

W ciągu ostatnich lat rola witaminy D₃ była intensywnie badana, a sama witamina D jest obecnie jednym z najpopularniejszych suplementów. Niski poziom witaminy D powiązany jest z defektami w mineralizacji kości, przewlekłymi chorobami o podłożu autoimmunologicznym, z chorobami układu krążenia, cukrzycą, stwardnieniem rozsianym, reumatoidalnym zapaleniem stawów, gruźlicą, a także nowotworami złośliwymi. Witamina D niewątpliwie jest ważnym składnikiem układu hormonalnego, który kontroluje homeostazę wapnia i mineralizację kości. Witamina D wpływa również na ekspresję genów biorących udział w procesach różnicowania, aktywacji i proliferacji wielu typów komórek. Stąd bioaktywność witaminy D₃ jest możliwa dopiero po dwóch hydroksylacjach zachodzących w wątrobie i nerkach. Pierwszy metabolit (kalcydiol - 25(OH)D₃) powstaje w wątrobie przy udziale 23-hydroksylazy, a drugi metabolit (kalcytriol - 1,25(OH)₂D₃) pod wpływem 1 α -hydroksylazy. Jednak oba metabolity mogą być aktywowane przez działanie 24-hydroksylazy (CYP24A1). Zauważono, że sam 1,25(OH)₂D₃ negatywnie reguluje CYP27B1 i indukuje enzym CYP24A1 do generowania 1,24,25(OH)₃-witaminy D₃, pierwszego etapu katabolizmu 1,25(OH)₂D₃. W naszym badaniu chcemy uwzględnić VDBP (białko wiążące witaminę D) oraz VDR (receptor witaminy D) w powyższym równaniu. Aby skorzystać z działania witaminy D na komórki ludzkie, należy sprawdzić, czy wyższe dawki jej metabolitów zwiększają poziom wytwarzanych VDBP (odpowiedzialnych za transport) i VDR (odpowiedzialnych za dalsze przekazywanie sygnału). Poprzez zaproponowane badania chcemy znaleźć przyczynę niskiego poziomu witaminy D, VDR, VDBP. Wyniki mogą być przydatne w przyszłości do opracowania potencjalnego sposobu, który pozwoli pacjentom czerpać pełne korzyści z suplementacji witaminy D, a nawet jej metabolitów, bez ryzyka działania cytotoksycznego na komórki wątroby.

Obecnie zleca się pomiar 25(OH)D, którego wynik zależy od całkowitego stężenia 25(OH)D – czyli sumy stężeń 25(OH)D₃ i 25(OH)D₂ i wykorzystywany jest jako znormalizowana metoda w badaniach epidemiologicznych i klinicznych. Różne agencje i stowarzyszenia zalecają różne stężenia 25(OH)D, które można by uznać za poważny niedobór, lekki niedobór, odpowiedni poziom oraz toksyczny poziom witaminy D. Jednak oficjalne rekomendacje nie zawierają bezpiecznej dawki 1,25(OH)₂D₃ ze względu na jego mikro molarne do nanomolowych stężeń i krótki okres półtrwania w krwiobiegu. Możliwe, że zamiast mierzyć poziom metabolitu, można by analizować ekspresję genów i poziom białka enzymów odpowiedzialnych za metabolizm witaminy i korelować z niskim/wysokim poziomem metabolitu.

Czy niski poziom witaminy D badanej na zlecenie lekarza jest związany z niskim poziomem białka transportowego, receptora, a przede wszystkim enzymów i jego metabolitów? Czy przyjmowanie dużej dawki witaminy D przez krótki czas zwiększy ekspresję genów zaangażowanych w jej szlak metaboliczny? Czy metabolit witaminy D może działać toksycznie na komórki wątroby, a jeśli tak to w jakich dawkach? Jakie dawki witaminy D pozwalają na osiągnięcie stężenia 1,25(OH)₂D₃ na poziomie wykazującym działanie cytotoksyczne? Choć proponowany przez nas projekt nie pomoże odpowiedzieć na wszystkie te fascynujące pytania, wierzymy, że jest on dużym wkładem w poszerzenie wiedzy na temat metabolizmu witaminy D. Projekt łączy zagadnienia związane z biologią molekularną oraz biochemią i będzie dużym atutem dla kolejnych projektów ściśle związanych z nutrigenomiką czy biochemią medyczną.

W projekcie zaplanowaliśmy:

- (1) Badanie poziomów ekspresji genów CYP27B1, CYP24A1, VDR, VDBP pod wpływem 1,25(OH)₂D₃ w linii komórkowej Hep G2 metodą Real Time PCR.
- (2) Badanie poziomu białek: CYP27B1, CYP24A1, VDR, VDBP w linii komórkowej Hep G2 za pomocą analizy Western Blot.
- (3) Badanie (a) proliferacji, różnicowania, wzrostu komórek i (b) efektów cytotoksycznych na podstawie dawek 1,25(OH)₂D₃ w linii komórkowej Hep G2 za pomocą testów BrdU i WST-1.

Modelem badawczym jest linia komórkowa Hep G2.