα της έκκρισης της IL-6 μετά από διέγερση με PAF, φαίνονται στο διάγραμμα 6.4.



Διάγραμμα 6.4 Επίδραση του PAF στην έκκριση της IL-6 σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα HMCL κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS παρουσία ή απουσία *P*AF 10^{-6} M για 0, 24 και 48 ώρες. Συγκεκριμένα (α) χωρίς προσθήκη PAF ή του διαλύτη του, (β) με προσθήκη του διαλύτη του BSA-FFA 2,5 mg/ml σε νερό και (γ) με προσθήκη PAF. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης). **p*<0,05 μεταξύ PAF 24h και BSA 2,5 mg/ml H_2O 24h.

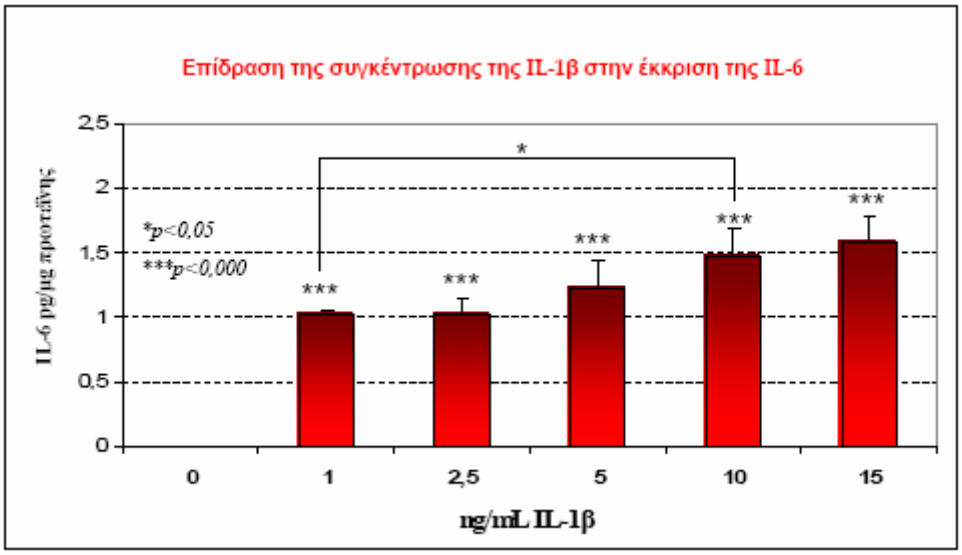
‡ Αναφέρεται στην αρχική συγκέντρωση του διαλύτη που αναδιαλύθηκε ο *P*AF.

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.4 υποδεικνύουν ότι η παρουσία του διαλύτη του *P*AF, BSA-FFA 2,5 mg/ml νερού (αρχική συγκέντρωση), δεν επηρεάζει την έκκριση της IL-6. Η αύξηση της IL-6 στις 24 ώρες είναι στατιστικώς σημαντική σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα αναφοράς (p=0,039). Αντίθετα δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική τροποποίηση στα επίπεδα της IL-6 μετά από 48 ώρες επώαση με PAF (p=0,132). Επομένως η έκκριση της IL-6 σε μεσαγγειακά κύτταρα διεγερμένα από *P*AF δεν φαίνεται να μεταβάλλονται σε μεγάλα χρονικά διαστήματα επώασης και πιθανός να έπρεπε να εξετασθούν μικρότερα χρονικά διαστήματα επώασης με τον συγκεκριμένο παράγοντα.

Από τα τρία ανωτέρω διαγράμματα συμπεραίνεται ότι η προσθήκη IL-1β προκαλεί τη μεγαλύτερη, συγκριτικά με L*P*S και *P*AF, αύξηση της παραγωγής IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα στις συνθήκες που δοκιμάσθηκαν. Επιπλέον, ο L*P*S είναι βακτηριακός πολυσακχαρίτης, γεγονός που σημαίνει ότι η προκαλούμενη από αυτόν φλεγμονή δεν προσομοιάζει τις συνθήκες που απαντώνται συνήθως στο ανθρώπινο σώμα. Για το λόγο αυτό επιλέγεται η IL-1β ως μέσο διέγερσης των κυτταρικών καλλιεργειών στη συνέχεια.

6.1.3 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκκριση της IL-6

Με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση της IL-1β που προκαλεί έκκριση IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, επωάστηκαν τα κύτταρα με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1β. Ο χρόνος επώασης που επιλέχθηκε είναι οι 24 ώρες, που όπως φαίνεται από το προηγούμενο πείραμα, παράγεται ικανοποιητική ποσότητα IL-6. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία 0 - 1 - 2,5 - 5 - 10 και 15 ng/ml IL-1β, διαλυμένης σε PBS 0,1% BSA-FFA. Στο τέλος του χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).



Διάγραμμα 6.5 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκκριση IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια επωάστηκαν για 24 ώρες με μια από τις ακόλουθες συγκεντρώσεις IL-1β (0 - 1 - 2,5 - 5 - 10 και 15 ng/ml). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). ***p<0,000 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (παρουσία μόνο του διαλύτη της IL-1β).

Στο διάγραμμα 6.5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τρία διαφορετικά πειράματα με τέσσερις επαναλήψεις στο καθένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι συγκεντρώσεις έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (p<0,000). Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ζευγών των συγκεντρώσεων της IL-1β που δοκιμάστηκαν, εκτός από των 1 με 10 ng/ml IL-1β (p=0,046) και 1 με 15 ng/ml IL-1β (p=0,024). Από προηγούμενη μελέτη, ξέρουμε ότι η IL-1β σε συγκέντρωση μέχρι και 5 ng/ml, δεν προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των

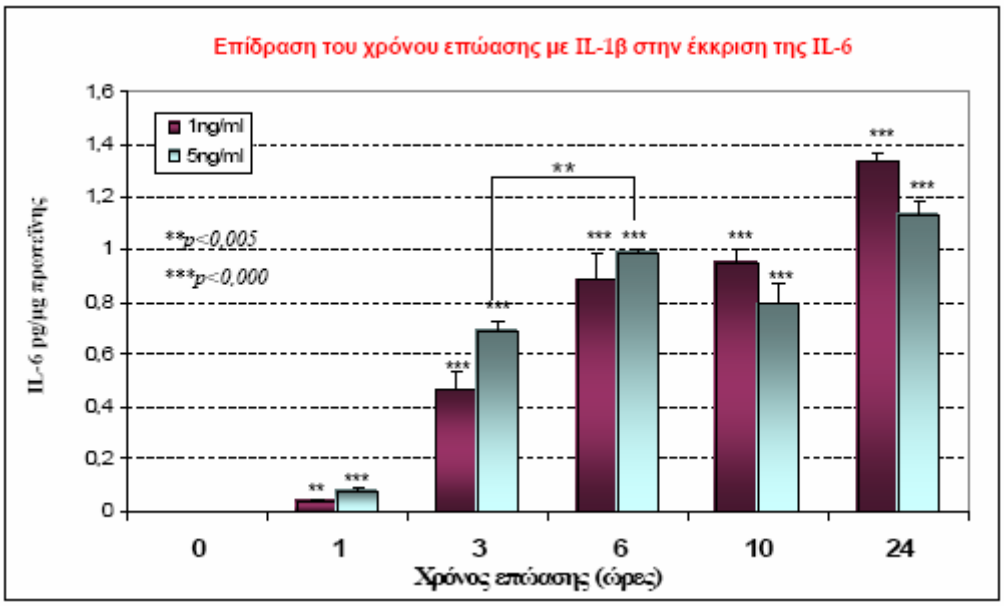
μεσαγγειακών κυττάρων [323]. Με σκοπό επομένως να αποφύγουμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την IL-1β, αλλά και να συνδυάσουμε τα αποτελέσματά μας με αυτά της προηγούμενης μελέτης στα ίδια κύτταρα [323], επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5 ng/ml ως δόση διέγερσης των μεσαγγειακών κυττάρων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από 24 ώρες τα μη διεγερμένα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εκκρίνουν μηδαμινά επίπεδα IL-6.

6.1.4 Επίδραση του χρόνου επώασης με IL-1β στην έκκριση της IL-6

Επόμενο στάδιο ήταν να επιλέξουμε το βέλτιστο χρόνο επώασης των κυττάρων με διεγέρτη την IL-1β. Από προηγούμενη μελέτη, ξέρουμε ότι η IL-1β σε συγκέντρωση μέχρι και 5 ng/ ml δεν προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων [323]. Με σκοπό επομένως να αποφύγουμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την IL-1β, αλλά και να συνδυάσουμε τα αποτελέσματα μας με αυτά της προηγούμενης μελέτης στα ίδια κύτταρα, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5 ng/ml ως δόση διέγερσης των μεσαγγειακών κυττάρων. Παρόλα αυτά, στην κινητική του χρόνου επιλέχθηκε να δοκιμασθεί και η μικρότερη συγκέντρωση της IL-1β, 1 ng/ml, για να ελέγξουμε αν επηρεάζει η συγκέντρωση της IL-1β την κινητική έκκρισης της IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM, παρουσία 5 ng/ml ή 1 ng/ml IL-1β διαλυμένης σε *P*BS 0,1% BSA-FFA, για διαφορετικούς χρόνους επώασης (*0, 1, 3, 6, 10 και 24 ώρες*). Στο τέλος του κάθε χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). Σε κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκε δείγμα αναφοράς, απουσία της IL-1β και παρουσία του διαλύτη *P*BS 0,1% BSA-FFA, το οποίο και αφαιρέθηκε από την αντίστοιχη συνθήκη.



Διάγραμμα 6.6 Επίδραση της IL-1β στην έκκριση της IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια επωάστηκαν με IL-1β (1 και 5 ng/ml) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6. Σε κάθε χρονική στιγμή έχει αφαιρεθεί το αντίστοιχο δείγμα αναφοράς που περιείχε μόνο τον διαλύτη της IL-1β. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). $^{**}p<0,05$ και $^{***}p<0,000$ σε σχέση με τις 0 ώρες επώασης με IL-1β.

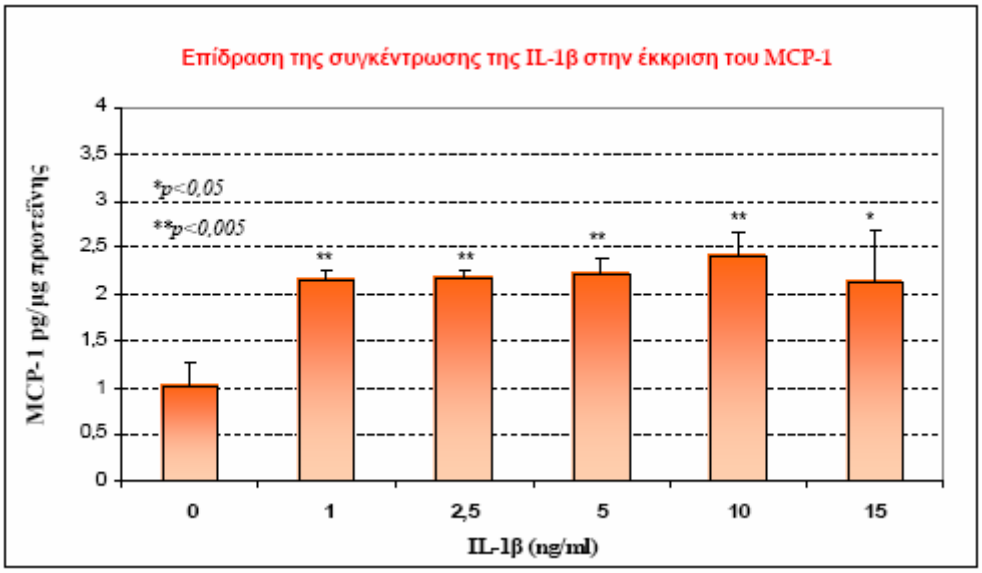
Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.6. υποδεικνύουν ότι η διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση έκκρισης IL-6 εντός του χρονικού διαστήματος της μιας ώρας. Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p\leq0,001$) στην έκκριση της IL-6, σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάσθηκαν, μετά από επώαση τόσο με 1 ng/ml όσο και με 5 ng/ml IL-1β. Φαίνεται πως η συγκέντρωση της IL-1β δεν επηρεάζει την κινητική της IL-6, αφού σε κάθε χρονική στιγμή η διαφορά της εκκρινόμενης IL-6 από 1 και 5 ng/ml IL-1β δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p>0,068$). Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκαν τα 5 ng/ml IL-1β ως συγκέντρωση του διεγέρτη. Δεδομένου του ότι η έκκριση της IL-6 αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά ($p=0,002$) από τις 3 στις 6 ώρες επώασης με 5 ng/ml IL-1β, επιλέγεται στο διάστημα των 6 ωρών για τα περαιτέρω πειράματα.

6.2 Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στην έκκριση MCP-1

6.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκκριση του MCP-1

Με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση της IL-1β που προκαλεί έκκριση χημειοτακτικού παράγοντα MCP-1 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, επωάστηκαν τα κύτταρα με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1β. Ο χρόνος επώασης των κυττάρων που επιλέχθηκε είναι οι 24 ώρες. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που

συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία 0 - 1 - 2,5 - 5 - 10 και 15 ng/ml IL-1β, διαλυμένης σε PBS 0,1% BSA-FFA. Στο τέλος του χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση του MCP-1, ενώ στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg MCP-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).



Διάγραμμα 6.7 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκκριση MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια επωάστηκαν για 24 ώρες με μια από τις ακόλουθες συγκεντρώσεις IL-1β (0, 1, 2,5, 5, 10 και 15 ng/ml). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg MC*P*-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). *p<0,05 και **p<0,005 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (παρουσία μόνο του διαλύτη της IL-1β).

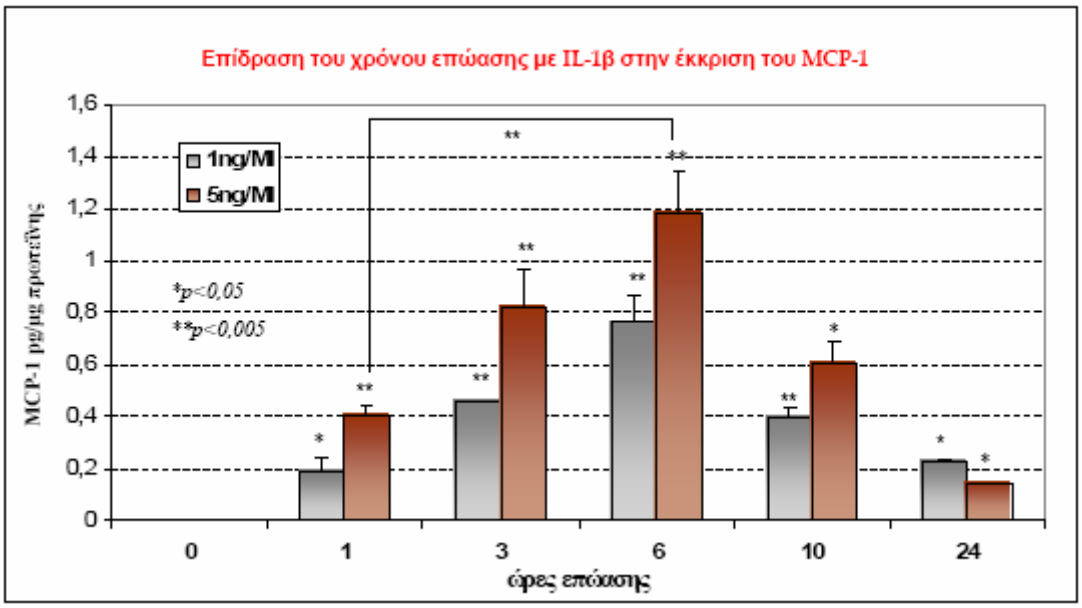
Από το διάγραμμα 6.7 προκύπτει ότι η επώαση των κυττάρων με IL-1β προκαλεί στατιστικώς σημαντική αύξηση έκκρισης του MCP-1 (p≤0,001) σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στον εκκρινόμενο MCP-1, μεταξύ των ζευγών των συγκεντρώσεων της IL-1β. Επιλέγονται τα 5 ng/ml IL-1β ως δόση του διεγέρτη, για να μελετήσουμε την έκκριση του MCP-1 ταυτόχρονα με την έκκριση της IL-6.

Να σημειωθεί πώς ενώ τα μη διεγερμένα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν μηδαμινή έκκριση IL-6, δεν ισχύει κάτι τέτοιο και για τον MC*P*-1, αφού εμφανίζουν σημαντική παραγωγή αυτού, όπως φαίνεται και από το σχήμα 6.7.

6.2.2. Επίδραση του χρόνου επώασης με IL-1β στην έκκριση του MCP-1

Επόμενο στάδιο ήταν να επιλέξουμε το βέλτιστο χρόνο επώασης με διεγέρτη την IL-1β. Για τους ίδιους λόγους που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκε να δοκιμασθούν η μικρότερη συγκέντρωση της IL-1β 1 ng/ml και τα 5 ng/ml για να εξεταστεί η έκκριση του MCP-1 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM, παρουσία είτε 1 ng/ml είτε 5 ng/ml IL-1β, διαλυμένης σε *P*BS 0,1% BSA-FFA, για διαφορετικούς χρόνους επώασης (*0, 1, 3, 6, 10 και 24 ώρες*). Στο τέλος του κάθε χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg MCP-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). Σε κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκε δείγμα αναφοράς απουσία IL-1β και παρουσία του PBS 0,1% BSA-FFA, το οποίο και αφαιρέθηκε από την αντίστοιχη συνθήκη.



Διάγραμμα 6.8 Επίδραση της IL-1β στην έκκριση του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και στη συνέχεια επωάστηκαν με IL-1β (1 και 5 ng/ml) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα και μετρήθηκε η έκκριση του MC*P*-1. Σε κάθε χρονική στιγμή έχει αφαιρεθεί το αντίστοιχο δείγμα αναφοράς που περιείχε μόνο τον διαλύτη της IL-1β. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg MC*P*-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). *p<0,05 και **p<0,005 σε σχέση με το με τις 0 ώρες επώασης IL-1β.

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.8 υποδεικνύουν ότι η διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση έκκρισης MCP-1 εντός του χρονικού διαστήματος της μιας ώρας. Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p \leq 0{,}041$) στην έκκριση του MCP-1, σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάσθηκαν, μετά από επώαση τόσο με 1 ng/ml όσο και με 5 ng/ml IL-1β. Από τα αποτελέσματα φαίνεται τα 5 ng/ml IL-1β προκαλούν στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκκρισης του MCP-1 στις 1 (p=0,013), 3 (p=0,045), και 6 ώρες (p=0,035) συγκρινόμενα με τα 1 ng/ml IL-1β. Αντίθετα στις 24 ώρες δεν παρατηρείται ανάλογη στατιστικώς σημαντική αύξηση, αποτέλεσμα το οποίο συμφωνεί με το προηγούμενο πείραμα. Επομένως αφού τα 5 ng/ml IL-1β προκαλούν μεγαλύτερη αύξηση, αλλά και για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκαν τα 5 ng/ml IL-1β ως συγκέντρωση του διεγέρτη. Επιπλέον αφενός επειδή στις 6 ώρες παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη έκκριση του MCP-1 αλλά και με σκοπό να μελετηθεί παράλληλα με την έκκριση της IL-6 επιλέγεται στο διάστημα των 6 ωρών ως χρόνος επώασης των κυττάρων με IL-1β.

