

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200788



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

151

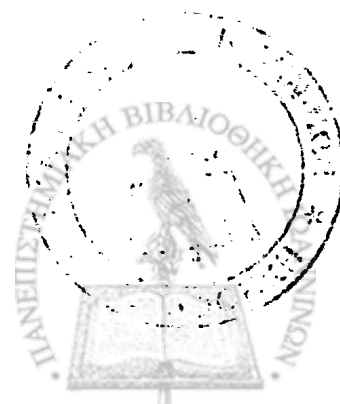


ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΚΑΡΑΓΙΩΡΓΑ
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ
ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΛΙΠΩΔΗ ΕΜΒΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Χημείας του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα
(Ν. 5343/1932, άρθρο 202).**



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

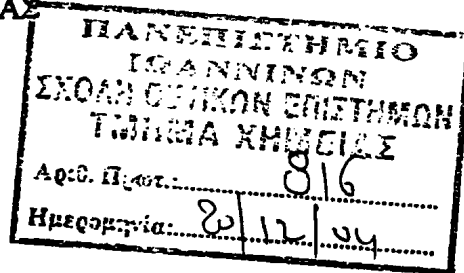
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ιωάννινα, 20-12-2004

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝ/ΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής διατριβής της κας Γεωργίας Καράγιωργα, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων την Δευτέρα 20 Δεκεμβρίου 2004, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: «Μελέτη Βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με Λιπώδη Εμβολή».

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση της υποψήφιας είναι ευρεία και ολοκληρωμένη.

Με βάση τα παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποφάσισε να γίνει η απονομή του τίτλου του Διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κα Γεωργία Καράγιωργα με βαθμό Άριστα.

Με τιμή,

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας Παν/μίου Αθηνών
3. Γεώργιος Νάκος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μαρία Σακαρέλλου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Παναγιώτης Καναβάρος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μωσής Ελισάφ, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Άννα Μπατιστάτου, Επ. Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

1565.
589A/14-01-05



Στους γονείς μου,

Χρήστο και Ελευθερία

Στην αδερφή μου, Μαρία



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα έκδοση αποτελεί την πρώτη έκδοση της σειράς «Βιβλίο της Γυναίκας» που κυκλοφορεί με τον τίτλο «Βιβλίο της Γυναίκας» και περιλαμβάνει τα βιβλία της Αγίας Γραφής που αφορούν στην γυναίκα. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία.

Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία.

Στο σύντροφό μου, Βαγγέλη

Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία.

Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία.

Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία. Η σειρά αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια να δοθεί στην γυναίκα η θέση που της αξίζει στην Εκκλησία και στην κοινωνία.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της διατριβής είχε η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας κ. Μαριλένα Λέκκα. Ήταν μεγάλη τύχη για μένα η συνεργασία μου μαζί της. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την πολύτιμη διδασκαλία της, για την απεριόριστη κατανόηση που έδειξε όλη την περίοδο της εκπόνησης της διατριβής μου και κυρίως για την συμπαράσταση και ενθάρρυνσή της όταν αποφάσισα να εργαστώ παράλληλα με την εκπόνηση της διατριβής μου. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την καθοριστικής σημασίας συμβολή της στην τελική εμφάνιση της παρούσας διατριβής.

Άμεση, επίσης, ήταν και η συμβολή στο σχεδιασμό και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιου Νάκου, Διευθυντή της μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και για τον χρόνο που αφιέρωσε για να με βοηθήσει στη διόρθωση του χειρογράφου. Τέλος, τον ευχαριστώ για την άρτια βιβλιογραφική ενημέρωση που μου παρείχε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου, Επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για τις ευγενικές της υποδείξεις.

Ευχαριστώ πολύ τη Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Βασιλική Γαλάνη για τις πολύτιμες υποδείξεις της κατά την εκμάθηση των τεχνικών που είχαν σχέση με την επεξεργασία των κυττάρων και την φιλοξενία της στο εργαστήριό της.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο κ. Ειρήνη Κητσιούλη για την εκπαίδευσή μου στο ξεκίνημα της διατριβής μου.



Πολλές ευχαριστίες οφείλω στους εργαζόμενους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων. Όλες οι κλινικές μετρήσεις έγιναν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και σημαντική στον τομέα αυτό ήταν η συμβολή των γιατρών της μονάδας.

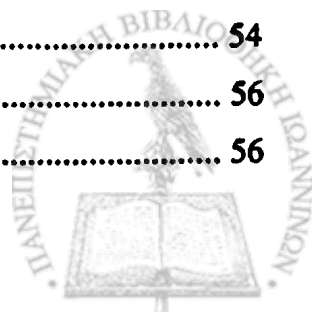
Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο που με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου και ιδιαίτερα την κ. Δέσποινα Πανταζή, τον κ. Θανάση Καρκαμπούνα και τον κ. Σταμάτη Λιοκάτη.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου για την αγάπη τους και στο σύζυγό μου Βαγγέλη γιατί υπήρξε για μένα πηγή βοήθειας και ενθάρρυνσης σε όλη αυτή τη δύσκολη περίοδο.

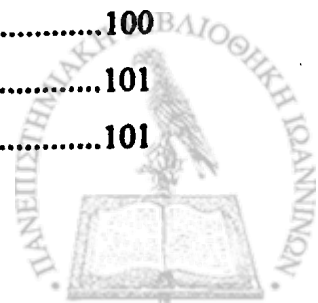


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

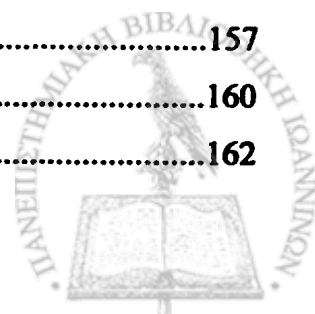
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	13
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	17
ΛΙΠΩΔΗΣ ΕΜΒΟΛΗ.....	17
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	17
ΟΡΙΣΜΟΣ.....	18
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΗΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΕΜΒΟΛΗΣ.....	18
Κλινικά Χαρακτηριστικά	18
Εργαστηριακά ευρήματα.....	20
Παθογένεση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	25
ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ.....	25
Αναπνευστικό σύστημα.....	25
Πνεύμονες.....	27
Τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα.....	29
Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη λειτουργία των πνευμόνων	32
Μηχανική των πνευμόνων.....	32
Φύση των δυνάμεων που προκαλούν την επαναφορά του πνεύμονα.....	33
Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα	38
Ρόλος των συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	41
Λιπίδια.....	41
Πρωτεΐνες	43
SP-A	43
SP-B	44
SP-C	46
SP-D	46
Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην άμυνα του πνεύμονα.....	47
Βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	52
Υποστρώματα	54
Σταδια βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης	56
“De novo” σύνθεση.....	56



Πορεία “ανάπλασης”-Remodelling	58
Σύνθεση άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	59
Έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	60
Ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στις κυψελίδες	63
Κυψελιδικά μακροφάγα και ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	67
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A ₂ (PLA ₂)	67
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF).....	71
ΛΙΠΙΔΙΚΟΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ	71
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ PAF.....	74
Πορεία Ανάπλασης (Remodeling pathway).....	74
De novo πορεία βιοσύνθεσης	74
PAF-ακετυλυδρολάση (ACh).....	75
Παθοφυσιολογικές δράσεις του PAF.....	83
Μηχανισμοί δράσης- μεταγωγή σήματος.....	83
Ενεργοποίηση των κυττάρων	85
Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων	85
Φλεγμονώδεις δράσεις του PAF	87
Συσχέτιση του PAF με ασθένειες	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	89
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	89
Διαδικασία λήψης του BAL	89
Κατεργασία του BAL.....	89
Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών του BAL με τη μέθοδο Lowry	89
Αρχή της μεθόδου	89
Εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Bligh-Dyer.....	92
Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC.....	94
Εκχύλιση PC.....	97
Διαχωρισμός και εκχύλιση των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων	98
Προσδιορισμός λιπιδικού φωσφόρου	99
Αρχή της μεθόδου	99
Αντιδραστήρια	100
Διαλύματα εργασίας.....	101
Πρότυπο διάλυμα φωσφορικού 5 μg /ml	101



Πειραματική πορεία	101
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	102
Πειραματική πορεία	103
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	104
Βιολογικός προσδιορισμός του PAF σε BAL με συσσώρευση πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού	105
Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού	106
Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP).....	107
Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων.....	109
Επεξεργασία δειγμάτων	113
Προσδιορισμός Ολικών Εστέρων στο χλωροφορμικό εκχύλισμα του BAL	116
Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης στο Χλωροφορμικό εκχύλισμα του BAL...119	119
Προσδιορισμός της ενεργότητας της PLA ₂ με τη φθορισμομετρική μέθοδο	122
Προσδιορισμός ενεργότητας PAF-AcH με τη φθορισμομετρική μέθοδο	128
Εκχύλιση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων και καθαρισμός τους με TLC.....	132
Κατεργασία των κυττάρων του BAL.....	134
Προσδιορισμός κυτταρικού πλυθισμού με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.....	135
Χρώση κυττάρων με Sudan Black B	136
ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	138
ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ	
ΕΜΒΟΛΗΣ.....	140
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	141
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	142
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	142
Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.....	142
Ολική Πρωτεΐνη του BAL.....	144
Προσδιορισμός Ολικών Φωσφολιπιδίων του BAL	146
Προσδιορισμός των τάξεων των φωσφολιπιδίων στο BAL.....	148
Ένζυμα	153
Φωσφολιπάση A ₂	153
Ενεργότητα PAF-Ακετυλυδρολάσης	155
PAF	157
Εστέρες.....	160
Ολική Χοληστερόλη	162



Αεριοχρωματογραφική ανάλυση των λιπαρών οξέων.....	164
Κλάσμα Φωσφατιδυλοχολίνης.....	164
Τάξεις των ουδετέρων λιπιδίων.....	167
Ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων των ουδετέρων λιπιδίων σε λιπαρά οξέα .	172
Κύτταρα.....	180
Λιπδικό περιεχόμενο κυττάρων.....	180
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	181
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΕΜΒΟΛΗΣ.....	181
Πρωτεΐνες.....	181
Φωσφόρος.....	183
Ολική Χοληστερόλη.....	185
Εστέρες.....	188
Φωσφολιπάση A ₂	191
ΡΑΦ-Ακετυλυδρολάση.....	193
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο	195
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	195
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο	207
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	207
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	211
SUMMARY.....	216
ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	220
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	221
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	222



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διατριβή είχε σκοπό να προσεγγίσει την παθογένεση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής (FES) διαμέσω των μεταβολών που παρατηρούνται στις βιοχημικές παραμέτρους του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, αλλά και να διερευνήσει πιθανούς νέους βιοχημικούς δείκτες για τη διάγνωση του συνδρόμου.

Το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής είναι μια μετατραυματική επιπλοκή που εμφανίζεται κυρίως σε σοβαρά τραυματισμένους ασθενείς με κατάγματα της πύελου ή των μακρών οστών. Η κλινική του διάγνωση είναι συνήθως δύσκολη και αβέβαιη εξαιτίας του γεγονότος ότι η κλασική τριάδα συμπτωμάτων και σημείων που χαρακτηρίζει το σύνδρομο αυτό και εμφανίζεται 24-72 ώρες μετά τον τραυματισμό (οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, νευρολογική δυσλειτουργία και το χαρακτηριστικό πετεχειώδες εξάνθημα) σπανίως ανευρίσκεται. Επιπλέον, οι αναπνευστικές ή νευρολογικές διαταραχές συχνά αποδίδονται λανθασμένα στις συνυπάρχουσες θωρακικές και κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις. Επιπρόσθετα, η παθογένεση της πνευμονικής βλάβης στο Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής δεν είναι καλά γνωστή, ενώ δεν έχουν μελετηθεί οι μεταβολές στο BAL αυτών των ασθενών ως τώρα στη βιβλιογραφία.

Αντικείμενο της εργασίας μας ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης των ενεργοτήτων των φωσφολιπασών, καθώς επίσης και των συγκεντρώσεων αλλά και του είδους των ουδετέρων λιπιδίων που περιέχονται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα προκειμένου να βρεθούν πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής και να διερευνηθεί η παθογένεση της πνευμονικής βλάβης στο σύνδρομο αυτό. Θα πρέπει εδώ να τονιστεί ότι για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία έγινε ολοκληρωμένη μελέτη των βιοχημικών παραμέτρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής, καθώς και προσπάθεια επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων της μελέτης μας σε πειραματικό μοντέλο λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα.

Σκοπός της μελέτης των βιοχημικών παραγόντων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν:



- Η διερεύνηση του παθοφυσιολογικού υπόβαθρου της ανάπτυξης της πνευμονικής βλάβης σε ασθενείς με το Σύνδρομο της Λιτώδους Εμβολής.
- Η αναζήτηση του ρόλου των λιπολυτικών ενζύμων στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης σε ασθενείς με το Σύνδρομο της Λιτώδους Εμβολής.
- Η διερεύνηση του ρόλου των μεταβολών των ουδετέρων λιπιδίων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αυτών των ασθενών.
- Η αναζήτηση πιθανών δεικτών για τη διάγνωση του συνδρόμου.
- Η επιβεβαίωση των ευρημάτων από τους ασθενείς σε πειραματικό μοντέλο.

Θα είχε μεγάλη κλινική σημασία η εύρεση δεικτών που θα μπορούσαν να παρέχουν μια ταχεία και ακριβή διάγνωση αυτού του συνδρόμου. Πράγματι, επειδή οι τραυματίες συχνά αναπτύσσουν πρώιμες πνευμονικές ή νευρολογικές διαταραχές, η διάκριση μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς το Σύνδρομο της Λιτώδους Εμβολής θα μπορούσε να βοηθήσει στην αποφυγή πρόσθετης διερεύνησης και στην έγκαιρη έναρξη κατάλληλης θεραπείας. Επιπρόσθετα, η γνώση της παθογένεσης της πνευμονικής βλάβης στο Σύνδρομο της Λιτώδους Εμβολής θα επέτρεπε την εφαρμογή ειδικής προληπτικής ή θεραπευτικής αγωγής για αυτό το σύνδρομο.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA: Αραχιδονικό οξύ

ALI: Οξεία πνευμονική βλάβη

AMP: Μονοφωσφορική αδενοσίνη

Asp: Ασπαραγίνη

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

ARDS: Σύνδρομο οξείας ανπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων

BAL: Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

BSA: αλβουμίνη βοός

cAMP: Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

CE: Εστέρας χοληστερόλης

CoA: Συνένζυμο A

CP: Φωσφοκρεατίνη

CPK: Κινάση της φωσφοκρεατίνης

D: Dalton

DAG: Διακυλογλυκερόλη

DFP: Διϋσοπροπυλοφθοροφωσφορικό οξύ

DPPC: Διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνη

DSPC: Δικεκορεσμενηφωσφατιδυλοχολίνη

DG: Διγλυκερίδιο

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

FFA: Ελεύθερα λιπαρά οξέα

F_IO₂: Περιεκτικότητα του εισπνεόμενου αέρα σε οξυγόνο

FES: Σύνδρομο λιπώδους εμβολής

HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας

HETE: Υδροξυεικοσατετραενικό οξύ

His: Ιστιδίνη

IL: Ιντερλευκίνη

ICAM-1: Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1

Lys_o-PC: Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη



LPS: Λιποπολυσακχαρίτης
LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MG: Μονογλυκερίδιο
MMP: Ένζυμο αποικοδόμησης μεσοκυττάριας ουσίας μεταλλοπρωτεΐνάση
N: Newton
PA: Φωσφατιδικό οξύ
PLA₂: Φωσφολιπάση A₂
PLC: Φωσφολιπάση C
Ppl: Πίεση πλατώ
PAF: Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AcH: Ακετυλυδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PaO₂: Μερική πίεση του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα
PaCO₂: Μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα
PC: Φωσφατυδυλογολίνη
PG: Φωσφατιδυλογλυκερόλη
PG: Προσταγλανδίνη
PMN: Πολυμορφοπύρηνα
PI: Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη
PS: Φωσφατιδυλοσερίνη
Sph: Σφιγγομυελίνη
SP-A: Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A
SP-B: Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη B
SP-C: Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη C
SP-D: Επιφανειοδραστική πρωτεΐνη D
s-PLA₂: Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂
TLC: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TNF-a: Παράγοντας νέκρωσης όγκων
Tx: Θρομβοξάνιο
VT: Όγκος αέρα κάθε εισπνοής



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

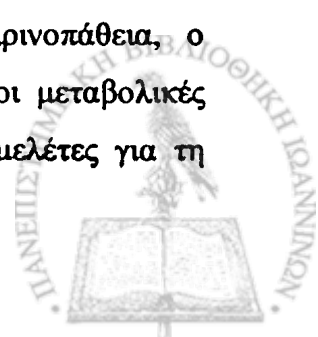
ΛΙΠΩΔΗΣ ΕΜΒΟΛΗ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής (ΣΛΕ, FES) είναι μια μετατραυματική επιπλοκή που εμφανίζεται κυρίως σε σοβαρά τραυματισμένους ασθενείς με κατάγματα της πυέλου ή των μακρών οστών. Αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας που συνοδεύει τα περιστατικά αυτά. Οι προσπάθειες για την κατανόηση αυτού του συνδρόμου, καθώς και για την αναζήτηση στοιχείων που θα βοηθήσουν στη διάγνωσή του, διαρκούν πάνω από έναν αιώνα.

Κάνοντας μια μικρή ιστορική αναδρομή, ο Zenker [1] περιγράφει το 1861 σταγόνες λίπους στα τριχοειδή του πνεύμονα ασθενούς που υπέστη θανατηφόρο θωρακονωτιαίο τραύμα. Στα 1865 ο Wagner [2] περιέγραψε τα παθολογικά χαρακτηριστικά της λιπώδους εμβολής. Η καθιέρωση εντούτοις μιας κλινικής διάγνωσης για το σύνδρομο της λιπώδους εμβολής έγινε στα 1873 από τον Bergmann [3] σε έναν 38χρονο ασθενή που υπέστη συνθλιπτικό κάταγμα του περιφερικού μηριαίου οστού. Στα 1879 ο Scriba [4] έκανε ανασκόπηση και συσχέτιση των κλινικών, παθολογοανατομικών και πειραματικών παρατηρήσεων που είχαν γίνει μέχρι τότε και αφορούσαν το FES. Στα 1957, 1969 και 1971 ο Peltier ασχολήθηκε εκτεταμένα με το πρόβλημα της λιπώδους εμβολής, συνέχισε την έρευνα και έδωσε έμφαση στη σημασία της πνευμονικής λιπώδους εμβολής.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 ήταν γνωστή η σχέση του FES με σκελετικά και τραύματα των μαλακών ιστών, καθώς επίσης και το γεγονός ότι οι τραυματισμοί αυτοί αποτελούν σημαντικό αίτιο εμφάνισης του Συνδρόμου της Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων (ΣΟΑΔ, ARDS), στο οποίο θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω. Το FES εντούτοις δεν εμφανίζεται μόνο μετά από ένα τραύμα. Κατά καιρούς έχει αναφερθεί η σχέση του FES με μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων, όπως η αιμοσφαιρινοπάθεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, τα εγκαύματα, οι σοβαρές λοιμώξεις, οι μεταβολικές διαταραχές, κτλ. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη



διερεύνηση των μηχανισμών που αφορούν την παθοφυσιολογία του FES και έχει διαπιστωθεί η σχέση του με το ARDS [5].

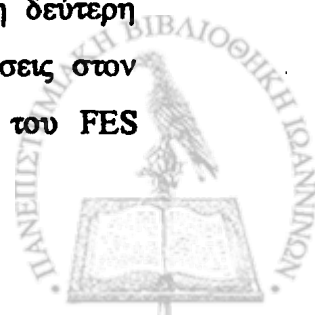
ΟΡΙΣΜΟΣ

Λιπώδης εμβολή είναι η ύπαρξη λίπους μέσα στην κυκλοφορία, η οποία μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα εμβολής με ή χωρίς κλινικές επιπτώσεις. Σύνδρομο Λιπώδους Εμβολής (FES) είναι η ύπαρξη λίπους μέσα στην κυκλοφορία, η οποία όμως συσχετίζεται με μία αναγνωρίσιμη κλινική συμπτωματολογία [6].

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΤΗΣ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΕΜΒΟΛΗΣ

Κλινικά Χαρακτηριστικά

Το FES συνοδεύεται από ένα σύνολο συμπτωμάτων που μπορεί να υπάρχουν και σε άλλες σοβαρές ασθένειες με αποτέλεσμα συνήθως να μην είναι πάντα εύκολη η διαφορική διάγνωση. Η εξέλιξη του μπορεί να είναι ραγδαία, με πνευμονική και συστηματική εμβολή λίπους, οξεία δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιαγγειακή κατάρρευση [7]. Συνήθως, εντούτοις, η εξέλιξη είναι βαθμιαία, με την εμφάνιση υποξαιμίας, νευρολογικών συμπτωμάτων, πυρετού και ενός χαρακτηριστικού πετεχλώδους εξανθήματος, που εμφανίζονται 24-72 ώρες μετά τον τραυματισμό [8]. Ο Gurd [9] πρότεινε τη χρήση δύο κατηγοριών κλινικών ενδείξεων μείζονος και ελάσσονος σημασίας για τη διάγνωση του συνδρόμου της λιπώδους εμβολής. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν: το πετεχλώδες εξάνθημα, διάφορες αναπνευστικές διαταραχές, όπως ταχύπνοια, δύσπνοια, αιμόπτυση, αμφοτερόπλευρα διάχυτα διηθήματα στην ακτινογραφία θώρακος, αμφοτερόπλευροι τριζόντες κατά την ακρόαση του θώρακα και, τέλος, νευρολογικά συμπτώματα, όπως σύγχυση, υπνηλία και κώμα. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν: η ταχυκαρδία, ο υψηλός πυρετός, οι αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή και οι νεφρικές διαταραχές. Για τη διάγνωση του FES



απαιτείται η παρουσία ενός συμπτώματος από την πρώτη κατηγορία συντεσσάρων από τη δεύτερη, επιπρόσθετα από την ύπαρξη λίπους στον ορρό. Τα διαγνωστικά αυτά κριτήρια, όπως θεσπίστηκαν από τον Gurd [9] θεωρήθηκαν αναξιόπιστα, καθώς λιποσφαίρια συχνά βρίσκονται στο αίμα υγιών εθελοντών και τραυματιών χωρίς κλινική ένδειξη FES [10]. Ο Lindeque [11] υποστήριξε ότι κάθε ασθενής με κάταγμα μηριαίου οστού ή κνήμης, ο οποίος παρουσίαζε συγκεκριμένες διαταραχές κάποιων αναπνευστικών παραμέτρων ήταν ύποπτος για FES [11]. Τα κριτήρια αυτά του Lindeque οδήγησαν σε διάγνωση του FES με ποσοστό επιτυχίας 29%, το υψηλότερο μέχρι τότε. Συνήθως, το FES συνοδεύεται από διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος. Η σοβαρότητα μπορεί να ποικίλει, αλλά η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι σχετικά συχνή. Ο Bulger [12] αναφέρει ότι 44% των ασθενών με διάγνωση FES χρειάστηκαν για κάποιο διάστημα μηχανική υποστήριξη της αναπνοής.

Το πετεχειώδες εξάνθημα είναι χαρακτηριστικό του συνδρόμου. Εμφανίζεται στο 60% των ασθενών συνήθως στον επιπεφυκότα, στη στοματική κοιλότητα, στις πτυχώσεις του δέρματος, στον τράχηλο και στον αχίλλειο τένοντα [13]. Παράγοντες που μπορεί να συνεισφέρουν στην εμφάνιση του εξανθήματος είναι η μειωμένη ροή αίματος, η μείωση των θρομβωτικών παραγόντων και οι διαταραχές στα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα [14]. Επιπρόσθετα, εμφανίζονται συχνά νευρολογικές εκδηλώσεις που κυμαίνονται από υπνηλία και σύγχυση μέχρι κώμα [15, 16, 17]. Οι επιλοκές από το κεντρικό νευρικό σύστημα μπορούν να υπάρχουν και χωρίς την παρουσία των αναπνευστικών διαταραχών εμφανίζονται, όμως, παράλληλα με το πετεχειώδες εξάνθημα, τον πυρετό, την ταχυκαρδία και την υπόταση [18].



Εργαστηριακά ευρήματα

Για τη διάγνωση του FES χρησιμοποιείται ένα μεγάλο εύρος εργαστηριακών ευρημάτων, τα περισσότερα από τα οποία είναι μη ειδικά. Συχνά εμφανίζεται θρομβοκυτοπενία, καθώς και μια ανεξήγητη αναιμία [19]. Ο μηχανισμός που προκαλεί τη θρομβοκυτοπενία δεν είναι καλά κατανοητός, αλλά τόσο η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από την εμβολή του μυελού των οστών με τον σχηματισμό του θρόμβου, όσο και η κατανάλωση των αιμοπεταλίων από την ανεπιθύμητη ενδαγγειακή πήξη έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνισή της [20]. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος, που ακολουθεί τον τραυματισμό, μπορεί να συσχετίζεται με την εμφάνιση υποκαλιαιμίας [21]. Επιπρόσθετα, η υπαλβουλιναίμια έχει προταθεί ως ένας πολύ καλός δείκτης διάγνωσης εξαιτίας της πρόσδεσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην αλβουμίνη, με αποτέλεσμα η τελευταία να μην ανιχνεύεται στον ορρό [22]. Οι αναλύσεις αίματος και ούρων μπορεί να δείξουν λιποσφαίρια αποτελώντας ένδειξη, όχι όμως και απόδειξη της παρουσίας λιπώδους εμβολής. Η ακτινογραφία θώρακος δείχνει αμφοτερόπλευρα πνευμονικά διηθήματα που δίνουν την εντύπωση «χιονιού».

Για τη διάγνωση του συνδρόμου έχουν προταθεί διάφορες βιοχημικές δοκιμασίες. Στο παρελθόν είχαν αναπτυχθεί διάφορες βιολογικές δοκιμασίες, όπως η ενεργότητα της λιπάσης του ορρού ή η ανίχνευση λιποσφαιρίων σε ούρα, που ήταν όμως μικρής ευαισθησίας και ειδικότητας [23]. Νεότερες μελέτες έχουν γίνει για να διαπιστωθεί αν ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων με έγκλειστα λίπους, που ανακτώνται από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη διάγνωση της λιπώδους εμβολής. Στις μελέτες αυτές εκτιμήθηκε η ύπαρξη λιποσφαιρίων στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και ειδικότερα στα κυψελιδικά μακροφάγα. Έτσι, σε μελέτη που έγινε από την ομάδα του Mimosz [24], ο ολικός αριθμός των κυττάρων με έγκλειστα λίπους σε τραυματίες και ασθενείς με ARDS (Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας Ενηλίκων) βρέθηκε αυξημένος κατά τρεις φορές σε σύγκριση με αυτόν που παρουσίαζαν μετεγχειρητικοί ασθενείς που δεν εμφάνισαν κανένα από αυτά τα δύο σύνδρομα. Η αύξηση αυτή ήταν αποτέλεσμα της επιμέρους αύξησης του αριθμού των κυψελιδικών μακροφάγων για τους

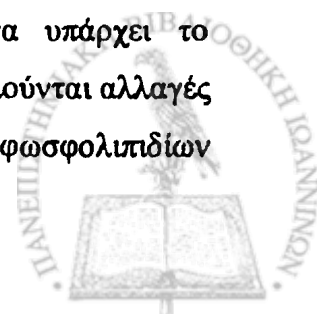


τραυματίες ασθενείς με FES και των ουδετερόφιλων για τους ασθενείς με ARDS. Δε βρέθηκε, όμως, κάποια σημαντική διαφορά στον αριθμό και στον τύπο των κυττάρων με έγκλειστα λίπους που ανακτήθηκε από το BAL μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς κλινική ένδειξη λιπώδους εμβολής. Κατέληξαν, επομένως, στο συμπέρασμα ότι το περιεχόμενο λίπος στα κυψελιδικά κύτταρα ήταν παρόμοιο σε ασθενείς με αναπνευστική ανεπάρκεια ανεξάρτητα από την αιτιολογία. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των κυττάρων που περιέχει λιποσφαίρια θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς με πνευμονικά διηθήματα για τη διάγνωση του συνδρόμου της λιπώδους εμβολής, με την προϋπόθεση ότι ο αριθμός αυτών των κυττάρων θα είναι σημαντικά αυξημένος (30% του συνόλου των κυττάρων του BAL).

Παθογένεση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής.

Η πνευμονική βλάβη του FES χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση φλεγμονής και οιδήματος, ως αποτέλεσμα της αυξημένης διαβατότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης που προκαλείται από την εμβολή λίπους. Στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης της λιπώδους εμβολής συμμετέχουν μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως η φωσφολιπάση A_2 (PLA₂), η PAF ακετυλυδρολάση (PAF-AcH) και ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF).

Η φωσφολιπάση A_2 είναι ένα λιπολυτικό ένζυμο που δρα ως μεσολαβητής σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Κατά κύριο λόγο παράγεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα [25], τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η εκκρινόμενη PLA₂ τύπου II (sPLA₂-II) ελευθερώνεται στον κυψελιδικό χώρο σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που χαρακτηρίζουν το ARDS [26]. Για την καταλυτική της δράση απαιτούνται συγκεντρώσεις Ca^{2+} της τάξεως των mM [27], οι οποίες υπάρχουν στον κυψελιδικό χώρο [28]. Συνεπώς, μετά την απελευθέρωση του ενζύμου από τα κυψελιδικά μακροφάγα υπάρχει το κατάλληλο περιβάλλον για να δράσει με αποτέλεσμα να προκαλούνται αλλαγές στο λιπδικό προφίλ του BAL, όσον αφορά τη συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων



του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά και επιμέρους αλλαγές που αφορούν την ποιοτική σύσταση των φωσφολιπιδίων. Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας των ασθενών με οξεία πνευμονική βλάβη (ALI) και FES.

Οι PLA_2 μπορούν να επηρεάσουν την πνευμονική λειτουργία υδρολύοντας τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των λυσο-φωσφολιπιδίων [29] και συγκεκριμένα της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (λύσο-PC). Η λυσο-PC παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ARDS και της πνευμονικής βλάβης του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής με τους εξής μηχανισμούς: α) ασκεί βλαπτικές επιδράσεις στις κυψελίδες και το ενδοθήλιο [30], β) αυξάνει την τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα [31] και γ) αδρανοποιεί τον επιφανειοδραστικό παράγοντα [32]. Επομένως, η PLA_2 πιθανώς συμμετέχει άμεσα στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης που συσχετίζεται με τη λιπώδη εμβολή.

Η αυξημένη ενεργότητα φωσφολιπάσης A_2 είναι επίσης υπεύθυνη για την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος και εικοσανοειδών, δηλαδή των βιολογικά δραστικών μεταβολιτών του, όπως είναι οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια [33]. Επιπλέον, η εκκρινόμενη PLA_2 θα μπορούσε να συμμετέχει στην παραγωγή του PAF, ενός σημαντικού λιπιδικού μεσολαβητή της φλεγμονής που εμπλέκεται στην παθογένεση της οξείας πνευμονικής βλάβης [34, 35].

Το ένζυμο PAF ακετυλυδρολάση (PAF-AcH) υδρολύει την ακετυλομάδα του PAF, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ανενεργού λυσο-PAF. Με τον τρόπο αυτό η PAF-AcH ανταγωνίζεται τη φλεγμονώδη δράση του PAF, παίζοντας έτσι πιθανά ένα προστατευτικό ρόλο στην οξεία πνευμονική βλάβη [36, 217]. Είναι, επομένως, πιθανό τα επίπεδα της PAF-AcH να έχουν σχέση με την παθογένεση της πνευμονικής βλάβης στην λιπώδη εμβολή, δεδομένου ότι τα χαμηλά επίπεδα PAF-AcH οδηγούν σε επιπλέον αύξηση των ήδη αυξημένων επιπέδων του PAF.

Σε μελέτη που έγινε σε μοντέλο λιπώδους εμβολής σε χοίρους δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη ενεργότητα φωσφολιπάσης A_2 και τη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης που προκαλεί η λιπώδης εμβολή. Εντούτοις, τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντιδιαστολή με προηγούμενες μελέτες σε άλλα πειραματικά μοντέλα, οι οποίες έδειξαν ότι η ενεργότητα της



φωσφολιπάσης A_2 είναι αυξημένη σε περιπτώσεις περισσότερο παρατεταμένης ή σοβαρής λιπώδους εμβολής. Χρειάζεται, επομένως, περισσότερη έρευνα για να διαφωτιστεί πλήρως ο ρόλος της PLA_2 στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης στη λιπώδη εμβολή [37].

Αντικείμενο της εργασίας μας ήταν η διερεύνηση των μεταβολών των ενεργοτήτων των φωσφολιπασών, των επιπέδων του PAF, καθώς επίσης και των επιπέδων αλλά και του είδους των ουδετέρων λιπιδίων που περιέχονται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα στο BAL ασθενών με λιπώδη εμβολή, προκειμένου: α) να κατανοηθεί η παθογένεση και β) να βρεθούν πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής.

Βασικό συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι τα φωσφολιπίδια. Το πιο σημαντικό φωσφολιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η οποία αποτελείται κατά 50% από διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC). Η DPPC συντίθεται με τη βοήθεια τρανσαμινασών, οι οποίες αντικαθιστούν το λιπαρό οξύ της PC στη δεύτερη θέση με παλμιτικό [62]. Η DPPC από μόνη της δεν είναι ικανή να υποστηρίξει τη λειτουργία των πνευμόνων εξαιτίας της ανεπαρκούς επιφανειοδραστικότητάς της [38]. Ο ρόλος των άλλων συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Εντούτοις είναι γνωστό ότι βελτιώνουν τις ιδιότητες της DPPC in vivo [38, 39, 40, 41]. Σε υγιείς πνεύμονες η σωστή αναλογία φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και DPPC είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Για παράδειγμα, η αύξηση του λόγου DPPC/ PG στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη του ARDS [42, 43, 44, 45]. Παρουσία της PG, η χοληστερόλη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι εστέρες χοληστερόλης βελτιώνουν τις ιδιότητες της DPPC in vitro [46, 47, 48]. Η σχέση όμως μεταξύ των συγκεντρώσεων των παραπάνω λιπιδίων και της παθοφυσιολογίας της πνευμονικής βλάβης στο FES δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

Προσδοκώμενα αποτελέσματα από τη μελέτη των παραπάνω βιοχημικών λιπδικών παραγόντων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είναι:



- Η διερεύνηση του παθοφυσιολογικού υπόβαθρου που ευθύνεται για την ανάπτυξη της πνευμονικής βλάβης στο Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής.
- Η αναζήτηση του ρόλου των λιπολυτικών ενζύμων και του PAF στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης στη λιπώδη εμβολή.
- Η διερεύνηση του ρόλου των μεταβολών των ουδετέρων λιπιδίων στο BAL.
- Η αναζήτηση δεικτών για τη διάγνωση των ασθενών υψηλού κινδύνου εμφάνισης αυτού του συνδρόμου.

Θα είχε μεγάλη κλινική σημασία η εύρεση δεικτών που θα μπορούσαν να παρέχουν μια ταχεία και ακριβή διάγνωση αυτού του συνδρόμου. Πράγματι, επειδή οι τραυματίες συχνά αναπτύσσουν πρώιμες πνευμονικές ή νευρολογικές διαταραχές άλλης αιτιολογίας, η διάκριση μεταξύ ασθενών με ή χωρίς το σύνδρομο της λιπώδους εμβολής (FES) θα μπορούσε να βοηθήσει στην αποφυγή πρόσθετης διερεύνησης και στην έγκαιρη έναρξη κατάλληλης θεραπείας. Επιπρόσθετα, μια τέτοια δοκιμασία, θα επέτρεπε την εφαρμογή ειδικής θεραπευτικής αγωγής για αυτό το σύνδρομο.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ – ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ

Αναπνευστικό σύστημα

Κύρια λειτουργία των πνευμόνων είναι η ανταλλαγή οξυγόνου μεταξύ του εισπνεόμενου αέρα και του αίματος. Η κυτταρική αναπνοή αφορά τη διαδικασία πρόσληψης οξυγόνου κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των οργανικών μορίων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εισπνεόμενου αέρα και του αίματος, δηλαδή η διαδικασία της αναπνοής διαμέσω του αναπνευστικού συστήματος, είναι η διαδικασία κατά την οποία το απαιτούμενο για την κυτταρική αναπνοή οξυγόνο προσλαμβάνεται από τον ατμοσφαιρικό αέρα και διαμέσω του κυκλοφορικού συστήματος μεταφέρεται στους ιστούς, ενώ παράλληλα το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τους ιστούς αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα.

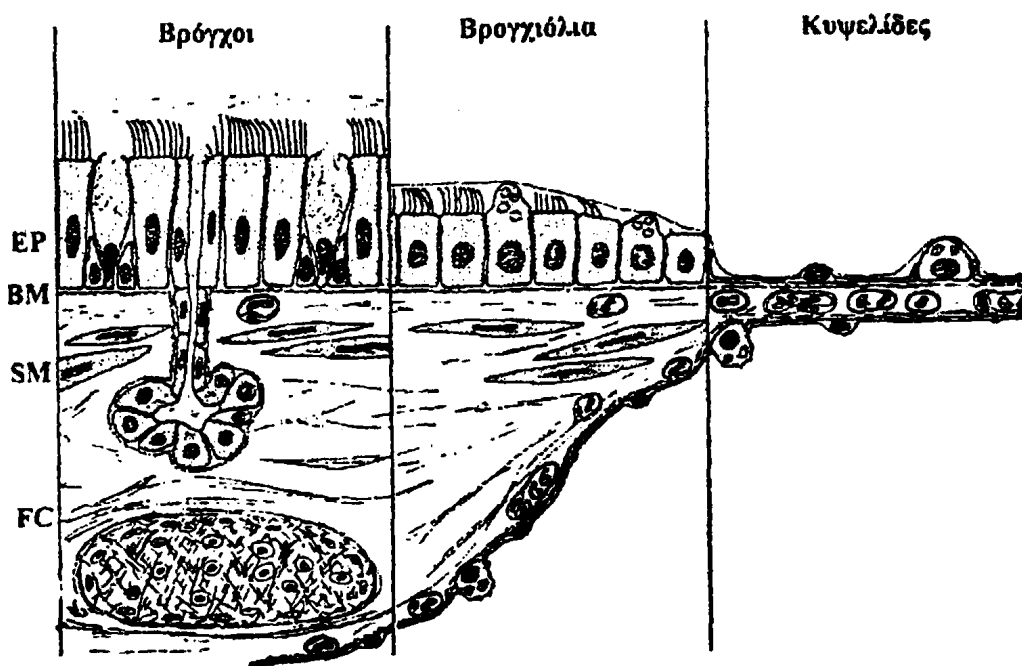
Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από την αντλία και τους πνεύμονες με τους αεραγωγούς. Η αντλία αποτελείται από τον υπεζωκότα, το θωρακικό κλωβό, τα νεύρα, τους αναπνευστικούς μύες και το αναπνευστικό κέντρο στον εγκέφαλο.

Οι αεραγωγοί (Σχήμα 1) συνίστανται σε μία σειρά διακλαδιζόμενων σωληνίσκων που καθίστανται στενότεροι, βραχύτεροι και περισσότεροι όσο προχωρούν πιο βαθειά μέσα στον πνεύμονα. Η τραχεία διακλαδίζεται στους δυο κύριους βρόγχους, που με τη σειρά τους διακλαδίζονται σε λοβώδεις και τμηματικούς βρόγχους. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τα τελικά βρογχιόλια, που αποτελούν τις μικρότερες αεροφόρες οδούς πριν από τις κυψελίδες. Το σύνολο αυτών των βρόγχων αποτελεί τους αεραγωγούς. Τα τελικά βρογχιόλια διακλαδίζονται και αυτά και καταλήγουν στις κυψελίδες. Οι κυψελίδες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του πνευμονικού ιστού και είναι δομές με λεπτά τοιχώματα που περιβάλλονται από πυκνό δίκτυο τριχοειδών αγγείων, που αποτελούν τα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία. Η διευθέτηση αυτή παρέχει μια επιφάνεια τεράστιας έκτασης και ελάχιστου πάχους, ιδανική για την



ανταλλαγή των αερίων. Η ανταλλαγή γίνεται με συνεχή διάχυση των αερίων, όπως του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, διαμέσου της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης και με περιοδική αναπλήρωση των κυψελιδικών αερίων από την ατμόσφαιρα [49, 50].

Σχήμα 1: Αρχιτεκτονική των τοιχωμάτων των αεραγωγών. EP: Επιθηλιακή στοιβάδα, BM: Βασική μεμβράνη, SM: Λεία-μυϊκή στοιβάδα, FC: Στρώμα συνδετικού ιστού [51].



Πνεύμονες

Ένας φυσιολογικός πνεύμονας ενήλικα ζυγίζει 300-400g. Ο δεξιός πνεύμονας αποτελείται από τρεις λοβούς, τον άνω, τον μέσο και τον κάτω και δέκα βρογχοπνευμονικά τμήματα, ενώ ο αριστερός πνεύμονας από τον άνω και κάτω λοβό και εννέα βρογχοπνευμονικά τμήματα. Η παροχή του αίματος στους πνεύμονες γίνεται τόσο από την πνευμονική κυκλοφορία όσο και από τις βρογχικές αρτηρίες. Η πνευμονική κυκλοφορία μεταφέρει το αίμα από τη δεξιά καρδιά διαμέσου της πνευμονικής αρτηρίας και των πνευμονικών φλεβών στον αριστερό κόλπο. Οι βρογχικές αρτηρίες προέρχονται από την αορτή και παρέχουν οξυγονωμένο αίμα στο πνευμονικό παρέγχυμα.

Οι αεραγωγοί από το λάρυγγα μέχρι και τα βρογχιόλια επικαλύπτονται από κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα (cilia), καθώς και από διάσπαρτα βλεννοεκκριτικά κύτταρα, η εκκρινόμενη βλέννα των οποίων επικάθεται στην κορυφή των κροσσών και χρησιμεύει ως παγίδα για τις διάφορες ξένες ουσίες που περιέχει ο αέρας. Οι κροσσοί έχουν μήκος περίπου 10μm και είναι δυνατό να φτάσουν το μισό μήκος των κυττάρων. Η βλέννα καθώς και οι κροσσοί βοηθούν στην απομάκρυνση ουσιών και νεκρών κυττάρων με συνεχείς κυματοειδείς κινήσεις, οι οποίες προωθούν τη βλέννα και τα άλλα συστατικά προς τους μεγαλύτερους βρόγχους και την τραχεία, απ' όπου και αποβάλλονται με το βήχα.



Σχήμα 2: Επιθήλιο των βρογχιολίων. Φαίνονται χαρακτηριστικά τα κροσσωτά κύτταρα *cilia* [51].



Τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα

Το τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα αποτελείται από το επιθήλιο, τη βασική μεμβράνη και το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων.

Το επιθήλιο γενικά καλύπτει όλες τις επιφάνειες του σώματος, τόσο τις κοιλότητες όσο και τους σωληνώδεις αγωγούς. Λειτουργεί, έτσι, ως μεσόφαση μεταξύ των βιολογικών διαμερισμάτων. Οι επιθηλιακές μεσοφάσεις μετέχουν σε ευρέως φάσματος δραστηριότητες, όπως η απορρόφηση, η έκκριση και η προστασία από επιβλαβείς παράγοντες. Το επιθήλιο αποτελείται από ένα ή περισσότερα στρώματα κυττάρων και υποστηρίζεται από μία μεμβράνη μεταβλητού πάχους, τη βασική μεμβράνη.

Στο κυψελιδικό επιθήλιο υπάρχουν μόνο δυο είδη κυττάρων: τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου I και τύπου II. Τα κύτταρα τύπου I (Σχήμα 3) έχουν μακρύ και λεπτό κυτταρόπλασμα και ο ρόλος τους είναι η δομική στήριξη του επιθηλίου. Επικαλύπτουν το 90% της κυψελιδικής επιφάνειας. Τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II έχουν κυβικό σχήμα και καλύπτουν το 10% της κυψελιδικής επιφάνειας. Τα κύτταρα τύπου II είναι περισσότερα σε αριθμό στο κυψελιδικό επιθήλιο από τα κύτταρα τύπου I (αποτελούν περίπου τα 2/3 του συνόλου των επιθηλιακών κυττάρων), αλλά καλύπτουν πολύ μικρότερη έκταση επιφάνειας. Τα κυψελιδικά πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι τα κύρια κύτταρα του μεταβολισμού του επιφανειοδραστικού παράγοντα (lung surfactant) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον υγιή πνεύμονα όσο και στην παθογένεση της πνευμονικής βλάβης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τύπου II συνθέτουν και μεταβολίζουν όλα τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες του ενεργού επιφανειοδραστικού παράγοντα [52]. Οι πρωτεΐνες SP-A, SP-B και SP-C, παράγονται αποκλειστικά από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, ενώ η SP-D παράγεται και από τα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων (clara cells). Τα ουδέτερα λιπίδια συμπεριλαμβανομένης και της χοληστερόλης συντίθενται επίσης από τα κύτταρα τύπου II, παρόλο που ορισμένα ποσά χοληστερόλης είναι πιθανό να προέρχονται από το πλάσμα.

Στα κύτταρα τύπου II (Σχήμα 3) ο επιφανειοδραστικός παράγοντας οργανώνεται με τη μορφή πολυστοιβαδωτών σωματίων. Τα σωματίδια αυτά

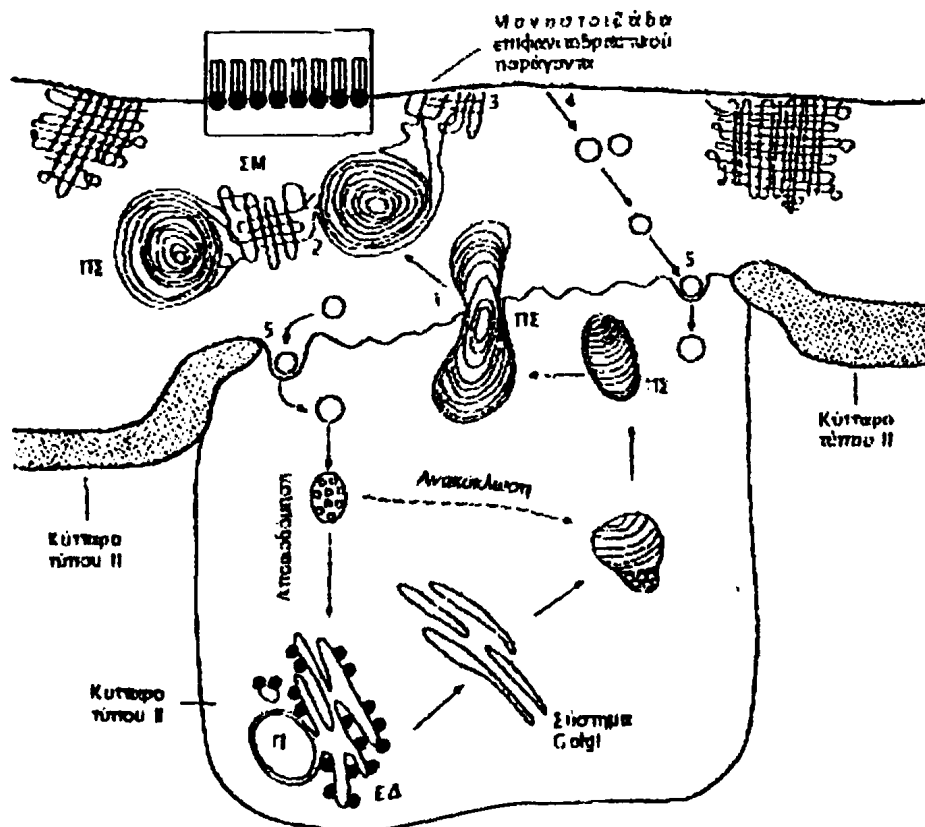


μετατρέπονται στο επιθήλιο σε ένα σύμπλεγμα γνωστό ως σωληνώδης μυελίνη. Στη συνέχεια η σωληνώδης μυελίνη ξεδιπλώνεται στην επιφάνεια μεταξύ αέρα και υγρού, παίρνει τη μορφή μονοστοιβάδας και επικαλύπτει τα κυψελιδικά τοιχώματα [53].

Τα κυψελιδικά τριχοειδή αγγεία σχηματίζουν ένα πολύ πυκνό πλέγμα μέσα στο τοίχωμα κάθε κυψελίδας. Η διάμετρος του κάθε τριχοειδούς στην απόληξή του είναι περίπου όση και ενός ερυθρού κυττάρου. Το μήκος κάθε τριχοειδικού τμήματος είναι τόσο μικρό ώστε το πυκνό αυτό δίκτυο να σχηματίζει μια συνεχή επιφάνεια αίματος στο κυψελιδικό τοίχωμα, που αποτελεί μια πολύ αποτελεσματική διάταξη για την ανταλλαγή αερίων. Κάθε ερυθροκύτταρο βρίσκεται περίπου για ένα δευτερόλεπτο στο τριχοειδικό δίκτυο και συνήθως σε αυτό το διάστημα ταξιδεύει σε δύο ή τρεις κυψελίδες, χρόνος αρκετός για την εξισσορόπηση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ του κυψελιδικού αέρα και του τριχοειδικού αίματος. Το εσωτερικό των τριχοειδών αγγείων καλύπτεται από το ενδοθήλιο, το οποίο μοιράζεται τη βασική μεμβράνη με το κυψελιδικό επιθήλιο (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων συντίθεται στα κυψελδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II ως ένα σύμπλεγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών. Αποθηκεύεται στα πολυστοιβαδωτά σωμάτια και εκκρίνεται στην κυψελδική μεσόφαση. Εκεί σχηματίζει ετερογενή, πλούσια σε φωσφολιπίδια συσσωματώματα με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας μονοστοιβάδας στη μεσόφαση αέρα-υγρού, η οποία δρα μειώνοντας την επιφανειακή τάση κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας στην μεσόφαση τελικά ανακυκλώνεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου I [54]. ΠΣ: Πολυστοιβαδωτό Σωμάτιο, ΣΜ: Σωληνώδης Μυελίνη, ΕΔ: Ενδοπλασματικό δίκτυο



Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη λειτουργία των πνευμόνων

Μηχανική των πνευμόνων

Η κίνηση των πνευμόνων στην αναπνοή είναι παθητική και υπακούει σε εξωτερικές δυνάμεις. Στην περίπτωση της φυσιολογικής αναπνοής οι εξωτερικές δυνάμεις είναι οι αναπνευστικοί μύες και η κίνηση του διαφράγματος, ενώ κατά τον μηχανικό αερισμό ο αναπνευστήρας είναι αυτός που δημιουργεί τη διαφορά πίεσης μεταξύ των αεραγωγών και του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να συντελείται η αναπνοή. Και στις δυο περιπτώσεις όμως, ο τρόπος με τον οποίο αποκρίνονται οι πνεύμονες ρυθμίζεται από την αντίσταση του αναπνευστικού συστήματος. Η αντίσταση αυτή είναι τόσο η ελαστική αντίσταση του ιστού και της μεσόφασης αέρα υγρού, όσο και η αντίσταση τριβής της ροής του αέρα. Το έργο που καταναλώνεται στην αντίσταση της τριβής εκλύεται ως θερμότητα και χάνεται. Το έργο, όμως, που καταναλώνεται στην εξουδετέρωση της ελαστικής αντίστασης των πνευμόνων αποθηκεύεται ως δυναμική ενέργεια και αυτή η ελαστική παραμόρφωση κατά τη διάρκεια της εισπνοής αποτελεί την πηγή ενέργειας για την εκπνοή, τόσο στη φυσιολογική όσο και στην μηχανική αναπνοή.

Οι πνεύμονες μπορεί να θεωρηθούν ως μια ελαστική δομή με μεταβαλλόμενο όγκο ανάλογα με τη διαφορά της διατοιχωματικής πίεσης. (Σχήμα 4) Ως διατοιχωματική πίεση ορίζεται η διαφορά μεταξύ της πίεσης στον κυψελιδικό χώρο και της πίεσης στο χώρο του υπεζωκότα. Η πίεση μέσα σε μια κυψελίδα είναι πάντα μεγαλύτερη από την πίεση του περιβάλλοντος διάμεσου ιστού, εκτός αν μηδενιστεί ο όγκος της. Η διατοιχωματική πίεση μεταβάλλεται ανάλογα με τη μεταβολή του όγκου του πνεύμονα.

Όταν η διατοιχωματική πίεση είναι ίση με την πίεση επαναφοράς των πνευμόνων, ο πνεύμονας βρίσκεται στο σημείο ισορροπίας. Σε αυτό το σημείο ισορροπίας η ελαστική επαναφορά των πνευμόνων είναι ίση και αντίθετη με την ελαστική επαναφορά του θωρακικού τοιχώματος. Η ελαστική επαναφορά είναι μέγεθος αντίθετο προς τη διατασιμότητα (compliance) του πνεύμονα.



Φύση των δυνάμεων που προκαλούν την επαναφορά του πνεύμονα

Παλιότερα πίστευαν ότι η ελαστική επαναφορά των πνευμόνων οφειλόταν αποκλειστικά και μόνο στη διάταση των ελαστικών ινών του πνευμονικού παρεγχύματος. Το 1929 ο von Neergaard [55] διαπίστωσε πρώτος ότι η ελαστικότητα ενός πνεύμονα γεμάτου με νερό και εμβαπτισμένου σε αυτό είναι κατά πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη στον αέρα, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι ένα μέρος της ελαστικής επαναφοράς οφειλόταν στην επιφανειακή τάση της τεράστιας σε έκταση μεσόφασης αέρα-«νερού» που επενδύει τις κυψελίδες.

Η επιφανειακή τάση είναι η δύναμη, σε dynes, που δρα εγκάρσια σε μια υποθετική γραμμή στην επιφάνεια ενός υγρού, μήκους 1cm. Οφείλεται στο γεγονός ότι οι δυνάμεις μεταξύ των μορίων ενός υγρού είναι πολύ πιο ισχυρές από αυτές μεταξύ του υγρού και του αέρα με αποτέλεσμα η επιφανειακή έκταση του υγρού να τείνει να γίνει όσο το δυνατό πιο μικρή.

Η πίεση σε μια κυψελίδα καθορίζεται από το νόμο του Laplace

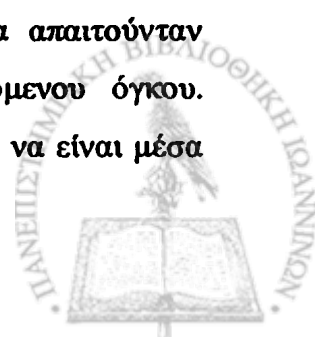
$$P=2T/R$$

όπου P η πίεση μέσα στη κυψελίδα (dyn/cm²),

T η επιφανειακή τάση του υγρού (dyn/cm) και

R η ακτίνα της κυψελίδας.

