



## ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 25 – ΜΑΡΤΙΟΣ 2018

### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Η ΕΠΟΠΟΙΑ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ  
ΠΑΡΙΚΑΛΣΙΤΟΛΗΣ ΣΕ ΝΕΦΡΙΚΑ  
ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

ΠΡΟΣΕΧΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΒΡΑΒΕΙΑ EUROMEDLAB2017

Ο πατέρας μου, αθλητής στίβου στα νιάτα του –πένταθλο και 100m– αφού μάταια προσπάθησε να εκμαιεύσει από τη μοναχοκόρη του αξιόλογες αθλητικές επιδόσεις, ο μόνος καρπός που έδρεψε από τις προσπάθειές του, ήταν η αγάπη μου για τον κλασικό αθλητισμό. Συχνά λοιπόν παρακολουθώ τις αθλητικές εκδηλώσεις. Έτσι μετά από άλλη μια εφημερία κάθησα εξοντωμένη στον καναπέ μου, να απολαύσω το αγαπημένο μου άθλημα, το άλμα επί κοντώ στο Παγκόσμιο Πρωτάθλημα Κλειστού Στίβου (Μπέρμινγχαμ, 1-4/3/2018). Οι δυο δικοί μας αθλητές ήδη είχαν πλασαριστεί στη δεκάδα -Εμμανουήλ Καραλής, 5.80m, 5ος και Κώστας Φιλιππίδης, 5.70m, 7ος- και τρεις αθλητές, οι Piotr Lisek (Πολωνία), Sam Kendricks (ΗΠΑ) και Renaud Lavillenie (Γαλλία) συνέχιζαν για τα μετάλλια. Αφού λοιπόν ξεκαθάρισε ότι ο Lisek θα πάρει το χάλκινο 5.85m, έμενε η μονομαχία μεταξύ Kendricks και Lavillenie. Πρώτος δοκιμάζει στα 5.90m ο Kendricks, ενώ ο Lavillenie τον χειροκροτεί για να τον ενθαρρύνει, ρίχνει τον πήχυ μένοντας στα 5.85m και στο ασημένιο μετάλλιο. Ο Lavillenie έχει πια κερδίσει το χρυσό με 5.90m και στην τελευταία προσπάθειά του ανεβάζει στα 6.00m, για να καταρρίψει το ρεκόρ αγώνων. Σε αυτή του την προσπάθεια, οι συναθλητές του παρακινούν τους θεατές να χειροκροτούν για να τον ενθαρρύνουν. Δεν τα καταφέρνει. Απογοήτευση.

Τι έμεινε στο τέλος του αγώνα; Η εκτίμηση και ο σεβασμός όλων μας για γι' αυτούς τους επικοντιστές. Γιατί οι νεαροί αθλητές που είδαμε, ξέρουν. Καταλαβαίνουν, ότι όσο πιο άξιος είναι ο «αντίπαλος», τόσο μεγαλύτερη είναι η νίκη. Ξέρουν ότι στο στίβο της ζωής «κανείς δεν είναι ένα νησί» και το επίτευγμα ενός συντελεί στην επιτυχία όλων. Αχ, να μπορούσαν να στείλουν το μήνυμα της ευγενούς άμιλλας και σε όλους εμάς τους σοβαρούς και αξιόλογους εργαστηριακούς, ώστε να εκτιμάμε τους συναδέλφους μας και να χαιρόμαστε με τα επιτεύγματά τους. Να προσπαθούμε «πάντα ψηλότερα ν' ανεβαίνουμε, πάντα μακρύτερα να κοιτάζουμε», «όλο ψηλά κι όλο ψηλότερα κι όλο στα ωραία και στα μεγάλα».

Αγαπητοί συνάδελφοι διαβάστε στο καινούργιο μας τεύχος τα ενδιαφέροντα άρθρα για τη βιταμίνη D, γραμμένα από μια έμπειρη και μια νεότερη συνάδελφο και χαρείτε το όμορφο ελληνικό Πάσχα, που έρχεται.

Καλή Ανάσταση σε όλους,

Ανδριανή Γρηγοράτου

[https://en.wikipedia.org/wiki/2018\\_IAAF\\_World\\_Indoor\\_Championships\\_%E2%80%93\\_Men's\\_pole\\_vault](https://en.wikipedia.org/wiki/2018_IAAF_World_Indoor_Championships_%E2%80%93_Men's_pole_vault)

<https://www.youtube.com/watch?v=ou3BjsMHh14>

Αποσπάσματα από τον Χέμιγγουεϊ, τον Γκαίτε και το Βερίτη.



## Πρόσκληση σε Τακτική Απολογιστική Γενική Συνέλευση

Αγαπητοί συνάδελφοι,

Το ΔΣ της Εταιρείας σας προσκαλεί σε Τακτική Γενική Συνέλευση που θα πραγματοποιηθεί την Πέμπτη 3 Μαΐου 2018 και ώρα 13:30 στην **Ένωση Ελλήνων Χημικών (Κάνιγγος 27, Αθήνα)**. Σε περίπτωση που δεν υπάρξει απαρτία, η Γενική Συνέλευση θα επαναληφθεί την επόμενη ημέρα 4 Μαΐου 2018 στον ίδιο χώρο και την ίδια ώρα. Σε περίπτωση που δεν θα υπάρξει και πάλι απαρτία, η Γενική Συνέλευση θα πραγματοποιηθεί οριστικά στον ίδιο χώρο, όπου θα λάβει χώρα και το Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης με θέμα: «Η προστασία των Προσωπικών Δεδομένων (GDPR) μέσα από τη Διαχείριση Κινδύνων στα In Vitro Διαγνωστικά Εργαστήρια», το

**Σάββατο 5 Μαΐου 2018, ώρα 13.30**

Θέματα Τακτικής Γενικής Συνέλευσης:

- 1) Απολογισμός δράσης του ΔΣ
- 2) Οικονομικός απολογισμός του ΔΣ
- 3) Διάφορα θέματα

Η παρουσία όλων των συναδέλφων είναι απαραίτητη προκειμένου να ακουστούν όλες οι απόψεις πάνω στα προβλήματα του κλάδου. Υπενθυμίζουμε ότι δικαίωμα συμμετοχής στη ΓΣ έχουν, εκτός των τακτικών, και τα αρωγά μέλη της Εταιρείας.

---

## Η ΕΠΟΠΟΙΑ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

*Αγγ. Μελπίδου, Βιοχημικό εργαστήριο ΠΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»*

Επί μακρόν ο άνθρωπος υπέφερε από ασθένειες όπως η ραχίτιδα, το σκορβούτο, η beri-beri και άλλες παρόμοιες, ωστόσο η αιτία τους παρέμενε άγνωστη έως τον εικοστό αιώνα. Όσον αφορά στην διατροφή, τον δέκατο ένατο αιώνα έως τις αρχές του εικοστού, κυριαρχούσε το δόγμα των Γερμανών χημικών, ότι η κατάλληλη δίαιτα αποτελείται από 12% πρωτεΐνη, 5% μέταλλα, 10-30% λίπος και το υπόλοιπο υδατάνθρακες. Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές με τα πειράματά τους έδειξαν ότι αυτό δεν ήταν αληθές. Τα ζώα που τράφηκαν δοκιμαστικά με την συγκεκριμένη αναλογία από καθαρές πρώτες ύλες των ανωτέρω διαιτητικών συστατικών, δεν κατάφεραν να επιβιώσουν. Προφανώς, κάτι που έλειπε από αυτές τις καθαρές πρώτες ύλες, χρειαζόταν για την επιβίωση. Επιπλέον και άλλα ευρήματα συνηγορούσαν στο γεγονός της ύπαρξης βασικών αναγκαίων μικροθρεπτικών συστατικών στην διατροφή.

Η ιδέα των βιταμινών προτάθηκε αρχικά από τον Πολωνό χημικό Kazimier Funk (Βαρσοβία 1884 - Νέα Υόρκη 1967), ο οποίος διέβλεψε την παρουσία μίας “vital amine” στις τροφές, η οποία ήταν αναγκαία για την υγεία και την επιβίωση. Στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin, ο καθηγητής Γεωργικής Χημείας Stephen Moulton Babcock (1843 - 1931) ήταν επί χρόνια πολέμιος του ανωτέρω δόγματος των Γερμανών χημικών. Διεξήγαγε πειράματα με τον επικεφαλής του Τμήματος της Γεωργικής Χημείας, βιοχημικό Edwin B. Hart (1854-1953), στο κοπάδι των αγελάδων του Πανεπιστημίου τρέφοντας διαφορετικές ομάδες αγελάδων, με διαφορετικά σιτηρέσια καταλήγοντας σε διαφορετικά αποτελέσματα. Τελικώς, η ομάδα του Πανεπιστημίου του Wisconsin συμπέρανε σωστά, ότι υπάρχουν διαιτητικοί παράγοντες υπεύθυνοι για την υγεία και την ευεξία. Το συμπέρασμα αυτό οδήγησε τον Hart να ξεκινήσει μια σειρά πειραμάτων για να ελέγξει αυτήν την υπόθεση. Έτσι, οι Hart και Babcock επέτρεψαν στον καθηγητή McCollum (βιοχημικός, 1879 - 1967) να χρησιμοποιήσει σαν πειραματικό μοντέλο τον λευκό αρουραίο, για να μελετήσει την σπουδαιότητα των διάφορων διαιτητικών συστατικών, παρά το γεγονός ότι οι αρουραίοι θεωρούνται εχθροί και δεν έχουν θέση σε Κολλέγιο επιστήμης της γεωργίας και των γαλακτοκομικών. Με τον λευκό αρουραίο, οι McCollum και Marguerite Davis (βιοχημικός, 1887 - 1967) απέδειξαν ότι το βούτυρο και το μωρονόλαδο περιείχαν έναν παράγοντα απαραίτητο για την ανάπτυξη καθώς και την πρόληψη της ξηροφθαλμίας. Επιπλέον οι McCollum και Davis και ανεξάρτητα, οι Thomas Burr Osborne (βιοχημικός, 1859 - 1929) και Lafayette Mendel (βιοχημικός, 1872 - 1935) από το Πανεπιστήμιο του Yale ανακάλυψαν έναν υδατοδιαλυτό παράγοντα υπεύθυνο για την πρόληψη μιας νευρολογικής ασθένειας παρόμοιας με την νόσο beri-beri. Ο McCollum σε συνεννόηση με τον καθηγητή H. Steenbock (βιοχημικός, 1886 - 1967) αποφάσισαν να χρησιμοποιήσουν την ιδέα του Funk και να ονομάσουν τους παράγοντες αυτούς βιταμίνες. Ο πρωτοευρεθείς λιποδιαλυτός παράγοντας ονομάσθηκε *βιταμίνη Α* και εν συνεχεία ο υδατοδιαλυτός παράγοντας ονομάσθηκε *βιταμίνη Β*. Σύντομα ένας άλλος υδατοδιαλυτός παράγοντας που αποδείχτηκε ότι απέτρεπε την νόσο του σκορβούτου, ονομάσθηκε *βιταμίνη C*. Είχε ανοίξει ο δρόμος για την ανακάλυψη της επόμενης βιταμίνης, της τέταρτης στην σειρά ανακάλυψης, της *βιταμίνης D*.