6.3 Μελέτη επίδρασης ολικών πολικών λιποειδών ελαιολάδου στην έκκριση των κυτταροκινών

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν δείξει ότι τα πολικά λιποειδή ελαιολάδου έχουν ευεργετικές δράσεις έναντι του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών. Δεδομένης της ομοιότητας ανάμεσα στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης και της σπειραματοσκλήρυνσης, διερευνήθηκε η επίδραση των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου στις καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων, που είχαν προηγουμένως διεγερθεί με κατάλληλη ποσότητα IL-1β, ώστε να προσομοιαστούν οι συνθήκες της φλεγμονώδους διαδικασίας σε επίπεδο νεφρού. Είναι γνωστό ότι, τα συστατικά του ελαιόλαδου μεταξύ άλλων αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo*, την παραγωγή απολιποπρωτεϊνών, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και συμμετέχουν στην εκκαθάριση υπεροξειδίου και άλλων δραστικών μορίων οξυγόνου, περιορίζοντας έτσι την πρόοδο της αθηρωμάτωσης [64] (*άρθρο ανασκόπησης*). Συγκεκριμένα προηγούμενη *in vitro* μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έδειξε ότι τα πολικά λιποειδή ελαιολάδου είναι ισχυροί αναστολείς του PAF, μειώνοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [40]. Σε πιο πρόσφατη *in vivo* μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας χορηγήθηκε σε κουνέλια αθηρογόνος δίαιτα ή αθηρογόνος δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο, πολικά ή ουδέτερα λιποειδή ελαιολάδου για 45 μέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κουνέλια που τράφηκαν με τροφή εμπλουτισμένη σε ελαιόλαδο και πολικά λιποειδή ελαιολάδου εμφάνισαν μικρότερο πάχος αθηρωματικής πλάκας που σχετίστηκε με μειωμένη ικανότητα των αιμοπεταλίων να συσσωρεύονται έναντι του PAF [54]. Από τη στιγμή που ο PAF έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης – συνεισφέρει μεταξύ άλλων και στη ρύθμιση παραγωγής κυτταρινών, σελεκτινών και ιντεγκρινών [324](*άρθρο*

ανασκόπησης) – η αναστολή του παρέχει προστασία έναντι της αθηρωμάτωσης και επομένως ίσως έναντι και της σπειραματοσκλήρυνσης.

Γνωρίζοντας ότι τα πολικά λιποειδή είναι το βιολογικά ενεργό κλάσμα του ελαιολάδου, έγινε απομόνωση τους και δοκιμάστηκε η δράση τους στις καλλιέργειες των μεσαγγειακών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε η πιθανή βιολογική δράση των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου σε επίπεδο νεφρού.

6.3.1 Εκχύλιση πολικών λιποειδών ελαιολάδου

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο που προέρχεται από ελαιόλαδο Κορωναϊκής ποικιλίας. Απομονώθηκαν από αυτό, τα ολικά πολικά λιποειδή (*ΟΠΛ*) με τροποποιημένη κατανομή κατ΄ αντιρροή σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στην παράγραφο 5.4.1. Η ποσότητα που εκχυλίστηκε είναι 1,9 mg ΟΠΛ / ml ελαιολάδου. Το κλάσμα των πολικών λιποειδών ελαιολάδου χωρίστηκε σε κατάλληλες ποσότητες που αφού κλείστηκαν σε ατμόσφαιρα αέριου αζώτου φυλάχτηκαν στους -20°C, μέχρι τη χρήση τους. Για τα πειράματα εξατμίσθηκε ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν με κατάλληλη ποσότητα DMSO.

Με σκοπό να γίνει μια πρώτη διερεύνηση της σύστασης του πολικού εκχυλίσματος των πολικών λιποειδών πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί. Ο προσδιορισμός του φωσφόρου στο κλάσμα των πολικών λιποειδών από ελαιόλαδο ήταν αρνητικός, κάτι που συνεπάγεται την απουσία φωσφολιποειδών απ' αυτό. Ο προσδιορισμός σακχάρων στο κλάσμα των πολικών λιποειδών από ελαιόλαδο έδειξε περιεκτικότητα 37 μg γλυκόζης / ml ΟΠΛ, που υποδεικνύει την ύπαρξη γλυκολιποειδών στο δείγμα. Τέλος, στον προσδιορισμό των φαινολικών χρησιμοποιήθηκαν δυο πρότυπες φαινολικές ενώσεις και τα αποτελέσματα έδειξαν περιεκτικότητα 46,8 μg γαλλικού οξέος / ml ΟΠΛ και 54,3 μg τυροσόλης / ml ΟΠΛ στο δείγμα επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη φαινολικών ενώσεων στο κλάσμα των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου.

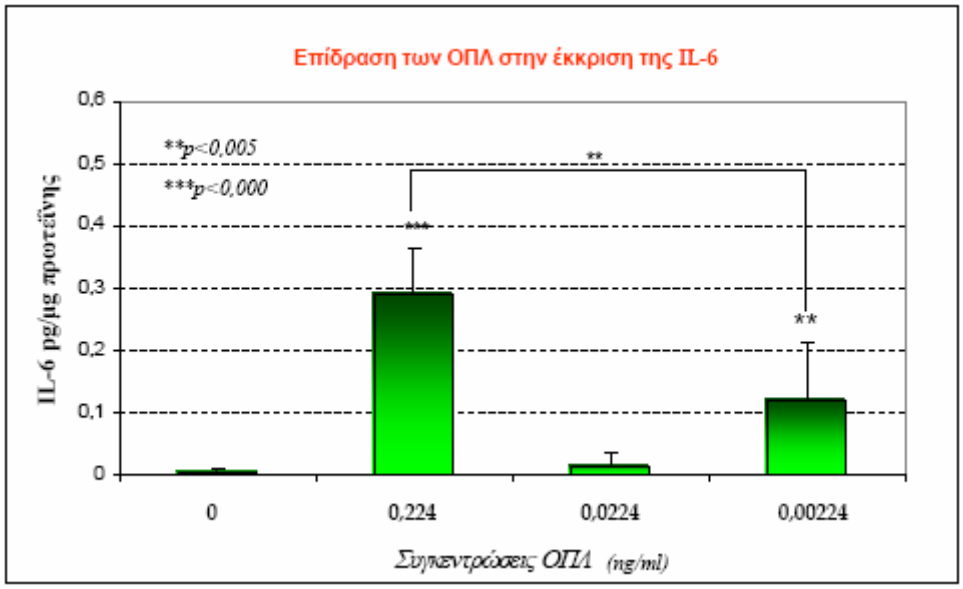
6.3.2 Επίδραση Ολικών Πολικών Λιποειδών στην έκκριση IL-6

Αρχικά θελήσαμε να εξετάσουμε εάν το κλάσμα των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου μπορεί να επηρεάσει από μόνο του την έκκριση της IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Συγκεκριμένα για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πολικών λιποειδών ελαιολάδου. Ειδικότερα, εξατμίστηκαν 500 μl εκχυλίσματος ΟΠΛ σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 50 μl DMSO, ώστε το δείγμα να έχει συγκέντρωση 22,4 μg ΟΠΛ / μl. Με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 από αυτό το διάλυμα προκύψανε διαλύματα συγκεντρώσεων 2,24

ΟΠΛ μg/μl, 0,224 ΟΠΛ μg/μl και 0,0224 ΟΠΛ μg/μl. Σε κάθε περίπτωση η ποσότητα του DMSO δεν ξεπερνούσε το 0,01% v.v. στο μέσο καλλιέργειας.

Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε απουσία (*δείγμα αναφοράς*) ή παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων του κλάσματος των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου για 6 ώρες. Οι τελικές συγκεντρώσεις στο θρεπτικό υλικό του πειράματος των πολικών λιποειδών ήταν 0,224 – 0,0224 – 0,00224 ΟΠΛ ng/ml. Στο δείγμα αναφοράς είχε τοποθετηθεί αντίστοιχη (*με τα δείγματα*) ποσότητα τόσο του διαλύτη των πολικών λιποειδών (DMSO) όσο και του διαλύτη της IL-1β (PBS 0,1% BSA-FFA). Το χρονικό διάστημα των 6 ωρών επιλέχθηκε δεδομένου ότι με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα αυτό το διάστημα, κρίθηκε ως βέλτιστο για την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6. Στο τέλος του χρόνου επώασης, συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6, ενώ στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).



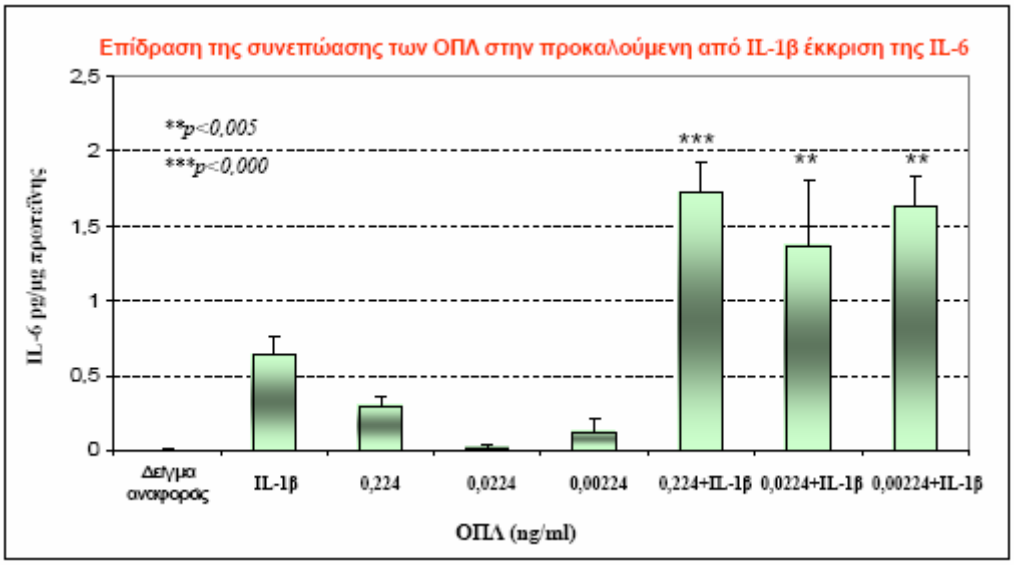
Διάγραμμα 6.9 Επίδραση του κλάσματος των πολικών λιποειδών ελαιολάδου στην έκκριση της IL-6 από μεσαγγειακά κύτταρα. Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια επωάστηκαν με ΟΠΛ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για 6 ώρες. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). $^{**}p<0,05$, $^{***}p<0,000$ σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

Από το διάγραμμα 6.9 προκύπτει ότι τα πολικά λιποειδή μπορούν να τροποποιήσουν την έκκριση της IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. παρόλα αυτά φαίνεται ότι η έκκριση της IL-6 δεν είναι δοσοεξαρτώμενη της συγκέντρωσης των ΟΠΛ ελαιολάδου, αλλά ότι εμφανίζει μορφή κώδωνα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,224 ng/ml) και η μικρότερη συγκέντρωση (0,00224 ng/ml) των ΟΠΛ προκαλεί στατιστικώς σημαντική (p=0,000 και p=0,004 αντίστοιχα) αύξηση της έκκρισης

της IL-6 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Η διαφορά μεταξύ τους είναι επίσης στατιστικώς σημαντική (p=0,003). Η μεσαία συγκέντρωση δεν φαίνεται να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την έκκριση της IL-6.

6.3.3 Επίδραση της συνεπώασης των Ολικών Πολικών Λιποειδών στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6

Με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6 σε μεσαγγειακά κύτταρα, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM (α) απουσία IL-1β και ΟΠΛ (β) παρουσία 5 ng/ml IL-1β (γ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,224 ng/ml ΟΠΛ (δ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,0224 ng/ml (ε) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,0224 ng/ml ΟΠΛ. Τα κύτταρα συν-επωάστηκαν με τα ΟΠΛ και την IL-1β για το χρονικό διάστημα των 6 ωρών και στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

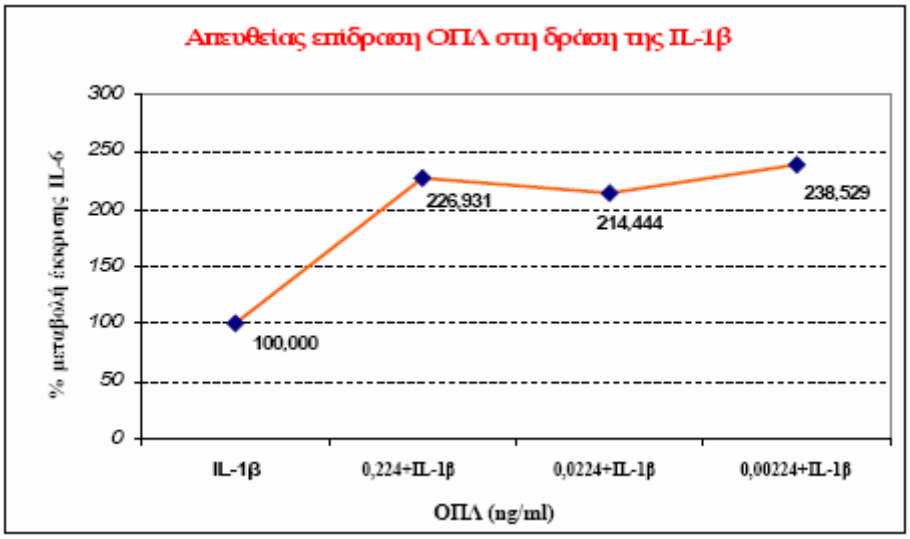


Διάγραμμα 6.10 Επίδραση της συνεπώασης των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 ώρες (α) απουσία IL-1β και ΟΠΛ (β) παρουσία 5 ng/ml IL-1β (γ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,224 ng/ml ΟΠΛ (δ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,0224 ng/ml (ε) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,00224 ng/ml ΟΠΛ. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/ μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). **p<0,005 και ***p<0,000 σε σχέση με τα 5 ng/ml IL-1β.

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.10 υποδεικνύουν ότι τα ΟΠΛ ελαιολάδου αυξάνουν συνεργιστικά με την IL-1β, μετά από συνεπώασή τους, την έκκριση IL-6. Μετά από 6 ώρες συνεπώασης, τα 5 ng/ml IL-1β μαζί με καθεμία από τις τρεις συγκεντρώσεις ΟΠΛ αυξάνουν στατιστικώς σημαντικά την εκκρινόμενη IL-6 ($p \leq 0{,}001$) σε σχέση με την δράση μόνο της IL-1β. Μεταξύ των ζευγών των ΟΠΛ/IL-1β δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά υποδηλώνοντας ότι η αύξηση έκκρισης της IL-6 είναι μη δοσοεξαρτώμενη της συγκέντρωσης των ΟΠΛ. Το αποτέλεσμα αυτά έρχεται σε συμφωνία με το προηγούμενο διάγραμμα 6.9.

Στο σχήμα 6.11 φαίνεται η απευθείας επίδραση των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου στη δράση της IL-1β έχοντας αφαιρέσει την επιμέρους επίδραση των ποσοτήτων των ΟΠΛ. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως % της προκαλούμενης από IL-1β έκκρισης της IL-6.



Διάγραμμα 6.11 Απευθείας επίδραση των ΟΠΛ ελαιολάδου στη δράση της IL-1β.

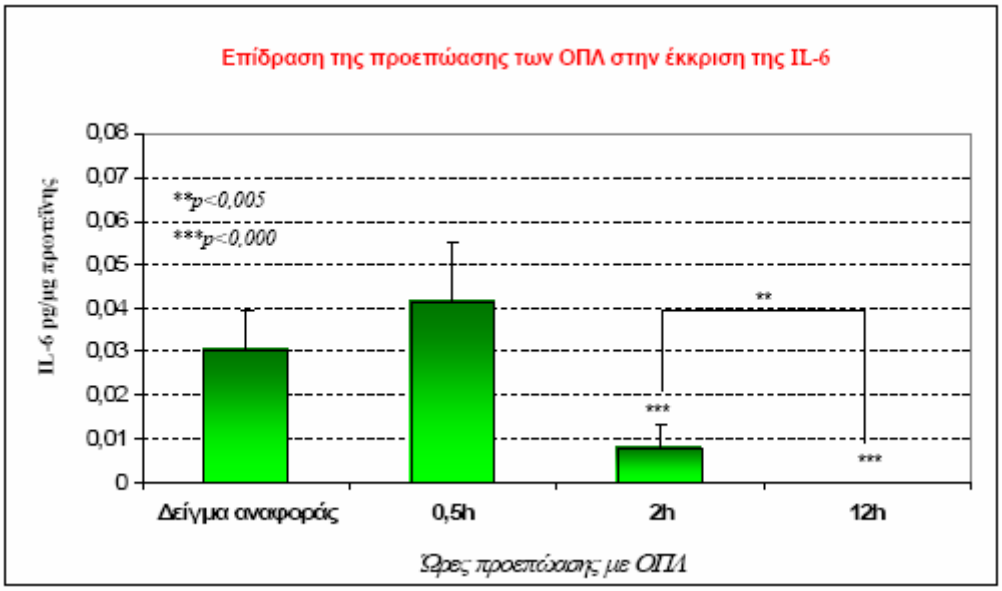
Τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 ώρες (α) απουσία IL-1β και ΟΠΛ (β) παρουσία 5 ng/ml IL-1β (γ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,224 ng/ml ΟΠΛ (δ) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,0224 ng/ml (ε) παρουσία 5 ng/ml IL-1β και 0,0224 μg/ml ΟΠΛ. Αφαιρέθηκε η επιμέρους επίδραση των ποσοτήτων των ΟΠΛ. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως % της προκαλούμενης από IL-1β έκκρισης της IL-6.

6.3.4 Επίδραση της προεπώασης των Ολικών Πολικών Λιποειδών στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση IL-6

Η επίδραση των ΟΠΛ στις λειτουργίες των μεσαγγειακών κυττάρων και στη δράση της IL-1β μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών και σε διαφορετικά επίπεδα (*δράση σε επίπεδο υποδοχέα, σε επίπεδο μεταγωγής σήματος ,ή σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης*). Με σκοπό να μελετήσουμε ένα πιθανό διαφορετικό μηχανισμό δράσης τον ΟΠΛ αποφασίστηκε να γίνει προ-επώαση των κυττάρων με ΟΠΛ και στη συνέχεια διέγερση με IL-1β.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος των ΟΠΛ στην έκκριση της IL-6, μετά από προεπώαση των κυττάρων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0, 2, 12 ώρες). Για το σκοπό

αυτό, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία εκχυλίσματος ΟΠΛ 0,224 ng/ml (σε DMSO), για χρονικό διάστημα 30 min, 2h και 12h. Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με *P*BS και επώασή τους με τον διαλύτη της IL-1β, *P*BS 0,1% BSA-FFA, για 6 ώρες. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

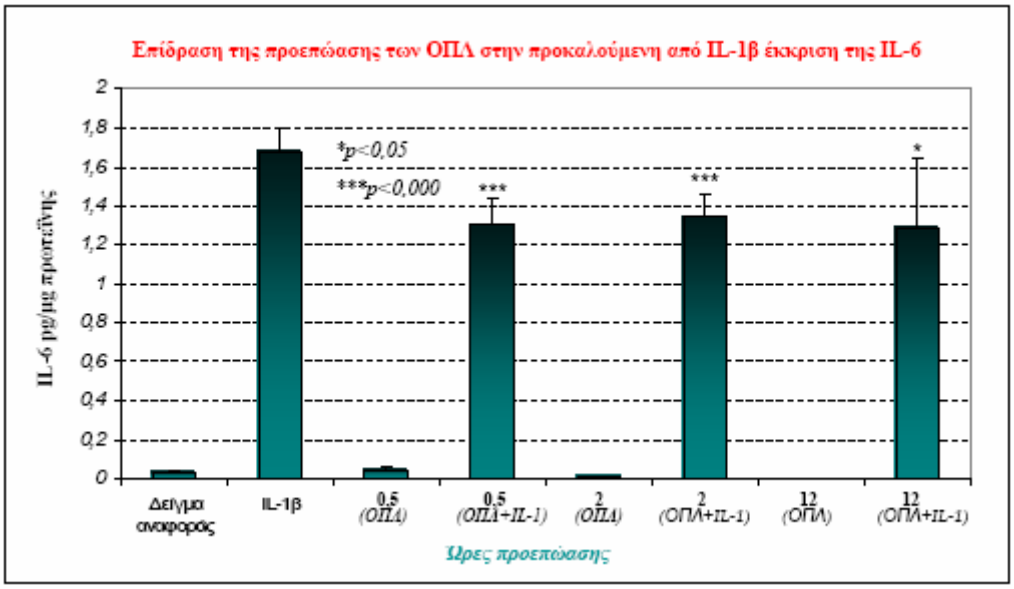


Διάγραμμα 6.12 Επίδραση της προεπώασης των ΟΠΛ στην έκκριση της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 – 0,5 – 2 - 12 ώρες) και στη συνέχεια με *P*BS 0,1% BSA-FFA για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/ μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). ***p<0,000 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

Από το διάγραμμα 6.12, προκύπτει ότι η προεπώαση των κυττάρων με 0,224 ng/ml ΟΠΛ μέχρι τα 30 λεπτά δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα IL-6 αφού η παρατηρούμενη αύξηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική (p=0,081). Στις δυο ώρες προεπώαση τα ΟΠΛ μειώνουν στατιστικώς σημαντικά (p=0,000) τα βασικά επίπεδα IL-6 και αυτή η μείωση διατηρείται μέχρι και τις 12 ώρες προεπώαση. Να σημειωθεί ότι μετά από 12ωρη προεπώαση και την ακόλουθη 6ωρη επώαση με το διαλύτη της IL-1β, τα επίπεδα της IL-6 είναι μη ανιχνεύσιμα (p=0,000). Φαίνεται λοιπόν, πως η μείωση των βασικών επιπέδων της IL-6 (*σε μη διεγερμένα από IL-1β κύτταρα*) είναι χρονοεξαρτώμενη από την προεπώαση.

