



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Β' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΥΠΟΟΥΡΙΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Θ. ΤΖΟΒΑΡΑΣ

ΙΑΤΡΟΣ - ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. ΤΖΟΒΑΡΑ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ: 22-10-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 489^α/4-2-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ελισάφ Μωυσής, Καθηγητής Παθολογίας

ΜΕΛΗ

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Χημείας, Τμήματος Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-2-2003

*«ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΥΠΟΟΥΡΙΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ
ΝΕΦΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΑ»*

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 668^α/13-10-2009

1. Ελισάφ Μωυσής, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Τσιάνος Επαμεινώνδας, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Βιοχημείας Χημικού Τμήματος Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Λυμπερόπουλος Ευάγγελος, Λέκτορας Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-11-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



*Στους γονείς μου
Θόδωρο & Αθηνά*

*Στη Γυναίκα μου
Όλγα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Απο τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον εμπνευστή της διδακτορικής μου διατριβής τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, τη συνεχή επίβλεψη της διατριβής, τις χρήσιμες υποδείξεις του, τη διδασκαλία του στην κατανόηση της λειτουργίας του νεφρικού σωληναρίου, τη διδασκαλία του στον επιστημονικό τρόπο σκέψης και τέλος τη διόρθωση του κειμένου.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού των ούρων αποτελεί μια μοντέρνα τεχνική αναγνώρισης σωληναριακής νεφρικής διαταραχής στη οποία στηρίχθηκε η διδακτορική διατριβή. Την γνωριμία μου με τον κόσμο της φασματοσκοπίας και της μεταβιομικής την οφείλω στην κ. Ελένη Μπαϊρακτάρη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, στην οποία οφείλω ευγνωμοσύνη για την συμπαράσταση της, την συμβολή της και για την πολύτιμη βοήθεια της. Ομοίως, θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Νίκο Ψυχογιό και την κ. Χριστίνα Κωσταρά για την πολύτιμη βοήθεια τους στη λήψη και αξιολόγηση των φασμάτων NMR.

Η βοήθεια του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού της Β' Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στη συλλογή των δειγμάτων ασθενείς που ελάμβαναν αμινογλυκοσίδες ήταν επίσης ανεκτίμητη και για αυτό το λόγο τους ευχαριστώ θερμά.

Η γονιδιακή ανάλυση έγινε στο τμήμα Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ευχαριστώ θερμά τον διευθυντή του τμήματος κ. Ιωάννη Γεωργίου Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και την κ. Ανθή Χαντζηκυριακίδου για την πολύτιμη βοήθεια τους που ήταν απαραίτητη για την ολοκλήρωση της διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</u>	17
1.1 Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης.....	18
1.2 Ο Νεφρός.....	21
1.2.1 Η λειτουργία του νεφρού.....	21
1.2.2 Το ουροφόρο σωληνάριο.....	24
1.2.3 Σωληναριακή λειτουργία.....	25
1.2.4 Αρχές μεταφοράς ουσιών στα νεφρικά σωληνάρια.....	28
1.2.5 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς.....	31
1.2.6 Σωληναριακές παθήσεις.....	37
1.3 Το ουρικό οξύ.....	39
1.3.1 Μεταβολισμός του ουρικού οξέος.....	39
1.3.2 Ημερήσια παραγωγή ουρικού οξέος.....	42
1.3.3 Φυσιολογικές τιμές του ουρικού οξέος στο αίμα.....	42
1.3.4 Νεφρική απέκκριση του ουρικού οξέος.....	43
1.3.5 Μηχανισμοί μεταφοράς του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο...	46
1.3.6 Νεότερα δεδομένα σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος....	49
1.3.7 Το ουρικό οξύ ως αντιοξειδωτική ουσία.....	51
1.3.8 Άνθρωπος και ουρικό οξύ.....	52
1.3.9 Υποουριχαιμία.....	53
1.3.10 Πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία.....	54
1.4 Νεφροτοξικά φάρμακα.....	58
1.4.1 Αμινογλυκοσίδες.....	59
1.4.2 Μηχανισμός δράσεως και αντιμικροβιακό φάσμα	59
1.4.3 Παρενέργειες των αμινογλυκοσιδών.....	61
1.4.4 Νεφροτοξικότητα από αμινογλυκοσίδες.....	61
1.4.5 Μηχανισμός νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών.....	62

1.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	66
1.5.1 Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	66
1.5.2. Δημιουργία σήματος NMR.....	69
1.5.2.1. Επίδραση παλμών.....	69
1.5.2.2.Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή.....	70
1.5.2.3. Μετασχηματισμός Fourier.....	71
1.5.2.4. Λόγος σήματος προς θόρυβο.....	71
1.5.3. Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR.....	72
1.5.3.1. Αριθμός σημάτων στο φάσμα NMR.....	73
1.5.3.2. Θέσεις των σημάτων στο φάσμα - Χημική μετατόπιση.....	73
1.5.3.3. Ένταση των σημάτων στο φάσμα NMR.....	76
1.5.3.4. Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling).....	76
1.6. Τεχνικές αναγνώρισης προτύπων	78
1.6.1. Η έννοια και η ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων.....	78
1.6.2. Προεπεξεργασία των δεδομένων	79
1.6.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών.....	80
1.6.4 Μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων.....	82
1.6.5 Ορθοκανονική διόρθωση σήματος.....	84
1.6.6 Αξιολόγηση των μοντέλων	86
1.7 Διερεύνηση της νεφρικής λειτουργίας με φασματοσκοπία	89
1.7.1 Μελέτες σε πειραματόζωα.....	89
1.7.2 Μελέτες σε ανθρώπους.....	95
1.8 Η έννοια της Μεταβονομικής (Metabonomics).....	98
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	<u>103</u>
2.1 Μελέτη φασματοσκοπίας ^1H NMR των ούρων σε άτομα με	
 πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία.....	104
2.1.1 Υλικό της μελέτης.....	104

2.1.2 Μεθοδολογία.....	104
2.1.2.1 Βιοχημικός έλεγχος.....	105
2.1.2.2 ¹ H NMR φασματοσκοπία.....	107
2.1.3 Στατιστική ανάλυση.....	109
2.1.4 Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων.....	109
2.2 Γονιδιακή μελέτη ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία.....	112
2.2.1 Υλικό της μελέτης.....	112
2.2.2 Μεθοδολογία.....	112
2.3 Μελέτη νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών	114
2.3.1 Υλικό της μελέτης.....	114
2.3.2 Μεθοδολογία.....	115
2.4 Αποτελέσματα.....	117
2.4.1 Μελέτη φασματοσκοπίας ¹H NMR των ούρων σε άτομα με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία.....	117
2.4.1.1 Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης	117
2.4.1.2 Το ¹ H-NMR φάσμα των ούρων.....	120
2.4.1.3 Μεταβονομική προσέγγιση.....	121
2.4.1.4 Ανάλυση αναγνώρισης προτύπων.....	121
2.4.1.5 Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων μεταβολιτών.....	129
2.4.1.6 Αξιολόγηση των μοντέλων.....	130
2.4.2 Γονιδιακή μελέτη ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία.....	133
2.4.3 Μελέτη νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών.....	136
2.5 Συζήτηση.....	143
2.6 Συμπεράσματα.....	160

2.7 Περίληψη.....	163
2.8 Summary.....	166
2.9 Βιβλιογραφία.....	169

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Το ανθρώπινο απεκκριτικό σύστημα.....	22
Σχήμα 2. Η σπειραματική μεμβράνη.....	23
Σχήμα 3. Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο.....	25
Σχήμα 4. Συστήματα μεταφοράς ουσιών διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών.....	31
Σχήμα 5. Συμμεταφορείς και αντιμεταφορείς.....	34
Σχήμα 6. Το ουρικό οξύ.....	39
Σχήμα 7. Ο μεταβολισμός του ουρικού οξέος.....	41
Σχήμα 8. Το μοντέλο τεσσάρων συστατικών μεταφοράς του ουρικού οξέος.....	45
Σχήμα 9. Μηχανισμοί μεταφοράς του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο.....	46
Σχήμα 10. Ο μεταφορέας του ουρικού οξέος URAT1.....	49
Σχήμα 11. Το γονίδιο SLC22A12 και η δευτερογενής δομή της πρωτεΐνης URAT1.....	55
Σχήμα 12. Αλλαγές στη δομή των εγγύς σωληναριακών κυττάρων κατά τη θεραπεία με αμινογλυκοσίδες.....	63
Σχήμα 13. Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών “μ” απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.....	67
Σχήμα 14. Μεταβάσεις μεταξύ δύο καταστάσεων που παρατηρούνται με την απορρόφηση ή εκπομπή κβαντικής ενέργειας.....	68
Σχήμα 15. Σχέση της θέσης του ανύσματος της μαγνήτισης με το σήμα συνάρτησης χρόνου και το σήμα συνάρτησης συχνότητας.....	71
Σχήμα 16. Φάσμα ^1H NMR αραιού διαλύματος αιθυλοβενζολίου με διαφορετικό αριθμό σαρώσεων.....	72
Σχήμα 17. Η κορυφή συντονισμού του ^1H του μεθυλίου ($-\text{CH}_2$) σε σύγκριση με την κορυφή συντονισμού του ^1H του λιγότερο θωρακισμένου πυρήνα ^1H μιας αρωματικής ομάδας (Ar).....	75
Σχήμα 18. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}$	77
Σχήμα 19. Σύζευξη πρωτονίων με μεγάλη διαφορά χημικών μετατοπίσεων.....	77

Σχήμα 20. Διαίρεση της αλειφατικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR βιολογικού δείγματος σε φασματικές περιοχές ίσου εύρους σε ppm.....	80
Σχήμα 21. Το PCA μοντέλο προσεγγίζει τη διακύμανση μεταξύ των δεδομένων.....	81
Σχήμα 22. Εφαρμογή της PLS-DA για τη δημιουργία στατιστικού μοντέλου.....	83
Σχήμα 23. Γράφημα συντεταγμένων και συντελεστών παλινδρόμησης.....	84
Σχήμα 24. Η γεωμετρική απεικόνιση των PLS-DA και OSC/PLS-DA μοντέλων.....	86
Σχήμα 25. Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA ασθενών ήπιας–σοβαρής νεφρικής βλάβης με τη διαδικασία εσωτερικής αξιολόγησης.....	88
Σχήμα 26. Γραφήματα συντεταγμένων μετά τη χορήγηση σε αρουραίους 2 διαφορετικών ομάδων νεφροτοξινών.....	92
Σχήμα 27. Μεταβονομική ανίχνευση της νεφροτοξικότητας.....	94
Σχήμα 28. Κατανομή των βιβλιογραφικών αναφορών την περίοδο 1998-2006 με πεδίο αναζήτησης τον όρο “metabolomics”.....	101
Σχήμα 29. Η πυραμίδα της ζωής.....	102
Σχήμα 30. Αντιπροσωπευτικά φάσματα ^1H NMR 500 MHz στα ούρα από ένα άτομο με ΠΝΥ και από ένα υγιές άτομο.....	120
Σχήμα 31. Γράφημα συντεταγμένων της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών.....	122
Σχήμα 32. Γραφήματα συντεταγμένων και διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης.....	125
Σχήμα 33. Μοντέλο με βάση το φύλο.....	127
Σχήμα 34 Μοντέλο νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών γυναικών.....	128
Σχήμα 35. Διαγράμματα ελέγχου αξιοπιστίας των μοντέλων νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών ατόμων με τη διαδικασία της εσωτερικής αξιολόγησης.....	132
Σχήμα 36. Διαγράμματα ελέγχου αξιοπιστίας των μοντέλων νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών ατόμων με τη διαδικασία της εξωτερικής αξιολόγησης.....	133
Σχήμα 37. Αναζήτηση της πρωτοδιάταξης των δειγμάτων και ανίχνευση του πολυμορφισμού $^{124}\text{T}>\text{C}$ μετά από την εφαρμογή SSCP	

και η ταυτοποίηση διαφορετικών SSCP patterns.....	135
Σχήμα 38. Αντιπροσωπευτικά φάσματα ^1H NMR 500 MHz στα ούρα από ένα ασθενή πριν την έναρξη της θεραπείας και μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη.....	142
Σχήμα 39. Το μοντέλο διαταραχής του εγγύς σωληναρίου σε ασθενείς με ΠΝΥ, όπως διαπιστώθηκε στη μελέτη μας.....	153
Σχήμα 40. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα που είναι ευαίσθητος στο $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ από τις αμινογλυκοσίδες.....	157
Σχήμα 41. Το μοντέλο διαταραχής της λειτουργίας του εγγύς σωληναρίου σε ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδη.....	159

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Γενετικά καθορισμένες σωληναριακές διαταραχές.....	36
Πίνακας 2. Παθήσεις των νεφρικών σωληναρίων.....	38
Πίνακας 3. Ουσίες που επηρεάζουν την απέκκριση του ουρικού οξέος.....	48
Πίνακας 4. Οι συχνότερες μεταλλάξεις του γονιδίου SLC22A12.....	56
Πίνακας 5. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	119
Πίνακας 6. Σύγκριση των παραμέτρων των τριών μοντέλων PLS-DA και OSC/PLS-DA που δημιουργήθηκαν στη μελέτη.....	123
Πίνακας 7. Διαφορές των συστατικών των ούρων σε υποουριχαιμικά και νορμοουριχαιμικά άτομα και συντελεστές παλινδρόμησης των PLS-DA and OSC/PLS-DA μοντέλων.....	124
Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβολιτών των ατόμων με ΠΝΥ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου.....	129
Πίνακας 9. Παράμετροι και ποσοστά ταξινόμησης μεταξύ νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών ατόμων που προέκυψαν από τις διαδικασίες εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης...	130
Πίνακας 10. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ατόμων με ΠΝΥ που πήραν μέρος στη γονιδιακή μελέτη.....	134
Πίνακας 11. Κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών.....	136
Πίνακας 12. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών.....	137
Πίνακας 13. Σύγκριση των βιοχημικών παραμέτρων του ορού και των ούρων των ασθενών πριν την έναρξη της θεραπείας με την 5 ^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.....	139
Πίνακας 14. Οι κλασματικές απεκκρίσεις των παραμέτρων που μετρήθηκαν μετά τη θεραπεία σε σύγκριση με τις κλασματικές απεκκρίσεις πριν την έναρξη της θεραπείας.....	140
Πίνακας 15. Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων μεταβολιτών του φάσματος των ούρων των ασθενών πριν την έναρξη της θεραπείας με την 5 ^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.....	141

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης

Η πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία (ΠΝΥ) είναι μια διαταραχή της ομοιόστασης του ουρικού οξέος, η οποία χαρακτηρίζεται από επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό μικρότερα από 2.5mg/dl και από αυξημένη κλασματική απέκκριση ουρικού οξέος στα ούρα (FEUA>10%). Τα άτομα με ΠΝΥ δεν έχουν συμπτώματα. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί περιστατικά οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μετά από άσκηση, καθώς και ουρολιθίασης. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η ΠΝΥ είναι αποτέλεσμα διαταραχής της σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων (κυρίως του γονιδίου SLC22A12) που κωδικοποιούν μεταφορείς του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο.

Αν και τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό μπορεί να συσχετίζονται με καταστάσεις γενικευμένης διαταραχής της λειτουργίας του εγγύς σωληναρίου, τα άτομα με ΠΝΥ, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν εκλεκτική διαταραχή του εγγύς νεφρικού σωληναρίου που αφορά την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος. Ωστόσο, η σωληναριακή λειτουργία σε αυτά τα άτομα δεν έχει εκτιμηθεί αναλυτικά. Την τελευταία 25ετία, η φασματοσκοπία NMR έχει αναδειχθεί ως μια από τις πλέον σημαντικές μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών και ιδιαίτερα των ούρων. Το σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι παρέχει ταυτόχρονα μια λεπτομερή απεικόνιση του συνόλου των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά. Η χρήση της μεταβονομικής, μιας σύγχρονης αναλυτικής τεχνικής, μπορεί να αποκαλύψει βιοχημικές διαταραχές στα ούρα σε άτομα με ΠΝΥ, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τη δυσλειτουργία του εγγύς σωληναρίου. Επίσης, δεν υπάρχουν δεδομένα όσον αφορά τις υπεύθυνες μεταλλάξεις που αφορούν το μεταφορέα του ουρικού οξέος σε Έλληνες με ΠΝΥ.

Οι νεφροί είναι τα όργανα, διαμέσου των οποίων απομακρύνονται από τον οργανισμό τα περισσότερα φάρμακα και οι μεταβολίτες τους. Είναι αναμενόμενο οι νεφροί να υφίστανται τις συνέπειες της τοξικής δράσης των φαρμάκων. Η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας που οφείλεται σε φάρμακα είναι αρκετά συχνή και μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση της

νοσηρότητας, ενώ είναι δυνατόν εύκολα να διαφύγει της προσοχής. Τα φάρμακα μπορούν να οδηγήσουν σε νεφρική δυσλειτουργία με διάφορους μηχανισμούς. Η καλύτερη πρόληψη της νεφροπάθειας από φάρμακα είναι η αποφυγή των δυνητικά νεφροτοξικών φαρμάκων, ιδιαίτερα σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις η χορήγηση νεφροτοξικών φαρμάκων κρίνεται απαραίτητη αφού συχνά δεν υπάρχουν εναλλακτικές λύσεις.

Οι αμινογλυκοσίδες σε συνδυασμό με τις β-λακτάμες θεωρούνται απαραίτητα φάρμακα για την αντιμετώπιση νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια και κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους και ουδετεροπενικούς ασθενείς. Στους νοσηλευόμενους ασθενείς, οι αμινογλυκοσίδες είναι το συχνότερο αίτιο νεφροτοξικότητας από φάρμακα. Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια από αμινογλυκοσίδες είναι συνήθως αναστρέψιμη μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιστατικά μόνιμης νεφρικής βλάβης που συσχετίζεται με τη χορήγηση αμινογλυκοσιδών. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η αναγνώριση της πρώιμης νεφρικής βλάβης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

- 1) η εκτίμηση της σωληναριακής λειτουργίας ατόμων με ΠΝΥ
- 2) η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου SLC22A12 που είναι υπεύθυνες για τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος σε Έλληνες με ΠΝΥ
- 3) η εκτίμηση της χρησιμότητας της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για την ανεύρεση πρώιμων μεταβολών της σύστασης των ούρων σε ασθενείς που λαμβάνουν αμινογλυκοσίδες, καθώς και την ανίχνευση συνύπαρξης άλλων ηλεκτρολυτικών διαταραχών σε αυτούς τους ασθενείς.

Για αυτό το σκοπό έγινε πλήρης βιοχημικός έλεγχος του ορού και των ούρων ατόμων με ΠΝΥ. Επίσης, καταγράφηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR το μεταβολικό προφίλ των ούρων ατόμων με ΠΝΥ, επεξεργάστηκε με τεχνικές

αναγνώρισης προτύπων και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου).

Επίσης, ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις του γονιδίου SLC22A12 σε μια υποομάδα ατόμων με ΠΝΥ, κατά μήκος των 10 εξωνίων του.

Τέλος, μελετήθηκαν ασθενείς που εισήχθησαν στην παθολογική κλινική του Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων και έλαβαν αμινογλυκοσίδη για την ανεύρεση πρώιμων δεικτών σωληναριακής βλάβης, με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού των ούρων.

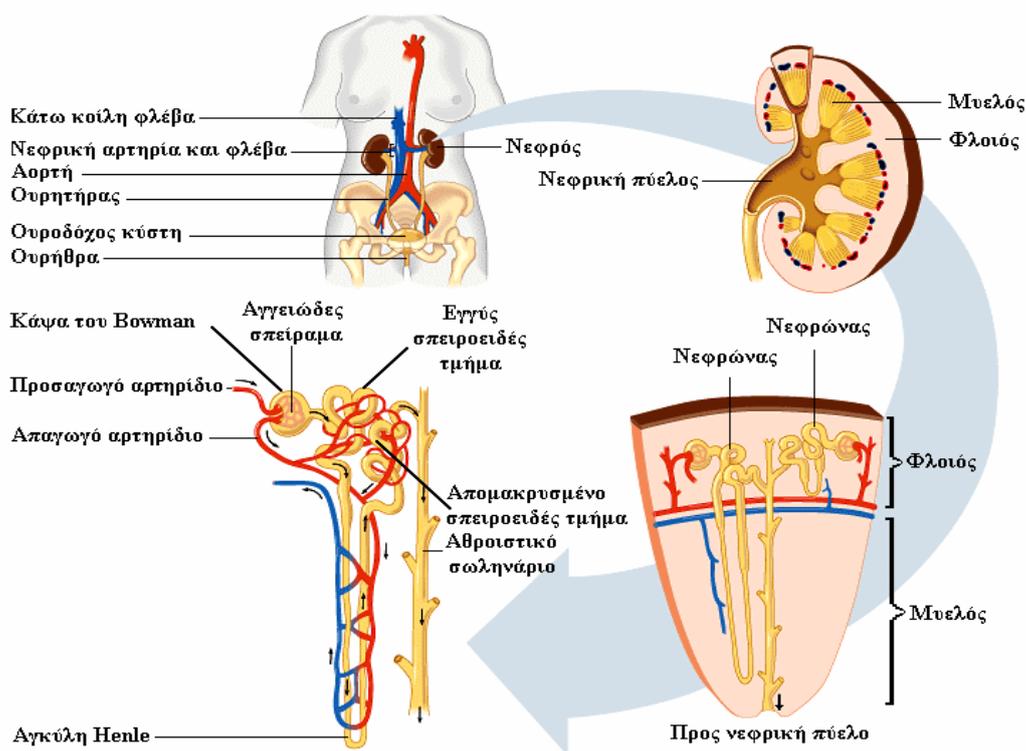
1.2 Ο Νεφρός

1.2.1 Η λειτουργία του νεφρού

Ο νεφρός είναι το κυριότερο υπεύθυνο όργανο για τη διατήρηση σε σταθερό επίπεδο της σύστασης και του όγκου των υγρών του σώματος. Οι κυριότερες λειτουργίες των νεφρών είναι:

- 1) η ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, καθώς και της περιεκτικότητας του οργανισμού σε νερό και ηλεκτρολύτες,
- 2) η απέκκριση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού (ουρία από το μεταβολισμό των πρωτεϊνών, κρεατινίνη από το μυϊκό μεταβολισμό, ουρικό οξύ από τη διάσπαση των πουρινών και των πυριμιδών),
- 3) η αποβολή χημικών ουσιών, όπως φαρμάκων και συντηρητικών των τροφίμων και
- 4) η έκκριση ορμονών, όπως ερυθροποιητίνης (για τον έλεγχο της παραγωγής ερυθροκυττάρων), ρενίνης (που οδηγεί σε παραγωγή αγγειοτενσίνης II και ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης του αίματος και της ομοιόστασης του νατρίου) και 1α υδροξυλάσης (που είναι απαραίτητο ένζυμο για το μεταβολισμό της βιταμίνης D) ¹.

Η αρχιτεκτονική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας, ο οποίος αποτελείται από : το αγγειώδες σπείραμα, την κάψα του Bowman, το ουροφόρο σωληνάριο και την παρασπειραματική συσκευή (**Σχήμα 1**). Ο αριθμός των νεφρώνων ανέρχεται σε 700.000 μέχρι 1.200.000 για κάθε φυσιολογικό νεφρό. Τα 7/8 των σπειραμάτων βρίσκονται στη φλοιώδη μοίρα, ενώ τα υπόλοιπα στη μυελώδη μοίρα. Το μήκος του ουροφόρου σωληναρίου ανέρχεται σε 5.5 cm περίπου ^{2,3}.

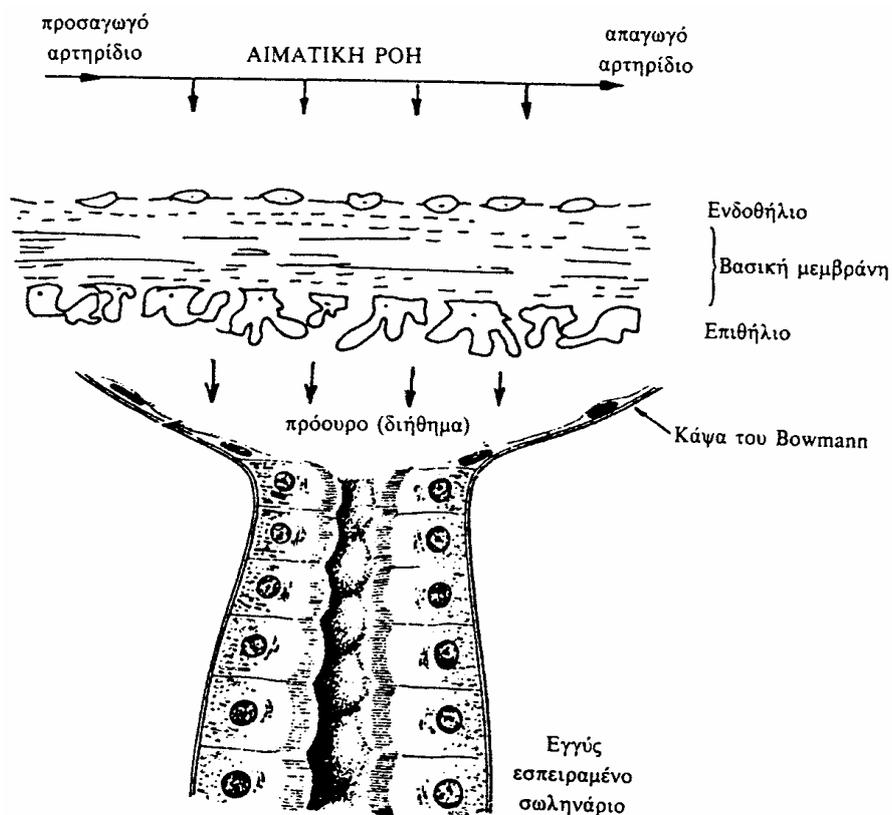


Σχήμα 1. Το ανθρώπινο απεκκριτικό σύστημα. Από το νεφρό στο νεφρώνα.

Το αίμα διηθείται στη μεμβράνη των σπειραμάτων, η οποία αποτελείται από τρεις κύριες στοιβάδες (**Σχήμα 2**): 1) την ενδοθηλιακή στοιβάδα των τριχοειδικών κυττάρων, 2) τη βασική μεμβράνη (basement membrane) και 3) τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων. Οι πόροι του ενδοθηλίου, εμποδίζουν τη διόδο των ουδετέρων μακρομορίων μέσης ακτίνας μεγαλύτερης των 375\AA , ενώ επιτρέπουν την ταχύτατη διήθηση του νερού και των διαλυτών ουσιών μικρού μοριακού βάρους. Επιπλέον, το αμφίπλευρα ανιονικό τμήμα των ενδοθηλιακών πόρων καθώς και της βασικής μεμβράνης διευκολύνει αφενός μεν το φιλτράρισμα των θετικά φορτισμένων μορίων αφετέρου δε περιορίζει τη διήθηση της αλβουμίνης, αφού σε φυσιολογικές τιμές pH έχει αρνητικό φορτίο. Τα τριχοειδικά κύτταρα που επενδύουν το σπείραμα συνιστούν ένα διάτρητο ενδοθήλιο. Οι περισσότεροι πόροι του τοιχώματος των τριχοειδών είναι πολύ στενοί και δεν επιτρέπουν τη διήθηση σωματιδίων με μέση διάμετρο μεγαλύτερη των 70\AA , δρουν δηλαδή ως ρυθμιστές μεγέθους (size selectivity). Επειδή οι πρωτεΐνες του πλάσματος έχουν διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από 70\AA , εμποδίζεται η διήθηση προς το

σωληνάριο όλων των ουσιών που έχουν μοριακό βάρος ίσο ή μεγαλύτερο των πρωτεϊνών του πλάσματος. Επομένως η σπειραματική μεμβράνη εμφανίζει επιλεκτικότητα τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς το φορτίο των προς διήθηση διαλυτών ουσιών.

Το πρόουρο λοιπόν έχει παρόμοια σύνθεση με το πλάσμα, αλλά η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε αυτό είναι περίπου το 0,03% της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα. Η ποσότητα πλάσματος που διηθείται κάθε λεπτό σε όλους τους νεφρώνες και των δύο νεφρών ονομάζεται ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) και κυμαίνεται στα 125 ml/min. Η συνολική λοιπόν ποσότητα πρόουρου που παράγεται ημερησίως κυμαίνεται σε φυσιολογικά άτομα από 135-180 lt⁴. Εφόσον ο όγκος αυτός αναλογεί σε τουλάχιστον δεκαπλάσιο όγκο από το εξωκυττάριο υγρό και περίπου 50πλάσιο από το πλάσμα, είναι προφανές ότι σχεδόν όλο το διηθημένο υγρό πρέπει να επιστρέψει στη συστηματική κυκλοφορία, σχηματίζοντας τελικά 1.5-2 λίτρα ούρων ημερησίως.



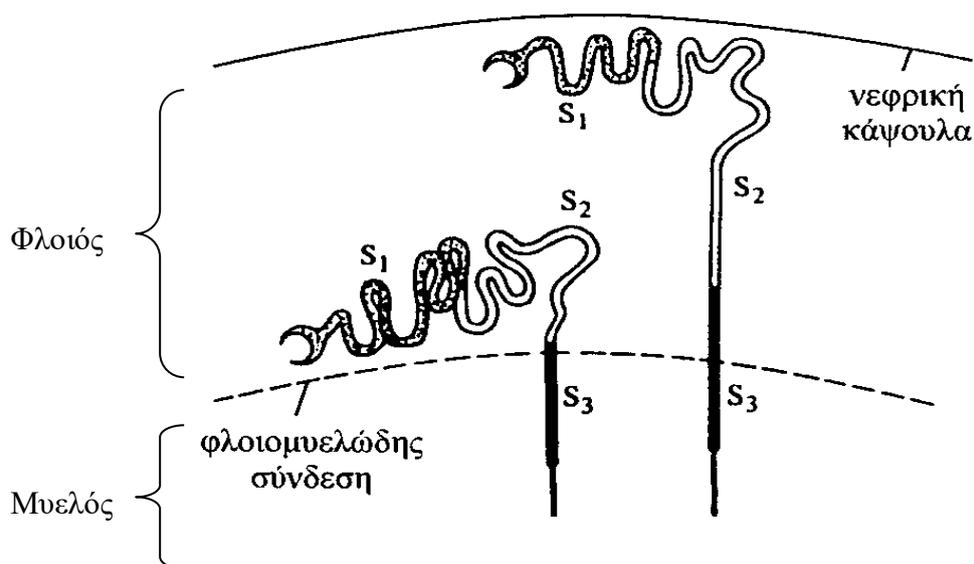
Σχήμα 2. Η σπειραματική μεμβράνη (Rose and Post, 2001)

1.2.2 Το ουροφόρο σωληνάριο

Το ουροφόρο σωληνάριο διαιρείται σε τρία τμήματα: το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (ΕΕΣ), την αγκύλη του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Το μήκος κάθε σωληναρίου ανέρχεται σε 50-55mm, ενώ το συνολικό μήκος τους φτάνει τα 120 km. Τα εσπειραμένα σωληνάρια βρίσκονται στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού και τα ευθέα τμήματα της αγκύλης του Henle στη μυελώδη μοίρα (**Σχήμα 1**).

Το ΕΕΣ, αφού αρχικά διαγράφει ελικοειδή πορεία (εσπειραμένη μοίρα), στη συνέχεια ευθείαζεται και στενεύει μέσα στη μυελώδη μοίρα (ευθεία μοίρα), για να σχηματίσει την αγκύλη του Henle. Το ΕΕΣ υποδιαιρείται σε τρία τμήματα, τα S1, S2 και S3. Από αυτά τα τμήματα, το S1 αντιστοιχεί στο τμήμα του ΕΕΣ το οποίο ευρίσκεται στο φλοιό, το S2 αντιστοιχεί στο υπόλοιπο του εσπειραμένου τμήματος και στην αρχή του ευθέος και το S3 αντιστοιχεί στο υπόλοιπο του ευθέος τμήματος και εντοπίζεται κύρια στην έξω στοιβάδα της εξωτερικής ζώνης του μυελού (**Σχήμα 3**). Επαλείφεται από κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα, με έντονη λειτουργική δραστηριότητα, η οποία εκφράζεται από τις διαφορετικές μορφολογικές και ιστοχημικές ιδιότητες και εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία σε τοξίνες. Το χαμηλό τοιχωματικό επιθήλιο της κάψας του Bowman μετατρέπεται στο υψηλό επιθήλιο του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Τα κύτταρα αυτά διακρίνονται σε δύο είδη υπό την έννοια ότι περικλείονται από δύο ξεχωριστές μεμβράνες, που έχουν διαφορετικές λειτουργίες: 1) την αυλική μεμβράνη που βλέπει προς τον αυλό του σωληναρίου (luminal membrane) και 2) την πλαγιοβασική μεμβράνη (basolateral membrane) που περικλείει τον πλευρικό ενδοκυτταρικό χώρο και βλέπει προς το διάμεσο χώρο και τα περισωληναριακά τριχοειδή. Η αυλική μεμβράνη είναι εφοδιασμένη με κύτταρα που διαθέτουν ψηκτροειδή παρυφή, λεπτοκοκκιώδες ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και ασαφή κυτταρικά όρια. Το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα αντανακλά το μεγάλο αριθμό των μιτοχονδρίων, ενώ το ασαφές των κυτταρικών ορίων είναι αποτέλεσμα της αλληλοδιαπλοκής που εμφανίζουν οι επιφάνειες παρακείμενων κυττάρων. Η ψηκτροειδής παρυφή αντιπροσωπεύει χιλιάδες μικρολάχνες. Κάθε κύτταρο του ΕΕΣ φέρει

στην ελεύθερη επιφάνεια του 6.500 κροσσούς, που αυξάνουν την επιφάνεια του ουροφόρου σωληναρίου 40 και πλέον φορές.



Σχήμα 3. Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (Rose and Post, 2001)

1.2.3 Σωληναριακή λειτουργία

Η μεταφορά μιας ουσίας μπορεί να γίνει είτε διαμέσου του κυττάρου (διακυτταρική) είτε μεταξύ δύο γειτονικών κυττάρων (παρακυτταρική). Η παρακυτταρική μεταφορική οδός είναι δευτερεύουσας σημασίας, ενώ η διακυτταρική μεταφορά είναι αυτή που συντηρεί τις απαραίτητες ηλεκτροχημικές κλίσεις. Η παρακυτταρική οδός είναι ο κύριος τρόπος παθητικής μεταφοράς ιόντων ⁵.

Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης κυμαίνεται μεταξύ 135 και 180 L/ημέρα σε υγιή ενήλικα άτομα, δηλαδή ένας όγκος περίπου 10 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του εξωκυττάρου χώρου και 60 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του πλάσματος. Το γεγονός αυτό υποσημαίνει ότι σχεδόν όλο το διηθούμενο υγρό επιστρέφει στη συστηματική κυκλοφορία. Η επανάκτηση του διηθημένου υγρού πραγματοποιείται διαμέσου της διαδικασίας της **σωληναριακής επαναρρόφησης**. Το νερό και οι ηλεκτρολύτες μεταφέρονται από το

σωληναριακό αυλό στον ενδιάμεσο περισωληναριακό χώρο και στη συνέχεια στη συστηματική κυκλοφορία. Η διαδικασία της σωληναριακής επαναρρόφησης περιλαμβάνει τη μεταφορά των ουσιών διαμέσου του τοιχώματος των σωληναριακών κυττάρων, το οποίο αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα.

Οι διαλυτές ουσίες μπορούν να κινηθούν και στην αντίθετη κατεύθυνση, από το περισωληναριακό τριχοειδές δίκτυο διαμέσου των σωληναριακών κυττάρων προς το σωληναριακό αυλό (**σωληναριακή έκκριση**). Η σωληναριακή επαναρρόφηση ή έκκριση των ιόντων διευκολύνεται από πρωτεΐνες-φορείς ή από εξειδικευμένα κανάλια ιόντων. Τελικά, για κάθε διηθούμενη ουσία η ποσότητα που απεκκρίνεται με τα ούρα προκύπτει από τη σχέση:

$$\text{Απέκκριση} = \text{Διήθηση} - [\text{Επαναρρόφηση} - \text{Έκκριση}]$$

Η επαναρρόφηση και έκκριση διαφόρων ουσιών σε διάφορα τμήματα των σωληναρίων περιληπτικά έχει ως εξής: Η διακίνηση του νερού γίνεται αποκλειστικά με την οσμωτική διάχυση, που προκαλείται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, από την ελάττωση της συγκέντρωσης μίας διαλυτής ουσίας στο υγρό των σωληναρίων και αύξηση της στο περισωληναριακό υγρό. Περίπου το 50% της συνολικής ποσότητας της ουρίας επαναρροφάται κατά τη διάρκεια της διαδρομής του διηθήματος μέσα στο σωληναριακό σύστημα. Η κρεατινίνη διηθείται πλήρως, δεν απορροφάται στα σωληνάκια, ενώ μικρές ποσότητες εκκρίνονται από τα εγγύς σωληνάκια, έτσι ώστε η ολική της ποσότητα της κρεατινίνης που απεκκρίνεται να αυξάνεται περίπου κατά 20%.

Αρχικά το πρόουρο εισέρχεται στο ΕΕΣ, το οποίο αποτελείται: 1) από την αρχική εσπειραμένη μοίρα S_1 (pars convoluta), 2) το τελικό εσπειραμένο τμήμα και την αρχική ορθή μοίρα S_2 και 3) την τελική ορθή μοίρα S_3 (pars recta) (**Σχήμα 3**). Υπό φυσιολογικές συνθήκες στο ΕΕΣ επαναρροφούνται περίπου τα 2/3 του όγκου του υπερδιηθήματος και ολόκληρες σχεδόν οι διηθούμενες ποσότητες νατρίου, χλωρίου, γλυκόζης, αμινοξέων, πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, φωσφόρου, ουρικού οξέος και διπτανθρακικών, με μια διαδικασία που αφήνει στο σωληνάριο ένα υγρό ισότονο προς το

πλάσμα. Ο όγκος του υγρού που επαναρροφάται από το ΕΕΣ επηρεάζεται από τις μεταβολές του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης και του όγκου του εξωκυττάρου υγρού ⁴.

Ορισμένα άλλα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού, όπως τα θειικά, φωσφορικά και νιτρικά ιόντα επαναρροφώνται πολύ λιγότερο σε σύγκριση με την επαναρρόφηση του νερού με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους να αυξάνονται στα επιμέρους τμήματα των σωληναρίων. Ωστόσο τα ιόντα αυτά επαναρροφώνται ενεργητικά, κυρίως στο εγγύς και άπω σωληνάριο, ένα γεγονός που εμποδίζει την υπερβολική μείωση τους στο εξωκυττάριο υγρό. Τα ιόντα καλίου εκκρίνονται ενεργητικά στο σωληναριακό υγρό κατά τη διέλευση του από τα άπω εσπειραμένα και αθροιστικά σωληνάκια, ενώ τα ιόντα H^+ εκκρίνονται ενεργητικά στα εγγύς, τα άπω και τα αθροιστικά σωληνάκια. Το ασβέστιο, το μαγνήσιο και άλλα θετικά φορτισμένα ιόντα επαναρροφώνται ενεργητικά, ενώ η επαναρρόφηση πολλών από τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα είναι αποτέλεσμα διαφορών ηλεκτρικού δυναμικού που αναπτύσσονται με την επαναρρόφηση θετικών ιόντων. Τέλος, το ουρικό οξύ, μετά από μια πολύπλοκη διαδικασία για την οποία θα γίνει λεπτομερή αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο, επαναρροφάται σε ποσοστό που φθάνει το 90%.

Η αγκύλη του Henle, χάρη στην ιδιότυπη κατασκευή της, διαχωρίζει την επαναρρόφηση του χλωριούχου νατρίου από την επαναρρόφηση του νερού και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την αραίωση ή τη συμπύκνωση των ούρων. Έτσι, από το ισοοσμωτικό υπερδιήθημα απορροφάται στην αγκύλη του Henle περίπου το 15%, ενώ από το χλωριούχο νάτριο απορροφάται περίπου το 25%. Επιπλέον στο παχύ ανιόν τμήμα της αγκύλης του Henle επαναρροφάται και μεγάλο μέρος του ασβεστίου. Η λειτουργία του άπω νεφρώνα ρυθμίζεται από ειδικές ορμόνες και καθορίζει την τελική σύνθεση των ούρων. Η ωσμωτικότητα των ούρων καθορίζεται από τη δραστηριότητα της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH), η οποία ρυθμίζει την απορρόφηση νερού στα αθροιστικά σωληνάκια, ενώ η αλδοστερόνη επηρεάζει τις συγκεντρώσεις του νατρίου, του καλίου και του υδρογονοκατιόντων στα ούρα.

Αν και κατά πόσο μία ουσία συμπυκνώνεται μέσα στο σωληναριακό υγρό καθορίζεται από την επαναρρόφηση (ή έκκριση) της ουσίας σε σύγκριση με την αντίστοιχη επαναρρόφηση του νερού. Εάν απορροφάται μεγαλύτερο ποσοστό νερού, η ουσία συμπυκνώνεται, ενώ εάν επαναρροφάται μεγαλύτερο ποσοστό ουσίας τότε η συγκέντρωση της μειώνεται. Οι ουσίες που είναι σημαντικές για τη θρέψη (γλυκόζη, πρωτεΐνες και αμινοξέα) επαναρροφώνται πολύ πιο γρήγορα από το νερό, η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται εξαιρετικά γρήγορα στα εγγύς σωληνάκια και είναι ουσιαστικά μηδενική σε όλο το υπόλοιπο σωληναριακό σύστημα και στα ούρα. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις όλων των τελικών μεταβολικών προϊόντων προοδευτικά αυξάνονται κατά μήκος του σωληναριακού συστήματος, διότι όλες αυτές οι ουσίες επαναρροφώνται σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με το νερό.

1.2.4 Αρχές μεταφοράς ουσιών στα νεφρικά σωληνάκια

Ο ομοιοστατικός ρόλος των νεφρών στη ρύθμιση του όγκου και της σύστασης των υγρών του οργανισμού είναι το αποτέλεσμα ειδικών διεργασιών μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα στη διαδρομή των νεφρικών σωληναρίων. Μετά τη διήθηση στο σπείραμα το υγρό που θα φτάσει στο χώρο του Bowman, αποτελεί υπερδιήθημα του πλάσματος. Η τελική όμως σύνθεση των ούρων είναι αποτέλεσμα μιας σειράς διεργασιών, οι οποίες συνίστανται τόσο σε επαναρρόφηση όσο και έκκριση των ουσιών από τα επιθηλιακά κύτταρα σε όλο το μήκος του σωληναρίου. Οι ικανότητες των βιολογικών μεμβρανών να μετέχουν σε λειτουργίες μεταφοράς προκύπτει από τη δυνατότητά τους να είναι εκλεκτικά διαπερατές και να διαθέτουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες φορείς.

Οι βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς ουσιών διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών μπορούν να χωρισθούν σε δυο κατηγορίες. Σε αυτούς τους μηχανισμούς στους οποίους οι διαφορές φυσικών παραμέτρων (π.χ. πίεση, συγκέντρωση) εκατέρωθεν της μεμβράνης εξουδετερώνονται και σε αυτούς τους μηχανισμούς στους οποίους οι διαφορές διατηρούνται. Η διάχυση, η ροή υγρών και η διευκολυνόμενη διάχυση ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, ενώ η ενεργός μεταφορά στη δεύτερη (**Σχήμα 4**).

Η **παθητική διακίνηση** ιόντων ή άλλων ουσιών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται εφόσον υπάρχει διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης, με το φυσικό φαινόμενο της διάχυσης, χωρίς να καταναλώνεται ενέργεια.

Η παρουσία ειδικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αυξάνει εκλεκτικά τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς επιτρέπει και επιτείνει τη διαδικασία της διάχυσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διευκολυνόμενη διάχυση και παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις της παθητικής μεταφοράς ουσιών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτεϊνικές αυτές δομές που λειτουργούν ως πρωτεΐνες μεταφοράς (transport proteins) περιλαμβάνουν στην περίπτωση της παθητικής μεταφοράς τους *πόρους* (pore), τα *κανάλια* (channel) και τους *παθητικούς μεταφορείς* (carrier, ή passive transporter). Οι πόροι και τα κανάλια είναι ανοίγματα, περάσματα της κυτταρικής μεμβράνης, που επιτρέπουν την επικοινωνία του κυττάρου με τον εξωκυττάριο χώρο και ως εκ τούτου την ιοντική διακίνηση ταυτόχρονα και προς τις δύο κατευθύνσεις, όπως και στην περίπτωση της απλής διάχυσης. Η διαφορά των πόρων από τα κανάλια έγκειται στο γεγονός ότι οι μεν πόροι είναι συνεχώς *'ανοικτοί'* (open), ενώ τα κανάλια μεταπίπτουν μεταξύ της *'ανοικτής'* και *'κλειστής'* διαμόρφωσης (open - close), που επιτρέπει ή παρεμποδίζει την ιοντική διακίνηση.

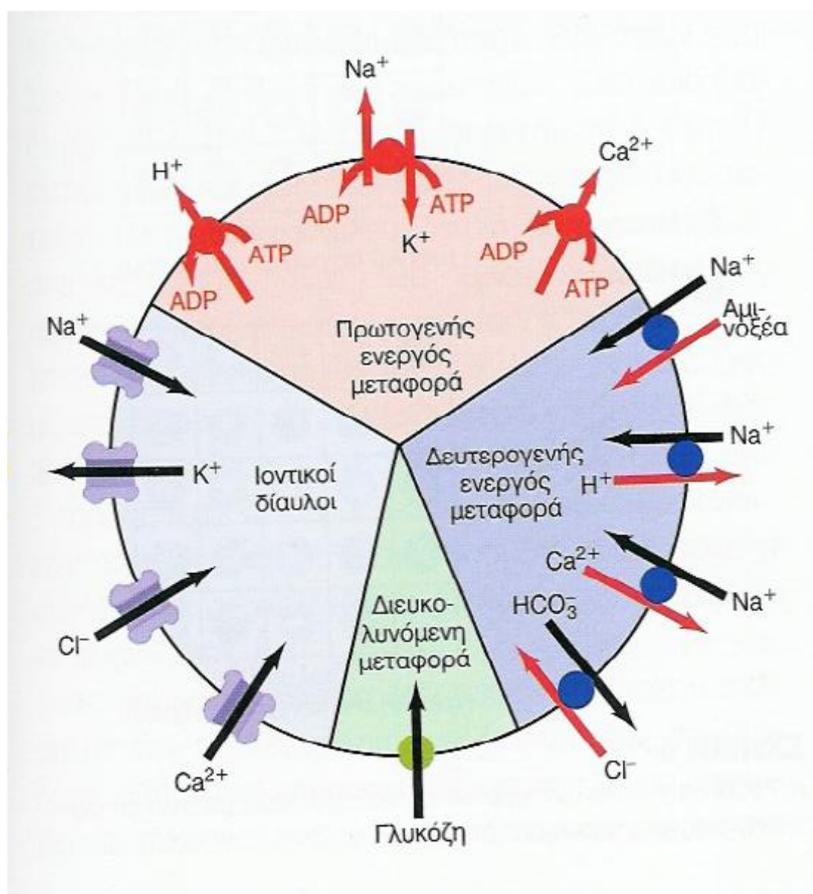
Η **ενεργητική διακίνηση** των ιόντων και άλλων ουσιών δημιουργεί διαφορά συγκεντρώσεων των ουσιών εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης, διακινώντας τα ιόντα ή μόρια ενάντια στην υφιστάμενη ηλεκτροχημική τους κλίση. Οι πρωτεϊνικοί μεταφορείς που επιτρέπουν την ενεργητική διακίνηση είναι οι *αντλίες* (pumps) και οι *ενεργητικοί μεταφορείς* (active transporters). Η ενεργητική μεταφορά προϋποθέτει κατανάλωση ενέργειας, που παράγεται από την υδρόλυση του ATP και διακρίνεται σε πρωτογενής και δευτερογενής ενεργητική μεταφορά (**Σχήμα 4**).

Στην περίπτωση της *πρωτογενούς ενεργητικής μεταφοράς*, το μεταφορικό σύστημα είναι μια αντλία, δηλαδή μια ATPase. Η μεταφορά των ιόντων γίνεται ενάντια στην ηλεκτροχημική τους κλίση και συνδέεται άμεσα με την παραγόμενη ενέργεια από την υδρόλυση του ATP. Η περίπτωση της Na^+, K^+ -

ATPase, της K^+ - ATPase, της H^+ - ATPase και της Ca^{2+} - ATPase αποτελούν τυπικά παραδείγματα τέτοιων συστημάτων μεταφοράς.

Στην περίπτωση της *δευτερογενούς ενεργητικής μεταφοράς*, η διακίνηση γίνεται από ένα σύστημα ταυτόχρονης μεταφοράς, που διασυνδέει τη μεταφορά μιας ουσίας *X ενάντια στην ηλεκτροχημική της κλίση* με την μεταφορά μιας άλλης ουσίας, συνήθως των ιόντων Na^+ , που διαχέονται σύμφωνα με την ηλεκτροχημική τους κλίση. Όταν η ταυτόχρονη μεταφορά και των δύο ουσιών γίνεται προς την ίδια κατεύθυνση ο ενεργητικός μεταφορέας αναφέρεται ως *συμμεταφορέας* (cotransporter, ή symport), ενώ όταν γίνεται προς αντίθετη κατεύθυνση αναφέρεται ως *αντιμεταφορέας* ή *ανταλλάκτης* (antiport, ή exchanger). Σε αυτή την περίπτωση η ενεργητική μεταφορά της ουσίας *X* εξαρτάται ενεργειακά από την παρουσία ηλεκτροχημικής κλίσης για το Na^+ , που προκύπτει από τη δράση της Na^+,K^+ - ATPase. Η επαναρρόφηση γλυκόζης στο εγγύς σωληνάριο διαμέσου των εξαρτώμενων από το Na^+ συμμεταφορέων γλυκόζης (sodium - glucose transporters, SGLT) αποτελεί παράδειγμα δευτερογενούς ενεργητικής μεταφοράς.

Στην πλαγιοβασική επιφάνεια εντοπίζεται η Na^+,K^+ - ATPase, γνωστή και ως αντλία Na^+ , που αποτελεί το πρότυπο της *πρωτογενούς ενεργητικής μεταφοράς*. Η ενέργεια που προέρχεται από την *υδρόλυση του ATP σε ADP* από την Na^+,K^+ - ATPase δαπανάται για τη μεταφορά 3 ιόντων Na^+ εκτός και 2 ιόντων K^+ εντός των κυττάρων, ενάντια στην κλίση συγκέντρωσης τους. Κατά συνέπεια, η δραστηριότητα της Na^+,K^+ - ATPase διατηρεί αυξημένη την ενδοκυττάρια συγκέντρωση K και μειωμένη την αντίστοιχη του Na^+ .



Σχήμα 4. Συστήματα μεταφοράς ουσιών διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών

1.2.5 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς

Τα εξωτερικά και εσωτερικά «σύνορα» των κυτάρων σχηματίζονται από τις βιολογικές μεμβράνες. Η διάταξη των λιπιδίων των μεμβρανών σε διπλοστοιβάδα γίνεται αυτόματα λόγω των επιδράσεων του νερού στα αμφίτροπα μόρια των λιπιδίων. Έτσι, συμπεριφέρονται ως διαχωριστικές επιφάνειες επιτρέποντας τη διαμερισματοποίηση, χωρίς όμως να είναι αδρανή συστήματα. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούν ελεγχόμενους φραγμούς διαπερατότητας που ρυθμίζουν την κίνηση των βιομορίων από και προς το εσωτερικό του κυτάρου. Ο ζωτικής σημασίας αυτός ρόλος των μεμβρανών θα ήταν αδύνατος χωρίς την παρουσία οργανωμένων

πρωτεϊνικών συστημάτων στη μεμβράνη, που συγκροτούν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Οι **μεμβρανικές πρωτεΐνες** διακρίνονται σε *ενδομεμβρανικές* ή ενσωματωμένες (integral ή intrinsic) και σε *περιφερικές* ή *εξωμεμβρανικές* (peripheral ή extrinsic). Ενδομεμβρανικές (ενσωματωμένες) και περιφερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να λειτουργούν συνεργικά μέσα στο κύτταρο, όπως για παράδειγμα στα συστήματα των μεμβρανικών υποδοχέων (integral) – πρωτεϊνικών κινασών (peripheral), που εξυπηρετούν έναν από τους γνωστούς μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης.

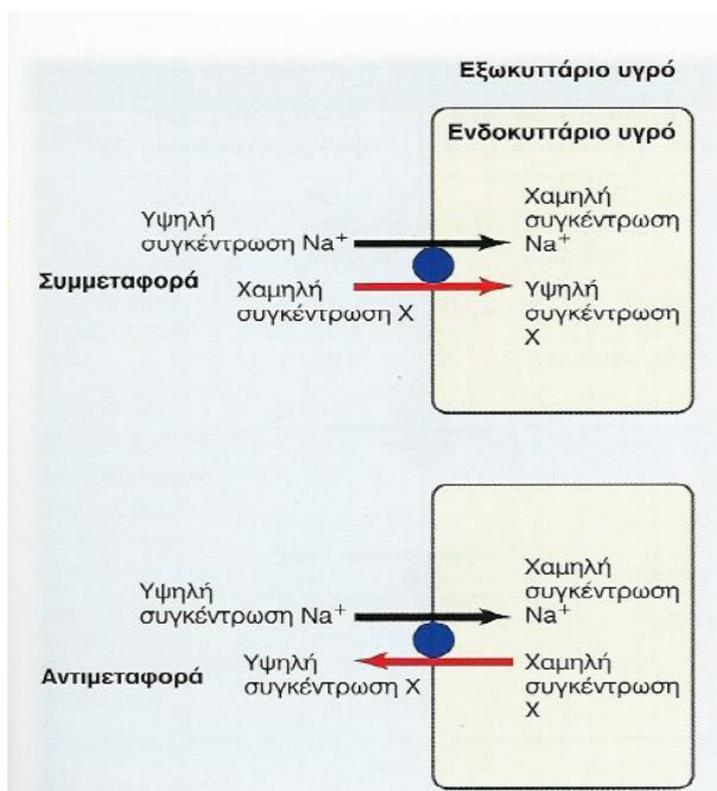
Συνοπτικά, οι λειτουργίες που καταλύονται από ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (signal transduction) και ενέργειας (energy transduction), όπως είναι: (α) υποδοχείς σημάτων σε μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης, (β) έλεγχος της επικοινωνίας και των αλληλεπιδράσεων του κυττάρου με το περιβάλλον του ή με άλλα κύτταρα, (γ) οξειδοαναγωγικά ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα, (δ) πρόσληψη μικρομορίων που χρησιμοποιούνται ως μεταβολικά ενδιάμεσα και ρύθμιση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ιόντων ή απέκκριση κυτταροτοξικών ουσιών. Στην περίπτωση (δ), πρόκειται κυρίως για τις **πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς** δηλαδή, πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με 4 έως 14, συνήθως, διαμεμβρανικά τμήματα (κατά κανόνα, α-έλικες) (transmembrane segments, TMSs, ή transmembrane helices, TMHs), μεταξύ των οποίων σχηματίζεται ένα στερεοδιαταξικά ευέλικτο κέντρο δέσμευσης υποστρώματος. Ως προς το δομικό τους τύπο, οι πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς ανήκουν στην κατηγορία των πολυτοπικών διαμεμβρανικών (transmembrane) πρωτεϊνών, επειδή διατρέχουν (span) περισσότερες από μία φορές την κυτταρική μεμβράνη^{6, 7, 8}.