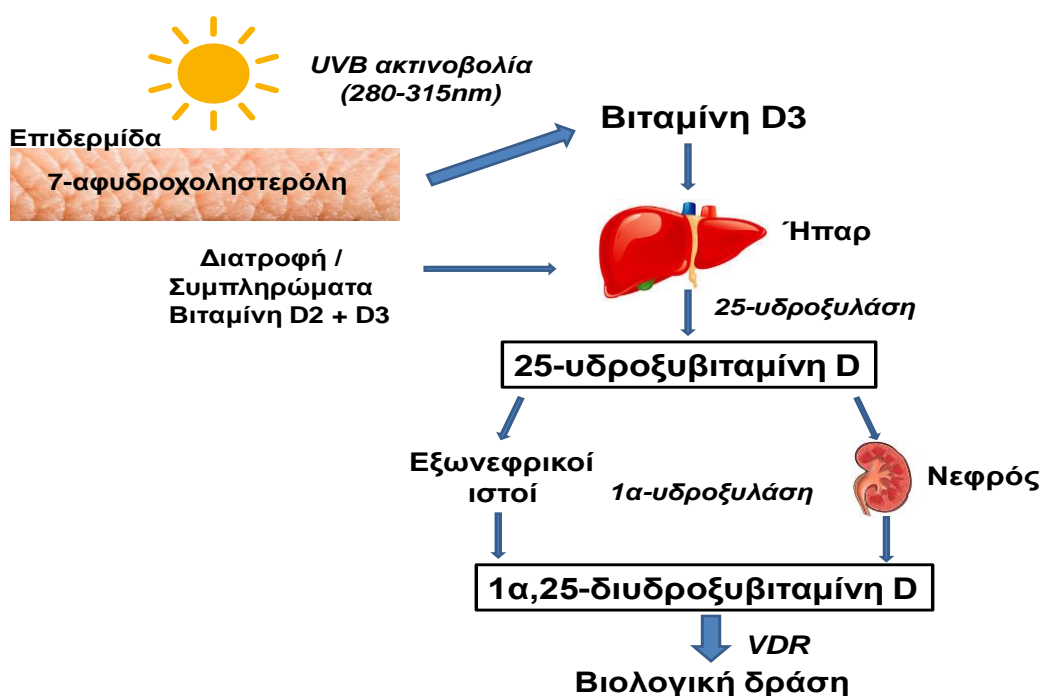
Στις αρχές του εικοστού αιώνα, στο Ηνωμένο Βασίλειο και κυρίως στην Σκωτία, η επίπτωση της ραχίτιδας ήταν τόσο μεγάλη, ώστε ήταν γνωστή με το όνομα «Αγγλική Ασθένεια». Ο γιατρός Sir Edward Mellanby, εντυπωσιασμένος από τα ευρήματα του McCollum, σκέφτηκε ότι η ραχίτιδα θα μπορούσε να οφείλεται σε έλλειψη ενός διαιτητικού συστατικού. Χρησιμοποιώντας την δίαιτα των Σκωτσέζων, η οποία βασιζόταν κυρίως στην βρώμη, τάισε σκύλους οι οποίοι και εντελώς τυχαία ήταν περιορισμένοι σε κλειστό χώρο, χωρίς δυνατότητα έκθεσης τους στην ηλιακή ακτινοβολία. Οι σκύλοι ανέπτυξαν ραχίτιδα παρόμοια με την ανθρώπινη νόσο. Στην συνέχεια, ο Sir Mellanby θεράπευε την ραχίτιδα ενισχύοντας την τροφή των σκύλων με μωρουνόλαδο. Θεώρησε επομένως πιθανόν ότι η βιταμίνη Α ήταν υπεύθυνη για την πρόληψη της ραχίτιδας. Στις ΗΠΑ, ο McCollum θέλοντας να ελέγξει αυτήν την υπόθεση, διοχέτευσε αέριο οξυγόνο στο μωρουνόλαδο, καταστρέφοντας έτσι την βιταμίνη Α. Διαπίστωσε ότι αυτό το παρασκεύασμα του μωρουνόλαδου δεν είχε πλέον την δυνατότητα πρόληψης της ξηροφθαλμίας, διατηρούσε όμως την δυνατότητα θεραπείας της ραχίτιδας. Έτσι στα 1922, ο McCollum και οι συνεργάτες του δημοσιεύουν στο *J Biol Chem* το συμπέρασμα στο οποίο ορθά κατέληξαν, ότι ο παράγοντας ο οποίος θεραπεύει την ραχίτιδα είναι μια νέα βιταμίνη, την οποία ονόμασαν βιταμίνη D.

Εν τω μεταξύ ιατρικά ευρήματα από την Βιέννη και από την Αγγλία έδειχναν την δυνατότητα θεραπείας της ραχίτιδας σε παιδιά που υπέφεραν από την νόσο, με την έκθεση τους στη θερινή ηλιακή ακτινοβολία αλλά και σε τεχνητή UV ακτινοβολία. Τα ευρήματα αυτά προσέλκυσαν το ενδιαφέρον του καθηγητή Steenbock στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin, ο οποίος ήδη από το 1916, μελετώντας γίδες, είχε δείξει ότι όταν τα ζώα το καλοκαίρι ευρίσκονταν στην ύπαιθρο, εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία, ήσαν σε θετικό ισοζύγιο ασβεστίου, ενώ το χειμώνα που τα ζώα ήταν κλεισμένα στην στάνη, απουσία ηλιακής ακτινοβολίας, το ισοζύγιο ασβεστίου ήταν αρνητικό. Συνδέοντας λοιπόν την ηλιακή ακτινοβολία με την πρόσληψη ασβεστίου, άρχισε να ακτινοβολεί με UV ακτινοβολία τους αρουραίους, την τροφή τους καθώς και τον αέρα στα κλουβιά τους. Διαπίστωσε έτσι, ότι η έκθεση στην UV ακτινοβολία όχι μόνο των ζώων αλλά και της τροφής τους μπορούσε να αποτρέψει την εμφάνιση ή να θεραπεύσει την ραχίτιδα. Ανακάλυψε δε ότι αυτή η ιδιότητα συνδέεται με το ασαπωνοποίητο υλικό των λιπαρών σωμάτων, συμπεραίνοντας ορθά, ότι ένα αδρανές λιποειδές συστατικό της τροφής αλλά και του δέρματος μπορούσε να μετατραπεί μέσω της UV ακτινοβολίας σε δραστική αντιραχίτικη ουσία. Στη συνέχεια ο καθηγητής Steenbock προχώρησε στην κατοχύρωση της διαδικασίας με πατέντα, με την οποία μπόρεσε να προσελκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί αυτή η ανακάλυψη για την εξάλειψη της ραχίτιδας.

Το 1932 έγινε δυνατή η ταυτοποίηση της δομής της βιταμίνης D, μετά την απομόνωση της D2 μορφής της, από τον Askew και τους συνεργάτες του από ένα μείγμα που προέκυψε μετά από ακτινοβόληση της εργοστερόλης. Η D1 μορφή δεν ήταν παρά ένα προϊόν προσθήκης της D2 με λουμιστερόλη. Το 1935 απομονώνεται από τον Windaus η 7-αφυδροχοληστερόλη και το 1937 ταυτοποιείται η μορφή D3 από τους Windaus και Bock. Θεωρείται ότι η D3 είναι η μορφή της βιταμίνης D, συντίθεται στο δέρμα μετά από UV ακτινοβόληση της 7-αφυδροχοληστερόλης. Τέθηκε λοιπόν το ερώτημα κατά πόσον η βιταμίνη D είναι πραγματικά μία βιταμίνη, ή συντίθεται κανονικά στο δέρμα και δεν βρίσκεται στα τρόφιμα. Βέβαια, το γεγονός του σχηματισμού της D3

στο δέρμα μετά από UV ακτινοβολία της 7-αφυδροχοληστερόλης δεν αποδεικνύεται παρά μόνο το 1978 από τον Esvelt, ο οποίος απομόνωσε και ταυτοποίησε τη βιταμίνη D3 με φασματοφωτομετρία μάζης.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η σύνθεση της βιταμίνης D3 ξεκινά στο εντερικό επιθήλιο με οξείδωση της χοληστερόλης σε 7-αφυδροχοληστερόλη (7-DHC). Η 7-DHC μεταφέρεται στις μεμβράνες των ινοβλαστών και των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, φωτολύεται από την UVB ακτινοβολία του ηλίου (280-315nm) σε προβιταμίνη D3, η οποία ισομερίζεται με την θερμοκρασία σε βιταμίνη D3. Η ενδογενής αυτή σύνθεση αντιστοιχεί περίπου στο 80-90% της βιταμίνης D που χρειαζόμαστε. Τα φυτά παράγουν την μορφή D2, ενώ ο άνθρωπος και τα ζώα παράγουν την μορφή D3. Ο άνθρωπος προσλαμβάνει επίσης την βιταμίνη D σε μικρή ποσότητα, μέσω της τροφής, είτε στην D2, είτε στην D3 μορφή. Οι μορφές D2 και D3, αν και έχουν διαφορές ως προς την αποτελεσματικότητά τους, θεωρείται ότι μεταβολίζονται και λειτουργούν κατά τον ίδιο περίπου τρόπο.



Σύνθεση της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D

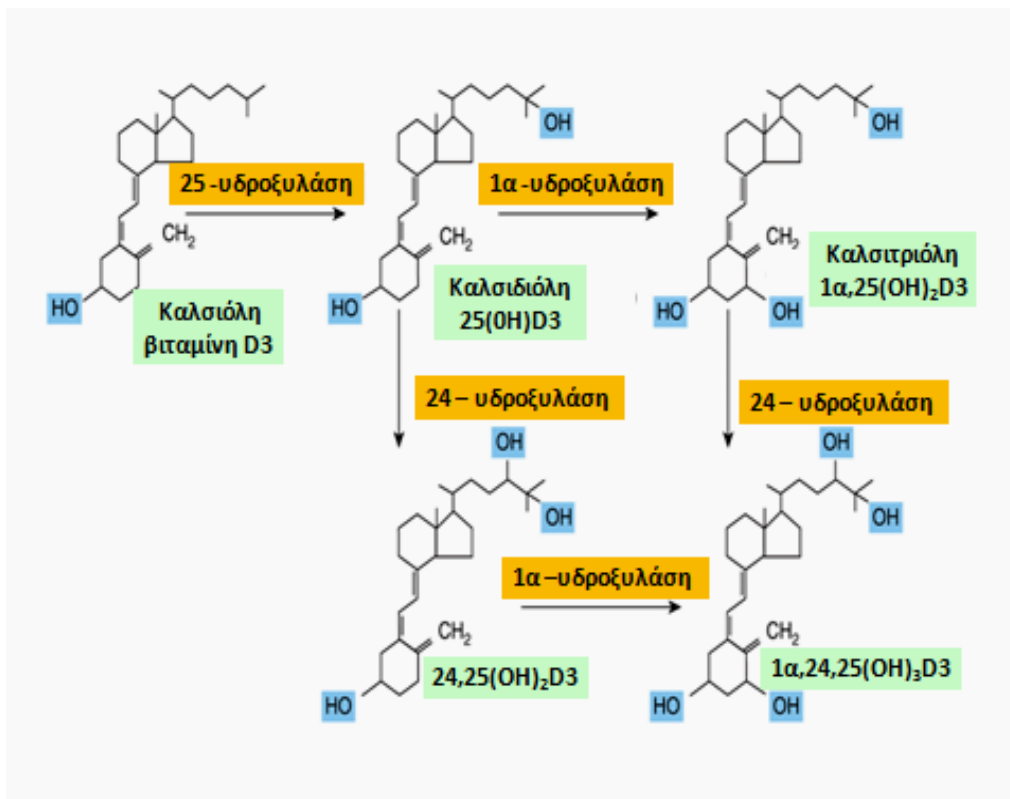
Τελικά, το αποτέλεσμα των πρώτων σημαντικών ανακαλύψεων ήταν η εξάλειψη της ραχίτιδας σαν μέγιστο ιατρικό πρόβλημα της εποχής. Η έρευνα για την βιταμίνη D συνεχίζεται αλλά με χαμηλότερους ρυθμούς. Η ιδέα να περιγραφεί η βιταμίνη D σαν συνένζυμο απορρίπτεται και πλέον μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 60, θεωρείται ότι η βιταμίνη D δρά αυτούσια χωρίς μεταβολική τροποποίηση. Η έρευνα επικεντρώνεται στην προσπάθεια κατανόησης του τρόπου με τον οποίο αυτό το στεροειδές θεραπεύει την ραχίτιδα στα παιδιά και την οστεομαλακία στους ενήλικες. Το 1925, ένα από τα πρώτα πειράματα, που ωστόσο δεν αξιολογήθηκε