Οι κυψελίδες μπορεί να θεωρηθούν ότι συμπεριφέρονται ως φουσαλλίδες παρά το γεγονός ότι ο κυψελιδικός αέρας επικοινωνεί διαμέσω των αεραγωγών με το περιβάλλον. Στο *Σχήμα 4* απεικονίζεται μια τυπική κυψελίδα ακτίνας 0.1mm. Αν το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες ήταν νερό (επιφανειακή τάση 72mN/m ή dyn/cm) η πίεση στο εσωτερικό της κυψελίδας θα ήταν 1.44 KPa, δηλαδή ο πνεύμονας θα ήταν εξαιρετικά δύσκαμπτος και θα απαιτούνταν εξαιρετικά μεγάλες πιέσεις για τη διακίνηση του αναπνεόμενου όγκου. Προκειμένου οι πιέσεις που αναπτύσσονται μέσα στην κυψελίδα να είναι μέσα



στο φάσμα των πιέσεων που είναι δυνατό να αναπτυχθούν για να γίνουν οι αναπνευστικές κινήσεις, θα πρέπει το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες να έχει επιφανειακή τάση 20-40 mN/m και κατά συνέπεια η πίεση στην αντίστοιχη κυψελίδα να είναι 0.4-0.8 KPa.

Η ανάγκη της παρουσίας ενός υγρού υλικού το οποίο θα επενδύει τις κυψελίδες και θα μεταβάλλει την επιφανειακή τάση φαίνεται στο πρώτο μέρος του *Σχήματος 4*. Αν οι δύο κυψελίδες έχουν την ίδια επιφανειακή τάση και η μία έχει τη μισή ακτίνα από την άλλη, τότε η πίεση που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της μικρότερης είναι διπλάσια από την πίεση που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της μεγαλύτερης. Αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς πίεσης είναι η μετακίνηση αέρα από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη κυψελίδα γεγονός που θα είχε ως συνέπεια την αύξηση της αστάθειας των αεροφόρων κοιλοτήτων. Στην περίπτωση αυτή, οι συσταλτικές δυνάμεις που θα προκαλούσε το υγρό που επενδύει τις κυψελίδες θα ήταν μεγαλύτερες στην εκπνοή (μικρός όγκος πνεύμονα) και μικρότερες στην εισπνοή (μεγάλος όγκος πνεύμονα), μια κατάσταση εντελώς αντίθετη με αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα.

Έτσι συμπεραίνουμε ότι το υγρό που επαλείφει τις κυψελίδες θα πρέπει να έχει επιφανειακή τάση μικρότερη από το νερό, αλλά και μεταβλητότητα της τιμής της ανάλογα με την έκταση της κυψελίδας [56]. Οι ιδιότητες αυτές επαληθεύονται από την απευθείας μέτρηση της επιφανειακής τάσης σε κυψελιδικό εκπλύμα. Στο δεύτερο μέρος του *Σχήματος 4* φαίνεται η μεταβολή της επιφανειακής τάσης του κυψελιδικού εκπλύματος σε σχέση με την επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια της έκπτυξης των πνευμόνων η επιφανειακή τάση αυξάνεται σε επίπεδα παραπλήσια με αυτά του πλάσματος, ενώ κατά τη διάρκεια της σύμπτυξης των πνευμόνων η επιφανειακή τάση μειώνεται σε επίπεδα πολύ μικρότερα της επιφανειακής τάσης των άλλων σωματικών υγρών [57].

Οι συνέπειες των μεταβολών αυτών φαίνονται στο τρίτο μέρος του *Σχήματος 4*, όπου φαίνεται σαφώς ότι εξαιτίας της διαφορετικής επιφανειακής τάσης η πίεση στη μικρότερη κυψελίδα είναι μικρότερη από αυτή στη μεγαλύτερη κυψελίδα, ενώ η ροή του αέρα έχει την τάση να εξισορροπεί και να σταθεροποιεί τον όγκο των κυψελίδων. Συνολικά μια τέτοια ιδιότητα εκδηλώνεται με μείωση της πίεσης επαναφοράς όταν μειώνεται ο όγκος του



πνεύμονα και με αύξηση αντίστοιχα όταν αυξάνεται ο αντίστοιχος όγκος του πνεύμονα, γεγονός που εξασφαλίζει τη σταθερότητα του πνεύμονα [58].

Η χαμηλή επιφανειακή τάση του υγρού που καλύπτει τις κυψελίδες και η εξάρτησή της από την επιφάνεια οφείλεται σε ένα επιφανειακά δραστικό υλικό. Επιφανειοδραστικό υλικό εξ' ορισμού είναι κάθε ουσία η οποία λόγω της δομής της έχει μια ενεργειακή προτίμηση να κατανέμεται στη μεσόφαση αέρα-υγρού, επηρεάζοντας τοπικά τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα την ελάττωση της επιφανειακής τάσης. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια (90%) και κάποιες ειδικές πρωτεΐνες (8%) (Πίνακας 1). Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που είναι υδρόφοβα κατευθύνονται προς την αέρια φάση, ενώ το άλλο άκρο του μορίου που είναι υδρόφιλο βρίσκεται στο υγρό που επικαλύπτει τις κυψελίδες.

Έτσι, τα μόρια αυτά περιορίζονται στην επιφάνεια όπου δρώντας ως απορρυπαντικά μειώνουν την επιφανειακή τάση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στη μεσόφαση. Κατά τη διάρκεια της εκπνοής, καθώς μικραίνει η επιφάνεια των κυψελίδων, τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνωθούνται μεταξύ τους προκαλώντας έτσι αύξηση της επιφανειακής τάσης, η οποία στη συνέχεια τείνει να μειωθεί. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα τα οποία έχουν ευθύγραμμες δομές στο χώρο, «πακετάρουν» μεταξύ τους πιο αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της εκπνοής από ό,τι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, των οποίων η δομή δεν είναι ευθύγραμμη. Επομένως, το συστατικό εκείνο του επιφανειοδραστικού παράγοντα το οποίο κυρίως ευθύνεται για την επίδραση στην επιφανειακή τάση είναι η διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), της οποίας οι λιπαρές αλυσίδες έχουν ευθύγραμμη διάταξη στο χώρο.



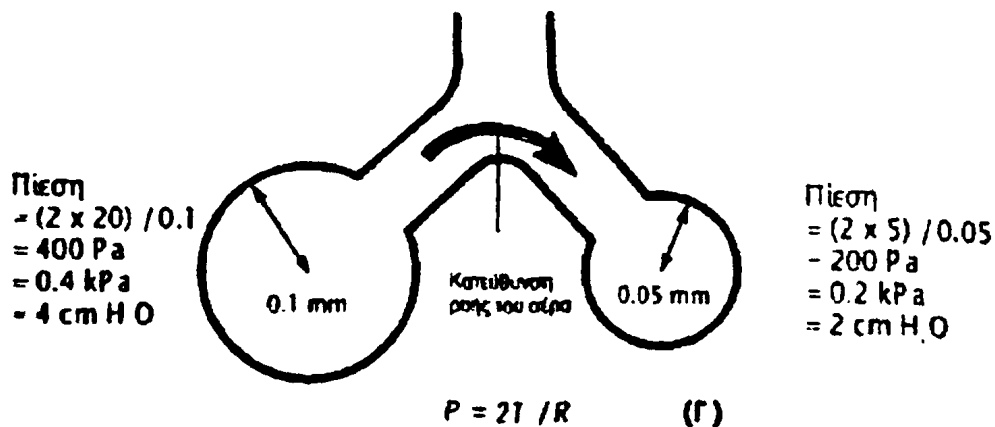
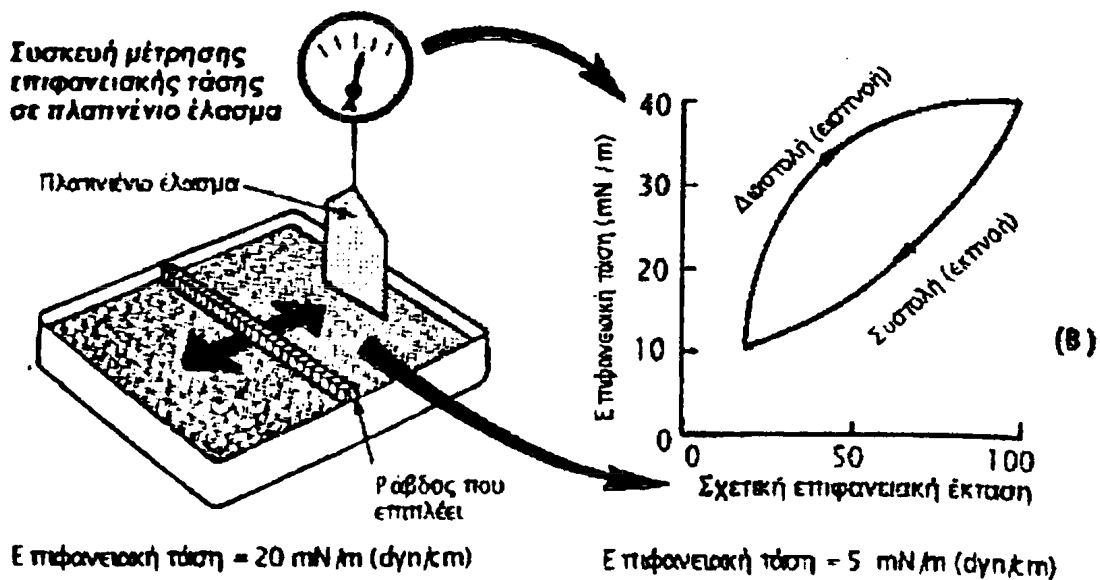
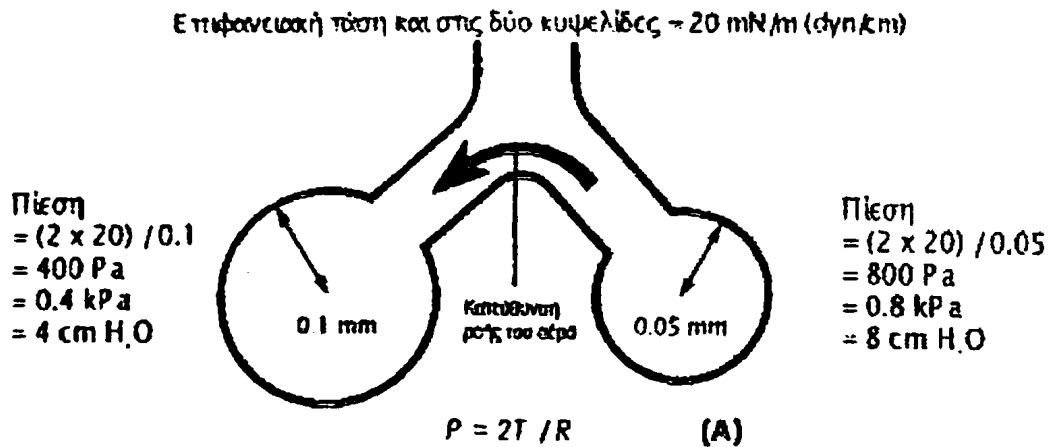
Πίνακας 1. Σύσταση λιπιδίων και πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

90%	Λιπίδια
90%	Φωσφολιπίδια
70-80%	PC (κυρίως DPPC)
10%	PG
	PI, PS, PE, Sph
10%	Ουδέτερα λιπίδια (κυρίως χοληστερόλη)
8%	Πρωτεΐνες
50%	SP- A
49%	SP- D
1%	SP-B, SP- C

PC: φωσφατιδυλοχολίνη, DPPC: διπαλμιτοδλοφωσφατιδυλοχολίνη, PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη, PI: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, Sph: σφιγγομυελίνη, SP- : επιφανειοδραστική πρωτεΐνη-



Σχήμα 4: Επιφανειακή τάση και διατοιχωματική πίεση (Α) Πιέσεις σε δυο κυψελίδες διαφορετικού μεγέθους με όμοια επιφανειακή τάση, (Β) Μεταβολή της επιφανειακής τάσης σε συνάρτηση με την επιφάνεια και (Γ) Πιέσεις σε δυο κυψελίδες.



Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

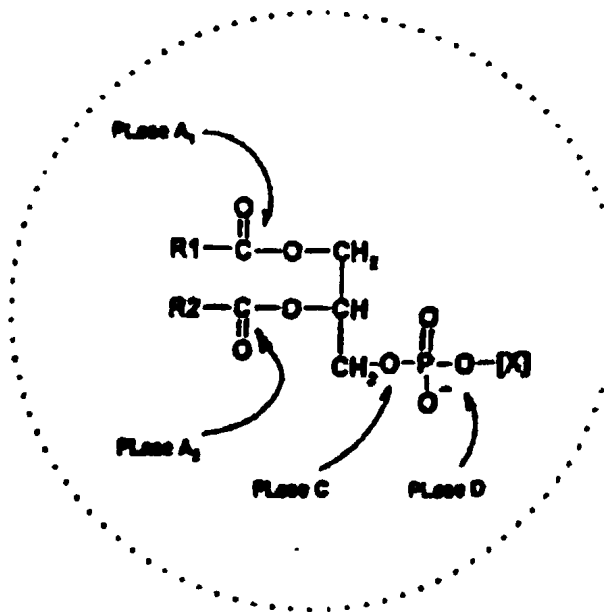
Η εσωτερική επιφάνεια (κυψελίδες) του πνεύμονα καλύπτεται από ένα ισχυρά επιφανειοδραστικό υλικό το οποίο δίνει τη δυνατότητα στις κυψελίδες να διατηρούν «μικρούς όγκους» στον πνεύμονα εξαιτίας της χαμηλής επιφανειακής τάσης αυτού του υλικού. Το υλικό αυτό είναι γνωστό ως επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων και είναι ένα μίγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών [59, 60]. Το μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από λιπίδια (90% κατά βάρος) και μόνο ένα 6-8% από πρωτεΐνες (Πίνακας 1, Σχήμα 5). Ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων έδειξε ότι το 80-90% αυτών είναι φωσφολιπίδια, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από ουδέτερα λιπίδια, με κύριο συστατικό τη χοληστερόλη [61, 62]. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), γνωστή και ως λεκιθίνη, κυριαρχεί στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων σε ποσοστό 70-80% των φωσφολιπιδίων. Το 60% περίπου των μορίων της PC είναι κυρίως διπαλμιτούλο-PC (DPPC), δηλαδή PC εστεροποιημένη και στις δυο θέσεις με παλμιτικό οξύ. Ακολουθεί η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), που αποτελεί το 10% των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τέλος, υπάρχουν μικρά ποσοστά φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), φωσφατιδυλοσερίνης (PS), φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης (PI) και σφιγγομυελίνης (Sph).



Σχήμα 5: Είδη λιπιδίων του επιφανειδραστικού παράγοντα και οι δράσεις των φωσφολιπασών. Οι φωσφολιπάσες είναι υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τα φωσφολιπίδια με αποτέλεσμα να παράγονται λυσοφωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

ΛΙΠΙΔΙΑ

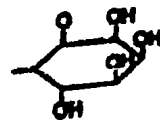
Φωσφολιπίδιο



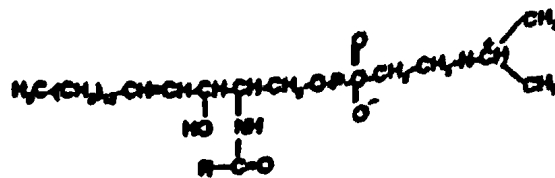
εν X =

- H
- CH₂CH₂NH₂
- CH₂CH₂N(CH₃)₂
- CH₂-CH(OH)-CH₂-OH
- CH₂CH₂(NH₂)COOH

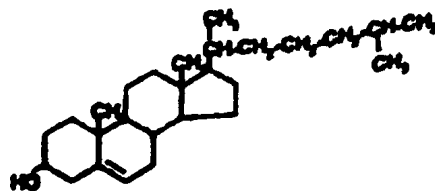
- ΦΩΣΦΑΤΙΚΟ ΟΞΥ (FA)
- ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗ (PE)
- ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΗΝΗ (PC)
- ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗ (PG)
- ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΪΝΗ (PE)
- ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗ (PI)



R, R₁, R₂ = Λιπαρά οξέα ή άλλα μεγάλα μόρια



ΣΦΙΓΟΒΥΤΕΛΙΝΗ (Sph)



ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗ (Chol)



Το αμνιακό υγρό κατά τον τοκετό είναι εμπλουτισμένο σε επιφανειοδραστικό παράγοντα γιατί βρίσκεται σε συνεχή επαφή με τους πνεύμονες του εμβρύου. Το γεγονός αυτό χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ωριμότητας των εμβρυϊκών πνευμόνων. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η πνευμονική ωριμότητα συσχετίζεται με το λόγο φωσφατιδυλοχολίνης/σφιγγομυελίνης (PC/Sph) στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων. Αν ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος από 2 μπορεί να αποκλεισθεί με σημαντική ακρίβεια η ανάπτυξη συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας στο νεογνό. Στις περιπτώσεις, όμως, που ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 2 δεν υπάρχει ικανοποιητική πρόβλεψη [63, 64]. Οι ενήλικες, όμως με ARDS που είχαν φυσιολογικό ποσοστό PC, είχαν χαμηλά επίπεδα PG στον επιφανειοδραστικό παράγοντα.

Το δεύτερο κύριο φωσφολιπίδιο στον επιφανειοδραστικό παράγοντα ενός ενήλικα είναι, όπως προαναφέρθηκε, η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), η οποία είναι ένα όξινο φωσφολιπίδιο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η PG είναι σχεδόν ανύπαρκτη στο έκπλυμα πνευμόνων βρεφών με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η PG παίζει σημαντικό συμπληρωματικό ρόλο στην ωριμότητα των πνευμόνων και η απουσία της αποτελεί ικανοποιητικό δείκτη πρόβλεψης της πνευμονικής ανωριμότητας των εμβρύων. Στους περισσότερους ιστούς η PG αποτελεί πρόδρομη ένωση για την καρδιολιπίνη και συναντάται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (της τάξης του 1% της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων).

Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI) βρίσκεται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα του ενήλικα σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Κατά τη διάρκεια όμως της κύησης και μετά την 25^η εβδομάδα παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων των όξινων λιπιδίων στο αμνιακό υγρό. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη εμφανίζει τη μέγιστη συγκέντρωσή της την 35^η εβδομάδα και μετά παρουσιάζει κάμψη. Αντίθετα, η PG εμφανίζεται μετά την 35^η εβδομάδα και αυξάνει μέχρι τη γέννηση.

Εκτός από λιπίδια, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας περιέχει, όπως προαναφέρθηκε, και πρωτεΐνες, τις λεγόμενες επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες (SP). Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και οργανώνονται διαμέσω του συστήματος Golgi σε πολυστοιβαδωτά σωμάτια. Ένα χαρακτηριστικό



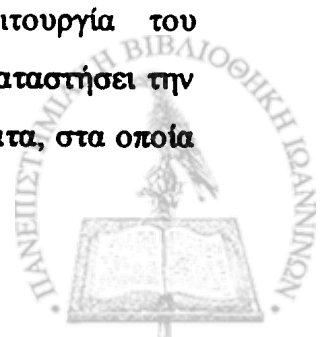
πνευμονοκύτταρο τύπου II μπορεί να έχει 100-150 πολυστοιβαδωτά σωμάτια διαμέτρου περίπου 1μm δεσμευμένα στη μεμβράνη του. Τα πολυστοιβαδωτά σωμάτια είναι οι τελικές αποθήκες του επιφανειοδραστικού παράγοντα πριν από την έκκρισή του. Τα οργανίδια αυτά φαίνονται να είναι γεμάτα με διακριτές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων, καθώς επίσης και με άμορφο πρωτεϊνικό υλικό [52, 53].

Ρόλος των συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Λιπίδια

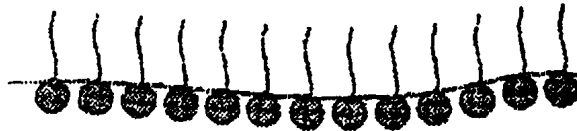
Τα φωσφολιπίδια, ως βιολογικά μόρια, αποτελούν βασικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών όλων των κυττάρων και των κυτταρικών οργανιδίων. Συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα και αποτελούν μεταβολικά υποστρώματα για σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις. Σημαντικός, επίσης, είναι ο ρόλος των γλυκεροφωσφολιπιδίων ως συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων (αποτελούν το 85% κατά βάρος του ενδογενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα). Η μοριακή δομή και η βιοφυσική συμπεριφορά των λιπιδίων συνδέεται άμεσα με την επιφανειακή δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων. Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που είναι υδρόφοβα, κατευθύνονται προς την αέρια φάση, ενώ το άλλο άκρο του μορίου που είναι υδρόφιλο βρίσκεται στο υγρό που επικαλύπτει τις πνευμονικές κυψελίδες. Έτσι, τα μόρια αυτά περιορίζονται στην επιφάνεια, όπου δρώντας ως απορρυπαντικά μειώνουν την επιφανειακή τάση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στη μεσόφαση αέρα υγρού.

Σημαντικό ρόλο στη μείωση της επιφανειακής τάσης παίζει η διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αντίθετα ο ρόλος των άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι λιγότερο γνωστός. Πιθανά συντελούν στη γρήγορη προσρόφηση και εξάπλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην αέρια-υγρή μεσόφαση. Εάν τα όξινα φωσφολιπίδια είναι απαραίτητα για την φυσιολογική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα, τότε η PI θα μπορούσε να υποκαταστήσει την PG. Με βάση την υπόθεση αυτή οι ερευνητές διεξήγαγαν πειράματα, στα οποία



ενήλικα κουνέλια προσλάμβαναν με την τροφή τους μυοϊνοσιτόλη. Παρατήρησαν ότι οι επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν άλλαξαν, παρά την αύξηση της PI και τη μείωση της PG. Αυτό σημαίνει ότι η PG δεν είναι απαραίτητη για την ικανότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα να μειώνει την επιφανειακή τάση (Σχήμα 6). Έχει βρεθεί ότι η PG αποτελεί φυσικό αναστολέα του PAF, καθώς και άλλων μεσολαβητών της θρόμβωσης, όπως της θρομβίνης και της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP). Συνεπώς η PG πιθανά διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στον εμβρυϊκό επιφανειοδραστικό παράγοντα αναστέλλοντας τις δράσεις αυτών των μεσολαβητών [56].

Σχήμα 6: Μονοστοιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μεσόφαση αέρα-υγρού, η οποία μειώνει την επιφανειακή τάση.



Πρωτεΐνες

SP-A

Η SP-A, που αποτελεί περίπου το 50% των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα (4% του ολικού επιφανειοδραστικού παράγοντα), είναι υδρόφιλη πολυμερής πρωτεΐνη, υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης και με μοριακό βάρος περίπου 650 kDa. Η λειτουργική μορφή της SP- A είναι πιθανώς ένα σύμπλεγμα από έξι τριμερή, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες και μη ομοιοπολικούς δεσμούς στις κολλαγονικές περιοχές [65, 66]. Το μονομερές της μοριακό βάρος κυμαίνεται από 28- 36 kDa, ανάλογα με το βαθμό της γλυκοζυλίωσης [67, 68].

Η σύνθεσή της γίνεται στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, στα μη κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιολίων και σε μερικά επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων (clara cells) [65, 66, 69, 70].

Η SP- A δεσμεύει λιπίδια και ιδιαίτερα την DPPC και προκαλεί συσσώρευση των φωσfolιπιδικών κυστιδίων παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), ενώ συμμετέχει στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης από το εκκρινόμενο υλικό των πολυστοιβαδωτών σωματίων. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι ο σχηματισμός της σωληνώδους μυελίνης εξαρτάται από την παρουσία των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και ιδιαίτερα της DPPC και PG, καθώς επίσης και από τις πρωτεΐνες SP- A, SP- B και από το Ca^{2+} . Το γεγονός ότι η SP- A εντοπίζεται στις γωνίες του πλέγματος της σωληνώδους μυελίνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτή είναι που παρέχει τις βάσεις στήριξης για το σχηματισμό αυτής της δομής. Σε συνεργασία μάλιστα με την SP- B αυξάνει την κατανομή των λιπιδίων στη μεσόφαση αέρα-υγρού [71, 72, 73].

Ένας άλλος φυσιολογικός ρόλος της SP- A είναι η ρύθμιση της ομοιοστασίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Πιστεύεται επίσης ότι ρυθμίζει τις μεταβολικές διαδικασίες ανταλλαγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα μεταξύ των κυττάρων τύπου II και του κυψελιδικού διαστήματος, πιθανά διαμέσω υποδοχέων. Από πειράματα *in vitro* βρέθηκε ότι η SP- A



μειώνει την έκκριση των πολυστοιβαδωτών σωματίων από τα κύτταρα τύπου II και αυξάνει την πρόσληψη της DPPC από τα κύτταρα αυτά, παρόλο που η άποψη αυτή αμφισβητήθηκε στη συνέχεια. Ένας τρίτος ρόλος που προτάθηκε για την SP- A πάλι μετά από *in vitro* πειράματα, είναι η συμμετοχή της σε μηχανισμούς κυτταρικής άμυνας, δρώντας ως μια λεκτίνη τύπου- C [74, 75, 76, 77, 78].

SP-B

Η SP- B είναι ένα σχετικά μικρό υδρόφοβο πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από 79 αμινοξέα. Αποτελεί το 0.1% του ολικού επιφανειοδραστικού παράγοντα και μαζί με την SP-C περίπου το 1% των SP. Το μοριακό βάρος του μονομερούς της είναι 8 kDa. Υπό μη αναγωγικές συνθήκες βρίσκεται με τη μορφή διμερούς, αλλά και μερικές φορές ως ολιγομερές. Έχει ένα ισχυρά θετικό φορτίο που επιλεκτικά απωθεί και απομακρύνει ανιοντικά και ακόρεστα λιπίδια από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα που επικαλύπτει τις κυψελίδες, αυξάνοντας έτσι την επιφανειακή τάση. Παράγεται με πρωτεολυτική διαδικασία από ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο 381 αμινοξέων στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (Σχήμα 7) [79, 80, 81]. Η SP- B εκφράζεται με έναν ισχυρό κυτταροειδικό τρόπο. Συντίθεται ως μια πρόδρομη πρωτεΐνη η οποία γλυκοζυλιώνεται και μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi και από εκεί στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια, τα οποία τελικά πακετάρονται στη σωληνώδη μυελίνη [82]. Το γεγονός αυτό υποστηρίχθηκε μετά από παρατηρήσεις ότι η SP- B ενισχύει την προσρόφηση μορίων φωσφολιπιδίων από αιωρούμενες μεμβράνες στη μεσόφαση αέρα-υγρού.

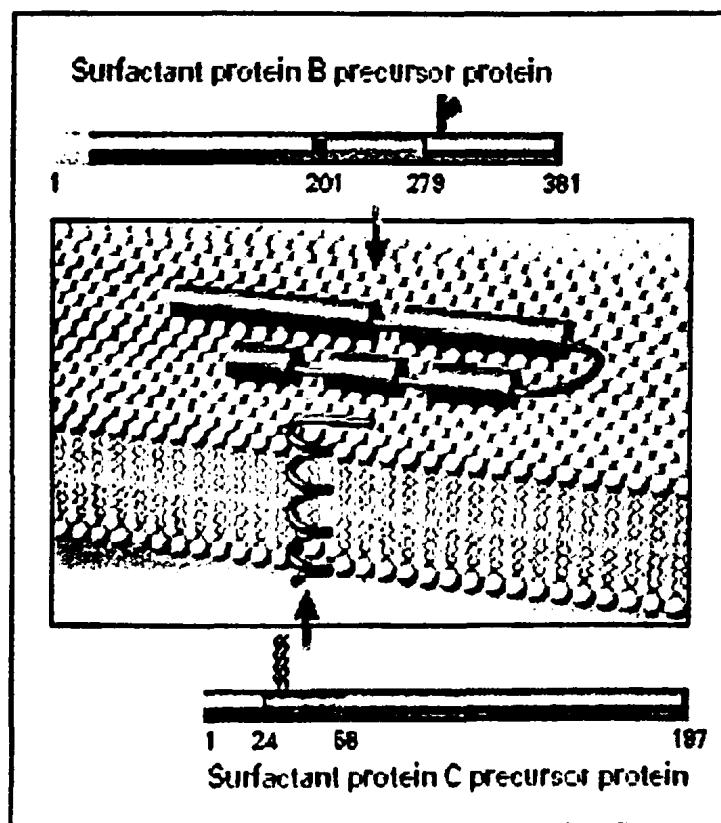
Ο ρόλος της SP- B στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι σημαντικός, αφού η έλλειψή της οδηγεί σε εξασθένηση των πνευμόνων και αναπνευστική ανεπάρκεια [83]. Η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της SP- B στους αεραγωγούς μετά τη γέννηση οδηγεί σε οξεία ανοσολογική αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται από απενεργοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα με ταυτόχρονη μείωση της διατασιμότητας του πνεύμονα, νέκρωση του επιθηλίου των αεραγωγών, ανάπτυξη υαλοειδούς



μεμβράνης στο κυψελιδικό επιθήλιο, συσσώρευση ουδετερόφιλων και, τέλος, διαρροή των πρωτεϊνών του ορρού στον κυψελιδικό χώρο [84].

Η SP- A από μόνη της έχει μικρή συνεισφορά στην προσρόφηση των φωσφολιπιδίων, αλλά επιταχύνει την προσρόφηση την οποία προκαλεί η SP- B. Η SP- B μπορεί να αλληλεπιδρά ειδικά με την PG. Έχει προταθεί ότι η SP- B όχι μόνο αυξάνει την προσρόφηση των φωσφολιπιδίων, αλλά βοηθάει στην απομάκρυνση της PG και των άλλων μορίων, εκτός της DPPC, από τη μονοστιβάδα κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων συστολών και διαστολών κατά την αναπνοή, εμπλουτίζοντας έτσι τη μονοστιβάδα σε DPPC.

Σχήμα 7: Πρωτεολυτική διαδικασία παραγωγής της SP-B και SP-C. Η SP-B παράγεται με πρωτεολυτική διαδικασία από ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο με 381 αμινοξέα στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II. Η SP-C σχηματίζεται από μια πρόδρομη πρωτεΐνη με 197 αμινοξέα [81].



SP-C

Η SP- C είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο πολυπεπίδιο που αποτελείται από 35 αμινοξέα και είναι πλούσιο σε βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη. Συντίθεται στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II. Η δομή της SP- C είναι αρκετά πιο διάκριτη από τη δομή της SP- B. Συνδέεται ομοιοπολικά με τις λιπαρές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων και επιταχύνει την εναπόθεση και προσρόφηση των φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων, που έχουν εκκριθεί στο υλικό που επικαλύπτει τις κυψελίδες, με παράλληλο μετασχηματισμό τους σε διπλοστοιβάδα. Πιθανά μάλιστα να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον καταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα [85]. Η χορήγηση SP-C σε πρόωρα νεογνά εφαρμόζεται για τη θεραπεία του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας αυτών των νεογνών.

SP-D

Η SP-D είναι μια υδατοδιαλυτή δωδεκαμερής γλυκοπρωτεΐνη τύπου κολλαγόνου και αποτελεί το 4.9% του ολικού επιφανειοδραστικού παράγοντα [86]. Τα μονομερή της σχηματίζουν τριμερή με δισουλφιδικές γέφυρες, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν ένα πολυμερές από 12 όμοια πολυπεπίδια με μοριακό βάρος 43 kDa το καθένα [87]. Συντίθεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II και από τα κύτταρα clara [88, 89].

Η SP-D έχει έναν σημαντικό αμυντικό ρόλο δράοντας σαν οψωνίνη και πιθανά συμμετέχει στη ρύθμιση του επιπέδου των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και της ενεργότητας της μεταλλοπρωτεΐνάσης του μεσοκυττάριου χώρου [90].

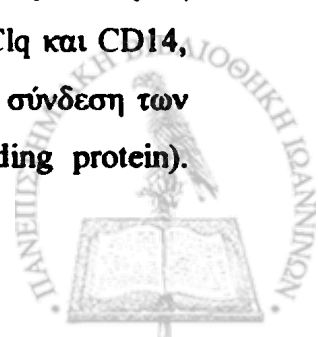


Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην άμυνα του πνεύμονα

Ο πνεύμονας εκτίθεται σε σημαντικό ποσό μολυσματικών παραγόντων, αφού ο ρυθμός αερισμού των κυψελίδων είναι περίπου 5 λίτρα το λεπτό. Παρόλα αυτά, η μόλυνση του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στους υγιείς ανθρώπους είναι ένα σπάνιο φαινόμενο. Αυτό οφείλεται στην αποτελεσματικότητα των μηχανισμών φυσικής ανοσίας, οι οποίοι προστατεύουν τον πνεύμονα από τη μόλυνση.

Εκτός από τη βασική φυσιολογική του λειτουργία στη ρύθμιση της επιφανειακής τάσης, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας συμμετέχει στο μηχανισμό φυσικής ανοσίας του πνεύμονα τόσο στους μικρούς αεραγωγούς, όσο και στις κυψελίδες, παρεμποδίζοντας την προσκόλληση διαφόρων μικροοργανισμών και αλλεργιογόνων στο κυψελιδικό επιθήλιο. Οι δύο αποπρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, SP-A και SP-D, συνεισφέρουν στην άμυνα του πνεύμονα ρυθμίζοντας την οψωνινοποίηση, αλλά και τη φαγοκύττωση διαφόρων μικροοργανισμών, τη δέσμευση βακτηριακών τοξινών και τη χημειοταξία των μακροφάγων [91].

Μια σειρά πρόσφατων μελετών υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο της SP-A στη φυσική άμυνα των πνευμόνων. Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των στοιχείων του επιφανειοδραστικού παράγοντα που προάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μορίων, δημιουργώντας υπό φυσιολογικές συνθήκες ένα ανοσολογικά σταθερό πνευμονικό περιβάλλον [92, 93]. Αν και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι ακόμα άγνωστοι, υπάρχει μια ποικιλία ενδείξεων για την ύπαρξη υποδοχέων για την SP-A στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II και ενός ειδικού υποδοχέα για την SP-A (SPR-210) στα κυψελιδικά μακροφάγα, οι οποίοι πιθανά να διαδραματίζουν ρόλο διαβιβαστή κάποιων δράσεων της SP-A [94, 95, 96, 97]. Επιπρόσθετα η SP-A αλληλεπιδρά και με άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας όπως η καρλετικουλίνη (callecticulin), ο υποδοχέας του συμπληρώματος C1q και CD14, καθώς και ο υποδοχέας για το σύμπλεγμα που προκύπτει από τη σύνδεση των λιποπολυσακχαριτών και της αντίστοιχης πρωτεΐνης (LPS binding protein).



Έχουν περιγραφεί τροποποιήσεις της SP-A οφειλόμενες σε νόσο ή έκθεση σε διάφορες ουσίες με αποτέλεσμα τη μεταβολή μιας ή περισσότερων λειτουργιών αυτής της πρωτεΐνης. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν ομοιοπολικές μεταβολές, ενζυμικές διασπάσεις ή μετατροπές στο σχηματισμό των ολιγομερών της SP-A.

Επιπρόσθετα, ένας αριθμός μελετών *in vivo* και *in vitro* δείχνουν ότι η SP-A και τα άλλα στοιχεία του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη λειτουργία των μακροφάγων και των άλλων ανοσοκυττάρων. Η SP-A μπορεί να αυξήσει πολλές από τις λειτουργικές ικανότητες των μακροφάγων με αποτέλεσμα να καθίστανται πιο επαρκή στο ρόλο τους στη φυσική ανοσολογική απάντηση των πνευμόνων, ενώ αντίθετα, τα επικρατούντα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν κατασταλτικό ρόλο σε πολλές από αυτές τις λειτουργίες. Ανάμεσα στις λειτουργίες των μακροφάγων που ενισχύει η SP-A είναι η χημειοταξία, η φαγοκυττάρωση και η μικροβιοκτόνος δράση διαμέσω της παραγωγής διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων. Οι λειτουργίες αυτές πιθανά επίσης ενισχύονται από την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και από την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης που ρυθμίζονται από την SP-A, όπως η ICAM-1, η CD-14 και η TRL4.

Όσον αφορά τη φαγοκυττάρωση, τόσο η SP-A, όσο και η SP-D μπορούν να εξουδετερώσουν κάποιους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ιούς και μύκητες. Η σημασία της δράσης της SP-A στη φαγοκυττάρωση ποικίλλει. Έτσι, η SP-A μπορεί να δρα σαν οψωνίνη βοηθώντας στην αναγνώριση του μικροοργανισμού από τα φαγοκύτταρα, ή συμβάλλοντας στη σύνδεση του μικροοργανισμού με το φαγοκύτταρο, με αποτέλεσμα την είσοδό του σε αυτό και την καταστροφή του.

Όταν η SP-A υποεκφράζεται ή υπερεκφράζεται, τα μακροφάγα καθίστανται ανενεργά ή ενεργά αντίστοιχα και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες νοσολογικές καταστάσεις. Τα επίπεδα της SP-A φυσιολογικά αυξάνονται ως απάντηση του πνεύμονα στην έκθεση σε παθογόνα μικρόβια, λιτοπολυσακχαρίτες, διάφορες οξειδωτικές ρίζες και άλλους βλαπτικούς παράγοντες. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα επίπεδα της SP-A στο BAL ασθενών με διάφορες πνευμονικές νόσους είναι μειωμένα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η SP-A παίζει ένα σημαντικό και πολυπρόσωπο

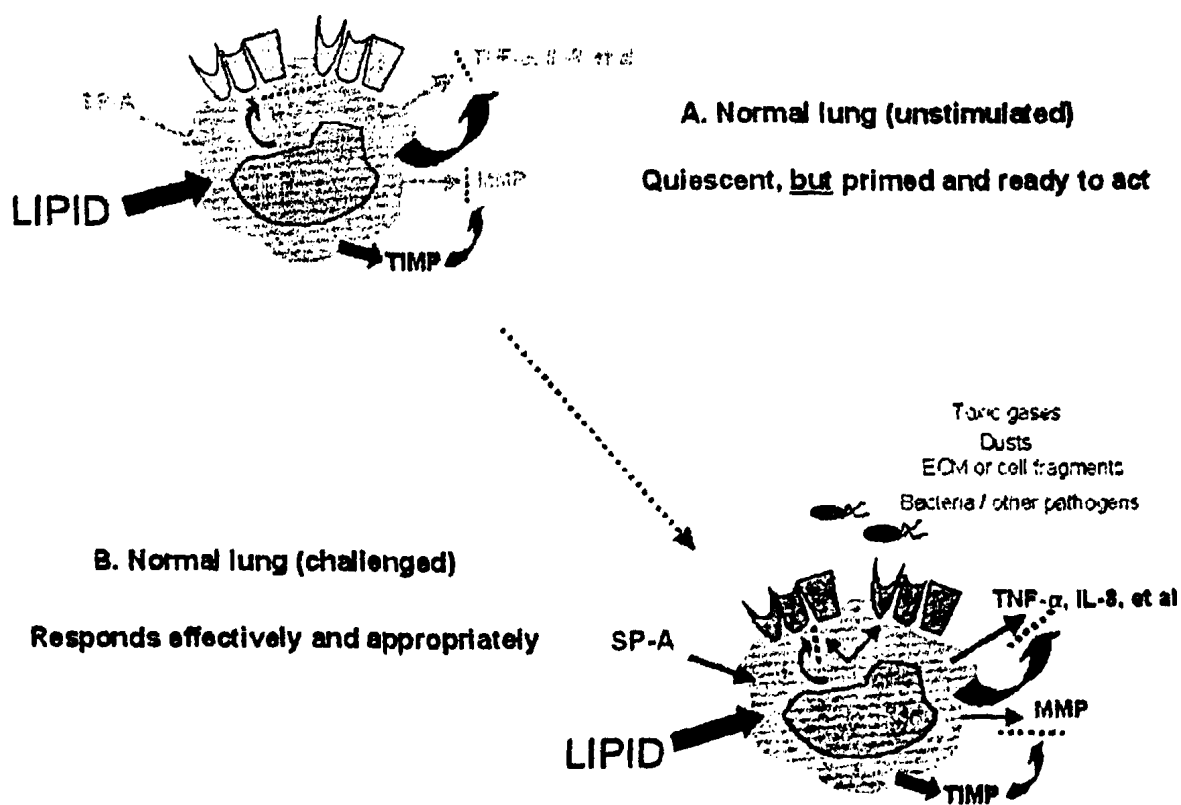


ρόλο, προστατεύοντας τον πνεύμονα από μια σειρά δυνητικών κινδύνων και συμβάλλοντας στην αποκατάσταση των όποιων ιστικών καταστροφών. Ο ακριβής καθορισμός του ρόλου της SP-A σε πολλές από αυτές τις καταστάσεις περιπλέκεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι διαφορές στη διαδικασία λήψης, επεξεργασίας και ανάλυσης του BAL, η εγγενής αδυναμία του BAL να δώσει αξιόπιστες πληροφορίες για ετερογενείς ή εστιακές πνευμονικές νόσους, οι διαφορετικές στιγμές και τα ποικίλα στάδια της νόσου στα οποία λαμβάνονται τα δείγματα BAL ανθρώπων ή ζώων και η ενδεχόμενη επίδραση διαφόρων θεραπειών, όπως τα κορτικοστεροειδή, που μπορεί να μεταβάλλουν κάποια από τα στοιχεία του επιφανειοδραστικού συστήματος.

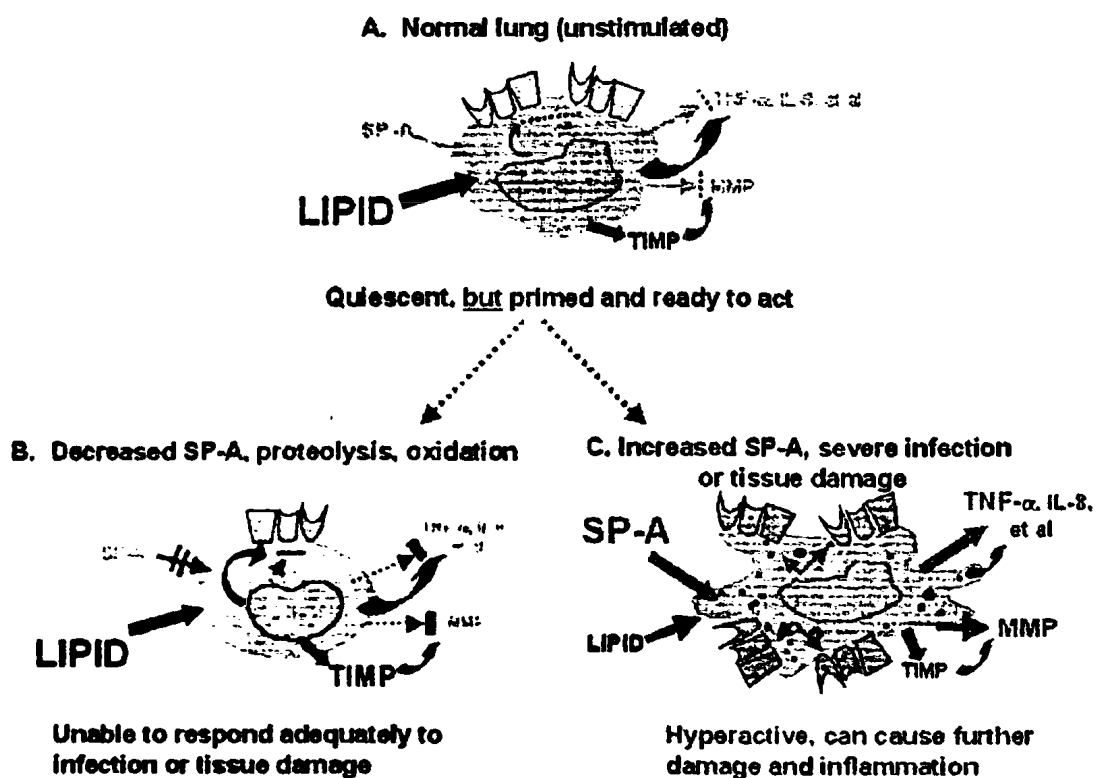
Σε μια προσπάθεια εναρμόνισης των διαφορετικών *in vivo* και *in vitro* δεδομένων, προτείνουμε μοντέλα δράσης της SP-A στη λειτουργία των κυψελιδικών μακροφάγων τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στα μοντέλα αυτά απεικονίζονται αρκετά αντιπροσωπευτικά σημεία και στόχοι, ενώ δεν απεικονίζονται κάποιες άλλες διαδικασίες και προϊόντα σχετικά με τη ρύθμιση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Εδώ περιλαμβάνεται η παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών, η σύνθεση και η έκκριση διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους, ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) και η έκφραση δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας. Οι πληροφορίες στις οποίες στηρίζονται τα μοντέλα αυτά είναι βασισμένα στη διεθνή βιβλιογραφία και την ακόλουθη γενική άποψη [90] (Σχήμα 8, Σχήμα 9): Στο φυσιολογικό πνεύμονα βρίσκονται τόσο η SP-A όσο και τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, με τα επίπεδα της πρώτης να αντιστοιχούν γύρω στο 5% ή λιγότερο των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Εκτιμάται ότι σε φυσιολογικές συνθήκες το μεγαλύτερο μέρος της SP-A στον πνεύμονα είναι συνδεδεμένο με λιπίδια και ένα σχετικά μικρό μέρος είναι «ελεύθερο» [93, 98]. Υποθέτουμε ότι το μικρό αυτό μέρος της ελεύθερης SP-A αντικατοπτρίζει τα πολύ χαμηλότερα ιδιοσυστατικά επίπεδα της ελεύθερης λιπιδίων SP-A που υπάρχουν σε άλλα όργανα εκτός του πνεύμονα και ότι είναι επαρκή για τη λειτουργία της φυσικής ανοσίας [99, 100, 101].



Σχήμα 8: Επίδραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη λειτουργία των μακροφάγων υπο φυσιολογικές συνθήκες. **Σχήμα A:** Κυψελιδικό μακροφάγο σε ηρεμία με επαρκή επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας, όπως ICAM-1, CD-14, TLR4, οι οποίες είναι πιθανό να χρησιμεύσουν για τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και για την αναγνώριση και ανταπόκριση σε διάφορα παθογόνα μικρόβια, σε προϊόντα αυτών (LPS) ή σε άλλα επιβλαβή ερεθίσματα. **Σχήμα B:** Μακροφάγο ενεργοποιημένο από από διάφορα μικροβιακά ερεθίσματα, τμήματα εξωκυττάριας ουσίας (ECM), κότταρα, εισπνεόμενη σκόνη ή τοξικά αέρια. Πολλά από τα ερεθίσματα είναι δυνατό να προκαλέσουν αυξημένα επίπεδα της SP-A εντός των προσβαλλόμενων κυψελίδων. Εκκρινόμενες κυτοκίνες μπορούν να ρυθμίσουν περαιτέρω τη δραστικότητα των μακροφάγων και να στρατολογήσουν επιπλέον κότταρα. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν ότι η κατασταλτική δράση των επιφανειοδραστικών λιπιδίων η οποία είναι μερικώς αναστρέψιμη [102].



Σχήμα 9: Τα αποτελέσματα των μεταβαλλόμενων επιπέδων της SP-A στη λειτουργία των μακροφάγων. A: Φυσιολογική κατάσταση. B: Τροποποιημένος φαινότυπος μακροφάγου όταν τα επίπεδα της SP-A είναι χαμηλά. C: Φαινότυπος μακροφάγου όταν τα επίπεδα της SP-A αυξάνονται ή/και τα επίπεδα των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα μειώνονται [102].



ICAM-1: διακυταρικό μόριο προσκόλλησης 1, TLR4: πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας, TIMP: μεταλλοπρωτεϊνάση, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκου, IL: ιντερλευκίνη, MMP: ένζυμο αποικοδόμησης μεσοκυττάριας ουσίας, LPS: λιποπολυσακχαρίτης.

Βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα

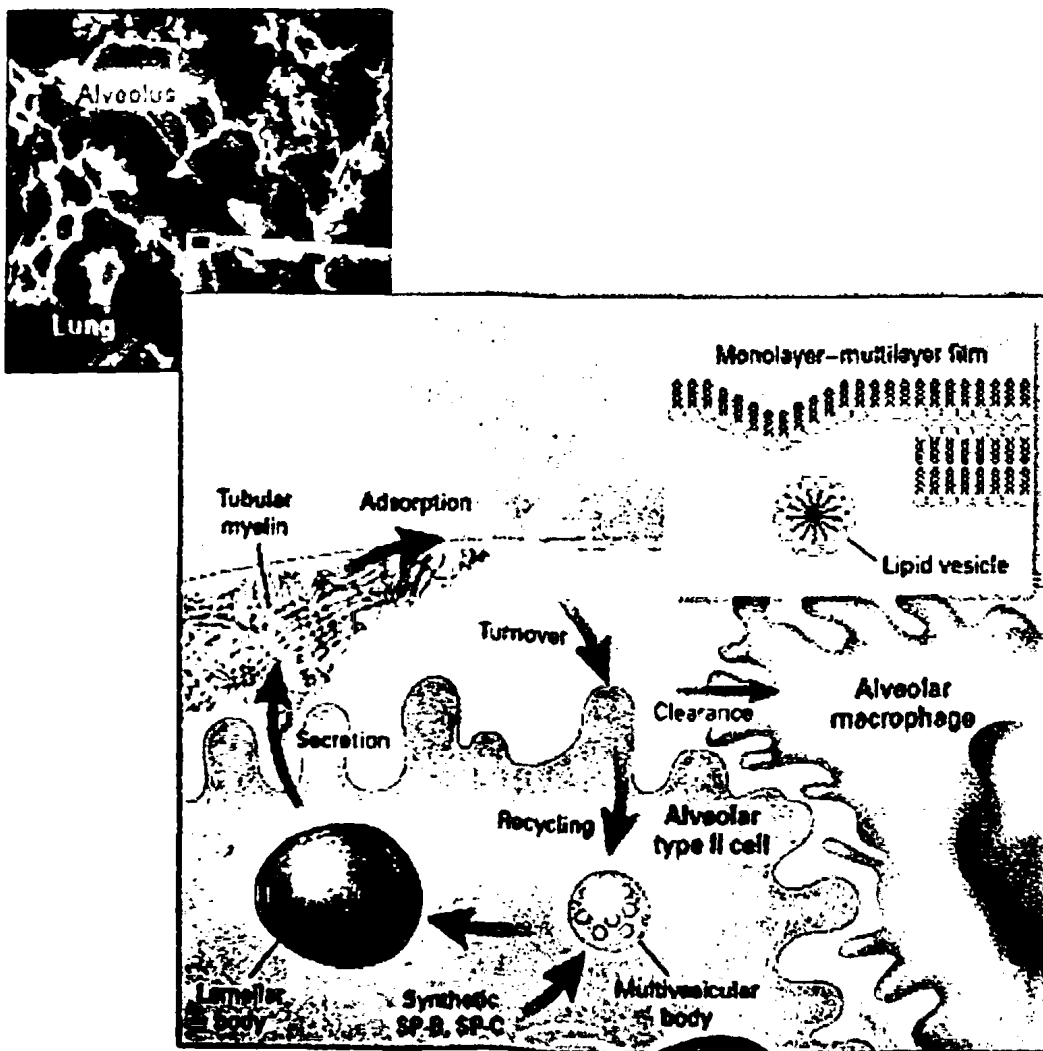
Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και οργανώνονται διαμέσω του συστήματος Golgi σε πολυστοιβαδωτά σωμάτια (Σχήμα 10). Ένα χαρακτηριστικό πνευμονοκύτταρο τύπου II μπορεί να έχει 100-150 πολυστοιβαδωτά σωμάτια, τα οποία είναι δεσμευμένα στη μεμβράνη του. Τα πολυστοιβαδωτά σωμάτια είναι οι τελικές αποθήκες του επιφανειοδραστικού παράγοντα πριν από την έκκρισή του. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα οργανίδια αυτά φαίνονται να είναι γεμάτα με διακριτές διλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων. Παρατηρείται, επίσης, πυκνό άμορφο πρωτεϊνικό υλικό.

Η ενδοκυττάρια κίνηση των φωσφολιπιδίων στο πνευμονοκύτταρο τύπου II περιλαμβάνει ειδικές μεταφορικές πρωτεΐνες για τη φωσφατιδυλοχολίνη και για τα ανιονικά φωσφολιπίδια. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανόν να συμμετέχουν στον αποχωρισμό των φωσφολιπιδίων από την κυτταρική μεμβράνη στο κύτταρο τύπου II.

Οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A, B και C μεταφέρονται από το σύστημα Golgi στα πολυστοιβαδωτά σωμάτια διαμέσω πολυκυκλικών σωματίων. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση και τους μηχανισμούς στόχευσης των πρωτεϊνών, καθώς και την ενσωμάτωσή τους με τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα υπάρχει ακόμα αβεβαιότητα. Ωστόσο, είναι σαφές ότι η πλειοψηφία των ενδοκυτταρικών διαδικασιών για τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβαίνουν πριν το επίπεδο των πολυστοιβαδωτών σωματίων. Για παράδειγμα, τα πολυστοιβαδωτά σωμάτια δε διαθέτουν πλήρη σειρά των ενζύμων που απαιτούνται για τη de novo σύνθεση και την πορεία ανάπτυξης των φωσφολιπιδίων.



Σχήμα 10: Τα φωσφολιπίδια και οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα συντίθενται από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στα πολυστοιβαδωτά σωμάτια. Οι SP-B, SP-C και τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα εκκρίνονται και αλληλεπιδρούν με την SP-A για να σχηματίσουν τη σωληνώδη μυελίνη. Τα κυψελιδικά μακροφάγα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκκαθάριση και τον καταβολισμό των λιπιδίων και πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα [81].



Υποστρώματα

Η σύνθεση των γλυκεροφωσfolιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα πραγματοποιείται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II με τέτοιο ρυθμό ώστε να παράγεται μεγάλη ποσότητα κορεσμένης φωσφατιδυλοχολίνης.

Η κύρια πηγή προέλευσης του σκελετού της γλυκερόλης για τη σύνθεση των γλυκεροφωσfolιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε ώριμα κύτταρα τύπου II είναι η γλυκόζη από την κυκλοφορία [103]. Η γλυκερόλη αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα για τη σύνθεση της PC στην αρχική φάση της εμβρυϊκής περιόδου [104]. Στην ύστερη εμβρυϊκή περίοδο το γλυκογόνο, το οποίο έχει συσσωρευτεί στα κύτταρα τύπου II αποτελεί σημαντική πηγή ανθρακα για τη βιοσύνθεση των φωσfolιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα [105].