Γενικότερα, οι πρωτεΐνες μεταφοράς (transporters) σύμφωνα με το διεθνές σύστημα φυλογενετικής – λειτουργικής ταξινόμησης και ονοματολογίας (Transport Commission, TC system, 1999) (<http://www.tcdb.org>) ταξινομούνται σε **διαύλους (channels- TC1)** και σε **μεταφορείς (carriers)**. Οι διαύλοι επιτελούν πάντα διευκολυνόμενη διάχυση, δηλαδή δεν συσσωρεύουν αλλά απλώς εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις ιόντων ή μικρομορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης (equilibrative transport). Οι μεταφορείς επιτελούν

κυρίως αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς, που επιτρέπουν «ασύμμετρη» συσσώρευση ιόντων ή μικρομορίων, προς τη μία πλευρά της μεμβράνης, ακόμη και ενάντια της διαβάθμισης συγκεντρώσεών τους (concentrative transport) και έχουν μεγαλύτερη ευελιξία διαμορφώσεων⁹. Οι αντιδράσεις ενεργού μεταφοράς αντλούν την απαραίτητη ενέργεια για τη μεταφορά ενός υποστρώματος από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη είτε από μία «πρωτογενή» πηγή, όπως είναι η υδρόλυση του ATP, είτε, έμμεσα, από μια «δευτερογενή» πηγή ενέργειας (ηλεκτροχημική διαβάθμιση ιόντων). Έτσι, μιλάμε για πρωτεΐνες ενεργού μεταφοράς πρωτογενούς και δευτερογενούς τύπου, αντίστοιχα (**Primary-TC3 and Secondary-TC2 active transporters**).

Οι μεταφορείς ενεργού μεταφοράς δευτερογενούς τύπου μπορούν να λειτουργήσουν ως:

- 1) **μονομεταφορείς (uniporters)**, που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς ενός μόνο είδους μορίου διαμέσου της μεμβράνης, ανεξάρτητα από την κίνηση άλλων μορίων,
- 2) **συμμεταφορείς (symporters)**, που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο διαφορετικών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς την ίδια κατεύθυνση και
- 3) **αντιμεταφορείς ή ανταλλάκτες (antiporters)**, που καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς δύο ειδών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, προς διαμετρικά αντίθετες κατευθύνσεις (**Σχήμα 5**).



Σχήμα 5. Συμμεταφορείς και αντιμεταφορείς εξαρτώμενοι από το Na^+ στα επιθηλιακά κύτταρα του σωληναρίου.

Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στο επίπεδο της αναλυτικής δομής και του μηχανισμού λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται κυρίως σε σημαντικά τεχνικά προβλήματα που προέρχονται από τον έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα (hydrophobicity) και τη λειτουργική σημασία της ευελιξίας της στερεοδιάταξης (conformational flexibility) των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η δέσμευση του ειδικού υποστρώματος στο αντίστοιχο κέντρο δέσμευσης σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του μεταφορέα από πρωτογενή ή δευτερογενή πηγή ενέργειας οδηγεί σε αντιστρεπτή αλλαγή της στερεοδιάταξης του μορίου (conformation change), η οποία επιτρέπει τελικά τη διαμεμβρανική μεταφορά προς μία κατεύθυνση, π.χ. προς το εσωτερικό ή το εξωτερικό του κυττάρου (vectorial transport). Ως συνέπεια, η απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών από το μεμβρανικό περιβάλλον και η ανάκτησή τους σε μορφή λειτουργική και συγχρόνως κατάλληλη για αναλυτικές βιοφυσικές μελέτες εμφανίζει μεγάλες, αν όχι ανυπέρβλητες, τεχνικές δυσχέρειες.

Όπως προκύπτει από την εξελισσόμενη καταγραφή και ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας πολλών γονιδιωμάτων, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς μικρομορίων - ιόντων αποτελούν σημαντικό ποσοστό του ολικού αριθμού των γνωστών γονιδιακών προϊόντων (5-15%, ανάλογα με το γονιδίωμα) και έχουν ουσιαστικό ρόλο, τόσο για τις προσαρμογές των παθογόνων ή μη μικροοργανισμών σε διαφορετικά ενδιαιτήματα (microbial adaptations), όσο και για την ανθρώπινη φυσιολογία και ομοιοστασία ή την εκδήλωση νοσημάτων (human physiology and disease) ¹⁰. Επομένως, οποιαδήποτε αλλαγή σε πρωτεΐνη που ελέγχει την αναγνώριση ορμόνης ή τη μεταφορά ιόντων ή μεταβολικών υποστρωμάτων πιθανώς να έχει σημαντικές κλινικές συνέπειες. Με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών για τη μελέτη διαδικασιών μεμβρανικής μεταφοράς, κλωνοποιήθηκαν αρκετές σημαντικές πρωτεΐνες - φορείς. Έτσι, οι πληροφορίες που μας παρείχαν όλες αυτές οι μοριακές προσεγγίσεις έχουν οδηγήσει σε τεράστια πρόοδο για την κατανόηση της λειτουργίας και της ρύθμισης της μεμβρανικής μεταφοράς τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ένας συνεχώς αυξανόμενος κατάλογος διαταραχών που οφείλονται σε μεταλλάξεις ορμονικών υποδοχέων ή πρωτεϊνών-φορέων στους νεφρούς φαίνεται στον **Πίνακα 1**. Σύγχρονα δεδομένα της μοριακής και γενετικής επιστήμης έχουν πλέον αποκαλύψει ότι για κάθε ένα από αυτά τα νοσήματα, υπάρχει και η αντίστοιχη υποκείμενη γενετική διαταραχή (μετάλλαξη) στο γονίδιο που κωδικοποιεί και ελέγχει τη λειτουργία της αντίστοιχης με το νόσημα πρωτεΐνης - μεταφορέα.

Πίνακας 1. Γενετικά καθορισμένες σωληναριακές διαταραχές

Νόσος	Παράγωγα γονιδίων (Πρωτεΐνες φορείς)	Πρωτοπαθείς διαταραχές	Κλινικά χαρακτηριστικά
Σύνδρομο Bartter	ROMK δίαυλος Na ⁺ , Συμμεταφορέας Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ , δίαυλος ClC-kb Cl	Μείωση επαναρρόφησης Na και Cl στο ΑΣ	Υπερρενιαιμία, Υπόταση, MA Υποκαλιαιμία
Σύνδρομο Gitelman	Συμμεταφορέας NaCl (NCCT)	Μείωση επαναρρόφησης NaCl στο άπω σωληνάριο	Υπόταση, MA Υποκαλιαιμία, Υπασβεστιουρία Υπομαγνησιαιμία
Σύνδρομο Liddle	ENaC Δίαυλος Na ⁺ (Δίαυλος Na ⁺ ευαίσθητος στην αμιλορίδη)	Αύξηση επαναρρόφησης Na ⁺ στο ΑΣ	Υπέρταση, MA Υποκαλιαιμία Υπορενιαιμία
Ψευδούπιοαλδοστερονισμός Τύπου 1	ENaC Δίαυλος Na ⁺ Υποδοχέας αλατοκορτικοειδών	Μείωση επαναρρόφησης Na ⁺ στο ΑΣ	Υπόταση, MO Υπερκαλιαιμία
Άπω νεφροσωληναριακή οξέωση	Ανιμεταφορέας AE1 Cl ⁻ - HCO ₃ ⁻	Μείωση έκκρισης H ⁺ στο αθροιστικό σωληνάριο	Υποκαλιαιμία MO
Νεφρογενής άπιοιος διαβήτης	V2 υποδοχέας βαζοπρεσίνης, Δίαυλος νερού, ακουαπορίνη 2	Μείωση διαπερατότητας νερού στο ΑΣ	Πολυουρία Υπερνατρίαμια
Κυστινουρία	D2H μεταφορέας διβασικού αμινοξέος (rBAT)	Μείωση επαναρρόφησης κυστίνης στο ΕΣ	Νεφρολιθίαση Χαμηλό ανάστημα
Νόσος Hartnup	Μεταφορέας ουδέτερων αμινοξέων στο ΕΣ (B ⁰ AT1)	Μείωση επαναρρόφησης ουδέτερων αμινοξέων	Δερματίτιδα, Διάρροια, Άνοια
Ιμινογλυκινουρία	Μεταφορέας ουδέτερων αμινοξέων στο ΕΣ	Μείωση επαναρρόφησης προλίνης, υδροξυπρολίνης και γλυκίνης	Καλοήθης κατάσταση
Νόσος Dent	ClC - 5 δίαυλος Cl ⁻	Άγνωστη	Υπερασβεστιαιμία, Λευκωματουρία, Λιθίαση
Νεφρική γλυκοζουρία	Μεταφορέας νατρίου – γλυκόζης 2 SGLT-2	Μείωση επαναρρόφησης γλυκόζης	Πολυουρία, Πολυδιψία
Πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία	Μεταφορέας ουρικού URAT1	Μείωση επαναρρόφησης ουρικού οξέος	ΟΝΑ μετά από άσκηση, Λιθίαση

MA: μεταβολική αλκάλωση, MO: μεταβολική οξέωση, ΑΣ: αθροιστικό σωληνάριο

1.2.6 Σωληναριακές παθήσεις

Οι σωληναριακές παθήσεις είναι βλάβες των σωληναρίων που εκδηλώνονται με μεταβολές του αποβαλλόμενου όγκου των ούρων, της αποβαλλόμενης ποσότητας διαφόρων ουσιών, του pH των ούρων, της ωσμωτικότητας και του ειδικού βάρους των ούρων, καθώς και παθολογικών χαρακτηριστικών στη μικροσκοπική εξέταση των ούρων (κοκκώδεις, λευκοκυτταρικοί ή επιθηλιακοί κύλινδροι). Η αναγνώριση της σωληναριακής βλάβης απαιτεί ικανό βαθμό ευαισθητοποίησης του κλινικού ιατρού στη διάγνωση των παθήσεων του σωληναρίου.

Οι παθήσεις των ουροφόρων σωληναρίων διακρίνονται σε κληρονομούμενες διαταραχές, οι οποίες οφείλονται σε γενετικές βλάβες μεταφορέων στις οποίες έγινε ήδη αναφορά και σε επίκτητες διαταραχές, δηλαδή σε δευτεροπαθείς αλλοιώσεις της λειτουργίας του νεφρικού σωληναρίου (**Πίνακας 2**).

Κοινό αιτιοπαθογενετικό αίτιο των διαφόρων σωληναριακών διαταραχών αποτελεί ένα έλλειμμα στο μηχανισμό μεταφοράς και επαναρρόφησης διαφόρων ουσιών κατά μήκος των ουροφόρων σωληναρίων. Ο διαμεσωληναριακός χώρος, σε αντίθεση με το αγγειώδες σπείραμα, αποτελεί τον πλέον ευαίσθητο στόχο διαφόρων νεφροτοξικών παραγόντων. Έτσι, γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του νεφρικού σωληναρίου και επομένως και των πρωτεϊνών-φορέων.

Σε καταστάσεις δυσλειτουργίας των ουροφόρων σωληναρίων οι κύριες βιοχημικές διαταραχές αφορούν την επαναρρόφηση ηλεκτρολυτών, γλυκόζης, φωσφόρου, ασβεστίου, αμινοξέων, πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους (<40.400D) κυρίως α_1 και β_2 μικροσφαιρίνης, λυσοζύμης και καλλικρεΐνης, καθώς και την ικανότητα οξινοποίησης και συμπύκνωσης των ούρων. Έτσι, για τον καθορισμό του τμήματος του νεφρικού σωληναρίου που δυσλειτουργεί και την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των παθήσεων του ουροφόρου σωληναρίου, είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε το τμήμα του νεφρικού σωληναρίου στο οποίο γίνεται η μεταφορά της αποβαλλόμενης ουσίας, καθώς και το μηχανισμό μεταφοράς της.

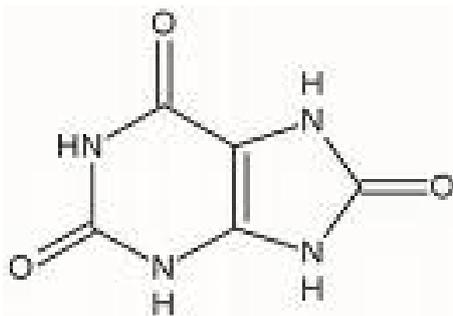
Πίνακας 2. Παθήσεις των νεφρικών σωληναρίων

Παθήσεις των νεφρικών σωληναρίων	
Κληρονομούμενες διαταραχές των ουροφόρων σωληναρίων	Επίκτητες διαταραχές των ουροφόρων σωληναρίων
<ul style="list-style-type: none"> • Νεφροσωληναριακή οξέωση τύπου I,II,IV • Σύνδρομο Bartter και Gitelman • Σύνδρομο Liddle • Σύνδρομο Fanconi • Νεφρολιθίαση • Νεφρική γλυκοζουρία • Σύνδρομο δυσαπορρόφησης γλυκόζης-γαλακτόζης • Κυστινουρία I,II,III, • Κυστίνωση • Νόσος Dent • Πρωτοπαθής υπεροξαλουρία • Χ-φυλοσύνδετη υποφωσφαταιμική ραχίτιδα • Ψευδουποαλδοστερονισμός I , II • Οικογενής υπασβεστιουρική υπερασβεστιαμία • Νεφρογενής άποιος διαβήτης • Πολυκυστική νόσος • Σύνδρομο Lowe • Οζώδης σκλήρυνση • Μιτοχονδριακή διαμεσοσωληναριακή νεφρίτιδα • Αμυλοείδωση 	<ul style="list-style-type: none"> • Διαμεσοσωληναριακή νεφρίτιδα • Οξεία σωληναριακή νέκρωση • Διαβητική νεφροπάθεια • Υπέρταση • Νεφροπάθεια από παλινδρόμηση • Ουρική νεφροπάθεια • Δυσπρωτεϊναιμίες • Ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων • Σύνδρομο Sjogren • Φάρμακα-Τοξίνες-Βαρέα μέταλλα

1.3 Το ουρικό οξύ

1.3.1 Μεταβολισμός του ουρικού οξέος

Το ουρικό οξύ είναι μια 2-6-8 τριοξυπουρίνη και αποτελεί το πιο σημαντικό τελικό μεταβολικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Το ουρικό οξύ

Είναι ένα ασθενές οξύ με μοριακό βάρος 168 Daltons και σταθερά διάστασης $pK_{a1}=5.75$ ¹¹. Έτσι, σε φυσιολογικό pH αίματος βρίσκεται ως ουρικό μονοάντριο με ανώτερο όριο διαλυτότητας στο ανθρώπινο πλάσμα περίπου τα 7mg/dl¹². Η διαλυτότητα του ουρικού οξέος εξαρτάται από τη θερμοκρασία του υδατικού διαλύματος και την περιεκτικότητά του σε νάτριο. Ένα υδατικό διάλυμα στους 37°C με συγκέντρωση νατρίου ίση με αυτή του φυσιολογικού ανθρώπινου ορού είναι κορεσμένο όταν η συγκέντρωση του ουρικού οξέος ανέρχεται στα 6.4 - 6.8 mg/dl. Τόσο το ουρικό οξύ όσο και τα άλατά του είναι σχετικά δυσδιάλυτα στο νερό. Φυσιολογικά, περίπου το 5% του ουρικού οξέος είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος¹³.

Το ουρικό οξύ προέρχεται από την υδρόλυση των πουρινών τόσο αυτών που είναι εξωγενούς (από τις τροφές) όσο και αυτών που είναι ενδογενούς προέλευσης. Οι βάσεις της πουρίνης είναι η αδενίνη (A) (6-αμινο-πουρίνη) και η γουανίνη (G) (2-αμινο-6-οξυ-πουρίνη) που ανευρίσκονται στο RNA και στο DNA. Το ουρικό οξύ είναι τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, στα πουλιά, καθώς και σε πολλά είδη πιθήκων της Ν. Αμερικής¹⁴. Το ουρικό οξύ σε μερικούς οργανισμούς αποικοδομείται περαιτέρω. Στα περισσότερα των θηλαστικών, εκτός των πρωτευόντων, υπάρχει το ένζυμο

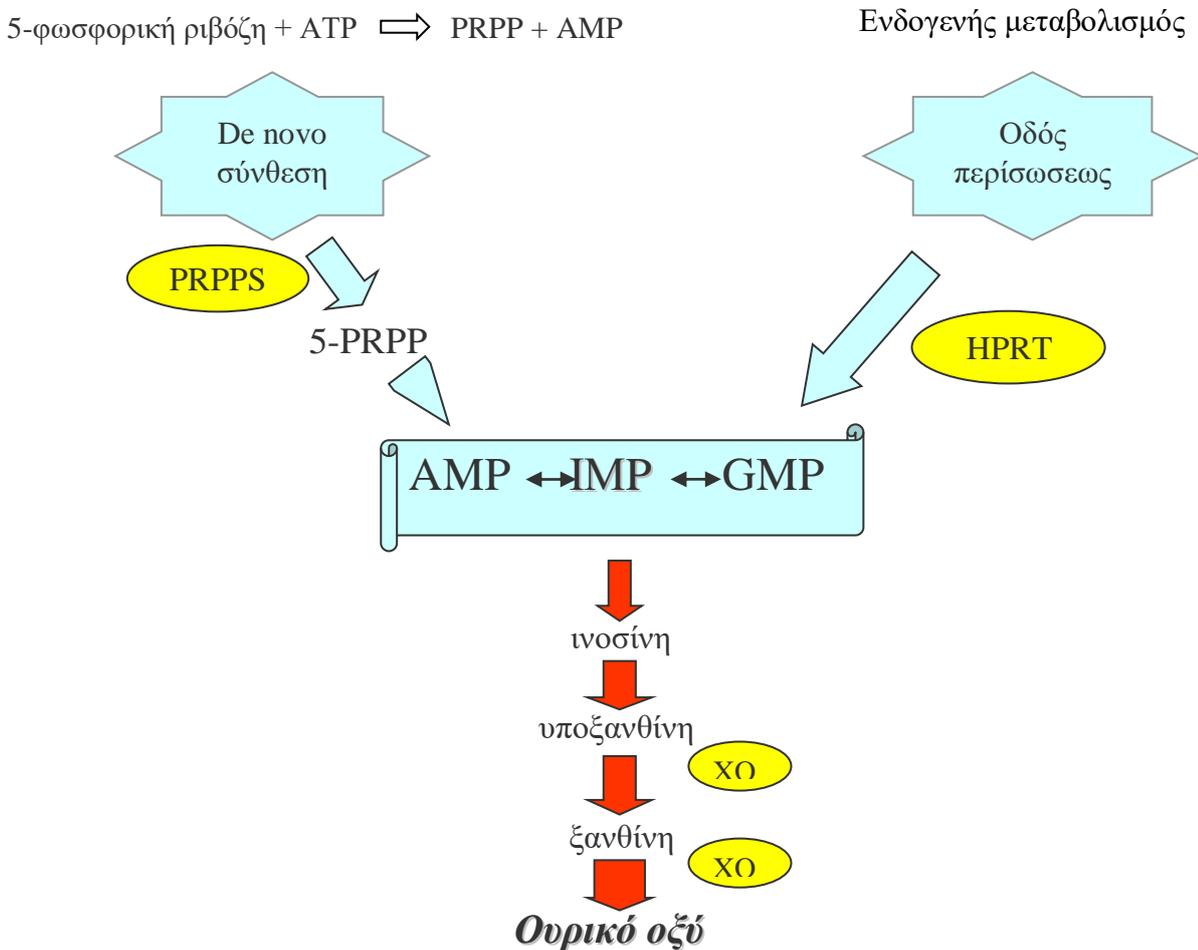
ουρικάση που διασπά το ουρικό οξύ στο ήπαρ στην πιο ευδιάλυτη αλλαντοΐνη. Κατά την διάρκεια της εξέλιξης του ανθρώπινου είδους το ένζυμο ουρικάση εξαφανίσθηκε με γενετικές μεταλλάξεις, που πιθανώς έγιναν πριν από 24 έως 8 εκατομμύρια έτη¹⁵. Η διάσπαση του ουρικού οξέος συνεχίζεται στα τελεόστεα ψάρια, με αποτέλεσμα η αλλαντοΐνη με την επίδραση της αλλαντοϊνάσης να μετατρέπεται σε αλλαντοϊκό οξύ. Η αποικοδόμηση προχωρά ένα βήμα παραπέρα στα αμφίβια και στα περισσότερα είδη ψαριών. Τέλος, σε μερικά θαλάσσια ασπόνδυλα, η ουρία υδρολύεται σε NH_4^+ και CO_2 ¹⁶. Φαίνεται πιθανά ότι τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές χάθηκαν σταδιακά κατά την πορεία της εξέλιξης των ανώτερων θηλαστικών.

Η ενδογενής παραγωγή των πουρινών είναι αποτέλεσμα του καταβολισμού των πυρινηκών οξέων, καθώς και της «*εκ νέου σύνθεσης*» (*de novo σύνθεση*) **(Σχήμα 7)**. Για την «*de novo σύνθεση*» τα απαραίτητα δομικά συστατικά προέρχονται από τα κύτταρα του οργανισμού. Η *5-φωσφορική ριβόζη* παρουσία ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) και με το ένζυμο *ριβοζοφωσφορική-διφωσφοκινάση* μετατρέπεται σε *5-φωσφορική-1-πυροφωσφορική ριβόζη (PRPP)*. Στην πορεία συντίθεται η φωσφοριβοσυλαμίνη, με αμίνωση του PRPP από τη γλουταμίνη. Η αντίδραση αυτή που αναφέρθηκε για τη σύνθεση της φωσφοριβοσυλαμίνης διαδραματίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των πουρινών. Η περαιτέρω βιοσύνθεση καταλήγει στο σχηματισμό του *ινοσικού οξέος (IMP)*, που είναι η ενδιάμεση «μητρική ουσία» για τη σύνθεση του *αδενιλικού οξέος (AMP)* και του *γουανυλικού οξέος (GMP)*. Το ινοσινικό οξύ σχηματίζεται από διάφορες αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν το PRPP, 2 μόρια γλουταμίνης, 2 μόρια γλυκίνης, το ασπαρτικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ, μονοανθρακικές ρίζες, το CO_2 και 6 μόρια ATP.

Έτσι, η σύνθεση του «μητρικού» τύπου πουρινονουκλεοτιδίου IMP είναι «πολυέξοδη». Για αυτό το λόγο ο οργανισμός προσπαθεί να αποφύγει την *de novo σύνθεση* βάσεων και όταν είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσει τις βάσεις που προέρχονται από τον ενδογενή καταβολισμό των νουκλεοτιδίων. Η προσπάθεια αυτή είναι γνωστή ως «*Οδός περισώσεως των βάσεων πουρίνης*» (*Salvage pathway*) και πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου της φωσφοριβοσύλωσης των βάσεων πουρίνης. Η φωσφοριβοσύλωση

εξυπηρετείται από δυο ένζυμα, την αδενο-φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση (A-PRPP-T) που συμμετέχει στο σχηματισμό AMP (από PRPP και αδενίνη) και από την υποξανθίνο-γουανίνο-φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση (HX-G-PRPP-T) που παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα και συμβάλει στο σχηματισμό του IMP και GMP (από PRPP και υποξανθίνη ή γουανίνη αντίστοιχα).

Μερική ανεπάρκεια του ενζύμου HX-G-PRPP-T έχει απομονωθεί σε μερικές μορφές πρωτοπαθούς ουρικής αρθρίτιδας, ενώ ολική έλλειψη του ίδιου ενζύμου υπάρχει στο σύνδρομο Lesh-Nyhan ¹⁷.



Σχήμα 7. Ο μεταβολισμός του ουρικού οξέος

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, PRPP: 5-φωσφορική-1-πυροφωσφορική ριβόζη, AMP: αδενιλικό οξύ, IMP: ινοσινικό οξύ, GMP: γουανυλικό οξύ, HPRT: υποξανθίνο-φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση, XO: οξειδάση της ξανθίνης

Όπως αναφέρθηκε οι πουρίνες τελικά καταβολίζονται σε ουρικό οξύ. Η *οξειδάση της ξανθίνης (XO)* είναι το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια σε ουρικό οξύ (**Σχήμα 7**). Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από την αλλοπουρινόλη, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής του ουρικού οξέος. Η αλλοπουρινόλη έχει και μια δεύτερη δράση, που ίσως είναι και πιο σημαντική. Μειώνει την ενδοκυτταρική πυκνότητα της ριβοζοφωσφορικής-διφωσφοκινάσης, δηλαδή του ενός από τα δυο ένζυμα που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση των πουρινών ¹⁸.

1.3.2 Ημερήσια παραγωγή του ουρικού οξέος

Στα θηλαστικά το ουρικό οξύ παράγεται από το μεταβολισμό μόνο των πουρινών. Έτσι στον φυσιολογικό άνθρωπο το ουρικό οξύ αποτελεί μόνο το 1-2 % του ολικού αζώτου των ούρων ¹⁹.

Υπολογίζεται ότι σε φυσιολογικά άτομα που υποβάλλονται σε δίαιτα πτωχή σε πουρίνες, παράγονται 600-700 mg ουρικού οξέος την ημέρα, ενώ παράγονται άλλα 200-300mg σε άτομα που υποβάλλονται σε συνηθισμένη διατροφή ²⁰. Τα 450mg περίπου απεκκρίνονται στα ούρα και περίπου 200mg στο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά πολύ λίγο ουρικό οξύ ανευρίσκεται τελικά στα κόπρανα, αφού τα βακτηρίδια του παχέος εντέρου διαθέτουν ουρικάση, αλλαντοϊκάση και ουρεάση που μετατρέπουν το ουρικό οξύ σε αμμωνία και CO₂ ²¹. Η συμμετοχή της εξωγενούς πρόληψης πουρινών στα επίπεδα του ουρικού οξέος είναι μικρή. Μπορεί να υποστηριχθεί ότι το 80% του ουρικού οξέος έχει ενδογενή προέλευση και μόνο το 20% εξωγενή ²². Ένας φυσιολογικός άνθρωπος που καταναλώνει τροφή πτωχή σε πουρίνες έχει μια δεξαμενή ουρικού περίπου 1200mg.

1.3.3 Φυσιολογικές τιμές του ουρικού οξέος στο αίμα

Τα επίπεδα του ουρικού στο αίμα εξαρτώνται τόσο από το ρυθμό της παραγωγής του από τον καταβολισμό των πουρινών όσο και από το ρυθμό της απέκκρισης του από τους νεφρούς.

Οι φυσιολογικές τιμές του ουρικού οξέος στον ορό του αίματος κυμαίνονται μεταξύ 3.5 και 7.5mg/dl (200-450 μmol/l).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό είναι:

A) Το φύλλο. Τα επίπεδα του ουρικού οξέος είναι υψηλότερα στους άνδρες (περίπου 20% υψηλότερα) σε σύγκριση με τις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες. Μετά την εμμηνόπαυση τα επίπεδα του ουρικού οξέος στις γυναίκες εξισώνονται με τα αντίστοιχα των ανδρών ²³.

B) Η ηλικία. Τα επίπεδα του ουρικού οξέος στα νεογνά και στα άτομα μικρής ηλικίας (πριν από την εφηβεία) είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα στο αίμα των ενηλίκων ²⁴.

Στον ανθρώπινο ορό το εύρος των τιμών αναφοράς του ουρικού οξέος είναι 4.4 - 7.6 mg/dl (262 - 452 μmol/l) για τους άνδρες και 2.5 - 6.6 mg/dl (137 - 393 μmol/l) για τις γυναίκες.

1.3.4 Νεφρική απέκκριση του ουρικού οξέος

Όπως προαναφέρθηκε, σε ένα φυσιολογικό άτομο τα 2/3 (70%) του ουρικού οξέος απεκκρίνονται διαμέσου των νεφρών. Φυσιολογικά απεκκρίνονται με τα ούρα έως 750mg την ημέρα ουρικού οξέος στις γυναίκες και έως 800mg την ημέρα στους άνδρες. Ο νεφρός διαθέτει ένα πολύ ισχυρό επαναρροφητικό σύστημα που έχει ως αποτέλεσμα η νεφρική αποβολή του ουρικού οξέος να αντιστοιχεί μόλις στο 10% του διηθούμενου φορτίου ²⁵. Έτσι, οι νεφροί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του ουρικού οξέος και πιθανά στην παθογένεια νοσημάτων που σχετίζονται με το ουρικό οξύ. Για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντικό να κατανοηθούν οι μηχανισμοί απέκκρισης του ουρικού από τους νεφρούς.

Σύμφωνα με πολλές μελέτες το ουρικό οξύ, παρόλο που κατά 5% είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, διηθείται πλήρως στο νεφρικό σπείραμα ²⁶⁻²⁸. Το 1950 οι Praetorius και Kirk περιέγραψαν περίπτωση ασθενούς με υποουριχαιμία και κλασματική απέκκριση (FE%) του ουρικού οξέος 146%. Δηλαδή, απεκκρίθηκε 46% περισσότερο από το διηθούμενο φορτίο ουρικού οξέος. Οι συγγραφείς οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι το ουρικό οξύ εκκρίνεται από τα νεφρικά σωληνάκια ²⁹. Το 1959 οι Gutman και συν. δημοσίευσαν μελέτη με πιο τεκμηριωμένες απόψεις όσον αφορά τη σωληναριακή απέκκριση του ουρικού οξέος, μετά τη χορήγηση σουλφυν-πυραζόνης και διαλυμάτων μανιτόλης και ουρικού οξέος σε ασθενείς με ήπια νεφρική ανεπάρκεια. Με τεχνική κάθαρσης βρέθηκε ότι η σχέση του αποβαλλόμενου προς το διηθούμενο ουρικό οξύ ήταν πάνω από τη μονάδα, δηλ. η FE% του ουρικού οξέος >100% ³⁰. Η εκκριτική ικανότητα του σωληναρίου υποστηρίχθηκε και από άλλες μελέτες ^{31, 32}. Αντίθετα, δεν υπήρχαν στοιχεία επανέκκρισης του ουρικού οξέος από το άπω σωληνάριο ³². Το 1961 ο ίδιος ερευνητής παρουσίασε μια πιο ολοκληρωμένη άποψη σύμφωνα με την οποία το ουρικό οξύ του πλάσματος στον άνθρωπο και στα άλλα θηλαστικά διηθείται πλήρως στο σπείραμα, επαναρροφάται με ενεργητική μεταφορά στα σωληνάκια, ενώ ο νεφρός έχει τη δυνατότητα ενεργητικής σωληναριακής έκκρισης του ουρικού οξέος. Προτάθηκε δηλαδή ο αποκαλούμενος μηχανισμός των *τριών συστατικών* “*the three components mechanism*” ³³.

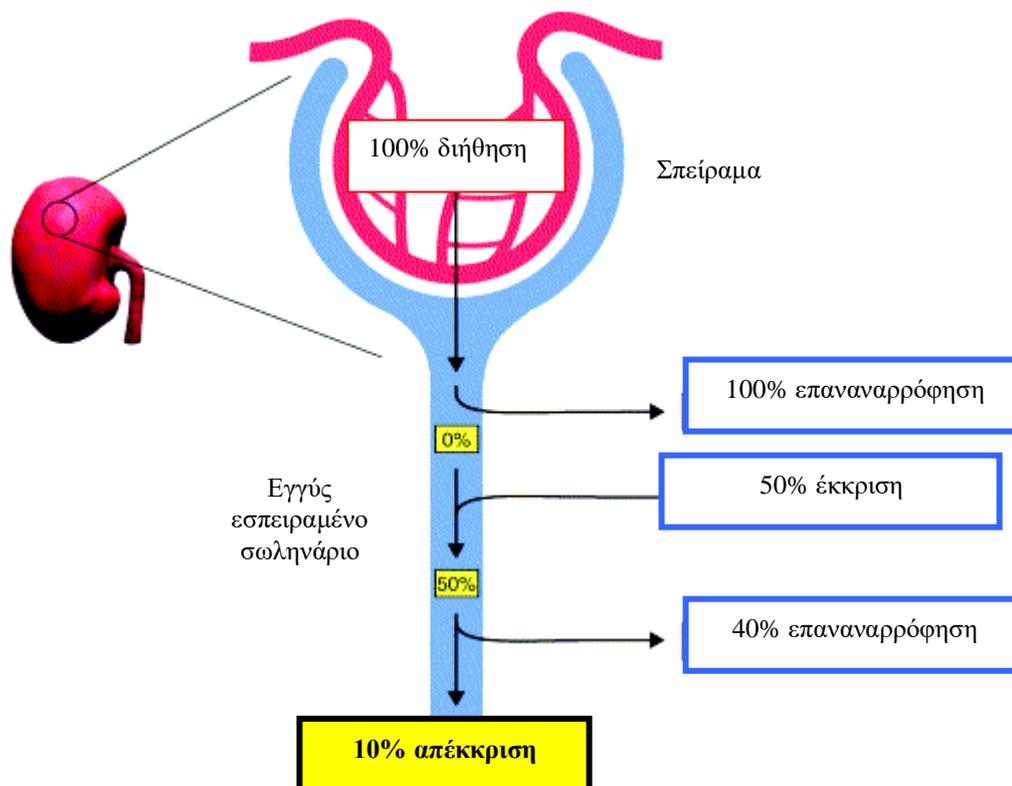
Νεότερα όμως δεδομένα δείχνουν ότι η απέκκριση του ουρικού οξέος είναι περισσότερο πολύπλοκη από ότι προηγούμενα είχε διατυπωθεί και έτσι τελικά προτάθηκε το μοντέλο της μετεκκριτικής επαναρροφήσεως “*post-secretory reabsorptive site model*” ή αλλιώς **μοντέλο των τεσσάρων συστατικών** “*four components model*” ³⁴⁻³⁶ (**Σχήμα 8**).

Η μετεκκριτική επαναρρόφηση αποδείχθηκε με έμμεσο τρόπο με τη χρησιμοποίηση της πυραζιναμίνης (PZA). Η χρησιμοποίηση της PZA ξεκίνησε με την παραδοχή ότι το φάρμακο αυτό αναστέλλει σχεδόν πλήρως τη σωληναριακή έκκριση του ουρικού οξέος, ενώ δεν επηρεάζει την επαναρρόφηση του. Μετά τη χορήγηση PZA σε φυσιολογικό άτομο, η αποβολή του ουρικού οξέος περιορίζεται σε σημαντικό βαθμό³⁷. Έτσι με τη χορήγηση PZA σε συνδυασμό με ουρικοζουρικά φάρμακα βρέθηκε ότι

περιορίζεται η δράση των ουρικοζουρικών φαρμάκων^{34, 37}. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα ουρικοζουρικά φάρμακα μειώνουν την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος σε μια περιοχή του σωληναρίου που βρίσκεται μετά την αναστολή της σωληναριακής έκκρισης από την ΡΖΑ, δηλαδή, στην ονομαζόμενη «μετεκκριτική επαναρροφητική περιοχή».

Έτσι, το πρότυπο της νεφρικής απεκκρίσεως του ουρικού οξέος, όπως έχει διαμορφωθεί και είναι σήμερα αποδεκτό, έχει ως εξής:

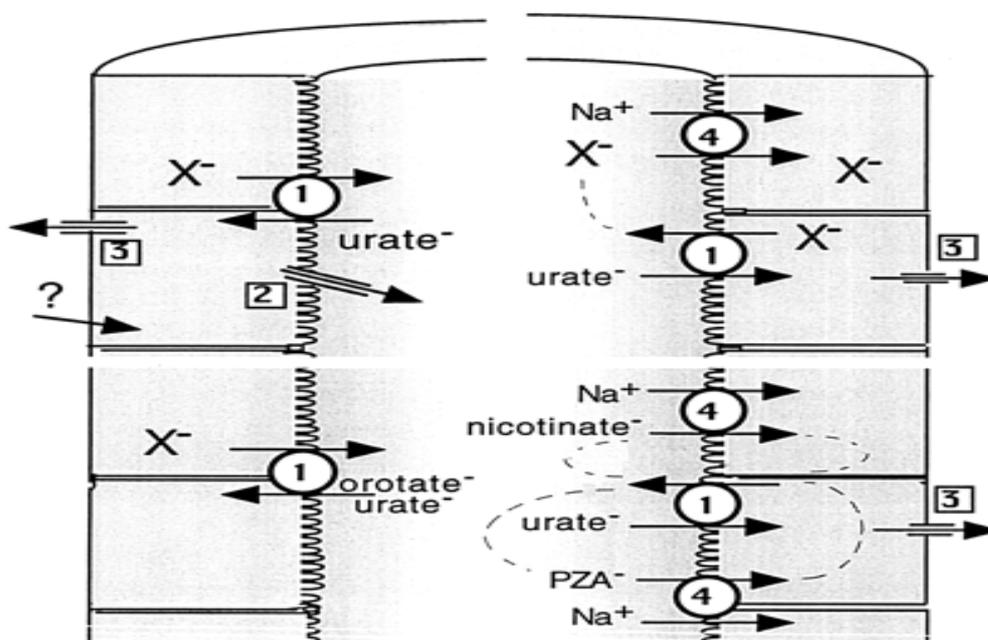
1) το ουρικό οξύ διηθείται πλήρως στο νεφρικό σπείραμα. 2) Στη συνέχεια επαναρροφάται σχεδόν εξολοκλήρου (κατά 99.3%) στο αρχικό τμήμα (S1) του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. 3) Ακολούθως, σε μια πιο απομακρυσμένη περιοχή του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (S2) γίνεται η σωληναριακή έκκριση του ουρικού οξέος σε ποσοστό 50% περίπου του αρχικά διηθούμενου φορτίου. 4) Τέλος, επαναρροφάται ένα ποσοστό 80% του εκκρινόμενου ουρικού οξέος σε μια μετεκκριτική θέση που βρίσκεται στο τελικό τμήμα (S3) του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και η οποία είναι «ευαίσθητη» στη δράση των ουρικοζουρικών φαρμάκων (**Σχήμα 8**)³⁸.



Σχήμα 8. Το μοντέλο των τεσσάρων συστατικών μεταφοράς του ουρικού οξέος

1.3.5 Μηχανισμοί μεταφοράς του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο

Οι μηχανισμοί μεταφοράς όσον αφορά το ουρικό οξύ, όπως και τα οργανικά ανιόντα γενικότερα, είναι εντοπισμένοι στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Μελέτες μικροπαρακεντήσεων και μικροδιαχύσεων ουρικού οξέος, έδειξαν ότι το ουρικό οξύ έχει μια μεταφορά διπλής κατεύθυνσης, με υπεροχή της επαναρρόφησης, σε είδη όπως οι αρουραίοι, οι σκύλοι και οι πίθηκοι *Cebus* ή με υπεροχή της έκκρισης στους χοίρους και στα κουνέλια ³⁹.



Σχήμα 9 : Μηχανισμοί μεταφοράς του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο.

1: Ανταλλάκτης ανιόντος/ουρικού οξέος, 2: Εξαρτώμενος από τη διαφορά δυναμικού μεταφορέας του ουρικού οξέος (apical voltage-sensitive transporter) στην αυλική μεμβράνη 3: εξαρτώμενος από τη διαφορά δυναμικού μεταφορέας του ουρικού οξέος στην πλαγιοβασική μεμβράνη (basolateral voltage-sensitive transporter), 4: Συμμεταφορείς Νατρίου-Ανιόντος της αυλικής μεμβράνης (sodium-anion cotransporters). Στην εικόνα φαίνεται ότι το οροτικό οξύ που δρά στον ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος από την πλευρά του σωληναριακού αυλού ανταγωνίζεται τη μεταφορά του ουρικού οξέος και επομένως έχει ουρικοζουρική δράση. Αντίθετα, το νικοτινικό οξύ και η πυραζιναμίδη (PZA) αφού μεταφερθούν διαμέσου του συμμεταφορέα Νατρίου-Ανιόντος μέσα στο σωληναριακό κύτταρο, διευκολύνουν την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος και επομένως έχουν αντιουρικοζουρική δράση.

A) Επαναρρόφηση του ουρικού οξέος

Η επαναρρόφηση αποτελεί βασικό μηχανισμό της σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος και παρατηρείται κυρίως στο εγγύς σωληνάριο με ελάχιστη έως καθόλου επαναρρόφηση στο άπω σωληνάριο^{27, 40}. Θεωρητικά κάθε σωληναριακό κύτταρο έχει την ικανότητα να επαναρροφήσει ή να εκκρίνει ουρικό οξύ, αλλά μελέτες έδειξαν ότι η επαναρρόφηση παρατηρείται στο αρχικό S1-τμήμα του εγγύς σωληναρίου και στο τελευταίο S3-τμήμα του εγγύς σωληναρίου, στην ονομαζόμενη «μετεκκριτική επαναρροφητική περιοχή»^{41, 42}. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μεταφορά του ουρικού στο επιθηλιακό κύτταρο του νεφρικού σωληναρίου γίνεται με τη συνεργασία ενός συστήματος συμμεταφοράς ανιόντος/νατρίου και ενός συστήματος αντιμεταφοράς διαμέσου ενός μεταφορέα-ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος (urate-anion exchanger) (**Σχήμα 9**). Έτσι, ουσιαστικά υπάρχει μια έμμεση συμμεταφορά ουρικού οξέος και νατρίου στο νεφρικό σωληνάριο, αφού τα δύο συστήματα μεταφοράς δρουν παράλληλα. Δηλαδή, οργανικά ανιόντα αρχικά εισέρχονται στο σωληναριακό κύτταρο με ένα σύστημα συμμεταφοράς με νάτριο και στη συνέχεια επιστρέφουν στον σωληναριακό αυλό με ανταλλαγή με ουρικό οξύ το οποίο επαναρροφάται. Από το σωληναριακό αυλό ανιόντα, όπως το γαλακτικό, το β-υδροξυβουτυρικό και το ακετοξικό μεταφέρονται μαζί με το νάτριο στο σωληναριακό κύτταρο. Έτσι, εξασφαλίζεται αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών ανιόντων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του ουρικού οξέος στο σωληναριακό κύτταρο, διαμέσου του ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος. Επίσης, αυτά τα ανιόντα παράγονται και από τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό. Έτσι, η αυξημένη επαναρρόφηση του ουρικού οξέος οδηγεί σε μείωση της αποβολής του και σε υπερουριχαιμία. Τέτοια αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος φαίνεται ότι παρατηρείται στους ανθρώπους κατά τη διάρκεια της νηστείας ή αστίας εξαιτίας της συσσώρευσης των κετονών στο σωληναριακό κύτταρο ή επίσης κατά τη διάρκεια πειραματικής έγχυσης β-υδροξυβουτυρικού ή ακετοξεικού οξέος σε υγιή άτομα ⁴³.

Στον ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος δρουν τόσο οι ουρικοζουρικοί όσο και οι αντιουρικοζουρικοί παράγοντες. Η ουρικοζουρική ή η αντιουρικοζουρική

δράση της κάθε ουσίας εξαρτάται από τη θέση από την οποία δρα στον ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος, δηλ. από την πλευρά του σωληναριακού αυλού ή από το εσωτερικό των σωληναριακών κύτταρων. Έτσι, τα ενδοκυττάρια υποστρώματα του ανταλλάκτη ανιόντος/ουρικού οξέος επάγουν την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος (αντιουρικοζουρικοί παράγοντες), ενώ οι ουρικοζουρικοί παράγοντες δρουν από το σωληναριακό αυλό και εμποδίζουν την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος (**Σχήμα 9**)³⁸. Μερικές ουσίες που επηρεάζουν την απέκκριση του ουρικού οξέος φαίνονται στον **πίνακα 3**.

B) Έκκριση του ουρικού οξέος

Η έκκριση του ουρικού οξέος αυξάνει την ποσότητα του ουρικού οξέος στον σωληναριακό αυλό, αφού περισσότερο από το 95% του διηθούμενου ουρικού οξέος συνήθως επαναρροφάται. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το ουρικό οξύ των ούρων ήταν ακριβώς αυτό που διέφυγε την επαναρρόφηση. Με τη βοήθεια όμως φαρμακολογικών μελετών διαπιστώθηκε ότι το ουρικό οξύ που αποβάλλεται είναι προϊόν καθαρής σωληναριακής έκκρισης⁴⁴. Ενδείξεις από μελέτες μικροπαρακεντήσεων και in vitro πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι το ουρικό οξύ εκκρίνεται στο S2-τμήμα του εγγύς σωληναρίου. Η μεταφορά αυτή αποτελεί μια ενεργητική διαδικασία, διαμέσου ενός μεταφορέα που εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού (voltage sensitive transporter)⁴¹.

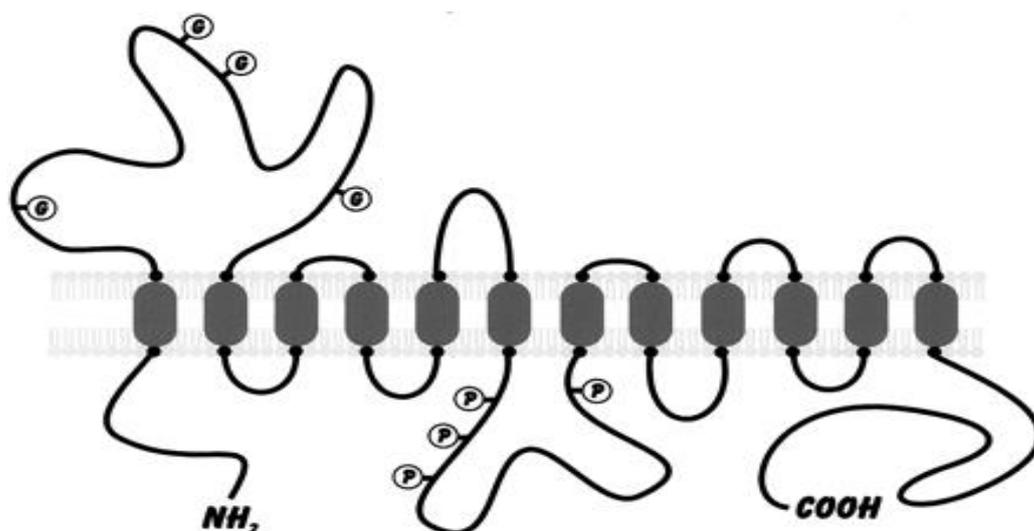
Πίνακας 3. Ουσίες που επηρεάζουν την απέκκριση του ουρικού οξέος

Ουσίες που μειώνουν την απέκκριση του ουρικού οξέος	Ουσίες που αυξάνουν την απέκκριση του ουρικού οξέος
Γαλακτικό οξύ	Οροτικό οξύ (βιτ. Β13)
Ακετοξεϊκό οξύ	Βενζοδιαρόνη
β-υδροξυβουτιρικό οξύ	Προβενεσίδη
Νικοτινικό οξύ	Φαινοφιμπράτη
Πυραζιναμίδη/πυραζινικό οξύ	Λοσαρτάνη
Μικρές δόσεις ασπιρίνης	Μεγάλες δόσεις ασπιρίνης

1.3.6 Νεότερα δεδομένα της σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος

Ο Epomoto και συν. το 2002, μελετώντας το ανθρώπινο γονιδίωμα για γονιδιακές αλληλουχίες συμβατές με την οικογένεια των μεταφορέων οργανικών ανιόντων (OAT-family), ανακάλυψαν ότι μια γονιδιακή αλληλουχία την οποία ονόμασαν SLC22A12 (στο χρωμόσωμα 11q13), εκφράζονταν κυρίως στους νεφρούς. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση του ανθρώπινου νεφρού έδειξε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό, την οποία ονόμασαν URAT1, βρίσκεται στην ψηκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς σωληναρίου του νεφρού. Επιπρόσθετα, μετά την έγχυση του URAT1 σε αυγά βατράχων (*Xenopus*) διαπιστώθηκε ότι το URAT1 είχε την δυνατότητα να δεσμεύει και να μεταφέρει ουρικό οξύ ⁴⁵.

Η πρωτεΐνη URAT1 είναι ένας μεταφορέας οργανικών ανιόντων (organic anion transporters - OAT), ανήκει στην υπεροικογένεια των SLC22 (solute carrier family 22), είναι ένας ανταλλάκτης ουρικού/ανιόντος και αποτελεί «στόχο» (υπόστρωμα) των ουρικοζουρικών και αντιουρικοζουρικών παραγόντων. Έχει παρόμοια δομή με τους μεταφορείς της οικογένειας OAT, αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα, και δυο ενδοκυττάρια άκρα, ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό ⁴⁵. **(Σχήμα 10)**



Σχήμα 10. Ο μεταφορέας του ουρικού οξέος URAT1.

Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την πρωτεΐνη μεταφορέα που είναι υπεύθυνη για την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο ⁴⁵. Τα νεφρικά σωληνάρια άλλων θηλαστικών, όπως των κουνελιών και των χοίρων, δεν διαθέτουν URAT1 και για αυτό το λόγο κυρίως εκκρίνουν ουρικό οξύ από το νεφρικό σωληνάριο. Αντίθετα, ο μηχανισμός έκκρισης του ουρικού οξέος στον άνθρωπο είναι αμελητέος. Επομένως, η ύπαρξη του URAT1 στο νεφρικό σωληνάριο του ανθρώπου φαίνεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του ουρικού οξέος στον ορό του αίματος. Επίσης, η ύπαρξη του URAT1 έχει πολύ μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της δράσης πολλών φαρμάκων ή των προϊόντων του μεταβολισμού τους, όσον αφορά την απέκκριση του ουρικού οξέος. Ο Enomoto και οι συν. στην ίδια μελέτη έδειξαν ότι οι ουσίες που δρουν μέσα από το σωληναριακό αυλό αναστέλλουν άμεσα τη δράση του URAT1 (ουρικοζουρικές ουσίες), ενώ οι αντιουρικοζουρικές ουσίες δρουν από το κυτταρόπλασμα του σωληναριακού κυττάρου και αποτελούν το υπόστρωμα (ανιόν) αντιμεταφοράς που ενισχύει την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος.

Επίσης, μελέτες μικροπαρακέντησης έδειξαν ότι στη μεταφορά του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο συμμετέχουν και άλλοι μεταφορείς της οικογένειας των OAT, παρόμοιας δομής με τον URAT1, όπως ο OAT1, 3 και 4. Από αυτούς τους μεταφορείς, οι OAT1 και 3 βρίσκονται κυρίως στην πλαγιοβασική μεμβράνη του εγγύς σωληναρίου. Φαίνεται λοιπόν ότι αυτοί οι μεταφορείς μεταφέρουν το ουρικό οξύ στο σωληναριακό κύτταρο από τα περισωληναριακά τριχοειδή και όχι από τον αυλό του σωληναρίου. Τέλος, η ισομορφή OAT4, η οποία βρίσκεται κυρίως στον πλακούντα, υπάρχει και στην ψηκτροειδή παρυφή των εγγύς σωληναριακών κυττάρων και έχει παρόμοια δράση με τον URAT1.

Εκτός των αντιμεταφορέων ουρικού οξέος/ανιόντος που προαναφέρθηκαν, πρόσφατα βρέθηκε και ένας μεταφορέας του ουρικού οξέος που λειτουργεί με διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού (voltage-sensitive urate transporter), UAT. Το γονίδιο που κωδικοποιεί αυτόν το μεταφορέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 11 εξώνια. Ο μεταφορέας αυτός εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς και λειτουργεί ως κανάλι μεταφοράς μιας κατευθύνσεως

του ουρικού οξέος. Στο νεφρό βρίσκεται τόσο στην ψηκτροειδή παρυφή όσο και στην πλαγιοβασική μεμβράνη του εγγύς σωληναρίου και είναι υπεύθυνος για την έκκριση του ουρικού οξέος τόσο στο σωληναριακό αυλό όσο και στον περισωληναριακό χώρο.

Παρόλο που πολλές μοριακές και γενετικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη αρκετών μεταφορέων που συμμετέχουν στην σωληναριακή μεταφορά του ουρικού οξέος, η μεταφορά του ουρικού οξέος είναι πολύπλοκη και παραμένει ασαφής.

1.3.7 Το ουρικό οξύ ως αντιοξειδωτική ουσία

Όπως αναφέρθηκε, το μέσο επίπεδο του ουρικού οξέος στον ορό του αίματος των ανθρώπων είναι κοντά στο όριο διαλυτότητας. Αντίθετα, τα ανθρωποειδή (όπως οι πίθηκοι) έχουν δέκα φορές χαμηλότερα επίπεδα. Μια σημαντική αύξηση του ουρικού οξέος έλαβε χώρα κατά την εξέλιξη των ανώτερων ζώων. Ποιο είναι το πλεονέκτημα της επιλογής τόσο υψηλών επιπέδων ουρικού οξέος, κοντά στα όρια της ουρικής αρθρίτιδας, σε πολλούς ανθρώπους; Φαίνεται ότι το ουρικό οξύ έχει μια σημαντική ευεργετική δράση. Είναι ένας πολύ αποδοτικός εκκαθαριστής (scavenger) των υψηλής δραστηριότητας και βλαπτικότητας ριζών οξυγόνου, δηλαδή των ριζών υδροξυλίου, των ανιόντων υπεροξειδίου, του ατομικού οξυγόνου και των οξυγονωμένων ενδιάμεσων της αίμης με τον Fe σε υψηλή οξειδωτική κατάσταση (+4 και +5). Το ουρικό οξύ μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό με διάφορους τρόπους. Διαμέσου της δέσμευσης των ιόντων σιδήρου και χαλκού σε μορφές που δεν επιταχύνουν τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και διαμέσου της απευθείας δέσμευσης οξειδωτικών ουσιών, όπως του μονήρους οξυγόνου, του υποχλωριώδους οξέος και των υπεροξυνιτροδών ριζών ^{46, 47}. Επίσης, προλαμβάνει την αποδόμηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD3) από το H₂O₂, αυξάνοντας τη δυνατότητα της να απομακρύνει τα υπεροξειδικά ανιόντα (O²⁻). Επειδή το O²⁻ αδρανοποιεί το μονοξείδιο του αζώτου (NO), επιτυγχάνεται μια έμμεση αύξηση του NO που είναι μια σημαντική ουσία για τη φυσιολογική ενδοθηλιακή λειτουργία ⁴⁸. Επίσης, μπλοκάρεται ο σχηματισμός του

υπεροξινιτρώδους ανιόντος (ONOO^-) και με αυτό το τρόπο προστατεύονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες από νιτροζυλίωση.

Το ουρικό οξύ ως αντιοξειδωτική ουσία είναι το ίδιο δραστικό με το ασκορβικό οξύ. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι το ασκορβικό και το ουρικό οξύ έχουν παρόμοιες και συμπληρωματικές λειτουργίες στα θηλαστικά. Είναι και οι δύο βασικές αντιοξειδωτικές ουσίες που απαλλάσσουν το πλάσμα του αίματος από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ^{46, 49}. Το ασκορβικό οξύ, επιπλέον, είναι απαραίτητο για αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις, στις οποίες διατηρεί τα ιόντα μεταλλικών συμπαραγόντων στην ανηγμένη τους μορφή και απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες, προφυλάσσοντας τους ιστούς από οξειδωτική καταστροφή. Επιπρόσθετα, το ουρικό οξύ σταθεροποιεί το ασκορβικό οξύ στα βιολογικά υγρά ⁵⁰. Η σπουδαιότητα του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικής ουσίας, είναι ιδιαίτερα εμφανής σε είδη που δεν μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ ⁵¹. Το ουρικό οξύ ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση τόσο σε κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικές μεμβράνες), όσο και σε γενετικό επίπεδο, προστατεύοντας τόσο την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών όσο και το γενετικό υλικό (DNA) αντίστοιχα ⁵².

Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι το ουρικό οξύ δρα ως ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό *in vivo* σε μοντέλα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε συνθήκες οξειδωτικού stress ^{53, 54}. Δυο τυφλές τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση ουρικού οξέος σε υγιείς εθελοντές βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ^{55, 56}.