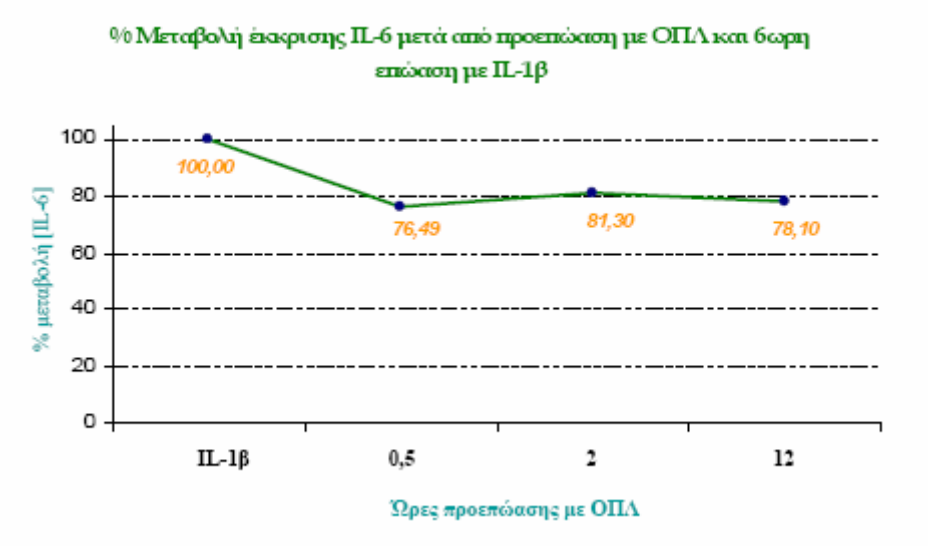
Με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6, τα κύτταρα προεπωάστηκαν με ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και ακολούθησε 6ωρη επώαση με IL-1β. Συγκεκριμένα, στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία εκχυλίσματος ΟΠΛ 0,224 ng/ml (σε DMSO), για χρονικό διάστημα 30 min, 2h και 12h. Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με *P*BS και επώασή τους 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg IL-6/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).



Διάγραμμα 6.13 Επίδραση της προεπώασης των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 – 0,5 – 2 - 12 ώρες) και στη συνέχεια με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg IL-6/ μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). *p<0,05 και ***p<0,000 σε σχέση με την IL-1β.

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.12 υποδεικνύουν ότι η προεπώαση των κυττάρων με 0,224 μg/μl ΟΠΛ περιορίζει στατιστικώς σημαντικά την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6. Η προεπώαση διάρκειας 30 min περιορίζει την έκκριση της IL-6 κατά 23,51% (p=0,000), ενώ οι προεπωάσεις διάρκειας 2 και 12 ωρών κατά 18,69% (p=0,000) και 21,90% (p=0,013) αντίστοιχα (*βλ. και διάγραμμα 6.13*). Μεταξύ των ζευγών ΟΠΛ/IL-1β δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

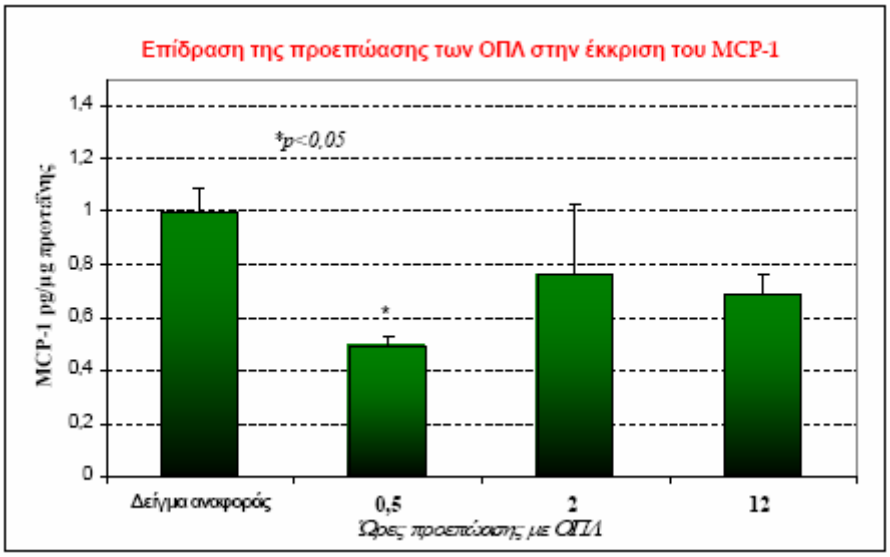


Διάγραμμα 6.14 Ποσοστιαία μεταβολή της έκκρισης IL-6 μετά από προεπώαση μεσαγγειακών κυττάρων με ΟΠΛ και ακόλουθη επώαση με IL-1β.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 - 0,5 - 2 -12 ώρες) και στη συνέχεια με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % μεταβολή επί του δείγματος της IL-1β (100%).

6.3.5 Επίδραση της συνεπώασης των ολικών πολικών λιποειδών στην έκκριση προκαλούμενη από IL-1β έκκριση MCP-1

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος των ΟΠΛ στην έκκριση του χημειοτακτικού παράγοντα MC*P*-1, μετά από προεπώαση των κυττάρων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν με διαδικασία που συνοπτικά είναι η εξής: στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία εκχυλίσματος ΟΠΛ 0,224 ng/ml (σε DMSO), για χρονικά διαστήματα 30 min, 2h και 12h. Μετά το πέρας των χρονικών διαστημάτων προ-επώασης ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με PBS και επώασή τους με τον διαλύτη της IL-1β, PBS 0,1% BSA-FFA, για 6 ώρες. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση του MCP-1. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως pg MCP-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

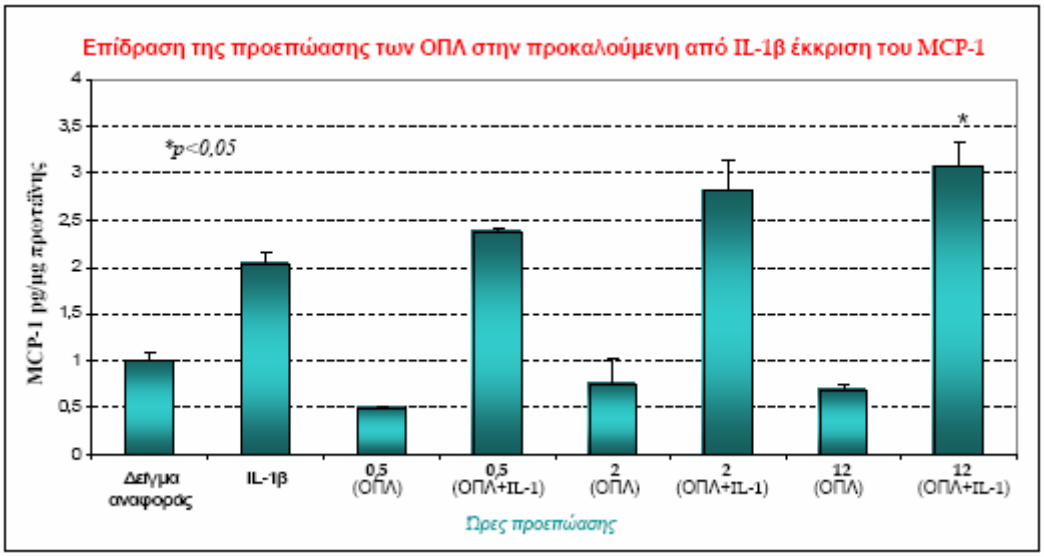


Διάγραμμα 6.15 Επίδραση της προεπώασης με ΟΠΛ στην έκκριση του MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 - 0,5 - 2 -12 ώρες) και στη συνέχεια με PBS 0,1% BSA-FFA για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg MCP-1/ μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). *p<0,05 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς 0 ώρες προεπώαση.

Από το διάγραμμα 6.14 διακρίνουμε ότι η προεπώαση των μεσαγγειακών κυττάρων με το εκχύλισμα ΟΠΛ ελαιολάδου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκκρισης του MCP-1. Η προεπώαση των 30 min και η ακόλουθη 6ωρη επώαση με το διαλύτη της IL-1β, μειώνει στατιστικώς σημαντικά την έκκριση του MCP-1 (p<0,05), ενώ οι προεπωάσεις των 2 και 12 ωρών παρόλο που δείχνουν τάση μείωσης δεν προκάλεσαν στατιστικώς σημαντική αλλαγή.

Με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση του MCP-1, τα κύτταρα προεπωάστηκαν με ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και ακολούθησε 6ωρη επώαση με IL-1β. Συγκεκριμένα, στη φάση όπου τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS, το οποίο περιέχει 0,2 % w/v BSA-FFA, για 24 ώρες ώστε να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM για 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και προστίθεται φρέσκο SFM παρουσία εκχυλίσματος ΟΠΛ 0,224 ng/ml σε DMSO, για χρονικό διάστημα 30 min, 2h και 12h. Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με PBS και επώασή τους 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g και μετρήθηκε η έκκριση του MCP-1. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αριθμό των κυττάρων και εκφράζονται ως *p*g MCP-1/μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

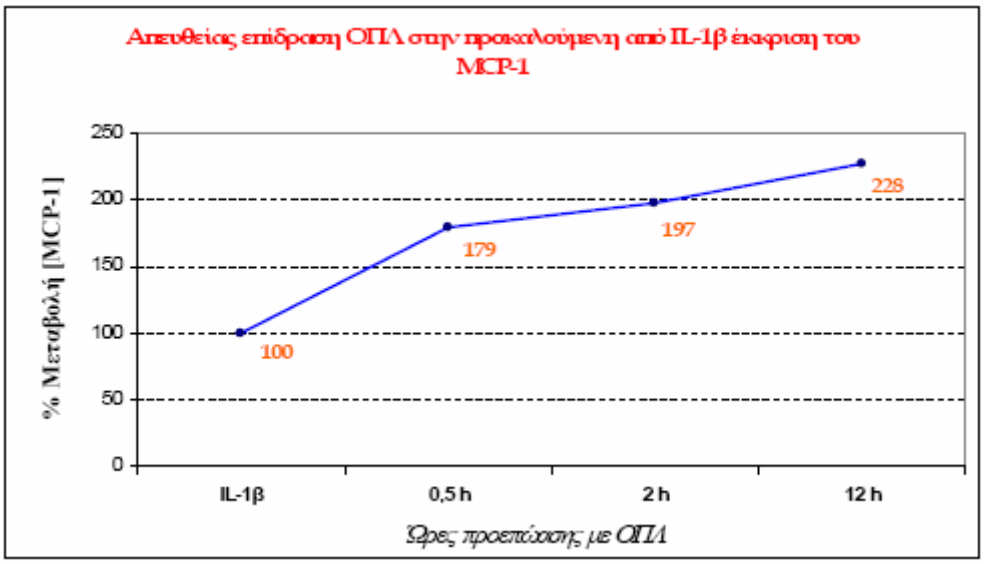


Διάγραμμα 6.16 Επίδραση των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση MCP-1 μετά από προεπώαση των μεσαγγειακών κυττάρων.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 - 0,5 - 2 -12 ώρες) και στη συνέχεια με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με προσδιορισμό πρωτεΐνης και εκφράζονται ως pg MCP-1/ μg πρωτεΐνης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση). *p<0,05 σε σχέση με την IL-1β.

Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.15 υποδεικνύουν πως η προεπώαση των μεσαγγειακών κυττάρων με ΟΠΛ και η μετέπειτα επώαση με IL-1β για 6 ώρες, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τάσης ενίσχυσης της έκκρισης του MCP-1. Οι προεπωάσεις των 30 λεπτών και 2 ωρών (ΟΠΛ+IL-1β) δεν αύξησαν στατιστικώς σημαντικά την έκκριση του MCP-1, σε αντίθεση με την προεπώαση των 12 ωρών (p=0,035). Επιπλέον, αν και τα ζεύγη των ΟΠΛ/IL-1β δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικές διαφορές, είναι φανερή η τάση ενίσχυσης της έκκρισης του MC*P*-1, υπό αυτές τις συνθήκες, με την πάροδο του χρόνου. Άλλωστε, μετά από 12 ώρες προεπώασης με 0,224 ng/ml ΟΠΛ και ακόλουθη 6ωρη επώαση με 5 ng/ml IL-1β, η παραγωγή του MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την IL-1β μόνη της.

Στο σχήμα 6.17 φαίνεται η απευθείας επίδραση των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου στη δράση της IL-1 β έχοντας αφαιρέσει την επιμέρους επίδραση των ποσοτήτων των ΟΠΛ. Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως % της προκαλούμενης από IL-1β έκκρισης του MCP-1.



Διάγραμμα 6.17 Ποσοστιαία μεταβολή της έκκρισης MCP-1 μετά από προεπώαση μεσαγγειακών κυττάρων με ΟΠΛ και ακόλουθη επώαση με IL-1β.

Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς όρο και στη συνέχεια προεπωάστηκαν με 0,224 ng/ml ΟΠΛ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0 - 0,5 – 2 - 12 ώρες) και στη συνέχεια με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % μεταβολή επί του δείγματος αναφοράς (100%).

6.4 Μελέτη του υποδοχέα της λιποπρωτεϊνης LDL στα μεσαγγειακά κύτταρα

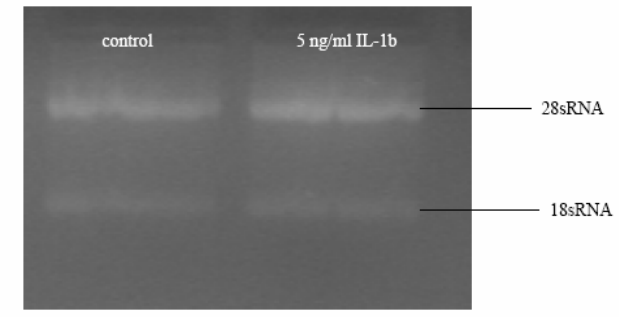
Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος ο σχηματισμός των μεσαγγειακών αφρωδών κυττάρων αποτελεί κύριο στάδιο στην εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης. Είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας της LDL βρίσκεται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης μέσω ενός συστήματος, που ελέγχει τη μεταφορά της χοληστερόλης μέσω της LDL άλλα και τη σύνθεση της. Επομένως η nLDL θεωρείται ότι δεν ευθύνεται για την εισροή των λιποειδών στα κύτταρα και τη μετατροπή τους σε αφρώδη. Αντιθέτως, η oxLDL έχει πλήρως ενοχοποιηθεί για τη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων μέσω των μη ελεγχόμενων εκκαθαριστών υποδοχέων. Τα τελευταία όμως χρόνια εξετάζεται και το ενδεχόμενο κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες να διαταράσσεται ο έλεγχος με ανατροφοδότηση και να λειτουργεί ο ίδιος ο υποδοχέας της nLDL με ιδιότητα εκκαθαριστή συμβάλλοντας στη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων και επομένως στη δημιουργία της βλάβης. Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχει ήδη αναφερθεί ότι μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία ελέγχου του υποδοχέα της nLDL και να οδηγήσουν στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων. Θελήσαμε επομένως να επιβεβαιώσουμε τη δράση της IL-1β στην έκφραση του υποδοχέα της LDL και στη συνέχεια να μελετήσουμε την επίδραση των ΟΠΛ σε αυτή

τη δράση. Για το σκοπό αυτό εκχυλίστηκε το RNA από τα κύτταρα και εξετάσθηκαν με RT-PCR τα επίπεδα mRNA του LDLr.

6.4.1 Ηλεκτροφόρηση RNA

Το RNA αποτελεί μονόκλωνο μόριο, το οποίο σε αντίθεση με το DNA (*δίκλωνο*) είναι ευάλωτο στη δράση αποδιατακτικών μορίων, όπως είναι οι RNAάσες. Οι RNAάσες είναι άφθονες και πολύ σταθερές πρωτεΐνες, που μπορούν να διασπάσουν το RNA και είναι δύσκολο να απενεργοποιηθούν. Η πιο κοινή πηγή μόλυνσης είναι τα χέρια του ερευνητή καθώς και τα βακτήρια και οι μύκητες (μούχλα) που μπορεί να είναι παρόντα στα σωματίδια σκόνης του αέρα. Γι' αυτό πέρα από τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων των RNAάσων είναι πολύ σημαντικό η απομόνωση του RNA να γίνεται σε καθαρό και κλειστό περιβάλλον και να γίνεται συχνή αλλαγή γαντιών. Επιπλέον, η ανάπτυξη υψηλής θερμοκρασίας στα δείγματα RNA, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης αποτελεί ένα επιπλέον παράγοντα που μπορεί να συμβάλλει στην αποδιάταξη του μορίου. Η αύξηση της θερμοκρασίας στα δείγματα RNA αυξάνει και την ενέργεια της εσωτερικής ενέργειας των δεσμών του μορίου, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση του. Γι΄ αυτό και όλη η διαδικασία της απομόνωσης θα πρέπει να γίνεται στους $4^{o}C$, το οποίο επιτυγχάνεται με τη διατήρηση των δειγμάτων RNA σε πάγο. Η διαδικασία απομόνωσης αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των μεθόδων.

Με σκοπό να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα του τρόπου εργασίας, όσον αναφορά την εξάλειψη της δράσης αποδιατακτικών παραγόντων στο RNA κατά την απομόνωση του πραγματοποιούνταν, κατά διαστήματα, ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (*2,5 g*) απομονωμένου RNA. Παρακάτω φαίνεται χαρακτηριστική πηκτή ηλεκτροφόρησης RNA.



Εικόνα 6.48 Πηκτή ηλεκτροφόρησης RNA. Απομόνωση RNA από HMCL κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί απουσία (δείγμα αναφοράς) ή παρουσία 5 ng/ml IL-1β για 24 ώρες.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν ότι από όλα τα δείγματα προέκυψε μόνο μία ταινία, το οποίο δηλώνει ότι το RNA δεν διασπάστηκε, έτσι ώστε να προκύψουν επιμέρους τμήματα με μικρότερο μέγεθος. Επομένως, η μέθοδος απομόνωσης εξαλείφει τη δράση των RNAασών και απομακρύνει πιθανές προσμίξεις του RNA με DNA ή με πρωτεΐνες.