Τα λιπαρά οξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση των λιπιδίων εξασφαλίζονται από την κυκλοφορία ως ελεύθερα λιπαρά οξέα από τα τριγλυκερίδια των λιποπρωτεϊνών. Είναι πιθανό η πρόσληψη των λιπαρών οξέων της κυκλοφορίας από τα κύτταρα τύπου II να διαμεσολαμβάνεται από μια μεμβρανική πρωτεΐνη [106]. Λιπαρά οξέα σχηματίζονται επίσης στο εσωτερικό των κυττάρων τύπου II κατά την υδρόλυση των φωσfolιπιδίων, όταν αυτά προσλαμβάνονται από τις κυψελίδες [107]. Τέλος, τα λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν στα κύτταρα τύπου II de novo [108, 109], στη διαδικασία όμως αυτή προτιμάται το γαλακτικό οξύ από τη γλυκόζη ως υπόστρωμα [109]. Στην ύστερη εμβρυϊκή περίοδο, το γλυκογόνο μπορεί να αποτελεί σημαντική πρόδρομη ένωση των λιπαρών οξέων [105], ενώ το ακετοξικό οξύ μπορεί να αποτελεί σημαντική πρόδρομη ένωση των λιπαρών οξέων που μετέχουν στη βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα νεογνά [110]. Η σχετική συμβολή των διαφόρων πηγών λιπαρών οξέων δεν είναι πλήρως γνωστή και ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και τη διατροφή. Στους πνεύμονες εμβρύου αρουραίου, ο ρυθμός σύνθεσης των λιπαρών οξέων και οι ειδικές ενεργότητες της συνθάσης των λιπαρών οξέων και της ακέτυλο-CoA καρβοξυλάσης, οι οποίες μετατρέπουν το ακέτυλο-CoA διαμέσου του μηλονυλο-CoA σε λιπαρό



οξύ, αυξάνουν παράλληλα με την αύξηση της παραγωγής επιφανειοδραστικού παράγοντα [111].

Οι αναστολείς της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων μειώνουν το ρυθμό της σύνθεσης της δικεκορεσμένης- PC (DSPC) σε πνεύμονα εμβρύου αρουραίου ακόμα και μετά την προσθήκη παλμιτικού οξέος [112]. Αν συγκρίνουμε τα λιπαρά οξέα που συντίθενται από το ακετοξικό οξύ με το εξωγενές παλμιτικό οξύ, τα πρώτα προτιμούν να ενσωματωθούν στην PC και DSPC του επιφανειοδραστικού παράγοντα στους πνεύμονες νεογέννητων κουνελιών, σε αντίθεση με το εξωγενές παλμιτικό οξύ [113]. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι στους πνεύμονες ποντικού και αρουραίου οι ενεργότητες της συνθάσης λιπαρών οξέων και της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης μειώνονται με τη νηστεία και αυξάνουν με την επαναπρόσληψη τροφής, παρόμοια με ό,τι συμβαίνει στο ήπαρ αυτών των πειραματόζωων κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι μετά τη νηστεία και την επαναπρόσληψη τροφής με δίαιτα πλούσια σε υδατάνθρακες, η ακετυλο-CoA καρβοξυλάση και η συνθάση των λιπαρών οξέων στους πνεύμονες ενήλικου αρουραίου μεταβάλλονται σε μικρότερο βαθμό από ό,τι στο ήπαρ των ίδιων αρουραίων. Το ίδιο παρατηρήθηκε τόσο για τη λιγάζση του ATP- κιτρικού οξέος όσο και για το μηλικό ένζυμο, δύο ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταφορά του ακετυλο- CoA από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο κυτοσόλιο, όπου το ακετυλο- CoA μετατρέπεται σε λιπαρό οξύ [114]. Η χολίνη που απαιτείται από τα κύτταρα τύπου II για τη σύνθεση της PC προέρχεται κύρια από τη διατροφή [115]. Τα κύτταρα τύπου II συσσωρεύουν τη χολίνη με διαδικασία ενεργητικής μεταφοράς. Η μυοϊνοσιτόλη, που απαιτείται τόσο για τη σύνθεση της PI του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όσο και της PI που χρησιμοποιείται στη μεταγωγή σήματος, συντίθεται από διάφορους ιστούς του σώματος, ένιοτε όμως απαιτείται επιπλέον συμπλήρωμα με τη διατροφή [116]. Ο ιστός πνεύμονα κουνελιού μπορεί να παράγει ινοσιτόλη από τη γλυκόζη [117]. Τέλος, τα κύτταρα τύπου II μπορούν να προσλάβουν ινοσιτόλη με μηχανισμούς που απαιτούν ή όχι κατανάλωση ενέργειας [118], γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι τα κύτταρα αυτά προσλαμβάνουν την ινοσιτόλη που χρειάζονται για το σχηματισμό της PI είτε μερικά εξωγενώς είτε από άλλα πνευμονοκύτταρα είτε τέλος από το αίμα.



Σταδια βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης

“De novo” σύνθεση

Η σύνθεση “εξαρχής” ή de novo σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης από διπαλμιτυλο-PA αφορά μόνο το 50% της συνολικά παραγόμενης DPPC [119, 120]. Η de novo σύνθεση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα ξεκινά με την ακυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και το σχηματισμό του φωσφατιδικού οξέος. (Σχήμα 11). Τα λιπαρά οξέα που χρειάζονται για τα στάδια της ακυλίωσης μετατρέπονται σε ακέτυλο-CoAs με τη βοήθεια της ακυλο-CoA συνθετάσης. Το πρώτο βήμα σύνθεσης του PA είναι ο σχηματισμός του 1-άκυλο-γλύκερο-3-φωσφορικού οξέος από την ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης. Στα κύτταρα τύπου II του ενήλικα το ένζυμο αυτό εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Το δεύτερο βήμα της ακυλίωσης καταλύεται από την ακυλοτρανσφεράση του 1-ακυλο-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος. Οι πορείες για τη βιοσύνθεση τόσο της PC όσο και της PG και της PI διαχωρίζονται μετά το σχηματισμό του PA.

Για τη σύνθεση της PC, το PA υδρολύεται προς διακυλογλυκερόλη με τη δράση μιας φωσφατάσης του φωσφατιδικού οξέος. Σε ιστό πνεύμονα έχουν αναγνωριστεί αρκετές διαφορετικές μορφές του ενζύμου αυτού, οι οποίες διαφέρουν στην κυτταρική τους διαμερισματοποίηση (κυτοσολικό ή μεμβρανικό ένζυμο) και στη μορφή του υποστρώματος που χρησιμοποιούν (PA δεσμευμένο με μεμβράνη ή διασκορπισμένο στο κυτόπλασμα) [121].

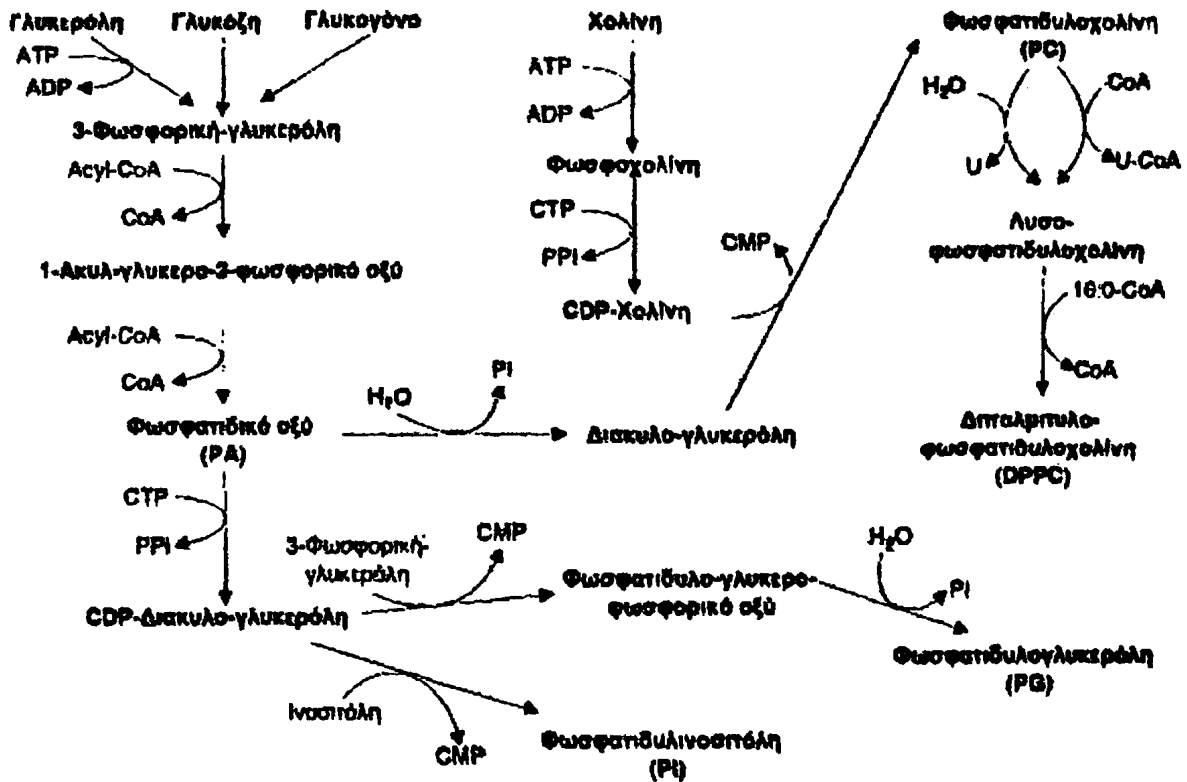
Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του ενζύμου CDP-χολίνη: φωσφοχολινοτρανσφεράση συντίθεται PC. Η CDP-χολίνη σχηματίζεται από χολίνη με διαδοχικές δράσεις της κινάσης της χολίνης και της κυτιδυλοτρανσφεράσης της φωσφοχολίνης. Η κινάση της χολίνης είναι κυτοσολικό ένζυμο. Στο κυτοσόλιο των κυττάρων τύπου II βρέθηκε ότι η ειδική ενεργότητά της είναι πέντε φορές μεγαλύτερη από ό,τι στο κυτοσόλιο του πνεύμονα [122]. Η κυτιδυλοτρανσφεράση της χολίνης έχει βρεθεί τόσο στο διαλυτό όσο και στο μεμβρανικό πλάσμα από πνεύμονες και κυψελιδικά κύτταρα τύπου II [123, 124]. Το διαλυτό κλάσμα περιέχει δυο διμερείς μορφές



του ενζύμου αυτού την L- και την H- μορφή. Η L-μορφή, ένα διμερές του οποίου η καταλυτική υπομονάδα έχει MB 45 kDa η οποία όμως είναι ανενεργή απουσία λιπιδίων. Ωστόσο, η κυρίαρχη διαλυτή μορφή είναι η H-μορφή, η οποία φαίνεται ότι είναι μια λιποπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους, σύμπλεγμα αποπρωτεΐνης της L-μορφής με λιπίδια, και αποτελεί πιθανότατα την ενεργό μορφή του ενζύμου [125]. Η μεμβρανική μορφή της κυτιδυλοτρανσφεράσης της φωσφοχολίνης είναι σχεδόν ίδια με τη διαλυτή H-μορφή [124]. Η μετατροπή της μιας μορφής του ενζύμου στην άλλη μπορεί να έχει σημασία σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση του σχηματισμού της PC. Το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης της PC καταλύεται από τη φωσφοχολινοτρανσφεράση και πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο.



Σχήμα 11: Στάδια σύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και της φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης (PI) [126].



Πορεία “ανάπλασης”-Remodelling

Ο μηχανισμός “ανάπλασης”, με τον οποίο σχηματίζεται το υπόλοιπο 50% της DPPC, περιλαμβάνει την απομάκρυνση του ακόρεστου λιπαρού οξέος από τη θέση sn-2 της αρχικά συντιθέμενης PC και την επανακυλίωσή της με παλμιτικό οξύ διαμέσω του παλμιτυλο-CoA και με τη βοήθεια της ακυλοτρανσφεράσης της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης, που είναι ένα μικροσωμιακό ένζυμο. Το τελευταίο αυτό ένζυμο βρίσκεται σε μεγάλες



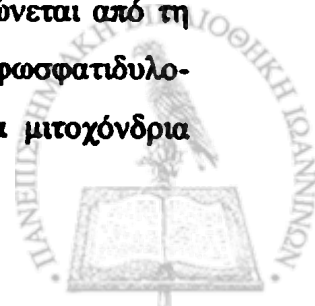
ποσότητες στα κύτταρα τύπου II και εμφανίζει εξειδίκευση υποστρώματος για το παλμιτυλο-CoA [127].

Η φωσφολιπάση-A₂ φαίνεται ότι εμπλέκεται στο μηχανισμό απαकुλίωσης της PC κατά την πορεία της ανάπτυξης. Η θεώρηση αυτή στηρίχθηκε σε παρατηρήσεις σε κύτταρα τύπου II, στα οποία οι αναστολείς της φωσφολιπάσης-A₂ μείωσαν το βαθμό κορεσμού της PC που είχε συντεθεί από διάφορες ραδιενεργές πρόδρομες ενώσεις [128, 129], ενώ η ενεργοποίηση του ενζύμου οδήγησε σε αύξηση του κορεσμού της PC [130, 131]. Κύριο ρόλο στη σύνθεση της διπαλμιτυλο-PC σε πνευμονοκύτταρα τύπου II φαίνεται πως έχει μια όξινη φωσφολιπάση-A₂ ανεξάρτητη του Ca²⁺ [132]. Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις ότι η απαकुλίωση μπορεί να γίνει και με την ακυλοτρανσφεράση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης με αντίστροφη κατεύθυνση. Φωσφολιπάση-A₂ ανεξάρτητη του Ca²⁺ και ενεργή σε όξινο pH έχει βρεθεί σε ομογενοποίηση πνευμόνων, στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, στα πολυστοιβαδωτά σωμάτια, στα λυσοσώματα και στα κυψελιδικά μακροφάγα [129, 133, 134, 135].

Σύνθεση άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Τα όξινα λιπίδια PG και PI συντίθενται από την CDP-διακυλογλυκερόλη (Σχήμα 11), η οποία παράγεται από φωσφατιδικό οξύ διαμέσω της κυτιδυλοτρανσφεράσης του φωσφατιδικού οξέος. Είναι πιθανό ότι στη σύνθεση της PG και της PI του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμμετέχουν μικροσωμιακά ένζυμα και όχι μιτοχονδριακά. Η PI παράγεται από τη CDP-διακυλογλυκερόλη αφού αντιδράσει με την μυο-ινοσιτόλη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η φωσφατιδυλοτρανσφεράση της CDP-διακυλο-γλυκερόλης-ινοσιτόλης, η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των πνευμονικών κυττάρων τύπου II [136, 137].

Εναλλακτικά, η CDP-διακυλογλυκερόλη με τη φωσφατιδυλοτρανσφεράση του γλυκερο-φωσφορικού οξέος μετατρέπεται σε φωσφατιδυλο-γλυκερο-φωσφορικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποφωσφορυλιώνεται από τη φωσφατάση της φωσφατιδυλο-γλυκερόλης προς PG. Η φωσφατιδυλο-τρανσφεράση του γλυκερο-φωσφορικού οξέος, σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια



τόσο στα ώριμα [137], όσο και στα εμβρυϊκά πνευμονικά κύτταρα τύπου II [136]. Υπάρχουν, ωστόσο, ισχυρές ενδείξεις ότι για τη δημιουργία της PG υπεύθυνη είναι η μικροσωμική φωσφατιδυλοτρανσφεράση του γλυκεροφωσφορικού οξέος [136].

Μελέτες που έγιναν σε απομονωμένους ιστούς πνευμόνων αρουραίων έδειξαν ότι μόνο ένα 7-10% της χοληστερόλης του επιφανειοδραστικού παράγοντα παράγεται ενδογενώς και ότι η περισσότερη χοληστερόλη προέρχεται από τις χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) ή από τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL) διαμέσω υποδοχέων [138]. Τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών αυτών στην κυκλοφορία ρυθμίζουν πιθανά την ενδογενή σύνθεση της χοληστερόλης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [138].

Έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα εκκρίνονται από τα κύτταρα τύπου II με εξωκύτωση των πολυστοιβαδωτών σωματίων [139]. Στην εκκριτική αυτή διαδικασία φαίνεται να συμμετέχουν μικροσωλινίσκοι και μικροϊνίδια [140] και φαίνεται ότι η έκκριση διεγείρεται από τον αυξημένο αερισμό κατά τη μηχανική αναπνοή. Είναι πιθανό η διέγερση αυτή να οφείλεται στην παραμόρφωση των πνευμονικών κυττάρων τύπου II ή στην ενδοκυττάρια αλλαγή του pH. Επίσης, οι χημικοί μεσολαβητές διεγείρουν την *in vitro* έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα κύτταρα τύπου II. Στους χημικούς μεσολαβητές περιλαμβάνονται οι κατεχολαμίνες, το ATP, η πρωτεϊνοκινάση A και C, το cAMP, οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια [141]. Επιπλέον, η έκκριση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα διεγείρεται από αγωνιστές του β-αδρενεργικού υποδοχέα, του χολινεργικού υποδοχέα, καθώς και του υποδοχέα της βασοπρεσίνης [140, 141]. Η διέγερση συνοδεύεται από αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του cAMP και της κυτοσολικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνοκινάσης A και της πρωτεϊνοκινάσης C (Σχήμα 12).

Στη ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όμως, υπάρχουν και ανασταλτικοί μηχανισμοί. Η έκκριση της PC από απομονωμένα



κύτταρα τύπου II αναστέλλεται από κορεσμένες PCs σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία μετάπτωσής τους (για παράδειγμα η DPPC στους 37°C) [142]. Έτσι, όταν σχηματίζονται κυστίδια από καθαρή DPPC in vivo μπορεί αυτά να ενεργούν ως ανασταλτικοί ρυθμιστές της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η έκκριση της PC από απομονωμένα πνευμονικά κύτταρα τύπου II αναστέλλεται ισχυρά και από την SP-A.

Δεν είναι βέβαιο αν η SP-A εκκρίνεται μαζί με τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν κάτι τέτοιο, άλλες όμως μελέτες έδειξαν ότι η SP-A εκκρίνεται με διαφορετικό τρόπο από την έκκριση των πολυστοιβαδωτών σωματίων [143 144]. Η απουσία της SP-D από τα πολυστοιβαδωτά σωματίδια δείχνει ότι αυτή η πρωτεΐνη εκκρίνεται ανεξάρτητα από την DPPC, ενώ η αυξημένη παρουσία των SP-B και SP-C σε αυτά τα σωματίδια υποδεικνύει ότι αυτές οι υδρόφοβες πρωτεΐνες εκκρίνονται μαζί με τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα [145].

Στη ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμμετέχει και το ένζυμο φωσφολιπάση A₂, το οποίο με τη δράση του στα φωσφολιπίδια απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ είναι αυτό που στη συνέχεια διεγείρει την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Με τη χρήση ειδικών αναστολέων των φωσφολιπασών A₂ βρέθηκε ότι η Ca²⁺-εξαρτώμενη κυτοσολική φωσφολιπάση πιθανά μετέχει στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II του αρουραίου [146].

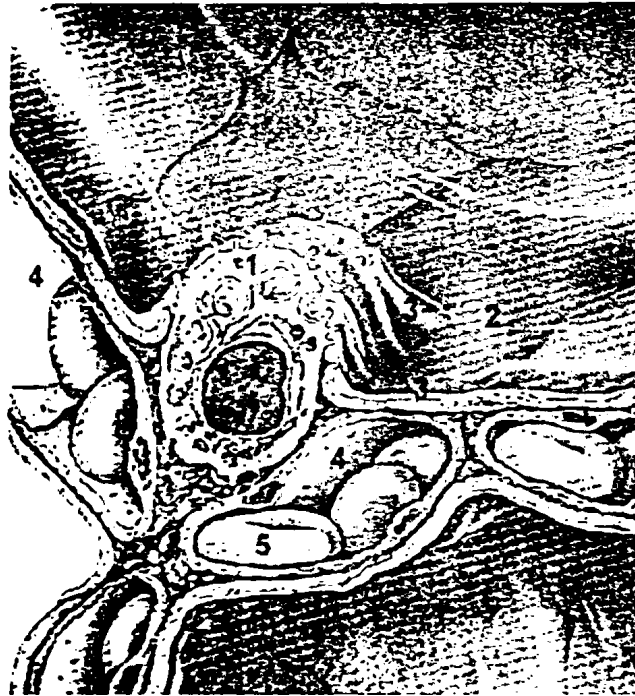
Μετά την έκκρισή τους στον κυψελιδικό χώρο τα πολυστοιβαδωτά σωματίδια παίρνουν τη μορφή της σωληνώδους μυελίνης [147]. Στην ανακατανομή αυτή των φωσφολιπιδίων πιθανά συμμετέχουν η SP-A, η SP-B και το Ca²⁺. Η σωληνώδης μυελίνη είναι η πρόδρομη μορφή της μονοστοιβάδας του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Οι SP-B, SP-C και SP-A μπορεί να συμμετέχουν στην εισαγωγή αυτών των φωσφολιπιδίων από τη σωληνώδη μυελίνη στη μονοστοιβάδα. Η επιφανειακή αυτή μεμβράνη στη συνέχεια εμπλουτίζεται σε DPPC. Στον εμπλουτισμό αυτό πιθανώς να συμμετέχει η SP-B και ίσως και η SP-A.



Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας που ανακτάται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των πνευμόνων μπορεί να διαχωριστεί σε διαφορετικά υποκλάσματα με φυγοκεντρήσεις [147]. Τα βαριά μεγάλα συσσωματώματα που περιέχουν τη σωληνώδη μυελίνη είναι πρόδρομες ενώσεις των ελαφρύτερων μικρών συσσωματωμάτων, τα οποία είναι κυρίως κυστίδια. Οι ελαφρές μορφές περιέχουν λιγότερες πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, απορροφώνται λιγότερο εύκολα στη μεσόφαση αέρα-υγρού σε σύγκριση με τις βαρύτερες μορφές και θεωρούνται επιφανειοδραστικός παράγοντας χωρίς καλές λειτουργικές ιδιότητες. Η βαριά μορφή είναι δυνατό *in vitro* να μετατραπεί στην ελαφριά μορφή. Η μετατροπή αυτή απαιτεί επαναλαμβανόμενη διαστολή και συστολή της επιφάνειας του επιφανειοδραστικού παράγοντα και τη δράση μιας σερινο-πρωτεάσης, η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και πιθανά παράγεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας η SP-B αποδομείται [148]. Έχει υποτεθεί ότι μέσα στα μεγάλα συσσωματώματα η SP-B είναι δυσπρόσιτη στη σερινο-πρωτεάση, αλλά κατά τη διάρκεια της ελάττωσης της επιφάνειας, όταν ο επιφανειοδραστικός παράγοντας απορροφάται στη μεσόφαση αέρα-υγρού, η SP-B μπορεί να διασπαστεί από την πρωτεάση. Κατά τη διάρκεια της μείωσης της επιφάνειας, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, χωρίς πλέον την SP-B, σχηματίζει μικρά συσσωματώματα.



Σχήμα 12: Έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην επιφάνεια των κυψελίδων από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. 1) Πνευμονοκύτταρα τύπου II, 2) Πνευμονοκύτταρα τύπου I, 3) Το στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, 4) Κυψελιδικό τριχοειδές αγγείο και 5) Ερυθροκύτταρα.



Ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στις κυψελίδες

Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα ανακυκλώνονται από τις κυψελίδες κάθε 5-10 ώρες. Αυτό μπορεί να γίνεται με αποδόμησή τους από τα κυψελιδικά μακροφάγα (σε ποσοστό 10-15%), μεταφορά τους από τους κροσσούς στους ανώτερους αεραγωγούς (2-5%) ή μετακίνησή τους διαμέσου του επιθηλίου και του ενδοθηλίου στο αίμα και στη λέμφο. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι το μεγαλύτερο μέρος των φωσφολιπιδίων επαναπροσλαμβάνεται και ξαναχρησιμοποιείται από τα κύτταρα τύπου II [149]. Η αποτελεσματικότητα αυτού του μηχανισμού ποικίλει με την ηλικία και μπορεί να φτάσει στο 85%. Μέρος των φωσφολιπιδίων αποδομούνται πιθανά από τα λυσοσώματα και τα

προϊόντα αποικοδόμησης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ένα άλλο μέρος ανακυκλώνεται αυτούσιο σε πολυστοιβαδωτά σωματίδια. Η SP-A φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση στην επαναπρόσληψη των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα κύτταρα τύπου II [150], ενώ οι υδρόφοβες πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη διαδικασία αυτή [151].

Η SP-A επαναπροσλαμβάνεται από τα κύτταρα τύπου II με ενδοκύττωση πιθανά διαμέσου υποδοχέων [152, 153] και εναποτίθεται στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια χωρίς να αποδομηθεί [150]. Παρόμοια, η SP-B προσλαμβάνεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, ανακυκλώνεται χωρίς να αποδομηθεί στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια με τα οποία και επανεκκρίνεται ξανά [154]. Ωστόσο, ένα μέρος της SP-B αποδομείται μέσα στα κύτταρα τύπου II [155]. Αν και η πρόσληψη της φτωχής σε φωσφολιπίδια SP-B από τα κύτταρα τύπου II δεν γίνεται διαμέσω υποδοχέων, υπάρχουν ενδείξεις ότι παρουσία φωσφολιπιδίων, η SP-B μπορεί να δεσμευτεί με ειδικές περιοχές στη μεμβράνη των κυττάρων τύπου II [156]. Αντίθετα, μετά από ενδοτραχειακή ενστάλλαξη ιχνηθετημένης SP-C στους πνεύμονες αρουραίου ανιχνεύτηκε πολύ γρήγορα ραδιενέργεια στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια [157].

Για τη διατήρηση μιας σταθερής κατάστασης η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, καθώς και η απομάκρυνσή του πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία. Οι β-αδρενεργικοί αγωνιστές διεγείρουν όχι μόνο την έκκριση αλλά και την επαναπρόσληψη του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Έχει προταθεί ότι η SP-A παίζει επίσης σημαντικό ρόλο, αναστέλλοντας την έκκρισή του. Το γεγονός αυτό μάλιστα έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως σήμα αναγνώρισης για την επαναπρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα τύπου II. Είναι άγνωστο όμως μέχρι τώρα πώς ρυθμίζεται η σύνθεση νέου επιφανειοδραστικού υλικού. Στην κυψελιδική πρωτεΐνωση υπάρχει πλεόνασμα επιφανειοδραστικού υλικού στον κυψελιδικό χώρο. Το αν αυτό το πλεόνασμα προέρχεται από υπερπαραγωγή, ατελή μεταβολισμό μέσα στις κυψελίδες ή από διαταραχή στην επαναπρόσληψή του παραμένει άγνωστο.

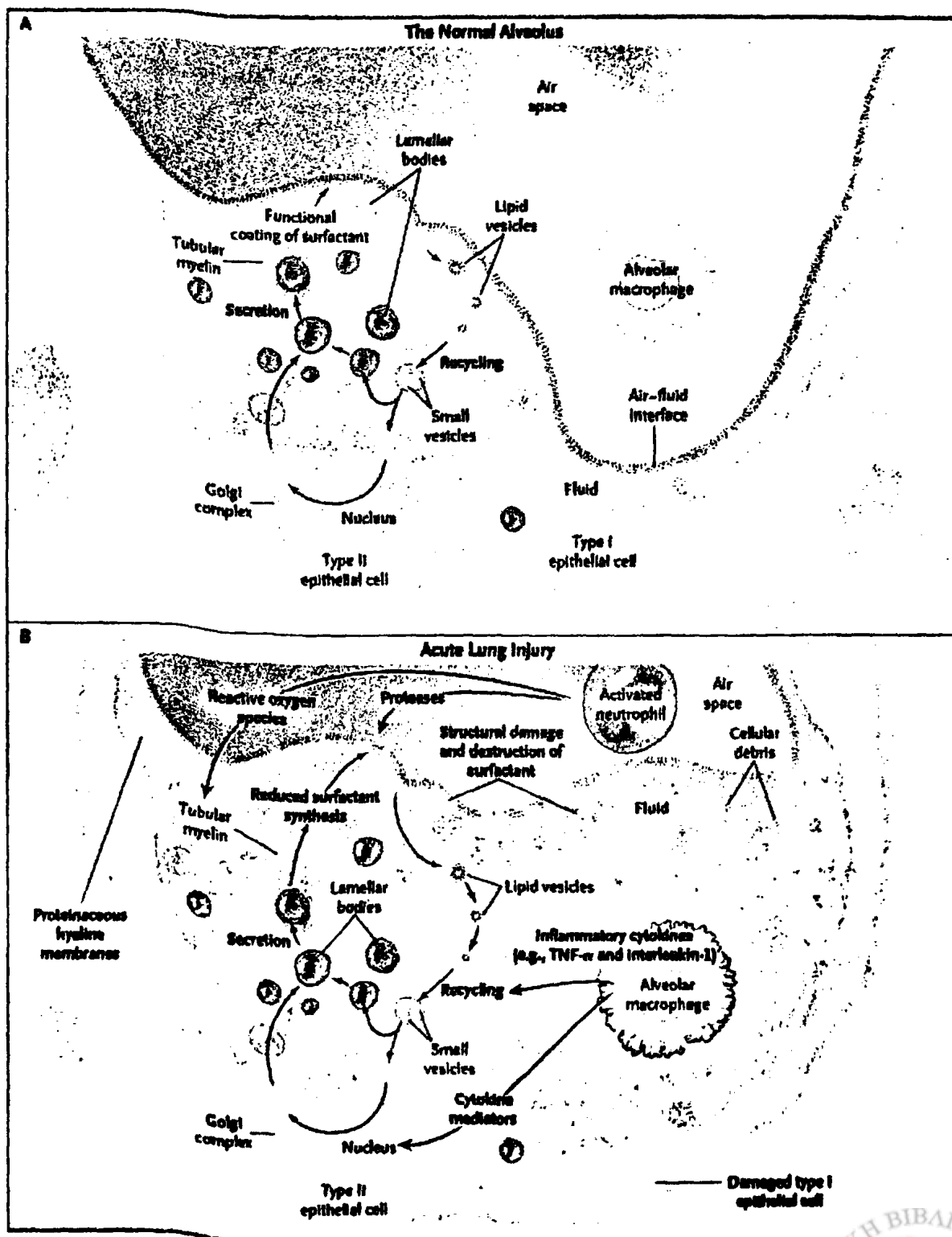


Κυψελιδικά μακροφάγα και ανακύκληση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία είναι και τα μεγαλύτερα σε όγκο κύτταρα του πνευμονικού παρεγχύματος, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του πνεύμονα. Είναι ελεύθερα κύτταρα και βρίσκονται προσκολλημένα διαμέσω ψευδοποδίων στο κυψελιδικό επιθήλιο, όπου μπορούν να μετακινούνται στην επιφάνειά του. Ο κύριος ρόλος τους είναι η φαγοκυττάρωση ξένων ουσιών και βακτηρίων, τα οποία εισέρχονται στην περιοχή του πνευμονικού παρεγχύματος και μπορεί να είναι επιβλαβή για τον πνεύμονα. Η μεγάλη περιεκτικότητά τους σε φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα σε διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη υποδεικνύει ότι τα μακροφάγα εμπλέκονται στο μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [158]. Η συμμετοχή των κυψελιδικών μακροφάγων στην ανακύκληση του επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται στο *Σχήμα 13*. Σε μια φυσιολογική κυψελίδα ο επιφανειοδραστικός παράγοντας συντίθεται και «πακετάρεται» σε πολυστοιβαδωτά σωμάτια στο κυτόπλασμα των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα σωμάτια αυτά μεταναστεύουν στην κυτταρική μεμβράνη, με την οποία αρχικά συγχωνεύονται και στη συνέχεια ελευθερώνονται στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού μέσα στην κυψελίδα. Ακολουθεί ο σχηματισμός της σωληνώδους μυελίνης, η οποία και δημιουργεί τη λειτουργική επίστρωση. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται και οι πρωτεΐνες, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η ανακύκληση του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβαίνει διαμέσω της διαδικασίας της ενδοκύττωσής του από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Αλλαγές στο μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω στάδια. Για παράδειγμα το ARDS, του οποίου η παθοφυσιολογία δεν έχει πλήρως διαφωτιστεί, είναι πιθανό να προκαλείται από την καταστροφή και την αλλαγή στη δομή των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα εξαιτίας της φλεγμονής του πνευμονικού παρεγχύματος. Επιπρόσθετα, η σύνθεση και η ανακύκληση του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι πιθανό να μειώνονται και η δράση του να ελαττώνεται από τη συσσώρευση πρωτεϊνικού υλικού εξαιτίας του συνυπάρχοντος πνευμονικού οιδήματος [159].



Σχήμα 13: Παραγωγή και ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε φυσιολογική κυψελίδα (A) και αλλαγές στο μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε οξύ πνευμονικό τραύμα (B) [159].



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A₂ (PLA₂)

Η φωσφολιπάση A₂ (PLA₂) αποτελεί μια υπεροικογένεια ενζύμων, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να καταλύουν ειδικά την υδρόλυση του κεντρικού (sn-2) εστερικού δεσμού σε ένα φωσφολιπιδικό υπόστρωμα [160, 161, 162, 163]. Φυσικά υποστρώματα της PLA₂ είναι ο PAF, τα βραχείας λιπαρής αλυσίδας οξειδωμένα φωσφολιπίδια και τα μεγάλης λιπαρής αλυσίδας φωσφολιπίδια με ακυλ-αλυσίδες στη θέση sn-2, από 2 (ακετυλ-) ως 20 (αραχιδινικό) και παραπάνω άτομα άνθρακα [164]. Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσο-φωσφολιπίδια. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από την PLA₂, όπως το αραχιδονικό οξύ (AA) και το ελαϊκό οξύ (OA), μπορούν να είναι σημαντικές πηγές ενέργειας ενώ το AA που παράγεται δρα ως δεύτερος μεσολαβητής σε κυτταρικό επίπεδο [165, 166] και αποτελεί πρόδρομη ουσία των εικοσανοειδών, τα οποία μπορούν να είναι μεσολαβητές της φλεγμονής και της μετάδοσης σήματος [167, 168, 169]. Τα άλλα παράγωγα της δράσης της PLA₂, τα λυσο-φωσφολιπίδια, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη στόχευση των κυττάρων, στην ανάπλαση των φωσφολιπιδίων και στη διαπερατότητα των μεμβρανών [170, 171]. Συμπερασματικά, η δράση των φωσφολιπασών είναι σημαντική στη ρύθμιση των κυτταρικών σημάτων, όπως φαίνεται από την καταλυόμενη από τη PLA₂ υδρόλυση του PAF προς την ανενεργή του μορφή, τον λυσο-PAF [172, 173, 174]. Όσο διαφέρουν οι δράσεις των φωσφολιπασών άλλα τόσα είναι και τα μέλη της υπεροικογένειας αυτών των ενζύμων.

Η ενζυμική δραστηριότητα που τώρα χαρακτηρίζεται ως PLA₂ πρωτομελετήθηκε στις αρχές του 1890 χρησιμοποιώντας δηλητήριο κόμπρας [175, 176, 177]. Μια εκκρινόμενη PLA₂ με παρόμοιες ιδιότητες βρέθηκε σε μεγάλες ποσότητες στο πάγκρεας χοίρου [176]. Αργότερα βρέθηκε ότι αυτή η εκκρινόμενη φωσφολιπάση ήταν Ca²⁺-εξαρτώμενη, είχε ισχυρούς δισουλφιδικούς δεσμούς και η καταλυτική της δράση οφειλόταν στο κέντρο



ιστιδίνης και ασπαραγίνης [160]. Όλες οι εκκρινόμενες PLA₂ που βρέθηκαν σε δηλητήρια και παγκρεατικά υγρά ζώων, καθώς επίσης και διάφορα παρεμφερή ένζυμα, κατατάχθηκαν αρχικά σε δυο κατηγορίες, με κριτήριο τη θέση του δισουλφιδικού δεσμού και την ύπαρξη ειδικών βρόγχων και προεκτάσεων [160, 178, 179]. Η ομάδα I περιλαμβάνει ένζυμα με μοριακό βάρος 14kDa, τα οποία έχουν δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των κέντρων 11 και 77. Η ομάδα II δεν έχει την 11-17 δισουλφιδική γέφυρα, αλλά έχει έξι ενεργά κέντρα στο καρβοξυτελικό άκρο με μια δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ του τελευταίου αμινοξέος και του ενεργού κέντρου 50 [180]. Η ομάδα II επεκτάθηκε για να περιλάβει τη μη παγκρεατική PLA₂ από θηλαστικά, αναφερόμενη από μερικούς και ως sPLA₂, εξαιτίας της αρχικής της απομόνωσης σε αρθρικό (synovial) υγρό [181, 182] και η οποία αναφέρεται ως PLA₂ ομάδα ΙΑ. Στην ομάδα ΙΙΙ κατατάχθηκε το ένζυμο που απομονώθηκε από το δηλητήριο μέλισσας και έχει εντελώς διαφορετική δομή από αυτά της ομάδας I και II.

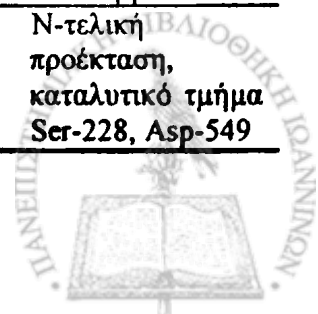
Το 1991, περιγράφηκε στα ουδετερόφιλα [183] και στα αιμοπετάλια [184] η δράση της κυτοσολικής PLA₂. Το ένζυμο αυτό έχει μοριακό βάρος 85kDa, εμφανίζει μια προτίμηση προς τα φωσφολιπίδια που περιέχουν αραχιδονικό οξύ και μεταφέρεται από το κυτοσόλιο στις μεμβράνες παρουσία μικρών επιπέδων Ca²⁺. Έχουν, μάλιστα, αναφερθεί εξειδικευμένες μελέτες που έδειξαν τη δράση του ενζύμου αυτού ως λυσοφωσφολιπάσης [185] και ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂) [186]. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά ορίζουν την ομάδα IV [187].

Η ανακάλυψη και άλλων μορφών εκκρινόμενης PLA₂, που ναι μεν έκαναν χρήση καταλυτικής ιστιδίνης, αλλά δεν μπορούσαν να ταξινομηθούν σε καμία από τις τέσσερις ομάδες, οδήγησε στην καθιέρωση των ομάδων V, IX, X και XI. Η ανακάλυψη και άλλων τριών ομάδων ανέβασε το συνολικό αριθμό των κατηγοριών PLA₂ στο 11, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, όπου συνοψίζονται οι κύριες ομάδες φωσφολιπασών και τα χαρακτηριστικά τους.



Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των κύριων ομάδων PL A₂ [163, 188].

Ομάδα	Προέλευση	Εντοπισμός	Μέγεθος (kDa)	Απαιτήση Ca ²⁺	Αριθμός δισουλφιδικών δεσμών	Μοριακά χαρακτηριστικά
I						
A	Κόμπρα	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζευγάρι His-Asp
B	Πάγκρεας χοίρου/ ανθρώπου	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζευγάρι His-Asp, θηλιά φιδιού
II						
A	Κροταλίας, οχιά, ανθρώπινο αρθρικό υγρό αιμοπετάλια	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζευγάρι His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
B	Οχιά Gaboon	Εκκρινόμενη	13-15	mM	6	Ζευγάρι His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
C	Όρχεις ποντικών/ αρουραίων	Εκκρινόμενη	15	mM	8	Ζευγάρι His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
D	Πάγκρεας/ σπλήνα ανθρώπου/ ποντικού	Εκκρινόμενη	14-15		7	Ζευγάρι His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
E	Εγκέφαλος/ καρδιά ανθρώπου/ ποντικού	Εκκρινόμενη	14-15		7	Ζευγάρι His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
F	Όρχεις/ έμβρυο ποντικού	Εκκρινόμενη	16-17		7	Ζευγάρι His-Asp
III	Μέλισσες, σαύρες	Εκκρινόμενη	16-18	mM	5	Ζευγάρι His-Asp,
IV						
A	Ήπαρ αρουραίου, αιμοπετάλια ανθρώπου.	Κυτοσολική	85	<μM		Ser-228 στην αλληλουχία GLSGS, απαίτηση Arg-200, Asp-549, φωσφορυλίωση στη θέση Ser-505, υπόλειμμα Cal-B
B	Ανθρώπινος εγκέφαλος πάγκρεας/ ήπαρ	Κυτοσολική	114	<μM		N-τελική προέκταση, καταλυτικό τμήμα Ser-228, Asp-549



C	Ανθρώπινη καρδιά, σκελετικός μυς	Κυτο-σολική	61	-		Καταλυτικό τμήμα Ser-228, Asp-549
V	Πνεύμονας/καρδιά, ανθρώπου/αρουραίου/ποντικού, μακροφάγα	Εκκρι-νόμενη	14	mM	6	Ζευγάρι His-Asp, όχι θηλιά φιδιού, όχι καρβοξυλική προέκταση
VI						
A-1	Μακρο-φάγα, P388D ₁	Κυτο-σολική	80-90	-		8 επαναλήψεις αγκυρίνης, ενεργό κέντρο από G-X-S-X-G
A-2	Ανθρώπινα β-λεμφοκύτταρα	Κυτο-σολική	88-90	-		7 επαναλήψεις αγκυρίνης, ενεργό κέντρο από G-X-S-X-G
B	Ανθρώπινη καρδιά, σκελετικός μυς	Κυτο-σολική	88	-		Συνδεδεμένη σε μεμβράνες, ενεργό κέντρο από G-X-S-X-G
VII						
A	Ανθρώπινο πλάσμα	Εκκρι-νόμενη	45	-		Αλληλουχία GX SXG, Ser-273, Asp-296, His-351
B	Ήπαρ/νεφρός ανθρώπου/βοός	Κυτο-σολική	40	-		Μυριστυλιωμένο στο N-τελικό άκρο
VIII						
	Εγκέφαλος μόσχου	Κυτο-σολική	29	-		Ser-47
IX						
	Θαλάσσιο σαλιγκάρι	Εκκρι-νόμενη	14	<mM	6	Ζευγάρι His-Asp
X						
	Ανθρώπινα λευκοκύτταρα	Εκκρι-νόμενη	14		6	Ζευγάρι His-Asp, γλυκοζυλιωμένη
XI						
A	Ρίζες πράσινου ρυζιού	Εκκρι-νόμενη	12		6	Ζευγάρι His-Asp, μοναδικές Cys
B	Ρίζες πράσινου ρυζιού	Εκκρι-νόμενη	13		6	Ζευγάρι His-Asp, μοναδικές Cys

Cal B=Ca²⁺ -λιπίδιο ή C-2



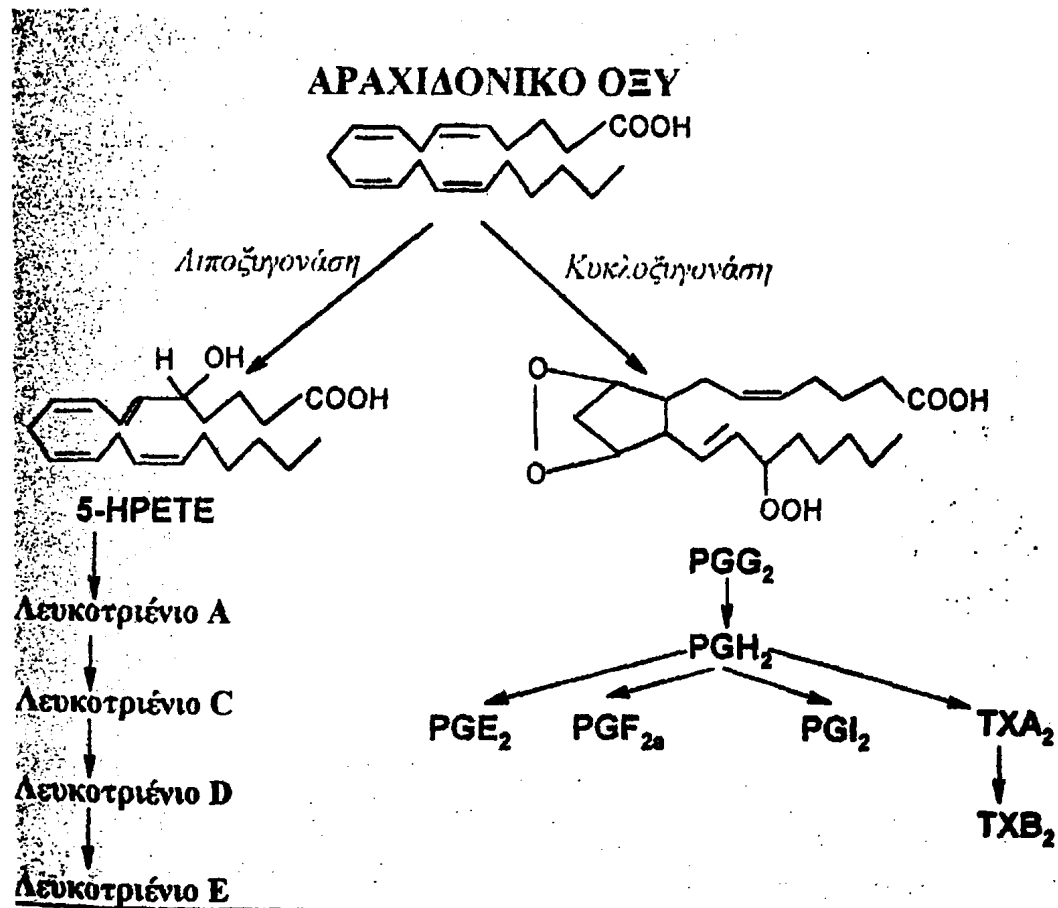
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (ΡΑΦ)

ΛΙΠΙΔΙΚΟΙ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ

Οι λιπιδικοί μεσολαβητές είναι βιολογικά δραστικά μόρια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Η πιο καλά μελετημένη τάξη λιπιδικών μεσολαβητών είναι οι προερχόμενοι από το αραχιδονικό οξύ, που ονομάζονται εικοσανοειδή. Από αυτά τα πιο σημαντικά είναι οι προσταγλανδίνες, το θρομβοξάνιο A_2 , η προστακυκλίνη και τα λευκοτριένια. Με τη δράση της κυκλοξυγονάσης στο αραχιδονικό οξύ σχηματίζονται οι προσταγλανδίνες PGE_2 και PGD_2 , η προστακυκλίνη PGI_2 και το θρομβοξάνιο A_2 . Η δράση της κυκλοξυγονάσης αναστέλεται από την ασπιρίνη, η οποία ακετυλιώνει μη αντιστρεπτά το ένζυμο έτσι ώστε να μην είναι δυνατή η σύνδεσή του με το αραχιδονικό οξύ. Τα λευκοτριένια σχηματίζονται από το αραχιδονικό οξύ με τη δράση του ενζύμου 5-λιποξυγονάση, το οποίο εκκινεί την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Σύνθεση των εικοσανοειδών από το αραχιδονικό οξύ.



Στους λιπιδικούς μεσολαβητές, οι οποίοι έχουν δράση τοπικής ορμόνης, οφείλεται ένα σημαντικό μέρος της ρύθμισης της φλεγμονής. Οι λιπιδικοί μεσολαβητές δεν βρίσκονται αποθηκευμένοι ως προσχηματισμένοι μεσολαβητές, αλλά δημιουργούνται ταχύτατα ύστερα από ερεθισμό ή ενεργοποίηση των κυττάρων. Η παρουσία αυτών των λιπιδίων θεωρείται απαραίτητη για τη ρύθμιση της φλεγμονής, ενώ η συμμετοχή τους στη βλάβη των ιστών και τις ασθένειες είναι υπό διερεύνηση.

Ένας πολύ ισχυρός μεσολαβητής της φλεγμονής και της αλλεργίας είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor ή PAF).

Ο PAF αρχικά περιγράφηκε ως ένας δραστικός μεσολαβητής που εκκρίνεται από τα λευκοκύτταρα κουνελιού όταν αυτά υποβληθούν σε

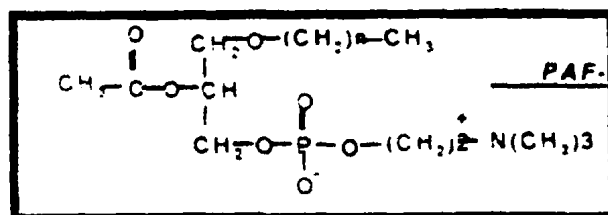


αναφυλακτικό σοκ. Επιπρόσθετα, ο PAF προκαλεί έκκριση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού *in vitro* [189, 190]. Η τελευταία αυτή βιολογική του δράση είναι υπεύθυνη για την ονομασία που του δόθηκε το 1972 από τους Benveniste και τους συνεργάτες του [191] όταν ακόμα ο χημικός του τύπος ήταν άγνωστος. Η ταυτοποίηση της χημικής του δομής έγινε το 1979 από τους Demopoulos και τους συνεργάτες του ως 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη [192, 193, 194], οι οποίοι ερευνητές και τον συνέθεσαν χημικά. Το 1980 η ομάδα του Hanahan [195] ταυτοποίησε τη δομή του φυσικού PAF που βιοσυντίθεται *in vitro* από ενεργοποιημένα βασεόφιλα κουνελιού. Οι κυριότερες κυτταρικές πηγές του είναι τα βασεόφιλα, τα πολυμορφοπύρηνα, τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα (περιτοναϊκά και κυψελιδικά), τα μονοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα νεφρικά κύτταρα, το πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* και διάφορα βακτήρια [196]. Η ποικιλομορφία των κυττάρων που εκκρίνουν τον PAF δείχνει ότι το φωσφολιπίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των οξέων και χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων [197]. Ο PAF είναι ένας ισχυρός βιοδραστικός παράγοντας που μπορεί να δράσει ως αυτακοειδές αλλά και ως παρακρινικό μόριο. Όλα τα κύτταρα τα οποία παράγουν PAF αποτελούν συγχρόνως τα ίδια στόχο των βιολογικών δράσεων που προκαλούνται από τον ίδιο τον PAF.

Ο PAF είναι ένα φωσφολιπίδιο, δομικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης (Σχήμα 15). Ο φυσικής προέλευσης PAF, που απομονώθηκε από ευαισθητοποιημένα βασεόφιλα κουνελιού μετά από ενεργοποίησή τους [195], περιέχει δυο κυρίως λιπαρές αλυσίδες 16 ή 18 ατόμων άνθρακα (σε ποσοστό 10 και 90% αντίστοιχα), οι οποίες συνδέονται με αιθερικό δεσμό στη θέση 1 του γλυκερινικού σκελετού. Στη θέση 2 υπάρχει εστεροποιημένη μια οξική ομάδα που είναι υπεύθυνη και για τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Τέλος, στη θέση 3 του γλυκερινικού σκελετού είναι η χολίνη (χαρακτηριστική πολική ομάδα), που συνδέεται με τη φωσφορική ομάδα. Σήμερα, λέγοντας PAF εννοούμε μια οικογένεια φωσφολιπιδίων της χολίνης, των οποίων η βιολογική δραστηριότητα εξαρτάται από το μήκος των λιπαρών αλυσίδων στις θέσεις 1 και 2 [198, 199, 200]. Το πλέον δραστικό μόριο είναι η 1-Ο-παλμιτοϋλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη.



Σχήμα 15: Μοριακός τύπος του PAF



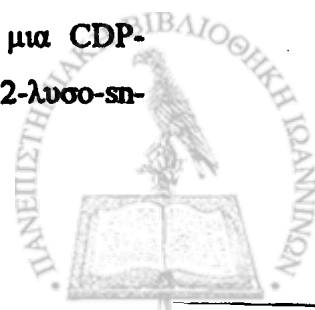
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ PAF

Πορεία Ανάπλασης (Remodeling pathway)

Η πορεία ανάπλασης θεωρείται υπεύθυνη για την παραγωγή του PAF μετά από διέγερση των κυττάρων της φλεγμονής και απαιτεί κυτταρική διέγερση με ενεργοποίηση μιας ενδοκυττάριας φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂), η οποία παρουσία ιόντων ασβεστίου υδρολύει τον εστερικό δεσμό στη θέση sn-2 της ενδοκυττάριας 1-O-παλμιτοϋλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης προς 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (Lyso-PAF) και αραχιδονικό οξύ. Ο Lyso-PAF που παράγεται ακετυλιώνεται με τη δράση μιας ακετυλο-τρανσφεράσης προς το βιολογικά δραστικό μόριο PAF. Η μεταβολική αποδόμηση του PAF πραγματοποιείται με τη δράση της ακετυλυδρολάσης (AcH), ένα ένζυμο που πολύ γρήγορα υδρολύει την ακετυλομάδα του PAF παράγοντας Lyso-PAF [201, 202]. Ο βιολογικά ανενεργός Lyso-PAF επανακυλιώνεται με τη δράση μιας ακυλοτρανσφεράσης, κλείνοντας έτσι το μεταβολικό κύκλο [203, 204].

De novo πορεία βιοσύνθεσης

Η de novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF καταλύεται από μια CDP-φωσφοχολινοτρανσφεράση. Το αρχικό υπόστρωμα 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-



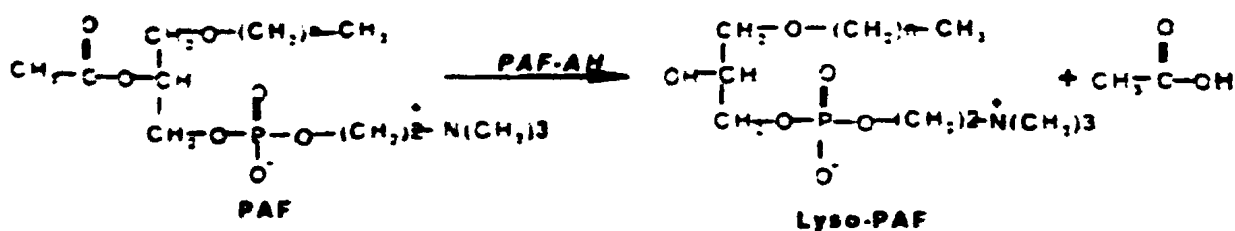
γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ ακετυλιώνεται στην sn-2 θέση με τη δράση μιας ακετυλοCoA-ακετυλοτρανσφεράσης παρουσία ακετυλοCoA. Στη συνέχεια με τη δράση της φωσφοϋδρολάσης του 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από την sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η βιοσύνθεση του PAF ολοκληρώνεται με τη δράση της CDP- φωσφοχολινοτρανσφεράσης η οποία μεταφέρει την ομάδα της φωσφοχολίνης από τη CDP χολίνη στην 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερόλη [205].

Η συγκέντρωση του PAF στα διάφορα κύτταρα και ιστούς ρυθμίζεται κυρίως από τον καταβολισμό του παρά από τη βιοσύνθεσή του. Η αποικοδόμηση και απενεργοποίησή του, η οποία είναι ανεξάρτητη από τη διέγερση των κυττάρων, καταλύεται από ένα και μοναδικό ένζυμο γνωστό ως PAF-ακετυλυδρολάση.

PAF-ακετυλυδρολάση (AcH)

Η PAF-AcH είναι μια φωσφολιπάση A_2 [206] που υδρολύει τον εστερικό δεσμό που υπάρχει στην sn-2 θέση του μορίου του PAF απελευθερώνοντας μια οξική ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιολογική του δράση.

Σχήμα 16: Υδρόλυση του PAF από την PAF-ακετυλυδρολάση



Ο Lyso-PAF που παράγεται επανακυλιώνεται πολύ γρήγορα στα κύτταρα, όπως έχουμε ήδη αναφέρει.