1.3.8 Άνθρωπος και ουρικό οξύ

Τα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος στον άνθρωπο οφείλονται τόσο στην εξελικτική απενεργοποίηση του ενζύμου της ουρικής όξωσης όσο και στο ισχυρό σύστημα επαναρρόφησης του ουρικού οξέος από τους νεφρούς.

Είναι αξιοπερίεργο το γεγονός ότι το ουρικό οξύ, ένα άχρηστο τελικό μεταβολικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, στον άνθρωπο ανήκει στην κατηγορία των ουσιών που κατακρατούνται με ζήλο από το νεφρό. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται από τη σχεδόν πλήρη επαναρρόφηση του ουρικού οξέος, παρά την ελεύθερη διήθηση του από το νεφρικό σπείραμα,

ώστε η κλασματική απέκκριση του στα ούρα να είναι σχετικά χαμηλή, με αποτέλεσμα να είναι υψηλά τα επίπεδα του στο πλάσμα. Υπάρχουν διαφορές όσον αφορά τη νεφρική αποβολή του ουρικού οξέος μεταξύ διαφόρων ειδών ζώων ⁵⁷. Η κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος στον άνθρωπο είναι η χαμηλότερη στο ζωικό βασίλειο³⁸.

Τα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος στους ανθρώπους σε σύγκριση με τα ανθρωποειδή και άλλα κατώτερα σπονδυλωτά, μπορεί να συνεισφέρουν σημαντικά στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των ανθρώπων και στη χαμηλότερη επίπτωση νεοπλασιών ⁵¹.

1.3.9 Υποουριχαιμία

Η υποουριχαιμία είναι μια αρκετά συχνή διαταραχή της ομοιόστασης του ουρικού οξέος και χαρακτηρίζεται από επίπεδα ουρικού στον ορό χαμηλότερα από 2,5 mg/dl. Βρίσκεται σε ποσοστό 1-2% των νοσηλευόμενων ασθενών, αλλά και στο 0,5% των υγιών ατόμων ^{58, 59}.

Τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό μπορεί να οφείλονται είτε σε μειωμένη παραγωγή του (**μεταβολική υποουριχαιμία**) ή σε αυξημένη απέκκριση του από τους νεφρούς (**νεφρική υποουριχαιμία**). Στη μεταβολική υποουριχαιμία υπάρχουν συγγενή (πρωτοπαθή) η δευτεροπαθή (συνήθως φαρμακογενή) αίτια που περιορίζουν την παραγωγή του ουρικού οξέος ⁶⁰. Τα πιο γνωστά αίτια πρωτοπαθούς μεταβολικής υποουριχαιμίας είναι η ανεπάρκεια ενζύμων του καταβολισμού των πουρινών, όπως της φωσφορυλάσης του πουρινικού νουκλεοζίτη (PNP) και της οξειδάσης της ξανθίνης (κληρονομική ξανθινουρία), ενώ τυπικό παράδειγμα δευτεροπαθούς μεταβολικής υποουριχαιμίας είναι η θεραπεία με αλλοπουρινόλη (ενός ισχυρού αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης). Έτσι τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό είναι χαμηλά, ενώ η νεφρική κάθαρση του ουρικού οξέος είναι φυσιολογική ($FE_{UA} < 10\%$) ⁶⁰.

Αντίθετα, στη νεφρική υποουριχαιμία τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό οφείλονται σε αυξημένη απέκκριση του ουρικού οξέος από τους

νεφρούς (FE_{UA}>10%)⁶¹. Υπάρχουν επίσης δύο τύποι νεφρικής υποουριχαιμίας : η πρωτοπαθής και η δευτεροπαθής νεφρική υποουριχαιμία. Στην πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία η διαταραχή οφείλεται σε νεφρική σωληναριακή βλάβη της επαναρρόφησης ή/και της έκκρισης του ουρικού οξέος και έχει πιθανά γενετικά αίτια. Συγκεκριμένα με τη διαταραχή αυτή έχουν συσχετισθεί βλάβες του γονιδίου SLC22A12 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταφορέα URAT1 του ουρικού οξέος. Η δευτεροπαθής νεφρική υποουριχαιμία είναι μια διαταραχή που συνοδεύει άλλες παθολογικές καταστάσεις ή νοσήματα που συσχετίζονται με αυξημένη απέκκριση ουρικού οξέος από τους νεφρούς, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ο αποφρακτικός ίκτερος, οι ενδοκράνιες παθήσεις, το σύνδρομο της απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης, το σύνδρομο Fanconi, η νευρογενής ανορεξία, η ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, η νόσος Hodgkin και άλλες συμπαγείς ή αιματολογικές νεοπλασίες^{59, 62, 63}. Επίσης, η δευτεροπαθής νεφρική υποουριχαιμία μπορεί να οφείλεται σε φάρμακα που έχουν ουρικοζουρική δράση, όπως η λοσαρτάνη, η φαινοφιμπράτη, η κοτριμοξαζόλη και η προβενεσίδη⁶⁴⁻⁶⁶.

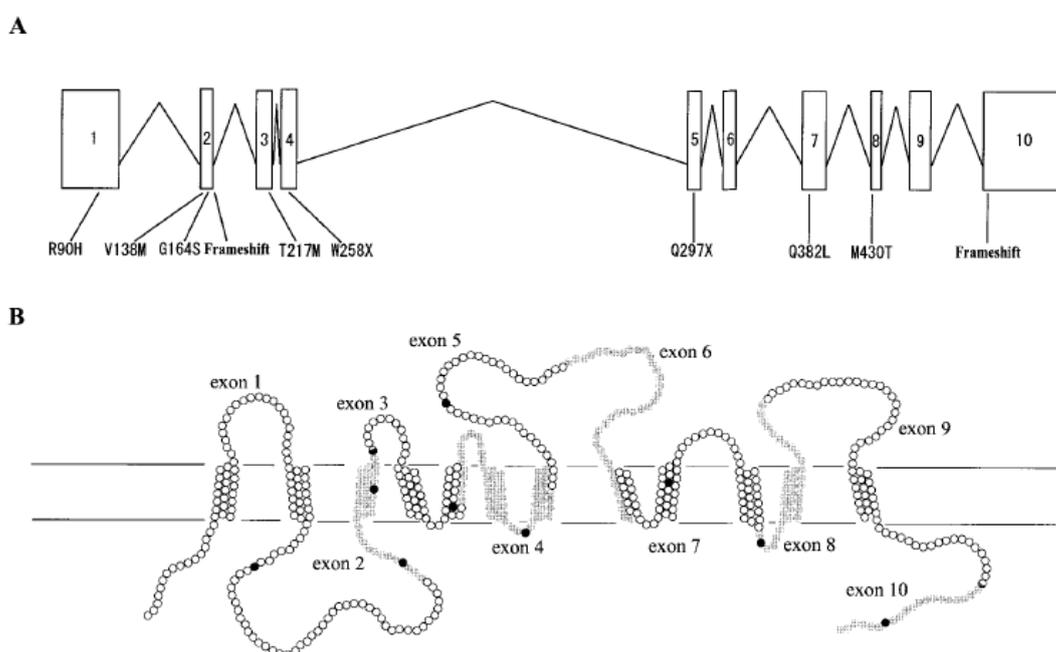
1.3.10 Πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία

Η πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία είναι μια διαταραχή της ομοιόστασης του ουρικού οξέως η οποία χαρακτηρίζεται από επίπεδα ουρικού στον ορό μικρότερα από 2.5mg/dl και από αυξημένη κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος στα ούρα (FE_{UA}>10%). Παρόλο που η διαταραχή δεν συνοδεύεται από συμπτώματα έχουν αναφερθεί περιστατικά νεφρολιθίασης και οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μετά από έντονη άσκηση.

Η πρόσφατη ανακάλυψη του URAT1 άλλαξε τα δεδομένα όσον αφορά το μηχανισμό σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος, το ρόλο του νεφρού στην παθογένεια των διαταραχών του μεταβολισμού του ουρικού οξέος και την επίδραση ορισμένων φαρμάκων στα επίπεδα του ουρικού οξέος.

Η ανάλυση του γονιδίου SLC22A12 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη URAT1, σε ασθενείς με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία ανέδειξε αρκετές

μεταλλάξεις υπεύθυνες που έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του μεταφορέα στο νεφρικό σωληνάριο. Οι περισσότερες μελέτες έγιναν σε Ασιατικό πληθυσμό (ιδιαίτερα σε Ιάπωνες), στον οποίο η συχνότερη μετάλλαξη είναι η G774A (W258X). Ωστόσο, και άλλες μεταλλάξεις φαίνονται να είναι υπεύθυνες για την απενεργοποίηση του μεταφορέα, αλλά σε μικρότερη συχνότητα (R90H, V138M, G164S, T217M, Q297X, Q382L, M430T, Q312L, R477H, T1253G, IVS2+1 G>A και 1639-1643delGTCCT) ⁶⁷ ⁶⁸ (Σχήμα 11 και Πίνακας 4).



Σχήμα 11 : **A.** Το γονίδιο SLC22A12. Τα 10 εξόνια του γονιδίου και οι σημαντικότερες μεταλλάξεις. **B.** Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης URAT1. Κάθε κύκλος αντιπροσωπεύει ένα αμινοξύ. Οι μεταλλάξεις φαίνονται ως μαύροι κύκλοι.

Έτσι, μετά από μία σειρά μελετών οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία είναι μια εκλεκτική διαταραχή του νεφρικού σωληναρίου όσον αφορά την ομοιοστασία του ουρικού οξέος και οφείλεται σε βλάβη του μεταφορέα του ουρικού οξέος εξαιτίας γονιδιακών μεταλλάξεων ⁶⁸⁻⁷⁵.

Πίνακας 4: Οι συχνότερες μεταλλάξεις του γονιδίου SLC22A12⁶⁸

Νουκλεοτίδιο	Αλλαγή Αμινοξέος
1 c.774G >A	W258X
2 c.774G >A, c.269G >A	W258X, R90H
3 c.774G >A, c.412G >A	W258X, V138M
4 c.774G >A, c.650C >T	W258X, T217M
5 c.774G >A, c.889C >T	W258X, Q297X
6 c.774G >A, IVS2 + 1G→A	W258X, Frameshift
7 c.774G >A, c.490G >A	W258X, G164S
8 c.774G >A, c.1639_1643del5	W258X, Frameshift
9 c.774G >A, c.1145A >T	W258X, Q382L
10 c.774G >A, c.1430G >A	W258X, R477H
11 c.774G >A	W258X
12 c.269G >A	R90H
13 c.269G >A	R90H
14 c.650C >T	T217M
15 c.889C >T, IVS2 + 1G→A	Q297X, Frameshift
16 c.894G >T	E298D
17 g.6244–6471del	deletion of D313–333P
18 c.1289T >C	M430T

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία δεν συνοδεύεται από συμπτώματα, αλλά υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μετά από άσκηση, καθώς και ουρολιθίασης. Έχουν περιγράψει δυο μηχανισμοί που είναι πιθανά υπεύθυνοι για αυτές τις επιπλοκές:

A) Ο μηχανισμός της κατακρήμνισης του ουρικού οξέος στα νεφρικά σωληνάκια.

Σε μια σταθερή κατάσταση, οι ασθενείς με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία έχουν αυξημένη κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος, αλλά φυσιολογική 24ωρη απέκκριση (δεδομένου ότι σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία μεταξύ της απέκκρισης και της παραγωγής του ουρικού οξέος). Ωστόσο, εάν τα άτομα αυτά εκτεθούν σε ένα αυξημένο φορτίο ουρικού οξέος,

εμφανίζουν αυξημένη απέκκριση του ουρικού οξέος και τουλάχιστον παροδικά έχουν σημαντική ουρικοζουρία. Η παρατεταμένη ή η έντονη άσκηση συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος που οφείλεται στον καταβολισμό του ATP των μυών και αύξηση της ADP με αποτέλεσμα την παραγωγή υποξανθίνης που μετατρέπεται στη συνέχεια σε ουρικό οξύ στο ήπαρ [43.44]. Έτσι, η σημαντική ουρικοζουρία μπορεί να οδηγήσει σε κατακρήμνιση και κρυστάλλωση του ουρικού οξέος στα νεφρικά σωληνάκια.

B) Ο μηχανισμός παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

Το ουρικό οξύ είναι μια από τις σημαντικές ουσίες του εξωκυττάριου αντιοξειδωτικού συστήματος. Στα φυσιολογικά άτομα, η επαναρρόφηση του διηθούμενου από το νεφρικό σπείραμα ουρικού οξέος και η έκκριση του με τη μετεκκριτική επαναρρόφηση του, εξασφαλίζουν μεγάλη κυκλοφορία του ουρικού οξέος στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα. Η έντονη σωματική άσκηση προκαλεί νεφρική αγγειοσύσπαση και μειωμένη νεφρική ροή αίματος. Μετά τη διακοπή της άσκησης, υπάρχει έντονη επαναιμάτωση. Δημιουργούνται δηλαδή συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Στα άτομα με φυσιολογικά επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα, η κυκλοφορία του ουρικού οξέος στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα εξασφαλίζει επαρκή αντιοξειδωτική άμυνα απέναντι στη βλαπτική δράση των ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, τα άτομα με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία δεν έχουν την απαραίτητη προστατευτική αντιοξειδωτική δράση του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο. Πράγματι, εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων του ουρικού οξέος στο ορό οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια της άσκησης προκαλούν βλάβη του εγγύς σωληναρίου. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η βλάβη του νεφρικού σωληναρίου είναι αναστρέψιμη, σπάνια η διαταραχή αυτή καταλήγει σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια.

1.4 Νεφροτοξικά φάρμακα

Οι νεφροί είναι τα όργανα, διαμέσου των οποίων απομακρύνονται από τον οργανισμό τα περισσότερα φάρμακα και οι μεταβολίτες τους. Είναι αναμενόμενο οι νεφροί να υφίστανται τις συνέπειες της τοξικής δράσης των φαρμάκων. Επιπλέον, η πλούσια αιμάτωση των νεφρών, το εκτεταμένο δίκτυο τριχοειδών, η αυξημένη ενδοσπειραματική πίεση που ευνοεί την παγίδευση ανοσοσυμπλεγμάτων, η λειτουργία πολλαπλών ενζυμικών συστημάτων, η διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών, η σωληναριακή έκκριση και επαναρρόφηση πολλών φαρμάκων, η αποσύνδεση φαρμάκων από τις πρωτεΐνες και η συμπύκνωση των φαρμάκων στον αυλό των σωληναρίων που δημιουργεί πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το πλάσμα, συνθέτουν ένα περιβάλλον που καθιστά τα ενδοθηλιακά, σωληναριακά και διάμεσα νεφρικά κύτταρα ευάλωτα στην τοξική δράση των φαρμάκων. Αν και η βλάβη μπορεί να αφορά οποιοδήποτε τμήμα του νεφρού, τα νεφρικά σωληνάκια αποτελούν τον κύριο στόχο των νεφροτοξικών φαρμάκων. Οι βλάβες είναι συνήθως αναστρέψιμες εάν εντοπισθούν νωρίς και διακοπεί έγκαιρα το υπεύθυνο φάρμακο⁷⁶⁻⁷⁸.

Οι εκδηλώσεις της νεφροτοξικότητας των φαρμάκων ποικίλουν, από υποκλινικές, που συνήθως δεν γίνονται αντιληπτές, έως οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA) που απαιτεί εξωνεφρική κάθαρση. Η ακριβής συχνότητα της νεφροτοξικότητας από φάρμακα δεν είναι εύκολο να προσδιορισθεί. Αναφέρονται ποσοστά οξείας σωληναριακής νέκρωσης και οξείας διάμεσης νεφρίτιδας από φάρμακα έως 18,3% και νεφροτοξικότητας από αντιβιοτικά έως και 36%⁷⁹. Η τοξική δράση των φαρμάκων στο νεφρό μπορεί να εκδηλωθεί ως ONA (προνεφρική αζωθαιμία, οξεία σωληναριακή νέκρωση, οξεία διάμεση νεφρίτιδα, θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, ενδονεφρική και μετανεφρική απόφραξη), σπειραματική βλάβη, διαταραχή των ηλεκτρολυτών, της οξεοβασικής ισορροπίας και χρόνια νεφρική βλάβη⁸⁰.

Περισσότερα από 200 φάρμακα έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση νεφρικής βλάβης, με κυριότερους εκπροσώπους τα αντιβιοτικά, τα σκιαγραφικά μέσα, τους αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Η νεφρική βλάβη είναι συνήθως

αναστρέψιμη και η νεφρική λειτουργία αποκαθίσταται μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Ωστόσο, ορισμένα φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν χρόνια νεφρική βλάβη. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται εγρήγορση από τον κλινικό γιατρό για τον εντοπισμό των πρώιμων σημείων νεφροτοξικότητας και την έγκαιρη διακοπή του υπεύθυνου φαρμάκου.

Τυπικό παράδειγμα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημέρα κλινική πράξη και προκαλούν οξεία νεφρική βλάβη αποτελούν οι αμινογλυκοσίδες.

1.4.1 Αμινογλυκοσίδες

Η ομάδα αυτή των αντιμικροβιακών ουσιών αποτελεί την πρώτη σειρά αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα και σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν η στρεπτομυκίνη, η νεομυκίνη, η καναμυκίνη, η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η διβεκακίνη, η αμικασίνη και η νετιλμικίνη. Οι συνδυασμοί των αμινογλυκοσιδών με τις β-λακτάμες καθιέρωσαν τα φάρμακα αυτά ως απαραίτητους παράγοντες για τη θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια και κυρίως για τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανοσοκατασταλαμένους και ουδετεροπενικούς ασθενείς ⁷⁷.

1.4.2 Μηχανισμός δράσης και αντιμικροβιακό φάσμα των αμινογλυκοσιδών

Ο μηχανισμός δράσης των αμινογλυκοσιδών δεν είναι πλήρως γνωστός. Ωστόσο, είναι αποδεδειγμένο ότι αναστέλλουν τη μεταβολική πρωτεϊνοσύνθεση δρώντας στο επίπεδο της ριβοσωματικής λειτουργίας. Το ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα των αμινογλυκοσιδών περιλαμβάνει κυρίως Gram αρνητικά βακτήρια και σε λιγότερο βαθμό Gram θετικούς κόκκους. Χαρακτηριστική είναι η ταχεία βακτηριοκτόνος δράση τους έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, καθώς και το αποκαλούμενο "post antibiotic effect" (χρονική διάρκεια αναστολής του πολλαπλασιασμού των μικροβίων μετά την απομάκρυνση του αντιβιοτικού), στο οποίο βασίζεται η άποψη για την εφάπαξ χορήγηση της συνολικής ημερησίας δόσης των αμινογλυκοσιδών ⁸¹.

Οι αμινογλυκοσίδες έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Απορροφούνται ελάχιστα από το γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ απορροφούνται ικανοποιητικά μετά από ενδομυϊκή χορήγηση και μπορούν να χορηγηθούν σε ενδοφλέβια στάγδην έγχυση. Διέρχονται τον πλακούντα, αλλά δεν διέρχονται στο ΕΝΥ και το υδατοειδές υγρό του οφθαλμού ακόμα και παρουσία φλεγμονής. Δεν συγκεντρώνονται στα χοληφόρα όταν υπάρχει απόφραξη. Η κινητική τους στις βρογχικές εκκρίσεις δεν δίνει ικανοποιητικά επίπεδα για την αντιμετώπιση χρόνιων λοιμώξεων του βρογχικού δένδρου που οφείλονται σε *P. aeruginosa*. Οι αμινογλυκοσίδες διεισδύουν καλά στο αρθρικό, το πλευριτικό και το περικαρδιακό υγρό, καθώς και στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Δεν μεταβολίζονται και απεκκρίνονται σχεδόν αποκλειστικά με σπειραματική διήθηση από τους νεφρούς και έχουν κάθαρση ανάλογη με την κάθαρση της ενδογενούς κρεατινίνης. Ο χρόνος υποδιπλασιασμού τους στον ορό κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4 ωρών σε φυσιολογική νεφρική λειτουργία, ενώ ο χρόνος παρατείνεται σε νεφρική ανεπάρκεια και επομένως είναι αναγκαία η τροποποίηση του δοσολογικού σχήματος ανάλογα με το βαθμό της. Η τροποποίηση γίνεται είτε με μείωση της δόσης βάσει νομογραμμάτων που βασίζονται στην κρεατινίνη του ορού ή την κάθαρση της κρεατινίνης⁸².

Η στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για τη θεραπεία της φυματίωσης και της βρουκέλλωσης. Η χρήση της σε λοιμώξεις από άλλα βακτήρια δημιουργεί ταχέως ανθεκτικά στελέχη. Η νεομυκίνη είναι πολύ τοξική σε παρεντερική χορήγηση και χρησιμοποιείται μόνο από το στόμα για αντισηψία του εντέρου ή τοπικά. Η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η σισομυκίνη, η διβεκακίνη, η αμικασίνη και η νετιλμικίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία λοιμώξεων από εντεροβακτηροειδή, *Pseudomonas aeruginosa* και ορισμένα στελέχη σταφυλοκόκκων. Πολλά από τα αρχικά ευαίσθητα στελέχη εντεροβακτηροειδών (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. Cloacae* και είδη *Acinetobacter*), *P. Aeruginosa*, καθώς και σταφυλοκόκκων έχουν αναπτύξει αντοχή στις αμινογλυκοσίδες διαμέσου της παραγωγής ενζύμων που τις αδρανοποιούν⁸³. Το γεγονός αυτό αποτελεί σήμερα ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα στις νοσοκομειακές λοιμώξεις της χώρας μας.

1.4.3 Παρενέργειες των αμινογλυκοσιδών

Οι κύριες τοξικές επιδράσεις των αμινογλυκοσιδών είναι η νεφροτοξικότητα και η ωτοτοξικότητα. Λιγότερο συχνές παρενέργειες είναι ο αποκλεισμός των νευρομυϊκών συνάψεων, οι αλλεργικές αντιδράσεις, η ναυτία, οι έμετοι και η αύξηση των ηπατικών ενζύμων.

Η νεφροτοξικότητα των αμινογλυκοσιδών αποτελεί βασικό πρόβλημα στη χρήση τους, αν και η δυνατότητα που παρέχεται σήμερα στα περισσότερα νοσοκομεία για τη μέτρηση των επιπέδων τους στο αίμα και τη προσαρμογή ανάλογα της δοσολογίας τους δίνει τη δυνατότητα αποφυγής της. Επιπλέον η χορήγηση σε μια εφάπαξ δόση, ενώ είναι εξίσου αποτελεσματική, φαίνεται ότι μειώνει την τοξικότητα^{84, 85}.

Η ωτοτοξικότητα ακολουθεί συνήθως την νεφροτοξικότητα και συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των αμινογλυκοσιδών στην έσω λέμφο και την εκλεκτική διαδοχική καταστροφή των τριχωτών κυττάρων του οργάνου του Corti και του αγγειώδους πετάλου του έξω τοιχώματος του κοχλιακού πόρου, που έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την απώλεια της ακοής στις υψηλές συχνότητες και στη συνέχεια τη σκλήρυνση του ακουστικού νεύρου και την πλήρη κώφωση. Οι διάφορες αμινογλυκοσίδες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά το βαθμό ωτοτοξικότητας και το είδος της, δηλαδή αιθουσαία ή κοχλιακή. Η καναμυκίνη και η αμικασίνη προκαλούν κυρίως βλάβη του κοχλιακού νεύρου, ενώ η γενταμικίνη και η τομπραμυκίνη κυρίως του αιθουσαίου νεύρου. Η στρεπτομυκίνη μπορεί να προκαλέσει βλάβη και στα δύο νεύρα. Η ωτοτοξικότητα του κοχλιακού νεύρου είναι συνήθως μη αναστρέψιμη⁸⁶.

Νευρομυϊκή παράλυση παρατηρείται σπάνια μετά από ταχεία ενδοφλέβια χορήγηση αμινογλυκοσίδης και συνήθως σε ασθενείς με μυασθένεια ή σε ασθενείς που λαμβάνουν συγχρόνως γενικά αναισθητικά ή άλλα φάρμακα που προκαλούν νευρομυϊκό αποκλεισμό, όπως δεκαμεθόνιο, σουξινυλοχολίνη ή κουράριο, κινιδίνη, ή μαγνήσιο⁸⁷.

1.4.4 Νεφροτοξικότητα από αμινογλυκοσίδες

Στους νοσοκομειακούς ασθενείς, οι αμινογλυκοσίδες είναι το συχνότερο αίτιο νεφροτοξικότητας από φάρμακα. Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια από

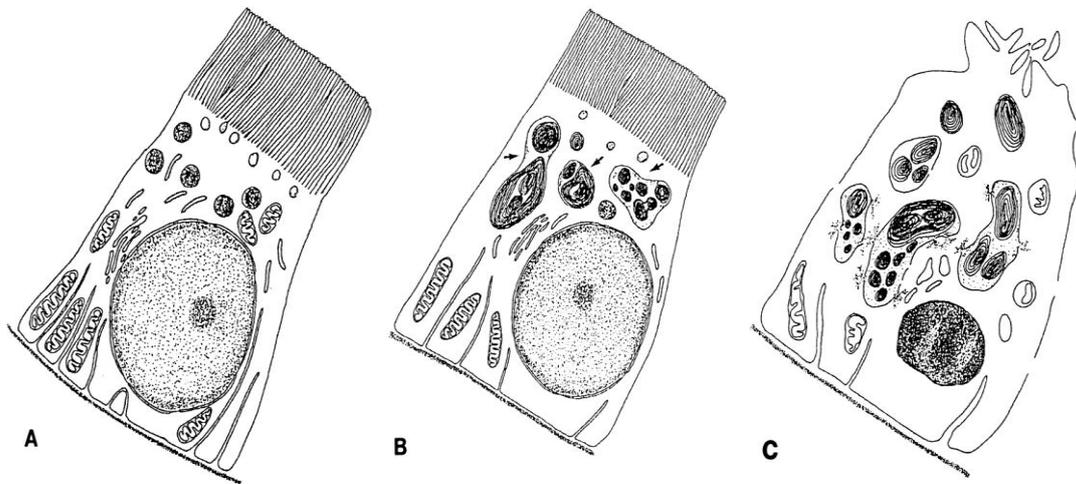
αμινογλυκοσίδες είναι συνήθως αναστρέψιμη. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιστατικά μόνιμης νεφρικής βλάβης μετά από χορήγηση αμινογλυκοσιδών. Τα πρώιμα σημεία νεφροτοξικότητας είναι αναστρέψιμα και δεν επιβάλλουν τη διακοπή της χορήγησης των αμινογλυκοσιδών. Πρέπει όμως κατά τη χρήση τους να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες κινδύνου νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες. Σε ιδιαίτερο κίνδυνο βρίσκονται οι ηλικιωμένοι ασθενείς, οι ασθενείς που λαμβάνουν διουρητικά ή άλλα νεφροτοξικά φάρμακα, οι ασθενείς με υποογκαιμία, καθώς και οι ασθενείς με προϋπάρχουσα χρόνια νεφρική βλάβη ⁸⁸. Η ONA που οφείλεται σε αμινογλυκοσίδες είναι συνήθως μη ολιγουρική και αποτελεί σχετικά συχνή επιπλοκή της αγωγής με αμινογλυκοσίδες. Μπορεί να προκληθεί έστω και αν παρακολουθούνται τακτικά τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα ⁸⁹. Οφείλεται σε άμεση τοξική δράση του φαρμάκου στο νεφρικό σωληνάριο και η επίπτωση της κυμαίνεται από 2% έως και 50% με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται σε ασθενείς με βαριά κλινική κατάσταση.

1.4.5 Μηχανισμός νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών

Οι αμινογλυκοσίδες προσβάλλουν κυρίως την ψηκτροειδή παρυφή των κυττάρων του εγγύς νεφρικού σωληναρίου. Η τοξικότητα είναι αποτέλεσμα της αθροιστικής συγκέντρωσης του φαρμάκου στο νεφρικό φλοιό εξαιτίας πινοκύτωσης από τα κύτταρα των εγγύς σωληναρίων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη παράταση του χρόνου ημίσειας ζωής του φαρμάκου στο νεφρικό ιστό πάνω από 100 ώρες, σε σύγκριση με το φυσιολογικό χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα που είναι 3 ώρες ⁹⁰.

Ο ακριβής μηχανισμός της νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Η νεφροτοξικότητα φαίνεται ότι σχετίζεται με τον αριθμό των αρνητικά φορτισμένων αμινομάδων. Η νεομυκίνη έχει το μεγαλύτερο αριθμό αμινομάδων και ακολουθούν κατά σειρά η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η αμικασίνη και η στρεπτομυκίνη. Πρόκειται για οργανικές βάσεις, οι οποίες διηθούνται ελεύθερα, εισέρχονται στο κύτταρο με πινοκύτωση, διαμέσου του υποδοχέα megalin, που βρίσκεται στην ψηκτροειδή παρυφή των νεφρικών σωληναρίων και μεταφέρονται στα

λυσosώματα, όπου συσσωρεύονται και προκαλούν μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν τις λυσοσωματικές φωσφολιπάσες, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των φωσφολιπιδίων⁹¹. Όταν η συγκέντρωση των αμινογλυκοσιδών και των φωσφολιπιδίων υπερβεί ένα κρίσιμο όριο, επέρχεται λύση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και οι ισχυρές υδρολάσες διαταράσσουν βασικές λειτουργίες του κυττάρου (μιτοχονδριακή αναπνοή, σύνθεση πρωτεϊνών, ομοίωση ασβεστίου) και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (**Σχήμα 12**).



Σχήμα 12 . Αλλαγές στη δομή των εγγύς σωληναριακών κυττάρων κατά τη θεραπεία με αμινογλυκοσίδες. (A) Φυσιολογικό κύτταρο του επιθηλίου του εγγύς νεφρικού σωληναρίου (B) Αύξηση του μεγέθους των λυσοσωμάτων που προκαλείται από σταδιακή συσσώρευση φωσφολιπιδίων. (C) Όταν η συγκέντρωση των αμινογλυκοσιδών και των φωσφολιπιδίων υπερβεί ένα κρίσιμο όριο, επέρχεται λύση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και οι ισχυρές υδρολάσες διαταράσσουν βασικές λειτουργίες του κυττάρου, καθώς και την αρχιτεκτονική του κυττάρου (μιτοχονδριακό οίδημα, λύση της συνέχειας της κυτταρικής μεμβράνης, καταστροφή των μικρολαχνών της ψηκτροειδούς παρυφής) και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο⁹¹

Ασθενείς με υποκείμενη νεφρική νόσο, μείωση του ενδαγγειακού όγκου, προχωρημένη ηλικία ή ασθενείς που λαμβάνουν νεφροτοξικά φάρμακα, όπως αμφοτερικίνη, cisplatin ή σκιαγραφικές ουσίες είναι περισσότερο επιρρεπείς στην νεφροτοξικότητα των αμινογλυκοσίδων .

Η έναρξη της νεφρικής ανεπάρκειας είναι συνήθως βραδύτερη και η ημερήσια άνοδος της κρεατινίνης του ορού τείνει να είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται σε ΟΝΑ από άλλα αίτια. Πρώιμες εκδηλώσεις αποτελούν η αύξηση ορισμένων σωληναριακών ενζύμων στα ούρα (N-ακετυλ-β-γλυκοζαμινιδάση - NAG, β-γαλακτοσιδάση - GAL, αλκαλική φωσφατάση - ALP), η γλυκοζουρία και η μαγνησιουρία ⁹². Στη συνέχεια εμφανίζεται διαταραχή της συμπυκνωτικής ικανότητας του νεφρώνα με παθολογικά ευρήματα στα ούρα, όπως η λευκωματουρία, η παρουσία λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων, η κυλινδρουρία, καθώς και η αύξηση της ουρίας και της κρεατινίνης του ορού συνήθως μετά από 5-7 ημέρες θεραπείας. Σε πάνω από το 50% των ασθενών με νεφροτοξική βλάβη, η μείωση της νεφρικής λειτουργίας εμφανίζεται μετά τη συμπλήρωση της θεραπείας. Η αποκατάσταση από τις νεφροτοξικές δράσεις της θεραπείας με αμινογλυκοσίδες είναι συνήθως αργή και συχνά απαιτεί 4 έως 6 εβδομάδες. Ωστόσο, σε ορισμένους ασθενείς, ιδιαίτερα αυτούς με προϋπάρχουσα νεφρική ανεπάρκεια η νεφρική λειτουργία μπορεί να μην αποκατασταθεί πλήρως ⁸⁹.

Η μελέτη της νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη διαφόρων κρίσιμων μηχανισμών, η γνώση των οποίων μπορεί να επιτρέψει την ασφαλέστερη χρήση αυτών των φαρμάκων. Μεταξύ των διαφόρων προσεγγίσεων, μόνο η εφ' άπαξ ημερήσια δόση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη κλινική πράξη. Επειδή η νεφροτοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη (δόση και διάρκεια θεραπείας) συνιστάται να αποφεύγεται η παρατεταμένη χορήγηση των αμινογλυκοσιδών. Άλλες στρατηγικές για τη μείωση της νεφροτοξικότητας, όπως η συγχορήγηση πολυασπαρατικού οξέος ή δεσφεριοξαμίνης χρειάζονται περισσότερες κλινικές μελέτες για να αποδείξουν την προστατευτική τους δράση ⁸⁹. Η θεραπεία της νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες είναι κυρίως υποστηρικτική ⁹³.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η νεφροτοξικότητα από τις αμινογλυκοσίδες παρατηρείται συχνά σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε μια παθολογική κλινική. Έτσι, έχει ιδιαίτερη σημασία η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση διακοπή του φαρμάκου, διαδικασίες που απαιτούν σωστή αξιολόγηση των

εργαστηριακών παραμέτρων και γνώση του μηχανισμού νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών μέσα από νέες τεχνικές αναγνώρισης των πρώιμων εκδηλώσεων της τοξικής επίδρασης των αμινογλυκοσιδών στο νεφρό. Μια τέτοια τεχνική είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR) που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη.

1.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

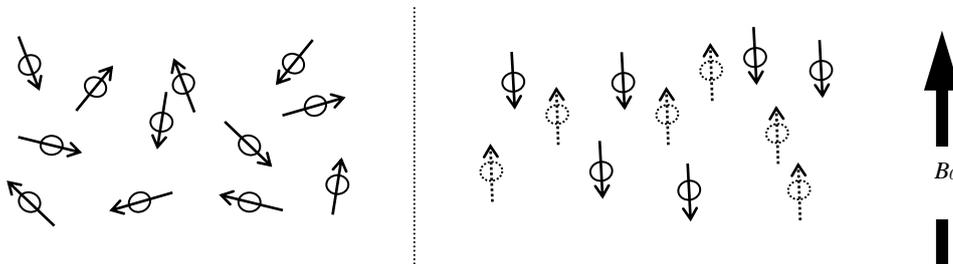
1.5.1 Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μία ευαίσθητη πυρηνική αναλυτική τεχνική με εφαρμογές στη Φυσική, Χημεία, Βιοχημεία, Βιοφυσική και στην Ιατρική. Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μία μορφή απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που από δείγμα, σε συχνότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν τους πυρήνες του δείγματος. Ένα φάσμα NMR είναι ουσιαστικά ένα διάγραμμα των κορυφών απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα συντονισμού. Τα πρώτα πειράματα NMR έγιναν το 1938 από τους Rabi και συνεργάτες σε μοριακές δέσμες ⁹⁴ και στη συνέχεια το 1945 από τον Bloch και τους συνεργάτες του ⁹⁵ στο Πανεπιστήμιο Stanford της Καλιφόρνιας και τον Purcell και τους συνεργάτες του ⁹⁶ στο Πανεπιστήμιο Harvard της Μασαχουσέτης (1952, βραβείο Nobel Φυσικής για τους δύο ερευνητές).

Αναλύοντας τις τρεις λέξεις του ονόματος του φαινομένου προκύπτει ότι ο όρος *Πυρηνικός* αναφέρεται στο χώρο της ύλης από τον οποίο προέρχεται το σήμα -η πληροφορία- διότι βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με μη μηδενική ολική στροφορμή. Ο όρος *Μαγνητικός* αναφέρεται στην ιδιότητα του χώρου με την οποία συσχετίζεται άμεσα το φαινόμενο, δηλαδή το μαγνητικό πεδίο των ατομικών πυρήνων της ύλης. Ο τρίτος όρος, *Συντονισμός*, αναφέρεται στη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να ανιχνευθεί το σήμα. Το NMR είναι ένα φαινόμενο διπλού χρόνου. Στον πρώτο χρόνο οι πυρήνες των ατόμων της ύλης (δέκτες) διεγείρονται κατά την αλληλεπίδραση τους με παλμούς ραδιοσυχνότητας από το πηνίο εκπομπής (πομπός). Στο δεύτερο χρόνο οι ίδιοι πυρήνες, λειτουργώντας ως πομποί, αποδιεγείρονται κατά την αλληλεπίδραση τους με το γειτονικό μοριακό τους περιβάλλον, εκπέμποντας ενέργεια με τη μορφή ραδιοσυχνότητας που λαμβάνεται από το πηνίο λήψης (δέκτης). Το σήμα καταγράφεται στη διάρκεια του 2^{ου} χρόνου, δηλαδή κατά την αποδιέγερση των πυρήνων από τη διεγερμένη τους κατάσταση στην κατάσταση της θερμοδυναμικής τους ισορροπίας (Θ. Ι.).

Οι πυρήνες όλων των στοιχείων περιέχουν φορτία και όταν περιστρέφονται, λόγω των ιδιοπεριστροφών τους (**spin**), συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα (μικροσκοπικός μαγνήτης) και επάγουν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής. Το μέγεθος του δημιουργούμενου διπόλου αποτελεί θεμελιώδη πυρηνική ιδιότητα που καλείται *πυρηνική μαγνητική ροπή* (μ) Η ένταση των μαγνητικών αυτών πεδίων εξαρτάται από τη *μαγνητική διπολική ροπή* ή *πυρηνική μαγνητική ροπή* μ , η οποία αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα των πυρήνων. Η *ολική πυρηνική στροφορμή* I , είναι ένα επίσης θεμελιώδες διανυσματικό μέγεθος που χαρακτηρίζει τους πυρήνες και το διάνυσμα της είναι παράλληλο ή αντιπαράλληλο με το διάνυσμα της μαγνητικής ροπής και δίνεται από τη σχέση: $\mu = \gamma I$, όπου ο *παράγοντας* γ καλείται πυρηνικός γυρομαγνητικός λόγος και αποτελεί χαρακτηριστικό του κάθε πυρήνα (πρωτόνιο $\gamma=2.79$ και νετρόνιο $\gamma=-1.909$). Η εμφάνιση μη μηδενικής γωνιακής στροφορμής I , άρα και μη μηδενικής μαγνητικής διπολικής ροπής μ σε ένα πυρήνα εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των πρωτονίων και νετρονίων, δηλαδή των νουκλεονίων.⁹⁷

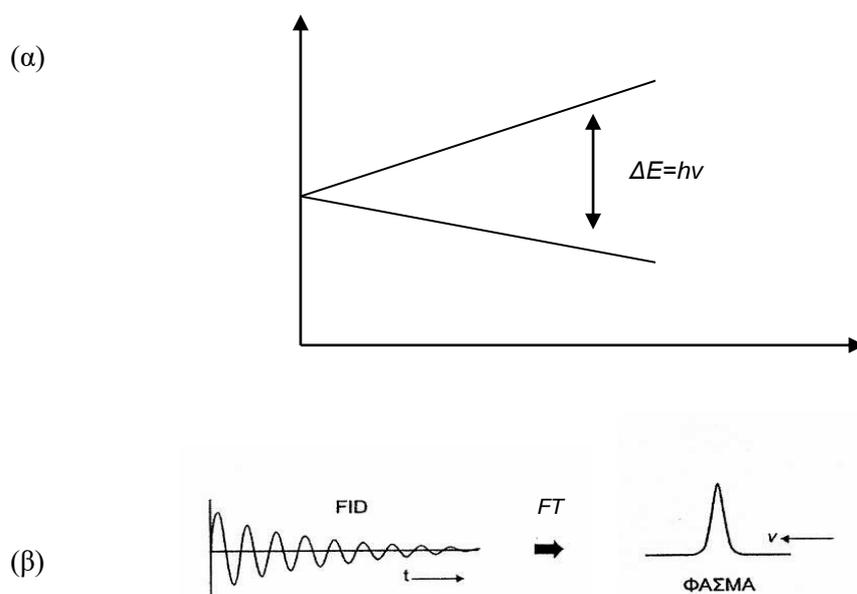
Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα ανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο (**Σχήμα 13α**). Με την παρουσία όμως εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 κατά μήκος του άξονα z επιλέγεται μια φυσική διεύθυνση προς την οποία τείνουν να προσανατολισθούν οι μαγνητικές ροπές των πυρήνων: παράλληλα προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) ή αντιπαράλληλα (υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση) (**Σχήμα 13β**).



Σχήμα 13. Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

Η τιμή της γωνιακής στροφορμής (I) του πυρήνα του πρωτονίου είναι $\frac{1}{2}$ και επομένως μπορεί να έχει δυο δυνατούς προσανατολισμούς: παράλληλα προς το μαγνητικό πεδίο B_0 ($I=1/2$, χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) και αντιπαράλληλα ($I=-1/2$, υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση). Η μετάβαση από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση πραγματοποιείται με την απορρόφηση ενέργειας γνωστής ως ενέργεια διέγερσης, η οποία είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δυο καταστάσεων (**Σχήμα 14α**). Η ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών είναι ανάλογη της έντασης του μαγνητικού πεδίου B_0 .

Η εκθετική εξασθένιση του σήματος κατά την αποδιέγερση των πυρήνων καλείται **ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free Induction Decay-FID)**, η οποία αποθηκεύεται στη μνήμη του υπολογιστή και μετατρέπεται με μια μαθηματική συνάρτηση γνωστή ως «μετασχηματισμός *Fourier*» σε σήμα συχνοτήτων, το φάσμα NMR (**Σχήμα 14β**).



Σχήμα 14. α) Μεταβάσεις μεταξύ δύο καταστάσεων που παρατηρούνται με την απορρόφηση ή εκπομπή κβαντικής ενέργειας ισοδύναμης με την ενεργειακή διαφορά των δυο καταστάσεων **β)** Επεξεργασία της FID από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

FT: Fourier Transformation, FID: ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή

1.5.2. Δημιουργία σήματος NMR

Το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε κατάλληλα δευτεριωμένο διαλύτη μεταφέρεται σε ειδικό γυάλινο σωληνάριο NMR με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα που βρίσκεται μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Η ακτινοβολία με παλμούς ραδιοσυχνοτήτων (συνήθως παλμός 90°) εκπέμπεται από ένα πηνίο (πομπός) που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα για χρονικό διάστημα μερικών μsec . Ο ραδιοπαλμός δεν είναι μονοχρωματικός, αλλά περιλαμβάνει ένα εύρος συχνοτήτων ($\sim\text{MHz}$) γύρω από την κεντρική συχνότητα εκπομπής του ν_0 . Το εύρος των συχνοτήτων μπορεί να θεωρηθεί ως μια κατανομή γύρω από την κεντρική συχνότητα $\nu_0 \pm 1/t_p$, όπου t_p είναι η διάρκεια εφαρμογής του παλμού. Με τον τρόπο αυτό διεγείρονται ταυτόχρονα όλοι οι πυρήνες πρωτονίου και ο καθένας αποδιεγείρεται ανάλογα με το γειτονικό ηλεκτρονιακό του περιβάλλον. Το πείραμα επαναλαμβάνεται αρκετές φορές για να ενισχυθεί το σήμα, αφήνοντας στο ενδιάμεσο κάποιο χρονικό διάστημα για την πλήρη αποδιέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος. Τα δεδομένα καταγράφονται με τη μορφή ενός σήματος συνάρτησης χρόνου (FID), το οποίο όπως προαναφέρθηκε, μετατρέπεται με το μετασχηματισμό Fourier σε συνάρτηση συχνοτήτων

1.5.2.1. Επίδραση παλμών

Αρχικά, η μαγνήτιση του πυρήνα είναι παράλληλη με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε μια διεύθυνση παράλληλη προς τον άξονα $+z$. Με την εφαρμογή ενός παλμού κατά μήκος ενός κάθετου προς τον z άξονα (π.χ. κατά μήκος του $+x$, $-x$, $+y$ ή $-y$) η μαγνήτιση αλλάζει διεύθυνση. Όταν ο παλμός εφαρμοστεί κατά μήκος του άξονα x , ένα γραμμικό πεδίο δημιουργείται κατά μήκος του άξονα y .

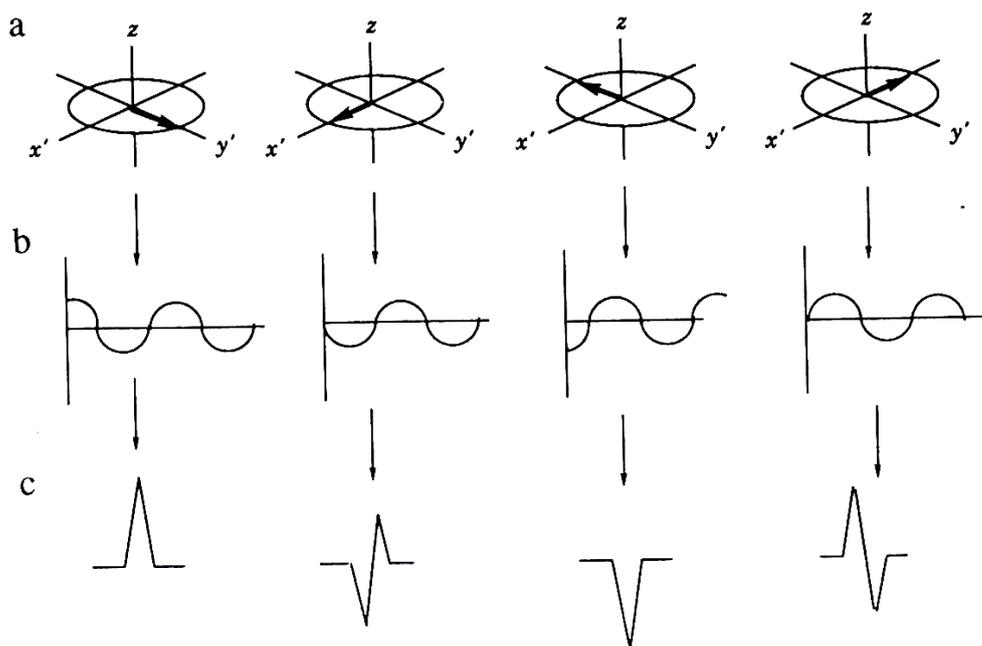
Ο βαθμός με τον οποίο η μαγνήτιση του άξονα z αποκλίνει καθορίζεται από το χρόνο εφαρμογής του παλμού. Με τον όρο παλμός 90° εννοούμε ότι προκαλείται απόκλιση του ανύσματος της μαγνήτισης κατά 90 μοίρες. Εάν ο

χρόνος εφαρμογής ενός παλμού 90° είναι t μs , τότε απαιτείται το μισό χρονικό διάστημα ($t/2$ μs) για να αποκλίνει η μαγνήτιση κατά 45° , ενώ το διπλάσιο διάστημα ($2t$ μs) για να αποκλίνει κατά 180° . Η διάρκεια εφαρμογής ενός παλμού είναι αντιστρόφως ανάλογη του εύρους συχνοτήτων, δηλαδή για να γίνει διέγερση των πυρήνων σε μεγάλο εύρος συχνοτήτων πρέπει να εφαρμοσθεί ένας παλμός μικρής διάρκειας και αντίστροφα ⁹⁷.

1.5.2.2. Ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free induction decay-FID)

Όταν το άνυσμα της μαγνήτισης βρίσκεται κατά μήκος του άξονα z δεν προκύπτει κάποιο σήμα NMR. Όταν ένας παλμός εφαρμοσθεί κατά μήκος του άξονα x' , αφενός μεν η μαγνήτιση αποκλίνει από τον άξονα z και εμφανίζεται κατά μήκος του άξονα y' , αφετέρου οι πυρήνες που βρίσκονται εντός του εύρους συχνοτήτων που δημιουργεί ο παλμός, αποκλίνουν ταυτόχρονα κατά την ίδια γωνία. Η σχέση της θέσης του ανύσματος της μαγνήτισης με το σήμα και τη φάση του σήματος φαίνεται στο **Σχήμα 15**. Η ένταση του σήματος θα είναι μέγιστη αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού. Κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης, το άνυσμα της μαγνήτισης θα μετακινηθεί από τον άξονα y' προς τον άξονα x' και το σήμα θα εξασθενίσει μέχρι που θα λάβει την τιμή μηδέν όταν φτάσει στον άξονα x' . Καθώς μετατοπίζεται προς τον άξονα $-y'$, εμφανίζεται αρνητικό σήμα, το οποίο λαμβάνει τη μέγιστη αρνητική τιμή όταν το άνυσμα μετακινηθεί στον άξονα $-y'$. Καθώς το άνυσμα μετακινείται προς τον άξονα $-x'$, το αρνητικό σήμα λαμβάνει πάλι την τιμή μηδέν και έπειτα λαμβάνει θετικές τιμές μέχρι να φτάσει στον άξονα y' (**Σχήμα 15β**).

Η εκθετικά φθίνουσα συνάρτηση του σήματος με το χρόνο η οποία περιέχει και το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ονομάζεται *ελευθέρως φθίνουσα επαγωγή (Free Induction Decay-FID)* ⁹⁷.



Σχήμα 15: Σχέση **α)** της θέσης του ανύσματος της μαγνήτισης με **β)** το σήμα συνάρτησης χρόνου και **γ)** το σήμα συνάρτησης συχνότητας

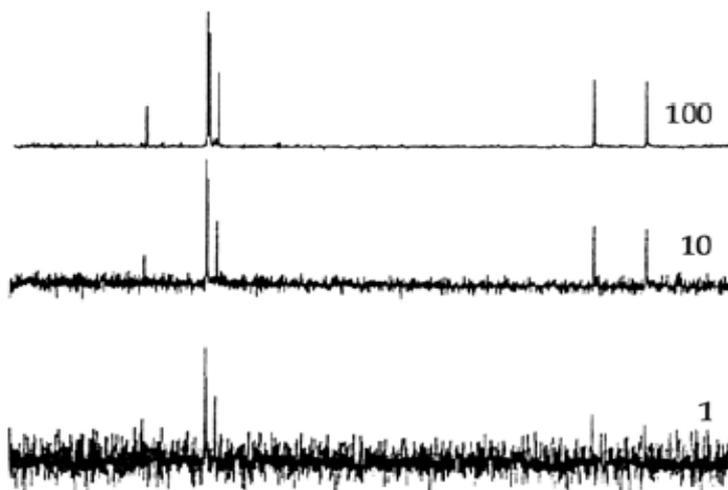
1.5.2.3. Μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transformation, FT)

Τα δεδομένα στον φασματογράφο NMR λαμβάνονται σε συνάρτηση με το χρόνο και για να χρησιμοποιηθούν πρέπει να μετατραπούν σε συνάρτηση με τη συχνότητα. Η μετατροπή των δεδομένων συνάρτησης χρόνου σε φάσμα συνάρτησης της συχνότητας πραγματοποιείται με το *μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transformation)*.

1.5.2.4. Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-noise ratio)

Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR είναι η χαμηλή ευαισθησία σε σύγκριση με τις μεθόδους IR και UV-VIS. Η βελτίωση του λόγου του σήματος προς το θόρυβο μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση της ισχύος του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ή την επανάληψη της λήψης του φάσματος αρκετές φορές. Με την επανάληψη της λήψης του

φάσματος, οι κορυφές απορρόφησης του NMR θα προστεθούν και θα ενταθούν, ενώ ο θόρυβος που είναι τυχαία κατανεμημένος εξουδετερώνεται. Η μέθοδος οδηγεί σε σημαντική βελτίωση του λόγου σήματος/θορύβου (που δίνεται από την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των σαρώσεων, π.χ. για 1000 σαρώσεις ο λόγος γίνεται μεγαλύτερος κατά 10 φορές) (**Σχήμα 16**).



Σχήμα 16. Φάσμα ^1H NMR αραιού διαλύματος αιθυλοβενζολίου με διαφορετικό αριθμό σαρώσεων (1, 10, 100). Με αύξηση των σαρώσεων ο «θόρυβος» μειώνεται, ενώ ενισχύονται οι φασματικές γραμμές απορρόφησης.

1.5.3. Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR

Το φάσμα NMR που περιλαμβάνει πολλές κορυφές απορρόφησης (σήματα), μπορεί να δώσει λεπτομερή πληροφορία σχετικά με τη μοριακή δομή των ενώσεων. Θα εξετάσουμε τα χαρακτηριστικά του φάσματος NMR:

1. **τον αριθμό των σημάτων**, από τον οποίο είναι εφικτή η άντληση πληροφοριών σχετικά με τον αριθμό των διαφορετικών ειδών πρωτονίων που υπάρχουν στο μόριο μιας ένωσης
2. **τις θέσεις των σημάτων (χημική μετατόπιση)**, από τις οποίες αντλούνται πληροφορίες σχετικά με το ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε είδους πρωτονίων

3. τις εντάσεις των σημάτων που δίνουν πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων που υπάρχουν σε κάθε είδος και
4. τη σχάση του σήματος σε επιμέρους κορυφές, που δίνει πληροφορίες για το περιβάλλον του πρωτονίου σε σχέση με τα γειτονικά πρωτόνια.

1.5.3.1. Αριθμός σημάτων στο φάσμα NMR

Σε ένα δεδομένο μόριο, πρωτόνια με το ίδιο περιβάλλον απορροφούν στην ίδια (εφαρμοζόμενη) ένταση πεδίου, ενώ πρωτόνια με διαφορετικό περιβάλλον απορροφούν σε διαφορετικές (εφαρμοζόμενες) εντάσεις πεδίου. Τα πρώτα ονομάζονται *χημικώς ισοδύναμα* πρωτόνια, ενώ τα τελευταία *χημικώς μη-ισοδύναμα*. Ο αριθμός των σημάτων στο φάσμα NMR δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των ισοδύναμων πρωτονίων και τα είδη των πρωτονίων που υπάρχουν σε ένα μόριο, όπως φαίνεται στο παράδειγμα:



1.5.3.2 Θέσεις των σημάτων στο φάσμα NMR - Χημική μετατόπιση

Οι θέσεις των σημάτων στην κλίμακα του φάσματος δίνουν πληροφορίες για τα είδη των πρωτονίων: πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή, αρωματικά, αλειφατικά, βενζυλικά, βινυλικά, ακετυλενικά, γειτονικά σε αλογόνα ή σε άλλα άτομα ή ομάδες. Αυτά τα διαφορετικά είδη πρωτονίων έχουν διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, το οποίο καθορίζει ακριβώς τη θέση στην οποία απορροφά το πρωτόνιο στο φάσμα NMR.