6.4.2 Επίδραση της συγκέντρωσης της IL-1β στην έκφραση του mRNA του n-LDL υποδοχέα.

Τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως και όλα τα κύτταρα καλύπτουν τις ανάγκες τους σε χοληστερόλη μέσω της πρόσληψης της από τους n-LDL υποδοχείς, που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση του n-LDL υποδοχέα υπόκεινται σε αυστηρό κυτταρικό έλεγχο. Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης αποτελούν το σήμα για τη μείωση του ρυθμού έκφρασης του n-LDL υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ μειωμένα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης σηματοδοτούν την αύξηση του ρυθμού έκφρασης του n-LDL υποδοχέα. Επομένως, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης επηρεάζει ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης του n-LDL υποδοχέα.

Εξαιτίας αυτού του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης ο n-LDL υποδοχέας θεωρείτο ότι δε συμμετείχε στη μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη, αφού τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο εσωτερικό των αφρωδών κυττάρων θα προκαλούσαν αναστολή της έκφρασης του στην κυτταρική επιφάνεια. Παρ'όλα αυτά μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη [292] απέδειξε ότι σε καταστάσεις φλεγμονής στο σπείραμα, αφού ανθρώπινα τα μεσαγγειακά κύτταρα επωαστούν με 5 ng/ml IL-1β ή 50 ng/ml TNF-α, ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης του LDL υποδοχέα μπορεί να απορυθμιστεί, με αποτέλεσμα τον αυξανόμενο ρυθμό έκφρασης του, ως απόκριση στα αυξανόμενα εξωκυτταρικά επίπεδα γηγενούς LDL. Συνεπώς, οι LDL υποδοχείς συμμετέχουν στην μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη μέσω αυξημένης δέσμευσης γηγενούς LDL-χοληστερόλης.

Τα HMCL κύτταρα αποψύχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας 25 cm^2. Στη φάση που τα κύτταρα βρίσκονταν στο 80% της συμβολής τους απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης και τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς FCS (SFM), το οποίο περιέχει 0,2% BSA για 24h ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν. Μετά την παραμονή τους σε SFM, για 24 ώρες τα κύτταρα εκπλένονται με *P*BS και προστίθεται φρέσκο SFM που περιέχει για κάθε δείγμα ξεχωριστά IL-1β σε συγκεντρώσεις: 0 ng/ml, 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml και 15 ng/ml, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση-διέγερση των κυττάρων με IL-1β για 24h.

Μετά από την ολοκλήρωση 24ωρών επώασης-διέγερσης των κυττάρων με IL-1β τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσεως. Στη συνέχεια τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με IL-1β ξεπλύθηκαν με PBS και απομονώθηκε το ολικού τους RNA.

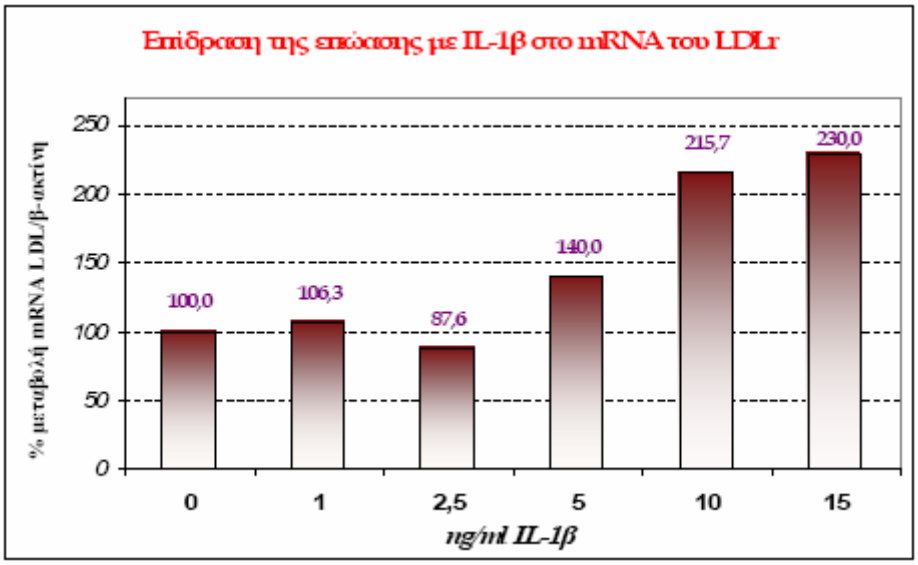
Με RT-PCR δημιουργήθηκε και πολλαπλασιάστηκε το c-DNA του nLDL υποδοχέα και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το

γονίδιο της β-ακτίνης. Η β-ακτίνη αποτελεί γονίδιο βασικής λειτουργίας του κυττάρου, του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή από δείγμα σε δείγμα. Συνεπώς, χρησιμοποιείται για να κανονικοποιηθούν οι τιμές της έντασης των ταινιών του γονιδίου που μελετάμε, εξαλείφοντας έτσι σφάλματα στους υπολογισμούς λόγω της διαφορετικής απόδοσης σε cDNA και DNA κατά την αντίδραση RT-*P*CR από δείγμα σε δείγμα. Η περιγραφή των μεθόδων αναφέρεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5.

Μετά την RT-PCR για τον υποδοχέα της nLDL και για την β-ακτίνη στις συνθήκες που αναφέρονται στις μεθόδους, γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων και χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο. Οι ταινίες που προκύπτουν έχουν το μέγεθος που προβλέπεται από τη θέση των αντίστοιχων εναρκτήριων μορίων στο cDNA. Για τον υποδοχέα της nLDL (LDLr) 258 bp και για την β-ακτίνη (β-ακ)1000 bp.

Η ένταση κάθε ταινίας που προέκυψε από την πηκτή ηλεκτροφόρησης ποσοτικοποιήθηκε, μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Gel-pro 3.1. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης και κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5. Για την εκτίμηση της μεταβολής της έκφρασης του n-LDL υποδοχέα ως προς το δείγμα αναφοράς, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως επί % μεταβολή του λόγου LDLr/β-ακτίνης κάθε δείγματος σε σχέση με το λόγο LDLr/β-ακτίνης του δείγματος αναφοράς, που στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν το δείγμα κυττάρων που επωάστηκε με συγκέντρωση IL-1β: 0 ng/ml.

Στο διάγραμμα 6.19 παρουσιάζεται η επίδραση της 24ωρης επώασης των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1β στην έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα.



Διάγραμμα 6.19 Επίδραση της επώασης των HMCL με IL-1β στην έκφραση του mRNA του LDLr.

Τα κύτταρα επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0-1-2,5-5-10-15 ng/ml) IL-1β για 24 ώρες. Στη συνέχεια, απομονώθηκε το RNA των κυττάρων και προσδιορίστηκε η έκφραση του mRNA του LDL υποδοχέα τους με RT-PCR. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την β-ακτίνη και εκφράζονται ως ποσοστιαία μεταβολή του mRNA του LDLr/ β-ακτίνη σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (0 ng/ml IL-1β).

Τα αποτελέσματα που περιέχονται στο ανωτέρω διάγραμμα προέρχονται από πρόδρομα πειράματα. Την θετική επίδραση της IL-1 έχουν δείξει σε προηγούμενη εργασία ο Ruan και οι συνεργάτες του [292], όπου τα 5 ng/ml IL-1β αύξησαν την έκφραση του mRNA του LDLr και μετέτρεψαν κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη κύτταρα, αυξάνοντας την πρόσληψη LDL από αυτά. Τα αποτελέσματα των δικών μας πρόδρομων πειραμάτων, που περιέχονται στο διάγραμμα 6.19, επιβεβαιώνουν την προκαλούμενη από IL-1β αύξηση έκφρασης του mRNA του υποδοχέα των λιποπρωτεϊνών LDL. Η IL-1β σε συγκέντρωση 5 ng/ml προκαλεί αύξηση της έκφρασής του κατά 40%, ενώ τα 10 και τα 15 ng/ml προκαλούν αντίστοιχα αύξηση της τάξης του 115,7% και 130% αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (0 ng/ml).

Κεφάλαιο 7ο
Συζήτηση

Θεωρείται πλέον δεδομένο ότι η Μεσογειακή δίαιτα μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματικό μέτρο πρόληψης καρδιαγγειακών παθήσεων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, πολλοί ερευνητές έχουν συσχετίσει τη Μεσογειακή Διατροφή με βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, με μειωμένο κίνδυνο θρόμβωσης, με βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη, με μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και της καρδιακής κοιλιακής ερεθιστικότητας [1](*άρθρο ανασκόπησης*). Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η Μεσογειακή Δίαιτα συνεισφέρει στη μείωση του ρυθμού θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο [4, 5, 7, 9], του κινδύνου εμφάνισης οξέος επεισοδίου στεφανιαίου συνδρόμου [6, 9] ή εμφράγματος του μυοκαρδίου [8, 9].

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής δίαιτας, στο οποίο αποδίδεται μεγάλο μέρος των ευεργετικών επιδράσεών της για την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι η υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου [28-30]. Το ελαιόλαδο αποτελεί πηγή φαινολικών ενώσεων (*όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το καφεϊκό και κουμαρικό οξύ*), τοκοφερολών και των MFA (*όπως το ελαϊκό οξύ*) [12]. Η Μεσογειακή δίαιτα, πλούσια σε ελαιόλαδο, βελτιώνει τους κύριους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, όπως το λιποπρωτεϊνικό προφίλ, την αιματική πίεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης και το αντιθρομβωτικό προφίλ. Τα μικροσυστατικά του παρθένου ελαιολάδου στον άνθρωπο φαίνεται ότι βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [28-32].

Τα τελευταία χρόνια μια σειρά μελετών επισημαίνουν ότι η αθηροσκλήρυνση και η σπειραματοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρωση» [263, 268]. Στις ομοιότητες της αθηροσκλήρυνσης και της σπειραματοσκλήρυνσης συγκαταλέγονται ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός των λιποειδών, ο συνεχόμενος πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ή μεσαγγειακών κυττάρων που ακολουθεί τον αρχικό τραυματισμό του ενδοθηλίου, ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, η υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η νέκρωση του ιστού και τελικά η σκλήρυνση. Όπως προαναφέρθηκε, η ομοιότητα των εκδηλώσεων των δυο παθήσεων οφείλεται πιθανότατα στο ότι: (**α**) το σπείραμα έχει κύτταρα που ανταποκρίνονται στον τραυματισμό της αρτηρίας (*ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα*), (**β**) στο γεγονός ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα ομοιάζουν των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων σε επίπεδο προέλευσης, ανατομίας, ιστοχημείας και λειτουργικότητας (*δηλ. συσταλτικότητας*) και (γ) στο ότι η βασική σπειραματική μεμβράνη έχει ικανότητα δέσμευσης των λιποπρωτεϊνών πλάσματος [269, 270]. Όποτε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης της αθηροσκλήρυνσης (*ως φλεγμονώδης διαδικασία*) μπορεί να βρει εφαρμογή και στην περίπτωση της σπειραματοσκλήρυνσης [269, 270].

Επειδή τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι τα βασικά κύτταρα του σπειράματος, εμπλέκονται σαφώς στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης. Μάλιστα, έχουν πολλές κοινές ιδιότητες με τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, αφού προσλαμβάνουν τροποποιημένη ή μη LDL και θεωρούνται κομμάτι της νεφρικής βλάβης που μεσολαβείται από λιποειδή [103]. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ο PAF μπορούν να επηρεάσουν την πρόσληψη λιποειδών και φαίνεται ότι μπορούν να μετατρέψουν τα κύτταρα αυτά σε αφρώδη [103, 272]. Τα ενεργοποιημένα από κυτταροκίνες ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα εμφανίζουν τις ακόλουθες αλλαγές: (α) αυξάνουν σε μέγεθος, καθώς διαστέλλονται το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, αυξάνονται τα ελεύθερα ριβοσώματα και πολυσώματα, (β) αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό τους, (γ) αυξάνουν την έκφραση του mRNA της IL-6 μετά από διέγερση με IL-6 ή IL-1 μαζί με IL-6, αλλά και (δ) απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες PAF, TxB_2 και ανιόντος υπεροξειδίου [121]. Οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές, προσομοιάζουν το ρόλο των μεσαγγειακών σε συνθήκες σπειραματοσκλήρυνσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων για τη μελέτη των επιδράσεων του ελαιολάδου στην παθογένεση της σπειραματοσκλήρυνσης.

Από τα μικροσυστατικά του ελαιολάδου, απαντώνται στη βιβλιογραφία μελέτες που εξετάζουν το ελαϊκό οξύ και την βιταμίνη Ε σε μεσαγγειακά κύτταρα. Ο Mishra και συνεργάτες του [305] έδειξαν ότι τα ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ελαϊκό και λινελαϊκό, δεν προκαλούν απόπτωση των κυττάρων, σε αντίθεση με τα κορεσμένα παλμιτικό και στεαρικό οξύ σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, φαίνεται ότι υψηλές δόσεις της βιταμίνης Ε αποδεικνύονται προστατευτικές [307-309] έναντι της σπειραματοσκλήρυνσης, καθώς μειώνουν την ανοσοδραστικότητα του TGF-β σε μεσαγγειακά κύτταρα [311], την αλβουμινουρία και τη σπειραματική υπερδιήθηση σε κάποιες μελέτες [307-309]. Σε μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού, η παρέμβαση με βιταμίνη Ε έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού τους [312-314], της παραγωγής διάφορων τύπων (α-I, III, IV) κολλαγόνου [315-317], των επιδράσεων της οξειδωμένης LDL σε αυτά [315, 318, 319] και της αναστολής της υπεροξείδωσης των λιποειδών [307, 316]. Τέλος, δυο κλινικές μελέτες έδειξαν ότι υψηλές δόσεις βιταμίνης Ε σε διαβητικούς ασθενείς μείωσαν την μικροαλβουμινουρία [320, 321]. Προηγούμενη *in vitro* μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έδειξε ότι τα πολικά λιποειδή ελαιολάδου είναι ισχυροί αναστολείς του PAF, μειώνοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [40]. Σε πιο πρόσφατη *in vivo* της ερευνητικής μας ομάδας χορηγήθηκε σε κουνέλια αθηρογόνος δίαιτα ή αθηρογόνος δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο, πολικά ή ουδέτερα λιποειδή ελαιολάδου για 45 μέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κουνέλια που τράφηκαν με τροφή εμπλουτισμένη σε ελαιόλαδο και πολικά λιποειδή ελαιολάδου εμφάνισαν μικρότερο πάχος αθηρωματικής πλάκας που σχετίστηκε με μειωμένη ικανότητα των αιμοπεταλίων να συσσωρεύονται έναντι του PAF [54]. Από τη στιγμή που ο PAF έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης – συνεισφέρει μεταξύ άλλων και στη ρύθμιση παραγωγής κυτταρινών, σελεκτινών και ιντεγκρινών [324](*άρθρο ανασκόπησης*) – η αναστολή του παρέχει προστασία έναντι της αθηρωμάτωσης και επομένως ίσως έναντι και της σπειραματοσκλήρυνσης.

Στο σημείο αυτό, να τονιστεί η έλλειψη ερευνών στη βιβλιογραφία, που να αφορούν την *in vitro* μελέτη των επιδράσεων του ελαιολάδου σε συνθήκες παρόμοιες με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ή σπειραματική φλεγμονή. Λαμβάνοντας υπόψιν, την ομοιότητα της σπειραματοσκλήρυνσης και της αθηροσκλήρυνσης, αλλά και το πλήθος των ερευνών που αφορούν τις ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου στον περιορισμό της προόδου της αθηροσκλήρυνσης, δοκιμάστηκε η δράση αυτού σε *in vitro* συνθήκες σπειραματικής φλεγμονής. Οπότε, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των πιθανών επιδράσεων του ελαιολάδου σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων, που ύστερα από κατάλληλη διέγερση ώστε να προσομοιάζουν με τις συνθήκες της φλεγμονώδους διαδικασίας.

Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκε διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β, LPS ή PAF. Συγκεκριμένα η διέγερση των κυττάρων έγινε με : (**α**) 10 ng/ml IL-1β (**β**) 0,1 mg/ml LPS και (**γ**) 10^{-6} M PAF. Τα κύτταρα επωάστηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα: 0, 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η IL-1β είναι πιο ισχυρός διεγέρτης από τον LPS και τον PAF (*σειρά ισχυρότερου διεγέρτη:* IL-1β> LPS> PAF). Προτιμήθηκε επομένως η διέγερση των κυττάρων να γίνει με IL-1β που παράγεται από πληθώρα κυττάρων σε παθολογικές καταστάσεις και έχει προ-φλεγμονώδεις δράσεις ενώ ο LPS όντας βακτηριακός πολυσακχαρίτης, δεν προσεγγίζει τις συνήθεις συνθήκες που απαντώνται στον άνθρωπο.

Η IL-1β θεωρείται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στις νεφρικές λειτουργίες. Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, η IL-1β αναστέλλει τη ροή [^{3}H]-χοληστερόλης [102, 103], αυξάνει την παραγωγή της πρωτεΐνης MMP-9 της θεμέλιας ουσίας [104, 105] και αυξάνει τη δραστικότητα του TF [106] που θεωρείται ότι προάγει την φλεγμονή [107]. Επιπλέον, η IL-1β προκαλεί την αύξηση παραγωγής του bFGF, που μεσολαβεί τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων σε απάντηση φλεγμονωδών παραγόντων [108]. Σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού, η IL-1 αυξάνει την παραγωγή ROS [109], την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 [110, 111], διεγείρει τη φωσφολιπάση PLA_2 [112], προκαλεί την έκφραση συνθάσης του NO [113] και αυξάνει τη σύνθεση TxB_2 και PGE_2 μέσω αύξησης της δραστικότητας της COX-1 [114].

Η IL-1 φαίνεται ότι προκαλεί επίσης την έκκριση της IL-6 [100, 115-118] και του MCP-1 [110, 115, 119, 120] από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Η έκκριση της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα διεγερμένα με IL-1 (*ή LPS*), αποδόθηκε σε ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από το cAMP PKA [122], ενώ εμπλέκονται ο NF-κB [325], ο NF-IL6 [118, 325], ο AP-1 [128] και ο IRF-1 [129]. Αφετέρου, η διέγερση της έκκρισης του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ενεργοποιημένα με IL-1 θεωρείται ότι οφείλεται στην οικογένεια των NF-κB πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων [130-136].

Στον πίνακα 7.1 συνοψίζονται μελέτες όπου μεσαγγειακά κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Πίνακας 7.5 Επώαση μεσαγγειακών κυττάρων ανθρώπου ή ποντικού με IL-1β.