Η PAF-ακετυλυδρολάση μπορεί να ταξινομηθεί σε ενδοκυττάρια και εκκρινόμενη, με κυριότερο εκπρόσωπο της τελευταίας την PAF-AcH του πλάσματος [207]. Ενεργότητα PAF-ακετυλυδρολάσης έχει βρεθεί σε μια πλειάδα ιστών, στα κύτταρα του αίματος, στο πλάσμα ανθρώπου και άλλων θηλαστικών, καθώς και στο μικροσωματικό κλάσμα του πρωτόζωου *Tetrahymena Pygiformis* [208, 209, 210]. (Πίνακας 3)



Πίνακας 3: Κατανομή της PAF-AcH στα διάφορα είδη θηλαστικών [212].

Είδος	Ιστοί- Κύτταρα	Πηγή της PAF-AcH
Άνθρωπος	Ουδετερόφιλα,	Ομογενοποίηση
	Ηωσινόφιλα Αιμοπετάλια	Κυτοσόλιο
	Μονοκύτταρα-	Ομογενοποίηση
	Μακροφάγα	Κυτοσόλιο
	Ερυθροκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Νεφροί	Υπερκείμενο
	HepG2	
	Ορρός- Πλάσμα	
Επίμυς	Νεφροί	Κυτοσόλιο
	Νεφρικός φλοιός	Κυτοσόλιο
	Πνεύμονας	Κυτοσόλιο
	Εγκέφαλος	Κυτοσόλιο
	Σπλήνας	Κυτοσόλιο
	Ήπαρ	Κυτοσόλιο
	Καρδιά	Κυτοσόλιο
	Κοκκιοκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Μονοκύτταρα-	Ομογενοποίηση
	Μακροφάγα	Ομογενοποίηση
	Λεμφοκύτταρα	Ομογενοποίηση
	Αιμοπετάλια	
	Ερυθροκύτταρα	Ομογενοποίηση
Πλάσμα		
Ποντίκι	Περιτόνεο	Ομογενοποίηση
	Μακροφάγα	
	Πλάσμα	
Βόδι	Αιμοπετάλια	Υπερκείμενο
Κουνέλι	Νεφρά	Κυτοσόλιο
	Σπλήνα	Κυτοσόλιο
Ινδικό χοιρίδιο	Νεφρά	Κυτοσόλιο
	Πλάσμα	



Ενδοκυττάρια μορφές της PAF-AcH έχουν βρεθεί κυρίως στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και στους νεφρούς και διακρίνονται σε δύο ισομορφές, τις I και II [211].

Η ισομορφή I φαίνεται να αποτελείται από δύο ή και περισσότερες υπομονάδες: Ia και Ib. Όλες οι ενδοκυττάρια μορφές, όπως επίσης και οι εκκρινόμενες, περιέχουν το καταλυτικό πενταπεπτίδιο (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) ή (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Val) που υπάρχει τόσο στις λιπάσες όσο και στις εστεράσες [212].

Από τις πιο μελετημένες ενδοκυττάρια ισομορφές της PAF-AcH είναι η Ib, η οποία έχει τρεις υπομονάδες α, β και γ, μοριακού βάρους 45, 30 και 29 kDa αντίστοιχα [213]. Οι υπομονάδες των 29 και 30 kDa είναι καταλυτικά ενεργές, ενώ η υπομονάδα των 45 kDa είναι καταλυτικά αδρανής, αλλά ρυθμίζει την ενεργότητα, τον εντοπισμό και τον μεταβολισμό του ολενζύμου [214].

Ενδοκυττάρια μορφή PAF-AcH είναι και αυτή των ερυθροκυττάρων η οποία αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες των 25 kDa. Οι φυσικοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες είναι διαφορετικές από αυτές του ενζύμου που υπάρχει στο πλάσμα.

Η ενδοκυττάρια PAF-AcH έχει εύρος βέλτιστου pH 7.5-8.5 και η ενεργότητά της δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων ασβεστίου, καθώς και από το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA). Είναι ειδική στο να υδρολύει μικρές λιπαρές αλυσίδες στην sn-2 θέση και εντοπίζεται κυρίως στο κυτοσόλιο.

Η PAF-AcH του πλάσματος εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα και έχει μοριακό βάρος 45 kDa. Το εύρος του βέλτιστου pH είναι 7.5-8.5 και η ενεργότητά της δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ιόντων ασβεστίου, καθώς και από το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), ενώ είναι ειδική στο να υδρολύει μικρές λιπαρές αλυσίδες στην sn-2 θέση. Αναστέλλεται από τη δράση αναστολέων των σερινοεστερασών, όπως το διϋσοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό (DFP), γεγονός που αποδεικνύει ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχει σερίνη. Επίσης, το ένζυμο του πλάσματος είναι υδρόφοβο και μεταφέρεται με τις υψηλής και χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες [215]. Τέλος, υδρολύει κατά προτίμηση την ακετυλομάδα των αναλόγων του PAF με ακυλομάδα στην sn-1 θέση, ενώ δεν υδρολύει ανάλογα του PAF με αιθανολαμίνη: τα τελευταία αναστέλλουν την υδρόλυση του PAF από την PAF-AcH του πλάσματος [201].



Ο κύριος βιολογικός ρόλος της PAF-AcH του πλάσματος φαίνεται να είναι η αδρανοποίηση του PAF και άλλων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, δρώντας έτσι ως μεσολαβητής-αναστολέας της φλεγμονής. Η φυσιολογική αυτή λειτουργία αποδείχθηκε πειραματικά σε ποντίκια με τη βοήθεια ανασυνδυασμένου ενζύμου AcH [216]. Συνεπώς η PAF-AcH του πλάσματος δρα ως αγωνιστής όλων των προ-φλεγμονωδών φωσφολιπιδίων. Αντιθέτως, η βιολογική δράση της ενδοκυττάριας PAF-AcH ισομορφής II δεν είναι και τόσο ξεκάθαρη. Σχετικά πρόσφατα δημοσιεύματα υποστηρίζουν ότι μπορεί να δρα προστατευτικά ενάντια στην απόπτωση που προκαλείται από οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα, τουλάχιστο σε ορισμένα όργανα, όπως για παράδειγμα το ήπαρ και ο νεφρός [217]. Η φυσιολογική δράση της ενδοκυττάριας PAF-AcH ισομορφής I και ειδικότερα της υπομονάδας Ib δεν είναι επίσης ξεκάθαρη. Αξιοσημείωτη προσοχή έχει δοθεί στη β-υπομονάδα, η οποία είναι προϊόν ενός γονιδίου που θεωρείται υπεύθυνο για την εμφάνιση της λειψεγκεφαλοπάθειας (lissencephaly) Miller-Dieker, μιας αναπτυξιακής διαταραχής του εγκεφάλου [218]. Η κυτταρική βάση της νόσου συνίσταται σε μια παθολογική νευρωνική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Το εύρημα ότι μία υπομονάδα της ενδοκυττάριας PAF-AcH παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου σχετίζεται με τη θεωρία πως ο PAF αποτελεί έναν νευροδιαβιβαστή μεγάλης δραστηριότητας [219]. Η β-υπομονάδα διαδραματίζει κυρίως ρόλο στους μηχανισμούς μετανάστευσης των κυττάρων. Υπάρχουν δύο βασικά θέματα που πρέπει να επιλυθούν. Πρώτον ποια είναι η λειτουργική συσχέτιση της ενεργότητας της α-υπομονάδας και της μετάδοσης σήματος από τη β-υπομονάδα. Δεύτερον, ποιος είναι ο προφανώς μοναδικός ρόλος της α-υπομονάδας στη ρύθμιση της μετανάστευσης των νευρώνων. Θεωρείται ότι η πρόσδεση των β-υπομονάδων σε δυο διαφορετικά α-διμερή ρυθμίζει την καταλυτική τους αποτελεσματικότητα [220] (*Εικόνα 1, Εικόνα 2, Πίνακας 4*).

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι τα πειραματικά αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αξιοσημείωτη ετερογένεια μεταξύ των ισοενζύμων της PAF-AcH και ο βιολογικός ρόλος του καθενός από αυτά απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση [207].

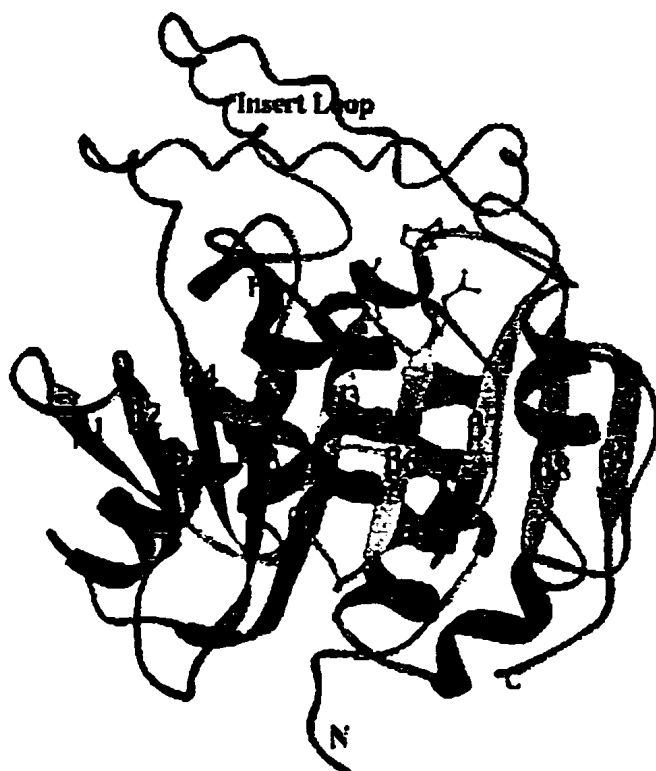


Πίνακας 4: Εκκρινόμενες και ενδοκυττάρια μορφές της PAF-AcH [221, 222, 223].

Τύπος	Ισομορφή	Πηγή	Ενεργό κέντρο	Μοριακό βάρος
Εκκρινόμενη	-	Πλάσμα	GHSFG	45kDa
Ενδοκυττάρια	Π	Ήπαρ & νεφροί	GHSFG	40 kDa
Ενδοκυττάρια	Ιb-γ υπομονάδα	Εγκέφαλος	GDSL V	29 kDa
Ενδοκυττάρια	Ιb-β υπομονάδα	Εγκέφαλος	GDSMV	30 kDa

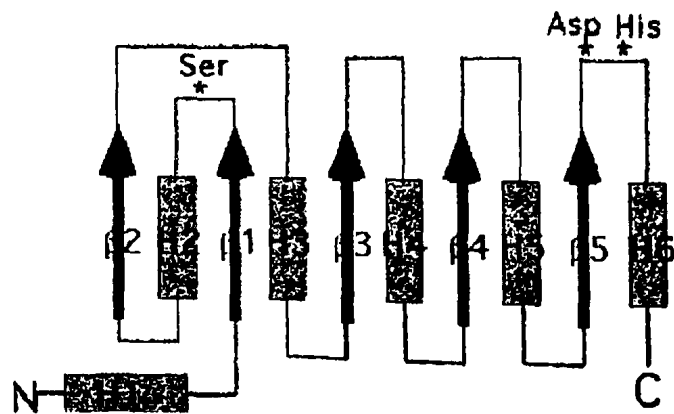


Εικόνα 1: Τρισδιάστατο μοντέλο της PAF-AcH του πλάσματος. Τα τρία καταλυτικά κέντρα, περιλαμβανομένων και των πλάγιων αλυσίδων φαίνονται στην πάνω πλευρά της β-υπομονάδας. Με μπλέ απεικονίζεται μια υποθετική δομή για το τμήμα εισόδου ή «βλέφαρο». Στο «βλέφαρο» προσδίδεται η εκλεκτικότητα του ενζύμου. Αυτή η εισδοχή είναι μοναδική για την PAF-AcH της υπομονάδας α/β [207].

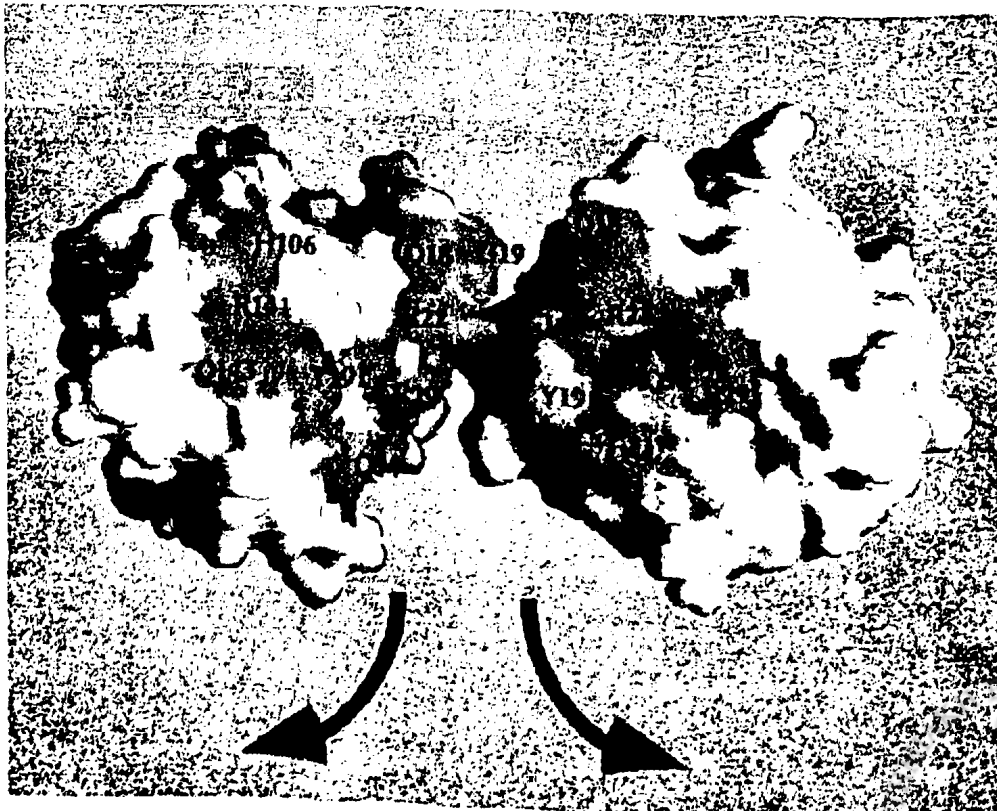


Εικόνα 2: (Α) Σχηματική απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της α-υπομονάδας της PAF-AcH-(Ib). Το ενεργό κέντρο σερίνης τοποθετείται μέσα στο βρόγχο σε αντίθεση με την PAF-AcH του πλάσματος. (Β) Τρισδιάστατο μοντέλο της α₁ υπομονάδας. Σε αντίθεση με την PAF-AcH του πλάσματος και την ισομορφή II, το ενεργό κέντρο δεν καλύπτεται από κάποιο βρόγχο και το καταλυτικό κέντρο φαίνεται να είναι προσβάσιμο από το διαλύτη. Τα κέντρα που βρίσκονται στη μεσόφαση είναι κυρίως πολικά [207].

Α)



Β)



Παθοφυσιολογικές δράσεις του PAF

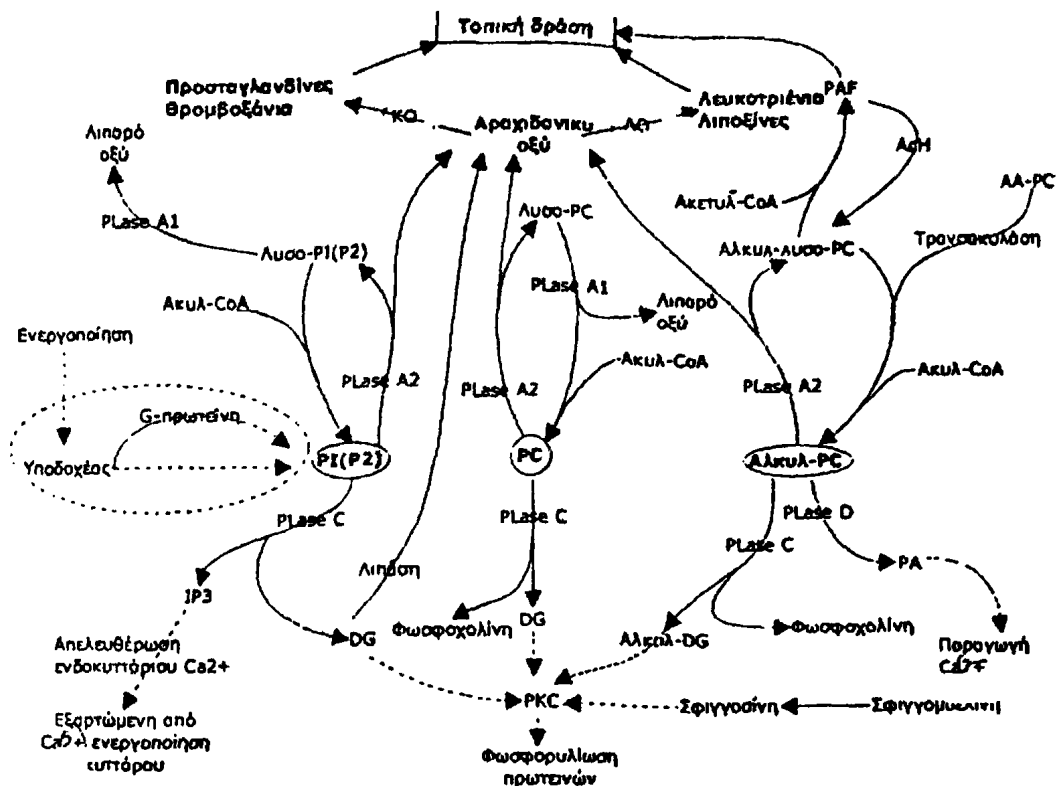
Ο PAF είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής όχι μόνο για τα περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα, αλλά για τα λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, καθώς επίσης και για τα νεφρικά και επιθηλιακά κύτταρα.

Μηχανισμοί δράσης- μεταγωγή σήματος

Η ενεργοποίηση που προκαλεί ο PAF στα κύτταρα θεωρείται ότι ξεκινάει με την αλληλεπίδρασή του με έναν ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα που συνδέεται με μια G-πρωτεΐνη [224]. Εκτός από τον εξωκυττάριο PAF, πολλά είδη κυττάρων περιέχουν σημαντικές ποσότητες PAF στο κυτοσόλιο, όπου αυτό το φωσφολιπίδιο μπορεί να δράσει ως ένας δεύτερος διαβιβαστής. Το αν υπάρχουν εξειδικευμένοι ενδοκυττάριοι υποδοχείς για τον PAF είναι ακόμα ένα θέμα προς συζήτηση, αν και υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξή τους [225]. Σε πολλά φλεγμονώδη κύτταρα όπως αιμοπετάλια, πολυμορφοπύρρηνα (PMN), μονοκύτταρα/μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα, το αρχικό αποτέλεσμα που έχει παρατηρηθεί αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους από τον PAF είναι η απότομη αύξηση των επιπέδων του Ca^{2+} στο κυτοσόλιο. Η φωσφολιπάση C (PLC) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP_2) και ενεργοποιείται από μια G-πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3). Η IP_3 προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτοπλασματική επιφάνεια των αποθηκών Ca^{2+} , ανοίγει τις ενδοκυττάριας αποθήκες Ca^{2+} , οπότε και παρατηρείται απότομη αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Στη συνέχεια τα ιόντα ασβεστίου που απελευθερώνονται ενεργοποιούν την PLA_2 , η οποία καταλύει την παραγωγή του αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Σχήμα 17).



Σχήμα 17: Μεταγωγή σήματος και τα στάδια δημιουργίας των λιπιδικών μεσολαβητών



Η DAG παράλληλα ενεργοποιεί μια πρωτεϊνοκινάση C που φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες C του κυτταροπλάσματος με διαφορετικές δράσεις στα κύτταρα-στόχους, ενώ η ίδια φωσφορυλιώνεται σε φωσφατιδικό οξύ, το οποίο συμμετέχει επίσης στην απελευθέρωση Ca^{2+} . Εναλλακτικά, η DAG μπορεί να υδρολυθεί από μια λιπάση στην sn-2 θέση, που είναι εστεροποιημένη με αραχιδονικό οξύ, απελευθερώνοντας το αραχιδονικό. Το αραχιδονικό οξύ που παράγεται μεταβολίζεται διαμέσω του κύκλου της κυκλοοξυγονάσης και/ή της λιτοξυγονάσης.

Ενεργοποίηση των κυττάρων

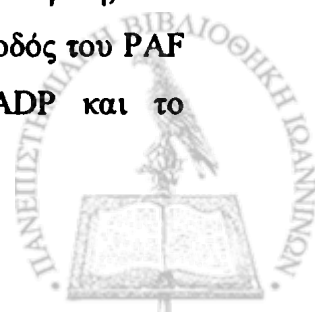
Όλα τα κύτταρα τα οποία παράγουν PAF αποτελούν συγχρόνως τα ίδια και στόχους των βιολογικών δράσεων που προκαλούνται από τον PAF. Οι κυριότερες δράσεις του PAF στα διάφορα κύτταρα-στόχους συνοψίζονται στον *Πίνακα 5*.

Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια κουνελιού παράγουν PAF κατά τη διέγερσή τους διαμέσου των υποδοχέων τους [195]. Η ποσότητα του παραγόμενου PAF εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ενεργοποιητών [θρομβίνη, κολλαγόνο, ADP, θρομβοξανίου A_2 (TXA_2)], αλλά είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τον παραγόμενο PAF από τα κύτταρα που συμμετέχουν στην αλλεργία και στη φλεγμονή. Η παρουσία ιόντων Ca^{2+} είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του PAF.

Ο PAF είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής για τα αιμοπετάλια πολλών ειδών ζώων. Προκαλεί την μη αντιστρεπτή, εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου, συσώρευση τους, η οποία ακολουθείται από έκκριση του περιεχομένου των πυκνών σωματίων (σεροτονίνη, ισταμίνη) των α-κοκκίων, καθώς και από παραγωγή θρομβοξανίων. Επιπρόσθετα, προκαλεί εκκίνηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Η παρουσία EDTA, που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου, αναστέλλει τη συσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF, καθώς και την παραγωγή PAF από τα αιμοπετάλια αυτά. Η συσώρευση που προκαλεί ο PAF στα αιμοπετάλια είναι εξαιρετικά ισχυρή, αφού προκαλεί συσώρευση σε πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού σε συγκεντρώσεις 10-100pM.

Η συσώρευση που προκαλεί ο PAF δεν επηρεάζεται από τους αναστολείς του ADP [φωσφοκρεατίνη/κινάση της φωσφοκρεατίνης (CP/CPK)] ούτε από τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η ασπιρίνη, που είναι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης. Δηλαδή η συσσωρευτική οδός του PAF είναι ανεξάρτητη των συσσωρεύσεων που προκαλούν το ADP και το αραχιδονικό οξύ [200].



Πίνακας 5: Δράσεις του PAF σε κύτταρα- στόχους.

Κύτταρο στόχος	Απόκριση στην ενεργοποίηση με PAF
Αιμοπετάλια	Έκκριση, συσσώρευση, αλλαγή σχήματος, ενεργοποίηση του κύκλου της PI και προϊόντων μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, σύνθεση TXA ₂ , φωσφορυλίωση πρωτεϊνών.
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, αυξημένη προσκόλληση συσσώρευση, χημειοτακτισμός, έκκριση λυσοσωμικών ενζύμων, σύνθεση LT, παραγωγή HETE, ενεργοποίηση του κύκλου του PI, αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου.
Ηωσινόφιλα	Σύνθεση LT, παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου, χημειοτακτισμός.
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα	Χημειοτακτισμός, διαφοροποίηση, συσσώρευση, σύνθεση TXA ₂ και PG, παραγωγή TNF και ανιόντος υπεροξειδίου, παραγωγή IL, αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου.
Ενδοθηλιακά	Αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου, έκκριση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, δομικές αλλαγές, σύνθεση ενδοκυττάριου ασβεστίου και PG.
Λεία μυικά κύτταρα	Αύξηση ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου, ενεργοποίηση του κύκλου PI, σύνθεση PG.
Πρωτόζωα (<i>Tetrahymena Pyriformis</i>)	Ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης PG, αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, αύξηση της γλυκονόλυσης

PI: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, TXA₂: θρομβοξάνιο A₂, LT: λευκοτριένιο, HETE: υδροξυεικοσατριένιο, PG: προσταγλανδίνη, IL: ιντερλευκίνη.



Φλεγμονώδεις δράσεις του PAF

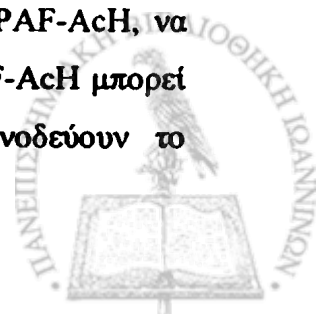
Ενδοφλέβια χορήγηση αλκυλ-ακετυλο-GPC προκαλεί ενδοαγγειακή συσσώρευση αιμοπεταλίων και ουδετεροφύλων με επακόλουθη θρομβοκυτοπενία και ουδετεροπενία. Επίσης, αυξάνονται τα ενδοαγγειακά επίπεδα του θρομβοξανίου B₂.

Όταν ο PAF χορηγηθεί ενδοφλέβια σε πειραματόζωα προκαλεί αγγειοδιαστολή και υπόταση, αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλεί οίδημα.

Ο PAF είναι ένας προφλεγμονώδης μεσολαβητής που εμπλέκεται στην παθογένεση ποικίλων οξέων και χρόνιων πνευμονικών ασθενειών [226]. Η οξειδωτική αποικοδόμηση της ακόρεστης φωσφατιδυλοχολίνης παράγει ενώσεις, που ομοιάζουν με τον PAF, τα λεγόμενα PAF-like φωσφολιπίδια, τα οποία έχουν μία βραχεία αλυσίδα στη θέση sn-2, προερχόμενη από την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων [227, 228, 229]. Αν και οι μετρήσεις PAF σε BAL δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, τα υψηλά επίπεδα λυσο-PAF σε ασθενείς με φλεγμονώδη πνευμονική νόσο υποδεικνύουν ότι ο PAF πιθανά αποτελεί συστατικό του BAL [230, 231]. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η μεταφορά εξωγενούς PAF στον πνεύμονα μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη [232, 233]. Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση του PAF και των PAF-like φωσφολιπιδίων πρέπει να είναι αυστηρά ελεγχόμενη.

Στους ιστούς και τα βιολογικά υγρά τα επίπεδα του PAF ρυθμίζονται από την κυτταρική βιοσύνθεση και έκκρισή του καθώς και από την PAF-AcH, όπως έχουμε προαναφέρει. Η ενεργότητα της PAF-AcH συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των μακροφάγων, αφού η κύρια πηγή PAF-AcH στο ελεύθερο κυττάρων BAL είναι τα μακροφάγα [234, 235, 236].

Οι ελεύθερες ρίζες αναστέλλουν μη αντιστρεπτά την PAF-AcH [237] με αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία προκαλεί σχηματισμό ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια μείωση των επιπέδων της PAF-AcH, να ενισχύεται η προ-φλεγμονώδης δράση του PAF. Επιπλέον, η PAF-AcH μπορεί να αδρανοποιήσει τα PAF-like φωσφολιπίδια, τα οποία συνοδεύουν το



σχηματισμό ελευθέρων ριζών σε μια σειρά φλεγμονωδών αντιδράσεων [238]. Συνεπώς, η PAF-AcH είναι σημαντικό στοιχείο του αμυντικού συστήματος προστατεύοντας τα κύτταρα και τα βιολογικά υγρά από τη φλεγμονή [239].

Συσχέτιση του PAF με ασθένειες

Ο PAF συσχετίζεται με πολλές ασθένειες, όπως άσθμα, συστηματική αναφυλαξία, υδρονέφρωση, κίρρωση του ήπατος, υπέρταση, λευκοπενία οφειλόμενη στην αιμοδιάλυση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, θρόμβωση, απόρριψη μοσχευμάτων, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ενδοτοξικό σοκ, έγκαιμα, ψωρίαση [240] και περιοδοντίτιδα [241].

Στο αναπνευστικό σύστημα θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο στη δημιουργία και την επιδείνωση του άσθματος. Προκαλεί βρογχόσπασμο, μακράς διάρκειας φλεγμονή και παρατεταμένη, μη ειδική υπερευαισθησία. Σε ασθενείς με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (ARDS) βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα, καθώς επίσης και σε ασθενείς με πνευμονική θρομβοεμβολή [234, 242].

Παρόλη όμως την εμπλοκή του PAF σε διάφορες ασθένειες υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τον ρόλο του σε φυσιολογικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως στην ωοθηλακιορρηξία, στην κινητικότητα του σπέρματος, στη ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου και, τέλος, στην έναρξη του τοκετού εξαιτίας της ισχυρής μητροσυσταλτικής δράσης του. Θεωρείται δε ένας από τους παράγοντες που συμμετέχει στην πρόκληση πρόωρου τοκετού. Για το λόγο αυτό και τα επίπεδα της PAF-AcH στο πλάσμα κατά τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης είναι υψηλά, ώστε να διατηρούνται χαμηλά τα επίπεδα του PAF και να αποφεύγεται έτσι η πρόωρη συστολή της μήτρας. Αντίθετα, τα επίπεδα της PAF-AcH μειώνονται όταν πλησιάζει ο τοκετός, ώστε η συσσώρευση του PAF να προκαλέσει την έναρξη των συστολών.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διαδικασία λήψης του BAL

Έξι δείγματα των 20 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 37°C, εγχύονται διαμέσου βρογχοσκοπίου με οπτικές ίνες. Στο πρώτο κλάσμα του υγρού που ανακτάται και αντιστοιχεί στο βρογχικό έκκριμα, γίνεται μικροβιολογικός έλεγχος, ενώ το υπόλοιπο υγρό (BAL) συλλέγεται σε σωλήνες εμβαπτισμένους σε παγόλουτρο, για την αποφυγή αποδόμησης του PAF από την ενεργότητα της PAF-ακετυλυδρολάσης.

Κατεργασία του BAL

Το BAL στη συνέχεια διηθείται από αποστειρωμένη γάζα για να απομακρυνθεί η βλέννα και φυγοκεντρείται στις 500 x g για 15 min στους 4 °C σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sorvall RC-5B, Dupont, Canada) για να καθιζάνουν τα κύτταρα. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 1 ml RPMI ή PBS και ακολουθεί κατεργασία τους

Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών του BAL με τη μέθοδο Lowry

(για 40-200 μg πρωτεΐνης)

Αρχή της μεθόδου

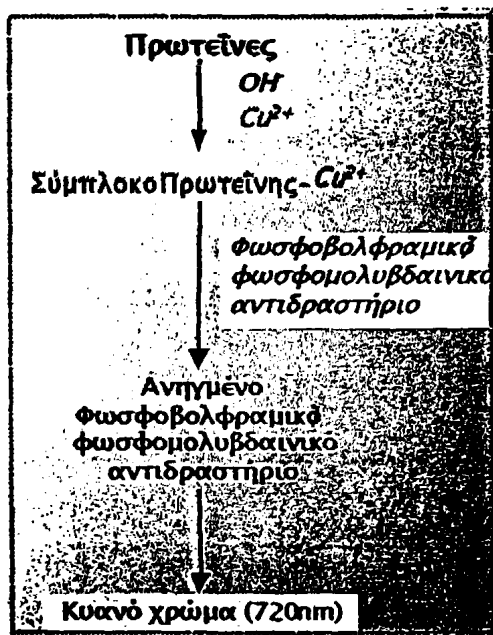
Οι πρωτεΐνες αρχικά δεσμεύονται με τα ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Folin & Phenol (φωσφο-μολυβδαινικό-φωσφο-βολφραμικό αντιδραστήριο), το οποίο ανάγεται από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών- Cu^{2+} με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανού χρώματος που απορροφά στα 720nm [243] (Σχήμα 18).



Αντιδραστήρια

- NaOH (M.B.: 40, Merck)
- Na_2CO_3 (M.B.: 105.99, Fluca)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (M.B.: 249.68, Fluca)
- Κιτρικό νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.B.: 294.10, Merck)
- Αντιδραστήριο φαινόλης: Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma)
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, 100 g, A-9647, Sigma)

Σχήμα 18. Διάγραμμα ροής προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.



Διάλυμα 1 N NaOH

4 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Διάλυμα 0.5 N NaOH

2 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 2% Na₂CO₃

20 g Na₂CO₃ διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 1 lt. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 1 % κιτρικού νατρίου

1.139 g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C. Διάλυμα 0.5% CuSO₄·5H₂O σε 1% κιτρικό νάτριο 0.5g CuSO₄ διαλύονται σε 100ml διαλύματος 1% κιτρικού νατρίου. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Μίγμα διαλυμάτων 2% Na₂CO₃ και 0.5% CuSO₄ σε αναλογία 50:1

Σε 50 ml διαλύματος 2 % Na₂CO₃ προστίθεται 1 ml διαλύματος 0.5% CuSO₄. Το μίγμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πρότυπο διάλυμα BSA 200 μg/ml σε 0.5 N NaOH

20 mg BSA διαλύονται σε 100 ml 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για λίγες ώρες μέχρι να διαλυθεί η BSA. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες και διατηρείται στους -20 °C.

Αντιδραστήριο φαινόλης

Ορισμένος όγκος αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu αναμιγνύεται με ίσο όγκο H₂O. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική πορεία**Πρότυπη καμπύλη**

Προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1ml προτύπου διαλύματος BSA 200 μg/ml (0-200 μg BSA αντίστοιχα) σε 5 πλαστικούς σωλήνες και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1ml με 0.5 N NaOH.



Προετοιμασία των δειγμάτων

Κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL (από 50μl έως 500μl το μέγιστο) μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα. Στο σωλήνα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1 N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με διάλυμα 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 60 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να υδρολυθούν οι πρωτεΐνες.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Σε κάθε σωλήνα (πρότυπα και δείγματα) προστίθενται 5 ml μίγματος 2% Na_2CO_3 και 0.5% CuSO_4 . Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5ml αντιδραστηρίου φαινόλης και αμέσως ακολουθεί ανάδευση. Σχηματίζεται κυανούν χρώμα και μετά από 30 min γίνεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων στα 750 nm σε γυάλινη κυψελίδα.

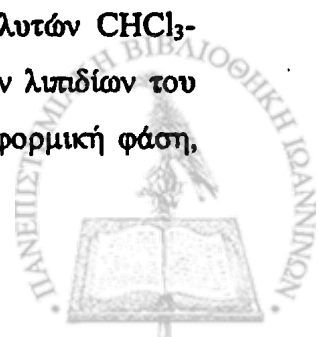
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε πρωτεΐνες κατασκευάζεται γράφημα της βέλτιστης ευθείας, της μορφής $y = ax + \beta$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεϊνών), βάσει της οποίας υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματός μας. Τέλος γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά ml δείγματος BAL.

Εκχύλιση λιπιδίων με τη μέθοδο Bligh-Dyer

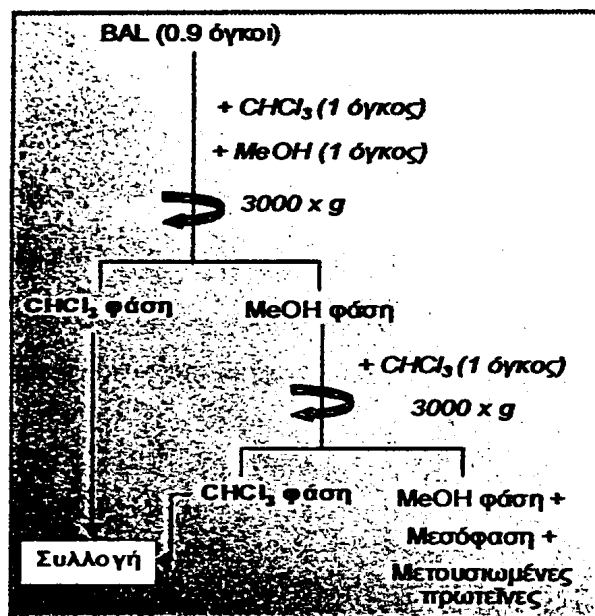
Αρχή της μεθόδου

Με το σχηματισμό κατάλληλης πολικότητας συστήματος διαλυτών CHCl_3 - $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$, (1:1:0.9), επιτυγχάνεται η εκχύλιση και παραλαβή των λιπιδίων του BAL. Στο διφασικό σύστημα τα λιπίδια κατανέμονται στην χλωροφορμική φάση,



ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση [244] (Σχήμα 19).

Σχήμα 19. Διάγραμμα ροής της εκχύλισης λιπιδίων του BAL



Αντιδραστήρια

Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M. B.: 119.38, Labscan)

Μεθανόλη (CH_3OH , M. B.: 32.04, Labscan)

Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC**Αρχή της μεθόδου**

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων επιτυγχάνεται με τη διαφορετική μετατόπιση του κάθε λιπιδίου στην επιστρωμένη με πυριτικό οξύ πλάκα TLC, κυρίως ανάλογα με την πολικότητα των λιπιδίων και του μίγματος διαλυτών που χρησιμοποιείται.

Υλικά

- Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 20 cm x 20 cm και πάχους 250 μm (Silica gel 60A, K6, Whatman)
- Θάλαμοι χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm
- NaOH (M.B.: 40, Merck)
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M. B.: 119.38, Labscan)
- Μεθανόλη (MeOH, M. B.: 32.04, Labscan)
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M. B.: 60.053, Carlo Erba Reagenti)
- Πετρελαϊκός αιθέρας (Analytical Reagent, Labscan)
- Διαιθυλαιθέρας (M.B.: 74-12, Analytical Reagent, Riedel-de Haën)
- Πρότυπα λιπίδια του εμπορίου: PC, λυσο-PC, Sph, PE, PG, PS, PI
- TNS [[2-p-toluidinyl-naphthylene-6-sulfonate], M. B.: 351.5, Sigma]
- Trizma hydrochlorica, [[[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 157.6, Sigma] ή Trizma base, [[Tris(hydroxymethyl)aminomethane], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 121.1, Sigma]



Διαλύματα

Διάλυμα 1 N NaOH

4g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 50 mM Trizma hydrochlorica

Ζυγίζονται 788 mg trizma hydrochlorica και διαλύονται σε 100 ml νερού.

Διάλυμα 1 mM TNS

Ζυγίζονται 36 mg TNS και διαλύονται σε 100 ml διαλύματος 50 mM Tris-HCl ή σε 100 ml 50 mM Trizma base. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 με διάλυμα 1 N HCl αν χρησιμοποιήσουμε Trizma base ή με διάλυμα 1 N NaOH αν χρησιμοποιήσουμε Tris-HCl. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Πειραματική πορεία

Τοποθέτηση δειγμάτων

Χωρίζουμε τις πλάκες TLC σε παράλληλες λωρίδες πλάτους αναλόγου της ποσότητας των λιπιδίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε, συνήθως 1-2 cm. Στις ακραίες λωρίδες τοποθετούμε τα πρότυπα λιπίδια και στις υπόλοιπες τα δείγματα. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης σε ρεύμα N₂ τα λιπίδια διαλύονται σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (80 μl) και τοποθετούνται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur στην πλάκα TLC για να διαχωριστούν. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά για την ποσοτική παραλαβή των λιπιδίων.



Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων

Η πλάκα αναπτύσσεται σε κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (65:35:7, v/v). Αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρι το μέτωπο των διαλυτών να φτάσει ένα εκατοστό περίπου κάτω από την κορυφή της πλάκας. Στη συνέχεια στεγνώνουμε την πλάκα με θερμό αέρα για μερικά λεπτά.

Διαχωρισμός τάξεων φωσφολιπιδίων

Η πλάκα αναπτύσσεται διαδοχικά σε δύο συστήματα. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από έναν κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-πετρελαϊκού αιθέρα-μεθανόλης-οξικού οξέος σε αναλογία (50:30:15:10, v/v). Αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρι το μέτωπο των διαλυτών να φτάσει ένα εκατοστό περίπου κάτω από την κορυφή της πλάκας. Στη συνέχεια στεγνώνουμε την πλάκα με θερμό αέρα για μερικά λεπτά και την τοποθετούμε στο δεύτερο σύστημα ανάπτυξης. Αυτό αποτελείται από έναν κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού-οξικού οξέος σε αναλογία (65:35:5:10, v/v). Αφήνεται να αναπτυχθεί για 90 λεπτά περίπου. Στη συνέχεια στεγνώνουμε την πλάκα με θερμό αέρα για μερικά λεπτά.

Διαχωρισμός ουδετέρων λιπιδίων

Η ανάπτυξη της πλάκας γίνεται σε θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας-διαιθυλεθέρας-οξικό οξύ σε αναλογία 80:20:1 (v/v) και η πλάκα στεγνώνεται όπως πριν.

Εμφάνιση λιπιδίων

Τα λιπίδια μετά τον διαχωρισμό τους εμφανίζονται στο υπεριώδες φως. Η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα TNS και οι περιοχές των λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως. Η εμφάνισή τους ενίοτε γίνεται και σε ατμούς I_2 .



Εκχύλιση PC

Υλικά

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M.B.: 119.38, Analytical Reagent, Labscan)
- Μεθανόλη (CH_3OH , M.B.: 32.04, Analytical Reagent, Labscan)

Πειραματική πορεία

Η περιοχή της PC αποξύνεται από τη πλάκα TLC και εκχυλίζεται 2 φορές με 1.9 ml μίγματος CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (1:2:0.8, v/v) μετά από φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 min. Στα ενωμένα υπερκείμενα προστίθενται 1 ml CHCl_3 και 1 ml H_2O προς σχηματισμό δύο φάσεων. Αναδεύουμε πολύ καλά και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 500 x g για 10 min. Παραλαμβάνεται η κάτω (χλωροφορμική) φάση και επαναλαμβάνεται εκχύλιση στην υδατομεθανολική φάση με προσθήκη 1ml CHCl_3 . Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα που περιέχουν την PC ενώνονται και φυλάσσονται στους -20°C .



Διαχωρισμός και εκχύλιση των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M.B.: 119.38, Analytical Reagent, Labscan)
- Μεθανόλη (CH_3OH , M.B.: 32.04, Analytical Reagent, Labscan)
- Πετρελαϊκός αιθέρας (Analytical Reagent, Labscan)
- Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 20 cm x 20 cm και πάχους 250 μm (Silica gel 60A, K6, Whatman)
- Θάλαμοι χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm
- Διαιθυλαιθέρας (M.B.: 74-12, Analytical Reagent, Riedel-de Haën)
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M.B.: 60.053, Carlo Erba Reagenti)

Διαλύματα

Πρότυπο ισομοριακό μίγμα ουδετέρων λιπιδίων για TLC που περιέχει:

α) Χοληστερόλη, β) Ελαϊκό εστέρα χοληστερόλης, γ) Μεθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος, δ) Ελαϊκό οξύ, ε) Τριελαϊνη

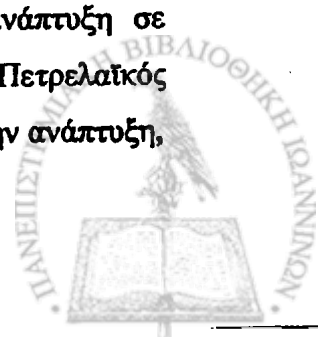
Πρότυπο ισομοριακό μίγμα ουδετέρων λιπιδίων για TLC που περιέχει:

α) Μονοπαλμιτίνη, β) Διπαλμιτίνη, γ) Τριπαλμιτίνη

Πειραματική πορεία

Στο εκχύλισμα των ουδετέρων λιπιδίων εξατμίζεται ο διαλύτης υπό N_2 και τα ουδέτερα λιπίδια αναδιαλύονται σε μικρό όγκο πετρελαϊκού αιθέρα (~100 μl).

Στη συνέχεια τοποθετούνται στην πλάκα TLC. Ακολουθεί ανάπτυξη σε κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει 100 ml μίγματος διαλυτών: Πετρελαϊκός αιθέρας-Διαιθυλεθέρας-Οξικό οξύ σε αναλογία (80:20:1), (v/v). Μετά την ανάπτυξη,



η πλάκα στεγνώνεται και ψεκάζεται με TNS. Αφού εντοπιστούν στο υπεριώδες φως, οι διάφορες τάξεις ουδετέρων λιπιδίων (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια, εστέρες χοληστερόλης), αποξύνονται από τη πλάκα TLC και εκχυλίζονται 2 φορές με 1.9 ml μίγματος CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (1:2:0.8 v/v) μετά από φυγοκέντρηση στα 1000 x g για 10 min. Στα ενωμένα υπερκείμενα προστίθενται 1 ml CHCl_3 και 1 ml H_2O προς σχηματισμό δύο φάσεων. Αναδεύουμε πολύ καλά και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 500 x g για 10 min. Παραλαμβάνεται η κάτω (χλωροφορμική) φάση και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση στην υδατομεθανολική φάση με προσθήκη 1 ml CHCl_3 . Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα που περιέχουν τις διάφορες τάξεις των ουδετέρων λιπιδίων ενώνονται και φυλάσσονται στους -20°C .

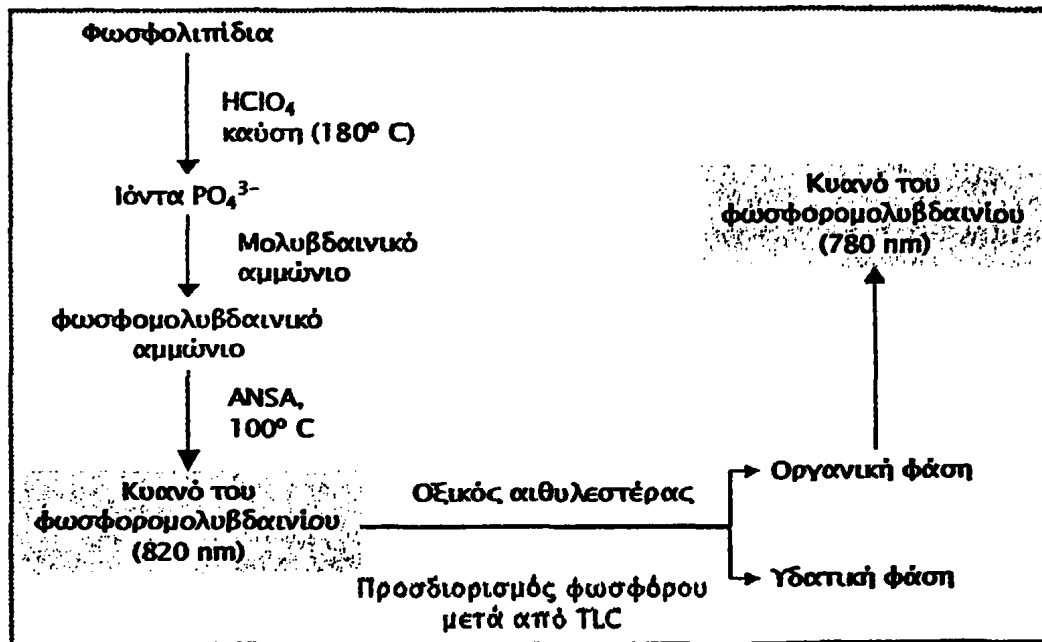
Προσδιορισμός λιπιδικού φωσφόρου

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου των φωσfolιπιδίων σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση με υπερχλωρικό οξύ. Στη συνέχεια, με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφορομολυβδαινικό, το οποίο τέλος ανάγεται από το αμινοναφθοσουλφονικό οξύ (ANSA) σε κυανού του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον [245]. Το κυανούν σύμπλοκο που παράγεται φωτομετρείται στα 820 nm (Σχήμα 20).



Σχήμα 20. Διάγραμμα ροής του προσδιορισμού φωσφόρου.



Αντιδραστήρια

- 1) HClO₄ 70 % (M. B.:100.46, Fluca)
 - 2) Μολυβδαινικό αμμώνιο ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, M. B.: 1235.86, Merck)
 - 3) NaHSO₃ (M. B.:104.06, Mallinckrodt)
 - 4) Na₂S₂O₅ (M. B.:190, Ferak)
 - 5) Na₂SO₃ (M. B.:126.04, Fluca)
 - 6) 1-αμινο-2-ναφθολο-4-σουλφονικό οξύ (ANSA, M. B.:239.2, Sigma)
 - 7) KH₂PO₄ (M. B.:136.09, Merck)
- ❖ Οξικός αιθυλεστέρας (CH₃OOC₂H₅, M. B.:88.11, Labscan)

Διαλύματα εργασίας

Πρότυπο διάλυμα φωσφορικού 5 μg /ml

Ποσότητα KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105°C επί μία ώρα και τοποθετείται σε ξηραντήρα. Στη συνέχεια ζυγίζονται 2.202 mg και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

0.4 % μολυβδαινικό αμμώνιο

Διαλύονται 2.125 g ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου σε νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C .

Διάλυμα αμινοναφθοσουλφονικού οξέος (ANSA)

Διαλύονται 30 g NaHSO_3 (ή 28.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 6 g Na_2SO_3 σε 250 ml νερό υπό ελαφρά θέρμανση και ανάδευση. Στο διάλυμα αυτό διαλύονται επίσης 0.5 g 1,2,4-αμινο-ναφθοσουλφονικό οξύ (ANSA). Αν σε 3 ώρες σχηματιστεί ίζημα το διάλυμα διηθείται και διατηρείται στους 4°C .

Αντιδραστήριο ANSA

Αναμιγνύονται 4 ml του διαλύματος ANSA με 6 ml απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

A) Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου λιπιδικού εκχυλίσματος

Πειραματική πορεία

Κατεργασία δείγματος

Ποσότητα εκχυλίσματος λιπιδίων περιεκτικότητας από 1-5 μg P μεταφέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα pyrex, όπου εξατμίζονται οι διαλύτες σε ρεύμα N_2 . Προστίθεται 0.5 ml 70 % HClO_4 και ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170 - 180°C για 5 ώρες. Μετά την καύση το δείγμα αφήνεται να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml H_2O .



Πρότυπα δείγματα

Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες rytex προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml (0-5 μg φωσφόρου) προτύπου διαλύματος φωσφόρου 5 μg/ml και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO₄.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου. Με συνεχή ανάδευση προστίθεται 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA και στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται σε υδρόλουτρο στους 100 °C για 15 min. Αφού οι σωλήνες ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου, το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί φωτομετρείται στα 820 nm σε γυάλινη κυψελίδα.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Σχηματίζεται γραφική παράσταση των απορροφήσεων των προτύπων διαλυμάτων συναρτήσει της ποσότητας φωσφόρου που περιέχουν σε μg. Χαράσσεται η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα σημεία και υπολογίζεται η εξίσωσή της που είναι της μορφής $y = ax + \beta$.

Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα αυτών σε φωσφόρο. Τέλος, τα αποτελέσματα ανάγονται σε μg P/ml δείγματος BAL.



B) Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC

Πειραματική πορεία

Πρότυπα δείγματα

Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 ml (0-5 μg φωσφόρου) προτύπου διαλύματος φωσφόρου 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO_4 .

Προετοιμασία δειγμάτων

Περιοχές του πυριτικού οξέος της πλάκας που περιέχουν φωσφολιπίδια, καθώς και τμήματα αναλόγου μεγέθους που χρησιμοποιούνται ως τυφλά δείγματα, αποξύνονται και μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες pyrex. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml διαλύματος 70 % HClO_4

Επεξεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170-180 °C για 5 ώρες. Μετά την καύση τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml H_2O . Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου με συνεχή ανάδευση 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA και θέρμανση σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστίθενται 5 ml οξικού αιθυλεστέρα. Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται να ηρεμήσουν. Διαχωρίζονται δύο φάσεις με το χρώμα να έχει εκχυλιστεί στην οργανική φάση του οξικού μεθυλεστέρα (ανώτερη). Παραλαμβάνεται προσεκτικά με πιπέτα pasteur σε γυάλινη κυψελίδα και φωτομετρείται στη συνέχεια στα 780 nm.



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται όπως και πριν. Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των περιοχών του πυριτικού οξέος της πλάκας σε μg φωσφόρου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων.

Παρατηρήσεις

Όλα τα γυάλινα σκεύη πλένονται πριν χρησιμοποιηθούν με χρωμοθειικό οξύ ή με 1 % νιτρικό οξύ. Αυτό γίνεται διότι τα απορρυπαντικά περιέχουν φωσφορικά άλατα και αφήνουν στα τοιχώματα των γυάλινων σκευών ποσότητα φωσφόρου ικανή πολλές φορές να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα



**Βιολογικός προσδιορισμός του PAF σε BAL με συσσώρευση
πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού**

Αντιδραστήρια

- EGTA (Ethylene glycol bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid, MB.: 380.4, Serva)
- EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, MB: 372.2, Sigma)
- Ζελατίνη (Merck)
- KCl (MB: 74.56, Ferak)
- NaCl (MB:58.44, Merck)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (MB: 203.31, Fluka)
- $NaHCO_3$ (MB: 84.01, Merck)
- Γλυκόζη (MB: 136.09, Fluka)
- Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη (Egicalm)
- Οξαλικο αμμώνιο ($(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, MB.:142.11, Mallinckrodt)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (MB:147, Sigma)
- Φωσφοκρεατίνη ($C_4H_8N_3O_5P \cdot Na_2$ (N-[imino (phosphonoamino) methyl]-N-methylglycine) ή CP, MB: 255.1, Sigma)
- Κινάση της φωσφοκρεατίνης (creatine phosphokinase ή CPK, 17500 units, 310 units/mg, Sigma)
- PAF (O 1270, C_{16} , MB: 523.7, O 1355, C_{18} , MB: 551.8, Bachem)



Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού

Διαλύματα

Διάλυμα 0.2 M EDTA σε φυσιολογικό ορρό, που χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό

7.4440 g EDTA·(Na) και 0.9 g NaCl διαλύονται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 0.2 M EGTA

7.6080 g EGTA διαλύονται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Διάλυμα 10 % ζελατίνης

5 g ζελατίνης διαλύονται σε περίπου 40 ml H₂O. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια με θέρμανση μέχρι να διαλυθεί η ζελατίνη πλήρως. Αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με H₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης των αιμοπεταλίων, pH 6.5

195 mg KCl, 212.5 mg MgCl₂·6H₂O, 8 g NaCl, 1.0150 g NaHCO₃, 1 ml διαλύματος 0.2 M EDTA, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος ζελατίνης 10 % διαλύονται σε 1 lt H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 6.5 με μικρή ποσότητα HCl. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 80 ml και διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 0.1 M ακετυλοσαλικυλικού

16.2 mg ακετυλοσαλικυλικού διαλύονται σε 500 μl φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα 1 % οξαλικού αμμωνίου

1g οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

Διάλυμα 0.2 M φωσφοκρεατίνης (CP)

Διαλύονται 134.4 mg της ουσίας σε 2 ml φυσιολογικό ορρό. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 200 μl, τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και διατηρείται στους -20 °C.



Διάλυμα κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CPK) 10 units/μl

58 mg (17500 units) CPK διαλύονται σε 1.75 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 40 μl, τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και διατηρείται στους -20°C .

Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)**Χειρισμός του πειραματόζωου**

Το κουνέλι τοποθετείται σε ειδική παγίδα με τέτοιο τρόπο ώστε να προεξέχει το κεφάλι του. Στη συνέχεια, το τρίχωμα της περιοχής του αυτιού από όπου πρόκειται να γίνει η λήψη του αίματος, ξυρίζεται με κοινό ξυράφι. Η περιοχή αυτή μετά καθαρίζεται με οινόπνευμα. Τέλος, χρησιμοποιείται ξυλόλιο με κινήσεις τριβής πάνω σε αυτή την περιοχή, το οποίο αυξάνει την αιμάτωση και δρα και ως τοπικό αναισθητικό.

Συλλογή του αίματος

Από την κεντρική αρτηρία του αυτιού των κουνελιών συλλέγονται 40 ml αίματος με βελόνες 21G, σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml, ο οποίος περιέχει 1 ml 0.2 M EDTA ως αντιπηκτικό. Το αίμα αναδεύεται ήπια. Μετά το πέρας της λήψης το αυτί του κουνελιού πρίζεται ώστε να σταματήσει η ροή του αίματος και στη συνέχεια εκπλένεται με αιθυλική αλκοόλη και σαπυνοδιάλυμα. Τέλος, σκουπίζεται προσεκτικά. Από κάθε αιμοληψία παραλαμβάνονται τελικά περίπου 3-10 ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων συγκέντρωσης 2.5×10^9 αιμοπετάλια/ml.



1^η φυγοκέντρηση: παραλαβή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP)

Παραλαμβάνεται το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα με φυγοκέντρηση του αίματος σε 375 x g για 20 min, σε φυγόκεντρο χωρίς φρένο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπερκείμενο [πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP)], μεταφέρεται με πλαστική αυτόματη πιπέτα σε καθαρό πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml.

2^η φυγοκέντρηση: παραλαβή ιζήματος αιμοπεταλίων

Το PRP φυγοκεντρείται σε 1400 x g για 15 min. Το υπερκείμενο [πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια, (PPP)] αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται προσεκτικά σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, pH 6.5, με πλαστική αυτόματη πιπέτα. Στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 40 ml με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, pH 6.5. Στα 40 ml του εναιωρήματος προστίθενται 40 μl διαλύματος 0.1 M ασπιρίνης για αναστολή της κυκλοξυγονάσης και αφήνεται για 15 min.

Μέτρηση των αιμοπεταλίων

Κατά τη διάρκεια της επώασης του εναιωρήματος με το ακετυλοσαλικυλικό γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων: 100 μl εναιωρήματος αιμοπεταλίων προστίθενται σε 1.9 ml διαλύματος 1 % οξαλικού αμμωνίου (αραίωση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια με αυτόματη πιπέτα. 10 μl δείγματος τοποθετούνται με πιπέτα και στις δύο πλευρές του αιματοκυτομέτρου (Newbauer), πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί γυάλινη καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 30 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με κοινό οπτικό μικροσκόπιο (Olympus), του οποίου το σύστημα Abbé βρίσκεται στην κατώτερη θέση του, χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης x 40. Τα αιμοπετάλια εμφανίζονται



σαν μικρά διαθλαστικά σωμάτια που διακρίνονται εύκολα. Γίνεται μέτρηση των αιμοπεταλίων 5 τετραγώνων (80 μικρά) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτόμετρου. Το συνολικό άθροισμα (Σ_A) αν πολλαπλασιαστεί επί 1000 δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος. Στη συνέχεια γίνεται υπολογισμός με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$$V = \sum_A \frac{0.04}{2.5}$$

Το αποτέλεσμα της παραπάνω εξίσωσης αντιστοιχεί στον όγκο (V σε ml) που πρέπει να επαναιωρηθούν τα αιμοπετάλια, έτσι ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 2.5×10^9 αιμοπετάλια/ml.

3^η φυγοκέντρηση: ρύθμιση συγκέντρωσης αιμοπεταλίων

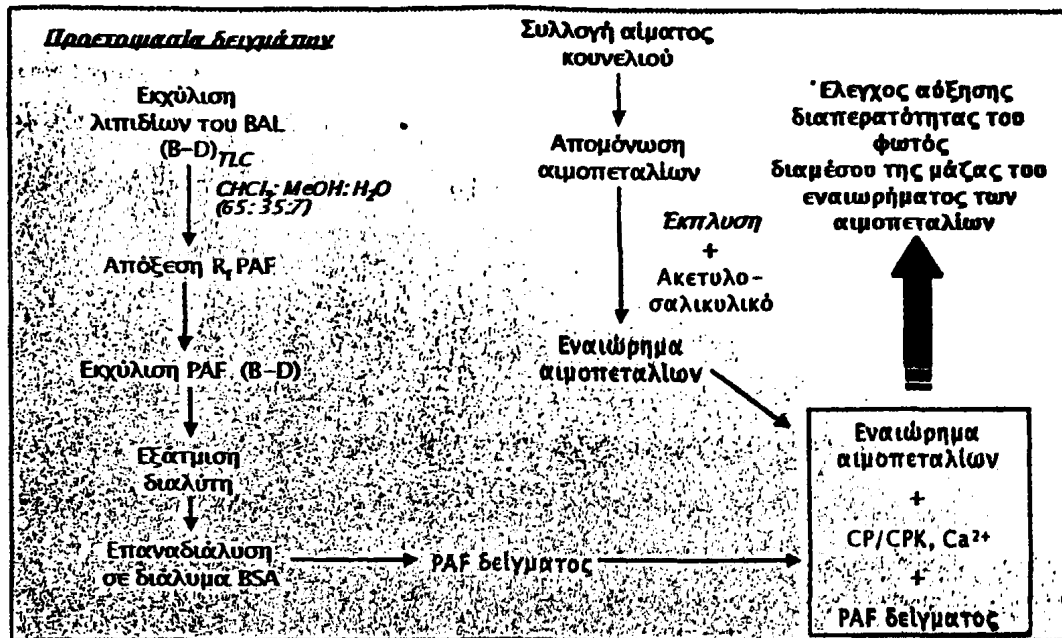
Τα αιμοπετάλια απομονώνονται με φυγοκέντρηση σε $1400 \times g$ για 15 min. Το υπερκείμενο αποχύνεται και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται στον υπολογισμένο από την παραπάνω εξίσωση όγκο ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης με pH 6.5.

Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PAF των δειγμάτων επιτυγχάνεται με τη μέτρηση του βαθμού συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων PAF. Η συσσώρευση έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του φωτός διαμέσου της μάζας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετριέται σε ειδικό νεφελόμετρο [246] (Σχήμα 21).





Σχήμα 21. Σχηματικό διάγραμμα του βιολογικού προσδιορισμού του PAF σε BAL με συσσώρευση πλωμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Τα αιμοπετάλια που χρησιμοποιούνται κατεργάζονται με ασπιρίνη, ώστε να αναστέλλεται η παραγωγή και έκκριση του TXA_2 , καθώς και με σύστημα CP/CPK, ώστε να απομακρύνεται το εκκρινόμενο κατά την ενεργοποίηση ADP, το οποίο επίσης προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Υλικά-αντιδραστήρια

Βλ. σελ. 105



Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode με ζελατίνη και ασβέστιο, 2.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 137 mM NaCl, 7.6 mM Tris-HCl, 1.3 mM CaCl₂·2H₂O, 1 g/lt γλυκόζη, 0.25 % ζελατίνη και pH 7.4

Διαλύονται 195 mg KCl, 212.5 mg MgCl₂·6H₂O, 8g NaCl, 1.21 g Tris-HCl, 191 mg CaCl₂·2H₂O, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος 10 % ζελατίνης, σε νερό τελικού όγκου 1 lt. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 40 ml και διατηρείται στους -20 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης αμινοπεταλίων, pH 7.4

Σε 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tyrode με ζελατίνη και ασβέστιο, pH 7.4, προστίθενται 200 μl διαλύματος 0.2 M CP (τελική συγκέντρωση 1 mM) και 40 μl διαλύματος CPK 10 units/μl (τελική συγκέντρωση 10 units/ml). Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA

250 mg BSA διαλύονται σε 100 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Πρότυπα διαλύματα PAF

1^ο διάλυμα PAF:

Διαλύονται 10 mg PAF σε 10 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1). Προκύπτει διάλυμα 1 mg/ml, ή 1.91×10^{-3} M PAF (C₁₆) και 1.8×10^{-3} M PAF (C₁₈). Γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου σε 2 δείγματα των 30 μl.

A' αραιώση PAF:

Αραιώνονται 250 μl του προηγούμενου διαλύματος σε 25 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) σε ογκομετρική φιάλη. Προκύπτει διάλυμα 10 μg/ml ή 1.91×10^{-5} M PAF (C₁₆) και 1.8×10^{-5} M PAF (C₁₈). Γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου σε 2 δείγματα των 4 ml.



B' αραιώση PAF:

Αραιώνονται 100 μl του προηγούμενου διαλύματος (1 μg PAF) σε 10 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα. Προκύπτει διάλυμα 0.1 ng/μl ή 100 pg/μl.

Διάλυμα εργασίας PAF 5 και 10 pg/μl:

Από το προηγούμενο διάλυμα παραλαμβάνονται 50 και 100 μl αντίστοιχα, εξατμίζονται προσεκτικά μέχρι ξηρού και αναδιαλύονται σε 1 ml BSA 2.5 mg/ml. Για να διαλυθεί επαρκώς ο PAF γίνεται επώαση του μίγματος για τουλάχιστον 15 min στους 37 °C. Στη συνέχεια το διάλυμα διαμοιράζεται σε eppendorf και φυλάσσεται στους -20 °C.

Παρατηρήσεις

Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να πλυθούν με την ακόλουθη σειρά: άλκαλι, σαπούνι, νερό, νιτρικό οξύ, ξανά νερό και τέλος με απεσταγμένο νερό. Στα πώματα τοποθετείται αλουμινόχαρτο για την αποφυγή ρύπανσής τους με PAF.



Πειραματική πορεία

Επεξεργασία δειγμάτων

Εκχύλιση των λιπιδίων του BAL

Ποσότητα δείγματος BAL ίση με 9 ml εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer με προσθήκη 10 ml μεθανόλης και 10 ml χλωροφορμίου σε γυάλινο σωλήνα rytex. Αφού γίνει ανάδευση για 1 min το μίγμα φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 10 min, έτσι ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση και η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη επιπλέον 10 ml χλωροφορμίου στην υδατομεθανολική φάση. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα ενώνονται και εξατμίζονται σε ρεύμα N₂.

TLC

Το λιπιδικό υπόλειμμα που βρίσκεται στον γυάλινο σωλήνα επαναδιαλύεται δύο ή τρεις φορές σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (100 μl) και τοποθετείται σε πλάκα TLC ποσοτικά (Silica gel 60, 20 x 20 cm, Merck). Στην πλάκα τοποθετούνται, επίσης, πρότυπα διαλύματα λιπιδίων: PC, λυσο-PC και Sph. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (65:35:7, v/v). Αφήνεται για ανάπτυξη για 50-60 min περίπου. Αφού εξατμιστούν οι διαλύτες από την πλάκα, αυτή ψεκάζεται με διάλυμα TNS (βλ. διαλύματα, σελ. 95) και οι περιοχές των λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως.



Εκχύλιση του PAF

Η περιοχή του λιπιδίου του δείγματος, που αντιστοιχεί στο R_f του προτύπου διαλύματος PAF και μεταξύ των R_f της σφιγγομυελίνης και της λυσο-PC, αποξύνεται, τοποθετείται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και το πυριτικό οξύ εκχυλίζεται με 1.9 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (1:2:0.8), (v/v). Γίνεται ανάδευση για 1 min, φυγοκέντρωση σε 3000 στροφές για 10 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό γυάλινο σωλήνα. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά. Τα εκχυλίσματα ενώνονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα, στον οποίο προστίθενται 1 ml χλωροφορμίου και 1 ml νερού. Το διφασικό σύστημα που δημιουργείται αναδεύεται για 1 min και φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 10 min. Η οργανική φάση παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέτα *pasteur* και στην υδατομεθανολική φάση προστίθεται επιπλέον 1 ml χλωροφορμίου. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση, φυγοκέντρωση και συλλογή της χλωροφορμικής φάσης. Οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις περιέχουν τον PAF. Ο διαλύτης εξατμίζεται σχολαστικά σε ρεύμα N_2 . Τέλος, ο PAF διαλυτοποιείται σε μικρή ποσότητα (50-100 μ l) διαλύματος 2.5 mg BSA /ml στους 37 °C για 15 min.

Ρύθμιση του συσσωρευόμετρου

Η θερμοκρασία της κυψελίδας του οργάνου (CHRONO-LOG) ρυθμίζεται στους 37 °C. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα αιμοπετάλια διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ρυθμίσεις οργάνου

Ρυθμίζουμε το 90 % της κλίμακας του καταγραφικού, προσθέτοντας σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και το κουμπί με την ένδειξη PPP (platelet poor plasma) ρυθμίζεται έτσι ώστε η γραφίδα του καταγραφικού να δείχνει το 90% της κλίμακας.



Ρυθμίζουμε το 10 % της κλίμακας του καταγραφικού προσθέτοντας σε άλλη γυάλινη κυψελίδα, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4 και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και το κουμπί με την ένδειξη PRP (platelet rich plasma) ρυθμίζεται έτσι ώστε η γραφίδα του καταγραφικού να δείχνει το 10 % της κλίμακας.

Πρότυπη καμπύλη/Προσδιορισμός του EC_{50}

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προστίθενται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 1 min. Στη συνέχεια προστίθενται αυξανόμενοι όγκοι (μερικά μl) των προτύπων διαλυμάτων PAF (C16:0) και καταγράφονται οι συσσωρεύσεις. Αν το λιπίδιο είναι διαλυμένο σε 60% αιθανόλη δεν μπορούμε να υπερβούμε τα 10 μl. Αν είναι διαλυμένο σε BSA δεν υπάρχει περιορισμός όγκου αρκεί να μη μεταβάλλεται σημαντικά ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Δοκιμάζονται ποσότητες προτύπου διαλύματος PAF από 10 pg ως 50 pg ώστε να βρεθεί η περιοχή γραμμικής απόκρισης η οποία ποικίλει ανάλογα με το πειραματόζωο. Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέσο της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς είναι η ημίσεια αποτελεσματική συγκέντρωση (effective concentration, EC_{50}). Ρυθμίζουμε ώστε οι τιμές να βρίσκονται γύρω στο EC_{50} για να είναι αξιόπιστες.

Μέτρηση των δειγμάτων

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προσθέτονται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο. Στη συνέχεια προστίθενται διάφοροι όγκοι των δειγμάτων και καταγράφονται οι συσσωρεύσεις.



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Σχεδιάζεται γράφημα το οποίο περιέχει τις συσσωρεύσεις (ύψος καμπύλης συσσωρεύσεως σε mm) συναρτήσεως των ποσοτήτων PAF (pg). Αυτή είναι η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει σιγμοειδή μορφή. Αξιόπιστοι υπολογισμοί γίνονται μόνο όταν οι συσσωρεύσεις που προκαλούν τα δείγματα αντιστοιχούν στη γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης. Τέλος, με βάση την πρότυπη καμπύλη γίνεται ο υπολογισμός των περιεκτικότητων των δειγμάτων BAL σε PAF και η αναγωγή των αποτελεσμάτων σε pg PAF/9 ml δείγματος BAL.

Προσδιορισμός Ολικών Εστέρων στο χλωροφορμικό εκχύλισμα του BAL

Αρχή της μεθόδου

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός εστέρων σε λιπίδια στηρίζεται στην υδροξυαμινόλυση, κατά την οποία ένας εστέρας αντιδρά με την αλκαλική υδροξυλαμίνη προς σχηματισμό ενός υδροξυαμικού οξέος. Το τελευταίο σχηματίζει ένα μωβ χηλικό σύμπλεγμα με το σίδηρο παρουσία υπερχλωρικού σιδήρου [247].

Υλικά –Αντιδραστήρια

- Υπερχλωρικός σίδηρος, $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$
- Υπερχλωρικό οξύ, HClO_4 70% (Analytical Reagent, Riedel de Haen)
- Υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, HONH_2HCl
- Καυστικό νάτριο, NaOH (MB=40, Analytical Reagent, Fluka)
- Απόλυτη αιθανόλη, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (MB:50, Analytical Reagent, Labscan)
- Χλωροφόρμιο, (CHCl_3 , MB: 119.38, Analytical Reagent, Labscan)
- Πρότυπο τρυπαλιμίνης, (MB: 807.3, Fluka)



Διαλύματα

Πυκνό διάλυμα $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$, 0.1441M

5g $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ διαλύονται σε 10ml HClO_4 70%. Προσθέτουμε 10ml απεσταγμένου νερού μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται ο όγκός με ψυχρή απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στο ψυγείο και το διάλυμα παραμένει σταθερό για μερικούς μήνες.

Διάλυμα εργασίας $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$

Σε 1ml του προηγούμενου διαλύματος προστιθεται 0.7ml HClO_4 70% και το μίγμα αραιώνεται με απόλυτη αιθανόλη στα 25ml. Το διάλυμα παρασκευάζεται εκ νέου κάθε φορά.

Διάλυμα 4% υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.575N)-Διάλυμα A

2g HONH_2HCl διαλύονται σε 2.5ml απεσταγμένου νερού και αραιώνεται με απόλυτη αιθανόλη μέχρι όγκου 50ml. Φυλάσσεται στο ψυγείο σε πλαστικό σκεύος για λίγες μέρες.

Αλκοολικό διάλυμα NaOH 2N – Διάλυμα B

4g NaOH διαλύονται σε 5ml νερό, παγώνουμε, και το μίγμα αραιώνεται στα 50ml με απόλυτη αιθανόλη. Φυλάσσεται στο ψυγείο.

Αλκαλικό διάλυμα υδροξυλαμίνης

Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι από τα διαλύματα A και B. Το μίγμα διηθείται ή φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το διαυγές υπερκείμενο. Παρασκευάζεται εκ νέου πριν από κάθε χρήση.

Πρότυπο διάλυμα τριταλιμίνης (πυκνό)

295 mg τριταλιμίνης διαλύονται σε λίγο χλωροφόρμιο και αραιώνουμε στα 10ml με CHCl_3 .

Διάλυμα εργασίας τριταλιμίνης, 1 mg/εστέρος/ml

1ml πυκνού διαλύματος τριταλιμίνης αραιώνονται στα 100ml με CHCl_3 .



Πειραματική πορεία

Πρότυπη καμπύλη

Προστίθενται 0, 50, 100 και 150, 200, 250 μl προτύπου διαλύματος τριπαλμιτίνης (0, 0.1, 1.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μg τριπαλμιτίνης) σε 7 γυάλινους σωλήνες και στη συνέχεια εξατμίζουμε μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL (~10 mgP/ml BAL) εκχυλίζεται κατά Bligh- Dyer φορές. Τα ενωμένα χλωροφορμικά εκχυλίσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Σε κάθε σωλήνα (πρότυπα και δείγματα) προστίθενται 1 ml αλκαλικό διάλυμα υδροξυλαμίνης. Οι σωλήνες αναδεύονται σε vortex και ακολουθεί θέρμανση στους 60-65°C και ψύξη. Ακολουθεί προσθήκη 3ml από το διάλυμα εργασίας $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$. Μετά από 30 min γίνεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων στα 530 nm σε γυάλινη κυψελίδα.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε χοληστερόλη κατασκευάζεται γράφημα της βέλτιστης ευθείας, της μορφής $y = ax + \beta$ (απορρόφηση συναρτήσει μg τριπαλμιτίνης), με βάση την οποία υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση σε τριπαλμιτίνη του δείγματός μας. Τέλος, γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης της χοληστερόλης ανά 10 ml δείγματος BAL, ανά μg πρωτεΐνης και ανά γP.



Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης στο Χλωροφορμικό εκχύλισμα του BAL

Αρχή της μεθόδου

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης σε λιπίδια στηρίζεται αρχικά στη διάσπαση των εστέρων της χοληστερόλης με την προσθήκη οξικού οξέος και στη συνέχεια στο σχηματισμό ροζ συμπλόκου της χοληστερόλης με τον χλωριούχο σίδηρο, το οποίο σύμπλοκο και φωτομετρούμε. [248]

Υλικά- Αντιδραστήρια

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, [Iron III Chloride Hexahydrate (MB= 270.3, Merck)
- H_3PO_4 85%
- CH_3COOH , acetic acid glacial, (MB=54, Labscan)
- $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{OH}$, isopropyl alcohol, (MB=83, Riedel De Haen)
- π. H_2SO_4
- Χοληστερόλη

Διαλύματα

Πυκνό διάλυμα χλωριούχου σιδήρου

2.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται με προσοχή σε H_3PO_4 85%, το διάλυμα ψύχεται και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml.

Διάλυμα εργασίας χλωριούχου σιδήρου

4ml πυκνού διαλύματος χλωριούχου σιδήρου αραιώνεται με π. H_2SO_4 , το διάλυμα ψύχεται και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50ml.

Πυκνό διάλυμα προτύπου χοληστερόλης

400mg χοληστερόλης διαλύονται σε 100ml ισοπροπανόλης



Πρότυπο χοληστερόλης- διάλυμα εργασίας

1ml πυκνού διαλύματος προτύπου αραιώνεται με ισοπροπανόλη μέχρι τα 20ml.

Πειραματική πορεία

Πρότυπη καμπύλη

Προστίθενται 0, 25, 50, 75, 100 και 150 μl προτύπου διαλύματος χοληστερόλης 0.2μg/μl (5-30 μg χοληστερόλης αντίστοιχα) σε 6 γυάλινους σωλήνες και στη συνέχεια εξατμίζουμε μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL (~10γ P/ml BAL) εκχυλίζεται 2 φορές κατά Bligh-Dyer. Τα ενωμένα χλωροφορμικά εκχυλίσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Σε κάθε σωλήνα (πρότυπα και δείγματα) προστίθενται 1.5 ml CH_3COOH . Οι σωλήνες αναδεύονται σε vortex και στη συνέχεια προστίθεται 1ml διαλύματος εργασίας χλωριούχου σιδήρου και ακολουθεί ανάδευση και ψύξη. Μετά από 10 min γίνεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων και των προτύπων στα 550 nm σε γυάλινη κυψελίδα (σχηματισμός ροζ χρώματος).



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

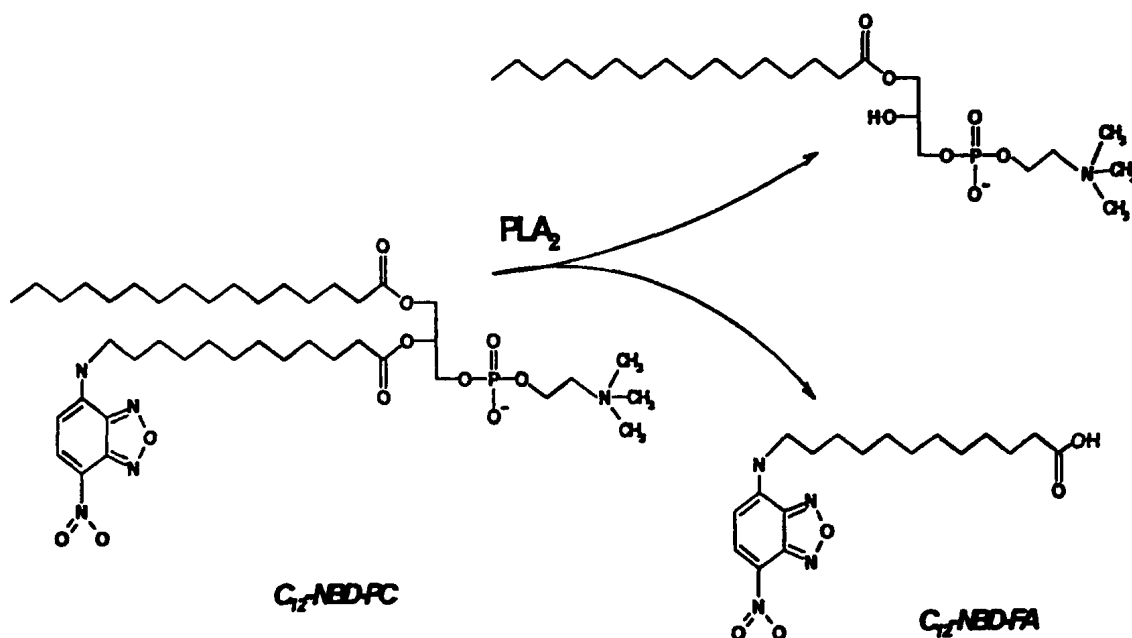
Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε χοληστερόλη κατασκευάζεται γράφημα της βέλτιστης ευθείας, της μορφής $y = ax + \beta$ (απορρόφηση συναρτήσει μg χοληστερόλης), με βάση την οποία υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση σε χοληστερόλη του δείγματός μας. Τέλος, γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης της χοληστερόλης ανά ml δείγματος BAL και ανά γP .



Προσδιορισμός της ενεργότητας της PLA_2 με τη φθορισμομετρική μέθοδο

Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PLA_2 με τη φθορισμομετρική μέθοδο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία στη θέση sn-2 του μορίου της είναι εστεροποιημένη με μεγάλης αλυσίδας λιπαρό οξύ, το οποίο στην άκρη του έχει φθορίζουσα ομάδα (C_{12} -NBD-PC). Η φθορίζουσα C_{12} -NBD-φωσφατιδυλοχολίνη όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα και διεγερθεί στα 475 nm φθορίζει ελάχιστα στα 535 nm. Υδρόλυση αυτής από μια φωσφολιπάση A_2 (PLA_2) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του C_{12} -NBD-λιπαρού οξέος (Σχήμα 22), το οποίο σε υδατικό διάλυμα φθορίζει 50 φορές περισσότερο από το υπόστρωμα χωρίς καμία μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής.



Σχήμα 22: Αντίδραση υδρόλυσης της C_{12} -NBD-PC από την PLA_2



Υλικά-Αντιδραστήρια και Διαλύματα

- Φασματοφθορισμόμετρο Perkin-Elmer LS-3 με λάμπα ξένου και φωτοπολλαπλασιαστή RCA 931
- Κυψελίδα φθορισμού (Hellma cuvette 104F-OS, 10 mm light path, Windaus Labortechnik GMBH & Co., Mullheim/Baden)
- C₆-NBD-PC, (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810130, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) / ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, P-3412, Sigma)
- C₆-NBD-FA, (6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoic acid; σε στερεή κατάσταση, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) / ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, N-5013, Sigma)
- C₁₂-NBD-PC, (1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810131, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA))
- C₁₂-NBD-FA, σε στερεή κατάσταση, (12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid; 790440, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA)
- Αιθανόλη (MB: 46, Labscan)
- Tris-HCl, ([[Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride], C₄H₁₁NO₃, MB: 157.6, Sigma)
- EDTA (ethylenediamino-tetraacetic acid; C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O, MB: 372.2, Sigma)
- CaCl₂, (MB: 110.99, Sigma)
- Λουτρό υπερήχων, (Fritsch Laborette, type 17.202, Germany)



Βασικά διαλύματα

Διάλυμα 0.5 mM C₆-NBD-PC σε αιθανόλη

Ποσότητα ίση με 2 mg C₆-NBD-PC διαλύεται σε 5.182 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε ποσότητες του 1 ml και διατηρείται στους -20 °C.

Πυκνό διάλυμα 1 mM C₆-NBD-FA σε αιθανόλη

Ποσότητα ίση με 2 mg C₆-NBD-PC διαλύεται σε 6.796 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 0.1 mM C₆-NBD-FA σε αιθανόλη

100 μl του πυκνού διαλύματος 1 mM C₆-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 0.5 mM C₁₂-NBD-PC σε αιθανόλη

Ποσότητα ίση με 1 mg C₁₂-NBD-PC διαλύεται σε 2.333 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε δύο σωληνάκια και διατηρείται στους -20 °C.

Πυκνό διάλυμα 1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

Ποσότητα ίση με 1 mg C₁₂-NBD-FA διαλύεται σε 2.642 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα που προκύπτει είναι περιεκτικότητας 3.78 % και διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 0.1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

100 μl του πυκνού διαλύματος 1 mM C₁₂-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα 10 % EDTA, pH 7.4

Ζυγίζονται 10 g EDTA και προστίθενται σε 80 ml νερού. Το ελαιώδες τοποθετείται προς μαγνητική ανάδευση με ταυτόχρονη ρύθμιση του pH. Το EDTA αρχικά δεν διαλύεται, όμως όταν το pH ρυθμιστεί στο 7.4 τότε διαλύεται. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

Διάλυμα 0.5 M CaCl₂ pH 7.4

Ζυγίζονται 2.7747 g CaCl₂ και διαλύονται σε 50 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.



Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4

Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε 80 ml νερού και προστίθενται 2.941 ml διαλύματος 0.34 M ή 10 % EDTA pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -4°C .

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4

Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε 80 ml νερού και προστίθενται 400 μl διαλύματος 0.5 M CaCl_2 pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -4°C .

Διάλυμα BSA 2 mg/ml

Ζυγίζονται 20 mg BSA και διαλύονται σε 10 ml νερού. Το διάλυμα αφήνεται αναδευεται για μερικές ώρες μέχρι να διαλυθεί τελείως η BSA. Φυλάσσεται στους -20°C .

Διάλυμα BSA 2.5 mg/ml

Ζυγίζονται 25 mg BSA και διαλύονται σε 10 ml νερού. Το διάλυμα αναδεύεται για μερικές ώρες μέχρι να διαλυθεί τελείως η BSA. Φυλάσσεται στους -20°C .

Πειραματική πορεία**Προετοιμασία του διαλύματος με το υπόστρωμα**

Η συγκέντρωση του υποστρώματος ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι μεγαλύτερη της κρίσιμης μυκτολιακής συγκέντρωσης. Τα κυστίδια του υποστρώματος δημιουργούνται με την προσθήκη 10 μl του αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C_{12} -NBD-PC σε 940 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4 [249] σε κυψελίδα φθορισμού του 1 ml. Σε πειράματα, στα οποία δεν είναι επιθυμητή η παρουσία ιόντων Ca^{2+} , χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4. Η κυψελίδα πωματίζεται με το ειδικό πόμα και αναποδογυρίζεται 3 με 4 φορές για να αναδευτεί. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φθορισμόμετρο, το διάλυμα διεγείρεται στα 475 nm και μετρείται η ένταση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται στα 535 nm. Η τιμή αυτή του φθορισμού αφαιρείται στη συνέχεια από τις υπόλοιπες μετρήσεις.



Έναρξη της αντίδρασης

Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 μl της πηγής του ενζύμου (παγκρεατική PLA_2 του εμπορίου ή 100 μl BAL) στο προηγούμενο διάλυμα. Ακολουθεί αμέσως ανάδευση και συνεχής καταγραφή της μεταβολής του φθορισμού του διαλύματος.

Πρότυπη καμπύλη

Σε μια σειρά από κυψελίδες που περιέχουν 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 10 μl αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ προστίθενται 0, 2, 4, 6, 8, και 10 μl (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 nmol) του προτύπου αιθανολικού διαλύματος 0.1 mM $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA}$. Κάθε δείγμα πρέπει να τοποθετείται εις διπλούν. Μετρείται ο φθορισμός τους και από αυτόν αφαιρείται η τιμή του φθορισμού που αντιστοιχεί στο διάλυμα που περιέχει μόνο την $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$. Χαράσσεται πρότυπη καμπύλη της έντασης του φθορισμού συναρτήσει της ποσότητας του $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA}$ σε nmol ανά ml.

Χρήση εσωτερικού προτύπου

Στην περίπτωση που κάποια από τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης δύνανται να επηρεάσουν το φθορισμό του προϊόντος, μπορεί να γίνει χρήση εσωτερικού προτύπου αντί για πρότυπη καμπύλη στο τέλος της παρακολούθησης της αντίδρασης.

Έτσι, στο τέλος της καταγραφής της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης προστίθενται 5 μl του προτύπου αιθανολικού διαλύματος 0.1 mM $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA}$. Η προσθήκη ίδιας ποσότητας προτύπου επαναλαμβάνεται για δεύτερη και τρίτη φορά. Η μέση τιμή της αύξησης του φθορισμού που θα παρατηρηθεί μετά τις δύο διαδοχικές προσθήκες αντιστοιχεί στο φθορισμό του 0.5 nmol του $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA}$.



Έκφραση των αποτελεσμάτων

Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας μεταβολής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου, που παρατηρείται από 30min περίπου μέχρι 3 ώρες μετά την προσθήκη της πηγής του ενζύμου. Βάσει της πρότυπης καμπύλης ή του εσωτερικού προτύπου ο φθορισμός μετατρέπεται σε nmol προϊόντος της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται για το BAL ως nmol C₁₂-NBD-FA/ώρα/ml BAL ή ως nmol C₁₂-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης του BAL.

Η ενεργότητα της PLA₂ εκφρασμένη σε nmole FA/h/ml υπολογίζεται από τον τύπο:

$$S = \frac{6 \times a \times 10^4}{F \times V}$$

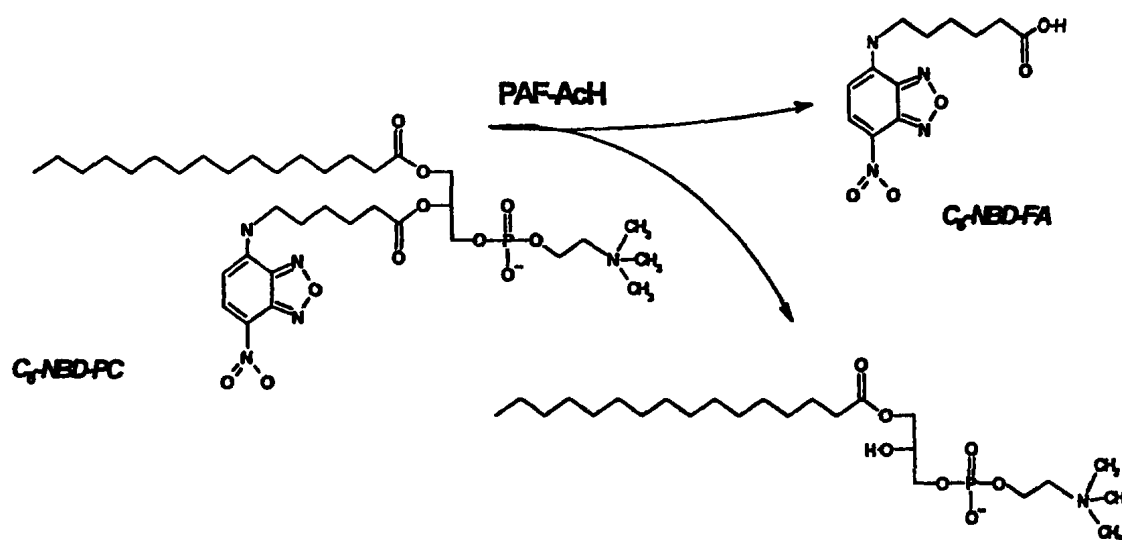
όπου:

S,	Ενεργότητα PLA₂ (nmol FA/h/ml BAL)
a,	Κλίση της ευθείας
F,	Μέση τιμή φθορισμού 1 nmol NBD-FA στο μίγμα αντίδρασης
V,	Όγκος δείγματος (μl)



Προσδιορισμός ενεργότητας PAF-AcH με τη φθορισμομετρική μέθοδο

Ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στον φθορισμομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A₂ με τη μόνη διαφορά ότι στον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-AcH χρησιμοποιείται η C₆-NBD-PC ως υπόστρωμα της αντίδρασης και το αντίστοιχο C₆-NBD-FA ως πρότυπο αντί των C₁₂-NBD-PC και C₁₂-NBD-FA αντίστοιχα (Σχήμα 23). Ωστόσο, σε συγκριτικά πειράματα δοκιμάζονται και τα δύο υποστρώματα.



Σχήμα 23: Αντίδραση υδρόλυσης της C₆-NBD-PC από την PAF-AcH

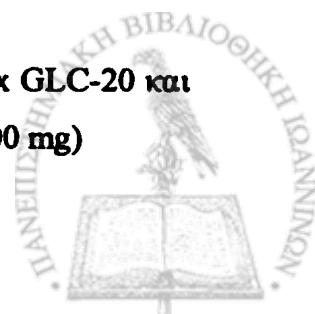
Ανάλυση λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία

Αρχή της μεθόδου

Τα λιπαρά οξέα των διαφόρων κλασμάτων λιπιδίων μετατρέπονται διαμέσω μιας αντίδρασης μετεστεροποίησης στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους [250]. Για την αντίδραση μετεστεροποίησης χρησιμοποιείται μεθανολικό διάλυμα τριφθοριούχου βορίου ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) 14%. Η μεθυλομάδα για το σχηματισμό του εστέρα παρέχεται από τη CH_3OH , ενώ το BF_3 χρησιμεύει ως καταλύτης. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που σχηματίζονται με τον παραπάνω τρόπο αναλύονται με αέρια χρωματογραφία.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Αέριος χρωματογράφος (GC-14, Shimadzu) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID) και τριχοειδή στήλη (methyl silicone, 007-1-30W-0.25F, Quadrex)
- Πρόγραμμα καταγραφής και επεξεργασίας χρωματογραφήματος (DAPA Chromatography System V1.4x)
- pHμετρικό χαρτί
- n-Εξάνιο (M.B.: 86.18, Standard for GC, >99.7 %, CH-9740, Fluka)
- Πετρελαϊκός αιθέρας (Analytical Reagent, Labscan)
- Διαιθυλαιθέρας (M.B.: 74-12, Analytical Reagent, Riedel-de Haën)
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M.B.: 60.053, Carlo Erba Reagenti)
- Na_2SO_4 (MB: 142.04, Riedel-de Haën)
- Πρότυπο ισομοριακό μίγμα ουδετέρων λιπιδίων που περιέχει:
 - α) Χοληστερόλη, β) Ελαϊκό εστέρα χοληστερόλης, γ) Μεθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος, δ) Ελαϊκό οξύ, ε) Τριελαΐνη
- Πρότυπα μίγματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME Mix GLC-20 και GLC-30, Supelco, 100 mg, Lipid Standards, 80F-7190, Sigma, 100 mg)



Διαλύματα

Πρότυπο ισομοριακό μίγμα ουδετέρων λιπιδίων που περιέχει:

α) Χοληστερόλη, β) Ελαϊκό εστέρα χοληστερόλης, γ) Μεθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος, δ) Ελαϊκό οξύ, ε) Τριελαΐνη

Διάλυμα 14% BF_3 σε CH_3OH (B-1252, Sigma)

Πρότυπα διαλύματα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων 10 mg/ml:

Πρότυπο Α

Το περιεχόμενο της αμπούλας (100 mg) με το μίγμα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων διαλυτοποιείται σε 10 ml εξάνιο. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάζεται ισομοριακό πρότυπο διάλυμα 10 mg/ml σε εξάνιο των εξής μεθυλεστέρων:

- Μεθυλεστέρας του οκτανοϊκού οξέος (8:0)
- Μεθυλεστέρας του δεκανοϊκού οξέος (10:0)
- Μεθυλεστέρας του λαυρικού οξέος (12:0)
- Μεθυλεστέρας του μυριστικού οξέος (14:0)
- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (16:0)



Πρότυπο Β

Ομοίως παρασκευάζεται ισομοριακό πρότυπο διάλυμα 10 mg/ml σε εξάνιο των εξής μεθυλεστέρων:

- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (16:0)
- Μεθυλεστέρας του στεατικού οξέος (18:0)
- Μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (18:1)
- Μεθυλεστέρας του λινολενικού οξέος (18:3)
- Μεθυλεστέρας του αραχιδικού οξέος (20:0)

Πρότυπο Γ

Ομοίως παρασκευάζεται ισομοριακό πρότυπο διάλυμα 10 mg/ml σε εξάνιο των εξής μεθυλεστέρων:

- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (16:0)
- Μεθυλεστέρας του στεατικού οξέος (18:0)
- Μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (18:1)
- Μεθυλεστέρας του λινολενικού οξέος (18:3)
- Μεθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος (18:2)

Όλα τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C .

Διαλύματα εργασίας πρότυπων μεθυλεστέρων:

100 μl από τα παραπάνω διαλύματα μίγματος πρότυπων μεθυλεστέρων παραλαμβάνονται με αυτόματη πιπέτα και αραιώνονται με εξάνιο σε τελικό όγκο 5 ml. Φυλάσσονται σε ατμόσφαιρα N_2 στους -20°C .



Πειραματική πορεία

Μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων του κλάσματος της PC και των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων

Στα εκχυλίσματα των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων, αφού εξατμιστεί ο διαλύτης σε ρεύμα N_2 , και στο κλάσμα της PC, όπως αυτό αποξύνεται από την πλάκα, προστίθενται από 1 ml διαλύματος 14% BF_3 σε CH_3OH . Οι σωλήνες κλείνονται και τοποθετούνται σε αμμόλουτρο στους $100^\circ C$. Η μεν μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων της PC απαιτεί θέρμανση για 15 min, η δε των λιπαρών οξέων των ουδετέρων λιπιδίων 1 ώρα [251]. Μετά τη θέρμανση οι σωλήνες απομακρύνονται από το αμμόλουτρο και προστίθεται 1 ml H_2O σε κάθε σωλήνα για τον τερματισμό της αντίδρασης.

Εκχύλιση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων και καθαρισμός τους με TLC

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχύλιζονται 2 φορές με 2 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Συλλέγονται οι υπερκείμενες (αιθερικές φάσεις) και ξεπλένονται με 4 ml H_2O τόσες φορές, έως ότου το pH της υδατικής φάσης να είναι ~6.7, το οποίο δηλώνει πλήρη απομάκρυνση των λιπαρών οξέων που πιθανά δεν αντέδρασαν. Στη συνέχεια προστίθεται άνυδρο Na_2SO_4 και ακολουθεί διήθηση ώστε να απομακρυνθούν οι μικροποσότητες του H_2O που έχουν μείνει. Ακολούθως, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ατμόσφαιρα N_2 και αναδιαλύουμε σε 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα.

Ο καθαρισμός των μεθυλεστέρων γίνεται με ανάπτυξη τους σε TLC χρησιμοποιώντας ως μίγμα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα-δισυλβουθενικού οξέος σε αναλογία 80:20:1 (v/v).



Μετά την ανάπτυξη της πλάκας και την εμφάνιση των κηλίδων με ατμούς I_2 , οι περιοχές των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων αποξύνονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωληνάκι με 1.9 ml μίγματος $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$, (1:2:0.8, v/v). Ακολουθεί η εκχύλιση τους κατά Bligh- Dyer. Στα τελικά χλωροφορμικά εκχυλίσματα εξατμίζεται ο διαλύτης σε ατμόσφαιρα N_2 και το δείγμα αναδυναύεται σε 100 μl εξάνιο.

Ένα ml από αυτό το διάλυμα σε εξάνιο, εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο [252]. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθείται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

Αρχική θερμοκρασία	: 50°C
Τελική θερμοκρασία	: 190°C
Ρυθμός αύξησης	: 4°C/min
Θερμοκρασία εισαγωγέα	: 270°C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	: 340°C

Πρότυπα διαλύματα

Ένα ml από τα διαλύματα εργασίας των πρότυπων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων γίνεται με βάση τους χρόνους κατακράτησης των μεθυλεστέρων τους, συγκρίνοντάς τους με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης των πρότυπων μεθυλεστέρων.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται ολοκληρώνοντας και υπολογίζοντας το εμβαδόν των διαφόρων κορυφών του χρωματογραφήματος, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητάς του κάθε μεθυλεστέρα στο δείγμα.



Κατεργασία των κυττάρων του BAL

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Trypan blue (T 0776, Sigma)
- Αιματοκυττόμετρο Newbauer
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Μικροσκόπιο

Πειραματική πορεία

Σε 10-50 μl κυτταρικού εναιωρήματος κυττάρων σε RPMI ή PBS (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων) προστίθεται ποσότητα 50-100 μl αραιωμένου 1:10 διαλύματος Trypan blue σε αναλογία 1:3. Τα κύτταρα μετριοούνται σε αιματοκυττόμετρο Newbauer (τα νεκρά κύτταρα βάφονται μπλε) και ρυθμίζουμε τον αριθμό τους σε 2.5×10^6 κύτταρα / ml PBS. Τέλος, ποσότητες των 10 μl αυτού του εναιωρήματος στρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες και αφού παραμείνουν στους 4°C για τουλάχιστον 24 ώρες βάφονται ή φυλάσσονται στους -80°C.



Προσδιορισμός κυτταρικού πλυθισμού με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιώντας το συνδυασμό χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης πετυχαίνεται η διαφορετική χρώση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος ενός κυττάρου. Συγκεκριμένα η αιματοξυλίνη ως βασική χρωστική, αντιδρά σχηματίζοντας ηλεκτροστατικούς δεσμούς και βάφει συστατικά του κυττάρου που περιέχουν οξέα. Με αυτό τον τρόπο βάφεται ο πυρήνας (μπλε), λόγω της περιεκτικότητάς του σε νουκλεοπρωτεΐνες [253]. Αντιθέτως, η ηωσίνη ως όξινη χρωστική, χρωματίζει (ροζ) τα βασικά συστατικά του κυττάρου που υπάρχουν στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

Υλικά-Διαλύματα

- Μικροσκόπιο
- Καλυπτρίδες
- Αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, M.B.: 46, Labscan)
- Ακετόνη (M.B.: 58.08, Riedel-de Haën)
- Ξυλόλιο (4-0201, Sigma)
- Φορμαλδεύδη (Διάλυμα 10 %, F 1635, Sigma)
- Οξυνοσιμένο οινόπνευμα: Παρασκευάζεται με προσεκτική προσθήκη 10 σταγόνων πυκνού HCl σε 990 ml αιθανόλης 70 %.
- Διάλυμα αιματοξυλίνης: (Hematoxylin solution, Gill No.3, Catalog No. GHS-3, Sigma). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Stock διάλυμα Ηωσίνης: Παρασκευάζεται διαλύοντας 1g ηωσίνης (E8761, Sigma) με 20 ml dH_2O και 80 ml αιθανόλης 95 %
- Διάλυμα εργασίας ηωσίνης: Παρασκευάζεται με ανάμιξη 1 μέρους διαλύματος stock με 3 μέρη αλκοόλη 80 %.



Πειραματική πορεία

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα επιστρωμένα κύτταρα εμβαπτίζονται στο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10 % ώστε να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα πάνω στη πλάκα. Στη συνέχεια ξεπλένονται για 30 δευτερόλεπτα με απεσταγμένο νερό και για 1 min με νερό βρύσης. Ακολουθεί η εμβάπτισή τους για 30 δευτερόλεπτα στο διάλυμα αιματοξυλίνης, με την οποία αντιδρούν και βάφονται μπλε οι νουκλεοπρωτεΐνες του πυρήνα. Ύστερα ξεπλένονται με νερό βρύσης για 1 min και εμβαπτίζονται για λίγα δευτερόλεπτα στο διάλυμα της οξυνισμένης αλκοόλης. Ακολουθεί εμβάπτιση στο διάλυμα ηωσίνης για 3min και μετά ξεπλένονται για 1 min σε κατά σειρά διαλύματα αιθανόλης 60, 70 και 95 %. Τελικά, εμβαπτίζονται για λίγα δευτερόλεπτα σε ακετόνη και ξυλόλιο και, αφού στεγνώσουν, καλύπτονται με καλυπτρίδες και εξετάζονται στο μικροσκόπιο.

Χρώση κυττάρων με Sudan Black B

Αρχή της μεθόδου

Τα λιπίδια, κυρίως τα ουδέτερα λιπίδια, τα φωσφολιπίδια και οι στερόλες, δίνουν θετική αντίδραση και χρωματίζονται μαύρα με τη χρώση Sudan Black B. Τα κύτταρα που βάφονται με αυτό το τρόπο είναι τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, ενώ δεν βάφονται τα λεμφοκύτταρα.

Υλικά-Διαλύματα

- Μικροσκόπιο
- Καλυπτρίδες
- Αιθανόλη (CH₃CH₂OH, M.B.: 46, Labscan)
- Ακετόνη (M.B.: 58.08, Riedel-de Haën)
- Ξυλόλιο (4-0201, Sigma)



- Διάλυμα βαφής Sudan Black B: (Sudan Black B staining reagent, Catalog No. 380-1, Sigma). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Διάλυμα αιματοξυλίνης: (Hematoxylin solution, Gill No.3, Catalog No. GHS-3, Sigma). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Διάλυμα γλουταραλδεύδης: (Glutaraldehyde solution, Catalog No. 380-2, Sigma). Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα μονιμοποίησης (Glutaraldehyde fixative solution): Παρασκευάζεται με ανάμιξη του διαλύματος γλουταραλδεύδης με ακετόνη σε αναλογία 1:3. Φυλάσσεται στους 4°C.

Πειραματική πορεία

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα επιστρωμένα κύτταρα εμβαπτίζονται στο διάλυμα μονιμοποίησης σε θερμοκρασία 4°C για 1 min με απαλή ανακίνηση. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα μονιμοποιούνται πάνω στη πλάκα. Στη συνέχεια ξεπλένονται σχολαστικά με απιονισμένο νερό και ακολούθως εμβαπτίζονται στο διάλυμα βαφής Sudan Black B για 5 min υπο συνεχή ανακίνηση. Ύστερα ξεπλένονται 3 φορές με 70 % αιθανόλη και με απεσταγμένο νερό. Τελικά, εμβαπτίζονται στο διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 min και ξεπλένονται σχολαστικά με νερό βρύσης. Αφού στεγνώσουν καλύπτονται με καλυπτρίδες και εξετάζονται στο μικροσκόπιο.



ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μελέτη έλαβαν μέρος δεκαπέντε ασθενείς που βρίσκονταν σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής και οι οποίοι είχαν εμφανίσει το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής (ΣΛΕ). Έξι μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς με Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων (ΣΟΑΔ, ARDS), από τους οποίους ελήφθη BAL για άλλους λόγους, χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου 1 (control group 1). Τέλος, πέντε μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς, οι οποίοι δεν παρουσίαζαν οξεία πνευμονική βλάβη, χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου 2 (control group 2).

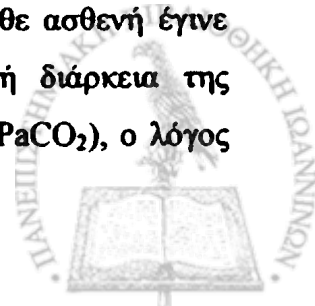
Τα κριτήρια για τη διάγνωση του FES ήταν: 1) υποξαιμία, 2) νευρολογικές διαταραχές και 3) έκχυση πετεχειώδους εξανθήματος. Όλοι οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη εμφάνισαν τη χαρακτηριστική τριάδα των συμπτωμάτων 24-72 ώρες μετά από κατάγματα μακρών οστών. Τα κριτήρια διασωλήνωσης και μηχανικής υποστήριξης ήταν: 1) σοβαρή υποξαιμία, δηλαδή $PaO_2/FiO_2 < 200$, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της PEEP, 2) διαταραχή του επιπέδου συνείδησης.

Τα κριτήρια για τη διάγνωση του ARDS ήταν: 1) οξεία υποξαιμική αναπνευστική ανεπάρκεια, η οποία απαιτούσε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, 2) αμφοτερόπλευρα διάχυτα πνευμονικά διηθήματα στην ακτινογραφία θώρακος, 3) $PaO_2/FiO_2 < 200$ ανεξάρτητα από τα επίπεδα της PEEP, 4) πίεση ενσφήνωσης πνευμονικών τριχοειδών $< 18 \text{ mmHg}$ ή απουσία κλινικής ένδειξης για αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια και 5) παρουσία παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση του ARDS.

Τέλος, ως ασθενείς με οξεία πνευμονική βλάβη, αλλά χωρίς ARDS, χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οποίοι έχουν PaO_2/FiO_2 μεταξύ 200-300.

Ασθενείς με ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Επιπρόσθετα, σε κανέναν από τους ασθενείς δεν χορηγήθηκε παρεντερική διατροφή ή νάρκωση με propofol.

Οι κλινικές μετρήσεις έγιναν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Σε κάθε ασθενή έγινε καταγραφή των ακόλουθων παραμέτρων: η ηλικία, η χρονική διάρκεια της μηχανικής αναπνοής, η αρτηριακή τάση διοξειδίου του άνθρακα ($PaCO_2$), ο λόγος



της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα προς την περιεκτικότητα του εισπνεόμενου οξυγόνου (P_{aO_2}/F_{iO_2}), η διατασιμότητα του αναπνευστικού συστήματος (compliance), ο όγκος αέρα κάθε εισπνοής (VT), η πίεση πλατώ (Ppl), το pH του αρτηριακού αίματος και η συγκέντρωση των διττανθρακικών στο αρτηριακό αίμα (HCO_3^-).



ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΕΜΒΟΛΗΣ

Για το πειραματικό μοντέλο της λιπώδους εμβολής χρησιμοποιήθηκαν τρία αρνιά βάρους από 12 ως 15 kg. Στα ζώα αρχικά χορηγήθηκε νάρκωση με ατροπίνη (0.02mg/kg) και ασεπρομαζίνη (0.05mg/kg). Στη συνέχεια η αναισθησία ενισχύθηκε με χορήγηση θειοπεντάλης (0.5 mg/kg) και τα ζώα διασωληνώθηκαν. Οι πνεύμονες αερίζονταν με οξυγόνο για να διατηρηθεί το PaCO₂ μεταξύ 35 και 45 mmHg. Η αναισθησία διατηρήθηκε με τη χρήση NO/O₂ (66/33%) και αλοθάνιο (1.5%). Σε όλα τα ζώα τοποθετήθηκε αγγειακός καθετήρας στην κάτω κοίλη φλέβα, ενώ σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χορηγούνταν διάλυμα Ringer (30ml/kg/h) από περιφερική φλέβα. Λίγο πριν την επέμβαση ελήφθησαν 15ml αρτηριακού και φλεβικού αίματος. Ταυτόχρονα έγινε η λήψη κατάλληλης ποσότητας BAL (~20ml). Η τεχνητή πρόκληση λιπώδους εμβολής έγινε με τη λήψη μυελού των οστών από το μηριαίο οστό και την εισαγωγή του στην κυκλοφορία από την κάτω κοίλη φλέβα. Η επέμβαση έγινε και στις τρεις περιπτώσεις κάτω από στείρες συνθήκες. Μία ώρα μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής ελήφθησαν 15ml αρτηριακού και φλεβικού αίματος, ενώ ταυτόχρονα έγινε και η λήψη του BAL. Μετά από 2 ώρες τα ζώα υποβάλλονταν σε ευθανασία με χορήγηση πεντοβαρβιτόνης (110mg/kg). Αμέσως πριν την ευθανασία ελήφθησαν ξανά 15ml αρτηριακού και φλεβικού αίματος, ενώ ταυτόχρονα έγινε και η λήψη του BAL.



ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, USA). Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις δοκιμασίες τέθηκε στο $p < 0.05$. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή (mean) \pm μία σταθερή απόκλιση (SD). Η σύγκριση των συχνοτήτων και των ποσοστών μεταξύ των ομάδων της μελέτης έγινε με τη δοκιμασία χ^2 -test. Ο έλεγχος για τη κανονικότητα ή μη της κατανομής κάθε παραμέτρου έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων με κανονική κατανομή (normal distribution) έγινε με τη δοκιμασία της ανάλυσης της μεταβλητότητας σε μία διεύθυνση [breakdown & one-way analysis of variance (ANOVA)] για σύγκριση μεταξύ τριών ομάδων. Στην τελευταία περίπτωση, εφόσον το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό, εφαρμόστηκε η δοκιμασία της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς [least significance difference (LSD)] για τις ανά ζεύγη συγκρίσεις των ομάδων.