Η κυκλοφορία των ηλεκτρονίων γύρω από γειτονικούς πυρήνες δημιουργεί δευτεροταγή μαγνητικά πεδία, τα επαγόμενα μαγνητικά πεδία, τα οποία είτε αντιτίθενται είτε ενισχύουν το εφαρμοζόμενο πεδίο επί του πρωτονίου. Στην περίπτωση που αντιτίθενται, το εφαρμοζόμενο εξωτερικό πεδίο που γίνεται αντιληπτό από το υπό εξέταση πρωτόνιο μειώνεται και το πρωτόνιο λέγεται

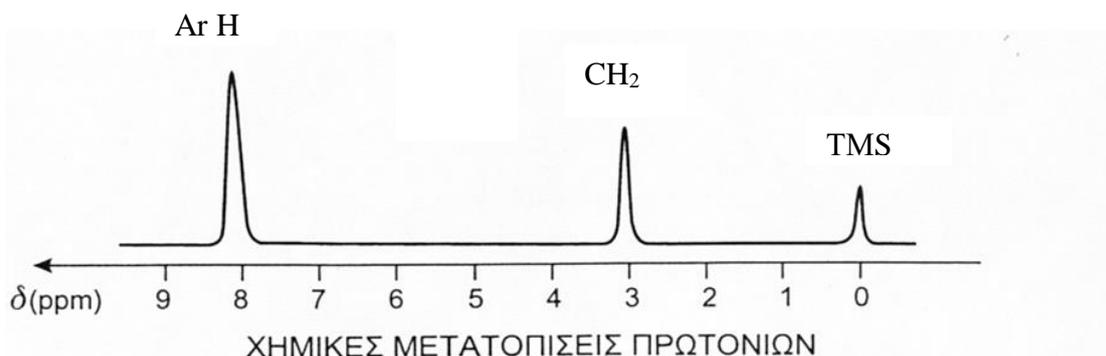
προστατευμένο (θωρακισμένο), ενώ στη δεύτερη αυξάνεται και το πρωτόνιο λέγεται αποπροστατευμένο.

Ένα προστατευμένο πρωτόνιο, συγκρινόμενο με το γυμνό πρωτόνιο, απαιτεί ισχυρότερη ένταση εφαρμοζόμενου πεδίου, ενώ ένα αποπροστατευόμενο πρωτόνιο απαιτεί χαμηλότερη ένταση. Κατά συνέπεια, η προστασία μετατοπίζει την απορρόφηση σε υψηλότερο πεδίο, ενώ η αποπροστασία σε χαμηλότερο. Οι μετατοπίσεις στη θέση της απορρόφησης NMR, που προκαλούνται από προστασία ή αποπροστασία των ηλεκτρονίων, αποκαλούνται χημικές μετατοπίσεις.

Για να καθοριστούν οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων ^1H ώστε να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους σε διαφορετικά πειράματα, χρησιμοποιείται μία ουσία αναφοράς. Στη φασματοσκοπία NMR δεν ενδιαφέρει η γνώση της απόλυτης τιμής της συχνότητας συντονισμού μιας ουσίας, αλλά η σχετική της τιμή ως προς την ουσία αναφοράς. Η ουσία αναφοράς συνήθως επιλέγεται έτσι ώστε να υφίσταται μια πολύ ισχυρή θωράκιση από τα περιφερειακά της ηλεκτρόνια (διαμαγνητισμός) και να συντονίζεται σε υψηλότερη ένταση πεδίου, σε σχέση με άλλες οργανικές ενώσεις. Πρέπει επίσης να έχει πολύ σταθερή και συμμετρική δομή, να εμφανίζει ισχυρή πυρηνική προάσπιση και να δίνει μία απλή και χαρακτηριστική κορυφή συντονισμού που να μην επηρεάζεται από τις πειραματικές συνθήκες. Ως ουσία αναφοράς για φάσματα ^1H και ^{13}C σε οργανικούς διαλύτες χρησιμοποιείται κυρίως το τετραμεθυλοσιλάνιο $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ή TMS, ενώ σε υδατικό διαλύτη το άλας $[\text{C}_6\text{H}_9\text{D}_4\text{NaO}_2\text{Si}]$ ή TSP. Η απλή κορυφή συντονισμού των ουσιών αναφοράς στο φάσμα ^1H -NMR προέρχεται από τη συνεισφορά 12 ισοδύναμων ^1H για το TMS και 9 για το TSP.

Επιπλέον, όσο πιο θωρακισμένος είναι ο πυρήνας ^1H μιας χημικής ένωσης, τόσο η συχνότητα συντονισμού του πυρήνα αυτού θα πλησιάζει προς τη συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ένωσης αναφοράς. Τότε το σήμα απορρόφησης του ^1H βρίσκεται προς τα δεξιά του φάσματος κοντά στην κορυφή συντονισμού της ουσίας αναφοράς, δηλαδή σε υψηλές εντάσεις (up field) εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (μικρή τιμή του δ , μεθυλένιο $-\text{CH}_2$) (Σχήμα 17). Όμως όσο λιγότερο θωρακισμένος είναι ο πυρήνας ^1H μιας

χημικής ένωσης, τόσο η συχνότητα συντονισμού του ^1H θα βρίσκεται προς τα αριστερά του φάσματος μακριά από την κορυφή συντονισμού της ουσίας αναφοράς, σε χαμηλές εντάσεις (downfield) εφαρμοζόμενου πεδίου (μεγάλη τιμή του δ , αρωματική ομάδα Ar) (**Σχήμα 17**).



Σχήμα 17: Η κορυφή συντονισμού του ^1H του μεθυλένιου ($-\text{CH}_2$) σε σύγκριση με την κορυφή συντονισμού του ^1H του λιγότερο θωρακισμένου πυρήνα ^1H μιας αρωματικής ομάδας (Ar).

Η χημική μετατόπιση (δ) εκφράζεται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) του ολικού εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Δεδομένου ότι η προστασία και η αποπροστασία προκαλούνται από επαγόμενα δευτερογενή πεδία, το μέγεθος της χημικής μετατόπισης είναι ανάλογο της ραδιοσυχνότητας με την οποία το πεδίο πρέπει να παραβληθεί. Η χημική μετατόπιση ορίζεται ως η διαφορά της συχνότητας συντονισμού του υπό εξέταση πυρήνα ν_δ από τη συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ουσίας αναφοράς ν_α .

Εάν ν_δ και ν_α είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδων πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς, αντίστοιχα, και ν_0 η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα δ , όπου

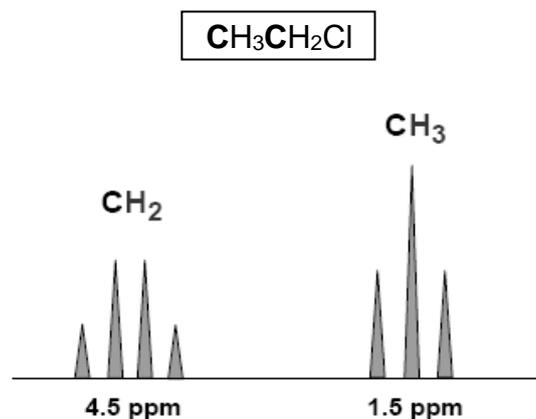
$$\delta = \frac{\nu_\delta - \nu_\alpha}{\nu_0} \times 10^6 \text{ ppm}$$

1.5.3.3. Ένταση των σημάτων στο φάσμα NMR

Η ένταση της κορυφής ενός σήματος NMR, είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των πρωτονίων που συντονίζονται. Για την ποσοτική σύγκριση των κορυφών διαφόρων πρωτονίων υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών δηλαδή της περιοχής κάτω από ένα σήμα NMR. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πρωτονίων που διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ενέργειας που απορροφάται και συνεπώς είναι μεγαλύτερη η περιοχή κάτω από την κορυφή απορρόφησης. Επομένως η ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αναλογίας των πρωτονίων που υπάρχουν στο μόριο μίας χημικής ένωσης. Επίσης αν είναι γνωστή η συγκέντρωση της ουσίας αναφοράς ή κάποιας άλλης πρότυπης ουσίας που περιέχεται στο δείγμα, τότε μπορεί να υπολογισθεί και η συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας.

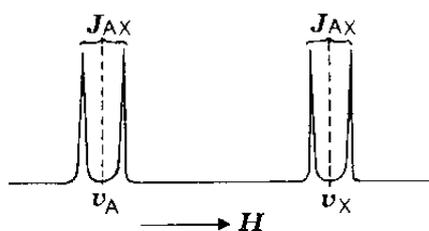
1.5.3.4 Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling)

Σε πολλά φάσματα ^1H NMR οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές, τετραπλές κλπ). Το σχάσιμο της κορυφής ενός πρωτονίου λόγω της σύζευξης με N γειτονικά πρωτόνια, ακολουθεί το γενικό κανόνα $N+1$ (**Σχήμα 18**). Ο αριθμός των συνιστωσών ονομάζεται πολλαπλότητα. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή) καλείται spin-spin σύζευξη (spin-spin coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι διαμέσου του χώρου, αλλά διαμέσου των δεσμών του μορίου.



Σχήμα 18. Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}$ παρατηρούμε μια τετραπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στα δύο χημικά ισοδύναμα πρωτόνια CH_2 και μια τριπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στα τρία χημικά ισοδύναμα πρωτόνια CH_3 . Τα CH_3 έχουν δύο γειτονικά πρωτόνια, επομένως η πολλαπλότητα είναι $2 + 1 = 3$ (τριπλή κορυφή). Τα CH_2 έχουν τρία γειτονικά πρωτόνια, επομένως η πολλαπλότητα είναι $3 + 1 = 4$ (τετραπλή κορυφή).

Η σύζευξη μεταξύ δυο πυρήνων (ή δυο ομάδων ισότιμων πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά σύζευξης J_{AX} , που είναι η απόσταση σε Hz των επιμέρους κορυφών των σύνθετων (πολλαπλών) κορυφών των δυο ομάδων. Η σταθερά σύζευξης εξαρτάται μόνο από την ηλεκτρονιακή σχέση μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πρωτονίων και επομένως είναι η ίδια στις δυο ομάδες (**Σχήμα 19**) και, σε αντίθεση με τη σταθερά θωρακίσεως, η σταθερά σύζευξης είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, για το λόγο αυτό δεν δίνεται σε ppm, αλλά πάντοτε σε Hz.



Σχήμα 19. Σύζευξη πρωτονίων με μεγάλη διαφορά ($\Delta\nu$) χημικών μετατοπίσεων.

Κατά συνέπεια, με τη λήψη του φάσματος NMR μιας ένωσης σε δυο συχνότητες μπορούμε να διακρίνουμε τις πολλαπλές κορυφές που οφείλονται σε πρωτόνια με διαφορετική χημική μετατόπιση από εκείνες που οφείλονται σε spin-spin σύζευξη ⁹⁸.

1.6 Τεχνικές αναγνώρισης προτύπων

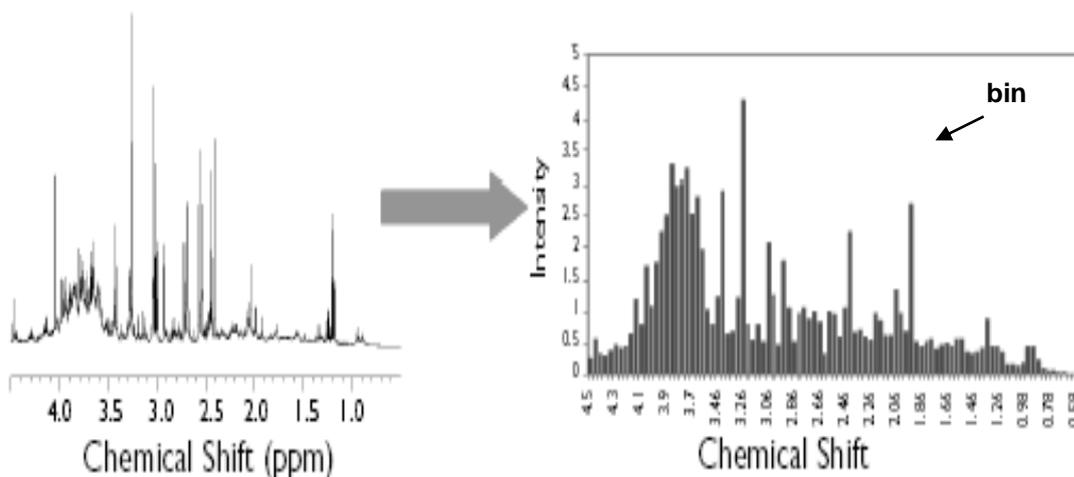
1.6.1. Η έννοια και η ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην επεξεργασία των δεδομένων των μελετών με νέες στατιστικές μεθόδους ανάλυσης. Με τον όρο **Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων (Multivariate Data Analysis, MDA)** εννοούμε την ανάλυση που πραγματοποιείται με σκοπό την ανάκτηση της πιο σημαντικής πληροφορίας από πίνακες που περιέχουν πολυάριθμα πειραματικά δεδομένα ⁹⁹. Η Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων συχνά αποκαλείται και **Αναγνώριση Προτύπων (Pattern Recognition, PR)**, διότι αποβλέπει στην εύρεση ενός μοντέλου δεδομένων (data pattern) για τον χαρακτηρισμό ή την ταξινόμηση μιας ή περισσότερων κλάσεων παρατηρήσεων (classes observations) ¹⁰⁰. Το μοντέλο (pattern) μιας κλάσης περιέχει πληροφορίες για τις σχέσεις και τις αναλογίες που χαρακτηρίζουν τις παρατηρήσεις της κλάσης αυτής, καθώς επίσης για το πόσο όμοιες ή όχι είναι οι μεταβλητές (variables) του υπό μελέτη συστήματος. Οι στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στην Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: τις εποπτευόμενες και μη εποπτευόμενες (supervised και unsupervised) μεθόδους ¹⁰¹. Με τις μη εποπτευόμενες τεχνικές η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων επιτυγχάνεται με τα γραφήματα συντεταγμένων (scores plot), στα οποία φαίνεται εάν υπάρχουν τάσεις ομαδοποίησης μεταξύ των δειγμάτων και τα γραφήματα φορτίων (loadings plots) όπου φαίνονται οι μεταβλητές που συνεισφέρουν στις παρατηρούμενες τάσεις ομαδοποίησης. Με τις εποπτευόμενες τεχνικές χρησιμοποιούνται γνωστές πληροφορίες από τα δεδομένα με τις οποίες γίνεται, πριν τη δημιουργία του στατιστικού μοντέλου, προεπιλεγμένα η ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες ή

υποομάδες. Για την αξιολόγηση (validation) των στατιστικών μοντέλων επιλέγεται τυχαία ένας αριθμός δειγμάτων από το σύνολο αυτών των δειγμάτων και αποτελεί την ομάδα βαθμονόμησης (calibration set) και ελέγχεται η ορθή ή όχι ταξινόμηση ενός άλλου αριθμού δειγμάτων που επίσης έχει επιλεγθεί τυχαία από το σύνολο των δειγμάτων και αποτελεί την ομάδα ελέγχου (test set). Στις μη εποπτευόμενες μεθόδους ανήκει η **Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών-ΑΚΣ (Principal Component Analysis, PCA)**, ενώ στις εποπτευόμενες μεθόδους ανήκει η **Ανάλυση Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων** και η **Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS and Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA)**.

1.6.2. Προεπεξεργασία των δεδομένων

Τα φάσματα NMR μετατρέπονται με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων σε πίνακες πολυμεταβλητών δεδομένων και στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυση τους με εφαρμογή των τεχνικών PR. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 20** κάθε φάσμα NMR, που αντιστοιχεί σε μια παρατήρηση ή δείγμα (observation), διαιρείται σε ίσου εύρους τμήματα (bins), που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη φασματική περιοχή μετατόπισης (δ , ppm) και αποτελούν τις μεταβλητές (variables).



Σχήμα 20. Διάρθρωση της αλειφατικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR βιολογικού δείγματος σε φασματικές περιοχές ίσου εύρους σε ppm.

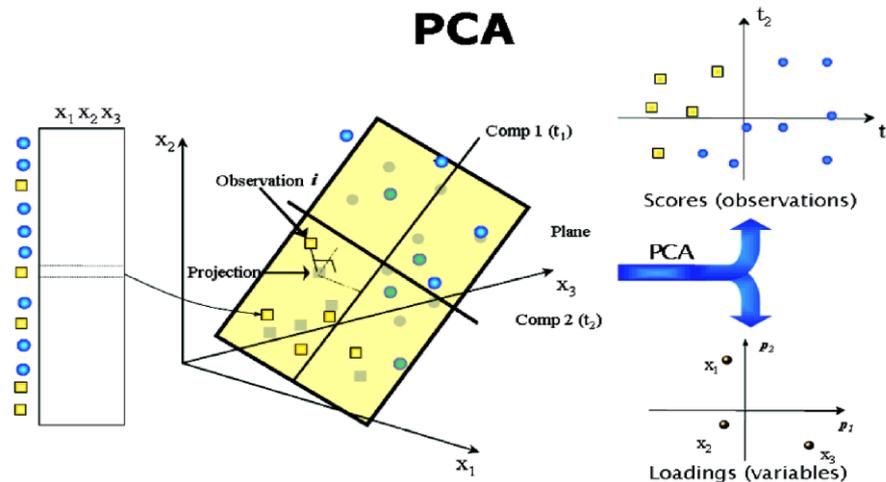
Τις γραμμές στον πίνακα δεδομένων αποτελούν τα δείγματα (observations), ενώ τις στήλες οι τιμές της έντασης για κάθε bin. Πριν την εφαρμογή κάποιας τεχνικής PR, γίνεται κατάλληλη προ-επεξεργασία (preprocessing) των δεδομένων δηλαδή κανονικοποίηση (normalization) και ρύθμιση της κλίμακας (scaling). Η κανονικοποίηση εφαρμόζεται κατά μήκος των γραμμών του πίνακα με τέτοιο τρόπο ώστε τα φασματοσκοπικά δεδομένα να καταστούν άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η διαδικασία ρύθμισης της κλίμακας (scaling) εκτελείται σε κάθε στήλη του πίνακα δηλαδή σε κάθε μεταβλητή (bin). Η πιο συχνή διαδικασία στη μεταβιομηχανία είναι η αφαίρεση από όλες τις τιμές της στήλης του μέσου όρου αυτών και ονομάζεται *mean-centering*.

1.6.3 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών-ΑΚΣ (Principal Component Analysis, PCA)

Η τεχνική ΑΚΣ (PCA) αποτελεί το αρχικό στάδιο για την ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων ¹⁰⁰. Δημιουργούνται ανεξάρτητοι συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών που ονομάζονται Principal Components, PC (Κύριες Συνιστώσες), οι οποίοι αφενός μεν είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους, αφετέρου περιέχουν όσο γίνεται μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών.

Η πρώτη PC είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών και περιέχει τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων, ενώ η δεύτερη ένας άλλος γραμμικός συνδυασμός ορθογώνιος ως προς τον πρώτο και περιέχει την επόμενη πιο ολοκληρωμένη περιγραφή των δεδομένων (**Σχήμα 21**). Η γραφική παράσταση των δυο πρώτων PC περιέχει το μέγιστο βαθμό πληροφορίας, ενώ οι επόμενες PC εκφράζουν όλο και λιγότερο ποσοστό από τη διακύμανση των δεδομένων.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 21**, σε κάθε παρατήρηση (observation) αντιστοιχεί μια μοναδική προβολή (projection) σε ένα επίπεδο 2 διαστάσεων με άξονες τις 2 πρώτες PC (comp 1 t_1 , comp 2 t_2). Από το επίπεδα αυτό προκύπτουν δυο γραφήματα: το γράφημα συντεταγμένων (scores plot) στο οποίο απεικονίζονται οι σχέσεις ομαδοποίησης ή ακραίων συμπεριφορών και το γράφημα φορτίων (loadings plot), στο οποίο απεικονίζεται η επίδραση των μεταβλητών στο στατιστικό μοντέλο, καθώς και οι μεταξύ τους σχέσεις. Τα δυο αυτά γραφήματα είναι αλληλοεξαρτώμενα, καθώς η διάταξη με την οποία υπάρχουν ανάμεσα στις παρατηρήσεις (εντοπισμός ομάδων, τάσεων των μεταβλητών) στο γράφημα των φορτίων ερμηνεύει τη διάταξη των δειγμάτων στο γράφημα συντεταγμένων ¹⁰².



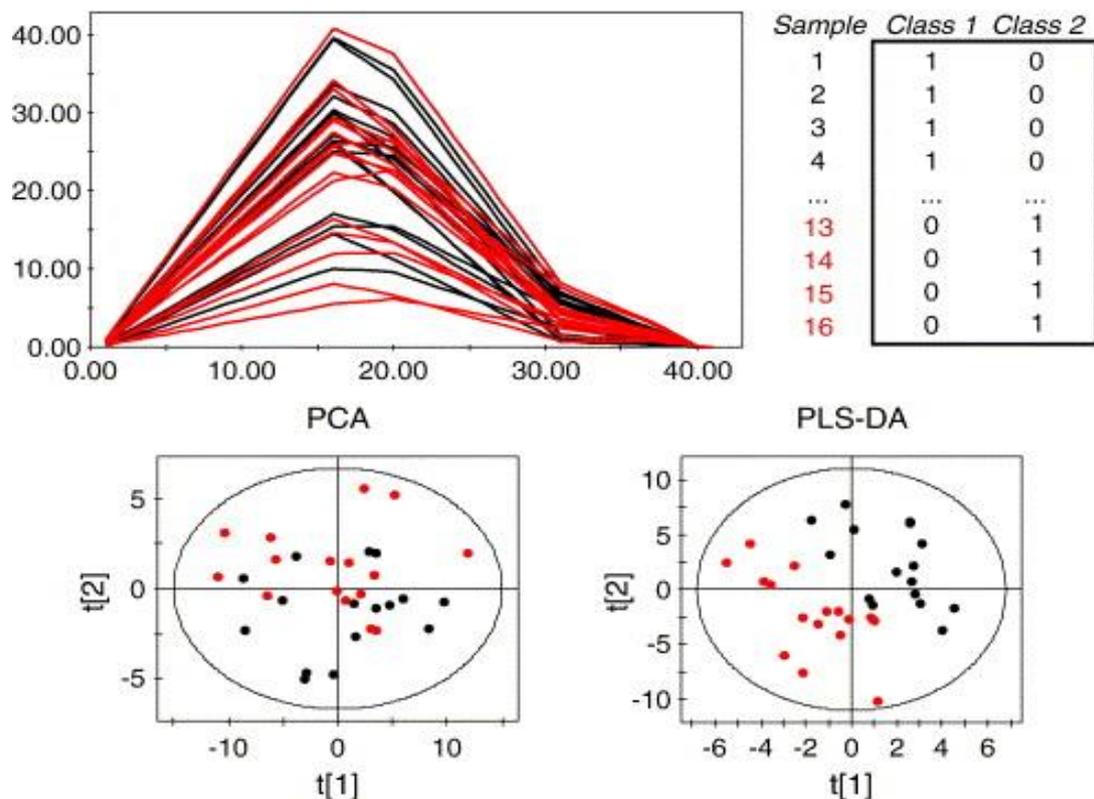
Σχήμα 21. Το PCA μοντέλο προσεγγίζει τη διακύμανση μεταξύ των δεδομένων. Η ερμηνεία του βασίζεται στο γράφημα συντεταγμένων (scores plot) και το γράφημα φορτίων (loadings plot).

1.6.4 Μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least-Squares Method by Projections to Latent Structures-PLS) αναπτύχθηκε μεταξύ 1975 και 1982 από τον Herman Wold και τους συνεργάτες του και έχει γίνει μια από τις πρότυπες μεθόδους πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Το αρχικό PLS μοντέλο, με δύο πίνακες μεταβλητών (X και Y) γραμμικά συσχετιζόμενων, έχει ενισχυθεί και επεκταθεί από το 1980.

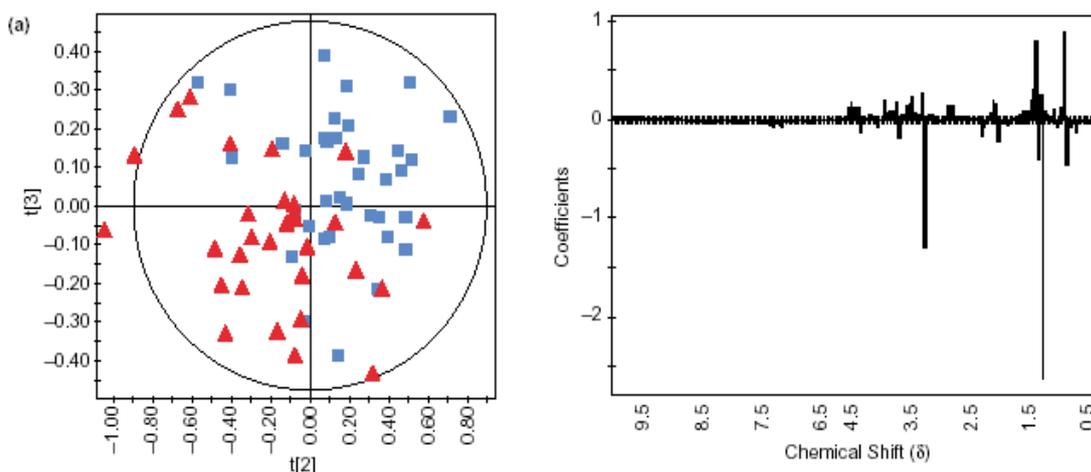
Τα PLS μοντέλα επηρεάζονται αρνητικά από τη συστηματική διακύμανση στον πίνακα X, η οποία δεν συσχετίζεται με τον πίνακα Y, δηλαδή, από τη διακύμανση που δεν αποτελεί τμήμα της κοινής δομής συσχετισμού μεταξύ των X-Y. Αυτό οδηγεί πολλές φορές σε λάθη σχετικά με την ερμηνεία.

Η Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA (Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων) όπως αναφέρθηκε ανήκει στις εποπτευόμενες μεθόδους, καθώς τα δείγματα με βάση κάποιες ποιοτικές μεταβλητές που τα χαρακτηρίζουν, όπως το φύλο και η νόσος, ταξινομούνται σε ένα πίνακα Y. Οι ποιοτικές αυτές μεταβλητές συμβολίζονται με τις μεταβλητές ταξινόμησης π.χ. 1 αν το δείγμα ανήκει σε μια ομάδα και 0 αν δεν ανήκει (Σχήμα 22) ¹⁰². Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται εκείνες οι μεταβλητές που συμβάλλουν στο βέλτιστο διαχωρισμό μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων.



Σχήμα 22 Εφαρμογή της PLS-DA για τη δημιουργία στατιστικού μοντέλου ταξινόμησης. Πάνω αριστερά: φάσματα δύο διαφορετικών ομάδων (κόκκινες γραμμές-μαύρες γραμμές). Πάνω δεξιά: πίνακας ταξινόμησης Y για ένα στατιστικό μοντέλο 2 ομάδων. Κάτω αριστερά: γράφημα συντεταγμένων του PCA μοντέλου. Κάτω δεξιά: γράφημα συντεταγμένων του PLS-DA μοντέλου που δείχνει το διαχωρισμό των 2 ομάδων (Keun, 2006, p.100).

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια δυο γραφημάτων, όπως στην PCA ανάλυση, το γράφημα συντεταγμένων (scores plot) και το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης (regression coefficients plot) (**Σχήμα 23**).



Σχήμα 23. Αριστερά το γράφημα συντεταγμένων (scores plot) και δεξιά το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης (regression coefficients plot) του PLS-DA μοντέλου. Στο γράφημα των συντεταγμένων (αριστερά) φαίνεται ο διαχωρισμός των ασθενών με νόσο 3 αγγείων (μπλε τετράγωνα) και των ασθενών με φυσιολογικά αγγεία (κόκκινα τρίγωνα), ενώ στο γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης (δεξιά) εμφανίζονται οι περιοχές του φάσματος του ορού που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των δυο ομάδων¹⁰³.

1.6.5 Ορθοκανονική Διόρθωση Σήματος

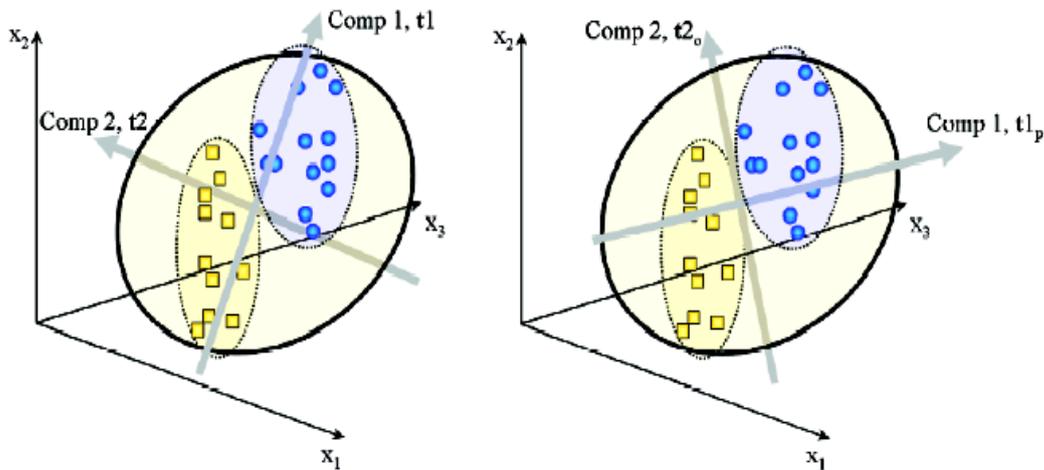
Αν και ο σκοπός μια μεταβιομικής μελέτης είναι η εξαγωγή πληροφορίας από δεδομένα NMR η οποία σχετίζεται με τη διακύμανση της τάξης, τα μεταβιομικά δεδομένα συχνά περιέχουν διακύμανση που οφείλεται σε περιβαλλοντικές και φυσιολογικές επιδράσεις (π.χ διαίτα, κατάσταση υγείας, στρες, διαφορές μεταξύ φύλων). Η ερμηνεία των μεταβιομικών δεδομένων είναι εμπλουτισμένη από αυτή την πολυπλοκότητα και διακύμανση. Έτσι, ενώ σε μερικές περιπτώσεις η φυσιολογική διακύμανση μπορεί να κρύψει τα λεπτομερή μεταβολικά αποτελέσματα σχετικά με την τοξικότητα ή τη νόσο, σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι χρήσιμη στην ερμηνεία της απάντησης ενός οργανισμού σε ένα εξωτερικό ερέθισμα.

Η διακύμανση στα φασματικά προφίλ των βιολογικών υγρών είναι σαφώς πολύ μεγαλύτερη στους ανθρώπινους πληθυσμούς όπου το γενετικό

υπόβαθρο, η διατροφή και οι συνθήκες του τρόπου ζωής είναι πολύ λιγότερο ελεγχόμενα σε σύγκριση με τα φασματικά προφίλ των βιολογικών υγρών των πειραματόζων. Η εφαρμογή των διαφόρων βημάτων προεπεξεργασίας όπως η ρύθμιση της κλίμακας (scaling) ή το φιλτράρισμα (filtering) των μεταβιονομικών δεδομένων μπορεί να ενισχύσουν την πληροφορία που σχετίζεται με την τάξη (π.χ. τοξικότητα, νόσος) και να ελαχιστοποιήσει την επίδραση ξένων παραγόντων. Μια τέτοια μέθοδος επεξεργασίας δεδομένων είναι η Ορθοκανονική Διόρθωση Σήματος σε πίνακες μεταβιονομικών δεδομένων. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική η διακύμανση, η οποία είναι ορθοκανονική (μη σχετιζόμενη) με την ταυτότητα της τάξης αφαιρείται με αποτέλεσμα τα υπολογιζόμενα πολυμεταβλητά μοντέλα να εστιάζουν στη διάκριση της τάξης. Επιπλέον, η ανάλυση της αφαιρούμενης ορθοκανονικής διακύμανσης, από την άποψη των ορθοκανονικών συνιστωσών, παρέχει μια εξήγηση των συστηματικών φασματικών αλλαγών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύγχυση (confounding) των αρχικών δεδομένων NMR.

Η Ορθοκανονική Διόρθωση Σήματος (Orthogonal Signal Correction, OSC) είναι μια τεχνική η οποία ανακαλύφθηκε από τον Wold και τους συνεργάτες του το 1998 ¹⁰⁴. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένα φίλτρο δηλαδή μια μαθηματική συνάρτηση για την αφαίρεση της συστηματικής διακύμανσης (systematic variation) των δεδομένων του πίνακα X, η οποία ουσιαστικά δεν συνεισφέρει στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και είναι μαθηματικώς ανεξάρτητη από τα δεδομένα του πίνακα Y (**Σχήμα 24**).

Τα στατιστικά μοντέλα που προκύπτουν μετά την εφαρμογή της τεχνικής φιλτραρίσματος ερμηνεύονται με αντίστοιχα γραφήματα, όπως στην περίπτωση των PCA και PLS-DA μοντέλων.



Σχήμα 24. Η γεωμετρική απεικόνιση των PLS-DA και OSC/PLS-DA μοντέλων. Στο αριστερό γράφημα που αφορά το PLS-DA μοντέλο, δεν μπορεί να διαχωρισθεί η μεταξύ των ομάδων διακύμανση από αυτή εντός των ομάδων. Στο δεξί γράφημα που αφορά το OSC/PLS-DA μοντέλο διαχωρίζονται οι δυο αυτές διακυμάνσεις με αποτέλεσμα με τη δεύτερη συνιστώσα (Comp 2) να διαχωρίζονται οι δυο ομάδες μεταξύ τους ¹⁰².

1.6.6. Αξιολόγηση των μοντέλων

Όπως αναφέρθηκε, οι κατηγορίες των εποπτευόμενων τεχνικών χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταξινόμηση δειγμάτων. Αυτή η ταξινόμηση πραγματοποιείται με τη δημιουργία σε πρώτο στάδιο μιας ομάδας βαθμονόμησης (training set) με παρατηρήσεις (δείγματα) που ανήκουν σε συγκεκριμένα και προκαθορισμένα σύνολα, π.χ. 2 πληθυσμοί ασθενών – υγιών ατόμων. Η ομάδα αυτή χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να δημιουργηθούν ένα ή περισσότερα στατιστικά μοντέλα με βάση τις αρχικές μεταβλητές X . Η αξιοπιστία του στατιστικού μοντέλου ελέγχεται διαμέσου μιας ομάδας αξιολόγησης (test or validation set) που αποτελείται από «γνωστά» δείγματα των προκαθορισμένων συνόλων, δηλαδή δειγμάτων που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση.

Αν το στατιστικό μοντέλο κατατάξει τα δείγματα αυτά σωστά στα αντίστοιχα προκαθορισμένα σύνολα, τότε θεωρείται αξιόπιστο και μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει μια ομάδα «αγνώστων» δειγμάτων, δηλαδή καινούριων δειγμάτων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση¹⁰⁵.

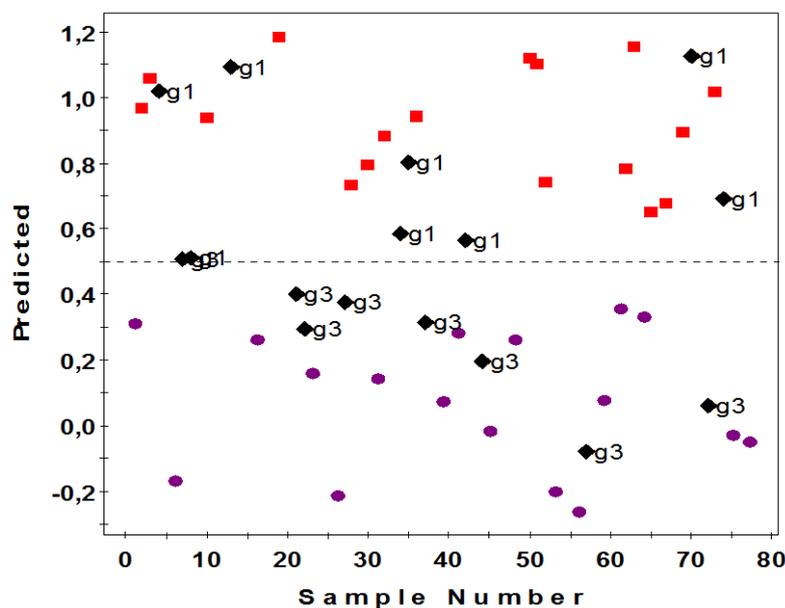
Σύμφωνα με τις οδηγίες της διεθνούς ομάδας εργασίας SMRS (Standard Metabolic Reporting Structures working group, SMRS), το πρώτο βήμα ελέγχου της αξιοπιστίας ενός μοντέλου είναι η *διασταυρούμενη αξιολόγηση (cross-validation)*, η οποία ξεχωρίζει τα αξιοποιήσιμα δεδομένα από το θόρυβο, παρέχοντας έτσι μια ρεαλιστική εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης που έχει το μοντέλο¹⁰⁶. Ωστόσο, για να μπορεί να γίνει μια σωστή αποτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης ενός στατιστικού μοντέλου είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δεδομένα τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα κατά τη δημιουργία του μοντέλου. Τα νέα αυτά δεδομένα ορίζουν την *ομάδα εξωτερικής αξιολόγησης*, (prediction set), η οποία εφαρμόζεται στο στατιστικό μοντέλο στοχεύοντας στην πρόβλεψη κάποιας ιδιότητας των δειγμάτων ή στην ταξινόμηση τους ως προς την κατηγορία στην οποία ανήκουν. Στην παρούσα διατριβή, η ικανότητα πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων αφορά την ταξινόμηση δειγμάτων (φασμάτων NMR από ούρα) που προέρχονται από ομάδες υγιών ατόμων ή ατόμων με υποουριχαιμία.

Είναι πιθανό η ικανότητα πρόβλεψης ενός στατιστικού μοντέλου να είναι ανεπαρκής επειδή τα δεδομένα της ομάδας εξωτερικής αξιολόγησης διέπονται από κάποιες νέες 'σχέσεις' που δεν υπήρχαν στην ομάδα βαθμονόμησης. Στις περιπτώσεις αυτές η ομάδα εξωτερικής αξιολόγησης πρέπει να ενσωματώνεται με την ομάδα βαθμονόμησης, να αναπτύσσεται ένα καινούριο μοντέλο και να επιλέγεται μια νέα ομάδα αξιολόγησης, ώστε να γίνεται εκ νέου αποτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης. Αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία δημιουργίας ενός στατιστικού μοντέλου είναι μια *επαναληπτική διαδικασία* όπου η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου πρέπει να αποτιμηθεί αρκετές φορές⁹⁹.

Στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός ($n < 10$) ή δεν υπάρχουν διαθέσιμα νέα δεδομένα, ένας εναλλακτικός τρόπος αποτίμησης της ικανότητας πρόβλεψης ενός μοντέλου είναι διαμέσου *εσωτερικής αξιολόγησης* (held-back data) με τη χρησιμοποίηση μιας κατάλληλης *ομάδας εσωτερικής αξιολόγησης* (test set). Η ομάδα αυτή δεν περιέχει καινούρια δεδομένα, αλλά προκύπτει από την τυχαία επιλογή από τα δειγμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης του

στατιστικού μοντέλου. Συνήθως το 10 – 30% των αρχικών δεδομένων επιλέγεται για να ορίσει την ομάδα εσωτερικής αξιολόγησης, αρκεί η επιλογή να είναι τυχαία και να περιλαμβάνονται δείγματα από όλες τις διακριτές ομάδες ή τάσεις ομαδοποίησης που παρατηρήθηκαν κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης.

Το ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης των δειγμάτων γίνεται συνήθως με την χάραξη ειδικών διαγραμμάτων, όπου η τεταγμένη y οριοθετεί τις κατηγορίες στις οποίες ανήκουν τα δείγματα, ενώ η καταμέτρηση των δειγμάτων που ταξινομούνται επιτυχώς ή ανεπιτυχώς προσδιορίζει την ευαισθησία και την ειδικότητα του στατιστικού μοντέλου, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 25**.



Σχήμα 25 Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA ασθενών ήπιας–σοβαρής νεφρικής βλάβης με τη διαδικασία εσωτερικής αξιολόγησης.

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 17 ασθενείς με ήπια (■), 17 ασθενείς με σοβαρή (◆) νεφρική βλάβη. Ομάδα αξιολόγησης: 8 ασθενείς με ήπια (◆g1), 8 ασθενείς με σοβαρή (◆g3) νεφρική βλάβη.

1.7 Διερεύνηση της νεφρικής λειτουργίας με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Το φάσμα NMR των βιολογικών υγρών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα μοναδικό πολυδιάστατο μεταβολικό «αποτύπωμα», το οποίο φαίνεται ότι διαφοροποιείται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού. Την τελευταία 25ετία, η φασματοσκοπία NMR έχει αναδειχθεί ως μια από τις πλέον σημαντικές μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών και ιδιαίτερα των ούρων. Έτσι, η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων έχει χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις των νεφρών και ιδιαίτερα στις τοξικές επιδράσεις εξωγενών ουσιών στους νεφρούς ^{107, 108}.

1.7.1 Μελέτες σε πειραματόζωα

Για τη διερεύνηση της νεφρικής δυσλειτουργίας ή βλάβης, η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων έχει εστιασθεί σχεδόν αποκλειστικά σε μελέτες με πειραματόζωα. Το σκεπτικό της πλειονότητας αυτών των μελετών ήταν η χορήγηση σε πειραματόζωα νεφροτοξικών ουσιών (νεφροτοξινών) που προσβάλλουν συγκεκριμένες περιοχές του νεφρού, η συλλογή δειγμάτων ούρων σε καθορισμένες χρονικές στιγμές και η καταγραφή των σχετικών φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ ούρων. Από τις πρώτες μελέτες φάνηκε αφενός ότι η σύσταση του φάσματος NMR εξαρτάται ισχυρά από το σημείο δράσης της νεφροτοξίνης στην οποία έχει εκτεθεί το πειραματόζωο ¹⁰⁹⁻¹¹¹, αφετέρου δε ότι είναι τουλάχιστον το ίδιο ευαίσθητη με τις συμβατικές βιοχημικές μεθόδους ¹¹². *Οι πολυάριθμες εργασίες που ακολούθησαν κατέστησαν σαφές ότι κάθε νεφροτοξίνη ή ομάδα νεφροτοξινών προκαλεί χαρακτηριστικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις και τη σύσταση των ενδογενών μεταβολιτών των ούρων, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τη θέση και το μηχανισμό της τοξικής δράσης* ¹¹³. Σε όλες σχεδόν τις μελέτες ο ακριβής εντοπισμός της νεφρικής βλάβης έγινε με βάση τη βιοψία νεφρού των πειραματόζωων και στη συνέχεια με συσχέτιση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ ¹¹⁴⁻¹¹⁸.

Συνοπτικά μόνο αναφέρεται ότι νεφροτοξίνες που προσβάλλουν το εγγύς σωληνάριο προκαλούν μια σειρά από επαναλήψιμες χρονοεξαρτώμενες αλλαγές του μεταβολικού προφίλ των ούρων και συγκεκριμένα γλυκοζουρία, αμινοξουρία και αύξηση της απέκκρισης του γαλακτικού και οξικού οξέος¹⁰⁹. Αντίστοιχα, τοξικές ουσίες που προσβάλλουν τη μυελώδη περιοχή του νεφρού αποκαλύπτουν ένα διαφορετικό μεταβολικό προφίλ στα ούρα, όσον αφορά τόσο τη βιοχημική του σύσταση όσο και τη χρονική εξέλιξη της βλάβης¹¹¹. Συγκεκριμένα, η νέκρωση της νεφρικής θηλής (renal papillary necrosis) εξαιτίας της χορήγησης αυτών των τοξικών ουσιών οδηγεί αρχικά σε αύξηση των συγκεντρώσεων στα ούρα της διμεθυλαμίνης (DMA) και του τριμέθυλο-*N*-αμινοξειδίου (TMAO) και μετά το πρώτο 24ώρο σε αυξημένη απέκκριση της διμεθυλογλυκίνης (DMG) και των οξέων ηλεκτρικό και οξικό, καθώς και σε μειωμένη απέκκριση του TMAO και του 2-οξογλου-ταρικού οξέος¹⁰⁹. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν μάλιστα θεωρηθεί και ως πιθανοί δείκτες βλάβης της νεφρικής θηλής^{109, 111}.

Για την καλύτερη συστηματοποίηση και αξιοποίηση της βιοχημικής πληροφορίας που περιέχουν τα πολύπλοκα μεταβολικά προφίλ των ούρων, η ερευνητική ομάδα των Nicholson και Lindon εφάρμοσε για πρώτη φορά το 1990 τις τεχνικές PR στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης¹¹⁹. Συγκεκριμένα, έγινε χορήγηση σε αρουραίους 2 διαφορετικών ομάδων νεφροτοξινών, 4 που προκαλούν νέκρωση στο εγγύς σωληνάριο (HCBD, PAP, CrO₄, HgCl₂)¹ και 2 που προκαλούν νέκρωση της νεφρικής θηλής (PI, BEA)¹. Στη συνέχεια, σε 4 χρονικές στιγμές μετά από τη χορήγηση (0, 8, 24 και 48 ώρες) προσδιορίστηκαν 5 παράμετροι συμβατικού βιοχημικού ελέγχου (γλυκόζη και ουρία ορού, γGT και NAG ούρων και ρυθμός ροής ούρων)² και έγινε καταγραφή των αντίστοιχων φασμάτων ¹H-NMR των ούρων. Ο σκοπός της πρωτοποριακής για την εποχή μελέτης ήταν η εφαρμογή της τεχνικής PCA στα δεδομένα αφενός του κλασικού βιοχημικού ελέγχου και αφετέρου της φασματοσκοπίας ¹H-NMR και η σύγκριση των αντίστοιχων στατιστικών μοντέλων ως προς την ορθότητα της ταξινόμησης για την εκάστοτε περιοχή νεφρικής βλάβης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φασματοσκοπία ¹H-NMR προσέφερε όχι μόνο καλύτερο διαχωρισμό της σωληναριακής βλάβης από τη

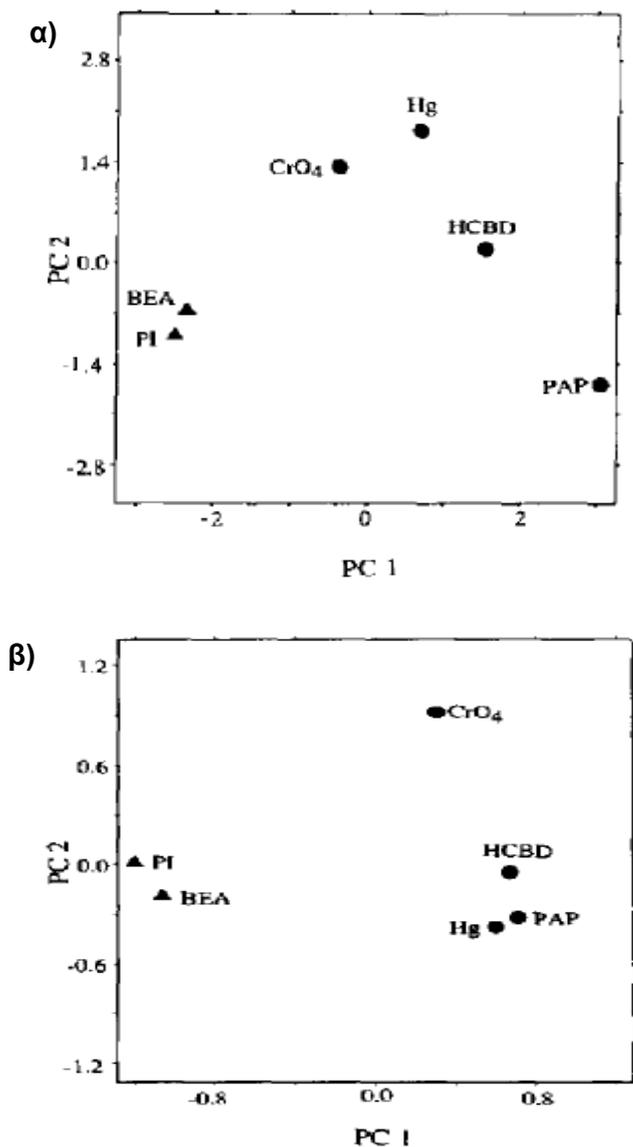
¹ HCBD: hexachlorobutadiene, PAP: *p*-aminophenol, BEA: bromoethanamine, PI: propyleneimine.

² γGT: γ-γλουταμινοτρανσφεράση, NAG: *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase.

βλάβη στη νεφρική θηλή σε σύγκριση με το βιοχημικό έλεγχο, αλλά μπόρεσε να διακρίνει και τη νέκρωση στην εσπειραμένη μοίρα (*pars convoluta*) του εγγύς σωληναρίου εξαιτίας της χορήγησης του CrO₄, από τη νέκρωση στην ορθή μοίρα (*pars recta*) εξαιτίας της χορήγησης των HCBD, PAP και HgCl₂ **(Σχήμα 26)** ¹¹⁹.

Οι δυο επόμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν την επιτυχή εφαρμογή των τεχνικών PR στη φασματοσκοπία ¹H-NMR ούρων πειραματόζων στα οποία είχαν χορηγηθεί τοξικές ουσίες που προσβάλλουν τη φλοιώδη και μυελώδη περιοχή του νεφρού και το ήπαρ ^{120 101}. Σε αυτές τις μελέτες έγινε ορθή ταξινόμηση των ¹H-NMR μεταβολικών δεδομένων ανάλογα με την εκάστοτε ιστική βλάβη, σωστή πρόβλεψη των τοξικολογικών επιδράσεων νέων τοξικών ουσιών που χορηγήθηκαν και διερευνήθηκε η ανταπόκριση στη διαφορετική δοσολογία των τοξικών ουσιών.

Η ιδιαίτερη επιτυχία των τριών αυτών μελετών την περίοδο 1990-1991 αποτέλεσε το έναυσμα για τη μετέπειτα ολοένα και συχνότερη εφαρμογή των τεχνικών PR στη ¹H-NMR φασματοσκοπία των ούρων με σκοπό την διερεύνηση της νεφρικής βλάβης και των σχετικών μηχανισμών βλάβης (Lindon et al., 2000). Σε επόμενες μελέτες ως πολυμεταβλητά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν οι εντάσεις κορυφών προεπιλεγμένων μεταβολιτών εφαρμόζοντας τις unsupervised τεχνικές PCA και NLM (non linear mapping). Με τις μελέτες αυτές επιτεύχθηκε σαφής διαφοροποίηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων που καταγράφηκε σε τοξικογενείς βλάβες της φλοιώδης και της μυελώδης περιοχής του νεφρού ¹²¹. Ειδικότερα στη περίπτωση των τοξικών ουσιών που προσβάλλουν τη φλοιώδη περιοχή, ένας επιμέρους διαχωρισμός των δειγμάτων των ούρων κατέστη δυνατός αντανακλώντας τη διαφορετική βλάβη συγκεκριμένων περιοχών του εγγύς σωληναρίου (S₁, S₂/S₃ τμήμα) ¹¹⁸.



Σχήμα 26. Γραφήματα συντεταγμένων των δυο πρώτων PCs μετά τη χορήγηση σε αρουραίους 2 διαφορετικών ομάδων νεφροτοξινών, 4 που προκαλούν νέκρωση στο εγγύς σωληνάριο (HCBBD, PAP, CrO₄, HgCl₂)³ και 2 που προκαλούν νέκρωση της νεφρικής θηλής (PI, BEA). α) κλασικός βιοχημικός έλεγχος και β) φασματοσκοπία ¹H-NMR. Η φασματοσκοπία ¹H-NMR προσέφερε όχι μόνο καλύτερο διαχωρισμό της σωληναριακής βλάβης από τη βλάβη στη νεφρική θηλή σε σύγκριση με το βιοχημικό έλεγχο, αλλά μπόρεσε να διακρίνει και τη νέκρωση στην εσπειραμένη μοίρα (pars convoluta) του εγγύς σωληναρίου εξαιτίας της χορήγησης του CrO₄ από τη νέκρωση στην ορθή μοίρα (pars recta) εξαιτίας της χορήγησης των HCBBD, PAP και HgCl₂ ¹¹⁹.

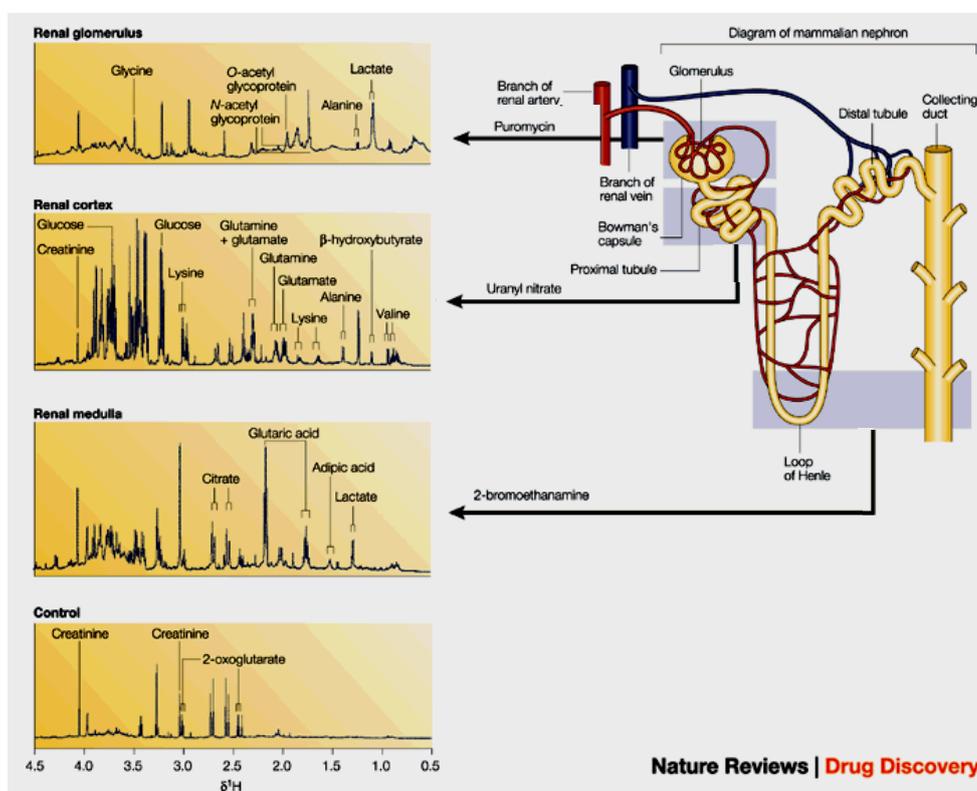
³ HCBBD: hexachlorobutadiene, PAP: *p*-aminophenol, BEA: bromoethanamine, PI: propyleneimine.

Οι τεχνικές PR προσέφεραν επίσης τη δυνατότητα σχεδιασμού των λεγόμενων μεταβολικών τροχιών (metabolic trajectories). Η πρώτη φορά που επετεύχθηκε αυτός ο σχεδιασμός ήταν σε μια μελέτη PCA, στην οποία χορηγήθηκαν σε αρουραίους οι τοξικές ουσίες BEA και HgCl_2 που προσβάλλουν επιλεκτικά τη μυελώδη και τη φλοιώδη περιοχή αντίστοιχα ¹²¹. Έγινε ποσοτικός προσδιορισμός 24 μεταβολιτών στο φάσμα NMR σε 8 χρονικές στιγμές κατά την εξέλιξη και υποχώρηση της νεφρικής βλάβης. Η ανάλυση έδειξε ότι η βαλίνη, η ταυρίνη, το TMAO και η γλυκόζη συσχετίζονται με την τοξικότητα του HgCl_2 , ενώ το οξικό οξύ, η μεθυλαμίνη, η διμεθυλαμίνη, το γαλακτικό οξύ και η κρεατίνη συσχετίζονται με την τοξικότητα της BEA. Η πρώτη τοξικολογική μελέτη που έγινε εφαρμόζοντας την τεχνική PCA σε ψηφιοποιημένα δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ για τη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης έδειξε ότι η μέθοδος της ψηφιοποίησης είναι το ίδιο αποτελεσματική με τη μέθοδο των προεπιλεγμένων μεταβολιτών ¹²². Ακολούθησε στη συνέχεια μια πιο εμπεριστατωμένη μελέτη, στην οποία χορηγήθηκαν συνολικά 10 τοξικές ουσίες που προσβάλλουν το ήπαρ και το νεφρό ⁴ και διερευνήθηκαν τα αντίστοιχα μεταβολικά προφίλ των ούρων ¹¹⁶. Έγινε σαφής διαφοροποίηση των μεταβολικών προφίλ των ούρων μεταξύ των ομάδων τοξικών ουσιών που προσβάλλουν το ήπαρ και εκείνων που προσβάλλουν επιλεκτικά το νεφρό. Συγκεκριμένα, πρόκληση βλάβης στο σπείραμα οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση ταυρίνης και κρεατίνης και μειωμένη απέκκριση TMAO, καθώς και των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του κιτρικού οξέος. Αλλοιώσεις στη μυελώδη περιοχή προκαλούν αύξηση των επιπέδων του γλουταρικού οξέος και μικρή μείωση των επιπέδων των οξέων κιτρικό και 2-οξογλουταρικό, καθώς και του TMAO. Στο εγγύς σωληνάριο, μια βλάβη στην S_1 εσπειραμένη μοίρα οδηγεί σε παροδική γλυκοζουρία, ενώ στην S_2/S_3 ορθή μοίρα οδηγεί σε γλυκοζουρία με ταυτόχρονη αμινοξουρία και αύξηση των επιπέδων αρκετών οργανικών οξέων ¹¹⁶. Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις των μεταβολικών προφίλ των ούρων συνοψίζονται στην **Σχήμα 27**.

