

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

«Η επίδραση της εφελκυστικής τάσης  
στους αποπτωτικούς μηχανισμούς  
επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων  
και κυψελιδικών μακροφάγων»

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μαρκατζίνου Β. Ελισάβετ**  
**Βιολόγος**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**

- στα πλαίσια του Μέτρου 8.3 του Ε.Π Ανταγωνιστικότητα,  
Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης και συγχρηματοδοτείται κατά:**
- **80% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση-Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο**
  - **20% τη Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο-Υπουργείο Ανάπτυξης-Γενική Γραμματεία Έρευνας & Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα**



Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- κ. Λέκκα Μαρία Ελένη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
- κ. Νάκος Γεώργιος, Καθηγητής, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
- κ. Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

#### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- κ. Λέκκα Μαρία Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
- κ. Νάκος Γεώργιος, Καθηγητής, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
- κ. Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
- κ. Τράγκα Θεώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
- κ. Μπάη Μαρία, Καθηγήτρια, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
- κ. Μπατιστάτου Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
- κ. Κουλούρας Βασίλης, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

*Στη μητέρα μου*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αναμφίβολα, η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής, είναι ένας μακρύς και επίπονος δρόμος, πλήρης αντιφατικών συναισθημάτων. Για πολλούς αποτελεί την απαρχή μιας λαμπρά διαφαινόμενης καριέρας, για άλλους ένα ακόμη εφόδιο στο δισάκι των γνώσεων. Για μένα η εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής, πέρα από την χαρά της γνώσης, αποτελεί και την εκπλήρωση ενός ονείρου που έσερνα μαζί μου από τα φοιτητικά μου χρόνια. Ένα όνειρο που έμελλε να μείνει ανεκπλήρωτο, εάν δεν είχα την τύχη να συναντήσω στο δρόμο μου καταξιωμένους δασκάλους που με βοήθησαν να το εκπληρώσω.

Θα ήθελα λοιπόν, πέρα από την βαθιά μου ευγνωμοσύνη, να εκφράσω και ένα μεγάλο ευχαριστώ:

Στην Επιβλέπουσα την παρούσα διατριβή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας κ. Λέκκα Μαρία Ελένη, όχι μόνο για το ότι με τίμησε με την ανάθεση της διατριβής αυτής, αλλά κυρίως για το ότι με την βαθιά διδακτική και πειραματική εμπειρία που την διακρίνει, συνέβαλε τα μέγιστα τόσο στη σύλληψη και διαμόρφωση του θέματος, όσο και στον καθορισμό του πειραματικού πρωτοκόλλου. Επιπλέον, ήταν αυτή που μου μετέδιδε τις πολύτιμες γνώσεις της και την μακρόχρονη εμπειρία της και με καθοδηγούσε, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδρομής, βάζοντάς με στην σωστή πορεία κάθε φορά που παρέκλινα από αυτήν.

Στον Καθηγητή, διευθυντή της μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ιωαννίνων, κ.Νάκο Γεώργιο, για τη συνεχή επίβλεψη του σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του και κυρίως γιατί συνέβαλε τα πλείστα στη μελέτη και αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων, ενώ η εμμονή του στην γνώση και στην επιστημονική ακρίβεια συνετέλεσαν ώστε να λάβει την τελική της μορφή η παρούσα διατριβή. Θερμά ευχαριστώ τον κ. Νάκο και για την συμβολή του στην έγκριση της χρηματοδότησης της παρούσας εργασίας.

Στον καθηγητή, διευθυντή του εργαστηρίου Ιστολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ.Καναβάρο Παναγιώτη, για την πολύτιμη συμβολή του στη βελτίωση και επιστημονική ορθότητα της παρούσας εργασίας με τις υποδείξεις και τις γνώσεις του. Μου μετέδωσε όλη τη γνώση που κατέχω σήμερα όσον αφορά στην απόπτωση, και με δίδαξε να σκέφτομαι ανοιχτά και να αναζητώ πάντα αυτό που βρίσκεται πίσω από αυτό που βλέπουμε, όταν μαθήτευσα δίπλα του στα πρώτα χρόνια της μεταπτυχιακής μου προσπάθειας.

Στις κυρίες, κ.Τράγκα Θεώνη, κ.Μπάη Μαρία, κ.Μπατιστάτου Άννα, και στον κ.Κουλούρα Βασίλη, μέλη της συμβουλευτικής επταμελούς επιτροπής, για τον πολύτιμο χρόνο τους, τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους πάνω στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ιδιαίτερα οφείλω να ευχαριστήσω την κ. Κητσιούλη Ειρήνη, για την πολύτιμη συνεργασία της και την καθοριστική της συμμετοχή σε ένα κομμάτι της παρούσης διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ τους φίλους και συναδέλφους μου, Αντωνίου Γεωργία, Καρκαμπούνα Θανάση, Πανταζή Δέσποινα, Λέτσιου Ελευθερία, Νικόλα Σάιμον, για τη συνεργασία τους, και τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο. Ανεκτίμητη είναι η συμβολή της τόσο εντός εργαστηρίου όσο και εκτός, κάθε φορά που οι δυσκολίες φαίνονταν ανυπέρβλητες.

Ευχαριστώ τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη συνεργασία, και τη συμμετοχή σε υλικο- τεχνική υποστήριξη.

Ευχαριστώ τον κ.Χριστοφορίδη Σάββα, για την απομόνωση και χορήγηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε ένα κομμάτι της διατριβής.

*Τέλος, ένα ευχαριστώ, ως ελάχιστο φόρο τιμή, στην οικογένειά μου, στους δικούς μου ανθρώπους, που αν και μακριά πίστεψαν σε εμένα και με βοήθησαν να ολοκληρώσω το «όνειρο».*

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	I-V
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	VI
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Απόπτωση	1
Γενικά	1
Απόπτωση και νέκρωση	2
Μορφολογία της απόπτωσης	3
Βιοχημεία της απόπτωσης	5
Η εξωγενής οδός της απόπτωσης	7
Η ενδογενής οδός απόπτωσης	8
Απόπτωση και φαγοκυττάρωση	11
Απόπτωση και κυτταρικός κύκλος	12
Απόπτωση και καρκίνος	13
Φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης στον πνεύμονα	14
Απόπτωση και ανάπτυξη των πνευμόνων	14
Απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων τύπου II (ΑΤII)	15
Απόπτωση των ΑΤII και ασθένειες των πνευμόνων	15
Απόπτωση επιθηλιακών κυττάρων στο ARDS	16

2. Φλεγμονή	17
Οξεία φλεγμονή	19
Αρχική κυτταρική απόκριση	19
Φλεγμονώδεις κυτοκίνες	20
Χρόνια φλεγμονή	21
Τα κύτταρα της χρόνιας φλεγμονής	21
Οι κυτοκίνες που σχετίζονται με τη χρόνια φλεγμονή	22
Η ρύθμιση της φλεγμονής στους πνεύμονες	23
3. Φωσφολιπάσες	24
Γενικά	24
Κυτοσολική φωσφολιπάση A2	25
εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A2	26
Βιολογικές πηγές φωσφολιπασών	27
Ο ρόλος των PLA <sub>2</sub> s στη φλεγμονή	28
PLA <sub>2</sub> και απόπτωση	29
cPLA <sub>2</sub> και απόπτωση	29
Άλλες PLA <sub>2</sub> και απόπτωση	30
4. Το αναπνευστικό σύστημα και η μηχανική υποστήριξη	32
Γενικά	32
Το αναπνευστικό σύστημα	33
Βασική λειτουργία των πνευμόνων	35
Ο πνεύμονας	35
Τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα	37
Κυψελιδικό επιθήλιο	38
Κυψελιδικά τριχοειδή αγγεία	39



Μηχανική του πνευμονικού αερισμού	40
Φυσιολογική αναπνοή	40
Μηχανικός αερισμός	41
Προβλήματα που σχετίζονται με τον μηχανικό αερισμό	41
Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα	42
Επιφανειακή τάση	43
Μηχανικές καταπονήσεις στον πνεύμονα και στα κύτταρα	44
Πειραματικές τεχνικές για την εφαρμογή δυνάμεων στα κύτταρα	46
Μηχανική διάταση	47
Επίδραση της μηχανικής καταπόνησης στα κύτταρα	49
Μεταγωγή μηχανικού σήματος	51
5. Τα υπό εξέταση πειραματικά μοντέλα	53
Κυτταρική σειρά A549	53
Κυτταρική σειρά MLE12	53
Μονοκύτταρα μακροφάγα κύτταρα	53
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	56
1. Καλλιέργειες κυττάρων	56
Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549	56
Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς MLE12	56
Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου	61
Απομόνωση και καλλιέργεια κυψελιδικών μακροφάγων	61
2. Συνθήκες μηχανικής διάτασης	63
3. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης	63
4.. Ηλεκτροφόρηση	65

5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών	72
6. Κυτταρομετρία ροής	78
7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	80
Πρωτόκολλο μελέτης	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	84
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	84
Επιλογή πειραματικού μοντέλου	84
Επιλογή πειραματικών συνθηκών	86
Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού	86
Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549	87
Επίδραση του CH11 επαγωγέα στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.	90
Συσχέτιση φλεγμονής και απόπτωσης σε A549 κύτταρα μετά την επίδραση με μηχανικό ερέθισμα	92
Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων των φωσφολιπασών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	94
Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα MLE12	96
Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα	98
Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε πρωτογενείς καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων	100

Επίδραση του TNFα χημικού μεσολαβητή στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού	102
Επίδραση του TNFα χημικού μεσολαβητή στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549	103
Επίδραση του TNFα χημικού μεσολαβητή στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα HUVEC	105
Μελέτη μιας νέας πειραματικής μεθοδολογίας	107
Προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη σε προσκολλημένα και αποκολλημένα κύτταρα A549 μετά από επίδραση μηχανικής τάσης	107
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AA (*Arachidonic Acid*) = αραχιδονικό οξύ
- aiPLA2 (*acidic independent phospholipase A<sub>2</sub>*)
- ALI (*Acute Lung Injury*) = οξεία πνευμονική βλάβη
- ALI (*Acute Lung Injury*) = οξεία πνευμονική βλάβη
- ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) = σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας
- ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) = Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής
- ATII (*Alveolar type II cells*) = επιθηλιακά κύτταρα τύπου II
- BAL (*Bronchoalveolar Lavage*) = Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
- BSA (*Bovine Serum Albumin*)
- BSA (*Bovine Serum Albumin*), Αλβουμίνη ορού βοός
- cPLA2 (*cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>*) = κυτοσολική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>
- EDTA (*Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid*) = Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
- FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) = Κυτταρομετρία ροής
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) = Ορός βοός
- NF-κB (*Nuclear factor- kappa B*)
- PAF (*platelet-activating factor*) = παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
- PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) = Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου
- PARP (*Poly ADP ribose polymarese*)
- PBS (*Phosphate Buffer Saline*) = Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
- PBS (*phosphate buffer saline*) = ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
- Phospho-cPLA2 (*phosphorylated cPLA2*) = φωσφορυλιωμένη cPLA2
- PLA<sub>2</sub> (*phospholipase A<sub>2</sub>*) = φωσφολιπάση A<sub>2</sub>
- PLIP (*cPLA2-interacting protein*)
- PS (*phosphatidylserine*) = φωσφατιδυλοσερίνη
- PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*)
- RIP (*receptor interactive protein*)
- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) = δωδεκυλοθειικό νάτριο
- SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) = Δωδεκυλοθειικό νάτριο
- SP-A (*surfactant protein A*) = πρωτεΐνη A το επιφανειοδραστικού παράγοντα
- sPLA2 (*secretory Phospholipase A2*) = εκκρινόμενη Φωσφολιπάση A<sub>2</sub>
- sPLA2 (*secretory phospholipase A2*) = εκκρινόμενη φωσφολιπάση A<sub>2</sub>

TEMED (*N,N,N,N*'-Tetramethylethylenediamine)

TGF (*transforming growth factor*)

TNF (Tumor Necrosis Factor) = Ογκονεκρωτικός Παράγοντας

TNFR (*tumor necrosis factor receptor*)

TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* )

TRADD (*TNF- associated death domain*)

TRAIL (*TNF- related apoptosis-inducing ligand*)

ΑΜφ (Alveolar Macrophages) = κυψελιδικά μακροφάγα

Μφ (Macrophages) = μακροφάγα



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο μηχανικός αερισμός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της βασικής υποστήριξης των οργάνων στις μονάδες εντατικής θεραπείας εδώ και αρκετές δεκαετίες. Πρόσφατα κλινικά δεδομένα έχουν υποδείξει ωστόσο πως μηχανικός αερισμός δε στερείται επιπλοκών και θα πρέπει να εφαρμόζεται με μεγάλη προσοχή.

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής εργασίας είναι να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης της απόπτωσης στον πνεύμονα μετά από μηχανικό αερισμό.

Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της εφελκυστικής τάσης σε κυτταρικούς πληθυσμούς επιθηλιακών κυττάρων ενδοθηλιακών κυττάρων, και κυψελιδικών μακροφάγων.

Υπάρχουν επιπλέον αρκετές ενδείξεις ότι οι κυτοκίνες εμπλέκονται σε σημαντικές παθολογικές διεργασίες του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένων της φλεγμονής και της ογκογένεσης. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε επιπλέον η επίδραση του TNFα στην απόπτωση ανθρώπινων επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές και πρωτογενείς καλλιέργειες προκειμένου να ελεγχθεί η καταλληλότητα των πειραματικών μοντέλων μετά από επίδραση των μηχανικών και χημικών ερεθισμάτων.

Συνολικά:

1. Διερευνήθηκε η καταλληλότητα διαφόρων κυτταρικών σειρών-μοντέλων για υποβολή στο συνδυασμό μηχανικής διάτασης και χημικού ερεθίσματος. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν οι σειρές A549 (ATCC CCL-185), MLE12 (ATCC CRL-2110), (ευγενική χορηγία κ. S. Matalon) ως μοντέλα πνευμονοκυττάρων τύπου II, πρωτογενείς καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από ομφάλιο λώρο (ευγενική χορηγία κ. Σ. Χριστοφορίδη) και κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα (απομονωμένα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών της μονάδας εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων).
2. Διερευνήθηκε αν με stretch ενεργοποιούνται η κυτοσολική φωσφολιπάση A2 (cPLA2) και η εκκρινόμενη φωσφολιπάση (sPLA2) στις πειραματικές μας συνθήκες. Σημειωτέον, ότι η οικογένεια των PLA2 βρίσκεται στο επίκεντρο του παρόντος ερευνητικού προγράμματος διότι είναι δείκτες φλεγμονής, συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος και στη βιοσύνθεση / ανάπλαση των



φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα (pulmonary surfactant).

3. Διερευνήθηκε η επίδραση μεσολαβητών της απόπτωσης και συγκεκριμένα των CH11, TNF $\alpha$ , στην επαγωγή του αποπτωτικού μηχανισμού. Η ενεργοποίηση έγινε σε διάφορους συνδιασμούς ώστε να μελετηθεί η δόσο-εξαρτώμενη και η χρονο-εξαρτώμενη επίδραση των επαγωγέων.

Μεθοδολογικά:

1. Η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής και προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη.
2. Ως δείκτης φλεγμονής χρησιμοποιήθηκε η παραγωγή και η ενεργοποίηση των PLA $_2$ . Η ποιοτική ανίχνευση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση.
3. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των PLA $_2$  πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Τα αποτελέσματα της εργασίας συνηγορούν στα εξής:

1. Η τάση εφελκυσμού ενεργοποιεί την απόπτωση, με διαφορετικό ωστόσο τρόπο στα υπό εξέταση μοντέλα.
2. Ο TNF $\alpha$  παρουσιάζει αποπτωτική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε αντίθεση με τα κύτταρα A549, στα οποία περιορίζει την αποπτωτική δράση του μεσολαβητή CH11.
3. Στα κύτταρα A549, τα σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής και απόπτωσης φαίνεται να εμπλέκονται, με παράδειγμα την αύξηση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A $_2$  σε κύτταρα που παρουσίασαν υψηλό αποπτωτικό δείκτη.
4. Σε κάθε περίπτωση, η ένταση του ερεθίσματος, μηχανικού (τάση εφελκυσμού) ή χημικού, φάνηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης.

Από τα αποτελέσματα αναμένονται συμπεράσματα για τα σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής και απόπτωσης μετά από μηχανικά ερεθίσματα. Τα μονοπάτια αλληλοσυνδέονται, και η ανάδειξη χρήσιμων συμπερασμάτων αναμένεται να δώσει απαντήσεις σε βασικά ερωτήματα που σχετίζονται με τις βλάβες προκαλούμενες από αναπνευστήρα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### 1. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

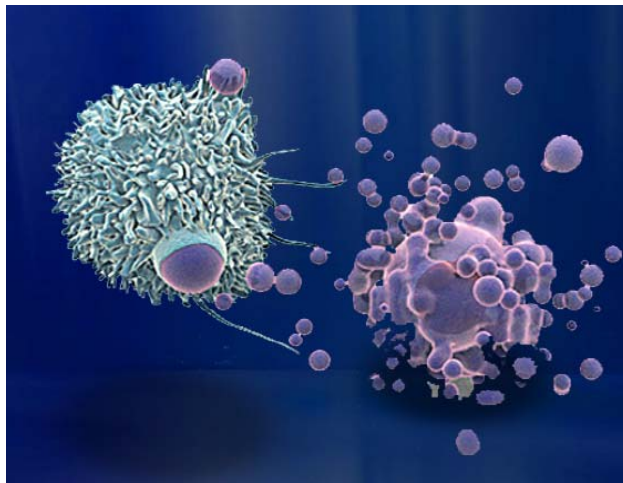
#### Γενικά

Ο ελληνικός όρος απόπτωση (από + πτώση), ο οποίος αναφέρεται στο πέσιμο των γηρασμένων φύλλων από τα δένδρα το φθινόπωρο, έχει παγκοσμίως καθιερωθεί για την απόδοση μιας κατά μεγάλο βαθμό υπαγόμενης σε ρύθμιση μορφής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία καθορίζεται από συγκεκριμένα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά.



Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναφέρεται σε έναν τύπο κυτταρικού θανάτου στον οποίο το κύτταρο ενεργά χρησιμοποιεί ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα για να προκαλέσει το δικό του θάνατο. Η απόπτωση, που αποτελεί την κύρια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και είναι μία θεμελιώδης διαδικασία τόσο για την ανάπτυξη όσο και για τη διατήρηση της δομής και της οργάνωσης όλων των πολυκύτταρων οργανισμών.

Πρώτος ο Kerr διερεύνησε αυτή τη μορφή κυτταρικού θανάτου και εισήγαγε τον όρο «απόπτωση» (αρχικά την είχε αποκαλέσει ως συρρικνωμένη νέκρωση και αργότερα



τη μετονόμασε σε απόπτωση), περιγράφοντας τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων που παρατήρησε με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε δείγματα ιστών από επινεφρίδια (1).

Εγγενείς μηχανισμοί ή εξωγενή ερεθίσματα ενεργοποιούν μια σειρά από γενετικά προγραμματισμένα γεγονότα τα οποία θα προκαλέσουν τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος επιτρέπει την απομάκρυνση κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη καθώς και των γηρασμένων ή ανεπιθυμητών κυττάρων χωρίς να προκαλεί καταστροφή του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος ( 2)



Η απόπτωση έχει σημαντική συνεισφορά στη διατήρηση της κυτταρικής και ιστικής ομοιόστασης. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί ότι όχι μόνο ο ανορθόδοξος κυτταρικός πολλαπλασιασμός αλλά και η αποτυχία της απόπτωσης ενέχεται στην ογκογένεση.

Τα «όπλα αυτοκτονίας» των κυττάρων είναι διάφορες πρωτεΐνες (πρωτεάσες) που αποικοδομούν, με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, το γενετικό υλικό των κυττάρων και τα καθιστούν ανίκανα να διατηρήσουν τη ζωή τους.

Όταν ένα κύτταρο πρόκειται να υποστεί απόπτωση, υφίσταται ορισμένες αλλαγές που οδηγούν στην απόσπασή του από τα γειτονικά κύτταρα και στη διάσπασή του σε κομμάτια, τα οποία απορροφώνται από άλλα κύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή.

### Απόπτωση και νέκρωση

Εκτός της απόπτωσης έχει προσδιοριστεί ένας ακόμη τύπος κυτταρικού θανάτου, η νέκρωση (Πίνακας 1). Η απόπτωση είναι μια γενετικά καθορισμένη ενεργός διαδικασία, μία φυσιολογική διαδικασία κυτταρικού θανάτου, η οποία με τον προγραμματισμένο τρόπο που επιτελείται και με τη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης δεν επιφέρει την καταστροφή των γειτονικών κυττάρων και συνεπώς την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης. Η απόπτωση είναι ένα φαινόμενο που αφορά μεμονωμένα κύτταρα.

Αντίθετα, η νέκρωση είναι μια τυχαία παθητική διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική διάλυση των κυτταρικών δομών. Πιο αναλυτικά, η νέκρωση επιφέρει τη μη αντιστρεπτή καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, τη διόγκωση του κυττάρου και ανεξέλεγκτη έκλυση ενζύμων (λιπασών, πρωτεασών κ.λ.π.), τα οποία προκαλούν καταστροφή και των παρακείμενων κυττάρων καθώς και την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης. Η νέκρωση επέρχεται συνήθως μετά από μη αναστρέψιμη βλάβη που οφείλεται σε ακραίες αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος και αφορά ομάδες κυττάρων.



Πίνακας 1: Μορφολογικές και βιοχημικές διαφορές μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης

Απόπτωση	Νέκρωση
Σε μεμονωμένα κύτταρα Δεν διαταράσσεται η ακεραιότητα των μεμβρανών	Ομάδες κυττάρων Διαταράσσεται η ακεραιότητα των μεμβρανών
Ελάττωση του όγκου του κυττάρου Διατηρείται η ακεραιότητα των κυτταροπλασματικών οργανιδίων Η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε μεγάλη μάζα Μη τυχαίος τεμαχισμός του DNA Το κύτταρο διασπάται σε μικρά τεμαχίδια → αποπτωτικά σωματίδια Φαγοκυττάρωση από μακροφάγα και γειτονικά κύτταρα	Αύξηση του όγκου του κυττάρου Παρουσιάζουν εξοίδωση Σε μικρές αβροίσεις Τυχαία διάσπαση του DNA
Οχι φλεγμονώδη αντίδραση Προκαλείται από φυσιολογικά ερεθίσματα Είναι ρυθμιζόμενη επεξεργασία με στάδιο σύνδεσης και ενεργοποίησης Χρειάζεται ενέργεια De novo μεταγραφή γονιδίων	Καταστροφή του κυττάρου Φαγοκυττάρωση από μακροφάγα του διάμεσου υποστρώματος Φλεγμονώδη αντίδραση Προκαλείται από μη φυσιολογικές επιδράσεις Απώλεια ρύθμισης της ιοντικής ομοιόστασης Δεν χρειάζεται ενέργεια Δεν γίνεται μεταγραφή άλλων γονιδίων

### Μορφολογία της απόπτωσης

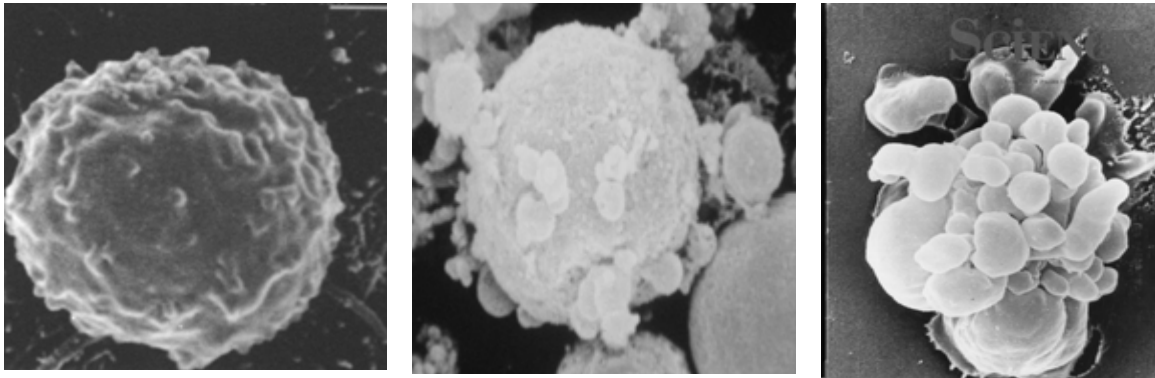
Οι μορφολογικές μεταβολές που υφίσταται το κύτταρο κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουν ταξινομηθεί σε τρεις φάσεις.

Η αρχική φάση της απόπτωσης χαρακτηρίζεται μορφολογικά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από συμπύκνωση και περιφερική διάταξη της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη και ακολουθείται από κατακερματισμό του πυρήνα (3). Το κυτταρόπλασμα παρουσιάζει και αυτό πύκνωση και σχηματίζει πτυχώσεις, οι οποίες περιβάλλουν τα τμήματα του κατακερματισμένου πυρήνα. Πιο αναλυτικά, το κύτταρο αποχωρίζεται αρχικά από τα γειτονικά του κύτταρα, η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε ημισεληνοειδείς σχηματισμούς στην περιφέρεια του πυρήνα, ο πυρηνίσκος αποδομείται, τα κυτταρικά οργανίδια συμπυκνώνονται, το ενδοπλασματικό δίκτυο διατείνεται, τα ριβοσώματα οργανώνονται κατά ομάδες, τα ινίδια του κυτταροσκελετού ενώνονται και ο όγκος του κυτταροπλάσματος μειώνεται. Επιπλέον, παρατηρείται απώλεια εξειδικευμένων επιφανειακών δομών, όπως είναι οι μικρολάχνες.

Κατά τη δεύτερη φάση επέρχεται διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία αποτελούν τμήματα κυτταροπλάσματος και πυρήνα που περιβάλλονται από μεμβράνη (4; 5). Αρχικά σχηματίζονται οι «φουσαλίδες» της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες μπορεί να διανοιχθούν μακριά από το κύτταρο. Πρόκειται για μια δυναμική διεργασία που δίνει την εντύπωση «βρασμού» του κυττάρου. Τόσο ο πυρήνας όσο και το κυτταρόπλασμα διασπώνται σε τμήματα διαφόρου μεγέθους ενώ το

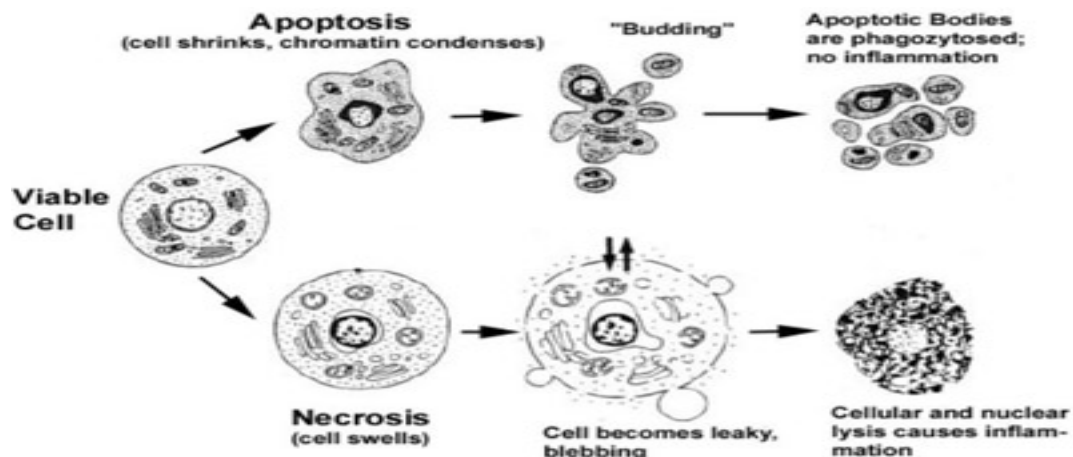


εναπομείναν κύτταρο μετατρέπεται σε ένα στρογγυλό σωματίο, καλυπτόμενο από λεία μεμβράνη, το οποίο ονομάζεται «αποπτωτικό σωματίο».



Κατά την τρίτη και τελευταία φάση τα αποπτωτικά σωματίδια φαγοκυτταρώνονται ταχέως από γειτονικά κύτταρα ή από τα μακροφάγα κύτταρα και καταβολίζονται από τα έξυμα των λυσοσωμάτων. Δεδομένου ότι τα ενδοκυττάρια συστατικά δε διαρρέουν στον εξωκυττάριο χώρο, δεν ενεργοποιείται η τοπική φλεγμονώδης απόκριση.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός του DNA από τη δράση ενδονουκλεασών. Η αρχική διάσπαση του DNA γίνεται σε τμήματα 300 χιλιάδων και/ή 50 χιλιάδων ζευγών βάσεων και συνήθως ακολουθείται από διάσπαση σε μικρότερα ενδονουκλεοσωμικά τμήματα μεγέθους 180-200 ζευγών βάσεων.. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι το φαινόμενο του κατακερματισμού του DNA δεν παρατηρείται αποκλειστικά στην απόπτωση αλλά μπορεί επίσης να συμβεί και κατά τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης (6). Επιπλέον, η απόπτωση έχει παρατηρηθεί και σε απύρρηνα κύτταρα, γεγονός που σημαίνει ότι η ενδοπυρηνική διάσπαση του DNA δεν είναι προϋπόθεση για τον χαρακτηρισμό ενός κυττάρου ως αποπτωτικού (7), αν και οι μελέτες αυτές δέχονται κριτική ως προς τη συσχέτιση των ευρημάτων με ότι συμβαίνει σε εμπύρρηνα κύτταρα.



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση των σταδίων της απόπτωσης



Δεδομένου ότι ο ορισμός της απόπτωσης είναι αυστηρά μορφολογικός γεννάται το εξής ερώτημα: Ποια είναι τα ελάχιστα μορφολογικά κριτήρια, από το σύνολο των περιγραφέντων παραπάνω, που πρέπει να πληρεί ένα κύτταρο ώστε να χαρακτηριστεί ως αποπτωτικό; Παρότι τα όρια στον ορισμό της απόπτωσης δεν έχουν προσδιοριστεί σαφώς, υπάρχει μια γενική συμφωνία ότι η συμπύκνωση της χρωματίνης αποτελεί απόλυτη προϋπόθεση. Βέβαια, είναι γεγονός ότι ένα κύτταρο μπορεί να βρίσκεται σε διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου χωρίς ακόμα να έχει αναπτύξει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (8).

### Βιοχημεία της Απόπτωσης

Η διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνει συνοπτικά τρεις φάσεις:

- α) Σήματα διέγερσης του αποπτωτικού μηχανισμού. Η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού πραγματοποιείται με τη μεταβίβαση σήματος μέσω ενός υποδοχέα. Για παράδειγμα, η απόπτωση μπορεί να αρχίζει με τη διέγερση μιας σειράς υποδοχέων όπως CD95 (Fas/Apo1) ή TNFR (Tumour Necrosis Factor Receptor). Τα συνδεδετικά μόρια (ligands) που συνδέονται με αυτούς τους υποδοχείς TNFR, ανήκουν στην υπεροικογένεια παραγόντων νέκρωσης όγκων TNF (Tumour Necrosis Factor).
- β) Μεταγωγή σήματος. Οικογένειες πρωτεϊνών όπως αυτή της Bcl ελέγχουν και ρυθμίζουν την πορεία του αποπτωτικού μονοπατιού.
- γ) Εκτέλεση. Οι κασπάσες λειτουργούν ως εκτελεστές της απόπτωσης και ως αποδέκτες σημάτων που επάγουν την απόπτωση.

### A) Επαγωγή της απόπτωσης

Η έναρξη της απόπτωσης, είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών εξωγενών ή ενδογενών σημάτων (Πίνακας 2), που όμως έχουν κοινή κατάληξη (9,10,11,12,13,14,15,16,17). Τα σήματα ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού προέρχονται είτε από την επιφάνεια του κυττάρου (εξωγενή) (Ashkenazi and Dixit, 1998), όπως η αλληλεπίδραση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumour necrosis factor, TNF) με τον υποδοχέα του, ή του Fas (Apo-1 ή CD95) με τον Fas-L είτε από το κυτταρόπλασμα (ενδογενή) και οφείλονται στην επίδραση της ακτινοβολίας, χημικών παραγόντων, υποξίας ή άλλων ερεθισμάτων.



Αναστολείς της απόπτωσης			
Φυσιολογικοί αναστολείς	Γονίδια ιών	Φαρμακολογικοί παράγοντες	
Παράγοντες ανάπτυξης	Αδενοϊός (E1B)	Αναστολείς καρπιαίνης	
Εξωκυττάρια ουσία	Μπακουλοϊός (p53, IAP)	Αναστολείς κυστεϊνοπρωτεασών	
CD40	Ιός Epstein-Barr (BHRF1, LMP-1)	Προαγωγοί όγκων	
Ουδέτερα αμινοξέα	Ιός έρπητα (γ1 34,5)	Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	
Ψευδάργυρος		Φαινοβαρβιτάλη	
Οιστρογόνα		α-εξακλωρο-κυκλοεξάνιο	
Ανδρογόνα			
Επαγωγείς της απόπτωσης			
Φυσιολογικοί επαγωγείς	Επαγωγείς σχετιζόμενοι με τη θλάση	Θεραπευτικοί	Τοξίνες
Οικογένεια TNF	Θερμικό shock	παραγόντες	Αιθανόλη
TNF	Ιογενής λοίμωξη	Χημειοθεραπευτικά	β-πεπτιδιο
Fas-L (Fas Ligand)	Τοξίνες βακτηριδίων	Σισπλαΐνη	αμυλοειδούς
Transforming Growth Factor β	Ογκογονίδια (myc, rel, E1A)	Μεθοτρεξάτη	
Νευροδιαβιβαστές	p53 (ογκοκατασταλτής)	Βλεομυκίνη	
Γλουταμικό	Κυτταρολυτικά T-κύτταρα	Δοξορουβικίνη	
Ντοπαμίνη	Οξειδωτικά	Βινκριστίνη	
N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ	Ελεύθερες ρίζες	Ακτινοβολία γ	
Απουσία παραγόντων ανάπτυξης	Έλλειψη τροφικών παραγόντων,	Υπεριώδεις ακτίνες	
Ασβέστιο	αντιμεταβολίτες		
Γλυκοκορτικοειδή			

Πίνακας 2: Μερικοί από τους παράγοντες που επάγουν ή καταστέλλουν την απόπτωση.

## B) Μεταγωγή σήματος

Πρωτεΐνες ρυθμιστές της απόπτωσης (πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας Bcl-2 και της οικογένειας των αναστολέων της απόπτωσης IAP). είναι κλειδιά για τη ζωή ή το θάνατο των κυττάρων αφού επάγουν ή μπλοκάρουν τα μηνύματα θανάτου.

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν έναν καταρράκτη μοριακών γεγονότων.

## Γ) Εκτέλεση της απόπτωσης

Κατά την εκτελεστική φάση οι ενεργοποιημένοι πρωτεΐνες δρουν σε πολλαπλούς στόχους της αποπτωτικής διεργασίας. Οι τελικοί εκτελεστές της απόπτωσης είναι οι κασπάσες, ειδικές πρωτεάσες του ασπαρτικού οξέος περιέχουσες μόρια κυστεΐνης, οι οποίες ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους (Kidd VJ , 1998). Αυτές οι πρωτεάσες συντίθενται ως προένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται μέσω πρωτεολυτικής δράσης και διασπών έναν αριθμό κυτταρικών υποστρωμάτων, όπως την poly (ADP-ribose) polymerase, τη lamin B και τις DNA τοποϊσομεράσες I και II (18).

Οι ενεργοποιημένες κασπάσες προκαλούν αποδόμηση των κυτταρικών συστατικών και ενεργοποίηση συγκεκριμένων ενδονουκλεασών που κατακερματίζουν το DNA, και οδηγούν σε αποδόμηση της χρωματίνης. Εν συνεχεία, το κύτταρο αποκολλάται από τα γειτονικά του κύτταρα, μετατρέπεται σε αποπτωτικό και φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα.



Δύο είναι οι κύριες οδοί απόπτωσης: η εξωγενής οδός ή όπως ονομάζεται το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου, που επάγεται από τη δέσμευση υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας με μόρια “θανάτου” π.χ. μέλη της οικογένειας του TNF, και η ενδογενής οδός ή το μιτοχονδριακό μονοπάτι, που επάγεται από στρεσογόνα σήματα όπως η καταστροφή του DNA και η έλλειψη τροφικών παραγόντων. Κάθε μια οδός ενεργοποιεί τις ειδικές εναρκτήριες κασπάσες, την κασπάση-8 και κασπάση-9 αντίστοιχα. Οι δύο παραπάνω οδοί σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες συνδέονται και τα μόρια του ενός μονοπατιού μπορούν να επηρεάσουν το άλλο (19).

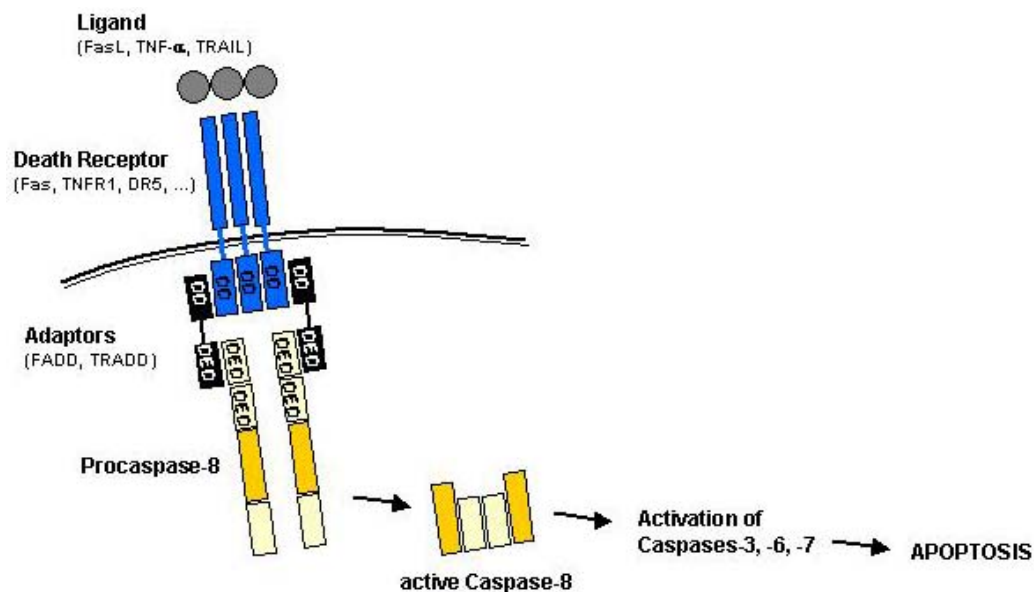
### Η εξωγενής οδός της απόπτωσης

Η εξωγενής οδός απόπτωσης περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες) με τους προσδέτες τους. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μέλη της υπεροικογένειας των υποδοχέων TNF (20). Τα μέλη της οικογένειας των TNF υποδοχέων φέρουν παρόμοιες εξωκυτταρικές περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και αποτελούνται από μία κυτταροπλασματική περιοχή, περίπου 80 αμινοξέων, την περιοχή θανάτου (Ashkenazi and Dixit, 1998). Η περιοχή αυτή θανάτου παίζει σημαντικό ρόλο στη διαβίβαση των σημάτων θανάτου από την κυτταρική επιφάνεια προς τις ενδοκυτταρικές μηνυματοφόρους οδούς. Στους καλύτερα χαρακτηρισμένους προσδέτες και τους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου περιλαμβάνονται οι παρακάτω: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 και Apo2L/DR5 (21,22,23). Τα καλύτερα χαρακτηριζόμενα μοντέλα απόπτωσης περιλαμβάνουν τα FasL/FasR και TNF- $\alpha$ /TNFR1 προσδέματα/υποδοχείς. Στα παραπάνω μοντέλα πραγματοποιείται σύνδεση του υποδοχέα με το μηνυματοφόρο μόριο, γεγονός που προσελκύει κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-προσαρμογείς, που διαθέτουν περιοχές θανάτου με τις οποίες προσδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς. Στο μοντέλο Fas/FasL στηρίζεται μέρος της παρούσης διδακτορικής διατριβής. Η πρόσδεση του FAS προσδέματος (FasL) στον αντίστοιχο υποδοχέα (FasR), οδηγεί στη σύνδεση της FADD πρωτεΐνης-προσαρμογέα με τον FasR. Ενώ, αντίστοιχα η πρόσδεση του TNF προσδέματος στον αντίστοιχο υποδοχέα (TNFR), οδηγεί στη σύνδεση της TRADD πρωτεΐνης-προσαρμογέα με τον TNFR καθώς και την «επιστράτευση» των FADD και RIP (24,25,26). Στη συνέχεια η FADD συνδέεται με την προκασπάση-8 μέσω του διμερισμού της περιοχής θανάτου. Στο σημείο αυτό, συντελείται η ενεργοποίηση και πρωτεόλυση της προκασπάσης-8 οπότε





και προκύπτει η κασπάση-8 (27). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 πυροδοτεί τις διεργασίες που περιλαμβάνονται στο μονοπάτι θανάτωσης.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της εξωτερικής οδού της απόπτωσης.