Η σύγκριση των ενδιαμέσων τιμών των παραμέτρων με μη κανονική κατανομή (skewed distribution) έγινε με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis ANOVA median test για σύγκριση μεταξύ 3 ομάδων. Στην τελευταία περίπτωση, εφόσον το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό, εφαρμόστηκε η δοκιμασία Mann-Whitney U test για τις ανά ζεύγη συγκρίσεις των ομάδων.

Ο υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης (r) μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων σε μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate analysis) έγινε με την εξίσωση του Pearson, ενώ ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας του συντελεστή συσχέτισης έγινε με τη χρησιμοποίηση της Student's t-κατανομής με 2 βαθμούς ελευθερίας (df).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που εντάχθηκαν στη μελέτη φαίνονται στον *Πίνακα 6*.

Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

N ^ο	Ηλικία (έτη)	Φύλο	Πάθηση	PO ₂ /FiO ₂	Έκβαση
FES					
1	17	Γ	Κατάγματα οστών	104	Ανάρρωση
2	35	Γ	Κατάγματα οστών	122	Ανάρρωση
3	43	A	Κατάγματα οστών	130	Ανάρρωση
4	62	A	Κατάγματα οστών	140	Ανάρρωση
5	55	A	Κατάγματα οστών	148	Ανάρρωση
6	22	A	Κατάγματα οστών	88	Ανάρρωση
7	48	A	Κατάγματα οστών	140	Ανάρρωση
8	50	Γ	Κατάγματα οστών	90	Ανάρρωση
9	43	A	Κατάγματα οστών	132	Θάνατος
10	22	A	Κατάγματα οστών	140	Ανάρρωση
11	38	A	Κατάγματα οστών	96	Ανάρρωση
12	44	A	Κατάγματα οστών	142	Ανάρρωση
13	59	A	Κατάγματα οστών	144	Ανάρρωση
<i>Mean</i>	41.4			124.3	
<i>SD</i>	14.3			22.0	



ARDS-Ομάδα Ελέγχου (control) 1

1	23	Γ	Πνευμονία	108	Ανάρρωση
2	49	A	Εισρόφηση	140	Ανάρρωση
3	67	Γ	Σήψη	90	Ανάρρωση
4	52	Γ	Εισρόφηση	148	Ανάρρωση
5	32	A	Σήψη	138	Ανάρρωση
6	70	A	Σήψη	140	Θάνατος
<i>Mean</i>	48.8			127.3	
<i>SD</i>	18.6			22.9	

Ασθενείς χωρίς πνευμονική νόσο- Ομάδα Ελέγχου (Control) 2

1	52	A	CVA	360	Ανάρρωση
2	46	Γ	H/S	420	Ανάρρωση
3	19	A	H/S	320	Ανάρρωση
4	75	A	CVA	346	Θάνατος
5	35	A	NM	328	Ανάρρωση
<i>Mean</i>	45.4			354.8	
<i>SD</i>	20.8			39.6	

H/S=κατάγματα κρανίου ή κατάγματα σπονδυλικής στήλης, CVA=αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, NM=νευρομυϊκή παράλυση, Mean= μέση τιμή, SD= τυπική απόκλιση, A: άνδρες, Γ: γυναίκες, PaO₂/ FiO₂=λόγος της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα προς την περιεκτικότητα σε O₂ του εισπνεόμενου μίγματος αέρα, ARDS: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων.



Ολική Πρωτεΐνη του BAL

Όπως φαίνεται στο *Σχήμα 24* και στον *Πίνακα 7*, τα επίπεδα της πρωτεΐνης του BAL στους ασθενείς με FES ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα (1911 ± 1248 $\mu\text{g/ml}$ BAL) σε σύγκριση με τις δύο ομάδες ελέγχου [876.7 ± 276.0 , $p < 0.05$ και 137 ± 32 $\mu\text{g/ml}$ BAL, $p < 0.01$, για τη σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (control) 1 και 2, αντίστοιχα].

Πίνακας 7: Περιεκτικότητα του BAL σε ολική πρωτεΐνη στις ομάδες της μελέτης

	FES (n=13)	Control 1-(ARDS) (n=6)	Control 2 (n=5)
Ολική Πρωτεΐνη $\mu\text{g/ml}$	$1911 \pm 1248^{*\dagger}$	877 ± 276	137 ± 32

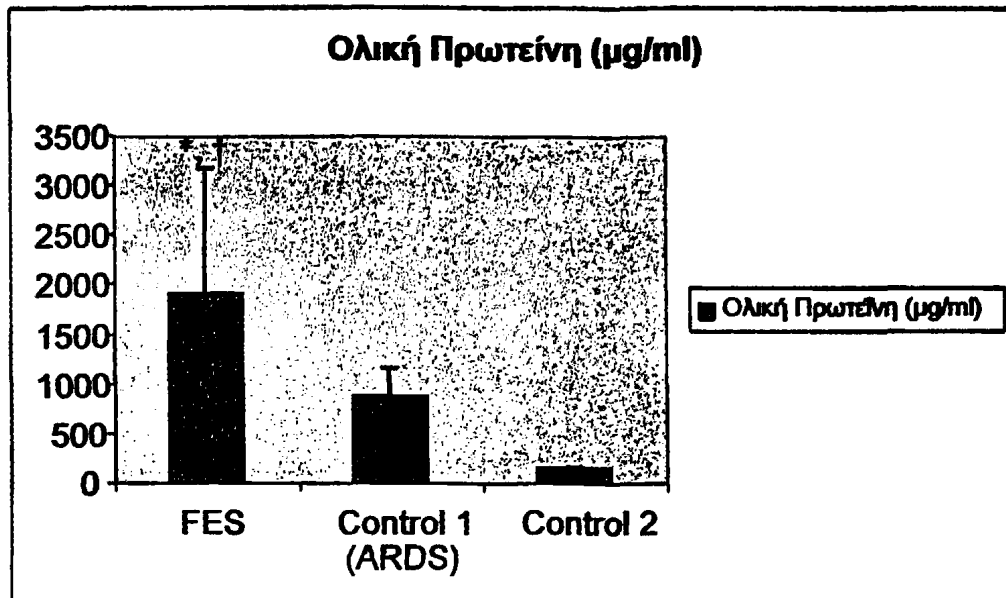
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1: $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2: $p < 0.01$

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν: μέση τιμή (Mean) \pm τυπική απόκλιση (SD)



Σχήμα 24: Επίπεδα πρωτεΐνης του BAL σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου (control 1 και 2)



*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1: $p < 0.05$,

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2: $p < 0.01$

Προσδιορισμός Ολικών Φωσφολιπιδίων του BAL

Τα ολικά φωσφολιπίδια στο BAL των ασθενών με FES ήταν σημαντικά αυξημένα (3.7 ± 1.2 γP/ml) σε σύγκριση και με τις δυο ομάδες ελεγχου 1 και 2 (2.7 ± 1.9 , $p < 0.001$ και 2.3 ± 0.5 γP/ml, $p < 0.01$ για τη σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2, αντίστοιχα).

Πίνακας 8: Περιεκτικότητα του BAL σε ολικά φωσφολιπίδια στις ομάδες της μελέτης.

	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
Ολικά PLs (γP/ml)	$3.7 \pm 1.2^{*†}$	2.7 ± 0.9	2.3 ± 0.5

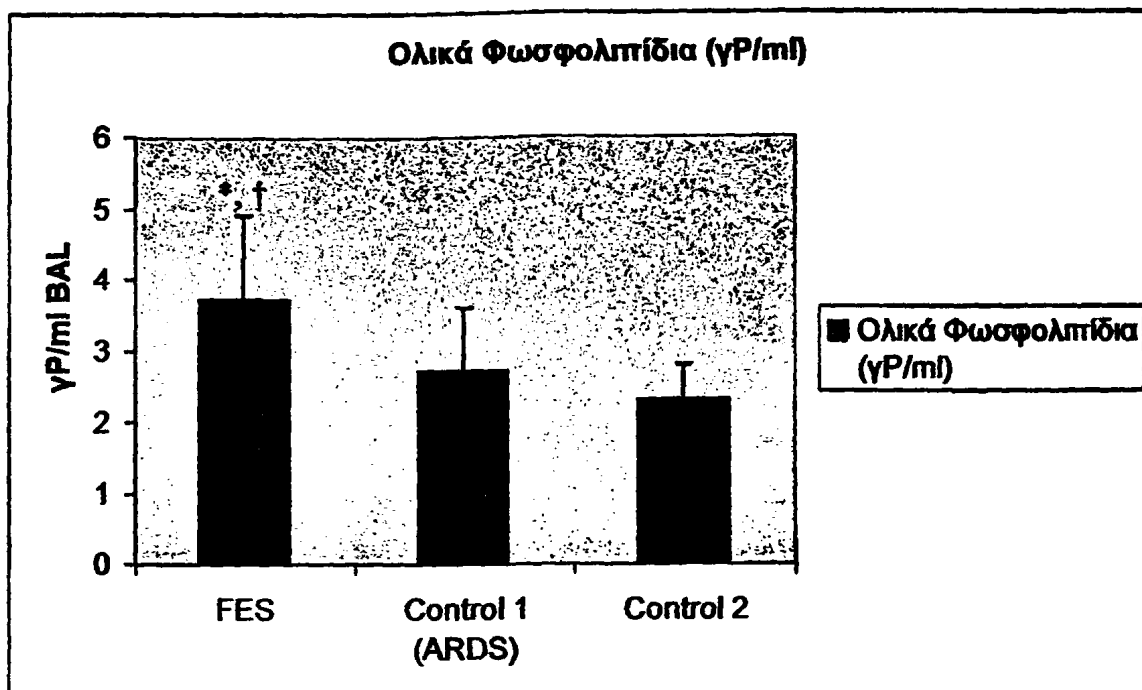
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 1:
 $p < 0.001$,

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2:
 $p < 0.01$

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν: μέση τιμή (Mean) ± τυπική απόκλιση (SD)



Σχήμα 25: Επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με FES και των ομάδων ελέγχου (control 1 και 2)



*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1: $p < 0.001$,

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2: $p < 0.01$

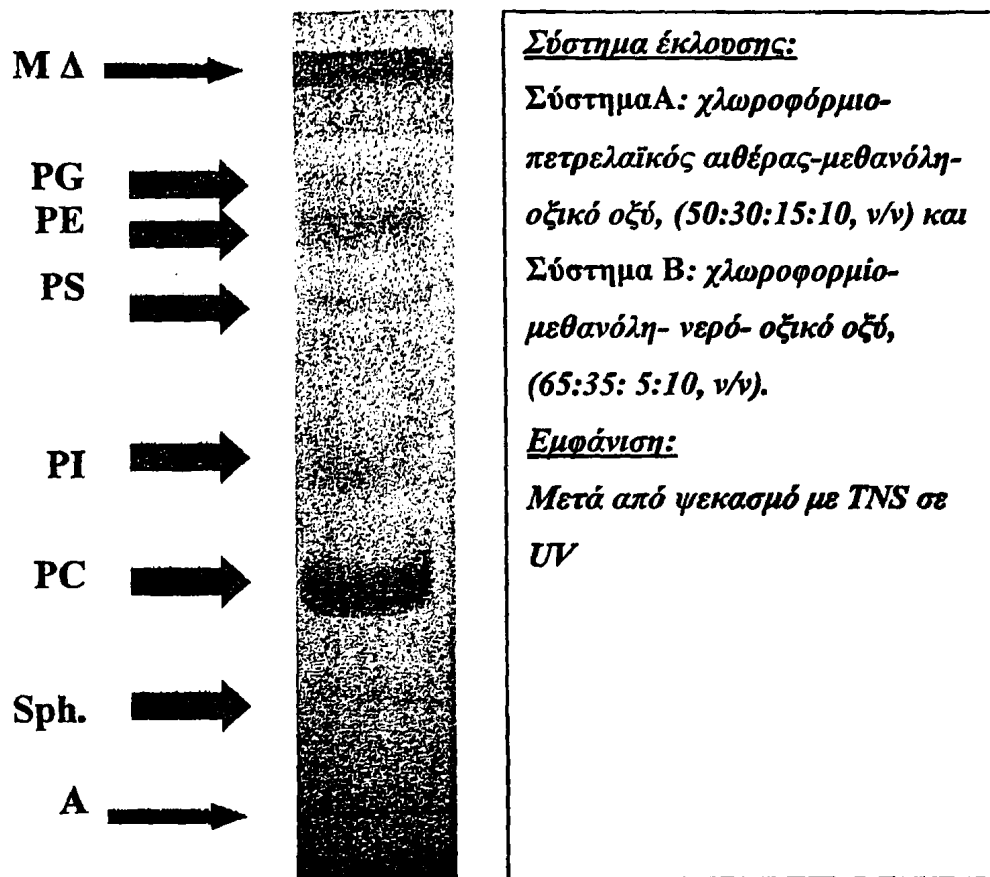
Προσδιορισμός των τάξεων των φωσφολιπιδίων στο BAL

Για την ανάλυση των τάξεων των φωσφολιπιδίων, κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL από τους ασθενείς της μελέτης εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer και κατεργάζεται όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Μετά την ανάπτυξη της πλάκας και στα δύο συστήματα, αφήνεται να στεγνώσει και εμφανίζεται σε λάμπα UV. Στη συνέχεια, οι περιοχές του πυριτικού οξέος της πλάκας που περιέχουν φωσφολιπίδια, καθώς και τμήματα αναλόγου μεγέθους που χρησιμοποιούνται ως τυφλά δείγματα αποξύνονται και μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου rytec για να γίνει ο προσδιορισμός του λιπιδικού φωσφόρου (*Εικόνα 3*).

Οι μεταβολές στα ποσοστά των επιμέρους τάξεων φωσφολιπιδίων στους ασθενείς με FES ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ARDS (control 1): Η φωσφατιδυλογολίνη (PC) και η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) μειώθηκαν, ενώ η σφιγγομυελίνη (Sph) αυξήθηκε και στις δυο ομάδες ασθενών σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI) μεταξύ των τριών ομάδων. Αντίθετα, η λυσο-φωσφατιδυλογολίνη (Lyso-PC) ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με FES σε σύγκριση τόσο με την ομάδα των ασθενών με ARDS (control 1), όσο και με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου (control) 2 (*Πίνακας 9, Σχήμα 26*).



Εικόνα 3: Τυπική εικόνα διαχωρισμού τάξεων φωσφολιπιδίων μετά από εκχύλιση κατάλληλης ποσότητας δείγματος ΒΑΛ



*A: Αρχή, MΔ: Μέτωπο διαλύτη,; Sph: σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη,
 PI: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη,
 PE; φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PG: φωσφατιδυλογλυκερόλη.
 TNS: 2-p-toluidinyl-naphthylene-6-sulfonate, UV: υπεριώδες φως.*

Πίνακας 9: Προσδιορισμός των τάξεων των φωσφολιπιδίων στο BAL στις τρεις ομάδες της μελέτης

Ποσοστά επί του συνόλου των φωσφολιπιδίων	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), %	53.7±8.3†	50.9±6.6*	76.0±5.2
Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), %	5.1±1.8†	5.3±1.1*	8.7±2.1
Σφιγγομυελίνη (Sph), %	13.7±5.9†	15.7±5.9*	2.3±0.8
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), %	5.7±2.2	6.9±1.2	4.2±0.6
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS), %	6.9±2.9	7.7±2.8	4.4±0.6
Φωσφατιδυλοινωσιτόλη (PI), %	7.5±2.2	8.3±3.2	4.1±1.1
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), %	2.8±1.6†	1.9±1.5*	0

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2: $p < 0.05$

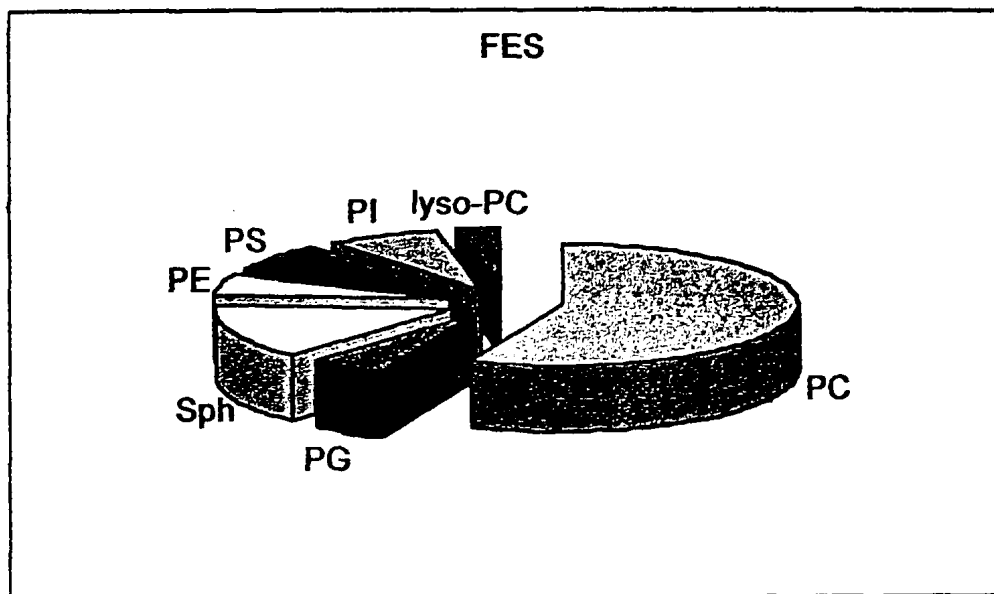
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2: $p < 0.05$

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν: μέση τιμή (Mean)±τυπική απόκλιση (SD)

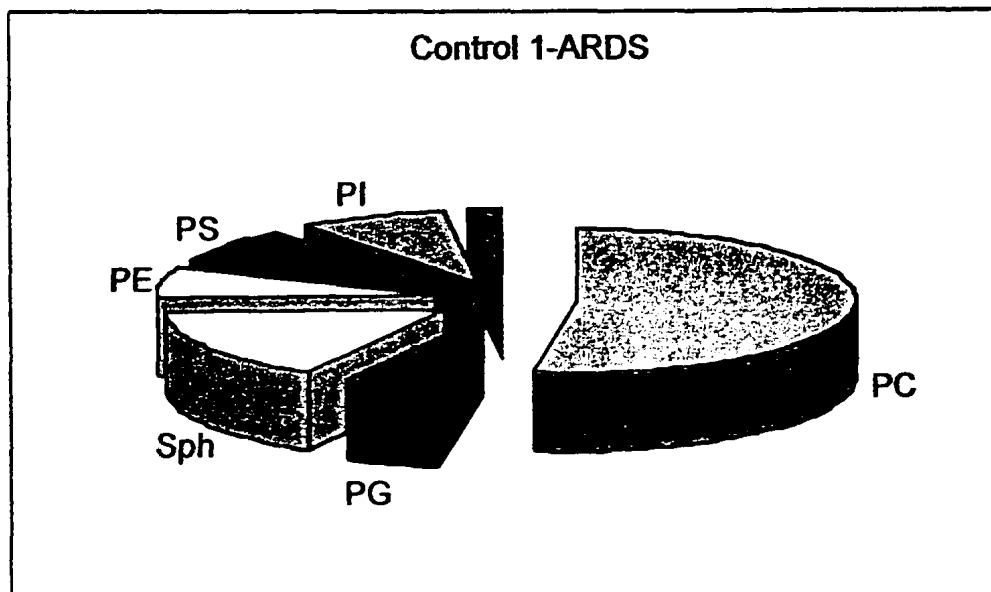


Σχήμα 26: Τάξεις φωσφολιπιδίων σε BAL ασθενών. A: FES, B: Ομάδα ελέγχου (Control) 1- ARDS, Γ: Ομάδα ελέγχου (Control) 2

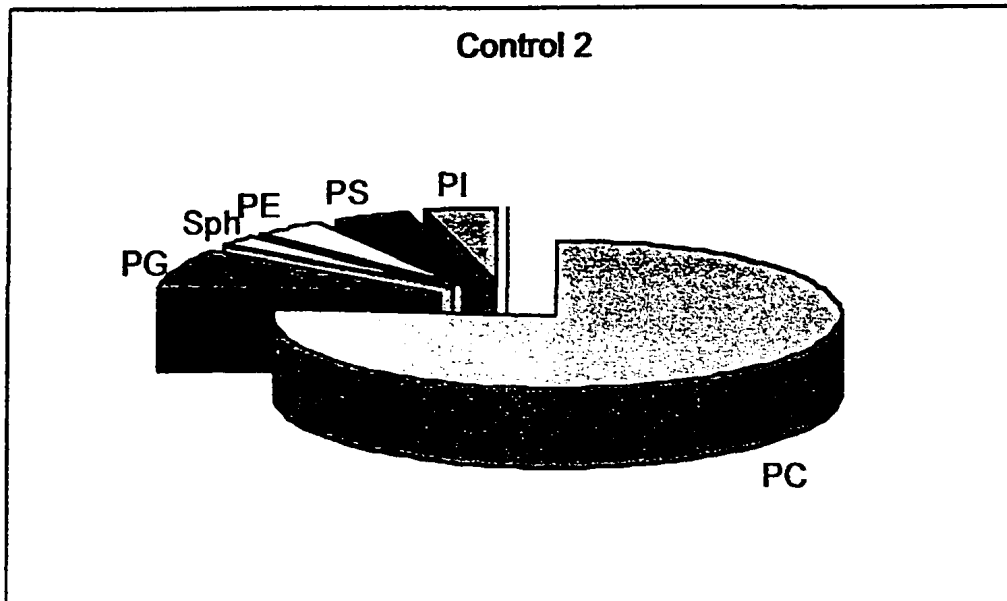
A



B



Γ



Sph: σφιγγομυελίνη, *PC*: φωσφατιδυλοχολίνη, *PI*: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, *PS*: φωσφατιδυλοσερίνη, *PE*: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, *PG*: φωσφατιδυλογλυκερόλη.

Ένζυμα

Φωσφολιπάση A₂

Η ενεργότητα της PLA₂ στο BAL μετρήθηκε με τη φθορισμομετρική μέθοδο, όπως αυτή περιγράφεται στο πειραματικό μέρος. Οι ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 είχαν σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα PLA₂ (0.01 ± 0.01 nmol/ml/min) σε σύγκριση τόσο με τους ασθενείς με FES (0.51 ± 0.13 nmol/ml/min, $p < 0.0001$), όσο και με τους ασθενείς με ARDS (control 1) (0.65 ± 3.2 nmol/ml/min, $p < 0.0001$) (Σχήμα 27, Πίνακας 10), ενώ δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των ασθενών με FES και των ασθενών με ARDS.

Πίνακας 10: Ενεργότητα PLA₂ στις τρεις ομάδες της μελέτης

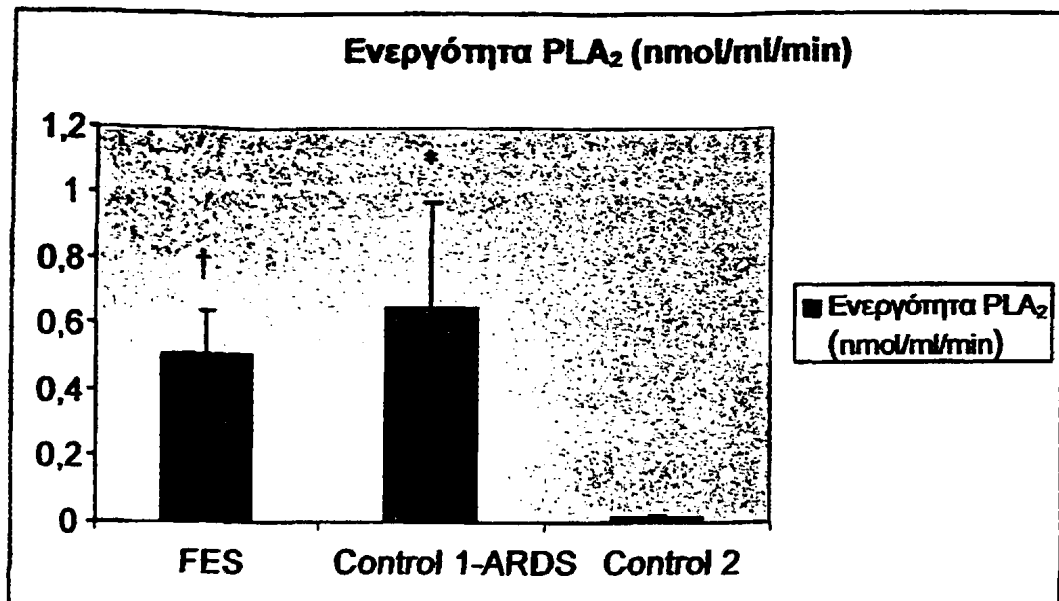
	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
Ενεργότητα PLA ₂ nmol/ml/min	0.51 ± 0.13 †	0.65 ± 0.32 *	0.01 ± 0.01

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2:
 $p < 0.0001$

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2:
 $p < 0.0001$



Σχήμα 27: Ενεργότητα PLA_2 στους ασθενείς με FES και τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (control 1 και 2).



†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2:
 $P < 0.0001$

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2:
 $P < 0.0001$

Ενεργότητα PAF-Ακετυλδολάσης

Η ενεργότητα PAF-AcH στο BAL ασθενών με FES (0.06 ± 0.04 nmol/ml/min) ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1 (control 1-ARDS) και της ομάδας ελέγχου 2 (control 2) (5.45 ± 3.1 nmol/ml/min, $p < 0.0001$ και 1.20 ± 0.60 nmol/ml/min, $p < 0.001$, αντίστοιχα). (Σχήμα 28, Πίνακας 11). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ARDS είχαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα PAF-AcH σε σύγκριση τόσο με τους ασθενείς με FES, όσο και με την ομάδα ελέγχου 2 (control 2) ($p < 0.001$).

Πίνακας 11: Ενεργότητα PAF-AcH στο BAL στις ομάδες της μελέτης

	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
PAF-AcH, nmol/ml/min	$0.06 \pm 0.04 \ddagger \ddagger$	$5.45 \pm 3.10^{* \#}$	1.20 ± 0.60

*: $p < 0.001$ για τη σύγκριση με τους ασθενείς με FES

#: $p < 0.001$ για τη σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 (control 2)

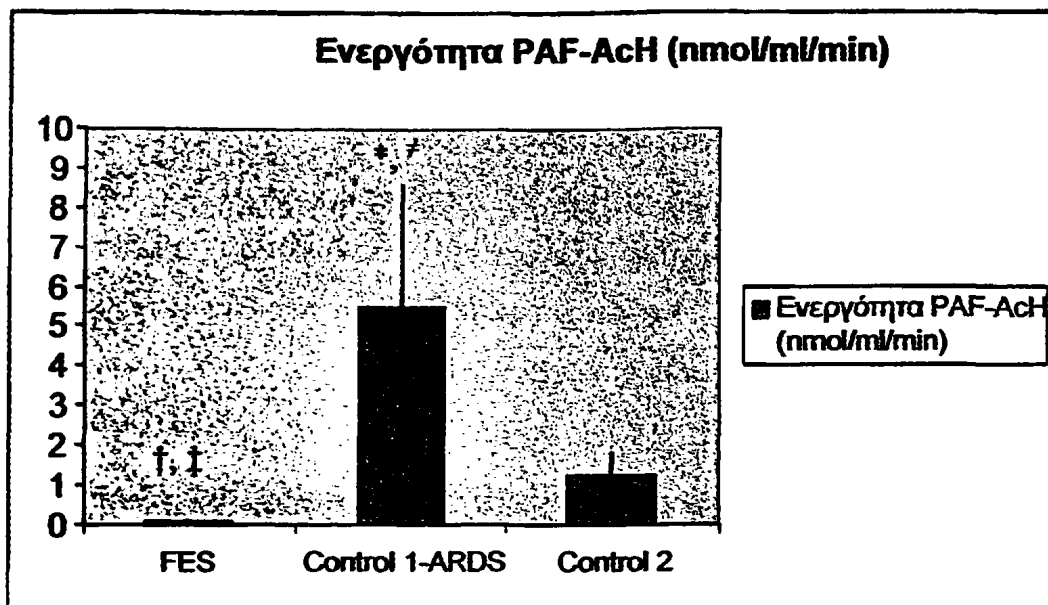
‡: $p < 0.0001$ για τη σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 (control 2)

†: $p < 0.001$ για τη σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 (control 2)

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν: μέση τιμή (Mean) \pm τυπική απόκλιση (SD)



Σχήμα 28: Ενεργότητα PAF-AcH σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2



*: $p < 0.001$, για τη σύγκριση με τους ασθενείς με FES

‡: $p < 0.0001$ για τη σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 (control 2)

†: $p < 0.001$, για τη σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 (control 2)

‡: $p < 0.001$ για τη σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 (control 2)

PAF

Όπως φαίνεται στο *Σχήμα 29* και στον *Πίνακα 12* παρατηρήθηκαν σημαντικά πιο αυξημένα επίπεδα PAF στους ασθενείς με FES (1089 ± 364 pg/9ml) σε σύγκριση και με τις δυο ομάδες ελέγχου 1 και 2 (189 ± 38 pg/9ml, $p < 0.0001$ και 28 ± 49 pg/9ml, $p < 0.0001$, αντίστοιχα).

Όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 30*, στους ασθενείς με FES παρατηρήθηκε αντίστροφη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του PAF και της PAF-AcH ($r = 0.91$, $p < 0.0001$), ενώ καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στις ομάδες ελέγχου 1 και 2 ($r = 0.04$, $p = NS$ και $r = 0.06$, $p = NS$, αντίστοιχα).

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις του PAF στο BAL στις ομάδες της μελέτης

	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
PAF, pg/9ml	$1089 \pm 364^{*†}$	$189 \pm 38‡$	28 ± 49

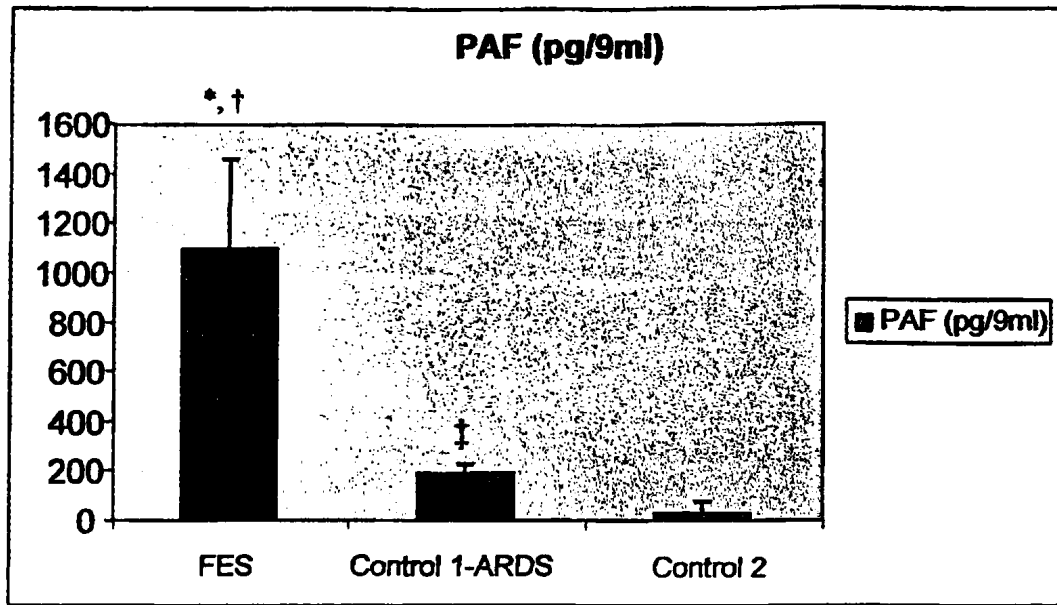
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 1, $p < 0.0001$.

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς του control 2, $p < 0.0001$.

‡: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$.



Σχήμα 29: Επίπεδα PAF σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2

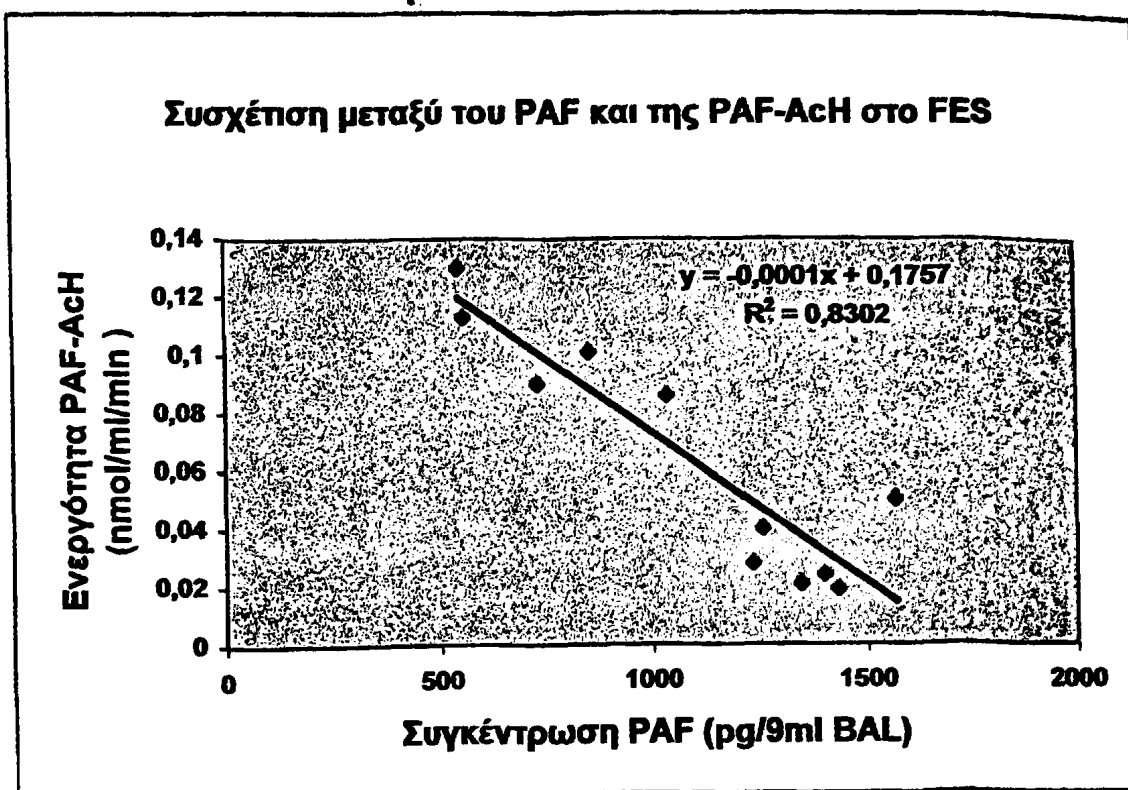


*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου (control) 1, $p < 0.0001$.

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου (control) 2, $p < 0.0001$.

‡: Στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας ελέγχου 1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$.

Σχήμα 30: Συσχέτιση του PAF και της PAF-AcH σε ασθενείς με FES



Εστέρες

Η συγκέντρωση των ολικών εστέρων του BAL στους ασθενείς της ομάδας με FES ήταν σημαντικά υψηλότερη (0.448 ± 0.220 $\mu\text{g}/\gamma\text{P}$) σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2 (0.015 ± 0.010 , $p < 0.01$ και 0.035 ± 0.070 $\mu\text{g}/\gamma\text{P}$, $p < 0.01$, αντίστοιχα) (Πίνακας 13, Σχήμα 31).

Πίνακας 13: Συγκέντρωση ολικών εστέρων του BAL στις ομάδες της μελέτης.

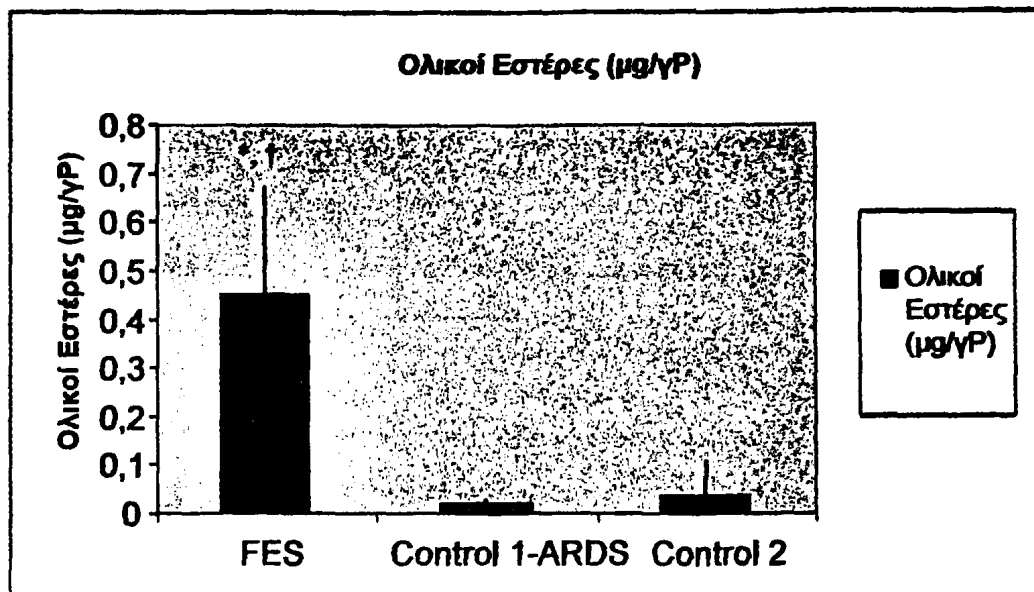
	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
Συγκέντρωση Ολικών Εστέρων, $\mu\text{g}/\gamma\text{P}$	$0.440 \pm 0.220^{*\dagger}$	0.015 ± 0.010	0.035 ± 0.07

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) 1, $p < 0.01$.

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) 2, $p < 0.01$.



Σχήμα 31: Επίπεδα ολικών εστέρων σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου (control) 1 και 2.



*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.01$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.01$

Ολική Χοληστερόλη

Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης του BAL σε ασθενείς με FES ήταν σημαντικά αυξημένα (10.2 ± 5.3 $\mu\text{g}/\gamma\text{P}$) σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (4.38 ± 0.75 , $p < 0.05$ και 1.97 ± 1.22 $\mu\text{g}/\gamma\text{P}$, $p < 0.03$ αντίστοιχα) (Σχήμα 32, Πίνακας 14). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης του BAL στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1 ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2 ($p < 0.05$).

Πίνακας 14: Συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης στις ομάδες της μελέτης

	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
Ολική Χοληστερόλη ($\mu\text{g}/\gamma\text{P}$)	$9.58 \pm 6.47^{*\dagger}$	$4.38 \pm 0.92_{\ddagger}$	1.97 ± 1.22

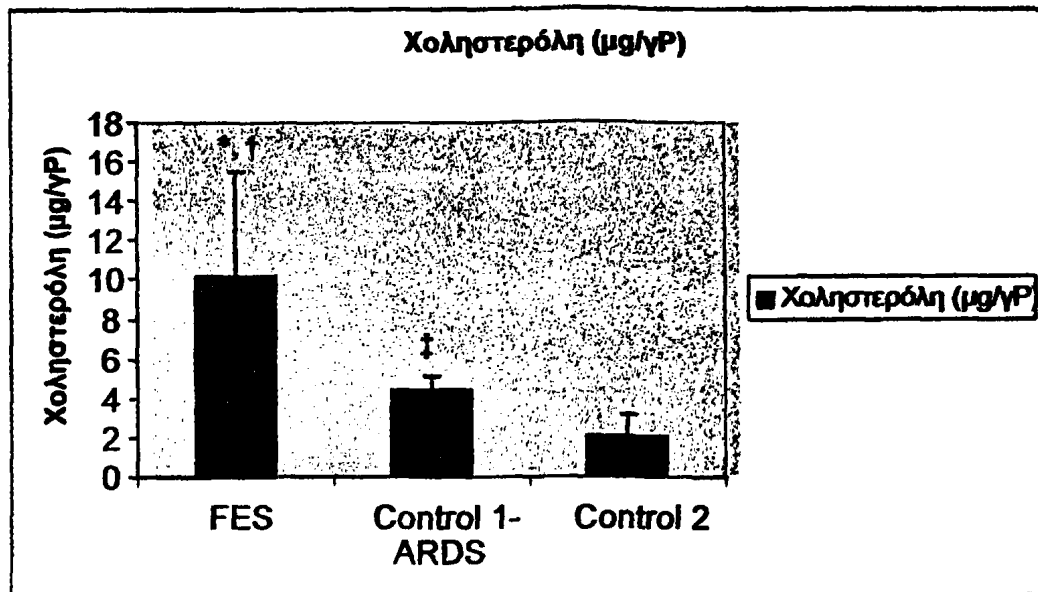
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.03$

‡: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$



Σχήμα 32: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2



*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.03$

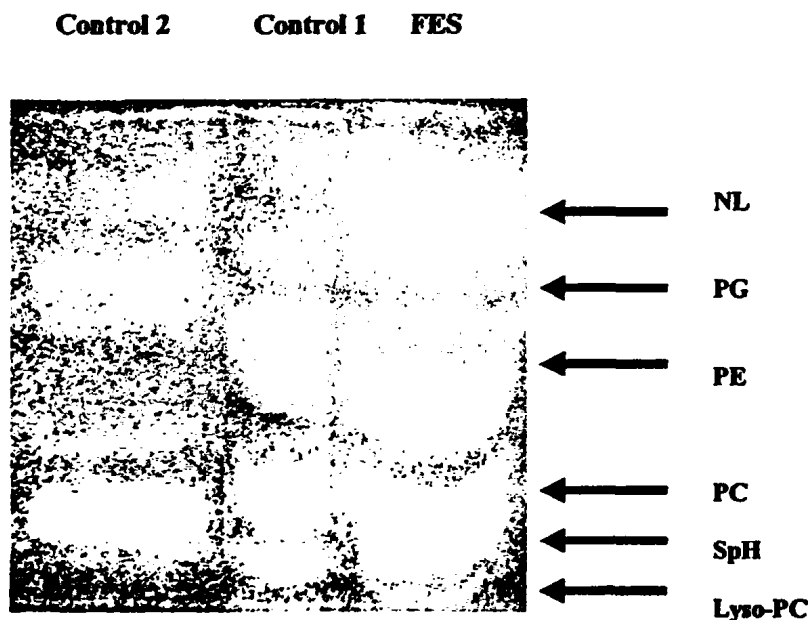
‡: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$

Αεριοχρωματογραφική ανάλυση των λιπαρών οξέων

Κλάσμα Φωσφατιδυλοχολίνης

Για την ανάλυση του κλάσματος της φωσφατιδυλοχολίνης κατάλληλη ποσότητα δείγματος που περιέχει ~10γΡ εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer και στη συνέχεια αναπτύσσεται σε θάλαμο κορεσμένο με μίγμα χλωροφόρμιου-μεθανόλης-νερού, σε αναλογία 65:35:7, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Αφού στεγνώσει η πλάκα, τότε εμφανίζεται σε UV. Η μορφή που παίρνουμε φαίνεται στην *Εικόνα 4*.

Εικόνα 4: Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων του BAL σε ασθενή με FES και σε ασθενή τη ομάδας ελέγχου (control) 1 και 2



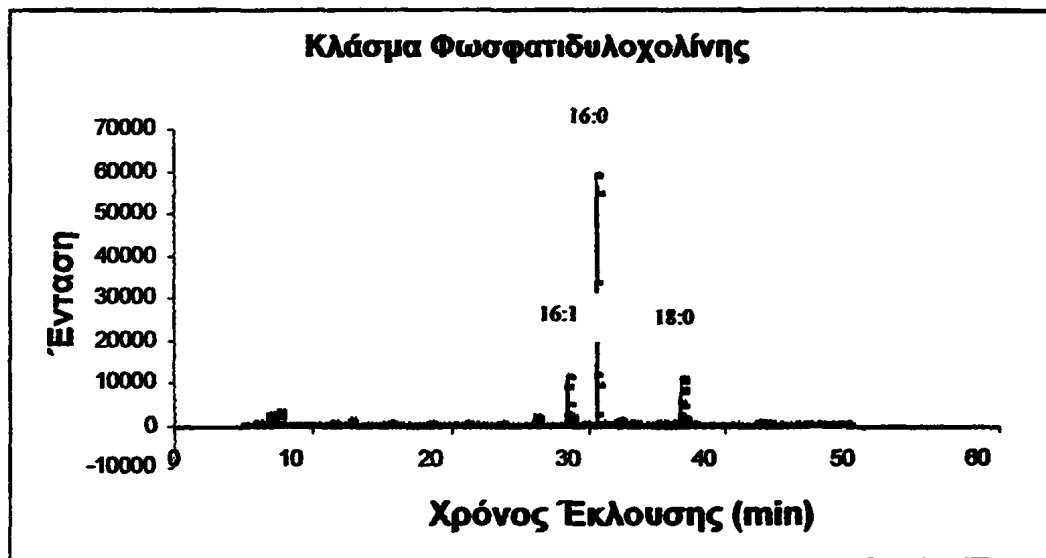
NL: Ουδέτερα λιπίδια, **PG:** Φωσφατιδυλογλυκερόλη, **PE:** Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, **PC:** Φωσφατιδυλοχολίνη, **SpH:** Σφιγγομυελίνη.

Η περιοχή της φωσφατιδυλοχολίνης αποξύνεται και τοποθετείται απευθείας (χωρίς εκχύλιση) σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παρουσία αζώτου και στη συνέχεια κατεργάζεται, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία, για την παραγωγή των



μεθυλεστέρων. Οι μεθυλεστέρες καθαρίζονται και αναλύονται με αέρια χρωματογραφία (Σχήμα 33).

Σχήμα 33: Τυπικό χρωματογράφημα ανάλυσης του κλάσματος της φωσφατιδυλοχολίνης ασθενούς με FES



Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) έδειξε μια σημαντική αύξηση στη σύσταση σε ελαϊκό οξύ στους ασθενείς με FES ($17.7 \pm 7.0\%$) σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου (control) 2 ($p < 0.0001$). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση και για το στεατικό οξύ στους ασθενείς με FES ($22.2 \pm 12.0\%$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) 2 ($8.2 \pm 2.0\%$, $P < 0.05$). Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στη σύσταση σε παλμιτικό στους ασθενείς με FES ($54.3 \pm 17\%$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control) 2 ($74.4 \pm 20.0\%$, $p < 0.05$) (Σχήμα 34, Πίνακας 15).

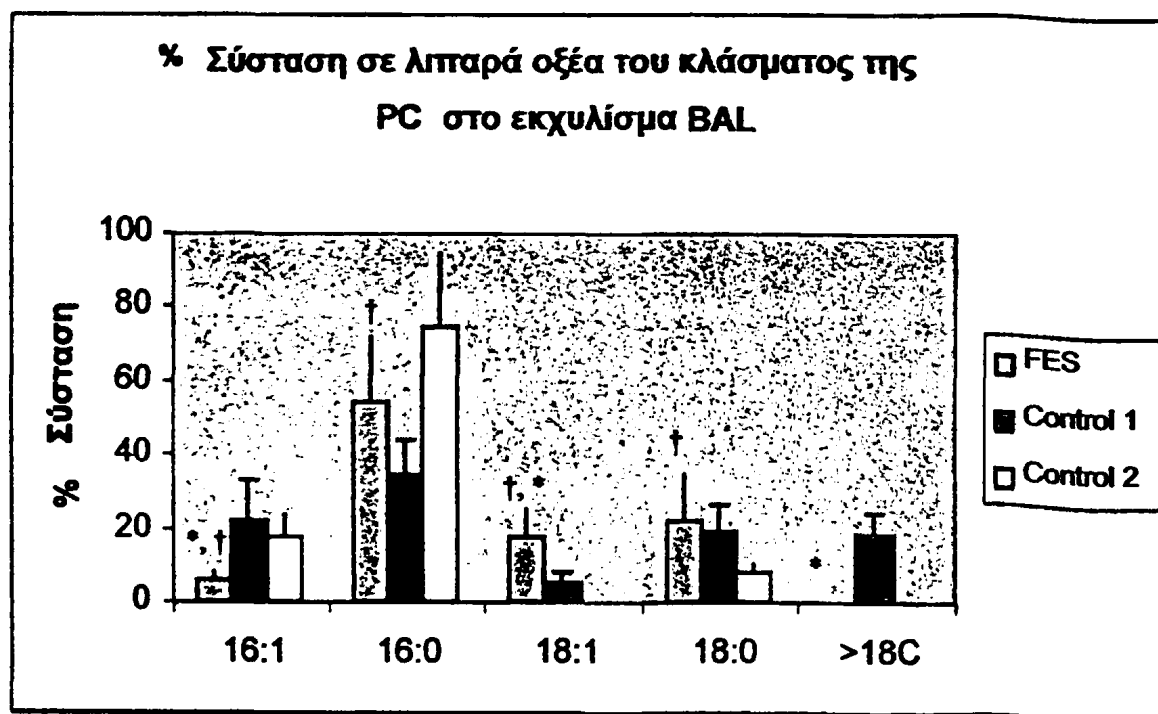
Πίνακας 15: Ποσοστιαία σύσταση σε λιπαρά οξέα του κλάσματος της φωσφατιδυλοχολίνης στις ομάδες της μελέτης

	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)	
Κλάσμα PC (%)	16:1	5.9±2.0†*	22.0±11.0	17.5±6.5
	16:0	54.3±17.0†	34.0±10.0	74.4±20.5
	18:1	17.7±7.0†*	5.0±3.0	0
	18:0	22.2±12.0†	19.0±7.0	8.2±2.0
	>18:C	0*	18.0±6.0	0

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$

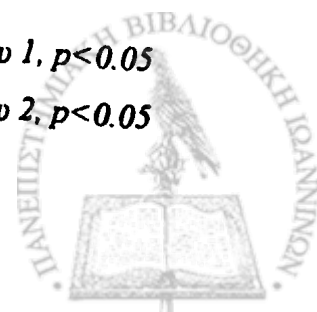
Σχήμα 34: % Σύσταση σε λιπαρά οξέα του κλάσματος της φωσφατιδυλοχολίνης στο BAL ασθενών με FES και στα control 1 και 2



16: 1: Παλμιτελαϊκό, 16:0: Παλμιτικό οξύ, 18:1: Ελαϊκό οξύ, 18:0: Στεατικό οξύ, >18C: οξύ με περισσότερα από 18 άτομα άνθρακα.

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$

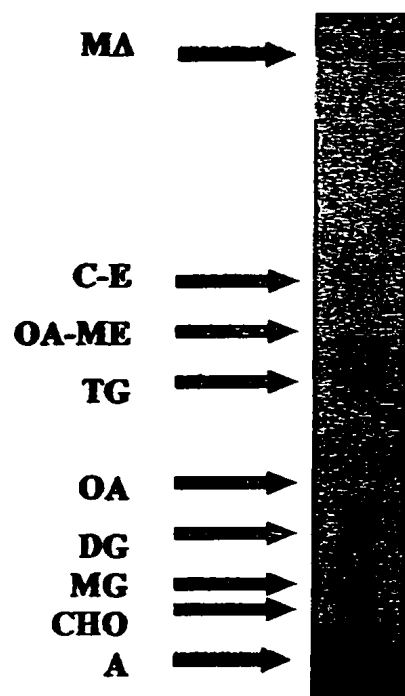


Τάξεις των ουδετέρων λιπιδίων

Για την ανάλυση των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων αποξύνεται από την αντίστοιχη περιοχή της πλάκας το κλάσμα ουδετέρων λιπιδίων, το οποίο όπως φαίνεται στην *Εικόνα 4*, είναι ιδιαίτερα αυξημένο στους ασθενείς με FES. Η περιοχή του πυριτικού οξέος που αντιστοιχεί στο κλάσμα των ουδετέρων λιπιδίων εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer δύο φορές και στη συνέχεια κατεργάζεται, όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία, για τον διαχωρισμό των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων. Οι περιοχές των δειγμάτων που αντιστοιχούν στις περιοχές των προτύπων αποξύνονται από την πλάκα, εκχυλίζονται κατά Bligh-Dyer δύο φορές και τα ενωμένα χλωροφορμικά εκχυλίσματα, αφού εξατμιστούν σε ρεύμα N_2 , κατεργάζονται όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία, για την παρασκευή των μεθυλεστέρων τους. Οι μεθυλεστέρες καθαρίζονται και αναλύονται με αέρια χρωματογραφία (*Εικόνα 5*).

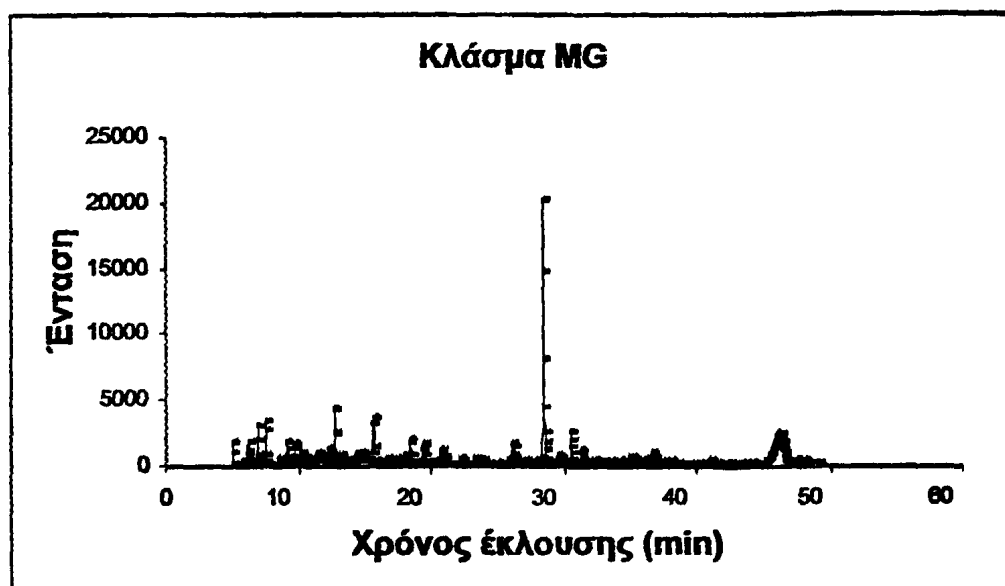


Εικόνα 5: Τυπικός διαχωρισμός ουδετέρων λιπιδίων του BAL μετά από εκχύλιση κατάλληλης ποσότητας δείγματος. Σύστημα έκλουσης: Πετρελαϊκός αιθέρας-δισυθλεθέρας-οξικό οξύ, 80:20:1, v/v



A: αρχή, *MA:* μέτωπο διαλύτη, *CHO:* χοληστερόλη, *MG:* μονογλυκερίδια, *DG:* διγλυκερίδια, *TG:* τριγλυκερίδια, *OA:* ελαϊκό οξύ, *TG:* τριγλυκερίδια, *OA-ME:* μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος, *C-E:* εστέρας χοληστερόλης

Σχήμα 35: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ανάλυσης του κλάσματος των μονογλυκεριδίων ασθενούς με FES



Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων ουδετέρων λιπιδίων έδειξε μία σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) του κλάσματος των ουδετέρων λιπιδίων στους ασθενείς με FES σε σύγκριση και με τις δύο ομάδες ελέγχου, μία σημαντική μείωση ($p < 0.05$) του κλάσματος των τριγλυκεριδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων και μία σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) του κλάσματος των εστέρων χοληστερόλης στους ασθενείς με FES, πάντα σε σύγκριση με τις δυο άλλες ομάδες ασθενών. Στον Πίνακα 16 και στο Σχήμα 36 παρουσιάζονται οι τάξεις των ουδετέρων λιπιδίων στους ασθενείς με FES και στις δύο ομάδες ελέγχου 1 και 2.