Η χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ των ούρων επεκτάθηκε επίσης στη διερεύνηση της πολυκυστικής νόσου των νεφρών σε αρουραίους ¹²³. Έχουν

⁴ 3 ηπατοτοξικές και 7 νεφροτοξικές που προσβάλλουν: 2 το σπείραμα, 1 τη μυελώδη περιοχή, 1 την S_1 εσπειραμένη μοίρα και 3 την S_2/S_3 ορθή μοίρα του εγγύς σωληναρίου.

δημοσιευθεί πολλές εργασίες σχετικά με την αξία της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ των ούρων στην εκτίμηση της βλάβης της μυελώδους περιοχής του νεφρού εξαιτίας ισχαιμίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης νεφρικών μοσχευμάτων χοίρων (cold-stored kidney transplants) ¹²⁴⁻¹²⁶. Επίσης, έχει γίνει εκτενής διερεύνηση της προστατευτικής επίδρασης των διαφόρων υγρών συντήρησης στη νεφρική λειτουργία των μοσχευμάτων ^{126, 127}, ενώ έχει προταθεί ότι η καταγραφή της απέκκρισης ορισμένων οσμολυτών (TMAO, DMA), καθώς και των οξέων κιτρικό, γαλακτικό και οξικό θα μπορούσε να συμβάλει στην πρώιμη ανίχνευση νεφρικών αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια της συντήρησης και της μεταμόσχευσης ¹²⁸.



Σχήμα 27. Μεταβολομική ανίχνευση της νεφροτοξικότητας.

Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ 600MHz ούρων μετά από χορήγηση σε αρουραίους εξωγενών ουσιών που προσβάλλουν επιλεκτικά το νεφρό σε σύγκριση με ένα φάσμα ούρων από πειραματόζωο ελέγχου. Κάθε φάσμα αποτυπώνει το χαρακτηριστικό μεταβολικό προφίλ των ούρων που αντανακλά την εκάστοτε νεφρική βλάβη στο σπείραμα, στο σωληνάριο ή στη μυελώδη περιοχή που προκαλεί η αντίστοιχη νεφροτοξική ουσία (puromycin, uranyl nitrate, 2-bromoethanamine) ¹²⁹.

Συμπερασματικά, η γνώση και η εμπειρία που αποκτήθηκε κατά τη δεκαετία 1989-1999 με τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων στη νεφρική

βλάβη, αποδόθηκε με τον όρο «Μεταβονομική»¹³⁰. Έκτοτε, με γνώμονα κυρίως την ¹H-NMR μεταβονομική, πραγματοποιήθηκαν δεκάδες τοξικολογικές μελέτες σε πειραματόζωα, οι οποίες επέτρεψαν την ορθή ταξινόμηση ή/και πρόβλεψη των δειγμάτων των ούρων με βάση την περιοχή βλάβης ή νέκρωσης ιστού.

Τέλος, εξαιρετικό ενδιαφέρον έχει η άποψη που δημοσιεύθηκε το 2006 στο *Nature* ότι το μεταβολικό προφίλ ενός συγκεκριμένου πειραματόζωου (και κατ' επέκταση ενός οργανισμού) πριν τη χορήγηση μιας εξωγενούς ουσίας, περιέχει επαρκείς πληροφορίες ώστε να μπορεί να επιτρέψει την πρόβλεψη της απόκρισης του μεταβολισμού ή της τοξικής δράσης της χορηγούμενης ουσίας χωρίς προηγούμενη γνώση του γενομικού του προφίλ¹³¹. Αυτό οδήγησε στην πρόταση ενός νέου όρου, της *Φαρμακομεταβονομικής* (*Pharmacometabonomics*), που ορίζεται ως: «η πρόβλεψη της επίδρασης (π.χ. αποτελεσματικότητα ή τοξικότητα) ενός φαρμάκου ή μιας εξωγενούς παρέμβασης σε ένα συγκεκριμένο άνθρωπο, που βασίζεται σε ένα μαθηματικό μοντέλο προπαρεμβατικών μεταβολικών «αποτυπωμάτων» και η οποία ανοίγει το δρόμο στην εξατομικευμένη φαρμακευτική παρέμβαση (personalized drug treatment)¹³¹.

1.7.2 Μελέτες σε ανθρώπους

Παρόμοια αποτελέσματα με τις παραπάνω μελέτες νεφροτοξικότητας σε πειραματόζωα έχουν παρατηρηθεί και σε φασματοσκοπικές μελέτες ¹H-NMR ούρων στον άνθρωπο. Η πλειονότητα αυτών των μελετών αφορά την ανίχνευση νεφρικής βλάβης εξαιτίας της έκθεσης σε εξωγενείς ουσίες που μπορεί να εμφανίσουν νεφροτοξικές ιδιότητες¹³², όπως φαινόλη¹³³, ζιζανιοκτόνα¹³⁴, ή εξαιτίας δηλητηρίασης από υπερκατανάλωση μεθανόλης¹³⁵, φαρμάκων, όπως παρακεταμόλης¹³⁶ και ασπιρίνης¹³⁷ ή εξαιτίας άλλων παθολογικών καταστάσεων, όπως στον αποφρακτικό ίκτερο¹³⁸. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση ifosfamide κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, οδήγησε στην εμφάνιση νεφροτοξικότητας που χαρακτηρίζεται από σωληναριακή διαταραχή¹⁰⁸. Σε αυτές τις μελέτες η φασματοσκοπία ¹H-NMR των ούρων συνέβαλε τόσο στη πρώιμη διαπίστωση

της νεφρικής δυσλειτουργίας, όσο και στην ανάνηψη, στις περιπτώσεις εκείνες, στις οποίες οι σωληναριακές ή σπειραματικές αλλοιώσεις ήταν πλήρως ή μερικώς αναστρέψιμες.

Οι κλινικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ στη διερεύνηση της νεφρικής δυσλειτουργίας εξαιτίας νεφρικών ή άλλων συστηματικών νοσημάτων είναι λίγες, αλλά ιδιαίτερα αξιόλογες. Στις πιο σημαντικές από αυτές συγκαταλέγεται αυτή των Bell et al., οι οποίοι ανέφεραν την ταυτοποίηση για πρώτη φορά του TMAO και την επιβεβαίωση της διμεθυλαμίνης (DMA) στο πλάσμα αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του TMAO με τη σοβαρότητα της νόσου ^{139, 140}. Επίσης, σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του TMAO στα ούρα, καθώς και ο λόγος (DMA/TMAO) θα μπορούσε να προσδιορίσει τη δυσλειτουργία των νεφρικών μοσχευμάτων κατά την κλινική παρακολούθηση (follow-up) ασθενών που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού ¹⁴¹. Η αυξημένη αυτή απέκκριση του TMAO μπόρεσε έγκαιρα να συσχετισθεί με την απόρριψη των νεφρικών μοσχευμάτων πριν από την ιστοπαθολογική επιβεβαίωση της, είτε εξαιτίας οξείας σωληναριακής νέκρωσης, είτε εξαιτίας νεφροτοξικής δράσης της κυκλοσπορίνης που είχε χορηγηθεί ως ανοσοκατασταλτικό ¹⁴².

Σε μια κλινική μελέτη αναφέρεται ότι επιλέγοντας μια κατάλληλη περιοχή του φάσματος και εφαρμόζοντας γραμμική διαχωριστική ανάλυση (linear discriminant analysis) και τεχνικές διασταυρούμενης ταξινόμησης (cross-validated classification), η $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία των ούρων στη μεταμόσχευση νεφρού θα μπορούσε να δώσει ενδείξεις όσον αφορά την απόρριψη του μοσχεύματος νωρίτερα από τις κλασικές βιοχημικές μεθόδους με ευαισθησία 93% και ειδικότητα 96% ¹⁴³. Συγκεκριμένα, ο NMR ταξινομητής (NMR classifier) αυτής της μελέτης προσδιόρισε την υποκλινική απόρριψη (subclinical rejection) του μοσχεύματος 3 εβδομάδες νωρίτερα από τις ενδείξεις απόρριψης που καθορίζονταν από την αύξηση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού και έτσι να επιτρέπει την έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση και ελαχιστοποίηση των κινδύνων που ενέχει η φαρμακευτική αγωγή με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης σε ασθενείς με διάφορες μορφές σπειραματονεφρίτιδας εφαρμόστηκε για

πρώτη φορά σε δυο μελέτες από την ομάδα της Knubovets το 1992, οι οποίες αφορούσαν ασθενείς με χρόνια ή οξεία σπειραματονεφρίτιδα, νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η σύγκριση των μεταβολικών προφίλ των ούρων της ομάδας των νεφροπαθών με τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου υγιών ατόμων έδειξε αλλοιώσεις του ενδιάμεσου σωληναριακού ιστού, καθώς και μεμονωμένες διαταραχές του εγγύς σωληναρίου ή της νεφρικής θηλής ¹⁴⁴. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι οι σωληναριακές αλλοιώσεις συνοδεύονται από αμινοξουρία (λευκίνη, γλυκίνη, αλανίνη, κ.α.) και γλυκοζουρία, ενώ η δυσλειτουργία της μυελώδους μοίρας οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση TMAO και DMA ¹⁴⁵.

Άλλες εργασίες που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας ¹H-NMR των ούρων για τη διερεύνηση νεφρικών παθήσεων αφορούν την αποτίμηση της νεφρικής λειτουργίας φυσιολογικών και πρόωρων νεογνών, ¹⁴⁶ καθώς και νεογνών με αμφοτερόπλευρη αποφρακτική ουροπάθεια (bilateral obstructive uropathy) καταγράφοντας τα αντίστοιχα μεταβολικά προφίλ των ούρων κατά τη διάρκεια της κύησης ¹⁴⁷. Έχει επίσης διερευνηθεί η νεφρική λειτουργία σε παιδιά και εφήβους με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, καθώς και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ^{148, 149}.

Η πρώτη φορά που εφαρμόστηκαν σε κλινικές μελέτες οι τεχνικές PR σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία ¹H-NMR ήταν το 1994, όταν έγινε ταξινόμηση των δειγμάτων ούρων ασθενών με ενδογενείς διαταραχές του μεταβολισμού με βάση το μεταβολικών προφίλ των ούρων ¹⁵⁰. Επίσης, σε μελέτες με βάση τη μεταβολομική ανάλυση των ούρων έχει αναφερθεί η διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας ¹⁵¹. Μια άλλη κλινική μελέτη σχετικά με τη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης με βάση τη ¹H-NMR μεταβολομική που δημοσιεύθηκε πρόσφατα, εξετάζει τη δυνατότητα διάγνωσης της διαβητικής νεφροπάθειας καταγράφοντας και συγκρίνοντας το μεταβολικό προφίλ του ορού των ασθενών σε σύγκριση με το μεταβολικό προφίλ μιας ομάδας υγιών ατόμων ¹⁵².

Σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων η ¹H-NMR ανάλυση των ούρων 77 ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα ανίχνευσε την ύπαρξη αλλοιώσεων στο σωληναριοδιάμεσο ιστό, ενώ υπήρχε ικανοποιητική συσχέτιση με τα ευρήματα της βιοψίας νεφρού.

Δεδομένου λοιπόν ότι η συνύπαρξη σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων στη σπειραματονεφρίτιδα διαδραματίζει καθοριστικό προγνωστικό ρόλο στην εξέλιξη της σπειραματικής νεφρικής νόσου, η μεταβονομική ανάλυση των ούρων με βάση τη φασματοσκοπία NMR φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην έγκαιρη εκτίμηση της σοβαρότητας της νεφρικής βλάβης καθώς και στην παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας ¹⁵³.

Τέλος, υπάρχει μια διάχυτη αισιοδοξία ότι η πρόοδος αυτών των τεχνικών θα συμβάλει τελικά στην ανάπτυξη και καθιέρωση μιας γρήγορης και μη επεμβατικής προσέγγισης για την κλινική παρακολούθηση των μεταμοσχευμένων ατόμων ¹⁵⁴.

1.8 Η έννοια της Μεταβονομικής (Metabonomics)

Είναι γεγονός ότι οι σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται συχνά για τη μέτρηση της απόκρισης των ζώντων οργανισμών, κυττάρων ή ιστών στη χορήγηση φαρμάκων ή άλλων εξωγενών ουσιών (xenobiotics) τόσο στο επίπεδο της γενετικής όσο και της έκφρασης των κυτταρικών πρωτεϊνών, με βάση τις γονιδιακές και πρωτεϊνικές μεθόδους αντίστοιχα. Οι τρέχουσες τεχνικές της βιοπληροφορικής (bio-informatics), γενωμική (genomics) και πρωτεωμική (proteomics), έχουν αποδείξει ότι αποτελούν πολύ δυναμικά εργαλεία για τη μελέτη των διαφορετικών τρόπων βιολογικής απόκρισης στην έκθεση εξωγενών ουσιών. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές αυτές, ακόμα και αν συνδυασθούν, δεν παρέχουν το πλήθος των πληροφοριών που απαιτούνται για την κατανόηση της συνολικής κυτταρικής λειτουργίας των ζώντων συστημάτων, αφού και οι δυο τεχνικές αγνοούν τη δυναμική μεταβολική κατάσταση του οργανισμού.

Το 1999 οι Nicholson, Lindon και Holmes του τμήματος Βιολογικής Χημείας του Imperial College του Λονδίνου εισήγαγαν μια νέα έννοια, αυτή της *Μεταβονομικής* (Metabonomics) σε αναλογία με τις έννοιες της πρωτεωμικής και γενωμικής. *Ο όρος Μεταβονομική ορίζεται ως ο ποσοτικός προσδιορισμός της πολυπαραμετρικής μεταβολικής απόκρισης των ζώντων συστημάτων σε παθοφυσιολογικές διεγέρσεις ή γενετικές τροποποιήσεις* ¹³⁰. Αφορά δηλαδή ένα σύστημα προσέγγισης για την in vivo μελέτη των μεταβολικών προφίλ

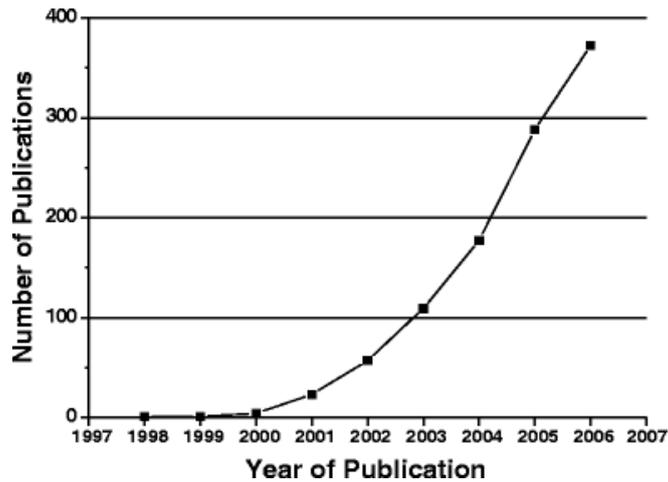
των βιολογικών υγρών, η οποία στοχεύει στη συλλογή πληροφοριών που αφορούν το μηχανισμό δράσης παθολογικών καταστάσεων, της τοξικότητας των φαρμάκων και της επίδρασης των γονιδίων. Τα μέλη της ερευνητικής ομάδας που επινόησαν την καινούρια αυτή έννοια, χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι συνέθεσαν τον όρο μεταβολομική από τις ελληνικές λέξεις «meta», για να εκφράσουν την *αλλαγή*, και «nomos» για να εκφράσουν ένα *σύστημα κανόνων*. Με το συνδυασμό των δυο αυτών λημμάτων, περιγράφεται η δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (σύστημα κανόνων, nomos), τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιήσουν αλλαγές του μεταβολισμού (αλλαγή, meta) ¹⁵⁵.

Ο σκοπός μίας τέτοιας διαδικασίας είναι να αποκαλύψει βιοχημικές πληροφορίες, οι οποίες αντικατοπτρίζουν πραγματικά βιολογικά συμβάντα ¹²⁹. Για τη διερεύνηση των περίπλοκων μεταβολικών προφίλ απαιτούνται αναλυτικές προσεγγίσεις, οι οποίες πρέπει να είναι μη εκλεκτικές, αλλά και «πλούσιες σε πληροφορία», όπως η φασματοσκοπία NMR, η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS), η αέριος χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS), η υψηλής πιστότητας υγρή χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και τεχνικές οπτικής πυκνότητας. Βιοαναλυτικά οι αναλυτικές τεχνικές NMR και MS είναι τα πιο ισχυρά μέσα δημιουργίας πολυμεταβλητών μεταβολικών δεδομένων, των οποίων η ανάλυση και ερμηνεία πραγματοποιείται με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων ¹⁵⁶.

Η επινόηση της έννοιας της μεταβολομικής αποτέλεσε ουσιαστικά το επιστέγασμα των πολυάριθμων και πρωτοποριακών μελετών των μελών της προαναφερθείσας ερευνητικής ομάδας από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έκτοτε ^{105, 106, 111, 156-158}. Η ομάδα αυτή επικεντρώθηκε κυρίως στη χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την καταγραφή του μεταβολικού προφίλ βιολογικών υγρών, ιστών ή εκχυλισμάτων τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή τοξικές επιδράσεις, κυρίως σε τρωκτικά (ποντικοί, επίμυες) και σε μικρότερο βαθμό στον άνθρωπο. Ο κύριος λόγος εστίασης σε μελέτες των βιολογικών υγρών με φασματοσκοπία NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας και πρωτίστως πρωτονίου, είναι ότι η αναλυτική αυτή τεχνική παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για τη βιοχημική και τοξικολογική δράση ενός ευρέους φάσματος εξωγενών μεταβολιτών, καθώς και για τη διαταραχή των

μεταβολιτών σε παθολογικές καταστάσεις. Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ είναι μια μη επεμβατική τεχνική, όπου ένα απλό φάσμα λαμβάνεται συνήθως σε λίγα λεπτά με ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος. Τα πλεονέκτημα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι παρέχεται η δυνατότητα της άμεσης καταγραφής οποιασδήποτε αλλαγής του μεταβολικού προφίλ του οργανισμού και παράλληλα της αποκάλυψης και ταυτοποίησης νέων ή μη αναμενόμενων μεταβολιτών που σχετίζονται με νόσο ή προσβολή ιστού, καθιστούν την τεχνική αυτή ως την πλέον κατάλληλη για την ανάπτυξη της μεταβιομικής.

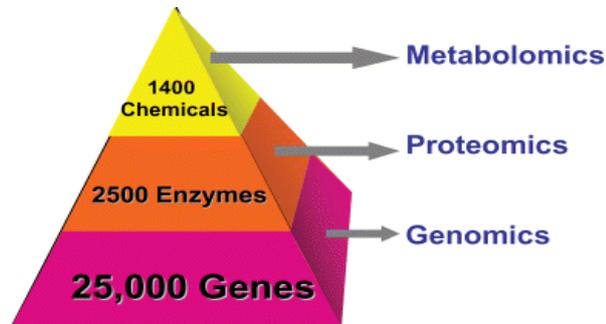
Θα ήταν σκόπιμο στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι συχνά ο όρος Μεταβιομική συγχέεται ή ταυτίζεται με τον όρο Μεταβολομική (Metabolomics) ¹⁵⁹. Η Μεταβολομική αφορά τη μελέτη του «μεταβολώματος» (metabolome) που αναφέρεται στο πλήρες σύνολο των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους (εξωγενών ή ενδογενών) που μπορούν να υπάρξουν σε ένα ζωντανό κύτταρο, ιστό ή οργανισμό ¹⁶⁰. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως ανάλυση του μεταβολώματος (metabolome analysis) το 1998 από τους Tweeddale et al. στη φαινοτυπική διερεύνηση του *Escherichia coli* ¹⁶¹. Με βάση την επικρατέστερη άποψη στη διεθνή βιβλιογραφία, η μεταβιομική είναι συνδεδεμένη περισσότερο με τη φασματοσκοπία NMR, ενώ η μεταβολομική με τη φασματοσκοπία μάζας ¹⁶². *Η διαφοροποίηση όμως των δυο εννοιών δεν είναι στην αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται, αλλά στο γεγονός ότι η μεταβολομική δίνει περισσότερο έμφαση στη μελέτη του συνολικού μεταβολικού προφίλ των κυττάρων, ενώ η μεταβιομική περιγράφει κυρίως τις μεταβολικές αλλαγές που εντοπίζονται κυρίως στα βιολογικά υγρά.* Ωστόσο, στη διεθνή βιβλιογραφία, η μεταβολομική αποτελεί τον πλέον πιο διαδεδομένο όρο εκ των δυο, αφού η μεταβιομική θεωρείται από τους επιστήμονες άλλοτε ως ταυτόσημη έννοια με τη μεταβολομική και άλλοτε ως υποκατηγορία της. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αναζήτηση στην παγκόσμια ηλεκτρονική βάση βιβλιογραφικών αναφορών PubMed έδωσε για το μήνα Απρίλιο του 2009, 1156 αναφορές στο πεδίο "metabolomics" και μόνο 336 στο "metabonomics". Ο αριθμός μάλιστα των δημοσιεύσεων μέχρι και το 2006 φαίνεται ότι ακολουθεί εκθετική πορεία και εκτιμάται ότι θα συνεχίσει και τα επόμενα χρόνια (**Σχήμα 28**).



Σχήμα 28. Κατανομή των βιβλιογραφικών αναφορών την περίοδο 1998-2006 με πεδίο αναζήτησης τον όρο “metabolomics” στη ηλεκτρονική βάση ISI Web of Knowledge (Oldiges et al., 2007).

Συμπερασματικά, για να γίνει καλύτερα κατανοητή η συνάφεια και συμπληρωματικότητα των τεχνικών “-omics”, (όπως συχνά αναφέρονται στη βιβλιογραφία η γενωμική, πρωτεωμική και μεταβολομική) θα μπορούσε σχηματικά να αναφερθεί το εξής: Δεδομένου ότι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μπορούν σε μερικές περιπτώσεις να επιφέρουν αλλαγές στο μεταβολισμό, θεωρητικά είναι εφικτό, ανιχνεύοντας τις αλλαγές του μεταβολισμού να εξάγονται συμπεράσματα για τις αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και το αντίστροφο. Οι λειτουργίες όμως τόσο του κυττάρου όσο και του οργανισμού είναι συνεχείς και αλληλοεξαρτώμενες με αποτέλεσμα να είναι ανιχνεύσιμες σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης, όπως της γονιδιακής έκφρασης, της πρωτεϊνοσύνθεσης και του μεταβολισμού. Η μεταβολομική δεν προϋποθέτει την πλήρη ανάλυση του γονιδιώματος προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους ενός οργανισμού, οι οποίοι συνήθως ανιχνεύονται ευκολότερα καθώς είναι σημαντικά λιγότεροι τόσο σε σχέση με τα γονίδια όσο και τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, δεν είναι πανάκεια για την επίλυση διαγνωστικών προβλημάτων καθώς αποτελεί ένα μικρό μέρος «της πυραμίδας της ζωής» και εκτός των αλληλοεπιδράσεων της με τη γενωμική και την πρωτεωμική, επηρεάζεται σημαντικά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά και παράγοντες βιολογικής μεταβλητότητας στον άνθρωπο (**Σχήμα 29**). Αυτό που σίγουρα

προσφέρει είναι μια προσέγγιση από την «κορυφή της πυραμίδας» και μπορεί έτσι να βοηθήσει στην κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα σε ένα οργανισμό ¹⁶³.



Σχήμα 29. Η «πυραμίδα της ζωής» που απεικονίζει τη σχέση της γενωμικής, της πρωτεωμικής και της μεταβολομικής στον άνθρωπο. Ο εκτιμώμενος αριθμός των γονιδίων, ενζύμων και μεταβολιτών > 1μM φαίνεται σε κάθε τμήμα της πυραμίδας ¹⁶⁴.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μελέτη φασματοσκοπίας ^1H NMR των ούρων σε άτομα με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία

2.1.1 Υλικό της μελέτης

Μελετήθηκαν τριάντα έξι (36) άτομα με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία που δεν είχαν συγγενική σχέση μεταξύ τους. Τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος διαπιστώθηκαν τυχαία σε έλεγχο ρουτίνας, καθώς τα άτομα ήταν ασυμπτωματικά. Ως πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία ορίστηκε η διαταραχή που χαρακτηρίζεται από επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό χαμηλότερα από 2.5mg/dl ($sUA < 2.5\text{mg/dl}$) και κλασματική απέκκριση ουρικού πάνω από 10% ($FEUA > 10\%$). Σε όλα τα άτομα έγινε λεπτομερής λήψη ιστορικού και ενδεδειγμένη φυσική εξέταση, για να αποκλειστούν από τη μελέτη άτομα με νοσήματα ή φάρμακα που επηρεάζουν την ομοιοστασία του ουρικού οξέος.

Τριάντα εννέα (39) υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου με φυσιολογικά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό ($sUA = 2.5-7.0\text{mg/dl}$) και $FEUA < 10\%$ αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Τα άτομα αυτά δεν έπαιρναν φάρμακα και δεν είχαν ιστορικό νεφρολιθίασης, αιματουρίας ή οξείας νεφρικής ανεπάρκειας. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιστημονική επιτροπή έρευνας και δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τα άτομα της μελέτης έδωσαν τη συγκατάθεσή τους να συμπεριληφθούν στη μελέτη.

2.1.2 Μεθοδολογία

Από όλα τα άτομα της μελέτης ζητήθηκε να μη πάρουν φάρμακα (συμπεριλαμβανομένων και των μη συνταγογραφούμενων φαρμάκων ευρείας χρήσεως) και να απέχουν από την κατανάλωση οινοπνεύματος και ψαριών 24 ώρες πριν από τη λήψη των δειγμάτων, αφού είναι γνωστό ότι οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ των ούρων. Η λήψη του δείγματος αίματος έγινε μετά από 12 ώρες νηστείας, ενώ επίσης συλλέχθηκαν τουλάχιστον 20 ml πρωινών ούρων σε αποστειρωμένα δοχεία συλλογής

ούρων. Ο ορός του αίματος διαχωρίσθηκε μετά από φυγοκέντρηση 15 λεπτών σε 1500g. Τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Hettich, UNIVERSAL II για 10 λεπτά σε 1500g για την αφαίρεση πιθανών ιζημάτων και από το υπερκείμενο προσδιορίσθηκαν οι βιοχημικοί παράμετροι.

Σε ένα τμήμα του υπερκείμενου των δειγμάτων των ούρων προστέθηκαν 100 μl διαλύματος αζιδίου του νατρίου συγκέντρωσης 1g/l (NaN₃) ανά 2 ml ούρων, για την αποφυγή πιθανής βακτηριακής μόλυνσης, και στη συνέχεια το δείγμα αυτό διαμοιράσθηκε σε επιμέρους δείγματα των 1 ml και αποθηκεύθηκε σε Cryovials (Greiner, Bio-One) στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση των NMR πειραμάτων εντός 4 μηνών ¹⁵⁵.

2.1.2.1 Βιοχημικός έλεγχος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιοχημικών παραμέτρων (γλυκόζης, κρεατινίνης, ουρίας, ουρικού οξέος και ηλεκτρολυτών) των ούρων και του ορού πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή Olympus AU600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany) με τις καθιερωμένες μεθόδους. Η μέτρηση των επιπέδων των ολικών πρωτεϊνών έγινε φωτομετρικά με τη μέθοδο του σουλφοσαλυκιλικού οξέος ¹⁶⁵.

Οι επιμέρους πρωτεΐνες των ούρων (αλβουμίνη (UAlb), ανοσοσφαιρίνη G (UIgG) και α₁-μικροσφαιρίνη (Uα₁m)) μετρήθηκαν σε νεφελομετρητή Behring Nephelometer BN ProSpect (Dade Behring, Holding GmbH, Lieberbach, Germany). Η απέκκριση αυτών των πρωτεϊνών εκφράσθηκε ως προς τη συγκέντρωση της κρεατινίνης των ούρων (Ucr) δηλαδή, ως UAlb/Ucr, UIgG/Ucr και Uα₁m/Ucr σε mg/g κρεατινίνης.

Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) υπολογίσθηκε με την εξίσωση MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) ¹⁶⁶ :

$$\text{GFR} = 170 \times [\text{P}_{\text{cr}}]^{-0.999} \times [\text{ηλικία}]^{-0.176} \times [0.762 \text{ σε γυναίκες}] \times [\text{SUN}]^{-0.170} \times [\text{Alb}]^{+0.318},$$

όπου P_{cr} , SUN και Alb, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στον ορό της κρεατινίνης και της ουρίας σε mg/dL, και της αλβουμίνης σε g/dL.

Η μέτρηση του ουρικού οξέος στον ορό και στα ούρα έγινε με ενζυματική χρωματομετρική δοκιμασία, η οποία βασίζεται στην αντίδραση του ουρικού με την ουρικάση:



Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η αντίδραση Trinder για τη μέτρηση του H_2O_2 .

Οι κλασματικές απεκκρίσεις των ηλεκτρολυτών και του ουρικού οξέος στο δείγμα των ούρων υπολογίσθηκαν σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\%FE_e = (U_e \times Scr / S_e \times Ucr) \times 100\%$$

Όπου $\%FE_e$ η κλασματική απέκκριση των ηλεκτρολυτών (e) ή του ουρικού οξέος, U_e και S_e η συγκέντρωση της αντίστοιχης ουσίας στα ούρα και στον ορό αντίστοιχα, ενώ Scr και Ucr τα επίπεδα της κρεατινίνης στον ορό και τα ούρα αντίστοιχα. Τιμές κλασματικής απέκκρισης καλίου, ασβεστίου, μαγνησίου και φωσφόρου μεγαλύτερες από 13%, 3%, 4% και 20% θεωρήθηκαν παθολογικά αυξημένες ^{167, 168}.

Το ποσοστό της επαναρροφούμενης γλυκόζης ($\%Tgluc$), το οποίο αντιπροσωπεύει το ποσοστό της διηθούμενης γλυκόζης που επαναρροφάται από το εγγύς σωληνάριο υπολογίσθηκε με τον τύπο:

$$\%Tgluc = 1 - Ugl \times Scr / Sgl \times Ucr$$

όπου Sgl και Ugl τα επίπεδα της γλυκόζης στον ορό και τα ούρα, και Scr και Ucr τα επίπεδα της κρεατινίνης στον ορό και τα ούρα αντίστοιχα. Τιμές της $\%Tgluc$ μικρότερες από 99.7% αποτελούν ένδειξη μειωμένης σωληναριακής επαναρρόφησης της γλυκόζης, δηλαδή γλυκοζουρίας ¹⁶⁹.

Ο ουδός επαναρρόφησης των φωσφορικών (TmPO_4/GFR) εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του νομογράμματος των Walton και Bijvoet ¹⁷⁰. Οι ασθενείς με επίπεδα φωσφόρου χαμηλότερα από 2.8mg/dl, κλασματική απέκκριση φωσφόρου πάνω από 20% και ουδό επαναρρόφησης < 2.5mg/dl θεωρήθηκε ότι εμφανίζουν απρόσφορη φωσφατουρία.

2.1.2.2 ¹H NMR φασματοσκοπία

Για τα αποθηκευμένα στους -80 °C δείγματα ούρων που προορίζονταν για φασματοσκοπική ανάλυση, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Αρχικά, απόκτηση θερμικής ισορροπίας με παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και στη συνέχεια ανάδευση (Vortex, VELP Scientifica) 400 μl ούρων και ανάμειξή τους με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.2 M Na_2HPO_4 / 0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4. Na_2HPO_4 , M=141.96 g/mol, Riedel-de Haën, NaH_2PO_4 , M=156.01 g/mol, Merck). Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος συνέβαλε στην όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και την καλύτερη σταθεροποίηση του στην περιοχή 7.4 ± 0.5 ¹⁷¹. Σύντομη ήπια ανάδευση, αναμονή 10 λεπτών για την πλήρη ανάμειξη των ούρων με το ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων ¹⁷². Μεταφορά 500 μl από το διαυγές υπερκείμενο σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5 χιλ. (Wilmad 535-PP, Sigma-Aldrich) και προσθήκη 50 μl διαλύματος δευτεριωμένου ύδατος (D_2O , M=20.03 g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) που περιείχε 0.075% δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-²H₄)-1-propionate (TSP, M=172.28 g/mol, Sigma-Aldrich). Η τελική συγκέντρωση του TSP στο σωληνάριο NMR ήταν 0.456 mM. Το D_2O χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για τη σταθεροποίηση της συχνότητας πεδίου (field frequency lock-solvent) του φασματογράφου NMR. Το δευτεριωμένο άλας TSP αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ($\delta^1\text{H}$ 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων. Το D_2O προστέθηκε ακριβώς πριν την εκτέλεση των πειραμάτων ¹H NMR για να ελαχιστοποιηθεί η ανταλλαγή των εύκολα αποσπώμενων πρωτονίων με το δευτέριο ¹⁷³.

Η λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ μιας διάστασης (1D) έγινε στους 300 K στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX (Bruker Biospin GmbH) του Εργαστηρίου NMR του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε συχνότητα 500,13 MHz με το λογισμικό XWINNMR V.2.6 της ίδιας εταιρείας.

Για την καταστολή του σήματος του νερού (water suppression) χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°- t_1 -90°- t_m -90°- FID λήψη) ¹⁷⁴ όπου: RD: ο χρόνος αποκατάστασης 3s (relaxation delay) ώστε να εξασφαλισθεί πλήρη αποδιέγερση των πυρήνων μεταξύ των διαδοχικών παλμών στη διάρκεια του οποίου έγινε η καταστολή της κορυφής συντονισμού του νερού, t_1 : χρόνος 3μs που αντιστοιχεί στο πρώτο μέρος του πειράματος NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) t_m : ο χρόνος ανάμειξης 150ms στη διάρκεια του οποίου έγινε επιλεκτική ακτινοβολή της κορυφής συντονισμού του νερού.

Σε κάθε δείγμα έγινε συλλογή 128 σαρώσεων (scans), 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 6009.6 Hz (αντιστοιχεί σε 12.02ppm) και παλμό 90° διάρκειας 8-10μs. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα πραγματικά δεδομένα (size spectrum, SI) αυξήθηκαν με την προσθήκη μηδενικών στη μνήμη του υπολογιστή (zero filling) σε 64K, ώστε να ληφθεί τελική μήτρα δεδομένων 64K × 64K. Για την αύξηση της ευαισθησίας οι ελευθέρως φθίνουσες απαγωγές (FIDs) πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function), που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier, έγινε διόρθωση της φάσης και στη συνέχεια της γραμμής βάσης των φασμάτων με την εφαρμογή μιας απλής πολυωνυμικής συνάρτησης 5^{ου} βαθμού με το λογισμικό πρόγραμμα TopSpin 1.2 (Bruker Biospin GmbH).

Η ταυτοποίηση των απεκκρινόμενων μεταβολιτών έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων και της πολλαπλότητας των κορυφών συντονισμού ¹⁷⁵ ¹³⁰. Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών έγινε με βάση το ύψος της κορυφής συντονισμού επιλεγμένων σημάτων για κάθε μεταβολίτη λαμβάνοντας υπόψη κάθε φορά τον αριθμό των πρωτονίων που αντιστοιχούσαν σε κάθε κορυφή. Ακολούθησε κανονικοποίηση των εκάστοτε κορυφών ως προς το ύψος της κορυφής

συντονισμού της μεθυλομάδας της κρεατινίνης στα 3.06ppm και οι μεταβολίτες εκφράστηκαν σε mmol/mol κρεατινίνης

2.1.3 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων εφαρμόστηκαν παραμετρικές στατιστικές μέθοδοι με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού Statistica 6.0 (StatSoft Inc). Η κανονικότητα των μεταβλητών που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Kolmogorof-Smirnof . Όλες οι μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η σύγκριση των παραμέτρων της μελέτης έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας student's t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές. Η σημαντικότητα ορίστηκε για τιμές $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (Mean \pm SD).

2.1.4 Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων

Τα ψηφιοποιημένα $^1\text{H-NMR}$ φάσματα εισήχθησαν από το πρόγραμμα TopSpin στο λογισμικό πρόγραμμα AMIX 3.2.4 (Analysis of MIXtures, Bruker Analytik), στο οποίο κάθε φάσμα τεμαχίστηκε με τον ίδιο τρόπο σε 244 συνεχείς **περιοχές ολοκλήρωσης (bins)** με πλάτος 0.04ppm η κάθε μια και εύρος χημικής μετατόπισης από 0.20 έως 10.00ppm. Η περιοχή μεταξύ 4.38 και 6.30 ppm εξαιρέθηκε από την ανάλυση, επειδή περιέχει αλλοιώσεις της μορφής της γραμμής βάσης από τη μη πλήρη καταστολή της κορυφής του νερού, καθώς και από τη διευρυμένη κορυφή της ουρίας λόγω ανταλλαγής των N-πρωτονίων της με δευτέρια του διαλύτη. Παρόλο που το pH ρυθμίστηκε στην περιοχή 7.4 ± 0.5 , οι κορυφές συντονισμού του κιτρικού οξέος και της κρεατινίνης εμφάνισαν μια μικρή εξάρτηση από την τιμή του pH με αποτέλεσμα να συντονίζονται συχνά σε ελαφρά διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Για αυτό το σκοπό, τα bins που αντιστοιχούσαν στο κιτρικό οξύ (2,50 – 2,58 και 2,66 – 2,74) και στην κρεατινίνη (3,02 – 3,06 και 4,02 – 4,06) ενοποιήθηκαν στα "superbins" 2,54 και 2,70 για το κιτρικό 3,04 και 4,04 για την κρεατινίνη αντίστοιχα. Όλα τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας κάθε bin με το ολικό εμβαδό του φάσματος στο πρόγραμμα AMIX για να ληφθεί υπόψη η μεγάλη διαβάθμιση της πυκνότητας των δειγμάτων των

ούρων. Ο πίνακας δεδομένων που τελικά προέκυψε μετά και τις προαναφερθείσες επεξεργασίες περιείχε 194 bins και αποτέλεσε τη βάση δεδομένων (input descriptor) για την ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων. Αυτή η βάση δεδομένων επεξεργάστηκε αρχικά με το Microsoft Excel (Microsoft Office 2000, υπό μορφή ASCII) και στη συνέχεια με το λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 10.5 (UMETRICS AB, Box 7960, SE 90719, Umeå, Sweden). Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA) στα δεδομένα NMR, έγινε κεντράρισμα του μηδενός (mean centering) κάθε στήλης και όλα τα δεδομένα διαιρέθηκαν με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης της στήλης που ανήκαν (Pareto scaling)⁹⁹.

Η PCA χρησιμοποιήθηκε αρχικά για μια γενική επισκόπηση του συνόλου των μεταβιομικών δεδομένων, την επισήμανση δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers) μεταξύ των παρατηρήσεων (observations, φάσματα), καθώς και την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης ομαδοποίησης ή και διαχωρισμού των δεδομένων⁹⁹. Ο εντοπισμός τυχόν δειγμάτων με έντονα ακραία συμπεριφορά (strong outliers) που βρίσκονταν έξω από την έλλειψη Hotelling T² επιπέδου εμπιστοσύνης 0,95, έγινε με τη βοήθεια των γραφημάτων συντεταγμένων PCA (scores plot). Αντίστοιχα, τα γραφήματα DmodX των υπολοίπων του στατιστικού μοντέλου PCA (model residuals plots DmodX) χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνευθούν τυχόν δείγματα με μετρίως ακραία συμπεριφορά (moderate outliers) που υπερέβησαν το όριο επιπέδου εμπιστοσύνης 0.05 .

Με την PLS-DA αναζητήθηκε η εκάστοτε σχέση που συνδέει τον πίνακα X (περιοχές ολοκλήρωσης NMR, bins) με ένα πίνακα εξαρτημένων μεταβλητών κατηγοριοποίησης Y, που περιείχε κωδικοποιημένη την πληροφορία γένους ή νόσου. Συγκεκριμένα με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η βέλτιστη δυνατή διαχωριστική συνάρτηση (discriminant function), δηλαδή το στατιστικό μοντέλο PLS-DA, που παρείχε το σαφέστερο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων της μελέτης βάσει των μεταβλητών X, δηλαδή των περιοχών ολοκλήρωσης NMR⁹⁹. Για την ερμηνεία των γραφημάτων συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκαν τα διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης (regression coefficients plots) αποσκοπώντας στην ανάδειξη των περιοχών που συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων.

Η τεχνική OSC εφαρμόστηκε για την αφαίρεση εκείνων των γραμμικών συνδυασμών των μεταβλητών X που ήταν ορθογώνιοι προς το διάνυσμα Y των εξαρτημένων μεταβλητών κατηγοριοποίησης, με σκοπό την ελαχιστοποίηση της διατομικής μεταβλητότητας και την επίτευξη του μεγαλύτερου βαθμού διάκρισης των υπό μελέτη ομάδων.

Σε κάθε στατιστικό μοντέλο εφαρμόστηκε η μέθοδος **διασταυρούμενης αξιολόγησης (cross validation)** με την προεπιλεγμένη διαδικασία των 7 επαναλήψεων του λογισμικού προγράμματος SIMCA-P. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής ήταν η αφαίρεση του 1/7 των αρχικών δεδομένων, η δημιουργία νέων στατιστικών μοντέλων από τα εναπομείναντα, η πρόβλεψη των δεδομένων που αφαιρέθηκαν και η σύγκριση των τιμών πρόβλεψης με τις πραγματικές τιμές. Η παράμετρος Q^2 που υπολογίστηκε με τη μέθοδο αυτή παρείχε μια *εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης* των στατιστικών μοντέλων θεωρώντας «καλή ικανότητας πρόβλεψης» για $Q^2 > 0.5$ και «άριστη ικανότητας πρόβλεψης» για $Q^2 > 0.9$, ενώ αντίστοιχα η παράμετρος R^2 , παρείχε μια ποσοτική εκτίμηση της προσαρμογής του στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα (goodness of fit) ⁹⁹.

Επιπλέον, εφαρμόστηκαν διαδικασίες τόσο εσωτερικής (held-back data) όσο και εξωτερικής αξιολόγησης (external data validation) των στατιστικών μοντέλων. Στην πρώτη περίπτωση η αξιολόγηση έγινε με τυχαία επιλογή μερικών από τα δεδομένα βάσει των οποίων έγινε η βαθμονόμηση του εκάστοτε στατιστικού μοντέλου, ενώ στη δεύτερη περίπτωση όταν συμπεριλήφθηκαν δεδομένα τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα κατά την δημιουργία των μοντέλων. Έτσι, στην παρούσα μελέτη περίπου το 78% των δεδομένων συγκρότησε την ομάδα βαθμονόμησης (training set) και το υπόλοιπο 22% καθόρισε την ομάδα εσωτερικής αξιολόγησης (test set). Σε όλα τα φάσματα δόθηκε μια κατάλληλη αριθμητική τιμή κατηγοριοποίησης (ψευδομεταβλητής) ανάλογα με την υποομάδα στην οποία ανήκαν για την κατασκευή του αντίστοιχου πίνακα απόκρισης Y (response Y matrix). Το ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης των δειγμάτων έγινε με τη χάραξη ειδικών διαγραμμάτων ελέγχου της αξιοπιστίας (Y -Predicted scatter plots), όπου οι υποομάδες των δειγμάτων οριοθετήθηκαν από την ευθεία $y=0.5$ για βαθμό εμπιστοσύνης 95%. Με βάση τις επιτυχείς και ανεπιτυχείς κατατάξεις των

δειγμάτων ορίστηκαν τα Αληθώς Θετικά (ΑΘ), Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ), Ψευδώς Θετικά (ΨΘ) και Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ) αποτελέσματα και έγινε στη συνέχεια εκτίμηση της ευαισθησίας $[ΑΘ/(ΑΘ + ΨΑ) \times 100]$ και της ειδικότητας $[ΑΑ/(ΑΑ + ΨΘ) \times 100]$ ¹⁷⁶.

2.2 Γονιδιακή μελέτη ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία

2.2.1 Υλικό της μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν 9 άτομα που πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση της ΠΝΥ και ήταν από διαφορετικές οικογένειες. Τα άτομα δεν είχαν συμπτώματα και προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για έλεγχο ρουτίνας (check-up). Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 50 υγιή άτομα με φυσιολογικά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό.

2.2.2 Μεθοδολογία

Το γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε από λευκά αιμοσφαίρια ¹⁷⁷. Σε 700 μl περιφερικού ολικού αίματος προστέθηκαν 700 μl διαλύματος TKM (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 4 mM MgCl₂ και 2 mM EDTA pH 8) και 25 μl NP-40 (Nonyphenoxy Polyethoxy Ethanol-40). Το μίγμα αυτών των διαλυμάτων προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια αναδεύθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 3 min. Το ίζημα των λευκοκυττάρων πλύθηκε με 0,5 ml διαλύματος TKM 4-5 φορές μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα των ερυθροκυττάρων, το οποίο φαίνεται μακροσκοπικά από την λευκή/ υποκίτρινη χροιά του ιζήματος. Σε αυτές τις πλύσεις του ιζήματος η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε στις 10.000 στροφές για 1 sec. Στο καθαρό ίζημα των λευκοκυττάρων προστέθηκαν 200 μl TKM και 15 μl διαλύματος SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate) και θερμάνθηκε για 5 min στους 55°C. Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η λύση των λευκοκυττάρων, των πυρήνων τους και η μετουσίωση των πρωτεϊνών που είναι προσκολλημένες στο DNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 75μl

διαλύματος NaCl και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 3 min. Το αποτέλεσμα αυτού του σταδίου είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο erpendorf και προστέθηκαν 750 μl απόλυτης αιθανόλης -20 °C. Η αιθανόλη αφυδατώνει το DNA, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να συλλεχθεί εύκολα και μετά να διαλυθεί σε 50 μl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EDTA pH 8). Το DNA που απομονώθηκε διατηρήθηκε στους 4°C.

Στη συνέχεια με τη χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε πολλαπλασιασμός του προαγωγέα (promotor) και όλων των εξωνίων (exons) του γονιδίου SLC22A12.

Κάθε αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 25 μl και πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστήριων σε σωλήνα "erpendorf":

- ✓ 100 ng DNA
- ✓ 50 pmols κάθε εκκινητή
- ✓ 200 μM κάθε dNTP (A, T, G, C)
- ✓ 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x PCR buffer, απουσία Mg⁺⁺
- ✓ 1 mM MgCl₂
- ✓ 2,5 U Taq DNA πολυμεράσης
- ✓ Συμπλήρωση με dd H₂O σε τελικό όγκο 25 μl

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR ήταν το εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 10 min
2. Αποδιάταξη στους 95 °C για 30 sec
3. Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 50 °C για 30 sec
4. Επιμήκυνση των θυγατρικών κλώνων στους 72°C για 1 min και 30 sec
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 για 30 κύκλους
6. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

Αφού ενισχύθηκε (εκατοντάδες χιλιάδες αντίγραφα) κάθε εξώνιο του γονιδίου σε κάθε υπό μελέτη δείγμα στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος

στερεοδιαμόρφωσης πολυμορφισμού απλής αλυσίδας, SSCP (single strand conformation polymorphisms).

Κατά τη διαδικασία της ανάλυσης SSCP γίνεται αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της περιοχής που ενισχύθηκε και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους βάρος και τη στερεοχημική τους διαμόρφωση. Αν το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των δειγμάτων απέκλινε από το φυσιολογικά αναμενόμενο, αυτό σήμαινε την πιθανή παρουσία κάποιας γενετικής αλλαγής στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου και στο συγκεκριμένο δείγμα.

Η ταυτοποίηση της αλλαγής πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια με την ανεύρεση της πρωτοδιάταξης του DNA για τη συγκεκριμένη περιοχή του υπό μελέτη γονιδίου. Η σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου που βρέθηκε με την αγρίου τύπου (wild type) αλληλουχία προσδιορίζει τη νουκλεοτιδική υποκατάσταση και κατ'επέκταση την πιθανή αλλαγή που επιφέρει σε κάποιο από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Αν αυτή η αλλαγή περιορίζεται μόνο σε πάσχοντα άτομα τότε χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη, ενώ αν αφορά και τα άτομα της ομάδας ελέγχου τότε αποτελεί πολυμορφισμό που αφορά το γενικό πληθυσμό.

2.3 Μελέτη νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών

2.3.1 Υλικό της μελέτης

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 19 ενήλικα άτομα που εισήχθησαν στην παθολογική κλινική του Π.Π.Ν.Ιωαννίνων με οξύ εμπύρετο νόσημα (λοίμωξη χοληφόρων ή ουροποιητικού). Οι ασθενείς έλαβαν διπλό αντιμικροβιακό σχήμα που αποτελούνταν από ένα μη νεφροτοξικό αντιβιοτικό (β-λακτάμη) και μια αμινογλυκοσίδη (αμικασίνη 1gr μια φορά την ημέρα). Σε όλα τα άτομα έγινε λήψη λεπτομερούς ιστορικού και ενδελεχής φυσική εξέταση ώστε να αποκλεισθούν από τη μελέτη ασθενείς με ιστορικό χρόνιας νεφρικής νόσου, σακχαρώδη διαβήτη, ουρολιθίαση, λευχαιμία, υπερχολερυθριναιμία ή ασθενείς που λαμβάνουν άλλα νεφροτοξικά φάρμακα. Ασθενείς με

επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (eGFR<60 ml/min/1,73 m²) ή ηλεκτρολυτικές διαταραχές εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Όλοι οι ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν φυσιολογικές βιοχημικές παραμέτρους όσον αφορά τη νεφρική λειτουργία και τους ηλεκτρολύτες του ορού πριν από την έναρξη της θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.

2.3.2 Μεθοδολογία

Ελήφθησαν από τους ασθενείς δείγματα αίματος και ούρων πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση (ημέρα 0) και την 5^η μέρα θεραπείας με την αμινογλυκοσίδη (ημέρα 5). Στον ορό μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης, της ουρίας, της κρεατινίνης, του νατρίου, του καλίου, του μαγνησίου, του ασβεστίου, του φωσφόρου, του χλωρίου και του ουρικού οξέος πριν και την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) υπολογίσθηκε με την εξίσωση MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) ¹⁶⁶ :

$$GFR = 170 \times [P_{cr}]^{-0.999} \times [\eta\lambda\iota\kappa\iota\alpha]^{-0.176} \times [0.762 \text{ σε γυναίκες}] \times [SUN]^{-0.170} \times [Alb]^{+0.318},$$

όπου P_{cr}, SUN και Alb, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ορού της κρεατινίνης και της ουρίας σε mg/dL και της αλβουμίνης σε g/dL.

Τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 1500g. Έγινε μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος των ούρων για την ανεύρεση κυττάρων ή κυλίνδρων και σε ένα μέρος από το υπερκείμενο των δειγμάτων ούρων προσδιορίστηκαν οι τιμές των βιοχημικών παραμέτρων πριν και την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.

Στο δείγμα των ούρων μετρήθηκαν το ειδικό βάρος των ούρων καθώς και οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και των λευκωμάτων. Επιπρόσθετα, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του νατρίου, του καλίου, του μαγνησίου, του ασβεστίου, του φωσφόρου, του χλωρίου και του ουρικού οξέος και υπολογίσθηκαν οι κλασματικές τους απεκκρίσεις (FE) πριν και την 5^η μέρα θεραπείας με

αμινογλυκοσίδη. Όπως αναφέρθηκε τιμές FE καλίου > 9%, FE μαγνησίου > 4%, FE ασβεστίου > 3%, FE φωσφόρου > 20% και FE ουρικού οξέος > 10%, υποσημαίνουν αυξημένη νεφρική απέκκριση των παραμέτρων ^{167, 168}.

Στο υπόλοιπο υπερκείμενο των δειγμάτων των ούρων προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος αζιδίου του νατρίου συγκέντρωσης 1g/L (NaN_3) ανά 2 mL ούρων για την αποφυγή πιθανής βακτηριακής μόλυνσης και το δείγμα διαμοιράσθηκε σε επιμέρους δείγματα των 1 mL και αποθηκεύτηκε σε Cryovials (Greiner, Bio-One) στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση των NMR πειραμάτων εντός 4 μηνών ¹⁷⁸.

Για τη λήψη των φασμάτων NMR ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη μελέτη των ατόμων με ΠΝΥ. Η ταυτοποίηση των απεκκρινόμενων μεταβολιτών έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων και της πολλαπλότητας των κορυφών συντονισμού ^{175 130}. Για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη μελέτη των ατόμων με ΠΝΥ και οι επιλεγμένοι μεταβολίτες εκφράστηκαν σε mmol/mol κρεατινίνης.

2.4 Αποτελέσματα

2.4.1 Μελέτη φασματοσκοπίας ^1H NMR των ούρων σε άτομα με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία

2.4.1.1 Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης

Στον Πίνακα 5 αναγράφονται τα δημογραφικά στοιχεία και οι κυριότερες βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (Mean \pm SD). Το κύριο συστατικό το οποίο διαφοροποιεί τις δύο ομάδες, δηλ. τα άτομα με ΠΝΥ από τα άτομα της ομάδας ελέγχου είναι η στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του ουρικού οξέος στον ορό και της κλασματικής απέκκρισης του στα ούρα ($p < 0.001$). Τα επίπεδα του νατρίου, του καλίου, του ασβεστίου, του φωσφόρου και του μαγνησίου στον ορό τόσο στην ομάδα των ατόμων με ΠΝΥ, όσο και στην ομάδα ελέγχου ήταν μέσα στα φυσιολογικά επίπεδα. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά τις κλασματικές απεκκρίσεις του νατρίου, του καλίου, του ασβεστίου, του φωσφόρου και του μαγνησίου, καθώς και στον ουδό επαναρόφησης των φωσφορικών (TmPO_4/GFR). Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε γλυκόζη στα ούρα των ατόμων της μελέτης, αφού το ποσοστό της επαναροφούμενης γλυκόζης ήταν πάνω από 99.7% και στις δύο ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην eGFR μεταξύ των δύο ομάδων.

Η ανάλυση της πρωτεϊνουρίας δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των υγιών ατόμων και των ατόμων με υποουριχαιμία. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα μεταξύ των δύο ομάδων. Επιπρόσθετα, στα άτομα των δύο ομάδων δεν ανιχνεύθηκε IgG, μια ανοσοσφαιρίνη που αποτελεί δείκτη της διαπερατότητας του νεφρικού σπειράματος. Η ανίχνευση της α1-μικροσφαιρίνης στα ούρα αποτελεί ένα ευαίσθητο δείκτη εκτίμησης της

λειτουργίας του εγγύς σωληναρίου. Μόνο 4 από τα 36 άτομα με ΠΝΥ (ποσοστό 11%) είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα α₁-μικροσφαιρίνης στα ούρα. Σε δύο από αυτά τα άτομα (ποσοστό 5.5%) η απέκκριση ήταν μεγαλύτερη από την ανώτερη φυσιολογική τιμή (14 mg/gCre), αλλά όχι πάνω από 20 mg/gCre. Ωστόσο, σε 6 άτομα της ομάδας ελέγχου (ποσοστό 15%) επίσης ανιχνεύθηκε α₁-μικροσφαιρίνη στα ούρα και σε 3 από αυτά τα άτομα (ποσοστό 7.6%) η απέκκριση α₁-μικροσφαιρίνης ήταν μεγαλύτερη από 14 mg/g Cre, αλλά όχι πάνω από 20 mg/gCre.