### Η ενδογενής οδός απόπτωσης

Τα ενδογενή μηνυματοφόρα μονοπάτια που επάγουν την απόπτωση περιλαμβάνουν ποικίλα ερεθίσματα, για τα οποία δεν μεσολαβεί κάποιος υποδοχέας, κατά τα οποία παράγονται ενδοκυτταρικά σήματα που αλληλεπιδρούν άμεσα με τους στόχους τους στο εσωτερικό των κυττάρων. Κύριοι συντελεστές της ενδογενούς οδού της απόπτωσης είναι τα μιτοχόνδρια.

Τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν την ενδογενή οδό παράγουν ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία στη συνέχεια μπορεί να δράσουν είτε θετικά (τέτοια ενδοκυτταρικά σήματα είναι η ακτινοβολία, οι τοξίνες, η υποξία, η υπερθέρμανση, οι ιικές μολύνσεις και οι ελεύθερες ρίζες) ή αρνητικά (όπως είναι η απουσία συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτταροκινών) οδηγώντας στην αδυναμία καταστολής του προγράμματος θανάτου του κυττάρου ενεργοποιώντας την απόπτωση. Τα παραπάνω σήματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και συντελούν στην απελευθέρωση (υπό φυσιολογικές συνθήκες οι πρωτεΐνες αυτές είναι απομονωμένες) των δύο κυριότερων ομάδων επαγωγέων αποπτωτικών πρωτεϊνών από το εσωτερικό των μιτοχονδρίων προς το κυτταρόπλασμα (28).



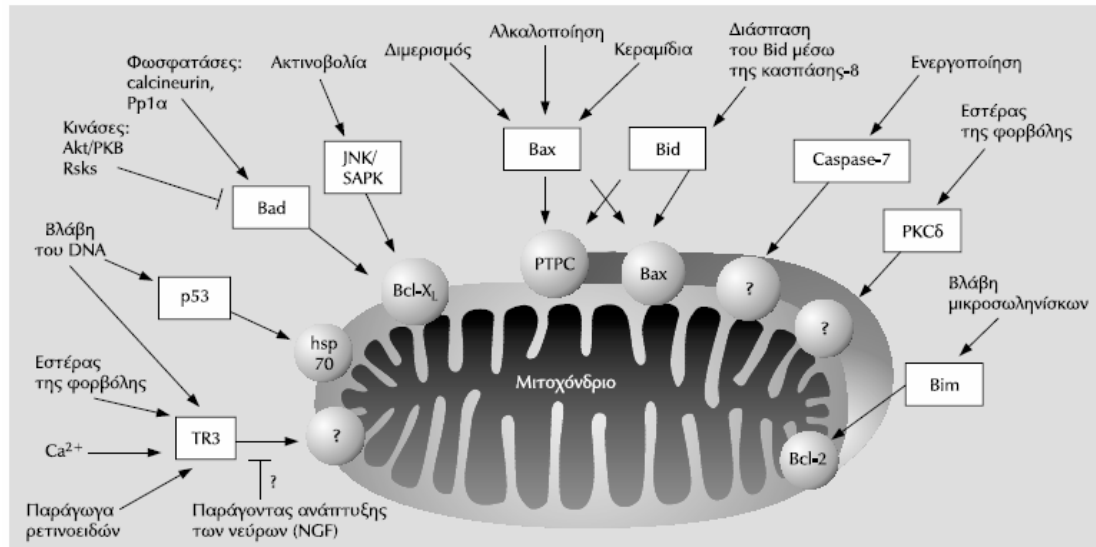
Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών περιλαμβάνει το κυτόχρωμα c, τις Smac/DIABLO και τις πρωτεάσες σερίνης HtrA2/Omi (29,30,31). Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από κασπάσες μιτοχονδριακή οδό.

Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών περιλαμβάνει τις AIF, ενδονουκλεάση G και CAD, οι οποίες απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια κατά την απόπτωση, γεγονός που συμβαίνει αφού έχει αποφασιστεί ότι το κύτταρο πρόκειται να θανατωθεί. Η AIF μετατοπίζεται στον πυρήνα, προκαλώντας τον κατακερματισμό του DNA σε κομμάτια μεγέθους περίπου 50–300 kb και τη συμπύκνωση της περιφερικής πυρηνικής χρωματίνης (32). Η ενδονουκλεάση G μετατοπίζεται επίσης στον πυρήνα, όπου και τεμαχίζει την πυρηνική χρωματίνη παράγοντας κομμάτια ολιγονουκλεοσωμικού DNA (33). Τόσο η AIF όσο και η ενδονουκλεάση G δρουν ανεξάρτητα από τις κασπάσες. Η CAD μετά την απελευθέρωσή της από τα μιτοχόνδρια μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου μετά την πρωτεόλυσή της από την κασπάση-3, τεμαχίζει την πυρηνική χρωματίνη παράγοντας ολιγονουκλεοσωμικό DNA και συντελεί στην πιο έντονη συμπύκνωση της χρωματίνης (34).

Ο έλεγχος και η ρύθμιση αυτών των μιτοχονδριακών γεγονότων απόπτωσης πραγματοποιείται από τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών (35).

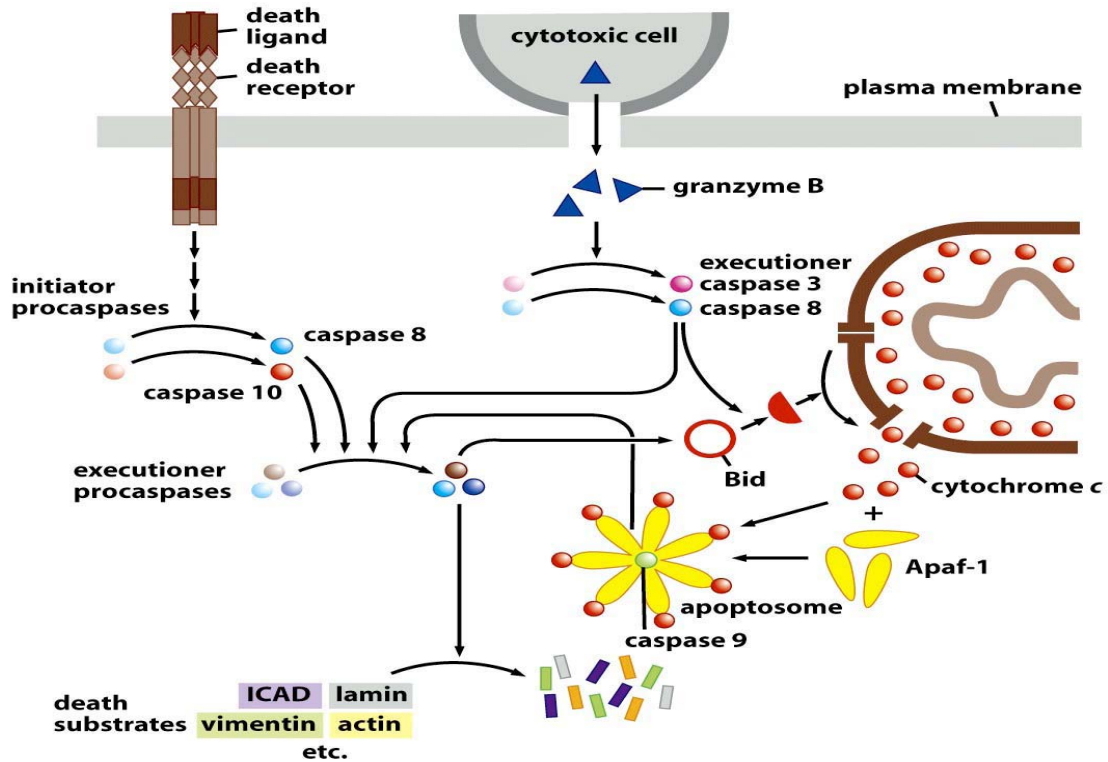
Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών μπορεί να δρουν είτε ως επαγωγείς-αποπτωτικά μόρια (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, και Blk), επάγοντας την ενεργοποίηση των κασπασών και επομένως την απόπτωση, ή ως αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w και BAG), παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και επομένως την ενεργοποίηση των κασπασών. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν σημαντικό ρόλο αφού ο λόγος τους (επαγωγείς-αποπτωτικές προς αντι-αποπτωτικές) καθορίζει τελικά αν τα κύτταρα θα υποστούν απόπτωση ή θα επιβιώσουν. Πιστεύεται ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών της οικογένειας των Bcl-2 είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια.





Εικόνα 3: Πρωτεΐνες παραγόμενες κατά τη διαδικασία της απόπτωσης κινούνται προς το μιτοχόνδριο επηρεάζοντας την κυτταρική του μεμβράνη. Οι τελικοί επαγωγείς (μέσα στα ορθογώνια πλαίσια), ενεργοποιούνται από διάφορες αποπτωτικές οδούς και στη συνέχεια κινούνται από το κυτταρόπλασμα προς τη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους υποδοχείς (μέσα σε κύκλους). Τελικά, ύστερα από την απελευθέρωση των προ-κασπασών και των ενεργοποιητών των κασπασών (π.χ. κυτόχρωμα c) επάγεται η ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών με αποτέλεσμα να λάβουν στη συνέχεια χώρα τα γεγονότα που οδηγούν στον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου, με τελική κατάληξη τη φαγοκυττάρωσή του.

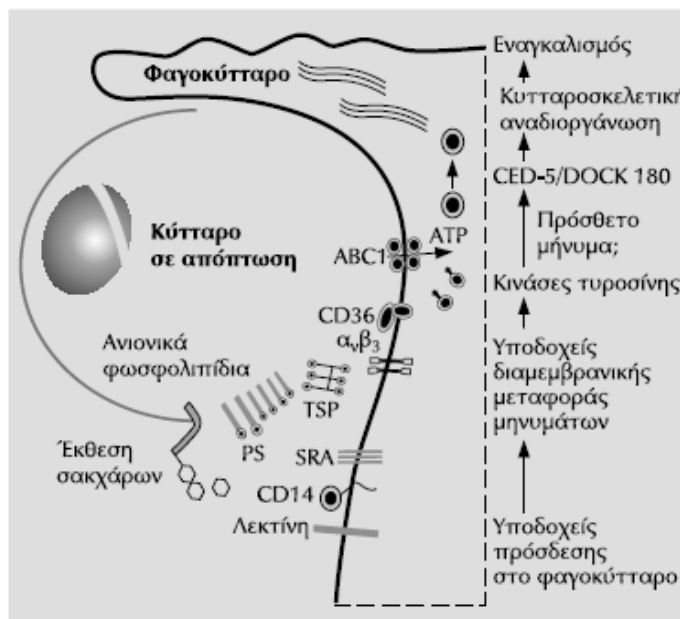




Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της εξωγενούς και ενδογενούς οδού ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού.

### Απόπτωση και φαγοκυττάρωση

Με την ολοκλήρωση του αποπτωτικού μηχανισμού τα αποπτωτικά σωματίδια απομακρύνονται ταχύτατα με φαγοκυττάρωση είτε με τη βοήθεια των εξειδικευμένων φαγοκυττάρων ή απλών κυττάρων που γειτνιάζουν με αυτά. Η αναγνώριση των αποπτωτικών σωματιών από τα φαγοκύτταρα πραγματοποιείται



μέσω του υποδοχέα της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) (36).

Εικόνα 5. Απεικόνιση των βημάτων που προηγούνται της φαγοκυττάρωσης ενός κυττάρου σε διαδικασία απόπτωσης. Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των



*κασπασών που επέρχεται μέσω διαφόρων επαγωγικών -απτωτικών οδών προκαλεί μια σειρά αλλαγών στην κυτταρική μεμβράνη, με σημαντικότερη την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης. Τα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν πολλαπλούς μηχανισμούς για την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων. (37).*

Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα φωσφολιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης το οποίο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης όπου και συγκρατείται μέσω δύο ATP-εξαρτώμενων ενζύμων, της φλιππάσης και της τρανσλοκάσης (38). Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του μηχανισμού της απόπτωσης τα δύο παραπάνω ένζυμα αναστέλλονται μέσω των κασπασών ενώ ενεργοποιείται ένα άλλο ένζυμο, η σκραμπλάση, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση της φωσφατιδυλοσερίνης προς την εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (39). Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης είναι ένα γενικό και πρώιμο χαρακτηριστικό της αποπτωτικής διαδικασίας, πολύ πριν ακόμα εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις του πυρήνα του κυττάρου. Η διαπίστωση, λοιπόν, της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης έχει αποτελέσει έναν εύλογο στόχο για την ανάπτυξη τεχνικών καθορισμού των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση.

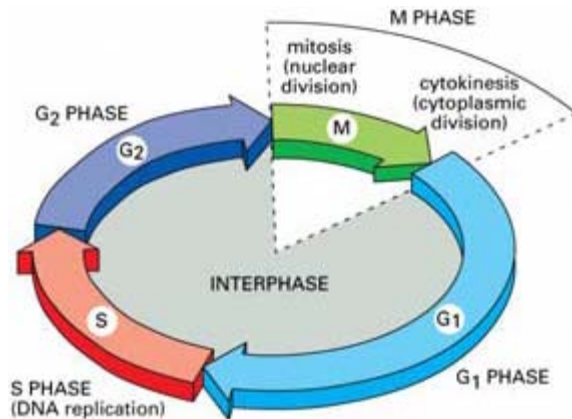
Μια τέτοια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα είναι ο προσδιορισμός της απόπτωσης με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής (FACS), όπου χρησιμοποιείται μια πρωτεΐνη με μεγάλη τάση σύνδεσης με τη φωσφατιδυλοσερίνη, η αννεξίνη V, η οποία επισημαίνεται με κάποια φθορίζουσα χρωστική και έτσι επισημαίνονται με έμμεσο τρόπο όλα τα αποπτωτικά κύτταρα (δηλαδή τα κύτταρα στα οποία η φωσφατιδυλοσερίνη βρίσκεται προς την εξωτερική πλευρά). Με κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων και στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

#### Απόπτωση και κυτταρικός κύκλος

Είναι προφανές πως ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση. Μεταλλάξεις σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο (πχ στο p53 που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να επιδιορθώσει τη βλάβη πριν το διπλασιασμό. Εάν η βλάβη είναι μη διορθώσιμη τότε το κύτταρο αποπίπτει. Ενεργοποίηση του



κυτταρικού πολλαπλασιασμού επάγει επίσης και το πρόγραμμα απόπτωσης το οποίο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, εκτός αν ενεργοποιηθούν σήματα επιβίωσης. Κατά συνέπεια η τελική κατάληξη (πολλαπλασιασμός ή απόπτωση) καθορίζεται από τη δυναμική σχέση επαγωγής αποπτωτικών διαδικασιών κυτταρικής αύξησης/πολλαπλασιασμού και αντι-αποπτωτικών μηνυμάτων κυτταρικής επιβίωσης.



### Απόπτωση και καρκίνος

Η απόπτωση, προκαλεί σήμερα ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς οποιαδήποτε παρέκκλιση της ρύθμισής της, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αυτοκτονία είτε πάρα πολλών είτε πολύ λίγων κυττάρων, είναι δυνατόν να συμβάλει στην πρόκληση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Ο καρκίνος αναπτύσσεται μετά τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε γονίδια που ελέγχουν την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων. Αν μια μετάλλαξη προκαλεί ανεπανόρθωτη βλάβη, τότε το κύτταρο συνήθως αυτοκτονεί για να μη μετατραπεί σε επικίνδυνο. Αν όμως ξεχάσει να «αυτοκτονήσει», τότε είτε το ίδιο είτε οι απόγονοί του ζουν αρκετά για να συσσωρευθούν και άλλες μεταλλάξεις, που το οδηγούν σε ανεξέλεγκτες διαιρέσεις και μεταστάσεις. Συνεπώς και στην περίπτωση του καρκίνου η αποτυχία απόπτωσης συνδέεται με γενετικές βλάβες, όταν το DNA του κυττάρου έχει υποστεί μια σοβαρή βλάβη, που δεν μπορεί να επιδιορθωθεί.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η επαγωγή της απόπτωσης επιταχύνει τον κυτταρικό κύκλο αλλά και ότι η καταστολή της απόπτωσης, κάτω από κάποιες συνθήκες, καταστέλλει τον κυτταρικό κύκλο (40) Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι μεταλλάξεις που οδηγούν σε εμφάνιση καρκίνου επάγουν ταυτόχρονα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καταστολή της απόπτωσης ένα συνδυασμό δυνητικά καταστροφικό για το κύτταρο. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι μόνο αν αυτές οι κατασταλτικές για την κυτταρική ανάπτυξη διαδικασίες (διακοπή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση) ανασταλούν, εκφράζονται πλήρως οι επαγωγικές για την κυτταρική αύξηση δράσεις του Ras. Αντίστοιχες δράσεις έχουν περιγραφεί και για το ογκογονίδιο myc (40) Υπάρχουν



πολλές ενδείξεις που καταγράφουν τη σημαντική αλληλεξάρτηση μεταξύ των επαγωγικών και ανασταλτικών για την κυτταρική αύξηση ιδιοτήτων ορισμένων ογκογονιδίων. Πράγματι, οι επαγωγικές δράσεις (κυτταρικός πολλαπλασιασμός) ισορροπούν με τις ανασταλτικές δράσεις (απόπτωση και διακοπή κυτταρικού κύκλου) (40).

## **Φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης στον πνεύμονα**

### Απόπτωση και ανάπτυξη των πνευμόνων

Για να είναι η ανταλλαγή αερίων αποδοτικότερη, η ανάπτυξη ιστού του πνεύμονα και η ανάπλαση του γίνεται ενδομήτρια (in utero) και μετά τη γέννηση. Η απόπτωση παρατηρείται καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των πνευμόνων, σημειώνοντας το σημαντικό ρόλο της στην όλη διαδικασία. Το αυξημένο ποσοστό της απόπτωσης των ΑΤΠ συμπίπτει με την μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, εμπλέκοντας την απόπτωση ως σημαντικό παράγοντα στην ανάπλαση του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της του τελικού σταδίου της εμβρυακής ανάπτυξης [41,42].

Η απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί να είναι αποτέλεσμα συνύπαρξης στις κυψελίδες αποπτωτικών παραγόντων, όπως ο transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [43], αντιαποπτωτικών παραγόντων όπως ο IGF-1 [44], το μονοξείδιο του αζώτου NO [45,46] και εκκρινόμενων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση [47].

Μετά τη γέννηση, η απόπτωση εμφανίζεται ως μια πολύ σημαντική διαδικασία μετά από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό και διαδοχικό μετασχηματισμό των πρωταρχικών κυστιδίων σε λειτουργικές κυψελίδες [48,49].

Η περίσσεια των ΑΤΠ είναι σημαντική διότι χρησιμεύουν ως θεωρούμενα εμβρυονικά κύτταρα για τα ΑΤΙ [50]. Επίσης, επειδή τα ΑΤΠ παράγουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα, μια υπερβολική παραγωγή διασφαλίζει διαθέσιμο επιφανειοδραστικό παράγοντα κατά τη διάρκεια της γέννησης [51]. Μετά την δημιουργία των κυψελίδων, η περίσσεια των ΑΤΠ μειώνεται σε αριθμό με διαφοροποίηση τους σε ΑΤΙ και με απόπτωση.



### Απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων τύπου II (ΑΤII)

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του πνεύμονα, υφίσταται μια σειρά από μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές που τον προετοιμάζουν για το ρόλο του ως όργανο ανταλλαγής αερίων. Τα τελικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του πνεύμονα χαρακτηρίζονται από παλινδρόμηση του μεσεγχύματος, το οποίο συνοδεύεται από την εξομάλυνση του επιθηλίου και την εισβολή των τριχοειδών αγγείων [51]. Η απόπτωση στο διάμεσο ιστό αυξάνει σημαντικά κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής και αρχιτεκτονικής ωρίμανσης του πνεύμονα. Η παρατηρούμενη μείωση του πληθυσμού των ΑΤII οφείλεται (α) σε μείωση του πολλαπλασιασμού των ΑΤII, (β) σε αύξηση της τελικής διαφοροποίησης σε ΑΤI, (γ) σε αύξηση της απόπτωσης των ΑΤII [52]. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πνεύμονα, ο ολικός αριθμός των ΑΤII δεν μειώνεται μόνο λόγω της διαφοροποίησης τους σε ΑΤI αλλά και λόγω της απόπτωσης, θεωρώντας την απόπτωση ως μια από τις αναπτυξιακές δυνάμεις που συμβάλουν στην ωρίμανση του πνεύμονα [48,53].

### Απόπτωση των ΑΤII και ασθένειες των πνευμόνων

Το ARDS/NRDS και το ALI είναι ασθένειες που σχετίζονται με ανωμαλίες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [54]. Οι πνεύμονες ασθενών με ALI εκδηλώνουν εκτεταμένη κυψελιδική βλάβη (DAD), η οποία στα πρώιμα στάδια χαρακτηρίζεται από υψηλή διαπερατότητα οιδήματος και στα τελικά στάδια από υπερπλασία των ΑΤII σύμφωνα με την κυψελιδική μεμβράνη (alveolar septa) και του διαμέσου πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών [55]. Η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο ALI οφείλεται σε πολλές αιτίες, αλλά πιο συχνά προκαλείται από την καταστροφή του μηχανισμού που εμπλέκεται στη δημιουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα ή στο θάνατο των ΑΤII [54].

Η επιδιόρθωση της βλάβης μετά το ALI απαιτεί την αποβολή της περίσσειας των ΑΤII. Η αποτυχία της αποβολής αυτής μπορεί να επάγει την φλεγμονή και να επιδεινώσει τον ήδη κατεστραμμένο πνεύμονα. Έτσι, το επιθήλιο του πνεύμονα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στην πνευμονική βλάβη.





### Απόπτωση επιθηλιακών κυττάρων στο ARDS

Έχουν βρεθεί επιθηλιακά αποπτωτικά κύτταρα στο κατεστραμμένο κυψελιδικό επιθήλιο των ασθενών με ARDS [56]. Κατά τη φάση της ανάλυσης του οξέος πνευμονικού τραύματος (acute lung injury), η απόπτωση των ΑΤΠ φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την εξαφάνιση της περίσσειας των επιθηλιακών κυττάρων [57,58]. Αυξημένες συγκεντρώσεις του διαλυτού Fas (FasL) έχουν βρεθεί στο BAL ασθενών με ARDS ή ALI [59,60,61,62] προτείνοντας ότι το σύστημα Fas μπορεί να εμπλέκεται στην απόπτωση που λαμβάνει χώρα στο ARDS ή ALI.

Τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II εκφράζουν και Fas και το FasL [59,61,66,63], το σύστημα Fas/FasL επάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων τύπου II in vivo και in vitro [63,64].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

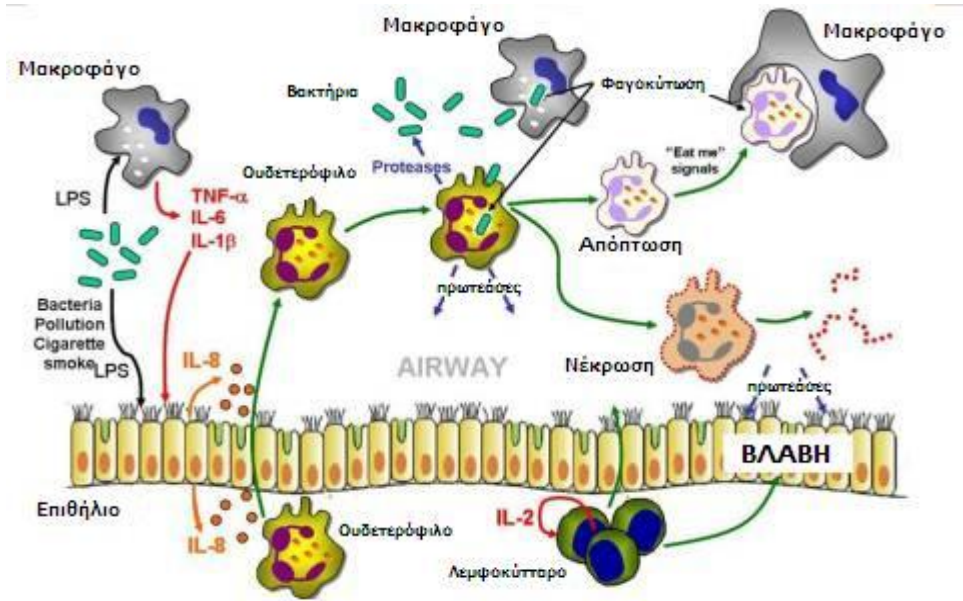
### 2. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

#### Γενικά

Οι κυτταροκίνες που ελευθερώνονται από τα μακροφάγα, ως απόκριση σε βακτηριακά συστατικά, έχουν ένα εύρος δράσεων που συνοπτικά είναι γνωστό ως **φλεγμονή**. Η φλεγμονή ορίζεται παραδοσιακά από τέσσερις λατινικές λέξεις *dolor*, *rubor*, *calor* και *tumor*, που σημαίνουν: πόνος, ερυθρότητα, θερμότητα και οίδημα και όλες αντανακλούν τις επιπτώσεις των κυτταροκινών στα τοπικά αιμοφόρα αγγεία. Διαστολή και αυξημένη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων οδηγεί σε αύξηση της τοπικής αιματικής ροής στη διαφυγή υγρού και συμβάλλει στην θερμότητα, την ερυθρότητα και το οίδημα. Οι κυτταροκίνες επίσης έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις προσκολλητικές ικανότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων, κάνοντας τα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα να προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων και διαμέσου αυτών να μεταναστεύουν στη θέση της λοίμωξης όπου και έλκονται από άλλες κυτταροκίνες. Η μεταμόσχευση των κυττάρων στον ιστό και οι τοπικές τους δράσεις είναι υπεύθυνες για τον πόνο. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που παρατηρούνται σε μια φλεγμονώδη απόκριση στις αρχικές φάσεις της είναι τα ουδετερόφιλα, ακολουθούμενα από τα μακροφάγα που ωριμάζουν σαν συνέχεια των προγόνων τους, των μονοκυττάρων. Αυτά συνεπώς είναι γνωστά ως φλεγμονώδη κύτταρα.

Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις που οφείλονται σε μια λοίμωξη, συμπεριλαμβάνουν και τα λεμφοκύτταρα, δημιουργώντας έτσι μια ειδική (επίκτητη) ανοσολογική απόκριση, που έχει ενεργοποιηθεί από αντιγόνο το οποίο προέρχεται από την περιοχή της λοίμωξης και οδεύει μέσω των λεμφαγγείων σε έναν επιχώριο λεμφαδένα. Τα βακτηριακά συστατικά προκαλούν αλλοιώσεις στα επιφανειακά μόρια των μακροφάγων και είναι σημαντικές για τον κεντρικό ρόλο αυτών των κυττάρων στην επαγωγή ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων.





Εικόνα 6: Φλεγμονώδεις αποκρίσεις

Η ρύπανση και οι περιβαλλοντικές συνθήκες κάνουν την φλεγμονή συχνή εκδήλωση των ασθενειών του αναπνευστικού. Οι πνεύμονες και οι άνω αεραγωγοί είναι βλεννογόνες επιφάνειες που εκτίθενται συχνά σε παθογόνους οργανισμούς και περιβαλλοντικές προκλήσεις [65]. Συνεπώς, η μελέτη του μηχανισμού της φλεγμονής είναι σημαντική για τη μείωση της βλάβης που προκαλείται στον ξενιστή, καθώς μπορεί να είναι ωφέλιμη ή επιζήμια για τον ίδιο.

Ο πρωταρχικός σκοπός της φλεγμονής είναι η προστασία του ξενιστή και η επιδιόρθωση της βλάβης που έχει υποστεί ο ιστός.

Η φλεγμονή μπορεί να ταξινομηθεί σε οξεία και σε χρόνια. Κάθε φλεγμονώδης απόκριση περιλαμβάνει ένα πλήθος διαμεσολαβητών που βρίσκονται σε όλα τα έμβια όντα. Επιπρόσθετα με τα βακτήρια και τους ιούς και το περιβάλλον μπορεί να επάγει φλεγμονή στο αναπνευστικό σύστημα [66-70]. Εξαιτίας της συνεχούς έκθεσης σε παθογόνα συστατικά του αέρα, το αναπνευστικό σύστημα έχει αναπτύξει ένα εκτεταμένο δίκτυο άμυνας για να βοηθάει στον έλεγχο των εισβολέων. Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις είναι άμεσες και χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο αγγειακό σύστημα. Άλλωστε τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, τα συστατικά του ορού, οι χημειοκίνες και οι κυτοκίνες παίζουν ρόλο τόσο στην πρόκληση όσο και στον έλεγχο της φλεγμονής. Η ενδοκυττάρια επικοινωνία λαμβάνει χώρα χρησιμοποιώντας κυτοκίνες, ιντερλευκίνες, λευκοτριένια,



προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια, τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, τις πρωτεΐνες της οξειάς φάσης και πολλά μόρια πρόσφυσης.

### Οξεία φλεγμονή

Όλες οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις ακολουθούν μια οξεία φάση. Η αυστηρότητα, η διάρκεια και ο τύπος της απόκρισης μεταβάλλονται λόγω των παραγόντων έναρξης, των μεσολαβητών της απόκρισης και του είδους των ζωντανών οργανισμών.

Σε όλα τα είδη, οι παράγοντες έναρξης που επάγουν την φλεγμονή, μπορεί να οφείλονται σε ιούς, βακτήρια, μύκητες, παράσιτα [68, 71-83].

Η αιτία έναρξης της φλεγμονής θα καθορίσει το είδος των κυττάρων που θα αποκριθούν.

### Αρχική κυτταρική απόκριση

Στα πρώτα στάδια της φλεγμονής, τα ουδετερόφιλα ή τα ηωσινόφιλα και τα ιστιοκύτταρα αποτελούν τα επικρατέστερα είδη κυττάρων. Τα ουδετερόφιλα εισέρχονται στους πνεύμονες ως απόκριση σε μεσολαβητές της οξειάς φλεγμονής [84,85,86,87]. Τα ουδετερόφιλα εισέρχονται στο πνευμονικό παρέγχυμα αρχικά από τα τριχοειδή [88], καθώς και με την πρόσδεση τους σε up-regulated P και E-σελεκτίνες και σε άλλα μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των μυικών ενδοθηλιακών κυττάρων [89,90]. Από τη στιγμή που τα ουδετερόφιλα βρίσκονται στο πνευμονικό ιστό, η έκφραση των υποδοχέων αυξάνεται, επιτρέποντας έτσι στα κύτταρα να αποκρίνονται στις χημειοκίνες, αυξάνοντας επιπλέον την μετανάστευση τους στην περιοχή της φλεγμονής [91]. Πολλά μόρια και τοξίνες που σχετίζονται με τα παθογόνα, όπως ο λιποσακχαρίτης (LPS), είναι χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα. Μετά την έναρξη των αγγειακών αλλαγών, τα ουδετερόφιλα που έχουν μεταναστεύσει έξω από τις φλέβες, αρχίζουν να φαγοκυτταρώνουν τα παθογόνα που βρίσκονται στο πνευμονικό παρέγχυμα. Στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα αυξάνονται τα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα Fc επιτρέποντας την αυξανόμενη πρόσληψη παθογόνων [92]. Το σήμα από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα διεγείρει την αναπνευστική έκρηξη έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και ενδιάμεσα αζώτου που βρίσκονται σε ενεργή μορφή στα κατεστραμμένα παθογόνα [93,94].



Όταν τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα ελευθερώνουν τα κοκκία τους στους τοπικούς ιστούς, προκαλούν την επιπλέον βλάβη τους. Έτσι, οι εκκρίσεις που βρίσκονται στους πνεύμονες συνυπάρχουν με τη μόλυνση και την οξεία φλεγμονή, η οποία περιέχει νεκρά κύτταρα, μικρόβια, συσσωρευμένο υγρό και πρωτεΐνες, που συνεισφέρουν επιπλέον στην παθολογία των πνευμόνων. Σημαντικά για την έλξη και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων είναι τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα, ειδικά τα μακροφάγα [84].

Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα/μακροφάγα αυξάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης που είναι απαραίτητα για τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων. Οι κυτοκίνες στη συνέχεια, προκαλούν την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα στους ιστούς [84,95]. Επιπρόσθετα με τα μακροφάγα, οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος παράγουν μεσολαβητές της φλεγμονής και χημειοτακτικούς παράγοντες για τα ουδετερόφιλα επιδρώντας έτσι στην ενεργοποίησή τους στην αναπνευστική οδό [86,96].

#### Φλεγμονώδεις κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες που επάγονται ως απόκριση στην φλεγμονή, εκφράζονται γρήγορα ακολουθώντας τη βλάβη ή τη μόλυνση. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες παράγονται κυρίως από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, αλλά και από τα επιθηλιακά και τις ινοβλάστες [84,86,96,97]. Πολλές από αυτές τις κυτοκίνες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη της φλεγμονής στο αναπνευστικό σύστημα. Οι κυριότερες κυτοκίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οξεία φλεγμονή είναι ο TNF- $\alpha$ , η IL-1 $\alpha$ , η IL-1 $\beta$  και η IL-6.

Η παραγωγή του TNF είναι σημαντική εκδήλωση της φλεγμονής που βρίσκεται στην αναπνευστική οδό έχοντας ως αποτέλεσμα ομοδυναμικές, μεταβολικές και παθολογικές καταστάσεις.

Ο TNF παράγεται αρχικά από μονοκύτταρα/μακροφάγα, ωστόσο, μικρές ποσότητες παράγονται και από άλλους πληθυσμούς κυττάρων. Σε περιπτώσεις που τα κυψελιδικά μακροφάγα μειώνονται, μπορεί να συνεχιστεί η παραγωγή του TNF [98,99,100].

Μικρά ποσοστά φλεγμονής σε συνδυασμό με την παραγωγή TNF είναι σημαντικά για να επάγουν την μετανάστευση των δενδρικών κυττάρων και των μακροφάγων στη draining lymph nodes, αρχίζοντας μια ανοσοαπόκριση [101]. Χαμηλά επίπεδα TNF



είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα έτσι ώστε να αυξηθεί η φαγοκύτωση και η καταστροφή οργανισμών. Υψηλά επίπεδα TNF παράγονται σε σχέση με τον αριθμό των παθογόνων της αναπνευστικής οδού συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων και ιών. Καθώς αυξάνονται τα επίπεδα του TNF, λαμβάνει χώρα σοβαρή βλάβη στο πνευμονικό παρέγχυμα και συστηματική ασθένεια οδηγώντας στο θάνατο τον ξενιστή. Πολλοί θάνατοι που οφείλονται σε μόλυνση από βακτήρια, ειδικά εξαιτίας των gram αρνητικών οργανισμών, μπορεί να αποδοθούν σε φλεγμονή εξαιτίας της παραγωγής του TNF [102,103].

### Χρόνια φλεγμονή

Η χρόνια φλεγμονή αρχικά ακολουθεί την ίδια πορεία με την οξεία φλεγμονώδη απόκριση. Λαμβάνει χώρα όταν η οξεία φλεγμονώδη απόκριση είναι ανεπαρκής για να καθαρίσει τους ιστούς που έχουν προσβληθεί από μικρόβια και ουσίες. Ο βασικός σκοπός της χρόνιας φλεγμονής είναι η εκκαθάριση των νεκρωτικών υπολειμμάτων που παράγονται από την οξεία φλεγμονή, η άμυνα εναντίον επίμονων μολύνσεων, η επούλωση και η επιδιόρθωση της βλάβης του πνευμονικού παρεγχύματος. Η καταστροφή της αρχιτεκτονικής του φυσιολογικού ιστού έχει ως αποτέλεσμα την επούλωση η οποία μπορεί να είναι προβληματική στην αναπνευστική οδό εξαιτίας της μειωμένης περιοχής ανταλλαγής οξυγόνου.

### Τα κύτταρα της χρόνιας φλεγμονής

Τα κύτταρα της χρόνιας φλεγμονής περιέχουν λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και πλασματοκύτταρα. Τα μακροφάγα φτάνουν στους πνεύμονες 5-6 ώρες μετά από την έναρξη της φλεγμονής. Μετά την άφιξη τους, ενεργοποιούνται αυξάνοντας την ικανότητα τους για φαγοκύτωση και την παραγωγή μεσολαβητών και κυτοκίνων που συνεισφέρουν επιπλέον στη φλεγμονώδη απόκριση.

Τα μονοκύτταρα έλκονται από τους ίδιους χημειοτακτικούς παράγοντες που προσελκύουν τα ουδετερόφιλα και τις CCL χημειοκίνες [104]. Οι χημειοκίνες και οι κυτοκίνες παράγονται από μονοπύρρηνα κύτταρα ως απόκριση στα προϊόντα που προέρχονται από την αποσύνθεση του ιστού. Τα μονοκύτταρα όπως και τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των σελεκτινών και των ιντεγκρινών, και μεταναστεύουν μέσω τοιχωμάτων των αγγείων. Μόλις τα μονοκύτταρα φτάνουν στην περιοχή της φλεγμονής ενεργοποιούνται και αρχίζουν να φαγοκυτταρώνουν τα βακτήρια και κατεστραμμένα κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα



και τους ιστούς. Οι κολλαγονάσες και οι ελαστάσες ελευθερώνονται από τα μακροφάγα καταστρέφοντας τον συνδετικό ιστό [105]. Ένας ενεργοποιητής του πλασμινογόνου ελευθερώνεται, συμβάλλοντας στην παραγωγή της πλασμίνης [106]. Ταυτοχρόνως, τα μακροφάγα εκκρίνουν IL-1, η οποία έλκει και ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνθεση του κολλαγόνου [107]. Ο νέος ιστός αντικαθιστά τον κατεστραμμένο και η βαθμιαία ανάπλαση λαμβάνει χώρα μέχρι οι ιστοί στην περιοχή της φλεγμονής επιστρέψουν στο φυσιολογικό.

Τυπικά, η φλεγμονή θεωρείται ωφέλιμη για τον ξενιστή και απαραίτητη για να εξαλείψει και να εμποδίσει τον αποικισμό των μικροβίων, για να ενεργοποιήσει την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσοαπόκριση, και να συνεισφέρει στη διαδικασία επούλωσης. Αν ωστόσο, η φλεγμονώδης διαδικασία δεν ελέγχεται ή αποτυγχάνει να διαλύσει την μόλυνση ή να καθαρίσει το επιβλαβές ερέθισμα, λαμβάνει χώρα παρατεταμένη και αυξημένη τοπική κυτταρική βλάβη και τραύμα. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, η απόκριση γίνεται χρόνια [108]. Η ικανότητα της αναπνευστικής οδού να επιστρέψει στο φυσιολογικό εξαρτάται από την αιτία, την διάρκεια, και την επιτυχία τόσο της φλεγμονώδους απόκρισης και όσο της ανοσοαπόκρισης να καθαρίσουν τους πνεύμονες από το ερέθισμα. Αν η φλεγμονή και η φλεγμονώδης απόκριση είναι επιτυχής στην εξάλειψη των παθογόνων, η φλεγμονώδης απόκριση διαλύεται και οι ιστοί του πνεύμονα επιστρέφουν στο φυσιολογικό.

Ωστόσο, αν το μικρόβιο δεν μπορεί να καταστραφεί ή αν η αιτία της φλεγμονής είναι μια αλλεργική αντίδραση, η φλεγμονή επιμένει.

#### Οι κυτοκίνες που σχετίζονται με τη χρόνια φλεγμονή

Οι ίδιες κυτοκίνες που εμπλέκονται στην οξεία φλεγμονή του αναπνευστικού συστήματος ενεργοποιούνται και στις χρόνιες μολύνσεις. Πολλά παθογόνα του αναπνευστικού οδηγούν στη μακροχρόνια παραγωγή του TNF και της IL-1, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα τη χρόνια πνευμονία. Η ελευθέρωση του TNF μειώνει την παραγωγή IL-6 και την εισροή φλεγμονωδών κυττάρων [109,110]. Μια σημαντική λειτουργία της IL-6 είναι η επαγωγή της διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα που παράγονται από ανοσοσφαιρίνη τα οποία επιτρέπουν στο αναπνευστικό σύστημα να αρχίσει να καθαρίζει τους πνεύμονες από τα μικρόβια [111]. Μια από τις πιο κοινές αιτίες της χρόνιας φλεγμονής στο αναπνευστικό σύστημα είναι οι αλλεργικές αντιδράσεις.



