



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Μεταβολισμός της βιταμίνης D σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα και ρύθμιση του από φυσικές ενώσεις»

Αγγέλη-Τερζίδου Αντωνία-Ευγενία

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Τσακάλωφ Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας (επιβλέπων)
- Λιάκος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Μάρτιος 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

Master Thesis

**“Metabolism of Vitamin D in human hepatocarcinoma cell line and its regulation
by natural compounds”**

Antonia-Eugenia Angeli-Terzidou

Biochemist-Biotechnologist

Advisory Thesis Committee:

- Tsakalof Andreas, Associate Professor of Medical Chemistry (Supervisor)
- Liakos Panagiotis, Associate Professor of Medical Biochemistry
- Speletas Mathaios, Professor of Clinical Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry.

Larissa, 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας, κυρίου Ανδρέα Τσακάλωφ.

Πριν την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω κάποια άτομα που συνέβαλλαν πρακτικά και συναισθηματικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Οι ευχαριστίες μου οφείλουν να ξεκινήσουν από τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Τσακάλωφ Ανδρέα, με τον οποίο συνεργαστήκαμε άριστα στο πλαίσιο της εργασίας μου. Τον ευχαριστώ προσωπικά για τις συμβουλές και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η προσφορά του αγγίζει τόσο το επιστημονικό όσο και το ανθρώπινο κομμάτι.

Οφείλω να ευχαριστήσω και τον Αναπληρωτή καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Λιάκο Παναγιώτη. Οι παρατηρήσεις καθώς και οι συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας βοήθησαν στην πρόοδο και την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστίες οφείλω και στον διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας και καθηγητή Βιοχημείας κ. Σίμο Γεώργιο τόσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στο εργαστήριο και να εμπλουτίσω τις επιστημονικές μου γνώσεις όσο και για τις προσωπικές του παρατηρήσεις που βοήθησαν στην πρόοδο της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση μου σε όλα τα μέλη ΔΕΠ που απαρτίζουν το εργαστήριο Βιοχημείας, η συνεχής δράση των οποίων διατηρεί το εργαστήριο σε υψηλό επιστημονικό επίπεδο. Προσωπικά θα ήθελα να αναφέρω τον αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία και την λέκτορα Βιοχημείας κ. Χαχάμη Γεωργία, τους οποίους θαυμάζω για την επιστημονική τους κατάρτιση και τους οποίους αναζήτησα για χρήσιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Θα ήθελα να ευχηθώ από καρδιάς τα καλύτερα στους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Γκοτινάκου Ιωάννα, Καραγιώτα Αγγελική, Κουκουλά Κρέων, Ταζέ Χρύσα και Υφαντή Άγγελο και στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα. Όλοι μαζί δημιουργήσαμε ένα άρτιο και φιλικό κλίμα συνεργασίας. Προσωπικές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στις απόφοιτους του μεταπτυχιακού προγράμματος Κεχαγιά Ελένη, η οποία αποτέλεσε τον

καθοδηγητή της εργασίας αυτής, καθώς και την Δισερή Κατερίνα, με την οποία πραγματοποιήσαμε μαζί τις μεταπτυχιακές μας σπουδές και υπήρξε ένα φιλικό και ψυχολογικό στήριγμα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να παραλείψω τους γονείς μου, Χρήστο και Δέσποινα, χωρίς του οποίους δεν θα ήμουν σε θέση να πραγματοποιήσω τις σπουδές αυτές. Ήταν πάντα δίπλα μου συναισθηματικά, ψυχικά, καθώς και υλικά για να στηρίξουν τις σπουδές μου και να με βοηθήσουν να προοδεύσω προσωπικά και επαγγελματικά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες επισημαίνουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D. In vitro και in vivo έρευνες υπογραμμίζουν τον ρόλο της βιταμίνης D στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση κ.ά. Η 1,25(OH)₂D, ή αλλιώς καλσιτριόλη, είναι η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης, παράγεται κυρίως στους νεφρούς και δρα με ενδοκρινή τρόπο, αλλά και σε πληθώρα κυττάρων και ιστών στον ανθρώπινο οργανισμό όπου και δρα με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο. Η έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, VDR, καθώς και των ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή και αποικοδόμηση της καλσιτριόλης, CYP27B1 και CYP24A1 αντίστοιχα, σε πληθώρα κυττάρων υποδεικνύει τις πλειοτροπικές δράσεις της βιταμίνης. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των 2 τελευταίων γονιδίων είναι απορυθμισμένη κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων CYP27B1 και CYP24A1 σε καρκινική ηπατική σειρά (Huh7) αποτέλεσε και τον αρχικό στόχο της παρούσας διπλωματικής.

Το γονίδιο CYP24A1 αποτελεί αντικείμενο έντονης μελέτης τα τελευταία χρόνια. Ο ρόλος του στην καρκινογένεση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η αυξημένη του έκφραση σε καρκινικές σειρές και ιστούς και η απευαισθητοποίηση των κυττάρων στις αντικαρκινικές ιδιότητες της βιταμίνης D αποτελούν ενδείξεις για την προ-καρκινική του δράση. Το γεγονός αυτό καθιστά το γονίδιο CYP24A1 ένα πιθανό ογκογονίδιο. Αναστολείς του CYP24A1 είτε σε επίπεδο μεταγραφής είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης μελετώνται από πολλές ερευνητικές ομάδες με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου ημιζωής της 1,25(OH)₂D και την ενίσχυση των ευεργετικών της δράσεων. Μέρος της εργασίας αυτής αποτέλεσε η εύρεση φυσικών ενώσεων που θα δρουν ανασταλτικά στην έκφραση του γονιδίου αυτού. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 4 флаβονοειδή, τα οποία είναι τα εξής: Γενιστεΐνη (Genistein), Καεμπφερόλη (Kaempferol), Βιοχανίνη Α (Biochanin A) και Φορμονονετίνη (Formononetin).

Λέξεις-κλειδιά: 1,25(OH)₂D, VDR, CYP27B1, CYP24A1, флаβονοειδή

ABSTRACT

A large number of epidemiological studies underlie the anticancer properties of Vitamin D. In vitro as well as in vivo studies reveal the *involvement* of vitamin D in cellular proliferation, apoptosis, cell cycle, angiogenesis and more. 1,25(OH)₂D or calcitriol, the active form of vitamin D, is mainly produced in the kidneys and act in an endocrine way, while it can also be produced by several cells and tissues throughout the body and act in an autocrine or paracrine way. Expression of the gene that encodes for the receptor of vitamin D, VDR, as well as the enzymes that catalyze the production and catabolism of calcitriol, CYP27B1 and CYP24A1 respectively, in plethora of tissues unveil the pleiotropic effects of vitamin D. Expression of the genes mentioned above are deregulated in cancer. Investigation of the expression pattern of CYP27B1 and CYP24A1 in human hepatocarcinoma cell line (Huh7) was the primary goal of this research work.

The past few years, CYP24A1 has attracted the attention of the scientific community. The involvement of this gene in carcinogenesis has not been fully elucidated. Increased expression of CYP24A1 in numerous cancer cell lines and tissues as well as the desensitization of cancer cells in the anticarcinogenic action of vitamin D uncover its carcinogenic properties. Based on these evidence, CYP24A1 is considered a potential oncogene. A number of research groups nowadays work on the investigation of transcriptional or protein inhibitors of CYP24A1 to extend the half-life of 1,25(OH)₂D and enhance its beneficial effects. Part of this thesis was the investigation of natural compounds that could act as inhibitors of the transcription of CYP24A1 gene. For this purpose, 4 flavonoids were tested: Genistein, Kaempferol, Biochanin A and Formononetin.

Key words: 1,25(OH)₂D, VDR, CYP27B1, CYP24A1, flavonoids

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό	11
1.2 Βιολογικές δράσεις βιταμίνης D	12
1.2.1 Γενωμικές δράσεις βιταμίνης D	13
1.2.2 Μη γενωμικές δράσεις βιταμίνης D	16
1.3 Ο ρόλος της βιταμίνης D στην υγεία του ανθρώπου	17
1.3.1 Βιταμίνη D και οστική υγεία	17
1.3.2 Βιταμίνη D και διαβήτης	18
1.3.3 Βιταμίνη D και ανοσοποιητικό σύστημα	20
1.3.4 Βιταμίνη D και καρκίνος	20
1.3.4.1 Επιδημιολογικές μελέτες	20
1.3.4.2. Βιοχημικό υπόβαθρο της δράσης της καλσιτριόλης	21
1.4 Η βιταμίνη D ως αντικαρκινικό φάρμακο – Κλινικές δοκιμές	22
1.4.1 VITAL trial	22
1.5 Μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D (CYP24A1 & CYP27B1)	23
1.5.1 CYP27B1 και σύνθεση της 1,25(OH)₂D	23
1.5.2 CYP24A1 και καταβολισμός της 1,25(OH)₂D	24
1.6 Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων CYP27B1 & CYP24A1	25
1.6.1 Ρύθμιση της έκφρασης του CYP27B1	26
1.6.2 Ρύθμιση της έκφρασης του CYP24A1	28
1.7 CYP27B1 & CYP24A1 και παθογένεια	28
1.7.1 CYP27B1 και διαταραχές της υγείας του ανθρώπου	28
1.7.2 CYP24A1 και διαταραχές της υγείας του ανθρώπου	29
1.8 Φυσικές ενώσεις-ρυθμιστές της έκφρασης των ενζύμων CYP27B1 και CYP24A1	30
1.8.1 Genistein	31

1.8.1.1. Δράση genistein.....	31
1.8.1.2 Genistein και διατροφή.....	33
1.8.1.3 Genistein & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1	33
1.8.1.4.Genistein και κλινικές δοκιμές.....	34
1.8.1.5 Συνεργιστικές και άλλες ιδιότητες της genistein.....	34
1.8.2 Kaempferol.....	35
1.8.2.1. Δράση kaempferol	35
1.8.2.2. Kaempferol και διατροφή.....	36
1.8.2.3 Kaempferol & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1	37
1.8.2.4 Kaempferol και κλινικές δοκιμές.....	37
1.8.2.5 Συνεργιστικές και άλλες ιδιότητες της kaempferol	37
1.8.3 Biochanin A	38
1.8.3.1 Δράση Biochanin A.....	38
1.8.3.2. Biochanin A και διατροφή.....	39
1.8.3.3 Biochanin A & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1	39
1.8.3.4 Biochanin A και κλινικές δοκιμές.....	39
1.8.3.5 Biochanin A και συνεργιστικές ιδιότητες	40
1.8.4. Formononetin.....	40
1.8.4.1 Δράση formononetin.....	40
1.8.4.2. Formononetin και διατροφή.....	41
1.8.4.3 Formononetin & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1	41
1.8.4.4 Formononetin και κλινικές δοκιμές.....	42
1.8.4.5 Formononetin και συνεργιστικές ιδιότητες	42
2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ.....	44
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
3.1 Υλικά.....	45

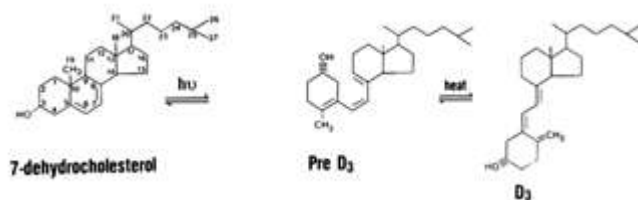
3.1.1 Κυτταρικές σειρές	45
3.1.2. Εκκινητές.....	45
3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιιεργειών	45
3.1.4 Χημικές ενώσεις-αντιδραστήρια	45
3.1.5 Απομόνωση RNA (kit).....	45
3.2 Μέθοδοι	45
3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	45
3.2.2 Απομόνωση ολικού κυτταροπλασματικού RNA.....	46
3.2.4 Σύνθεση cDNA	47
3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, RT-PCR)	48
3.2.6 Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA	49
3.2.7 UHPLC	51
3.2.8 Προκατεργασία των δειγμάτων για ανάλυση UHPLC	54
3.2.9 Στατιστική ανάλυση.....	54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
4.1 Επίδραση της 25(OH)D στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP27B1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	55
4.2 Επίδραση της 1,25(OH) ₂ D στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	56
4.3 Επίδραση των 1,25(OH) ₂ D-Genistein στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	58
4.4 Επίδραση των 1,25(OH) ₂ D-Genistein-NAC στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	61
4.5 Επίδραση των 1,25(OH) ₂ D-Καempferol στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	62
4.6 Επίδραση των 1,25(OH) ₂ D-Biochanin A στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	64

4.7 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Formononetin στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας	65
4.8 Δημιουργία προγράμματος για τον εντοπισμό της 1,25(OH)₂D μέσω U-HPLC	66
4.8.1 On line SPE	66
5. Συζήτηση	73
6. Βιβλιογραφία.....	77

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό

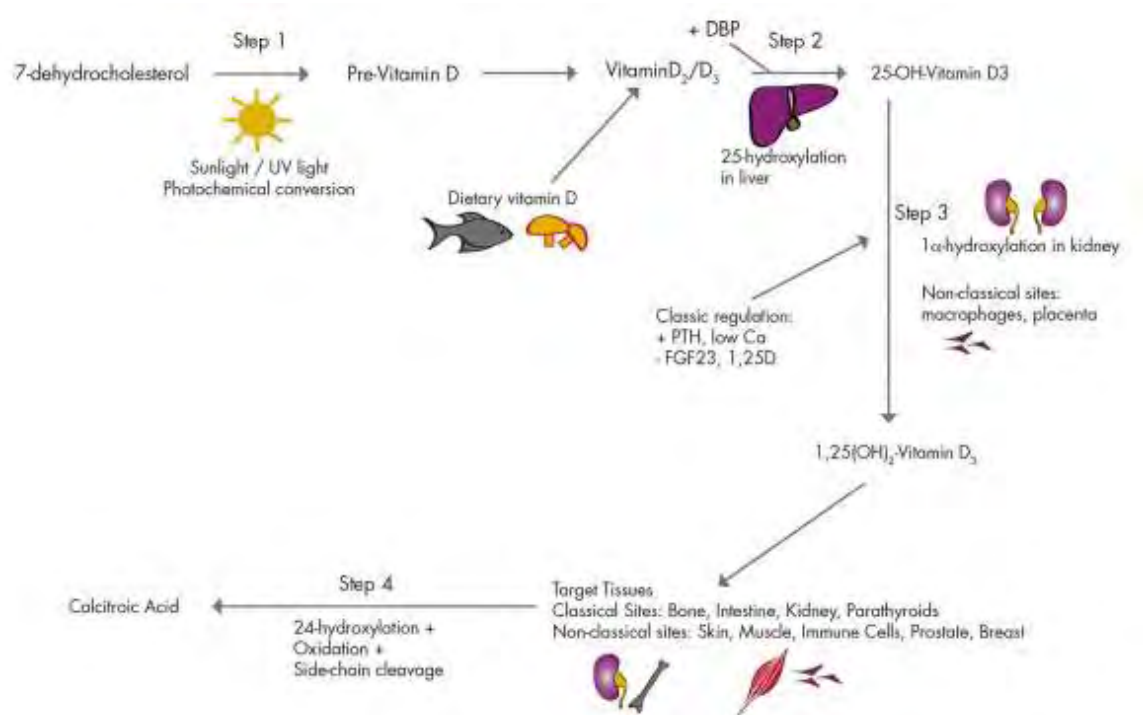
Η βιταμίνη D κατηγοριοποιείται εσφαλμένα στην οικογένεια των βιταμινών (1). Οι βιταμίνες αποτελούν μία τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν μπορεί να τις συνθέσει μόνος. Εν αντιθέσει, η βιταμίνη D παράγεται από τον οργανισμό μας. Η βιταμίνη D είναι γνωστή για τη σχέση της με το ηλιακό φως, εφόσον, για τους περισσότερους ανθρώπους, η μέτρια έκθεση στο φως του ήλιου είναι συνήθως επαρκής για να παράγουν από μόνοι τους τη συγκεκριμένη βιταμίνη. Η βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη) παράγεται από την 7-διϋδροχοληστερόλη (7-DHC) μέσω μιας διαδικασίας δύο σταδίων στην οποία ο δακτύλιος B θραύεται από την υπεριώδη ακτινοβολία (περιοχή 280-320 UVB) από τον ήλιο, σχηματίζοντας την προ-D3 που ισομερίζεται σε D3 (εικόνα 1.1). Η D3 διοχετεύεται από το δέρμα στην κυκλοφορία του αίματος δεσμευμένη στην βιταμίνη D-δεσμεύουσα πρωτεΐνη (Vitamin D Binding Protein, VDBP) (2) (3).



Εικόνα 1.1: Σύνθεση της βιταμίνης D3 υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας: 1. διάσπαση του β-δακτυλίου για το σχηματισμό της προ-βιταμίνης D3 και 2. ισομερισμός της προ-βιταμίνης D3 σε D3 (3)

Τα τρία βασικά στάδια του μεταβολισμού της βιταμίνης D, της 25-υδροξυλίωσης, της 1α-υδροξυλίωσης και της 24-υδροξυλίωσης εκτελούνται από οξειδάσες του κυτοχρώματος P450 μικτής λειτουργίας (CYPs). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (π.χ. CYP2R1) ή στα μιτοχόνδρια (π.χ. CYP27B1 και CYP24A1). Το ήπαρ είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό της βιταμίνης D σε 25(OH)D, την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D. Διαφορά ένζυμα έχουν δραστηριότητα 25-υδροξυλάσης, όπως τα CYP27A1, CYP2R1 και CYP3A4 αλλά το CYP2R1 είναι το πιο σημαντικό (4). Η 25(OH)D στη συνέχεια μεταβολίζεται περαιτέρω σε 1,25(OH)₂D από το ένζυμο CYP27B1. Παρόλο που οι νεφροί είναι η κύρια θέση παραγωγής της 1,25(OH)₂D, μία πληθώρα ιστών εκφράζουν την 1α-υδροξυλάση (εικόνα 1.12). Η 1,25(OH)₂D είναι η κύρια μορφή της βιταμίνης D με ορμονική δράση και υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις βιολογικές της αποκρίσεις στη βιταμίνη. Η 1,25(OH)₂D μειώνει τα επίπεδα της ίδιας της 1,25(OH)₂D στα κύτταρα κυρίως με διέγερση του καταβολισμού της μέσω της επαγωγής του

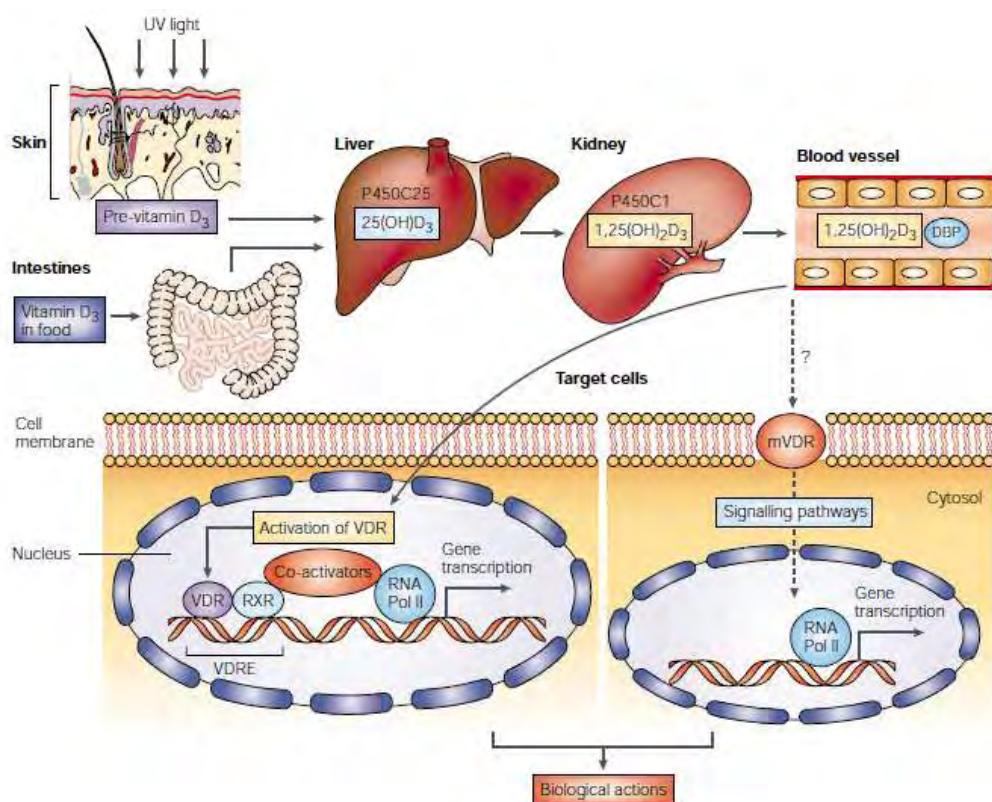
CYP24A1, της 24-υδροξυλάσης (εικόνα 1.2). Η 25(OH)D και η 1,25(OH)₂D υδροξυλιώνονται στη θέση 24 από το συγκεκριμένο ένζυμο για να σχηματίσουν 24,25(OH)₂D και 1,24,25(OH)₃D, αντίστοιχα (3).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D παράγεται στο δέρμα υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας. Η μεταβολική ενεργοποίηση καταλύεται από το ένζυμο CYP27B1, ενώ η απενεργοποίηση από το ένζυμο CYP24A1. (5)

1.2 Βιολογικές δράσεις βιταμίνης D

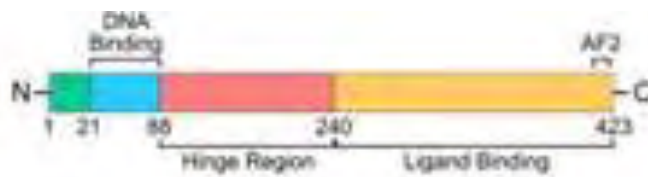
Η δραστική μορφή της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D₃, ή αλλιώς καλσιτριόλη, σχετίζεται πρωτίστως με την ομοιοστασία ασβεστίου και φωσφόρου στον οργανισμό, καθώς και μη κλασικούς ρόλους που έχουν να κάνουν με τη ρύθμιση των κυτταρικών και ιστικών λειτουργιών. Η καλσιτριόλη επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα, καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, επάγει την κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση σε υγιή και καρκινικά κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων και προστατεύει το DNA από τις οξειδωτικές βλάβες (6) (7). Τόσο η καλσιτριόλη όσο και οι υπόλοιπες μορφές της βιταμίνης D διαθέτουν ογκοστατικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (8). Όπως και άλλα πυρηνικά στεροειδή, η βιταμίνη D έχει τόσο γενωμικές όσο και μη γενωμικές δράσεις (9) (10) (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση της βιοσύνθεσης της βιταμίνης D, καθώς και των γενωμικών και μη γενωμικών της ρόλων. Οι δράσεις της ενεργής μορφής της βιταμίνης D διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα της βιταμίνης, VDR. Το ετεροδιμερές VDR-RXR συνδέεται πάνω στα στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης (VDRE) στο DNA και οδηγεί στην αλλαγή έκφρασης γονιδίων. Τελευταίες μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη μεμβρανικού υποδοχέα της βιταμίνης, ο οποίος ενεργοποιεί ενδοκυττάρια μονοπάτια. (11)

1.2.1 Γενωμικές δράσεις βιταμίνης D

Η βιταμίνη D εκτελεί τις βιολογικές γενωμικές της δράσεις μέσω του πυρηνικού της υποδοχέα, VDR (Vitamin D Receptor). Ο VDR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Αποτελείται από 3 διακριτές δομικές περιοχές: την N-τελική περιοχή σύνδεσης στο DNA (DNA Binding Domain), την C-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain) και την ενδιάμεση περιοχή άρθρωσης (hinge domain) (12) (13). Ο VDR είναι μοναδικός μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων καθώς διαθέτει μία μικρή περιοχή ενεργοποίησης λειτουργίας (AF-1), η οποία αποτελείται μόλις από 21 αμινοξέα (Pike & Meyer, 2010) (Kraichely & MacDonald, 1998) (εικόνα 1.4). Η 1,25(OH)₂D αποτελεί τον βασικό προσδέτη του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR), με άλλες ενώσεις να έχουν χαρακτηριστεί ως προσδέτες χαμηλής συγγένειας του υποδοχέα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η 25(OH)D, το λιτοχολικό οξύ, το αραχιδονικό οξύ, η κουρκουμίνη κ.ά. (14)



Εικόνα 1.4: Δομικές περιοχές του πυρηνικού υποδοχέα VDR και των υπόλοιπων πυρηνικών υποδοχέων. Οι επικράτειες των πυρηνικών υποδοχέων είναι οι εξής: “AF-1” περιοχή υπεύθυνη για τη ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων ανεξάρτητα από την ύπαρξη του προσδέτη, “DNA-binding” περιοχή υπεύθυνη για τη σύνδεση των υποδοχέων στα κατάλληλα στοιχεία απόκρισης του DNA, “Hinge region” περιοχή υπεύθυνη πιθανότατα για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των υποδοχέων, “Ligand binding” περιοχή υπεύθυνη για τη σύνδεση του κατάλληλου προσδέτη και “AF-2” περιοχή υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες της μεταγραφής. (Pike & Meyer, 2010)

Μετά τη σύνδεση της με την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ο VDR ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος RXR, μετακινούνται στον πυρήνα και συνδέονται στα κατάλληλα στοιχεία απόκρισης στο DNA (VDREs) (8). Τα στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D αποτελούνται από 2 επαναλαμβανόμενες εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες (direct repeats), οι οποίες χωρίζονται από 3 ενδιάμεσα νουκλεοτίδια. Το μοτίβο αυτό είναι γνωστό ως DR3 και αποτελεί το πιο συνηθισμένο μοτίβο αλληλουχίας που αναγνωρίζει ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) (12) (3) (εικόνα 1.5).



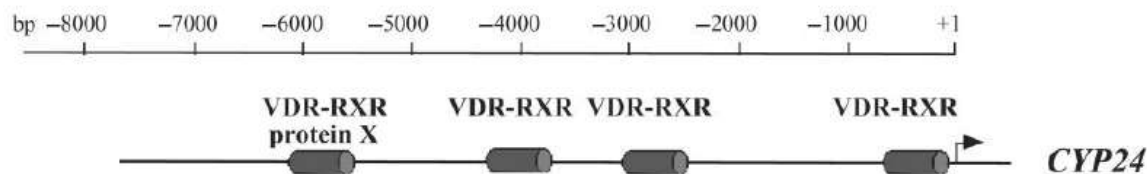
Εικόνα 1.5: Στοιχεία απόκρισης του ετεροδιμερούς VDR/RXR πάνω στη χρωματίνη (12)

Τα γονίδια που ελέγχονται από τα στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη (VDRE) ποικίλλουν από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό, καθώς εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες (14) (εικόνα 1.6). Η πληθώρα γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα VDR σχετίζονται με την ρύθμιση της ομοιοστασίας ασβεστίου, την ορυκτοποίηση των οστών, τον μεταβολισμό της βιταμίνης D, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος κ.ά. (14). Χαρακτηριστικό παράδειγμα γονιδίου που αποτελεί μεταγραφικός στόχος του υποδοχέα της βιταμίνης είναι το γονίδιο CYP24A1 (15) (16) (εικόνα 1.7). Τα VDREs μπορούν να εντοπίζονται οπουδήποτε πάνω στο γονιδίωμα, συχνά πολλές χιλιάδες ζεύγη βάσεων μακριά από το γονίδιο που ελέγχουν, ανοδικά, καθοδικά, ακόμα και σε μέσα στο ίδιο το γονίδιο-στόχο σε ιντρονικές ή εξωνικές περιοχές του γονιδίου (3) (17). Μετά τη σύνδεση του ετεροδιμερούς VDR-RXR στα VDREs, οι μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση διαμεσολαβούνται μέσω της ικανότητας του προσδεδμεμένου υποδοχέα να στρατολογεί συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς της μεταγραφής (17).