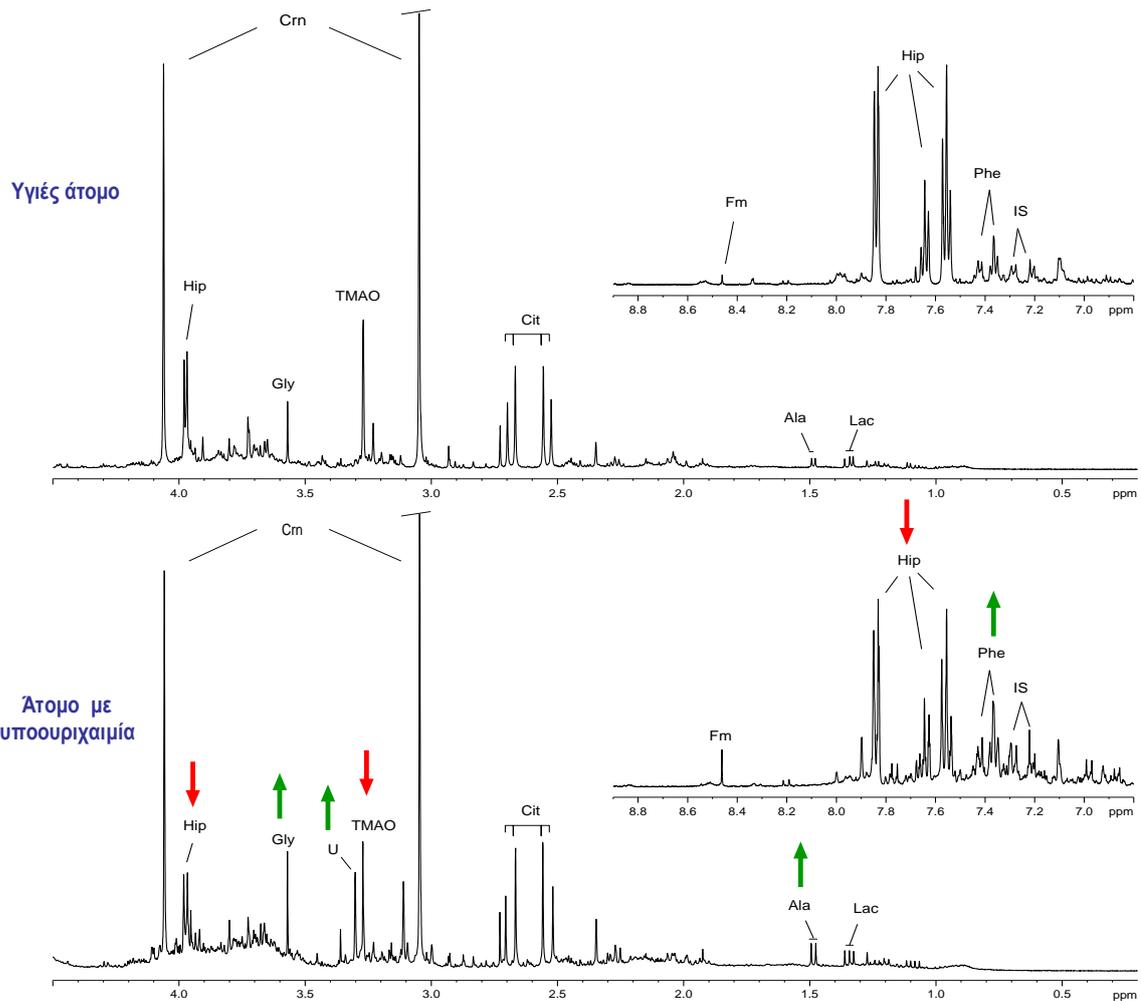
Πίνακας 5. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

	Άτομα με ΠΝΥ Μέση τιμή ± SD	Ομάδα ελέγχου Μέση τιμή ± SD	Τιμές αναφοράς	p
N	36	39		
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	8 / 28	13 / 26		
Ηλικία	40 ± 14	45 ± 10.3		NS
Ουρικό οξύ ορού (mg/dl)	2.1 ± 0.35	4.8 ± 1.42	Άνδρες 3.5 - 7.5 Γυναίκες 2.5 - 6.1	< 0.001
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	91.5 ± 11.5	94 ± 13	70 - 125	NS
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.8 ± 0.09	0.9 ± 0.15	0.6 - 1.2	NS
Ουρία ορού (mg/dl)	35 ± 8.42	30 ± 8.98	11 - 54	NS
Κάλιο ορού (mmol/l)	4.4 ± 0.40	4.3 ± 0.30	3.5 - 5.3	NS
Νάτριο ορού (mmol/l)	141 ± 2.10	141 ± 2.33	135 - 145	NS
Μαγνήσιο ορού (meq/l)	1.6 ± 0.12	1.7 ± 0.12	1.3 - 2.1	NS
Ασβέστιο ορού (mg/dl)	9.4 ± 0.48	9.3 ± 0.44	8.2 - 10.6	NS
Φωσφόρος ορού (mg/dl)	3.2 ± 0.44	3.3 ± 0.59	2.5 - 5.0	NS
FE ουρικού οξέος (%)	20.3 ± 6.7	6.5 ± 3.2	< 10	< 0.001
FE καλίου (%)	11.8 ± 2.6	10.3 ± 2.8	< 9	NS
FE νατρίου (%)	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.5 - 1.2	NS
FE μαγνησίου (%)	2.9 ± 1.3	2.9 ± 1.4	< 4	NS
FE ασβεστίου (%)	1.3 ± 0.7	1.1 ± 1.2	< 3	NS
FE φωσφόρου (%)	14.2 ± 6.5	17.1 ± 7.5	< 20	NS
eGFR (ml/min/1,73 m ²)	92.3 ± 17.3	91.8 ± 16.0	> 60	NS
Ualb/UCre (mg/g Cre)	13 ± 6.4	15 ± 3.6	< 25	NS
%Tglu	99.9 ± 0.02	99.8 ± 0.03	< 97	NS
TmPO ₄ /GFR (mg/dl)	3.0 ± 0.53	2.9 ± 0.9	2.5 - 3.9	NS

FE: Κλασματικές απεκκρίσεις; eGFR: Ρυθμός σπειραματικής διήθησης; %Tglu: ποσοστό επαναρρόφησης της γλυκόζης; TmPO₄/GFR: ουδός επαναρρόφησης των φωσφορικών, SD: σταθερά απόκλισης

2.4.1.2 Το ^1H -NMR φάσμα των ούρων

Στο **Σχήμα 30** παρουσιάζονται 2 αντιπροσωπευτικά φάσματα ούρων ^1H NMR 500 MHz από ένα υγιές άτομο και από ένα άτομο με ΠΝΥ, που απεικονίζουν το προφίλ των απεκκρινόμενων μεταβολιτών.



Σχήμα 30. Αντιπροσωπευτικά φάσματα ^1H NMR 500 MHz στα ούρα (δ 0.2 – 4.5 και 7.0 – 9.2ppm) από ένα άτομο με ΠΝΥ (κάτω) και από ένα υγιές άτομο (επάνω).

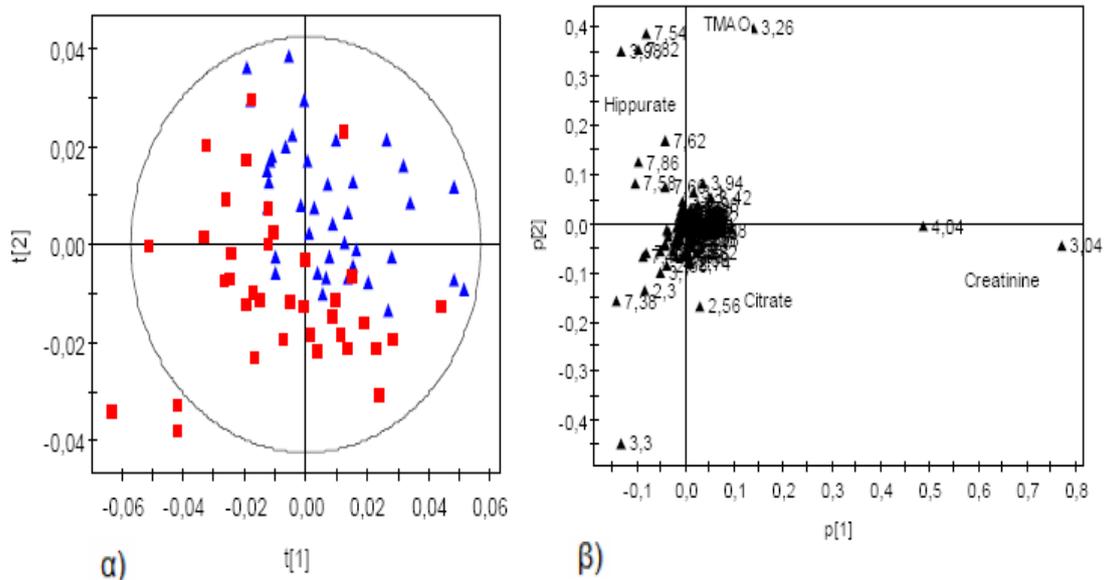
Συντμήσεις: Ala: αλανίνη, Cit: κιτρικό οξύ, Cr: κρεατίνη, Crn: κρεατινίνη, Hip: ιππουρικό οξύ, U: μη ταυτοποιημένος μεταβολίτης, DMA: διμεθυλαμίνη, Fm: μυρμηγκικό οξύ, Gly: γλυκίνη, Lac: γαλακτικό οξύ, Phe: φαινυλαλανίνη, TMAO: τριμεθυλο-*N*-αμινοξείδιο, IS: ισιδίνη.

Τα κύρια συστατικά ενός φυσιολογικού φάσματος ούρων $^1\text{H-NMR}$ είναι η κρεατινίνη, που εμφανίζεται με δυο έντονες κορυφές συντονισμού στα 3.05 και 4.06ppm, το ιππουρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, η γλυκίνη, το τριμεθυλο-*N*-αμινοξείδιο (TMAO), η διμεθυλαμίνη (DMA), ίχνη από ανιόντα του γαλακτικού και του 3-υδροξυβουτυρικού (3-HB) οξέος, καθώς και ίχνη αμινοξέων, όπως αλανίνη, ιστιδίνη, βαλίνη και φαινυλαλανίνη ¹⁷⁹. Το φάσμα περιέχει επίσης εκατοντάδες μικρές κορυφές από μεταβολίτες, οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται σε ίχνη, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί. Μια πρώτη οπτική σύγκριση των δυο φασμάτων δείχνει ότι στο φάσμα του ατόμου με ΠΝΥ παρατηρείται αυξημένη απέκκριση αλανίνης, φαινυλαλανίνης, γλυκίνης και ενός μη ταυτοποιημένου μεταβολίτη στα 3.3ppm, ενώ παρατηρείται μειωμένη απέκκριση TMAO, κρεατινίνης και ιππουρικού οξέος σε σύγκριση με το φάσμα του υγιούς ατόμου.

2.4.1.3 Μεταβολομική προσέγγιση

2.4.1.4 Ανάλυση αναγνώρισης προτύπων

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (ΑΚΣ) εφαρμόστηκε στα δεδομένα των ατόμων της μελέτης και το γράφημα συντεταγμένων (**Σχήμα 31α**) έδειξε μια τάση διαχωρισμού μεταξύ των δύο ομάδων (υγιή άτομα – υποουριχαιμικά άτομα) με τα άτομα της ομάδας ελέγχου να ομαδοποιούνται στο δεξιό τμήμα, ενώ τα άτομα με υποουριχαιμία να εκτείνονται κυρίως στο αριστερό τμήμα. Τα φάσματα τριών ασθενών δημιούργησαν μια μικρή υπο-ομάδα εκτός της έλλειψης του Hotelling, τα οποία είχαν αυξημένες κορυφές στα 3.3ppm (ένας μεταβολίτης, ο οποίος δεν έχει ταυτοποιηθεί). Στα αντίστοιχο διάγραμμα επιβάρυνσης οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν με παρόμοια πληροφορία ομαδοποιούνται και έτσι οι μεταβολίτες που βρίσκονται στο αριστερό τμήμα συσχετίζονται θετικά με τα άτομα με ΠΝΥ, ενώ οι μεταβολίτες που βρίσκονται στο δεξιό τμήμα συσχετίζονται με τα άτομα της ομάδας ελέγχου (**Σχήμα 31β**).



Σχήμα 31. α) Γράφημα συντεταγμένων της ΑΚΣ (PC1 vs. PC2) φασματοσκοπικών δεδομένων των ούρων 75 ατόμων. Τα 36 άτομα με ΠΝΥ είναι χρωματισμένοι (■) και τα 39 υγιή άτομα (▲). β) Το αντίστοιχο διάγραμμα επιβάρυνσης.

Με την τεχνική PLS-DA πραγματοποιήθηκε ένας πιο ευδιάκριτος διαχωρισμός, με κάποιο όμως βαθμό αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των δυο ομάδων (**Σχήμα 32Α**). Οι παράμετροι του μοντέλου R^2 (explained variation) και Q^2 (predicted variation) ήταν αντίστοιχα 0.51 και 0.42 (**Πίνακας 6**). Παρατηρώντας το διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης (**Σχήμα 32Β**), καθώς και τις τιμές τους (**Πίνακας 7**) για το PLS-DA μοντέλο βλέπουμε ότι οι μεταβολίτες οι οποίοι συσχετίζονται με τα άτομα της ομάδας ελέγχου είναι το ιπποουρικό οξύ, η κρεατινίνη και το ΤΜΑΟ (θετικές τιμές συντελεστών), ενώ οι μεταβολίτες που συσχετίζονται με τα υποουριχαιμικά άτομα είναι η φαινυλαλανίνη, η γλυκίνη, η γλουταμίνη, ένας άγνωστος μεταβολίτης (στα 3.3ppm), το οξικό οξύ και η αλανίνη (αρνητικές τιμές συντελεστών).

Για την ελαχιστοποίηση της πιθανής επίδρασης της διατομικής μεταβλητότητας εφαρμόσθηκε η τεχνική ορθοκανονικής διόρθωσης σήματος (OSC), με την οποία αφαιρέθηκαν αρχικά μια και στη συνέχεια δυο ορθογώνιες συνιστώσες και επαναλήφθηκε η τεχνική PLS-DA.

Το γράφημα συντεταγμένων των δυο πρώτων κύριων συνιστωσών (PCs) του μοντέλου OSC/PLS-DA μετά την αφαίρεση μιας συνιστώσας κατέδειξε ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου, με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου να συγκροτούν μια συμπαγή ομάδα στο δεξιό τμήμα του γραφήματος για θετικές τιμές της PC1 (**Σχήμα 32Γ**). Το διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης καθώς και οι τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης για την πρώτη συνιστώσα έδειξαν ότι οι μεταβολίτες που συνέβαλαν στο διαχωρισμό παρέμειναν σχεδόν οι ίδιοι με τους μεταβολίτες του μοντέλου PLS-DA. Δηλαδή, τα άτομα της ομάδας ελέγχου χαρακτηρίζονται από αυξημένες απεκκρίσεις ιππουρικού οξέος, κρεατινίνης και ΤΜΑΟ, ενώ τα άτομα με ΠΝΥ απεκκρίνουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινυλαανίνης, αλανίνης, γλυκίνης, γλουταμίνης, ενός μη ταυτοποιήσιμου μεταβολίτη (στα 3.3ppm), καθώς και οξικού οξέος. (**Σχήμα 32Δ και Πίνακας 7**). Οι τιμές των παραμέτρων R^2 και Q^2 βελτιώθηκαν σημαντικά σε 0.85 και 0.80 αντίστοιχα (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6 : Σύγκριση των παραμέτρων των τριών μοντέλων PLS-DA and OSC/PLS-DA που δημιουργήθηκαν στη μελέτη.

	Μοντέλο N – Y <i>75 άτομα: 36 Y + 39 N</i>		Μοντέλο με βάση το φύλο <i>75 άτομα: 36 Y + 39 N</i>		Μοντέλο σε γυναίκες <i>54 άτομα: 28 Y + 26 N</i>	
	R^2	Q^2	R^2	Q^2	R^2	Q^2
Παράμετροι						
PLS-DA	0.51	0.42	0.21	0.09	0.50	0.39
OSC/PLS-DA (1 OC)	0.85	0.80	0.32	0.25	0.93	0.88
OSC/PLS-DA (2 OCs)	0.92	0.90	0.39	0.34	0.98	0.97

N: νορμοουριχαιμικά άτομα, Y : υποουριχαιμικά άτομα, 1OC : μετά από αφαίρεση 1 ορθογώνιας συνιστώσας, 2 OCs: μετά από αφαίρεση 2 ορθογώνιων συνιστωσών

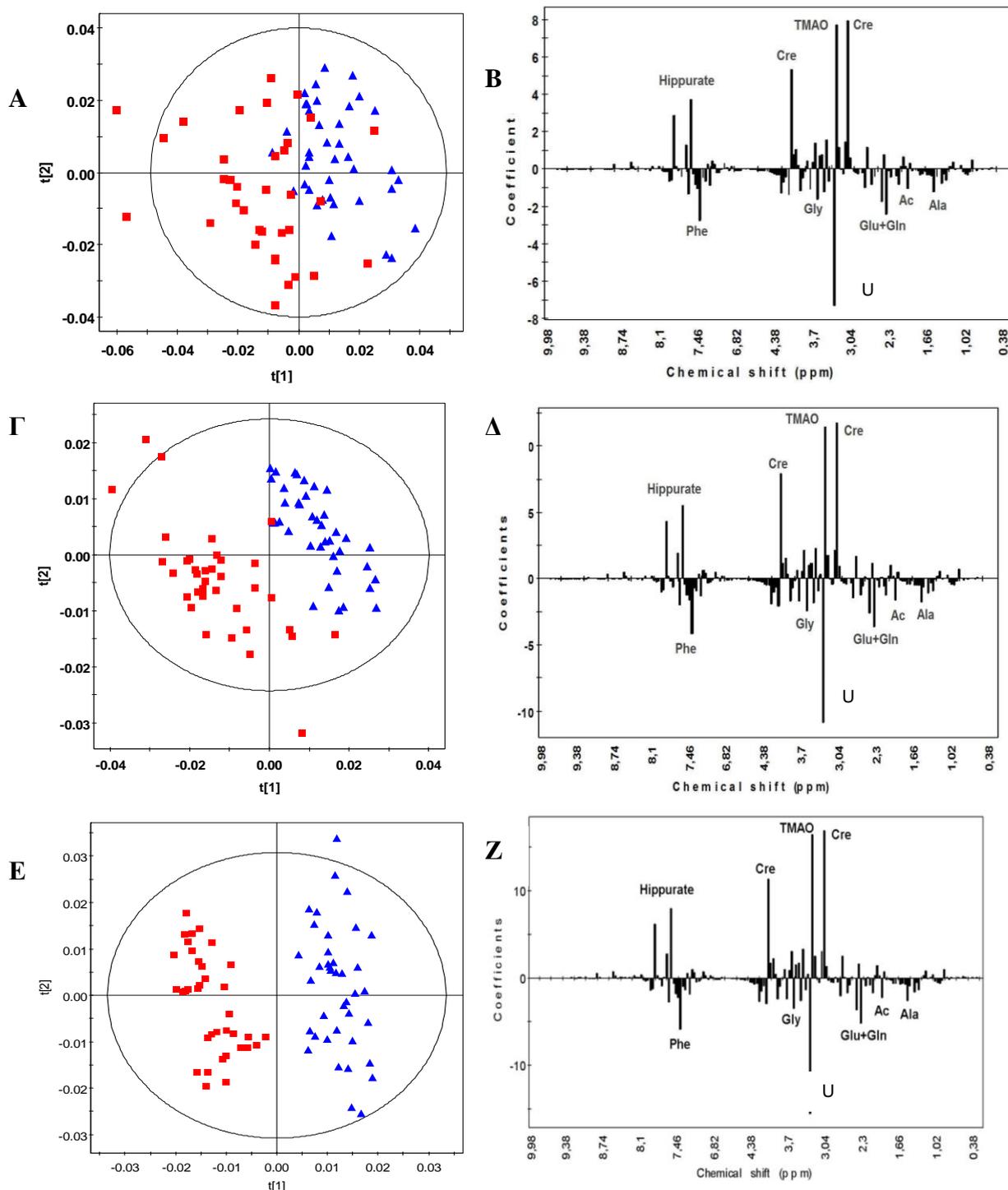
Με την αφαίρεση δυο ορθογώνιων συνιστωσών επαναλήφθηκε η τεχνική PLS-DA. Το διάγραμμα των σκορ (**Σχήμα 32Ε**) των δύο πρώτων κύριων

συνιστωσών του OSC/PLS-DA μοντέλου αποκάλυψε ένα πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των δύο ομάδων με αυξημένη συνεισφορά των συντελεστών που συνέβαλαν στο διαχωρισμό. Οι στατιστικές παράμετροι του μοντέλου ήταν $R^2=0.92$ και $Q^2=0.90$, τιμές που χαρακτηρίζουν το μοντέλο ως “άριστο” (Πίνακας 6).

Πίνακας 7. Διαφορές των συστατικών των ούρων σε υποουριχαιμικά και νορμοουριχαιμικά άτομα και συντελεστές παλινδρόμησης των PLS-DA and OSC/PLS-DA μοντέλων

Μεταβολίτες	N	Y	Χημική μετατόπιση (ppm)	PLS-DA	OSC/PLS-DA (1 OC)	OSC/PLS-DA (2 OC)
Κρεατινίνη	↑	↓	3.04 4.04	7.91 5.31	11.74 7.89	16.82 11.30
ΤΜΑΟ	↑	↓	3.26	7.68	11.43	16.35
Μη ταυτοποιήσιμος μεταβολίτης	↓	↑	3.30	-7.28	-10.85	-15.51
Ιππουρικό οξύ	↑	↓	7.54 7.82	3.72 2.90	5.55 4.32	7.93 6.17
Φαινυλαλανίνη	↓	↑	7.38	-2.78	-4.13	-5.91
Γλυκίνη	↓	↑	3.58	-1.65	-2.46	-3.52
Οξικό οξύ	↓	↑	1.94	-1.06	-1.58	-2.26
Αλανίνη	↓	↑	1.50	-1.20	-1.79	-2.57
Γλουταμίνη	↓	↑	2.30 2.38	-2.44 -1.73	-3.63 -2.57	-5.19 -3.68

N: νορμοουριχαιμικά άτομα, Y : υποουριχαιμικά άτομα, 1OC : μετά από αφαίρεση 1 ορθογώνιας συνιστώσας, 2 OCs: μετά από αφαίρεση 2 ορθογώνιων συνιστωσών



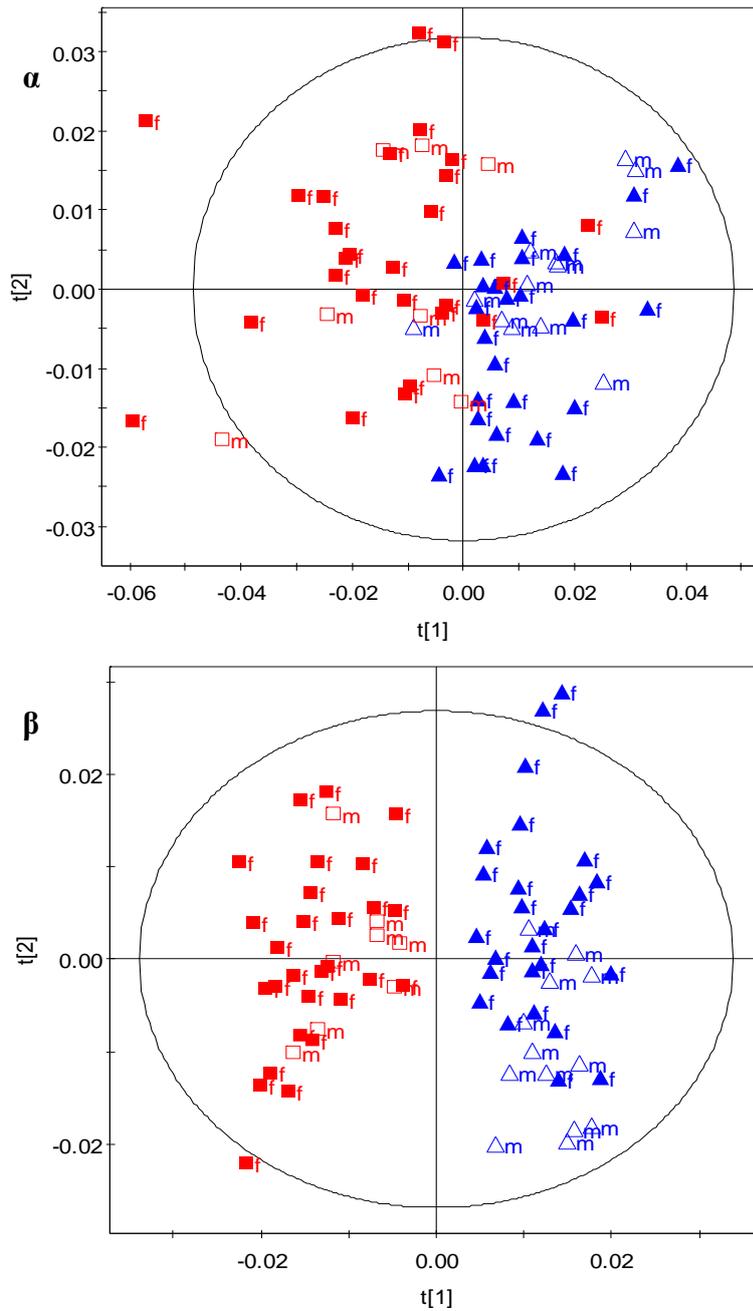
Σχήμα 32. Γραφήματα συντεταγμένων και διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης

Α, Γ και Ε: Γραφήματα συντεταγμένων PLS/DA μοντέλου, OSC/PLS-DA μοντέλου μετά την αφαίρεση 1 συνιστώσας και OSC/PLS-DA μοντέλου μετά την αφαίρεση 2 συνιστώσων, αντίστοιχα. **Β, Δ και Ζ:** Διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης του PLS/DA, OSC/PLS-DA (1 συν.) και OSC/PLS-DA (2 συν.) μοντέλων, αντίστοιχα. Φαίνονται οι κύριοι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό. Τα άτομα με υποουριχαιμία βρίσκονται να έχουν αρνητικές τιμές, ενώ τα νορμοουριχαιμικά άτομα θετικές τιμές συντελεστών. Τα άτομα με υποουριχαιμία υποσημαίνονται με το σύμβολο (■), ενώ τα άτομα της ομάδας ελέγχου με το σύμβολο (▲).

Προκειμένου να εξετασθεί η πιθανότητα διάκρισης των ατόμων με βάση το φύλο, τα γραφήματα συντεταγμένων PCA επανασχεδιάσθηκαν προσδίδοντας ένα χρωματικό συμβολισμό στα δείγματα, ώστε να διακρίνονται τα δύο φύλα. Δημιουργήθηκαν δηλαδή στατιστικά μοντέλα με βάση το φύλο (**Σχήμα 33α**). Έτσι, στα μοντέλα που δημιουργήθηκαν παρατηρήθηκε διαχωρισμός μεταξύ των δυο ομάδων που συσχετίζεται με την υποουριχαιμία και όχι με το φύλο. Ο διαχωρισμός αυτός ήταν πιο σαφής στο μοντέλο OSC/PLS-DA (**Σχήμα 33β**). Η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου ήταν χαμηλή, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 6** από την τιμή του $Q^2 = 0.09$ για το μοντέλο PLS-DA και $Q^2 = 0.25$ για το μοντέλο OSC/PLS-DA.

Για να εξετασθεί το ενδεχόμενο η μειωμένη αξιοπιστία του παραπάνω μοντέλου να οφείλεται στο μικρό αριθμό των ανδρών της μελέτης πραγματοποιήθηκε ένα νέο μοντέλο αυτή τη φορά μόνο στο γυναικείο πληθυσμό. Τα γραφήματα συντεταγμένων PCA αποκάλυψαν πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των γυναικών με υποουριχαιμία και των γυναικών της ομάδας ελέγχου (**Σχήμα 34**). Οι τιμές των παραμέτρων R^2 και Q^2 ήταν 0.98 και 0.97 αντίστοιχα για το OSC/PLS-DA μοντέλο μετά την αφαίρεση 2 ορθογώνιων συνιστωσών, τιμές που χαρακτηρίζουν το μοντέλο ως «άριστο» (**Πίνακας 6**).

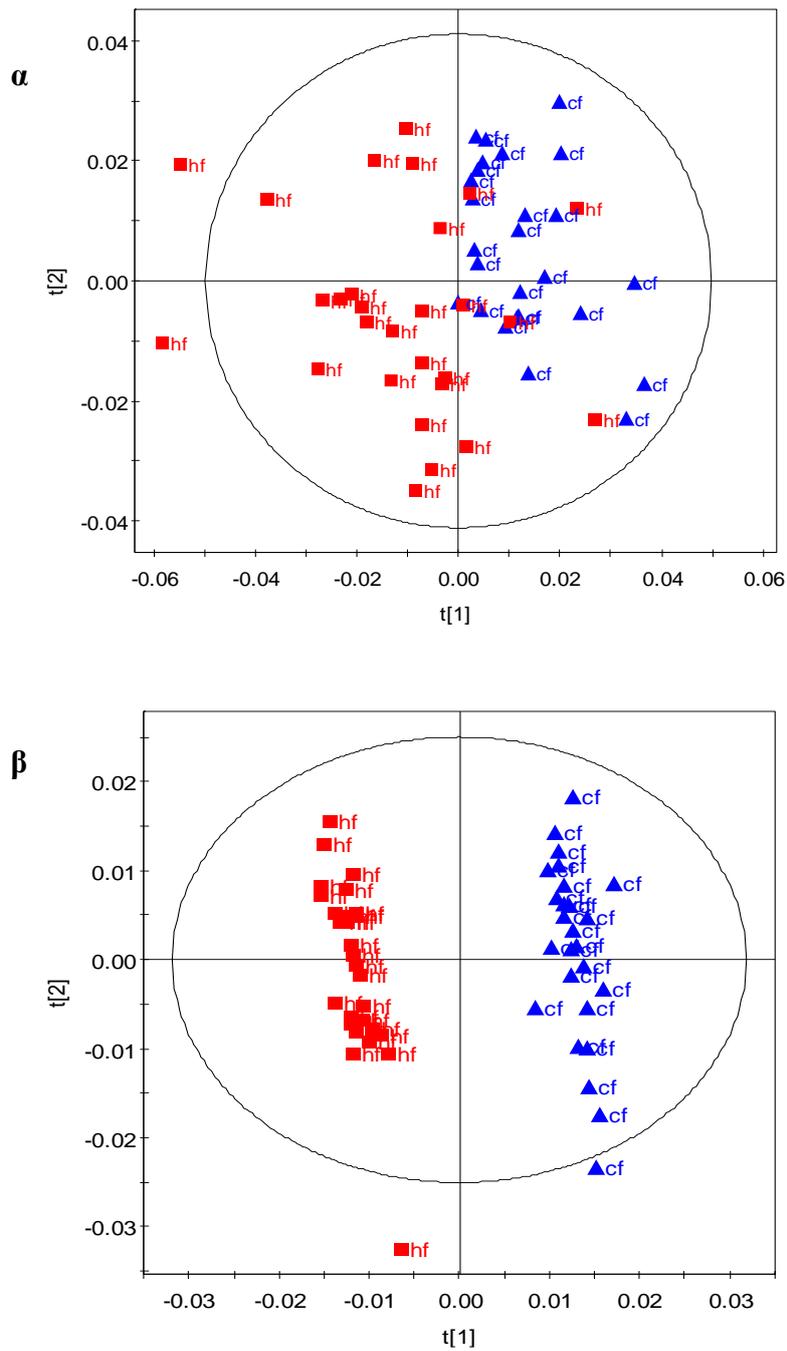
Οι τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης των 2 καινούριων μοντέλων δηλ. του μοντέλου με βάση το φύλο και του μοντέλου νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών γυναικών έδειξε ότι οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των δύο ομάδων είναι οι ίδιοι και στα 3 μοντέλα.



Σχήμα 33. Μοντέλο με βάση το φύλο

Παρατηρείται πλήρης διαχωρισμός των δυο υπό μελέτη ομάδων που σχετίζεται με τη νόσο και όχι με το φύλο. α) Γράφημα συντεταγμένων του μοντέλου PLS-DA; β) Γράφημα συντεταγμένων του μοντέλου OSC/PLS-DA μετά την αφαίρεση 2 συνιστωσών;

Νορμοουρχειμικές γυναίκες: ▲ f, Νορμοουρχειμικοί άνδρες: △ m ; Υποουρχειμικές γυναίκες: ■ f; Υποουρχειμικοί άνδρες □ m.



Σχήμα 34. Μοντέλο νορμοουριχαιμικών και υποουριχαιμικών γυναικών

Παρατηρείται πλήρης διαχωρισμός των δυο υπό μελέτη ομάδων ιδιαίτερα στο μοντέλο OSC/PLS-DA. α) Γράφημα συντεταγμένων του μοντέλου PLS-DA; β) Γράφημα συντεταγμένων του μοντέλου OSC/PLS-DA μετά την αφαίρεση 2 συνιστωσών;
 Νορμοουριχαιμικές γυναίκες : ▲ cf ; Υποουριχαιμικές γυναίκες : ■ hf

2.4.1.5 Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων μεταβολιτών των ούρων

Με βάση την ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων, οι κυριότεροι μεταβολίτες που συνεισέφεραν στο διαχωρισμό των δύο ομάδων ήταν το ιππουρικό οξύ, το ΤΜΑΟ, η φαινυλαλανίνη, η αλανίνη, η γλυκίνη, η γλουταμίνη, το οξικό οξύ, καθώς και ένας μη ταυτοποιήσιμος μεταβολίτης (στα 3.3ppm). Οι κορυφές που επελέγησαν για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών αυτών ήταν αυτές των παρακάτω χημικών μετατοπίσεων (ppm): της αλανίνης στα 1.48 (διπλή), της φαινυλαλανίνης στα 7.33 (διπλή), του οξικού οξέος στο 1.92 (απλή), του ΤΜΑΟ στα 3.26 (απλή), της γλυκίνης στα 3.57 (απλή) και του ιππουρικού οξέος στα 7.82 (διπλή). Έτσι 6 μεταβολίτες ποσοτικοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (Mean \pm SD), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 8**. Φαίνεται ότι με βάση την ποσοτικοποίηση των κυριότερων μεταβολιτών, τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν από αυτά της μεταβονομικής προσέγγισης. Έτσι, η απέκκριση των αμινοξέων αλανίνης, φαινυλαλανίνης και γλυκίνης καθώς και του οξικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποουριχαιμικά άτομα σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου, ενώ η απέκκριση του ιππουρικού οξέος καθώς και του ΤΜΑΟ δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δυο ομάδες.

Πίνακας 8 Συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβολιτών των ατόμων με ΠΝΥ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου.

Μεταβολίτες (mmoles/mol κρεατινίνης)	Χημική μετατόπιση (ppm)	Υποουριχαιμικά Άτομα Mean \pm SD	Άτομα της ομάδας ελέγχου Mean \pm SD	p
Αλανίνη	1.50	42.4 \pm 16	34.5 \pm 12.5	0.02
Φαινυλαλανίνη	7.33	46.2 \pm 14.7	34.1 \pm 13.7	<0.001
Οξικό οξύ	1.94	21.1 \pm 8.9	17.2 \pm 5.3	0.02
Γλυκίνη	3.58	253.0 \pm 140.5	174.6 \pm 91.6	0.005
ΤΜΑΟ	3.26	70.8 \pm 49.2	73.7 \pm 55.6	NS
Ιππουρικό οξύ	7.54, 7.82	210.0 \pm 120.0	219.7 \pm 134.9	NS

2.4.1.6 Αξιολόγηση των μοντέλων

Προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία των μοντέλων μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση τόσο με εσωτερικά δεδομένα (held-back or internal validation) όσο και με εξωτερικά δεδομένα (external validation). Στην πρώτη περίπτωση ζητείται από το πρόγραμμα να προβλέψει την τάξη δεδομένων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία των μοντέλων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται δεδομένα τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία των μοντέλων και σε αυτή την περίπτωση ο έλεγχος της προβλεπτικής ικανότητας είναι πιο αυστηρός.

Πίνακας 9 Παράμετροι και ποσοστά ταξινόμησης των μοντέλων OSC/PLS-DA (μετά την αφαίρεση 2 συνιστωσών) μεταξύ νορμουριχαιμικών και υποουριχαιμικών ατόμων που προέκυψαν από τις διαδικασίες εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης.

Μοντέλα OSC/PLS-DA	Υποουριχαιμικά – Νορμουριχαιμικά άτομα					
	Ομάδα βαθμονόμησης	Ομάδα αξιολόγησης	Παράμετροι		Ταξινόμηση	
	59 (28Y/31N)	16 (8Y-8N)	R ²	Q ²	H	C
1 ^ο μοντέλο			0.83	0.74	8/8	8/8
2 ^ο μοντέλο			0.83	0.75	8/8	8/8
3 ^ο μοντέλο			0.83	0.75	8/8	8/8

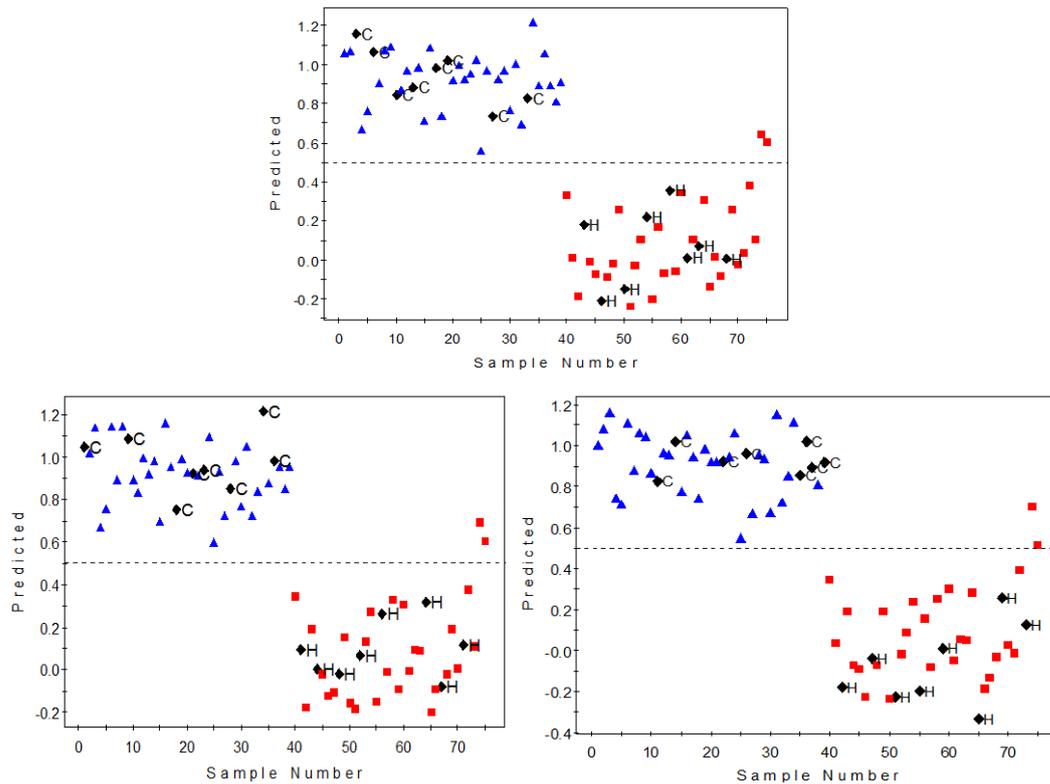
Εξωτερική αξιολόγηση	Ομάδα βαθμονόμησης	Ομάδα αξιολόγησης	Παράμετροι		Ταξινόμηση	
	59 (28Y/31N)	16 (8Y-8N)	R ²	Q ²	H	C
1 ^ο μοντέλο			0.87	0.81	8/8	8/8
2 ^ο μοντέλο			0.89	0.84	8/8	8/8
3 ^ο μοντέλο			0.80	0.69	8/8	8/8

Y : Υποουριχαιμικά άτομα, N : Νορμουριχαιμικά άτομα (ομάδα ελέγχου)

A) Εσωτερική αξιολόγηση

Για το μοντέλο της μελέτης επιλέχθηκαν τυχαία δείγματα βαθμονόμησης και αξιολόγησης και η επικύρωση επαναλήφθηκε 3 φορές με νέα αλλά και ισάριθμα δείγματα κάθε φορά. Έτσι κάθε φορά το δείγμα βαθμονόμησης αποτελούνταν από 59 άτομα (28 υποουριχαιμικά / 31 νορμοουριχαιμικά άτομα) και τα υπόλοιπα 16 δείγματα (8 υποουριχαιμικά / 8 νορμοουριχαιμικά άτομα) αποτέλεσαν το σετ αξιολόγησης. Το δείγμα αξιολόγησης επιλέχθηκε να αποτελείται από 16 άτομα προκειμένου αφενός να μην αποδυναμώνονται τα μοντέλα και αφετέρου να υπάρχει ένας στατιστικά σημαντικός αριθμός δειγμάτων για πρόβλεψη.

Τα αποτελέσματα των παραμέτρων των OSC/PLS-DA μοντέλων, καθώς επίσης και των επιτυχών ταξινομήσεων φαίνονται στον **Πίνακα 9**. Το ποσοστό ορθής ταξινόμησης ήταν 100% (8 άτομα στα 8) τόσο για τα υποουριχαιμικά άτομα όσο και για τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 100% για επίπεδο σημαντικότητας <0.05 (**Σχήμα 35**).



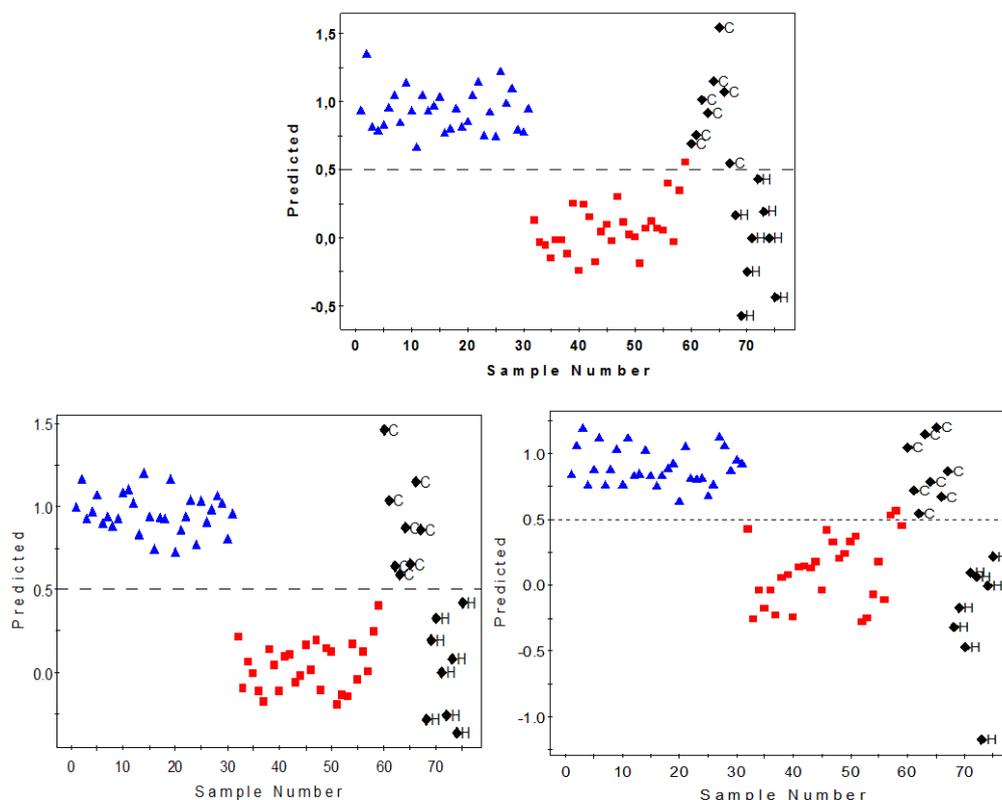
Σχήμα 35. Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA νορμοουριχαιμικών – υποουριχαιμικών ατόμων για τις τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας εσωτερικής αξιολόγησης (μετά την αφαίρεση 2 συστασιών).

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 31 νορμοουριχαιμικά άτομα (▲), 28 υποουριχαιμικά άτομα (■). Ομάδα αξιολόγησης: 8 νορμοουριχαιμικά άτομα (◆C), 8 υποουριχαιμικά άτομα (◆H). **α)** 1^η, **β)** 2^η, **γ)** 3^η επανάληψη.

B) Εξωτερική αξιολόγηση

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε αυτή την περίπτωση, όπου ελέγχθηκαν 3 διαφορετικά σετ αποτελούμενα από 59 άτομα για το δείγμα βαθμονόμησης και από 16 άτομα για το δείγμα αξιολόγησης (**Σχήμα 36**). Η αξιολόγηση των μοντέλων με εξωτερικά δεδομένα ενισχύει την αξιοπιστία τους γιατί τα δείγματα αξιολόγησης αποτελούνται από άτομα “άγνωστα” ως προς τα μοντέλα, δηλ. άτομα τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη δημιουργία των μοντέλων. Έτσι το πρόγραμμα καλείται να ταξινομήσει νέα δείγματα με βάση τις παραμέτρους των γνωστών δειγμάτων (δείγμα βαθμονόμησης). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 9**. Το ποσοστό

ορθής ταξινόμησης ήταν 100% (8 άτομα στα 8) τόσο για τα υποουριχαιμικά άτομα όσο και για τα άτομα της ομάδας ελέγχου.



Σχήμα 36. Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA νορμοουριχαιμικών – υποουριχαιμικών ατόμων για τις τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας εξωτερικής αξιολόγησης (μετά την αφαίρεση 2 συνιστωσών).

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης (59 άτομα) : 31 νορμοουριχαιμικά άτομα (▲), 28 υποουριχαιμικά άτομα (■). Ομάδα αξιολόγησης: 8 νορμοουριχαιμικά άτομα (◆C), 8 υποουριχαιμικά άτομα (◆H). α) 1^η, β) 2^η, γ) 3^η επανάληψη

2.4.2 Γονιδιακή μελέτη ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία

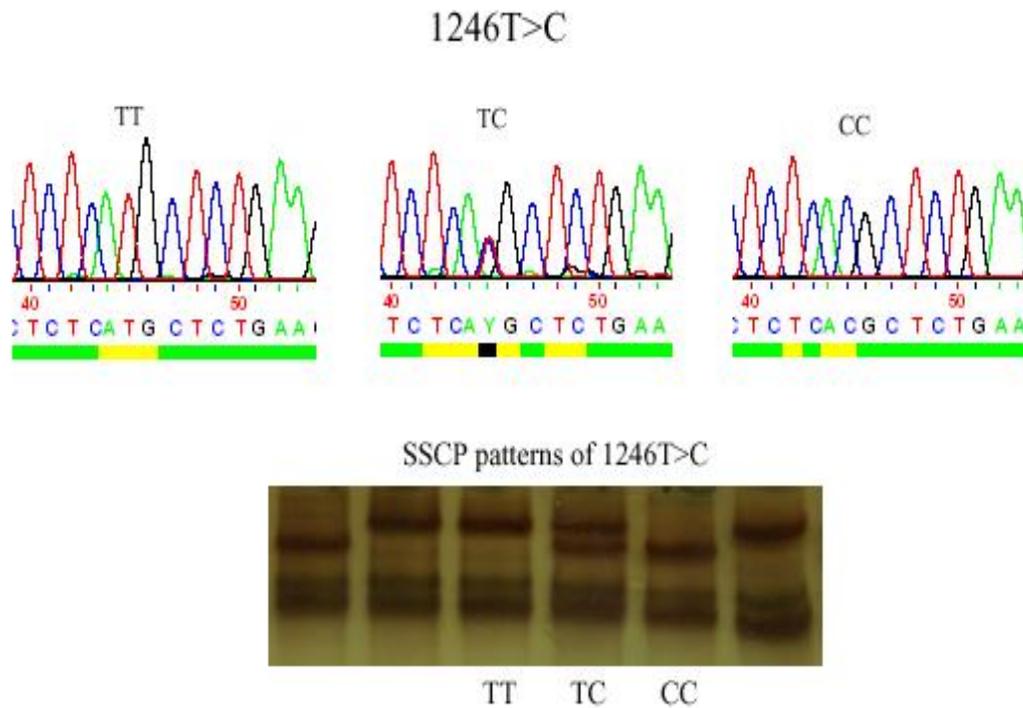
Στον Πίνακα 10 φαίνονται τα δημογραφικά στοιχεία και οι κυριότερες βιοχημικές παράμετροι των 9 ατόμων με ΠΝΥ στα οποία έγινε η γονιδιακή μελέτη. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (Mean ± SD). Δεν διαπιστώθηκαν παθολογικές τιμές τόσο στα επίπεδα των ηλεκτρολυτών στον ορό όσο και στις κλασματικές απεκκρίσεις τους στα ούρα.

Πίνακας 10. Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ατόμων με ΠΝΥ που πήραν μέρος στη γονιδιακή μελέτη.

	Άτομα με ΝΠΥ									Μέση τιμή ± SD	Φυσιολογικές τιμές
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Φύλο (άνδρες, Α / γυναίκες, Γ)	Α	Γ	Γ	Γ	Γ	Α	Γ	Γ	Γ	7 Α / 2 Γ	
Ηλικία	22	44	38	30	60	50	51	55	24	41.8 ± 14	
Γλυκόζη ορού (mg/dl)	82	104	105	103	93	91	101	103	87	96.5 ± 8.4	70 - 125
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.8	0.8	0.8	0.6	0.9	0.8	0.6	0.8	0.7	0.7 ± 0.1	0.6 - 1.2
Ουρία ορού (mg/dl)	22	26	32	33	30	30	36	47	24	31 ± 7.4	11 - 54
Ουρικό οξύ ορού (mg/dl)	2.1	1.6	1.5	1.8	2.4	2.4	1.7	1.8	2.2	1.9 ± 0.3	m :3.5 - 7.5 f :2.5-6.1
Κάλιο ορού (mmol/l)	4.2	4.5	4.7	4.5	4.1	4.7	4.3	4.3	4.2	4.4 ± 0.2	3.5 - 5.3
Νάτριο ορού (mmol/l)	140	142	140	140	142	142	141	143	140	141 ± 1.1	135 - 153
Μαγνήσιο ορού (meq/l)	1.4	1.4	1.6	1.4	1.5	1.5	1.4	1.7	1.6	1.5 ± 0.1	1.3 - 2.1
Ασβέστιο ορού (mg/dl)	10.3	8.7	9.9	9.8	9.6	9.3	10.0	9.7	9.4	9.6 ± 0.4	8.2 - 10.6
Φωσφόρος ορού (mg/dl)	3.4	3.4	3.0	2.9	2.8	3.6	3.6	3.5	3.6	3.3 ± 0.34	2.5 - 5.0
FE ουρικού (%)	18.2	28.8	16.2	25.9	29.2	19.0	11.9	12.5	14.4	19.6 ± 6.7	<10
FE καλίου (%)	9.1	7.8	11.8	11.5	10.7	4.7	5.3	9.1	7.7	8.6 ± 2.6	<9
FE νατρίου (%)	0.6	1.1	0.5	0.9	1.1	0.6	0.3	0.4	0.3	0.6 ± 0.3	0.5-1.2
FE μαγνησίου (%)	3.6	2.1	1.8	3.4	1.8	3.9	1.3	2.3	2.7	2.4 ± 0.8	<4
FE ασβεστίου (%)	1.6	1.1	1.0	0.6	0.9	2.5	1.3	0.5	1.2	1.2 ± 0.5	<3
FE φωσφόρου (%)	10.9	20.0	26.6	11.9	12.6	26.7	11.7	7.4	5.9	15.3 ± 8.1	<20
GFR (ml/min/1.73 m ²)	128	83	85	125	68	109	112	79	109	99.7 ± 21.4	>60
%Tglu	99.95	99.96	99.95	99.95	99.89	99.94	99.95	99.94	99.92	99.9 ± 0.02	<97
TmPO ₄ /GFR (mg/dl)	2.8	2.7	2.3	2.8	2.6	2.7	3.3	3.6	3.9	3.0 ± 0.53	2.5 - 4.5

FE: Κλασματική απέκκριση; GFR: ρυθμός σπειραματικής διήθησης; %Tglu: ποσοστό της επαναρροφούμενης γλυκόζης; TmPO₄/GFR: ουδός επαναρρόφησης φωσφόρου

Η γονιδιακή ανάλυση δεν ανέδειξε μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC22A12 εκτός ενός σιωπηλού πολυμορφισμού 1246T>C (His142His) στο εξώνιο 2 του γονιδίου (**Σχήμα 37**).



Σχήμα 37. A) Αναζήτηση της πρωτοδιάταξης των δειγμάτων (**sequencing**) και ανίχνευση του πολυμορφισμού 1246T>C μετά από την εφαρμογή SSCP και **B)** η ταυτοποίηση διαφορετικών **SSCP patterns**

2.4.3 Μελέτη νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης φαίνονται στον **Πίνακα 11** .

Πίνακας 11. Κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Αριθμός ασθενών	19
Ηλικία	59 ± 11,3
Φύλο	
Γυναίκες	11
Άνδρες	8
Νόσημα	
Οξεία χολοκυστίτιδα	12
Λοίμωξη ουροποιητικού	7

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης πριν την έναρξη της αγωγής με αμινογλυκοσίδες φαίνονται στον **Πίνακα 12** .