Συγγραφέας	Παραπομπή	Κύτταρα	Χρόνος επώασης	Δόση IL-1β	Δράση IL-1β
Ruan XZ et al	[102]	HMCL	24 ώρες	5 ng/ml	↓*ροή chol από τα HMCL στις HDL*
Eberhart W et al	[104]	Rat MC	24 ώρες	2 nM	↑*MMP-9*
Akool El S et al	[105]	Rat MC	20 ώρες	2 nM	↑*MMP-9*
Lang D et al	[106]	HMCL	12 ώρες	0-30 U/ml	↑*TF*
Bohler T et al	[109]	Rat MC	24 ώρες	50 ng/ml	↑*ROS, H_2O_2, υπεροξείδωση λιποειδών, απόπτωση HMCL*
Lee SK et al	[110]	HMCL	3/6/24/48 ώρες	1 ng/ml	↑*MCP-1, RANTES, ICAM-1*
Guo G et al	[111]	HMCL	24 ώρες	10 ng/ml	↑*NF-κB, ICAM-1*
Dorsam G et al	[112]	Rat MC	50 ώρες	100 pM IL-1 + TNF-α	↑*PLA_2*
Guan Z et al	[113]	Rat MC	N/A	100 U/ml	↑*COX-2 (PGE_2)*
Tsai CY et al	[114]	Rat MC	2-24 ώρες	25 ng/ml	↑ *COX-1 (PGE_2, TxB_2)*
Abbott F et al	[116]	HMCL	1-24 ώρες	6 pg/ml	↑*IL-6, IL-8*
Nazakato Y et al	[118]	HMCL	24 ώρες	10 ng/ml IL-1 + 10ng/ml IL-4	↑*IL-6*
Rovin BH et al	[119]	HMCL	18 ώρες	1,1 ng/ml	↑*MCP-1*
Grassl C et al	[122]	Rat MC	24 ώρες	1 ng/ml	↑*IL-6*
Chang JW et al	[130]	HMCL	30 λεπτά	N/A	↑*NF-κB, ενδοκυτταρικά Ca^{2+}, MCP-1*
Lee MJ et al	[132]	HMCL	24 ώρες	250 pg/ml	↑*MCP-1*
Rovin BH et al	[133]	HMCL	1/2 ώρες	1,1 ng/ml	↑*NF-κB, MCP-1*
Lucio-Cazana J et al	[136]	Rat MC	6/24 ώρες	10 ng/ml	↑*MCP-1*
Ruan XZ et al	[292]	HMCL	24 ώρες	5 ng/ml	↑*mRNA LDLr*

N/A: μη διαθέσιμα στοιχεία

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης αρχικά αναζητήσαμε τη βέλτιστη συγκέντρωση για τη διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β, ώστε να εκκρίνεται ικανοποιητική ποσότητα IL-6 και MCP-1. Πραγματοποιήθηκε επομένως επώαση των μεσαγγειακών κυττάρων για 24 ώρες παρουσία 0 – 1 – 2,5 – 5 – 10 και 15 ng/ml IL-1β και μετρήθηκε η έκκριση της IL-6 και του MCP-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι συγκεντρώσεις παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (p<0,000). Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ζευγών των συγκεντρώσεων της IL-1β που δοκιμάστηκαν, εκτός από των 1 με 10 ng/ml IL-1β (p=0,046) και 1 με 15 ng/ml IL-1β (p=0,024). Όσον αφορά την έκκριση του MCP-1 σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση (p≤0,001) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στον εκκρινόμενο MCP-1, μεταξύ των ζευγών των συγκεντρώσεων της IL-1β. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 1 ng/ml IL-1β είναι ικανό να προκαλέσει σημαντική έκκριση και των δυο κυτταροκινών στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Επόμενο στάδιο ήταν να καθοριστεί ο βέλτιστος χρόνος επώασης των κυττάρων με IL-1β. Πραγματοποιήθηκε επομένως πείραμα κινητικής με δύο συγκεντρώσεις IL-1β τα 1 ng/ml και τα 5

ng/ml για να ελέγξουμε αν επηρεάζει η συγκέντρωση της IL-1β την κινητική έκκρισης της IL-6 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Η επώαση των κυττάρων έγινε για 0, 1, 3, 6, 10 και 24 ώρες. Στο τέλος του χρόνου επώασης μετρήθηκε η έκκριση της IL-6 και του MCP-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει διαφορά ανάμεσα στην κινητική έκκρισης της IL-6 και του MCP-1. Όσον αφορά την έκκριση της IL-6 φάνηκε ότι η διέγερση των μεσαγγειακών κυττάρων με IL-1β προκάλεσε αύξηση εντός του χρονικού διαστήματος της μιας ώρας ή οποία ενισχύθηκε μέχρι της 6 ώρες όπου έφτασε σε πλατό. Η συγκέντρωση της IL-1β δεν επηρέασε την κινητική της IL-6, αφού σε κάθε χρονική στιγμή η διαφορά της εκκρινόμενης IL-6 από τα 1 και τα 5 ng/ml IL-1β δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (p>0,068). Αντίθετα η IL-1β προκάλεσε έκκριση του MCP-1 ή οποία είχε τη μορφή κώδωνα με μέγιστο να παρατηρείται στις 6 ώρες. Από τα αποτελέσματα φαίνεται τα 5 ng/ml IL-1β συγκρινόμενα με τα 1 ng/ml IL-1β προκαλούν στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκκρισης του MCP-1 στις 1 (p=0,013), 3 (p=0,045), και 6 ώρες (p=0,035).

Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η IL-1β προκαλεί την έκκριση της IL-6 και MCP-1 από τα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Οι συγκεντρώσεις IL-1β που έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυτές τις μελέτες ποικίλουν από 6 pg/ml μέχρι 10 ng/ml (*βλ. πίνακα 7.1*). Επιπλέον σε αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί χρόνοι επώασης των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων από 30 λεπτά μέχρι και 48 ώρες. Συγκεκριμένα, σε δυο έρευνες [110, 136] μελετήθηκε η έκκριση του MCP-1 μετά από εξάωρη επώαση των κυττάρων με IL-1β, ενώ συνήθως η έκκριση της IL-6 μελετούταν στις 24 ώρες [116, 118, 122]. Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα και με σκοπό να μελετήσουμε την ταυτόχρονη έκκρισή των δυο κυτταροκινών επιλέχθηκε ως χρόνος επώασης των κυττάρων με την IL-1β οι 6 ώρες.

Σε μια παλαιότερη μελέτη, οι Ruan και συνεργάτες, επώασαν ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα με 5 ng/ml IL-1β και υψηλή συγκέντρωση (250 μg/ml) μη τροποποιημένης LDL για 24 ώρες και μελετήθηκε ο σχηματισμός των μεσαγγειακών αφρωδών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η IL-1β σε συγκέντρωση 5 ng/ml, οδηγεί σε σχηματισμό αφρωδών μεσαγγειακών κυττάρων [292]. Η ίδια ερευνητική ομάδα επώασε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, που επισημάνθηκαν με [^{3}H]θυμιδίνη, με 5 ng/ml IL-1β για 24 ώρες, οπότε και εξέτασαν τον πολλαπλασιασμό τους. Φάνηκε ότι η IL-1β σε συγκέντρωση μέχρι 5 ng/ml, δεν προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων [323].

Με σκοπό επομένως να αποφύγουμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από την IL-1β, αλλά και να συνδυάσουμε τα αποτελέσματά μας με αυτά των προηγουμένων μελετών στα ίδια κύτταρα [292, 323], επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5 ng/ml IL-1β ως δόση διέγερσης των μεσαγγειακών κυττάρων.

Να σημειωθεί πως τόσο η IL-6 όσο και ο MCP-1, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες των μεσαγγειακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η IL-6 θεωρείται ένας αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για τα σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα και η ενδοσπειραματική παραγωγή της θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεση της μεσαγγειακής σπειραματονεφρίτιδας στον

άνθρωπο [166-168]. Για το λόγο αυτό, υποστηρίζεται πως τα επίπεδα της IL-6 στα ούρα αποτελούν ένα καλό δείκτη πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων [165], αλλά και της διαβητικής νεφροπάθειας [169]. Σε αρκετούς τύπους ανθρώπινης μεσαγγειακής νεφρίτιδας τα επίπεδα της IL-6 είναι υψηλά, ενώ η συγκέντρωση της IL-6 στα ούρα έχει συσχετιστεί με τη δραστηριότητα της νόσου [170]. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε αν αυτό είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της φλεγμονής. Ο Ihm και οι συνεργάτες του [168] έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη ΙΙ, που εμπλέκεται στην πρόοδο νεφρικών νόσων συμπεριλαμβανομένης και της διαβητικής νεφροπάθειας, αυξάνει την παραγωγή IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, μετά από επώαση 48 ωρών. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (450 mg/dl) μείωσε την παραγωγή της IL-6. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορεί να είναι περίπλοκη και να εξαρτάται από τις τοπικές επιδράσεις της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης ή/ και της αγγειοτενσίνης ΙΙ. Προσομοιάζοντας τη σπειραματική φλεγμονή, ο Massy και συνεργάτες του [171], έδειξαν ότι η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη προκαλεί αύξηση της παραγωγής IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Αύξηση παραγωγής της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει και ο PDGF, που εμπλέκεται και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών [174]. Από την άλλη πλευρά ο Eitner και οι συνεργάτες του [159] αναφέρουν πως η IL-6 δεν αποτελεί *in vivo* τον πιο σημαντικό μεσολαβητή του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων και της υπερπαραγωγής θεμέλιας ουσίας.

Σε αντιδιαστολή με τις πλειοτροπικές και διεγερτικές της ανοσολογικής απάντησης δράσεις, η IL-6 έχει και σαφείς αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Η 48ωρη επώαση με IL-1 και IL-6 μεσαγγειακών κυττάρων ποντικού, ενεργοποιημένων με όρο, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εν μέρει λόγω της ενδογενούς παραγωγής προσταγλαδινών [164]. Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της IL-6 είναι η αναστολή του NF-κΒ [153].

Αφετέρου, θεωρείται ότι ο MCP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ανθρώπινων νεφρικών παθήσεων. Τα επίπεδα του MCP-1 στα ούρα είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με προχωρημένη πάθηση των νεφρών και συσχετίζονται με δείκτες προόδου της νόσου, όπως ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων [221]. Ο MCP-1 πιθανότατα συμμετέχει στην παθογένεση των φλεγμονωδών νεφρικών νόσων, μέσω προσέλκυσης και ενεργοποίησης των μονοκυττάρων. Από *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, προκύπτει ότι η αλληλεπίδρασή τους με αιμοπετάλια οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του MCP-1 από αυτά [225]. Επιπλέον, ο MCP-1 μεσολαβεί την εναπόθεση κολλαγόνου στην πειραματική σπειραματονεφρίτιδα προκαλούμενη από TGF-β, οπότε η έκκρισή του σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει σε σκλήρυνση [222]. Προσομοιάζοντας τη σπειραματική τριχοειδική υπέρταση, αποδείχθηκε ότι η πρόκληση μηχανικής διάτασης σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση παραγωγής του MCP-1, μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ [229, 230]. Η επίδραση αυτή ενισχύθηκε με συνδυασμό της μηχανικής διάτασης, με επώαση των κυττάρων σε υψηλή

συγκέντρωση γλυκόζης (450mg/dl) [229]. Παρόμοια επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, προσομοιάζοντας την διαβητική νεφροπάθεια, έδειξαν και άλλες έρευνες [231, 232]. Ο Wada και οι συνεργάτες του [226] υποστηρίζουν ότι η υπερέκκριση του MCP-1 μπορεί να αποτελεί ένα κοινό ρυθμιστικό μονοπάτι που συμμετέχει στην προοδευτική νεφρική βλάβη, ανεξάρτητα από την αιτία που οδηγεί σε σπειραματοσκλήρυνση και επακόλουθη ανεπαρκή νεφρική λειτουργία.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του ελαιολάδου στις λειτουργίες των διεγερμένων από IL-1β ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων, απομονώθηκαν τα ΟΠΛ του ελαιολάδου με τροποποιημένη κατανομή κατ' αντιρροή και έγινε διερεύνηση της χημικής τους σύστασης. Ο προσδιορισμός του φωσφόρου στο ελαιόλαδο ήταν αρνητικός, κάτι που συνεπάγεται την απουσία φωσφολιποειδών απ' αυτό. Ο προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή έδειξε περιεκτικότητα 37 μg γλυκόζης/ml ΟΠΛ, που υποδεικνύει την ύπαρξη γλυκολιποειδών στο δείγμα. Τέλος, ο προσδιορισμός των φαινολικών έδειξε περιεκτικότητα 46,8 μg γαλλικού οξέος/ml ΟΠΛ και 54,3 μg τυροσόλης/ml ΟΠΛ.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των ΟΠΛ στην έκκριση της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα. ΟΠΛ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ΟΠΛ μπορούν να τροποποιήσουν την έκκριση της IL-6. Συγκεκριμένα η μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,224 ng/ml) και η μικρότερη συγκέντρωση (0,00224 ng/ml) των ΟΠΛ προκάλεσε στατιστικώς σημαντική (p=0,000 και p=0,004 αντίστοιχα) αύξηση της έκκρισης της IL-6 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Η διαφορά μεταξύ τους είναι επίσης στατιστικώς σημαντική (p=0,003). Η μεσαία συγκέντρωση δεν φαίνεται να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την έκκριση της IL-6.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των ΟΠΛ στην προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6 από τα μεσαγγειακά κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε επομένως συνεπώαση των κυττάρων με 5 ng/ml IL-1β και με μια από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ΟΠΛ (0,224 – 0,0224 – 0,00224 ng/ml) για 6 ώρες. Φάνηκε ότι τα ΟΠΛ ελαιολάδου αυξάνουν στατιστικώς σημαντικά συνεργιστικά με την IL-1β, την έκκριση IL-6 μετά από 6 ώρες συνεπώασης. Η αύξηση της έκκρισης της IL-6 φαίνεται να είναι μη δοσοεξαρτώμενη της συγκέντρωσης των ΟΠΛ.

Η επίδραση των ΟΠΛ στις λειτουργίες των μεσαγγειακών κυττάρων και στη δράση της IL-1β μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών και σε διαφορετικά επίπεδα (*δράση σε επίπεδο υποδοχέα, σε επίπεδο μεταγωγής σήματος, ή σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης*). Με σκοπό να μελετήσουμε ένα πιθανό διαφορετικό μηχανισμό δράσης τον ΟΠΛ αποφασίστηκε να γίνει προ-επώαση των κυττάρων με ΟΠΛ και στη συνέχεια διέγερση με IL-1β. Πραγματοποιήθηκε επομένως προεπώαση των κυττάρων για 0, 0,5, 2 και 12 ώρες με 0,224 ng/ml ΟΠΛ και ακολούθως είτε επωάστηκαν με τον διαλύτη της IL-1 είτε με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προεπώαση των κυττάρων με ΟΠΛ για 2 ώρες μειώνει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα IL-6 που εκκρίνουν τα μεσαγγειακά κύτταρα, ενώ μετά από 12 ώρες προεπώασης τα επίπεδα IL-6 είναι μη

ανιχνεύσιμα. Η προεπώαση των κυττάρων με ΟΠΛ περιορίζει στατιστικώς σημαντικά την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6. Η προεπώαση διάρκειας 30 λεπτών περιορίζει την έκκριση της IL-6 κατά 23,51%, ενώ οι προεπωάσεις διάρκειας 2 και 12 ωρών κατά 18,69% και 21,90% αντίστοιχα. Όπως φαίνεται η προεπώαση με τα ΟΠΛ είχε ως αποτέλεσμα να μειώσει την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση της IL-6. Η μείωση αυτή δεν φαίνεται να εξαρτάται από το χρόνο προεπώασης αφού δεν υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση.

Είναι φανερό λοιπόν, πως οι διαδικασίες προεπώασης και συνεπώασης επιδρούν διαφορετικά στην έκκριση της IL-6 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα διεγερμένα με IL-1β. Γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα ενεργοποιούνται διαφορετικοί μηχανισμοί σε κάθε μια από τις πειραματικές αυτές διαδικασίες, ώστε να επηρεαστεί ανάλογα η έκκριση της IL-6.

Οι Stalinka και συνεργάτες [326] εξέτασαν τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB, AP-1 και STAT σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HepG2) και ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλιαίας φλέβας (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC). Και οι δυο τύποι κυττάρων διεγέρθηκαν με 10 ng/ml IL-1β (*για να μετρηθεί ο NF-κB και ο AP-1*) ή με 10 ή 25 ng/ml IL-6 (*για να μετρηθεί ο STAT3*). Δέκα λεπτά πριν την ενεργοποίηση με IL-1 ή 5 λεπτά μετά από αυτήν, προστέθηκαν στα κύτταρα καθένα από τα 21 διαφορετικά εκχυλίσματα εδώμιμων φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν για 60 λεπτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 8 από τα 21 εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν μείωσαν σημαντικά την ενεργοποίηση του NF-κB ή/ και του AP-1, αλλά δεν επηρέασαν την εξαρτώμενη από IL-6 ενεργοποίηση του STAT3. Η εκτιμώμενη βιολογική δραστικότητα, όπως υποστηρίζουν οι συγγραφείς, εξαρτάται εν μέρει από τον τύπο των κυττάρων στόχων (HepG2 και HUVEC), αλλά και από τη σειρά προσθήκης της IL-1 και του φυτικού εκχυλίσματος στα κύτταρα. Κάτι που υποδηλώνει ότι σε κάποιες περιπτώσεις τα ενεργά συστατικά του εκχυλίσματος μπορούν να αναστείλουν τον καταρράκτη σηματοδότησης που προκαλείται από τις κυτταροκίνες, μόνο αν προστεθούν πριν από αυτήν. Επιπλέον, η μειωμένη ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα μπορεί να οφείλεται είτε σε τροποποίηση των δομικών συστατικών του, όπως στην περίπτωση της p65 υπομονάδας του NF-κB [327], είτε σε αναστολή του καταρράκτη σηματοδότησης.

Επειδή η διαδικασία της συνεπώασης των ΟΠΛ ελαιολάδου και IL-1β είχε ως αποτέλεσμα την συνεργιστική ενίσχυση έκκρισης της IL-6, δοκιμάστηκε μόνο η διαδικασία προεπώασης των κυττάρων με ΟΠΛ, ώστε να διερευνηθεί η τυχόν ανασταλτική τους δράση στην έκκριση του MCP-1. Πραγματοποιήθηκε επομένως προεπώαση των κυττάρων για 0, 0,5, 2 και 12 ώρες με 0,224 ng/ml ΟΠΛ και ακολούθως είτε επωάστηκαν με τον διαλύτη της IL-1 είτε με 5 ng/ml IL-1β για 6 ώρες. Το εκχύλισμα ΟΠΛ ελαιολάδου, από μόνο του, εμφανίζει τάση μείωσης της βασικής έκκρισης του MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα. Η προεπώαση των 30 min και η ακόλουθη 6ωρη επώαση με το διαλύτη της IL-1β, μειώνει στατιστικώς σημαντικά την έκκριση του MCP-1, ενώ οι προεπωάσεις των

2 και 12 ωρών εμφάνισαν τάση μείωσης. Η προεπώαση των μεσαγγειακών κυττάρων με ΟΠΛ και η μετέπειτα επώαση με IL-1β, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τάσης ενίσχυσης της έκκρισης του MCP-1. Οι προεπωάσεις των 30 λεπτών και 2 ωρών (ΟΠΛ+IL-1β) δεν αύξησαν στατιστικώς σημαντικά την έκκριση του MCP-1, σε αντίθεση με την προεπώαση των 12 ωρών. Αν και τα ζεύγη των ΟΠΛ/IL-1β για τα διαφορετικά διαστήματα προεπώασης δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικές διαφορές, είναι φανερή η τάση ενίσχυσης της έκκρισης του MCP-1, υπό αυτές τις συνθήκες, με την πάροδο του χρόνου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ΟΠΛ σε συνθήκες προεπώασης εμφάνισαν τάση ενίσχυσης της προκαλούμενης από IL-1β έκκρισης του MCP-1, υποθέτουμε την ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού που μεσολαβεί την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση του MCP-1, σε σχέση με την αντίστοιχη της IL-6.