Table 1 Representative VDREs in genes directly modulated in their expression by 1,25D

Gene	Network	Bioeffect (s)	Type	Location	5'-Half	Spacer	3'-Half	References
<i>rBGP</i>	Bone	Bone metabolism	Positive	-456	GGGTGA	atg	AGGACA	[120]
<i>mSPP1</i>	Bone	Bone metabolism	Positive	-757	GGTCA	cga	GGTCA	[120]
<i>mLRP5</i>	Bone	Bone anabolism	Positive	+656	GGGTCA	ctg	GGGTCA	[20]
<i>mLRP5</i>	Bone	Bone anabolism	Positive	+19 kb	GGGTCA	tgc	AGGTTC	[18]
<i>mRANKL</i>	Bone	Bone resorption	Positive	-22.7 kb	TGACCT	cccttg	GGGTCA	[1]
<i>mRANKL</i>	Bone	Bone resorption	Positive	-76 kb	GGTTGC	ctg	AGTTC	[28]
<i>cPTH</i>	Mineral	Mineral homeostasis	Negative	-60	GGGTCA	gga	GGGTGT	[121]
<i>hTRPV6</i>	Mineral	Intestinal Ca ²⁺ transport	Positive	-2100	GGGTCA	gtg	GGTTCG	[17]
<i>hTRPV6</i>	Mineral	Intestinal Ca ²⁺ transport	Positive	-2155	AGGTCT	tgg	GGTTC	[17]
<i>hFGF23</i>	Mineral	Renal phosphate reabsorption	Positive	-32.9 kb	TGAACT	caagg	AGGGCA	[38]
<i>hklotho</i>	Mineral	Renal phosphate reabsorption	Positive	-31 kb	AGTTC	aga	AGTTC	[63]
<i>hCYP24A1</i>	Detox	1,25D detoxification	Positive	-151	AGGTGA	gcg	AGGGCG	[120]
<i>hCYP24A1</i>	Detox	1,25D detoxification	Positive	-274	AGTTC	ccg	GGTGTG	[120]
<i>hCYP3A4</i>	Detox	Xenobiotic detoxification	Positive	-169	TGAACT	caaagg	AGGTTC	[85]
<i>hCYP3A4</i>	Detox	Xenobiotic detoxification	Positive	-7.7 kb	GGGTCA	gca	AGTTC	[84]
<i>hp21</i>	Cell life	Cell cycle control	Positive	-765	AGGGAG	att	GGTTC	[120]
<i>hFOXO1</i>	Cell life	Cell cycle control	Positive	-2856	GGGTCA	cca	AGGTGA	[120]
<i>rPTHrP</i>	Cell life	Mammalian hair cycle	Negative	-805	AGGTTC	ctc	AGTGAA	[103]
<i>hSOSTDC1 (Wise)</i>	Cell life	Mammalian hair cycle	Negative	-6214	AGGACA	gca	GGGACA	[118]
<i>hCAMP</i>	Immune	Antimicrobial peptide	Positive	-615	GGTTC	atg	GGTTC	[120]
<i>mCBS</i>	Metabolism	Homocysteine clearance	Positive	+5923	GGGTTC	atg	AGTTC	[74]

Εικόνα 1.6: Παραδείγματα γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποδοχέα της βιταμίνης D, VDR. Ανάμεσα τους και το γονίδιο CYP24A1. (14)

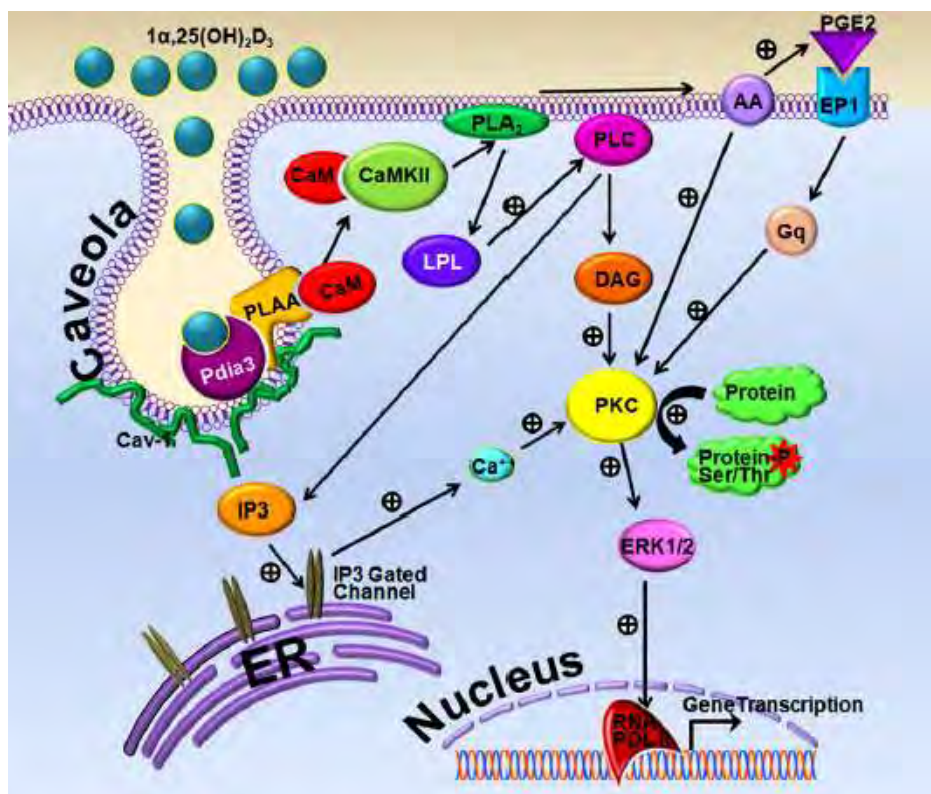


Εικόνα 1.7: Απεικόνιση των στοιχείων απόκρισης στη βιταμίνη (VDRE) στον εκκινητή του γονιδίου CYP24A1, υποδηλώνοντας ότι το παραπάνω γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα VDR (15)

1.2.2 Μη γενωμικές δράσεις βιταμίνης D

Τα τελευταία χρόνια ποικίλες αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία κάνουν λόγο για την ύπαρξη ενός ακόμη υποδοχέα της βιταμίνης D, του Pdia3/ERp57/GRp58/MARRS (Membrane Associated Rapid Response steroid binding protein) (<http://www.oapublishinglondon.com/article/444>). Για το χαρακτηρισμό του συγκεκριμένου υποδοχέα δεν έχει καθιερωθεί μία μόνο ονομασία, αλλά αναφέρεται με όλες τις παραπάνω στις επιστημονικές έρευνες. Ο υποδοχέας MARRS πρωτοαναγνωρίστηκε και μελετήθηκε ως πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου και αλληλεπιδρά με νεοσυντιθέμενες γλυκοπρωτεΐνες. Ο MARRS εντοπίζεται, εκτός από το ΕΔ, στο κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη. Στην πλασματική μεμβράνη αναγνωρίζει και συνδέεται με την βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D, αλλά και με την 25(OH)D με χαμηλότερη συγγένεια (18) (19). Η ενεργοποίηση του MARRS οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Μία κατηγορία δράσεων της 1,25(OH)₂D αφορούν και γρήγορες αποκρίσεις, οι οποίες είναι πολύ ταχείες για να περιλαμβάνουν γενωμικές διαδικασίες (20) (21). Ωστόσο, η μη γενωμική σηματοδότηση μπορεί να επηρεάσει έμμεσα τη μεταγραφή μέσω διασταυρούμενης σηματοδότησης. Η πλέον βασική μη γενωμική απόκριση στη βιταμίνη D αφορά την είσοδο ιόντων Ca²⁺ μέσα στο κύτταρο, η οποία διαμεσολαβείται από κανάλια Ca²⁺ στην πλασματική μεμβράνη που ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα VDR. Άλλες δράσεις αφορούν την ενεργοποίηση CaMKII (πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca²⁺/καλμοδουλίνη), PLA₂ (φωσφολιπάση A₂), PLC (φωσφολιπάση C), DAG (διάκυλογλυκερόλη), PKC (πρωτεϊνική κινάση C) και ERK1/2 (MAP κινάσες) μέσω της ενεργοποίησης του μεμβρανικού υποδοχέα της βιταμίνης D, MARRS (20)(22)(23)(24)(25) (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Απεικόνιση των ενδοκυττάρων μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τη βιταμίνη D και τον μεμβρανικό της υποδοχέα, MARRS (Membrane Associated Rapid Response Steroid binding protein). Ενδείξεις υπάρχουν για την ενεργοποίηση των ενεργοποίηση CaMKII (πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca²⁺/καλμοδουλίνη), PLA₂ (φωσφολιπάση A₂), PLC (φωσφολιπάση C), DAG (διάκλυογλυκερόλη), PKC (πρωτεϊνική κινάση C) και ERK1/2. (26)

1.3 Ο ρόλος της βιταμίνης D στην υγεία του ανθρώπου

Ο κλασικός ρόλος της βιταμίνης D αποτελεί η ρύθμιση της ομοιοστασίας ασβεστίου και φωσφόρου μέσα στον οργανισμό. Η καθολική αυτή λειτουργία της βιταμίνης D είναι υπεύθυνη για την υγεία των οστών. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, η βιταμίνη D αποτελεί αντικείμενο μελέτης για το ρόλο της σε εξω-σκελετικές ασθένειες και διαταραχές της υγείας, όπως η εμπλοκή της στο ανοσοποιητικό σύστημα, στον σακχαρώδη διαβήτη, στον καρκίνο κ.ά.

1.3.1 Βιταμίνη D και οστική υγεία

Η καλσιτριόλη είναι υπεύθυνη για την εντερική απορρόφηση και νεφρική επαναρρόφηση του ασβεστίου μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μοντέλο που επικρατεί για την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο είναι η διευκολυνόμενη διάχυση. Η διαδικασία περιλαμβάνει απορρόφηση του ασβεστίου από ειδικά κανάλια της βασικής μεμβράνης, σύνδεση του στην ασβεστιο-συνδέουσα πρωτεΐνη calcidin και εξώθηση ασβεστίου στην κυκλοφορία του αίματος από την βασοπλευρική μεμβράνη (27). Ανεπάρκεια βιταμίνης D (εικόνες 1.9 και 1.10) οδηγεί σε ανωμαλίες στην ομοιοστασία ασβεστίου και φωσφόρου, καθώς και στην υγεία των οστών. Πιο συγκεκριμένα,

προκαλείται μείωση της απορρόφησης ασβεστίου και φωσφόρου από τα κύτταρα του εντέρου που έχει ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων τους στο πλάσμα και την μετέπειτα αύξηση των επιπέδων της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH), μιας ορμόνης που εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως δευτερογενής υπερπαραθυρεοειδισμός (28). Στον δευτερογενή υπερπαραθυρεοειδισμό, τα επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα διατηρούνται σε φυσιολογικά όρια μέσω της κινητοποίησης ιόντων ασβεστίου από τα οστά και της αυξημένης απέκκρισης φωσφόρου από τους νεφρούς. Αποτέλεσμα αυτής της κινητοποίησης είναι η μείωση της οστικής πυκνότητας και η πρόκληση οστεοπόρωσης. Παράλληλα, τα επίπεδα των ιόντων φωσφόρου στο πλάσμα μειώνονται, μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως φωσφατουρία. Σε ανήλικα παιδιά η ελλιπής ορυκτοποίηση των οστών προκαλεί ραχίτιδα, ενώ στους ενήλικες το τελικό αποτέλεσμα είναι η οστεομαλακία (29).

25(OH)D concentration	Classification
≤10 ng/mL	Deficient
11-20 ng/mL	Insufficient
>20 ng/mL	Optimal

^a 25(OH)D = 25-hydroxyvitamin D.

^b To convert from ng/mL to nmol/L, multiply by 2.496.

Εικόνα 1.9: Ταξινόμηση της έλλειψης ή επάρκειας βιταμίνης D βασισμένη στη συγκέντρωση 25(OH)D που εντοπίζεται στο πλάσμα (30)

Level of vitamin D deficiency	Serum 25-hydroxyvitamin D concentration (µg/L)
Mild	10–19*
Moderate	5–9
Severe ^(a)	< 5

*≥ 20 µg/L for the general population and ≥ 30 µg/L for elderly persons at risk of falls or people diagnosed with osteoporosis.

Εικόνα 1.10: Επίπεδα ανεπάρκειας βιταμίνης D (29)

1.3.2 Βιταμίνη D και διαβήτης

Η έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D, VDR, και του CYP27B1 στο πάγκρεας αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις για τη συμμετοχή της βιταμίνης στη σωστή λειτουργία του παγκρέατος (31) (32). Τόσο ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) τύπου I όσο και ο ΣΔ τύπου II έχουν συνδεθεί με την ανεπάρκεια βιταμίνης D. Ο ΣΔ τύπου I χαρακτηρίζεται ως μία αυτοάνοση

διαταραχή που σχετίζεται με τα β κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης. Πιο συγκεκριμένα, ο ΣΔ τύπου I περιλαμβάνει την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι των β κυττάρων και την απόπτωση τους μέσω του συστήματος Fas-Fas Ligand. Στην επιφάνεια των β κυττάρων εκφράζεται ο Fas, ενώ στην επιφάνεια των μονοπύρηνων κυττάρων εκφράζεται ο Fas Ligand (33). Η φλεγμονώδης αυτή κατάσταση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των β κυττάρων και την μείωση της παραγωγής ινσουλίνης. Ανεπάρκεια βιταμίνης D συνδέεται και με τον ΣΔ τύπου II. Χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στο πλάσμα έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλή έκφραση του υποδοχέα της ινσουλίνης και κατά συνέπεια ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη (34). Η καλσιτριόλη επάγει την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης, IR, στα μονοπύρηννα κύτταρα U937 (35). Η επαγωγή αυτή είναι άμεση καθώς έχουν βρεθεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνης (VDRE) στον υποδοχέα του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης (36). Η επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα της ινσουλίνης πιθανόν αποτελεί ένα βήμα στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην ινσουλίνη. Επιδημιολογική μελέτη στην Κοπεγχάγη υποστηρίζει πως τα χαμηλά επίπεδα της κυκλοφορούσας μορφής της βιταμίνης D είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη ΣΔ τύπου II (37). Αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάζει μία μελέτη των Ye et al. όπου επισημαίνεται ότι τα επίπεδα της 25(OH)D δεν σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ τύπου II (38). Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για την αποσαφήνιση της σχέσης που συνδέει τη βιταμίνη D και τον ΣΔ τύπου II.

1.3.3 Βιταμίνη D και ανοσοποιητικό σύστημα

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η βιταμίνη D και στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η παραγωγή της καλσιτριόλης επάγεται τοπικά, καθώς το γονίδιο CYP27B1 φέρεται να εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος, στο δέρμα, καθώς και στα μακροφάγα, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της τοπικά παραγόμενης 1,25(OH)₂D στη ρύθμιση των ανοσιακών αποκρίσεων (39) (40). Η καλσιτριόλη επηρεάζει το φαινότυπο των T βοηθητικών κυττάρων, καθώς ενισχύει τον Th2 φαινότυπο και την παραγωγή IL-4, IL-5 και IL-10 (41). Αλλαγές και στο φαινότυπο των δενδριτικών κυττάρων επάγει η καλσιτριόλη. Πιο συγκεκριμένα, η 1,25(OH)₂D προκαλεί αλλαγές στην παραγωγή πρωτεϊνών-δεικτών του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC II), αλλαγές στο προφίλ έκφρασης κυτοκινών, καθώς και αλλαγές στο φαινότυπο των κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η καλσιτριόλη επάγει μία πρόωμη μη ώριμη μορφή των δενδριτικών κυττάρων, η οποία έχει μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων (Ferreira et al., 2011). Αλλαγές και στη διαφοροποίηση των B κυττάρων επάγονται από την καλσιτριόλη. Η 1,25(OH)₂D αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων B κυττάρων, με την ανασταλτική αυτή επίδραση να συνδυάζεται με έναρξη της απόπτωσης, αναστέλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την έκκριση αντισωμάτων από αυτά (42). Τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν πως η 1,25(OH)₂D διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την απόκριση του οργανισμού τόσο σε αυτοάνοσες καταστάσεις όσο και σε εξωγενείς μολυσματικούς παράγοντες.

1.3.4 Βιταμίνη D και καρκίνος

Οι κλασικοί ρόλοι της βιταμίνης D σχετίζονται με την ομοιοστασία ασβεστίου και φωσφόρου μέσα στον οργανισμό, που είναι απαραίτητη για την υγεία των οστών. Ωστόσο, εκτενής έρευνα έχει πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες για την χαμηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και την ανεπάρκεια της βιταμίνης με τον αυξημένο κίνδυνο για εξω-σκελετικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος.

1.3.4.1 Επιδημιολογικές μελέτες

Επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου και τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας με γεωγραφικές περιοχές που εκτίθενται σε μειωμένη ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (UV-B). Δεδομένης της σημασίας της υπεριώδους ακτινοβολίας στη σύνθεση της βιταμίνης D, μπορούμε να συσχετίσουμε τα χαμηλά επίπεδα ηλιακής ακτινοβολίας σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές με τα μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D των κατοίκων των περιοχών αυτών (43). Πληθώρα ερευνητικών μελετών υποστηρίζουν την αντίστροφη σχέση που συνδέει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου σε σχέση με τα κυκλοφορούντα επίπεδα βιταμίνης D (

25(OH)D) στο πλάσμα (Garland et al., 2006). Συγκεκριμένα η βιταμίνη D έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, μαστού, προστάτη και ωοθηκών. Υψηλά επίπεδα 25(OH)D συσχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου σε γυναίκες άνω των 60 ετών (44). Χαμηλά επίπεδα 25(OH)D συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο προστάτη σε άνδρες <52 ετών (45). Δεν λείπουν, όμως, και οι μελέτες που δεν βρίσκουν κάποια συσχέτιση ανάμεσα στη βιταμίνη D και τον κίνδυνο καρκινογένεσης (46) (47).

1.3.4.2. Βιοχημικό υπόβαθρο της δράσης της καλσιτριόλης

Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D είναι καλά χαρακτηρισμένοι και περιλαμβάνουν τη ρύθμιση αυξητικών παραγόντων, του κυτταρικού κύκλου, σηματοδοτικών μονοπατιών κ.ά. (6). Η καλσιτριόλη αναστέλλει την μιτογόνο σηματοδότηση που διαμεσολαβείται από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο IGF1, μέσω αύξησης της έκφρασης της συνδέουσας πρωτεΐνης του IGF-1 (IGF-1 binding protein-3) (48). Η αύξηση αυτή είναι άμεση καθώς έχουν αναγνωριστεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη (VDRE) στον υποκινητή του γονιδίου IGFBP-3 (49). Άμεση συσχέτιση εμφανίζει η βιταμίνη D και με τον υποδοχέα των οιστρογόνων, ER. Μελέτες έδειξαν πως η καλσιτριόλη μειώνει την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων σε καρκινική σειρά μαστού και συμβάλλει στην μείωση της απόκρισης των κυττάρων στην παρουσία οιστρογόνων (50). Η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων περιλαμβάνει την σύνδεση του VDR σε κατάλληλα αρνητικά στοιχεία απόκρισης στο DNA (negative VDRE) στον υποδοχέα του γονιδίου ERα (51). Αρνητική επίδραση στο σύστημα σηματοδότησης των οιστρογόνων ασκεί και η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της αρωματάσης από την καλσιτριόλη. Μείωση παραγωγής του ενζύμου της αρωματάσης συνεπάγεται μείωση παραγωγής των οιστρογόνων, γεγονός απαραίτητο για την καρκινογένεση σε ER+ καρκινικά κύτταρα μαστού (52).

Ανάμεσα στις δράσεις της καλσιτριόλης συγκαταλέγεται και η ρύθμιση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα VEGF μέσω της ρύθμισης των εξαρτώμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIF, hypoxia inducible factors). Τόσο η μελέτη των Ben-Shoshan et al. όσο και προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Kechagia et al., unpublished data) υπογραμμίζουν τον αρνητικό ρόλο που διαδραματίζει η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων hif. Η καλσιτριόλη μειώνει τόσο τα πρωτεϊνικά επίπεδα των hif όσο και τη μεταγραφική τους ενεργότητα, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα VEGF (53).

Η καλσιτριόλη ενεργοποιεί ενδογενή μονοπάτια απόπτωσης μέσω μείωσης της έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το Bcl-2, και αύξησης της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το Bax (54). Μείωση της παραγωγής των Bcl-2 και Bcl-X_L αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ύστερα από επώαση των κυττάρων παρουσία της καλσιτριόλης παρατηρείται σε καρκινική σειρά προστάτη, χωρίς ωστόσο ταυτόχρονη αύξηση στις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bcl-X_S (55). Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει την εμπλοκή της καλσιτριόλης στον κυτταρικό κύκλο.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η καλσιτριόλη αυξάνει την έκφραση αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKI, cyclin-dependent kinase inhibitors), όπως η p21 και η p27, μειώνοντας κατά συνέπεια την δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDK, cyclin-dependent kinases) και σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο (48) (56) (57). Πληθώρα μελετών υποδεικνύουν την αρνητική επίδραση της καλσιτριόλης στον κυτταρικό κύκλο και την αναστολή των κυττάρων στη φάση G0/G1 μέσω μείωσης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, Rb, και μείωσης της έκφρασης του ογκογονιδίου c-myc (Jensen et al., 2001) (58).

1.4 Η βιταμίνη D ως αντικαρκινικό φάρμακο – Κλινικές δοκιμές

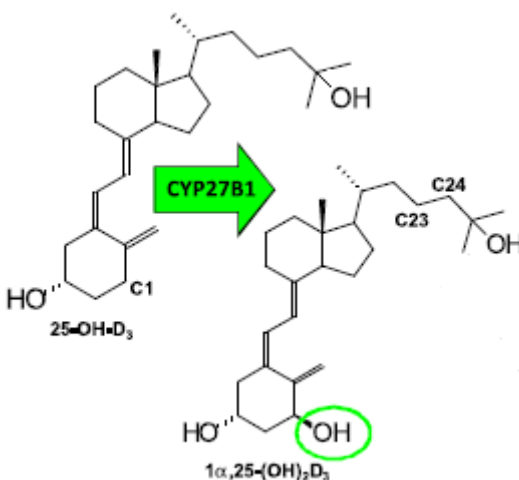
1.4.1 VITAL trial

Μία μεγάλη ερευνητική μελέτη (VITAL trial, VITamin D and OmegA-3 TriaL) βρίσκεται σε εξέλιξη στην Ιατρική σχολή του πανεπιστημίου Harvard ερευνώντας τον πιθανό προστατευτικό ρόλο της λήψης βιταμίνης D στην μείωση του κινδύνου της εμφάνισης καρκίνου, καρδιακού επεισοδίου και εγκεφαλικού σε υγιείς εθελοντές. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει 25.871 άντρες και γυναίκες οι οποίοι λαμβάνουν καθημερινά συμπληρώματα βιταμίνης D (2000 IU). Τα μέχρι τώρα πρώιμα δεδομένα για τα αποτελέσματα της δοκιμής υποδεικνύουν ότι η λήψη βιταμίνης D δεν μειώνει το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ή καρδιαγγειακών επεισοδίων, αλλά μειώνει τα ποσοστά θνησιμότητας που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα, 793 εθελοντές ανάμεσα στους 12.927 που λαμβάνουν τα συμπληρώματα βιταμίνης εμφάνισαν καρκίνο (6.13%) συγκριτικά με τους 824 συμμετέχοντες ανάμεσα στους 12.944 που ανήκουν στην κατηγορία placebo (6.37%). Ωστόσο, 25% μείωση στα επίπεδα θνησιμότητας παρατηρήθηκε στους συμμετέχοντες που έπασχαν από καρκίνο. Η ερευνητική αυτή τυχαίοποιημένη δοκιμή (randomized trial) για την μελέτη της επίδρασης της λήψης συμπληρωμάτων βιταμίνης D βρίσκεται σε εξέλιξη αλλά τα μέχρι τώρα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η λήψη 2000 IU ημερησίως δεν μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ή καρδιαγγειακού επεισοδίου αλλά σχετίζονται με μείωση των επιπέδων θνησιμότητας σε συμμετέχοντες οι οποίοι πάσχουν από καρκίνο (<https://www.vitalstudy.org/>).

1.5 Μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D (CYP24A1 & CYP27B1)

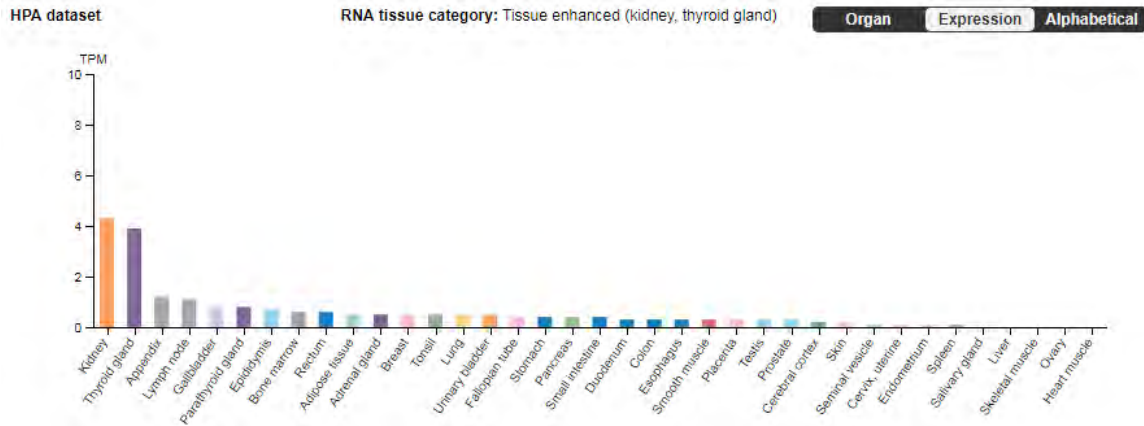
1.5.1 CYP27B1 και σύνθεση της 1,25(OH)₂D

Το γονίδιο *CYP27B1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή 12q14.1 και κωδικοποιεί το ένζυμο του κυτοχρώματος P450 *cyp27b1*. Το *cyp27b1* είναι μία μιτοχονδριακή μονοξυγενάση που καταλύει την υδροξυλίωση της 25(OH)D στη θέση 1α (εικόνα 1.11). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 1α,25(OH)₂D, την βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D, η οποία είναι υπεύθυνη για την ομοιοστασία ασβεστίου και φωσφόρου μέσα στον οργανισμό, καθώς και άλλες προαναφερθείσες δράσεις. Συνεπώς, το ένζυμο *cyp27b1* ρυθμίζει τα επίπεδα της ενεργής μορφής της βιταμίνης D, 1α,25(OH)₂D.



Εικόνα 1.11: Αντίδραση μετατροπής της 25(OH)D σε 1,25(OH)₂D από το ένζυμο μεταβολισμού CYP27B1(59)

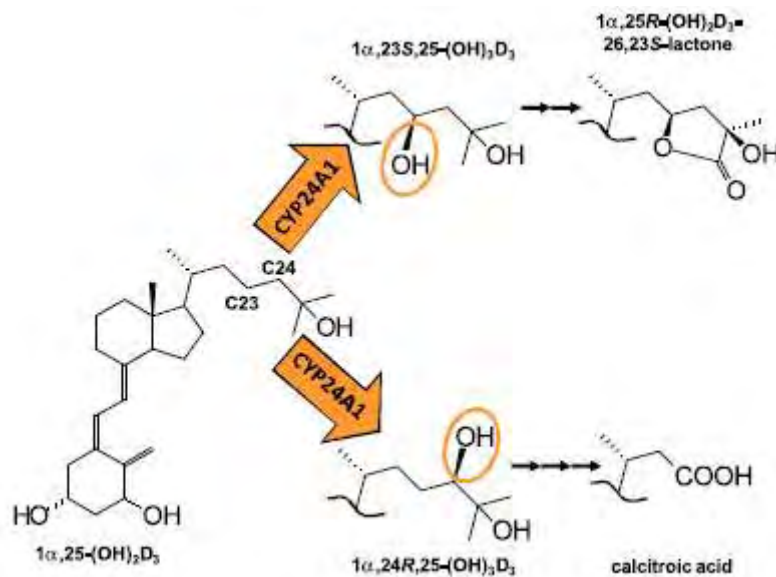
Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP27B1 εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς σε όλο το σώμα, με τη μεγαλύτερη έκφραση να εντοπίζεται στους νεφρούς και το θυρεοειδή αδέν. Χαμηλότερα επίπεδα RNA εντοπίζονται στο έντερο, τους λεμφαδένες, τη χοληδόχο κύστη, τον παραθυρεοειδή αδέν, καθώς σε πλήθος άλλων ιστών στο ανθρώπινο σώμα (εικόνα 1.12). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η παραγωγή του RNA του γονιδίου *CYP27B1* είναι διάσπαρτη, καθώς εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Η διεθνής βιβλιογραφία υποδεικνύει την έκφραση του γονιδίου CYP27B1 σε διάφορους ιστούς (6), με την κυρίαρχη έκφραση να παρατηρείται στα εγγύς σωληνάκια των νεφρών (39).