Πίνακας 12. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Παράμετρος	Μέση τιμή±SD	Εύρος τιμών	Φυσιολογικές τιμές
<u>ΟΡΟΣ</u>			
Γλυκόζη (mg/dl)	111,2 ± 26	61 - 168	70 - 125
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,9 ± 0,2	0,6 - 1,3	0,6 - 0,1
Ουρία (mg/dl)	44,7 ± 21	19 - 96	11 - 50
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4,4 ± 1,1	3,7 - 6,5	3,0 - 7,5
Κάλιο (mmol/l)	4,2 ± 0,5	3,4 - 5,3	3,5 - 5,3
Νάτριο (mmol/l)	140 ± 5,9	135 - 148	135 - 145
Μαγνήσιο (meq/l)	1,5 ± 0,2	1,3 - 1,8	1,3 - 2,1
Ασβέστιο (mg/dl)	8,8 ± 0,6	7,9 - 9,8	8,2 - 10,6
Φωσφόρος (mg/dl)	3,3 ± 0,7	2,8 - 5,1	2,5 - 5,0
Χλώριο (meq/L)	105 ± 7,9	95 - 112	98 - 110
<u>ΟΥΡΑ</u>			
FE Ουρικού οξέος (%)	6,1 ± 5,0	2,5 - 13	<10
FE Καλίου (%)	7,8 ± 1,9	5,2 - 11	<9
FE Νατρίου (%)	0,7 ± 0,7	0,03 - 2,7	0,5 - 1,2
FE Μαγνησίου (%)	2,2 ± 1,3	0,6 - 4,2	<4
FE Ασβεστίου (%)	0,5 ± 0,2	0,07 - 1,01	<3
FE Φωσφόρου (%)	16 ± 10	0,4 - 36	<20
U _{Tr} /U _{Cre} (mg/g)	0,3 ± 0,1	0,05 - 0,7	<0,2

FE: κλασματική απέκκριση

Στον **Πίνακα 13** φαίνονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά στον ορό και τα ούρα των ασθενών πριν την έναρξη (ημέρα 0) και την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (ημέρα 5). Όπως φαίνεται στον πίνακα δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις τιμές των βιοχημικών παραμέτρων του ορού μεταξύ αυτών των δυο χρονικών στιγμών, εκτός των επιπέδων της ουρίας που ήταν υψηλότερα κατά τον πρώτο έλεγχο των ασθενών (ημέρα 0). Δεν παρατηρήθηκε έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, όπως προκύπτει από τις τιμές της eGFR μετά από 5 μέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε υποκαλιαιμία (συγκέντρωση καλίου στον ορό < 3,5 meq/L), υπομαγνησισαιμία (συγκέντρωση μαγνησίου < 1,3 meq/L), ή υποφωσφαταιμία (συγκέντρωση φωσφόρου στον ορό < 2,5 mg/dl) σε κανένα ασθενή μετά από 5 μέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Ωστόσο, 5 ασθενείς (ποσοστό 26,3%) εμφάνισαν υποουριχαιμία, δηλαδή μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος στον ορό κάτω από 3,5 mg/dl, μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.

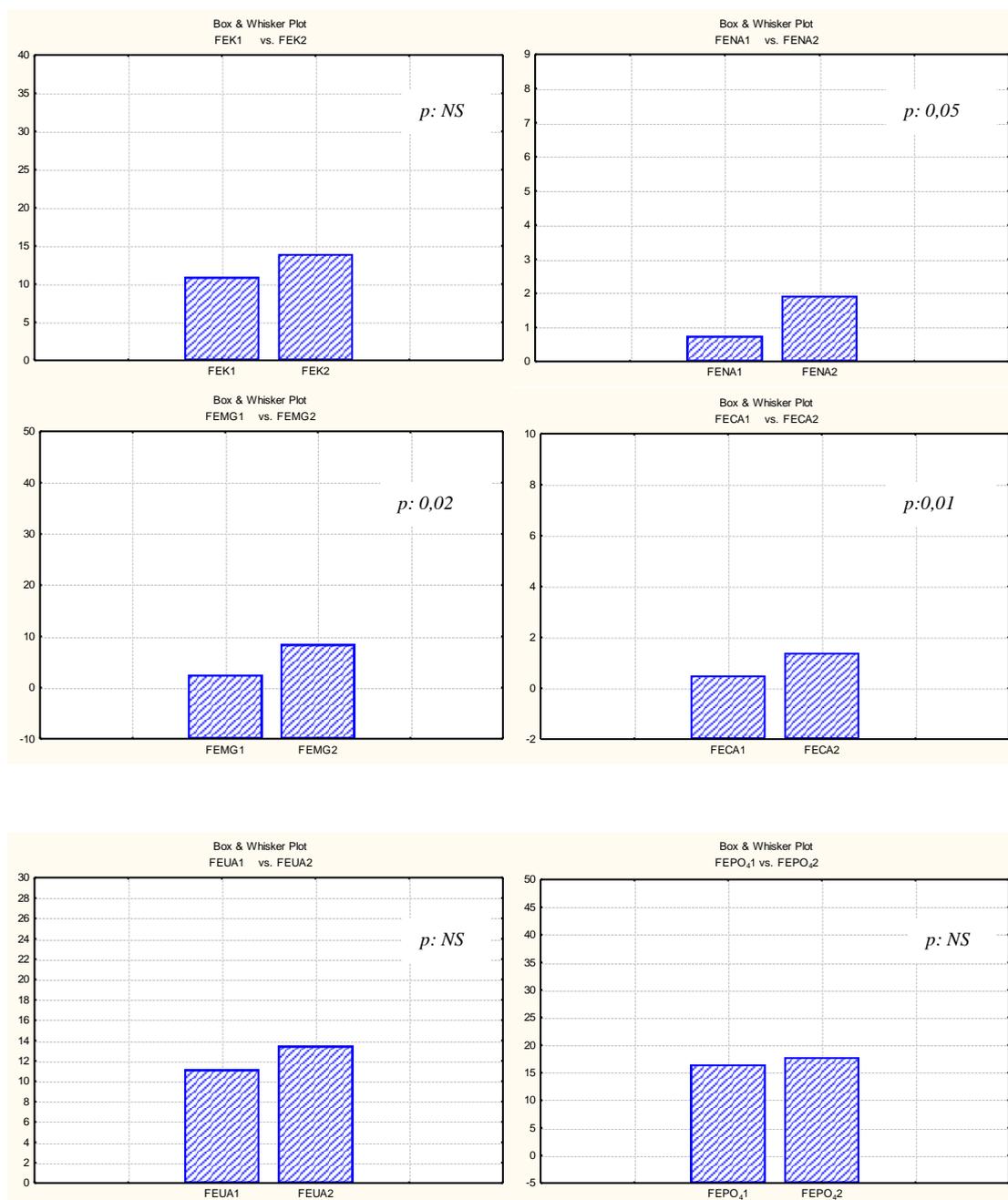
Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των κλασματικών απεκκρίσεων του μαγνησίου, του ασβεστίου και του νατρίου κατά την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (ημέρα 5) σε σύγκριση με τις κλασματικές απεκκρίσεις της ημέρας 0. Ωστόσο, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 14**, οι κλασματικές απεκκρίσεις και των υπολοίπων παραμέτρων που μετρήθηκαν δηλαδή του ουρικού οξέος, του καλίου και του φωσφόρου είχαν μια τάση αύξησης κατά την 5^η ημέρα της θεραπείας. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της πρωτεϊνουρίας κατά την 5^η ημέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδες, όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, γλυκοζουρία δεν εμφάνισε κανένας ασθενής της μελέτης.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος των ούρων δεν ανέδειξε κοκκώδεις ή υαλοκοκκώδεις κυλίνδρους μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη.

Πίνακας 13: Σύγκριση των βιοχημικών παραμέτρων του ορού και των ούρων των ασθενών πριν την έναρξη της θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (ημέρα 0) με την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (ημέρα 5).

Παράμετρος	Ημέρα 0	Ημέρα 5	p
	Μέση τιμή±SD	Μέση τιμή±SD	
ΟΡΟΣ			
Γλυκόζη (mg/dl)	111,2 ± 26	102,9 ± 2,0	NS
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	NS
eGFR	88±16	87±14	NS
Ουρία (mg/dl)	44,7 ± 21	25,2 ± 7,8	0,001
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4,4 ± 1,1	4,0 ± 1,3	NS
Κάλιο (mmol/L)	4,2 ± 0,5	4,4 ± 0,5	NS
Νάτριο (mmol/L)	140 ± 5,9	139 ± 2,8	NS
Μαγνήσιο (meq/L)	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	NS
Ασβέστιο (mg/dl)	8,8 ± 0,6	8,7 ± 0,4	NS
Φωσφόρος (mg/dl)	3,3 ± 0,7	3,1 ± 1,5	NS
Χλώριο (meq/L)	105 ± 7,9	102 ± 3,2	NS
ΟΥΡΑ			
FE Ουρικού οξέος(%)	6,1 ± 5,0	17,4 ± 18,0	NS
FE Καλίου(%)	7,8 ± 1,9	12,7 ± 8,2	NS
FE Νατρίου(%)	0,7 ± 0,7	2,6 ± 3,9	0,05
FE Μαγνησίου(%)	2,2 ± 1,3	8,7 ± 7,1	0,02
FE Ασβεστίου(%)	0,5 ± 0,2	0,8 ± 2,1	0,01
FE Φωσφόρου(%)	16 ± 10	25,1 ± 36,7	NS
FE Χλωρίου(%)	3,6 ± 6,6	3,1 ± 2,8	NS
U _{TPR} /U _{CRE}	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,6	NS

FE: κλασματική απέκκριση



Πίνακας 14. Οι κλασματικές απεκκρίσεις των παραμέτρων που μετρήθηκαν, δηλαδή του καλίου, του νατρίου, του μαγνησίου, του ασβεστίου και του ουρικού οξέος έχουν την τάση να αυξάνονται την 5^η ημέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (FEK2, FENA2, FEMG2, FECA2, FEUA2, FEPO₄2) σε σύγκριση με τις κλασματικές απεκκρίσεις πριν την έναρξη της θεραπείας (FEK1, FENA1, FEMG1, FECA1, FEUA1, FEPO₄1).

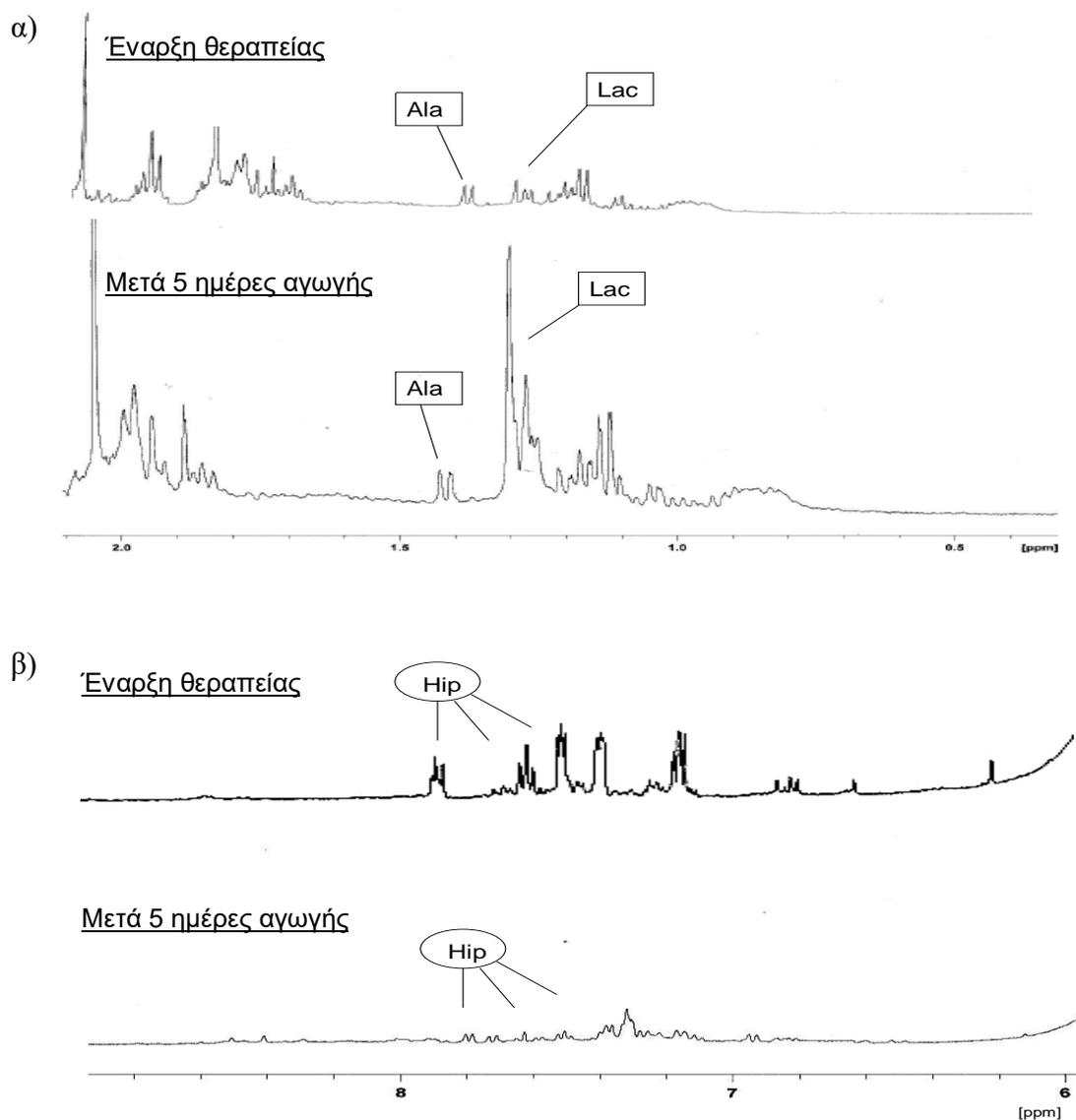
Η ανάλυση των ούρων με φασματοσκοπία NMR έγινε πριν και μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Οι συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβολιτών του φάσματος φαίνονται στον **Πίνακα 15**. Οι κορυφές που επελέγησαν για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών αυτών ήταν αυτές των παρακάτω χημικών μετατοπίσεων (ppm): του γαλακτικού οξέος στα 1.34 (διπλή), της αλανίνης στα 1.48 (διπλή), του κιτρικού οξέος στα 2.54 (διπλή) και στα 2.70 (διπλή), του TMAO στα 3.26 (απλή), της γλυκίνης στα 3.57 (απλή) και του ιππουρικού οξέος στα 7.82 (διπλή).

Πινάκας 15. Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων μεταβολιτών του φάσματος των ούρων των ασθενών πριν την έναρξη της θεραπείας (ημέρα 0) με την 5^η μέρα θεραπείας (ημέρα 5) με αμινογλυκοσίδη.

Μεταβολίτες (mmoles/ mol κρεατινίνης)	Έναρξη θεραπείας	Μετά 5 ημέρες αγωγής	
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD	p
Ιππουρικό οξύ	69 ± 36	34 ± 22	0,04
Γλυκίνη	253 ± 164	181 ± 126	NS
TMAO	19 ± 12	24 ± 21	NS
Κιτρικό οξύ	147 ± 74	104 ± 55	NS
Αλανίνη	14 ± 12	33,6 ± 23	0,04
Γαλακτικό οξύ	20 ± 27	71 ± 56	0,03

Στον **Πίνακα 15** φαίνεται ότι τα επίπεδα του ιππουρικού οξέος, της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδες σε σύγκριση με τα επίπεδα τους στα ούρα πριν την έναρξη της θεραπείας (ημέρα 0). Συγκεκριμένα, μειώθηκε η απέκκριση του ιππουρικού οξέος, ενώ αυξήθηκαν οι απεκκρίσεις της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμικασίνη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση των ευρημάτων αυτών με την αύξηση της κλασματικής απέκκρισης του ασβεστίου και του μαγνησίου μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμικασίνη.

Στο **Σχήμα 37** φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR 500MHz ούρων από ένα ασθενή πριν την έναρξη της θεραπείας και ένα φάσμα ^1H NMR 500MHz ούρων του ίδιου ασθενή μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη.



Σχήμα 38. Αντιπροσωπευτικά φάσματα ^1H NMR 500 MHz στα ούρα (δ 0.3 – 2.1 και 6.0 – 9.0ppm) από ένα ασθενή πριν την έναρξη της θεραπείας (επάνω) και μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη (κάτω). Φαίνεται ότι αυξήθηκε η απέκκριση της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος (α) ενώ μειώθηκε η απέκκριση του ιππουρικού οξέος (β) στα ούρα του ασθενή μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη.

2.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ουρικό οξύ είναι μια αρκετά παρεξηγημένη ουσία διότι έχει συνδυασθεί μόνο με παθολογικές καταστάσεις των οποίων είναι σημαντικός δείκτης ή και προδιαθεσικός παράγοντας¹⁸⁰. Υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό παρατηρούνται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 2, σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και σε υπέρτασικά άτομα, ενώ αποτελεί και ισχυρό προγνωστικό παράγοντα θνητότητας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια¹⁸¹. Η πρώτη παρατήρηση ότι άτομα με αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα έχουν αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο χρονολογείται εδώ και 50 έτη¹⁸². Η υπερουριχαιμία, η οποία ορίζεται ως αύξηση του ουρικού οξέος στον ορό πάνω από 6,5mg/dl στους άνδρες και 6,0mg/dl στις γυναίκες, έχει συσχετισθεί με αυξημένη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν είτε το γενικό πληθυσμό¹⁸³⁻¹⁸⁵, είτε υπέρτασικά άτομα¹⁸⁶⁻¹⁸⁸, είτε ασθενείς με προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο¹⁸⁹. Επίσης, το ουρικό οξύ, μια δυσδιάλυτη ουσία, όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο αίμα εναποτίθεται με τη μορφή κρυστάλλων σε διάφορα σημεία του σώματος και συχνότερα σε αρθρώσεις (ουρική αρθρίτιδα) ή στους νεφρούς (ουρική νεφροπάθεια). Στις περισσότερες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, φαίνεται ότι εάν γίνει προσαρμογή ως προς τους παράγοντες που έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν το ουρικό οξύ στο αίμα ή συμβάλλουν στην αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η ηλικία, η παρουσία υπέρτασης, νεφρικής νόσου ή μικρολευκωματινουρίας, η κατανάλωση οινοπνεύματος, η παχυσαρκία και η χρήση διουρητικών, τότε η συσχέτιση της υπερουριχαιμίας με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο χάνει τη στατιστική της σημαντικότητα. Έτσι, η ασυμπτωματική υπερουριχαιμία θεωρείται δείκτης των παραπάνω καταστάσεων που αποτελούν παράγοντες αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου και δεν χρήζει φαρμακευτικής αντιμετώπισης, εκτός και εάν συνδέεται με νεφρολιθίαση ή κρίσεις ουρικής αρθρίτιδας.

Παράλληλα, το ουρικό οξύ είναι μια ουσία που δρα ως ενδογενές αντιοξειδωτικό στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτός πιθανά είναι ο λόγος που τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο αίμα του ανθρώπινου οργανισμού είναι υψηλότερα σε σύγκριση με τα ζώα, ως αποτέλεσμα της απενεργοποίησης του ενζύμου ουρικήση, καθώς και ενός ισχυρού επανααρροφητικού συστήματος στους νεφρούς. Εξαιτίας αυτών των αντιοξειδωτικών δράσεων του ουρικού οξέος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ένα προστατευτικό ρόλο του ουρικού οξέος σε νοσήματα, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer ή μετά από μεγάλα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια^{190, 191}. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα υψηλότερα επίπεδα του ουρικού οξέος πιθανά συνεισφέρουν στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και τη χαμηλότερη συχνότητα νεοπλασιών στον άνθρωπο σε σύγκριση με τα ζώα. Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος μπορεί ως ένα βαθμό να δρουν προστατευτικά σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, γεγονός που πιθανά αποτέλεσε ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τους προγόνους μας. Μελέτες έδειξαν ότι η μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAC) ασθενών με αθηρωμάτωση οφείλεται στα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος¹⁹². Επομένως, είναι πιθανό ότι η υπερουριχαιμία αποτελεί μια προστατευτική ανταπόκριση του οργανισμού στο χρόνια οξειδωτικό stress που συνοδεύει την αθηρωματική νόσο¹⁹³. Ωστόσο, παραμένει ακόμα αναπάντητο το ερώτημα, εάν το αυξημένο ουρικό οξύ έχει άμεση σχέση αιτίας-αποτελέσματος με την καρδιαγγειακή νόσο ή εάν απλά συνυπάρχει ως ένας δείκτης αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου.

Η πρωτοπαθής νεφρική υποουριχαιμία είναι μια διαταραχή της ομοιόστασης του ουρικού οξέος, η οποία χαρακτηρίζεται από επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό μικρότερα από 2.5mg/dl και από αυξημένη κλασματική απέκκριση του ουρικού οξέος στα ούρα (FEUA>10%). Παρόλο που η κατάσταση αυτή είναι ασυμπτωματική, έχουν περιγραφεί αρκετά περιστατικά οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μετά από άσκηση και ουρολιθίασης σε άτομα με ΠΝΥ. Τα άτομα με ΠΝΥ δεν έχουν την απαραίτητη προστατευτική αντιοξειδωτική δράση του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο. Πράγματι, εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων του ουρικού οξέος στον ορό οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια της άσκησης προκαλούν βλάβη του εγγύς σωληναρίου. Ωστόσο,

τα άτομα με ΠΝΥ της παρούσας μελέτης δεν είχαν ιστορικό ΟΝΑ μετά από άσκηση ή νεφρολιθίασης.

Οι δυο αυτές αντίθετες πλευρές του ουρικού οξέος όσον αφορά την επίδραση του στον οργανισμό, προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πράγματι, τα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό φαίνεται ότι συσχετίζονται με την αθηρωμάτωση και την υπέρταση, ενώ τα χαμηλά επίπεδα παρέχουν χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα ¹⁹³. Επομένως, τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό πρέπει να βρίσκονται μέσα στα φυσιολογικά όρια, γεγονός που προϋποθέτει την ύπαρξη αυστηρών ρυθμιστικών συστημάτων στον οργανισμό. Μετά την ανακάλυψη του μεταφορέα του ουρικού URAT1 το 2002, αποδόθηκε σημαντικός ρόλος στους νεφρούς για τη ρύθμιση των επιπέδων του ουρικού οξέος στο αίμα. Πράγματι, αυτός ο μεταφορέας διατηρεί τα επίπεδα του ουρικού οξέος σε ικανοποιητικά επίπεδα, γεγονός που μεγιστοποιεί τις ευεργετικές του ιδιότητες. Επιπρόσθετα, η πολυπλοκότητα στη μεταφορά του ουρικού οξέος (μοντέλο των τεσσάρων σταδίων) εξασφαλίζει αυξημένες συγκεντρώσεις ουρικού οξέος στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου, τα οποία είναι ευαίσθητα στη δράση των ελευθέρων ριζών. Επίσης, ο μεταφορέας αυτός είναι σημαντικός όχι μόνο για την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος, αλλά και εξαιτίας της ιδιότητας του να αλληλεπιδρά με φάρμακα και μεταβολίτες φαρμάκων και καθορίζει με αυτό τον τρόπο την υπερουριχαιμική ή ουρικοζουρική τους δράση. Οι νεφροί και κατ'επέκταση η λειτουργικότητα του μεταφορέα URAT1, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια τόσο της υπερ- όσο και της υποουριχαιμίας. Η ανάλυση του γονιδίου SLC22A12 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη URAT1, σε ασθενείς με ΠΝΥ, ανέδειξε αρκετές μεταλλάξεις υπεύθυνες για την απενεργοποίηση του μεταφορέα στο νεφρικό σωληνάριο. Η ΠΝΥ αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο έρευνας του μεταφορέα του ουρικού οξέος. Οι περισσότερες μελέτες ασθενών με ΠΝΥ έγιναν σε Ασιατικό πληθυσμό (ιδιαίτερα σε Ιάπωνες), στον οποίο η συχνότερη μετάλλαξη είναι η G774A (W258X). Ωστόσο, και άλλες μεταλλάξεις φαίνεται ότι είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της υποουριχαιμίας αλλά σε μικρότερη συχνότητα (R90H, V138M, G164S, T217M, Q297X, Q382L, M430T, Q312L, R477H, T1253G, IVS2+1 G>A, and 1639-1643delGTCCT) ⁶⁷ ⁶⁸. Έτσι, μετά από μία σειρά

μελετών οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ΠΝΥ είναι μια εκλεκτική διαταραχή του νεφρικού σωληναρίου για το ουρικό οξύ και οφείλεται σε γονιδιακές μεταλλάξεις του μεταφορέα του ουρικού URAT1⁶⁸⁻⁷⁵.

Η παρούσα εργασία προσπάθησε να συνεισφέρει στο ανωτέρω πεδίο με τη μελέτη Ελλήνων με ΠΝΥ. Έτσι έγινε εξέταση των ούρων ατόμων με ΠΝΥ, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ¹H NMR, για να διευκρινισθεί εάν πρόκειται για εκλεκτική διαταραχή που αφορά την επαναρρόφηση του ουρικού οξέος, όπως φαίνεται από τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας ή για μια πιο γενικευμένη βλάβη του εγγύς σωληναρίου. Αρχικά, έγινε γενετικός έλεγχος για την ανεύρεση μεταλλάξεων στο γονίδιο SLC22A12 που είναι υπεύθυνες για την ΠΝΥ, σύμφωνα με τα σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα. Μελετήθηκε το γονίδιο SLC22A12 σε 9 άτομα (7 γυναίκες και 2 άνδρες) με ΠΝΥ, που είχαν τις χαμηλότερες τιμές του ουρικού οξέος στον ορό. Με ανάλυση SSCP του γονιδίου δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στα άτομα αυτά, εκτός από ένα σιωπηλό πολυμορφισμό (1246T>C) στο εξώνιο 2 του γονιδίου, γεγονός που περιγράφεται για δεύτερη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία^{73, 194}. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μία αλλαγή βάσεως στη θέση 1246 του εξωνίου 2, χωρίς όμως να υπάρχει αλλαγή αμινοξέος (Histidine→ Histidine). Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα ότι οι σιωπηλές μεταλλάξεις αν και δεν αλλάζουν την αλληλουχία των αμινοξέων και τη δομή της πρωτεΐνης πιθανά επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της¹⁹⁵. Επίσης, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στους Έλληνες με ΠΝΥ μπορεί να σημαίνει ότι πιθανά υπάρχει και άλλος μεταφορέας, που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά του ουρικού οξέος στο εγγύς σωληνάριο, ο οποίος δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί.

Ο εργαστηριακός έλεγχος δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα επίπεδα της κρεατινίνης, του καλίου, του μαγνησίου, του φωσφόρου, του ασβεστίου και του νατρίου του ορού των ατόμων με ΠΝΥ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Επίσης, η eGFR, η νεφρική επαναρρόφηση της γλυκόζης, ο ουδός επαναρρόφησης των φωσφορικών και οι κλασματικές απεκκρίσεις του καλίου, του μαγνησίου, του φωσφόρου, του ασβεστίου και του νατρίου δεν είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο υπό μελέτη ομάδων.

Ο έλεγχος της πρωτεϊνουρίας δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων. Συγκεκριμένα, δεν ανιχνεύθηκε IgG στα ούρα τόσο των υποουριχαιμικών ατόμων όσο και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Επίσης, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα των ατόμων με ΠΝΥ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Είναι γνωστό ότι η α_1 -μικροσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που διηθείται ελεύθερα από το νεφρικό σπείραμα και επαναροφάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Επομένως, η ύπαρξη α_1 -μικροσφαιρίνης στα ούρα είναι ένας αξιόπιστος δείκτης βλάβης του εγγύς σωληναρίου. Μόνο σε 4 από τα 36 άτομα με ΠΝΥ ανιχνεύθηκε μικρή ποσότητα α_1 -μικροσφαιρίνης στα ούρα. Ωστόσο, 6 από τα 39 άτομα της ομάδας ελέγχου είχαν επίσης ανιχνεύσιμη α_1 -μικροσφαιρίνη, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι δεν υπήρχαν διαφορές όσον αφορά την απέκκριση της α_1 -μικροσφαιρίνης μεταξύ των δυο ομάδων. Έτσι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις κλασσικές βιοχημικές μεθόδους δεν ανέδειξαν διαφορές μεταξύ των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου και επομένως δεν υπήρχαν ενδείξεις σωληναριακής διαταραχής στους υποουριχαιμικούς ασθενείς.

Την τελευταία 25ετία, η φασματοσκοπία NMR έχει αναδειχθεί ως μια από τις πλέον σημαντικές μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών και ιδιαίτερα των ούρων. Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι παρέχει ταυτόχρονα μια λεπτομερή απεικόνιση του συνόλου των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά σε πειραματικό χρόνο λίγων λεπτών και με ελάχιστη προεργασία του δείγματος ¹⁹⁶. Αντίθετα, στις καθιερωμένες βιοχημικές δοκιμασίες, επιλέγονται εκ των προτέρων οι μεταβολίτες που θα προσδιορισθούν και χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια για τον κάθε μεταβολίτη.

Το φάσμα NMR των βιολογικών υγρών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα μοναδικό πολυδιάστατο μεταβολικό «αποτύπωμα», το οποίο φαίνεται ότι διαφοροποιείται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού. Η ιδιαίτερη όμως πολυπλοκότητα των φασμάτων είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για την αξιοποίηση της πολύτιμης βιοχημικής

πληροφορίας που περιέχουν ¹⁹⁷. Για αυτό το λόγο εκδηλώθηκε ένα έντονο ενδιαφέρον στις αρχές της δεκαετίας του 1990 για τη χρησιμοποίηση τεχνικών αναγνώρισης προτύπων με σκοπό την άντληση της πιο σημαντικής βιοχημικής πληροφορίας που υπάρχει στα φάσματα NMR ^{121 119 198}.

Αυτές οι πρώτες εφαρμογές οδήγησαν στην έννοια της μεταβονομικής το 1999 ¹³⁰ και έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μεταβονομικές μελέτες κυρίως με βάση τη φασματοσκοπία ¹H NMR. Οι πιο πρόσφατες από τις μελέτες αυτές έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση της επίδρασης μεταβλητών παραγόντων, όπως η ενδοατομική διακύμανση ^{199 200}, οι διατροφικές συνήθειες ή παρεμβάσεις ^{172 173 201 202 203 171}, το φύλο, η ηλικία, καθώς ακόμη και η χορήγηση αναλγητικών φαρμάκων ευρείας χρήσεως ²⁰⁴, στο βιοχημικό προφίλ των ούρων και του πλάσματος υγιών ατόμων. Ωστόσο, υπάρχει αναγκαιότητα για τον περαιτέρω καθορισμό του φυσιολογικού προφίλ των ούρων σε διάφορες ομάδες του πληθυσμού, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια αξιόπιστη βάση δεδομένων.

Στην παρούσα μελέτη έγινε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία μια μεταβονομική προσέγγιση του μεταβολικού προφίλ των ούρων ατόμων με ΠΝΥ με βάση τη φασματοσκοπία ¹H NMR. Με την τεχνική αυτή, μελετήθηκε μια ομάδα ατόμων με ΠΝΥ σε σύγκριση με μια ομάδα υγιών ατόμων που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου.

Η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων επέτρεψε μια σαφή διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Η τεχνική PCA ανέδειξε μια αδρή τάση διαφοροποίησης, ενώ η τεχνική PLS-DA μια ισχυρή τάση διαχωρισμού μεταξύ των δύο ομάδων. Η ελαχιστοποίηση όμως της διατομικής μεταβλητότητας διαμέσου της εφαρμογής της τεχνικής OSC συνετέλεσε στη δημιουργία στατιστικών μοντέλων που παρείχαν πλήρη και σαφή διαχωρισμό μεταξύ των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Τα στατιστικά μοντέλα που προέκυψαν, ήταν σε θέση να προβλέψουν την παρουσία νεφρικής σωληναριακής βλάβης με ευαισθησία και ειδικότητα 100%, για επίπεδο εμπιστοσύνης > 95%. Συνολικά διαπιστώθηκε ότι στα ούρα των ατόμων με ΠΝΥ παρατηρείται αυξημένη απέκκριση αλανίνης, φαινυλαλανίνης, γλυκίνης, γλουταμίνης, οξικού οξέος και ενός μη ταυτοποιημένου μεταβολίτη στα

3.3ppm, ενώ παρατηρείται μειωμένη απέκκριση ΤΜΑΟ, κρεατινίνης και ιππουρικού οξέος σε σύγκριση με τα ούρα των νορμοουριχαιμικών ατόμων.

Το 98% του ποσού των αμινοξέων που διηθούνται από το σπείραμα επανααρροφάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και μόνο το 1-2% αποβάλλεται στα ούρα. Γενικά η μεταφορά των αμινοξέων, γίνεται με τέσσερις ξεχωριστούς μηχανισμούς συµμεταφοράς που δεν συναγωνίζονται μεταξύ τους και χρησιµοποιούνται για τις ακόλουθες τάξεις αµινοξέων, σύµφωνα µε τον οργανισµό του ανθρώπινου γονιδιώµατος HUGO (<http://www.genenames.org>).

- **Τα 15 ουδέτερα αµινοξέα** (αλανίνη, ασπαραγίνη, κυστεΐνη, γλουταµίνη, γλυκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, µεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη, σερίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη και βαλίνη) µεταφέρονται από το εξαρτώµενο από το Na⁺ σύστηµα B^ο, που ανακαλύφθηκε το 1996, διαµέσου του µεταφορέα B^οAT1 (γονίδιο SLC6A19) που βρίσκεται στο S1 τµήµα του ΕΕΣ.
- **Τα 3 βασικά αµινοξέα** (λυσίνη, ορνιθίνη και αργινίνη) µεταφέρονται από τα µη- εξαρτώµενα από το Na⁺ συστήµατα µεταφοράς γ+L και b^ο, διαµέσου των µεταφορέων γ+LAT1 και b^οAT (γονίδια SLC7A7 και SLC7A9, αντίστοιχα).
- **Τα 2 όξινα αµινοξέα** (γλουταµικό και ασπαρτικό οξύ) µεταφέρονται διαµέσου του εξαρτώµενου από το Na⁺ µεταφορέα EAAC1/EAAT3 (SLC1A1) που βρίσκεται στα αρχικά τµήµατα S1, S2 του ΕΕΣ.
- µια τέταρτη οµάδα περιλαµβάνει τη γλυκίνη, την προλίνη και την υδροξυπρολίνη. Μεταφέρονται από τον εξαρτώµενο από το Na⁺ µεταφορέα IMINO/SIT (SLC6A20) που βρίσκεται στο S1-S3 τµήµα του ΕΕΣ.

Η αυξηµένη απέκκριση αµινοξέων στα ούρα οφείλεται σε βλάβη των συστηµάτων µεταφοράς τους στο ΕΕΣ. Γενικευµένη ονοµάζεται η

αμινοξουρία όταν υπάρχει αύξηση της απέκκρισης όλων των αμινοξέων, τα όποια βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στα ούρα των φυσιολογικών ατόμων και παρατηρείται στο σύνδρομο Fanconi. Η ύπαρξη του συνδρόμου Fanconi υποδηλώνει γενικευμένη βλάβη του ΕΕΣ. Εκτός από τη γενικευμένη αμινοξουρία, σε πολλές παθήσεις παρατηρείται αυξημένη απέκκριση μεμονωμένων αμινοξέων. Στην νόσο του Hartnup διαταράσσεται η μεταφορά όλων των ουδέτερων αμινοξέων με αποτέλεσμα οι απεκκρίσεις τους στα ούρα είναι αυξημένες. Στην κυστινουρία παρατηρείται αυξημένη απέκκριση κυστίνης, λυσίνης, ορνιθίνης και αργινίνης, ενώ στη μεμονωμένη κυστινουρία μόνο κυστίνης. Στην δικαρβοξυλική αμινοξουρία έχουμε αυξημένη απέκκριση των 2 όξινων αμινοξέων, γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος. Τέλος, στην ιμινογλυκινουρία έχουμε αυξημένη απέκκριση στα ούρα της γλυκίνης, της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Σύγχρονα δεδομένα της μοριακής και γενετικής επιστήμης έχουν πλέον αποκαλύψει ότι για κάθε ένα από τα νοσήματα αυτά υπάρχει και η αντίστοιχη υποκείμενη γενετική διαταραχή (μετάλλαξη) στο γονίδιο που κωδικοποιεί και ελέγχει την αντίστοιχη με το νόσημα πρωτεΐνη-μεταφορέα.

Στα άτομα με ΠΝΥ που μελετήθηκαν, διαπιστώθηκε αυξημένη απέκκριση των αμινοξέων αλανίνη, φαινυλαλανίνη, γλουταμίνη και γλυκίνη. Πρόκειται δηλαδή για μια εκλεκτική αμινοξουρία τεσσάρων ουδέτερων αμινοξέων, τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί μεταφέρονται κυρίως στο S1 τμήμα του ΕΕΣ από τον εξαρτώμενο από το Na^+ μεταφορέα B^oAT1 (SLC6A19). Επίσης, είναι γνωστό ότι στο τμήμα αυτό του ΕΕΣ επαναρροφάται σχεδόν όλο (99%) το διηθούμενο από το σπείραμα ουρικό οξύ από τον μεταφορέα URAT1 (SLC22A12). Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι στα άτομα με ΠΝΥ υπάρχει μια δυσλειτουργία του ΕΕΣ, που μιμείται ατελώς την νόσο του Hartnup (Hartnup-like aminoaciduria). Η δυσλειτουργία αυτή αφορά πιθανότατα το τμήμα S1 του ΕΕΣ, αφού σε αυτό το τμήμα επαναρροφούνται τόσο τα αμινοξέα αλανίνη, φαινυλαλανίνη, γλουταμίνη και γλυκίνη όσο και το ουρικό οξύ. Δεν αποκλείεται στα άτομα με ΠΝΥ η διαταραχή αυτή να οφείλεται σε αλληλεπίδραση των μεταφορέων που βρίσκονται στο τμήμα S1 του ΕΕΣ ή σε βλάβη ενός κοινού συστήματος μεταφοράς που βρίσκεται σε αυτό το τμήμα και αναγνωρίζει ως υπόστρωμα τόσο το ουρικό οξύ όσο και τα απεκκρινόμενα

αμινοξέα. Επίσης, είναι πιθανό ένας κοινός αιτιοπαθολογικός μηχανισμός να προκαλεί βλάβη στους μεταφορείς URAT1 του ουρικού οξέος και B⁰AT1 των εν λόγω αμινοξέων, διαμέσου μεταλλάξεων στα γονίδια SLC22A12 και SLC6A19, αντίστοιχα. Πρέπει να επισημανθεί ότι ο σωληναριοδιάμεσος χώρος σε αντίθεση με το αγγειώδες σπείραμα αποτελεί τον πλέον ευαίσθητο στόχο διαφόρων νεφροτοξικών παραγόντων (πχ. οξειδωτικό στρες). Πράγματι, όπως έχει αναφερθεί, τα άτομα με ΠΝΥ έχουν μεγάλο κίνδυνο τοξικής βλάβης των επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς σωληναρίου από τη δράση των ελευθέρων ριζών, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαταραχή της λειτουργίας των συστημάτων μεταφοράς του ουρικού οξέος και των εν λόγω ουδέτερων αμινοξέων.

Εκτός από την αυξημένη απέκκριση των αμινοξέων, ο έλεγχος των ούρων των υποουριχαιμικών ατόμων με φασματοσκοπία ¹H NMR, ανέδειξε αυξημένη απέκκριση και άλλων μεταβολιτών που συσχετίζονται με διαταραχή της λειτουργίας του ΕΕΣ. Πράγματι, στα ούρα των ατόμων με ΠΝΥ διαπιστώθηκε αυξημένη απέκκριση οξικού οξέος σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Η αυξημένη απέκκριση οξικού οξέος στα ούρα έχει αναφερθεί στην εγγύς σωληναριακή νέκρωση μετά από χορήγηση HgCl₂ και κυκλοσπορίνης σε πειραματόζωα, καθώς και σε νεφροτοξικές αλλοιώσεις της μυελώδους περιοχής του νεφρού ^{205, 206 207}.

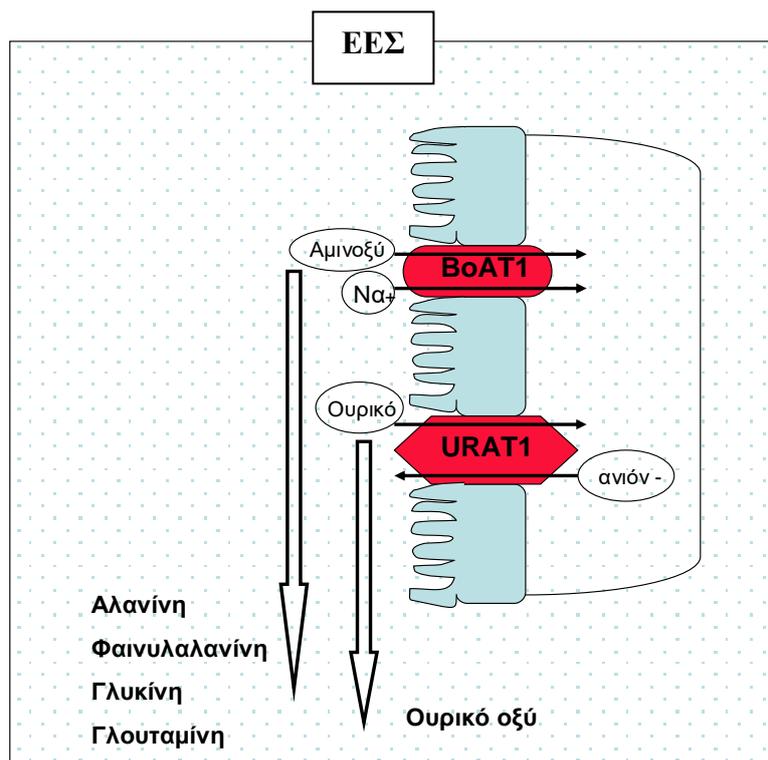
Το TMAO είναι μια οσμωτικά ενεργός ουσία που προκύπτει από την οξείδωση της τριμεθυλαμίνης (TMA) στο ήπαρ παρουσία του ενζύμου flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) ²⁰⁸. Αναστολή της ενεργότητας αυτού του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία οξείδωσης της TMA σε TMAO και οδηγεί στο μεταβολικό νόσημα της τριμεθυλαμινοουρίας, στο οποίο παρατηρείται αυξημένη απέκκριση μη οξειδωμένης TMA στα ούρα, στην αναπνοή και στον ιδρώτα με έντονη χαρακτηριστική οσμή ψαριού ²⁰⁹. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το TMAO εμφανίζει υψηλή διατομική μεταβλητότητα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα ^{210, 211}. Πρέπει να επισημανθεί ότι αυξημένα επίπεδα μεθυλαμινών στα ούρα, κυρίως του TMAO, έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις καταστροφής της μυελώδους μοίρας του νεφρού, καθώς και σε πρόωμη απόρριψη νεφρικών μοσχευμάτων μετά από

μεταμόσχευση νεφρού ^{114, 141}. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη απέκκριση ΤΜΑΟ στα άτομα με ΠΝΥ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι σε αυτά τα άτομα υπάρχει διαταραχή του σωληναριοδιάμεσου ιστού και όχι νέκρωση της μυελώδους περιοχής ή καταστροφή των νεφρικών θηλών ¹⁴⁴.

Το ιππουρικό οξύ παράγεται κατά την αντίδραση του βενζοϊκού οξέος με την γλυκίνη στο ήπαρ και στο νεφρό ²¹². Το ιππουρικό οξύ είναι ένα φυσιολογικό συστατικό των ούρων στον άνθρωπο, εκκρίνεται από το εγγύς νεφρικό σωληνάριο και η συγκέντρωσή του έχει συσχετισθεί με τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου ²¹³. Η υψηλή διακύμανση των επιπέδων του ιππουρικού οξέος στα ούρα θα μπορούσε να αποδοθεί στο διαφορετικό βαθμό πρόσληψης του βενζοϊκού οξέος που χρησιμοποιείται συχνά ως συντηρητικό στα τρόφιμα ²¹⁴. Επίσης, αυξημένα επίπεδα ιππουρικού οξέος έχουν αναφερθεί σε υγιή άτομα μετά από κατανάλωση μαύρου ή πράσινου τσαγιού καθώς και χαμομηλιού για μια περίοδο 2 εβδομάδων ²¹⁵. Ωστόσο, σημαντική ελάττωση των επιπέδων του ιππουρικού οξέος στα ούρα μπορεί να είναι ενδεικτική σωληναριακής δυσλειτουργίας και συγκεκριμένα μείωσης της έκκρισής του από το σωληνάριο ²¹¹. Επιπρόσθετα, η αυξημένη απέκκριση γλυκίνης που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΠΝΥ, πιθανά έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της γλυκίνης που είναι απαραίτητη για την παραγωγή ιππουρικού οξέος στο νεφρό, ένα εύρημα που μπορεί να ερμηνεύσει τη μειωμένη απέκκριση του ιππουρικού οξέος που παρατηρήθηκε στα άτομα με ΠΝΥ.

Το κιτρικό οξύ του υπερδιηθήματος επαναρροφάται αποκλειστικά από τα επιθηλιακά κύτταρα του ΕΕΣ. Έτσι, η αναστολή της απέκκρισης του κιτρικού οξέος αποτελεί ένα αξιόπιστο δείκτη σωληναριακής βλάβης του ΕΕΣ. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα άτομα με ΠΝΥ δεν παρατηρήθηκε αναστολή της απέκκρισης του κιτρικού οξέος σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου, ένα εύρημα που υποδηλώνει μια περιορισμένη βλάβη του εγγύς σωληναρίου. Επομένως, η διαταραχή αφορά την επαναρρόφηση συγκεκριμένων μεταβολιτών και επηρεάζει συγκεκριμένους μεταφορείς.

Είναι επομένως εμφανές ότι η ΠΝΥ παρά το γεγονός ότι θεωρείται μια εκλεκτική διαταραχή της λειτουργίας του εγγύς σωληναρίου, συνοδεύεται από αυξημένη απέκκριση και άλλων μεταβολιτών πέραν του ουρικού οξέος. Κοινό αιτιοπαθογενετικό αίτιο αυτών των ευρημάτων αποτελεί μια διαταραχή στο μηχανισμό μεταφοράς και επαναρόφησης διαφόρων ουσιών (κυρίως αμινοξέων) κατά μήκος των ουροφόρων σωληναρίων. Η αμινοξουρία που παρατηρήθηκε στα άτομα με ΠΝΥ ήταν εκλεκτική, τύπου Hartnup, αφού αφορούσε 4 ουδέτερα αμινοξέα (Hartnup-like aminoaciduria) (**Σχήμα 39**). Επομένως τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν μια γενικευμένη διαταραχή του εγγύς σωληναρίου (ατελές σύνδρομο Fanconi ?) στα άτομα με ΠΝΥ και όχι μια εκλεκτική διαταραχή που αφορά μόνο το ουρικό οξύ.



Σχήμα 39. Το μοντέλο διαταραχής του εγγύς σωληναρίου σε ασθενείς με ΠΝΥ, όπως διαπιστώθηκε στη μελέτη μας. Η διαταραχή της λειτουργίας του μεταφορέα του ουρικού οξέος URAT1, καθώς και του μεταφορέα των ουδέτερων αμινοξέων B⁰AT1 οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση τους στα ούρα.

ΕΕΣ: Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο

Μελέτη νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες

Η εμφάνιση νεφροτοξικότητας εξαιτίας της λήψης αμινογλυκοσιδών αποτελεί την κύρια και συχνότερη ανεπιθύμητη ενέργεια τους στην κλινική πράξη. Μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση της νοσηρότητας με σημαντικό επιπρόσθετο κόστος θεραπείας για κάθε νοσηλευόμενο ασθενή. Ένα ποσοστό περίπου 15% των ασθενών που λαμβάνουν αμινογλυκοσίδη εμφανίζουν διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας, η οποία είναι σχεδόν πάντα αναστρέψιμη με τη διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου και είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης και κατακράτησης των αμινογλυκοσιδών στα σωληναριακά κύτταρα του ΕΕΣ.

Η νεφροτοξικότητα των αμινογλυκοσιδών αρχίζει να εκδηλώνεται 5-7 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας με κύριο πρώιμο εύρημα στα ούρα την αύξηση ορισμένων σωληναριακών ενζύμων, όπως της N-ακετυλ-β-γλυκοζαμινιδάσης (NAG), της β-γαλακτοσιδάσης (GAL) και της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Ακολουθεί η εμφάνιση γλυκοζουρίας, μαγνησιουρίας και παθολογικού ιζήματος ούρων με την παρουσία κυλίνδρων. Πρέπει να αναφερθεί ότι εάν και έχουν αναπτυχθεί δοκιμασίες ανίχνευσης των παραπάνω ενζύμων για την πρώιμη διάγνωση της αρχόμενης νεφροτοξικότητας, αυτές οι δοκιμασίες είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και όχι απολύτως ειδικές. Τελικά, μετά από ακόμη λίγες ημέρες (μετά την 7^η μέρα) μειώνεται ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης (eGFR). Ωστόσο, η μέτρηση των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού δεν αποτελεί ευαίσθητο δείκτη της προκαλούμενης νεφροτοξικότητας, δεδομένου ότι οι αμινογλυκοσίδες προκαλούν διαταραχή της λειτουργίας των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων η οποία δεν αντανακλάται άμεσα στα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού.

Επομένως, η νεφρική δυσλειτουργία από τη χρήση των αμινογλυκοσιδών είναι δυνατόν να διαφύγει της προσοχής μας. Η αναγνώριση της σωληναριακής διαταραχής απαιτεί ικανό βαθμό ευαισθητοποίησης του κλινικού ιατρού. Η ανάγκη χρησιμοποίησης νέων τεχνικών αναγνώρισης αρχόμενης σωληναριακής βλάβης είναι απαραίτητη. Το σημαντικό πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας ¹H-NMR είναι ότι παρέχει ταυτόχρονα μια

λεπτομερή απεικόνιση του συνόλου των μεταβολικών μικρού μοριακού βάρους που ανιχνεύονται στα ούρα. Η σημαντική συνεισφορά της $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπίας όμως έγκειται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες αυτούς δεν προσδιορίζονται στην κλινική πράξη αν και έχει αναφερθεί ότι έχουν αξιόλογη διαγνωστική αξία σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η διαταραχή της σωληναριακής λειτουργίας. Επιπρόσθετα, οι μεταβολίτες που ανιχνεύονται παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για τον εντοπισμό της νεφρικής βλάβης.

Στη μελέτη μας εκτιμήσαμε τη νεφρική λειτουργία σε ασθενείς που εισήχθησαν στην κλινική μας με λοίμωξη και έλαβαν αμινογλυκοσίδη για τουλάχιστον 5 ημέρες κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Η νεφρική λειτουργία εκτιμήθηκε με εργαστηριακό έλεγχο αίματος και ούρων, καθώς και με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ούρων πριν και μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (αμικασίνη 1gr/ημ).

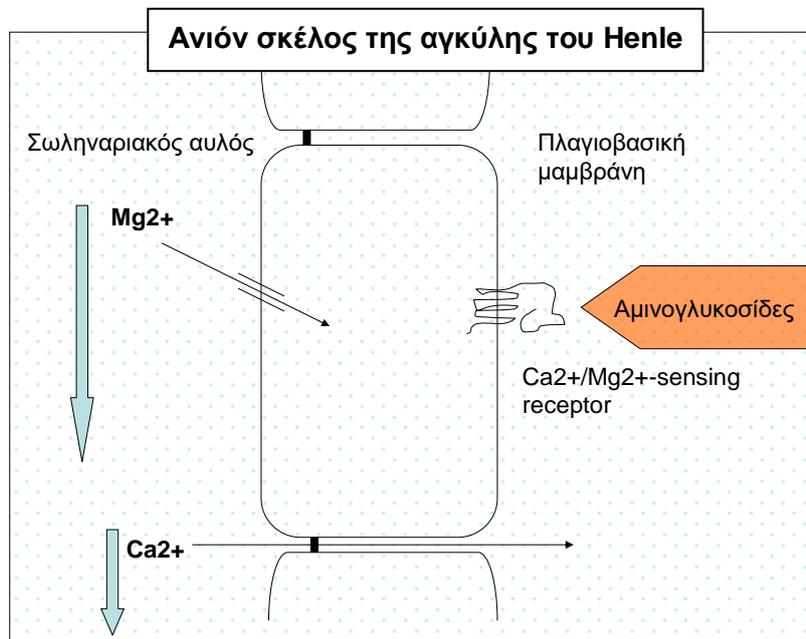
Οι ασθενείς δεν εμφάνισαν έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη, όπως φαίνεται από τη μεταβολή της κρεατινίνης και του eGFR. Ο βιοχημικός έλεγχος του αίματος δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους που μελετήθηκαν τις δυο χρονικές στιγμές. Κατά την εισαγωγή οι ασθενείς, ενώ ήταν αιμοδυναμικά σταθεροί, εμφάνιζαν ένα βαθμό συστολής του εξωκυττάριου όγκου εξαιτίας της λοίμωξης, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει τα υψηλότερα επίπεδα της ουρίας κατά τον πρώτο έλεγχο των ασθενών (ημέρα 0). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε 5 ασθενείς διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα ουρικού οξέος (συγκέντρωση του ουρικού οξέος στον ορό $< 3,5 \text{ mg/dl}$) που συνοδεύονταν από απρόσφορη ουρικοζουρία ($\text{FEUA} > 10\%$), μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη (ποσοστό 26,3%).

Οι κλασματικές απεκκρίσεις των παραμέτρων που μετρήθηκαν αυξήθηκαν κατά την 5^η ημέρα θεραπείας, χωρίς όμως να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, εκτός από τις κλασματικές απεκκρίσεις του μαγνησίου του ασβεστίου και του νατρίου που ήταν σημαντικά υψηλότερες την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδη σε σύγκριση με τις κλασματικές απεκκρίσεις πριν την έναρξη της θεραπείας. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μικρή όχι όμως στατιστικά σημαντική αύξηση της πρωτεϊνουρίας την 5^η ημέρα θεραπείας με

αμινογλυκοσίδες. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε γλυκοζουρία και κυλινδρουρία σε κανένα ασθενή της μελέτης μας.

Η αύξηση της κλασματικής απέκκρισης του νατρίου μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδες οφείλεται στην ενδοφλέβια χορήγηση νατριούχων διαλυμάτων, καθώς και στην οξεία σωληναριακή διαταραχή που προκαλείται από τις αμινογλυκοσίδες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί η εμφάνιση υποουριχαιμίας και απρόσφορης ουρικοζουρίας στο 1/3 περίπου των ασθενών, ένα εύρημα που υποδηλώνει βλάβη του εγγύς σωληναρίου.

Η μαγνησιουρία και η ασβεστιουρία ήταν οι πιο σημαντικές διαταραχές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς της μελέτης μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι οι αμινογλυκοσίδες επηρεάζουν τη σωληναριακή μεταφορά του μαγνησίου και του ασβεστίου στο τμήμα του σωληναρίου στο οποίο απορροφούνται και οι δύο ηλεκτρολύτες, δηλαδή το παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελετών σε πειραματόζωα ^{216, 217}. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί είναι άγνωστοι, αλλά η μαγνησιουρία και η ασβεστιουρία παρατηρούνται συνήθως χωρίς ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα σωληναριακά κύτταρα ²¹⁸. Οι αμινογλυκοσίδες είναι θετικά φορτισμένα μόρια (κατιόντα) και μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τον υποδοχέα που είναι ευαίσθητος στο Ca^{2+}/Mg^{2+} (Ca^{2+}/Mg^{2+} -sensing receptor) και βρίσκεται στην πλαγιοβασική μεμβράνη του σωληναριακού κυττάρου (**Σχήμα 40**). Η ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα από τις αμινογλυκοσίδες εμποδίζει την παθητική απορρόφηση του μαγνησίου και του ασβεστίου στην αγκύλη του Henle και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη νεφρική απέκκριση του μαγνησίου και του ασβεστίου πολύ πριν οι αμινογλυκοσίδες δράσουν τοξικά στο σωληναριακό κύτταρο ²¹⁹. Επομένως, οι αυξημένες κλασματικές απεκκρίσεις του μαγνησίου και του ασβεστίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες σωληναριακής διαταραχής που οφείλεται στη χορήγηση των αμινογλυκοσίδων



Σχήμα 40. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα που είναι ευαίσθητος στο $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ και βρίσκεται στην πλαγιοβασική μεμβράνη του σωληναριακού κυττάρου του παχέος ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle από τις αμινογλυκοσίδες έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη νεφρική απέκκριση του μαγνησίου και του ασβεστίου.

Η ανάλυση των ούρων με φασματοσκοπία ^1H NMR στους ασθενείς της μελέτης έδειξε διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων πριν και μετά τη θεραπεία με αμινογλυκοσίδη. Συγκεκριμένα, μειώθηκε η απέκκριση του ιππουρικού οξέος, ενώ αυξήθηκαν οι απεκκρίσεις της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμικασίνη.