αρκετά, ήταν του Shipley. Τεμάχια οστών από ραχιτικά ζώα επώασθηκαν με δύο τρόπους: σε ορό αίματος ζώων με έλλειψη βιταμίνης D και σε ορό αίματος ζώων στα οποία είχε χορηγηθεί βιταμίνη D. Στην δεύτερη περίπτωση παρατηρήθηκε εναπόθεση ασβεστίου και φωσφόρου στα οστικά τεμάχια. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε εναπόθεση ασβεστίου και φωσφόρου στα οστικά τεμάχια, όταν αυτά επώασθηκαν σε ορό αίματος ζώων με έλλειψη βιταμίνης D, στον οποίο προστέθηκε εξωγενώς βιταμίνη D. Σημαντική ήταν επίσης η παρατήρηση, ότι μπορούσε να επιτευχθεί ασβεστοποίηση των ραχιτικών οστικών τεμαχίων με επώαση τους σε διάλυμα που περιείχε ασβέστιο και φωσφόρο σε συγκεντρώσεις ίδιες με αυτές του ορού αίματος ζώων, στα οποία είχε χορηγηθεί βιταμίνη D. Αυτά τα αποτελέσματα αν και δεν υποδείκνυαν τον μηχανισμό δράσης της βιταμίνης D, υποδήλωναν ωστόσο, ότι η αποτυχία επιμετάλλωσης του οστίτη ιστού μπορεί να σημαίνει αποτυχία προμήθειας ασβεστίου και φωσφόρου στον οστίτη ιστό, όταν υπάρχει έλλειψη βιταμίνης D.

Το επόμενο σημαντικό βήμα ήταν η ανακάλυψη του Nicolaysen το 1937, ότι η βιταμίνη D αυξάνει την απορρόφηση του ασβεστίου από το λεπτό έντερο. Ο Nicolaysen πρότεινε την ύπαρξη ενός ενδογενούς παράγοντα, ο οποίος θα μπορούσε να πληροφορεί το έντερο για τις ανάγκες των οστών σε ασβέστιο. Αργότερα, ο ενδογενής αυτός παράγοντας του Nicolaysen προσδιορίστηκε ευκρινώς, με την ανακάλυψη της μεταβολικής οδού της βιταμίνης D. Μια άλλη ανακάλυψη που δεν εκτιμήθηκε αρκετά, ήταν των Carlsson και Bauer. Το 1952 οι Carlsson και Bauer ανακάλυψαν, ότι η βιταμίνη D μπορεί επίσης να προκαλέσει μετακίνηση του ασβεστίου από τα οστά στο πλάσμα. Αυτό, αν και φαινομενικά έδειχνε απομετάλλωση του οστού, ωστόσο αντιπροσώπευε έναν σημαντικό μηχανισμό δια του οποίου η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση στο πλάσμα της συγκέντρωσης του ασβεστίου, η οποία είναι απαραίτητη όχι μόνο για την επιμετάλλωση του σκελετού, αλλά και για τη λειτουργία του νευρομυϊκού συστήματος. Αυτή η ανακάλυψη έδειχνε ένα νέο τρόπο με τον οποίο η βιταμίνη D μπορούσε να προκαλέσει αύξηση του ασβεστίου στον ορό. Στη συνέχεια αποδείχτηκε επίσης, ότι η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφόρου μέσω της ενεργούς μεταφοράς φωσφόρου από τον αυλό του εντέρου στον ορό. Στα τέλη της δεκαετίας του '50, διευκρινίζεται από τις εργασίες των Lamm και Neuman ότι το αίμα φυσιολογικά είναι υπέρκορο σε ασβέστιο και φωσφόρο και ότι η επιμετάλλωση των οστών πρακτικά είναι μια καταλυόμενη διαδικασία κρυσταλλοποίησης. Η ιδέα ότι η βιταμίνη D αυξάνει το ασβέστιο και τον φωσφόρο σε υπέρκορα επίπεδα στον ορό προκαλώντας έτσι επιμετάλλωση των οστών, αποδείχτηκε τελικά από τους Underwood και DeLuca μόλις το 1984. Η έγχυση ασβεστίου και φωσφόρου σε αρουραίους με έλλειψη βιταμίνης D, έτσι ώστε να επιτευχθούν φυσιολογικά επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου στον ορό, είχε σαν αποτέλεσμα την φυσιολογική επιμετάλλωση των οστών.

Στα τέλη της δεκαετίας του '60, από τα πειράματα του DeLuca (Επικεφαλής του Τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Wisconsin, 1930-) και των συνεργατών του, φάνηκε ότι υπήρχε μια χρονική καθυστέρηση 16 ωρών μεταξύ της χορήγησης βιταμίνης D<sub>3</sub> σε ζώα με έλλειψη βιταμίνης D και της ενεργούς μεταφοράς ασβεστίου από το έντερο στην κυκλοφορία. Προφανώς αυτή η καθυστέρηση σήμαινε ότι κάποιες σημαντικές διεργασίες ελάμβαναν χώρα, προτού να φανεί η δράση της βιταμίνης D στο ασβέστιο. Για να αποδειχθεί η αιτία της καθυστέρησης στην δράση της βιταμίνης D μεταξύ του χρόνου χορήγησης της και της μεταφοράς

ασβεστίου, ήταν απαραίτητο να διευκρινισθεί αν η βιταμίνη D φθάνει τόσο γρήγορα στο έντερο, όσο ήταν αναμενόμενο, ή υπήρχε κάποια καθυστέρηση στην μεταφορά της. Αυτό απαιτούσε την σύνθεση ραδιενεργά επισημασμένης βιταμίνης D, που να διατηρεί υψηλή δραστηριότητα, έτσι ώστε να μπορεί να χορηγηθεί σε φυσιολογική δόση. Η επισήμανση με τρίτιο στις θέσεις 1 και 2 επέτρεψε την εύρεση μεταβολιτών της βιταμίνης D πολύ γρήγορα μετά την χορήγηση της, μέσα σε μία με δύο ώρες, και πολύ πριν την ανταπόκριση του εντέρου και των οστών. Οι μεταβολίτες αυτοί ανιχνεύθηκαν με χρωματογραφία πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Το μεγαλύτερο κλάσμα της χρωματογράφησης, που ονομάστηκε κορυφή 4, όταν χορηγήθηκε στα ζώα με έλλειψη βιταμίνης D αποδείχτηκε ότι είχε πιο ισχυρή και πιο γρήγορη δράση από την βιταμίνη D3 στην μεταφορά του ασβεστίου από το έντερο. Για να γίνει δυνατή η ταυτοποίηση του μεταβολίτη της κορυφής 4 ήταν απαραίτητη η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αυτού του κλάσματος. Για τον λόγο αυτό, το πλάσμα τεσσάρων χοίρων στους οποίους χορηγήθηκαν μεγάλες δόσεις βιταμίνης D3, υποβλήθηκε σε επανειλημμένες χρωματογραφίες silica gel.



Μεταβολισμός βιταμίνης D3

Ωστόσο σε αυτό το στάδιο καθαρότητας, εξ' αιτίας των λιπιδίων που παρεμβάλλονταν, δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση του μεταβολίτη με φασματοσκοπία μάζης. Με τελικό στάδιο καθαρισμού χρωματογραφία αντίστροφης φάσης έγινε δυνατή η παραγωγή καθαρού μεταβολίτη. Έτσι, το 1968, ο DeLuca και οι συνεργάτες του δημοσιεύουν στο *Biochemistry* την ταυτοποίηση του μεταβολίτη της κορυφής 4 με φασματοσκοπία μάζης, φασματοφωτομετρία υπεριώδους και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR. Ο μεταβολίτης αυτός ήταν η 25-υδροξυβιταμίνη D3 (25(OH)D3). Στη συνέχεια, οι DeLuca κ.α. χορηγούν 25(OH)D3 επισημασμένη με τρίτιο στις θέσεις 26 και 27, διαπιστώνοντας το γρήγορο μεταβολισμό της και σε άλλους