Οι Lucio-Cazana και συνεργάτες, εξέτασαν την επίδραση του all trans ρετινοϊκού οξέος (ATRA), ενός αναστολέα του AP-1, στη βασική και την προκαλούμενη από IL-1β έκκριση του MCP-1 από μεσαγγειακά κύτταρα ποντικού [136]. Προεπώασαν τα κύτταρα με ATRA για 2 ώρες και στη συνέχεια τα επώασαν για 6 και 24 ώρες με 10 ng/ml IL-1β. Η προεπώαση με ATRA ανέστειλε τη βασική παραγωγή mRNA του MCP-1, αλλά δεν επηρέασε την προκαλούμενη από IL-1β έκφρασή του. Τα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν φαρμακολογικοί και γενετικοί αναστολείς, υπέδειξαν ότι η προκαλούμενη από IL-1β αύξηση έκκρισης του MCP-1 εξαρτάται από τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB και είναι ανεξάρτητη του AP-1. Αντίθετα, φαίνεται πως η βασική έκκριση του MCP-1 εξαρτάται τόσο από τον NF-κB όσο και από τον AP-1. Το ATRA ανέστειλε την επίδραση του AP-1 στη βασική έκκριση του MCP-1, αλλά δεν ανέστειλε τη δράση του NF-κB. Όποτε μπορούμε να υποθέσουμε ότι και η διαφορά που παρατηρείται στα αποτελέσματα μας, μεταξύ βασικής και προκαλούμενης από IL-1β έκκρισης του MCP-1, μετά από προεπώαση των κυττάρων με ΟΠΛ, μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν ότι η IL-1β διεγείρει *in vitro* την παραγωγή τόσο της κυτταροκίνης IL-6 όσο και της χημειοκίνης MCP-1 από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Γεγονός που υποδεικνύει ότι τα σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα, σε συνθήκες φλεγμονής, παράγουν προφλεγμονώδεις παράγοντες που ενισχύουν την ένταση της διαδικασίας αυτής. Η προκαλούμενη από IL-1β αύξηση έκκρισης του MCP-1 συνεπάγεται πιθανότατα, σε επίπεδο νεφρού, τη χημειοτακτική προσέλκυση μονοκυττάρων και τη μετανάστευσή τους στον υποενδοθηλιακό χώρο των σπειραματικών τριχοειδών.

Η δοκιμασία επώασης των διεγερμένων από IL-1β κυττάρων με ΟΠΛ ελαιολάδου έδωσε διφορούμενα αποτελέσματα. Η έκκριση της IL-6 περιορίστηκε μόνο μετά από προεπώαση των κυττάρων με ΟΠΛ, ενώ αυξήθηκε συνεργιστικά από την συνεπώαση με IL-1β και ΟΠΛ. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε την ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκκριση της IL-6 στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, η προκαλούμενη έκκριση του MCP-1 συνεισφέρει στη συσσώρευση μονοκυττάρων/ μακροφάγων στις εστίες τις φλεγμονής, η βασική έκκριση αυτού παρατηρείται σε συγκεκριμένους μη φλεγμαίνοντες ιστούς, όπως το βρογχικό επιθήλιο και το νεφρικό σπείραμα [328]. Επειδή απαντώνται μακροφάγα στους ιστούς αυτούς, η μικρή βασική έκκριση MCP-1 μπορεί να συνεισφέρει στη συνεχή προσέλκυση μονοκυττάρων στις περιοχές αυτές. Στην παρούσα μελέτη, η προκαλούμενη από την IL-1β έκκριση του MCP-1 ενισχύθηκε μετά από προεπώαση των κυττάρων με ΟΠΛ, αντίθετα με την έκκριση της IL-6 που μειώθηκε. Το γεγονός ότι τα ΟΠΛ μειώνουν τη βασική έκκριση του MCP-1, μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση από τα ΟΠΛ σε σχέση με την IL-1β. Από τα αποτελέσματα των Lucio-Cazana και συνεργατών [136], μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα ΟΠΛ ενδεχομένως να αναστέλλουν την ενεργοποίηση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα, όπως ο AP-1, που δεν εξαρτάται από την IL-1β. Μπορεί, δηλαδή, να ενεργοποιούνται διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες από τα ΟΠΛ σε σχέση με την IL-1β, ώστε να προκύπτει και διαφορετικό αποτέλεσμα στην έκκριση του MCP-1 από τα μεσαγγειακά κύτταρα.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα 0,224 ng/ml ΟΠΛ αντιστοιχούν σε 0,5793 μl ελαιολάδου, που αντιστοιχεί περίπου στο 11,58% της ποσότητας ΟΠΛ που περιέχεται σε ένα μικρό κουτάλι ελαιόλαδο (όγκου 5 ml), η ποσότητα αυτή υπερκαλύπτεται από ένα μεσογειακό πρότυπο διατροφής πλούσιο σε ελαιόλαδο. Οπότε, η όποια ευεργετική επίδραση στις λειτουργίες των μεσαγγειακών κυττάρων είναι εύκολο να επιτευχθεί στα πλαίσια ενός ισορροπημένου διαιτολογίου που ακολουθεί το πρότυπο της μεσογειακής διατροφής.

Δεδομένων των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη, είναι αναγκαία η διερεύνηση των μηχανισμών που μεσολαβούν στην έκκριση της IL-6 και του MCP-1 σε διεγερμένα από κυτταροκίνες ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, καθώς επίσης και των μηχανισμών που ενεργοποιούνται παρουσία των ΟΠΛ ελαιολάδου. Η διερεύνηση του καταρράκτη μεταγωγής σήματος, που καταλήγει στην ενεργοποίηση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα ως απάντηση στην παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών, θα βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης. Η χρήση συστατικών με ικανότητα να εμποδίζουν τη μεταγωγή σήματος, που οδηγεί σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της μεσολαβούμενης από κυτταροκίνες οξείας και χρόνιας φλεγμονής. Επίσης, ίσως να ήταν χρήσιμο επόμενο βήμα η χορήγηση των ΟΠΛ σε πειραματόζωα, ώστε να μετρηθούν τα επίπεδα MCP-1 και IL-6 στο σπείραμα και να συνεκτιμηθεί η αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες, που ενδεχομένως εμπλέκονται στη διαδικασία της νεφρικής βλάβης. Η εφαρμογή ανταγωνιστών της δράσης των κυτταροκινών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική εναλλακτική θεραπεία σε πειραματικά μοντέλα σπειραματικών παθήσεων [329], οπότε ίσως να μπορεί αποτελέσει μια πιο εξειδικευμένη αντιμετώπιση της ανθρώπινης σπειραματονεφρίτιδας.

Επίδραση μικροθρεπτικών συστατικών της Μεσογειακής Δίαιτας στην έκκριση κυτταροκινών και στην έκφραση υποδοχέων λιποπρωτεϊνών από ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα.

Περίληψη

Θεωρητικό Υπόβαθρο: Η σπειραματοσκλήρυνση είναι το κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό στις περισσότερες νεφρικές παθήσεις και σχετίζεται άμεσα με την εξέλιξη αυτών σε νεφρική ανεπάρκεια. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι η σπειραματοσκλήρυνση και η αρτηριοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο όρος «σπειραματική αθηροσκλήρυνση». Τα μεσαγγειακά αποτελούν τα κύρια κύτταρα του σπειράματος και εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της βλάβης. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (PAF, IL-1, TNF-α) μπορούν να προκαλέσουν τη δυσλειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην εξέλιξη της βλάβης. Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της δράσης των πολικών λιποειδών ελαιολάδου στις φλεγμονώδεις διεργασίες των ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων.

Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (HMCL), η οποία διατηρεί τα ίδια χαρακτηριστικά με τα πρωτογενή μεσαγγειακά κύτταρα. Προσδιορίστηκε η έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1, με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELIZA), και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την κυτταρική πρωτεΐνη (μέθοδος Bradford). Τα επίπεδα mRNA του LDLr μετρήθηκαν με RT-PCR και κανονικοποιήθηκαν ως προς την β-ακτίνη. Τα ολικά πολικά λιποειδή (ΟΠΛ) ελαιολάδου εκχυλίστηκαν με τροποποιημένη κατανομή κατ'αντιρροή και πραγματοποιήθηκαν χημικοί προσδιορισμοί.

Αποτελέσματα: Βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες έκκρισης της IL-6 και του MCP-1 ύστερα από διέγερση με IL-1β στα HMCL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επώαση με IL-1β (5 ng/mL) προκαλεί έκκριση του MCP-1 και της IL-6 μετά από 1 και 3 ώρες αντίστοιχα. Τα ΟΠΛ φαίνεται ότι επηρεάζουν την δράση της IL-1β με διαφορετικούς μηχανισμούς αφού συν-επώαση των κυττάρων με ΟΠΛ και IL-1β είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκκρισης της IL-6 ($p \leq 0{,}001$), ενώ προ-επώαση (0,5-12 ώρες) των κυττάρων με ΟΠΛ και στη συνέχεια επώαση με IL-1β είχε σαν αποτέλεσμα την μερική αναστολή της έκκρισης της IL-6 ($p=0{,}000$). Προ-επώαση 12 ωρών των κυττάρων με ΟΠΛ και στη συνέχεια επώαση με IL-1β είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκκρισης του MCP-1 (p=0,035). Τα ΟΠΛ φαίνεται ότι απουσία διεγέρτη αυξάνουν την έκκριση της IL-6 αλλά αναστέλλουν του MCP-1. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε ότι η IL-1β αυξάνει τα επίπεδα mRNA του LDLr στα HMCL.

Συμπεράσματα: Η IL-1β προάγει την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών από τα HMCL προκαλώντας την έκκριση των κυτταροκινών IL-6 και MCP-1. Τα πολικά λιποειδή ελαιολάδου μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση της με διαφορετικούς μηχανισμούς εκδηλώνοντας πιθανώς προστατευτικό ρόλο.

Effect of Mediterranean diet micronutrients on cytokines secretion and lipoprotein receptors expression in human mesangial cells

Summary

Background: Glomerulosclerosis is the common pathological feature of most renal diseases and it is directly associated with end stage renal disease. In recent years, it has been observed that glomerulosclerosis and arteriosclerosis share common histological features and the term "glomerular atherosclerosis" has been proposed. Mesangial cells constitute primary glomerular cells and they are implicated in the progression of renal injury. Former studies have shown that proinflammatory mediators (PAF, IL-1, TNF-α) can cause the dysregulation of mesangial cells, which participate in detriment progression. Many studies have revealed the beneficial role of the Mediterranean diet in various pathological conditions. The aim of the present study is to investigate the effects of olive oil polar lipids (TPL) in human mesangial cells inflammatory processes.

Methods: A human mesangial cell line (HMCL) was used possessing the same characteristics as primary mesangial cells. Mesangial cells secretion of IL-6 and MCP-1 was determined by using Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) and results were normalised to cell protein (Bradford assay). LDLr mRNA levels were measured by using RT-PCR and they were normalised to mRNA beta-actin levels. TPL were extracted from olive oil by using counter current distribution extraction procedure and chemical determinations took place.

Results: The optimum conditions for IL-1beta induced secretion of IL-6 and MCP-1 by HMCL were determined. Results showed that cell incubation with 5 ng/ml IL-1beta induces MCP-1 and IL-6 secretion after 1 and 3 hours respectively. It seems that TPL affect IL-1beta actions on HMCL with different mechanisms since coincubation with TPL and IL-1beta resulted in enhanced levels of IL-6 ($p \leq 0.001$) while proincubation (for 0.5-12 hours) and subsequent incubation with IL-1beta resulted in partial suspension of IL-6 secretion ($p < 0.000$). Proincubation of HMCL for 12 hours with TPL and subsequent incubation with IL-1beta enhanced MCP-1 secretion ($p = 0.035$). TPL alone increased IL-6 and decreased MCP-1 levels. In addition, it was confirmed that IL-1beta increases LDLr mRNA in HMCL.

Conclusion: IL-1beta promotes the production of pro-inflammatory mediators by HMCL, inducing IL-6 and MCP-1 secretion. TPL of olive oil can modify IL-1beta actions with different mechanisms, implying a potentially beneficial role.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Panagiotakos, D.B., et al., *Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review.* Med Sci Monit, 2004. **10**(8): p. RA193-8.
2. Simopoulos, A.P., *The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence.* J Nutr, 2001. **131**(11 Suppl): p. 3065S-73S.
3. Trichopoulou, A., et al., *Cancer and Mediterranean dietary traditions.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(9): p. 869-73.
4. Renaud, S., et al., *Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease.* Am J Clin Nutr, 1995. **61**(suppl): p. 1360s-7s.
5. Kok, F.J. and Kromhout, D., *Atherosclerosis--epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet.* Eur J Nutr, 2004. **43 Suppl 1**: p. I/2-5.
6. Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., and Chrysohoou, C., *The role of traditional Mediterranean-type diet and lifestyle, in the development of acute coronary syndromes: preliminary results from cardio2000 study.* Eur J Pub Health, 2002. **1-2**: p. 7-11.
7. Trichopoulou, A., Costacou, T., and Bamia, C., *Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population.* N Engl J Med, 2003. **348**: p. 2599-608.
8. Martinez-Gonzalez, M.A., et al., *Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score.* Eur J Nutr, 2002. **41**(4): p. 153-60.
9. De Lorgeril, M., et al., *Mediterranean a-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease.* Lancet, 1994. **343**(1454-9).
10. Perez-Jimenez, F., Mata, P., and Lopez-Miranda, J., *Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol.* Atherosclerosis, 2002. **163**: p. 385-98.
11. Fuentes, F., et al., *Mediterranean and low fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men.* Am Intern Med, 2001. **134**: p. 1115-9.
12. Kris-Etherton, P.M., et al., *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer.* Am J Med, 2002. **113 Suppl 9B**: p. 71S-88S.
13. Anderson, J.W., et al., *Whole grain foods and heart disease risk.* J Am Coll Nutr, 2000. **19**: p. 291S-9S.
14. Brown, L., et al., *Cholesterol lowering effects of dietary fiber: a meta analysis.* Am J Clin Nutr, 1999. **69**: p. 30-42.
15. Arichi, H., et al., *Effects of stilbene components of the roots of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. on lipid metabolism.* Chem Pharm Bull, 1982. **30**: p. 1766-70.
16. Kimura, Y., Okuda, H., and Kubo, M., *Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes.* J Ethnopharmacol, 1995. **45**: p. 131-9.
17. Fragopoulou, E., et al., *Separation of biologically active lipids from red wine.* J Agric Food Chem., 2000. **48**: p. 1234-8.
18. Visioli, F. and Galli, C., *The role of antioxidants in the Mediterranean diet.* Lipids, 2001. **36 Suppl**: p. S49-52.
19. Eastwood, M.A., *Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease?* Qjm, 1999. **92**(9): p. 527-30.
20. Arab, L. and Steck, S., *Lycopene and cardiovascular disease.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**: p. 1691S-5S.
21. Alarcon de la Lastra, C., et al., *Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil.* Curr Pharm Des, 2001. **7**: p. 933-50.
22. Moreno, J.J. and Mitjavila, M.T., *The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review).* J Nutr Biochem, 2003. **14**(4): p. 182-95.
23. Visioli, F. and Galli, C., *Antiatherogenic components of olive oil.* Curr Atheros Reports, 2001. **3**: p. 64-7.
24. Boskou, D., *Olive oil: chemistry and technology*. 1996: Illinois.

25. Owen, R.W., et al., *Olives and olive oil in cancer prevention.* Eur J Cancer Prev, 2004. **13**(4): p. 319-26.
26. Perona, J.S., Cabello-Moruno, R., and Ruiz-Gutierrez, V., *The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function.* J Nutr Biochem, 2006. **in press**.
27. Tuck, K.L. and Hayball, P.J., *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects.* J Nutr Biochem, 2002. **13**: p. 634-44.
28. Ding, E.L. and Mozaffarian, D., *Optimal dietary habits for the prevention of stroke.* Semin Neurol, 2006. **26**(1): p. 11-23.
29. Carrero, J.J. and Grimble, R.F., *Does nutrition have a role in peripheral vascular disease?* Br J Nutr, 2006. **95**(2): p. 217-29.
30. Perez-Jimenez, F., *International conference on the healthy effect of virgin olive oil.* Eur J Clin Invest, 2005. **35**(7): p. 421-4.
31. Wahle, K.W., et al., *Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention.* Lipids, 2004. **39**(12): p. 1223-31.
32. Pattison, D.J., Harrison, R.A., and Symmons, D.P., *The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review.* J Rheumatol, 2004. **31**(7): p. 1310-9.
33. De la Cruz, J.P., et al., *Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol.* Thrombosis Research, 2000. **100**: p. 305-15.
34. Colomer, R. and Menendez, J.A., *Mediterranean diet, olive oil and cancer.* Clin Transl Oncol, 2006. **8**(1): p. 15-21.
35. Hashim, Y.Z., et al., *Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer.* Nutr Rev, 2005. **63**(11): p. 374-86.
36. Aguas, F., et al., *Prophylaxis approach to a-symptomatic post-menopausal women: breast cancer.* Maturitas, 2005. **52**(1): p. S23-31.
37. Visioli, F. and Galli, C., *The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings.* Nutr Rev, 1998. **56**: p. 142-7.
38. Mensink, R.P. and Katan, M.B., *Effect of dietary fatty acids on serun lipids and lipoproteins.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1992. **12**: p. 911-9.
39. Kelly, C.M., Smith, R.D., and Williams, C.M., *Dietary monounsaturated fatty acids and haemostasis.* Proc Nutr Soc, 2001. **60**(2): p. 161-70.
40. Karantonis, H.C., Antonopoulou, S., and Demopoulos, A., *Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils: comparison between olive oils and others.* J Agric Food Chem., 2002. **50**: p. 1150-60.
41. Reimund, J.M., et al., *In vitro modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions.* Clin Nutr, 2004. **23**(6): p. 1324-32.
42. Marquez Martin, A., et al., *Supressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages.* Free Radic Res, 2006. **40**(3): p. 295-302.
43. Visioli, F., et al., *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil costituents.* Atherosclerosis, 1995. **117**: p. 25-32.
44. Visioli, F., Bellomo, G., and Galli, C., *Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**: p. 60-4.
45. Carr, A., Tijerina, T., and Frei, B., *Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine- dependent modifications of low density lipoprotein.* Biochem J, 2000. **346**: p. 491-9.
46. Manna, C., et al., *Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damage.* J Nutr Biochem, 1999. **10**: p. 159-65.
47. Deiana, M., et al., *Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol.* Free Rad Biol Med, 1999. **20**: p. 762-9.
48. Petroni, A., et al., *Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive derived phenol identified by mass spectrometry.* Thrombosis Research, 1997. **87**(3): p. 315-22.
49. Visioli, F., Bellosta, S., and Galli, C., *Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages.* Life Sci, 1998. **62**: p. 541-6.

50. Carluccio, M.A., et al., *Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**: p. 622-9.
51. Miles, E.A., Zoubouli, P., and Calder, P.C., *Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures.* Nutrition, 2005. **21**(3): p. 389-94.
52. Turner, R., et al., *Antioxidant and anti-athirogenic activities of olive oil phenolics.* Int J Vitam Nutr Res, 2005. **75**(1): p. 61-70.
53. Bitler, C.M., et al., *Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity.* J Nutr, 2005. **135**: p. 1475-9.
54. Karantonis, H.C., et al., *In vivo antiatherogenic properties of oilve oil and its constituents lipid classes in hyperlidemic rabbits.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**: p. 174-85.
55. Leite, M.S., et al., *Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet.* Shock, 2005. **23**(2): p. 173-8.
56. Sadeghi, S., Wallace, F.A., and Calder, P.C., *Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice.* Immunology, 1999. **96**(3): p. 404-10.
57. El Seweidy, M.M., et al., *Dietary fatty acid unsaturation levels, lipoprotein oxidation and circulating chemokine in experimentally induced atherosclerotic rats.* J Pharm Pharmacol, 2005. **57**(11): p. 1467-74.
58. Mata, P., et al., *Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cells DNA synthesis.* Atheroscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**: p. 2088-95.
59. Ramirez-Tortoza, M.C., et al., *Extra virgin oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease.* J Nutr, 1999. **129**: p. 2177-83.
60. Yaqoob, P., et al., *Effect of olive oil on immune function in middle aged men.* Am J Clin Nutr, 1998. **67**: p. 129-35.
61. Tappia, P.S. and Grimble, R.F., *The relationship between altered membrane composition, eicosanoids and TNF-induced IL1 and IL6 production in macrophages of rats fed fats of different unsaturated fatty acid composition.* Mol Cell Biochem, 1996. **165**(2): p. 135-43.
62. Yaqoob, P. and Calder, P.C., *Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages.* Cell Immunol, 1995. **163**: p. 120-8.
63. Wallace, F.A., Miles, E.A., and Calder, P.C., *Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages.* Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1374-9.
64. Visioli, F., Poli, A., and Gall, C., *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.* Med Res Rev, 2002. **22**(1): p. 65-75.
65. Visioli, F., et al., *Olive oil phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking oxidative stress.* Circulation, 2000. **102**: p. 2169-71.
66. Visioli, F., et al., *Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**: p. 797-99.
67. Rodriguez-Rodriguez, R., et al., *Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in orujo olive oil on rat aorta.* Br J Nutr, 2004. **92**: p. 635-42.
68. Davison, A. and Cameron, G., *The Kidney*, in *Oxford textbook of clinical nephrology*, Grunfielled, G.P., Editor. 1998.
69. Abul-Ezz, S.A., et al., *Στοιχεία ανατομικής και φυσιολογίας νεφρών*, in *Cecil Παθολογία*, Andreoli, T.E., et al., Editors. 2000, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας: Αθήνα. p. 225-34.
70. Ellis, H., *Το ουροποιητικό σύστημα*, in *Clinical anatomy, a revision and applied anatomy for clinical students*. 1995, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνος: Αθήνα. p. 111-123.
71. Vander, A., et al., *Οι νεφροί, η ρύθμιση του νερού και των ανόργανων ιόντων*, in *Human Physiology, The mechanisms of body function*, Vander, A., Editor. 2001, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης: Αθήνα. p. 675-733.
72. Schlondorff, D., *Roles of the mesangium in glomerular function.* Kidney International, 1996. **49**: p. 1583-5.