Εικόνα 1.12: Επισκόπηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *CYP27B1* στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος (RNA expression overview, HPA dataset, ProteinAtlas.org)

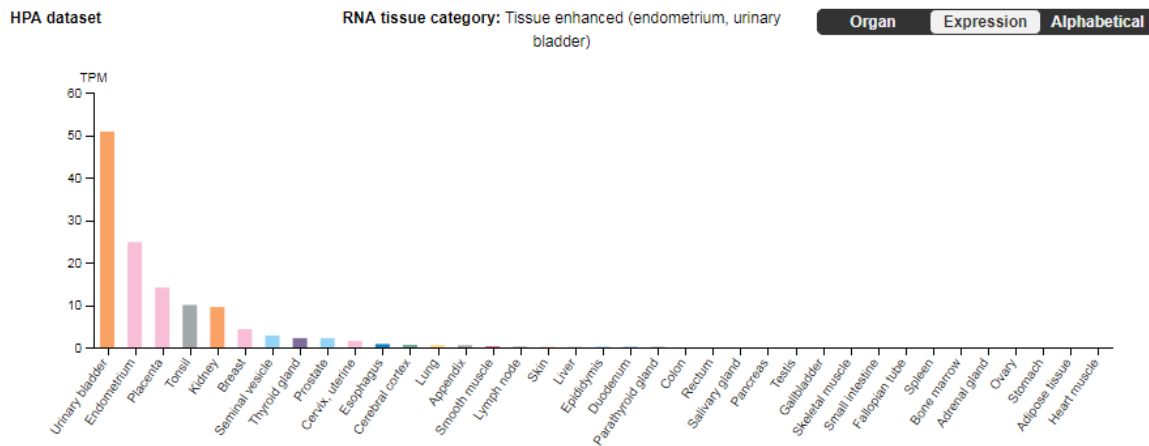
1.5.2 *CYP24A1* και καταβολισμός της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

Το γονίδιο *CYP24A1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή 20q13.2 και κωδικοποιεί το ένζυμο του κυτοχρώματος P450 *cyp24a1*. Η συγκεκριμένη περιοχή συχνά εμφανίζει ανωμαλίες σε πολλούς τύπους καρκίνου και έχει υψηλό αριθμό αντιγράφων στον καρκίνο του μαστού (60). Το *cyp24a1* είναι μία μιτοχondριακή μονοξυγενάση που καταλύει την υδροξυλίωση της ενεργής μορφής της βιταμίνης D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της καλσιτριόλης (εικόνα 1.13). Συνεπώς, το ένζυμο *cyp24a1* είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των επιπέδων της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ και σε γενικό επίπεδο των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου μέσα στον οργανισμό.



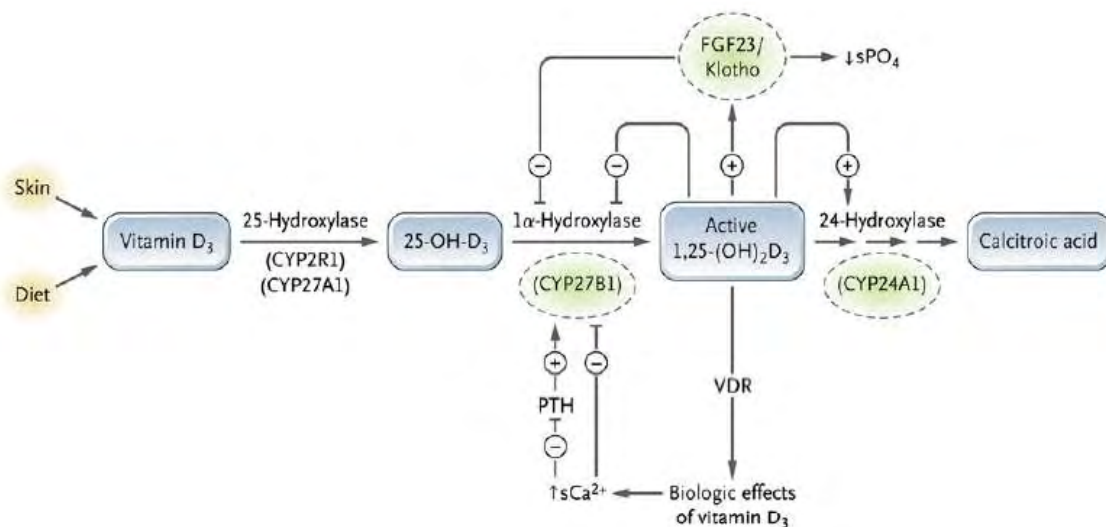
Εικόνα 1.13: Αντίδραση μετατροπής της 1,25(OH)₂D σε καλσιτροϊκό οξύ (calcitroic acid) από το ένζυμο μεταβολισμού CYP24A1 (59)

Τα επίπεδα RNA του γονιδίου CYP24A1 εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στους νεφρούς και σε χαμηλότερα επίπεδα στο ενδομήτριο, τον πλακούντα, τις αμυγδαλές και τους νεφρούς (εικόνα 1.14). Η παραγωγή του RNA του CYP24A1 εμφανίζεται λιγότερο διάσπαρτη στο ανθρώπινο σώμα συγκριτικά με το RNA του γονιδίου CYP27B1.



Εικόνα 1.14: Επισκόπηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου CYP24A1 στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος (RNA expression overview, HPA dataset, ProteinAtlas.org)

1.6 Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων CYP27B1 & CYP24A1



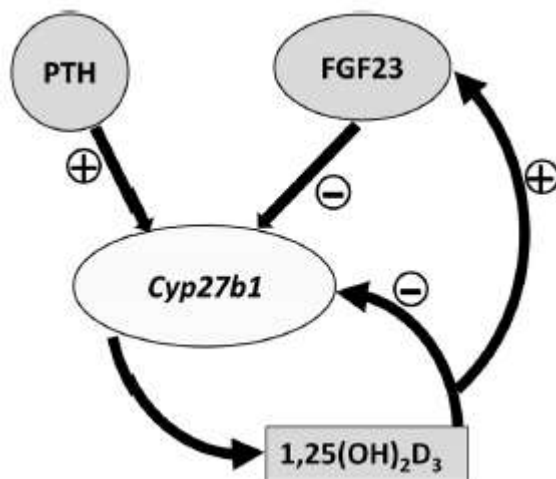
Εικόνα 1.15: Ρύθμιση της έκφρασης των μεταβολικών ενζύμων CYP27B1 και CYP24A1 από την παραθορμόνη (PTH), τον αυξητικό παράγοντα FGF23 και την καλσιτριόλη (Schlingmann et al., 2011)

1.6.1 Ρύθμιση της έκφρασης του CYP27B1

Η ρύθμιση του νεφρικού ενζύμου CYP27B1 ελέγχεται από 3 βασικούς παράγοντες: την PTH (παραθορμόνη), τον αυξητικό παράγοντα FGF23, καθώς και την 1,25(OH)₂D (εικόνες 1.15 και 1.16). Η παραθορμόνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου μέσα στον οργανισμό. Μετά την ενεργοποίηση της παραγωγής της λόγω χαμηλών επιπέδων ασβεστίου, η PTH επάγει την έκφραση του CYP27B1 στους νεφρούς (39). Η παραγωγή του ενζύμου εξυπηρετεί την παραγωγή της ενεργής μορφής της βιταμίνης D, της 1,25(OH)₂D, η οποία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ασβεστίου μέσα στον οργανισμό (59).

Ο αυξητικός παράγοντας FGF23 παίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην ομοιοστασία του φωσφόρου του πλάσματος. Σε αντίθεση με την PTH, ο FGF23 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του νεφρικού CYP27B1. Η παραγωγή του FGF23 κινητοποιείται μετά την αύξηση των επιπέδων του φωσφόρου μέσα στον οργανισμό και προκαλεί αναστολή της έκφρασης του νεφρικού CYP27B1, οδηγώντας στην μείωση των επιπέδων της 1,25(OH)₂D και κατά συνέπεια του φωσφόρου στο πλάσμα (59).

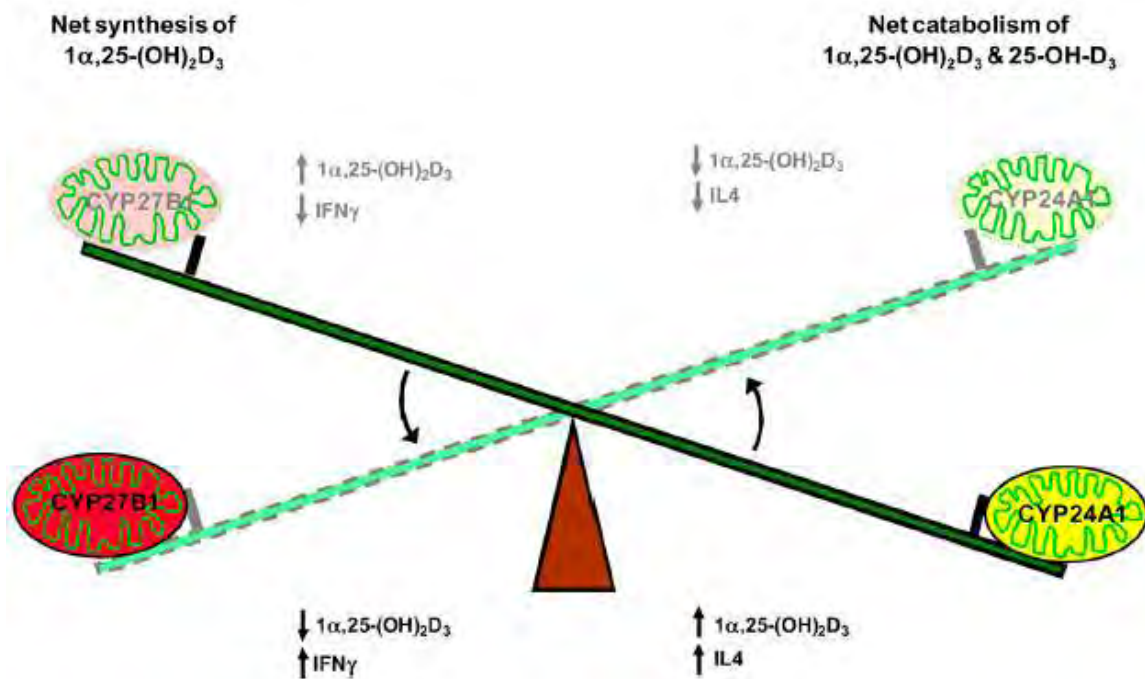
Η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου CYP27B1 στους νεφρούς μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα της βιταμίνης (VDR) και τον VDIR (Vitamin D Inhibitory Receptor), οι οποίοι στρατολογούν απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) και μεθυλο-τρανσφεράσες του DNA στον υποκινητή του γονιδίου CYP27B1 αναστέλλοντας την έκφραση του (61).



Εικόνα 1.16: Ρύθμιση του ενζύμου CYP27B1 από την παραθορμόνη (PTH), τον αυξητικό παράγοντα FGF23 και την καλσιτρόλη (62)

Η ρύθμιση του ενζύμου CYP27B1 σε εξω-νεφρικούς ιστούς διαφέρει από τη ρύθμιση στα νεφρικά κύτταρα (39). Μελέτες σε ανθρώπινους οστεοβλάστες υπέδειξαν πως τα επίπεδα mRNA του ενζύμου CYP27B1 δεν επηρεάζονται παρουσία των PTH, FGF23 ή ιόντων φωσφόρου. Τα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου, σε αντίθεση, προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου CYP27B1 (63). Υψηλά επίπεδα ασβεστίου στους οστεοβλάστες οδήγησαν σε αυξημένη τοπική σύνθεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, η οποία είναι υπεύθυνη για την ορυκτοποίηση των οστών. Έχει καταστεί σαφές ότι το νεφρικό και το εξω-νεφρικό CYP27B1 ρυθμίζονται από διαφορετικούς παράγοντες, με το εξω-νεφρικό γονίδιο να μεταβάλλεται από τοπικούς ιστο-ειδικούς παράγοντες, όπως π.χ. οι κυτοκίνες (40) (εικόνα 1.17).

Διαφορές στη ρύθμιση του νεφρικού CYP27B1 από εξω-νεφρικούς ιστούς πιθανότατα οφείλεται σε διαφορές στην λειτουργία του ενζύμου. Η τοπικά παραγόμενη $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ δεν δρα με ενδοκρινή τρόπο, αλλά με παρακρινείς και αυτοκρινείς μηχανισμούς, οι οποίοι ελέγχουν την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, την ορυκτοποίηση των οστών, την υπέρμετρη ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και την πρόοδο του όγκου (63) (64).



Εικόνα 1.17: Ρύθμιση των επιπέδων της $25(\text{OH})\text{D}$ και της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ από την ισορροπία ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων CYP27B1 και CYP24A1. Τοπικοί ιστο-ειδικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση των δύο γονιδίων. (4)

1.6.2 Ρύθμιση της έκφρασης του CYP24A1

Η ρύθμιση του ενζύμου CYP24A1 ελέγχεται παρομοίως από 3 παράγοντες: την PTH (παραθορμόνη), τον αυξητικό παράγοντα FGF23, καθώς και την 1,25(OH)₂D (εικόνα 1.15). Η παραθορμόνη λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του ενζύμου στους νεφρούς, καθώς η διαμεσολαβούμενη από την 1,25(OH)₂D δράση της οδηγεί στην αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση του mRNA του CYP24A1. Σε αντίθεση με την καταστολή της έκφρασης του ενζύμου στα νεφρικά κύτταρα, η PTH οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής του CYP24A1 στους οστεοβλάστες μέσω του ενδοκυττάριου μονοπατιού που περιλαμβάνει ενεργοποίηση του cAMP. Η επαγωγή του ενζύμου στους οστεοβλάστες πιθανότατα εξυπηρετεί την αποτροπή της υπέρμετρης αύξησης των επιπέδων της 1,25(OH)₂D, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει ανωμαλίες στον σχηματισμό των οστών (59).

Ο αυξητικός παράγοντας FGF23 προκαλεί επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου CYP24A1 στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρικών κυττάρων (59).

Η 1,25(OH)₂D προκαλεί αρνητική ανατροφοδότηση, καθώς η ίδια η ορμόνη επάγει την έκφραση του γονιδίου CYP24A1 και τον μετέπειτα καταβολισμό της βιταμίνης D. Με τον συγκεκριμένο σύστημα ανατροφοδότησης διασφαλίζεται ότι οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης ενδοκυττάρια κινούνται σε συγκεκριμένο εύρος τιμών ώστε να μην καθίσταται η ορμόνη τοξική για το κύτταρο.

Το νεφρικό CYP24A1 έχει ως κύρια λειτουργία την επίτευξη ισορροπίας στα επίπεδα της κυκλοφορούσας 25(OH)D και 1,25(OH)₂D, ενώ το εξω-νεφρικό CYP24A1 πιθανότατα δρα σε συνδυασμό με το τοπικά-παραγόμενο CYP27B1 για να ρυθμίζουν την τοπική παραγωγή και έκθεση των κυττάρων στην βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D (4).

1.7 CYP27B1 & CYP24A1 και παθογένεια

1.7.1 CYP27B1 και διαταραχές της υγείας του ανθρώπου

Μεταλλάξεις του γονιδίου CYP27B1 είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της σπάνιας αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου της ραχίτιδας από ψευδο-ανεπάρκεια βιταμίνης D ή αλλιώς HVDDR (Hereditary Vitamin D Dependent Rickets) (65). Περισσότερες από 70 μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο CYP27B1, οι οποίες προκαλούν απώλεια λειτουργικότητας στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Η συγκεκριμένη διαταραχή χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή της 1,25(OH)₂D, μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου και κατά συνέπεια χαμηλά επίπεδα ασβεστίου (υπασβεστιαμία) και φωσφόρου (υποφωσφαταιμία) στο πλάσμα και αυξημένη

παραθυρεοειδή ορμόνη (PTH). Οι ασθενείς που πάσχουν από HVDRR έχουν μαλακά, αδύναμα οστά, επιρρεπή σε κατάγματα (66).

Το γονίδιο CYP27B1 έχει συνδεθεί και με την καρκινογένεση. Η έκφραση του είναι απορυθμισμένη κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου CYP27B1 σε καρκινικό και υγιή ιστό από ωοθήκες ασθενών και υγιών δοτών υπέδειξε πως τα επίπεδα του παραπάνω γονιδίου μειώνονται στον καρκινικό ιστό σε σύγκριση με το επιθήλιο των υγιών ιστών και η σχέση που συνδέει την έκφραση του γονιδίου με το στάδιο διαφοροποίησης του καρκίνου είναι ανάλογη, καθώς οι πλήρως διαφοροποιημένοι όγκοι των ασθενών εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης ενώ οι ατελώς διαφοροποιημένοι χαμηλότερα (8) (43). Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP27B1 δεν παρατηρήθηκε σε καρκινικά κύτταρα θυρεοειδούς σε σχέση με υγιή κύτταρα (67). Μικρή τάση για μείωση, η οποία ωστόσο δεν είναι στατιστικώς σημαντική, παρατηρείται και σε κύτταρα κολικού αδενοκρινώματος ασθενών (Horvath et al., 2010). Δεν είναι αποσαφηνισθεί ακόμα ποια η σχέση που συνδέει την καρκινογένεση με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου CYP27B1, καθώς και τα διάφορα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την κατανόηση του ρόλου του παραπάνω γονιδίου στην εξέλιξη της καρκινογένεσης και την αντικαρκινική δράση της καλσιτριόλης.

1.7.2 CYP24A1 και διαταραχές της υγείας του ανθρώπου

Μεταλλάξεις του γονιδίου CYP24A1 έχουν συνδεθεί με την ιδιοπαθή παιδική υπερασβεστιαμία (idiopathic infantile hypercalcemia). Πλήθος μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας έχουν εντοπιστεί στο ένζυμο καταβολισμού της βιταμίνης D και συνδέονται με επιπλοκές στους νεφρούς, όπως νεφρολιθίαση και νεφρασβέστωση (68). Μεταλλάξεις στο γονίδιο CYP24A1 έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένο καταβολισμό της 1,25(OH)₂D και κατά συνέπεια αυξημένες συγκεντρώσεις της μέσα στον οργανισμό. Οι συγκεντρώσεις αυτές προκαλούν αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου, γεγονός που οδηγεί σε υπερασβεστιαμία (69).

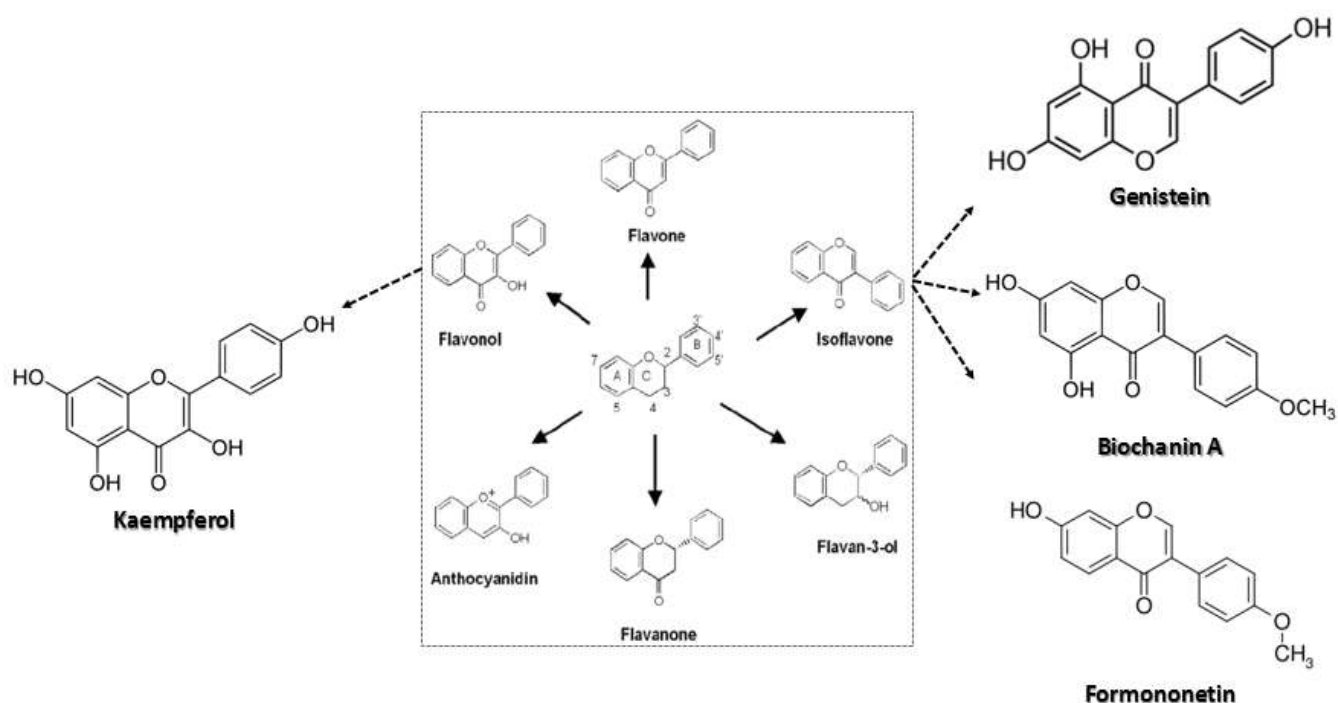
Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του CYP24A1 έχουν συσχετιστεί με την καρκινογένεση. Πληθώρα καρκινικών κυττάρων παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του γονιδίου CYP24A1, έχοντας ως αποτέλεσμα τον αυξημένο μεταβολισμό της 1,25(OH)₂D μέσα στο κύτταρο «ακυρώνοντας» τις αντικαρκινικές δράσεις της βιολογικά δραστικής μορφής της βιταμίνης D. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρήθηκαν σε καρκινικούς ιστούς προστάτη σε σύγκριση με υγιείς ιστούς (Tannour-Louet et al., 2014). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη μελέτη των Balla et al. όπου τα επίπεδα mRNA του

CYP24A1 σε καρκινικά κύτταρα θυρεοειδούς ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα συγκριτικά με υγιή κύτταρα (67). Αυξημένη έκφραση του γονιδίου παρατηρείται και σε κύτταρα κολικού αδενοκαρκινώματος, όπου υπάρχει σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του CYP24A1 συγκριτικά με υγιείς ιστούς εθελοντών και με αδενώματα. Το γεγονός αυτό αποτελεί μία ένδειξη ότι η έκφραση του CYP24A1 δεν αυξάνεται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης αλλά σε πιο προχωρημένα στάδια. Καμία συσχέτιση με ιστολογικές παραμέτρους των όγκων δεν συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου CYP24A1 (Horvath et al., 2010).

Κοινό χαρακτηριστικό σε διάφορους καρκινικούς ιστούς από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες αποτελεί η αυξημένη έκφραση του παραπάνω γονιδίου. Δεν είναι ωστόσο κατανοητό ποιοι παράγοντες οδηγούν στην αύξηση της έκφρασης του. Οι παράγοντες που έχουν αποδοθεί στην υπερέκφραση του γονιδίου στον καρκίνο και δεν σχετίζονται με την επαγωγή από την καλσιτριόλη είναι η ενίσχυση της χρωμοσωμικής περιοχής 20q13.2-13.3 (στην οποία και ανήκει το γονίδιο CYP24A1), μετα-μεταγραφική ρύθμιση του mRNA από miRNA, αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού που περιλαμβάνει την κινάση CK2 και επιγενετικές τροποποιήσεις στον υποκινητή του γονιδίου CYP24A1 (6). Όλα οι παραπάνω υποθέσεις απομένει να μελετηθούν περαιτέρω. Το γονίδιο CYP24A1 θεωρείται πλέον ένα πιθανό ογκογονίδιο και αποτελεί στόχος αντικαρκινικής θεραπείας (39) (6) (64) (70) (60) (Chen et al., 2011).

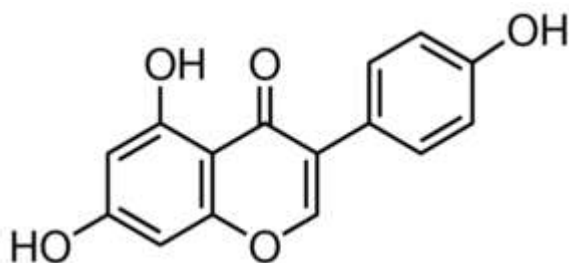
1.8 Φυσικές ενώσεις-ρυθμιστές της έκφρασης των ενζύμων CYP27B1 και CYP24A1

Χαμηλά ποσοστά διάφορων καρκινικών τύπων παρατηρούνται σε Ασιατικούς πληθυσμούς συγκριτικά με τον Δυτικό πολιτισμό. Οι διαφορές αυτές έχουν συσχετιστεί με περιβαλλοντικούς παράγοντες, και ειδικότερα την διατροφή των Ασιατών, η οποία περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες σόγιας και παραγώγων της σόγιας (Banerjee et al., 2008) (71). Οι τροφές αυτές είναι πλούσιες σε φυτο-οιστρογόνα. Οι φυσικοί αυτοί μεταβολίτες έχουν μελετηθεί εκτενώς τόσο in vitro όσο και in vivo για τις αντικαρκινικές ιδιότητες που διαθέτουν. Μέρος της παρούσας εργασίας αποτελεί ο έλεγχος της επίδρασης 4 φυσικών φλαβονοειδών στην έκφραση των γονιδίων *CYP27B1* και *CYP24A1*. Οι ουσίες αυτές είναι οι εξής: Genistein, Kaempferol, Biochanin A και Formononetin (εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18: Απεικόνιση και κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών που εξετάστηκαν

1.8.1 Genistein



Εικόνα 1.19: Δομή του ισοφλαβονοειδούς genistein

1.8.1.1. Δράση genistein

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να διευκρινιστεί ο ρόλος της genistein στην καρκινογένεση. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες της genistein σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία περιλαμβάνουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου, αναστολή κινάσων τυροσίνης, αναστολή της τοποϊσομεράσης II, καθώς και αντι-οιστρογονικές δράσεις (Banerjee et al., 2008). Η genistein έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε συνεργιστική δράση με την 1,25(OH)₂D. Η genistein προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M, ενώ η 1,25(OH)₂D αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1/0. Συν-χορήγηση των 2 ουσιών προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στις 2 φάσεις και κρίνεται πιο αποτελεσματική στην

αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (72). Αρνητική επίδραση εμφανίζει η genistein και στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, cyp27b1 και cyp24a1. Πιο συγκεκριμένα, το ισοφλαβονοειδές αυτό φαίνεται να αναστέλλει την έκφραση των 2 ενζύμων σε μεταγραφικό επίπεδο σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (64). Μια ακόμη μελετημένη δράση της genistein στα κύτταρα του μαστού αφορά τη δράση της ως αντι-οιστρογόνο, καθώς λειτουργεί ως αναστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER), καθώς και ενζύμων που οδηγούν στην παραγωγή των οιστρογόνων (73).

Πολλές μελέτες, ωστόσο, κάνουν λόγο για προ-καρκινικές ιδιότητες της genistein, οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Λόγω της ικανότητας της να προσδένεται στον υποδοχέα των στεροειδών, η genistein διαθέτει οιστρογονικές ιδιότητες. Η συγγένεια σύνδεσης της με τον υποδοχέα ER είναι αρκετές φορές χαμηλότερη από αυτή της εστραδιόλης (74). Εκτός από την απευθείας σύνδεση της με τον υποδοχέα των οιστρογόνων, η genistein μπορεί να επηρεάσει την οιστρογονικότητα έμμεσα μέσω της αναστολής του ενζύμου cyp1a1. Η genistein λειτουργεί ως μη ανταγωνιστικός αναστολέας του παραπάνω ενζύμου του κυτοχρώματος P450, το οποίο πέραν της ικανότητας του να μεταβολίζει καρκινογόνες ουσίες, είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό της 17β-εστραδιόλης. Συνεπώς, η επαγόμενη από την genistein αναστολή του καταβολισμού της εστραδιόλης μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά επίπεδα κυκλοφορούσας εστραδιόλης και κατά συνέπεια αυξημένη ενεργοποίηση του ER (73).

Με τα μέχρι τώρα δεδομένα, μπορούμε να είμαστε σίγουροι αν η genistein δρα ως αντικαρκινική ή καρκινογόνα ουσία; Οι διαφορετικές αποκρίσεις των κυτταρικών σειρών στην genistein πιθανόν υποδεικνύουν ένα δόσο-εξαρτώμενο και κυτταρο-εξαρτώμενο τρόπο δράσης. Μία μελέτη των Hsieh et al., καταδεικνύει αυτό το γεγονός. Η μιτογόνο δράση της genistein σε κύτταρα του μαστού παρατηρείται σε χαμηλές δόσεις (0,01-1μM), ενώ οι αντικαρκινικές της δράσεις σχετίζονται με υψηλές δόσεις (>10μM) (75).

1.8.1.2 Genistein και διατροφή

		mean content
Flavonoids - Isoflavonoids - Genistein		
Alcoholic beverages		
Beers	Beer [Ale]	1.00e-03 mg/100 ml
Non-alcoholic beverages		
Soy drinks	Soy, milk	0.41 mg/100 ml
Seasonings		
Other seasonings	Soy sauce	0.23 mg/100 ml
Seeds		
Nuts	Peanut	0.03 mg/100 g FW
Pulses - Beans - Common bean	Common bean [Black], whole, raw	0.60 mg/100 g FW
	Common bean [Others], whole, raw	0.20 mg/100 g FW
	Common bean [White], whole, raw	0.20 mg/100 g FW
Soy and soy products	Soy paste, cheonggukang	3.50 mg/100 g FW
	Soy paste, doenjang	0.03 mg/100 g FW
	Soy paste, miso	7.25 mg/100 g FW
	Soy paste, nato	4.28 mg/100 g FW
	Soy, bacon bits	4.80 mg/100 g FW
	Soy, burger, raw	0.39 mg/100 g FW
	Soy, cheese	0.39 mg/100 g FW
	Soy, flour	3.62 mg/100 g FW
	Soy, meat	5.22 mg/100 g FW
	Soy, milk powder	1.88 mg/100 g FW
	Soy, pudding	0.50 mg/100 g FW
	Soy, sausage	1.13 mg/100 g FW
	Soy, tempe	10.00 mg/100 g FW
	Soy, tofu	1.63 mg/100 g FW
	Soy, tofu, fermented	9.68 mg/100 g FW
	Soy, yogurt	2.14 mg/100 g FW
	Soybean, edamame	0.54 mg/100 g FW
Soybean, roasted	4.89 mg/100 g FW	
Soybean, sprout, raw	0.12 mg/100 g FW	

Εικόνα 1.20: Εντοπισμός της genistein στις τροφές (phenol-explorer.eu)

Η genistein έχει εντοπιστεί σε πληθώρα τροφίμων και ποτών. Συγκεκριμένα, η μύρα, τα προϊόντα σόγιας, διάφορα είδη ξηρών καρπών, καθώς και τα όσπρια περιέχουν σημαντικές ποσότητες του φυσικού αυτού ισοφλαβονοειδούς (εικόνα 1.20).