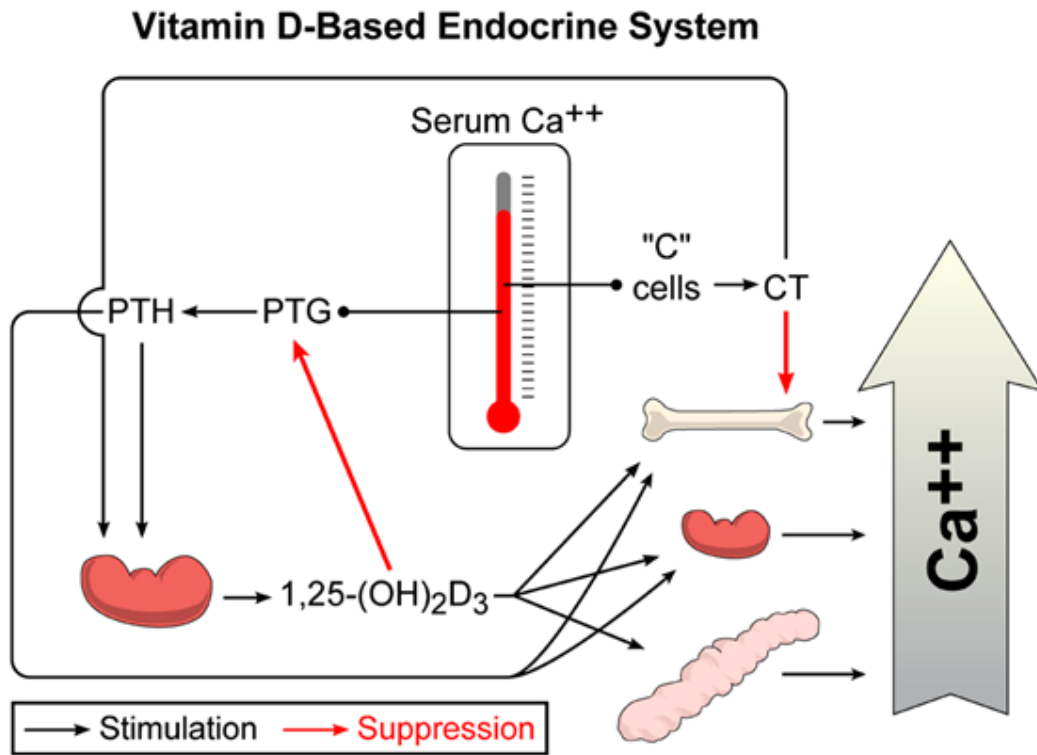
μεταβολίτες. Για να διευκρινισθεί περαιτέρω ποιός από αυτούς τους μεταβολίτες είναι ο δραστικά ενεργός, η ομάδα του DeLuca χορήγησε ραδιενεργά επισημασμένη βιταμίνη D3 σε κοτόπουλα με έλλειψη βιταμίνης D. Από τον εντερικό ιστό 1600 κοτόπουλων απομονώθηκε, μετά από οκτώ χρωματογραφικά στάδια, ένας μεταβολίτης ο οποίος όμως δεν ήταν σε τόσο καθαρή μορφή για να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία μάζης. Τελικά μετά την μετατροπή της απομονωθείσας ουσίας σε τριμεθυλοσίλυλο (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, TMS) παράγωγο έγινε εφικτός ο χρωματογραφικός καθαρισμός του μεταβολίτη και η ταυτοποίηση του με φασματοσκοπία μάζης. Οι DeLuca κ.α δημοσιεύουν στο *Biochemistry*, το 1971, την απομόνωση και ταυτοποίηση της 1,25-διυδροξυχοληκασιφερόλης, ενός μεταβολίτη της βιταμίνης D δραστικού στον εντερικό ιστό. Αυτή υπήρξε και η πρώτη ταυτοποίηση της 1,25-διυδροξυβιταμίνης D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3). Αργότερα οι DeLuca κ.α διευκρινίζοντας την διαμόρφωση του υδροξυλίου στην θέση 1, καταλήγουν τελικά στο συμπέρασμα ότι ο ενεργός μεταβολίτης είναι η 1α,25-διυδροξυβιταμίνη D3 (1α,25(OH)<sub>2</sub>D3). Η 1α,25(OH)<sub>2</sub>D3 αποδείχτηκε εξαιρετικά δραστική με πολύ μικρό όμως χρόνο ημιζωής, αναγνωρίστηκε δε σαν η μεταβολικά ενεργός μορφή της βιταμίνης D υπεύθυνη για την ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου στον ορό καθώς και για την επιμετάλλωση του σκελετού. Έως το 1983, η ομάδα του DeLuca προχώρησε στην απομόνωση και χαρακτηρισμό περίπου τριάντα μεταβολιτών της βιταμίνης D. Επίσης, είχαν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί και οι μεταβολίτες της βιταμίνης D2, οι 25(OH)D2 και 1α,25(OH)<sub>2</sub>D2.

Ένας μεταβολίτης στον οποίο δόθηκε επίσης αρκετή προσοχή ήταν η 24R,25-διυδροξυβιταμίνη D3. Με εκτεταμένα πειράματα οι DeLuca και Boyle διερεύνησαν τον λειτουργικό ρόλο της αποδεικνύοντας τελικά, ότι δεν πρόκειται για δραστικό μεταβολίτη. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η υδροξυλίωση της 25(OH)D3, αλλά και της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D3 στην θέση 24 οδηγεί στον καταβολισμό τους. Τελικά μέχρι το 1975 είχε γίνει σαφές ότι η βιταμίνη D για να εκφράσει την δράση της στο ασβέστιο, στον φωσφόρο και στον οστικό μεταβολισμό, πρέπει πρώτα να μεταβολισθεί στην μορφή 25(OH)D, η οποία είναι βιολογικά ακόμη αδρανής και εν συνεχεία να μετατραπεί περαιτέρω στην ενεργό ορμονική μορφή της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D3.

Παράλληλα το 1969, προσδιορίζεται ότι το υπεύθυνο όργανο για την μετατροπή της βιταμίνης D3 σε 25(OH)D3 είναι το ήπαρ, διότι με υφολική ηπατεκτομή εξαλείφεται σε μεγάλο ποσοστό αυτή η μετατροπή. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το ηπατικό ένζυμο του κυτοχρώματος P450, το CYP2R1, είναι η 25-υδροξυλάση που είναι κυρίως υπεύθυνη για την υδροξυλίωση της βιταμίνης D στην θέση 25. Ένα χρόνο μετά, το 1970, ο καθηγητής E. Kodicek από το Cambridge, ο οποίος ήδη από την δεκαετία του 50, είχε και αυτός ασχοληθεί με τον μεταβολισμό της βιταμίνης D, μαζί με τον Fraser, δημοσιεύουν στο *Nature* την απόδειξη ότι η μετατροπή της 25(OH)D3 σε έναν βιολογικά ισχυρά δραστικό μεταβολίτη, λαμβάνει χώρα στο νεφρό. Ο ισχυρά δραστικός αυτός μεταβολίτης δεν είναι άλλος παρά η 1α,25(OH)<sub>2</sub>D3 όπως αποδεικνύεται από την ομάδα του DeLuca το 1971. Την ίδια χρονιά επίσης, οι Fraser και Kodicek δημοσιεύουν στο *Nature* την ταυτοποίηση της 1,25-διυδροξυχοληκασιφερόλης, μιας νέας ορμόνης του νεφρού που ρυθμίζει τον μεταβολισμό του ασβεστίου. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η 25(OH)D3 μετατρέπεται στην ενεργό ορμονική μορφή της 1α,25-διυδροξυβιταμίνης D3 (1α,25(OH)<sub>2</sub>D3), με δεύτερη υδροξυλίωση της στην θέση 1 από το μιτοχονδριακό ένζυμο του κυτοχρώματος P450, 1α-υδροξυλάση (CYP27B1), κυρίως στους νεφρούς, στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Η σύνθεση της



1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> που ανευρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος, φαίνεται να συμβαίνει αποκλειστικά στους νεφρούς, διότι οι χρονίως πάσχοντες νεφροπαθείς εμφανίζουν χαμηλή δραστικότητα του ενζύμου 1α-υδροξυλάση και κατά συνέπεια, πολύ μειωμένα επίπεδα της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στον ορό. Ωστόσο το ένζυμο 1α-υδροξυλάση ανιχνεύεται και σε άλλους ιστούς όπως στον προστάτη, στον μαστό, στο ενδοθήλιο, στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού συστήματος και στα καρδιομυοκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει την δυνατότητα και «τοπικής» μετατροπής της 25(OH)D<sub>3</sub> σε 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.



Διαγραμματική αναπαράσταση του ενδοκρινικού συστήματος με βάση τη βιταμίνη D. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύουν ασβέστιο στους παραθυρεοειδείς και τα παραθυλακίωδη κύτταρα (γνωστά και ως C-κύτταρα) του θυρεοειδούς αδένου παρουσιάζονται ως θερμομότρο. Η ελαφρά υπασβεστιασμία προκαλεί έκκριση της PTH, ώστε το κυτόχρωμα CYP27B1 να υδροξυλιώσει την 25(OH)D<sub>3</sub> προς 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, που κατευθύνει την κινητοποίηση ασβεστίου στο έντερο, τους νεφρούς και τα οστά. Απεικονίζεται η ανάδρομη αναστολή της σύνθεσης και έκκρισης της PTH από την 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> και η αναστολή της οστικής απορρόφησης. (από DeLuca HF, History of the discovery of vitamin D and its active metabolites (Ref.1).

Στην συνέχεια το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ρύθμιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Ο Ian Boyle από την ομάδα του DeLuca αποδεικνύει ότι όταν η διαίτα είναι φτωχή σε ασβέστιο, τότε το ποσοστό μετατροπής της 25(OH)D<sub>3</sub> σε 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> είναι υψηλό, οδηγώντας σε πολύ υψηλά επίπεδα της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στο αίμα. Το αντίθετο συμβαίνει με διαίτα πλούσια σε ασβέστιο. Η σύνθεση της ενεργού μορφής της βιταμίνης D καταστέλλεται με αποτέλεσμα την παραγωγή χαμηλών επιπέδων 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στο αίμα. Ο

Garabedian από την ομάδα του DeLuca δείχνει το 1972, ότι η υπασβεστιαϊμία ανιχνεύεται από τους παραθυροειδείς αδένες με αποτέλεσμα αύξηση της παραθορμόνης (PTH) η οποία διεγείρει την 1α-υδροξυλάση στον νεφρό για την παραγωγή 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Όταν αφαίρεσε τους παραθυροειδείς, το ζώο ήταν ανίκανο να «αισθανθεί» την υπασβεστιαϊμία για να μπορέσει να συνθέσει 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ο ενδογενής παράγοντας του Nicolaysen αναγνωρίστηκε ως το σύστημα PTH/1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Από την ανακάλυψη της βιταμίνης D το 1922 μέχρι σήμερα, η γνώση μας πάνω στον κρίσιμο ρόλο της βιταμίνης D στην υγεία και στην ασθένεια συνεχώς επεκτείνεται. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η λειτουργία της ενεργού ορμονικής μορφής 1α,25(OH)<sub>2</sub>D, είτε προερχόμενη από τους νεφρούς είτε εξωνεφρικά, εκτός από την ρύθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου και του φωσφόρου και κατά συνέπεια του οστικού μεταβολισμού, περιλαμβάνει επιπλέον την κυτταρική διαφοροποίηση και αντιπροπλασιαστική δράση σε διάφορες κατηγορίες κυττάρων, όπως κύτταρα του μυελού των οστών, κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, επιθηλιακά κύτταρα δέρματος, μαστού και προστάτη, λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού συστήματος και καρδιομυοκύτταρα. Η 1α,25(OH)<sub>2</sub>D επιτυγχάνει αυτές τις δράσεις μέσω ενός μεταγραφικού μηχανισμού, ο οποίος ενεργοποιείται με την σύνδεση της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D στον υποδοχέα της (Vitamin D Receptor-VDR). Με αυτόν τον τρόπο, η ορμόνη 1α,25(OH)<sub>2</sub>D ρυθμίζει άμεσα την γονιδιακή έκφραση μίας πληθώρας γονιδίων, που εξαρτώνται από την βιταμίνη D, στα κύτταρα-στόχους της. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του VDR μέσω σύνδεσης του με την 1α,25(OH)<sub>2</sub>D, ρυθμίζει περίπου το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες, όσον αφορά στην επάρκεια της βιταμίνης D στο γενικό πληθυσμό, δείχνουν ότι περίπου το 50% των ενηλίκων παγκοσμίως είναι είτε σε ανεπάρκεια, είτε σε έλλειψη. Το γεγονός αυτό φαίνεται να έχει σημαντική επίπτωση, όχι μόνο στην παθοφυσιολογία των μυοσκελετικών ασθενειών αλλά και σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι λοιμώξεις και η καρδιαγγειακή νόσος.