Πίνακας 16: Τάξεις των ουδετέρων λιπιδίων στις ομάδες της μελέτης

Σύσταση (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
MG	42.3±21.6*†	23.7±21.4	0
DG	9.5±2.4	13.6±21.4	13.3±8.8
TG	10.1±4.5*†	43.7±14.3	38.1±11.0
FFA	10.8±3.2*†	35.3±7.9	41.2±6.8
C-E	34.8±21.4*†	2.6±1.2	7.3±3.2

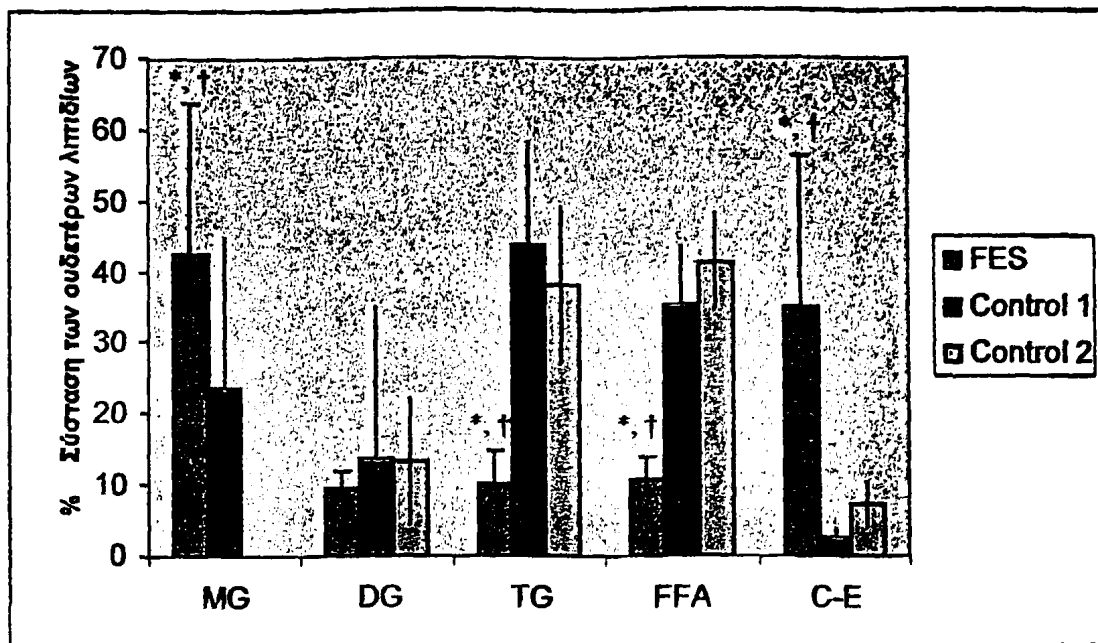
MG: Μονογλυκερίδια , DG: Διγλυκερίδια, TG: τριγλυκερίδια, FFA: ελεύθερα λιπαρά οξέα, C-E: Εστέρες χοληστερόλης

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$



Σχήμα 36: Σχηματική απεικόνιση των τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων σε ασθενείς με FES καθώς και στις δυο ομάδες ελέγχου (control) 1 και 2



MG: μονογλυκερίδια , DG: διγλυκερίδια, TG: τριγλυκερίδια, FFA: ελεύθερα λιπαρά οξέα, C-E: εστέρες χοληστερόλης

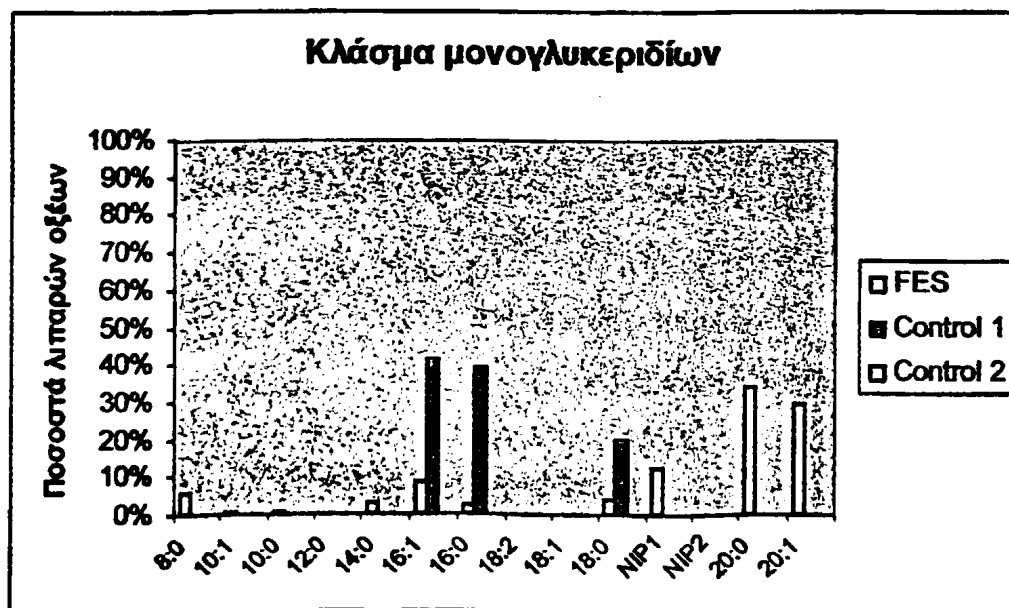
*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1, $p < 0.05$

†: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, $p < 0.05$

Ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων των ουδετέρων λιπιδίων σε λιπαρά οξέα

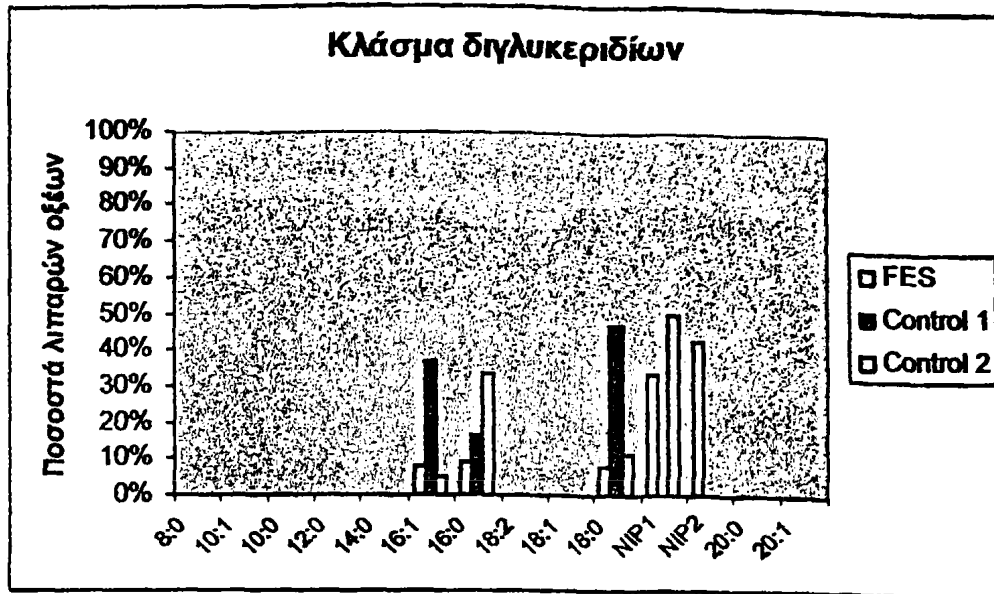
Στα Σχήματα 37-41 και στους Πίνακες 17-21, παρουσιάζονται τα ποσοστά της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα των διαφόρων κλασμάτων των ουδετέρων λιπιδίων στους ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2.

Σχήμα 37: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης του κλάσματος των μονογλυκεριδίων (MG) σε λιπαρά οξέα



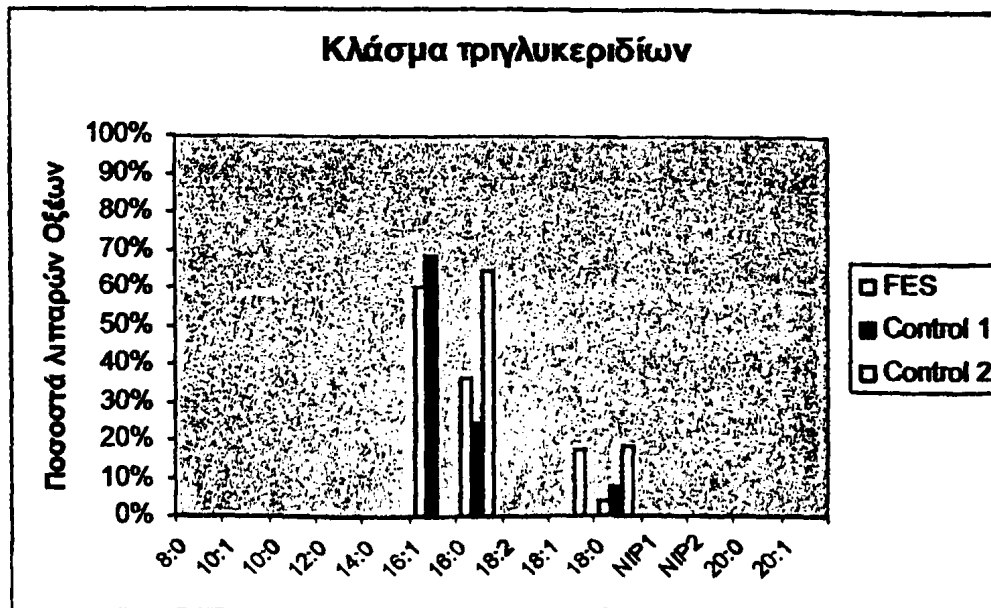
Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοκοιμημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)

Σχήμα 38: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης του κλάσματος των διγλυκεριδίων (DG) σε λιπαρά οξέα

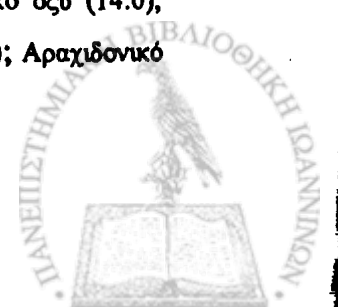


Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)

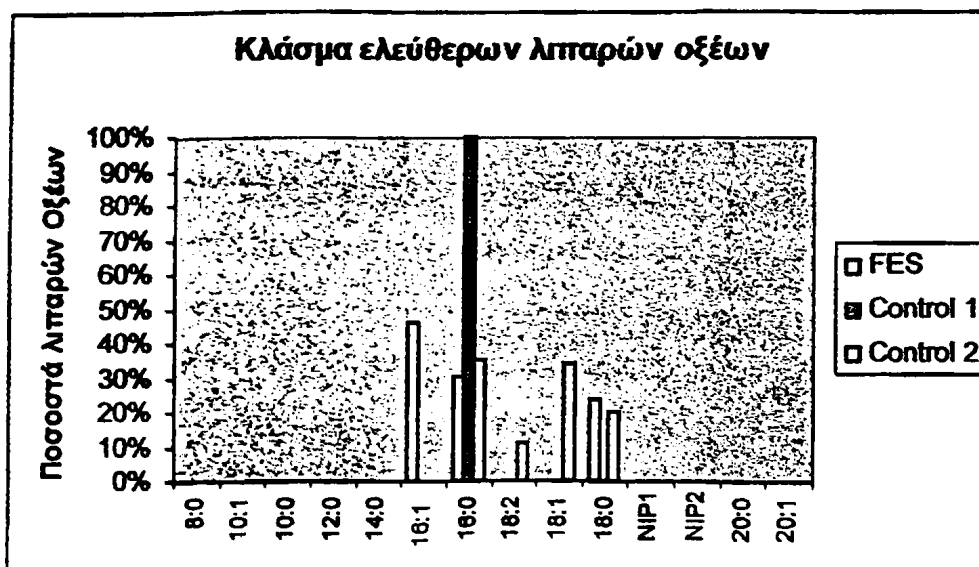
Σχήμα 39: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης του κλάσματος των τριγλυκεριδίων (TG) σε λιπαρά οξέα



Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)

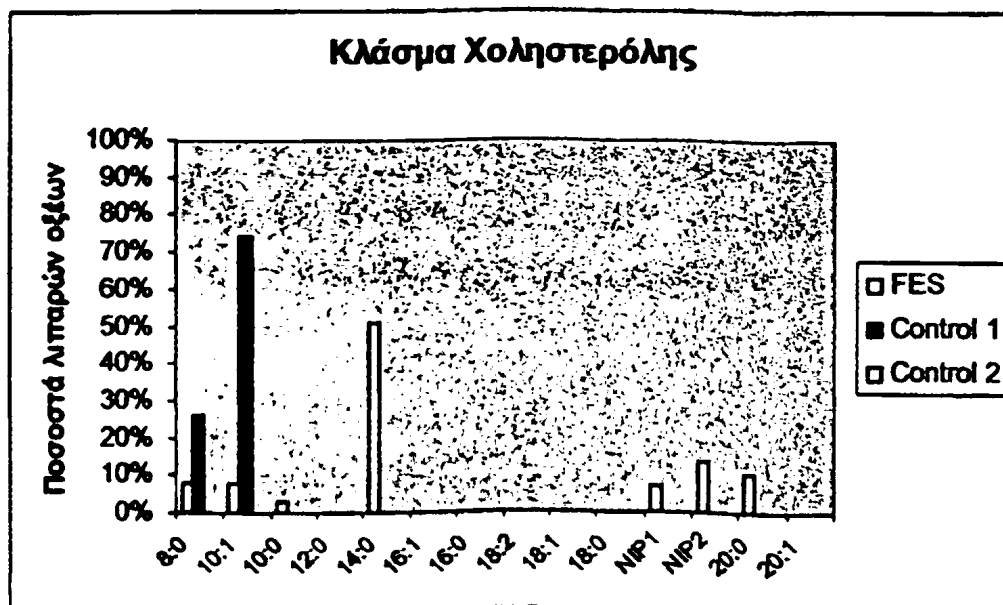


Σχήμα 40: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης του κλάσματος των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) σε λιπαρά οξέα



Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαιϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)

Σχήμα 41: Σχηματική απεικόνιση της σύστασης του κλάσματος της χοληστερόλης σε λιπαρά οξέα



Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαιϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)



Πίνακας 17: Ποσοστά των λιπαρών οξέων στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2

Λιπαρά οξέα (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
8:0	5.70±1.00	0	0
10:1	0.51±0.13	0	0
10:0	0.73±0.40	0	0
12:0	0	0	0
14:0	2.92±1.00	0	0
16:1	8.38±1.80	41.48±12.12	0
16:0	2.18±0.80	38.82±19.10	0
18:2	0	0	0
18:1	0	0	0
18:0	4.20±1.30	19.69±8.90	0
NIP 1	12.29±8.00	0	0
NIP 2	0	0	0
20:0	33.79±12.00	0	0
20:1	29.29±11.00	0	0

Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)



Πίνακας 18: Ποσοστά λιπαρών οξέων στο κλάσμα των διγλυκεριδίων σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου control 1 και 2

Λιπαρά οξέα (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
8:0	0	0	0
10:1	0	0	0
10:0	0	0	0
12:0	0	0	0
14:0	0	0	0
16:1	7.87±0.34	36.63±12.75	5.20±3.12
16:0	8.90±1.34	16.44±8.32	33.42±14.31
18:2	0	0	0
18:1	0	0	0
18:0	7.63±1.76	46.93±26.00	11.38±8.71
NIP 1	33.28±14.50	0	50.00±25.78
NIP 2	42.33±10.11	0	0
20:0	0	0	0
20:1	0	0	0

Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)



Πίνακας 19: Ποσοστά λιπαρών οξέων στο κλάσμα των τριγλυκεριδίων σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2

Λιπαρά οξέα (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
8:0	0	0	0
10:1	0	0	0
10:0	0	0	0
12:0	0	0	0
14:0	0	0	0
16:1	60±13	68±18	0
16:0	36±14	24±12	64±21
18:2	0	0	0
18:1	0	0	0
18:0	4±3	7±4	18±7
NIP 1	0	0	0
NIP 2	0	0	0
20:0	0	0	0
20:1	0	0	0

Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)



Πίνακας 20: Ποσοστά λιπαρών οξέων στο κλάσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2

Λιπαρά οξέα (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
8:0	0	0	0
10:1	0	0	0
10:0	0	0	0
12:0	0	0	0
14:0	0	0	0
16:1	46.0±14.3%	0	0
16:0	30.4±1.3%	100±0%	35.4±12.5%
18:2	0	0	10.8±8.0%
18:1	0	0	33.7±21.7%
18:0	23.4±6.0%	0	20.2±14.6%
NIP 1	0	0	0
NIP 2	0	0	0
20:0	0	0	0
20:1	0	0	0

Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λιγνελαιϊκό οξύ (18:2); Ελαιϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)



Πίνακας 21: Ποσοστά λιπαρών οξέων στο κλάσμα της χοληστερόλης σε ασθενείς με FES και στις ομάδες ελέγχου 1 και 2

Λιπαρά οξέα (%)	FES (n=13)	Control 1-ARDS (n=6)	Control 2 (n=5)
8:0	8.1±1.1	25.9±12.6	0
10:1	8.1±3.0	74.1±23.7	0
10:0	3.1±1.2	0	0
12:0	0	0	0
14:0	50.9±20.1	0	0
16:1	0	0	0
16:0	0	0	35.4
18:2	0	0	10.8±7.8
18:1	0	0	33.7±11.9
18:0	0	0	20.2±5.4
NIP 1	6.5±2.1	0	0
NIP 2	13.3±6.6	0	0
20:0	10.1±6.8	0	0
20:1	0	0	0

Οκτανοϊκό οξύ (8:0); Δεκανοϊκό οξύ (10:0); Λαυρικό οξύ (12:0); Μυριστικό οξύ (14:0); Παλμιτικό οξύ (16:0); Λινελαϊκό οξύ (18:2); Ελαϊκό οξύ (18:1); Στεατικό οξύ (18:0); Αραχιδονικό οξύ (20:0); Μη ταυτοποιημένη κορυφή (NIP 1, NIP 2)

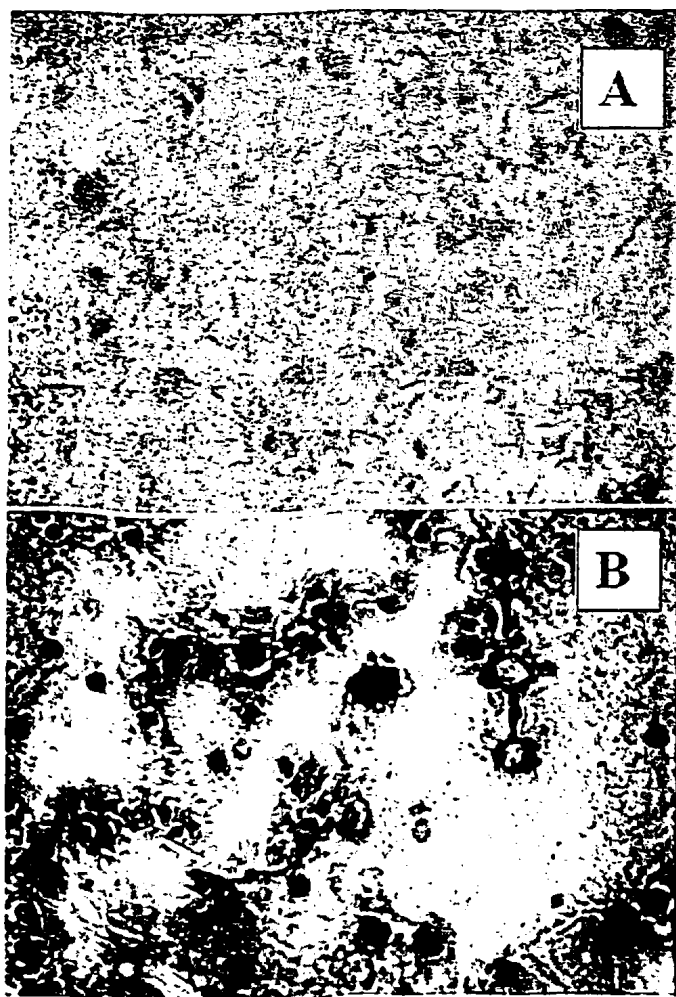


Κύτταρα

Λιπιδικό περιεχόμενο κυττάρων

Το ποσοστό των κυψελιδικών μακροφάγων με έγκλειστα λίπους που βάφτηκαν με τη χρώση Sudan Black B ήταν $34.0 \pm 23.3\%$, $13.0 \pm 8.0\%$ και $2.0 \pm 3.2\%$, στους ασθενείς με FES και στους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2, αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ FES και της ομάδας ελέγχου 2 ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$), σε αντίθεση με τη διαφορά μεταξύ FES και της ομάδας ελέγχου 1 (ARDS) ($p = NS$).

Εικόνα 6: Εικόνα κυψελιδικών μακροφάγων μετά τη χρώση με Sudan Black B, A: σε ασθενή της ομάδας ελέγχου 1 και B: σε ασθενή με λιπώδη εμβολή



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΕΜΒΟΛΗΣ

Πρωτεΐνες

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν στο BAL πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μία ώρα μετά την έναρξη, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής. Παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) των επιπέδων της πρωτεΐνης στο BAL που ελήφθη μία ώρα μετά την έγχυση του μυελού των οστών σε σύγκριση με τα επίπεδα πριν από την έγχυση, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο BAL τείνουν να επανέρχονται στα αρχικά πριν από την έγχυση του μυελού των οστών επίπεδα (Σχήμα 42, Πίνακας 22).

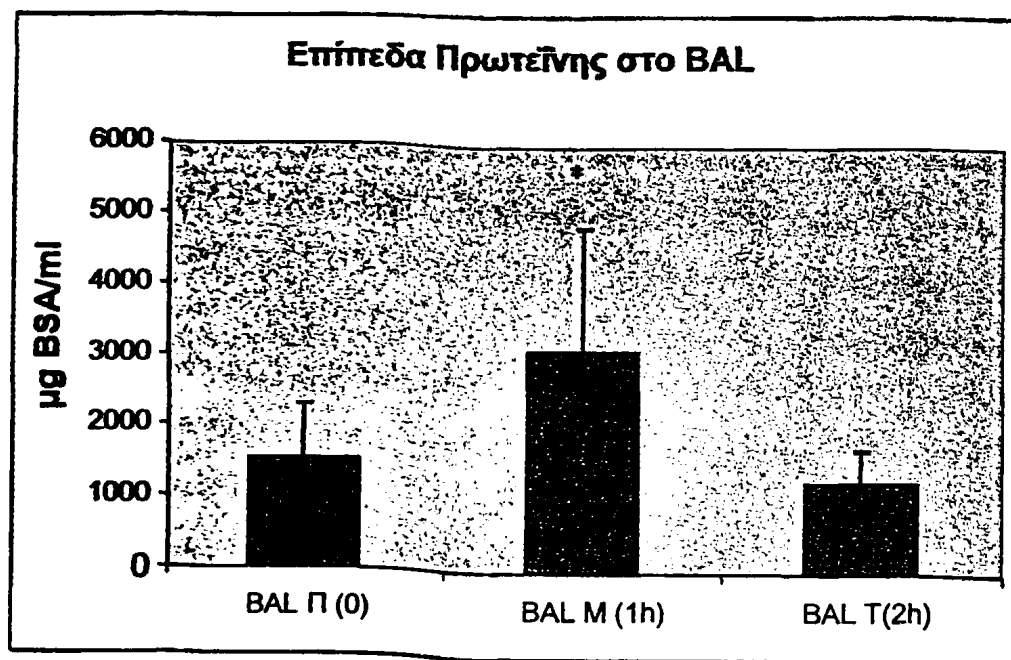
Πίνακας 22: Επίπεδα της πρωτεΐνης στο BAL σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Δείγμα (n=3)	Πρωτεΐνη (μg BSA/ml BAL)
BAL Πρίν (0)	1524±780
BAL Μετά (1h)	3109±1752*
BAL Τέλος (2h)	1280±476

*: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης πριν την έγχυση του μυελού των οστών



Σχήμα 42: Επίπεδα της πρωτεΐνης στο BAL πριν την έγχυση μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



*: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης πριν την έγχυση του μυελού των οστών

Φωσφόρος

Οι μετρήσεις του φωσφόρου έγιναν στα δείγματα του BAL που ελήφθησαν πριν την έγχυση του μυελού των οστών, μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής. Παρατηρήθηκε μία αύξηση των επιπέδων του φωσφόρου μία ώρα μετά την έγχυση του μυελού των οστών, η οποία προσεγγίζει το 29.8% στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής ($p=NS$) (Σχήμα 43, Πίνακας 23). Όσον αφορά τη συγκέντρωση του φωσφόρου ανά mg πρωτεΐνης BAL, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση αυτής ($p<0.05$) μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας σε σύγκριση με την συγκέντρωση του φωσφόρου ανά mg πρωτεΐνης BAL πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής (Σχήμα 44). Ο προσδιορισμός του φωσφόρου έγινε μετά από εκχύλιση κατάλληλης ποσότητας δείγματος BAL.

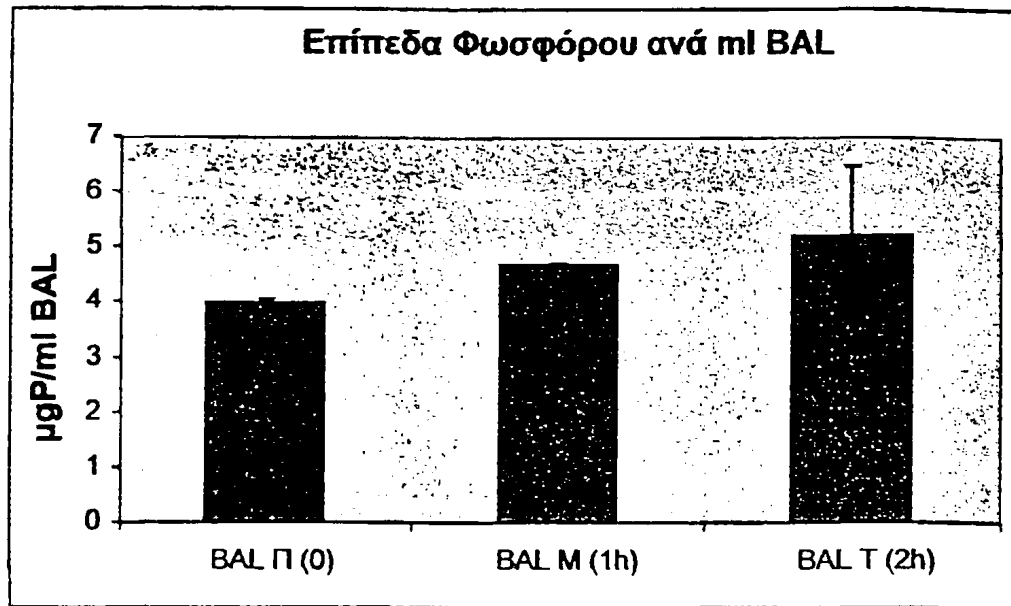
Πίνακας 23: Επίπεδα φωσφόρου στο BAL σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Δείγμα (n=3)	Φώσφορος ($\mu\text{gP/ml BAL}$)
BAL Πρίν (0)	4.0 \pm 0.1
BAL Μετά (1h)	4.7 \pm 0.0
BAL Τέλος (2h)	5.2 \pm 1.3
Δείγμα (n=3)	Φωσφόρος BAL ($\mu\text{gP/mg BSA}$)
BAL Πρίν (0)	0.00260 \pm 0.00008
BAL Μετά (1h)	0.00150 \pm 0.00002
BAL Τέλος (2h)	0.00400 \pm 0.00270†

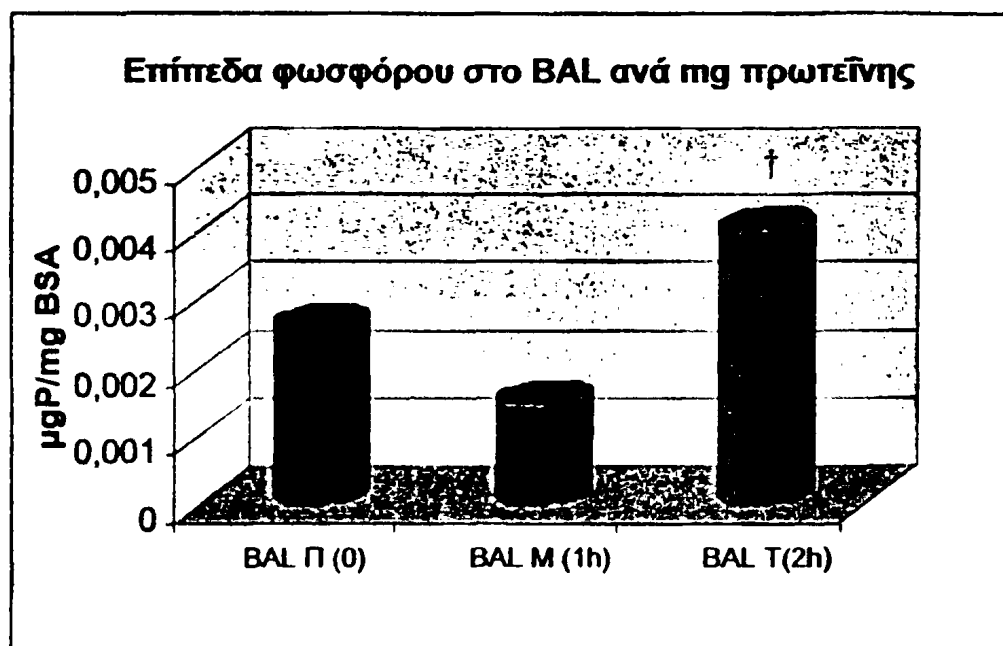
†: Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την τιμή πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής, $p<0.05$



Σχήμα 43: Επίπεδα φωσφόρου ανά ml BAL πριν την έγχυση του μυελού των οστών, μια ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



Σχήμα 44: Επίπεδα φωσφόρου στο BAL ανά mg πρωτεΐνης πριν την έγχυση του μυελού των οστών, μια ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



†: $p < 0.05$ για τη σύγκριση του P του BAL ανά mg πρωτεΐνης με τα επίπεδα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



Ολική Χοληστερόλη

Η συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης προσδιορίστηκε στο BAL, αλλά και στον ορρό τόσο του φλεβικού όσο και του αρτηριακού αίματος που ελήφθησαν πριν την έγχυση του μυελού των οστών, μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής. Παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) των επιπέδων της χοληστερόλης στο BAL που ελήφθη μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών, αύξηση που παρέμεινε και μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής. Αντίθετα, η συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης τόσο στο φλεβικό όσο και στο αρτηριακό αίμα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ($p = NS$) (Σχήμα 45, Σχήμα 46, Πίνακας 24).

Πίνακας 24: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο BAL και στον ορρό αρτηριακού και φλεβικού αίματος σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Δείγμα	Χοληστερόλη (pg chol/mg BSA)
Ορρός Αρτηριακού αίματος Πρίν (0)	1.9±2.6
Ορρός Αρτηριακού αίματος Μετά (1h)	1.6±2.3
Ορρός Αρτηριακού αίματος Τέλος (2h)	1.5±0.3
Ορρός Φλεβικού αίματος Πρίν (0)	1.9±0.2
Ορρός Φλεβικού αίματος Μετά (1h)	1.8±0.8
Ορρός Φλεβικού αίματος Τέλος (2h)	1.5±0.45

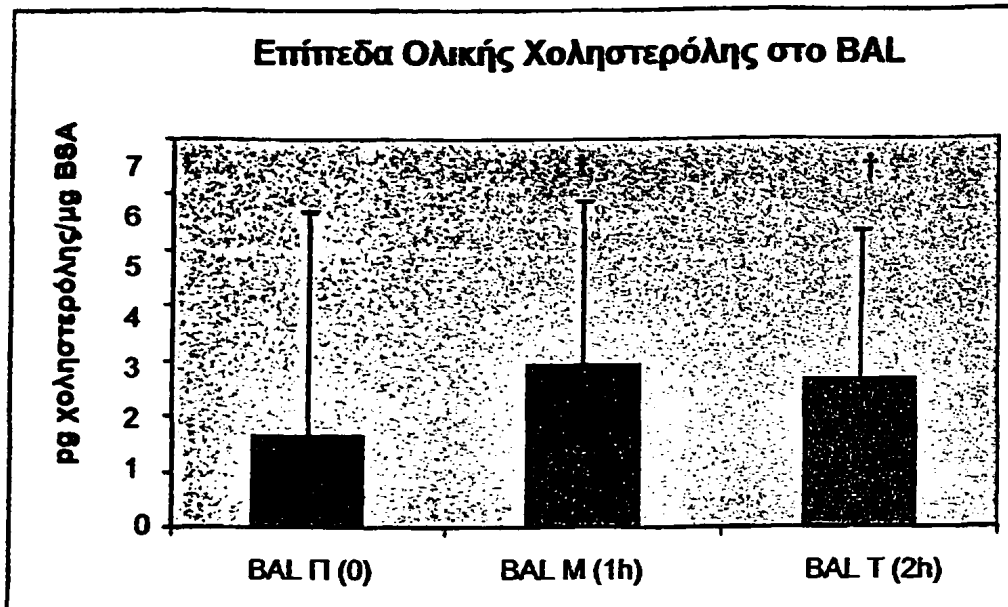
Δείγμα	Χοληστερόλη (pg chol/mg BSA)
BAL Πρίν (0)	1.6±0.72
BAL Μετά (1h)	3.0±2.9*
BAL Τέλος (2h)	2.6±2.7†

*: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τις τιμές της ολικής χοληστερόλης στο BAL πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

†: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τις τιμές της ολικής χοληστερόλης του BAL πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών



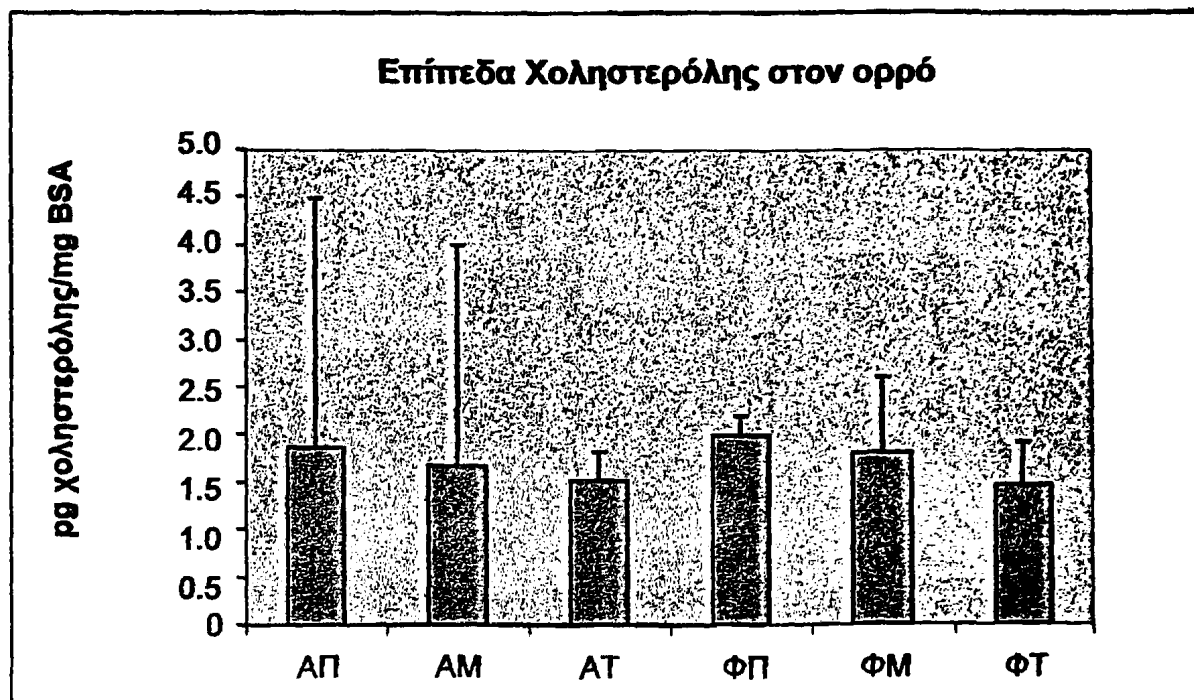
Σχήμα 45: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο BAL που ελήφθη πριν την έγχυση του μυελού των οστών, μία ώρα μετά την έναρξή της και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



*: $p < 0.05$, για τη σύγκριση με τις τιμές της ολικής χοληστερόλης στο BAL πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

†: $p < 0.05$, για τη σύγκριση με τις τιμές της ολικής χοληστερόλης στο BAL πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

Σχήμα 46: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορρό φλεβικού και αρτηριακού αίματος που ελήφθη πριν την έγχυση μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



Α: αρτηριακό αίμα, Φ: φλεβικό αίμα, Π: πριν την έγχυση του μυελού των οστών, Μ: μία ώρα μετά την την έγχυση μυελού των οστών, Τ: δύο ώρες μετά την έγχυση του μυελού των οστών

Εστέρες

Η μέτρηση των ολικών εστέρων στο BAL που ελήφθη πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μία ώρα μετά καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής έδειξε μία σημαντική μείωση των εστέρων μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας εμβολής ($p < 0.05$) σε σύγκριση τις τιμές πριν την έναρξη της έγχυσης. Αντίθετα, η συγκέντρωση των ολικών εστέρων στον ορρό αρτηριακού και φλεβικού αίματος που ελήφθησαν πριν την έγχυση μυελού των οστών, μία ώρα μετά καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά ($p = NS$) Η μέτρηση των εστέρων έγινε μετά από εκχύλιση κατάλληλης ποσότητας δείγματος BAL και ορού όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία (Πίνακας 25, Σχήμα 47).

Πίνακας 25: Επίπεδα ολικών εστέρων στο BAL και στον ορρό αρτηριακού και φλεβικού αίματος σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

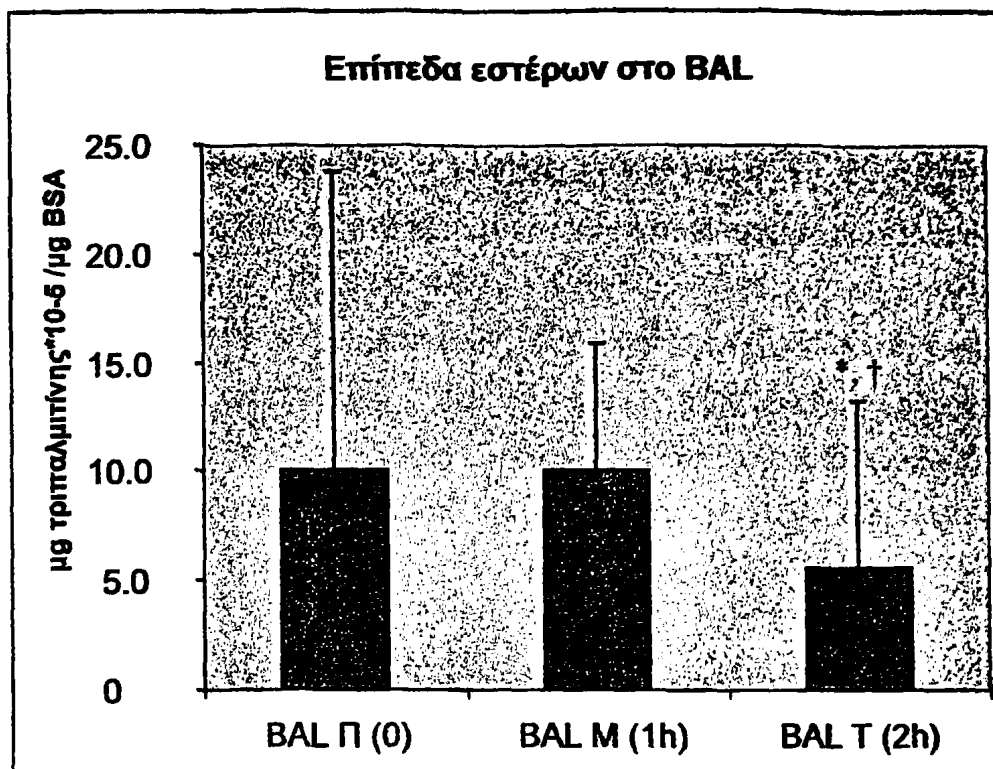
Δείγμα (n=3)	Εστέρες (μg τριπαλμιτίνης/μg BSA)
Ορρός Αρτηριακού αίματος Πρίν (0)	$0.8 \pm 0.1 \times 10^{-5}$
Ορρός Αρτηριακού αίματος Μετά (1h)	$0.8 \pm 0.2 \times 10^{-5}$
Ορρός Αρτηριακού αίματος Τέλος (2h)	$1.1 \pm 0.5 \times 10^{-5}$
Ορρός Φλεβικού αίματος Πρίν (0)	$0.9 \pm 0.3 \times 10^{-5}$
Ορρός Φλεβικού αίματος Μετά (1h)	$1.2 \pm 0.9 \times 10^{-5}$
Ορρός Φλεβικού αίματος Τέλος (2h)	$1.1 \pm 0.7 \times 10^{-5}$
BAL Πρίν (0)	$10.0 \pm 13.8 \times 10^{-5}$
BAL Μετά (1h)	$10.0 \pm 5.9 \times 10^{-5}$
BAL Τέλος (2h)	$5.6 \pm 7.7 \times 10^{-5} \dagger*$

†: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση των ολικών εστέρων στο BAL πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

*: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση των ολικών εστέρων στο BAL μία ώρα μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



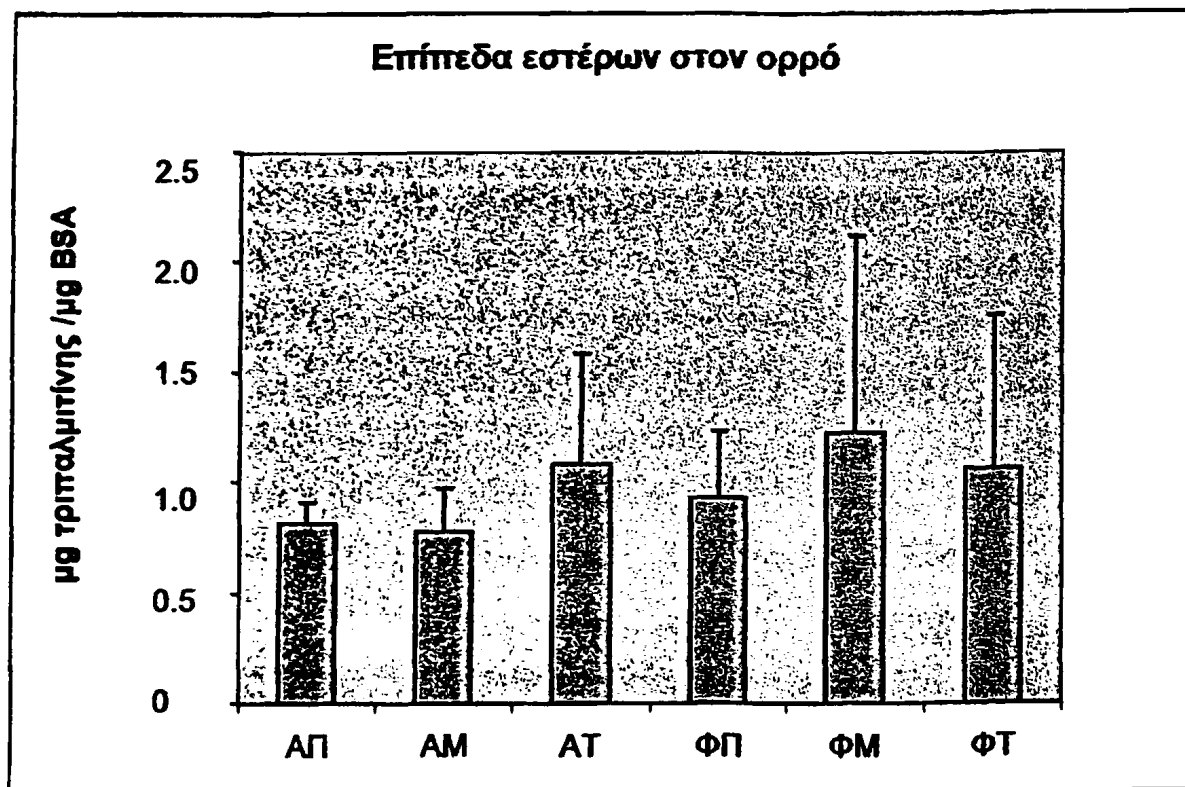
Σχήμα 47: Επίπεδα εστέρων στο BAL που ελήφθη πριν την έγχυση μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



†: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση των ολικών εστέρων στο BAL πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

*: $p < 0.05$ για τη σύγκριση με τη συγκέντρωση των ολικών εστέρων στο BAL μία ώρα μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Σχήμα 48: Επίπεδα εστέρων στον ορρό φλεβικού και αρτηριακού αίματος που ελήφθη πριν την έγχυση μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



Α: αρτηριακό αίμα, Φ: φλεβικό αίμα, Π: πριν την έγχυση του μυελού των οστών, Μ: μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών, Τ: δύο ώρες μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

Φωσφολιπάση A₂

Η σύγκριση της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A₂ στο BAL που ελήφθη πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μία ώρα μετά την έναρξη, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής έδειξε ότι μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών παρατηρήθηκε μια μη σημαντική κατά 27.5% αύξηση της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A₂ ($p=NS$), ενώ μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας αυτή η αύξηση της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A₂ ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ενεργότητά της πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών ($p<0.05$).

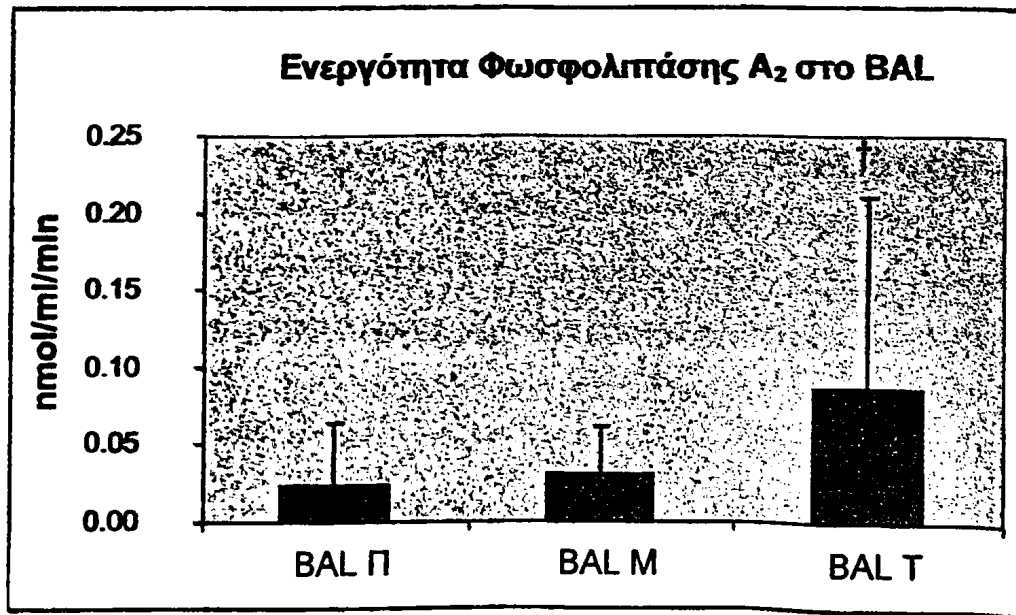
Πίνακας 26: Ενεργότητα της φωσφολιπάσης A₂ στο BAL σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Δείγμα (n=3)	Ενεργότητα Φωσφολιπάσης (nmol/ml/min)
BAL Πρίν (0)	0.02±0.04
BAL Μετά (1h)	0.03±0.03
BAL Τέλος (2h)	0.09±0.12†

†: Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ενεργότητα της PLA₂ πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής, $p<0.05$



Σχήμα 49: Ενεργότητα φωσφολιπάσης A_2 στο BAL που ελήφθη πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής



†: Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ενεργότητα της PLA_2 πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής, $p < 0.05$

PAF-Ακετυλδωρολάση

Η μέτρηση της ενεργότητας της PAF-ακετυλδωρολάσης στο BAL που ελήφθη πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μία ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής έδειξε ότι μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών τα επίπεδα της PAF-ακετυλδωρολάσης μειώθηκαν σημαντικά κατά 47.0% σε σύγκριση με τις τιμές της ενεργότητάς της πριν την έγχυση μυελού των οστών ($p < 0.05$), ενώ μετά το τέλος της διαδικασίας η ενεργότητα της PAF-ακετυλδωρολάσης αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τις τιμές της ενεργότητάς της πριν, καθώς και μία ώρα μετά την έγχυση μυελού των οστών ($p < 0.05$).

Πίνακας 27: Ενεργότητα της PAF-AcH στο BAL στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής

Δείγμα (n=3)	Ενεργότητα PAF-Ακετυλδωρολάσης (nmol/ml/min)
BAL Πρίν (0)	0.11±0.10
BAL Μετά (1h)	0.06±0.10†
BAL Τέλος (2h)	0.24±0.30*‡

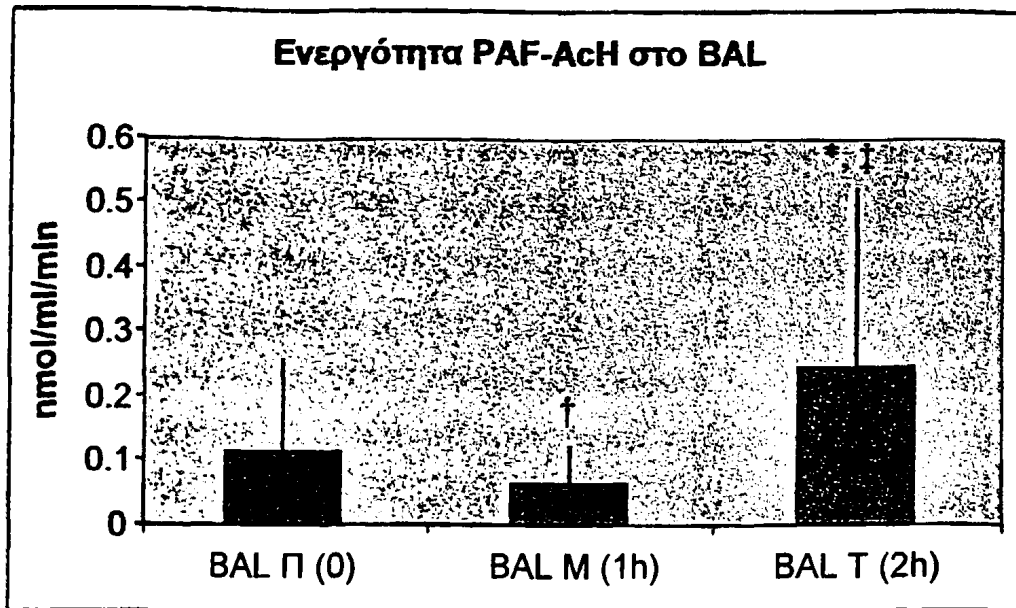
*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

†: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

‡: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών



Σχήμα 50: Ενεργότητα της PAF-AcH στο BAL που ελήφθη πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών, μια ώρα μετά, καθώς και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας λιπώδους εμβολής



*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

†: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

‡: $p < 0.05$ σε σύγκριση με την ενεργότητα της PAF-AcH μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής είναι μια μετατραυματική επιπλοκή, η οποία εμφανίζεται σε ασθενείς με σοβαρά κατάγματα, συνήθως της πυέλου ή των μακρών οστών. Επίσης, μπορεί να επιπλέξει την καρδιαναπνευστική ανάνηψη ή τη θεραπεία με παρεντερική διατροφή. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από μια κλασσική τριάδα συμπτωμάτων και σημείων, τα οποία εμφανίζονται 24-72 ώρες μετά το τραύμα: οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, νευρολογικές διαταραχές και έκθυση πετεχειώδους εξάνθηματος. Συχνά, εντούτοις, ένα ή περισσότερα από αυτά τα ευρήματα απουσιάζουν. Σε ασθενείς μάλιστα με μεμονωμένα αναπνευστικά συμπτώματα, η εμφάνιση υποξαιμίας και πνευμονικών διηθημάτων συχνά συγχέεται με άλλα πιο συχνά προβλήματα σε αυτούς τους ασθενείς, όπως η πνευμονία από εισρόφηση και η πνευμονική θλάση. Επιπλέον, οι νευρολογικές διαταραχές δεν είναι παθογνωμονικές και μπορεί να αποδοθούν από λάθος σε μετατραυματική εγκεφαλική βλάβη ή σε άλλα αίτια. Η διάγνωση επομένως του συνδρόμου δεν είναι εύκολη και συχνά καθυστερεί με αποτέλεσμα να χάνεται πολύτιμος χρόνος για την αντιμετώπιση του ασθενή.

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες εργαστηριακές δοκιμασίες για τη διάγνωση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής, όπως η ανίχνευση λιπιδίων στα ούρα και το αίμα, η μέτρηση της ενεργότητας της λιπάσης του ορού και η ανίχνευση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα κυττάρων που περιέχουν έγκλειστα λίπους. Οι μέθοδοι αυτές, όμως, υστερούν σε ευαισθησία και εξειδίκευση.

Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη για τη διερεύνηση της παθογένεσης της οξείας πνευμονικής βλάβης κατά τη διάρκεια του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής, αλλά και για την εύρεση ειδικών δεικτών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διάγνωση του συνδρόμου. Για το λόγο αυτό σε ασθενείς με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής, οι οποίοι ανέπτυξαν οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια με συνοδό υποξαιμία και χρειάστηκαν μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά η ολική πρωτεΐνη για

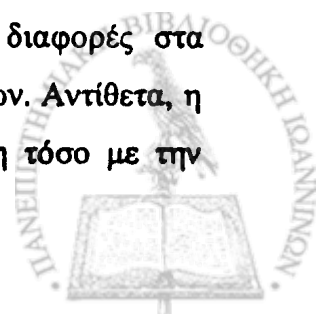


να διερευνηθεί η ακεραιότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης καθώς και τα ολικά φωσφολιπίδια, οι ολικοί εστέρες και η ολική χοληστερόλη στο BAL, τα οποία είναι τα κύρια συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η φλεγμονώδης απόκριση των κυττάρων του πνεύμονα. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν στο BAL αυτών των ασθενών η ενεργότητα της PLA₂ που αποτελεί δείκτη της φλεγμονής, η ενεργότητα της PAF-AcH που χρησιμοποιήθηκε ως αντιφλεγμονώδης δείκτης, καθώς και τα επίπεδα του PAF που αποτελεί ισχυρό μεσολαβητή της φλεγμονής. Κατόπιν, έγινε προσδιορισμός του είδους και του ποσοστού των ουδετέρων λιπιδίων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος των ασθενών με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής με εκείνα των ασθενών με Οξεία Πνευμονική Βλάβη-Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων από άλλους λόγους (ομάδα ελέγχου 1), καθώς και με τα χαρακτηριστικά του BAL από μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς, οι οποίοι δεν εμφάνιζαν καρδιοπνευμονική νόσο (ομάδα ελέγχου 2).