1.8.1.3 Genistein & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1

Πολλές μελέτες κάνουν λόγο για την αρνητική επίδραση της genistein στο ένζυμο cyp24a1. Το φυσικό αυτό φλαβονοειδές φαίνεται να λειτουργεί ως μη ειδικός αναστολέας του ενζύμου, επιμηκύνοντας με αυτό τον τρόπο τον χρόνο ημι-ζωής της 1,25(OH)₂D. Η επιστημονική μελέτη των Wang et al. υποστηρίζει πως η ικανότητα της genistein να αναστέλλει το cyp24a1 και να ενισχύει την αντι-καρκινική δράση της ενεργής μορφής της βιταμίνης D πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της ενζυμικής ικανότητας της πρωτεΐνης και όχι μέσω επίδρασης στην παραγωγή ή τη σταθερότητα του mRNA (Wang et al., 2012). Διαφορετικό τρόπο δράσης του φλαβονοειδούς

υποδεικνύει μία άλλη ερευνητική ομάδα, η οποία υποστηρίζει ότι η αναστολή του ενζύμου *cyp24a1* από την *genistein* πραγματοποιείται μέσω αναστολής της μεταγραφής του γονιδίου του (64).

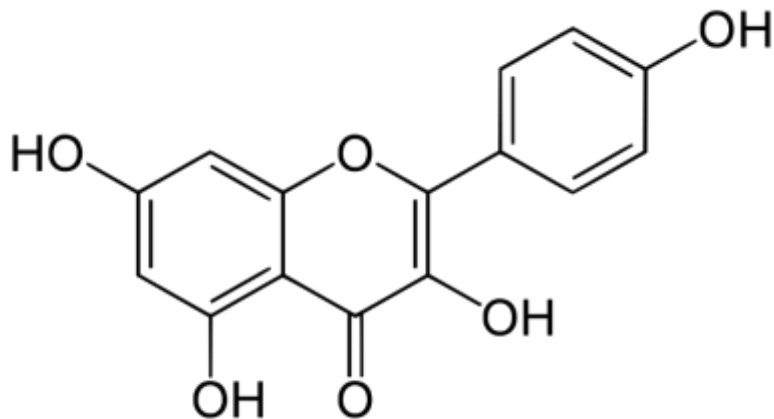
1.8.1.4. Genistein και κλινικές δοκιμές

Κλινικές δοκιμές φάσης I και II με συμπληρώματα ισοφλαβονοειδών έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Στις δοκιμές φάσης I εξετάστηκαν η ασφάλεια, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι και η απόδοση των χορηγούμενων από το στόμα ισοφλαβονοειδών. Δεν αναφέρθηκε τοξικότητα στους ασθενείς. Οι συγκεντρώσεις *genistein* στο πλάσμα των ασθενών έφτασαν μέχρι τα 16.3μM. Κλινική δοκιμή φάσης II πραγματοποιήθηκε εκ νέου σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και εξετάστηκε η συσχέτιση των επιπέδων του προστατικού αντιγόνου (PSA) με την από του στόματος χορήγηση των ισοφλαβονοειδών. Το συμπλήρωμα που λάμβαναν περιείχε *genistein*, *daidzein* και *glycitin* σε αναλογία 1.3:1:0.3. Τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής υπέδειξαν πως η χορήγηση συμπληρώματος ισοφλαβονοειδών ανέστειλε την αυξητική τάση των επιπέδων PSA στο πλάσμα των ασθενών τόσο σε υποπληθυσμούς ευαίσθητους σε ανδρογόνα (*androgen-sensitive*) όσο και σε υποπληθυσμούς ανθεκτικούς στα ανδρογόνα (*androgen-insensitive*) (Banerjee et al., 2008). Η έλλειψη σημαντικών ανεπιθύμητων παρενεργειών από τη χορήγηση των ισοφλαβονοειδών καθιστά επιτακτική την ανάγκη για την περαιτέρω μελέτη των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων δρουν και την πιθανή εφαρμογή τους ως χημειοπροστατευτικά και θεραπευτικά μέσα.

1.8.1.5 Συνεργιστικές και άλλες ιδιότητες της genistein

In vitro μελέτες καταδεικνύουν την συνεργιστική δράση της *genistein* σε συνδυασμό με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα. Μελέτη των Banerjee et al. πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της ενίσχυσης της δράσης του φαρμάκου *gemcitabine* μετά από προ-επώαση παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων παρουσία *genistein*. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι η *genistein* (25 μmol/L) ενίσχυσε την αντικαρκινική δράση του φαρμάκου *gemcitabine*, καθώς ο συνδυασμός του ισοφλαβονοειδούς και του φαρμάκου οδήγησε σε μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης *in vitro* σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία μίας μόνο ένωσης και αύξησε την *in vivo* θεραπευτική δράση του φαρμάκου, καθώς μείωσε το μέγεθος του όγκου στα ποντίκια (1mg *genistein*/μέρα/ποντίκι) (76). Παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα μελετήθηκαν και από την ομάδα των Li et al. για την επίδραση της *genistein* στη δράση των *docetaxel* και *cisplatin*. 30μmol/L *genistein* συνδυαστικά με τα παραπάνω αντικαρκινικά φάρμακα οδήγησαν σε αυξημένη αναστολή του κυτταρικού θανάτου και αυξημένη επαγωγή απόπτωσης των κυττάρων (77).

1.8.2 Kaempferol



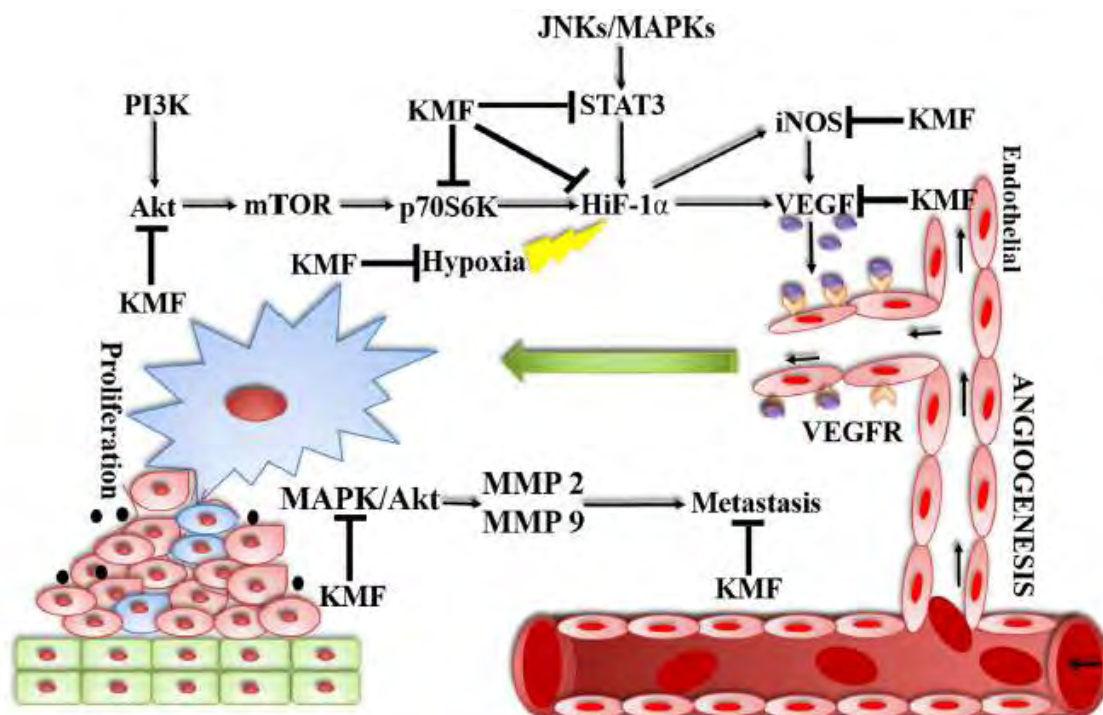
Εικόνα 1.21: Δομή του flavonol kaempferol

1.8.2.1. Δράση kaempferol

Πολλές πρόσφατες *in vitro* και *in vivo* μελέτες υποδεικνύουν τις αντι-πολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές ιδιότητες της kaempferol σε διάφορες ιστούς, όπως μαστό, ωοθήκες, πνεύμονα, πάγκρεας, στομάχου, προστάτη, νεφρών κ.ά.

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων από την kaempferol περιλαμβάνει αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικές φάσεις (G0/G1 και G2/M), αναστολή της έκφρασης διάφορων κυκλινών (κυκλίνες A, B1, D1, E) και επαγωγή της έκφρασης των CDK αναστολέων, p21 και p27. Πέρα του ρόλου της στον κυτταρικό κύκλο, η kaempferol επιδρά και στην κυτταρική απόπτωση, καθώς επάγει τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων είτε μέσω ενεργοποίησης της ενδοκυττάριας μιτοχονδριακής απόπτωσης είτε μέσω εξωκυττάριου μηχανισμού που διαμεσολαβείται από τον προσδέτη TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (78).

Μελέτη του εργαστηρίου μας απέδειξε πως το φυτικό αυτό φλαβονοειδές αναστέλλει έμμεσα την ενεργότητα του HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1), χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης, και μειώνει την κυτταρική επιβίωση υπό συνθήκες μειωμένου οξυγόνου σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα (Huh7) (79). Ανασταλτική επίδραση ασκεί η kaempferol και στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Αναλυτικότερα, η kaempferol ασκεί αρνητική δράση στις MMPs (MMP2 & 9) μέσω αναστολής των μονοπατιών MAPK/Akt (εικόνα 1.22). Τέλος, αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη G2/M φάση και επαγωγή της απόπτωσης προκαλεί η kaempferol σε νεφρικά καρκινικά κύτταρα. 50, 100 και 150μM του φλαβονοειδούς ανέστειλαν το μονοπάτι EGFR/p38 και οδήγησαν τα κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο (80).



Εικόνα 1.22: Αντι-αγγειογόνες και αντι-μεταστατικές ιδιότητες της kaempferol (78)

1.8.2.2. Kaempferol και διατροφή

		mean content
Flavonoids - Flavonols - Kaempferol		
Alcoholic beverages		
Wines - Berry wines	Black crowberry, wine	0.03 mg/100 ml
	Blackcurrant, wine	0.05 mg/100 ml
	Wine [Red]	0.23 mg/100 ml
Wines - Grape wines	Wine [Red]	0.23 mg/100 ml
	Wine [White]	0.02 mg/100 ml
Fruits and fruit products		
Fruits - Berries	Lingonberry, raw	0.53 mg/100 g FW
	Red raspberry, raw	2.14e-03 mg/100 g FW
Non-alcoholic beverages		
Fruit juices - Berry juices	Red raspberry, pure juice	0.04 mg/100 ml
Fruit juices - Pome juices	Apple [Dessert], pure juice	4.57e-03 mg/100 ml
Tea infusions	Tea [Black], bottled	0.13 mg/100 ml
	Tea [Black], infusion	6.38e-03 mg/100 ml
Seasonings		
Spices	Capers	104.29 mg/100 g FW
	Caraway	18.40 mg/100 g FW
	Cloves	23.80 mg/100 g FW
	Cumin	38.80 mg/100 g FW
Seeds		
Nuts	Almond	3.17e-03 mg/100 g FW
Pulses - Beans - Common bean	Common bean [Black], whole, raw	1.80 mg/100 g FW
	Common bean [White], whole, raw	0.82 mg/100 g FW
Vegetables		
Fruit vegetables	Tomato [Cherry], whole, raw	6.67e-03 mg/100 g FW
	Tomato, whole, raw	1.00e-02 mg/100 g FW
Pod vegetables	Broad bean pod, raw	0.03 mg/100 g FW

Εικόνα 1.23: Εντοπισμός της kaempferol στις τροφές (phenol-explorer.eu)

Η kaempferol εντοπίζεται σε διάφορα είδη σταφυλιών και κρασιού, σε λαχανικά, σε μπαχαρικά, καθώς και σε ορισμένα είδη ξηρών καρπών (εικόνα 1.23). Μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία της kaempferol στο τσάι, στο μπρόκολο, στα μήλα, στις φράουλες και τα όσπρια (81).

1.8.2.3 Kaempferol & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1

Άγνωστη παραμένει η σχέση της kaempferol με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, cyp27b1 και cyp24a1, καθώς δεν έχουν συνδεθεί σε καμία μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία. Ο σκοπός της μελέτης της επίδρασης της kaempferol στα 2 παραπάνω ένζυμα είναι διπλός: πρωταρχικός στόχος είναι η ανακάλυψη της θετικής ή αρνητικής σχέσης που συνδέει την kaempferol με την έκφραση των γονιδίων *CYP27B1* και *CYP24A1*, καθώς και η μελέτη της διαφοράς δραστηριότητας της kaempferol σε σχέση με την αντίστοιχη της genistein στα παραπάνω ένζυμα, με απώτερο σκοπό την συσχέτιση διαφορετικής δομής και δραστηριότητας.

1.8.2.4 Kaempferol και κλινικές δοκιμές

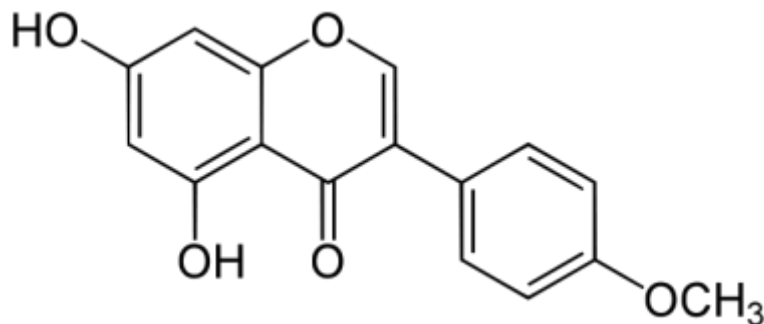
Μία μελέτη για την *in vivo* επίδραση της kaempferol στην πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών πραγματοποιήθηκε από το Nurses' Health Study με τη συμμετοχή Αμερικανών γυναικών νοσοκόμων. Η μελέτη περιλάμβανε 66.940 εθελόντριες, οι διατροφικές συνήθειες των οποίων παρακολουθούνταν από το 1984 έως το 2002. Μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα, 347 συμμετέχουσες ανέπτυξαν καρκίνο των ωοθηκών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπέδειξε πως η συνολική κατανάλωση φλαβονοειδών (kaempferol, myricetin, quercetin, luteolin και apigenin) δεν σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική 40% μείωση στη συχνότητα εμφάνισης καρκινογένεσης στην ομάδα που κατανάλωνε υψηλές συγκεντρώσεις kaempferol συγκριτικά με την ομάδα που κατανάλωνε χαμηλές συγκεντρώσεις του flavonol (Gates et al., 2007).

1.8.2.5 Συνεργιστικές και άλλες ιδιότητες της kaempferol

Οι συνεργιστικές ιδιότητες διαφόρων φλαβονοειδών μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο για την ενίσχυση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όσο και για την μείωση των παρενεργειών. Η kaempferol αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη ένωση, η οποία θα μπορούσε να ενισχύσει τη δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Μελέτη των Paio et al. υπέδειξε ότι η kaempferol επηρέασε την φαρμακοκινητική της tamoxifen, καθώς αύξησε την βιοδιαθεσιμότητα της μετά από χορήγηση από του στόματος 2,5mg/kg kaempferol. Η kaempferol πιθανότατα δρα ως αναστολέας των ενζύμων που καταβολίζουν την tamoxifen, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης και της ημίσειας ζωής του φαρμάκου (82). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και από μία άλλη

ερευνητική ομάδα που συσχετίζει την χορήγηση 1,4 mg/kg kaempferol με την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου etoposide σε αρουραίους (83).

1.8.3 Biochanin A



Εικόνα 1.24: Δομή του ισοφλαβονοειδούς Biochanin A

1.8.3.1 Δράση Biochanin A

Η biochanin A αποτελεί αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια λόγω του μεγάλου εύρους των φαρμακολογικών της δράσεων, όπως νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (84). Οι μοριακές δράσεις της biochanin A περιλαμβάνουν επιδράσεις στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, καθώς και σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και απόπτωση.

Η biochanin A οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S σε καρκινικές σειρές πνεύμονα (A549 και 95D) σε συγκεντρώσεις 50-400μM (85). Παρόμοια αποτελέσματα υποδεικνύει και η μελέτη των Sehdev et al. όπου η ανάπτυξη καρκινικών μαστικών κυττάρων SK-BR-3 αναστέλλεται παρουσία 50-100μM biochanin A (86). Η παρουσία 50 μM biochanin A μπορεί να αναστείλει κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με μιτογόνο δράση και με κυτταρική ανάπτυξη, όπως το μονοπάτι των Erk 1/2 και Akt/mTOR σε καρκινικά μαστικά κύτταρα SK-BR-3 (86). Η ανασταλτική επίδραση της biochanin A στη ενεργοποίηση της Akt πρωτεΐνης παρατηρήθηκε και σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος Panc1 και AsPC-1, όπου υψηλές συγκεντρώσεις του ισοφλαβονοειδούς (>30μM) ανέστειλαν την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt (87).

1.8.3.2. Biochanin A και διατροφή

Dietary source	Amount of biochanin A (mg/100g)
Alfalfa seeds, sprouted, raw	0.04
Apricots, dried, sulfured, uncooked	0.05
Beans, great northern, mature seeds, raw	0.60
Beans, kidney, all types, mature seeds, cooked, boiled, without salt	0.41
Beans, pinto, mature seeds, raw	0.28
Beans, snap, green, raw	0.04
Broadbeans (fava beans), mature seeds, raw	0.12
Chickpeas (garbanzo beans, bengal gram), mature seeds, raw	1.54
Clover sprouts, raw	0.59
Cowpeas, common (blackeyes, crowder, southern), mature seeds, raw	0.58
Kala chana, mature seeds, raw	1.26
Lima beans, large, mature seeds, raw	0.27
Lima beans, thin seeded (baby), mature seeds, raw	0.37
Pigeon peas (red gram), mature seeds, raw	0.10

Εικόνα 1.25: Εντοπισμός της biochanin A στις τροφές (84)

Η biochanin A εντοπίζεται σε πλήθος φυτικών προϊόντων, όπως τα όσπρια (σόγια, φασόλια, ρεβύθια, αμπελοφάσουλα), οι ξηροί καρποί, το λάχανο κ.ά.(εικόνα 1.25).

1.8.3.3 Biochanin A & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1

Καμία πληροφορία δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία για την επίδραση της biochanin A στην έκφραση των γονιδίων *CYP27B1* και *CYP24A1*. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν ο έλεγχος της επίδρασης του ισοφλαβονοειδούς στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων, καθώς και η συσχέτιση της δράσης της biochanin A με την αντίστοιχη της kaempferol και της genistein για την μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας.

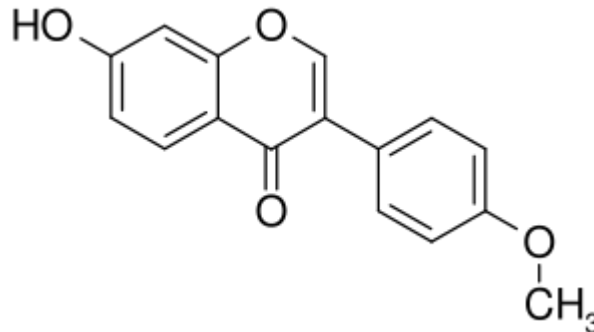
1.8.3.4 Biochanin A και κλινικές δοκιμές

Δυστυχώς δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία κλινική μελέτη, cohort study ή case-control study που να αφορά την επίδραση της biochanin A in vivo σε ανθρώπους. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα αφορούν την επίδραση συνολικών εκχυλισμάτων φλαβονοειδών ή τροφών που προέρχονται από τη σόγια σε συνάρτηση με την καρκινογένεση, και όχι άμεσα με την χορήγηση καθαρής biochanin A. Συνεπώς, δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπέρασμα για την in vivo επίδραση της biochanin A.

1.8.3.5 Biochanin A και συνεργιστικές ιδιότητες

In vitro πειράματα πραγματοποιήθηκαν για την διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης Biochanin A και Sorafenib σε ανθρώπινες ηπατικές καρκινικές σειρές (HepG2, SNU449, Huh7). Η συν-χορήγηση Sorafenib και Biochanin A σε αναλογία 1:50 αποδείχτηκε η κατάλληλη συνθήκη για τη μέγιστη απόπτωση των κυττάρων και στις 3 κυτταρικές σειρές. Ο συνδυασμός των 2 ουσιών αύξησε σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων στην pre-G φάση, ενώ μείωσε τον αριθμό των κυττάρων στην S φάση συγκριτικά με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνο στη Sorafenib. Η Biochanin A ενίσχυσε τις ανασταλτικές δράσεις της Sorafenib στον κυτταρικό κύκλο, καθώς ο συνδυασμός των 2 ουσιών οδήγησε σε μεγαλύτερη αναστολή της κυκλίνης D1 συγκριτικά με τα κύτταρα που εκτέθηκαν μόνο στη Sorafenib. Ανάλυση Western Blot έδειξε πως συνδυαστικά οι 2 ουσίες οδήγησαν στη μέγιστη αύξηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, ενώ μειώθηκε στο μέγιστο η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Συμπερασματικά, η μελέτη των Youssef et al. για τη συνεργιστική δράση των Biochanin A και Sorafenib υποδεικνύει πως in vitro η συν-χορήγηση των 2 ουσιών κρίθηκε αποτελεσματικότερη στην αύξηση του κυτταρικού θανάτου, την μέγιστη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση μονοπατιών μιτοχονδριακής απόπτωσης μέσω της Bax πρωτεΐνης (88).

1.8.4. Formononetin



Εικόνα 1.26: Δομή του ισοφλαβονοειδούς Formononetin

1.8.4.1 Δράση formononetin

Η formononetin ως φυτο-οιστρογόνο κατέχει αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς διάφορες μελέτες υποδεικνύουν την ικανότητα της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να επάγει την απόπτωση τους. Υψηλές συγκεντρώσεις formononetin (>20μM) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος (U20S), καρκινικών κυττάρων προστάτη (PC-3) και καρκινικών μαστικών κυττάρων (MCF-7) (89) (90) (91). Η αναστολή του

πολλαπλασιασμού στα PC-3 κύτταρα φαίνεται πως διαμεσολαβείται από τις αντι-οιστρογονικές ιδιότητες της formononetin, η οποία αναστέλλει την ενεργοποίηση και αυτο-φωσφορυλίωση του υποδοχέα IGF-1R (90). Αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε μαστική καρκινική σειρά παρατηρήθηκε μετά από 48ωρη επώαση με υψηλές συγκεντρώσεις της formononetin. Η παρουσία του ισοφλαβονοειδούς οδήγησε σε συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G0/G1 με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (91). Παρόμοια αποτελέσματα καταδεικνύει και η μελέτη των Li et al., όπου η formononetin αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη των PC-3 κυττάρων σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1 μέσω αναστολής της παραγωγής των CDK4 και Cyclin D1 πρωτεϊνών (92). Αναστολή του μονοπατιού PI3K/Akt σε κύτταρα HeLa παρατηρήθηκε μετά από επώαση 24 ωρών παρουσία της formononetin. Συγκεντρώσεις >5μM ανέστειλαν το παραπάνω μονοπάτι οδηγώντας στην αναστολή της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων (93). Όλα τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες που κατέχει η formononetin και την πιθανή εφαρμογή της σε κλινικό επίπεδο ως φυσική αντικαρκινική θεραπεία.

1.8.4.2. Formononetin και διατροφή

		mean content	min	max	SD	n	N	number of references
Flavonoids - Isoflavonoids - Formononetin								
Non-alcoholic beverages								
Soy drinks	Soy milk	1.20e-03 mg/100 ml	0	1.20e-03	0.00	1	1	1
Seasonings								
Other seasonings	Soy sauce	5.80e-03 mg/100 ml	0	5.80e-03	0.00	1	1	1
Seeds								
Other seeds	Sunflower seed, shell	0.02 mg/100 g FW	0	0.02	0.00	1	1	1
Soy and soy products								
	Soy germ, raw	5.30e-03 mg/100 g FW	0	5.30e-03	0.00	1	1	1
	Soy, tocof. bits	4.10e-03 mg/100 g FW	0	4.10e-03	0.00	1	1	1
	Soy, larger, raw	1.90e-05 mg/100 g FW	0	1.90e-05	0.00	1	1	1
	Soy, flour	0.01 mg/100 g FW	0	1.00e-02	0.03	0.01	2	6
	Soy, tempe	1.90e-03 mg/100 g FW	0	1.90e-03	0.00	1	1	1
	Soy, tofu	9.00e-04 mg/100 g FW	0	9.00e-04	0.00	1	1	1
	Soy, yogurt	1.90e-03 mg/100 g FW	0	1.90e-03	0.00	1	1	1
	Soybean, roasted	6.16 mg/100 g FW	0	6.16	0.00	1	1	1

Εικόνα 1.27: Εντοπισμός της formononetin στις τροφές (phenol-explorer.eu)

Η formononetin εντοπίζεται σε πληθώρα φυσικών τροφών (εικόνα 1.27). Μαζί με άλλα φυτο-οιστρογόνα, εμπεριέχεται σε όσπρια, όπως τα φασολάκια και η σόγια. Μεγάλες συγκεντρώσεις του ισο-φλαβονοειδούς υπάρχουν σε παραδοσιακά βότανα της Κίνας.

1.8.4.3 Formononetin & ρύθμιση της έκφρασης των CYP27B1 και CYP24A1

Καμία σύνδεση δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία για την formononetin και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, CYP27B1 και CYP24A1. Άγνωστη μέχρι σήμερα παραμένει η επίδραση του φλαβονοειδούς στην έκφραση και την δραστηριότητα των παραπάνω ενζύμων. Μέρος της

διπλωματικής αυτής εργασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της επίδρασης της formononetin στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά, καθώς και η συσχέτιση της δραστηριότητας του φυσικού φλαβονοειδούς με αυτή των υπόλοιπων φυσικών ενώσεων που μελετήθηκαν (genistein, kaempferol, biochanin A) με στόχο την μελέτη διαφοράς δομής-δραστηριότητας.

1.8.4.4 Formononetin και κλινικές δοκιμές

Ελάχιστες πληροφορίες είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία για την *in vivo* επίδραση της formononetin λόγω έλλειψης κλινικών δοκιμών. Τα μέχρι τώρα πρώιμα δεδομένα μίας κλινικής δοκιμής υποδεικνύουν την ευεργετική δράση των ισοφλαβονοειδών στην αναστολή της έναρξης της καρκινογένεσης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Η μελέτη των Jarred et al. αφορά 20 άνδρες με μη μεταστατικό καρκίνο του προστάτη οι οποίοι λάμβαναν καθημερινά 160 mg ισοφλαβονοειδών, όπως formononetin, biochanin A, genistein και daidzein σε αναλογία biochanin A + genistein : formononetin + daidzein 2:1. Πριν και μετά την λήψη των ισοφλαβονοειδών οι ασθενείς ελέγχθηκαν για βιοχημικές, κλινικές και παθολογικές παραμέτρους. Τα επίπεδα PSA, τεστοστερόνης και άλλων βιοχημικών παραμέτρων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές πριν και μετά τη λήψη των ισοφλαβονοειδών. Δείγματα των ασθενών ελήφθησαν ύστερα από προστατεκτομή και αναλύθηκαν για επίπεδα κυτταρικής απόπτωσης. Στα δείγματα των ασθενών που λάμβαναν το ειδικό συμπλήρωμα το ποσοστό κυτταρικής απόπτωσης ήταν στατιστικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των ασθενών που ανήκαν στο control group. Μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης παρατηρήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα των ασθενών με χαμηλό έως μέτριο βαθμό καρκινογένεσης (low-to-moderate-grade cancer). Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες των φλαβονοειδών. Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών κυρίως στην έναρξη της καρκινογένεσης παρά στην εξέλιξη της νόσου (94). Καμία κλινική μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής για την *in vivo* δράση της formononetin χωρίς την συν-χορήγηση άλλων φλαβονοειδών.