### Η ρύθμιση της φλεγμονής στους πνεύμονες

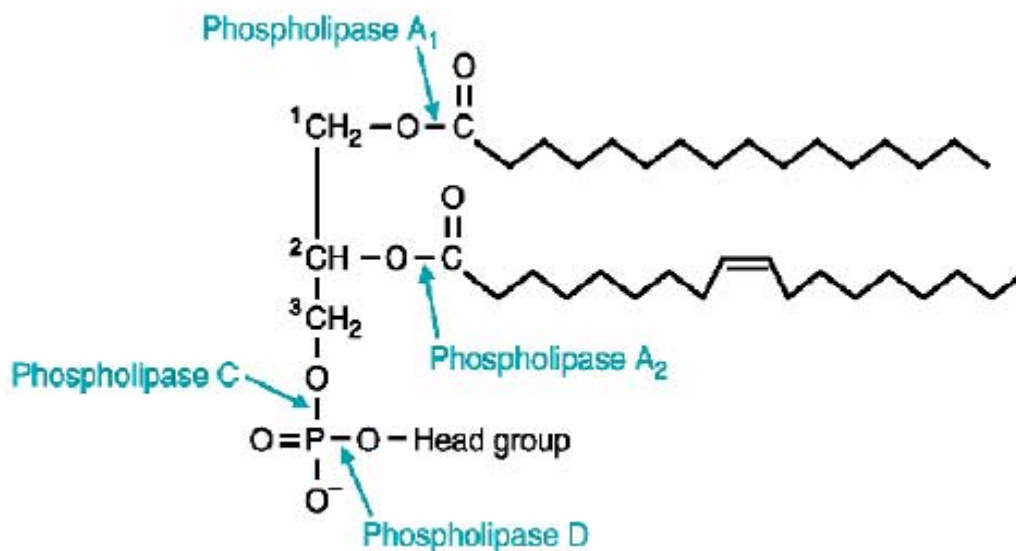
Επιπρόσθετα με την επαγωγή της φλεγμονής, οι κυτοκίνες που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα, παίζουν ενεργό ρόλο στην αναπνευστική οδό ρυθμίζοντας καθοδικά την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Οι κυτοκίνες είναι σημαντικές για την ρύθμιση της φλεγμονής και της ανοσοαπόκρισης στους πνεύμονες [112,113,114,115]. Ενώ η φλεγμονή ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα και ελέγχει τα παθογόνα, η ρύθμιση λαμβάνει χώρα μέσω της επαγωγής άλλων κυτοκινών. Το αναπνευστικό σύστημα διατηρεί ένα περιβάλλον το οποίο τείνει να μειώσει την φλεγμονή [115]. Η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αναστέλλεται από την IL-10 [116]. Η έλλειψη IL-10 στο αναπνευστικό σύστημα σχετίζεται με αυξημένη βλάβη στον ιστό και την φλεγμονή [117]. Η σπουδαιότητα των κυτοκινών αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα επίπεδα της μειώνονται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με άσθμα και σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [118,119,120]. Η ρύθμιση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών από τα κυψελιδικά μακροφάγα βρίσκεται υπό διερεύνηση και η μέχρι τώρα έρευνα έχει δείξει ότι υπάρχουν διαφορές στην παραγωγή κυτοκινών και στη ρύθμιση τους μεταξύ μονοκυττάρων και μακροφάγων [121].





Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>3. ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub>Γενικά

Οι φωσφολιπάσες ( PLAs), αποτελούν μια ευρέως διαδεδομένη κατηγορία ενζύμων, τα οποία μοιράζονται μία κοινή ιδιότητα: την υδρόλυση του ίδιου υποστρώματος, των φωσφολιπιδίων (**εικόνα 7**). Οι φωσφολιπάσες διαθέτουν μια ποικιλομορφία όσον αφορά τον τόπο δράσης τους στα φωσφολιπίδια, τον μηχανισμό και τον τρόπο λειτουργίας τους καθώς και την ρύθμισή τους. Η ευρεία δράση τους και η ποικιλία στην λειτουργία τους υπογραμμίζει την σημαντικότητά τους στον οργανισμό, μια και η συνεχής ανάπλαση των βιολογικών μεμβρανών απαιτεί την παρουσία ενός ή και περισσοτέρων τύπου φωσφολιπασών. Η σημαντικότητά τους όμως, υπερβαίνει τον ρόλο τους στην ομοιοστασία των μεμβρανών. Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι αρκετές φωσφολιπάσες επιτελούν την βιολογική τους λειτουργία ανεξάρτητα της καταλυτικής δράσης τους μέσω πρόσδεσης σε κάποιον ρυθμιστικό υποδοχέα. Πρωτεΐνες όμοιες φωσφολιπασών με τοξικές ιδιότητες αλλά χωρίς λειτουργική καταλυτική περιοχή βρίσκονται στα δηλητήρια. Οι περισσότερες φωσφολιπάσες που



**Εικόνα 7.** Οι δεσμοί-σημεία δράσης των διάφορων φωσφολιπασών στα φωσφολιπίδια



έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής είναι διαλυτές πρωτεΐνες. Αυτή η διαλυτή φύση τους υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδρασή τους με τις κυτταρικές μεμβράνες αποτελεί μέρος των ρυθμιστικών μηχανισμών που υπάρχουν για την ρύθμιση της δημιουργίας σηματοδοτικών μορίων προερχόμενα από λιπίδια, αλλά και της ίδιας της κυτταρικής μεμβράνης 111.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις βιολογικές ιδιότητες των φωσφολιπασών A<sub>2</sub>, τα ένζυμα αυτά μπορούν να καταταχθούν στις παρακάτω κατηγορίες: τις εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> (secretory phospholipases, sPLA<sub>2</sub>), τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου (cytosolic phospholipases, cPLA<sub>2</sub>) και τις ενδοκυττάρια ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου (intracellular phospholipases, iPLA<sub>2</sub>). Εκτός αυτών, υπάρχει και άλλη μια τάξη φωσφολιπασών A<sub>2</sub>, οι γνωστές PAF-ακετυλδρολάσες (PAF-acetylhydrolases, PAF-AcH), οι οποίες επιδρούν στον PAF και στα οξειδωμένα λιπίδια 113,114. Οι κατηγορίες αυτές διαφέρουν τόσο στη δομή τους, όσο και στην απαίτησή τους για ιόντα ασβεστίου, pH, εξειδίκευση υποστρωμάτων και αναστολείς (141,142).

#### Κυτοσολική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>

Η κυτοσολική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) όταν ανακαλύφθηκε, διαφοροποιήθηκε από τις υπάρχουσες κατηγορίες, που αποτελούνταν από εκκρινόμενες φωσφολιπάσες, λόγω του μεγάλου μοριακού της μεγέθους (περίπου 85 kDa), την απουσία πολλαπλών δισουλφιδικών δεσμών και την ύπαρξη ενός καταλυτικού υπολείμματος σερίνης. Όσον αφορά την παραγωγή εικοσανοειδών, δείχνει μια προτίμηση στον διαχωρισμό του αραχιδονικού οξέος από φωσφολιπίδια (143,144). Είναι γεγονός ότι αποτελεί την μοναδική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> που δείχνει εξειδίκευση στο αραχιδονικό οξύ της θέσης sn-2 και αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ξεχωριστή δομή του ενζύμου. Η cPLA<sub>2</sub> απαντάται στο κυττόςολιο ουσιαστικά όλων των κυττάρων που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής και πιθανώς σχετίζεται με σηματοδότηση μέσω υποδοχέων. Η cPLA<sub>2</sub> φωσφορυλιώνεται από MAP κινάσες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ειδική ενεργότητά της. Η cPLA<sub>2</sub> ενεργοποιείται μέσω μεταφοράς από το κυττόςολιο στον πυρηνικό φάκελο με διαδικασίες εξαρτώμενες των ιόντων ασβεστίου (145). Γι' αυτό το σκοπό διαθέτει μια ειδική περιοχή πρόσδεσης λιπιδίων, εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου C-2. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η cPLA<sub>2</sub> αλληλεπιδρά με ενδοκυττάρια μεμβράνες που περιέχουν ανιοντικά λιπίδια και αυτή ακριβώς η



αλληλεπίδραση, μέσω ηλεκτροστατικής απόθησης, κάνει προσβάσιμη την ενεργή περιοχή του ενζύμου (145).

Εκτός από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η ενεργοποίηση της cPLA2 ρυθμίζεται και από φωσφορυλιώσεις των περιοχών σερίνης. Οι MAP κινάσες είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν το ένζυμο, καθιστώντας το έτσι μέρος σημαντικών σηματοδοτικών οδών (146).

Εκτός από την κύρια μορφή της cPLA2, την  $\alpha$ , έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί και παράλογα αυτής. Η cPLA2  $-\beta$ , με μοριακό βάρος 110 kDa και 30% ομολογία στην αλληλουχία βάσεων με την  $-\alpha$ , ο βιολογικός ρόλος της οποίας δεν έχει διευκρινισθεί ακόμα, και η cPLA2  $-\gamma$  με μοριακό βάρος 61 kDa και 29% ομολογία στην αλληλουχία βάσεων η οποία πιθανώς διαδραματίζει ρόλο στην αποπτωτική απόκριση των μακροφάγων σε μυκοβακτήρια (147).

#### Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A2

Οι πρώτες φωσφολιπάσες A2 που αναγνωρίστηκαν, ανήκαν στην κατηγορία των χαμηλού μοριακού βάρους ενζύμων. Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A2 (sPLA2) χαρακτηρίζονται από ένα διατηρημένο μοτίβο που περιέχει καταλυτικά υπολείμματα ιστιδίνης, από το χαμηλό μοριακό τους βάρος (περίπου 14 kDa) και από την χαρακτηριστική τριτοταγή δομή τους η οποία και τις καθιστά ευπαθείς σε καταστολή με διθειοθρεϊτόλη (*dithiothreitol*). Σε αντίθεση με την κυτοσολική, οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A2 δεν εμφανίζουν κάποια προτίμηση για αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων. Οι sPLA2 διαφοροποιούνται μεταξύ τους όσον αφορά την δομή και την κατανομή τους στους ιστούς. Έχουν αναφερθεί ειδικοί για τις sPLA2 υποδοχείς, παρόμοιοι δομικά με τον υποδοχέα μανόζης, υποδηλώνοντας έτσι επιπλέον μη-ενζυμικές λειτουργίες των ενζύμων αυτών στην κυτταρική σηματοδότηση (148).

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί έξι διαφορετικά είδη εκκρινόμενων φωσφολιπασών A2 και έχουν ταξινομηθεί σε διαφορετικές κατηγορίες (*IB, IIA, IID, IIE, V & X*). Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A2 λαμβάνουν μέρος σε μια πληθώρα παθολογικών διαδικασιών, μέσω της απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια και οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην παραγωγή μιας πληθώρας φλεγμονωδών λιπιδικών μεσολαβητών όπως οι προσταγλανδίνες (*prostaglandins, PGs*), τα θρομβοξάνια (*Thromboxanes, TXs*) και τα λευκοτριένια (*Leukotriens, LTs*).



Η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A2 τύπου V διαθέτει μια τρυπτοφάνη στην περιοχή πρόσδεσης η οποία, εν μέρει, είναι υπεύθυνη για την ικανότητά της να υδρολύει κυτταρικές μεμβράνες. Εξωγενώς προστιθέμενη τύπου V μπορεί να επιφέρει υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης με επακόλουθη ενεργοποίηση της cPLA2 και αύξηση στη σύνθεση λευκοτριενίων. Η αφαίρεση της τρυπτοφάνης με μετάλλαξη, μειώνει αισθητά την αποτελεσματικότητα του ενζύμου. Όπως και η τύπου IIΑ, έτσι και η V προσδένεται σε πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας και εσωτερικεύεται.

Ωστόσο, αυτή η μετακίνηση στο εσωτερικό του κυττάρου ακολουθείται από αποικοδόμηση του ενζύμου και όχι από παραγωγή εικοσανοειδών. Οι φαινομενικές διαφορές στην κυτταρική πορεία που ακολουθούν οι τύπου IIΑ και V φωσφολιπάσες μπορεί να οφείλεται και στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων στα οποία έχουν μελετηθεί. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι η sPLA2 V επάγεται από φλεγμονώδεις παράγοντες, μεσολαβεί για την καθυστερημένη απόκριση της βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλογλυκερόλης και υποβοηθά την ενεργοποίηση των ιστιοκυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές τις ιδιότητες απαντώνται και στην τύπου IIΑ.

### Βιολογικές πηγές φωσφολιπασών A2

#### *Πνεύμονας*

Κυτοσολικές, εκκρινόμενες και ανεξάρτητες ασβεστίου φωσφολιπάσες A2 έχουν ανιχνευθεί σε πνεύμονες. Ειδικότερα μια μορφή κυτοσολικής φωσφολιπάσης έχει βρεθεί στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Αυτή η μορφή φαίνεται να έχει εξειδίκευση στο αραχιδονικό οξύ και μεταφέρεται από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη. Η μεταφορά αυτή είναι εξαρτώμενη των ιόντων ασβεστίου και στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7 ρυθμίζεται από πρωτεϊνικές κινάσες (149,150). Μια λυσοσωμιακή μορφή, ανεξάρτητη των ιόντων ασβεστίου (aiPLA2) πιθανολογείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό της DPPC κατά την ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, αλλά και στην βιοσύνθεση της DPPC από τα ίδια κύτταρα. Η μορφή αυτή φαίνεται να συσχετίζεται με τα πολυστοιβαδωτά σωμάτια (151). Ωστόσο ο φυσιολογικός ρόλος και η λειτουργία της PLA2 στα σωμάτια αυτά δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως, μια και απαντάται παρουσία της SP-A, πρωτεΐνη που αναστέλλει το ένζυμο (152).



### *Κύτταρα*

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις cPLA2 (153). Αύξηση της cPLA2 σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή PGE2 σε ενεργοποιημένους ινοβλάστες (154). Η IFN- $\gamma$  επιφέρει σύνθεση και ενεργοποίηση της cPLA2 σε κυτταρικές σειρές βρογχικού επιθηλίου (BEAS 2B) (155). Η iPLA2 έχει βρεθεί στο κυτοσόλιο της κυτταρικής σειράς μακροφάγων P388D1 (156). Η cPLA2 έχει βρεθεί σε επιθηλιακά κύτταρα που υφίστανται δυνάμεις μηχανικής τάσης (157). Οι sPLA2 και cPLA2 έχουν βρεθεί σε BAL και μακροφάγα αντίστοιχα (158). Η cPLA2 έχει βρεθεί αυξημένη σε καρδιακό ιστό μυών με σήψη (159). Στα ουδετερόφιλα, οι cPLA2 και sPLA2 προκαλούν απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών (160), ενώ στα κύτταρα HeLa η cPLA2 σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης (161). Στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα η cPLA2 επιφέρει παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (162). Αυξημένα επίπεδα εκκρινόμενης PLA2 έχουν βρεθεί στο BAL ασθενών με άσθμα, ενώ τα ηωσινόφιλα από ίδιους ασθενείς έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση αραχιδονικού οξέος από τα αντίστοιχα του αίματος (164). Τα κυψελιδικά μακροφάγα αποτελούν την κύρια sPLA2-ΠΑ σε πειραματικά μοντέλα οξείας πνευμονικής βλάβης (165).

### *Πλάσμα*

Η sPLA2 έχει βρεθεί σε βιολογικά υγρά φλεγμονής, ενώ τα επίπεδα του ενζύμου στο αίμα ή πλάσμα είναι αυξημένα σε φλεγμονώδεις νόσους όπως σήψη, παγκρεατίτιδα, περιτονίτιδα (166,167,168). Τα επίπεδα PLA2 στον ορό ασθενών με παγκρεατίτιδα και σήψη εμφανίζονται αυξημένα και σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης οξείας πνευμονικής βλάβης (169). Αυξημένη συγκέντρωση PLA2 σε ορό έχει βρεθεί σε πειραματικά μοντέλα οξείας παγκρεατίτιδας και σχετίζονται θετικά με τη βαρύτητα της επερχόμενης πνευμονικής ανεπάρκειας (170).

### Φωσφολιπάσες A2 και φλεγμονή

Αν και διαθέτουμε ικανοποιητική γνώση όσον αφορά την ενζυμολογία των φωσφολιπασών και τις συνέπειες της υπέρ-έκφρασής τους στα κύτταρα, οι βιολογικοί τους ρόλοι δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως ακόμη. Αν και η ύπαρξη μιας πληθώρας διαφορετικών ισοενζύμων είναι το λιγότερο ενδιαφέρον, η μελέτη τους αποτελεί επίπονο έργο. Η διατηρημένη καταλυτική περιοχή τους αποτελεί πρόκληση για την



σύνθεση αναστολέων εξειδικευμένων για το κάθε ενζυμικό είδος. Προηγούμενες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν γενετικές τεχνικές για την διακοπή της έκφρασης της cPLA<sub>2</sub> υποδεικνύουν ότι αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την διάκριση των βιολογικών ρόλων των διαφορετικών ισοενζύμων. Η sPLA<sub>2</sub> τύπου AII είναι το πιο μελετημένο ισοένζυμο. Από την ανακάλυψή της (171,172,173) και μετέπειτα έχει εμπλακεί σε μια πληθώρα φλεγμονωδών διαδικασιών και θεωρείται πλέον πρωτεΐνη οξείας φάσης (*acute phase protein*). Αυξημένα επίπεδα του ενζύμου στην κυκλοφορία του αίματος έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις παγκρεατίτιδας (174), σηπτικού σοκ (175) και εγκαυμάτων (176). Παρόλαυτά η πρόσφατη ανακάλυψη της sPLA<sub>2</sub> τύπου V ώθησε τους ερευνητές σε επανεξέταση ορισμένων από τους βιολογικούς ρόλους που αρχικά είχαν αποδοθεί στην sPLA<sub>2</sub> τύπου AII. Έτσι, η θνητότητα μυών ως απόκριση στο σηπτικό σοκ μειώθηκε όχι μόνο μετά τη χορήγηση αναστολέα κατά της εκκρινόμενης τύπου AII αλλά και μετά από παύση του γονιδίου του υποδοχέα τύπου M, του οποίου η τύπου AII είναι ισχνός προσδέτης (177).

### Φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> και απόπτωση

#### cPLA<sub>2</sub> και απόπτωση

Η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σχετίζεται με αλλαγές στο μεταβολισμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων. Σε μερικά είδη κυττάρων που υφίστανται απόπτωση, η ελευθέρωση του AA είναι παράλληλη με την μείωση της βιωσιμότητας του κυττάρου και της κατάτμησης του DNA.

Ο Wolf και ο Laster ανέφεραν ότι το AA ελευθερώνεται από κύτταρα που υφίστανται απόπτωση μέσω του TNF-α [178]. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι μια συγκεκριμένη φωσφολιπάση εμπλέκεται στη λυτική διαδικασία (lytic process). Έχει αναφερθεί ότι η cPLA<sub>2</sub> εμπλέκεται σε αρκετές κυτταροτοξικές αντιδράσεις, όπως ο τραυματισμός των επιδερμικών κυττάρων που επάγεται από το UV, η κυτταροτοξικότητα που επάγεται από οξειδωμένες ουσίες και ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από τον TNF-α [179].

Η απόπτωση που επάγεται από το Fas είναι ανεξάρτητη από την cPLA<sub>2</sub> επειδή η στραυροσύνδεση αυτού του υποδοχέα επάγει τον κυτταρικό θάνατο εξίσου καλά με την έλλειψη και την έκφραση της cPLA<sub>2</sub> στα κύτταρα L929 [180]. Επομένως, ο υποδοχέας του Fas και ο TNFR1 φαίνεται να ενεργούν μέσω διαφορετικών οδών για



την επαγωγή της απόπτωσης. Πολλά είδη κυττάρων δεν σκοτώνονται από τον TNF- $\alpha$ , υπάρχουν όμως μερικά που είναι ευαίσθητα στον TNF- $\alpha$  μετά από προσθήκη αναστολέων της μεταγραφής ή της μετάφρασης, ή αδενοϊών, και αυτή η ευαισθησία σχετίζεται με τα επίπεδα της cPLA<sub>2</sub> [181]. Αρκετοί προτείνουν ότι η ενεργότητα της cPLA<sub>2</sub> και του AA μπορεί να συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, το AA μπορεί να ενεργοποιήσει την σφιγγομυελινάση, προκαλώντας την παραγωγή κεραμιδίου και απόπτωση [182], αν και μελέτες προτείνουν ότι το κεραμίδιο είναι σημαντικός διαμεσολαβητής του κυτταρικού θανάτου [183].

Έχει αναφερθεί ότι η cPLA<sub>2</sub> ενεργοποιείται από τις κασπάσες στην απόπτωση που επάγεται από τον TNF [184]. Ομοίως, η απώλεια του σήματος επιβίωσης από την εξωκυττάρια μήτρα προκαλεί απόπτωση, και αναστέλλεται από τον αναστολέα της cPLA<sub>2</sub>, τον AACOCF3 [185]. Σ' αυτό το πείραμα ο αναστολέας AACOCF3 δεν είναι ειδικός για την cPLA<sub>2</sub>, αλλά αναστέλλει και την iPLA<sub>2</sub> τύπου VI. Επιπλέον, μπορεί να αναστείλει το COX [186]. Από την άλλη μεριά, η ελευθέρωση του AA που επάγεται από το Fas στην απόπτωση οφείλεται στην iPLA<sub>2</sub> απ' ότι στην cPLA<sub>2</sub> [188], της οποίας η ενζυμική δραστηριότητα αναστέλλεται από την διάσπαση που οφείλεται στην κασπάση-3 αν και η διαταραγμένη μεμβράνη των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση είναι ευαίσθητη στην sPLA<sub>2</sub> II [187].

Αναστολείς όπως η πυροφαινόνη για την cPLA<sub>2</sub> και το BEL για την iPLA<sub>2</sub> είναι χρήσιμοι για να καθοριστούν οι ακριβείς ρόλοι της cPLA<sub>2</sub> και της iPLA<sub>2</sub> στην απόπτωση.

Άλλη μια απόδειξη για την εμπλοκή της cPLA<sub>2</sub> στην απόπτωση προέρχεται από την απομόνωση μιας νέας πρωτεΐνης της cPLA<sub>2</sub>-interacting protein (PLIP) η οποία αλληλεπιδρά με την cPLA<sub>2</sub> μέσα στον πυρήνα [189]. Η έκφραση της PLIP επάγει την απόπτωση σε κύτταρα ποντικού αλλά όχι σε κύτταρα από cPLA<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice. Συνεπώς, η PLIP αλληλεπιδρά με την cPLA<sub>2</sub> και κάνει πιο αποτελεσματική την παραγωγή PGE<sub>2</sub> που οφείλεται στην cPLA<sub>2</sub> και στην απόπτωση.

#### sPLA<sub>2</sub> και απόπτωση

Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν το ρόλο της sPLA<sub>2</sub> στην απόπτωση. Η διέγερση της απόπτωσης από την cPLA<sub>2</sub> μπορεί εν μέρει να οφείλεται στις sPLA<sub>2</sub>s, επειδή ρυθμίζονται από την cPLA<sub>2</sub> [190-194]. Μελέτες αναφέρουν ότι η sPLA<sub>2</sub> συμβάλλει



στην απόπτωση των λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών. Αντίθετα, η ανασυνδυασμένη sPLA<sub>2</sub> φαίνεται να εμποδίζει την απόπτωση των ιστιοκυττάρων, αν και το AA δεν επηρεάζει την επιβίωση τους και η ανενεργός μορφή της sPLA<sub>2</sub> φαίνεται να αναστέλλει την απόπτωση [195]. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η αναστολή της απόπτωσης προκαλείται από την πρόσδεση της sPLA<sub>2</sub> σε υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια σηματοδότηση [196] που καταλήγει στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### 4. ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ Η ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ

#### Γενικά

Ο μηχανικός αερισμός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της βασικής υποστήριξης των οργάνων στις μονάδες εντατικής θεραπείας εδώ και αρκετές δεκαετίες. Ήδη από την αρχή επισημάνθηκαν δυνητικές επιπλοκές που συνοδεύουν την εφαρμογή του, τόσο από το αναπνευστικό σύστημα (όπως πνευμοθώρακας, αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων του αναπνευστικού, ατελεκτασίες, κ.λπ), όσο και από άλλα συστήματα (διαταραχές κυκλοφορικού, προβλήματα που σχετίζονται με την καταστολή του ασθενούς κλπ) (1). Η εκτεταμένη εφαρμογή του τις τρεις τελευταίες δεκαετίες ανέδειξε όμως και άλλες, λιγότερο ηχηρές κλινικά, αλλά εξίσου σημαντικές βλάβες που προκαλεί ο μηχανικός αερισμός στο πνευμονικό παρέγχυμα. Η επίπτωση των βλαβών αυτών φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τον αερισμό των ασθενών με ALI (Acute Lung Injury), η ακραία μορφή του οποίου είναι το ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome).

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην εντατική θεραπεία η θνητότητα των ασθενών με ARDS παραμένει αρκετά ψηλή. Πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι ο μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλεί πνευμονική βλάβη και να σχετίζεται με σημαντική επιβάρυνση της νοσηρότητας και της θνητότητας στο ARDS. Η βλάβη που προκαλεί ο ανανευστήρας σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χαρακτηρίζεται σαν VALI (Ventilator-Associated Lung Injury), δεδομένου ότι προς το παρόν μόνο η πιθανολόγησή της είναι δυνατή. Αντίθετα στα πειραματόζωα, στα οποία είναι μεθοδολογικά δυνατή η σύνδεση της βλάβης με το μηχανικό αερισμό, η βλάβη αυτή περιγράφεται σαν VILI (Ventilator-Induced Lung Injury)(122).

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο στο VALI, είναι η ενδεχόμενη συστηματική του διάσταση. Έχει βρεθεί ότι περισσότεροι ασθενείς με ARDS πεθαίνουν από ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και όχι από υποξία, όπως θα περίμενε κανείς. Η υπόθεση που έχει προταθεί για να εξηγήσει το φαινόμενο αυτό είναι ότι ο μηχανικός αερισμός όχι μόνο επιδεινώνει την προϋπάρχουσα πνευμονική βλάβη, αλλά συμβάλλει και στην ανάπτυξη συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS, Systemic Inflammatory Reaction Syndrome), που μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (MSOF, Multisystem Organ Failure) (122). Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση η μηχανική καταπόνηση του πνευμονικού παρεγχύματος, είτε με τη μορφή της υπερδιάτασης των



πνευμονικών κυψελίδων, είτε/και με τη μορφή της επαλαμβανόμενης έκπτυξης και σύμπτυξης των ατελεκτατικών περιοχών του πνεύμονα προκαλούν ή επιδεινώνουν την προϋπάρχουσα πνευμονική βλάβη και πυροδοτούν φλεγμονή. Οι μηχανικές καταπονήσεις του πνευμονικού παρεγχύματος μπορεί να είναι 3 ειδών: η καταπόνηση από διατμητικές τάσεις, η μηχανική παραμόρφωση (mechanical strain) και η δύναμη συμπίεσης από την σύσπαση των λείων μυικών ινών στους αεραγωγούς. Η άσκηση κάποιας δύναμης οδηγεί στην τριδιάστατη παραμόρφωση των κυττάρων.

Δεν υπάρχουν στοιχεία από κλινικές μελέτες που να αφορούν την επίπτωση του μηχανικού αερισμού σε μη παθολογικό πνευμονικό παρέγχυμα, αν και η αυξημένη επίπτωση παθολογικών εκδηλώσεων από τους πνεύμονες μηχανικά αεριζόμενων ασθενών χωρίς πνευμονική νόσο, υπαινίσσεται κάτι τέτοιο. Το σημαντικό ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι αν οι παρατηρηθείσες διαταραχές μπορούν να προληφθούν, δεδομένου ότι σήμερα δεν υπάρχουν δείκτες πρόωμης αναγνώρισης και παρακολούθησης της βλάβης, στοιχείο σημαντικό για την αποτροπή και την αντιμετώπισή της.

Οι περισσότεροι ασθενείς πεθαίνουν από ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και όχι από υποξία, όπως θα περίμενε κανείς. Η επικρατέστερη υπόθεση που έχει προταθεί για να εξηγήσει αυτά τα φαινόμενα είναι ότι ο ίδιος ο μηχανικός αερισμός είναι υπεύθυνος όχι μόνο για την επιδείνωση της προϋπάρχουσας πνευμονικής βλάβης, αλλά και για την ανάπτυξη μιας συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS, Systemic Inflammatory Reaction Syndrome) και της ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων (MSOF, MultiSystem Organ Failure) (122). Η μηχανική αναπνοή πιθανώς μπορεί να δώσει το έναυσμα μιας φλεγμονώδους απόκρισης, η οποία στη συνέχεια ενισχύεται και εξαπλώνεται με τρόπο χαρακτηριστικό για τη μεταγωγή των σημάτων σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα. Ο μηχανικός αερισμός των πνευμόνων αποτελεί ένα *in vivo* μοντέλο μελέτης της μηχανικής διάτασης που θα δούμε στη συνέχεια σε *in vitro* συνθήκες στην εργασία μας.

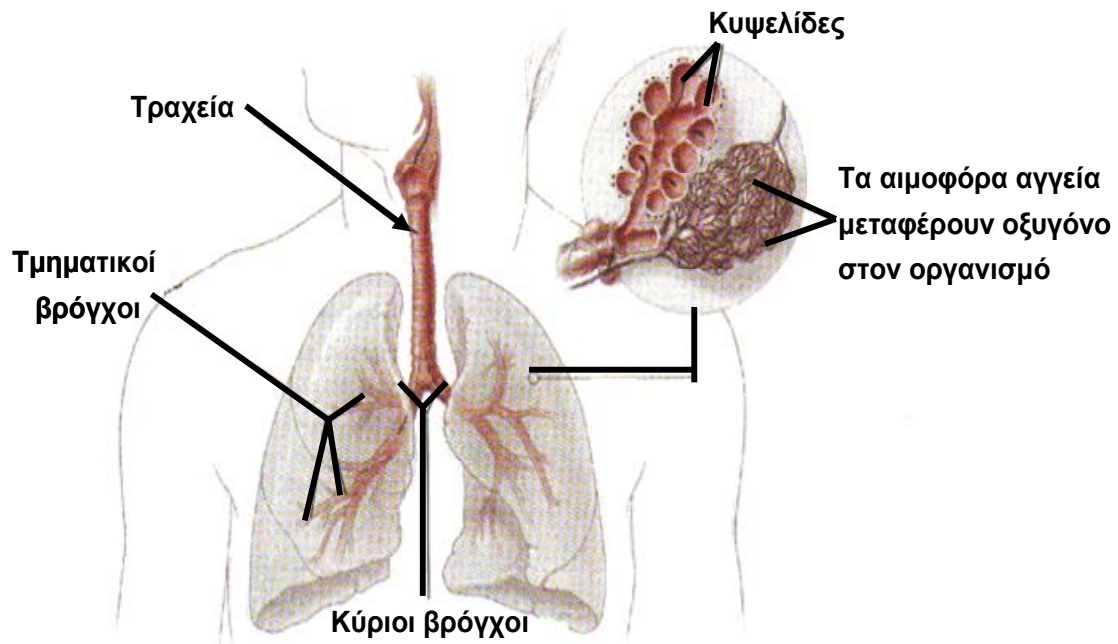
### **Το αναπνευστικό σύστημα**

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τις ρινικές κοιλότητες, το στοματική και ρινική μοίρα του φάρυγγα, το λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους και τους πνεύμονες.

Ο λάρυγγας προς τα κάτω συνεχίζεται με την τραχεία που είναι ένας σωλήνας μήκους 10 cm. Στο κάτω άκρο της η τραχεία χωρίζεται σε δύο κλάδους, τον αριστερό και δεξιό. Κάθε βρόγχος μπαίνει στο σύστοιχο πνεύμονα από την πύλη (είναι το σημείο



από το οποίο μπαίνουν στον πνεύμονα ο βρόγχος και η πνευμονική αρτηρία και βγαίνουν οι πνευμονικές φλέβες).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση του αναπνευστικού συστήματος.

Ο βρόγχος, αφού μπει στο σύστοιχο πνεύμονα διαιρείται, όπως τα κλαδιά ενός δένδρου (βρογχικό δένδρο), σε μικρότερους κλάδους οι οποίοι όταν αποκτήσουν διάμετρο 1 mm, καλούνται βρογχιόλια. Κάθε βρογχιόλιο συνεχίζει να διακλαδίζεται και οι τελικές διακλαδώσεις του εμφανίζουν στα τοιχώματά τους μικρά εκκολπώματα που λέγονται κυψελίδες. Οι διακλαδώσεις αυτές επειδή έχουν κάποια αναπνευστική λειτουργία, εξαιτίας των κυψελίδων, λέγονται αναπνευστικά βρογχιόλια. Κάθε αναπνευστικό βρογχιόλιο χωρίζεται σε 2-3 μικρούς κλάδους (κυψελωτοί πόροι) και κάθε ένας από αυτούς χωρίζεται σε 2-3 διευρισμένους κλάδους τα αεροθυλάκια. Στο τοίχωμα των κυψελωτών πόρων και των αεροθυλακίων υπάρχουν πολλές κυψελίδες. Οι κυψελίδες περιβάλλονται από πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων και σε αυτές γίνεται η ανταλλαγή των αερίων κατά την εισπνοή και την εκπνοή .

Οι κυψελίδες αποτελούνται από τη βασική μεμβράνη και από δύο είδη κυττάρων τα τύπου I, που είναι και τα πολυπληθέστερα και τα τύπου II. Τα κύτταρα τύπου II είναι λιγότερα (αποτελούν μόλις το 3 %) και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι



περιέχουν μικρά σωματίδια τα στιβαδωτά (Llamellar Bodies, LB). Τα σωματίδια αυτά εμπλέκονται στην παραγωγή, αποθήκευση και έκκριση του επιφανειοδραστικού υλικού που ονομάζεται επιφανειοδραστικός παράγοντας (surfactant).

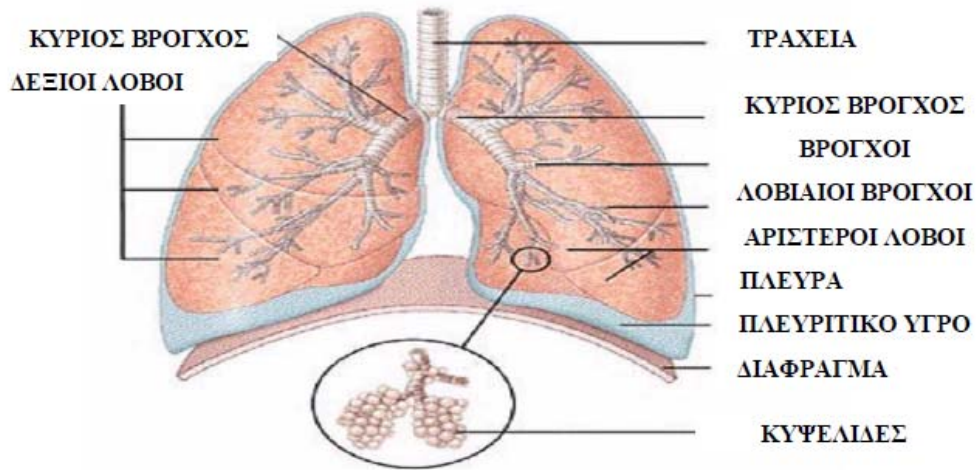
### **Βασική λειτουργία των πνευμόνων**

Η βασική λειτουργία των πνευμόνων είναι η ανταλλαγή του οξυγόνου ( $O_2$ , πρόσληψη) και του διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ , αποβολή) μεταξύ του αίματος, των πνευμονικών τριχοειδών και του κυψελιδικού αέρα μέσω της τριχοειδικής μεμβράνης, μιας διαχωριστικής μεμβράνης μεταξύ του κυψελιδικού χώρου και του αίματος. Η επιτέλεση αυτή της λειτουργίας απαιτεί, εκτός των άλλων, τη μετακίνηση μεγάλων όγκων αέρα από το περιβάλλον προς τις κυψελίδες και αντίθετα. Η μετακίνηση αυτή γίνεται μέσω του συστήματος των αεραγωγών που αρχίζει από τη μύτη και το στόμα, συνεχίζεται με το φάρυγγα, το λάρυγγα, τους αεραγωγούς μεγαλύτερης διαμέτρου (τραχεία 2 cm) και φθάνει σε αεραγωγούς πολύ μικρής διαμέτρου (βρογχιόλια <2 mm).

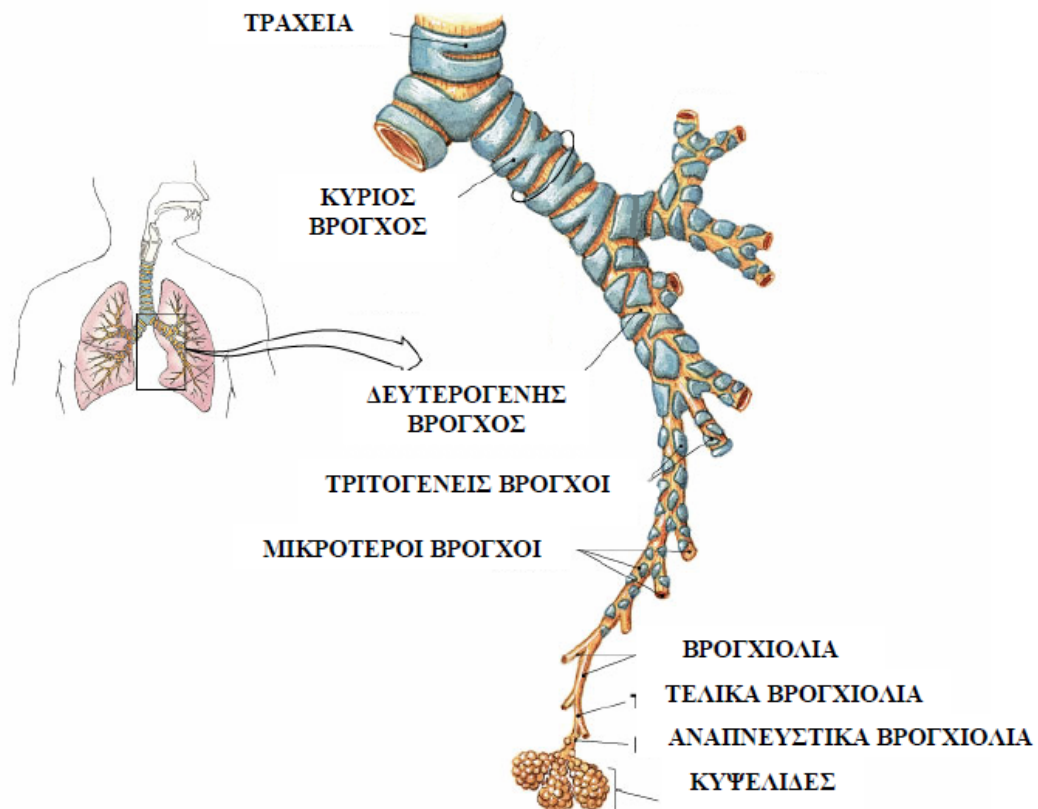
### **Ο πνεύμονας**

Ο ενήλικος πνεύμονας ζυγίζει 300 με 400 γραμμάρια και αποτελείται από 3 λοβούς δεξιά και 2 αριστερά. Οι πνεύμονες διαθέτουν διπλή παροχή αίματος, από την πνευμονική κυκλοφορία η οποία μεταφέρει το αίμα από την δεξιά κοιλία διαμέσου της πνευμονικής αρτηρίας και των πνευμονικών φλεβών στον αριστερό κόλπο και τις βρογχικές αρτηρίες, οι οποίες αποτελούν μέρος της συστημικής κυκλοφορίας. Οι πνεύμονες αποτελούνται από ένα σύστημα αεροφόρων οδών, μια σειρά διακλαδιζόμενων σωλήνων, οι οποίοι όσο πιο βαθιά στο πνευμονικό παρέγχυμα εισχωρούν, τόσο στενότεροι, βραχύτεροι και πολυπληθέστεροι γίνονται (**εικόνα 9**). Η τραχεία διαιρείται στον αριστερό και στον δεξιο κύριο βρόγχο όπου ο έκαστος διαιρείται στους λοβιαίους βρόγχους και εν συνεχεία στους τμηματικούς. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τον σχηματισμό των τελικών βρογχολίων, τα οποία με την εμφάνιση τοιχωματικών κυψελίδων μετατρέπονται σε αναπνευστικά και στη συνέχεια μεταπίπτουν στους κυψελιδικούς πόρους και τους κυψελιδικούς σάκους οι οποίοι και αποτελούνται πλήρως από κυψελίδες. Η κυψελιδική αυτή περιοχή στην οποία πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων είναι γνωστή ως αναπνευστική ζώνη.





Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου πνεύμονα.

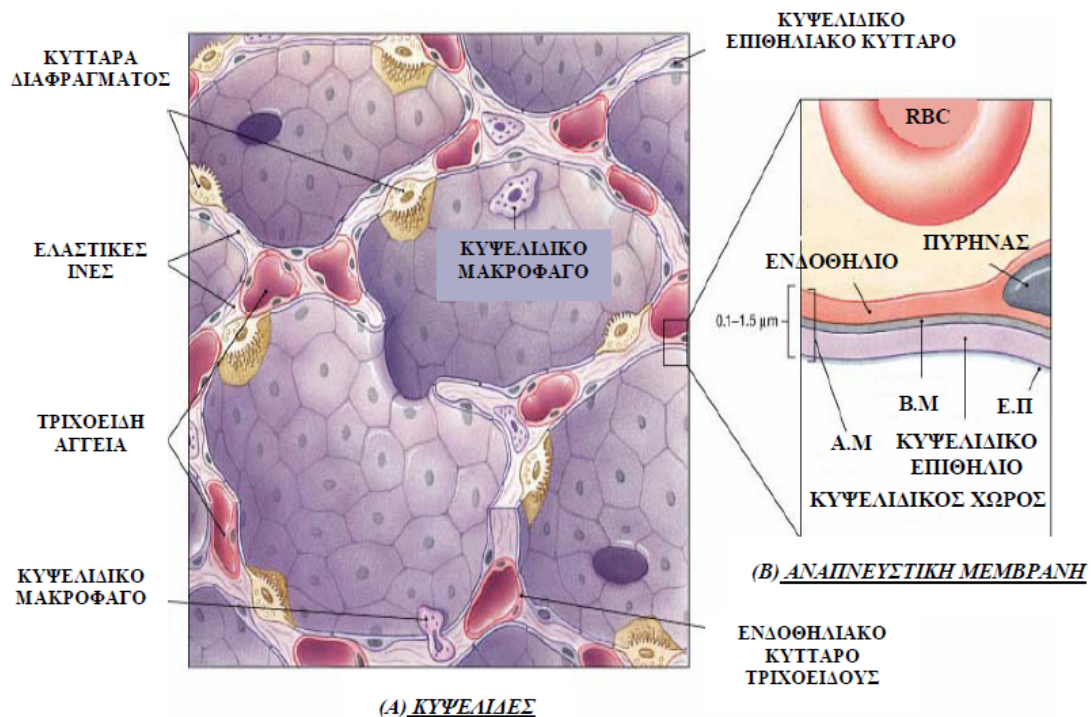


Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του βρογχικού δέντρου των πνευμόνων. Οι αεροφόροι οδοί ξεκινούν από την τραχεία και καταλήγουν στην αναπνευστική ζώνη, τις κυψελίδες.



Τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα

Η τριχοειδοκυψελιδική μεμβράνη αποτελείται από μια στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία διαχωρίζεται από το κυψελιδικό επιθήλιο μέσω μιας βασικής μεμβράνης. Οι επιθηλιακές και ενδοθηλιακές επιφάνειες συνδέονται με τη ρύθμιση της ανταλλαγής διαλυτών ουσιών στο πνευμονικό παρέγχυμα. Τα κυψελιδικά τριχοειδή επιτρέπουν την ελεύθερη μετακίνηση υγρού και μικρών διαλυτών ουσιών από τον αγγειακό χώρο προς την βασική μεμβράνη. Σε αντίθεση, το κυψελιδικό επιθήλιο δημιουργεί έναν εξειδικευμένο φραγμό που περιορίζει την μετακίνηση νερού και ιόντων προς τις κυψελίδες. Αν και η τριχοειδική επιφάνεια των κυψελίδων αποτελείται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα, ο κυψελιδικός χώρος καλύπτεται από τουλάχιστον 2 τύπους επιθηλιακών κυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου I καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας των κυψελίδων, ενώ τα τύπου II πολύ μικρότερο, αν και είναι τα κύτταρα υπεύθυνα για την σύνθεση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η αλληλεπίδραση αυτών των 2 επιθηλιακών κυτταρικών τύπων αποτελεί τον φραγμό για την μετακίνηση διαλυτών ουσιών στον πνεύμονα.



**Εικόνα 11.** Σχηματική αναπαράσταση (A) του κυψελιδικού χώρου και των κυττάρων αυτού καθώς και (B) της αναπνευστικής μεμβράνης που σχηματίζεται μεταξύ του κυψελιδικού χώρου και των τριχοειδών αγγείων της πνευμονικής κυκλοφορίας.

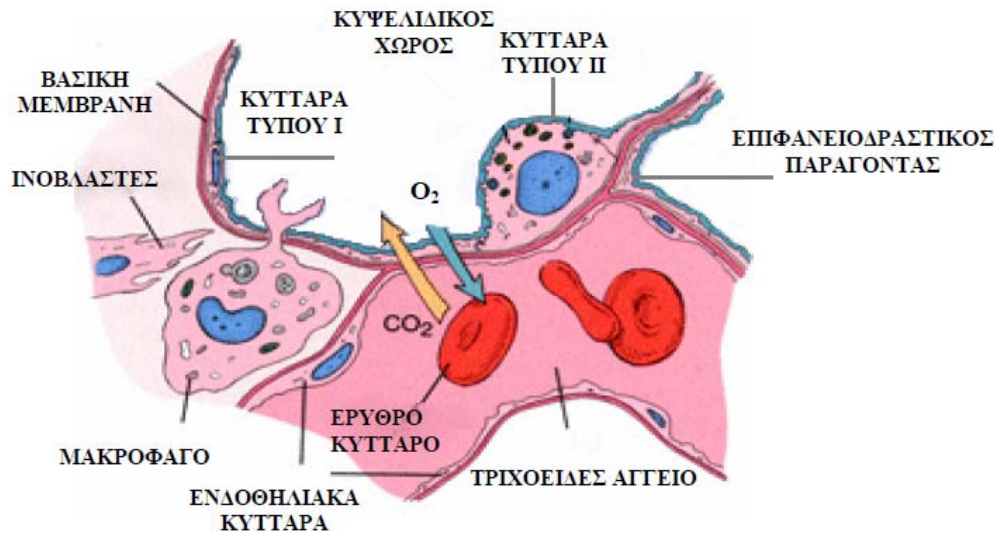


Όπου:

A.M= Αναπνευστική μεμβράνη

B.M= Βασική μεμβράνη

E.Π=Επιφανειοδραστικός παράγοντας



**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού μιας κυψελίδας. Διαφαίνονται τα κύτταρα τύπου I και II που καλύπτουν την επιφάνεια των κυψελίδων, καθώς και ο επιφανειοδραστικός παράγοντας. Τα τριχοειδή αγγεία χωρίζονται από το κυψελιδικό επιθήλιο μέσω μιας βασικής μεμβράνης.

### Κυψελιδικό επιθήλιο

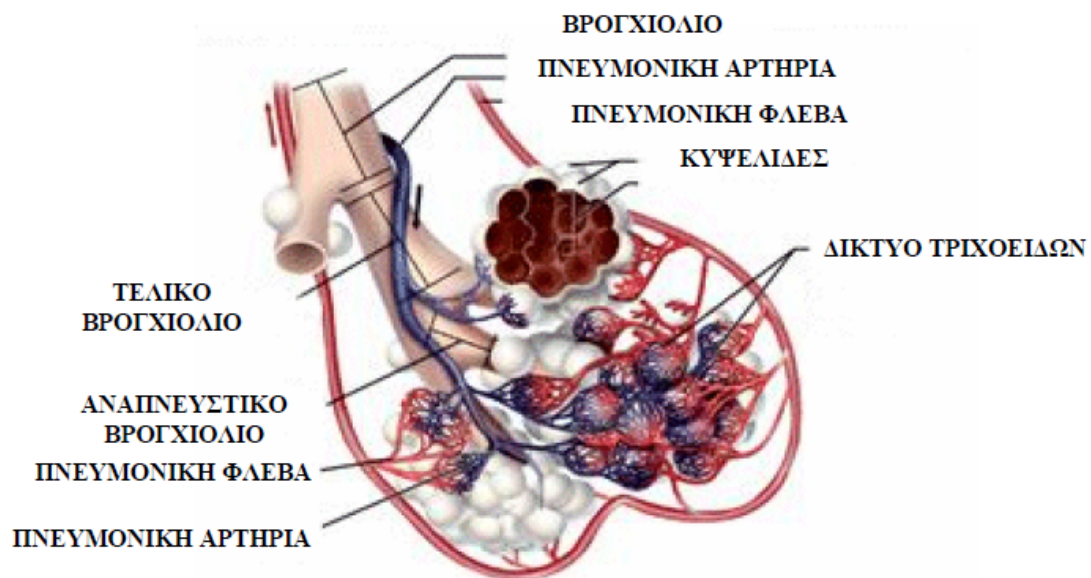
Το κυψελιδικό επιθήλιο, σχηματίζει μια κυψελιδική επένδυση και αποτελεί ένα μωσαϊκό δύο διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών. Το μεγαλύτερο ποσοστό της κυψελιδικής επιφάνειας καλύπτεται από μεγάλου μεγέθους επίπεδα κύτταρα, γνωστά ως πνευμονοκύτταρα τύπου I, τα οποία και αποτελούν τα δομικά στοιχεία ενός εξαιρετικά λεπτού φράγματος διάχυσης αερίων. Ο δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός που αποτελεί το κυψελιδικό επιθήλιο είναι τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Τα κύτταρα αυτά έχουν κυβοειδές σχήμα, καλύπτοντας έτσι μικρότερη επιφάνεια, και σε αντίθεση με τα πνευμονοκύτταρα τύπου I διαθέτουν πληθώρα κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.



### Κυψελιδικά τριχοειδή αγγεία

Τα αιμοφόρα αγγεία των πνευμόνων σχηματίζουν ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων σωλήνων που αρχίζει από την πνευμονική αρτηρία, φτάνει στα τριχοειδή και καταλήγει στις πνευμονικές φλέβες. Το δίκτυο των τριχοειδών είναι τόσο πυκνό του σχηματίζει ένα συνεχές στρώμα αίματος μέσα στο τοίχωμα των κυψελίδων, δομή ιδιαίτερα αποδοτική για την πραγματοποίηση της ανταλλαγής των αερίων.

Η διάμετρος του κάθε τριχοειδούς αγγείου στην απόληξή του είναι περίπου όση και η αντίστοιχη ενός ερυθρού κυττάρου. Το κάθε ερυθροκύτταρο παραμένει για περίπου ένα δευτερόλεπτο μέσα στο τριχοειδικό δίκτυο και κατά την διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου διέρχεται από δύο με τρεις κυψελίδες. Η ανατομική διάταξη της περιοχής εξυπηρετεί τόσο ικανοποιητικά την διαδικασία της ανταλλαγής των αερίων, που το μικρό αυτό χρονικό διάστημα είναι επαρκές για την πλήρη εξίσωση των συγκεντρώσεων του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ του κυψελιδικού αέρα και του τριχοειδικού αίματος. Το εσωτερικό των τριχοειδών αγγείων καλύπτεται από το ενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο μοιράζεται την βασική μεμβράνη με το κυψελιδικό επιθήλιο.



**Εικόνα 13.** Σχηματική αναπαράσταση κυψελίδας και κυψελιδικών τριχοειδών αγγείων. Στο σχήμα διαφαίνεται το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων που περιβάλλει όλη την κυψελιδική επιφάνεια.





## Μηχανική του πνευμονικού αερισμού

### Φυσιολογική αναπνοή

Η εισπνοή είναι αποτέλεσμα σύσπασης των αναπνευστικών μυών και γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με την εισπνευστική κίνηση του διαφράγματος. Η σύσπαση των μυών αυτών παράγει πίεση που θα προκαλέσει διάταση του θωρακικού κλωβού την οποία θα ακολουθήσει διάταση του πνεύμονα. Η πίεση (P, pressure) που παράγεται λόγω εφαρμογής δύναμης (F, Force) στις προσφύσεις των αναπνευστικών μυών λέγεται πίεση διάτασης (distending pressure) και καταναλώνεται για να υπερνικήσει τα εμπόδια που παρεμβάλλονται κατά τη διεργασία της διάτασης του συστήματος (θώρακας-πνεύμονας). Αυτά τα εμπόδια είναι τα εξής:

1. *Ελαστικότητα.* Ελαστικότητα πνευμόνων και θωρακικών τοιχωμάτων.
2. *Αντίσταση.* Αντίσταση των αεραγωγών στη ροή αέρα μέσω αυτών.
3. *Αντίσταση των ιστών του πνεύμονα και του θωρακικού κλωβού.* Δηλαδή την αντίσταση στην παραμόρφωση των πνευμόνων του θωρακικού κλωβού και των μορίων της κοιλιάς.
4. *Αδράνεια του συστήματος.* Το εύρος των αναπνευστικών κινήσεων και το επίπεδο ισορροπίας του συστήματος (θώρακας-πνεύμονας) στο τέλος της εκπνοής (ο όγκος των πνευμόνων στο τέλος μιας φυσιολογικής ήρεμης εκπνοής, Functional Residual Capacity, FRC) καθορίζονται από τη σχέση που υπάρχει μεταξύ διατασιμότητας (compliance) του θωρακικού τοιχώματος και του πνεύμονα, και της πίεσης που παράγεται κατά τη σύσπαση των εισπνευστικών μυών. Τα προηγούμενα γίνονται κατανοητά αν παρακολουθήσουμε τις μεταβολές των ελαστικών δυνάμεων του συστήματος (θώρακας-πνεύμονας) στον αναπνευστικό κύκλο. Η πίεση που προκαλεί διάταση του πνεύμονα προέρχεται από σύσπαση των αναπνευστικών μυών. Η διάταση προκαλεί ανάπτυξη δυνάμεως ελαστικής επαναφοράς από τον πνεύμονα που είναι ανάλογη με τη διάτασή του δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του μεγέθους του πνεύμονα τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η αναπτυσσόμενη δύναμη ελαστικής επαναφοράς που θα τείνει να τον επαναφέρει στο μέγεθος που είχε πριν αρχίσει η διεργασία της διάτασής του. Σε οποιαδήποτε φάση του αναπνευστικού κύκλου ακόμη και στο τέλος της ήρεμης εκπνοής και στο τέλος της ήρεμης εισπνοής το μέγεθος του θωρακικού κλωβού είναι μικρότερο του «φυσικού» για αυτό ο θωρακικός κλωβός αναπτύσσει πίεση ελαστικής επαναφοράς με φορά από μέσα προς τα έξω. Δηλαδή η αναπτυσσόμενη πίεση τείνει να τον επαναφέρει στο «φυσικό» του



μέγεθος. Στο επίπεδο της ολικής πνευμονικής χωρητικότητας (Total Lung Capacity,  $TLC_L$ ) το μέγεθος του θωρακικού κλωβού υπερβαίνει ελάχιστα το «φυσικό» του μέγεθος και τότε αναπτύσσει πίεση ελαστικής επαναφοράς από έξω προς τα μέσα. Η ολική πνευμονική χωρητικότητα ( $TLC_L$ ) είναι ο όγκος του αέρα που περιέχεται μέσα στους πνεύμονες στο τέλος της βαθύτατης εισπνοής.

### Μηχανικός αερισμός

Στην ηρεμία ή την άσκηση οι πνεύμονες διατηρούν φυσιολογικά επίπεδα της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα ( $PaO_2$ ) και της μερικής πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα ( $PaCO_2$ ). Στην κλινική πράξη θεωρείται ότι υπάρχει αναπνευστική ανεπάρκεια όταν σε ηρεμία η  $PaO_2 < 60$  mmHg και η  $PaCO_2 > 50$  mmHg και ενώ ο ασθενής αναπνέει σε αέρα δωματίου.

Ο μηχανικός αερισμός συνήθως εφαρμόζεται μέσω ενδοτραχειακού σωλήνα. Το ποσό του αέρα που χορηγείται, ο χρόνος εισπνοής και εκπνοής καθώς και ο όγκος του αναπνεόμενου αέρα με τους αναπνευστήρες είναι χαρακτηριστικά που ρυθμίζονται.

### Προβλήματα που σχετίζονται με τον μηχανικό αερισμό

Ο μηχανικός αερισμός δε στερείται επιπλοκών και θα πρέπει να εφαρμόζεται με μεγάλη προσοχή. Η εφαρμογή τραχειοσωλήνα που είναι απαραίτητος για τη σύνδεση με τον αναπνευστήρα εμπεριέχει πολλούς κινδύνους. Ο τραχειοσωλήνας διέρχεται από τις ανώτερες αεραγωγούς (μύτη, στόμα, φάρυγγα) με αποτέλεσμα οι ανάλογοι μηχανισμοί αυτών των μορίων που έχουν σκοπό τον καθαρισμό και εφύγραση του αέρα να μη λειτουργούν. Αν ο σωλήνας αποφραχθεί είναι πιθανόν να προκληθεί αναπνευστική παύση. Αν ο τραχειοσωλήνας δεν τοποθετηθεί σωστά τότε δυνατόν να αερίζεται μόνο ο πνεύμονας. Είναι δυνατόν να παρουσιαστούν βλάβες του βλεννογόνου της τραχείας που να οδηγούν σε στενώσεις μετά την αποσωλήνωση. Ο διασωληνωμένος ασθενής δεν έχει δυνατότητα να ομιλεί και να τρώει.

Οι αναπνευστήρες μπορεί να αυξήσουν υπερβολικά τη θετική πίεση με αποτέλεσμα να προκληθεί βλάβη στο πνευμονικού παρέγχυμα. Αν από τη βλάβη προκληθεί ρήξη τότε ο αέρας συσσωρεύεται μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα (πνευμονοθώρακας) ή μέσα στο μεσοθωράκιο. Μπορεί από το μεσοθωράκιο να φθάσει υποδερματικά προς το πρόσωπο και το θώρακα και να προκληθεί υποδερματικό εμφύσημα. Η εφαρμογή PEEP αυξάνει τον κίνδυνο ρήξης του πνεύμονα. Επίσης αυξάνει την



ενδοϋπεζωκοτική πίεση που αυξάνει την πίεση στη δεξιά κοιλία. Έτσι μειώνεται η διαφορά πίεσης μεταξύ των περιφερικών φλεβών και της δεξιάς καρδιάς με αποτέλεσμα στάση στην περιφέρεια, μείωση της φλεβικής επαναφοράς αίματος και τελική μείωση της καρδιακής παροχής (122,123).

#### Μηχανικά ερεθίσματα στον πνεύμονα

Ο πνεύμονας υφίσταται πληθώρα μηχανικών ερεθισμάτων που οφείλονται στην αναπνοή, στην πνευμονική κυκλοφορία και στην επιφανειακή τάση που ασκείται στην επιφάνεια των κυψελίδων. Μάλιστα, κατά την ανάπτυξη του εμβρύου ο πνεύμονας υφίσταται την επίδραση μηχανικών τάσεων λόγω των αναπνευστικών κινήσεων. Η αναπνοή είναι αποκλειστικά λειτουργία των πνευμόνων. Στο τραχειοβρογχικό δέντρο καταλήγουν νεύρα που ευθύνονται για την ρύθμιση του τόνου των λείων μυικών ινών των αεραγωγών και του συστημικού φλεβικού τόνου και ονομάζονται βραδέως προσαρμοζόμενοι σε μηχανική διέγερση πνευμονικοί υποδοχείς (Slowly Adapting Pulmonary Stretch Receptors, SARs). Επίσης υπάρχουν οι ταχέως αποκρινόμενοι υποδοχείς (Pulmonary Rapidly Adapting Receptors, RARs) που σχετίζονται με τα αντανακλαστικά του βήχα.

#### Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα

Μετά τη γέννηση, το πνευμονικό αγγειακό σύστημα εμφανίζει πολύ χαμηλές αντιστάσεις. Ο πνεύμονας δέχεται την ίδια ροή αίματος με όλα τα άλλα όργανα. Το αίμα στον πνεύμονα προέρχεται από τις πνευμονικές και βρογχικές αρτηρίες. Συνήθως, η πίεση στις πνευμονικές αρτηρίες είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή των άλλων οργάνων. Συνεπώς, τα αιμοφόρα αγγεία υφίστανται την επίδραση διατμηματικών τάσεων (shear stresses) από το ροή του αέρα καθώς και διάτασης λόγω της ροής του αίματος. Οι μεταβολές του όγκου του πνεύμονα που συμβαίνουν κατά την αναπνοή επηρεάζουν το άθροισμα των τάσεων που ασκούνται στο αγγειακό σύστημα του πνεύμονα.

Χαρακτηριστικές είναι επίσης οι διατμητικές τάσεις που ασκούνται στον πνεύμονα κατά τη ροή του αέρα στους αεραγωγούς. Η επιφανειακή τάση επίσης, επηρεάζει τη διατασιμότητα (compliance) του πνεύμονα, καθώς και την αντίσταση στους μικρούς αεραγωγούς. Οι δυνάμεις επιφανειακής τάσης επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα και την ομοιόμορφη διάταση του κυψελιδικού δικτύου στους πνεύμονες.



### Επιφανειακή τάση

Το κύριο μέρος του στατικού έργου της αναπνοής προέρχεται από την έκπτυξη των κυψελιδικών αερόσακων έναντι των δυνάμεων επιφανειακής τάσης. Η ενέργεια που ασκείται ανά μονάδα επιφάνειας ονομάζεται επιφανειακή τάση και στη συνέχεια στην εργασία θα εννοείται η τάση που ασκείται στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα που παράγουν τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, οργανώνονται στη μεσόφαση αέρα-υγρού και επηρεάζουν την επιφανειακή τάση. Η υγρή φάση η οποία υποστηρίζει το λεπτό υμένιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά αναφέρεται και ως υπόφαση. Ένα λεπτό υμένιο επιφανειοδραστικού παράγοντα πάντα μειώνει την επιφανειακή τάση σε τιμές χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίζονται χωρίς την παρουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης μειώνει την ανισορροπία δυνάμεων, επειδή οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και των μορίων του υγρού είναι μικρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του υγρού. Εάν τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα είχαν μεγαλύτερη έλξη για τα μόρια του υγρού από την έλξη μεταξύ τους, τότε αναγκαστικά θα διαλύονταν και εξ' ορισμού δε θα διέθεταν επιφανειοδραστική ικανότητα.

Οι μεταβολές της επιφανειακής τάσης ( $T$ ) στη μονοστιβάδα λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά περιγράφονται με όρους επιφανειακής πίεσης (Pressure,  $P$ ). Η επιφανειακή πίεση  $P$  είναι ίση με το ποσό της μείωσης της επιφανειακής τάσης σε μία μονοστιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Μαθηματική η επιφανειακή πίεση ορίζεται ως εξής:

$$P = T_0 - T$$

όπου

**$T_0$ :** η επιφανειακή τάση της καθαρής υγρής υπόφασης χωρίς την παρουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα και

**$T$ :** η επιφανειακή τάση με την παρουσία υμενίου επιφανειοδραστικού παράγοντα

Παρότι η επιφανειακή τάση και η επιφανειακή πίεση μετρούνται με τις ίδιες μονάδες, έχουν όμως αντίθετη κατεύθυνση. Όταν η επιφανειακή τάση είναι υψηλή, η επιφανειακή πίεση είναι χαμηλή και αντιστρόφως. Οι αριθμητικές τιμές της επιφανειακής πίεσης  $P$  κυμαίνονται μεταξύ 0 και  $T_0$ . Για το νερό ή το φυσιολογικό ορρό, το  $T_0$  είναι περίπου 70 mN/m στους 37 °C. Όταν η  $P=0$  τότε σημαίνει ότι δεν



έχει συμβεί καμία μείωση της επιφανειακής τάσης, κατάσταση η οποία υπάρχει σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Σε ακραία κατάσταση η τιμή του  $P=T_0$  και σημαίνει πως η επιφανειακή τάση έχει μειωθεί στο μηδέν από τη μονοστιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η μέγιστη μείωση παρατηρείται όταν η μονοστιβάδα βρίσκεται στην πιο συμπιεσμένη της μορφή, κατά την οποία το πακετάρισμα των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι όσο το δυνατόν πιο συμπαγές και η συγκέντρωση των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μονοστιβάδα είναι μέγιστη (125).

Επειδή ο κυψελιδικός χώρος των πνευμόνων μοιάζει με φυσαλίδες έχει δοθεί ο ορισμός ότι η επιφανειακή τάση είναι η δύναμη που δρα πάνω σε μία υποθετική γραμμή, μήκους 1 cm, στην ελεύθερη επιφάνεια ενός υγρού και ισχύει ο νόμος του Laplace (στη γενική του μορφή):

$$\text{Πίεση} = (4 \times \text{επιφανειακή τάση}) / \text{ακτίνα}$$

Όταν συμμετέχει μόνο μία επιφάνεια, όπως στην καλυπτόμενη με υγρά κυψελίδα, στον αριθμητή τίθεται μάλλον ο αριθμός 2 αντί 4.

Οι μονάδες μέτρησης των προηγούμενων μεγεθών στο διεθνές σύστημα μονάδων (SI, International System) είναι: η P μετράται σε Pascal ( $\text{Pa}=\text{N}/\text{m}^2=10.2 \text{ cm H}_2\text{O}=7.5 \text{ mm Hg}$  και  $1 \text{ mm Hg}=1.36 \text{ cm H}_2\text{O}$  και  $76 \text{ mm Hg}=100 \text{ g}/\text{cm}^2$ ), η τάση T σε Newton/m ( $\text{N}/\text{m}$  και  $\text{mN}/\text{m}=\text{dyn}/\text{cm}$ ) και η ακτίνα R σε μέτρα (m).

Οι φυσικές δυνάμεις που αναφέρθηκαν επηρεάζουν τη δομή, τη λειτουργία, την ανάπτυξη, την ωρίμανση του πνεύμονα και την αγγειογενεσία της πνευμονικής κυκλοφορίας.

### Μηχανικές καταπονήσεις στον πνεύμονα και στα κύτταρα

Στον πνεύμονα ασκούνται τρία είδη βασικών μηχανικών καταπονήσεων:

**α)** Μηχανική στρέβλωση σε ασθενείς με άσθμα κατά το βρογχόσπασμο. Η σύσπασση των λείων μυϊκών ινών στους αεραγωγούς δημιουργεί μια δύναμη συμπίεσης στους βλεννογόνους και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναδίπλωση του επιθηλίου των αεραγωγών και μείωση της επιφάνειάς τους.

**β)** Διατμητικές τάσεις. Αυτές προκαλούνται:

➤ όταν ρευστά, όπως το αίμα ή ο αέρας κινούνται κατά μήκος μιας επιφάνειας με κύτταρα. Τότε δημιουργείται μία τάση παράλληλη προς την



πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η οποία προκαλεί μια παραμόρφωση κατά την εφαιπτομένη της. Τέτοιες τάσεις αναπτύσσονται στους αεραγωγούς, από τη ροή αέρα και στα αγγεία λόγω της ροής του αίματος.

➤ από διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις στις κυψελίδες όταν έχουμε σχηματισμό οιδήματος.

Κατά τη μηχανική υποστήριξη της αναπνοής με θετική πίεση, οι κυψελίδες υποχρεώνονται να μεταπίπτουν κυκλικά και ταχέως από την κατάσταση της συρρίκνωσης και της πλημμυρίδας με υγρό κατά την εκπνοή σε κατάσταση διάτασης και πληρότητας με αέρα κατά την εισπνοή. Αυτό δημιουργεί σημαντικές διατμητικές τάσεις διότι συμβαίνει συνεχή ανακατανομή οιδήματος.

γ) Μηχανική παραμόρφωση (mechanical strain). Τροπή αναπτύσσεται όταν ασκηθεί δύναμη σε ελαστικό κύτταρο οπότε προκαλείται μηχανική διάταση (mechanical stretch) (εφελκυσμός, ), ή παραμορφωτική στρέβλωση (distortion). Αν και πολλοί υποστηρίζουν ότι οι κυψελίδες τείνουν να αυξήσουν την επιφάνειά τους κατά την εισπνοή ξεδιπλώνοντας τις πτυχώσεις μάλλον παρά εφελκύνοντας τις κυψελίδες, όμως ακόμη και στην περίπτωση αυτή, οι τάσεις που ασκούνται από τον πλευρικό χώρο, μεταφέρονται από τον πνεύμονα στα κυψελιδικά τοιχώματα κατά την ελαστική επαναφορά. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας του ενήλικα (ARDS), έχουμε αύξηση της ελαστικής επαναφοράς, οι δυνάμεις αυτές αυξάνουν και κατά συνέπεια η τροπή μεταβάλλεται.

Επιπλέον, εντός των κυττάρων ασκούνται δυνάμεις εφελκυσμού και μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στον κυτταροσκελετό (π.χ. από τη συστολή της ακτίνης) που επιδρούν σε όλο το κύτταρο, συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα.

Κατά την αναπνοή, οι τάσεις που προκαλούν την παραμόρφωση είναι πιο έντονες στα κύτταρα του κυψελιδικού τοιχώματος και του επιθηλίου, ενώ οι διατμητικές τάσεις επιδρούν στα τοιχώματα των αγγείων, μειούμενες από το αγγειακό ενδοθήλιο του πνεύμονα προς τα τριχοειδή. Αντίστοιχες δυνάμεις ασκούνται και σε άλλα σημεία εκτός από το ενδοθήλιο των αγγείων, όπως η επίδραση του πλευριτικού υγρού στα κύτταρα του πλευρικού μεσοθηλίου καθώς και της υγρής υπόφασης στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και στα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων (126).



### Περιγραφή μηχανικών καταπονήσεων στον πνεύμονα

Συνέπεια της άσκησης των προηγούμενων δυνάμεων είναι να προκαλείται τριδιάστατη παραμόρφωση των κυττάρων τα οποία λόγω του μικρού του μεγέθους τους και του ακανόνιστου σχήματός τους γίνεται δύσκολη η αξιολόγηση των παραμορφωτικών αλλαγών που προκαλούνται στα κύτταρα. Φυσικά αναφερόμαστε σε κύτταρα επειδή σχετικά είναι εύκολο να μελετηθούν οι παραμορφωτικές αλλαγές σε σχέση με οργανοτυπικές καλλιέργειες ή τον πνευμονικό ιστό.

Έτσι για την περιγραφή των μηχανικών καταπονήσεων έχουν αναπτυχθεί σε θεωρητικό επίπεδο μαθηματικά μοντέλα και τύποι που αναλύουν και υπολογίζουν τις προηγούμενες δυνάμεις που ασκούνται. Από την άλλη σε εργαστηριακό επίπεδο έχουν αναπτυχθεί ειδικές συσκευές, «συσκευές stretch», όπου ασκούνται οι δυνάμεις σε πνευμονοκύτταρα και μελετώνται τυχόν μεταβολές παραγόντων που μετέχουν σε διάφορα φαινόμενα.

### Είδη «συσκευών» μηχανικής διάτασης

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση μηχανικής διάτασης σε πνευμονοκύτταρα απαιτούνται δύο βασικά στοιχεία.

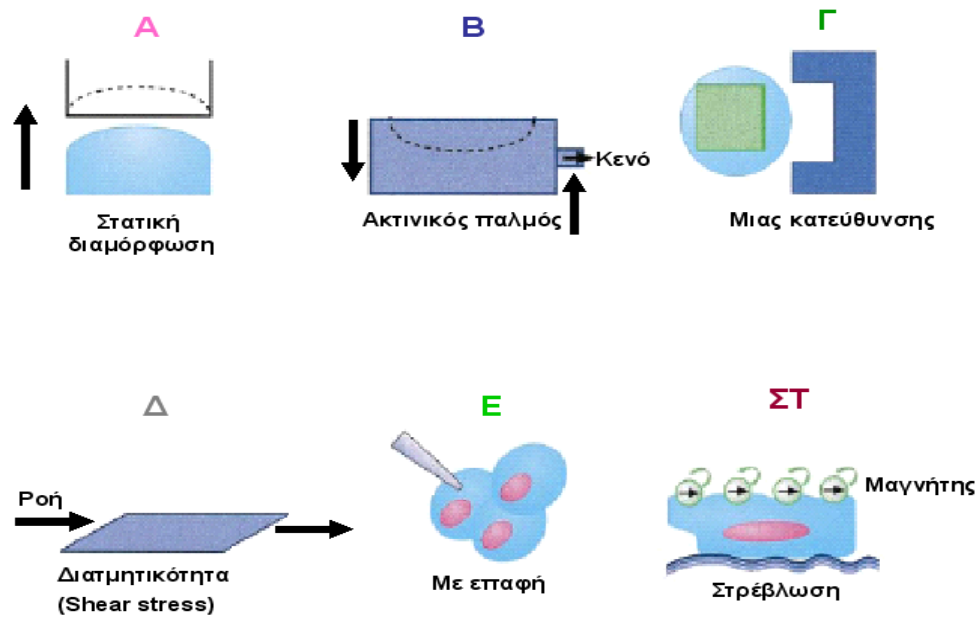
1. Μία ειδική «συσκευή» όπου γίνεται η καλλιέργεια των κυττάρων και θα μπορεί να δεχτεί την παραμορφωτική επίδραση (π.χ. τρυβλίο με ελαστικό πάτο).
2. Ένα αίτιο που να προκαλεί την παραμόρφωση όπως για παράδειγμα ένα βαρίδιο/ δύναμη, η εφαρμογή κενού, η ροή ρευστού, η εφαρμογή μαγνητικού πεδίου ή ακόμη η άσκηση μηχανικής πίεσης.

### Πειραματικές τεχνικές για την εφαρμογή δυνάμεων στα κύτταρα

Αναφέρθηκε ότι οι φυσικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στα κύτταρα μπορεί να προσδιοριστούν με ειδικούς όρους όπως τάση (stress), παραμόρφωση (strain) διατμητικότητα (shear stress). Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι όροι όπως διάταση (stretch) και παραμόρφωση (deformation). Οι όροι αυτοί όμως μπορεί να αντανακλούν καλύτερα τη φύση των δυνάμεων που εφαρμόζονται σε κύτταρα σε ζωντανά συστήματα και όχι σε καλλιέργειες κυττάρων.

Στο επόμενο σχήμα περιγράφονται συσκευές που έχουν αναπτυχθεί ή που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πνευμονοκύτταρα (Εικόνα 14).





**Εικόνα 14.** Πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται για μηχανική διέγερση πνευμονικών κυττάρων. **A.** Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη που πιέζεται σε κοίλη επιφάνεια άπαξ ή περιοδικά. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη που κυρτώνεται μετά από εφαρμογή κενού. **Γ.** Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ένα σπόγγο (Gelfoam), το ένα άκρο του οποίου προσκολλάται στη βάση του τρυβλίου ενώ το άλλο προσκολλάται σε μία μεταλλική βάση. Μία μαγνητική δύναμη δημιουργείται μέσω υπολογιστή και εφαρμόζεται ιδιαίτερα σε οργανοτυπικές καλλιέργειες. **Δ.** Εφελκυσμός. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα και εφαρμόζεται ροή ρευστού σε παράλληλο επίπεδο. Η ροή αυτή προκαλεί διατμητική τάση στα κύτταρα (shear stress). **Ε.** Μία μικροπιπέττα εφαρμόζεται στη μεμβράνη ενός κυττάρου και προκαλείται παραμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης. **ΣΤ.** Σε υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων συνδέονται μικροσφαιρίδια επικαλυμένα με προσδέτες, ενώ τα μικροσφαιρίδια μαγνητίζονται προς μία κατεύθυνση. Στη συνέχεια εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο ασθενέστερο σε διεύθυνση κάθετη προς την προηγούμενη που συστρέφει τα σφαιρίδια με ελεγχόμενη διατμητική τάση (127).

### Μηχανική διάταση

Η διάταση του πνεύμονα και η χαλάρωση κατά την αναπνοή προκαλούν παραμόρφωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, με τη διατμητικότητα (shear stress) ο όγκος του αέρα και η ροή των υγρών επίσης δημιουργούν πιέσεις οι οποίες





διατείνουν τα τοιχώματα των αεραγωγών και των αιμοφόρων αγγείων. Ωστόσο, αρκετές συσκευές έχουν σχεδιαστεί να προκαλούν αυτή τη μηχανική διέγερση στα πνευμονικά κύτταρα. Αυτές μπορεί να κατανεμηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το είδος της φυσικής δύναμης όπως για παράδειγμα στατική έναντι κυκλικής διάτασης, μοναξονική έναντι διαξονικής διάτασης και δύο διαστάσεων έναντι τριών διαστάσεων διάτασης.

#### *Στατική διάταση (Static Stretch)*

Παρόλο που ο πνεύμονας υποβάλλεται σε κυκλική διάταση με παλμική ροή αέρα και αίματος κατά τη διάρκεια της αναπνοής, η στατική διάταση που γίνεται άπαξ θεωρείται πάρα πολύ απλή για να περιγράψει την *in vivo* διάταση. Έχει το πλεονέκτημα ότι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων, στη διακίνηση ιόντων ασβεστίου και άλλα ενδοκυττάρια σήματα μπορεί να παρατηρηθούν απευθείας στο μικροσκόπιο. Στο **Σχήμα 14A** φαίνεται μία συσκευή στατικής διάτασης όπου γίνεται διαξονική παραμόρφωση (strain) στα κύτταρα που καλλιεργούνται σε μία ελαστική μεμβράνη ασκώντας θετική πίεση στο υπόβαθρο (128) που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάταση πνευμονοκυττάρων τύπου II αρουραίου προκειμένου να μελετηθεί η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης, φαίνεται αντίστοιχη συσκευή που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάταση κυττάρων οστού της γνάθου προκειμένου να μελετηθεί η φωσφορυλίωση της υπεροικογένειας των Ras πρωτεϊνών (129).

#### *Κυκλική Διάταση (Cyclic Stretch)*

Μία εμπορικά διαθέσιμη συσκευή, η Flexercell, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για να προκαλέσει κυκλική παραμόρφωση πολλών κυττάρων, όπως εμβρυϊκών, οστικών και μυϊκών. Σε αυτή τη συσκευή χρησιμοποιείται αντλία κενού με την οποία προκαλείται παραμόρφωση της ελαστικής μεμβράνης προς τα κάτω (**Σχήμα 14B**). Η μεμβράνη μπορεί να καλυφθεί με μία σειρά χημικών και εξωκυττάρων υλικών (extracellular matrix, ECM) Η προβλεπόμενη παραμόρφωση απλώνεται σε όλη την ελαστική μεμβράνη της συσκευής (130)

Πολλές είναι οι συσκευές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή διάτασης σε κύτταρα του πνεύμονα (131). Οι Wirtz & Dobbs παρατήρησαν ότι η επιφάνεια των κυττάρων ήταν μικρότερη σε σχέση με την επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων



που είχαν δεχθεί την επίδραση στατικής διάτασης. Κατά τη διάταση πιθανόν να έχουν σπάσει δεσμοί μεταξύ των κυττάρων.

Η παραμόρφωση των κυττάρων αλλά και του υποστρώματος όπου έχουν τοποθετηθεί έχει μελετηθεί και συσχετιστεί. Η παραμόρφωση που εφαρμόζεται στα κύτταρα δεν είναι πάντα ισοδύναμη με αυτή που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα και έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 60 % αυτής που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα (131). Το ποσοστό της παραμόρφωσης εξαρτάται από το είδος της διάτασης αλλά και το είδος των κυττάρων. Για παράδειγμα, σε ινοβλάστες -που απομονώθηκαν από καρδιά αρουραίου- που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε συσκευή διαξονικής παραμόρφωσης, βρέθηκε ότι η παραμόρφωσή τους συσχετίζεται πολύ καλά με την παραμόρφωση του υποστρώματος (132). Αντίθετα, σε μία παρόμοια συσκευή ετοιμάστηκαν επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα ενήλικα αρουραίου και διαπιστώθηκε ότι η παραμόρφωση ήταν δυσδιάκριτη σε σχέση με την παραμόρφωση του υποστρώματος όπου είχαν τοποθετηθεί (133).

#### Επίδραση της μηχανικής καταπόνησης στα κύτταρα

##### *Διαφοροποίηση πνευμονοκυττάρων τύπου II σε τύπου I*

Τα μηχανικά σήματα ρυθμίζουν τη μετάβαση και τη διατήρηση του φαινότυπου των κυττάρων τύπου II σε κύτταρα τύπου I στο κυψελιδικό επιθήλιο. Έτσι έχει αναφερθεί σε εμβρυϊκά εμφυτεύματα πνεύμονα, που έχουν προέλθει από ζώο που έχει διασωληνωθεί, μία μείωση του αριθμού των κυττάρων τύπου II που οφείλεται σε φαινόμενα διαφοροποίησης των κυττάρων τύπου II σε τύπου I. Επίσης, σε *in vitro* συνθήκες οι Gutierrez et al έδειξαν ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II αρουραίου η εφαρμογή μηχανικής διάτασης για 18 ώρες έδειξε μία αύξηση στην έκφραση δεικτών των κυττάρων τύπου I και μία αντίστοιχη μείωση των κυττάρων τύπου II (134).

##### *Πολλαπλασιασμός*

Η μηχανική διάταση έχει βρεθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό πνευμονοκυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς IMR-90, (εμβρυϊκοί ινοβλάστες από πνεύμονα ανθρώπου) αυξήθηκε μετά από εφαρμογή κυκλικής διάτασης (135). Σε *in vivo* συνθήκες για την επίδραση της



διάτασης στον πολλαπλασιασμό κυττάρων τύπου II θα πρέπει να συμπεριληφθούν επιπλέον και παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του πνεύμονα. Συγκεκριμένα θα πρέπει να επισημαίνονται διάφοροι παράγοντες όπως οι ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση των κυττάρων τύπου II με άλλα είδη κυττάρων. Για να βρεθούν οι μεσεγχυματικές-επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις, απομονωμένα εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες υπεβλήθησαν σε μηχανική διάταση το καθένα χωριστά ή σε συγκαλλιέργειες. Η παραμόρφωση αύξησε τη σύνθεση του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (deoxyribonucleic acid, DNA) και στα δύο είδη κυττάρων (136).

#### *Απώλεια της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης*

Η διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι μεγάλης σημασίας. Έχουν περιγραφεί μηχανισμοί που βοηθούν στη διατήρηση της τάσης της μεμβράνης των παραμορφωμένων κυττάρων κάτω από τα επίπεδα που οδηγούν σε λύση. Μελέτες σε πνευμονοκύτταρα τύπου II (A<sub>2</sub>Π) έχουν δείξει ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης οδηγεί σε αύξηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης για τη διατήρηση της ακεραιότητάς της και την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την παραγωγή ενέργειας και αναστέλλεται από το κρύο, τα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και από πιθανή βλάβη στο σύστημα διόρθωσης του κυτταροσκελετού [122].