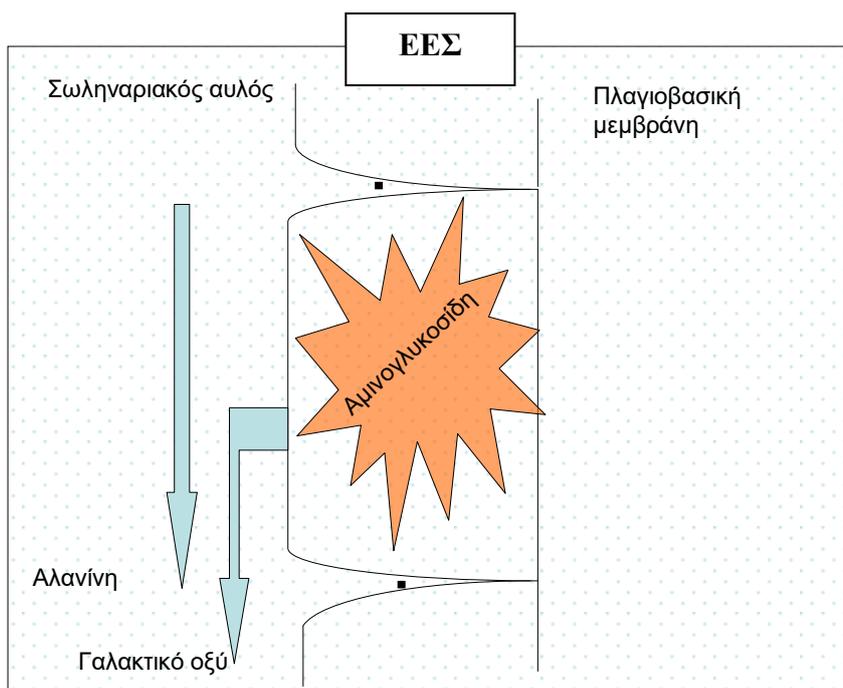
Η ελάττωση των επιπέδων του ιππουρικού οξέος στα ούρα, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να είναι ενδεικτική δυσλειτουργίας του εγγύς σωληναρίου εξαιτίας μείωσης της έκκρισής του από το σωληνάριο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο μηχανισμός της νεφροτοξικότητας των αμινογλυκοσιδών σχετίζεται με τη συσσώρευση του φαρμάκου στα επιθηλιακά κύτταρα του ΕΕΣ. Στη συνέχεια μια αλληλουχία γεγονότων έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή βασικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως της μιτοχονδριακής αναπνοής που οδηγεί στη λύση του κυττάρου, ένα εύρημα που δικαιολογεί την παρουσία γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά τη χορήγηση αμινογλυκοσιδών. Επίσης, η αύξηση της απέκκρισης του γαλακτικού οξέος έχει συσχετισθεί με μειωμένη εγγύς σωληναριακή επαναρρόφηση που οφείλεται σε βλάβη της ορθής μοίρας S_2/S_3 του εγγύς σωληναρίου και φαίνεται ότι είναι ένας δείκτης νέκρωσης της φλοιώδους περιοχής του νεφρού ²²⁰. Αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος έχουν αναφερθεί και σε συνδυασμό με μειωμένη απέκκριση κιτρικού οξέος, αφού το κιτρικό οξύ διασπάται σε οξικό οξύ και ακετοξικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και τελικά σε γαλακτικό οξύ²⁰⁷. Οι ασθενείς της μελέτης εμφάνισαν μειωμένη απέκκριση του κιτρικού οξέος την 5^η μέρα αγωγής με αμινογλυκοσίδες ένα εύρημα που συμφωνεί με τον παραπάνω μηχανισμό. Επομένως, η αύξηση της απέκκρισης του γαλακτικού οξέος μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη οφείλεται τόσο στην αυξημένη ενδοκυττάρια παραγωγή γαλακτικού οξέος όσο και στη μειωμένη επαναρρόφηση του από τα κύτταρα του ΕΕΣ.

Παράλληλα, η λύση των επιθηλιακών κυττάρων του ΕΕΣ που προκαλείται από την τοξική δράση των αμινογλυκοσιδών πιθανά συμβάλλει στη διαταραχή της λειτουργίας ορισμένων συστημάτων μεταφοράς αμινοξέων και στη μειωμένη επαναρρόφηση τους από το ΕΕΣ. Έτσι, η αύξηση της νεφρικής απέκκρισης της αλανίνης που εμφάνισαν οι ασθενείς μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη, πιθανά υποδηλώνει διαταραχή του μηχανισμού της επαναρρόφησης της αλανίνης στο ΕΕΣ.

Συνεπώς, τα ευρήματα με βάση την ¹H-NMR φασματοσκοπία των ούρων υποδηλώνουν την ύπαρξη διαταραχής της λειτουργίας του ΕΕΣ σε ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδη από την 5^η μόλις ημέρα της θεραπείας και οφείλεται στην τοξική δράση του φαρμάκου. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι τα ευρήματα αυτά δεν σχετίζονται με τη μαγνησιουρία και την ασβεστιουρία που

περιγράφηκαν παραπάνω και οφείλονται στην ενεργοποίηση του υποδοχέα που είναι ευαίσθητος στο $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ στο άπω σωληνάριο. Ωστόσο, η μείωση της απέκκρισης του ιππουρικού οξέος, καθώς και η αύξηση της απέκκρισης της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες (Σχήμα 41).



Σχήμα 41 Το μοντέλο διαταραχής της λειτουργίας του εγγύς σωληναρίου σε ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδη. Παρατηρείται αύξηση της απέκκρισης της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος μετά από 5 ημέρες αγωγής με αμινογλυκοσίδη, εξαιτίας της τοξικής βλάβης του φαρμάκου στο επιθηλιακό κύτταρο του ΕΕΣ.

ΕΕΣ: Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο

2.6 Συμπεράσματα

Στη παρούσα μελέτη:

1) Εκτιμήθηκε η σωληναριακή λειτουργία ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία (ΠΝΥ) με υπολογισμό της eGFR, της νεφρικής επαναρρόφησης της γλυκόζης, του ουδού επαναρρόφησης των φωσφορικών και των κλασματικών απεκκρίσεων του καλίου, του μαγνησίου, του φωσφόρου, του ασβεστίου και του νατρίου, καθώς και με έλεγχο της πρωτεϊνουρίας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις κλασσικές βιοχημικές μεθόδους δεν ανέδειξαν διαφορές μεταξύ των ατόμων με ΠΝΥ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου και επομένως δεν υπήρχαν ενδείξεις σωληναριακής διαταραχής στους υποουριχαιμικούς ασθενείς.

2) Έγινε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία μια μεταβολομική προσέγγιση του μεταβολικού προφίλ των ούρων ατόμων με ΠΝΥ με βάση τη φασματοσκοπία ^1H NMR. Το μεταβολικό προφίλ των ούρων των ατόμων με ΠΝΥ διέφερε σημαντικά από το μεταβολικό προφίλ των ούρων των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι στα ούρα των ατόμων με ΠΝΥ παρατηρείται αυξημένη απέκκριση αλανίνης, φαινυλαλανίνης, γλυκίνης, γλουταμίνης, οξικού οξέος και ενός μη ταυτοποιημένου μεταβολίτη, ενώ παρατηρείται μειωμένη απέκκριση TMAO, κρεατινίνης και ιππουρικού οξέος σε σύγκριση με τα ούρα των νορμοουριχαιμικών ατόμων. Έτσι σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφεται μια γενικευμένη διαταραχή του εγγύς σωληναρίου (ατελές σύνδρομο Fanconi?) στα άτομα με ΠΝΥ και όχι μια εκλεκτική διαταραχή που αφορά μόνο το ουρικό οξύ.

3) Η μεταβολομική ανάλυση των ούρων με βάση τη φασματοσκοπία NMR, ως μια γρήγορη και μη επεμβατική αναλυτική τεχνική, φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην έγκαιρη εκτίμηση της νεφρικής σωληναριακής βλάβης στα άτομα με ΠΝΥ.

4) Τα αποτελέσματα της μεταβονομικής μελέτης των ατόμων με ΠΝΥ μπορούν να συμβάλουν στην προσπάθεια που καταβάλλεται για την πλήρη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών του ανθρώπου, στα πλαίσια του Human Metabolome Project (<http://www.metabolomics.ca/index.htm>). Το ερευνητικό αυτό πρωτόκολλο ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2005 με σκοπό την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών (> 1μM) του ανθρωπίνου οργανισμού και έχει οδηγήσει στη δημιουργία της πληρέστερης αυτή τη στιγμή τράπεζας μεταβολομικών δεδομένων στον κόσμο.

5) Έγινε ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου SLC22A12 που είναι υπεύθυνες για την ΠΝΥ για πρώτη φορά σε Έλληνες με ΠΝΥ. Δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη υπεύθυνη για την πρωτοπαθή υποουριχαιμία στο γονίδιο SLC22A12 εκτός από ένα σιωπηλό πολυμορφισμό 1246T>C (His142His) στο εξόνιο 2 του γονιδίου SLC22A12. Επομένως, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η επίδραση του πολυμορφισμού που ανιχνεύθηκε στη δομή ή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης μεταφορέα του ουρικού οξέος URAT1, καθώς και η πιθανότητα ύπαρξης άλλου μεταφορέα του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο, ο οποίος δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί.

6) Μελετήθηκαν ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδη για την ανεύρεση πρώιμων ηλεκτρολυτικών διαταραχών. Δεν παρατηρήθηκε καμία ηλεκτρολυτική διαταραχή μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε γλυκοζουρία ή κυλινδρουρία σε κανένα ασθενή της μελέτης μας.

7) Η μαγνησιουρία και η ασβεστιουρία ήταν οι πιο σημαντικές διαταραχές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς της μελέτης μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Επομένως, οι αυξημένες κλασματικές απεκκρίσεις του μαγνησίου και του ασβεστίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες σωληναριακής διαταραχής που οφείλεται στη χορήγηση των αμινογλυκοσιδών.

8) Χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία ^1H NMR για την ανεύρεση πρώιμων μεταβολών της σύστασης των ούρων σε ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδες. Διαπιστώθηκε μείωση της απέκκρισης του ιππουρικού οξέος, καθώς και αύξηση της απέκκρισης της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη διαταραχής της λειτουργίας του ΕΕΣ σε ασθενείς που έλαβαν αμινογλυκοσίδη από την 5^η μόλις ημέρα της θεραπείας. Επομένως, η μείωση της απέκκρισης του ιππουρικού οξέος, καθώς και η αύξηση της απέκκρισης της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες.

9) Οι μεταβολές στην απέκκριση του ιππουρικού οξέος, της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδη δεν φαίνεται να σχετίζονται με την μαγνησιουρία και ασβεστιουρία. Συνεπώς, η εγγύς σωληναριακή βλάβη φαίνεται πως οφείλεται στην τοξική βλάβη των αμινογλυκοσίδων στα επιθηλιακά κύτταρα του ΕΕΣ, ενώ η άπω σωληναριακή βλάβη στην ενεργοποίηση του υποδοχέα που είναι ευαίσθητος στο $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ και βρίσκεται στην πλαγιοβασική μεμβράνη του σωληναριακού κυττάρου.

10) Η χρησιμοποίηση της φασματοσκοπίας ^1H NMR των ούρων φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην έγκαιρη αναγνώριση της σωληναριακής διαταραχής που προκαλείται από νεφροτοξικά φάρμακα.

2.7 Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

1. η εκτίμηση της σωληναριακής λειτουργίας ατόμων με πρωτοπαθή νεφρική υποουριχαιμία (ΠΝΥ). Για αυτό το σκοπό έγινε πλήρης βιοχημικός έλεγχος του ορού και των ούρων ατόμων με ΠΝΥ. Επίσης, καταγράφηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR το μεταβολικό προφίλ των ούρων ατόμων με ΠΝΥ, επεξεργάστηκε με τεχνικές αναγνώρισης προτύπων και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου)
2. η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου SLC22A12 που είναι υπεύθυνες για τα χαμηλά επίπεδα του ουρικού οξέος σε Έλληνες με ΠΝΥ
3. η εκτίμηση της χρησιμότητας της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για την ανεύρεση πρώιμων μεταβολών της σύστασης των ούρων σε ασθενείς που λαμβάνουν αμινογλυκοσίδες, καθώς και την ανίχνευση συνύπαρξης άλλων ηλεκτρολυτικών διαταραχών σε αυτούς τους ασθενείς.

Η ΠΝΥ είναι μια διαταραχή της ομοιόστασης του ουρικού οξέος, η οποία είναι αποτέλεσμα διαταραχής της σωληναριακής μεταφοράς του ουρικού οξέος και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων (κυρίως του γονιδίου SLC22A12) που κωδικοποιούν μεταφορείς του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο. Είναι η πρώτη φορά που εκτιμήθηκε η σωληναριακή λειτουργία ατόμων με ΠΝΥ με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού των ούρων. Στην μελέτη συμμετείχαν τριάντα έξι άτομα με ΠΝΥ, δηλαδή επίπεδα ουρικού οξέος κάτω από 2,5 mg/dL και FEUA μεγαλύτερη από 10%, που δεν είχαν συγγενική σχέση μεταξύ τους. Αποκλείστηκαν από τη μελέτη άτομα που είχαν νοσήματα ή έπαιρναν φάρμακα που επηρεάζουν την ομοιοστασία του ουρικού οξέος. Στην ομάδα ελέγχου συμμετείχαν τριάντα εννιά υγιή άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου με επίπεδα ουρικού οξέος πάνω από 4.0 mg/dL και FEUA λιγότερο από 10%. Τα άτομα με ΠΝΥ είχαν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Οι κλασματικές απεκκρίσεις των

ηλεκτρολυτών των ατόμων με ΠΝΥ δεν είχαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου

Εφαρμόσθηκε η τεχνική της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών στα δεδομένα από τη φασματοσκοπία ^1H NMR των ούρων των ατόμων της μελέτης και μέσω των στατιστικών μοντέλων που προέκυψαν έγινε πλήρης διαχωρισμός των υπό μελέτη ομάδων. Τα άτομα με ΠΝΥ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα φαινυλαλανίνης, αλανίνης, γλυκίνης, γλουταμίνης, οξικού οξέος, καθώς και ενός μη ταυτοποιήσιμου μεταβολίτη (στα 3.3ppm) και χαμηλότερα επίπεδα κρεατινίνης, τριμεθυλαμινοξειδίου και ιππουρικού οξέος στα ούρα σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας έλεγχου. Επομένως, η ΠΝΥ παρά το γεγονός ότι θεωρείται μια εκλεκτική διαταραχή του νεφρικού σωληναρίου που αφορά το ουρικό οξύ, συχνά συνοδεύεται από αυξημένη απέκκριση και άλλων μεταβολιτών εκτός του ουρικού οξέος, γεγονός που υποδηλώνει μια πιο γενικευμένη διαταραχή του εγγύς σωληναρίου (ατελές σύνδρομο Fanconi).

Για να διαλευκανθεί αν γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου SLC22A12 είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της ΠΝΥ σε Έλληνες, έγινε ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου SLC22A12 σε 9 άτομα της μελέτης. Δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη στα άτομα με ΠΝΥ εκτός από ένα σιωπηλό πολυμορφισμό 1246T>C (His142His) στο εξόνιο 2 του γονιδίου SLC22A12. Επομένως, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η επίδραση του πολυμορφισμού που ανιχνεύθηκε στη δομή ή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης URAT1, καθώς και η πιθανότητα ύπαρξης άλλου μεταφορέα του ουρικού οξέος στο νεφρικό σωληνάριο των ατόμων με ΠΝΥ.

Η εμφάνιση νεφροτοξικότητας εξαιτίας της λήψης αμινογλυκοσιδών αποτελεί την κύρια και συχνότερη ανεπιθύμητη ενέργεια τους στην κλινική πράξη. Η τοξικότητα είναι πιθανά αποτέλεσμα της συσσώρευσης και κατακράτησης των αμινογλυκοσιδών στα σωληναριακά κύτταρα του ΕΕΣ. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της νεφροτοξικότητας από τις αμινογλυκοσίδες δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Κλινικά, εκδηλώνεται ως μη-ολιγουρική οξεία σωληναριακή νέκρωση. Η αύξηση της ουρίας και της κρεατινίνης παρατηρείται μετά από 5 έως 7 ημέρες θεραπείας. Η βλάβη που προκαλείται από τις αμινογλυκοσίδες είναι σχεδόν πάντα αναστρέψιμη με τη διακοπή της

χορήγησης του φαρμάκου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περιστατικά μόνιμης νεφρικής βλάβης μετά από χορήγηση αμινογλυκοσιδών. Έτσι, έχει ιδιαίτερη σημασία η έγκαιρη αναγνώριση της σωληναριακής διαταραχής και η άμεση διακοπή του φαρμάκου.

Με τη μελέτη αυτή εκτιμήθηκε η χρησιμότητα της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού των ούρων για την ανεύρεση πρώιμων δεικτών στα ούρα ασθενών που λαμβάνουν αμινογλυκοσίδες για 5 ημέρες. Μελετήθηκαν 19 ενήλικα άτομα που εισήχθησαν στην παθολογική κλινική του Π.Π.Ν.Ιωαννίνων και έλαβαν αμινογλυκοσίδα. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία ή ασθενείς που ελάμβαναν άλλα νεφροτοξικά φάρμακα.

Δεν παρατηρήθηκαν ηλεκτρολυτικές διαταραχές ή έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, όπως προκύπτει από τις τιμές της eGFR μετά από 5 μέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδα. Ωστόσο, την 5^η μέρα θεραπείας με αμινογλυκοσίδα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των κλασματικών απεκκρίσεων του μαγνησίου και του ασβεστίου σε σύγκριση με τις κλασματικές απεκκρίσεις πριν την έναρξη της θεραπείας.

Η ανάλυση των ούρων με φασματοσκοπία ^1H NMR έδειξε μείωση της απέκκρισης του ιππουρικού οξέος, ενώ αυξήθηκαν οι απεκκρίσεις της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα των ασθενών μετά από 5 ημέρες θεραπείας με αμινογλυκοσίδα. Επομένως, η μείωση της απέκκρισης του ιππουρικού οξέος, καθώς και η αύξηση της απέκκρισης της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες νεφροτοξικότητας από αμινογλυκοσίδες.

2.8 Summary

The aim of this study was:

1. The evaluation of the tubular function in individuals with primary renal hypouricemia based on the serum and urine biochemical analysis and the metabonomic profile of urine analyzed by ^1H NMR spectroscopy.
2. The mutational analysis of SLC22A12 gene in subjects with primary renal hypouricemia originated from Greece.
3. The evaluation of the utility of ^1H NMR spectroscopy in the detection of early urine alterations in patients treated with aminoglycosides as well as the detection of any electrolyte abnormalities in these patients.

Primary renal hypouricemia (PRH) refers to a rare condition of increased renal urate clearance, caused by an isolated inborn error of membrane transport of urate in the renal proximal tubule. Defects in SLC22A12 gene, which encodes the renal urate transporter URAT1, have been reported to be related with the disease pathogenesis. This is the first study that assessed tubular function in primary renal hypouricemia using NMR-based metabonomic urine analysis. The study groups consisted of 36 unrelated asymptomatic subjects with primary renal hypouricemia, defined as serum uric acid levels (sUA) <2.5 mg/dL and fractional excretion of uric acid (FEUA) $>10\%$, after exclusion of diseases and drugs that may affect urate homeostasis, and 39 sex and age-matched healthy individuals with normal sUA levels (>4.0 mg/dL) and FEUA $<10\%$. Individuals with primary hypouricemia presented similar biochemical profiles to the controls without significant differences with regard to the FE of electrolytes and renal threshold for phosphate excretion. Individuals with primary hypouricemia were differentiated from healthy individuals in the Orthogonal Signal Correction Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (OSC/PLS-DA) models of the NMR data with a statistically significant separation. The components that contributed to this separation were the lower levels of hippurate, creatinine and trimethylamineoxide, and the higher levels of phenylalanine, alanine, glycine, glutamate, acetate and of an unidentified metabolite (3.3 ppm) observed in hypouricemic subjects compared with the controls. These data suggest that a

more generalized proximal tubular disorder that mimicking a partial Fanconi syndrome may underlie a so far considered selective tubular disorder.

To elucidate if SLC22A12 gene mutations are responsible for the low serum uric acid levels in Greek individuals, we performed a mutation analysis in Greek subjects with primary renal hypouricemia. No mutation was found but only a silent nucleotide polymorphism (SNP) 1246T>C (His142His) in exon 2 of the SLC22A12 gene. The absence of SLC22A12 gene mutations in Greek subjects with primary renal hypouricemia may indicate the existence of a novel urate transporter or the possibility that, a genetic mutation that does not cause a change in the amino acid sequence of the resulting protein can still alter the protein's function.

Acute kidney injury due to acute tubular necrosis is a relatively common complication of aminoglycoside therapy, affecting 10 to 20 percent of patients. Intracellular accumulation of the drug in the proximal tubules probably leads to cell necrosis, although the specific cellular mechanisms of aminoglycoside-induced nephrotoxicity have not been completely defined. Clinically, aminoglycoside related renal toxicity presents primarily as nonoliguric acute renal failure. Serum creatinine and blood urea nitrogen characteristically increase 5 to 7 days after initiation of aminoglycoside therapy. Although the vast majority of patients do recover, in some patients with several risk factors, recovery may be incomplete. In addition, various tubular dysfunction and electrolyte abnormalities may also occur. Thus, aminoglycoside-induced nephrotoxicity is a major concern and early diagnosis is critical in clinical practice.

This study was designed to evaluate the utility of ¹H NMR spectroscopy approach and find out new urinary biomarkers useful for the early detection of nephrotoxicity following treatment of patients with aminoglycoside for 5 days. Nineteen patients hospitalized in our clinic and receiving an aminoglycoside were included in the study. Patients with impaired renal function or patients receiving other nephrotoxic drugs were excluded from the study. Urine and

blood samples were collected before antibiotic administration and after 5 days of treatment.

Biochemical blood testing did not reveal any significant differences with regard to eGFR and serum electrolytes after 5 days of aminoglycoside treatment. However, fractional excretion of magnesium and calcium were significantly increased after 5 days of aminoglycoside treatment. ^1H NMR spectroscopic data showed increased amounts of alanine and lactic acid and decreased amounts of hippurate. Thus, these metabolites could be potential biomarkers for the early detection of aminoglycoside-induced nephrotoxicity.

2.9 Βιβλιογραφία

1. Yoshida T: Substrate metabolism and renal function. *Pediatr Clin North Am* 1976;23:627-637.
2. Yamada E: [Fine structure of the kidney]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1973;15:393-400.
3. Grondona F: [Structure and function of the kidney according to William Bowman]. *Clio Med* 1971;6:195-204.
4. Rose B, Post T, eds. *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*, 5th Edition; 2001.
5. Cooper K, Jakobsson E, Wolynes P: The theory of ion transport through membrane channels. *Prog Biophys Mol Biol* 1985;46:51-96.
6. Alberts AS: Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* 2001;276:2824-2830.
7. Lodish HF, Rodriguez RK, Klionsky DJ: Points of view: lectures: can't learn with them, can't learn without them. *Cell Biol Educ* 2004;3:202-211.
8. Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP: Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:625-630.
9. Saier MH, Jr.: Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol* 2000;175:165-180.
10. Kaback HR, Sahin-Toth M, Weinglass AB: The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:610-620.
11. Wilcox WR, Khalaf A, Weinberger A, Kippen I, Klinenberg JR: Solubility of uric acid and monosodium urate. *Med Biol Eng* 1972;10:522-531.

12. Kippen I, Klinenberg JR, Weinberger A, Wilcox WR: Factors affecting urate solubility in vitro. *Ann Rheum Dis* 1974;33:313-317.
13. Klinenberg JR, Kippen I: The binding of urate to plasma proteins determined by means of equilibrium dialysis. *J Lab Clin Med* 1970;75:503-510.
14. Fanelli GM, Jr., Bohn DL, Reilly SS: Renal urate transport in the chimpanzee. *Am J Physiol* 1971;220:613-620.
15. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT: Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 1992;34:78-84.
16. Jones ME: Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 1980;49:253-279.
17. Mateos EA, Puig JG: Purine metabolism in Lesch-Nyhan syndrome versus Kelley-Seegmiller syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:138-142.
18. Fox RM, O'Sullivan WJ: Purine and pyrimidine biosynthesis. Allopurinol and inborn errors. *Minn Med* 1971;54:397-401.
19. Roch-Ramel F: Renal excretion of uric acid in mammals. *Clin Nephrol* 1979;12:1-6.
20. Seegmiller JE, Laster L, Howell RR: Biochemistry of uric acid and its relation to gout. *N Engl J Med* 1963;268:821-827 concl.
21. Sorensen LB: Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum* 1965;8:694-706.
22. Dykman D, Simon EE: Hyperuricemia and uric acid nephropathy. *Arch Intern Med* 1987;147:1341-1345.

23. Mikkelsen WM, Dodge HJ, Valkenburg H: The Distribution of Serum Uric Acid Values in a Population Unselected as to Gout or Hyperuricemia: Tecumseh, Michigan 1959-1960. *Am J Med* 1965;39:242-251.
24. Harkness RA, Nicol AD: Plasma uric acid levels in children. *Arch Dis Child* 1969;44:773-778.
25. Fanelli GM, Jr.: Urate excretion. *Annu Rev Med* 1977;28:349-354.
26. Roch-Ramel F, Weiner IM: Excretion of urate by the kidneys of Cebus monkeys: a micropuncture study. *Am J Physiol* 1973;224:1369-1374.
27. De Rougemont D, Henchoz M, Roch-Ramel F: Renal urate excretion at various plasma concentrations in the rat: a free-flow micropuncture study. *Am J Physiol* 1976;231:387-392.
28. Weinman EJ, Steplock D, Sansom SC, Knight TF, Senekjian HO: Use of high-performance liquid chromatography for determination of urate concentrations in nonoliter quantities of fluid. *Kidney Int* 1981;19:83-85.
29. Praetorius E, Kirk JE: Hypouricemia: with evidence for tubular elimination of uric acid. *J Lab Clin Med* 1950;35:865-868.
30. Gutman AB, Yu TF, Berger L: Tubular secretion of urate in man. *J Clin Invest* 1959;38:1778-1781.
31. Uchida S, Matsuda O, Yokota T, Takemura T, Ando R, Kanemitsu H, Hamaguchi H, Miyake S, Marumo F: Adult Fanconi syndrome secondary to kappa-light chain myeloma: improvement of tubular functions after treatment for myeloma. *Nephron* 1990;55:332-335.
32. Podevin R, Ardaillou R, Paillard F, Fontanelle J, Richet G: [Study in man of the kinetics of the appearance of uric acid 2-14C in the urine]. *Nephron* 1968;5:134-140.

33. Gutman AB, Yu TF: A three-component system for regulation of renal excretion of uric acid in man. *Trans Assoc Am Physicians* 1961;74:353-365.
34. Diamond HS, Meisel AD: Postsecretory reabsorption of urate in man. *Arthritis Rheum* 1975;18:805-809.
35. Rieselbach RE, Steele TH: Influence of the kidney upon urate homeostasis in health and disease. *Am J Med* 1974;56:665-675.
36. Levinson DJ, Decker DE, Sorensen LB: Renal handling of uric acid in man. *Ann Clin Lab Sci* 1982;12:73-77.
37. Steele TH: Urate secretion in man: the pyrazinamide suppression test. *Ann Intern Med* 1973;79:734-737.
38. Roch-Ramel F, Guisan B: Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci* 1999;14:80-84.
39. Roch-Ramel F, Wong NL, Dirks JH: Renal excretion of urate in mongrel and Dalmatian dogs: a micropuncture study. *Am J Physiol* 1976;231:326-331.
40. Abramson RG, Levitt MF, Maesaka JK, Katz JH: A simple radioisotopic technique for the study of urate transport in the rat kidney. *J Appl Physiol* 1974;36:500-505.
41. Grantham JJ, Kennedy J, Cowley B: Tubule urate and PAH transport: sensitivity and specificity of serum protein inhibition. *Am J Physiol* 1987;252:F683-690.
42. Weinman EJ, Steplock D, Suki WN, Eknayan G: Urate reabsorption in proximal convoluted tubule of the rat kidney. *Am J Physiol* 1976;231:509-515.
43. Emmerson BT: Effect of drugs on the renal handling of urate. *Prog Biochem Pharmacol* 1974;9:142-152.

44. Leal-Pinto E, Tao W, Rappaport J, Richardson M, Knorr BA, Abramson RG: Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. *J Biol Chem* 1997;272:617-625.
45. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417:447-452.
46. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:6858-6862.
47. Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P: Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986;235:747-754.
48. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, Harrison DG, Fukai T: Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1402-1408.
49. Frei B, England L, Ames BN: Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6377-6381.
50. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P: Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med* 1985;1:117-124.
51. Hediger MA: Kidney function: gateway to a long life? *Nature* 2002;417:393, 395.
52. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, Bangsbo J: Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998;274:E600-606.

53. Layton ME, Wood JG, Yan ZY, Forster J: Ischemia/reperfusion alters uric acid and ascorbic acid levels in liver. *J Surg Res* 1996;64:1-5.
54. Moison RM, de Beaufort AJ, Haasnoot AA, Dubbelman TM, van Zoeren-Grobbe D, Berger HM: Uric acid and ascorbic acid redox ratios in plasma and tracheal aspirate of preterm babies with acute and chronic lung disease. *Free Radic Biol Med* 1997;23:226-234.
55. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR: Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:365-371.
56. Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR: Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:425-430.
57. Steele TH, Rieselbach RE: Renal urate excretion in normal man. *Nephron* 1975;14:21-32.
58. Hisatome I, Ogino K, Kotake H, Ishiko R, Saito M, Hasegawa J, Mashiba H, Nakamoto S: Cause of persistent hypouricemia in outpatients. *Nephron* 1989;51:13-16.
59. Bairaktari ET, Kakafika AI, Pritsivelis N, Hatzidimou KG, Tsianos EV, Seferiadis KI, Elisaf MS: Hypouricemia in individuals admitted to an inpatient hospital-based facility. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1225-1232.
60. Sperling O: Renal hypouricemia: classification, tubular defect and clinical consequences. *Contrib Nephrol* 1992;100:1-14.
61. Capasso G, Jaeger P, Robertson WG, Unwin RJ: Uric acid and the kidney: urate transport, stone disease and progressive renal failure. *Curr Pharm Des* 2005;11:4153-4159.

62. Cetin T, Oktenli C, Ozgurtas T, Yenicesu M, Sanisoglu SY, Oguz Y, Yildiz O, Kurt I, Musabak U, Bulucu F, Kocar IH: Renal tubular dysfunction in beta-thalassemia minor. *Am J Kidney Dis* 2003;42:1164-1168.
63. Munoz Sanz A, Barbado FJ, Pena JM, Redondo C, Arnalich F, Garcia Puig J, Vazquez JJ: [Paraneoplastic hypouricemia in Hodgkin's lymphoma secondary to a renal tubular reabsorption defect of uric acid (author's transl)]. *Med Clin (Barc)* 1981;76:307-310.
64. Wurzner G, Gerster JC, Chiolero A, Maillard M, Fallab-Stubi CL, Brunner HR, Burnier M: Comparative effects of losartan and irbesartan on serum uric acid in hypertensive patients with hyperuricaemia and gout. *J Hypertens* 2001;19:1855-1860.
65. Elisaf M, Tsimichodimos V, Bairaktari E, Siamopoulos KC: Effect of micronized fenofibrate and losartan combination on uric acid metabolism in hypertensive patients with hyperuricemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:60-63.
66. Liberopoulos E, Elisaf MS: Co-trimoxazole-induced hypouricemia. *Clin Nephrol* 1998;49:202.
67. Cheong HI, Kang JH, Lee JH, Ha IS, Kim S, Komoda F, Sekine T, Igarashi T, Choi Y: Mutational analysis of idiopathic renal hypouricemia in Korea. *Pediatr Nephrol* 2005;20:886-890.
68. Komatsuda A, Iwamoto K, Wakui H, Sawada K, Yamaguchi A: Analysis of mutations in the urate transporter 1 (URAT1) gene of Japanese patients with hypouricemia in northern Japan and review of the literature. *Ren Fail* 2006;28:223-227.
69. Inazu T: A case of renal hypouricemia caused by urate transporter 1 gene mutations. *Clin Nephrol* 2006;65:370-373.

70. Sperling O: Hereditary renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* 2006;89:14-18.
71. Takahashi T, Tsuchida S, Oyamada T, Ohno T, Miyashita M, Saito S, Komatsu K, Takashina K, Takada G: Recurrent URAT1 gene mutations and prevalence of renal hypouricemia in Japanese. *Pediatr Nephrol* 2005;20:576-578.
72. Wakida N, Tuyen DG, Adachi M, Miyoshi T, Nonoguchi H, Oka T, Ueda O, Tazawa M, Kurihara S, Yoneta Y, Shimada H, Oda T, Kikuchi Y, Matsuo H, Hosoyamada M, Endou H, Otagiri M, Tomita K, Kitamura K: Mutations in human urate transporter 1 gene in presecretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2169-2174.
73. Iwai N, Mino Y, Hosoyamada M, Tago N, Kokubo Y, Endou H: A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int* 2004;66:935-944.
74. Komoda F, Sekine T, Inatomi J, Enomoto A, Endou H, Ota T, Matsuyama T, Ogata T, Ikeda M, Awazu M, Muroya K, Kamimaki I, Igarashi T: The W258X mutation in SLC22A12 is the predominant cause of Japanese renal hypouricemia. *Pediatr Nephrol* 2004;19:728-733.
75. Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H, Hosoya T: Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:164-173.
76. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996;334:1448-1460.
77. Whelton A: The aminoglycosides. *Clin Orthop Relat Res* 1984:66-74.
78. Perazella MA: Drug-induced renal failure: update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity. *Am J Med Sci* 2003;325:349-362.

79. Ojogwu LI: Drug induced acute renal failure--a study of 35 cases. *West Afr J Med* 1992;11:185-189.
80. Koselj M, Kveder R, Bren AF, Rott T: Acute renal failure in patients with drug-induced acute interstitial nephritis. *Ren Fail* 1993;15:69-72.
81. Rodman DP, Maxwell AJ, McKnight JT: Extended dosage intervals for aminoglycosides. *Am J Hosp Pharm* 1994;51:2016-2021.
82. Mathews A, Bailie GR: Clinical pharmacokinetics, toxicity and cost effectiveness analysis of aminoglycosides and aminoglycoside dosing services. *J Clin Pharm Ther* 1987;12:273-291.
83. Edson RS, Terrell CL: The aminoglycosides: streptomycin, kanamycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, and sisomicin. *Mayo Clin Proc* 1987;62:916-920.
84. Ali MZ, Goetz MB: A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of single daily dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 1997;24:796-809.
85. Barza M, Ioannidis JP, Cappelleri JC, Lau J: Single or multiple daily doses of aminoglycosides: a meta-analysis. *Bmj* 1996;312:338-345.
86. Bitner-Glindzicz M, Rahman S: Ototoxicity caused by aminoglycosides. *Bmj* 2007;335:784-785.
87. Duff P: The aminoglycosides. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1992;19:511-517.
88. Raveh D, Kopyt M, Hite Y, Rudensky B, Sonnenblick M, Yinnon AM: Risk factors for nephrotoxicity in elderly patients receiving once-daily aminoglycosides. *Qjm* 2002;95:291-297.

89. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM: Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1003-1012.
90. Silverblatt F: Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Rev Infect Dis* 1982;4 Suppl:S360-365.
91. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM: Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2383-2392.
92. Mohammadi-Karakani A, Asgharzadeh-Haghighi S, Ghazi-Khansari M, Seyed-Ebrahimi A, Ghasemi A, Jabari E: Enzymuria determination in children treated with aminoglycosides drugs. *Hum Exp Toxicol* 2008;27:879-882.
93. Choudhury D, Ahmed Z: Drug-induced nephrotoxicity. *Med Clin North Am* 1997;81:705-717.
94. Rabi II, Zacharias JR, Millman Sa, Kusch P: A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys Rev* 1938;53 318-318.
95. Bloch F, Hansen WW, Packard ME: *Phys Rev* 1946;69:37.
96. Purcell EM, Torrey HC, V. PR: *Phys Rev* 1946;69:127.
97. Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. The Second Dimension in Solving Problems with NMR Spectroscopy. 1st Edition ed. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1996.
98. Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou Va, Barbarossou K: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and their Applications to Chemistry, Biology and Medicine. *Chem Educ Res Pract Eur* 2002;3:229-252.

99. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S: Multi- and Megavariate Data Analysis, Principles and Applications. *Umetrics AB: Umea, Sweden* 2001.
100. Wold S, Esbensen K, Geladi P: Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Sys* 1987;2:37-52.
101. Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK: Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Mol Pharmacol* 1991;39:629-642.
102. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T: Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 2007;6:469-479.
103. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ: Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 2002;8:1439-1444.
104. Wold S, Antti H, Lindgren Fa, J. Ö: Orthogonal signal correction of near-infrared spectra *Chemom Intell Lab Sys* 1998;44:175-185.
105. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK: Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 2004;9:1-31.
106. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK: Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:189-199.
107. Nicholson JK, Timbrell JA, Sadler PJ: Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats. *Mol Pharmacol* 1985;27:644-651.

108. Foxall PJ, Singer JM, Hartley JM, Neild GH, Lapsley M, Nicholson JK, Souhami RL: Urinary proton magnetic resonance studies of early ifosfamide-induced nephrotoxicity and encephalopathy. *Clin Cancer Res* 1997;3:1507-1518.
109. Gartland KP, Bonner FW, Nicholson JK: Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. *Mol Pharmacol* 1989;35:242-250.
110. Gartland KP, Eason CT, Wade KE, Bonner FW, Nicholson JK: Proton NMR spectroscopy of bile for monitoring the excretion of endogenous and xenobiotic metabolites: application to para-aminophenol. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7:699-707.
111. Holmes E, Bonner FW, Gartland KP, Nicholson JK: Proton NMR monitoring of the onset and recovery of experimental renal damage. *J Pharm Biomed Anal* 1990;8:959-962.
112. Murgatroyd LB, Pickford RJ, Smith IK, Wilson ID, Middleton BJ: ¹H-NMR spectroscopy as a means of monitoring nephrotoxicity as exemplified by studies with cephaloridine. *Hum Exp Toxicol* 1992;11:35-41.
113. Feng J, Li X, Pei F, Chen X, Li S, Nie Y: ¹H NMR analysis for metabolites in serum and urine from rats administrated chronically with La(NO₃)₃. *Anal Biochem* 2002;301:1-7.
114. Holmes E, Bonner FW, Nicholson JK: ¹H NMR spectroscopic and histopathological studies on propyleneimine-induced renal papillary necrosis in the rat and the multimammate desert mouse (*Mastomys natalensis*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997;116:125-134.
115. Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Nicholson JK, Lindon JC: 750 MHz ¹H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-

hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. *J Pharm Biomed Anal* 1997;15:1647-1659.

116. Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Ramos S, Spraul M, Neidig P, Connor SC, Connelly J, Damment SJ, Haselden J, Nicholson JK: Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biomed* 1998;11:235-244.

117. Harrison MP, Jones DV, Pickford RJ, Wilson ID: beta-Hydroxybutyrate: a urinary marker of imipenem induced nephrotoxicity in the cynomolgus monkey detected by high field ¹H NMR spectroscopy. *Biochem Pharmacol* 1991;41:2045-2049.

118. Anthony ML, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK: Pattern recognition classification of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine. *Mol Pharmacol* 1994;46:199-211.

119. Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK: A pattern recognition approach to the comparison of PMR and clinical chemical data for classification of nephrotoxicity. *J Pharm Biomed Anal* 1990;8:963-968.

120. Gartland KP, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC: Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed* 1990;3:166-172.

121. Holmes E, Bonner FW, Sweatman BC, Lindon JC, Beddell CR, Rahr E, Nicholson JK: Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol* 1992;42:922-930.

122. Spraul M, Hofmann M, Lindon JC, Farrant RD, Seddon MJ, Nicholson JK, Wilson ID: Evaluation of liquid chromatography coupled with high-field ¹H NMR spectroscopy for drug metabolite detection and characterization: the identification of paracetamol metabolites in urine and bile. *NMR Biomed* 1994;7:295-303.
123. Ogbron MR, Sareen S, Prychitko J, Buist R, Peeling J: Altered organic anion and osmolyte content and excretion in rat polycystic kidney disease: an NMR study. *Am J Physiol* 1997;272:F63-69.
124. Hauet T, Mothes D, Goujon JM, Caritez JC, Carretier M, Eugene M: Evaluation of injury preservation in pig kidney cold storage by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *J Urol* 1997;157:1155-1160.
125. Hauet T, Baumert H, Amor IB, Gibelin H, Tallineau C, Eugene M, Tillement JP, Carretier M: Pharmacological limitation of damage to renal medulla after cold storage and transplantation by trimetazidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:254-260.
126. Hauet T, Baumert H, Gibelin H, Godart C, Carretier M, Eugene M: Citrate, acetate and renal medullary osmolyte excretion in urine as predictor of renal changes after cold ischaemia and transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1093-1098.
127. Hauet T, Bauza G, Mothes D, Le Moyec L, Goujon JM, Dore B, Caritez JC, Carretier M, Eugene M, Tillement JP: Beneficial effect on rat kidney preservation of the antiischemic agent trimetazidine during cold storage and reperfusion: assessment by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Transplant Proc* 1997;29:2343-2344.
128. Baumert H, Richer JP, Gibelin H, Ben Amor I, Caritez JC, Germonville T, Carretier M, Eugene M, Hauet T: Early evaluation of renal medulla injury by (¹H) nuclear magnetic resonance spectroscopy after preservation and transplantation. *Transplant Proc* 2000;32:498-499.

129. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E: Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:153-161.
130. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E: 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-1189.
131. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK: Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006;440:1073-1077.
132. Komoroski EM, Komoroski RA, Valentine JL, Pearce JM, Kearns GL: The use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the detection of drug intoxication. *J Anal Toxicol* 2000;24:180-187.
133. Foxall PJ, Bending MR, Gartland KP, Nicholson JK: Acute renal failure following accidental cutaneous absorption of phenol: application of NMR urinalysis to monitor the disease process. *Hum Toxicol* 1989;8:491-496.
134. Bairaktari E, Katopodis K, Siamopoulos KC, Tsolas O: Paraquat-induced renal injury studied by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Clin Chem* 1998;44:1256-1261.
135. Janus T, Borowiak KS, Pabisiak K, Machoy-Mokrzynska A, Swiniarski A, Rozwadowski Z: ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation of urine for diagnostic and clinical assessment of methanol intoxication. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:257-260.
136. Shockcor JP, Unger SE, Wilson ID, Foxall PJ, Nicholson JK, Lindon JC: Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with

application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal Chem* 1996;68:4431-4435.

137. Tsimihodimos V, Psychogios N, Kakaidi V, Bairaktari E, Elisaf M: Salicylate-induced proximal tubular dysfunction. *Am J Kidney Dis* 2007;50:463-467.

138. Bairaktari E, Liamis G, Tsolas O, Elisaf M: Partially reversible renal tubular damage in patients with obstructive jaundice. *Hepatology* 2001;33:1365-1369.

139. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH: Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta* 1991;1096:101-107.

140. Holmes E, Foxall PJ, Nicholson JK: Proton NMR analysis of plasma from renal failure patients: evaluation of sample preparation and spectral-editing methods. *J Pharm Biomed Anal* 1990;8:955-958.

141. Foxall PJ, Mellotte GJ, Bending MR, Lindon JC, Nicholson JK: NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kidney Int* 1993;43:234-245.

142. Le Moyec L, Pruna A, Eugene M, Bedrossian J, Idatte JM, Huneau JF, Tome D: Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine and plasma in renal transplantation follow-up. *Nephron* 1993;65:433-439.

143. Smith IC, Baert R: Medical diagnosis by high resolution NMR of human specimens. *IUBMB Life* 2003;55:273-277.

144. Lundina TA, Knubovets TL, Sedov KR, Markova SA, Sibeldin LA: Variability of kidney tubular interstitial distortions in glomerulonephritis as measured by ¹H-NMR urinalysis. *Clin Chim Acta* 1993;214:165-173.

145. Knubovets TL, Lundina TA, Sibeldina LA, Sedov KR: ¹H NMR urinalysis in glomerulonephritis: a new prognostic criterion. *Magn Reson Imaging* 1992;10:127-134.
146. Foxall PJ, Bewley S, Neild GH, Rodeck CH, Nicholson JK: Analysis of fetal and neonatal urine using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F153-157.
147. Eugene M, Muller F, Dommergues M, Le Moyec L, Dumez Y: Evaluation of postnatal renal function in fetuses with bilateral obstructive uropathies by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:595-602.
148. Zuppi C, Messana I, Tapanainen P, Knip M, Vincenzoni F, Giardina B, Nuutinen M: Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine from children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin Chem* 2002;48:660-662.
149. Messana I, Forni F, Ferrari F, Rossi C, Giardina B, Zuppi C: Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clin Chem* 1998;44:1529-1534.
150. Holmes E, Foxall PJ, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, Sweatman BC, Rahr E, Lindon JC, Spraul M, et al.: Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ¹H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal Biochem* 1994;220:284-296.
151. t Hart BA, Vogels JT, Spijksma G, Brok HP, Polman C, van der Greef J: ¹H-NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease. *J Neurol Sci* 2003;212:21-30.

152. Makinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, Groop PH, Ala-Korpela M: Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabonomics of serum. *Magma* 2006;19:281-296.
153. Psihogios NG, Kalaitzidis RG, Dimou S, Seferiadis KI, Siamopoulos KC, Bairaktari ET: Evaluation of tubulointerstitial lesions' severity in patients with glomerulonephritides: an NMR-based metabonomic study. *J Proteome Res* 2007;6:3760-3770.
154. Wishart DS: Metabolomics in monitoring kidney transplants. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:637-642.
155. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK: So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem* 2003;75:384A-391A.
156. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK: Metabonomics in pharmaceutical R&D. *Febs J* 2007;274:1140-1151.
157. Nicholson JK, Timbrell JA, Bales JR, Sadler PJ: A high resolution proton nuclear magnetic resonance approach to the study of hepatocyte and drug metabolism. Application to acetaminophen. *Mol Pharmacol* 1985;27:634-643.
158. Lindon JC: NMR spectroscopy: Analytical applications from chemistry to the clinic. *J Pharm Biomed Anal* 1986;4:137-145.
159. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB: Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004;22:245-252.
160. Oliver S: Guilt-by-association goes global. *Nature* 2000;403:601-603.
161. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T: Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol* 1998;180:5109-5116.

162. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L: HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D521-526.

163. Wishart D: NMR spectroscopy and protein structure determination: applications to drug discovery and development. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;6:105-120.

164. Wishart DS: Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am J Transplant* 2005;5:2814-2820.

165. Henry RJ, Segalove M, Sobel C: Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:748-751.

166. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470.

167. Elisaf M, Siamopoulos KC: Fractional excretion of potassium in normal subjects and in patients with hypokalaemia. *Postgrad Med J* 1995;71:211-212.

168. Elisaf M, Panteli K, Theodorou J, Siamopoulos KC: Fractional excretion of magnesium in normal subjects and in patients with hypomagnesemia. *Magnes Res* 1997;10:315-320.

169. Rossi R, Danzebrink S, Linnenburger K, Hillebrand D, Gruneberg M, Sablitzky V, Deufel T, Ullrich K, Harms E: Assessment of tubular reabsorption

of sodium, glucose, phosphate and amino acids based on spot urine samples. *Acta Paediatr* 1994;83:1282-1286.

170. Walton RJ, Bijvoet OL: Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration. *Lancet* 1975;2:309-310.

171. Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stampler J, Elliott P, Chan Q, Holmes E: Assessment of analytical reproducibility of ^1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* 2006;78:2199-2208.

172. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Bingham S, Davis A, Holmes E, Nicholson JK, Cassidy A: Biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem* 2005;16:236-244.

173. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, Lockton A: Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2004;36:841-849.

174. Haseler LJ, Galloway GJ, Field J, Irving MG, Doddrell DM: Water-suppressed volume-selected ^1H NMR spectroscopy in vivo: application to study tumor metabolism. *Magn Reson Med* 1987;5:508-512.

175. Bales JR, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ: Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem* 1984;30:426-432.

176. Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J: OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemometrics* 2006 20:341-351.

177. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
178. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breaux AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidemann UG, Laursen SM, Tymiak A, Carr BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C: Contemporary issues in toxicology the role of metabolomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;187:137-146.
179. Bales JR, Sadler PJ, Nicholson JK, Timbrell JA: Urinary excretion of acetaminophen and its metabolites as studied by proton NMR spectroscopy. *Clin Chem* 1984;30:1631-1636.
180. Feig DI, Kang DH, Johnson RJ: Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008;359:1811-1821.
181. Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Ciccoira M, Shamim W, Kemp M, Segal R, Osterziel KJ, Leyva F, Hetzer R, Ponikowski P, Coats AJ: Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation* 2003;107:1991-1997.
182. Gertler MM, Garn SM, Levine SA: Serum uric acid in relation to age and physique in health and in coronary heart disease. *Ann Intern Med* 1951;34:1421-1431.
183. Cullerton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D: Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999;131:7-13.
184. Levine W, Dyer AR, Shekelle RB, Schoenberger JA, Stamler J: Serum uric acid and 11.5-year mortality of middle-aged women: findings of the

Chicago Heart Association Detection Project in Industry. *J Clin Epidemiol* 1989;42:257-267.

185. Moriarty JT, Folsom AR, Iribarren C, Nieto FJ, Rosamond WD: Serum uric acid and risk of coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Epidemiol* 2000;10:136-143.

186. Jossa F, Farinaro E, Panico S, Krogh V, Celentano E, Galasso R, Mancini M, Trevisan M: Serum uric acid and hypertension: the Olivetti heart study. *J Hum Hypertens* 1994;8:677-681.

187. Alderman M: Uric acid in hypertension and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 1999;15 Suppl F:20F-22F.

188. Wang JG, Staessen JA, Fagard RH, Birkenhager WH, Gong L, Liu L: Prognostic significance of serum creatinine and uric acid in older Chinese patients with isolated systolic hypertension. *Hypertension* 2001;37:1069-1074.

189. Bickel C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Rippin G, Hafner G, Daunhauer A, Hofmann KP, Meyer J: Serum uric acid as an independent predictor of mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2002;89:12-17.

190. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV: Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *Faseb J* 2000;14:691-698.

191. Amaro S, Planas AM, Chamorro A: Uric acid administration in patients with acute stroke: a novel approach to neuroprotection. *Expert Rev Neurother* 2008;8:259-270.

192. Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG: Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000;148:131-139.

193. Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M: Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003;41:1183-1190.

194. Tzovaras V, Chatzikiyakidou A, Bairaktari E, Liberopoulos EN, Georgiou I, Elisaf M: Absence of SLC22A12 gene mutations in Greek Caucasian patients with primary renal hypouricaemia. *Scand J Clin Lab Invest* 2007;67:589-595.

195. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525-528.

196. Neild GH, Foxall PJ, Lindon JC, Holmes EC, Nicholson JK: Uroscopy in the 21st century: high-field NMR spectroscopy. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:404-417.

197. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR: Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids combined with pattern recognition. *Concepts Magn Reson* 2000;12:289-320.

198. Spraul M, Nicholson JK, Lynch MJ, Lindon JC: Application of the one-dimensional TOCSY pulse sequence in 750 MHz ¹H-NMR spectroscopy for assignment of endogenous metabolite resonances in biofluids. *J Pharm Biomed Anal* 1994;12:613-618.

199. Teahan O, Gamble S, Holmes E, Waxman J, Nicholson JK, Bevan C, Keun HC: Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Anal Chem* 2006;78:4307-4318.

200. Maher AD, Zirah SF, Holmes E, Nicholson JK: Experimental and analytical variation in human urine in ¹H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Anal Chem* 2007;79:5204-5211.

201. Teague C, Holmes E, Maibaum E, Nicholson J, Tang H, Chan Q, Elliott P, Stamler J, Ueshima H, Zhou B, Wilson I: Ethyl glucoside in human urine following dietary exposure: detection by ^1H NMR spectroscopy as a result of metabonomic screening of humans. *Analyst* 2004;129:259-264.

202. Wang Y, Tang H, Holmes E, Lindon JC, Turini ME, Sprenger N, Bergonzelli G, Fay LB, Kochhar S, Nicholson JK: Biochemical characterization of rat intestine development using high-resolution magic-angle-spinning ^1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J Proteome Res* 2005;4:1324-1329.

203. Van Dorsten FA, Daykin CA, Mulder TP, Van Duynhoven JP: Metabonomics approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption. *J Agric Food Chem* 2006;54:6929-6938.

204. Holmes E, Loo RL, Cloarec O, Coen M, Tang H, Maibaum E, Bruce S, Chan Q, Elliott P, Stamler J, Wilson ID, Lindon JC, Nicholson JK: Detection of urinary drug metabolite (xenometabolome) signatures in molecular epidemiology studies via statistical total correlation (NMR) spectroscopy. *Anal Chem* 2007;79:2629-2640.

205. Lenz EM, Bright J, Knight R, Wilson ID, Major H: A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ^1H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependent changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst* 2004;129:535-541.

206. Lenz EM, Bright J, Knight R, Wilson ID, Major H: Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field ^1H NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:599-608.

207. Hauet T, Baumert H, Gibelin H, Hameury F, Goujon JM, Carretier M, Eugene M: Noninvasive monitoring of citrate, acetate, lactate, and renal

medullary osmolyte excretion in urine as biomarkers of exposure to ischemic reperfusion injury. *Cryobiology* 2000;41:280-291.

208. Al-Waiz M, Ayesb R, Mitchell SC, Idle JR, Smith RL: Disclosure of the metabolic retroversion of trimethylamine N-oxide in humans: a pharmacogenetic approach. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:608-612.

209. Rehman HU: Fish odor syndrome. *Postgrad Med J* 1999;75:451-452.

210. Hirama Y, Shinriki N, Fujino T, Uedaira H: ¹H-NMR spectroscopic analysis of human urine: periodic variation of trimethylamine oxide excretion. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1993;25:209-218.

211. Zuppi C, Messana I, Forni F, Rossi C, Pennacchietti L, Ferrari F, Giardina B: ¹H NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites. *Clin Chim Acta* 1997;265:85-97.

212. Kasuya F, Igarashi K, Fukui M: Participation of a medium chain acyl-CoA synthetase in glycine conjugation of the benzoic acid derivatives with the electron-donating groups. *Biochem Pharmacol* 1996;51:805-809.

213. Phipps AN, Stewart J, Wright B, Wilson ID: Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica* 1998;28:527-537.

214. Bollard ME, Holmes E, Lindon JC, Mitchell SC, Branstetter D, Zhang W, Nicholson JK: Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution (¹H) NMR spectroscopy of urine and pattern recognition. *Anal Biochem* 2001;295:194-202.

215. Wang Y, Tang H, Nicholson JK, Hylands PJ, Sampson J, Holmes E: A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. *J Agric Food Chem* 2005;53:191-196.

216. Foster JE, Harpur ES, Garland HO: An investigation of the acute effect of gentamicin on the renal handling of electrolytes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:38-43.
217. Parsons PP, Garland HO, Harpur ES, Old S: Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 1997;122:570-576.
218. Weinberg JM, Harding PG, Humes HD: Alterations in renal cortex cation homeostasis during mercuric chloride and gentamicin nephrotoxicity. *Exp Mol Pathol* 1983;39:43-60.
219. Bapty BW, Dai LJ, Ritchie G, Jirik F, Canaff L, Hendy GN, Quamme GA: Extracellular Mg²⁺- and Ca²⁺-sensing in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int* 1998;53:583-592.
220. Thirumurugan A, Thewles A, Gilbert RD, Hulton SA, Milford DV, Lote CJ, Taylor CM: Urinary L-lactate excretion is increased in renal Fanconi syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1767-1773.