1.8.4.5 Formononetin και συνεργιστικές ιδιότητες

Οι συνεργιστικές ιδιότητες της formononetin και του temozolomide (TMZ) μελετήθηκαν σε καρκινική σειρά γλοιοβλαστώματος (C6). Προσθήκη formononetin και TMZ σε σταθερή αναλογία 1:6.25 στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την αναστολή που παρατηρήθηκε από την επίδραση των 2 ουσιών ξεχωριστά. Αλλαγές παρατηρήθηκαν και στη μορφολογία των κυττάρων που εκτέθηκαν στο συνδυασμό των ουσιών, καθώς τα κύτταρα είχαν μικρότερη επιφάνεια και πιο συμπυκνωμένη χρωματίνη συγκριτικά με τα κύτταρα control και τα κύτταρα που εκτέθηκαν

μεμονωμένα στις ουσίες. Ο συνδυασμός 80μM formononetin και 500μM TMZ είχε ως αποτέλεσμα την μέγιστη μείωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, την μέγιστη αύξηση των Bax, cleaved caspase-3 και cleaved-caspase 9 (95). Η περαιτέρω μελέτη της συνεργιστικής δράσης formononetin και TMZ θα υποδείξει αν το φυσικό αυτό φλαβονοειδές μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη ως μέρος συνδυαστικής θεραπείας στην αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος και την άρση της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στο TMZ.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Πληθώρα ερευνητικών εργασιών έχουν πραγματοποιηθεί για την μελέτη του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, οι βιομετατροπές της βιταμίνης πραγματοποιούνται από ένζυμα μεταβολισμού P450. Η πλειοψηφία των μελετών αφορούν την κατανόηση των μηχανισμών αδρανοποίησης της καλσιτριόλης, της βιολογικά δραστικής μορφής της βιταμίνης D. Στόχος των πρόσφατων ερευνών είναι η ενίσχυση της δράσης της 1,25(OH)₂D μέσω αναστολής του ενζύμου που την καταβολίζει, *cyp24a1*, τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο δραστικότητας πρωτεΐνης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του μεταβολισμού της βιταμίνης D στην καρκινική ηπατική σειρά Huh7. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε

- η έκφραση των γονιδίων *CYP27B1* και *CYP24A1*
- η επίδραση των υποστρωμάτων των ενζύμων στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η επίδραση της 25(OH)D στην έκφραση του *CYP27B1* και η επίδραση της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του *CYP24A1*.
- η ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *CYP24A1* από φυσικές ενώσεις με σκοπό την ενίσχυση της αντικαρκινικής δράσης της καλσιτριόλης. Οι ενώσεις που ελέγχθηκαν είναι οι εξής: Genistein, Kaempferol, Biochanin A και Formononetin.

Η επίτευξη των παραπάνω στόχων περιλαμβάνει ανάλυση των επιπέδων mRNA των αντίστοιχων γονιδίων μέσω real-time PCR.

Το δεύτερο μέρος της διπλωματικής αυτής εργασίας περιλαμβάνει την ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης της 1,25(OH)₂D από κυτταρικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο της U-HPLC. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας αναπτύχθηκε μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της 25(OH)D σε πλάσμα ασθενών και υγιών ατόμων (96). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 UHPLC. Η διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου ακολουθεί στις παρακάτω σελίδες.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Huh7. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος.

3.1.2. Εκκινητές

Στα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA με RT-PCR (PCR πραγματικού χρόνου), οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

CYP27B1 Forward: 5' TGG CCC AGA TCC TAA CAC ATT T 3'

CYP27B1 Reverse: 5' GTC CGG GTC TTG GGT CTA ACT 3'

Οι εκκινητές του γονιδίου CYP27B1 βασίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία (97).

CYP24A1 Forward: 5' TCT CAA GAA ACA GCA CGA CAC CC 3'

CYP24A1 Reverse: 5' GCA CCG ACT CAA AGG AAC CCA AC 3'

Οι εκκινητές του γονιδίου CYP24A1 σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Prime3Plus.

3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιιεργειών

Από την εταιρεία BIOCHROME (Biochrome, U.K.) χρησιμοποιήθηκαν

- Θρεπτικά υγρά DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) high glucose
- οροί βόειου εμβρύου (FBS)
- αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη

3.1.4 Χημικές ενώσεις-αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma Aldrich (USA) και Merck (Germany).

3.1.5 Απομόνωση RNA (kit)

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoZol της εταιρείας Macherey-Nagel.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) καλλιεργούνται με θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο προστίθενται αντιβιοτικά (100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη)

και 10% ορός εμβρύου βοός (FBS), μέσα σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm ή 60 mm. Επωάζονται σε υγρανόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂.

Τα κύτταρα επωάζονται και ανακαλλιεργούνται όταν το τρυβλίο κορεστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Καθώς τα κύτταρα Huh7 διπλασιάζονται κάθε 14-16 ώρες αραιώνονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να χρειάζονται ανακαλλιέργεια κάθε 48 ώρες. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το κορεσμένο τρυβλίο όπου τα κύτταρα είναι προσκολλημένα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Για την αποκόλλησή τους γίνεται επίδραση με το ένζυμο θρυψίνη για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη αραιώση, και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων. Από το αιώρημα μεταφέρονται 1 ml κυττάρων σε νέα τρυβλία στα οποία έχουν προστεθεί 7 ml θρεπτικού μέσου. Η όλη κατεργασία των κυττάρων γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.2.2 Απομόνωση ολικού κυτταροπλασματικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία με μικρές παραλλαγές. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Σε άσηπτες συνθήκες έγινε προσθήκη 400 μl NucleoZOL σε κύτταρα που ιζηματοποιήθηκαν μετά την αιώρησή τους σε κρύο PBS. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 160 μl RNase free H₂O. Παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 30 s. Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 12000 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης (~500 μl) μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου erppendorf και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά 12000 x g. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 400 μl 75% αιθανόλης και φυγοκέντρηση τριών λεπτών 12000 x g. Αφαιρείται η αιθανόλη και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 12000 x g για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 30 μl ελεύθερο ριβονουκλεασών H₂O.

3.2.3. Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoFischer). Πιο συγκεκριμένα με μια πολύ μικρή ποσότητα 2 μl του δείγματος RNA προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του και ο λόγος απορρόφησης 260/280nm. Ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο της καθαρότητας του RNA και των προσμίξεων από DNA ή πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 ως 2. Στη μέτρηση των δειγμάτων ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας.

3.2.4 Σύνθεση cDNA

Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Αυτή η RNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από ρετροϊούς, χρειάζεται τη προσθήκη κατάλληλων εκκινήτων για να ξεκινήσει τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Στη συνέχεια η RNA αλυσίδα καταβολίζεται σε πολλά σημεία από τη δράση RNάσης. Τελικά, μια DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο DNA, ενώ μια λιγάση ενώνει τα κομμάτια με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit της εταιρείας Applied Biosystems και εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα η αντίδραση ετοιμάζεται στον πάγο ως εξής:

- 10μl δείγματος RNA 1μg
- 2μl RT Buffer (αρχικής συγκέντρωσης 10x)
- 0,8μl dNTP mix (αρχικής συγκέντρωσης 100mM)
- 2μl τυχαίων εκκινήτων
- 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4,2μl H₂O

Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση των εκκινήτων)
- 37°C για 120 λεπτά (ανάστροφη μεταγραφάση)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C – ψύξη

Στα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 80μl ddH₂O (διπλά αποσταγμένο νερό) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, RT-PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, παράγονται αντίγραφα cDNA από εκμαγείο mRNA. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (σύνθεση πρώτου κλώνου). Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση του επόμενου κλώνου και στα ακόλουθα βήματα ολοκληρώνεται η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται στη πρόσδεση στα ενισχυόμενα μόρια DNA μιας φθορίζουσας ουσίας και ανίχνευση της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος στο δίκλωνο DNA. Η φθορίζουσα ουσία μπορεί να είναι ειδική για μια ενισχυόμενη αλληλουχία επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό της από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών.

Στη παρούσα εργασία η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) με τη χρήση του αντιδραστήριου Syber Green mix (Applied Biosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, MgCl₂, dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου CYP27B1 και του γονιδίου CYP24A1, αλλά και αυτό του 18S που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα mRNA του τελευταίου δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται. Παρασκευάζονται δύο (2) μείγματα για τα δύο (2) διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 10 pMol/μl ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H₂O απαλλαγμένο από RNάσες και

DNάσες (ThermoFisher Scientific). Σε 7,5μl μείγματος προσθέτουμε 2,5μl cDNA. Κάθε συνθήκη ελέγχθηκε εις διπλούν, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA που έγινε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης και αφετέρου δείγμα με H₂O αντί για cDNA.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τα γονίδια CYP27B1 και CYP24A1 είναι οι ακόλουθες:

1. 95°C για 180 δευτερόλεπτα
2. 95°C για 15 δευτερόλεπτα
3. 62°C για 60 δευτερόλεπτα
4. 95°C για 10 δευτερόλεπτα
5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης

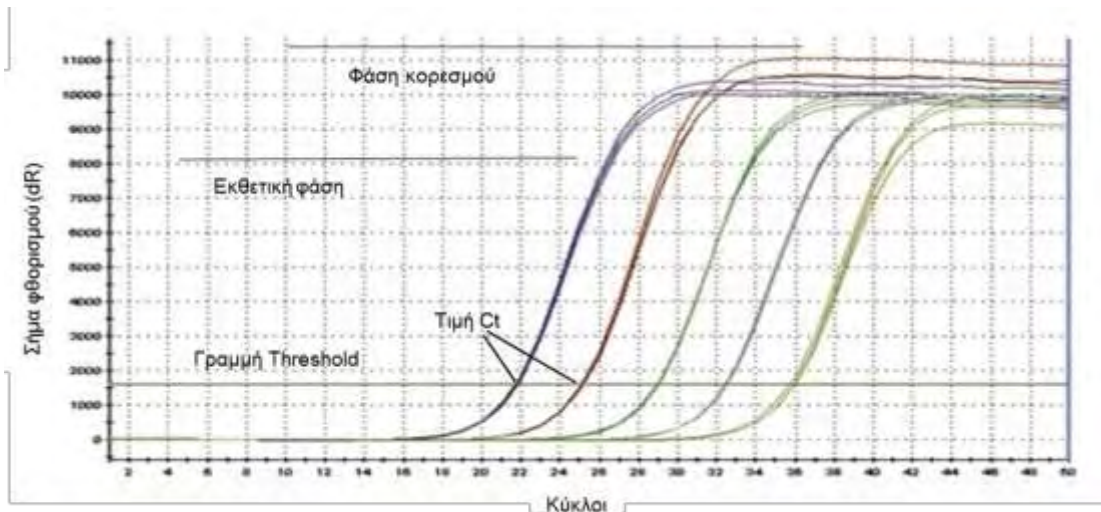
Οι συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς 18S είναι οι εξής:

1. 95°C για 180 δευτερόλεπτα
2. 95°C για 3 δευτερόλεπτα
3. 60°C για 30 δευτερόλεπτα
4. 95°C για 10 δευτερόλεπτα
5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης

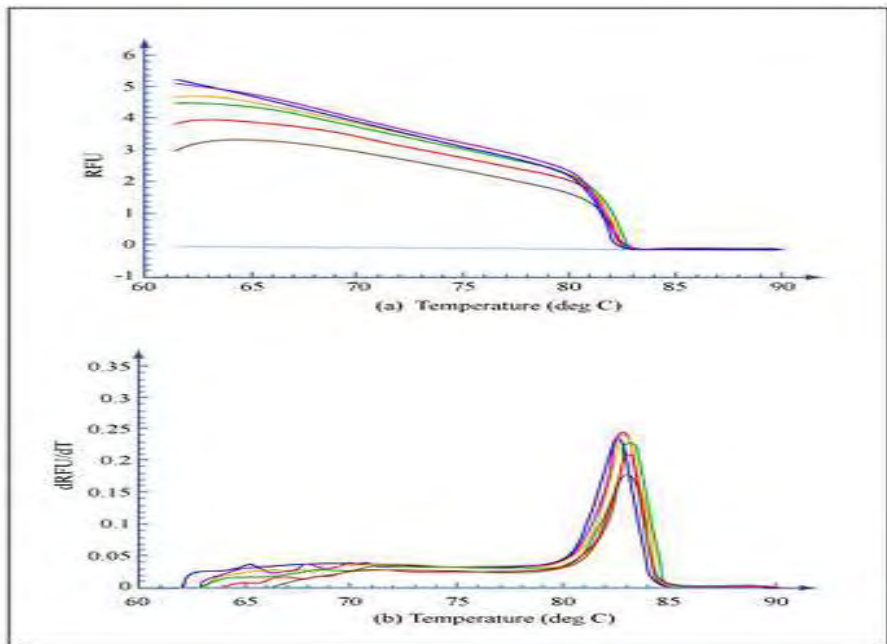
3.2.6 Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει σε πραγματικό χρόνο την αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε: εκθετική φάση και τη φάση κορεσμού. Η μεταβολή των φάσεων σχετίζεται με την σταδιακή εξάντληση των αντιδραστηρίων (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) και τη συσσώρευση μορίων που δρουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Έτσι, ενώ στην εκθετική φάση ο διπλασιασμός του αρχικού προϊόντος γίνεται ιδανικά, ακολούθως η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της, και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου

φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.



Η ενίσχυση των προϊόντων ακολουθείται από την αποδιάταξή τους σε ένα στάδιο αυξανόμενης θερμοκρασίας. Καθώς η θερμοκρασία τήξης των δίκλωνων μορίων επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, το σημείο τήξης T_m (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος. Από την άλλη με την αποδιάταξη των κλώνων, η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης των προϊόντων της Real-Time PCR μέσω μιας καμπύλης τήξης. Η καμπύλη αυτή εμφανίζει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και σε επόμενο στάδιο τον λόγο της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ($-dF/dT$). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βοηθάει στον έλεγχο της ειδικότητας και της καθαρότητας των προϊόντων αντίδρασης ενίσχυσης, καθώς αποκαλύπτει πιθανό διμερισμό εκκινητών ή επιμόλυνση με ξένο DNA. Τα μόρια DNA που ενισχύθηκαν στοχευμένα κατά την αντίδραση, αναμένονται να συμβαδίζουν και να συσσωρεύονται σε κοινή κορυφή στη καμπύλη τήξης. Αντίθετα, επιμολύνσεις θα δώσουν μεταβολή φθορισμού σε πολλαπλά σημεία τήξης.



Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA γίνεται με τη μέθοδο της $\Delta\Delta C_t$ (διαφορά της διαφοράς των κύκλων). Για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά C_t (ΔC_t) του γονιδίου-στόχου (*CYP27B1* & *CYP24A1*) και του 18S και στη συνέχεια από το ΔC_t κάθε δείγματος αφαιρείται το ΔC_t του δείγματος μάρτυρα (18S). Στη συνέχεια υπολογίζεται η δύναμη με βάση το δύο $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ που εκφράζει τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

3.2.7 UHPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Απόδοσης, γνωστή ως Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η HPLC είναι μια δυναμική διεργασία προσρόφησης (adsorption). Τα προς ανάλυση μόρια, κατά την κίνησή τους μέσω του πορώδους υλικού πλήρωσης της στήλης τείνουν να αλληλεπιδράσουν με θέσεις της προσροφητικής επιφάνειας, ενώ ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση.

Οι βασικές μονάδες ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι:

- Το σύστημα της αντλίας (pump).

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve).
- Στήλη (column).
- Ανιχνευτής (detector).
- Καταγραφικό.
- Υπολογιστής –εκτυπωτής

Το σύστημα αντλίας περιλαμβάνει το δοχείο του διαλύτη, τα διάφορα φίλτρα και τις διατάξεις πίεσης και ροής. Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλουση (isocratic), ή φιάλες μέχρι τέσσερις στη βαθμωτή έκλουση (gradient) όπου τοποθετούνται οι διαλύτες και απαερώνονται. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να φύγουν όλα τα διαλυμένα αέρια και κυρίως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα και μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής.

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη, ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόγχο.

Οι κυρίως στήλες ή απλά στήλες HPLC είναι κυλινδρικές από ανοξείδωτο μέταλλο, ή πλαστικό κατάλληλο, ώστε να αντέχουν στις μεγάλες πιέσεις που εξασκούν επάνω τους οι αντλίες. Οι διαστάσεις τους είναι 10-50 cm και η διάμετρός τους 1-5mm. Αγοράζονται έτοιμες από τις κατασκευάστριες εταιρίες. Το εσωτερικό τους πληρούται με λεπτόκοκκο αδρανές υλικό που οι πόροι του καλύπτονται με την υγρή στατική φάση.

Οι ανιχνευτές στην HPLC χρησιμοποιούνται τόσο για τον ποιοτικό, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς μελέτη ουσιών. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών και η επιλογή του κατάλληλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του προς ανάλυση μίγματος. Ένας εκ των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην HPLC και UHPLC, είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode-Array Detector, PDA), με τον οποίο ολόκληρο το φάσμα μιας ουσίας καταγράφεται σε δευτερόλεπτα, καθώς εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη. Ο ανιχνευτής αυτός συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους.

Η UHPLC αντιπροσωπεύει μια βελτιωμένη και εκσυγχρονισμένη εκδοχή της HPLC με σημαντικές καινοτομίες στην οργανολογία και στην τεχνολογία των σωματιδίων. Με τη χρήση στηλών νέας γενιάς πακεταρισμένες με σωματίδια μεγέθους 1.7 μm και όργανα σχεδιασμένα με εξειδικευμένες ικανότητες για να παρέχουν την κινητή φάση με πιέσεις έως και 15.000 psi, κατάφερε να επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην ανάλυση, στην ταχύτητα και στην ευαισθησία.



► ΔΙΑΛΥΤΕΣ

► ΑΝΤΛΙΑ

► ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ

► ΦΟΥΡΝΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜ/ΚΗ ΣΤΗΛΗ

► ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ PDA

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 UHPLC με ανιχνευτή PDA.

Για τη λειτουργία του συστήματος αυτού και την ανάλυση των δειγμάτων απαιτείται η εξοικείωση με το λογισμικό Chromeleon του συστήματος MODEL ULTIMATE 3000, δηλαδή η δημιουργία μιας sequence και ενός προγράμματος με το οποίο θα γίνει η ανάλυση της sequence.

Για την ανάλυση του κυτταρικών εκχυλισμάτων οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- Αναλυτική στήλη: SUPERALCO C18 (3μm, 4.6mm x 150mm)
- Εκλουστικό σύστημα (κινητή φάση): Ακετονιτρίλιο (C_2H_3N) 100% και H_2O με ακετοτονιτρίλιο 90%:10%, με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης
- Πίεση: 3500-4500psi

- Ταχύτητα ροής: 1mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 60°C
- Όγκος έγχυσης: 100μl

3.2.8 Προκατεργασία των δειγμάτων για ανάλυση UHPLC

Για τα δείγματα θρεπτικού μέσου κυττάρων Huh7, πριν εισαχθούν για χρωματογραφική ανάλυση στο παραπάνω σύστημα, ακολουθήθηκε συγκεκριμένη κατεργασία για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό του δείγματος:

- Προσθήκη ακετονιτριλίου στάγδην σε όγκο 1:1 με το δείγμα για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών
- Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με συσκευή vortex για λίγα δευτερόλεπτα και φυγοκέντριση στα 4000x g για 15 λεπτά στους 4°C
- Μετά την φυγοκέντριση, παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο, γιατί στο ίζημα συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν την ανάλυση
- Τέλος, το υπερκείμενο εισάγεται σε φίλτρο σύριγγας PVDF syringe filter 0.2μm, η χρήση του οποίου βοηθά στην κατακράτηση πιθανόν προσμίξεων ή πρωτεϊνών που υπάρχουν στο υπερκείμενο.

Έτσι, με τον τρόπο επεξεργασίας τα δείγματα που εισάγονται στη χρωματογραφική στήλη είναι καθαρά από προσμίξεις και δεν δημιουργούν προβλήματα επιμόλυνσης στη στήλη.

Στην παρούσα εργασία, τα δείγματα θρεπτικού μέσου επεξεργάστηκαν με αυτόν τον τρόπο πριν την ανάλυσή τους με UHPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της 1,25(OH)₂D στο θρεπτικό μέσο.

3.2.9 Στατιστική ανάλυση

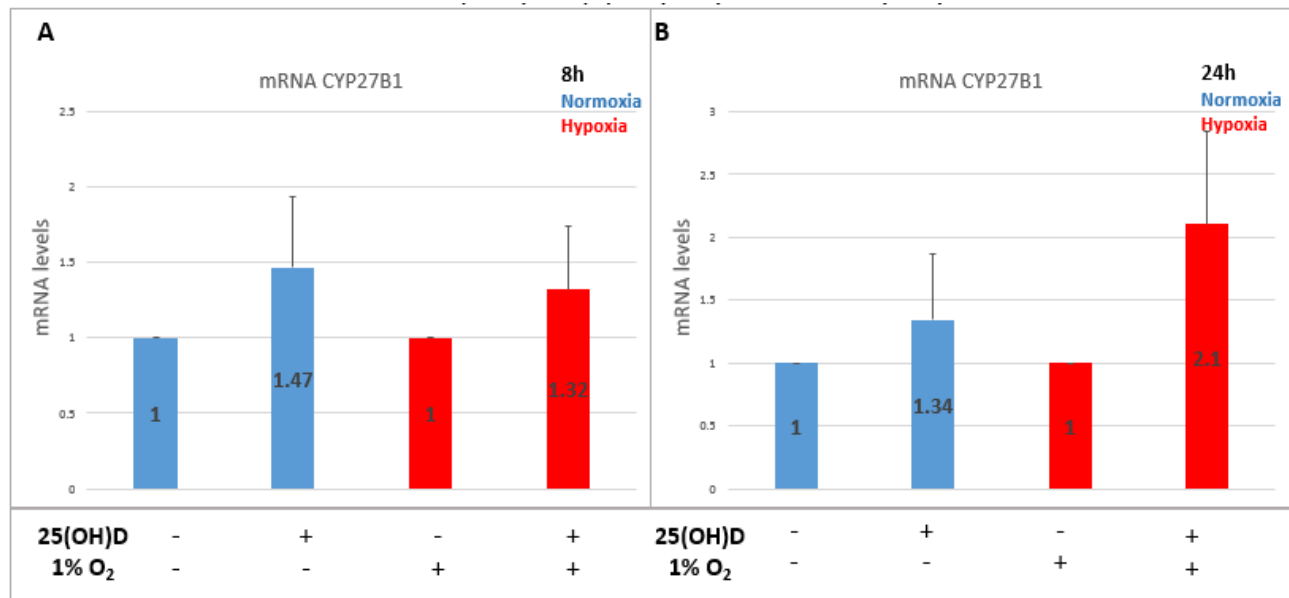
Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad InStat με ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπικό λάθος (SE). Το στατιστικά σημαντικό όριο είναι *p<0,05 και **p<0,01.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επίδραση της 25(OH)D στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP27B1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

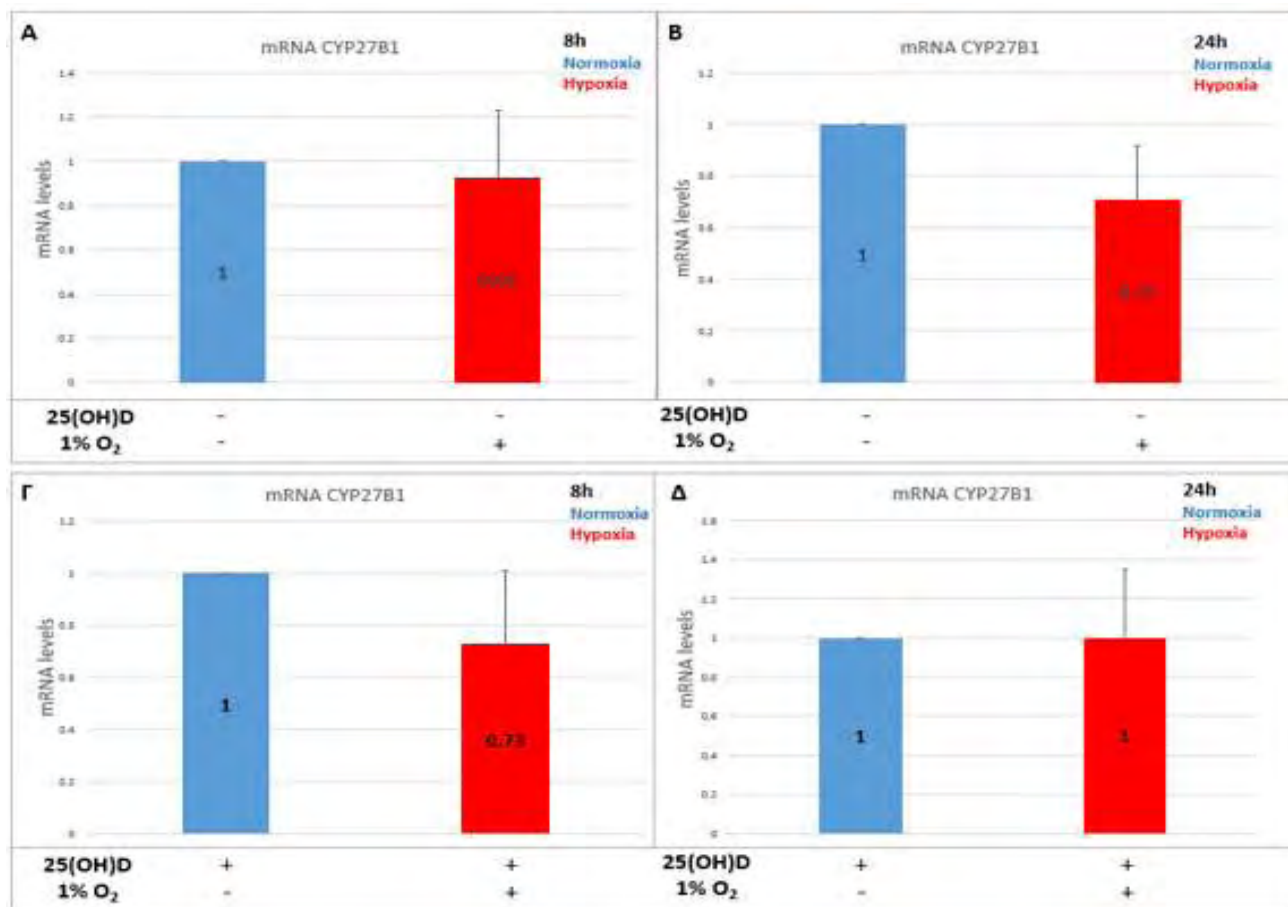
Για την μελέτη της επίδρασης της 25(OH)D στην έκφραση του *CYP27B1*, καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7 εκτέθηκαν σε 2,4μM 25(OH)D. Μετά την προσθήκη της κύριας κυκλοφορούσας μορφής της βιταμίνης στο θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν 1 ώρα σε συνθήκες νορμοξίας με σκοπό την είσοδο της βιταμίνης μέσα στα κύτταρα και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση κάτω από τις συνθήκες του πειράματος για 8 και 24 ώρες.

Η ενδογενής έκφραση του *CYP27B1* κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στην κυτταρική σειρά Huh7 (κύκλο ~30 με τη μέθοδο της Real-Time pcr). Η προσθήκη 25(OH)D στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων δεν ήταν ικανή να μεταβάλλει σημαντικά την έκφραση του *CYP27B1* στα Huh7 (εικόνα 4.1). Στις 8 ώρες επώασης, τα επίπεδα έκφρασης του υπό εξέταση γονιδίου παρουσιάζουν μικρές διακυμάνσεις τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Η βιταμίνη D δεν αποτέλεσε παράγοντας που επηρέασε την έκφραση του γονιδίου στις 8 ώρες. Παρόμοια εικόνα παρατηρούμε και στις 24 ώρες. Η έκφραση του *CYP27B1* εμφανίζει μικρές διαφορές, οι οποίες δεν κρίνονται στατιστικώς σημαντικές (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του *CYP27B1*, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 2,4μM 25(OH)D σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Η υποξία αποτελεί έναν ξεχωριστό παράγοντα ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την συμπεριφορά των κυττάρων και την απόκριση τους σε ερεθίσματα. Η υποξία μπορεί να μεταβάλλει και την έκφραση γονιδίων στα κύτταρα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τον έλεγχο της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου *CYP27B1* τόσο απουσία όσο και παρουσία της 25(OH)D. Παρατηρούμε πως σε όλες τις συνθήκες του πειράματος η υποξία δεν μεταβάλλει στατιστικώς σημαντικά την έκφραση του *CYP27B1* τόσο παρουσία όσο και απουσία της 25(OH)D (εικόνα 4.2).