#### *Απόπτωση*

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II υφίστανται απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης του πνεύμονα, διαδικασία που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του φυσιολογικού ρυθμού αναπλήρωσης των κυττάρων. Επίσης, η απόπτωση εκκινείται από μηχανικές δυνάμεις σε αρκετά διαφορετικά είδη κυττάρων και σε ιστούς. Η κυκλική διάταση έχει αποδειχθεί ότι επάγει αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα τύπου II λόγω απόπτωσης. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που μετράται ως αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάταση επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, κύριων δεικτών της απόπτωσης, στα κύτταρα τύπου II, (137).



### *Φλεγμονώδεις διαβιβαστές*

Επιπλέον, με τους προηγούμενους άμεσους δείκτες της απόπτωσης η διέγερση των κυττάρων λόγω διάτασης προκαλεί **1)** απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών και **2)** ενεργοποίηση διαφόρων μηχανισμών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην απόπτωση.

Φλεγμονώδεις παράγοντες που παράγονται σε απόκριση της διάτασης είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), οι προστακυκλίνες και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (Macrophage Inflammatory Protein-2, MIP-2). Επιπρόσθετα, σε μικρότερο όμως βαθμό, παράγονται ο ογκονεκρωτικός παράγοντας  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), οι IL-1 $\beta$ , IL-6, οι αποικιοδιεγερτικοί παράγοντες που είναι γνωστό ότι εκκρίνουν τα κύτταρα τύπου II [137].

### Μεταγωγή μηχανικού σήματος

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διάταση αλλά και τα άλλα είδη μηχανικών τάσεων διεγείρουν κυτταρικές αποκρίσεις μέσω μηχανισμών μεταγωγής σήματος τα οποία λειτουργούν κατά τον ίδιο τρόπο με τα χημικά σήματα. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση και η αλληλεπίδραση ποικίλων ενδοκυττάρων σημάτων περιλαμβάνουν 1) την παραγωγή δευτέρων αγγελιοφόρων, 2) την ενεργοποίηση ειδικών πρωτεϊνικών κινασών 3) τη φωσφορύλιωση και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων 4) την ενίσχυση σημάτων μέσω ενζυμικών καταρρακτών και 5) την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Στην περίπτωση πολλών ορμονών και χημικών σημάτων η διέγερση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας συνδέεται με τα προηγούμενα γεγονότα. Όμως στην περίπτωση των μηχανικών σημάτων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο τα προηγούμενα φαινόμενα συνδέονται με ενδοκυττάρια σήματα.

Είναι γνωστό ότι η διάταση ενεργοποιεί ιοντικούς διαύλους στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Έχει διευκρινισθεί ότι η κυκλική διάταση επάγει τη ροή ιόντων ασβεστίου σε εμβρυϊκά πνευμονοκύτταρα και διαπιστώθηκε η ευαισθησία στο γαδολίνιο, αναστολέα των ενεργοποιημένων από τη διάταση ιοντικών διαύλων (138).

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι κατά τη διαστολή του εμβρυϊκού πνεύμονα η όποια αλλαγή στη φύση της εξοκυττάριας μήτρας κατά την καλλιέργεια κυττάρων επηρεάζει την ρύθμιση της έκφρασης στο φαινότυπο των κυττάρων τύπου II και τον



πολλαπλασιασμό τους. Στηριζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) ρυθμίζει τα αποτελέσματα της διάτασης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II *in situ* (επί τόπου). Το πώς αυτό λαμβάνει χώρα και ποιος είναι ο ρόλος των ιντεγκρινών, τα διαμεμβρανικά μόρια προσκόλλησης τα οποία με φυσικό τρόπο συνδέουν την εξωκυττάρια μήτρα στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, είναι υπό διερεύνηση (139).



## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>

### 5. ΤΑ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

#### Κυτταρική σειρά A549

Η κυτταρική σειρά A549 αποτελεί ένα διαδομένο μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II (AΠII) (140). Έχει αναφερθεί ότι τα A549 αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο σε *in vitro* μελέτες πνευμονοκυττάρων τύπου II. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μπορεί να αναπτύσσεται εύκολα, σε μεγάλες ποσότητες και να διατηρεί τα φαινοτυπικά της χαρακτηριστικά της στην καλλιέργεια.. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου πνευμονικού επιθηλίου, ασθενούς, ηλικίας 60 ετών, γένους αρσενικού, εθνικότητας Καυκάσιου.

#### Κυτταρική σειρά MLE12

Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, απομονωμένα από ποντίκι, γένους θηλυκού, γενετικά τροποποιημένου με τον ιό SV40 (papiloma virus), με σκοπό την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης C του επιφανειοδραστικού παράγοντα (SP C). Είναι επιθηλιακά κύτταρα, και χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή ως ένα επιπλέον μοντέλο πνευμονοκυττάρων τύπου II.

#### Μονοκύτταρα μακροφάγα κύτταρα

Τα μονοκύτταρα αποτελούν το 3-9% των λευκοκυττάρων του αίματος. Είναι κύτταρα με διάμετρο 10 μm, διαθέτουν έναν νεφροειδή πυρήνα, και όμοια με την διαφοροποιημένη μορφή τους, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, αποτελούν τα φαγοκύτταρα. Τα μακροφάγα που βρίσκονται στους ιστούς έχουν μεγαλύτερη διάμετρο από τα μονοκύτταρα (22 μm) και διαθέτουν πληθώρα κοκκίων στο κυτταρόπλασμα τους, καθώς και μιτοχόνδρια ώστε να είναι σε θέση να παράγουν ενέργεια μέσω οξειδωτικού μεταβολισμού. Ειδικότερα, τα κυψελιδικά μακροφάγα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του πνεύμονα. Όπως όλα τα μακροφάγα, είναι μεγάλα, μονοκύτταρα φαγοκύτταρα τα οποία όμως βρίσκονται στην κυψελιδική επιφάνεια (εικόνα 15 ). Τα μονοκύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα όταν εξέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος και εισέρχονται σε ιστούς 68. Έρευνες έχουν υποδείξει ότι η πλειοψηφία των μακροφάγων που απαντώνται στους ιστούς προέρχεται από διαφοροποιημένα



μονοκύτταρα του αίματος, και μόνο ένα μικρό ποσοστό οφείλεται σε τοπικό πολλαπλασιασμό 69. Τα μονοκύτταρα είναι δυνατό να διαφοροποιηθούν απουσία φλεγμονωδών παραγόντων, όπως τα ιστιοκύτταρα στον συνδετικό ιστό, τα κύτταρα *kupffer* στο συκώτι, τα μικρόγλια του νευρικού συστήματος και τα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, τα μονοκύτταρα εξέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος και μεταναστεύουν στους ιστούς λόγω φλεγμονής 70. Πιστεύεται ότι αυτά τα μακροφάγα είναι πιο ενεργά από τα εγκατεστημένα.

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος με το να ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον μεταβολισμό λιπιδίων και σιδήρου, την απομάκρυνση βιολογικών απορριμμάτων και την εκκαθάριση μη-λειτουργικών κυττάρων. Όλα τα μονοκύτταρα έχουν την ικανότητα για φαγοκυττάρωση ερυθροκυττάρων καλυμμένα με ανοσοσφαιρίνες, μια στρατηγική διατήρησης της ομοιοστασίας του οργανισμού για την απομάκρυνση μη-λειτουργικών ερυθρών κυττάρων. Επίσης συμμετέχουν στην καταστροφή λεμφοκυττάρων και ουδετερόφιλων στον μυελό των οστών και πάλι συμβάλλοντας στην ομοιοστασία του οργανισμού. Αν και αυτή είναι η πρώτη λειτουργία τους, τα μονοκύτταρα διαθέτουν και μια δεύτερη. Εμπλέκονται ουσιαστικά σε όλες της φάσεις της φλεγμονής.

Σε αυτή την περίπτωση, μονοκύτταρα στρατολογούνται σε προβληματικές περιοχές μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών, έχοντας δύο αποστολές : αποκρίσεις φλεγμονώδεις και αντί-φλεγμονώδεις. Η φλεγμονώδης αντίδραση έχει ως στόχο την σύνθεση και έκκριση πρωτεϊνών οξείας φάσης (*acute phase proteins*), την χημειοταξία ουδετερόφιλων, την φαγοκυττάρωση ξένων σωμάτων, την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου, την κυτταροτοξικότητα. Στις αντί-φλεγμονώδεις αντιδράσεις συμπεριλαμβάνονται η εκκαθάριση βιολογικών απορριμμάτων, η παρεμπόδιση φλεγμονής, όπως μέσω του αγωνιστή του υποδοχέα IL- 1, η ενεργοποίηση της επανόρθωσης του συνδετικού ιστού και η αγγειογένεση.

#### Χημειοταξία και φαγοκυττάρωση μακροφάγων

Τα μονοκύτταρα σε περιπτώσεις φλεγμονής μεταναστεύουν από την κυκλοφορία του αίματος μέσω του ενδοθηλίου στις προβληματικές περιοχές. Η μετανάστευση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ειδικών διαβιβαστών και υποδοχέων, όπως σελεκτίνες και



ιντεγκρίνες και την χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων (*monocyte chemotactic protein 1, MCP-1*) 73. Κατά την διαπίδυση των μονοκυττάρων, το ενδοθήλιο αναστέλλει την διεργασία της θρόμβωσης, με την έκκριση διάφορων αντι-θρομβωτικών ουσιών όπως θρομβομοντουλίνη (*thrombomodulin*), μόρια όμοια με ηπαρίνη (*heparin-like molecules*) και πλασμινογόνο (*plasminogen*). Από την στιγμή που βρίσκονται στην περιοχή της φλεγμονής, τα μακροφάγα μπορούν να αρχίσουν να επιτελούν το έργο τους, το οποίο εκτός των άλλων συμπεριλαμβάνει και την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης.

Ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος. Αρχικά το ξένο σώμα αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα μέσω υποδοχέων, γεγονός που δίνει το σήμα έναρξης της φαγοκυττάρωσης. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό ακτίνης των μακροφάγων και την περικύκλωση του σωματιδίου από τα ψευδοπόδια μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στην ακτίνη 74. Στη συνέχεια η ακτίνη αποκολλάται από το φαγόσωμα, το οποίο μετά από μια σειρά τήξεων και σχάσεων μετατρέπεται σε ώριμο φαγο-λυσοσωμάτιο, ικανό να καταστρέψει τον εισβολέα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών της μονάδας εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η απομόνωση του εκπλύματος έγινε με την σύμφωνη γνώμη του ασθενούς ή των συγγενών και σύμφωνα με τους κανόνες της βιοηθικής.





## **1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A549 και MLE12**

Οι κυτταρικές σειρές A549 και MLE12 έχουν επίπεδα βιοασφάλειας (Biosafety Level) 1 και χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II.

### **1.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549**

#### **Αρχή της μεθόδου**

📖 Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1972 από τον D.J. Giard et al. από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από επιθήλιο πνεύμονα 58χρόνου άνδρα από τον Καύκασο. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες.

### **1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς MLE12**

#### **Αρχή της μεθόδου**

📖 Η κυτταρική σειρά MLE12 συνίσταται από καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, απομονωμένα από ποντίκι, γένους θηλυκού, γενετικά τροποποιημένου με τον ιό SV40 (papilloma virus), με σκοπό την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης C του επιφανειοδραστικού παράγοντα (SP C), ιδιότητα επιθηλιακά. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 8 ώρες.

#### **Συσκευές**

1. Θάλαμος Επώασης. Η ανάπτυξη γίνεται σε επωαστήρα συστάσεως 5 % CO<sub>2</sub> -95 % αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R)
2. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
3. Θάλαμος νηματοειδούς ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)

## Υλικά

1. Θρεπτικό υλικό Ham's F12K για την κυτταρική σειρά A549, Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1X, 500 ml, Cat. No. 21127022, Gibco-BRL (Life Technologies, Inc., Inchinnan, Scotland)
2. Θρεπτικό υλικό HITES medium εμπλουτισμένο με 2% fetal bovine serum, (Dulbecco's medium : Ham's F12, 50:50, Insulin 0.005 mg/ml , Transferrin 0.01 mg/ml , Sodium selenite 30 nM , Hydrocortisone 10 nM , beta-estradiol 10 nM , HEPES 10 mM) για την κυτταρική σειρά MLE12 .
3. Ανθρακικό νάτριο (7.5 % w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cat. No. 2080-060, Gibco-BRL, φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου)
4. Ορός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS, Cat. No. A15-101, PAA, The Cell Culture Company)
5. Αποστειρωμένο φίλτρο 0.45 μm (Sterile Syringe Filter, Part. No. 431220, Corning, Germany)
6. Γλουταμίνη (200 mM L-Glutamine, Cat. No.K0282, Seromed, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20 °C)
7. Αντιβιοτικό (Antibiotic-Antimycotic, prepared with: 10000 U/ml Penicillin G sodium, 10000 μg/ml Streptomycin Sulfate, 25 μg/ml amphotericin B as fungizone, Cat. No. 15240-062, Invitrogen Corporation, Gibco-BRL, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20 °C)
8. Αιθανόλη (MB:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
9. Διμεθυλοσουλφοξείδιο αποστειρωμένο (DMSO, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 1X, 50 ml, Cat. No. 11101-011, Gibco)
10. Αποστειρωμένες πιπέττες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια Corning των 15, 45 ml, τρυβλία petri των 10 ml (100/20 mm sterile 15 pieces, Cellstar)
11. Ειδικές θήκες φύλαξης κυττάρων στο υγρό άζωτο των 5 θέσεων (Cryocane, aluminum, pcs. 12, Cat. No. 5015-0001, Nunc)

## 👉 Διαλύματα εργασίας

### 1. Διάλυμα 12 N Αιθανόλης

350 ml απόλυτης αιθανόλης συμπληρώνονται μέχρι τελικού όγκου 500 ml με νερό. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2. Αδρανοποίηση FBS



Το παρασκεύασμα του εμπορίου FBS απενεργοποιείται σε υδρόλουτρο στους 60 °C για 30 min. Στη συνέχεια μοιράζεται σε αποστειρωμένα σωληνάκια/52 ml σε στείρες συνθήκες αφού πρώτα διηθηθεί σε αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20 °C.

**3. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549** τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM γλουταμίνη, 14.2 mM (1.5 g/l) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Στα 500 ml θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 52 ml αδρανοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης, 10 ml ανθρακικού νατρίου και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το χρώματος ροζ πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

**4. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων MLE12**

Dulbecco's medium : Ham's F12, 50:50, Insulin 0.005 mg/ml , Transferrin 0.01 mg/ml , Sodium selenite 30 nM , Hydrocortisone 10 nM , beta-estradiol 10 nM , HEPES 10 mM

Σε 500 ml θρεπτικού υλικού Dulbecco's medium προστίθενται 500 ml Ham's F12, 100 ml αδρανοποιημένου FBS, Insulin, Transferrin, Sodium selenite, beta-estradiol, HEPES γλουταμίνη και αντιβιοτικό σε στείρες συνθήκες. Το πορτοκαλί πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

## **Πάγωμα & Ξεπάγωμα των κυττάρων**

### *Πάγωμα κυττάρων*

Για τη δημιουργία αποθεμάτων (stock), σε 950 μl εναιωρήματος κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό προστίθενται 50 μl αποστειρωμένου DMSO. Φυλάσσονται σε σωληνάρια υψηλής κατάψυξης (cryovials) στους -80 °C για 2-5 μέρες (ρυθμός παγώματος 1 °C/min περίπου) και στη συνέχεια τοποθετούνται σε υγρό άζωτο.

### *Ξεπάγωμα κυττάρων*

Για την εκκίνηση νέας καλλιέργειας το σωληνάριο με το απόθεμα τοποθετείται σε υδρόλουτρο 37 °C για 1-2 min. Με αυτόματη πιπέττα αναδιασπείρονται προσεκτικά τα κύτταρα στο θάλαμο νηματοειδούς ροής όπου και ετοιμάζεται η καλλιέργεια διατήρησης (stock) σε τρυβλία των 10 ml με το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό. Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε ότι απόθεμα κυττάρων που ήταν παγωμένο για 6 μήνες στο υγρό άζωτο και χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια εργασίας είχε διατηρήσει τη βιωσιμότητά του σε ικανοποιητικό ποσοστό (80 %).



## 2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### Αρχή της μεθόδου

☞ Η παραλαβή των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό έγινε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εναιώρησή τους σε κατάλληλο ισότονο διάλυμα.

### Υλικά –Συσκευές

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 1X, 500 ml, Cat. No. 10010-015 Gibco)
2. PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride,  $C_7H_7FO_2S$ , FW:174.2, assay 99 %, R:26/27/28-34-15, S:45-36/37/39-22, Cat. No. P-7627, Sigma)
3. Tris-HCl ( $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ , FW:157.6, R:36/37/38, S:26-36, T-3253, Sigma)
4. EDTANa<sub>2</sub> ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , MW:372.24, assay 99 %, Cat. No. 34549, Riedel de Haen)
5. Χλωριούχο νάτριο (NaCl, assay 99.8 %, MB: 58.44, Cat. No. 31434, Riedel-de Haen)
6. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1x, 0.5 g/l trypsin, 0.2 g/l EDTA in PBS 1x, Cat. No. L11-004, PAA Laboratories, GMBH, Haidmannweg, A-4061, Pasching, Australia, 100 ml, φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}C$ )
7. Αιθανόλη (MB:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
8. Αποστειρωμένες πιπέττες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια Corning των 15, 45 ml
9. Ψυχόμενη φυγόκεντρος Juan (Ser. No. 30201076, Cat. No.11175703, Juan CR3i)

### ☞ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Διάλυμα 1 M PMSF

Ζυγίζονται 0.1742 g PMSF και διαλύονται σε 1 ml DMSO. Λόγω της δύσκολης διαλυτοποίησης του PMSF γίνεται υπερήχηση 5x10 φορές για 30 sec (50 W). Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστικό σωληνάκι στους  $-20^{\circ}C$ . Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την ετοιμασία αυτού του διαλύματος εκπλένονται με πυκνό αλκαλικό διάλυμα για την πλήρη διάσπαση του PMSF.

#### 2. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων pH=7.4

Σε 90 ml νερού διαλύονται 0.3152 g Tris-HCl (20 mM), 0.2922 g NaCl (50 mM), 0.0372 g EDTA (1 mM) και ρυθμίζεται η τιμή του pH=7.4. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl διαλύματος 1 M PMSF (τελική συγκέντρωση 1 mM). Γίνεται έλεγχος της τιμής του pH=7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε πλαστικά σωληνάκια/ 10 ml και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}C$ .



### **Πειραματική εκτέλεση (εργασία σε τρυβλία διαμέτρου 5 cm)**

Σε στείρες συνθήκες απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία, το ταπήτιο των κυττάρων εκπλένεται 2 φορές με 1.5 ml PBS και ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος Trypsin-EDTA. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα για 5 min. Ακολούθησε αδρανοποίηση θρυψίνης με 2 ml πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα φυγοκεντρίθηκαν σε 500xg για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS. Ακολούθησε φυγοκέντριση όπως προηγούμενα. Το ίζημα των κυττάρων εναιωρείται σε 1 ml PBS ή 1 ml του ρυθμιστικού διαλύματος φύλαξης των κυττάρων pH=7.4 προκειμένου να γίνει μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και ομογενοποίηση με υπέρηχους (4x15 sec, 25 W) στους 4 °C.

#### **2.1 Καμπύλη ανάπτυξης**

Προκειμένου να ετοιμαστούν καλλιέργειες κυττάρων σε τρυβλία ελαστικής μεμβράνης ετοιμάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης. Τα χρονικά διαστήματα παρακολούθησης των καλλιεργειών επιλέχθηκαν με βάση το χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς. Η καλλιέργεια των κυττάρων ( $4.1 \times 10^4 / \text{cm}^2$  για τα A549 και  $3.1 \times 10^4 / \text{cm}^2$  για τα H441) ετοιμάστηκε σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και σε τρυβλία χωρίς ελαστική μεμβράνη. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρωστική Trypan Blue αραιωμένη 1:10 με νερό.

#### **Συσκευές - Υλικά**

1. Ανάστροφο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ser.No.1131010065, Cat. No. D-22976, Kruss, Hamburg, Germany)
2. Βαφή Trypan Blue (Blue solution 0.4 % in NaCl, Cat. No. T- 8154, Sigma)
3. Πιπέττες αριθμημένες και πιπέττες Pasteur, αιματοκυττόμετρο, καλυπτρίδες
4. Τρυβλία ελαστικής μεμβράνης διαμέτρου 5.0 cm (Petriperm Hydrophilic, Cat. No. D-37079, Vivascience, Rudolf-Wissell-Str.28). Τρυβλία petri των 5 ml (60/15 mm sterile, Cellstar)

#### **2.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση - Μέτρηση αριθμού κυττάρων**

Υπό στείρες συνθήκες μεταφέρεται μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων (40  $\mu$ l) σε πλαστικό σωληνάκι. Ακολούθως, γίνεται αραιώση 1:1 με το διάλυμα βαφής Trypan Blue,



τοποθετήθηκαν 10 μl στο αιματοκυττόμετρο και η μέτρηση έγινε σε ανάστροφο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε φακό x40. Τα ζωντανά κύτταρα έχουν μικρό σφαιρικό σχήμα και «λαμπυρίζουν» ενώ τα νεκρά έχουν μπλε χρώμα.

### 2.1.3 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων/ ml έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) \times (\text{αραίωση}) \times 10000$$

Ακολούθως σχεδιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης η οποία αποτελεί το γράφημα του αριθμού των κυττάρων/cm<sup>2</sup> συναρτήσει του χρόνου ανάπτυξης των κυττάρων.

### 2.1.4. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου (Human umbilical endothelial cells, HUVEC)

Ενδοθηλιακά κύτταρα απομονωμένα από ομφάλιο λώρο καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε τρυβλίο επιστρωμένο με κολλαγόνο.

Το κολλαγόνο προστίθεται στο τριβλίο (2-3 ml) ½ h πριν από την επίστρωση των κυττάρων και ακολουθεί επώαση στους 37° C, 5% CO<sub>2</sub> για ½ h.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

#### Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Από 500 ml θρεπτικού υλικού M199 αφαιρούνται 26 ml. Προστίθενται 30 mg ECGS (Endothelial cell growth serum, ορός ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων), 120 ml απενεργοποιημένου ορού FCS (fetal calf serum) (20%), 300 μl Heparine (ηπαρίνη 10 units/μL σε PBS), 6 ml L-glutamine (2mM) και τέλος προστίθεται 6 ml αντιβιοτικό penicillin – streptomycin.

### 2.1.5. Απομόνωση και καλλιέργεια κυψελιδικών μακροφάγων

#### Λήψη και κατεργασία βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος

#### Αρχή της μεθόδου

Δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος λαμβάνονται μηχανικώς αεριζόμενους ασθενείς. Η διαδικασία αφορά στην έγχυση αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού, διαμέσου βρογχοσκοπίου, στους πνεύμονες των ασθενών. Στη συνέχεια το υγρό ανακτάται με εισρρόφηση και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την ανοσολογική κατάσταση του πνευμονικού παρεγχύματος του κάθε ασθενή.



Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στην μονάδα εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με την σύμφωνη γνώμη ασθενούς ή συγγενών και σύμφωνα με τους κανόνες της βιοηθικής.

#### Αντιδραστήρια

□ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, Phosphate Balanced Salt Solution, Gibco)

#### Διαλύματα

##### Πλήρες Θρεπτικό υλικό

Σε αποστειρωμένο conning των 50 ml προστίθενται:

- 26.7 ml απλού θρεπτικού υλικού
- 3 ml ορού βοός ο οποίος έχει θερμανθεί για 30 λεπτά στους 60°C για την απενεργοποίηση συμπληρώματος
- 0.3 ml γλουταμίνης
- 60 μl gentamicin
- 30 μl fungostatin

Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

#### Πειραματική Πορεία

##### **Παραλαβή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος**

Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός σε θερμοκρασία 37 °C εγχύεται διαμέσου βρογχοσκοπίου με οπτικές ίνες. Το πρώτο κλάσμα υγρού που ανακτήθηκε απορρίπτεται, ενώ το υπόλοιπο υγρό (BAL) συλλέγεται σε σωλήνες. Η όλη διεργασία του BAL πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4° C για την αποφυγή αποδόμησης του PAF από την ενεργότητα PAF-ακετυλυδρολάσης.

##### **Απομόνωση κυψελιδικών μακροφάγων (AM, Alveolar Macrophages)**

Στη συνέχεια το BAL διηθείται από αποστειρωμένα φίλτρα (cell strainer, 70μm nylon, Falcon,, 352350) για την απομάκρυνση της βλέννας και φυγοκεντρείται στα 500 g, για 15 λεπτά, στους 4°C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Juan, CR3i) για την απομόνωση των κυττάρων. Μετά την φυγοκέντρωση το απαλλαγμένο από κύτταρα υπερκείμενο BAL συλλέγεται και φυλάσσεται για περαιτέρω αναλύσεις προσδιορισμού πρωτεϊνών, λιπιδικού φωσφόρου και



ανίχνευση ισοενζύμων. Το ίζημα των κύτταρων εναιωρείται σε 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS και φυγοκεντρείται στα 500 g, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το στάδιο της έκπλυσης επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά και τελικά τα κύτταρα εναιωρούνται σε 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί μέτρηση κυτταρικών πληθυσμών και βιωσιμότητας και επίστρωση των κυττάρων σε τριβλία με πλήρες θρεπτικό υλικό.

### **3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ**

#### **Αρχή της μεθόδου**

☒ Η μηχανική διάταση (mechanical stretch) και ο TNFα αποτέλεσαν το μηχανικό και το χημικό ερέθισμα αντίστοιχα.

#### **Υλικά**

1. Τρυβλία ελαστικής μεμβράνης διαμέτρου 5.0 cm (Petri perm Hydrophilic, Cat. No. D-37079, Vivascience, Rudolf-Wissell-Str.28)
2. Plexiglas, κυλινδρικά ορειχάλκινα βαρίδια 712 g, διαμέτρου 5.0 cm

#### **3.1 Συσκευή μηχανικής διάτασης**

Καλλιέργειες κυττάρων A549 ( $4.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) (και MLE12,  $3.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη όπως περιγράφηκε πριν. Όταν τα κύτταρα είχαν σχηματίσει ταπήτιο (confluent 90 %, 48 ώρες για τα A549 και 16 ώρες για τα MLE12) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορρό και το σύστημα αφέθηκε για εξισορρόπηση για 30 min. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν πάνω σε Plexiglas και τοποθετήθηκαν βαρίδια για 1 και 4 ώρες. Η εφαρμογή της πίεσης έγινε στον επωαστήρα σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$ , συστάσεως 95 % σε οξυγόνο και 5 % σε  $\text{CO}_2$ . Η δύναμη  $35 \text{ g}/\text{cm}^2$  που εφαρμόστηκε αντιστοιχεί σε πίεση 26.6 mmHg ή αλλιώς 36.2 cm  $\text{H}_2\text{O}$  [8].

### **4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ**

#### **Αρχή της μεθόδου**

☒ Η μέθοδος Bradford είναι γρήγορη και ευαίσθητη στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Η τεχνική είναι απλή, πιο γρήγορη από τη μέθοδο Lowry και με λιγότερες παρεμποδίσεις, η δε βαφή G250 αντιδρά ειδικά με αργινυλο- και λυσινο- υπολείμματα πρωτεϊνών. Η μέθοδος





δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες χημικές ουσίες ενώ αυτές που παρεμποδίζουν σε βιολογικά δείγματα είναι συνήθως τα απορρυπαντικά και οι αμφολύτες [264,265].

### **Αντιδραστήρια**

1. Βαφή Brilliant Blue G-250 ( $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$ , FW:854.0, purity 98.0 %, Cat. No. B-0770, Sigma)
2. Αιθανόλη (MW:46.07, assay 99.8 %,  $1l=0.788$  Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
3. Φωσφορικό Οξύ ( $H_3PO_4$ , MW:98.00,  $1 L=1.71$  Kg, assay 85 %, R: 34, S: 26-45, Cat. No. 30417, Riedel-de Haen)
4. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V, assay 96 %, Cat. No. A-2153, Sigma)
5. Μεθανόλη ( $CH_3OH$ , FW:32.04, assay 99.8 %,  $d=0.791$  g/ml, R:11-23/25, S:1/2-7-16-24-25, Lab-Scan)

### **👉 Διαλύματα εργασίας**

#### **1. Διάλυμα 16.3 N αιθανόλης**

95 ml απόλυτης αιθανόλης αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 100 ml σε νερό.

#### **2. Αντιδραστήριο Βαφής (Home made reagent)**

50 mg Coomassie Blue G-250 διαλύονται σε 25 ml 95 % v/v αιθανόλης. Το διάλυμα αναμιγνύεται με 50 ml 85 % v/v  $H_3PO_4$  και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με δις απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε διήθηση σε χαρτί Whatman. Η μπλε βαφή φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη στους  $4^{\circ}C$  για αρκετές εβδομάδες. Η διήθηση επαναλαμβάνονταν κάθε φορά πριν τη χρήση.

#### **3. Πρότυπο διάλυμα 1 mg/ml αλβουμίνης σε δις απεσταγμένο νερό**

Ζυγίζονται 50 mg ενώσεως και διαλύονται σε 40 ml δις απεσταγμένο νερό υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο  $37^{\circ}C$ . Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με νερό. Το απόθεμα (stock) διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστικά σωληνάκια στους  $-20^{\circ}C$ .

#### **4. Διάλυμα εργασίας 25 μg/ml αλβουμίνης σε δις απεσταγμένο νερό**

Ογκομετρική φιάλη των 50 ml που περιέχει 35 ml περίπου δις απεσταγμένο νερό τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}C$  και προστίθενται 1.25 ml διαλύματος αλβουμίνης 1 mg/ml. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με δις απεσταγμένο νερό,



αναδεύεται ήπια και μοιράζεται σε πλαστικά σωληνάκια των 10 ml. Φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1 Εκτέλεση Προσδιορισμού (Microassay 1-20 $\mu\text{g}$ )

Σε 10 πλαστικά σωληνάκια των 1.5 ml (eppendorfs) τοποθετήθηκαν 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 320, 400, 600 και 800  $\mu\text{l}$  διαλύματος 25  $\mu\text{g/ml}$  BSA. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 800  $\mu\text{l}$  με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Ακολουθείται η ίδια διαδικασία και στα δείγματα τα οποία όμως έχουν αραιωθεί 1:10 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ή με το αντίστοιχο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 800  $\mu\text{l}$  με PBS. Τέλος, προστέθηκαν 200  $\mu\text{l}$  διηθημένης βαφής, ακολούθησε ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595 nm.

#### 4.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και την αντιστοιχία τους σε ποσότητα πρωτεΐνης χαράσσεται γράφημα μέχρι τα 6  $\mu\text{g}$ . Από την κλίση υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων σε πρωτεΐνη δειγμάτων μας. Η καμπύλη παρουσιάζει καλή γραμμικότητα μέχρι τα 6  $\mu\text{g}$ , ενώ ασφαλής περιοχή απορροφήσεως που δουλεύουμε είναι από 50 έως 150 μονάδες απορρόφησης.

## 5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

### Αρχή της μεθόδου

📖 Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει όλες εκείνες τις διεργασίες κατά τις οποίες φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία μέσα σε διαλύματα. Οι διεργασίες αυτές κατατάσσονται συνήθως σε δύο τάξεις, ανάλογα με το αν η ηλεκτροφόρηση γίνει σε στερεό μέσο ή μήτρα. Τα συστήματα ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα, χρησιμοποιούν υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, χωρίς στερεό μέσο ή μήτρα σαν υπόβαθρο στήριξης. Όλοι οι τύποι ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιούν μία βασική ομάδα αρχών όπως εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\text{Κινητικότητα του Μορίου} = (\text{εφαρμοζόμενη τάση}) * (\text{καθαρό φορτίο του μορίου}) / (\text{Τριβή του μορίου})$$

Έτσι η κινητικότητα του μορίου αυξάνει με την εφαρμοζόμενη τάση ή το φορτίο του και μειώνεται με την τριβή λόγω του σχήματος και του μεγέθους του.



## Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα 12.5 % πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) η μετανάστευση των πρωτεϊνών γίνεται όχι με βάση το ηλεκτρικό φορτίο αλλά με βάση το μοριακό βάρος τους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών ενώ προστίθεται και μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η μετατόπιση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το λογάριθμο της μάζας τους. Ο ακριβής καθορισμός των ζωνών των πρωτεϊνών μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες χρωστικές. Διαφορετικές πρωτεΐνες, σπάνια μετατοπίζονται κατά το ίδιο ποσοστό έτσι ώστε να ανιχνεύονται και ελάχιστες ποσότητες πρωτεΐνης, κάνοντας και ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων. Η ένταση του χρώματος της χρωματισμένης πρωτεΐνης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης πραγματοποιώντας έτσι και ποιοτική και ημιποσοτική εκτίμηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών [266].

### Υλικά

Bromophenol Blue Sodium Salt ( $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$ , MW:691.9, Cat. No. B-8026, Sigma)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400,  $\lambda_{max}=550$  nm, S:22, 24/25, Bio-Rad)

Ammonium Persulfate (APS) (Cat. No.161-0700, MW:228.20, R:8,22,37,42/43, S:17,24,26,43, Bio-Rad)

SDS (MW:288.38, Cat. No.161-0301, R: 22,36/38, S: 22, Bio-Rad)

Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (MW:154.17, Cat. No. 161-0200, 5 g, R: 22,37/38, S: 22,24/25, Bio-Rad)

Ακρυλαμίδιο (Acrylamide,  $C_3H_5NO$ , MW:71.08, R:45-46-24/25-48/23/24/25, S:53-45, Merck)

Γλυκερόλη (Glycerol,  $CH_2OHCHOHCH_2OH$ , MW:92.09, Assay 99.5 %, 2.5 L, Analar)

TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ , MW:116.2, 99 %, Cat. No.T-8133, R:11-20/22-34, S:16-26-36/37/39-45, Sigma)

Γλυκίνη (Glycine, MW:75.07, Cat. 161-0718, Bio-Rad)

**10.** Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol,  $C_2H_6OS$ , FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma)



11. Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Marker, Prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one-72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas)
12. Trizma Base ( $C_4H_{11}NO_3$ , MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)
13. Μεθανόλη (Methanol, 1l=0.79 Kg, MW:32.04, R:11-23/24/25-39/23/24/25, S:7-16-36/37-45, Riedel-de Haen)
14. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba)
15. Απόλυτη Αιθανόλη (Ethanol absolute, 1L=0.788 Kg, assay=99.8 %, MW:46.07, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)

### Συσκευές - εξαρτήματα ηλεκτροφόρησης (της εταιρίας Pharmacia Biotech)

1. SE 250 minigel electrophoresis vertical unit for 2 slab gels, Code No. 80-6147-45
2. SE 245 dual gel caster
3. Glass plates for Hoefer Vertical Slab gels pack of 10 plates (restangular glass plates), 10x8 cm, Code No. 80-6136-81 (διαστάσεις κάθε gel 8x7 cm)
4. Hoefer, Spacer-mate, model # Se219SM
5. 2xComb, Spineless, 10 well, 0.75x4.8 mm (thicknessxwidth), Code No. 80-6138-71
6. Spacers 8cmx0.75 mm (2), Code No. 80613795
7. Cellophane en rouleaux de 28 cmx50 en distributear, Cat. 24128, PolyLabo
8. Θερμοστατούμενη ανακινούμενη βάση (CONTROLA AE, χαρακτηρισμός CONE-112E, προμηθευτής Heidolph, ημ. Παρτίδας 080100296)

### 👉 Διαλύματα εργασίας

#### 1. 30 % Ακρυλαμίδιο / 0.8 % Bis-ακρυλαμίδιο

Ζυγίζονται 30 g ακρυλαμιδίου (4.22 M) και 0.8 g δις-ακρυλαμιδίου (5.19 mM). Διαλύονται με νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C.

#### 2. Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 M Trizma base pH 8.8 (Resolving gel separating buffer)

Ζυγίζονται 18.2 g Trizma base και διαλύονται σε 100 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 8.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

#### 3. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8 (Stacking gel buffer)

Ζυγίζονται 3.0 g Trizma base και διαλύονται σε 50 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

#### 4. Διάλυμα 0.35 M SDS



Ζυγίζονται 5 g SDS και διαλύονται, σε χαμηλή θέρμανση, με νερό σε τελικό όγκο 50 ml. Το διάλυμα διατηρείται για 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου.

**5. Υπερθειικό αμμώνιο 0.44 M APS**

Ζυγίζονται 0.1 g υπερθειικού αμμωνίου και διαλύονται με νερό σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

**6. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.025 M Trizma base, 0.192 M γλυκίνης, 0.035 M SDS, pH 8.3**

15.1 g Trizma base, 72.1 g γλυκίνης και 5 g SDS προστίθενται σε νερό και ρυθμίζεται το pH=8.3. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

**7. Διάλυμα εργασίας ηλεκτροφόρησης (Electrophoresis buffer, 10X)**

Το διάλυμα εργασίας ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση και προκύπτει λαμβάνοντας 10 ml του προηγούμενου ρυθμιστικού διαλύματος αραιώνοντας στα 100 ml με νερό.

**8. Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Trizma base, 1 w/v % SDS, 10 % v/v γλυκερόλη, 2 % v/v μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, pH 6.8 (2xSample treatment buffer)**

Αναμιγνύονται 0.3028 g Trizma base, 0.5 g SDS, 5 ml γλυκερόλης, 1 ml μερκαπτοαιθανόλης και 5 mg κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 0.5 ml σε πλαστικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -80 °C.

**9. Διάλυμα εργασίας προτύπων μοριακών βαρών**

2 ml διαλύματος αραιώνονται με 8 ml διαλύματος βρωμοφαινόλης (2xsample buffer). Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση.

**10. Διάλυμα χρωματισμού (0.025 % w/v Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % v/v μεθανόλη, 7 % v/v οξικό οξύ)**

Αναμιγνύονται 0.0625 g Coomassie Blue R-250 και 100 ml μεθανόλη με ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται 17.5 ml οξικό οξύ. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 250 ml με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 25 °C σε σκουρόχρωμη φιάλη για 6 μήνες.

**11. Διάλυμα αποχρωματισμού (1 N μεθανόλη & 1.2 N οξικό οξύ)**

Αναμιγνύονται 400 ml μεθανόλης και 70 ml οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 25 °C.

**12. Διάλυμα 2.06 N αιθανόλης**

60 ml απόλυτης αιθανόλης αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 500 ml σε νερό.



## Παρατηρήσεις

Όλα τα διαλύματα ετοιμάζονται με δισ απεσταγμένο νερό.

### 5.1 Εκτέλεση προσδιορισμού

#### 5.1.2 Ετοιμασία της ηλεκτροφόρησης

Αρχικά στήνεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μία γυάλινη πλάκα και μία από αλουμίνιο και ανάμεσά τους τοποθετούνται 2 μαύρες πλαστικές λωρίδες (spacers). Τοποθετούνται στο dual caster και βιδώνονται με προσοχή παράλληλα ανά δύο οι 6 βίδες. Ακολούθως ετοιμάζεται το πήκτωμα διαδρομής (separating gel) επιλέγοντας κάθε φορά το ποσοστό πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με τη μοριακή μάζα της υπό ανάλυση πρωτεΐνης στο δείγμα μας (**Πίνακας 3**). Το διάλυμα τοποθετείται με μικροσύριγγα ανάμεσα στις 2 πλάκες χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. Τοποθετούνται λίγες σταγόνες νερού προς σταθεροποίηση του πηκτώματος και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 min τουλάχιστον. Αφαιρούμε τις σταγόνες νερού με λίγο διηθητικό χαρτί.

**Πίνακας 3.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος σε διάφορα ποσοστά ακρυλαμιδίου.

Περιοχή MB (kD) που μπορεί να διαχωριστεί	% Ακρυλαμιδίου στο πήκτωμα επιστοίβασης
36-205	5 %
24-205	7.5 %
14-205	10 %
14-66*	12.5 %
14-45*	15 %
*Μεγαλύτερες πρωτεΐνες αποτυγχάνουν να μετακινηθούν στο πήκτωμα	



Πίνακας 4. Ανάλυση SDS-Page διαφόρων ισομορφών PLA<sub>2</sub>.

Διαλύματα	Separating gel (2 gels) (Πήκτωμα διαδρομής)			Stacking gel 4 % (Πήκτωμα επιστοίβασης)	
	10 % (c, iPLA <sub>2</sub> )	12.5 % (aiPLA <sub>2</sub> )	15 % (sPLA <sub>2</sub> )	2 gels	1 gel
ddH <sub>2</sub> O	1.25 ml	3.2 ml	4 ml	6.1 ml	3.05 ml
Trizma –Base 1.5 M pH=8.8	1.25 ml	2.5 ml	2.5 ml	-	-
Trizma –Base 0.5 M pH=6.8	-	-	-	2.5 ml	1.25 ml
Bis- Ακρυλαμίδιο	2.5 ml	4.2 ml	3.3 ml	1.3 ml	0.65 ml
10 % SDS	50 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl
10 % APS	25 μl	50 μl	50 μl	50 μl	25 μl
TEMED	7 μl	7 μl	7 μl	12 μl	7 μl

#### SDS-Page των cPLA<sub>2</sub>, pcPLA<sub>2</sub> και sPLA<sub>2</sub>.

Η ανάλυση SDS-Page έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [192]. Στη συνέχεια ετοιμάζεται το διάλυμα επιστοίβασης (stacking gel) σε πλαστικό σωληνάκι και τοποθετείται προσεκτικά πάνω από το διάλυμα διαδρομής χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. Αμέσως τοποθετείται ένα ειδικό χτενάκι μέχρι το πήκτωμα να πολυμεριστεί (1 ώρα περίπου). Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός τότε σημειώνονται οι θέσεις –well τοποθέτησης των δειγμάτων και αφαιρείται το χτενάκι. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (διάλυμα εργασίας 10x) στις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων μέχρι να τοποθετηθούν τα δείγματα.