73. Sopiano, P., *Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β-receptor mutant mice.* Genes Develop, 1994. **8**: p. 1888-96.
74. Lingappa, V.R., *Παθήσεις των νεφρών*, in *Cecil Παθολογία*, Mc Phee, S. and Moutsopoulos, C., Editors. 2000, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας: Αθήνα. p. 571-603.
75. Johnson, R.J. and Fefeehally, J., *Comprehensive Clinical Nephrology*. 2000, London.
76. Ιατρού, *Παθογενετικοί μηχανισμοί του νεφρού.* Ελληνική Νεφρολογία, 1996. **8**: p. 229-36.
77. Vleming, L.J., Bruijn, J.A., and van Es, L.A., *The pathogenesis of progressive renal failure.* The Netherlands J Med, 1999. **54**: p. 114-128.
78. Stahl, R.A., et al., *The platelet activating factor receptor antagonist WEB 2170 improves glomerular hemodynamics and morphology in proliferative model of mesangial cell injury.* J Am Soc Nephrol, 1991. **2**: p. 37-44.
79. Γούμενος, Δ. and Καλλιακμάνη, Π. *Σπειραματική βλάβη και οδοί προς αποκατάσταση της ή προς ίνωση του νεφρικού ιστού.* Ελληνική Νεφρολογία, 2001. **13**(1): p. 31-9.
80. El Nahas, A.M., *Glomerulosclerosis: intrinsic and extrinsic pathways.* Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**: p. 773-7.
81. Noronha, I.L., Fujihara, C.K., and Zatz, R., *The inflammatory compenent in progressive renal disease - are interventions possible?* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**: p. 363-8.
82. Gouser, W.G., *Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis.* Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(1): p. 10-5.
83. Hale, L.P. and Haynes, B.F., *Overview of development and function of lymphocytes.* IN: Basic Principles and Clinical Correlates, 1999(Eds JI Gallin and R Snyderman, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia): p. 119-35.
84. Rang, H.P. and Dale, M.M., *Pharmacology.* Churchill Livingstone, 1999: p. 198-225.
85. Cotran, R.S., Kumar, V., and Robbins, S.L., *Pathologic basis of disease.* 1994(WB Saunders Company, Philadelphia): p. 51-92.
86. Kluth, D.C. and Rees, A.J., *New approaches to modify glomerular inflammation.* J Nephrol, 1999. **12**: p. 66-75.
87. Matsukawa, A. and Yoshinaga, M., *Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils.* Inflamm Res, 1998. **47 Suppl 3**: p. S137-44.
88. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial cell-assosiated platelet activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion.* J Cell Biol, 1990. **115**: p. 529-40.
89. Baggliolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature, 1998. **392**: p. 565-8.
90. Dinarello, C., *Biologic basis for interleukin-1 in disease.* Blood, 1996. **87**: p. 2095-147.
91. Cavaillon, J.M., *Cytokines and macrophages.* Biomed Pharmacother, 1994. **48**(10): p. 445-53.
92. El Nahas, A.M., et al., *Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment.* Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 55-62.
93. Iida, H., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**: p. 6560-4.
94. Schocklmann, H.O., Lang, S., and Sterzel, R.B., *Regulation of mesangial cell proliferation.* Kidney Int, 1999. **56**: p. 1199-1207.
95. Abboud, H.E., *Growth factors in glomerulonephritis.* Kidney Int, 1993. **43**: p. 252-67.
96. Buschhausen, L., et al., *Regulation of mesangial cell function by vasodilatory signaling molecules.* Cardiovascular Res, 2001. **51**: p. 463-9.
97. Rosenwasser, L.J., *Biologic activities of IL-1 and its role in human disease.* J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(3): p. 344-50.
98. Auron, P. and Webb, A., *Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels.* Eur Cytokine Netw, 1994. **5**: p. 573-92.
99. Zoja, C., et al., *Interleukin-1 regulates cytokine gene expression in human mesangial cells through the interleukin-1 receptor type-1.* J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(12): p. 1709-15.
100. Zoja, C., Rambaldi, A., and Remuzzi, G., *Interleukin-1 and glomerular mesangial cells.* Ren Physiol Biochem, 1993. **16**(1-2): p. 89-92.
101. Dinarello, C., *The biological properties of interleukin-1.* Eur Cytokine Netw, 1994. **5**: p. 517-31.

102. Ruan, X.Z., et al., *Regulation of lipoprotein trafficking in the kidney: role of inflammatory mediators and transcription factors.* Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 1): p. 88-91.
103. Ruan, X.Z., Varghese, Z., and Moorhead, J.F., *Inflammation modifies lipid-mediated renal injury.* Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**: p. 27-32.
104. Eberhardt, W., et al., *Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways.* J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5788-97.
105. Akool el, S., et al., *Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 4901-16.
106. Lang, D., et al., *Protein kinase C (PKC) dependent induction of tissue factor (TF) by mesangial cells in response to inflammatory mediators and release during apoptosis.* Br J Pharmacol, 2002. **137**(7): p. 1116-24.
107. Chu, A.J., *Tissue factor mediates inflammation.* Arch Biochem Biophys, 2005. **440**(2): p. 123-32.
108. Francki, A., et al., *Autocrine growth regulation of human glomerular mesangial cells is primarily mediated by basic fibroblast growth factor.* Am J Pathol, 1995. **147**(5): p. 1372-82.
109. Bohler, T., et al., *TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers.* Cytokine, 2000. **12**(7): p. 986-91.
110. Lee, S.K., et al., *Chemokines, osteopontin, ICAM-1 gene expression in cultured rat mesangial cells.* J Korean Med Sci, 1998. **13**(2): p. 165-70.
111. Guo, G. and Wang, H., *[Regulative effect of nuclear factor kappa B on the expression of intercellular adhesion molecular-1 in human mesangial cells]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 1998. **78**(4): p. 290-2.
112. Dorsam, G., et al., *Diphenyleneiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A(2) in rat mesangial cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 271-9.
113. Guan, Z., et al., *Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28670-6.
114. Tsai, C.Y., et al., *Proinflammatory cytokines enhance COX-1 gene expression in cultured rat glomerular mesangial cells.* Int Immunopharmacol, 2004. **4**(1): p. 47-56.
115. Zoja, C., et al., *Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells.* Am J Pathol, 1991. **138**(4): p. 991-1003.
116. Abbott, F., et al., *Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8.* Kidney Int, 1991. **40**(4): p. 597-605.
117. Xiong, Z., et al., *[Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma incultured human mesangial cells]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2002. **82**(19): p. 1351-4.
118. Nakazato, Y., et al., *Interleukin (IL)-1 and IL-4 synergistically stimulate NF-IL6 activity and IL-6 production in human mesangial cells.* Kidney Int, 1998. **54**(1): p. 71-9.
119. Rovin, B.H., et al., *The mitogen-activated protein kinase p38 is necesssary for interleukin 1beta-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells.* Cytokine, 1999. **11**(2): p. 118-26.
120. Rovin, B.H. and Tan, L.C., *Role of protein kinase pathways in IL-1-induced chemoattractant expression by human mesangial cells.* Kidney Int, 1994. **46**(4): p. 1059-68.
121. Chen, W.P., Chen, A., and Lin, C.Y., *In vitro effects of interleukins on human mesangial cells: implications for glomerulonephritis.* J Pathol, 1995. **175**(3): p. 327-37.
122. Grassl, C., et al., *Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 1999. **10**: p. 1466-1477.

123. Robson, R.L., Westwick, J., and Brown, Z., *Interleukin-1 induced IL-8 and IL-6 gene expression and production in human mesangial cells is differiantially regulated by cAMP.* Kidney Int, 1995. **48**: p. 1767-77.
124. Matousovic, K., et al., *Inhibitors of cyclic nucleotide phospodiesterase isozymes type-III and type-IV suppress mitogenesis of rat mesangial cells.* J Clin Invest, 1995. **96**: p. 401-10.
125. Satriano, J.A., et al., *Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-γ, tumor necrosis factor-a, IgG aggregates,and cAMP in mouse mesangial cells.* J Immunol, 1993. **150**: p. 1971-8.
126. Satriano, J.A., et al., *Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**: p. 596-603.
127. Matsukasa, T., et al., *Trancription factors NF-IL6 and NF-κB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin-6 and interleukin-8.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 10193-7.
128. Dendorfer, U., Ottgen, P., and Libermann, T.A., *Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostagladins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide.* Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 4443-54.
129. Sanceau, J., et al., *Triggering of thenhuman interleukin-6 gene by interferron-γ and tumor necrosis factor-α in monocytic cells involves cooperation between interferron regulatory factor-1, NF-κB, and Sp1 transcription factors.* J Biol Chem, 1995. **270**: p. 27920-31.
130. Chang, J.W., et al., *Proinflammatory cytokine-induced NF-kappaB activation in human mesangial cells is mediated through intracellular calcium but not ROS: effects of silymarin.* Nephron Exp Nephrol, 2006. **103**(4): p. e156-65.
131. Jalal, D.I. and Kone, B.C., *Src activation of NF-kappaB augments IL-1beta-induced nitric oxide production in mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 99-106.
132. Lee, M.J., et al., *Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway.* J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2557-63.
133. Rovin, B.H., et al., *Modulation of IL-1-induced chemokine expression in human mesangial cells through alterations in redox status.* Cytokine, 1997. **9**(3): p. 178-86.
134. Yokoo, T. and Kitamura, M., *Antioxidant PDTC induces stromelysin expression in mesangial cells via a tyrosine kinase-AP-1 pathway.* Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. F806-11.
135. Rovin, B.H., et al., *Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells.* Kidney Int, 1995. **48**(4): p. 1263-71.
136. Lucio-Cazana, J., et al., *Suppression of constitutive but not Il-1beta-inducible expression of monocyte chemoattractant protein-1 in mesangial cells by retinoic acids: intervention in the activator protein-1 pathway.* J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(4): p. 688-94.
137. Perkins, N., *Achieving transcriptional specificity with NF-κB.* Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**: p. 1433-48.
138. Stylianou, E., et al., *Interleukin 1 induces NFκB through its type I but not type II receptor in lymphocytes.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 15836-41.
139. Lee, S.K., et al., *Exogenous nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha- or interleukin-1-beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells. Role of IkappaB-alpha and cyclic GMP.* Nephron, 2002. **92**(4): p. 780-7.
140. Coletta, I., et al., *Selective induction of MCP-1 in human mesangial cells by the IL-6/sIL-6R complex.* Exp Nephrol, 2000. **8**(1): p. 37-43.
141. Auwardt, R.B., et al., *Regulation of nuclear factor kappaB by corticosteroids in rat mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(9): p. 1620-8.
142. Stylianou, E., et al., *c-Rel and p65 transactivate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells.* Kidney Int, 1999. **56**: p. 873-882.
143. Barton, B.E., *IL-6: Insights into novel biological activities.* Clin Immunology and Immunopathology, 1997. **85**(1): p. 16-20.
144. Saito, M., et al., *Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer gp130, and its regulated expression in vivo.* J Immunol, 1992. **148**: p. 4066-71.
145. Yin, T.e.a., *Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11 mediated signal transduction.* J Immunol, 1993. **151**: p. 2555-61.

146. Jones, S.A., et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease.* Faseb J, 2001. **15**: p. 43-58.
147. Romano, M., Sironi, M., and Toniatti, C., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocytes recruitment.* Immunity, 1997. **6**: p. 315-25.
148. Naka, T., Nishimoto, N., and Kishimoto, T., *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine.* Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S233-42.
149. Yudkin, J.S., Kumari, M., and Humphries, S.E., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* Atherosclerosis, 2000. **148**: p. 209-14.
150. Black, K., Garrett, I.R., and Mundy, G.R., *Chinese hamster ovarian cells transfected with murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice.* Endocrinology, 1991. **128**: p. 2657-9.
151. Standiford, T.J., *Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists.* Curr Pharm Des, 2000. **6**(6): p. 633-49.
152. Baud, L. and Ardaillou, R., *Tumor necrosis factor in renal injury.* Miner Electrolyte Metab, 1995. **21**(4-5): p. 336-41.
153. Ahmed, S. and Ivashkiv, L.B., *Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways.* J Immunol, 2000. **165**: p. 5227-37.
154. Yasukawa, H., et al., *IL-6 induces an antiinflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.* Nature Immunology, 2003. **4**(6): p. 551-6.
155. Deon, D., et al., *Cross talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.* J Immunol, 2001. **167**: p. 5397-403.
156. Kluth, D.C. and Rees, A.J., *Inhibiting inflammatory cytokines.* Semin Nephrol, 1996. **16**(6): p. 576-82.
157. Akerda, D.e.a., *Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lympholytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-a.* Blood, 1993. **81**: p. 2076-84.
158. Solito, E., et al., *IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein.* Cytokine, 1998. **10**(7): p. 514-521.
159. Eitner, F., et al., *Role of interleukin-6 in mediating mesangial cell proliferation and matrix production in vivo.* Kidney Int, 1997. **51**(1): p. 69-78.
160. Karkar, A.M., et al., *Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by interleukin-6.* Kidney Int, 1993. **44**: p. 967-73.
161. Derfalvi, B., et al., *Interleukin-6-induced production of type II acute phase proteins and expression of junB gene are downregulated by human recombinant growth hormone in vitro.* Cell Biol Int, 2000. **24**(2): p. 109-14.
162. Horii, Y., et al., *Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis.* J Immunol, 1989. **143**(12): p. 3949-55.
163. Akutsu, Y., *[Study of correlation between urinary IL-6 level and mesangial lesion in childhood onset IgA nephropathy].* Hokkaido Igaku Zasshi, 1994. **69**(4): p. 686-96.
164. Matsell, D.G., Gaber, L.W., and Malik, K.U., *Cytokine stimulation of prostaglandin production inhibits the proliferation of serum-stimulated mesangial cells.* Kidney Int, 1994. **45**(1): p. 159-65.
165. Hirata, E., et al., *Rapid measurement of urinary IL-6 by ELISA: urinary IL-6 as a marker of mesangial proliferation.* Nippon Jinzo Gakkai Shi, 1994. **36**(1): p. 33-7.
166. Ruef, C., et al., *Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells.* Kidney Int, 1990. **38**(2): p. 249-57.
167. Iwano, M., et al., *Induction of interleukin 6 synthesis in mouse glomeruli and cultured mesangial cells.* Nephron, 1992. **62**(1): p. 58-65.
168. Ihm, C.G., et al., *Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells.* J Korean Med Sci, 2002. **17**(2): p. 208-12.
169. Shikano, M., et al., *Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy.* Nephron, 2000. **85**(1): p. 81-5.
170. Horii, Y., et al., *Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis.* Kidney Int Suppl, 1993. **39**: p. S71-5.

171. Massy, Z.A., et al., *Low-density lipoprotein-induced expression of interleukin-6, a marker of human mesangial cell inflammation: effects of oxidation and modulation by lovastatin.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(2): p. 536-40.
172. Li, H., et al., *Inhibition of lovastatin on proliferation and expression of proinflammatory cytokines in cultured human glomerular mesangial cells.* Chin Med J (Engl), 2003. **116**(9): p. 1366-9.
173. Xiong, Z., et al., *Anti-inflammatory effect of PPARgamma in cultured human mesangial cells.* Ren Fail, 2004. **26**(5): p. 497-505.
174. Roth, M., et al., *Intracellular interleukin 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1312-6.
175. Ruef, C., Kashgarian, M., and Coleman, D.L., *Mesangial cell-matrix interactions. Effects on mesangial cell growth and cytokine secretion.* Am J Pathol, 1992. **141**(2): p. 429-39.
176. Leonard, M., et al., *Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells.* Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1366-77.
177. Moutabarrik, A., Nakanishi, I., and Ishibashi, M., *Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells.* Scand J Immunol, 1994. **40**(2): p. 181-6.
178. Schwarz, M., et al., *IFNgamma induces functional chemokine receptor expression in human mesangial cells.* Clin Exp Immunol, 2002. **128**(2): p. 285-94.
179. Nishida, Y., et al., *Effect of lipoproteins on cultured human mesangial cells.* Am J Kidney Dis, 1997. **29**: p. 919-30.
180. Gomez-Guerrero, C., et al., *Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation.* J Immunol, 1994. **153**(11): p. 5247-55.
181. van den Dobbelsteen, M.E., et al., *Soluble aggregates of IgG and immune complexes enhance IL-6 production by renal mesangial cells.* Kidney Int, 1993. **43**(3): p. 544-53.
182. van den Dobbelsteen, M.E., et al., *Binding of dimeric and polymeric IgA to rat renal mesangial cells enhances the release of interleukin 6.* Kidney Int, 1994. **46**(2): p. 512-9.
183. Moura, I.C., et al., *Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(9): p. 2667-76.
184. Schieren, G., et al., *Fibronectin modulates interleukin 6 and fibronectin synthesis of human glomerular mesangial cells in culture.* Exp Nephrol, 1996. **4**(1): p. 48-55.
185. Shima, Y., et al., *All-trans-retinoic acid inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis in interleukin-6 transgenic mice.* Nephron Exp Nephrol, 2005. **100**(1): p. e54-62.
186. Moriyama, T., et al., *Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 1995. **6**(1): p. 95-101.
187. Kuo, Y.C., et al., *Chinese herbs as modulators of human mesangial cell proliferation: preliminary studies.* J Lab Clin Med, 1998. **132**(1): p. 76-85.
188. Chen, W.P., et al., *Intrarenal infusion of supernatant from cytokine-activated human mesangial cells may cause glomerular damage.* Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei), 1999. **62**(10): p. 657-65.
189. Hartner, A., et al., *Differential regulation of chemokines by leukemia inhibitory factor, interleukin-6 and oncostatin M.* Kidney Int, 1997. **51**(6): p. 1754-60.
190. Granger, R.L., Hughes, T.R., and Ramji, D.P., *Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1501**(2-3): p. 171-9.
191. Suyama, K., et al., *Induction of transcription factor AP-2 by cytokines and prostaglandins in cultured mesangial cells.* Am J Nephrol, 2001. **21**(4): p. 307-14.
192. Bagheri, N., Chintalacharuvu, S.R., and Emancipator, S.N., *Proinflammatory cytokines regulate Fc alphaR expression by human mesangial cells in vitro.* Clin Exp Immunol, 1997. **107**(2): p. 404-9.
193. Wu, S.H., et al., *Lipoxin A4 inhibits TNF-alpha-induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells.* Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 35-46.