### Ενδεικτική Βιβλιογραφία

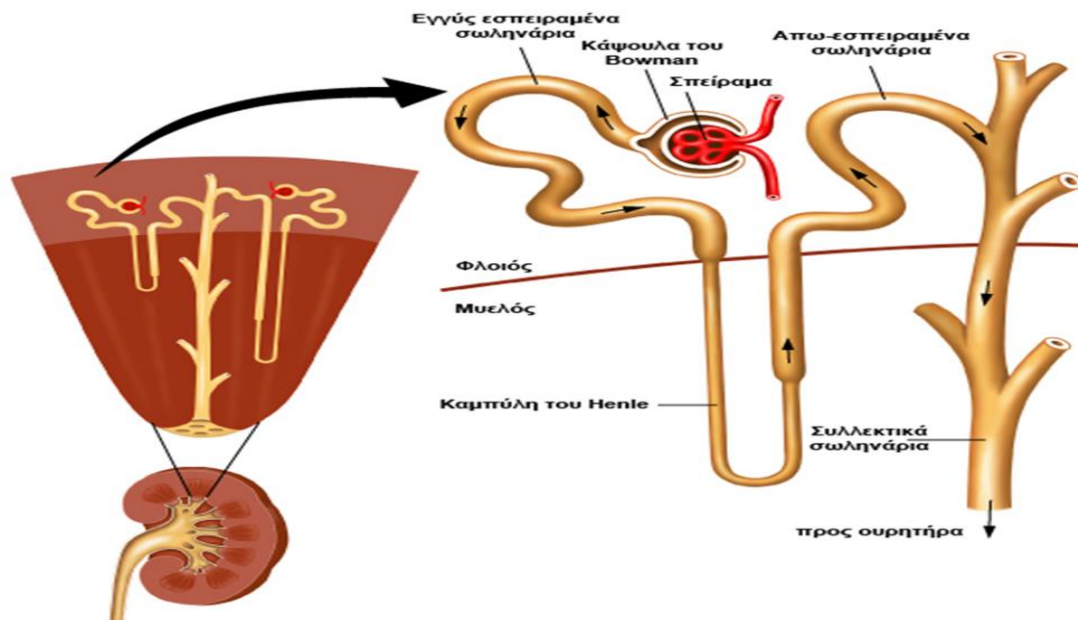
1. Hector F. DeLuca. Review History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep.* 2014; 3: 479
2. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293-298.
3. Steenbock H, Black A. Fat-soluble vitamins. XXIII. The induction of growth-promoting and calcifying properties in fats and their unsaponifiable constituents by exposure to light. *J Biol Chem* 1925;64:263-298.
4. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub>. *Biochemistry* 1968;7:3317-3322.
5. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Suda T, Cousins RJ. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry* 1971;10:2799-2804.
6. Ponchon G, Kennan AL, DeLuca HF. Activation of vitamin D by the liver. *J Clin Invest* 1969;48:2032-2037.
7. Garabedian M, Holick MF, DeLuca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1673-1676.

# ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΙΚΑΛΣΙΤΟΛΗΣ ΣΕ ΝΕΦΡΙΚΑ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Λάβδα Κασσάνδρα<sup>1</sup>, Δροσσοπούλου Γαρυφαλιά<sup>2</sup>

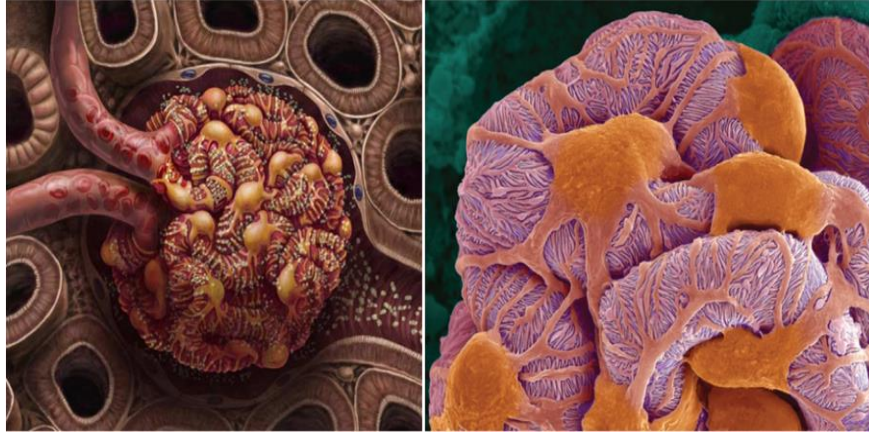
1: Προπτυχιακή φοιτήτρια τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ, 2: Διδάκτωρ, ερευνήτρια Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

## Ο ΝΕΦΡΟΣ ΚΑΙ ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΤΟΥ ΔΟΜΕΣ



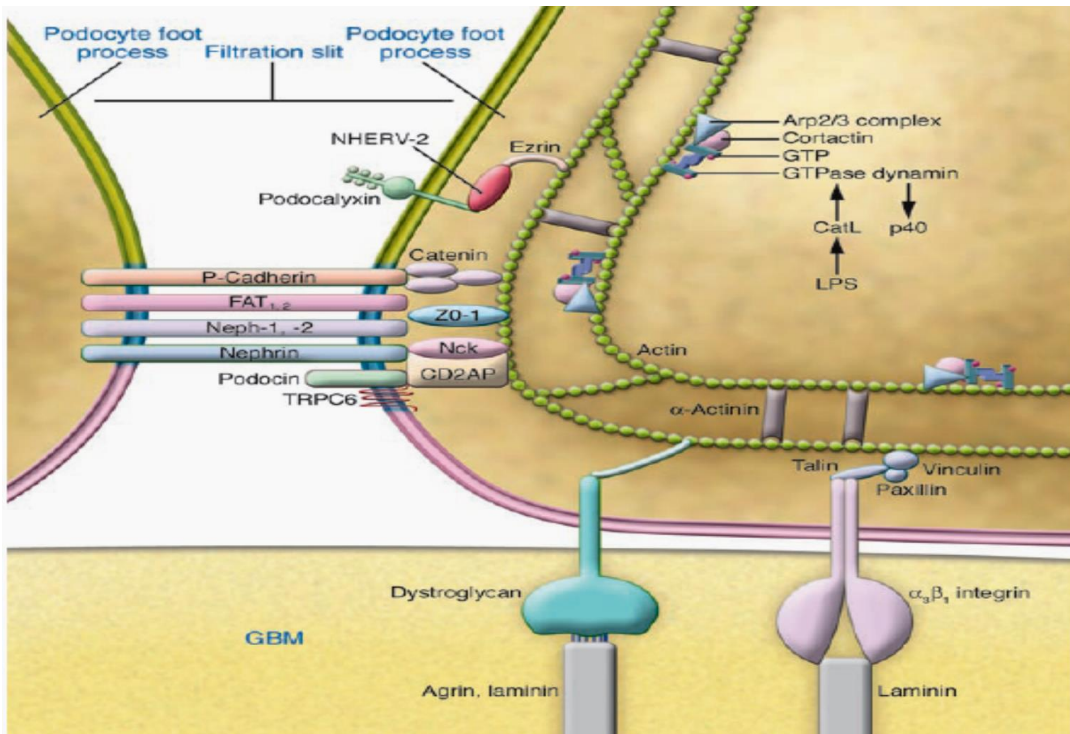
Κάθε νεφρός αποτελείται από το φλοιό εξωτερικά και το μυελό εσωτερικά. Ο νεφρός περιλαμβάνει τους νεφρώνες, οι οποίοι αποτελούν τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα του. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωματίο, από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, από την καμπύλη του Henle, από το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και από το σύστημα των συλλεκτικών σωληναρίων. Το νεφρικό σωματίο σχηματίζεται από το σπείραμα, το οποίο είναι ένα σύνολο από τριχοειδή αγγεία και από την κάψα του Bowman. Στο νεφρικό σωματίο γίνεται το πρώτο βήμα της διήθησης του πλάσματος του αίματος. Το πρώτο στάδιο παραγωγής των ούρων αρχίζει με την διήθηση του πλάσματος δια μέσου των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος. Το σπείραμα σχηματίζεται από ένα δίκτυο τριχοειδών αγγείων, που περιβάλλονται από την κάψα του Bowman. Κομβικά κύτταρα στη λειτουργία του σπειράματος είναι τα ποδοκύτταρα.

## ΣΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΙ ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΑ



Τα ποδοκύτταρα είναι επιθηλιακά κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, χωρίς όμως ικανότητα πολλαπλασιασμού. Εμφανίζουν επιθηλιακά και περιορισμένα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και έχουν ογκώδες σφαιρικό κυτταρικό σώμα, από το οποίο εκτείνονται μακρές κυτταροπλασματικές προεκβολές, οι λεγόμενες πρωτογενείς ποδοειδείς προεκβολές, προς τα τριχοειδή αγγεία, στα οποία προσφύονται με δευτερογενείς προεκβολές (ποδίσκους). Οι ποδίσκοι καλύπτουν τη βασική μεμβράνη με τη μορφή συμπλεκόμενων δακτύλων, που διαχωρίζονται από ανοίγματα που ονομάζονται σχισμές διήθησης. Οι σχισμές διήθησης αποτρέπουν τη διήθηση ορισμένων σημαντικών πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων. Οποιαδήποτε διαταραχή στη δομή των σχισμών διήθησης καθιστά το σπείραμα μη λειτουργικό.

### Δομή των σχισμών διήθησης



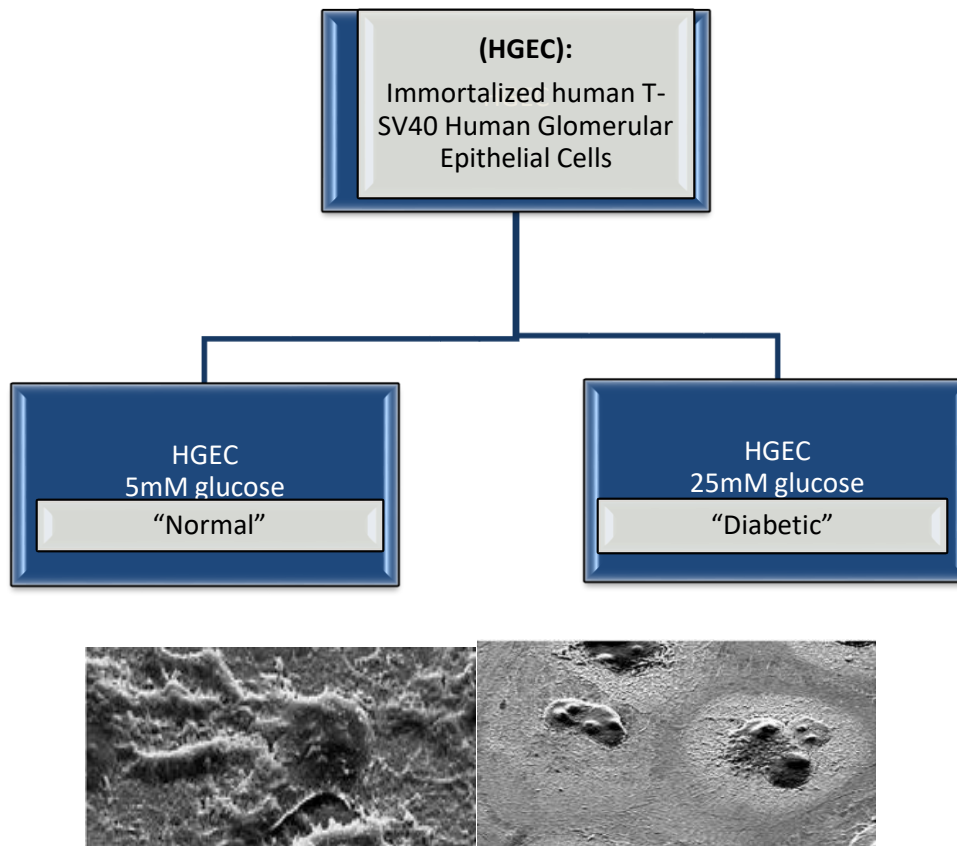
Οι σχισμές διήθησης αποτελούνται από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που βρίσκεται στην επιφάνεια των ποδοειδών προεκβολών. Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες νεφρίνη, ποδοκίνη, την ενδοκυττάρια

CD2AP(CD2-Associated Protein), καθώς και άλλες όπως η Neph1, η P-καδερίνη και η ZO-1 (Zonula occludens-1). Ο αριθμός των μορίων που φαίνεται ότι συμμετέχουν σε αυτό το σύμπλοκο συνεχώς αυξάνει. Απώλεια των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων και πρωτεϊνουρία. Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής του ποδοκυττάρου και της σχισμής διήθησης φαίνεται ότι παίζει η ποδοκαλυκίνη.