#### 5.1.3 Ετοιμασία δειγμάτων

Ετοιμάζονται καλλιέργειες κυττάρων στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, η μονοστιβάδα των κυττάρων εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 που έχει τοποθετηθεί στους 4 °C και τα κύτταρα συλλέγονται



με 200 μl διαλύματος βρωμοφαινόλης (2xsample buffer) σε πλαστικά σωληνάκια (eppendorfs). Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται για 10 min στους 95 °C και φυλάσσονται στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση.

#### 5.1.4 Τοποθέτηση δειγμάτων

Μετά τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων το sandwich gel αποσυναρμολογείται, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στερεώνεται με τα ειδικά clamps. Ακολούθως τοποθετείται στη συσκευή το διάλυμα εργασίας ηλεκτροφόρησης (10x), περίπου 100 ml για κάθε πήκτωμα. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται με αυτόματη πιπέττα με ειδικό ρύγχος απόληξης. Στην πρώτη και/ή στην τελευταία θέση τοποθετείται διάλυμα πρότυπων μοριακών βαρών. Η μέγιστη ποσότητα δείγματος που μπορεί να φορτωθεί σε κάθε θέση είναι 20 μl που αντιστοιχεί περίπου σε 80 μg πρωτεΐνης. Τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια στη συσκευή και συνδέονται στο τροφοδοτικό. Η ηλεκτροφόρηση τρέχει στα 75 mA για 1 ώρα περίπου.

#### 5.1.5 Χρώση των πρωτεϊνών του πηκτώματος

Αφού η χρωστική τρέξει μέχρι το τέλος του πηκτώματος κλείνουμε το τροφοδοτικό, βγάζουμε τα clamps και ακουμπάμε τις πλάκες σε διηθητικό χαρτί. Απομακρύνουμε τα spacers από τις άκρες, απομακρύνουμε τις πλάκες και μεταφέρουμε προσεκτικά το πήκτωμα σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρωματισμού. Η χρώση ολοκληρώνεται σε 1 ώρα ή και περισσότερο υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

#### 5.1.6 Αποχρωματισμός του πηκτώματος

Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετείται στο διάλυμα αποχρωματισμού και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να μείνουν χρωματισμένες σε ικανοποιητικό βαθμό οι πρωτεϊνικές ζώνες.

#### 5.1.7 Στέγνωμα και στερέωση του πηκτώματος

Ετοιμάζεται σελοφάν ηλεκτροφόρησης στις διαστάσεις περίπου του πηκτώματος και διαβρέχεται για 1-2 min σε διάλυμα 2.06 N (12 v/v) αιθανόλης. Στη συνέχεια σε τετράγωνο πλαίσιο από Plexiglas τοποθετείται το πήκτωμα προσεκτικά ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες. Πάνω στο πήκτωμα τοποθετείται ένα δεύτερο κομμάτι σελοφάν που έχει διαβραχεί σε αιθανόλη, τοποθετείται πλαίσιο από Plexiglas και στερεώνονται με ειδικούς





συνδετήρες. Τα πλαίσια που περιέχουν το πήκτωμα αφήνονται κάθετα να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 μέρες περίπου.

## 5.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

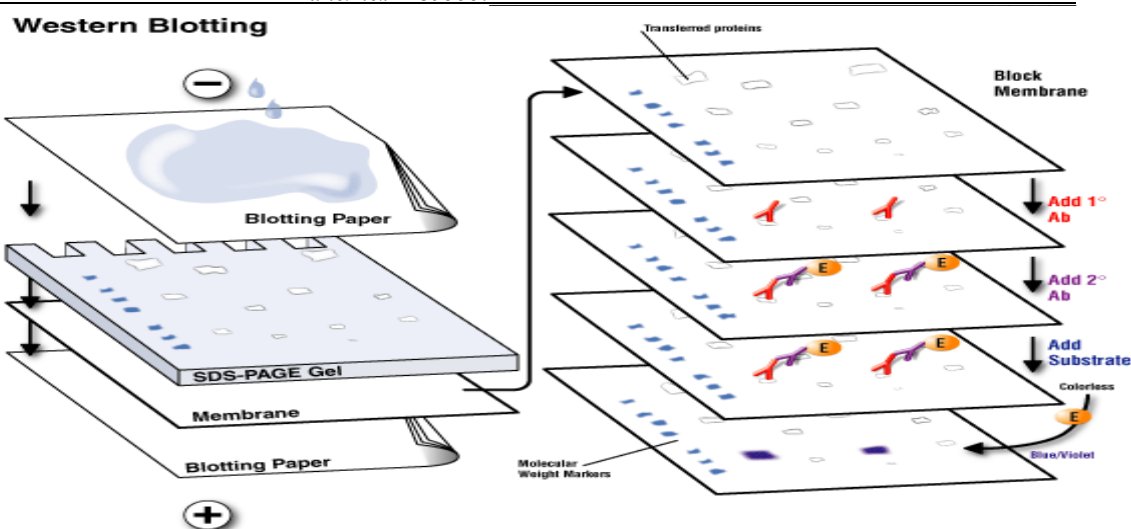
Όταν το πήκτωμα στεγνώσει τότε φωτογραφίζεται στο ορατό φως (Image Analyze, Vilber Lourmat) και γίνεται σύγκριση της έντασης στις ζώνες των δειγμάτων. Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών στο άγνωστο δείγμα γίνεται με σύγκριση του βαθμού μετανάστευσης με τις ζώνες του προτύπου.

## 6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

### Αρχή της μεθόδου

📖 Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (western blotting ή immunoblotting, χαρακτηρίστηκε έτσι επειδή μοιάζει με την τεχνική southern blotting, η οποία εφευρέθηκε και ονομάστηκε από τον E.M. Southern) δίνει τη δυνατότητα με ένα ειδικό πρωτεύων αντίσωμα να προσδιοριστεί η ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης που υπάρχει σε διάφορα δείγματα. Συνοπτικά, **1)** ετοιμάζονται πρωτεϊνικά δείγματα από κύτταρα τα οποία ομογενοποιούνται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα **2)** τα δείγματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη όπου γίνεται μεταφορά των πρωτεϊνών **3)** η μεμβράνη επωάζεται με ένα διάλυμα πρωτεΐνης (αραιωμένο διάλυμα γάλακτος) προκειμένου να προσροφηθούν μη επιθυμητά ίχνη πρωτεϊνών που έχουν απομείνει στη μεμβράνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο αντίσωμα (πρωτεύων) που είναι ικανό να προσδέεται στην επιθυμητή πρωτεΐνη **4)** ένα δευτερεύων αντίσωμα προστίθεται για να εντοπίσει θέσεις όπου το πρωτεύων έχει δεσμευτεί.





Σχήμα 15. Αρχή της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης.

#### Συσκευές – Υλικά

1. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Hoffer TE70 Semi-dry, Transpher unit, 80-6210-34, Serial No. 20098784, Amersham Biosciences Corp, USA)
2. Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Immuno-Blot PVDF membrane for N-terminal sequencing, Polyvinylidene difluoride, 140-150  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης/ $\text{cm}^2$  μεμβράνης, Cat. No. 162-0177, 26 cm x 3.3 m, 1 roll, Bio-Rad)
3. Διηθητικό χαρτί Whatman
4. Blotter paper (14x16 cm, Cat. No. 80-6211-67, Amersham Biosciences)
5. Tween-20 (d=1.095, S:24/25, Cat. No. 27,434-8, Aldrich)
6. TrizmaBase ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , FW:121.14, min 99.8 %, ερεθιστικό, Cat. No. T-1503, Sigma)
7. Διαλύματα χημειοφωταγείας (Horseradish Peroxidase labelled antibodies, ECL 1 & 2 RPN 2209 AmershamBiosciences, UK, περιέχει τα εξής: Detection reagent 1, 125 ml, Cat. No. 1059243, Detection reagent 2, 125 ml, Cat. No. 1059250)
8. Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (LifeRay 24x30 cm, ID. No., LI000216034, Ferrania Incorp. Italy)
9. Φιλμ (Kodak Biomax Xar Film, Scientific Imaging Film for Biological Imaging, 13x18 cm, 50 sheets, Kodak Industrie, Cedex France)
10. Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12, Ref. Cat. No. 5070933, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)
11. Υγρό στερέωσης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer, Ref. Cat. No. 5071071, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)



12. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου
13. Αντισώματα cPLA<sub>2</sub>, pcPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> (mouse anti-1-Cys Peroxiredoxin monoclonal antibody, isotype IgM, Cat. No. MAB 3478, Chemicon).
14. Δευτερεύων αντίσωμα (Mouse IgG, Prod.#31452 Pierce Biotechnology, Rockford USA)
15. Αντίσωμα β-ακτίνης (β-actin antibody, Cat No. 4967, Cell Signalling)
16. Βαφή Ponceau-S (0.1 % w/v Ponceau S solution in 5 % acetic acid, R:36/37/38, S:26-36, Cat. No. P-7170, Sigma)

### 👉 Διαλύματα εργασίας

#### 1. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών 192 mM σε γλυκίνη, 25 mM Trisma-Base, 1.3 mM SDS (Transfer buffer - Towbin buffer)

Ζυγίζονται 7.2 g γλυκίνης, 1.5 g Tris-Base, 5 ml 10 % v/v SDS και διαλύονται σε 50 ml νερό. Προστίθενται 100 ml απόλυτη αιθανόλη και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με νερό. Φυλάσσεται στους 4 °C.

#### 2. Διάλυμα έκπλυσης TBS 0.2 M Trizma-base, 1.4 M NaCl (stock solution 10x)

Ζυγίζονται 24.2 g Trizma-Base, 80 g NaCl και διαλύονται σε 800 ml νερό. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.6 και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L. Φυλάσσεται στους 4 °C.

#### 3. Διάλυμα εργασίας TBS

100 ml διαλύματος 10xTBS αραιώνονται στο 1 L με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους 4 °C.

#### 4. Διάλυμα έκπλυσης TBS με 0.1 % Tween-20 (διάλυμα εργασίας TBST)

Σε 100 ml διαλύματος 10xTBS προστίθενται 1000 μl Tween-20 και αραιώνονται στο 1 L με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους 4 °C.

#### 5. Διάλυμα δέσμευσης πρωτεϊνών 5 % w/v σε γάλα (blocking)

5 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου (πλούσιο σε καζεΐνη) διαλύονται σε 100 ml TBST σε πλαστικό σωλήνα. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση.

#### 6. Διάλυμα δέσμευσης πρωτεϊνών 10 % w/v σε γάλα (blocking)

10 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου (πλούσιο σε καζεΐνη) διαλύονται σε 100 ml TBST σε πλαστικό σωλήνα. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση.

#### 7. Διάλυμα εργασίας χημειοφωταύγειας

Αναμιγνύονται τα 2 διαλύματα χημειοφωταύγειας σε πλαστικό σωλήνα corning σε αναλογία 1:1 v/v ώστε να καλυφθεί η μεμβράνη (0.125 ml/cm<sup>2</sup>). Για μεμβράνη διαστάσεων 5x8 χρησιμοποιούνται από 800 μl του κάθε διαλύματος χημειοφωταύγειας. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση.



### **8. Διάλυμα εργασίας εμφάνισης του φιλμ**

Αναμιγνύονται 100 ml διαλύματος X-Ray Developer με 300 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

### **9. Διάλυμα εργασίας στερέωσης του φιλμ**

Αναμιγνύονται 100 ml διαλύματος X-Ray Fixer με 300 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

### **10. Διάλυμα εργασίας πρωτεύοντος αντισώματος**

6 ml μονοκλωνικού αντισώματος του εμπορίου αραιώθηκαν με 3 ml διαλύματος TBS (αραίωση 1:500). Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **11. Διάλυμα εργασίας δευτερεύοντος αντισώματος**

2 ml αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 10 ml διαλύματος δέσμευσης 10 % (αραίωση 1:10000). Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **12. Διάλυμα εργασίας αντισώματος β-ακτίνης**

1 ml αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου με 7 ml διαλύματος δέσμευσης 10 % (αραίωση 1:7000). Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **6.1 Πειραματική διαδικασία**

### **6.1.1 Ετοιμασία μεμβράνης**

Η μεμβράνη PVDF κόβεται σε διαστάσεις 5x8 cm, δηλαδή στις διαστάσεις του πηκτώματος (χωρίς το πήκτωμα επιστοίβασης). Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της μεμβράνης απαιτείται ενεργοποίησή της με μεθανόλη και στη συνέχεια εξισορρόπησή της στο διάλυμα μεταφοράς 1-2 min (transfer buffer). Η μεμβράνη είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί στη συσκευή ανοσοαποτύπωσης. Η διαδικασία θα πρέπει να γίνει σύντομα ώστε να μη στεγνώσει η μεμβράνη και δεν είναι εφικτή η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα.

### **6.1.2 Οριζόντια μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη**

Αρχικά ετοιμάζονται διηθητικά χαρτάκια Whatman διαφορετικού πάχους που κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος. Διαβρέχονται στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) και τοποθετούνται στη συσκευή ανοσοαποτύπωσης. Αρχικά στη συσκευή τοποθετούνται το πλαστικό δοχείο, 2 μεγαλύτερα φύλλα Whatman και ένα πιο λεπτό, μετά η μεμβράνη και το πήκτωμα που έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση (αφού έχει απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοίβασης). Πάνω από το πήκτωμα τοποθετείται ένα ψηλό χαρτάκι και τα 2 πιο παχιά Whatman. Η συσκευή κλείνεται και συνδέεται με το τροφοδοτικό. Η ανοσοαποτύπωση



διαρκεί 1 ώρα στα 75 V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μεταφοράς το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση προκειμένου να γίνει έλεγχος μεταφοράς των πρωτεϊνών.

### 6.1.3 Σήμανση (πρόσδεση) του αντισώματος στη μεμβράνη

Η μεμβράνη PVDF, όπου μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες, τοποθετείται για 5-10 δευτερόλεπτα σε δις απεσταγμένο νερό και αμέσως εμβαπτίζεται σε διάλυμα δέσμησης 5 % (blocking) για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης για 3 ώρες υπό ανάδευση στους 4 °C. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτεύων αντίσωμα τουλάχιστον για 3 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (ή overnight σε θερμοκρασία 4 °C). Μετά το πέρας της επώασης το διάλυμα απορρίπτεται και ακολουθούν 3 διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης: με TBST για 5 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

### 6.1.4 Εμφάνιση του ειδικού αντισώματος

Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερεύων αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό με το πρωτεύων, για 60 min περίπου υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (στο σκοτάδι). Μετά το πέρας της επώασης το διάλυμα του αντισώματος απορρίπτεται και ακολουθούν 4 εκπλύσεις σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Συγκεκριμένα 2x5 min με TBST και 2x5 min με TBS. Οι εκπλύσεις της μεμβράνης είναι απαραίτητες προκειμένου να αποτραπεί μη ειδική πρόσδεση του πρωτεύοντος και του δευτερεύοντος αντισώματος και να μειωθούν πιθανά προβλήματα κατά την εμφάνιση του φιλμ (Σχήμα 16).

## 6.2 Εμφάνιση του φιλμ

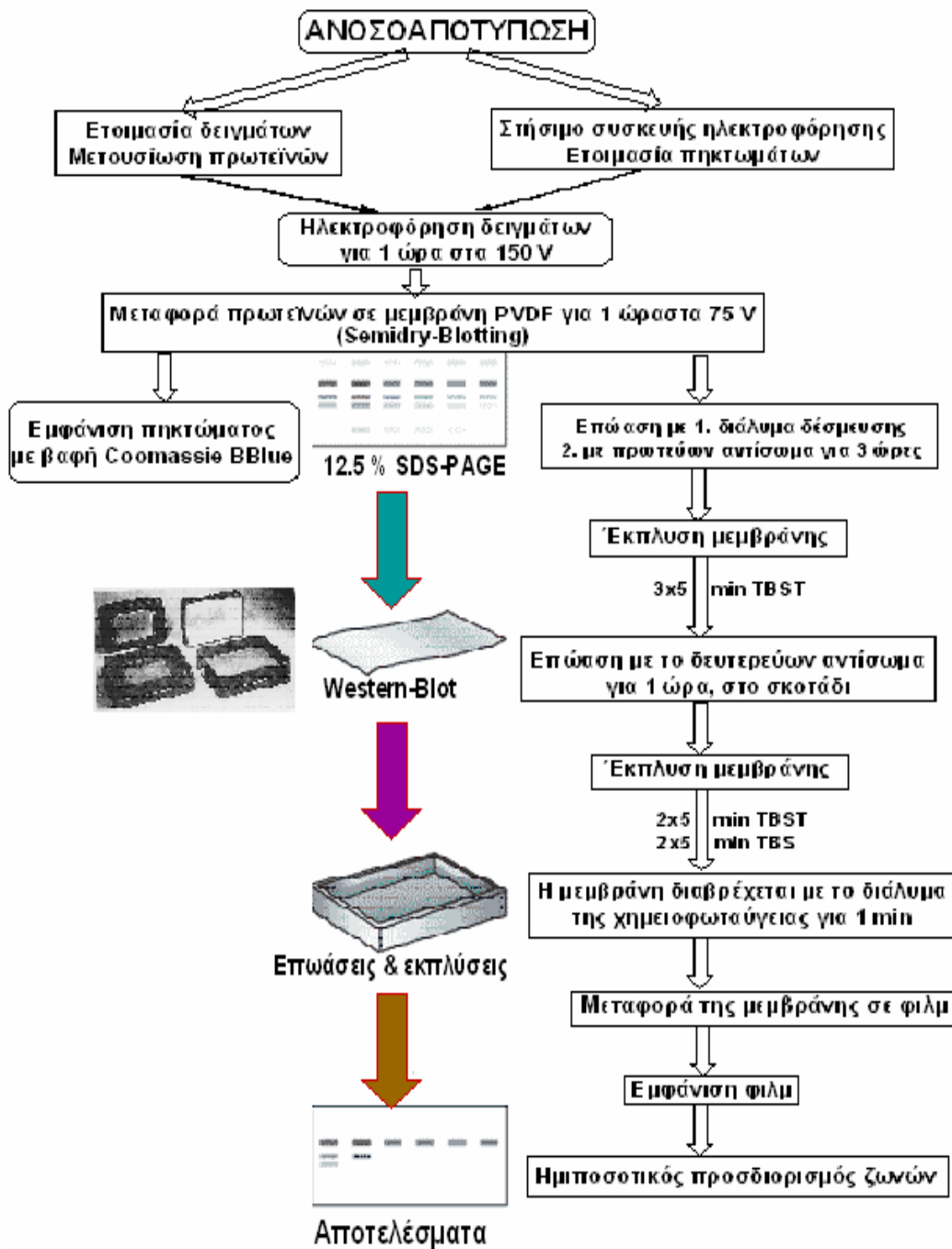
Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρεται μέσα στην ειδική κασετίνα εμφάνισης του φιλμ και εμποτίζεται με 1 ml με το διάλυμα εργασίας χημειοφωταύγειας για 1 min σε σκοτεινό χώρο. Στη συνέχεια τοποθετείται στη μεμβράνη το φιλμ και αφήνεται για 20 min περίπου σε σκοτεινό χώρο. Το φιλμ διαβρέχεται με το διάλυμα εμφάνισης, ξεπλένεται με νερό, μετά διαβρέχεται με το διάλυμα στερέωσης του φιλμ, ξεπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει το φιλμ.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου να διευκρινισθεί εάν έχει γίνει ισοφόρτωση των δειγμάτων τότε η μεμβράνη ξεπλένεται με νερό, τοποθετείται στο διάλυμα δέσμησης για 1 ώρα και αφήνεται με το αντίσωμα της ακτίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η εμφάνιση του αντισώματος και του φιλμ όπως αναφέρθηκε προηγούμενα.



Ακόμη, διευκρινίζεται ότι ως θετικό δείγμα αναφοράς (control) στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ομογενοποίηση κυττάρων HeLa.

Τέλος, ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα ImageJ (Ver.1.3).

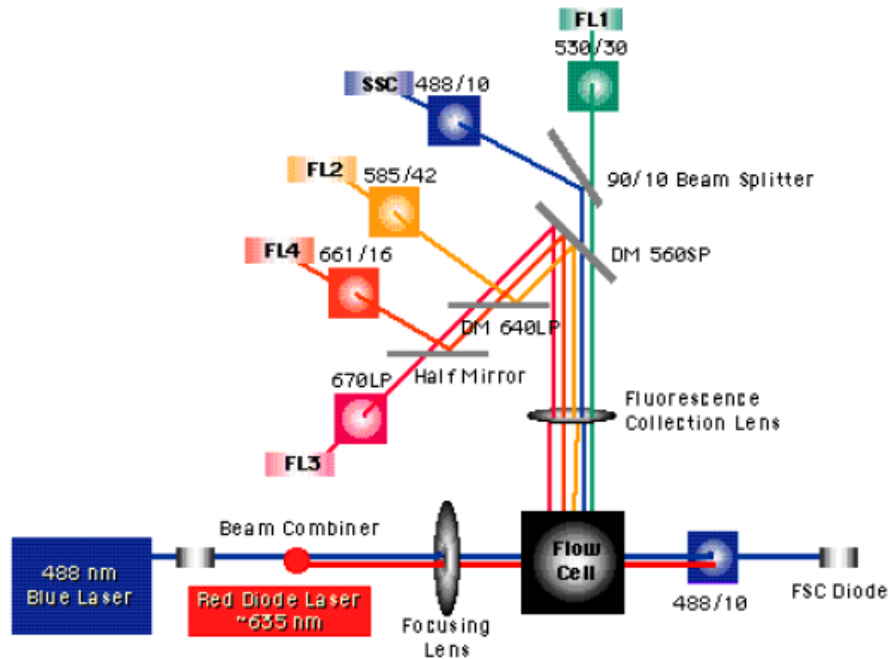


Σχήμα 16. Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.



## 7. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

### Αρχή μεθόδου



**Σχήμα 17** : Διάγραμμα ροής της λειτουργίας του κυτταρομέτρου ροής. (*Introduction to flow cytometry: a learning guide. BD Biosciences, April, 2000*)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης και ταξινόμησης κυττάρων ή άλλων βιοσωματιδίων, με βάση μορφολογικά αλλά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου, στηρίζεται στην ροή κυττάρων, τα οποία φωτίζονται, κάθετα στην κατεύθυνση ροής, από μία δέσμη μονοχρωματικού φωτός (LASER). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων μέγεθος, δηλαδή μέγιστη διάμετρος και κοκκίωση, προσδιορίζονται βάσει της έντασης του προσθίως και καθέτως σκεδαζομένου φωτός, το οποίο ανιχνεύεται μέσω της φωτοδιόδου και του φωτοπολλαπλασιαστή, αντίστοιχα. Η παρουσία και η ένταση δευτερογενούς ακτινοβολίας, που προέρχεται από την διέγερση ενός ή δύο φθοριοχρωμάτων, κατάλληλα συνδεδεμένων στα υπό ανίχνευση κύτταρα (π.χ. μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων) ανιχνεύεται μέσω ενός ή δύο φωτοπολλαπλασιαστών, αντίστοιχα. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την ανίχνευση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων δίδουν σημαντικές πληροφορίες για την παθοφυσιολογία τους.



## ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- FACS CALIBUR - BECTON DICKINSON
- πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 5ml

### 7.1 Πειραματική πορεία

Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα απόπτωσης με σήμανση ανεξίνης V και ιωδιούχου προπιδίου (PI). Προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη, που συνδυάζονται με την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης, τα κύτταρα επισημάνθηκαν με ανεξίνη V-FITC (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II; BD Biosciences).

Τα κύτταρα αναπτύσσονται και επιστρώνονται σε πολυτρυβλία μετά το 2<sup>ο</sup> μούρασμα σε πληθυσμιακό μέγεθος 10<sup>6</sup> κύτταρα/well. Καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό το οποίο εν συνεχεία αντικαθίσταται από μη πλήρες, χωρίς ορό (FBS) με σκοπό να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και να παραμείνουν όλα στο ίδιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Ακολουθώς επώάζονται για 24 ώρες με το υπό εξέταση ερέθισμα (μηχανικό ή χημικό ερέθισμα).

Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέγονται.

Τα υπερκείμενα φυγοκεντρώνονται στα 2000 g, 5 λεπτά, 4°C, και το ίζημα φυλάσσεται καθώς πιθανόν περιέχει νεκρά αλλά και αποπτωτικά κύτταρα σε προχωρημένο στάδιο.

Η αποκόλληση των κυττάρων πραγματοποιείται με θρυψίνη (0,5 ml/well), επώαση στους 37°C, και παρατήρηση στο μικροσκόπιο ώσπου να διαπιστωθεί η αποκόλληση. Η δράση της θρυψίνης διακόπεται με προσθήκη θρεπτικού υλικού (1ml/well). Τα αποκολλημένα πλέον κύτταρα συλλέγονται, και κάθε well εκπλένεται εκ νέου με 1 ml επιπλέον θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2000 g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα ίζημα (κύτταρα ζωντανά ή αποτωτικά σε αρχικό στάδιο) ενώνεται με το ίζημα του προηγούμενου σταδίου.

Τα κύτταρα εκπλένονται με 5 ml κρύου PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκειμένου.

Το συνολικό ίζημα εναιωρείται σε 1ml κρύου PBS. Το ίζημα τοποθετείται στον πάγο.

Προσδιορίζεται εκ νέου ο αριθμός των κυττάρων με σκοπό τον υπολογισμό των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν.





## 7.2 Προσδιορισμός αποπτωτικού δείκτη

Τα κύτταρα αφού μετρηθούν επαναφυγοκεντρούνται και εναιωρούνται σε 1ml binding buffer ( $10^6$  cells/ml). 100 μl από το εναιώρημα τοποθετούνται σε σωληνάκι flow. Προστίθενται 5μl Annexin 5 μl και PI. Πραγματοποιείται ελαφριά ανάδευση και επώαση σε σκότος για 15min στους 25°C. Ακολούθως προστίθενται 400 μl binding buffer σε κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής.

Ο συνδυασμός σήμανσης με ανεξίνη-V και ιωδιούχο προπίδιο επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ κυττάρων σε πρώιμα στάδια απόπτωσης (πρώιμη απόπτωση) (ανεξίνη-V -θετικά), κυττάρων σε τελικά στάδια απόπτωσης (όψιμη απόπτωση) (ανεξίνη-V και ιωδιούχο προπίδιο - θετικά), νεκρών κυττάρων (νέκρωση) (ιωδιούχο προπίδιο-θετικά) και υγιών κυττάρων (ανεξίνη-V και ιωδιούχο προπίδιο-αρνητικά).

## 8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR)

#### 8.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της. Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Dr. Kary Banks Mullis, ερευνητή της εταιρείας Cetus Corporation, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 για τη συνεισφορά του αυτή.

Το DNA στόχος που πρόκειται να ενισχυθεί, προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, εκκινητικά μόρια (primers), δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, και υπόκεινται σε μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Το DNA στόχος είναι αυτό που θα αποτελέσει το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αφετηρία τους εκκινητές, δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα



προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95°C, για 15 sec - 2 min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται στους κλώνους του DNA στόχου.
3. Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 72°C.

## 8.2 Συστατικά της αντίδρασης PCR

### ➤ Taq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών.

Χρησιμοποιώντας την θερμο-ανθεκτική Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, και αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει 5' → 3' δράση εξωνουκλεάσης.

### ➤ Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται, μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές.

### ➤ dNTPs

Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις κορεσμού (0.2 mM το καθένα).

### ➤ Αλληλουχίες-στόχοι



Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχειδειχθεί ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται, αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου μέσα στο τμήμα του DNA που χρησιμοποιείται δεν είναι συχνά υπό τον έλεγχο του ερευνητή. Θα ήταν ωφέλιμο, πριν από την πραγματοποίηση των πειραμάτων, να γινόταν μια σειρά πειραμάτων ελέγχου με διαφορετικά ποσά των γνωστών αλληλουχιών έτσι ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία της αντίδρασης.

Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοστεί και για τη γονιδιακή επέκταση RNA. Επειδή όμως, οι θερμοανθεκτικές πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, πρέπει πρώτα το RNA να μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA). Αυτό γίνεται με τη δράση του ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) είναι δυνατή η γονιδιακή επέκταση RNA ιών.

### **8.3 RT – PCR**

#### **Υλικά – Όργανα**

1. Αποστειρωμένα σωληνάκια για PCR (Certified PCR Performance Tested SARSTEDT 72.737.002)
2. Biorad iScript SYBR Green RT – PCR kit (Biorad 170-8893)
3. Primer sPLA<sub>2</sub> IIA (Hs-PLA2G2A-2-SG Qiagen QT 01476097)
4. Primer GAPDH (Hs-GAPDH-2-SG Qiagen QT 01192646)
5. Primers για PLA2G2A (LAB SUPPLIES)
6. Mini Opticon Real time PCR System (Biorad)

Για την παρασκευή cDNA χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα 100 ng RNA ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών (primers) ήταν 30 nM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 25 μl. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο κατά το οποίο ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 10 min στους 50°C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια 5 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 40 sec στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, 40 sec στη θερμοκρασία υβριδοποίησης ανάλογα με τον εκκινητή



και 1 min στους 72°C για την επέκταση των κλώνων. Ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση κυμαινόταν ανάλογα με τις απαιτήσεις των εκκινητών.

Οι αλληλουχίες των cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η οποία είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (housekeeping gene).





## ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις διπλών δειγμάτων. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η απεικόνισή τους σε σχεδιαγράμματα πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Excel της Microsoft Office Ver. 2000.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Ver. 13.0 για Windows. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με τη δοκιμή T-test (Independent Samples T-test) και την ONE WAY ANOVA, test Scheffe.

Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κανονικότητας των πειραματικών αποτελεσμάτων ώστε να πραγματοποιηθεί παραμετρικό τεστ.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στατιστικά όταν  $p < 0.05$ .

## ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ.

### ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

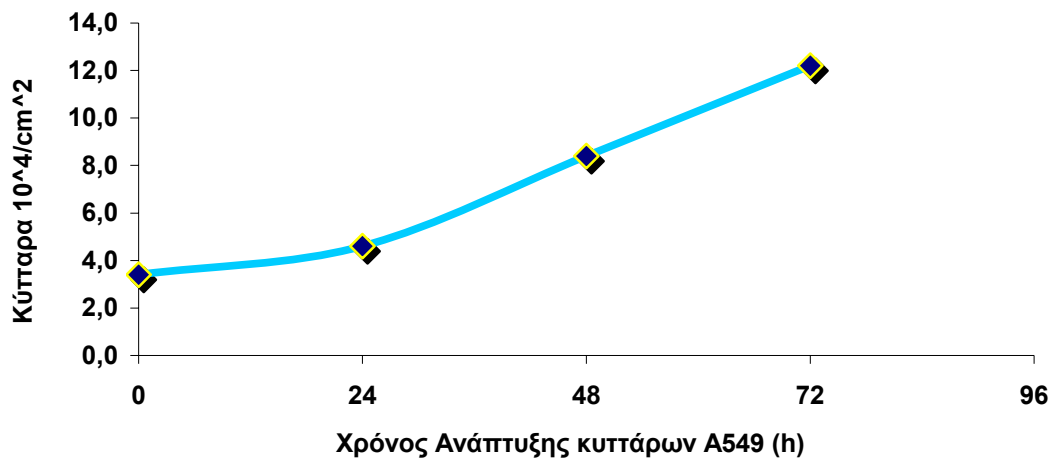
Τα προκαταρκτικά πειράματα αφορούσαν στην επιλογή των κατάλληλων κυτταρικών μοντέλων (επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα) και στον καθορισμό των πειραματικών συνθηκών, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της τάσης εφελκυσμού και των χημικών μεσολαβητών στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού.

Τα πειραματικά μοντέλα που προτάθηκαν ήταν η κυτταρικές σειρές A549 και MLE12 (επιθηλιακά κύτταρα για τα οποία για τα οποία έχει ήδη γίνει εκτενής αναφορά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι), πρωτογενείς καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC) και κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα απομονωμένα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών της μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι η δειγματοληψία του βρογχοκυψελιδικού



εκπλύματος πραγματοποιούνταν με τη σύμφωνη γνώμη του ασθενούς ή της οικογενείας του και σύμφωνα με όλους τους κανόνες της βιοηθικής.

Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα ελέγχθησαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξής τους και ως προς την ικανότητα προσκόλλησής τους σε τρυβλία με την ελαστική μεμβράνη, προϋπόθεση απαραίτητη για την εφαρμογή μηχανικής τάσης. Σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα κρίθηκαν ικανά προς ανάπτυξη και προσκόλληση. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς A549 με χρόνο πολλαπλασιασμού 24 h. Η αρχική καλλιέργεια περιλάμβανε  $8 \times 10^5$  κύτταρα/ml θρεπτικού μέσου ή  $4.1 \times 10^4$  κύτταρα/cm<sup>2</sup> ελαστικής μεμβράνης. Η καλλιέργεια παρακολούθηθηκε για 72 h. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



**Σχήμα.** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549 σε τρυβλία ελαστικής μεμβράνης (5 cm).

Εξαίρεση, ως προς την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και την θνησιμότητά τους, αποτέλεσαν ωστόσο τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία φάνηκαν να διατηρούνται σε καλλιέργειες μέχρι και τις 24 ώρες, χρονική στιγμή μετά από την οποία παρατηρήθηκε μαζική θνητότητα των κυττάρων. Συνεπώς, για το συγκεκριμένο μοντέλο οι συνθήκες επίδρασης θα περιορίζονταν μέχρι και τις 24 ώρες.



## ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Με δεδομένη την ικανότητα ανάπτυξης των επιλεγμένων κυτταρικών μοντέλων αναζητήθηκε ακολούθως η επίδραση μηχανικών και χημικών ερεθισμάτων στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Το μηχανικό ερέθισμα ήταν η τάση εφελκυσμού η οποία εφαρμόστηκε με ειδική συσκευή για την οποία έχει γίνει εκτενής αναφορά στο κεφάλαιο των μεθόδων.

Ως χημικό ερέθισμα χρησιμοποιήθηκε ο TNF $\alpha$ , ο οποίος αποτελεί και μεσολαβητή της φλεγμονώδους απόκρισης.

Το σύνολο των πειραμάτων αποσκοπούσε όχι μόνο στον προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη σε κάθε περίπτωση ερεθίσματος, αλλά παράλληλα στην σύγκριση των επιμέρους ερεθισμάτων ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον αποπτωτικό μηχανισμό, και στην σύγκριση των διαφορετικών κυτταρικών τύπων ως προς την ικανότητά τους να αποπύπτουν.

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Στα πειράματα που παρουσιάζονται ακολούθως αναζητείται το χρονικό εύρος εφαρμογής της μηχανικής τάσης το οποίο να ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε εφαρμογή μηχανικής διάτασης σε διάφορες χρονικές στιγμές, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και πότε ενεργοποιείται ο αποπτωτικός μηχανισμός.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα προαναφερθέντα πειραματικά μοντέλα. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν αφορούν στον προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη με κυτταρομετρία ροής.

Για κάθε συνθήκη επωάστηκαν διπλά δείγματα των  $10^6$  κυτάρων. Από αυτά ελήφθη τυχαίο δείγμα  $10^5$  κυτάρων,  $10^4$  από τα οποία μετρήθηκαν από τον κυτταρομετρητή. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις % του συνολικού πληθυσμού των  $10^4$  κυττάρων που προσμετρήθηκαν.

Επαναλαμβάνεται πως τα κύτταρα τα θετικά ως προς την Annexin V και αρνητικά ως προς το PI χαρακτηρίζονται ως πρώιμα αποπτωτικά, τα θετικά





προς Annexin V και το PI όψιμα αποπτωτικά, τα αρνητικά προς Annexin V και θετικά ως προς το PI νεκρωτικά, ενώ τέλος τα αρνητικά κύτταρα και ως προς τα δυο φθοριοχρώματα, ζωντανά.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι στα προκαταρκτικά πειράματα που ακολουθούν εφαρμόστηκε η μεθοδολογία που προτείνει η διεθνής βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συνένωση των αποπτωτικών – νεκρωτικών κυττάρων του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου με τα ζωντανά – αποπτωτικά προσκολλημένα κύτταρα του ταπήτιου, πριν από την ανάλυση με τον κυτταρομετρητή. Συνεπώς τα ποσοστά που παρουσιάζονται αφορούν το σύνολο των κυττάρων (ζωντανών – αποπτωτικών – νεκρωτικών).

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ A549

Σε κύτταρα A549, εφαρμόστηκε στατική και κυκλική εφαρμογή μηχανικής τάσης για τις χρονικές συνθήκες ½, 1, 2, 3 και 4 h. Ως εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον ενεργοποιητή της απόπτωσης CH11 (200ng/ml θρεπτικού μέσου), για τον οποίο έχει γίνει αναφορά στην εισαγωγή. Κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε τάση αποτελούν το πρότυπο αναφοράς (control). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα και το γράφημα που ακολουθούν.

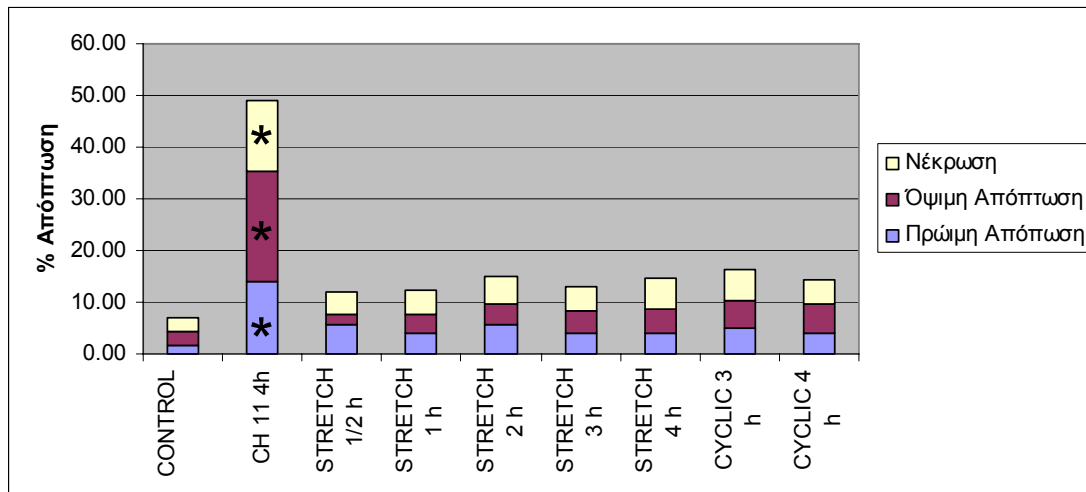
Πίνακας 1. Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	1.67	0.70	2.52	0.51	2.80	0.60
CH 11 4h	13.90	1.96	21.43	1.97	13.66	0.88
STRETCH 1/2 h	5.60	2.56	2.15	0.69	4.31	0.91
STRETCH 1 h	4.16	1.03	3.55	1.42	4.55	1.94
STRETCH 2 h	5.61	1.67	3.95	1.88	5.59	1.00
STRETCH 3 h	3.97	0.97	4.48	1.69	4.41	0.68
STRETCH 4 h	3.93	0.29	4.85	0.46	5.82	1.95
CYCLIC 3 h	5.11	2.10	5.35	0.95	5.78	1.66
CYCLIC 4 h	3.90	0.82	5.64	0.99	4.93	0.62



	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	4.19	1.21	6.99	1.81
CH 11 4h	35.33	3.93	48.99	4.81
STRETCH 1/2 h	7.75	3.25	12.06	4.16
STRETCH 1 h	7.71	2.45	12.26	4.38
STRETCH 2 h	9.56	3.55	15.15	4.55
STRETCH 3 h	8.45	2.66	12.86	3.34
STRETCH 4 h	8.78	0.75	14.60	2.70
CYCLIC 3 h	10.46	3.05	16.24	4.71
CYCLIC 4 h	9.54	1.81	14.47	2.43

Γράφημα 1: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις διπλών δειγμάτων. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών και της συνθήκης αναφοράς (κύτταρα control). Συνεπώς η τάση εφελκυσμού, μέχρι τις 4 τουλάχιστον ώρες, δεν ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό στα κύτταρα A549.



Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν ακολούθως πειράματα στα οποία η επίδραση της εφελκυστικής τάσης ορίστηκε στις 10, 15, και 24 h.