194. Gohda, T., et al., *Dilazep hydrochloride, an antiplatelet drug, inhibits lipopolysaccharide-induced mouse mesangial cell IL-6 secretion and proliferation.* Kidney Blood Press Res, 2001. **24**(1): p. 33-8.
195. Kayama, F., et al., *Pro-inflammatory cytokines and interleukin 6 in the renal response to bacterial endotoxin.* Cytokine, 1997. **9**(9): p. 688-95.
196. Benador, N.M. and Girardin, E.P., *Influence of heparin and type-IV collagen on IL-6 synthesis by rat glomerular mesangial cells.* Nephron, 1997. **77**(2): p. 219-24.
197. Rampino, T., et al., *Macrophage-stimulating protein is produced by tubular cells and activates mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 649-57.
198. Heidenreich, S., et al., *Induction of mesangial interleukin-6 synthesis by apoptotic U937 cells and monocytes.* Kidney Int, 1997. **52**(2): p. 318-28.
199. Kuroiwa, T., et al., *CD40 ligand-activated human monocytes amplify glomerular inflammatory responses through soluble and cell-to-cell contact-dependent mechanisms.* J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2168-75.
200. Muraoka, K., et al., *Immunosuppressant FK506 induces interleukin-6 production through the activation of transcription factor nuclear factor (NF)-kappa(B). Implications for FK506 nephropathy.* J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2433-9.
201. Pedreanez, A., et al., *Increased IL-6 in supernatant of rat mesangial cell cultures treated with erythrogenic toxin type B and its precursor isolated from nephritogenic streptococci.* Am J Nephrol, 2006. **26**(1): p. 75-81.
202. Shin, W.S., Szuba, A., and Rockson, S.G., *The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights.* Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 91-102.
203. Giunti, S., et al., *The MCP-1/CCR2 system has direct proinflammatory effects in human mesangial cells.* Kidney Int, 2006. **69**(5): p. 856-63.
204. Luster, A.D., *Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation.* N Engl J Med, 1998. **338**: p. 436-45.
205. Neote, K., et al., *Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells.* J Biol Chem, 1993. **268**: p. 12247-9.
206. Sica, A., et al., *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes.* J Exp Med, 1997. **185**: p. 969-74.
207. Bacon, K.B., et al., *Activation of dual T cell signalling by the chemokine RANTES.* Science, 1995. **269**: p. 1727-30.
208. Hayakawa, K., et al., *Spontaneous activation of the NF-{kappa}B signaling pathway in isolated normal glomeruli.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006.
209. Hisada, Y., Sakurai, H., and Sugaya, T., *Cell to cell interaction between mesangial cells and macrophages induces the expression of monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappaB activation.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(2): p. 309-16.
210. Holdsworth, S.R., Kitching, A.R., and Tipping, P.G., *Chemokines as therapeutic targets in renal disease.* Curr Opin Nephrol Hypertension, 2000. **9**: p. 505-11.
211. Charo, I.F. and Taubman, M.B., *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease.* Circ Res, 2004. **95**(9): p. 858-66.
212. Segerer, S., Nelson, P.J., and Schlondorff, D., *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**: p. 152-76.
213. Luther, S.A. and Cyster, J.G., *Chemokines as regulators of T cell differentiation.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 102-7.
214. Schramm, R. and Thorlacius, H., *Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids.* Inflamm Res, 2004. **53**: p. 644-652.
215. Wan, M.X., et al., *CC chemokines innduce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recriutment in vivo: intermediary role of mast cells.* Br J Pharmacol, 2003. **138**: p. 698-706.
216. Reape, T.J. and Groot, P.H., *Chemokines and atherosclerosis.* Atherosclerosis, 1999. **147**(2): p. 213-25.
217. Bursill, C.A., Channon, K.M., and Greaves, D.R., *The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics.* Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(2): p. 145-9.

218. Boisvert, W.A., *Modulation of atherogenesis by chemokines.* Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(4): p. 161-5.
219. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.* Mol Cell, 1998. **2**: p. 275-81.
220. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.* Nature, 1998. **394**: p. 894-7.
221. Wada, T., et al., *MIP-1a and MCP-1 contribute crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis.* Kidney Int, 1996. **56**: p. 995-1003.
222. Schneider, A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta.* Kidney Int, 1999. **56**: p. 135-44.
223. Wada, A., et al., *Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1).* Faseb J, 1996. **10**: p. 1418-25.
224. Mezzano, S.A., et al., *Overexertion of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy.* Kidney Int, 2000. **57**: p. 147-58.
225. Tanaka, T., et al., *Human platelets stimulate mesangial cells to produce monocyte chemoattractant protein-1 via the CD40/CD40 ligand pathway and may amplify glomerular injury.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(10): p. 2488-96.
226. Wada, T., et al., *Chemokines in renal diseases.* Int Immunopharmacol, 2001. **1**: p. 637-45.
227. Lynn, E.G., Siow, Y.L., and O, K., *Very low-density lipoprotein stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in mesangial cells.* Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1472-83.
228. Di Paolo, S., et al., *Low-density lipoproteins enhance transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) expression induced by cyclosporin in human mesangial cells.* Clin Exp Immunol, 1999. **117**(2): p. 355-60.
229. Gruden, G., et al., *Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via an NF-kappaB-dependent monocyte chemoattractant protein-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(3): p. 688-96.
230. Suda, T., et al., *Pressure-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through activation of MAP kinase.* Kidney Int, 2001. **60**(5): p. 1705-15.
231. Ha, H., et al., *Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(4): p. 894-902.
232. Ihm, C.G., et al., *A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells.* Nephron, 1998. **79**(1): p. 33-7.
233. Janssen, U., et al., *Differential expression of MCP-1 and its receptor CCR2 in glucose primed human mesangial cells.* Nephron, 2002. **92**(4): p. 797-806.
234. Banba, N., et al., *Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy.* Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 684-90.
235. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20309-15.
236. Brown, Z., et al., *IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells.* Kidney Int, 1992. **42**(1): p. 95-101.
237. Kitamura, M., *Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1.* J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1404-11.
238. Satriano, J.A., et al., *Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells.* J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1971-8.
239. Chang, J.W., et al., *C-reactive protein induces NF-kappaB activation through intracellular calcium and ROS in human mesangial cells.* Nephron Exp Nephrol, 2005. **101**(4): p. e165-72.
240. Hagiwara, S., et al., *Eicosapentaenoic acid ameliorates diabetic nephropathy of type 2 diabetic KKAy/Ta mice: involvement of MCP-1 suppression and decreased ERK1/2 and p38 phosphorylation.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(3): p. 605-15.

241. Kanegae, K., et al., *Synergistic induction of monocyte chemoattractant protein-1 by integrins and platelet-derived growth factor via focal adhesion kinase in mesangial cells.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(10): p. 2080-8.
242. Goppelt-Struebe, M. and Stroebel, M., *Synergistic induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by platelet-derived growth factor and interleukin-1.* FEBS Lett, 1995. **374**(3): p. 375-8.
243. Pai, R., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha on mesangial cell MCP-1 expression and monocyte migration: mechanisms mediated by signal transduction.* J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(6): p. 914-23.
244. Plank, C., et al., *Adrenomedullin reduces mesangial cell number and glomerular inflammation in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis.* Kidney Int, 2005. **68**(3): p. 1086-95.
245. Iwamoto, M., et al., *Adrenomedullin inhibits pressure-induced mesangial MCP-1 expression through activation of protein kinase A.* J Nephrol, 2003. **16**(5): p. 673-81.
246. Singhal, P.C., et al., *Matrix-mesangial cell interaction modulates migration of macrophages.* J Investig Med, 1998. **46**(9): p. 453-9.
247. Han, S.Y., et al., *Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1362-72.
248. Ohta, M.Y., et al., *Inhibitory effect of troglitazone on tumor necrosis factor alpha-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human mesangial cells.* Metabolism, 2000. **49**(2): p. 163-6.
249. Watanabe, Y., et al., *Integrins induce expression of monocyte chemoattractant protein-1 via focal adhesion kinase in mesangial cells.* Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 431-40.
250. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis.* J Immunol, 1998. **161**(1): p. 430-9.
251. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., and Egido, J., *Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells.* Kidney Int, 2000. **57**(6): p. 2285-98.
252. Grandaliano, G., et al., *Gamma interferon stimulates monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human mesangial cells.* J Lab Clin Med, 1994. **123**(2): p. 282-9.
253. Grandaliano, G., Valente, A.J., and Abboud, H.E., *A novel biologic activity of thrombin: stimulation of monocyte chemotactic protein production.* J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1737-41.
254. Brenner, B.M., Meyer, T.W., and Hostetter, T.H., *Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: The role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease.* N Engl J Med, 1982. **307**: p. 652-59.
255. Ljutic, D. and Kes, P., *The role of arterial hypertension in the progression of non-diabetic glomerular diseases.* Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(5): p. v28-30.
256. Zoccali, C., Mallamaci, F., and Tripepi, G., *Inflammation and atherosclerosis in End-Stage Renal Disease.* Blood Purif, 2003. **21**: p. 29-36.
257. Martinez-Maldonado, M., *Role of hypertension in the progressive renal disease.* Nephrol Dial Transplant, 2001. **49**(1): p. 72-4.
258. Adelman, R.D., *Obesity and renal disease.* Curr Opin Nephrol Hypertension, 2002. **11**: p. 331-5.
259. Virchow, R., *A more precise account of fatty metamorphosis*. 1860, London: Gryphonham. 366.
260. Moorhead, J.F., et al., *Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulointerstitial disease.* Lancet, 1982. **2**: p. 1309-11.
261. Moorhead, J.F., et al., *Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease.* Lancet, 1982. **2**: p. 1309-11.
262. de Mendoza, S.G., et al., *High density lipoproteinuria in nephrotic syndrome.* Metabolism, 1976. **25**: p. 1143-9.

263. Diamond, J.R. and Karnovsky, M.J., *Focal and segmental glomerulosclerosis: Analogies to atherosclerosis.* Kidney Int, 1988. **33**: p. 917-924.
264. Keane, W.F., et al., *The role of altered lipid metabolism in the progression of renal disease: experimental evidence.* Am J Kidney Dis, 1991. **17**: p. 38-42.
265. Zatz, R., et al., *Aging analbuminemic rats fail to develop focal glomerulosclerosis.* Kidney Int, 1989. **35**: p. 442A.
266. Kasiske, B.L., et al., *Effects of genetic obesity on renal structure and funtion in the Zucker rat.* J Lab Clin Med, 1985. **106**: p. 598-604.
267. Gjone, E., Blomhoff, J.P., and Skarbovik, A.J., *Possible association between an abnormal low density lipoprotein and nephropathy in lecithin cholesterol acyltransferase deficiency.* Clin Chim Act, 1974. **54**: p. 11-8.
268. Keane, W.F., Kasiske, B.L., and O'Donnell, M.P., *Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis.* Am J Nephrol, 1988. **8**: p. 261-71.
269. Latta, H. and Maunsbach, A.B., *Relations of the centrilobular region of the glomerulus to the juxtaglomerular apparatus.* J Ultrastruc Res, 1986. **6**: p. 562-78.
270. Scheinman, J.U., et al., *Human glomerular smooth muscle (mesangial) cells in culture.* Lab Invest, 1976. **34**: p. 150-8.
271. Grone, E.F., Abboud, H.E., and Hohne, M., *Actions of lipoproteins in cultured human mesangial cells: modulation by mitogenic vasoconstrictors.* Am J Physiol, 1992. **263**: p. F686-96.
272. Fragopoulou, E., et al., *Platelet-activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells.* J Lab Clin Med, 2006. **147**(6): p. 281-9.
273. Steinberg, D. and Wiztum, J.L., *Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts.* J Am Med Assoc, 1990. **264**: p. 3947-52.
274. Bhakdi, S., Dorweiler, B., and Kirchmann, R., *On the pathogenesis of atherosclerosis, enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety.* J Exp Med, 1995. **182**: p. 1959-71.
275. Ruan, X.Z., et al., *Minimally modified low density lipoprotein tumour necrosis factor alpha secretion from rat mesangial cells.* Kidney Int, 1995. **48**: p. 595.
276. Quinn, M.T., et al., *Oxidatively modified loy density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **84**: p. 2995-8.
277. Cushing, S.D., Berliner, J.A., and Valente, A.J., *Minimally modified low density liporpoteins induces monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**: p. 5134-8.
278. Rajavashisth, T.B., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins.* Nature, 1990. **344**: p. 254-7.
279. Ku, G., et al., *Induction of interleukin 1 β expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophage by 9-hydroxyoctadedecadienoic acid.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 14183-8.
280. Feingold, K.R., Hardardottir, I., and Grunfeld, C., *Beneficial effects of cytokine induced hyperlidemia.* Z Ernahrungswiss, 1998. **37**(1): p. 66-74.
281. Coritsidis, G., Rifici, V., and Gupta, S., *Preferential binding of oxidized LDL to rat glomeruli in vivo and cultured mesangial cells in vitro.* Kidney Int, 1991. **39**: p. 858-66.
282. Camussi, G., et al., *PAF-induced loss of glomerular anionic charges.* Kidney Int, 1984. **25**: p. 73-81.
283. Prescott, S.M., et al., *Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage--a role for P-selectin and platelet-activating factor.* Jpn Circ J, 1996. **60**: p. 137-41.
284. Sedor Jr, A.H., *Platelet activating factor stimulates oxygen radical release by cultured rat messangial cells.* Kidney Int, 1985. **222A**.
285. Ruiz-Ortega, M., et al., *Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**: p. 1266-75.

286. Jocks, T., et al., *Platelet-activating factor mediates monocyte chemoattractant protein-1 expression in glomerular immune injury.* Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**: p. 37-43.
287. Bussolati, B., et al., *Nitric oxide/platelet activating factor cross-talk in mesangial cells modulates the interaction with leukocytes.* Kidney Int, 2002. **62**: p. 1322-31.
288. Camussi, G., et al., *Involvement of cytokines and platelet-activating factor in renal pathology.* J Lipid Mediat, 1990. **2**: p. S203-13.
289. Liapikos, T.A., et al., *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated.* BDA Lipid Metab, 1994. **1212**: p. 353-60.
290. Marathe, G.K., et al., *Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines.* J Biol Chem, 1999. **274**: p. 28395-404.
291. Anami, Y., et al., *Human beta-migrating very low density lipoprotein induces foam cell formation in human mesangial cells.* Atherosclerosis, 1997. **135**: p. 225-34.
292. Ruan, X.Z., et al., *Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation.* Kidney Int, 2001. **60**: p. 1716-25.
293. Ruan, X.Z., et al., *Human mesangial cells express inducible macrophage scavenger receptor.* Kidney Int, 1999. **56**: p. 440-51.
294. Rossing, P., et al., *Fish oil in diabetic nephropathy.* Diabetes Care, 1996. **19**(11): p. 1214-9.
295. Donadio, J.V., et al., *A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy.* N Engl J Med, 1994. **331**(18): p. 1194-9.
296. Clark, W.F. and Parbtani, A., *Omega-3 fatty acid supplementation in clinical and experimental lupus nephritis.* Am J Kidney Dis, 1994. **23**(5): p. 644-7.
297. Clark, W.F., et al., *Fish oil in lupus nephritis: clinical findings and methological implications.* Kidney Int, 1993. **44**(1): p. 75-86.
298. Svensson, M., et al., *The effect of n-3 fatty acids on plasma lipidds and lipoproteins and blood pressure in patients with CRF.* Am J Kidney Dis, 2004. **44**(1): p. 77-83.
299. Myrup, B., et al., *Lack of effect of fish oil supplementation on coagulation and transcapillary escape rate of albumin in insulin-dependent diabetic patients with diabetic nephropathy.* Scand J Clin Lab Invest, 2001. **61**(5): p. 349-56.
300. Cleland, L.G., et al., *Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1988. **15**(10): p. 1471-5.
301. Jeffery, N.M., et al., *The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid.* Ann Nutr Metab, 1996. **40**(2): p. 71-80.
302. Cano, N.J., et al., *Intradialytic parenteral nutrition: comparison of olive oil versus soybean oil-based lipid emulsions.* Br J Nutr, 2006. **95**(1): p. 152-9.
303. Alberti, K. and Zimmet, P., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its comlications. Part 1: diagnosis and classification of diabetew mellitus provisional report of a WHO consultation.* Diabet Med, 1998. **15**: p. 539-53.
304. Esposito, K., et al., *Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial.* Jama, 2004. **292**(12): p. 1440-6.
305. Mishra, R. and Simonson, M.S., *Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G.* Cardiovasc Diabetol, 2005. **4**(1): p. 2.
306. Carluccio, M.A., et al., *Oleic acid inhibits endothelial activation. A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**: p. 220-8.
307. Kedziora-Kornatowska, K., et al., *Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney.* Nephron Exp Nephrol, 2003. **95**(4): p. e134-43.
308. Koya, D., et al., *Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**: p. 426-35.

309. Koya, D., et al., *d-alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway.* Biofactors, 1998. **7**: p. 69-76.
310. Lee, I.K., et al., *d-alpha tocopherol prevents the hyperglycemia induced activation of DAG-protein kinase C (PKC) pathway in vascular smooth muscle cell by an increase of DAG kinase activity.* Diabetes Res Clin Pract, 1999. **45**: p. 183-90.
311. Craven, P.A., et al., *Effects of supplementation with vitamin E and C on albuminuria, glomerular TGF-beta and glomerular size in diabetes.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**: p. 1405-14.
312. Mune, M., Otani, H., and Yukawa, S., *Effects of antioxidants on kidney disease.* Mech Ageing Dev, 2002. **123**(8): p. 1041-6.
313. Zhang, Y., et al., *Vitamin E inhibits proliferation of primary cultured human mesangial and endothelial cells.* Nephron, 2001. **89**(3): p. 291-6.
314. Otani, H., et al., *Vitamin E treatment of experimental glomerular disease in rats.* Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S66-9.
315. Lee, H.S., *Oxidized LDL, glomerular mesangial cells and collagen.* Diabetes Res Clin Pract, 1999. **45**(2-3): p. 117-22.
316. Trachtman, H., *Vitamin E prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells.* Microvasc Res, 1994. **47**(2): p. 232-9.
317. Trachtman, H., et al., *Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat mesangial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(1): p. 346-52.
318. Saborio, P., et al., *Alpha-tocopherol modulates lipoprotein cytotoxicity in obstructive nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2000. **14**(8-9): p. 740-6.
319. Ozaki, M., et al., *Phospholipase A2 activity in ox-LDL-stimulated mesangial cells and modulation by alpha-tocopherol.* Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S171-3.
320. Hirnerova, E., et al., *Effect of vitamin E therapy on progression of diabetic nephropathy.* Vnitr Lek, 2003. **49**: p. 529-34.
321. Gaede, P., et al., *Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients.* Diabet Med, 2001. **18**: p. 756-60.
322. Sraer, J.D., et al., *Stable cell lines of T-SV40 immortalized human glomerular mesangial cells.* Kidney Int, 1996. **49**: p. 267-70.
323. Ruan, X.Z., et al., *Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells.* Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**: p. 1391-7.
324. Demopoulos, A., Karantonis, H.C., and Antonopoulou, S., *Platelet activating factor - a molecular link between atherosclerosis theories.* Eur J Lipid Sci Technol, 2003. **105**: p. 705-16.
325. Matsusaka, T., et al., *Trancription factors NF-IL6 and NF-κB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin-6 and interleukin-8.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 10193-7.
326. Stalinka, K., et al., *Transcription factors as targets of the anti-inflammatory treatment. A cell culture study with extracts from some Mediterranean diet plants.* J Physiol Pharmacol, 2005. **56**(1): p. 157-69.
327. Garcia-Pineres, A.J., et al., *Cysteine 38 in p65/NF-kappa B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 39713-20.
328. Schreiner, G.F., et al., *Characterization of resident glomelural cells in rat expressing Ia determinants and manifesting genetically restricted interactions with lymphocytes.* J Clin Invest, 1981. **68**: p. 920-31.
329. Ortiz, A., et al., *The potential role of inflammatory and fibrogenic cytokines in the glomerular diseases.* J Lipid Mediat Cell Signal, 1994. **9**(1): p. 55-74.