## DDR1

Ο DDR1 προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων Discoidin Domain Receptor-1 (υποδοχέας τομέα δισκοϊδίνης-1). Είναι ένας υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (Tyrosine Kinase Receptors, RTKs) και οι πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας μελετώνται στις μέρες μας ως πιθανοί ρυθμιστές της νεφρικής βλάβης. Ο DDR1 είναι πιθανός μεσολαβητής βλάβης σε διάφορες ασθένειες και παίζει σημαντικό ρόλο στο ξεκίνημα και την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης, ανεξάρτητα από την κύρια αιτία της. Ο DDR1 έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεσολαβώντας για τον πολλαπλασιασμό και τη μεταστατική διαδικασία. Είναι ένας δείκτης πρόγνωσης και συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου.

### Human Glomerular Epithelial Cells (HGEC): «Ποδοκύτταρα»



Προκειμένου να μελετήσουμε τη ρύθμιση της σύνθεσης των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιούμε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης. Το σύστημα μελέτης μας είναι μια κυτταρική σειρά αθανатоποιημένων ανθρώπινων ποδοκυττάρων, τα οποία καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και εκφράζουν όλους τους ποδοκυτταρικούς δείκτες. Επίσης τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται και σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, ώστε να προσομοιάζουν διαβητικές καταστάσεις. Η καλλιέργεια των ποδοκυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης αποτελεί ένα *in vitro* μοντέλο ποδοκυτοπάθειας.

Μετά την έκθεση των ποδοκυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης μειώνεται προοδευτικά η έκφραση σημαντικών πρωτεϊνών – δεικτών του φαινοτύπου των ποδοκυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα

επίπεδα της νεφρίνης μειώνονται σημαντικά σε HGEC (Human Glomerular Epithelial Cells), τα οποία έχουν εκτεθεί σε υψηλή γλυκόζη για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

## ΣΤΟΧΟΙ

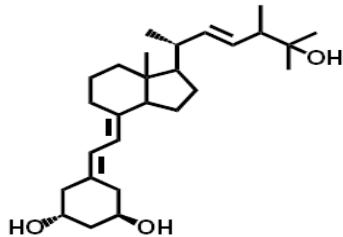
Η πιθανή αδυναμία αποκατάστασης των φυσιολογικών επιπέδων της νεφρίνης οφείλεται σε αποδιαφοροποίηση των ποδοκυττάρων και στόχος είναι η πυροδότηση της επαναδιαφοροποίησής τους. Η επίτευξη του στόχου αυτού θα μπορούσε να αποτελέσει μια προληπτική/θεραπευτική προσέγγιση της διαβητικής νεφροπάθειας.

## Η βιταμίνη D<sub>3</sub>

Η βιταμίνη D<sub>3</sub> συντίθεται στην επιδερμίδα μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας ή λαμβάνεται μέσω της διατροφής και κατόπιν αποθηκεύεται στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό. Το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης της είναι η 25-υδροξυλίωση η οποία καταλύεται από την 25-υδροξυλάση και γίνεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Η πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D<sub>3</sub> μεταφέρει την 25(OH)D<sub>3</sub> από το ήπαρ στους νεφρούς. Η ενεργοποίηση ολοκληρώνεται κυρίως στα κύτταρα του νεφρού μέσω της 1α-υδροξυλάσης, η οποία παράγει την ενεργή ορμόνη, 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Η 1α,25-διυδροξυ-βιταμίνη D<sub>3</sub> στους νεφρούς ρυθμίζει την επαναρόφηση του ασβεστίου στα άπω και εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια και αναστέλλει την παραγωγή της ρενίνης ρυθμίζοντας έτσι την αρτηριακή πίεση .

Επιπλέον, διάφορες μελέτες με πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ασκεί νεφροπροστατευτική δράση σε διάφορες χρόνιες παθήσεις των νεφρών προστατεύοντας τα ποδοκύτταρα και προλαμβάνοντας την πρωτεϊνουρία.

## Βιταμίνη D<sub>3</sub> και ανάλογα



Παρικαλιτόλη

1α,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>

Έχουν συντεθεί διάφορα ανάλογα της βιταμίνης D με λιγότερες παρενέργειες. Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δραστική μορφή της βιταμίνης D, η καλσιτριόλη, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> και το ανάλογό της, η παρικαλιτόλη, 1α,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>.

Επί μακρόν, σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ο δευτεροπαθής υπερπαραθυροειδισμός αντιμετωπιζόταν με 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ωστόσο η ασβεσταϊμική δράση της συχνά προκαλούσε υπερασβεσταϊμία. Από τότε αναπτύχθηκαν αρκετά ανάλογα της βιταμίνης D, όπως π.χ. η 1α,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>.

## Ο υποδοχέας της βιταμίνης D<sub>3</sub> (VDR)

Η βιταμίνη D δρα μέσω του υποδοχέα της, ο οποίος διμερίζεται με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος RXR (Retinoid X Receptor) και μαζί επάγουν την έκφραση γονιδίων.

## Σκοπός

Οι αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των ποδοκυττάρων συνδέονται στενά με την αύξηση της πρωτεϊνουρίας σε διάφορες νεφρικές διαταραχές, περιλαμβανομένης της διαβητικής νεφροπάθειας. Σκοπός της διπλωματικής ήταν η

διερεύνηση μοριακών μηχανισμών της νεφροπροστατευτικής δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης in vitro και ex vivo αναλύοντας τις μεταβολές των επιπέδων έκφρασης της νεφρίνης και του DDR1.

Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσον η καλσιτριόλη και το ανάλογό της εξασκούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα τους, VDR (Vitamin D Receptor), μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του VDR στις ανωτέρω συνθήκες .

Το σύστημα μελέτης μας, εκτός από τα σπειράματα αρουραίων, αποτελείται από μια κυτταρική σειρά ανθρώπινων ποδοκυττάρων, τα οποία καλλιεργούνται σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και εκφράζουν όλους τους ποδοκυτταρικούς δείκτες. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται και σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, ώστε να προσομοιάζουν διαβητικές καταστάσεις, όπου εμφανίζουν μειωμένη νεφρίνη. Τα κύτταρα αυτά εκτέθηκαν σε καλσιτριόλη και παρικαλσιτόλη.

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι ονομαστικά οι ακόλουθες:

- Απόψυξη κυττάρων
- Καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών
- Διατήρηση-ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών
- Απομόνωση σπειραμάτων από αρουραίους
- Καλλιέργεια σπειραμάτων
- Απομόνωση πρωτεϊνών
- Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (δοκιμή Bradford)
- Ανάλυση κατά Western (Western blotting):

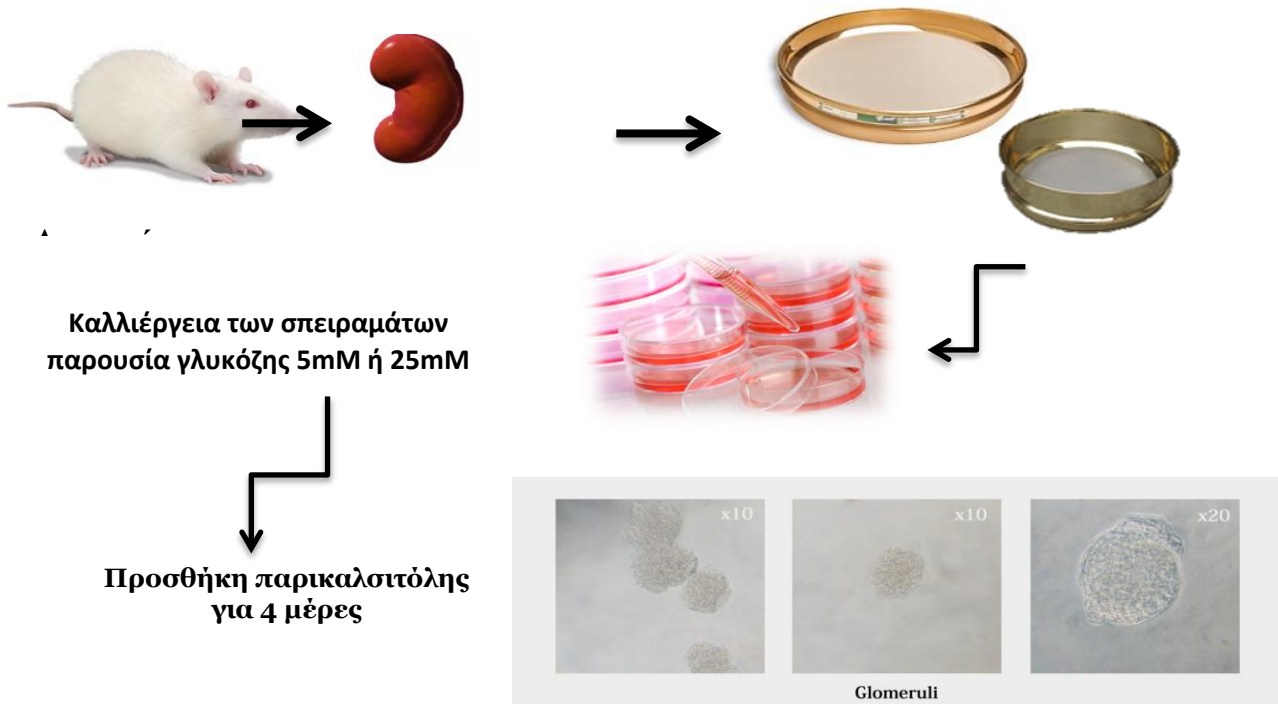
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης

Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών με τη χρήση της χημειοφωταύγειας.