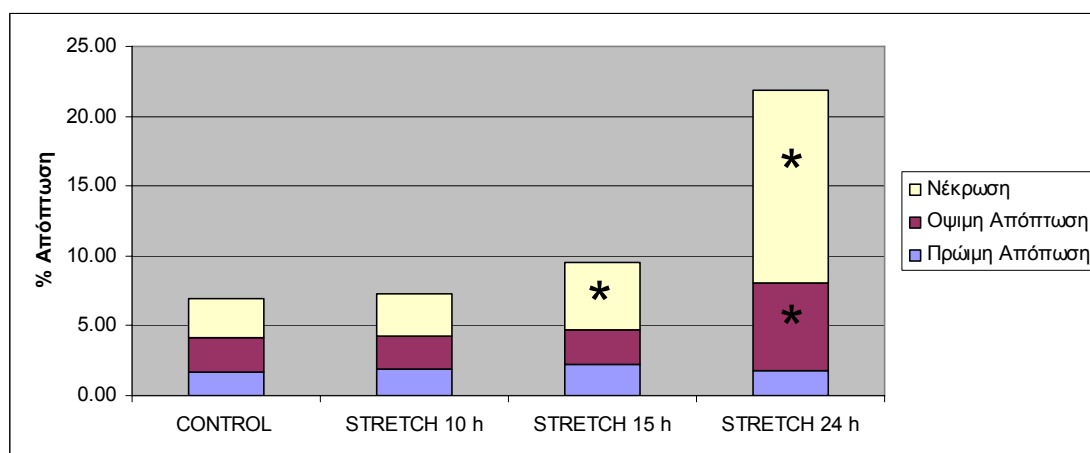
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα και το γράφημα που ακολουθούν.

Πίνακας 2: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	1.67	0.12	2.52	0.06	2.80	0.49
STRETCH 10 h	1.93	0.20	2.31	0.00	3.01	0.00
STRETCH 15 h	2.21	0.93	2.49	1.18	4.85	0.88
STRETCH 24 h	1.84	0.08	6.19	1.10	13.82	1.01

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	4.19	0.18	6.99	0.66
STRETCH 10 h	4.24	0.20	7.25	0.20
STRETCH 15 h	4.69	2.11	9.54	2.98
STRETCH 24 h	8.03	1.18	21.85	2.19

Γράφημα 2: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις



διπλών δειγμάτων. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο αποπτωτικός μηχανισμός, στα κύτταρα A549, ενεργοποιείται μετά από 24h εφαρμογής τάσης, χρονική στιγμή στην οποία τα υπό εξέταση δείγματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό δείγμα αναφοράς ( control).

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ CH11 ΕΠΑΓΩΓΕΑ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ A549

Όπως προαναφέρθηκε, ως εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον CH11 επαγωγέα σε συγκέντρωση 200 ng/mL. Για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης ενεργοποιητή, δηλαδή της μικρότερης συγκέντρωσης ικανής να ενεργοποιεί την απόπτωση, πραγματοποιήθηκε επιπλέον πειραματική διάταξη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 100, 200, 400 και 600 ng/mL και για 4 h.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

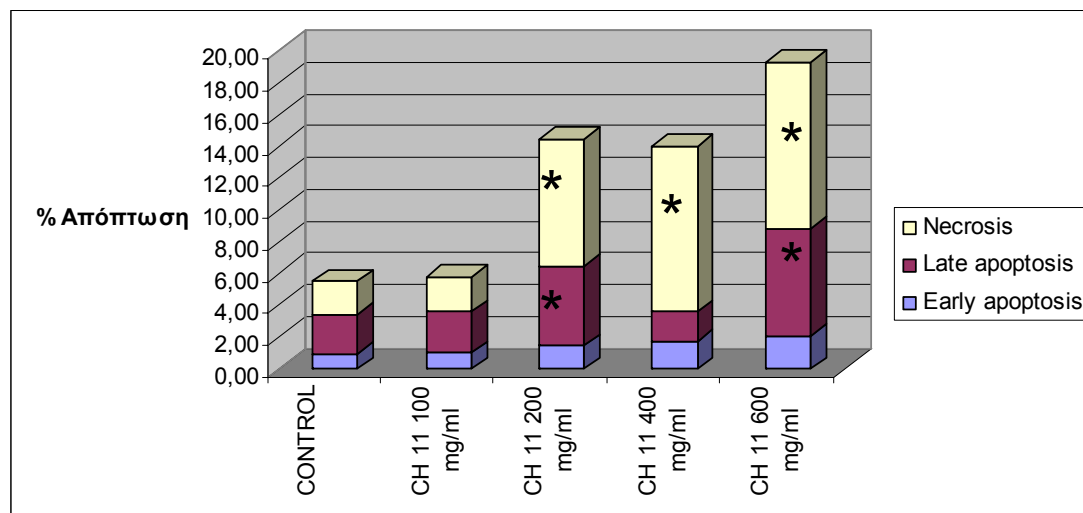
Πίνακας 3: Επίδραση του CH11 στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Ώσιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	0.91	0.12	2.48	0.06	2.11	0.49
CH11 100 mg/ml	1.00	0.30	2.60	0.34	2.20	0.90
CH11 200 mg/ml	13.90	1.96	21.43	1.97	13.66	0.88
CH11 400 mg/ml	14.50	0.78	25.38	0.60	15.00	1.74
CH11 600 mg/ml	16.00	2.93	26.00	3.80	17.00	0.78

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	3.39	0.18	5.49	0.66
CH11 100 mg/ml	3.60	0.64	5.80	1.54
CH11 200 mg/ml	35.33	3.93	48.99	4.81
CH11 400 mg/ml	39.88	1.38	54.88	3.12
CH11 600 mg/ml	42.00	6.73	59.00	7.52



Γράφημα 3: Επίδραση της τάσης του χημικού ενεργοποιητή της απόπτωσης CH11 στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις διπλών δειγμάτων. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Όπως παρατηρείται, η συγκέντρωση 200 ng/mL CH11 αυξάνει στατιστικά σημαντικά την απόπτωση στις 4 ώρες, αντίθετα με τη συγκέντρωση 100 ng/mL. Τα δείγματα 400 και 600 mg/mL διαφέρουν επίσης στατιστικά σημαντικά από το δείγμα αναφοράς, όχι όμως μεταξύ τους, ούτε μεταξύ αυτών και των 200 ng/mL. Συνεπώς η συγκέντρωση των 200 ng/mL θεωρείται ικανή για την ενεργοποίηση της απόπτωσης στα A549 και επελέγη για χρήση ως θετικό πρότυπο.



## ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ A549 ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

Στη συνέχεια αναζητήθηκε η πιθανή συσχέτιση φλεγμονής και απόπτωσης, καθώς πολλοί ενεργοποιητές του αποπτωτικού μηχανισμού είναι παράλληλα και μεσολαβητές της φλεγμονής (όπως βιβλιογραφικά επισημαίνεται και ο TNF $\alpha$ ).

Στην περίπτωση της μηχανικής υποστήριξης, όπου κλινικά δεδομένα έχουν υποδείξει την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού ήταν το επόμενο ερώτημα που τέθηκε.

Πειραματικά, σε κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί αποπτωτικά μετά από εφαρμογή τάσης εφελκυσμού, προσδιορίστηκε ποιοτικά η ύπαρξη των φωσφολιπασών cPLA $_2$ , pcPLA $_2$  και sPLA $_2$  με ανοσοαποτύπωση.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR).

### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blotting)

Σε κύτταρα A549, εφαρμόστηκε στατική μηχανική τάση για 24 h. Ως εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον ενεργοποιητή της απόπτωσης CH11 (200 ng/mL θρεπτικού μέσου), Κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε τάση αποτελούν το πρότυπο αναφοράς (control). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε συνδυασμός μηχανικού και χημικού ερεθίσματος (CH11 + τάση).

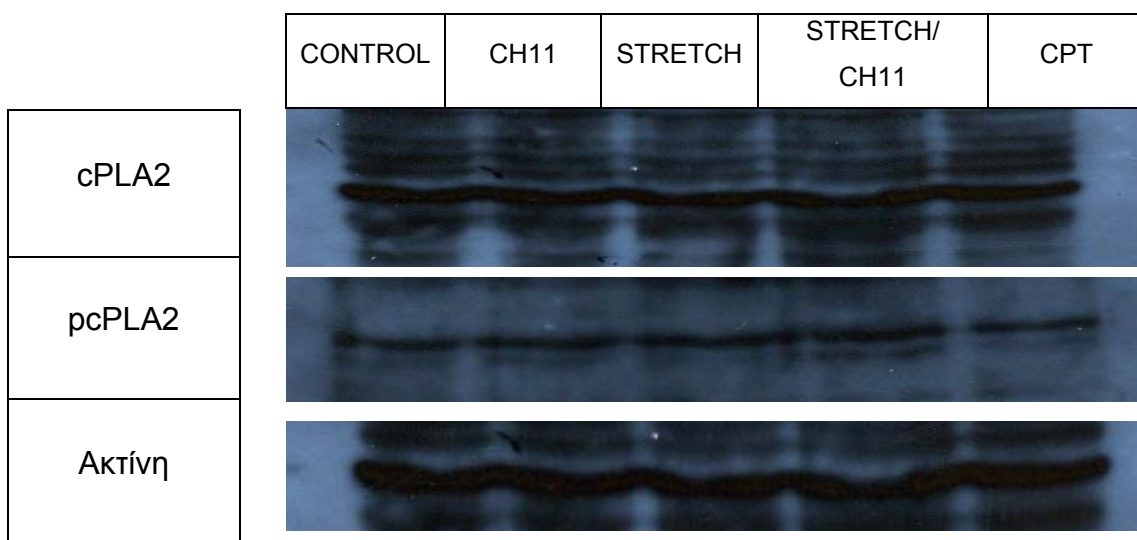
Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τα κύτταρα, και ποσότητα πρωτεΐνης 25 mg ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος και μεταφέρθηκαν με ηλεκτρομεταφορά σε νιτροκυτταρίνη. Στα αποτυπώματα νιτροκυτταρίνης προσδιορίστηκαν ποιοτικά με ειδικά αντισώματα οι υπό εξέταση φωσφολιπάσες.



Ο έλεγχος της ισοφόρτωσης των δειγμάτων γινόταν κάθε φορά με αντίσωμα ειδικό για την ακτίνη.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται ακολούθως.

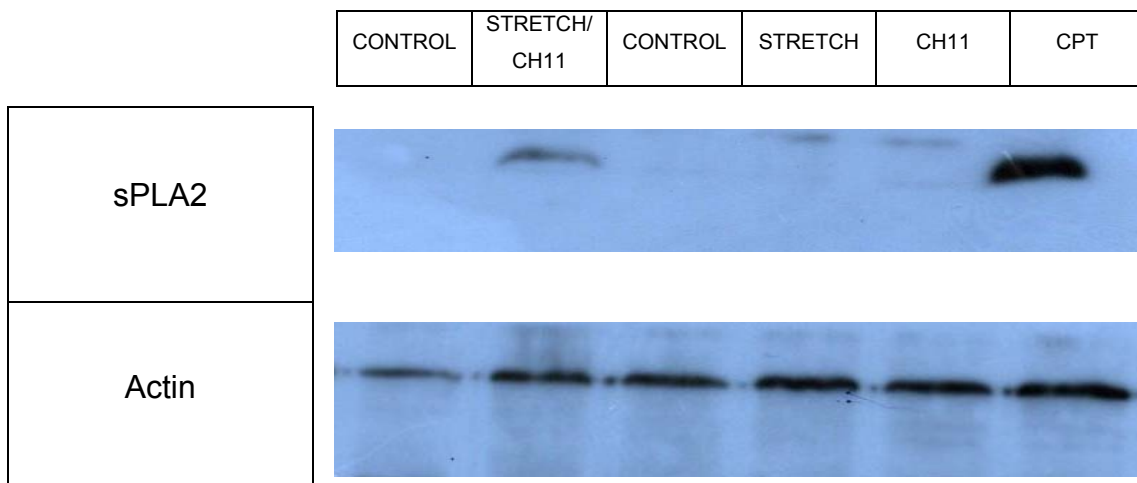
Σχεδιάγραμμα 1. Αποτελέσματα ανασοαποτύπωσης για τις φωσφολιπάσες cPLA<sub>2</sub> (κυτοσολική) και pcPLA<sub>2</sub> ( φωσφοριλιωμένη κυτοσολική) σε ομογενοποίηση κυττάρων.



Παρατηρείται πως τα επίπεδα έκφρασης της κυτοσολικής φωσφολιπάσης (cPLA<sub>2</sub>) καθώς και της ενεργοποιημένης κυτοσολικής φωσφολιπάσης (pcPLA<sub>2</sub>) δεν διέφεραν στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικά ενεργοποιημένων κυττάρων. Συνεπώς η κυτοσολική φωσφολιπάση cPLA<sub>2</sub> δεν εμπλέκεται στον αποπτωτικό μηχανισμό των μηχανο – ενεργοποιημένων κυττάρων A549.



Σχεδιάγραμμα 2: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης για τη φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub> (εκκρινόμενη φωσφολιπάση) σε ομογενοποίημα κυττάρων .



Η sPLA<sub>2</sub> ανιχνεύθηκε μόνο στα κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με συνδυασμό CH11+ STRETCH και καμπθοκεΐνη, και μάλιστα στο ομογενοποίημα (κυτοσόλιο) των κυττάρων και όχι στο υπερκείμενο.

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η επαγόμενη απόπτωση μέσω χημικού υποδοχέα (CH11) ή τάσης (STRETCH) δεν συμπεριλαμβάνει την συμμετοχή sPLA<sub>2</sub>, ωστόσο η συνδυαστική τους δράση πιθανώς να ενεργοποιεί κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι που να ενεργοποιεί την παραγωγή της sPLA<sub>2</sub> στα κύτταρα A549.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ  
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ  
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (rt-PCR)

Σε κύτταρα A549, εφαρμόστηκε, όπως παραπάνω, στατική μηχανική τάση για 24 h. Ως εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον ενεργοποιητή της απόπτωσης CH11 (200 ng/ml θρεπτικού μέσου), Κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε τάση αποτελούν το πρότυπο αναφοράς (control). Επιπλέον





πραγματοποιήθηκε συνδυασμός μηχανικού και χημικού ερεθίσματος (CH11 + τάση).

Από τα κύτταρα απομονώθηκε το ολικό ώριμο mRNA. Το τελευταίο υπεβλήθη σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της κυτοσολικής και εκκρινόμενης φωσφολιπάσης.

Σε όλες τις περιπτώσεις ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο για την πρωτεΐνη GADPH.

Τα αποτελέσματα εκφράζουν τη σχετική μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς στη συνθήκη αυτή.

Τα αποτελέσματα δίδονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 4. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη φωσφολιπάση (sPLA<sub>2</sub>).

Δείγμα	Σχετική μεταβολή της έκφρασης
CH11	1
Stretch	1
A549 CH11 + Stretch	1.8
Camptothecin	10.8

*Σχετική μεταβολή της έκφρασης = μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την sPLA<sub>2</sub> του δείγματος σε σχέση με το πρότυπο αναφοράς / μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς (GADPH) του δείγματος σε σχέση με το πρότυπο αναφοράς.*

Πίνακας 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την κυτοσολική φωσφολιπάση (cPLA<sub>2</sub>).

Δείγμα	Σχετική μεταβολή της έκφρασης
CH11	1
Stretch	1.1
A549 CH11 + Stretch	0.9
Camptothecin	1

*Σχετική μεταβολή της έκφρασης = μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την sPLA<sub>2</sub> του δείγματος σε σχέση με το πρότυπο αναφοράς /*



μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς (GADPH) του δείγματος σε σχέση με το πρότυπο αναφοράς.

Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της ποιοτικής ανίχνευσης των πρωτεϊνών.

Πιο συγκεκριμένα δεν παρατηρείται διαφορά στην έκφραση της κυτοσολικής φωσφολιπάσης, μεταξύ των υπό εξέταση δειγμάτων και του προτύπου αναφοράς (control).

Ως προς την εκκρινόμενη φωσφολιπάση παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του υπευθύνου γονιδίου, στα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε ταυτόχρονα χημικό και μηχανικό ερέθισμα και στα δείγματα τα οποία επωάστηκαν με καμπθοεκίνη.

Αναλυτικότερα παρατηρήθηκε διπλασιασμός της έκφρασης του γονιδίου στην πρώτη περίπτωση, σε σχέση με το πρότυπο αναφοράς και δεκαπλασιασμός στην δεύτερη περίπτωση.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ MLE12

Κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, όπως αναφερθήκαν στα κύτταρα A549, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα MLE12.

Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκε στατική και κυκλική εφαρμογή μηχανικής τάσης για τις χρονικές συνθήκες ½, 1, 2, 3 και 4 h. Ως εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον ενεργοποιητή της απόπτωσης CH11 (200 ng/mL θρεπτικού μέσου). Κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε τάση αποτελούν το πρότυπο αναφοράς (control). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα και στα γραφήματα που ακολουθούν.

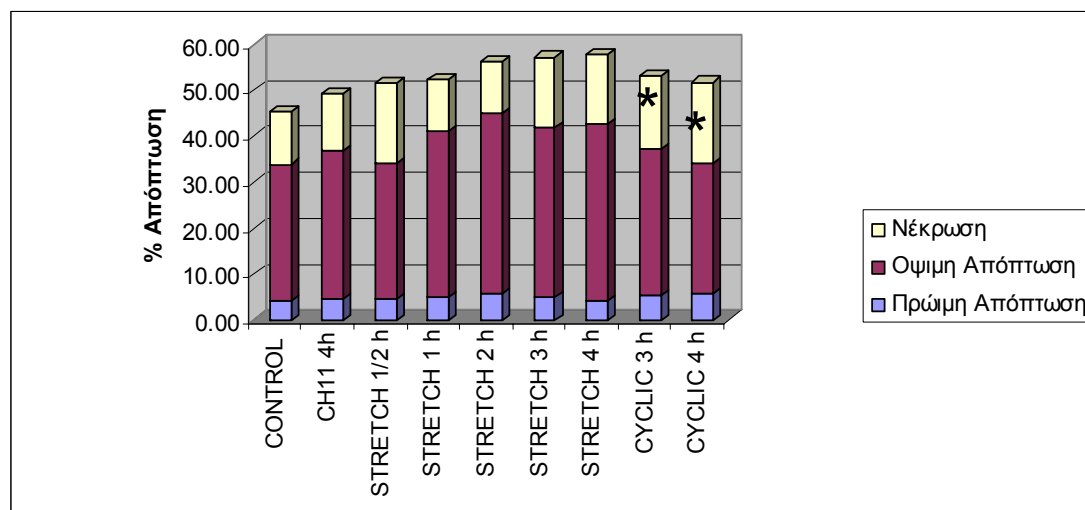


Πίνακας 6: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα MLE12

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	4.23	0.34	29.65	1.76	11.64	2.88
CH11 4h	4.67	0.79	32.30	2.61	12.21	2.25
STRETCH 1/2 h	4.69	0.01	29.25	2.23	17.78	2.94
STRETCH 1 h	4.83	1.14	36.37	2.01	11.25	1.66
STRETCH 2 h	5.87	1.79	38.93	1.88	11.62	1.27
STRETCH 3 h	4.77	0.52	37.08	1.65	15.37	1.55
STRETCH 4 h	4.15	0.18	38.59	0.13	15.13	0.87
CYCLIC 3 h	5.41	2.95	31.63	3.17	16.21	1.63
CYCLIC 4 h	5.59	0.09	28.43	0.45	17.76	2.21

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	33.88	2.10	45.52	4.99
CH11 4h	36.97	3.40	49.18	5.65
STRETCH 1/2 h	33.94	2.24	51.72	5.18
STRETCH 1 h	41.19	3.15	52.44	4.81
STRETCH 2 h	44.80	3.67	56.41	4.93
STRETCH 3 h	41.85	2.16	57.22	3.71
STRETCH 4 h	42.74	0.32	57.86	1.19
CYCLIC 3 h	37.04	6.12	53.25	7.75
CYCLIC 4 h	34.02	0.54	51.78	2.75

Γράφημα 6: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα MLE12.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες



συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις διπλών δειγμάτων. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Τα κύτταρα MLE12 παρουσίασαν υψηλά ποσοστά αποπτωτικών κυττάρων, ακόμα και μετά από λίγες ώρες επίδρασης με τα υπό εξέταση ερεθίσματα. Ωστόσο, τα υψηλά ποσοστά ακόμα και στο εσωτερικό πρότυπο αναφοράς (control) υποδεικνύει πως δεν ευθύνονται τα μηχανικά ή χημικά ερεθίσματα για την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στην περίπτωση αυτή.

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει χρόνο διαπλασισμού στις 4 ώρες. Ο μικρός κύκλος ζωής των κυττάρων αυτών πιθανόν να ευθύνεται για τα υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την μελέτη ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς.

Σημειώνεται η στατιστικά σημαντική αύξηση της νέκρωσης μετά από επίδραση επαναλαμβανόμενης τάσης. Πιθανώς η κυκλική τάση να καταστρέφει τις διακυτταρικές συνδέσεις και να οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Το επόμενο υπό εξέταση μοντέλο ήταν κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών της μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Υπενθυμίζεται ότι η δειγματοληψία του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος πραγματοποιούνταν με τη σύμφωνη γνώμη του ασθενούς ή της οικογένειάς του και σύμφωνα με όλους τους κανόνες της βιοηθικής.

Όπως προαναφέρθηκε τα κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα παρουσίασαν μεγάλη θνητότητα και επετεύχθη διατήρησή τους σε κυτταροκαλλιέργεια μέχρι και τις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της επίδρασης μηχανικών κα χημικών



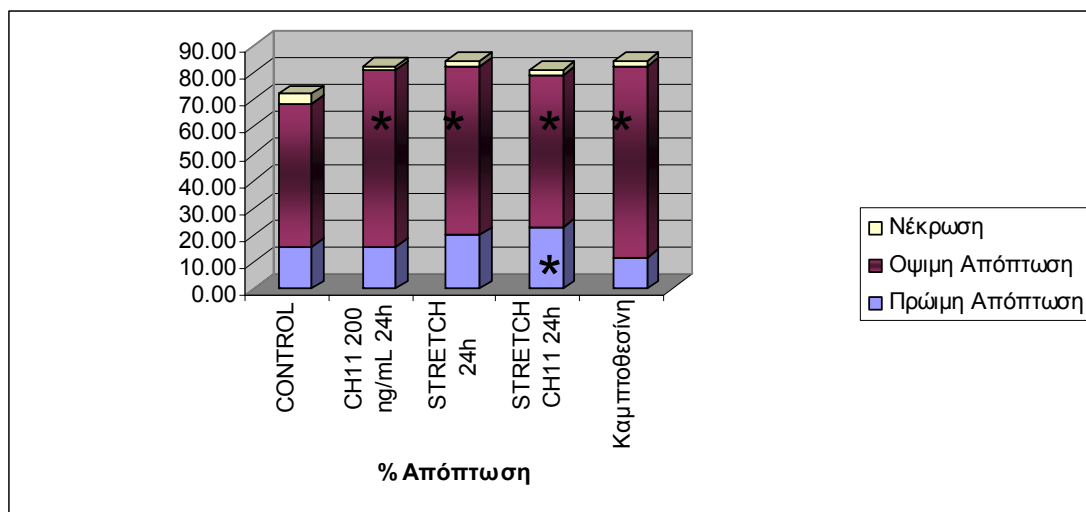
ερεθισμάτων με σκοπό την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού παρουσιάζονται στους πίνακες και το διάγραμμα που παρατείθενται ακολούθως.

Πίνακας 7: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	15.39	1.73	53.37	0.11	3.42	1.56
CH11 200 ng/mL 24h	15.62	5.48	65.25	5.70	1.59	0.37
STRETCH 24h	19.80	1.51	62.81	1.65	1.62	0.13
STRETCH CH11 24h	22.83	0.78	56.04	0.92	2.42	0.37
Καμπποθεσίνη	11.74	1.28	70.94	8.45	1.69	0.22

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	68.76	1.85	72.18	3.40
CH11 200 ng/mL 24h	80.87	11.18	82.46	11.55
STRETCH 24h	82.60	3.15	84.22	3.28
STRETCH CH11 24h	78.87	1.70	81.29	2.07
Καμπποθεκίνη	82.68	9.73	84.36	9.95

Γράφημα 7: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες



συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις διπλών δειγμάτων. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Παρατηρείται μαζική θνητότητα τόσο στα υπό εξέταση δείγματα όσο και στο εσωτερικό δείγμα αναφοράς. Συνεπώς δεν μπορεί να αποφανθεί κανείς πως τα χημικά και μηχανικά ερεθίσματα είναι υπεύθυνα για την επαγωγή του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα αυτά, αν και παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υποεξέταση δειγμάτων και του control.

Τα παρατηρούμενα συνολικά υψηλά ποσοστά θνητότητας πιθανόν να οφείλονται στην δυσκολία διατήρησης των κυττάρων αυτών σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΥΝΕC)

Το τελευταίο υπό εξέταση πειραματικό μοντέλο, στο οποίο αναζητήθηκε η επίδραση της τάσης στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού, περιλαμβάνει πρωτογενείς καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφάλιο λώρο απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις επαναλήψεις της πειραματικής διάταξης προέρχονταν από την ίδια αρχική καλλιέργεια και από το 3<sup>ο</sup> διαμοίρασμα αυτής (3<sup>rd</sup> passage). Με το γεγονός αυτό έγινε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστεί η δεδομένη, βιβλιογραφικά τουλάχιστον, ετερογένεια ως προς τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζουν οι πρωτογενείς καλλιέργειες.

Η πειραματική διάταξη περιελάμβανε εσωτερικό πρότυπο αναφοράς, θετικά πρότυπα αναφοράς με CH11 και Camptothecin, και δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε τάση εφελκυσμού και συνδιασμός τάσης εφελκυσμού και ενεργοποιητή της απόπτωσης, για 4 και 24 ώρες.



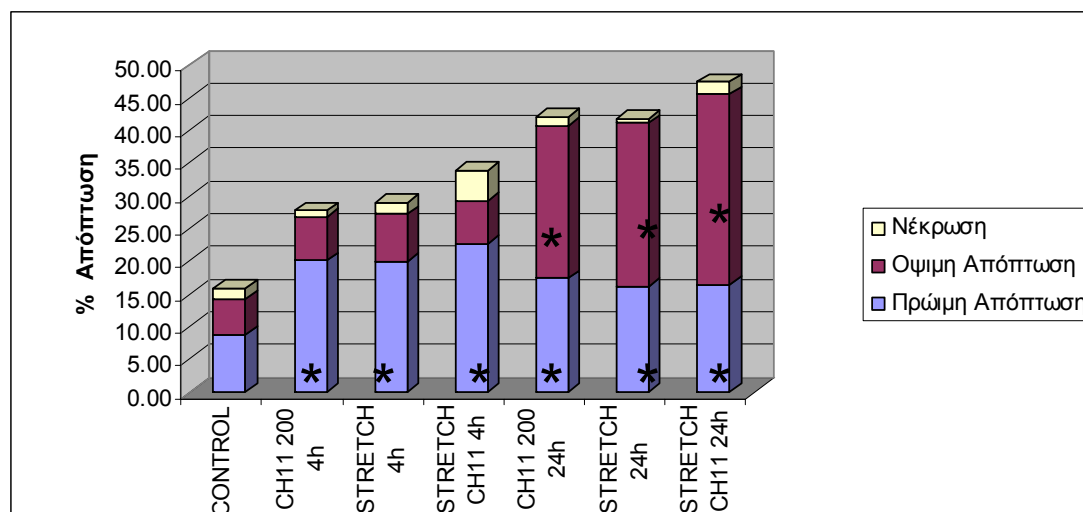
Τα αποτελέσματα δίδονται παρακάτω.

Πίνακας 8: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα HUVEC.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	8.81	7.99	5.33	0.60	1.70	1.01
CH11 200 4h	20.09	0.20	6.64	2.84	1.02	0.52
STRETCH 4h	20.05	0.25	7.14	1.60	1.76	0.01
STRETCH CH11 4h	22.72	0.00	6.50	0.00	4.67	0.00
CH11 200 24h	17.33	1.15	23.31	1.68	1.48	0.67
STRETCH 24h	16.13	1.75	24.93	1.97	0.74	0.30
STRETCH CH11 24h	16.40	1.38	29.09	1.71	1.85	1.42

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	14.14	8.59	15.84	9.60
CH11 200 4H	26.73	3.04	27.75	3.55
STRETCH 4H	27.19	1.85	28.95	1.86
STRETCH CH11 4H	29.22	0.00	33.89	0.00
CH11 200 24H	40.64	2.83	42.12	3.50
STRETCH 24H	41.06	3.72	41.80	4.02
STRETCH CH11 24H	45.49	3.09	47.34	4.51

Γράφημα 8: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα HUVEC.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις.



Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα ήταν διπλά. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν, πως η μηχανική τάση ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό ακόμα και στις 4 ώρες. Τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό πρότυπο (control). Στις 24 ώρες το φαινόμενο εξελίσσεται χρονικά με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνολικά ο αποπτωτικός δείκτης, να μειώνεται η πρώιμη και να αυξάνεται η όψιμη απόπτωση.

Τα παρατηρηθέντα αποτελέσματα συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία που παρουσιάζει τις πρωτεγενείς καλλιέργειες κυττάρων να ανταποκρίνονται εντονότερα στα διάφορα ερεθίσματα, σε αντίθεση με τις κυτταρικές σειρές, οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και μικρότερη θνητότητα.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TNF $\alpha$ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Παράλληλα με τα μηχανικά ερεθίσματα, και έχοντας διαπιστώσει πως η μηχανική τάση δεν ενεργοποιεί ξεκάθαρα στα διαφορετικά πειραματικά μοντέλα το αποπτωτικό μονοπάτι, μελετήθηκε η επίδραση ενός μεσολαβητή της φλεγμονής, του TNF $\alpha$ , για τον οποίο έχει γίνει εκτενής αναφορά στην εισαγωγή, στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Τα πειράματα εφαρμόστηκαν στα δυο πειραματικά μοντέλα που φάνηκαν να ανταποκρίνονται στα υπό εξέταση μηχανικά και χημικά ερεθίσματα, στα κύτταρα A549 και στα HUVEC.





ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TNF $\alpha$  ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ A549

Εφαρμόστηκε για συνολικά 24 ώρες επίδραση με TNF $\alpha$  σε συγκεντρώσεις 50 και 100 ng/mL, με CH11 200 ng/mL, συνδιαστική επίδραση TNF $\alpha$  και CH11 για τις ίδιες συγκεντρώσεις, και επιπλέον προεπάση με TNF $\alpha$  για 6 h και ακολούθως επίδραση με CH11. Κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε κανένα ερέθισμα αποτελούν το πρότυπο αναφοράς (control). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα και τα γραφήματα που ακολουθούν.

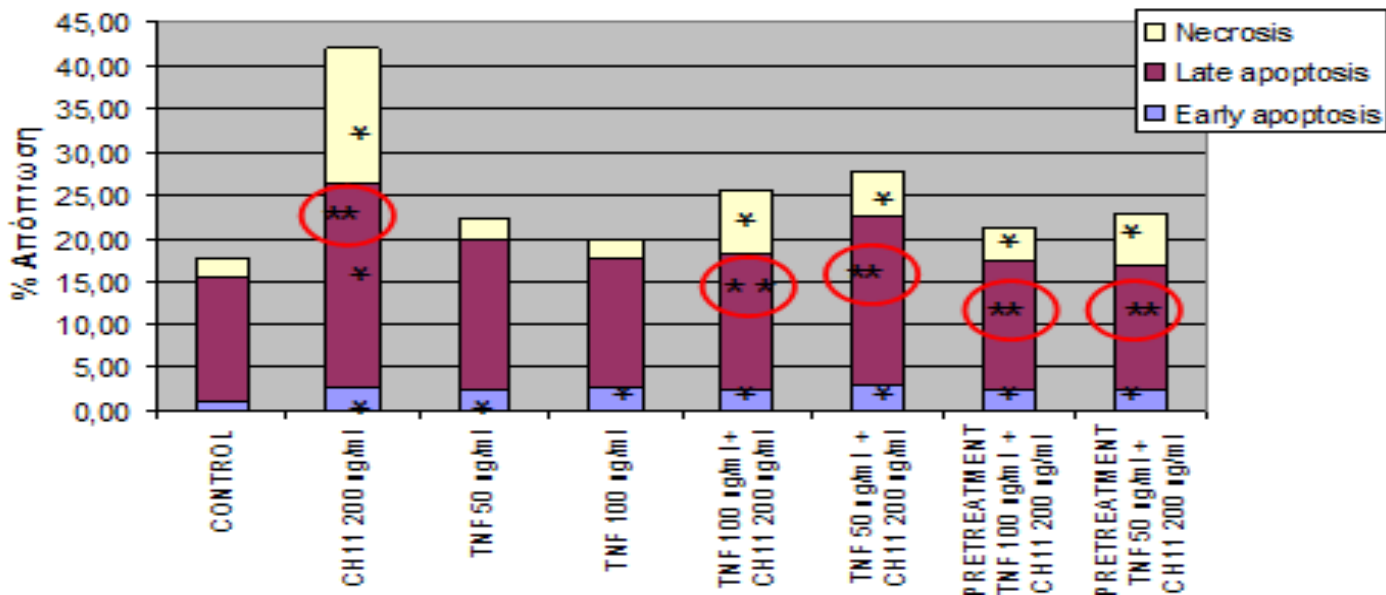
Πίνακας 9. Επίδραση του TNF $\alpha$  στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	1.14	0.68	11.78	2.87	4.96	2.12
CH11 200 mg/ml	2.79	0.57	14.89	1.89	10.48	3.22
TNF 50 ng/ml	2.22	0.80	22.80	1.43	9.93	0.68
TNF 100 ng/ml	2.09	1.13	19.86	1.57	7.79	2.69
TNF 100 ng/ml + CH11 200 mg/ml	2.04	0.74	18.77	2.05	9.09	2.97
TNF 50 ng/ml + CH11 200 mg/ml	2.98	1.63	17.38	2.94	6.97	2.74
PRETREATMENT TNF 50 ng/ml + CH11 200 mg/ml	2.54	1.45	15.61	1.97	6.49	3.32
PRETREATMENT TNF 100 ng/ml + CH11 200 mg/ml	2.45	1.29	18.19	2.32	7.90	3.00

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	12.92	3.55	17.88	5.67
CH11 200 ng/ml	17.69	2.46	28.17	5.68
TNF 50 ng/ml	25.02	2.23	34.95	2.92
TNF 100 ng/ml	21.95	2.70	29.74	5.39
TNF 100 ng/ml + CH11 200 mg/ml	20.81	2.79	29.90	5.77
TNF 50 ng/ml + CH11 200 mg/ml	20.35	4.57	27.32	7.31
PRETREATMENT TNF 50 ng/ml + CH11 200 mg/ml	18.15	3.41	24.65	6.73
PRETREATMENT TNF 100 ng/ml + CH11 200mg/ml	20.65	3.61	28.55	6.61



Γράφημα 9: Επίδραση του TNFα στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα A549.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα ήταν διπλά. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

\*\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το αντίστοιχο CH11 ( $p < 0,05$ )

Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα υποδεικνύουν ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιητή. Όλα τα υπό εξέταση δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό πρότυπο. Ιδιαίτερη προσοχή δίδεται στο γεγονός πως οι ενεργοποιητές CH11 και TNFα, δεν δρουν συνεργατικά, πιθανώς ενεργοποιώντας ο καθένας από αυτούς ένα διαφορετικό σηματοδοτικό μονοπάτι στα A549 κύτταρα, γεγονός που συμφωνεί με την διεθνή βιβλιογραφία.



ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TNF $\alpha$  ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HUVEC

Μετά από επίδραση TNF $\alpha$  για 24h προσδιορίστηκε ο αποπτωτικός δείκτης σε κύτταρα HUVEC. Αναζητήθηκε επιπλέον η επίδραση μικρότερης συγκέντρωσης TNF $\alpha$ , της τάξης των 25 ng/mL, και χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό θετικό πρότυπο απόπτωσης στο οποίο πραγματοποιήθηκε επίδραση με camptothecin.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται ακολούθως.

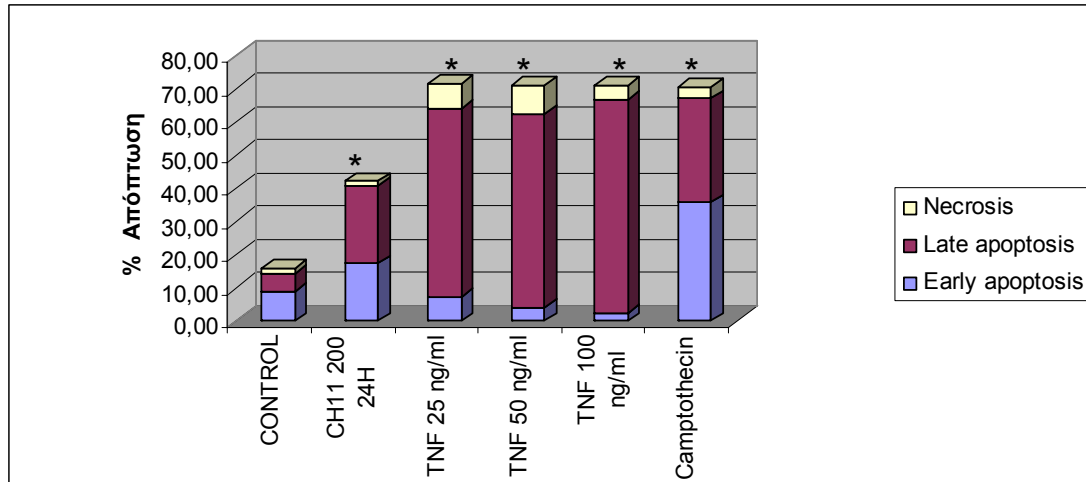
Πίνακας 10. Επίδραση του TNF $\alpha$  στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα HUVEC.

	Πρώιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Όψιμη Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Νέκρωση	Τυπική απόκλιση
CONTROL	8.81	0.99	5.33	1.60	1.70	1.01
CH11 200 24H	17.33	1.15	23.31	5.68	1.48	0.67
TNF 25 ng/ml	7.10	1.98	56.95	6.81	7.59	1.21
TNF 50 ng/ml	3.88	0.39	58.42	6.53	8.65	1.80
TNF 100 ng/ml	2.41	0.47	64.41	3.58	4.35	0.93
Camptothecin	35.69	5.76	31.38	5.77	3.69	0.31

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
CONTROL	14.14	2.59	15.84	3.60
CH11 200 24H	40.64	6.83	42.12	7.50
TNF 25 ng/ml	64.04	8.79	71.63	10.00
TNF 50 ng/ml	62.31	6.92	70.95	8.72
TNF 100 ng/ml	66.83	4.05	71.18	4.97
Camptothecin	67.06	11.53	70.75	11.84



Γράφημα 10: Επίδραση του TNFα στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα HUVEC.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα ήταν διπλά. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ) σε όλες τις υπό εξέταση παραμέτρους.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού μετά από επίδραση με TNFα. Όλα τα υπό εξέταση δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό πρότυπο.



## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΧΩΡΙΣΤΑ ΣΤΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΑΠΟΚΟΛΛΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.

Παρατηρώντας τα προαναφερθέντα πειραματικά αποτελέσματα, παρατηρεί κανείς πως η τάση εφελκυσμού ενεργοποιεί, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τουλάχιστον, τον αποπτωτικό μηχανισμό.

Αυτό ωστόσο που δεν φαίνεται ξεκάθαρα είναι το τι ακριβώς συμβαίνει με τα προσκολλημένα κύτταρα. Εάν πρόκειται για κύτταρα στα οποία ενεργοποιήθηκε ο αποπτωτικός μηχανισμός, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, ή εάν πρόκειται για απόλυτα υγιή κύτταρα.

Το ερώτημα που γεννάται σχετίζεται και χρονικά με τα προαναφερθέντα. Στις 24 ώρες όλα τα πρώιμα και όψιμα αποπτωτικά έχουν αποκολληθεί, ή κάποια είναι ακόμη προσκολλημένα; Εάν τα προσκολλημένα είναι απόλυτα υγιή, τότε η απομάκρυνση του επαγωγέα θα σήμαινε και περαιτέρω επιβίωση των κυττάρων, γεγονός με πρακτική εφαρμογή. Επιπλέον, κύτταρα στο υπερκείμενο θρεπτικό ήταν δυνατό να αποκολληθούν εξαιτίας της τάσης, χωρίς να ενεργοποιηθούν ωστόσο ως προς την απόπτωση.

Με αφορμή τον παραπάνω προβληματισμό σχεδιάστηκε πειραματική διάταξη κατά την οποία το πειραματικό πρωτόκολλο εφαρμόστηκε χωριστά για τα προσκολλημένα και χωριστά για τα αποκολλημένα (κύτταρα στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο) κύτταρα.

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΣΕ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΠΟΚΟΛΛΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ A549 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, μεθοδολογικά πραγματοποιήθηκε μια διαφοροποίηση προκειμένου να προσδιοριστεί ο αποπτωτικός δείκτης χωριστά στα προσκολλημένα και τα αποκολλημένα κύτταρα.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε παρόμοιες με τα προηγούμενα συνθήκες ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.



Τα αποτελέσματα παρατείνονται ακολούθως.