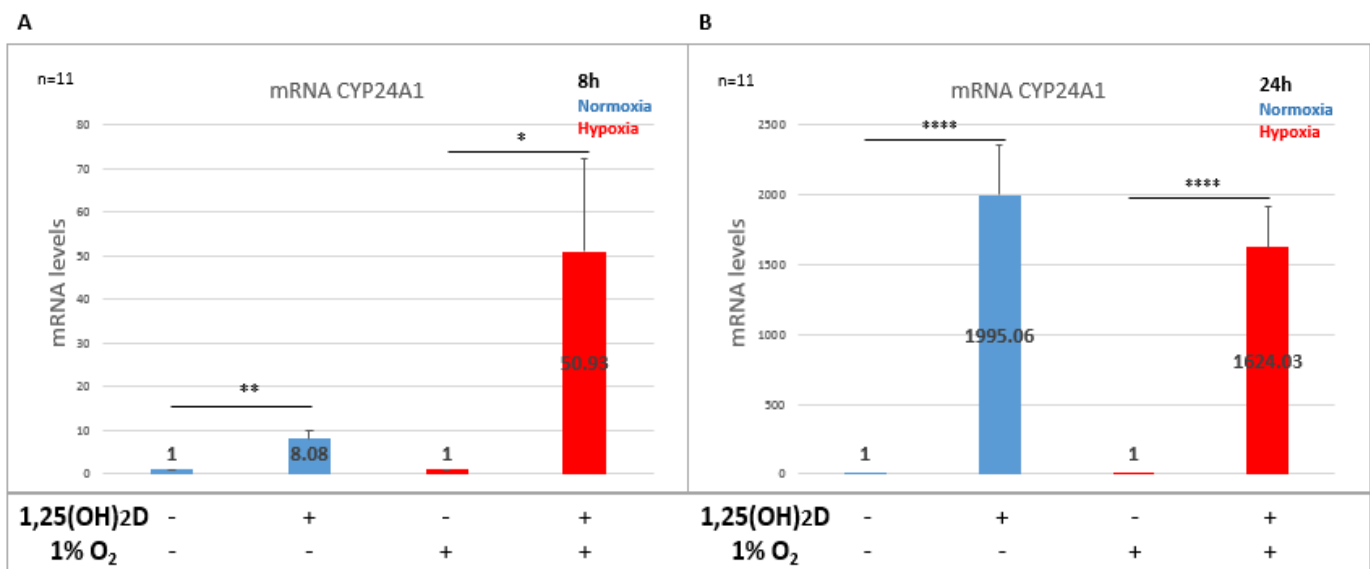
Εικόνα 4.2: Επίδραση της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου *CYP27B1* Α) απουσία της 25(OH)D στις 8 ώρες επώασης, Β) απουσία της 25(OH)D στις 24 ώρες έκφρασης, Γ) παρουσία της 25(OH)D στις 8 ώρες έκφρασης και Δ) παρουσία της 25(OH)D στις 24 ώρες έκφρασης

4.2 Επίδραση της 1,25(OH)₂D στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *CYP24A1* σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Για την μελέτη της επίδρασης της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του *CYP24A1*, καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7 εκτέθηκαν σε 100nM 1,25(OH)₂D. Μετά την προσθήκη της καλσιτριόλης στο θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν 1 ώρα σε συνθήκες νορμοξίας με σκοπό την είσοδο

της βιταμίνης μέσα στα κύτταρα και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση κάτω από τις συνθήκες του πειράματος για 8 και 24 ώρες.

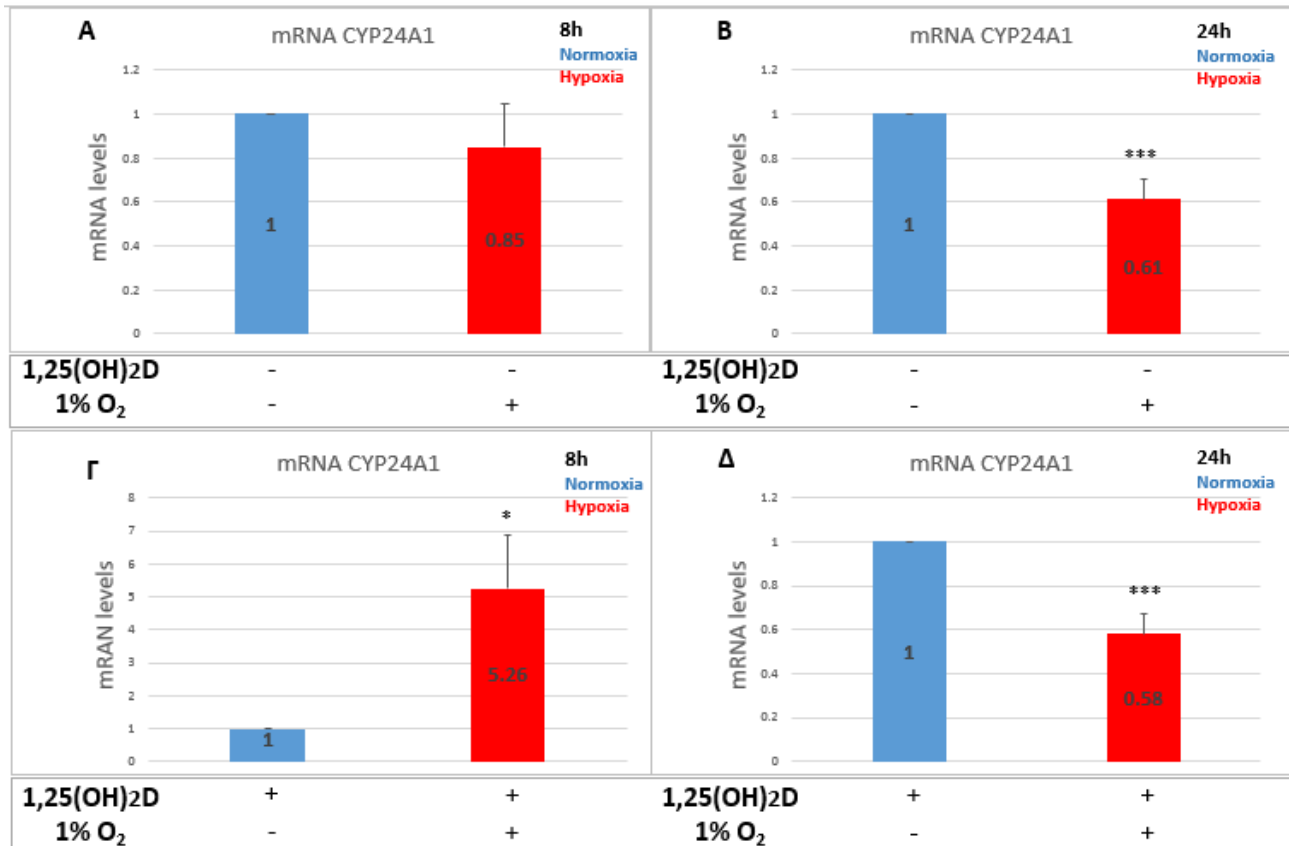
Η ενδογενής έκφραση του CYP24A1 κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στην κυτταρική σειρά Huh7 (κύκλος ~34 με τη μέθοδο της Real-Time PCR). Η προσθήκη της 1,25(OH)₂D στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων επάγει την έκφραση του CYP24A1 σε όλες τις συνθήκες του πειράματος (εικόνα 4.3). Πιο συγκεκριμένα, στις 8 ώρες επώασης η έκφραση του παραπάνω γονιδίου επάγεται 8 και 51 φορές σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας αντίστοιχα, με τα αποτελέσματα να είναι στατιστικώς σημαντικά. Εντυπωσιακή επαγωγή του γονιδίου παρατηρούμε στις 24 ώρες επώασης όπου η επαγωγή του γονιδίου αυξάνεται δραματικά. Στις 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας η επαγωγή αγγίζει ~ τις 2000 φορές, ενώ στις 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας τις 1600 φορές. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά (εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του CYP24A1, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 100nM 1,25(OH)₂D σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Η υποξία αποτελεί έναν ξεχωριστό παράγοντα ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την συμπεριφορά των κυττάρων και την απόκριση τους σε ερεθίσματα. Η υποξία μπορεί να μεταβάλλει και την έκφραση γονιδίων στα κύτταρα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για τον έλεγχο της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου CYP24A1 τόσο απουσία όσο και παρουσία της καλσιτριόλης. Στις 8 και 24 ώρες επώασης απουσία της 1,25(OH)₂D, η υποξία προκαλεί μείωση των επιπέδων του υπό εξέταση γονιδίου. Η πτώση στις 8 ώρες είναι της τάξης του

15% χωρίς να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Στις 24 ώρες επώασης απουσία της 1,25(OH)₂D, η υποξία προκαλεί πτώση των επιπέδων του CYP24A1 40%. Διαφορετική εικόνα παρατηρούμε στις 8 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία της καλσιτριόλης. Η υποξία αυξάνει την έκφραση του γονιδίου 5 φορές, με το αποτέλεσμα να είναι στατιστικώς σημαντικό. Αντίθετα, μείωση των επιπέδων της τάξης του 40% παρατηρείται στις 24 ώρες επώασης παρουσία της καλσιτριόλης (εικόνα 4.4).



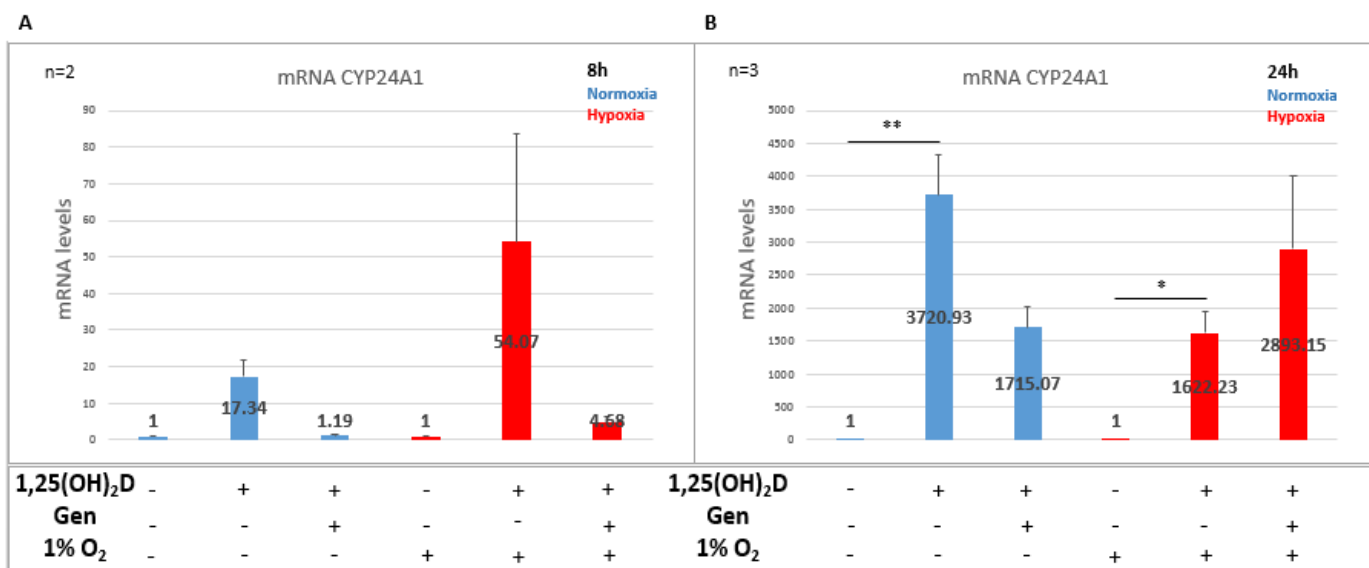
Εικόνα 4.4: Επίδραση της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου CYP24A1 Α) απουσία της 1,25(OH)₂D στις 8 ώρες επώασης, Β) απουσία της 1,25(OH)₂D στις 24 ώρες έκφρασης, Γ) παρουσία της 1,25(OH)₂D στις 8 ώρες έκφρασης και Δ) παρουσία της 1,25(OH)₂D στις 24 ώρες έκφρασης

4.3 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Genistein στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Η γενιστεΐνη αποτελεί μια ισοφλαβόνη (πολυφαινολική ουσία) η οποία συναντάται κυρίως στη σόγια και στα παράγωγα της. Πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών υποστηρίζουν την ικανότητα της γενιστεΐνης να αίρει την επαγόμενη από την καλσιτριόλη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου CYP24A1, που κωδικοποιεί για το ένζυμο που ευθύνεται για τον καταβολισμό τόσο της ενεργής μορφής της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D, όσο και της κύριας κυκλοφορούσας μορφής, 25(OH)D.

Για να μελετήσουμε την επίδραση της γενιστεΐνης στην έκφραση του *CYP24A1*, καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7 εκτέθηκαν σε 100nM 1,25(OH)₂D και 50μM της φαινολικής ουσίας για 8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) όσο και σε συνθήκες υποξίας (1% O₂). Με την προσθήκη της ουσίας στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, ακολούθησε 1 ώρα προ-επώασης με σκοπό να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D και ο φυτικός μεταβολίτης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων στις διάφορες συνθήκες του πειράματος. Με το πέρας της επώασης, τα κύτταρα λύθηκαν, απομονώθηκε το ολικό κυτταροπλασματικό RNA και τα επίπεδα έκφρασης του *CYP24A1* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής Real-Time PCR ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διαφοράς των κύκλων (2^(-ΔΔCt)).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λάβαμε συμπεραίνουμε πως η γενιστεΐνη ακολουθεί ένα χρονο-εξαρτώμενο και οξυγόνο-εξαρτώμενο τρόπο δράσης (εικόνα 4.5). Στις 8 ώρες επώασης, η έκφραση του *CYP24A1* επάγεται από την παρουσία της 1,25(OH)₂D σε συνθήκες νορμοξίας και σε μεγαλύτερο βαθμό σε συνθήκες υποξίας. Η γενιστεΐνη αίρει την δράση της καλσιτριόλης στην έκφραση του *CYP24A1* στις 8 ώρες νορμοξίας, επαναφέροντας τα επίπεδα της σε αυτά του control. Ακολουθώντας το ίδιο μοτίβο, η 1,25(OH)₂D επάγει την έκφραση του υπό εξέταση γονιδίου στις 8 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), μία δράση που αναστέλλεται παρουσία της γενιστεΐνης. Η αναστολή αγγίζει το 91%. Παρόμοια επίδραση παρατηρούμε και στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας. Η 1,25(OH)₂D επάγει την έκφραση του *CYP24A1* δραματικά (πάνω από 3500 φορές), με την γενιστεΐνη να αναστέλλει την επίδραση της καλσιτριόλης στην έκφραση του γονιδίου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Ένα διαφορετικό φαινόμενο πραγματοποιείται στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας. Η παρουσία της γενιστεΐνης δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του *CYP24A1*, τα οποία παραμένουν στα ίδια επίπεδα με αυτά των κυττάρων που εκτέθηκαν μόνο στην παρουσία της ενεργής μορφής της βιταμίνης D. Φαίνεται πως η γενιστεΐνη δεν έχει κάποια σημαντική επίδραση στην άρση της έκφρασης του γονιδίου που επάγεται από την καλσιτριόλη στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 4.5: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του CYP24A1, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 1,25(OH)₂D και Genistein σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Η υπόθεση που διατυπώσαμε για την εξήγηση του παραπάνω φαινομένου περιλαμβάνει την συμβολή του οξειδωτικού στρες. Είναι γνωστό από την διεθνή βιβλιογραφία πως η υποξία ευνοεί την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και τη δημιουργία οξειδωτικού στρες μέσα στα κύτταρα (98). Η γενιστεΐνη αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό μόριο και έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Η έκθεση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες για 24 ώρες μπορεί να οδηγεί στην υπέρμετρη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και στην κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων του κυττάρου. Η γενιστεΐνη είναι πιθανό να δρα ως αντιοξειδωτική ουσία, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες του κυττάρου. Η «κατανάλωση» της για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες μειώνει τα διαθέσιμα αποθέματα της ουσίας, τα οποία δεν επαρκούν για την αναστολή της δράσης της 1,25(OH)₂D. Ένα τέτοιο γεγονός θα μπορούσε να εξηγήσει την έλλειψη δράσης της ουσίας στις 24 ώρες. Για να εξετάσουμε την επίδραση του οξειδωτικού στρες, πραγματοποιήθηκε πείραμα με χορήγηση εξωγενούς αντιοξειδωτικής ουσίας (NAC). Η συν-χορήγηση γενιστεΐνης και αντιοξειδωτικών μορίων (NAC) πιθανότατα αποδειχθεί αποτελεσματικότερη στην αναστολή έκφρασης του γονιδίου CYP24A1 και αποτελεί μία υπόθεση που μένει να εξεταστεί.

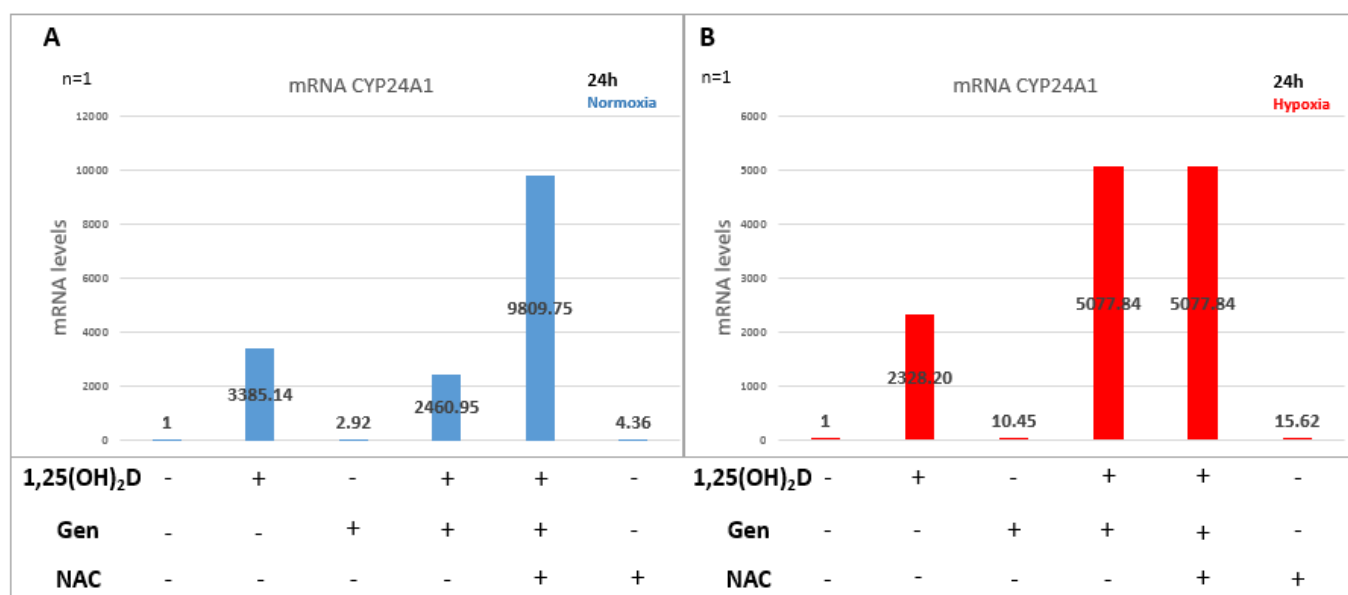
4.4 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Genistein-NAC στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Για να μελετηθεί η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην αδυναμία της γενιστεΐνης να άρει την δράση της 1,25(OH)₂D στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιήθηκε πείραμα με τη χρήση του αντιοξειδωτικού μορίου NAC. Το NAC αποτελεί μία πρόδρομη ουσία του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) και χρησιμοποιείται για την «καταπολέμηση» του οξειδωτικού στρες. Αν η υπόθεση που διατυπώσαμε για την συμβολή του οξειδωτικού στρες στην έλλειψη δράσης της γενιστεΐνης είναι αληθής, αναμένουμε πτώση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου CYP24A1 στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας.

Για τον έλεγχο αυτό, χορηγήθηκε 100nM 1,25(OH)₂D, 50μM γενιστεΐνης και 1mM NAC στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε προ-επώαση για μία ώρα με στόχο την είσοδο των ουσιών στα κύτταρα και μετέπειτα επώαση στις διάφορες συνθήκες του πειράματος.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία αναμενόμενη επαγωγή του γονιδίου *CYP24A1* από την καλσιτριόλη και άρση της δράσης αυτής από την γενιστεΐνη στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της δράσης της γενιστεΐνης. Η προσθήκη NAC στο θρεπτικό μέσο παρουσία της καλσιτριόλης και της γενιστεΐνης προκάλεσε μία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του υπό εξέταση γονιδίου. Το δείγμα που εκτέθηκε μόνο στο αντιοξειδωτικό μόριο NAC εμφάνισε μία αύξηση 4 φορές συγκριτικά με το δείγμα control. Αναμενόμενες αποτελούν και οι παρατηρήσεις στις 24 ώρες υποξίας όπου η καλσιτριόλη επάγει δραματικά την έκφραση του γονιδίου *CYP24A1*. Η δράση αυτή δεν επηρεάζεται από την παρουσία της γενιστεΐνης. Η προσθήκη NAC στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που εκτέθηκαν στην καλσιτριόλη και την γενιστεΐνη δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου συγκριτικά με το δείγμα που εκτέθηκε στην καλσιτριόλη και την γενιστεΐνη. Το δείγμα που εκτέθηκε μόνο στο NAC εμφάνισε αύξηση 15 φορές στην έκφραση του *CYP24A1* σε σχέση με το δείγμα control.

Το πείραμα έχει πραγματοποιηθεί μόλις 1 φορά και απαιτείται επανάληψη για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Τα πρώτα, ωστόσο, δεδομένα αυτού του πειράματος υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες δεν αποτελεί την αιτία πίσω από την έλλειψη δράσης της γενιστεΐνης στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 4.6: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του CYP24A1, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 1,25(OH)₂D και Genistein και NAC σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

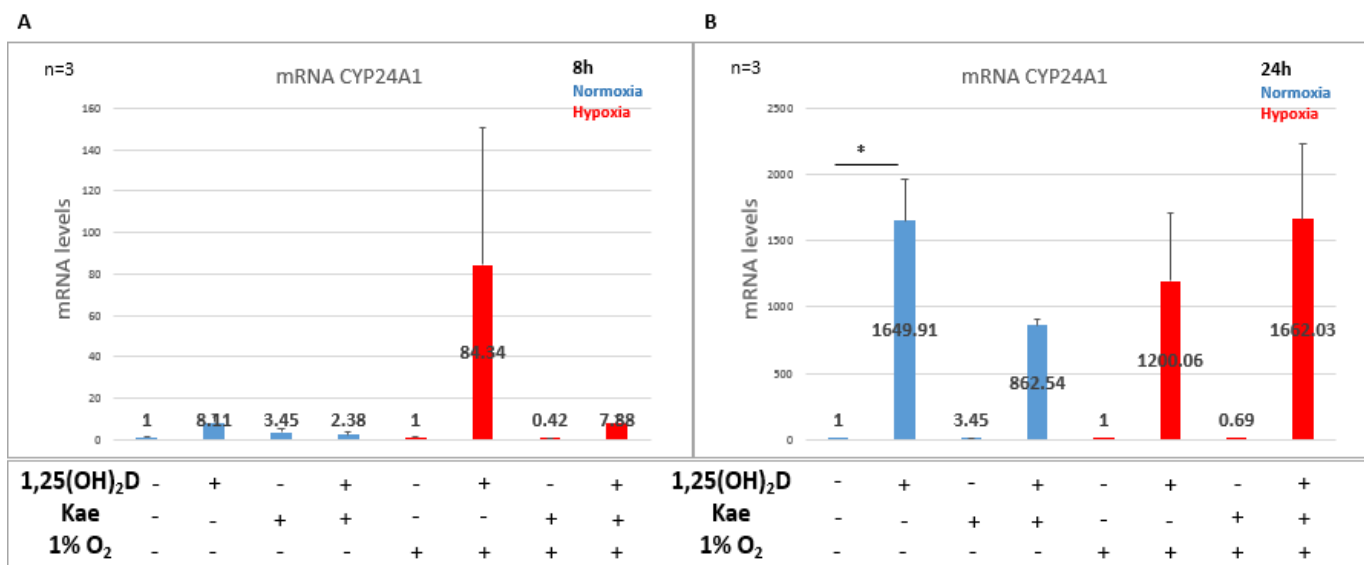
4.5 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Kaempferol στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Η καεμπφερόλη αποτελεί, όπως και η γενιστεΐνη, φυσικό φλαβονοειδές (ανήκει στις φλαβονόλες) και συναντάται σε διάφορα είδη σταφυλιών, στο τσάι και σε πληθώρα άλλων τροφών. Η διαφορά στα δομές των 2 μορίων (σχήματα 1.19 και 1.21) είναι ένα –OH (υδροξύλιο) και η σχετική τοποθέτηση του B δακτυλίου. Η εξέταση της δράσης της καεμπφερόλης στην έκφραση του CYP24A1 αποσκοπεί στον έλεγχο της σχέσης δομής-δραστικότητας των 2 μορίων. Η καεμπφερόλη δεν έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με τη δράση της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του CYP24A1.

Για τον έλεγχο της επίδρασης της kaempferol στην έκφραση του γονιδίου CYP24A1, κύτταρα Huh7 επώαστηκαν παρουσία 100nM 1,25(OH)₂D και 50μM kaempferol για 8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και σε συνθήκες νορμοξίας. Με την προσθήκη των παραπάνω ουσιών, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν 1 ώρα με σκοπό την είσοδο των ουσιών στα κύτταρα και στη συνέχεια εκτέθηκαν στις διάφορες συνθήκες του πειράματος. Με το τέλος της επώασης, τα κύτταρα λύθηκαν και απομονώθηκε το ολικό κυτταροπλασματικό RNA και τα επίπεδα έκφρασης του CYP24A1 προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής Real-Time PCR ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διαφοράς των κύκλων (2^(-ΔΔCt)).

Όπως αναμέναμε από προηγούμενα αποτελέσματα, η 1,25(OH)₂D επάγει την έκφραση του CYP24A1 στις 8 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Η προσθήκη 50μM καεμπφερόλης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την τάση για άρση της

δράσης της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του γονιδίου σε συνθήκες νορμοξίας, επίδραση ωστόσο που δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Εντονότερη είναι η επίδραση της καεμπερόλης στις 8 ώρες υποξίας, με την αναστολή να αγγίζει το 92%. Το συγκεκριμένο εύρημα δεν έχει περιγραφεί ξανά στο παρελθόν στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς δεν έχει μελετηθεί η δράση της καεμπερόλης σε συνδυασμό με τη δραστική μορφή της βιταμίνης D στην έκφραση του *CYP24A1* ούτε σε συνθήκες νορμοξίας ούτε σε συνθήκες υποξίας. Στις 24 ώρες επώασης των κυττάρων σε νορμοξία, η 1,25(OH)₂D επάγει εντυπωσιακά την έκφραση του *CYP24A1* (~ 1700 φορές). Η προσθήκη καεμπερόλης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Η 24ωρη επώαση σε συνθήκες υποξίας έχει ως αποτέλεσμα την απουσία άρσης της δράσης της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του *CYP24A1*, φαινόμενο παρόμοιο με αυτό που παρατηρήσαμε στη δράση της γενιστεΐνης στην έκφραση του παραπάνω γονιδίου στις 24 ώρες επώασης σε υποξία. Η αναίρεση της δράσης της καεμπερόλης σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών προκύπτει από άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό και πιθανότατα οφείλεται στον ίδιο μηχανισμό που αναιρεί τη δράση της γενιστεΐνης στις παραπάνω συνθήκες.



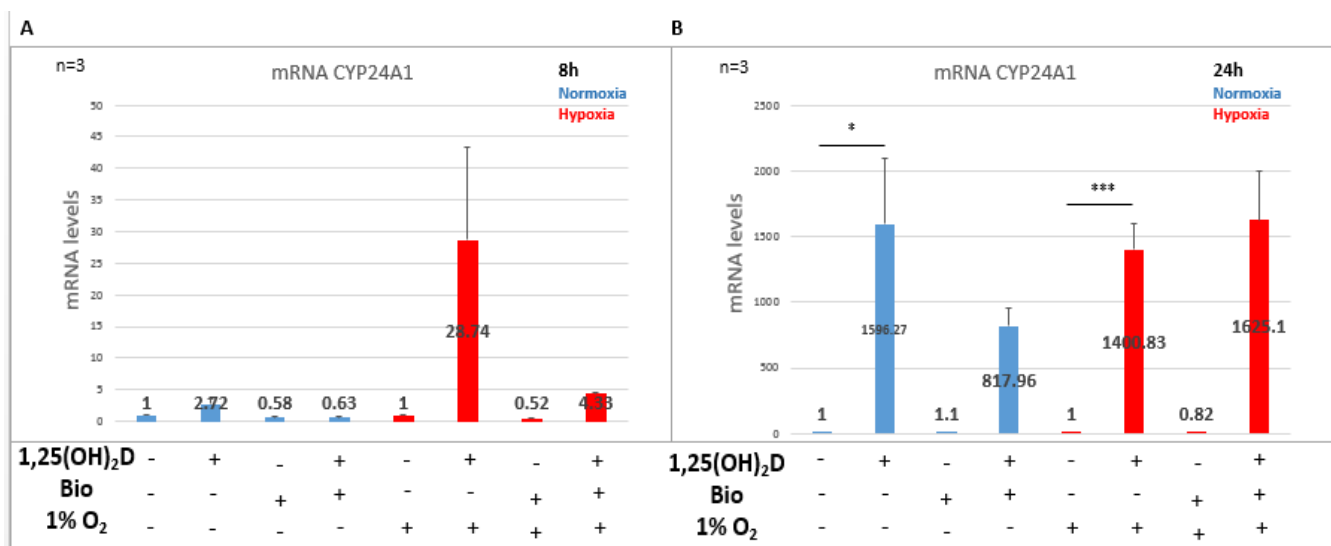
Εικόνα 4.7: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του *CYP24A1*, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 1,25(OH)₂D και Kaempferol σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

4.6 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Biochanin A στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Η βιοχανίνη A αποτελεί φυσικό φλαβονοειδές και ανήκει στην οικογένεια των ισο-φλαβονοειδών. Η δομική ομοιότητα του με την γενιστεΐνη είναι έντονη, καθώς διαφέρουν μόλις σε μία μεθυλομάδα (σχήματα 1.18 και 1.24). Η βιοχανίνη A δεν έχει μελετηθεί στην διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με την έκφραση του *CYP24A1*.