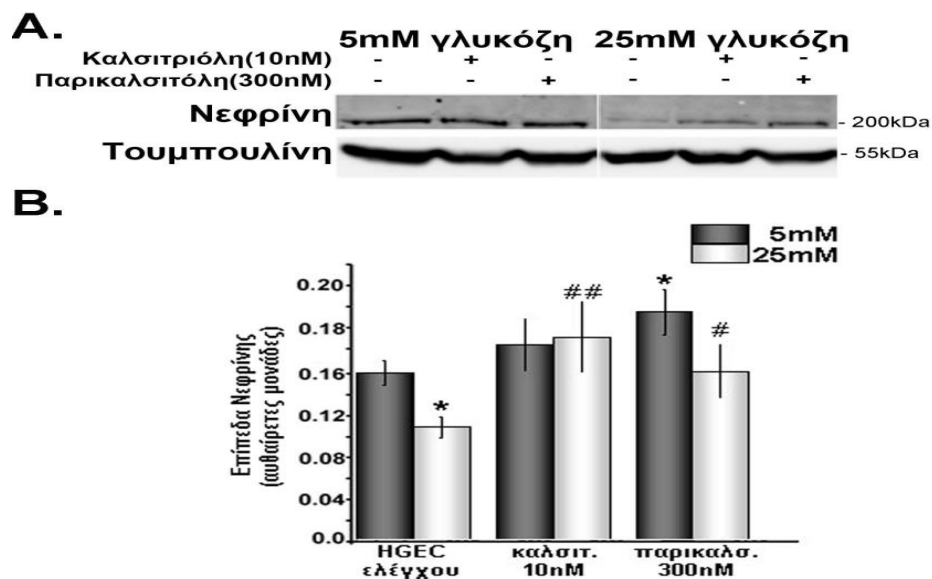
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων κατά την Western, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανοσοαποτυπώνεται με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης, η οποία είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού και αποτελεί την σταθερή ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα δείγματα που αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση.

- Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

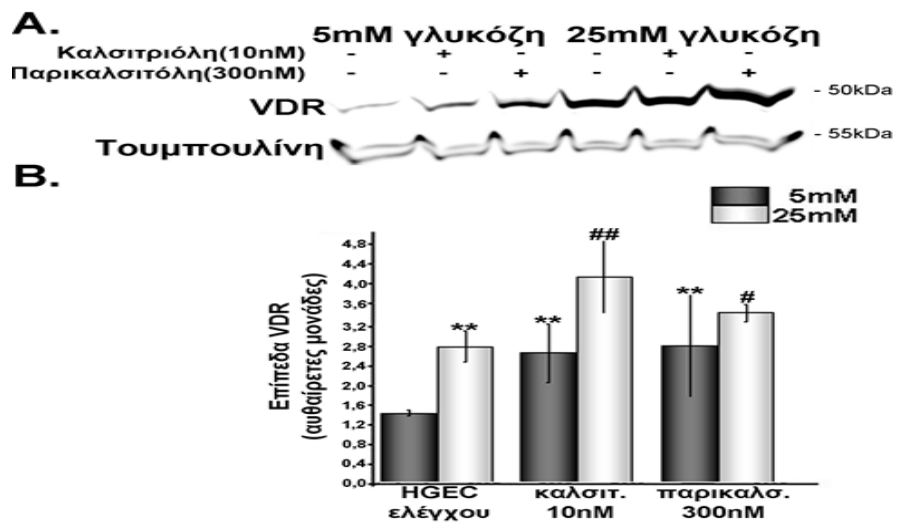
Δράση καλιτριόλης και παρακαλιτόλης στα ολικά επίπεδα έκφρασης της Νεφρίνης



Σχήμα 1: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της νεφρίνης και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης της Νεφρίνης (B) (\* $p < 0,05$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,005$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).

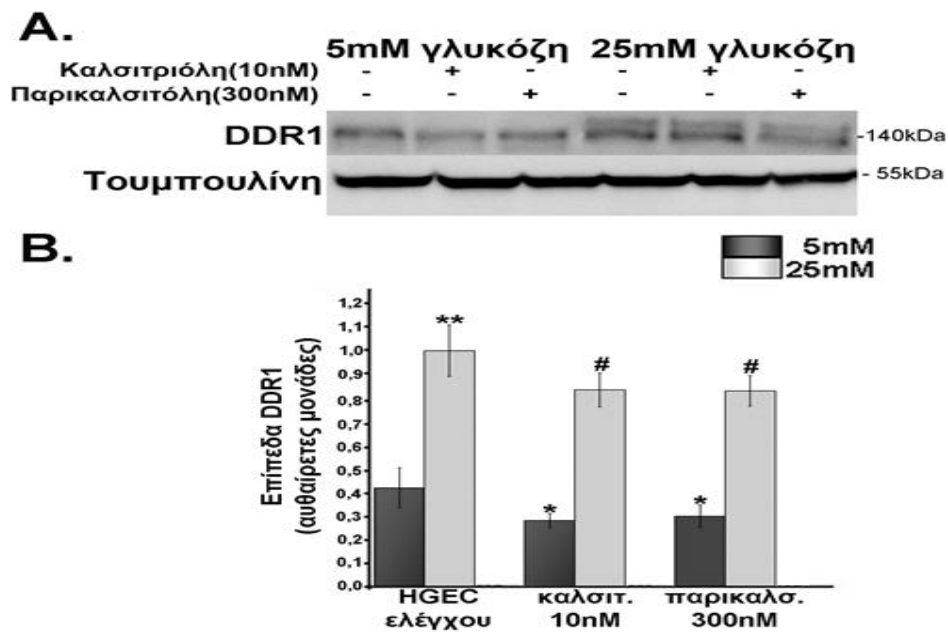


Δράση καλσιτριόλης και παρικαλιτόλης στα ολικά επίπεδα έκφρασης του VDR

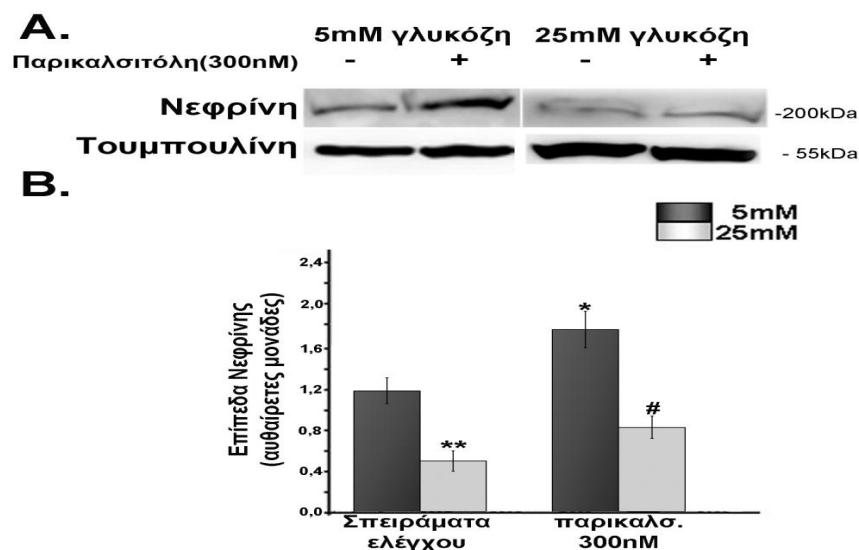


Σχήμα 2: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του VDR και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης του VDR (B) (\* $p < 0,05$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,005$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).

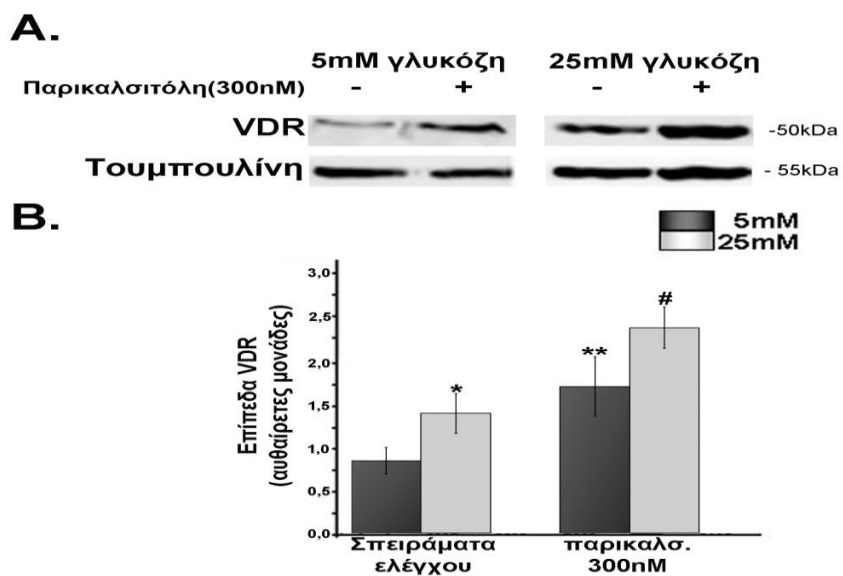
Δράση καλσιτριόλης και παρικαλιτόλης στα ολικά επίπεδα έκφρασης του DDR1



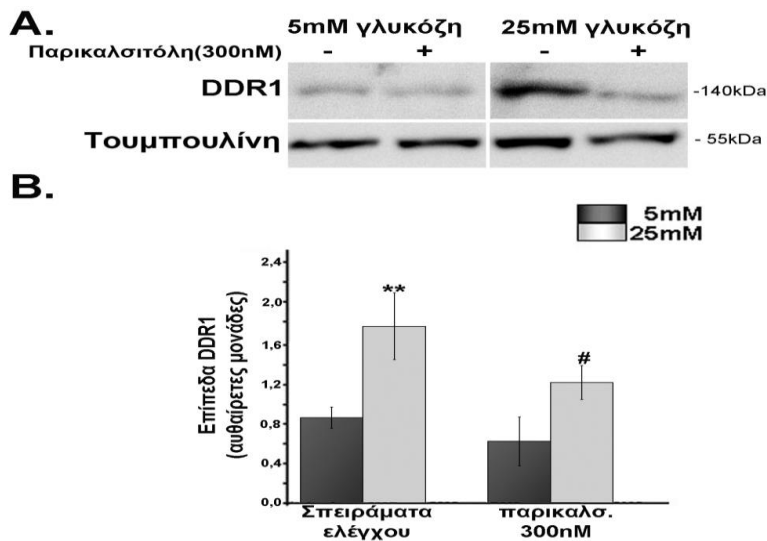
Σχήμα 3: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του DDR1 και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης του DDR1 (B) (\* $p < 0,05$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,005$ : σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).



Σχήμα 4: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western της νεφρίνης και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης της Νεφρίνης (B) (\* $p < 0,05$ : σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,005$ : σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).



Σχήμα 5: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του VDR και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης του VDR (B) (\* $p < 0,05$ : σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,005$ : σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).



Σχήμα 6: Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα κατά Western του DDR1 και της τουμπουλίνης (A) και επίπεδα έκφρασης του DDR1 (B) (\*\* $p < 0,005$ : σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 5mM γλυκόζη, # $p < 0,05$  σύγκριση με τα σπειράματα αναφοράς σε 25mM γλυκόζη).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιβεβαιώθηκε η έκφραση του VDR σε ανθρώπινα ποδοκύτταρα *in vitro* και *ex vivo* σε σπειράματα, που απομονώθηκαν από αρουραίους.

Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα της βιταμίνης D<sub>3</sub> στα κύτταρα HGEC και στα σπειράματα, μετά την καλλιέργειά τους σε διαβητικά επίπεδα γλυκόζης χωρίς την παρουσία διεγέρτη, σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν το ίδιο χρονικό διάστημα των τεσσάρων ημερών, σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και πάλι, απουσία διεγέρτη.