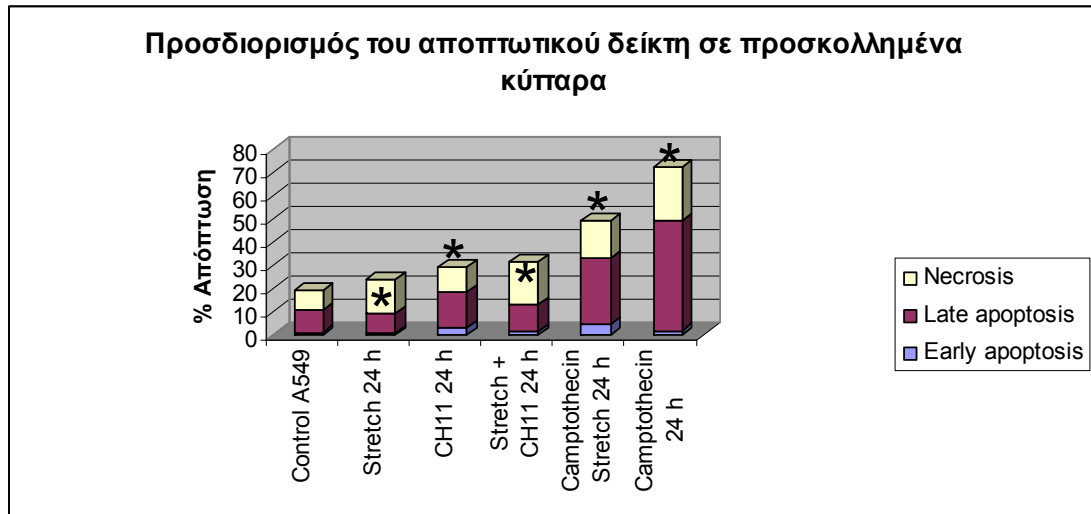
Πίνακας 11. Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε προσκολλημένα κύτταρα και αποκολλημένα κύτταρα A549.

	Πρώιμη Απόπτωση η	Τυπική απόκλιση η	Όψιμη Απόπτωση η	Τυπική απόκλιση η	Νέκρωσ η	Τυπική απόκλιση η
<b>Προσκολλημένα Κύτταρα</b>						
Control A549	0.99	0.01	9.61	2.60	8.26	1.01
Stretch 24 h	0.58	0.20	8.27	2.84	14.69	0.52
CH11 24 h	2.76	0.25	15.66	1.60	10.93	0.01
Stretch + CH11 24 h	1.31	0.00	11.64	0.00	18.81	0.00
Camptothecin Stretch 24 h	4.69	1.15	28.21	1.68	16.62	0.67
Camptothecin 24 h	1.81	0.75	47.59	1.97	23.03	0.30
<b>Αποκολλημένα Κύτταρα</b>						
Control A549	2.08	0.38	63.98	2.71	5.10	1.42
Stretch 24 h	5.32	0.98	77.25	3.61	4.45	1.21
CH11 24 h	6.31	0.39	76.93	2.43	8.68	2.80
Stretch + CH11 24 h	6.70	0.47	82.69	3.38	4.31	0.93
Camptothecin Stretch 24 h	1.49	0.76	18.02	1.77	72.16	3.31
Camptothecin 24 h	1.89	0.95	26.86	1.96	65.38	2.95

	Ολική Απόπτωση	Τυπική απόκλιση	Κυτταρικός Θάνατος	Τυπική απόκλιση
<b>Προσκολλημένα Κύτταρα</b>				
Control A549	10.61	2.61	18.87	3.62
Stretch 24 h	8.85	3.04	23.54	3.56
CH11 24 h	18.42	1.85	29.35	1.86
Stretch + CH11 24 h	12.94	0.00	31.75	0.00
Camptothecin Stretch 24 h	32.90	2.83	49.52	3.50
Camptothecin 24 h	49.40	2.72	72.43	3.02
<b>Αποκολλημένα Κύτταρα</b>				
Control A549	66.05	3.09	71.15	4.51
Stretch 24 h	82.56	4.59	87.01	5.80
CH11 24 h	83.24	2.82	91.92	5.62
Stretch + CH11 24 h	89.39	3.85	93.70	4.77
Camptothecin Stretch 24 h	19.51	2.53	91.67	5.84
Camptothecin 24 h	28.75	2.91	94.13	5.86



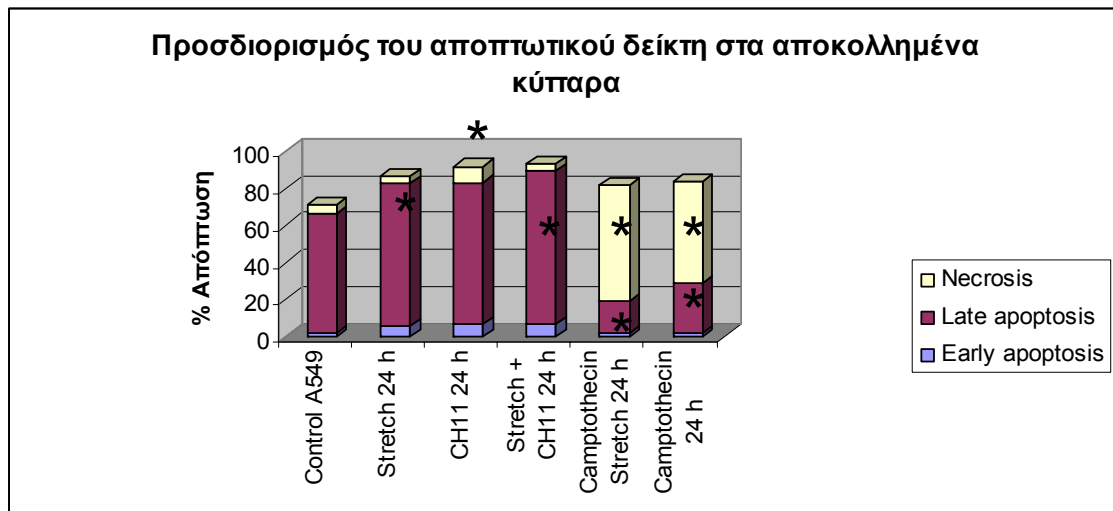
Γράφημα 11: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε προσκολλημένα κύτταρα A549.



Τα δεδομένα παρουσιάζουν το % ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (πρώιμης ή όψιμης απόπτωσης) και των νεκρωτικών κυττάρων σε σύνολο πληθυσμού  $10^4$  κυττάρων που ενεργοποιήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 3 τουλάχιστον επαναλήψεις. Σε κάθε περίπτωση τα δείγματα ήταν διπλά. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα εκφράζουν τον μέσο όρο των μετρήσεων.

\* Δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το control ( $p < 0,05$ ).

Γράφημα 12: Επίδραση της τάσης εφελκυσμού στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού σε αποκολλημένα κύτταρα A549.



Μια προσεχτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων υποδεικνύει πως τα προσκολλημένα κύτταρα ελάχιστα είναι αποπτωτικά ή νεκρωτικά, εκτός από αυτά στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επίδραση με camptothecin.

Στα αποκολλημένα κύτταρα παρατηρείται μεγάλο ποσοστό κυττάρων που βρίσκεται σε στάδιο όψιμης απόπτωσης (late apoptosis). Είναι επιπλέον ξεκάθαρη η επίδραση της camptothecin στη νέκρωση των κυττάρων.

Το εργαστήριο μας προτείνει μεθοδολογικά την εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου στον προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη.





## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΣΗΣ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟΥ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ

Η τάση εφελκυσμού φάνηκε να επιδρά διαφορετικά στους υπό εξέταση κυτταρικούς πληθυσμούς ως προς την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού.

#### Στα κύτταρα A549:

- Υπό την επίδραση μηχανικού ερεθίσματος για 24 ώρες ενεργοποιείται η απόπτωση. Τα υπό εξέταση δείγματα νεκρώνονται ή βρίσκονται σε όψιμη απόπτωση σε ποσοστό που διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το control.
- Στις 15 ώρες στατιστικά σημαντικό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται επίσης, όχι όμως απαραίτητα μέσω της αποπτωτικής οδού. Πιθανώς λόγω καταστροφής των διακυτταρικών συνδέσεων ή ενεργοποίησης κάποιου άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού.
- Τα δείγματα των 15 και 24 ωρών διαφέρουν και μεταξύ τους, πιθανώς το φαινόμενο να είναι χρονοεξαρτώμενο στα κύτταρα A549.

#### Στα κύτταρα MLE12:

- Τα κύτταρα MLE12 παρουσίασαν υψηλά ποσοστά αποπτωτικών κυττάρων, ακόμα και μετά από λίγες ώρες επίδρασης με τα υπό εξέταση ερεθίσματα.
- Ωστόσο, τα υψηλά ποσοστά ακόμα και στο εσωτερικό πρότυπο αναφοράς (control) υποδεικνύουν πως δεν ευθύνονται αποκλειστικά τα μηχανικά ή χημικά ερεθίσματα για την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στην περίπτωση αυτή.



Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει χρόνο διαπλασισμού στις 4 ώρες. Ο μικρός κύκλος ζωής των κυττάρων αυτών πιθανόν να ευθύνεται για τα υψηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την μελέτη ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

- Αξιοσημείωτη είναι η μείωση του ποσοστού των κυττάρων σε όψιμη απόπτωση μετά από την επίδραση κυκλικής τάσης και η αύξηση της νέκρωσης, σε σχέση με το control.

Πιθανώς η κυκλική (επαναλαμβανόμενη) τάση να καταπονεί περισσότερο τα κύτταρα, να καταστρέφει τις διακυτταρικές συνδέσεις διακόπτοντας την κυτταρική επικοινωνία και να οδηγεί γρηγορότερα στον κυτταρικό θάνατο.

#### Κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα:

- Παρατηρήθηκε μαζική θνητότητα τόσο στα υπό εξέταση δείγματα όσο και στο εσωτερικό δείγμα αναφοράς. Συνεπώς δεν μπορεί να αποφανθεί κανείς πως τα χημικά και μηχανικά ερεθίσματα είναι υπεύθυνα για την επαγωγή του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα αυτά.

Τα παρατηρούμενα συνολικά υψηλά ποσοστά θνητότητας πιθανόν να οφείλονται στην δυσκολία διατήρησης των κυττάρων αυτών σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.

- Αξιοσημείωτη είναι η μείωση του ποσοστού των κυττάρων σε πρώιμη απόπτωση μετά από την επίδραση με καμπποθεκίνη. Η τελευταία καταστρέφει το DNA και αυξάνει τα ποσοστά των κυττάρων σε όψιμη απόπτωση.
- Σε όλους τους συνδιασμούς, CH11, stretch και καμπποθεκίνης παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων σε όψιμη απόπτωση σε σχέση με το control.



- Μετά από επίδραση με τον συνδυασμό stretch και CH11 παρατηρήθηκε και η αύξηση της πρώιμης απόπτωσης, σε σχέση με το control.

Πιθανώς ο συνδυασμός αυτός να καταπονεί περισσότερο τα κύτταρα, να καταστρέφει τις διακυτταρικές συνδέσεις διακόπτοντας την κυτταρική επικοινωνία και να οδηγεί γρηγορότερα στον κυτταρικό θάνατο.

#### Ενδοθηλικά κύτταρα πρωτογενών καλλιιεργειών (HUVEC):

- Η μηχανική τάση ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό ακόμα και στις 4 ώρες.
- Τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό πρότυπο (control) αλλά και μεταξύ τους.
- Πιο συγκεκριμένα, εφαρμογή τάσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αυξάνει τον αποπτωτικό δείκτη.

Τα παρατηρηθέντα αποτελέσματα συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία που παρουσιάζει τις πρωτεγενείς καλλιέργειες κυττάρων να ανταποκρίνονται εντονότερα στα διάφορα ερεθίσματα, σε αντίθεση με τις κυτταρικές σειρές, οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και μικρότερη θνητότητα.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗ TNF $\alpha$ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ.

#### Στα κύτταρα.A549

- Όλα τα υπό εξέταση δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το εσωτερικό πρότυπο ως προς το ποσοστό της πρώιμης απόπτωσης.
- Ο CH11 ενεργοποιεί ισχυρά τον αποπτωτικό μηχανισμό σε όποιο συνδυασμό ερεθισμάτων κι αν συμμετέχει σε ποσοστό που διαφέρει



στατιστικά σημαντικά επιπλέον στην όψιμη απόπτωση και στη νέκρωση.

- Ο TNFα φαίνεται να παρεμποδίζει την ισχυρά αποπτωτική δράση του CH11 στα A549, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου.
- Η δράση αυτή του TNFα φαίνεται να είναι περισσότερο ισχυρή όταν πραγματοποιείται προ-επώαση των δειγμάτων.
- Οι ενεργοποιητές CH11 και TNFα, δεν δρουν συνεργικά, πιθανώς ενεργοποιώντας ο καθένας από αυτούς ένα διαφορετικό σηματοδοτικό μονοπάτι στα κύτταρα A549, γεγονός που συμφωνεί με την διεθνή βιβλιογραφία.

#### Στα ενδοθηλακά κύτταρα (HUVEC).

- Ο TNFα φαίνεται να παρουσιάζει ισχυρά αποπτωτική δράση του στα κύτταρα HUVEC, αυξάνοντας σημαντικά την απόπτωση και τη νέκρωση, σε αντίθεση με τη δράση του στα κύτταρα A549.
- Η δράση αυτή του TNFα φαίνεται να είναι δόσο-εξαρτώμενη, καθώς μεγαλύτερη δόση ενεργοποιητή αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων που περνούν από την πρώιμη σε όψιμη απόπτωση.

#### ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΝΑ ΑΠΟΠΤΟΥΝ

Μια προσεχτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων αποκαλύπτει και την κλιμακούμενη ικανότητα των διαφορετικών κυτταρικών τύπων να ανταπεξέρχονται στα χημικά ή μηχανικά ερεθίσματα και να αποπύπτουν ή όχι.



Πιο αναλυτικά, η σύγκριση των τεσσάρων διαφορετικών πειραματικών μοντέλων ως προς τον αποπτωτικό δείκτη μετά από ενεργοποίηση με μηχανική τάση αποκαλύπτει πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πρωτογενών καλλιιεργειών αποπύπτουν περισσότερο σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς A549. Η τάση ενεργοποιεί την απόπτωση από τις 4 ώρες στα HUVEC, ενώ απαιτούνται 24 h για τα A549.

Τα επιθηλιακά κύτταρα MLE12 νεκρώνονται, ανεξάρτητα από το αποπτωτικό μονοπάτι.

Το ίδιο ισχύει και για τα απομονωμένα κυψελιδικά μακροφάγα, για τα οποία υπάρχει ωστόσο δυσκολία διατήρησής τους σε κυτταροκαλλιιεργεια.

Ανάλογα είναι τα αποτελέματα και για το χημικό ερέθισμα.

Στα κύτταρα, A549 ο TNFα όχι μόνο δεν προκαλεί απόπτωση αλλά παράλληλα φαίνεται να μπλοκάρει την αποπτωτική δράση του CH11.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιθέτως ο χημικός αυτός μεσολαβητής παρουσιάζει ισχυρή αποπτωτική δράση.

#### ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ A549 ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

Παρατηρείται πως τα επίπεδα έκφρασης της κυτοσολικής φωσφολιπάσης (cPLA2) καθώς και της ενεργοποιημένης κυτοσολικής φωσφολιπάσης (pcPLA2) δεν διέφεραν στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των διαφορετικά ενεργοποιημένων κυτάρων. Συνεπώς η κυτοσολική φωσφολιπάση cPLA2 δεν εμπλέκεται στον αποπτωτικό μηχανισμό των μηχανο – ενεργοποιημένων A549 κυτάρων.

Η sPLA2 αντιθέτως ανιχνεύθηκε μόνο στα κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με συνδυασμό CH11+ STRETCH και καμπθοκεκίνης, και μάλιστα στο ομογενοποίημα (κυτοσόλιο) των κυτάρων και όχι στο υπερκείμενο.

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η επαγόμενη απόπτωση μέσω χημικού υποδοχέα (CH11) ή τάσης (STRETCH) δεν συμπεριλαμβάνει την συμμετοχή



sPLA2, ωστόσο η συνδυαστική τους δράση πιθανώς να ενεργοποιεί κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι που να ενεργοποιεί την παραγωγή της sPLA2 στα κύτταρα A549.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΩΝ

Συνολικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η μηχανική καταπόνηση ενεργοποίησε τον αποπτωτικό μηχανισμό σε επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (κύτταρα A549) και σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου (HUVEC).

Η χρονική διάρκεια του μηχανικού ερεθίσματος διαδραμάτισε σε κάθε περίπτωση σημαντικό ρόλο.

Χημικά ερεθίσματα, CH11, και καμπτοθεκίνη ενεργοποίησαν την απόπτωση σε όλους τους υπό εξέταση κυτταρικούς τύπους, γεγονός που συμφωνεί με την διεθνή βιβλιογραφία.

Ο φλεγμονώδης μεσολαβητής TNFα παρουσίασε αποπτωτική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC.

Στα A549 εν αντιθέσει παρουσιάζει αντι-αποπτωτική δράση, περιορίζοντας ουσιαστικά την αποπτωτική δράση του CH11, γεγονός που συμφωνεί και με προηγούμενα εργαστηριακά δεδομένα.

Στα κύτταρα αυτά, τα σηματοδοτικά μονοπάτια φλεγμονής και απόπτωσης φαίνεται να εμπλέκονται, με παράδειγμα την αύξηση της παραγωγής της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης sPLA2 σε κύτταρα που παρουσίασαν υψηλό αποπτωτικό δείκτη. Πιθανώς οι ενδοκυττάρειες πορείες σηματοδότησης να είναι κοινές ανεξάρτητα από το εξωτερικό ερέθισμα που τις προκαλεί, όπως για παράδειγμα συνέβη στην περίπτωση που η επίδραση με καμπτοθεκίνη και ο συνδυασμός μηχανικού (τάση εφελκυσμού) και χημικού (CH11) ερεθίσματος οδήγησαν στην παραγωγή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A2. Διαφορετικά δηλαδή σήματα μπορεί να καταλήξουν στον ίδιο στόχο (δημιουργία δεύτερου κοινού μηνύματος από τους τελεστές) και τελικά να τροποποιήσουν την έκφραση γονιδίων στόχων και παραγόμενων π.χ. εκκρινόμενων πρωτεϊνών.



Η κυτταρική σειρά MLE12 δεν αποτέλεσε καλό πειραματικό μοντέλο για την μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης, πιθανός εξαιτίας του σύντομου κύκλου ζωής, και για το λόγο αυτό δεν προτείνεται ως πειραματικό μοντέλο.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα, επίσης δεν προτείνονται ως κατάλληλο μοντέλο μελέτης, εξαιτίας του σύντομου κύκλου ζωής και της δυσκολίας διατήρησής τους σε κυτταροκαλλιέργειες.

Μεθοδολογικά, προτείνεται ο προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη χωριστά στα προσκολλημένα και τα αποκολλημένα κύτταρα, ανεξάρτητα από το είδος του ερεθίσματος.



- 1 Kerr JF, 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol methods Cell Biol* 46:1-27.
- 3 Kerr JF, 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol methods Cell Biol* 46:1-27.
- 4 Walker NI. 1987. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* 126(3):439-451.
- 5 Walker NI, Gobe GC. 1987. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J Pathol* 153(4):333-344.
- 8 Wang Y, Jiang H, Kanost MR. 1999. Biological activity of *Manduca sexta*.
- 9 Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381):1322-1326.
- 10 Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381):1305-1308.
- 11 Brenner C, Kroemer G. 2000. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 289(5482):1150-1151.
- 12 Evan G, Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. *Science* 281(5381):1317-1322.
- 13 Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381):1309- 1312.
- 14 Saraste A, Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45(3):528-537.





- 15 Savill J. 1998. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392(6675):442-443.
- 16 . Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267(5203):1445-1449.
- 17 Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281 (5381): 1312-1316.
- 19 Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2(4):277-288.
- 20 Locksley RM, Killeen N, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104(4):487-501.
- 21 Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272(51):32401-32410.
- 22 Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M. deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106(9):3214-3222.
- 23 Sulimann A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent pathways. *Oncogene* 20(17):2122-2133.
- 24 Grimm S, Stanger BZ, Leder P. 1996. RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent. *Proc Natl Acad Sci*



- U S A 93(20):10923-10927.
- 25 Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. 1995. The TNF receptor – 1 associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
- 26 Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296(5573):1635-1636.
- 27 Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14(22):5579-5588.
- 28 Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabell P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16):2861-2874.
- 29 Cai J, Yang J, Jones DP. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):139-149.
- 30 Du C, Fang, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1):33-42.
- 31 Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell death differ.* 9(10): 1031-1042.
- 32 Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zam Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*



- 410(6828):549-554.
- 33 Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842):95-99.
- 34 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662):43-50.
- 35 Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656.
- 36 Messmer UK, Pfeilschifter J, 200. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 22 (10):878-881.
- 37 Savill J. 1998. Apoptosis phagocytic docking without shocking. *Nature* 392(6675):442-443.
- 38 Van Herde WL, Poort S, van 't Veer C, Reutelingsperger CP, de Groot PG. 1994. Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. *Biochem J* 302 ( Pt 1):305-312.
- 38 Daleke DL, Lyles JV, Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 1486(1):108-127.
- 40 Evan G., Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. *Science* 281(5381):1317-1322.
- 41 De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Sueishi K, Luks FI. Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 21:65-76.



- 42 De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Sueishi K, Luks FI. Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol* 1998; 152: 179-190.
- 43 Sanchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1996; 271:7416-7422.
- 44 Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. 1997; 272:154-161.
- 45 Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms *J Biol Chem* 1997; 272:31138-31148.
- 46 Shami PJ, Sauls DL, Weinberg JB. Schedule and concentration-dependent induction of apoptosis in leukemia cells by nitric oxide. *Leukemia* 1998; 12:1461-1466.
- 47 Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13636-13641.
- 48 Schittny JC, Djonov V, Fine A, Burri PH. Programmed cell death contributes to postnatal lung development *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:786-793.
- 49 Brice MC, Honaker CE, Cross RJ. Lung fibroblasts undergo apoptosis following alveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:228-236.
- 50 Burri PH. The postnatal growth of the rat lung.3. Morphology *Anat rec* 1974; 180:77-98.



- 51 Burri PH, Moschopoulos M. Structural analysis of fetal rat lung development. *Anat Rec* 1992; 234: 399-418.
- 52 Scavo LM, Ertsey R, Chapin CJ, Allen L, Kitterman JA. Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:21-31.
- 53 Uhal BH. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium *Am J Physiol*. 1997; 272: L1031-L1045.
- 54 Smith RM, Spragg RG. The lung in the intensive care unit. In: Crystal RG, West JB (Eds.) *The Lung: Scientific Foundations*. Raven, New York, 2185-2196.
- 55 Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1998; 138: 720-723.
- 56 Song Y, Mao B, Quian G. The role of apoptosis and Fas/FasL in lung tissue in patients with acute respiratory distress syndrome. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1999;22: 610-612.
- 57 Bardales RH, Xie SS, Schaefer rF, and Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* 1996;149:845-852.
- 58 Wang HC, ShunCT, Hsu SM, Kuo SH, Luh KT and Yang PC. Fas/Fas ligand pathway is involved in the resolution of type II pneumocyte hyperplasia after acute lung injury: evidence from a rat model. *Crit Care Med*. 2002; 30:1528-1534.
- 59 Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, Matthay MA and Ware LB. Fas and fas ligand are upregulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and



- the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 2002;161:1783-1796.
60. Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R and Holmes M. Increased production of TGF- $\beta$  and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in CORD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285: L492-L499.
61. Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mogovin S, Chi EY, Jonas M and Martin TR. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). 1999; 163:2217-2225.
62. Ware LB and Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1376-1383.
63. Fine A, Anderson N, Rothstein T, Williams M and Gochuico B. FAS expression in pulmonary alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1993;273: L64-L71.
64. Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR and Liles WC. Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 2001; 158:153-161.
65. Kyd J.M., Foxwell A.R., Cripps A.W., Mucosal immunity in the lung and upper airway, *Vaccine* 19 2001; 2527–2533.
66. Charavaryamath C., Janardhan K.S., Townsend H.G., Willson P., Singh B., Multiple exposures to swine barn air induce lung inflammation and airway hyperresponsiveness, *Respir. Res.* 2005;6: 50.
67. Donaldson K., Mills N., Macnee W., Robinson S., Newby D., Role of inflammation in cardiopulmonary health effects of PM, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005;207: 483–438.



68. Hillman P., Gebremedhin K., Warner R., Ventilation system to minimize airborne bacteria, dust, humidity, and ammonia in calf nurseries, *J. Dairy Sci.* 1992;75:1305–1312.
69. Ishii H., Hayashi S., Hogg J.C., Fujii T., Goto Y., Sakamoto N., Mukae H., Vincent R., van Eeden S.F., Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment, *Respir. Res* 2005; 6: 87.
70. Phillippo M., Arthur J.R., Price J., Halliday G.J., The effects of selenium, housing and management on the incidence of pneumonia in housed calves, *Vet. Rec.* 1987;121: 509–512.
71. Ackermann M.R., Brogden K.A., Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Microbes Infect.* 2000;2: 1079–1088.
72. Ames T.R., Dairy calf pneumonia, the disease and its impact, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1997;13: 379–391.
73. Ankermann T., Wiemann T., Reisner A., Orłowska-Volk M., Kohler H., Krause M.F., Topical interleukin-8 antibody attracts leukocytes in a piglet lavage model, *Intensive Care Med.* 2005; 31: 272–280.
74. Calvert C.A., Rawlings C.A., Pulmonary manifestations of heartworm disease, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1985;15: 991–1009.
75. Happel K.I., Bagby G.J., Nelson S., Host defense and bacterial pneumonia, *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2004;25: 43–52.
76. Larsen L.E., Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review, *Acta Vet. Scand.* 2000;41: 1–24.



77. Mejias A., Chavez-Bueno S., Ramilo O., Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2005;18: 199–204.
78. Mosier D.A., Bacterial pneumonia, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1997;13: 483–493.
79. Powell D.G., Equine infectious respiratory disease, *Vet. Rec.* 1975;96: 30–34.
80. Roudebush P., Mycotic pneumonias, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1985;15: 949–969.
81. Straw B.E., Performance measured in pigs with pneumonia and housed in different environments, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991;198: 627–630.
82. Wilkins P.A., Lower airway diseases of the adult horse, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2003;19: 101–121.
83. Wilkins P.A., Lower respiratory problems of the neonate, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2003;19: 19–33.
84. Guo R.F., Ward P.A., Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model, *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33: 303–310.
85. Harmon B.G., Avian heterophils in inflammation and disease resistance, *Poult. Sci.* 1998;77: 972–977.
86. Lazarus S.C., Role of inflammation and inflammatory mediators in airways disease, *Am. J. Med.* 1986;81; 2–7.
87. Soethout E.C., Muller K.E., Rutten V.P., Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;87: 277–285.





88. Downey G.P., Worthen G.S., Henson P.M., Hyde D.M., Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum, *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993 ;147: 168–176.
89. Alon R., Chen S., Puri K.D., Finger E.B., Springer T.A., The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling, *J. Cell Biol.* 1997;138: 1169–1180.
90. Arfors K.E., Lundberg C., Lindbom L., Lundberg K., Beatty P.G., Harlan J.M., A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo, *Blood* 1987;69: 338–340.
91. Mulligan M.S., Varani J., Dame M.K., Lane C.L., Smith C.W., Anderson D.C., Ward P.A., Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats, *J. Clin. Invest.* 1991;88: 1396–1406.
92. Simms H.H., D'Amico R., Regulation of intracellular polymorphonuclear leukocyte Fc receptors by lipopolysaccharide, *Cell. Immunol.* 1994;157: 525–541.
93. Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H., Moilanen E., Nitric oxide production and signaling in inflammation, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005;4: 471–479.
94. Segal A.W., How neutrophils kill microbes, *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:197–223.
95. Bhatia M., Moochhala S., Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome, *J. Pathol.* 2004;202: 145–156.



96. Burns A.R., Simon S.I., Kukielka G.L., Rowen J.L., Lu H., Mendoza L.H., Brown E.S., Entman M.L., Smith C.W., Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts, *J. Immunol.* 1996;156:3389– 3401.
97. Murtaugh M.P., Baarsch M.J., Zhou Y., Scamurra R.W., Lin G., Inflammatory cytokines in animal health and disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996;54: 45–55.
98. Baarsch M.J., Wannemuehler M.J., Molitor T.W., Murtaugh M.P., Detection of tumor necrosis factor alpha from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay, *J. Immunol. Methods* 1991;140: 15–22.
99. Elder A., Johnston C., Gelein R., Finkelstein J., Wang Z., Notter R., Oberdorster G., Lung inflammation induced by endotoxin is enhanced in rats depleted of alveolar macrophages with aerosolized clodronate, *Exp. Lung Res.* 2005;31: 527–546.
100. Parbhakar O.P., Duke T., Townsend H.G., Singh B., Depletion of pulmonary intravascular macrophages partially inhibits lipopolysaccharide- induced lung inflammation in horses, *Vet. Res.* 2005;36:557–569.
101. Zou G.M., Tam Y.K., Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances, *Eur. Cytokine Netw.* 2002;13: 186–199.
102. Cohen J., The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* 2002;420: 885-891.
103. Tracey K.J., Beutler B., Lowry S.F., Merryweather J., Wolpe S., Milsark I.W., Hariri R.J., Fahey T.J.I., Zentella A., Albert J.D., Shires G.T., Cerami A., Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin, *Science* 1986;234: 470–474.
104. Gangur V., Birmingham N.P., Thanavorakul S., Chemokines in health and disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;86: 127–136.



105. Bienkowski R.S., Gotkin M.G., Control of collagen deposition in mammalian lung, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995;209:118–140.
106. Kucharewicz I., Kowal K., Buczko W., Bodzenta-Lukaszyk A., The plasmin system in airway remodelling, *Thromb. Res.* 2003;112: 1–7.
107. Zhang K., Phan S.H., Cytokines and pulmonary fibrosis, *Biol. Signals* 1996;5:232–239.
108. Reid L.M., The pathology of pulmonary inflammation, in: Bray M.A., Anderson W.H. (Eds.), *Mediators of Pulmonary Inflammation*, Marcel Dekker, New York, 1991; 1–33.
109. Aderka D., Le J.M., Vilcek J., IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice, *J. Immunol.* 1989;143: 3517–3523.
110. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A., Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood* 1990;75: 40–47.
111. Muraguchi A., Hirano T., Tang B., Matsuda T., Horii Y., Nakajima K., Kishimoto T., The essential role of B cell stimulatory factor 2 484 E.L. Thacker (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells, *J. Exp. Med.* 1988;167:332–344.
112. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells, *J. Immunol.* 1991;146: 3444–3451.
113. Pittet J.F., Griffiths M.J., Geiser T., Kaminski N., Dalton S.L., Huang X., Brown L.A., Gotwals P.J., Kotliansky V.E., Matthay M.A., Sheppard D., TGF-



- beta is a critical mediator of acute lung injury, *J. Clin. Invest.* 2001;107: 1537–1544.
114. Sher A., Fiorentino D., Caspar P., Pearce E., Mosmann T., Production of IL-10 by CD4+T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection, *J. Immunol.* 1991;147: 2713– 2716.
115. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B., Pawlowski S., Diebold R.J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvin D., et al., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease, *Nature* 1992;359:693–699.
116. Lo C.J., Fu M., Cryer H.G., Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome, *J. Surg. Res.* 1998;79:179–184.
117. Raychaudhuri B., Fisher C.J., Farver C.F., Malur A., Drazba J., Kavuru M.S., Thomassen M.J., Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages, *Cytokine* 2000;12: 1348–1355.
118. Bonfield T.L., Panuska J.R., Konstan M.W., Hilliard K.A., Hilliard J.B., Ghnaim H., Berger M., Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;152: 2111–2118.
119. Borish L., Aarons A., Rumbyrt J., CvietusaP., Negri J., Wenzel S., Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996;97: 1288–1296.
120. Gudmundsson G., Bosch A., Davidson B.L., Berg D.J., Hunninghake G.W., Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998;19:812–818.



121. Benton H.P., Tyler J.A., Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;154:421–428.
122. Μπατιστάτου Α., Καναβάρος Π. Πνευμονικές βλάβες που σχετίζονται/ προκαλούνται από αναπνευστήρα (VALI/VILI). Ιστολογική εικόνα-παθογενετικοί μηχανισμοί. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2004, Τόμος 7:55-62.
123. West J.B. *Respiratory Physiology. The essentials.* 5<sup>th</sup> ed., Μετάφραση Μπεχράκης Π.Κ., Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου.
124. Σπυρόπουλος Κ.Β. Πνευμονολογία (Παθοφυσιολογία των αναπνευστικών νόσων), Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1996, σελ. 172.
125. Λέκκα Μ.Ε., Καρκαμπούνας Α., Κητσιούλη Ε. Επιφανειακή τάση και επιφανειοδραστικές ουσίες. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2002, Τόμος 6:1-10.
126. Λέκκα Μ.Ε., Μασσαλάς Χ.Β. Μεταγωγή μηχανικού σήματος. *Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας*, 2004, Τόμος 6:29-47.
127. Mingyao L.A., Tanswell K., Post M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am. J. Physiol.*, 1999; 277:L667-L683.
128. Wirtz H.R.W., Dobbs L.G. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells. *Science*, 1990; 250:1266-1269.
129. Basdra, E., Huber, L.A., Komposch, G., Papavassiliou, A.G. Mechanical loading triggers specific biochemical responses in mandibular condylar chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1222:315-322.
130. Gilbert J.A., Weinhold P.S., Banes A.J., link G.W., Jones G.L. Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro. *J. Biomech.*, 1994; 27:1169-1177.



131. Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblin M.J., Vacek P., Low R.B. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.
132. Winston F.K., Macarak E.J., Gorfien S.F., Thibault L.E. A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. *J. Appl. Physiol.*, 1989; 67:397-405.
133. Lee A.A., Delhaas T., Waldman L.K., MacKenna D.A., Villarreal F.J., McCulloch A.D. An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 40)*, 1996; 271:C1400-1408.
134. Boitano S., Sanderson M.J., Dirksen E.R. A role for Ca<sup>2+</sup>-conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 1994; 107:3037-3044.
135. Gutierrez J.A., Gonzalez R.F., Dobbs L.G. Mechanical distension modulates pulmonary alveolar epithelial phenotypic expression in vitro. *Am. J. Physiol.*, 1998; 274:L196-L202.
136. Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblinn M.J., Vacek P., Low R.B. Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.
137. Xu J., Liu M., Tanswell A.K., Post M. Mesenchymal determination of mechanical strain-induced fetal lung cell proliferation. *Am. J. Physiol., (Lung Cell. Mol. Physiol. 19)*, 1998; 275:L540-L550.
138. Edwards Y.S. Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2001; 129:245-260.



139. Liu M., Xu J., Tanswell K., Post M. Inhibition of mechanical strain-induced fetal rat lung cell proliferation by gadolinium, a stretch-activated channel blocker. *J. Cell Biol.*, 1994; 161:501-507.
140. Berman A.E., Kozlova N.I. Integrins:structure and functions. *Membr. Cell Biol.*, 2000; 13:207-244.
141. Smith B.T. Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1977; 115:285-293.
142. Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 2001; 134:197– 205.
143. Gijon MA, Spencer DM, Leslie CC. Recent advances into the regulation of cytosolic phospholipase A2. *Adv Enzyme Regul* 2000; 40:255–68.
144. Clark JD, Lin LL, Kriz RW. A novel arachidonic acidselective cytosolic PLA2 contains aCa<sup>2+</sup>-dependent translocation domain withh omology to PKC and GAP. *Cell*1991;65:1043–1051.
145. Sharp JD, White DL, Chiou XG. Molecular cloning and expression of human Ca<sup>2+</sup>-sensitivecytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1991;266:14850–14853.
146. McNish RW, Peters-Golden M. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 196: 147–153.
147. Das S, Cho W. Roles of catalytic domain residues in interfacial binding an activation of Group IV cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 2002;277:23838–23846.



148. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993; 72:269–278.
149. Duan L, Gan H, Arm J, Remold HG. Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF- $\alpha$  in the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Immunol.* 2001;166:7469–7476.
150. Valentin E, Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2000;1488:59–70.
151. Channon JY and Leslie CC. A Ca-dependent mechanism for associating a soluble arachidonyl-hydrolysing PLA2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 1990; 265(10): 5409-5413.
152. Qiu ZH and Leslie CC. Protein kinase C dependent and independent pathways of MAP kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269(30): 19480-19487.
153. Fisher AB and Dodia C. Role of phospholipase A2 enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes. *J. Lipid Res.* 1996;37: 1057- 1064.
154. Fisher AB, Dodia C. () Lysosomal type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001;280: L748-L754.
155. Kramer RM, Roberts EF, Manetta JV, Hyslop PA, Jakubowski JA. Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets. *J Biol Chem* 1993 Dec 15;268(35):26796-804.
156. Hulkower KI, Hope WC, Chen T, Anderson CM, Coffey JW, Morgan DW. Interleukin-1 beta stimulates cytosolic phospholipase A2 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Apr 30;184(2):712-719.





157. Wu T, Levine SJ, Lawrence MG, Logun C, Angus CW, Shelhamer JH. Clin Invest 1994 Feb;93(2):571-577.
158. Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA. Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. J Biol Chem 1994 Mar 25;269(12):9227-33.
159. Pearce MJ, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Whatley RE. Shear stress activates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) and MAP kinase in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1996 Jan 17;218(2):500-4.
160. Sane AC, Mendenhall T, Bass DA. Secretory phospholipase A2 activity is elevated in bronchoalveolar lavage fluid after ovalbumin sensitization of guinea pigs. J Leukoc Biol 1996 Dec;60(6):704-9.
161. Tong LJ, Dong LW, Hsu HK, Liu MS. Phospholipase A2 activities are decreased during early but increased during late phases of sepsis in rat heart. J Surg Res 1998 Mar;75(2):165- 9.
162. Seeds MC, Nixon AB, Wykle RL, Bass DA. Differential activation of human neutrophil cytosolic phospholipase A2 and secretory phospholipase A2 during priming by 1,2-diacyl and 1-O-alkyl-2-acylglycerols. Biochim Biophys Acta 1998 Nov 2;1394(2-3):224-34.
163. Adam-Klages S, Schwandner R, Luschen S, Ussat S, Kreder D, Kronke M. Caspase260 mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A2 during apoptosis. J Immunol 1998 Nov 15;161(10):5687-94.
164. Zaitseva M, Hamasaki Y, Matsuo M, Miyazaki M, Hayasaki R, Muro E, Yamamoto S, Kobayashi I, Ichimaru T, Miyazaki S. Induction of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H2 synthase-2 by lipopolysaccharide in human polymorphonuclear leukocytes. Eur J Haematol 1999 Aug;63(2):94-102.



165. Calabrese C, Triggiani M, Marone G, Mazzeella G. Arachidonic acid metabolism in inflammatory cells of patients with bronchial asthma. *Allergy* 2000;55 Suppl 61:27-30.
166. Wu Y, Singer M, Thouron F, Alaoui-El-Azher M, Touqui L. Effect of surfactant on pulmonary expression of type IIA PLA(2) in an animal model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 Apr;282(4):L743-50.
167. Waydhas C, Baumgartner I, Nast-Kolb D, Lehnert P, Duswald KH, Schweiberer L. The clinical significance of serum phospholipase A in patients with multiple trauma. *Prog Clin Biol Res* 1989;308:763-8.
168. Vadas P, Pruzanski W. Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease. *Lab Invest* 1986 Oct;55(4):391-404.
169. Nevalainen TJ. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. *Clin Chem*. 1993 Dec;39(12):2453-9.
170. Edelson JD, Vadas P, Villar J, Mullen JB, Pruzanski W. Acute lung injury induced by phospholipase A2. Structural and functional changes. *Am Rev Respir Dis* 1991 May;143(5 Pt 1):1102-9.
171. Mirkovic D. The role of phospholipase A2 in the pathogenesis of respiratory damage in hemorrhagic necrotizing pancreatitis--assessment of a new experimental model. *Vojnosanit Pregl* 2000 Nov-Dec;57(6):625-33.
172. Elstad MR, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. A mechanism for resolution of pulmonary inflammation. *Chest*. 1991 Mar;99(3 Suppl):9S-10S.



173. Triggiani M, De Marino V, Sofia M, Faraone S, Ambrosio G, Carratu L, Marone G. Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156:94-100.
174. Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A, Vaitkus D, Fukuda T, Watanabe N, Fueki N, McIntyre TM, Zimmerman GY, Makino S, Prescott SM. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest* 1999; 103:989-997.
175. Triggiani M, De Marino V, Sofia M, Faraone S, Ambrosio G, Carratu L, Marone G. Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Jul;156(1):94-100 -261.
176. Jehle R, Schlame M, Buttner C, Frey B, Sinha P, Rustow B. Platelet-activating factor (PAF)- acetylhydrolase and PAF-like compounds in the lung: effects of hyperoxia. *Biochim Biophys Acta*. 2001 May 31;1532(1-2):60-6.
177. Seilhame JJ, Pruzanski W, Vadas P. Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 1989;264 :5335–5338.
178. Kramer RM, Hession C, Johansen B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 1989;264:5768–5775.
179. Komada M, Kudo I, Mizushima H, Kitamura N, Inoue K. Structure of cDNA coding for rat platelet phospholipase A2, *J. Biochem. (Tokyo)* 1989;106:545–547.
180. Nevalainen TJ, Hietaranta AJ, Gronroos JM. Phospholipase A2 in acute pancreatitis: new biochemical and pathological aspects, *Hepatology* 1999;46:2731–2735.
181. Vadas P, Scott K, Smith G. Serum phospholipase A2 enzyme activity and immunoreactivity in a prospective analysis of patients with septic shock, *Life Sci.* 1992;50:807–811.