Για το συγκεκριμένο πείραμα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τα παραπάνω φλαβονοειδή. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες επώαστηκαν τα κύτταρα Huh7 είναι 100nM 1,25(OH)₂D και 50μM βιοχανίνης A.

Σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα, η έκφραση του *CYP24A1* στις 8 ώρες έκφρασης τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας αυξάνεται με την παρουσία της καλσιτριόλης. Η επαγωγή στην υποξία είναι εντονότερη σε σχέση με την νορμοξία. Η βιοχανίνη A αίρει τη δράση της 1,25(OH)₂D αναφορικά με την έκφραση του *CYP24A1* στις 8 ώρες σε νορμοξικές και υποξικές συνθήκες σε ποσοστό 77% και 85% αντίστοιχα. Παρόμοια δράση του ισοφλαβονοειδούς παρατηρείται και στις 24 ώρες επώασης σε νορμοξία, όπου η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σε σύγκριση με το δείγμα που έχει επωαστεί παρουσία μόνο της καλσιτριόλης. Το ποσοστό μείωσης αγγίζει το 49%. Σε παρόμοια επίπεδα κυμαίνεται η έκφραση του *CYP24A1* στις 24 ώρες υποξίας, όπου το δείγμα παρουσία της βιταμίνης και του φλαβονοειδούς παρουσιάζει μία μικρή τάση για αύξηση συγκριτικά με το δείγμα που έχει επωαστεί μόνο παρουσία της βιταμίνης, χωρίς ωστόσο να προκύπτει στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Η εικόνα αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της επίδρασης της γενιστεΐνης και της καεμπερόλης στην έκφραση του *CYP24A1* στις 24 ώρες υποξίας.

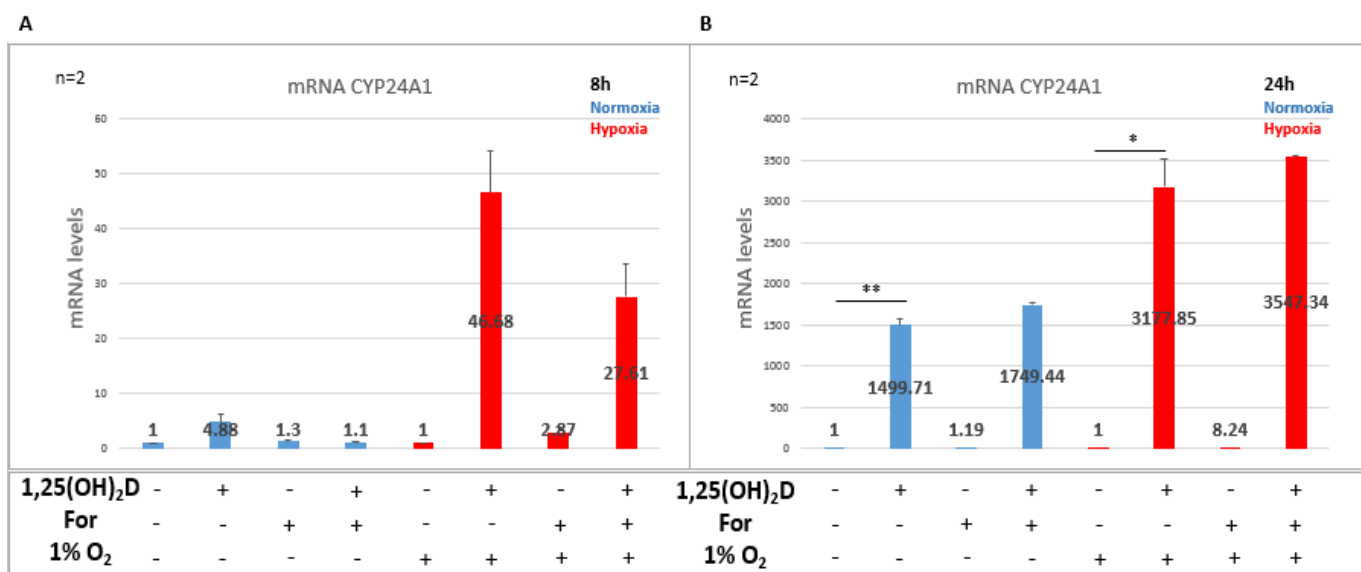


Εικόνα 4.8: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του CYP24A1, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 1,25(OH)₂D και Biochanin A σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

4.7 Επίδραση των 1,25(OH)₂D-Formononetin στα επίπεδα mRNA του γονιδίου CYP24A1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Η φορμονονετίνη αποτελεί το 4^ο φλαβονοειδές που εξετάστηκε στην παρούσα διπλωματική. Ανήκει στην κατηγορία των ισο-φλαβονοειδών και παρουσιάζει μεγάλες δομικές ομοιότητες με την γενιστεΐνη και την βιοχανίνη A (σχήματα 1.18, 1.24 και 1.26). Δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν για την επίδραση της στη δράση της 1,25(OH)₂D και την έκφραση του CYP24A1. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα είναι 100nM 1,25(OH)₂D και 50μM φορμονονετίνης.

Η 1,25(OH)₂D επάγει την έκφραση του CYP24A1 σε 8 ώρες νορμοξίας και υποξίας (5 και 47 φορές αντίστοιχα), σε παρόμοια επίπεδα με αυτά που παρατηρήθηκαν σε προηγούμενα πειράματα. Η προσθήκη της φορμονονετίνης αίρει τη δράση της καλσιτριόλης, καθώς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μειώνονται τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας μετά από 8 ώρες επώασης. Στις 8 ώρες νορμοξίας παρουσία της βιταμίνης και της φορμονονετίνης, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι παρόμοια με εκείνα του δείγματος control, ενώ στις 8 ώρες υποξίας η αναστολή αγγίζει το 41%. Στις 24 ώρες επώασης, η φορμονονετίνη παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν, καθώς δεν είναι ικανή να αναιρέσει τη δράση της καλσιτριόλης, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας, καθώς δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου. Η εικόνα που παρατηρούμε στις 24 ώρες υποξίας είναι ανάλογη με τα προηγούμενα αποτελέσματα των φλαβονοειδών, όπου δεν παρατηρείται καμία πτώση των επιπέδων του γονιδίου-στόχου.



Εικόνα 4.9: Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA του CYP24A1, με ποσοτική Real time PCR, με την προσθήκη 1,25(OH)₂D και Formononetin σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

4.8 Δημιουργία προγράμματος για τον εντοπισμό της 1,25(OH)₂D μέσω U-HPLC

Το δεύτερο κομμάτι της παρούσας διπλωματικής αφορά την ανάπτυξη προγράμματος ποιοτικού και ποσοτικού εντοπισμού της βιολογικά ενεργής μορφής της βιταμίνης D, της 1,25(OH)₂D. Για την ανάπτυξη μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα UHPLC με δυνατότητα εφαρμογής-επέκτασης για on line SPE.

4.8.1 On line SPE

Μια ανάλυση με εν σειρά εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελείται από 3 κύρια βήματα. Στο πρώτο βήμα το δείγμα μεταφέρεται από τον αυτόματο δειγματολήπτη στη στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης. Στο βήμα αυτό οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν του προς εξέταση δείγματος συγκρατούνται στην κατάλληλη στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης και οι υπόλοιπες ουσίες, όπως πρωτεΐνες και μικρά βιομόρια, δεν συγκρατούνται και αποβάλλονται μέσω της ροής στα απόβλητα. Στο δεύτερο βήμα το δείγμα μεταφέρεται από την στήλη SPE στην αναλυτική στήλη. Η επιλογή των αναλυτών είναι κρίσιμη στο συγκεκριμένο βήμα, καθώς είναι επιθυμητό να μεταφερθούν οι επιθυμητές ουσίες χωρίς να παρασύρουν άλλες ουσίες που πρέπει να παραμείνουν στη στήλη SPE. Στο τρίτο βήμα αναπτύσσεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών.

Η μετάβαση από βήμα σε βήμα στηρίζεται σε μία σειρά πειραμάτων που καθορίζουν τους χρόνους $t_{(v1)}$ και $t_{(v2)}$ που επιλέγονται για το γύρισμα της βαλβίδας που ρυθμίζει τη μετάβαση των βημάτων.

Για τη δημιουργία του προγράμματος παρακολούθησης της 1,25(OH)₂D απαιτείται ο καθορισμός των παρακάτω παραμέτρων:

i) Matrix Depletion Time ($t(M)$): χρόνος έκλουσης μήτρας

Για να υπολογιστεί ο χρόνος έκλουσης της μήτρας συνδέεται η στήλη SPE απευθείας με τον ανιχνευτή, εγχύεται το δείγμα στο σύστημα και σημειώνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία έχει εκλουστεί η μήτρα.

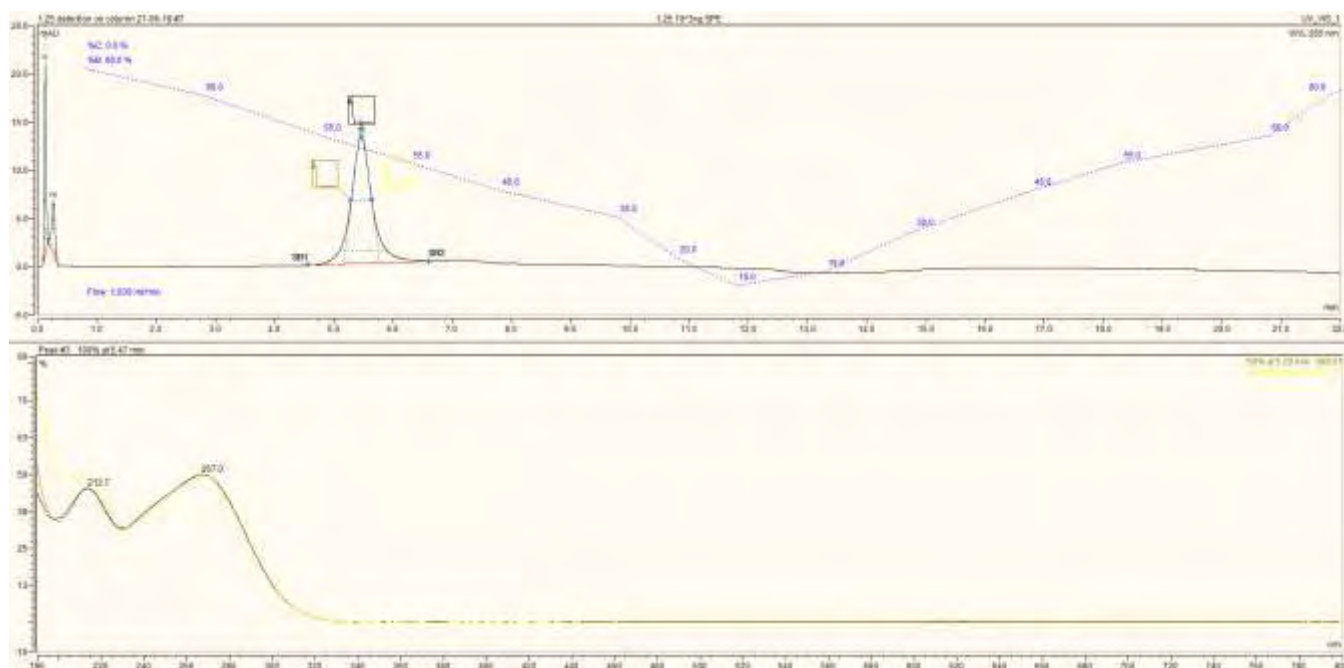
ii) Analyte Breakthrough Time ($t(A)$): χρόνος έκλουσης αναλύτη

Στη συνέχεια πρέπει να υπολογιστεί ο χρόνος που ξεκινά να εκλούεται από τη στήλη SPE ο αναλύτης. Για να υπολογιστεί ο $t(A)$, η SPE στήλη συνδέεται απευθείας με τον ανιχνευτή. Μετά την έγχυση πρότυπου διαλύματος αναλυτών σημειώνεται ο χρόνος που ξεκινά να εκλούεται ο αναλύτης. Ο χρόνος αυτός θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από τον $t(M)$ διασφαλίζοντας την ανάκτηση του αναλύτη (εικόνα 4.11).

Ακολουθήθηκαν οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες για την εύρεση των χρόνων που απαιτούνται από το λογισμικό για τον υπολογισμό των χρόνων $t_{(v1)}$ και $t_{(v2)}$. Για το χρόνο έκλουσης της μήτρας πραγματοποιήθηκε έγχυση 100μl μήτρας και ο χρόνος υπολογίστηκε σε $t(M)=0.153$ min (εικόνα 4.10). Για το χρόνο έκλουσης του αναλύτη πραγματοποιήθηκε έγχυση 100μl πρότυπου διαλύματος 1μg/ml 1,25(OH)₂D₃ και ο χρόνος υπολογίστηκε σε $t(A)=5.467$ min (εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.10: Υπολογισμός $t(M)$ μετά από έγχυση μήτρας στην στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης



Εικόνα 4.11: Υπολογισμός $t(A)$ μετά από έγχυση standard δείγματος βιταμίνης στην στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης. Η ταυτοποίηση της βιταμίνης πραγματοποιείται μέσω της απορρόφησης της.

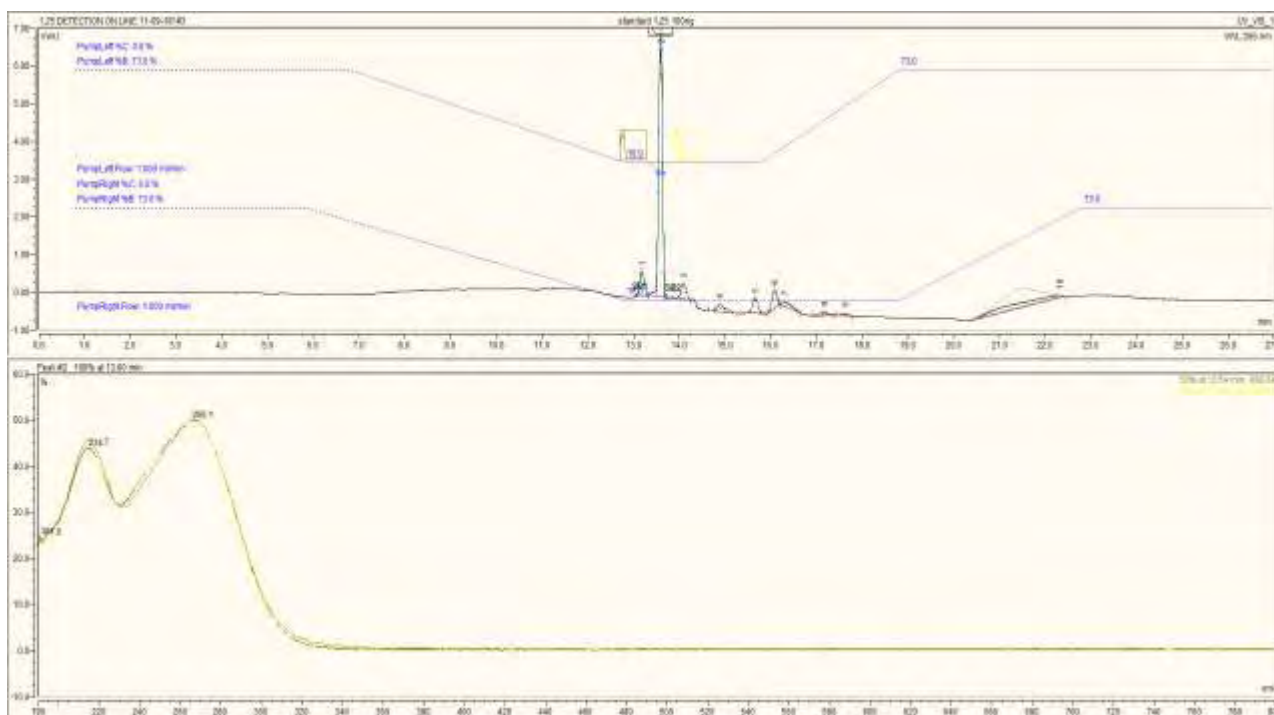
Επόμενο βήμα στην ανάπτυξη του προγράμματος αποτελεί ο καθορισμός του χρόνου έκλουσης της $1,25(OH)_2D$ από την αναλυτική στήλη. Για το βήμα αυτό, η αναλυτική στήλη συνδέεται απευθείας στον ανιχνευτή και γίνεται έγχυση standard δείγματος της βιταμίνης. Ο σκοπός του συγκεκριμένου βήματος αποτελεί, πέραν του καθορισμού του χρόνου έκλουσης της βιταμίνης, την

εύρεση των κατάλληλων διαλυτών και των κατάλληλων αναλογιών τους για την μη συγκράτηση της βιταμίνης στην αναλυτική στήλη. Ο χρόνος έκλουσης υπολογίστηκε σε 8.05min (εικόνα 4.12).



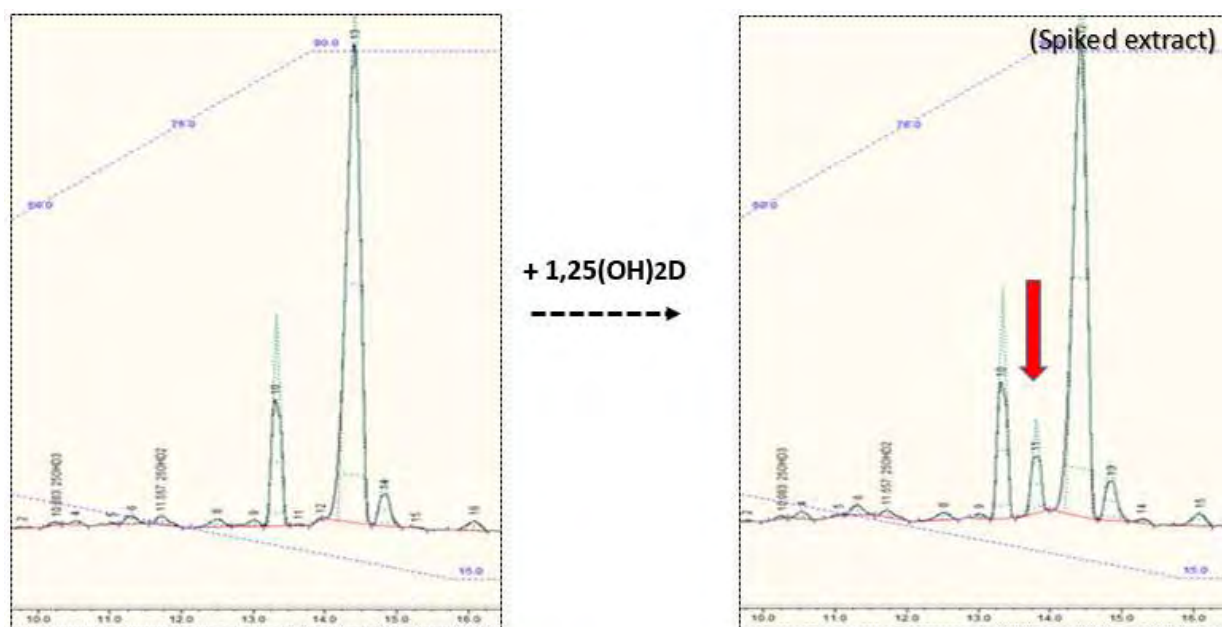
Εικόνα 4.12:Καθορισμός χρόνου έκλουσης της βιταμίνης από την αναλυτική στήλη. Η ταυτοποίηση της βιταμίνης πραγματοποιείται μέσω της απορρόφησης της.

Επόμενο βήμα αποτελεί ο υπολογισμός του χρόνου έκλουσης της βιταμίνης από το on line SPE σύστημα. Για το λόγο αυτό, τόσο η στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) όσο και η αναλυτική στήλη (analytical column) εισάγονται στο σύστημα και η αναλυτική στήλη συνδέεται με τον ανιχνευτή. Ο σκοπός αυτού του βήματος είναι ο καθορισμός των κατάλληλων διαλυτών και των κατάλληλων αναλογιών των διαλυτών που απαιτείται για την έκλουση της βιταμίνης, καθώς και ο έλεγχος των χρόνων $t(v1)$ και $t(v2)$ που υπολογίστηκαν για το σωστό γύρισμα της βαλβίδας ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά της $1,25(OH)_2D$ από την στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης στην αναλυτική στήλη (εικόνα 4.13). Ο χρόνος έκλουσης της βιταμίνης υπολογίστηκε σε 13.597min.



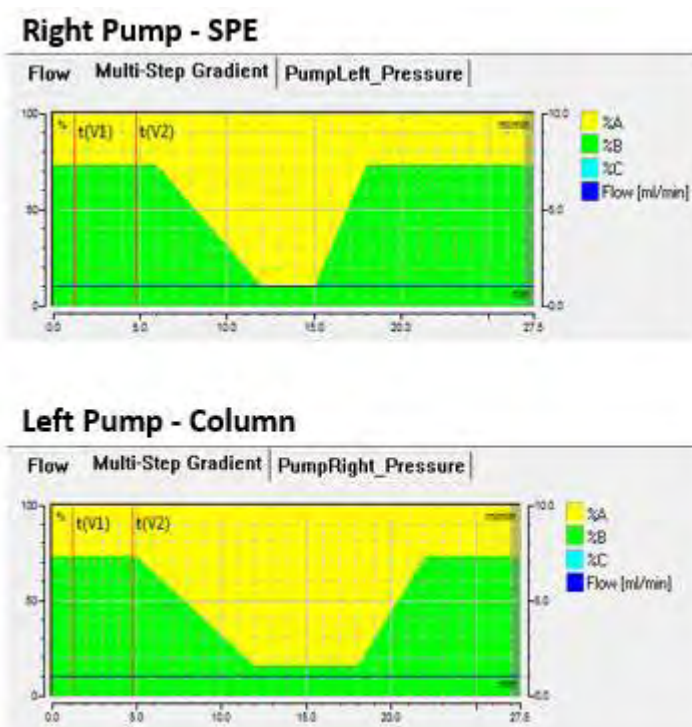
Εικόνα 4.13: Υπολογισμός του χρόνου έκλουσης της 1,25(OH)₂D από το on line σύστημα. Η ταυτοποίηση της βιταμίνης πραγματοποιείται μέσω της απορρόφησης της.

Τελευταίο βήμα είναι ο έλεγχος της καθαρότητας της κορυφής της 1,25(OH)₂D. Είναι αναγκαίο η κορυφή της βιταμίνης να μην αλληλεπικαλύπτεται με άλλες κορυφές ώστε να καταστεί εφικτή η ανίχνευση της μέσα σε άγνωστο δείγμα. Για τον έλεγχο της κορυφής πραγματοποιήθηκε έγχυση κυτταρικών εκχυλισμάτων ηπατοκαρκινώματος Huh7. Μετά την ανάλυση του δείγματος, έγινε εξωγενής προσθήκη 1,25(OH)₂D στο εκχύλισμα, το οποίο και αναλύθηκε ξανά από το σύστημα. Στα παρακάτω χρωματογραφήματα παρατηρούμε ότι δεν εντοπίζεται κάποια κορυφή στο χρόνο έκλουσης της 1,25(OH)₂D (εικόνα 4.14).



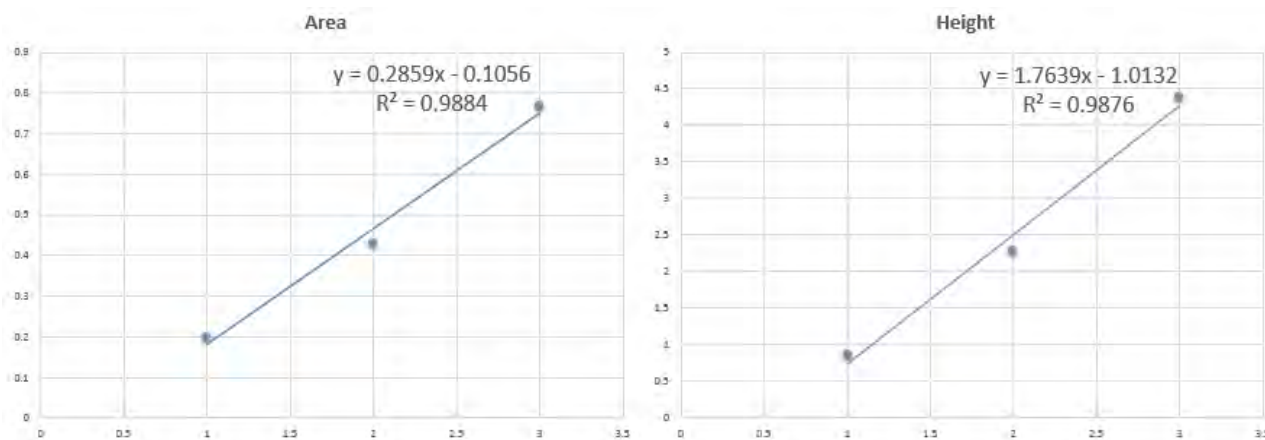
Εικόνα 4.14: Έλεγχος της καθαρότητας της κορυφής της 1,25(OH)₂D μετά από έγχυση κυτταρικών εκχυλισμάτων ηπατοκαρκινώματος Huh7

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, καταλήξαμε στην κατάλληλη επιλογή των διαλυτών και την ιδανική τους αναλογία. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν είναι 100% acetonitrile (διαλύτης A) και 10% acetonitrile-90% H₂O (διαλύτης B) (εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Επιλογή διαλυτών και κατάλληλων αναλογιών των διαλυτών στην U-HPLC για το πρόγραμμα ανίχνευσης της 1,25(OH)₂D

Για την ανίχνευση της συγκέντρωσης της 1,25(OH)₂D σε άγνωστα δείγματα, είναι απαραίτητος ο καθορισμός εξίσωσης για τον υπολογισμό του ύψους και του εμβαδού της κορυφής της βιταμίνης. Για τον υπολογισμό της εξίσωσης, έγινε έγχυση 20, 50 και 100ng/ml δειγμάτων 1,25(OH)₂D στο on line σύστημα.



Εικόνα 4.16: Πρότυπες εξισώσεις για τον υπολογισμό του εμβαδού και του ύψους της κορυφής της βιταμίνης

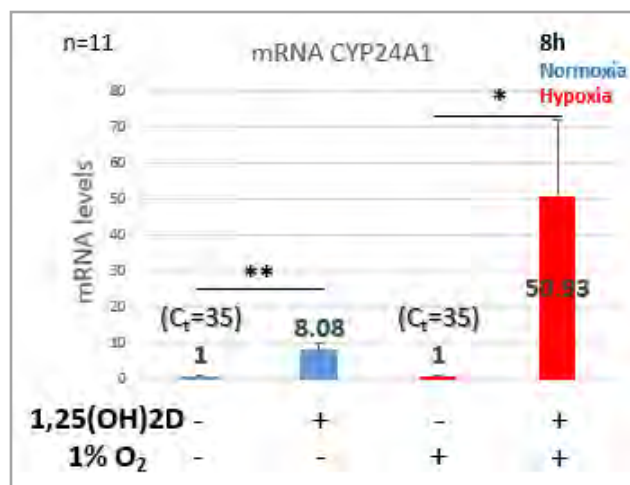
5. Συζήτηση

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D. In vitro και in vivo μελέτες πραγματοποιήθηκαν για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών δράσης της βιολογικά δραστικής μορφής της βιταμίνης, την καλσιτριόλη. Η καλσιτριόλη εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση, η κυτταρική απόπτωση και επιβίωση, η αγγειογένεση κ.ά. Η ικανότητα των κυττάρων, ωστόσο, να μεταβολίζουν την καλσιτριόλη έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της και την εξασθένιση των αντικαρκινικών της ιδιοτήτων. Η επιμήκυνση του χρόνου ημιζωής της καλσιτριόλης και η ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην παρουσία της αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική θεραπεία.