Μετά την επώαση με καλσιτριόλη ή παρικαλσιτόλη τα επίπεδα έκφρασης του VDR παρουσίασαν περαιτέρω αύξηση, τόσο παρουσία φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης, όσο και υψηλών (διαβητικών) επιπέδων γλυκόζης.

Η καλσιτριόλη και η παρικαλσιτόλη επανέφεραν την έκφραση της νεφρίνης σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα, που παρατηρήθηκαν σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης. Ενώ στα σπειράματα, για τα οποία μελετήθηκε η επίδραση μόνο της παρικαλσιτόλης, τα επίπεδα της νεφρίνης παρατηρήθηκε επίσης ότι επανέρχονται σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα, που παρατηρήθηκαν σε φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης.

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η βιταμίνη D<sub>3</sub> έχει την ικανότητα να αποτρέπει τη βλαπτική δράση του DDR1 τόσο *in vitro* (στα HGEC), όσο και *ex vivo* (σε απομονωμένα σπειράματα αρουραίων, προσομοιάζοντας έτσι τις συνθήκες που θα υπήρχαν σε ζωντανό οργανισμό).

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Μελέτη της δράσης της καλσιτριόλης και της παρικαλσιτόλης σε μοντέλα διαβητικών ζώων *in vivo*.

Διερεύνηση της πιθανότητας ο μεταγραφικός παράγοντας VDR να ελέγχει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως η νεφρίνη, αλλά και άλλες σημαντικές πρωτεΐνες όπως η PCLP και η podocin.

Ανάλυση του μονοπατιού σηματοδότησης του υποδοχέα DDR1.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jamie S. Lin, and Katalin Susztak: Podocytes: The Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep.* 2016 May; 16(5): 45.
2. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
3. Welsh GI, Saleem MA: The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:14-21.
4. Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, Tournal F, Ikehata M, Li M, Berra S, Carraro M, Messa P, and Rastaldi MP: Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1929-1940.
5. Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR: Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999;56:1481-1491.
6. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez-Solis R, Zambrowicz BP, Powell DR: Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking neph1, a novel protein with homology to nephrin. *Mol Cell Biol* 2001;21:4829-4836.
7. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH: Cd2ap is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F785-792.
8. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:288-296.
9. Levey AS, Coresh J: Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379:165-180.
10. Reddy GR, Kotlyarevska K, Ransom RF, Menon RK: The podocyte and diabetes mellitus: Is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:32-36.
11. Drossopoulou GI, Tsoதாக NE, Tsilibary EC: Impaired transcription factor interplay in addition to advanced glycation end products suppress podocalyxin expression in high glucose-treated human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F594-60.
12. Venieratos PD., Drossopoulou GI., Kapodistria KD., Tsilibary EC. and Kitsiou PV. "High glucose induces suppression of insulin signalling and apoptosis via upregulation of endogenous IL-1 $\beta$  and suppressor of cytokine signalling-1 in mouse pancreatic beta cells". *Cell Signal.* 2010;22(5): 791-800.
13. Tsoதாக NE, Sagnou M, Kotsopoulou ES, Tsilibary EC, Drossopoulou GI. "Glucose-induced gradual phenotypic modulation of cultured human glomerular epithelial cells may be independent of Wilms' tumor 1 (WT1)." (2013) *BMC Cell Biol.* 14(1):28.
14. Wang Y, Borchert ML, Deluca HF: Identification of the vitamin d receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012.

*Το παρόν άρθρο αποτελεί περίληψη της διπλωματικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια συνεργασίας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της ερευνήτριας Δόκτορος Δροσσοπούλου Γαρυφαλιάς. Η πλήρης βιβλιογραφία βρίσκεται στην διπλωματική, που έχει αναρτηθεί στο διαδικτυακό ιδρυματικό αποθετήριο του ΕΚΠΑ «Πέργαμος».*

## Τα βραβεία του AthensEuroMedLab 2017

Η βράβευση διακεκριμένων επιστημόνων, είναι παράδοση στη διάρκεια των Euromedlab. Κοινό χαρακτηριστικό όσων βραβεύτηκαν την προηγούμενη χρονιά, είναι η εξαιρετική δουλειά τους που αφιερώνεται στην επιστήμη και το κλινικό εργαστήριο.

Το 9ο βραβείο της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (EFLM, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) – Roche έλαβε ο Καθ. Callum G. Fraser (τμήμα Ογκολογίας, Νοσοκομείο Ninewells, Ιατρική Σχολή Ninewells, Dundee, Σκωτία) για τη συμβολή του στη μελέτη της βιολογικής διακύμανσης.



Βραβείο



Roche

Καθ. **Callum G. Fraser**, Κέντρο Έρευνας για την πρόληψη και τον έλεγχο του καρκίνου (Centre for Research into Cancer Prevention and Screening, CRiPS) στο τμήμα Ογκολογίας, Νοσοκομείο Ninewells, Ιατρική Σχολή Ninewells, Dundee, Σκωτία.

Το ειδικό βραβείο της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας – Κλινικής Βιοχημείας (GSCC-CB) για τη σημαντική συμβολή της στη Βαλκανική Ομοσπονδία Κλινικών Εργαστηρίων (Balkan Clinical Laboratory Federation, BCLF) από την ίδρυση της BCLF μέχρι σήμερα, έλαβε η Καθ. Nada Majkić-Singh (Φαρμακευτική Σχολή του Πανεπιστημίου του Βελιγραδίου).



Βραβείο



Καθ. **Nada Majkić-Singh**, Ινστιτούτο Ιατρικής Βιοχημείας στο Κλινικό Κέντρο Σερβίας και Πανεπιστήμιο του Βελιγραδίου, Σερβία.

Το 4ο βραβείο της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (EFLM, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) - Abbott Diagnostics δόθηκε στον Ελβετό Καθ. Andreas R. Huber, για το άρθρο του για τους βιοδείκτες από ποικίλες βιολογικές οδούς, που βελτιώνουν την πρώιμη διαστρωμάτωση κινδύνου σε ασθενείς στα επείγοντα: η πολυεθνική, προοπτική, μελέτη παρατήρησης TRIAGE CrossMark, για τον καθορισμό της προτεραιότητας των ασθενών βάσει της σοβαρότητας της κατάστασής τους [“Biomarkers from distinct biological pathways improve early risk stratification in medical emergency patients: the multinational, prospective, observational TRIAGE study CrossMark”].



Βραβείο



Abbott

Καθ. **Andreas R. Huber** Kantonsspital Aarau, Ινστιτούτο Εργαστηριακής Ιατρικής, Aarau, καντόνι Aargau στη Β. Ελβετία.

Η European Ligand Assay Society, ELAS-forum απένειμε το βραβείο καρκινικών δεικτών στον Καθ. Jaume Trapé για το άρθρο του: σχετικά με την αξιολόγηση των καρκινικών δεικτών στο ασκτικό υγρό: “Evaluation of two strategies for the interpretation of tumor markers in ascitic fluid”.



Βραβείο



Καθ. **Jaume Trapé**, Εργαστηριακή Ιατρική, Σχολή Επιστημών Υγείας, Althaia Xarxa Asistencial Universitària de Manresa, Καταλονία.

Το 1ο βραβείο της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (EFLM, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) EFLM - HyTest καρδιαγγειακών δεικτών έλαβε ο Δρ.

Thomas Kaier για την αξιολόγηση επιστημονική εργασία στον τομέα των καρδιαγγειακών παθήσεων για το άρθρο του για την απελευθέρωση βιολογικών δεικτών μυοκαρδιακής νέκρωσης από καρδιακά μυοκύτταρα και το άθικτο μυοκάρδιο “Quantifying the Release of Biomarkers of Myocardial Necrosis from Cardiac Myocytes and Intact Myocardium”.



Βραβείο



Δρ. **Thomas Kaier**, The Rayne Institute, St Thomas’ Hospital, Λονδίνο.

Η European Ligand Assay Society, ELAS-forum απένευσε το βραβείο Ενδοκρινολογίας στην Δρ. Caroline Le Goff για το άρθρο της σχετικά με τον καθορισμό τιμών αναφοράς για έξι στεροειδή στον ορό με υγρή χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας: “Establishment of reference values for six steroids in serum by LC-MS/MS”.



Βραβείο



Δρ. **Caroline Le Goff**, Τμήμα Κλινικής Χημείας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Liège, Center for Interdisciplinary research on Medicines (CIRM), Βέλγιο.

#### Πηγές:

- AthensEuroMedLab News, June 2017,
  - AthensEuroMedLab 2017, Daily News, 1.
-

## Προσεχή Συνέδρια

18 - 21 Απριλίου 2018



15th Arab Conference of Clinical Biology and Laboratory Medicine

Ραμάλα, Παλαιστίνη

2-4 Ιουλίου 2018



[http://ifccorg.hosting.insoft.dk/media/476771/flyer\\_nov-2017.pdf](http://ifccorg.hosting.insoft.dk/media/476771/flyer_nov-2017.pdf)

1st IFCC, EFLM, AFCB Conference  
"Laboratory Medicine: Meeting the needs of Mediterranean Nations"

Ρώμη, Ιταλία

9-12 Μαΐου 2018

9th Congress of the Croatian Society of Medical Biochemistry & Laboratory Medicine

Ζάγκρεμπ, Κροατία

9-12 Μαΐου 2018

2nd Congress of Romanian Association of Laboratory Medicine

Βουκουρέστι, Ρουμανία

23-25 Μαΐου 2018

14th EFLM Symposium for Balkan Region και

21st Serbian Congress of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine with international participations

Βελιγράδι, Σερβία



## Τα διαπιστευτήρια της σιωπής

Διάβασα πάλι όλα μου τα ποιήματα που έχω γράψει για σένα.

Τόσα πολλά λόγια

και τόσα λίγα τα ειπωμένα, τόσα στο βάθος τ' ανείπωτα.

Όμως εσύ που μπορείς να διαβάσεις

τους άγραφους νόμους του μέσα μου σύμπαντος

εσύ που έχεις ακούσει το μοναχικό τριζόνι της νύχτας,

που είδες το αόρατο φέγγος μιας τρομερής αποκάλυψης,

εσύ, προπάντων εσύ, που συνεχίζεις ν' ανθίζεις

πάνω στο μαύρο χιόνι που απλώνεται γύρω μου

μη βιαστείς να με κρίνεις, να κλείσεις τους δρόμους, να διαβάσεις λάθος το μήνυμα.

Κοίταξέ με μόνο στα μάτια,

μέτρησε τη βαθιά πληγή που ανοίγεται μέσα τους,

άκου τη σιωπή που κάνει να τρίζουν τα φύλλα στις αστροφεγγιές τους

κι όταν ημερέψεις το φόβο, που σαν το παγιδευμένο αγρίμι ουρλιάζει,

τότε θα καταλάβεις.

Θα δεις τι πόθοι ασφυκτιούν,

τι πάθος συντηρούν στις κρύπτες τους τα ζυγιασμένα λόγια.

Θανάσης Κωσταβάρας (Ανακασιά Βόλου 1927 – Αθήνα 2007).

"Wednesday Morning, 3 AM." The sound of silence by Simon and Garfunkel (1964).  
<https://www.youtube.com/watch?v=4zLfCnGVeL4>