Άγνωστος παραμένει ο μεταβολισμός της βιταμίνης στην καρκινική ηπατική σειρά Huh7. Αρχικός στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *CYP27B1* και *CYP24A1*, που κωδικοποιούν για 2 ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που ευθύνονται για την παραγωγή και την αποικοδόμηση της καλσιτριόλης αντίστοιχα. Παράλληλα εξετάστηκε και η επίδραση των υποστρωμάτων των 2 ενζύμων, 25(OH)D και 1,25(OH)₂D, στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Για την μείωση της αποικοδόμησης της καλσιτριόλης εξετάστηκαν 4 φυσικές ενώσεις ως ρυθμιστές της έκφρασης του γονιδίου *CYP24A1*.

Τα γονίδια *CYP27B1* και *CYP24A1* εκφράζονται στην κυτταρική σειρά Huh7 σύμφωνα με ανάλυση με την τεχνική της real time PCR. Ωστόσο, η έκφραση τους κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Η έκφραση του *CYP27B1* δεν φέρεται να επηρεάζεται από την παρουσία του ενζυμικού του υποστρώματος, 25(OH)D. Αντίθετα, η καλσιτριόλη επάγει την έκφραση του *CYP24A1* σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Εντυπωσιακή αύξηση παρατηρείται στις 24 ώρες επώασης των κυττάρων τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Η επαγωγή του γονιδίου αγγίζει ~ τις 2000 και 1600 φορές αντίστοιχα.

Κοινό μοτίβο όλων των επαναλήψεων του πειράματος αποτελεί η παρατήρηση πως η επαγωγή του γονιδίου *CYP24A1* στις 8 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας είναι μικρότερη συγκριτικά με την επαγωγή στις 8 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας (εικόνα 5.1).



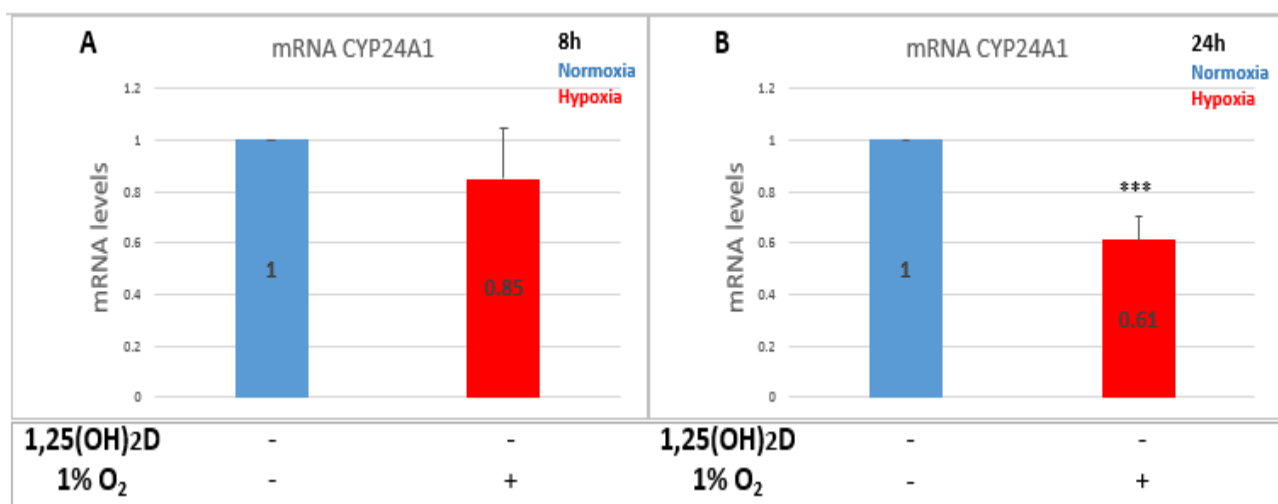
Εικόνα 5.1: Επίδραση της 1,25(OH)₂D στην έκφραση του γονιδίου *CYP24A1* σε 8 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας και σε συνθήκες υποξίας

Οι υποθέσεις για την εξήγηση του παραπάνω φαινομένου είναι οι εξής:

1. Το ένζυμο *cyp24a1* ανήκει στην κατηγορία των μονοξυγενασών. Αυτό σημαίνει πως απαιτείται μοριακό οξυγόνο για τη δράση του ενζύμου. Η υποξία, ωστόσο, αποτελεί μία κατάσταση χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Είναι πιθανό το ένζυμο να εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα σε υποξικές συνθήκες. Το κύτταρο για να αντισταθμίσει την έλλειψη ή μείωση δραστηριότητας του ενζύμου προκαλεί την περαιτέρω επαγωγή του γονιδίου του με απώτερο στόχο την αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων.

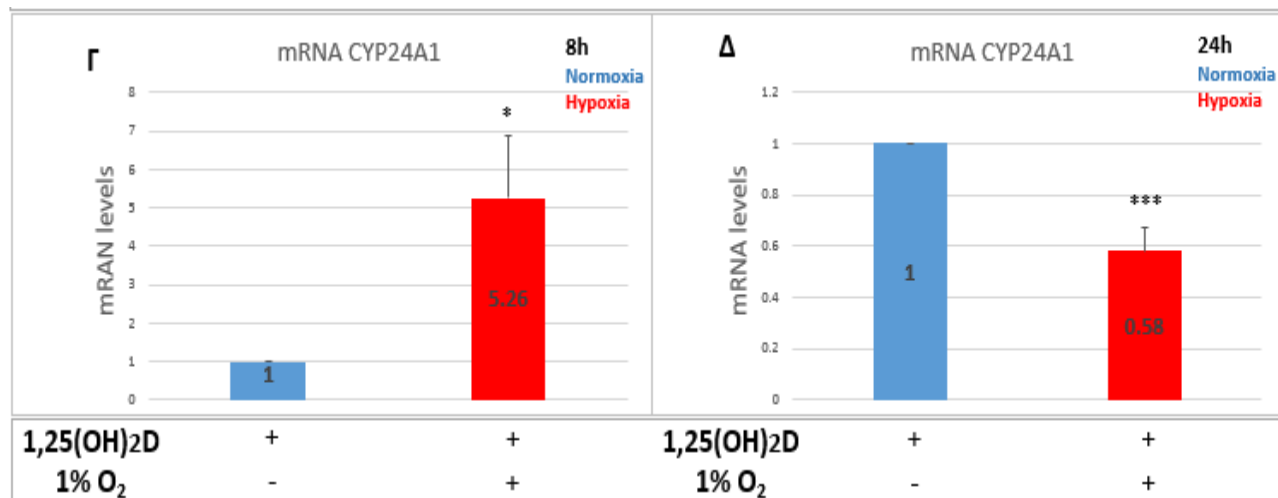
2. Η υποξία αποτελεί μία ξεχωριστή συνθήκη που μεταβάλλει την συμπεριφορά των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να είναι πιο επιθετικά σε υποξικές συνθήκες. Αυτό μπορεί να συνεπάγεται αυξημένη ανθεκτικότητα των υποξικών καρκινικών κυττάρων στην παρουσία της βιταμίνης συγκριτικά με τα νορμοξικά καρκινικά κύτταρα. Αποτέλεσμα αυτής της ανθεκτικότητας είναι ο ταχύτερος μεταβολισμός της καλσιτριόλης με στόχο την εξασθένιση των δράσεων της.

Στόχος της διπλωματικής αυτής αποτέλεσε και η επίδραση της υποξίας στα επίπεδα του γονιδίου *CYP24A1* απουσία και παρουσία της βιταμίνης D. Η υποξία αποτελεί μία ξεχωριστή συνθήκη που επηρεάζει τη συμπεριφορά των κυττάρων και την απόκριση τους στα ερεθίσματα. Στις 8 ώρες επώασης απουσία της καλσιτριόλης τα επίπεδα του *CYP24A1* δεν εμφανίζουν καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στην νορμοξία και την υποξία. Η υποξία προκαλεί μία μικρή τάση για μείωση στην έκφραση του γονιδίου. Στις 24 ώρες επώασης απουσία της καλσιτριόλης η υποξία μειώνει σημαντικά την έκφραση του γονιδίου συγκριτικά με την νορμοξία (εικόνα 5.2).



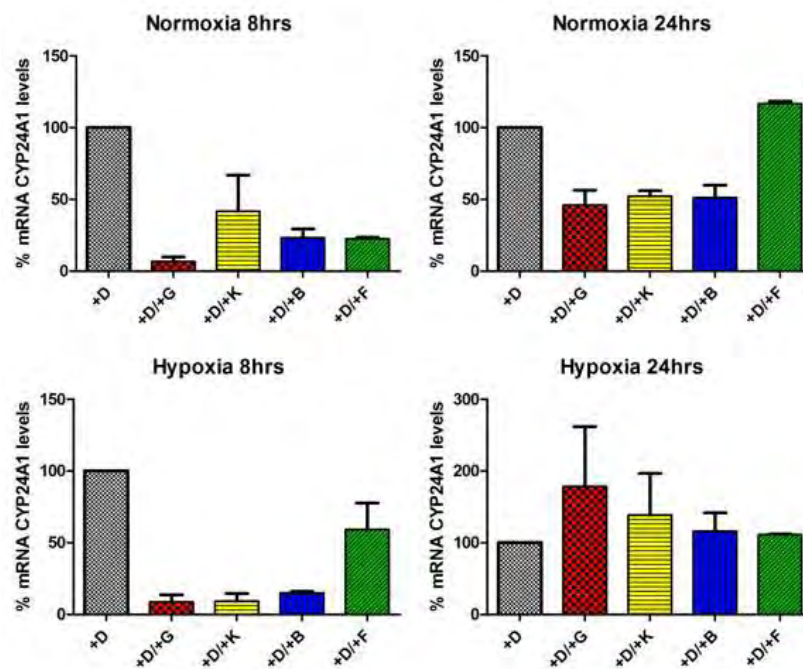
Εικόνα 5.2: Επίδραση της υποξίας στα επίπεδα του γονιδίου CYP24A1 απουσία της 1,25(OH)₂D Α) στις 8 ώρες επώασης και Β) στις 24 ώρες επώασης

Στις 8 ώρες επώασης παρουσία της καλσιτριόλης η υποξία προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του γονιδίου *CYP24A1*. Το φαινόμενο αυτό διαφέρει από την επίδραση της υποξίας απουσία της καλσιτριόλης στις 8 ώρες επώασης. Αυξημένη παραγωγή του *cyp24a1* συνεπάγεται αυξημένη αποικοδόμηση της καλσιτριόλης στην υποξία και απευαισθητοποίηση των κυττάρων στις αντικαρκινικές της ιδιότητες. Ένα διαφορετικό φαινόμενο, ωστόσο, παρατηρούμε στις 24 ώρες επώασης όπου η υποξία παρουσία της καλσιτριόλης προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων του γονιδίου. Είναι πιθανόν ο μηχανισμός στις 24 ώρες επώασης να είναι διαφορετικός από τις 8 ώρες επώασης. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την επίδραση της υποξίας απουσία της καλσιτριόλης στις 24 ώρες επώασης (εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3: Επίδρασης της υποξίας στα επίπεδα του γονιδίου CYP24A1 παρουσία της 1,25(OH)₂D Γ) στις 8 ώρες επώασης και Δ) στις 24 ώρες επώασης

Για τη μείωση των επιπέδων του γονιδίου *CYP24A1* μελετήθηκαν 4 φυσικές ενώσεις ως πιθανοί ρυθμιστές της έκφρασης του παραπάνω γονιδίου. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν τάση για άρση της επαγωγής του *CYP24A1* από την καλσιτριόλη σε διαφορετικό βαθμό στις 8 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας. Η γενιστεΐνη αποτέλεσε την πιο αποτελεσματική με την μείωση των επιπέδων του γονιδίου να αγγίζει το 90%. Στις 24 ώρες επώασης σε νορμοξία η φορμονονετίνη αποτυγχάνει να μειώσει τα επίπεδα του *CYP24A1*, με τις υπόλοιπες ενώσεις να εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα. Στις 8 ώρες επώασης σε υποξία οι ενώσεις προκαλούν μία τάση για μείωση των επιπέδων του γονιδίου, φαινόμενο που έρχεται σε συμφωνία με την επίδραση των ουσιών στις 8 ώρες επώασης σε νορμοξία. Η φορμονονετίνη αποτελεί την πιο «αδύναμη» ένωση στην πτώση των επιπέδων του *CYP24A1*. Ένα ξεχωριστό φαινόμενο παρατηρείται στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας. Όλα τα φλαβονοειδή δεν είναι ικανά να μειώσουν την έκφραση του γονιδίου. Η αδυναμία των ενώσεων genistein, kaempferol και biochanin A να δράσουν ως αναστολείς της δράσης της καλσιτριόλης ενδεχομένως οφείλεται στην ίδια αιτία. Η έλλειψη δραστηριότητας της φορμονονετίνης παρατηρείται και στις 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και δεν αποτελεί κοινό φαινόμενο με τις υπόλοιπες ενώσεις (εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4: Απεικόνιση της αναστολής της έκφρασης του γονιδίου *CYP24A1* από την παρουσία των ενώσεων genistein, kaempferol, biochanin A και formononetin σε 8 και 24 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να αίρουν την επαγωγή του *CYP24A1* από την καλσιτριόλη υποδεικνύει πως μπορούμε να στραφούμε σε διατροφικές πηγές για την ενίσχυση της

αντικαρκινικής θεραπείας. Περαιτέρω μελέτες κυτταρικού θανάτου και μετανάστευσης απαιτούνται για την λήψη συμπερασμάτων σχετικά με την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας της καλσιτριόλης και των φλαβονοειδών συγκριτικά με την μονοθεραπεία της καλσιτριόλης.

6. Βιβλιογραφία

1. Thomas DR. Vitamins in aging , health , and longevity. 2006;1(1):81–91.
2. Practice E. Review Article EP161604.RA VITAMIN D BINDING PROTEIN AND 25-HYDROXYVITAMIN D LEVELS: EMERGING CLINICAL APPLICATIONS. 2016;
3. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* [Internet]. 2014;21(3):319–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
4. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. 2014;55:13–31.
5. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The roles of vitamin D in skeletal muscle: Form, function, and metabolism. *Endocr Rev*. 2013;34(1):33–83.
6. Jeon S. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. 2018;
7. Krishnan A V, Feldman D. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. 2011;
8. Brozyna AA, Józwicki W, Jochymowski C, Slominski AT. Decreased expression of CYP27B1 correlates with the increased aggressiveness of ovarian carcinomas. *Oncol Rep*. 2015;33(2):599–606.
9. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. 2016;1–14.
10. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(APR):1–13.
11. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):601–14.
12. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. 2012;1:486–504.
13. Sladek FM. *NIH Public Access*. 2012;334:3–13.
14. Haussler MR, Whitfield GK. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. 2013;3:77–98.
15. Carlberg C, Dunlop TW. The impact of chromatin organization of vitamin D target genes. *Anticancer Res*. 2006;26(4 A):2637–45.
16. Pike JW, Meyer MB. Regulation of mouse Cyp24a1 expression via promoter-proximal and

- downstream-distal enhancers highlights new concepts of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ action. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2012;523(1):2–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.003>
17. Action D, Pike JW, Meyer MB. NIH Public Access. 2013;523(1):2–8.
 18. Nemere I, Safford SE, Rohe B, Desouza MM, Farach-carson MC. Identification and characterization of 1, 25D₃ -membrane-associated rapid response, steroid (1, 25D₃ -MARRS) binding protein &. 2004;90:281–5.
 19. Khanal RC, Nemere I. The ERp57 / GRp58 / 1, 25D₃ -MARRS Receptor : Multiple Functional Roles in Diverse Cell Systems. 2007;1087–93.
 20. Chen J, Lobachev KS, Grindel BJ, Farach-carson MC, Hyzy SL, El-baradie KB, et al. Chaperone properties of Pdia3 participate in rapid membrane actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. 2013;(C):1–13.
 21. Turano C, Gaucci E, Grillo C, Chichiarelli S. ERp57/GRP58: A protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett*. 2011;16(4):539–63.
 22. Boyan BD, Chen J, Schwartz Z. in musculoskeletal cells. *Steroids* [Internet]. 2012;77(10):892–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.04.018>
 23. Doroudi M, Plaisance MC, Boyan BD, Schwartz Z. dependent protein kinase II in bone and cartilage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015;145:65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.019>
 24. Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Schwartz Z. Membrane mediated signaling mechanisms are used differentially by metabolites of vitamin D₃ in musculoskeletal cells. 2002;67:421–7.
 25. Chen J, Doroudi M, Cheung J, Grozier AL, Schwartz Z, Boyan BD. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses. *Cell Signal* [Internet]. 2013;25(12):2362–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.020>
 26. Doroudi M, Plaisance MC, Boyan BD, Schwartz Z. Membrane actions of 1 α ,25(OH)₂D₃ are mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in bone and cartilage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015;145:65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.019>
 27. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. VITAMIN D : METABOLISM , MOLECULAR MECHANISM OF ACTION , AND PLEIOTROPIC EFFECTS VITAMIN D AND ITS BIOACTIVATION VITAMIN D ANALOGS. 2017;365–408.
 28. Lips P. Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly : Consequences for Bone Loss. *Endocr Rev* [Internet]. 2001;22(4):477–501. Available from: https://watermark.silverchair.com/edrv0477.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAaAYwggGiBqkqhkiG9w0BBwagggGTMIBjwIBADCCA YgGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMALSER8IZogTaN6q4AgEQgIIB WbMtdNdNbYmEiwCFtJxxyKGSXM7q4dfU7p_ibeaafOOhNaB
 29. Gani L, How C. Vitamin D deficiency. *Singapore Med J* [Internet]. 2015;56(08):433–7. Available from: <http://www.smj.org.sg/article/vitamin-d-deficiency>

30. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(1):50–60.
31. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 1994;267(3):E356–60. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1994.267.3.E356>
32. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes S V., Chan SLF, Squires PE, et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89–90:121–5.
33. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2014;383(9911):69–82.
34. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes* [Internet]. 2016;7(5):89. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v7/i5/89.htm>
35. Calle C, Maestro B, Molero S, Bajo S, Davila N. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene. *Cell Biochem Funct.* 2002;20(June 2001):227–32.
36. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84(2–3):223–30.
37. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: A prospective cohort study and metaanalysis. *Clin Chem.* 2013;59(2):381–91.
38. Ye Z, Sharp SJ, Burgess S, Scott RA, Imamura F, Langenberg C, et al. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D and incident type 2 diabetes: A mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2015;3(1):35–42. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70184-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70184-6)
39. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2011;1814(1):186–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.022>
40. Adams JS, Rafison B, Witzel S, Reyes RE, Shieh A, Chun R, et al. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase. 2014;144:22–7.
41. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O’Garra A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *J Immunol* [Internet]. 2001;167(9):4974–80. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.9.4974>
42. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Human B Cell Differentiation. *J Immunol* [Internet]. 2007;179(3):1634–47. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.3.1634>
43. Feldman D, Krishnan A V., Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342–57.

44. D. F, J. M, C.S. F, G.J. K, S.E. H, B.W. H, et al. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2004;13(9):1502–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L39202318%0Ahttp://bvqgsalud.c17.net/openurl?sid=EMBASE&issn=10559965&id=doi:&atitle=Plasma+vitamin+D+metabolites+and+risk+of+colorectal+cancer+in+women&stitle=Cancer+Epidemiol.+Biom>
45. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control*. 2000;11(9):847–52.
46. Gann PH, Ma J, Hennekens CH, Hollis BW, Haddad JG, Stampfer MJ. Circulating vitamin D metabolites in relation to subsequent development of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(UNITED STATES PT-Comparative Study PT-Journal Article PT-Research Support, U.S. Gov't, P.H.S LG-English DC-19961219 OVID MEDLINE UP 20131217):121–6.
47. Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M, Lumme S, Jellum E, Hallmans G, et al. Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: A longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Int J Cancer*. 2004;108(1):104–8.
48. Boyle BJ, Zhao X, Cohen P. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN-3 MEDIATES 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ GROWTH INHIBITION IN THE LNCAP PROSTATE CANCER CELL LINE THROUGH P21 / WAF1. 2001;165(April):1319–24.
49. Feldman D. Identification of a Functional Vitamin D Response Element in the Human Insulin-Like Growth Factor. 2004;18(5):1109–19.
50. Swami S, Krishnan A V, Feldman D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Down-Regulates Estrogen Receptor Abundance and Suppresses Estrogen Actions in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. 2000;6(August):3371–9.
51. Swami S, Krishnan A V, Peng L, Lundqvist J, Feldman D. Transrepression of the estrogen receptor promoter by calcitriol in human breast cancer cells via two negative vitamin D response elements. 2013;565–77.
52. Krishnan A V., Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: Implications for breast cancer therapy. *Endocrinology*. 2010;151(1):32–42.
53. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabweesh NJ. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2007;6(4):1433–9. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-06-0677>
54. Kizildag S, Ates H, Kizildag S. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Ann Hematol*. 2010;89(1):1–7.
55. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells

is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000;141(1):10–7.

56. Rao A, Coan A, Welsh J, Barclay WW, Koumenis C, Cramer SD. Vitamin D Receptor and p21 / WAF1 Are Targets of Genistein and 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ in Human Prostate Cancer Cells. 2004;25(13):2143–7.
57. Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1, 25 (OH)₂ Vitamin D₃ Induces Elevated Expression of the Cell Cycle-regulating Genes P21 and P27 in Squamous Carcinoma Cell Lines of the Head and Neck. 2001;25(12):103–10.
58. Rohan JNP, Weigel NL. Inhibiting Proliferation and Causing G₁ Accumulation in C4-2 Prostate Cancer Cells. 2015;25(May 2009):2046–54.
59. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2012;523(1):9–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.003>
60. Osanai M, Lee G-H. CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth. *Oncol Rep* [Internet]. 2016;36(5):2755–62. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2016.5072>
61. Kim MS, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S. 1 α ,25(OH)₂D₃-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265–266(SUPPL.):168–73.
62. Christakos S. In search of regulatory circuits that control the biological activity of Vitamin D. *J Biol Chem*. 2017;292(42):17559–60.
63. van der Meijden K, van Essen HW, Bloemers FW, Schulten EAJM, Lips P, Bravenboer N. Regulation of CYP27B1 mRNA Expression in Primary Human Osteoblasts. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2016;99(2):164–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27016371> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4932130> <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-016-0131-9> https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932130/pdf/223_2016_Article_131.pdf
64. Farhan H, Wähälä K, Cross HS. Genistein inhibits Vitamin D hydroxylases CYP24 and CYP27B1 expression in prostate cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;84(4):423–9.
65. Cho JH, Kang E, Kim G, Lee BH, Choi J. Long-term clinical outcome and the identification of homozygous CYP27B1 gene mutations in a patient with vitamin D hydroxylation-deficient rickets type 1A. 2016;169–73.
66. Demir K, Kattan WE, Zou M, Durmaz E, Binessa H. Novel CYP27B1 Gene Mutations in Patients with Vitamin D-Dependent Rickets Type 1A. 2015;1–14.
67. Balla B, Tobiás B, Kósa JP, Podani J, Horváth P, Nagy Z, et al. Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(3):313–21.
68. Dinour D, Beckerman P, Ganon L, Tordjman K, Eisenstein Z, Holtzman EJ. Loss-of-function mutations of CYP24A1, the vitamin D 24-hydroxylase gene, cause long-standing hypercalciuric nephrolithiasis and nephrocalcinosis. *J Urol* [Internet]. 2013;190(2):552–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2013.02.3188>

69. Molin A, Baudoin R, Kaufmann M, Souberbielle JC, Ryckewaert A, Vantghem MC, et al. CYP24A1 mutations in a cohort of hypercalcemic patients: Evidence for a recessive trait. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(10):E1343–52.
70. Kósa JP, Horváth P, Wölfling J, Kovács D, Balla B, Mátyus P, et al. CYP24A1 inhibition facilitates the anti-tumor effect of vitamin D3 on colorectal cancer cells. 2013;19(17):2621–8.
71. Zhang Q, Feng H, Qluwakemi B, Wang J, Yao S, Cheng G, et al. Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2017;68(1):28–42.
72. Rao A, Woodruff RD, Wade WN, Kute TE, Cramer SD. Nutrition and Cancer — Research Communication Genistein and Vitamin D. *Cell Cycle.* 2002;1(May):3191–4.
73. Bouker KB, Hilakivi-Clarke L. Genistein : Does It Prevent or Promote Breast Cancer ? Estrogenic Effects of Possible Antiestrogenic Effects of Genistein. *Environ Health Perspect.* 2000;108(8):701–8.
74. Martin P. ., Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 1978;103(5):1860–7.
75. Hsieh C-Y, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo1. *Cancer Res.* 1998;58(17):3833–8.
76. Banerjee S, Zhang Y, Ali S, Bhuiyan M, Wang Z, Chiao PJ, et al. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2005;65(19):9064–72.
77. Li Y, Ellis KL, Ali S, El-Rayes BF, Nedeljkovic-Kurepa A, Kucuk O, et al. Apoptosis-inducing effect of chemotherapeutic agents is potentiated by soy isoflavone genistein, a natural inhibitor of nf-kb in bxp-3 pancreatic cancer cell line. *Pancreas.* 2004;28(4):90–5.
78. Kashyap D, Sharma A, Singh H, Sak K, Punia S, Mukherjee TK. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action : Recent trends and advancements. *J Funct Foods [Internet].* 2017;30:203–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.022>
79. Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. Biochemical and Biophysical Research Communications The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2010;398(1):74–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.038>
80. Song W, Dang Q, Xu D, Chen Y, Zhu G, Wu K, et al. Kaempferol induces cell cycle arrest and apoptosis in renal cell carcinoma through EGFR / p38 signaling. 2014;1350–6.
81. Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer.* 2008;60(4):442–9.
82. Piao Y, Shin S, Choi J. Effects of Oral Kaempferol on the Pharmacokinetics of Tamoxifen and One of its Metabolites , 4-Hydroxytamoxifen , After Oral Administration of Tamoxifen to Rats. 2008;249(October 2007):245–9.
83. Li C, Li X, Choi J. Enhanced Bioavailability of Etoposide after Oral or Intravenous

Administration of Etoposide with Kaempferol in Rats. 2009;32(1):133–8.

84. Raheja S, Girdhar A, Lather V, Pandita D. Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2018;79(April):55–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.001>
85. Li Y, Yu H, Han F, Wang M, Luo Y, Guo X. Biochanin A Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Lung Cancer Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018:1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3545376/>
86. Bhushan A, Sehdev V, Lai JCK. Biochanin A modulates cell viability, invasion, and growth promoting signaling pathways in HER-2-positive breast cancer cells. *J Oncol*. 2009;2009.
87. Bhardwaj V, Tadinada SM, Jain A, Sehdev V, Daniels CK, Lai JCK, et al. Biochanin A reduces pancreatic cancer survival and progression. *Anticancer Drugs*. 2014;25(3):296–302.
88. Youssef MM, Tolba MF, Badawy NN, Liu AW, El-Ahwany E, Khalifa AE, et al. Novel combination of sorafenib and biochanin-A synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August 2015):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep30717>
89. Hu W, Xiao ZM. Formononetin induces apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 in vitro and in vivo. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(3):933–9.
90. Huang WJ, Bi LY, Li ZZ, Zhang X, Ye Y. Formononetin induces the mitochondrial apoptosis pathway in prostate cancer cells via downregulation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway. *Pharm Biol*. 2014;52(4):466–70.
91. Chen J, Zeng J, Xin M, Huang W, Chen X. Formononetin induces cell cycle arrest of human breast cancer cells via IGF1/PI3K/Akt pathways in vitro and in vivo. *Horm Metab Res*. 2011;43(10):681–6.
92. Li T, Zhao X, Mo Z, Huang W, Yan H, Ling Z, et al. Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of akt/cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(4):1351–8.
93. Jin YM, Xu TM, Zhao YH, Wang YC, Cui MH. In vitro and in vivo anti-cancer activity of formononetin on human cervical cancer cell line HeLa. *Tumor Biol*. 2014;35(3):2279–84.
94. R.A. J, M. K, C. D, S.J. M, A.M. C, A.J. H, et al. Induction of apoptosis in low to moderate-grade human prostate carcinoma by red clover-derived dietary isoflavones. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2002;11(12):1689–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496063><http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36020026><http://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=10559965&id=doi:&atitle=Induction+of+apoptosis+in+low+to+moderate-grade+human>
95. Zhang X, Ni Q, Wang Y, Fan H, Li Y. Synergistic Anticancer Effects of Formononetin and Temozolomide on Glioma C6 Cells. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2018;41(8):1194–202. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/41/8/41_b18-00002/_article
96. Palaiogiannis D, Bekou E, Pazaitou-Panayiotou K, Samanidou V, Tsakalof A. On-line SPE sample treatment as a tool for method automatization and detection limits reduction:

Quantification of 25-hydroxyvitamin D3/D2. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2017;1043:219–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.006>

97. van der Meijden K, Lips P, van Driel M, Heijboer AC, Schulten EAJM, Heijer M den, et al. Primary Human Osteoblasts in Response to 25-Hydroxyvitamin D3, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-Dihydroxyvitamin D3. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(10):e110283. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0110283>
98. McGarry T, Biniecka M, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2018;125(March):15–24.