Εργαστηριακά ευρήματα

Τα κύρια εργαστηριακά ευρήματα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με Λιπώδη Εμβολή ήταν:

- 1) αυξημένα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης, φωσφολιπιδίων και ουδετέρων λιπιδίων, ιδιαίτερα της ολικής χοληστερόλης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 και 2 (βλ. σχήμα 32).
- 2) ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων έδειξε μία σημαντική μείωση του κλάσματος των τριγλυκεριδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων και μία σημαντική αύξηση του κλάσματος των εστέρων της χοληστερόλης στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (βλ. σχήμα 36).
- 3) οι μεταβολές στα ποσοστά των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων στους ασθενείς με FES ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ARDS (ομάδα ελέγχου 1): η PC και η PG μειώθηκαν, ενώ η Sph αυξήθηκε και στις δυο ομάδες ασθενών σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά της PE, PS και PI μεταξύ των τριών ομάδων των ασθενών. Αντίθετα, η Lyso-PC ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με FES σε σύγκριση τόσο με την



ομάδα των ασθενών με ARDS (ομάδα ελέγχου 1), όσο και με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 (βλ. σχήμα 26).

- 4) αυξημένη ενεργότητα της φωσφολυτάσης A_2 στους ασθενείς με FES και στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, ενώ η ενεργότητα της φωσφολυτάσης A_2 των ασθενών με FES ήταν περισσότερο αυξημένη και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 (ARDS), εύρημα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διάκριση των ασθενών με FES από αυτούς με ARDS ή πνευμονική βλάβη άλλης αιτιολογίας (βλ. σχήμα 27).
- 5) αυξημένα επίπεδα PAF στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (βλ. σχήμα 29).
- 6) τα αυξημένα επίπεδα PAF είχαν αντίστροφη συσχέτιση με την PAF-AcH στους ασθενείς με FES (βλ. σχήμα 30), ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοια συσχέτιση στις άλλες δύο ομάδες των ασθενών.
- 7) αυξημένη συγκέντρωση των ολικών εστέρων του BAL στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (βλ. σχήμα 31).
- 8) η αεριοχρωματική ανάλυση στο κλάσμα της PC έδειξε μια σημαντική αύξηση στη σύσταση σε ελαϊκό και στεατικό οξύ στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση σε παλμιτικό οξύ στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2 (βλ. σχήμα 34)
- 9) η αεριοχρωματογραφική ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων των μονογλυκεριδίων, των διγλυκεριδίων, των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης έδειξε διαφοροποιήσεις τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES όσο και στην ομάδα των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2 (βλ. σχήματα 37-41). Συγκεκριμένα,
 - όσον αφορά το κλάσμα των μονογλυκεριδίων παρατηρήθηκε στους ασθενείς με FES αυξημένη περιεκτικότητα σε αραχιδονικό οξύ και μειωμένη περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ, καθώς επίσης και μια τάση για αύξηση της περιεκτικότητας των βραχείας αλυσίδας λιπαρών οξέων στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Στους ασθενείς με ARDS παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε παλμιτικό και στεατικό οξύ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.



- Στους ασθενείς με FES παρατηρήθηκε μειωμένη περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ στο κλάσμα των διγλυκεριδίων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, ενώ στους ασθενείς με ARDS παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα στεατικού και παλμιτελαϊκού οξέος και μειωμένη περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.
- Στους ασθενείς με FES όσο και στους ασθενείς με ARDS παρατηρήθηκε στο μειωμένη περιεκτικότητα κλάσμα των τριγλυκεριδίων σε παλμιτικό και στεατικό οξύ και αύξηση της περιεκτικότητας σε παλμιτελαϊκό οξύ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.
- Στους ασθενείς με FES παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε παλμιτελαϊκό οξύ και στους ασθενείς με ARDS αυξημένη περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ στο κλάσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.
- Τέλος, παρατηρήθηκε τόσο στους ασθενείς με FES όσο και στους ασθενείς με ARDS στο κλάσμα της χοληστερόλης αύξηση των βραχείας αλυσίδας λιπαρών οξέων, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.

10) αυξημένος αριθμός κυψελιδικών μακροφάγων που βάφτηκαν με τη χρώση Sudan Black B στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1 και 2, γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα άλλων μελετών που αναφέρουν αύξηση του αριθμού των κυττάρων με έγκλειστα λίπους. Το εύρημα αυτό, όμως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για τη διάγνωση των ασθενών με FES, αλλά μπορεί μαζί με επιπρόσθετα στοιχεία να βοηθήσει στη διάγνωση.

Πειραματικό μοντέλο

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τις υποθέσεις που κάναμε για την παθογένεση των βιοχημικών μεταβολών που συνοδεύουν το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής προχωρήσαμε στη διεξαγωγή κατάλληλου μοντέλου πειραματικής λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα. Στο παρελθόν, έχουν αναφερθεί μελέτες λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα, που όμως αφορούσαν μεμονωμένα τη μέτρηση της ενεργότητας της PLA₂ ή ιστολογικές αναλύσεις που προσδιόριζαν τον αριθμό των κυττάρων με έγκλειστα λίπους. Μελέτες, όμως, των βιοχημικών μεταβολών του BAL σε μοντέλο λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα δεν έχουν



γίνει ως τώρα. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, έγινε λήψη κατάλληλης ποσότητας BAL, καθώς και αρτηριακού και φλεβικού αίματος αμέσως πριν, μία ώρα μετά και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της τεχνητής λιπώδους εμβολής. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούσαν την ολική πρωτεΐνη, τα ολικά φωσφολιπίδια, τους ολικούς εστέρες και την ολική χοληστερόλη. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν οι ενεργότητες της PAF-AcH και της PLA₂.

Τα κύρια εργαστηριακά ευρήματα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και τον ορρό αρτηριακού και φλεβικού αίματος στα πειραματόζωα ήταν:

- 1) αύξηση της ολικής πρωτεΐνης του BAL μία ώρα μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής σε σύγκριση με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης πριν την έγχυση του μυελού των οστών
- 2) αύξηση των ολικών φωσφολιπιδίων του BAL μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των ολικών φωσφολιπιδίων πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών. Η αύξηση αυτή των ολικών φωσφολιπιδίων μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής γίνεται σημαντική σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έγχυση του μυελού των οστών αν υπολογίσουμε τα ολικά φωσφολιπίδια ανά mg πρωτεΐνης (BSA).
- 3) αύξηση της συγκέντρωσης της ολικής χοληστερόλης στο BAL μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών, καθώς και μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής σε σύγκριση με τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης στο BAL πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της ολικής χοληστερόλης στον ορρό του αρτηριακού και του φλεβικού αίματος δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής.
- 4) μείωση της συγκέντρωσης των ολικών εστέρων του BAL δύο ώρες μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών σε σύγκριση με τη συγκέντρωση πριν την έγχυση του μυελού των οστών. Η συγκέντρωση των ολικών εστέρων στον ορρό αρτηριακού και φλεβικού αίματος δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής.

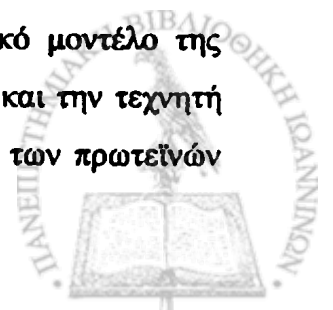


- 5) σημαντική αύξηση της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A_2 μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής σε σύγκριση με τις τιμές πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών.
- 6) μείωση της ενεργότητας της PAF-AcH στο BAL μία ώρα μετά την έγχυση του μυελού των οστών σε σύγκριση με τις τιμές της πριν την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών, ενώ μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής η ενεργότητά της αυξάνεται σημαντικά σε σύγκριση με τις τιμές της πριν καθώς και μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του μυελού των οστών.

Ολική πρωτεΐνη

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 της εισαγωγής, οι πρωτεΐνες αποτελούν βασικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της αναπνοής και στην άμυνα του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του BAL των ασθενών με λιπώδη εμβολή (FES), αλλά και με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS-ομάδα ελέγχου 1) σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν πνευμονική βλάβη (ομάδα ελέγχου 2) δείχνουν μία αύξηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο BAL. Συγκεκριμένα, η ολική πρωτεΐνη στο BAL των ασθενών με FES ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών που δεν εμφάνισαν πνευμονική βλάβη, αλλά και με την ομάδα των ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS). Επιπρόσθετα, στην ομάδα ασθενών με ARDS η ολική πρωτεΐνη στο BAL ήταν αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η αναπνευστική βλάβη στο FES συσχετίζεται με την εισροή πρωτεϊνών του πλάσματος εντός των κυψελίδων εξαιτίας της δυσλειτουργίας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης και της αύξησης της τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας. Στις μελέτες που έχουν γίνει ως τώρα αναφέρεται αύξηση των πρωτεϊνών του BAL σε ασθενείς με ARDS. Η ιδιαίτερα σημαντική αύξηση, όμως, της πρωτεΐνης στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με ARDS θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάγνωση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής.

Το παραπάνω εύρημα επιβεβαιώνεται και από το πειραματικό μοντέλο της λιπώδους εμβολής, στο οποίο μετά την έγχυση μυελού των οστών και την τεχνητή πρόκληση λιπώδους εμβολής παρατηρείται μία σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών



του BAL σε σύγκριση με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών.

Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στον κυψελιδικό χώρο μπορεί να έχει ως συνέπεια τη διαταραχή των βιοφυσικών ιδιοτήτων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, γεγονός που μπορεί να συσχετίζεται με την εμφάνιση υποξαιμίας [254, 255].

Φωσφολιπίδια

Όπως οι πρωτεΐνες του BAL, έτσι και τα φωσφολιπίδια αποτελούν βασικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα (όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 της εισαγωγής, το μεγαλύτερο μέρος του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελείται από φωσφολιπίδια) και επιτελούν πολύ σημαντικό έργο στη λειτουργία της αναπνοής.

Οι μεταβολές του λιπιδικού προφίλ του BAL όσον αφορά τα ολικά φωσφολιπίδια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με FES τα ολικά φωσφολιπίδια ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τις άλλες δυο ομάδες ελέγχου (control 1 και 2). Επιπρόσθετα, στην ομάδα ασθενών με ARDS (control 1) τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων ήταν αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν οξεία πνευμονική βλάβη (control 2). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών [35, 256, 257, 258], στις οποίες το ποσοστό των ολικών φωσφολιπιδίων στην πρόωμη φάση του ARDS ήταν αυξημένο σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν πνευμονική βλάβη. Τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES, όσο και στην ομάδα των ασθενών με ARDS, η λήψη του BAL έγινε κατά τις τρεις πρώτες μέρες, περίοδος η οποία θεωρείται πρόωμη για αυτά τα σύνδρομα.

Σε επίπεδο κυτταρικής φυσιολογίας η αύξηση αυτή των φωσφολιπιδίων στην ομάδα των ασθενών με FES, είναι πιθανό να οφείλεται στο λίπος του μυελού των οστών που εισέρχεται μέσα στις κυψελίδες εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης. Μια δεύτερη πιθανή αιτία είναι η αυξημένη τοπική παραγωγή αυτών των φωσφολιπιδίων εξαιτίας της δυσλειτουργίας των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Εάν η τοπική αυτή αύξηση των φωσφολιπιδίων που παρατηρείται στο FES προέρχεται από αυξημένη παραγωγή, έκκριση ή ατελή επαναπρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II παραμένει



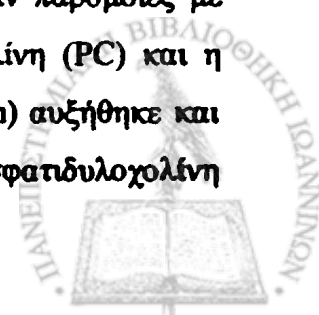
ένα θέμα προς διερεύνηση. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα να συνυπάρχουν και οι τρεις μηχανισμοί.

Η αύξηση αυτή των φωσφολιπιδίων μπορεί να ερμηνευτεί αν λάβουμε υπόψη ότι στην οξεία πνευμονική βλάβη τα πνευμονοκύτταρα τύπου II δυσλειτουργούν και έτσι διαταράσσεται η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, με αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητάς του σε φωσφολιπίδια. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Έχει αναφερθεί ότι διάφοροι φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως η PLA_2 , η PLC, λιπιδικοί μεσολαβητές, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, TNF- α και πρωτεάσες, που εκκρίνονται στον κυψελιδικό χώρο από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, μακροφάγα ή επιθηλιακά κύτταρα, ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [259].

Σε επίπεδο ερεθισμάτων είναι γνωστό ότι η μηχανική αναπνοή οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή φωσφολιπιδίων διαμέσω της ακετυλοχολίνης ή διαμέσω της διέγερσης των β -αδρενεργικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα να αποτελεί και αυτός ο μηχανισμός μια πιθανή εξήγηση για την παρατηρηθήσα αύξηση στη συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων [260, 261, 262]. Τέλος, σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές και ο PAF θα μπορούσε να συμβάλει στην αυξημένη σύνθεση ή /και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [263], οδηγώντας πάλι στην αύξηση των φωσφολιπιδίων. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς με FES τα επίπεδα του PAF βρέθηκαν εξαιρετικά υψηλά σε σύγκριση και με τις δυο ομάδες ελέγχου, εύρημα το οποίο θα συζητηθεί πρακικάτω.

Η αυξημένη συγκέντρωση φωσφολιπιδίων πιθανώς επιδρά στα βιοσυνθετικά μονοπάτια παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων με αποτέλεσμα να επηρεάζει άμεσα τη σύστασή του. Συγκεκριμένα, ο Chander A. και οι συνεργάτες του [264] έχουν δείξει ότι τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να προέρχονται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων που εισέρχονται στον κυψελιδικό χώρο διαμέσω της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης.

Οι ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων στην ομάδα των ασθενών με FES ήταν παρόμοιες με εκείνες στην ομάδα των ασθενών με ARDS. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) μειώθηκαν και η σφηγγομυελίνη (Sph) αυξήθηκε και στις δυο ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη



(lyso-PC) βρέθηκε υψηλότερη στους ασθενείς με FES συγκρινόμενη τόσο με την ομάδα του ARDS (control 1) όσο και με τους ασθενείς του control 2. Η μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης είναι πιθανό να οφείλεται στη δυσλειτουργία των πνευμονοκυττάρων τύπου II, τα οποία αποτελούν την κύρια κυτταρική πηγή προέλευσης για το φωσφολιπίδιο αυτό. Οι διαφοροποιήσεις αυτές επηρεάζουν άμεσα τη βιοφυσική δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [265], με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση υποξαιμίας και πνευμονικού οιδήματος.

Αξιοσημείωτη είναι και η αύξηση που παρατηρείται στη σφιγγομυελίνη (Sph). Συγκεκριμένα, το ποσοστό της Sph είναι ιδιαίτερα αυξημένο στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 της εισαγωγής, η σφιγγομυελίνη (Sph) και ιδιαίτερα ο λόγος PC/Sph συσχετίζεται με την πνευμονική ωριμότητα. Η αύξηση του ποσοστού της Sph στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 και 2 δεν είναι καλά κατανοητή, αλλά μπορεί να συσχετίζεται με την προσπάθεια του οργανισμού να διατηρήσει σταθερό το λόγο PC/Sph, ενώ βρίσκεται σε ένα ιδιαίτερα δυσμενές παθολογικό περιβάλλον.

Το κύριο συστατικό της DPPC είναι το παλμιτικό οξύ. Η μείωση του ποσοστού του παλμιτικού οξέος στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με FES, όπως και στην ομάδα των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε αυτούς τους ασθενείς η DPPC είναι μειωμένη. Οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στη μείωση αυτή δεν είναι καλά γνωστοί. Μια πιθανή εξήγηση για τη μείωση αυτή της DPPC είναι η δυσλειτουργία των πνευμονοκυττάρων τύπου II και συγκεκριμένα η δυσλειτουργία του συστήματος της τρανσακυλάσης, η απομάκρυνσή του με τα υγρά του πνευμονικού οιδήματος [266] και η εισροή PC από την κυκλοφορία, η οποία αλλοιώνει τα ποσοστά των λιπιδίων [267]. Τα ευρήματα της μελέτης μας όσον αφορά τους ασθενείς με ARDS συμφωνούν με τα αποτελέσματα παλιότερων μελετών που έδειξαν μείωση της PC σε αυτούς τους ασθενείς [258, 268, 269, 270].

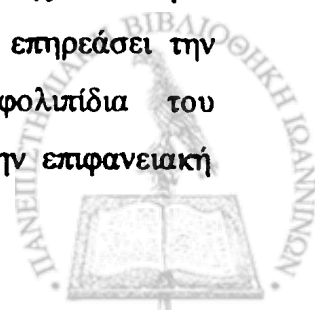


PAF και PAF-ακετυλυδρολάση

Τα επίπεδα του PAF στους ασθενείς με FES βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 1 και 2. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα του PAF εκτός του ότι συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής φωσφολιπιδίων, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι πιθανό να συσχετίζονται με μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Ο PAF θα μπορούσε να εμπλέκεται στην εμφάνιση πνευμονικού οιδήματος εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί διαφυγή από τα μικρά αγγεία [271], να διεγείρει τη βιοσύνθεση φλεγμονωδών μεσολαβητών και να προάγει την πνευμονική φλεβική αγγειοσύσπαση με αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης των τριχοειδών αγγείων [271, 272]. Η πρόσδεση του PAF σε υποδοχείς πάνω στην κυτταρική επιφάνεια θα μπορούσε να ρυθμίζει την απέκκριση, ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων [273]. Ο PAF βιοσυντίθεται από μια ποικιλία κυττάρων περιλαμβανομένων των κυψελιδικών μακροφάγων, των ουδετερόφιλων και των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Η δράση του είναι τοπική και γρήγορα διασπάται από την PAF-AcH προς τον ανενεργό λυσο-PAF [274]. Η PAF-AcH παίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα του PAF να δρά ως αυτακοειδές [275]. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας, η PAF-AcH σε ασθενείς με FES έχει αντίστροφη συσχέτιση με τον PAF, γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι και η PAF-AcH παράγεται τοπικά. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ PAF και PAF-AcH στους ασθενείς με ARDS από άλλες αιτίες δεν είναι πλήρως κατανοητό [35]. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι στους ασθενείς με ARDS η PAF-AcH προέρχεται κυρίως από το πλάσμα, όπου και υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Φωσφολιπάση A₂

Η παραγωγή του PAF ρυθμίζεται από την PLA₂, η οποία τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES, όσο και σε αυτήν των ασθενών με ARDS ήταν αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Στο πειραματικό μοντέλο επίσης της λιπώδους εμβολής παρατηρήθηκε μία αύξηση της PLA₂ μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της λιπώδους εμβολής σε σύγκριση με την ενεργότητα της PLA₂ πριν την έναρξη της έγχυσης μυελού των οστών. Η PLA₂ μπορεί να επηρεάσει την πνευμονική λειτουργία είτε άμεσα, υδρολύοντας τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων και αυξάνοντας την επιφανειακή

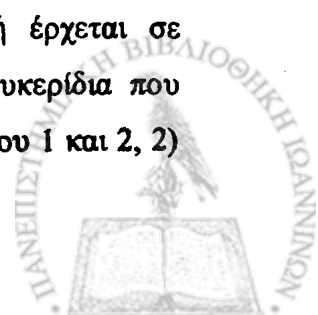


τάση [276, 277], είτε έμμεσα διαμέσω της παραγωγής βιολογικά δραστικών μορίων όπως ο PAF, η λυσο-PC και τα εικοσανοειδή.

Η PLA₂ μπορεί να παράγεται τοπικά στον πνεύμονα από φλεγμονώδη κύτταρα και να εκκρίνεται στον κυψελιδικό χώρο. Εντούτοις, κύρια πηγή της PLA₂ στον πνεύμονα θεωρούνται τα κυψελιδικά μακροφάγα [278]. Επιπρόσθετα, ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων όπως αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και ουδετερόφιλα παράγουν και εκκρίνουν PLA₂ μετά από τη διέγερσή τους [279]. Συγκεκριμένα, η PLA₂ στο BAL μπορεί να είναι εκκρινόμενη (sPLA₂) ή να είναι κυτοσολική. Η έκκριση της PLA₂ από τα κύτταρα ενεργοποιείται με την επίδραση διαφόρων φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Πιθανά, όμως, μέρος της PLA₂ του BAL να είναι κυτοσολική και να ανιχνεύεται στο BAL εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων. Η cPLA₂ εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος και είναι επαγόμενο ένζυμο.

Ουδέτερα λιπίδια

Η άμεση ανάμειξη της PLA₂ στην παθογένεση του ARDS αποδεικνύεται από μία μελέτη που έγινε σε μοντέλο με πειραματόζωα, όπου δείχθηκε η αύξηση του ενζύμου, αναλογικά μάλιστα με τη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης [280]. Τα υψηλά επίπεδα λυσο-PC που βρήκαμε στην ομάδα των ασθενών με FES δείχνουν ότι η PLA₂ πιθανώς εμπλέκεται στην παθογένεση του συνδρόμου, δεδομένου ότι η PLA₂ καταλύει την αποδόμηση της PC προς λυσο-PC και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Εντούτοις, το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους ασθενείς με FES ήταν χαμηλότερο σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με ARDS (control 1), ενώ ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το εύρημα θα μπορούσε να αποτελεί η τρανσακυλίωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε εστέρες χοληστερόλης (πιθανόν διαμέσω της ακυλ-CoA-χολεστερυλ-ακυλτρανσφεράσης). Η εκδοχή αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, σύμφωνα με τα οποία οι εστέρες χοληστερόλης στην ομάδα ασθενών με FES βρέθηκαν σημαντικά αυξημένοι σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε αυτή τη διαδικασία θα μπορούσαν να προέρχονται: 1) από τα τριγλυκερίδια, τα οποία μετατρέπονται σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα διαμέσω της ενεργοποίησης της λιπάσης των τριγλυκεριδίων. Η εκδοχή αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αυξημένα μονογλυκερίδια και τα μειωμένα τριγλυκερίδια που βρέθηκαν στο BAL ασθενών με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2, 2)



από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων και ιδιαίτερα της PC εξαιτίας της αυξημένης ενεργότητας PLA₂. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, στην οποία το ποσοστό της PC ήταν σημαντικά μειωμένο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2.

Οι διαφοροποιήσεις στη σύσταση των κλασμάτων των μονογλυκεριδίων, των διγλυκεριδίων, των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES, όσο και στην ομάδα των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2 υποδεικνύουν την ενεργοποίηση των μηχανισμών αποικοδόμησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά την παθογένεση αυτών των συνδρόμων. Συγκεκριμένα, οι διαφοροποιήσεις στη σύσταση των κλασμάτων των ουδετέρων λιπιδίων μπορεί να οφείλονται στην κατάτμηση των λιπαρών αλυσίδων στις θέσεις των διπλών δεσμών με σκοπό τη δημιουργία μορίων-μιμητών του PAF.

Τέλος, η αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών εστέρων στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τους ασθενείς με ARDS και τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου II επιβεβαιώνει την αυξημένη συγκέντρωση των ουδετέρων λιπιδίων, αφού αποτελεί δείκτη αυτών. Τα αυξημένα επίπεδα των ουδετέρων λιπιδίων και ιδιαίτερα της χοληστερόλης, όπως και των εστέρων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης. Η χοληστερόλη και οι ολικοί εστέρες μπορούν να μετρηθούν με σχετική ευκολία και για το λόγο αυτό και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφορική διάγνωση των ασθενών με FES από τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης που βρέθηκαν στο BAL των ασθενών με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής, αλλά και σε ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 2 δείχνουν την ύπαρξη αυξημένης τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής βλάπτει τον τριχοειδοκυψελιδικό φραγμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση οξείας πνευμονικής βλάβης με συνοδό πνευμονικό οίδημα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν άλλες μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν σε ασθενείς με ARDS, ενώ καμία παρόμοια μελέτη δεν είχε γίνει ως τώρα σε ασθενείς με FES. Η σημαντική αυτή αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τους ασθενείς με ARDS θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάγνωση του FES.
2. Στους ασθενείς με FES τα ολικά φωσφολιπίδια ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τις άλλες δυο ομάδες ελέγχου (control 1 και 2). Επιπρόσθετα, στην ομάδα ασθενών με ARDS (control 1) τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων ήταν αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν οξεία πνευμονική βλάβη (control 2). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών, στις οποίες το ποσοστό των ολικών φωσφολιπιδίων στην πρόιμη φάση του ARDS ήταν αυξημένο σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν πνευμονική βλάβη.
3. Οι ποιοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων στην ομάδα των ασθενών με FES ήταν παρόμοιες με εκείνες στην ομάδα των ασθενών με ARDS. Οι διαφοροποιήσεις αυτές επηρεάζουν άμεσα τη βιοφυσική δραστικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση υποξαιμίας και πνευμονικού οιδήματος.
4. Οι διαφοροποιήσεις στη σύσταση των κλασμάτων των μονογλυκεριδίων, των διγλυκεριδίων, των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της



χοληστερόλης τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES, όσο και στην ομάδα των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2 υποδεικνύουν την ενεργοποίηση των μηχανισμών αποικοδόμησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά την παθογένεση αυτών των συνδρόμων.

5. Η αυξημένη ενεργότητα της PLA_2 που βρέθηκε στους ασθενείς με λιπώδη εμβολή πιθανά οφείλεται σε αυξημένη τοπική παραγωγή και έκκριση στον κυψελιδικό χώρο από τα φλεγμονώδη κύτταρα. Πράγματι, μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και ουδετερόφιλα παράγουν και εκκρίνουν PLA_2 μετά από διέγερσή τους. Τα υψηλά αυτά επίπεδα φωσφολιπάσης A_2 επηρεάζουν άμεσα την πνευμονική λειτουργία προκαλώντας αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ του BAL διαμέσω ενεργοποίησης ενζυμικών ή οξειδωτικών διαδικασιών (πχ. υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα). Η πνευμονική λειτουργία επηρεάζεται και έμμεσα από την PLA_2 διαμέσω της παραγωγής βιολογικά δραστικών μορίων, όπως είναι ο PAF, η λυσο-PC και τα εικοσανοειδή. Με τον τρόπο αυτό η PLA_2 προάγει την φλεγμονή στο Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής με αποτέλεσμα η ανεύρεση αυξημένων επιπέδων της να μπορεί πιθανά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης ή ακόμη και πρόγνωσης. Στο παρελθόν, μόνο η PLA_2 του ορρού έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης του FES. Τα αυξημένα επίπεδα της PLA_2 οδηγούν σε αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ του BAL με ενεργοποίηση των ενζυμικών ή οξειδωτικών διαδικασιών. Επιπλέον, η PLA_2 και η PAF-AcH θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προαγωγή ή την μείωση, αντίστοιχα, της φλεγμονής στο FES.
6. Η PAF-AcH, η οποία βοηθά στη μείωση της φλεγμονής, βρέθηκε να έχει αντίστροφη συσχέτιση με τον PAF, τα επίπεδα του οποίου στους ασθενείς με λιπώδη εμβολή ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2. Τα αυξημένα επίπεδα PAF, εκτός του ότι συμβάλουν στην αύξηση της παραγωγής φωσφολιπιδίων, είναι πιθανό να συσχετίζονται με μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Τα παραπάνω μας οδηγούν στη σκέψη ότι η PAF-AcH παράγεται τοπικά προκειμένου να ανταγωνιστεί τις προφλεγμονώδεις δράσεις του PAF. Τα παραπάνω ευρήματα περιγράφονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.



7. Τα επίπεδα των ουδετέρων λιπιδίων και ιδιαίτερα της χοληστερόλης, στους ασθενείς με λιπώδη εμβολή ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2. Είναι φανερό ότι οι αυξημένες αυτές συγκεντρώσεις προέρχονται από τον μυελό των οστών, ο οποίος αποτελεί την πηγή των λιπιδικών εμβόλων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων της χοληστερόλης στους ασθενείς με λιπώδη εμβολή σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2 πιθανά οφείλεται στην τρανσακυλίωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων προς εστέρες χοληστερόλης πιθανά διαμέσω του ενζύμου ακυλ-CoA-χολεστερύλ-ακυλτρανσφεράση. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται είτε από τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα με τη δράση της λιπάσης των τριγλυκεριδίων, είτε από φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα από τη φωσφατιδυλοχολίνη με υδρόλυσή τους από την PLA₂. Η αύξηση των ουδετέρων λιπιδίων και ιδιαίτερα της χοληστερόλης και των εστέρων της χοληστερόλης που παρατηρήθηκαν στο BAL ασθενών με λιπώδη εμβολή σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2 αποτελούν πολύ σημαντικά ευρήματα, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης, δεδομένου ότι μπορούν να μετρηθούν εύκολα και να διαχωρίσουν τους ασθενείς με FES από τους ασθενείς με ARDS.
8. Η χρώση των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκκλύματος των ασθενών με λιπώδη εμβολή έδειξε ότι ο αριθμός των κυψελιδικών μακροφάγων με έγκλειστα λίπους ήταν αυξημένος σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου 1 και 2, αποτελέσματα που είναι σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία.
9. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω ευρήματα προχωρήσαμε στη διεξαγωγή κατάλληλου πειραματικού μοντέλου λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα. Στο παρελθόν, έχουν αναφερθεί μελέτες λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα, που όμως αφορούσαν μεμονωμένα τη μέτρηση της ενεργότητας της PLA₂ ή ιστολογικές αναλύσεις που προσδιόριζαν τον αριθμό των κυττάρων με έγκλειστα λίπους. Μελέτες όμως των βιοχημικών μεταβολών σε μοντέλο λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα δεν έχουν γίνει. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας επιβεβαιώνουν τις υποθέσεις που κάναμε για την παθογένεση των βιοχημικών μεταβολών που συνοδεύουν το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής. Συγκεκριμένα, τα ολικά φωσφολιπίδια, η ολική



πρωτεΐνη, η PLA₂ και η χοληστερόλη του BAL μετά την έγχυση του μυελού των οστών αυξήθηκαν σε σύγκριση με τα επίπεδά τους πριν την έναρξη της έγχυσης, ενώ η PAF-AcH μειώθηκε.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής είναι μια μετατραυματική επιπλοκή, η οποία εμφανίζεται σε ασθενείς με σοβαρά κατάγματα, συνήθως της πυέλου ή των μακρών οστών. Επίσης, μπορεί να επιπλέξει την καρδιοαναπνευστική ανάνηψη ή τη θεραπεία με παρεντερική διατροφή. Σύμφωνα με την επικρατούσα εκδοχή τα ουδέτερα λιπίδια αρχικά εισέρχονται στον πνεύμονα και προκαλούν απόφραξη των τριχοειδών αγγείων, ενώ στη συνέχεια οι λιπάσες που υπάρχουν τοπικά υδρολύουν αυτά τα λιπίδια απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία όμως είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον πνεύμονα. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από μια κλασική τριάδα συμπτωμάτων και σημείων, τα οποία εμφανίζονται 24-72 ώρες μετά το τραύμα: οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, νευρολογικές διαταραχές και έκθυση πετεχειώδους εξάνθηματος. Συχνά, εντούτοις, ένα ή περισσότερα από αυτά τα ευρήματα απουσιάζουν. Σε ασθενείς μάλιστα με μεμονωμένα αναπνευστικά συμπτώματα, η εμφάνιση υποξαιμίας και πνευμονικών διηθημάτων συχνά συγχέεται με άλλα πιο συχνά προβλήματα, όπως η πνευμονία από εισρόφηση και η πνευμονική θλάση. Επιπλέον, οι νευρολογικές διαταραχές δεν είναι παθογνωμονικές και μπορεί να αποδοθούν από λάθος σε μετατραυματική εγκεφαλική βλάβη ή σε άλλα αίτια. Η διάγνωση επομένως του συνδρόμου δεν είναι εύκολη και συχνά καθυστερεί με αποτέλεσμα να χάνεται πολύτιμος χρόνος για την αντιμετώπιση του ασθενή.

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες εργαστηριακές δοκιμασίες για τη διάγνωση του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής, όπως η ανίχνευση λιπτοσφαιρίων στα ούρα και στο αίμα, η μέτρηση της ενεργότητας της λιπάσης του ορρού και η ανίχνευση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα κυττάρων που περιέχουν έγκλειστα λίπους. Οι μέθοδοι αυτοί, όμως, υστερούν σε ευαισθησία και ειδικότητα, και για το λόγο αυτό η εύρεση ειδικών δεικτών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διάγνωση αυτού του συνδρόμου είναι πολύ σημαντική.

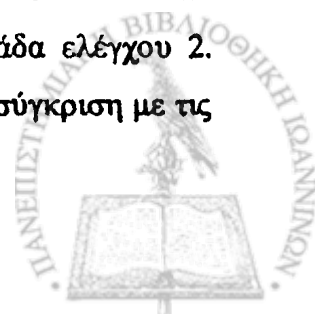
Σκοπός της εργασίας μας ήταν η διερεύνηση της παθογένεσης της οξείας πνευμονικής βλάβης κατά τη διάρκεια του Συνδρόμου της Λιπώδους Εμβολής και η εύρεση ειδικών δεικτών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διάγνωση αυτού του συνδρόμου. Για το λόγο αυτό σε ασθενείς με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής, οι οποίοι ανέπτυξαν οξεία αναπνευστική



ανεπάρκεια με συνοδό υποξαιμία και χρειάστηκαν μηχανική υποστήριξη της αναπνοής προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά η ολική πρωτεΐνη, τα ολικά φωσφολιπίδια, οι ολικοί εστέρες και η ολική χοληστερόλη στο BAL. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν στο BAL αυτών των ασθενών οι ενεργότητες της PAF-AcH και της PLA₂, καθώς και τα επίπεδα του PAF. Κατόπιν, έγινε προσδιορισμός του είδους και του ποσοστού των ουδετέρων λιπιδίων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος των ασθενών με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής με εκείνα των ασθενών με οξεία πνευμονική βλάβη-Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων από άλλους λόγους (ομάδα ελέγχου 1) και από μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς, οι οποίοι δεν εμφάνιζαν καρδιοπνευμονική νόσο (ομάδα ελέγχου 2).

Τα κύρια εργαστηριακά ευρήματα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με λιπώδη εμβολή ήταν:

- 1) αυξημένα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης, φωσφολιπιδίων και ουδετέρων λιπιδίων, ιδιαίτερα της ολικής χοληστερόλης σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.
- 2) σημαντική μείωση του κλάσματος των τριγλυκεριδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων και μία σημαντική αύξηση του κλάσματος των εστέρων της χοληστερόλης στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.
- 3) οι μεταβολές στα ποσοστά των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων στους ασθενείς με FES ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με ARDS (ομάδα ελέγχου 1).
- 4) αυξημένη ενεργότητα της φωσφολιπάσης A₂ σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.
- 5) αυξημένα επίπεδα PAF σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.
- 6) τα αυξημένα επίπεδα PAF είχαν αντίστροφη γραμμική συσχέτιση με την PAF-AcH μόνο στους ασθενείς με FES.
- 7) αυξημένη συγκέντρωση των ολικών εστέρων του BAL στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.
- 8) μια σημαντική αύξηση στη σύσταση του κλάσματος της PC σε ελαϊκό και στεατικό οξύ στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση σε παλμιτικό οξύ σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου 1 και 2.



- 9) Η ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων των μονογλυκεριδίων, των διγλυκεριδίων, των τριγλυκεριδίων, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης έδειξε διαφοροποιήσεις τόσο στην ομάδα των ασθενών με FES όσο και στην ομάδα των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση του παλμιτικού οξέως που υποδηλώνει μείωση της DPPC, ενώ οι διαφοροποιήσεις στη σύσταση των κλασμάτων των ουδετέρων λιπιδίων μπορεί να οφείλονται στην κατάτμηση των λιπαρών αλυσίδων στις θέσεις των διπλών δεσμών με σκοπό τη δημιουργία μορίων-μμητών του PAF.
- 10) αυξημένος αριθμός κυψελιδικών μακροφάγων που βάφτηκαν με τη χρώση Sudan Black B στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης που βρέθηκαν στο BAL των ασθενών με το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής και σε ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου 2 δείχνουν την ύπαρξη αυξημένης τριχοειδοκυψελιδικής διαπερατότητας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής βλάπτει τον τριχοειδοκυψελιδικό φραγμό, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οξείας πνευμονικής βλάβης με συνοδό πνευμονικό οίδημα. Η σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης στους ασθενείς με FES σε σύγκριση με τους ασθενείς που εμφάνισαν πνευμονική βλάβη από ARDS, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του FES.

Η αυξημένη αυτή τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα της μεμβράνης μπορεί να αποτελεί μία πιθανή εξήγηση και για την αύξηση που παρατηρείται στα ολικά φωσφολιπίδια. Μια δεύτερη πιθανή εξήγηση για αυτή την αύξηση των ολικών φωσφολιπιδίων αποτελεί η αύξηση της παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα και/ή της έκκρισής του από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II εξαιτίας της διέγερσης αυτών των κυττάρων από μηχανικά ή χημικά ερεθίσματα.

Η αυξημένη ενεργότητα PLA₂ που βρέθηκε στους ασθενείς με λιπώδη εμβολή σε σύγκριση και με τις δυο ομάδες ελέγχου πιθανά οφείλεται σε αυξημένη τοπική παραγωγή και έκκριση στον κυψελιδικό χώρο από τα φλεγμονώδη κύτταρα. Πραγματικά, μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και ουδετερόφιλα παράγουν και εκκρίνουν PLA₂ μετά από διέγερσή τους. Τα υψηλά αυτά επίπεδα φωσφολιπίδωσης επηρεάζουν άμεσα την πνευμονική λειτουργία προκαλώντας αλλαγές στο λιπιδικό προφίλ του BAL



διαμέσω ενεργοποίησης ενζυμικών ή οξειδωτικών διαδικασιών (πχ. υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα). Η πνευμονική λειτουργία επηρεάζεται και έμμεσα από την PLA_2 διαμέσω της παραγωγής βιολογικά δραστικών μορίων, όπως είναι ο PAF, η λυσο-PC και τα εικοσανοειδή. Με τον τρόπο αυτό η PLA_2 προάγει την φλεγμονή στο Σύνδρομο της Λιτώδους Εμβολής με αποτέλεσμα η εύρεση αυξημένων επιπέδων της να μπορεί πιθανά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης ή ακόμη και πρόγνωσης, αν και απαιτούνται περισσότερες μελέτες. Στο παρελθόν, μόνο η PLA_2 του ορού έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης

Η PAF-AcH, η οποία βοηθά στη μείωση της φλεγμονής, βρέθηκε να έχει αντίστροφη γραμμική συσχέτιση με τον PAF μόνο στην ομάδα των ασθενών με FES, τα επίπεδα του οποίου στους ασθενείς με λιτώδη εμβολή ήταν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση και με τις δυο ομάδες ελέγχου. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στη σκέψη ότι η PAF-AcH παράγεται τοπικά προκειμένου να ανταγωνιστεί τις προφλεγμονώδεις δράσεις του PAF. Τα παραπάνω ευρήματα περιγράφονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Τα επίπεδα των ουδετέρων λιπιδίων και ιδιαίτερα της χοληστερόλης στους ασθενείς με λιτώδη εμβολή βρέθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα σε σύγκριση με τους ασθενείς των ομάδων ελέγχου 1 και 2. Είναι φανερό ότι οι αυξημένες αυτές συγκεντρώσεις ουδετέρων λιπιδίων προέρχονται από τον μυελό των οστών, ο οποίος αποτελεί την πηγή των λιπδικών εμβόλων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων της χοληστερόλης στους ασθενείς με Λιτώδη Εμβολή πιθανά οφείλεται στην τρανσακυλίωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων προς εστέρες χοληστερόλης πιθανά διαμέσω του ενζύμου ακυλ-CoA-χολεστερυλ-ακυλτρανσφεράσης. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται είτε από τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα με τη δράση της λιπάσης των τριγλυκεριδίων, είτε από φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα από τη φωσφατιδυλοχολίνη με υδρόλυσή τους από την PLA_2 . Η αύξηση των ουδετέρων λιπιδίων και ιδιαίτερα της χοληστερόλης και των εστέρων της χοληστερόλης που παρατηρήθηκαν στο BAL ασθενών με Λιτώδη Εμβολή σε σύγκριση με τις δυο ομάδες ελέγχου αποτελούν πολύ σημαντικά ευρήματα, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης, δεδομένου ότι μπορούν να μετρηθούν εύκολα και να διαχωρίσουν τους ασθενείς με FES από τους ασθενείς με ARDS και τους ασθενείς χωρίς πνευμονική βλάβη.



Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω συμπεράσματα, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή κατάλληλου μοντέλου πειραματικής λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα. Στο παρελθόν, έχουν αναφερθεί μελέτες λιπώδους εμβολής σε πειραματόζωα, που όμως αφορούσαν μόνο την ενεργότητα της PLA₂ ή ιστολογικές αναλύσεις. Σύμφωνα με το πρωτόκολο, έγινε λήψη κατάλληλης ποσότητας BAL, καθώς και αρτηριακού και φλεβικού αίματος αμέσως πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το τέλος της διαδικασίας της τεχνητής λιπώδους εμβολής. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούν την ολική πρωτεΐνη, τα ολικά φωσφολιπίδια, τους ολικούς εστέρες και την ολική χοληστερόλη. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν οι ενεργότητες της PAF-AcH και της PLA₂. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων επιβεβαιώνουν τις υποθέσεις που κάναμε για την παθογένεση των βιοχημικών μεταβολών στο BAL που συνοδεύουν το Σύνδρομο της Λιπώδους Εμβολής.



SUMMARY

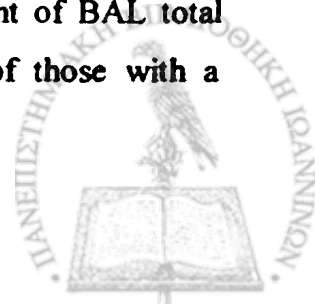
The Fat Embolism Syndrome (FES) is a posttraumatic complication, which is usually encountered in patients with serious injuries, especially those with pelvic or long bone fractures. It can also occur as a complication during cardiopulmonary resuscitation or lipid infusion used for parenteral feeding.

The aim of this study was to investigate the pathogenesis of acute lung injury during FES and to identify diagnostic markers through the evaluation of BAL (Bronchoalveolar Lavage) fluid alterations in trauma patients. In this direction, patients with FES who developed acute hypoxemic respiratory failure requiring mechanical ventilation were studied. BAL characteristics of the patients with FES were compared to those from patients with acute lung injury – acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) from other risk factors except FES and from mechanically ventilated patients without cardiopulmonary disease.

The major laboratory findings on BAL fluid of patients with fat embolism where: 1) increased levels of total protein, phospholipids and neutral lipids, especially of total cholesterol, 2) elevated activities of PLA₂, and 3) increased levels of PAF inversely correlated with PAF-AcH.

The increased protein levels in BAL fluid of patients with FES were a consistent finding, signifying an increase in alveolar-capillary permeability. This indicates that FES is associated with an alveolar-capillary barrier disorder leading to an acute lung injury with high permeability pulmonary edema. Of note, the increased concentration of protein in the alveolar space could further disturb the biophysical properties of surfactant resulting in hypoxemia.

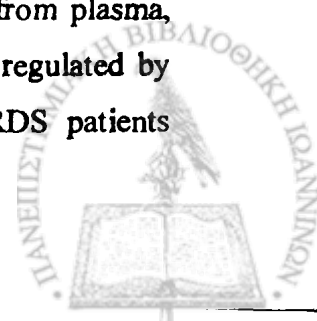
An interesting finding in this study was the prominently high concentration of neutral lipids and especially that of total cholesterol and cholesterol esters in BAL from all FES patients compared to both control and ARDS patients. The origination of neutral lipids is clearly from bone marrow, where they exist in high concentrations. The levels of total cholesterol and cholesterol esters can distinguish FES from ARDS due to other causes. Therefore, the measurement of BAL total cholesterol levels could be a diagnostic tool of FES, at least of those with a manifestation of acute lung injury.



Total phospholipid content in the FES was significantly higher compared to both controls and ARDS patients. Total phospholipids were also elevated in ARDS patients in comparison to normal group. In a previous work we have observed an increase of total phospholipids during early ARDS. In both groups, FES and ARDS, the BAL was performed during the first three days, period which is considered as early phase of the disease. This increase of phospholipids in FES could derive first from the bone marrow fat passing into the alveolar space through the increased alveolar-capillary membrane permeability and secondly from a local production, or probably to both. Whether the local increase of phospholipids was caused by an enhanced production, secretion or by a defect in reuptake of phospholipids by type II alveolar cells remains to be elucidated. It is known that hyperventilation promotes phospholipid production by acetylcholine or beta-adrenergic agonists-mediated mechanisms. Finally, PAF, according to some investigators could increase surfactant production and/or secretion. It is of note that PAF was found in very high levels in BAL fluid from FES compared to both control and ARDS patients.

The qualitative alterations of surfactant were similar with those of ARDS patients. The decrease of PC could be attributed to a dysfunction of type II alveolar cells, which are the main cellular source for these phospholipids. These alterations could directly affect surfactant biophysical activity.

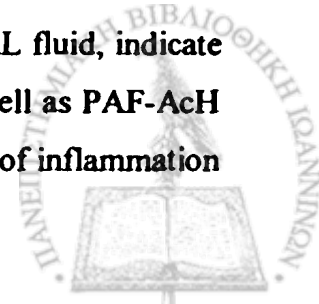
Elevated PAF levels could be related to a local inflammatory reaction. PAF could be implicated in pulmonary edema formation because of its ability to cause microvascular leaking, to stimulate biosynthesis of potent inflammatory mediators, as well as to induce pulmonary venous vasoconstriction increasing the pulmonary capillary pressure. PAF binding to cell surface receptor could regulate recruitment, activation and adhesion of neutrophils. It is synthesized by a variety of cells including alveolar macrophages, neutrophils and alveolar epithelial cells and acts locally, because it is rapidly inactivated by the circulating PAF-AcH. PAF-AcH plays a major role in the potential for PAF to function as an autacoid. The fact that PAF-AcH has inverse correlation with PAF may suggest that PAF-AcH is also locally produced. The fact that no correlation was found between PAF and PAF-AcH in ARDS patients from other reasons is not well understood. One explanation could be that in ARDS patients the majority of PAF-AcH was originating from plasma, where it exists in high concentrations. The production of PAF is also regulated by phospholipase A₂, which was increased in FES as well as in ARDS patients



compared to controls. Phospholipase A₂ can affect pulmonary function either directly, by hydrolyzing lung surfactant phospholipids and increasing surface tension or indirectly, through the production of biologically active molecules such as platelet-activating factor (PAF), lyso-phosphatidylcholine and eicosanoids. PLA₂ could be produced locally by inflammatory cells and secreted into the alveolar space. Alveolar macrophages are also considered as major source of PLA₂ in the lung. In addition, various cell types, such as platelets, mast cells, fibroblasts, macrophages and neutrophils produce and secrete PLA₂ following stimulation.

The involvement of phospholipase A₂ in ARDS has been shown in a study with animal models where the enzyme was increased in correlation with the severity of lung injury. The high levels of lyso-phosphatidylcholine in our patients with FES strongly indicate that PLA₂ is implicated in the pathogenesis of the syndrome, given that PLA₂ catalyses the degradation of PC to lyso-PC and free fatty acids. Against our expectations though, the percentage of free fatty acids in our patients with FES was lower compared to ARDS group, although it was higher than in our normal group. One explanation for this could be the transacylation of free fatty acids to cholesterol esters (possibly via acyl-CoA-cholesterol acyltransferase), which were found to be significantly increased. The free fatty acids used as substrates in this procedure could possibly derive: 1) from triglycerides which are converted to monoglycerides through a triglyceride lipase activation. This interpretation is in consistence to the increased monoglycerides and the decreased triglycerides in BAL from our patients with FES compared to both controls 1 and 2 2) from phospholipids and especially from PC due to the increased phospholipase A₂ activity. Of note, PC was decreased in FES patients in comparison with our normal group.

In conclusion, the high levels of protein concentration in BAL fluid from FES patients strongly suggests an increased capillary-alveolar membrane permeability. This confirms that FES is a risk factor for acute lung injury. The increased capillary-alveolar membrane permeability could also be an explanation for the observed increase of total phospholipids. This increase of total phospholipids could also signify an increase of surfactant production and/or secretion by type II alveolar cells. The stimulation of type II cells could be mechanical or chemical. The increased levels of PLA₂ activity, leading to changes in the lipid profile of BAL fluid, indicate activation of enzymic or oxidation processes. Therefore, PLA₂ as well as PAF-AcH could play an important role in the development or down-regulation of inflammation



in FES, respectively. Finally, the increase of neutral lipids and especially cholesterol and esters in BAL fluid could be a significant diagnostic tool and might clearly distinguish patients with FES from controls and those with ARDS.



ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Tsagaris H, Kitsioulis EI, Lahana A, Karagiorga G, Lekka ME, Nakos G. The alteration of biochemical parameters in BAL of patients with ventilator-associated pneumonia (VAP). Oral presentation in the 7th Hellenic Conference of Intensive Care, 7-10 October 1999, Athens.
2. Karagiorga G, Nakos G, Kitsakos A, Lekka ME. Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid from patients with Fat Embolism. Poster presentation in the Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Athens 2001.
3. Karagiorga G, Nakos G, Lekka ME. Biochemical parameters of Bronchoalveolar lavage fluid from patients with Fat Embolism. Poster presentation in the State of the Art, Athens 2002.
4. Karagiorga G, Nakos G, Lekka ME Biochemical parameters of Bronchoalveolar lavage fluid from patients with Fat Embolism. Poster presentation in the International Conference of Biochemistry of Lipids, September 2002 Athens.



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Karagiorga G, Nakos G, Lekka ME. Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in fat embolism. Am J Respir Crit Care Med (under review).



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

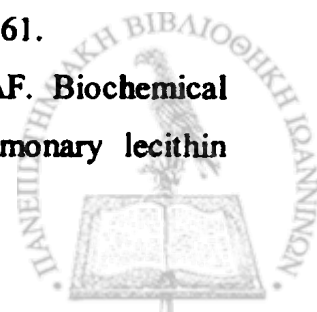
1. Zenker FA. Beitrage zur Anatomie und Physiologie der Lunge. Dresden: J Braunsdorf, 1862.
2. Wagner E. Die Fettemboli der Lungencapillaren. Arck Heilkunde 1913; 4:369-381.
3. von Bergman EB. Zur Lehre von der Fettemboli. Dorpat: EJ Darrow, 1863.
4. Scriba J. Untersuchungen uber die Fettemboli. Deut Zschir Chir 1980; 12:118-220.
5. von Wichert P, Joseph K, Muller B. Bronchoalveolar lavage. Quantification of intraalveolar fluid. Am Rev Respir Dis 1993; 147:148-152.
6. Mellor A, Soni N. Fat embolism. Anaesthesia 2001; 56:145-154.
7. Pell AC, Hughes D, Keating J, Christie J, Busuttill A, Sutherland GR. Brief report: fulminating fat embolism syndrome caused by paradoxical embolism through a patient foramen ovale. N Engl J Med 1993; 329:926-929.
8. Sevit S. The significance and pathology of fat embolism. Ann Clin Res 1977; 9:173-180
9. Gurd AR, Wilson RI. The Fat Embolism Syndrome. Br J Bone Joint Surg 1974; 56B:408-416.
10. Nolte WJ, Olofsson T, Scheersten T, Lewis H. Evaluation of the Gurd test for fat embolism. B J Bone Joint Surg 1974; 56B:417-420.
11. Lindeque BJ, Schoeman HS, Dommissie GF, Boeyens MC, Vlok AL. Fat Embolism and the Fat Embolism Syndrome. A double blind therapeutic study. Br J Bone Joint Surg 1987; 69:128-131.
12. Bulger EM, Smith DG, Maier RV, Jurkovich GJ. Fat Embolism Syndrome A 10-year review. Arch Surgery 1997; 132:435-439.
13. Tachakra SS. Distribution of skin petechiae in fat embolism rash. Lancet 1976; 1:84-85.
14. Jaffe FA. Petechial hemorrhages. A review of pathogenesis. Am J Med Pathol 1994; 15:2043-2047.
15. Arthurs MH, Morgan OS, Sivapragasam S. Fat embolism Syndrome following long bone fractures. W Ind Med J 1993; 42:115-117.



16. Jacobson DM, Terrence CF, Reinmuth OM. The neurologic manifestations of fat embolism. *Neurology* 1986; 36:847-851.
17. Fabian TC, Hoots AV, Stanford TS, Patterson CR, Mangiante EC. Fat embolism syndrome: prospective evaluation of in 92 fracture patients. *Crit Care Med* 1990; 18:42-46.
18. Scopa M, Magatti M, Rossito P. Neurologic symptoms in fat embolism syndrome: case report. *J Trauma* 1994; 36:906-908.
19. Jacobovitz-Derks D, Derks CM. Pulmonary neutral fat embolism in dogs. *Am J Pathol* 1979; 95:30-38.
20. Riseborough EJ, Herndon JH. Alterations in pulmonary function, coagulation and fat metabolism in patients with fractures of the lower limbs. *Clin Orthop Rel Res* 1976; 115:248-267.
21. van Besouw JP, Hinds CJ. Fat Embolism Syndrome. *Br J Hosp Med* 1989; 42:304-311.
22. Moylan JA, Birnbaum M, Katz A, Everson MA. Fat emboli syndrome. *J Trauma* 1976; 16:341-347.
23. Chastre J, Fagon JY, Soler P. Bronchoalveolar lavage for rapid diagnosis of the fat embolism syndrome in trauma patients. *Ann Intern Med* 1990; 113:583-588.
24. Mimos O. Contribution of bronchoalveolar lavage to the diagnosis of posttraumatic pulmonary fat embolism. *Int Care Med* 1995; 21:973-980.
25. Arbibe A, Vial D, Rosinsky-Chupin I, Havet N, Huerre M, Vargaftig BB, Touqui L. Endotoxin induces expression of phospholipase A₂ during acute lung injury in guinea pigs. *J Immunol* 1997; 159:391-400.
26. Arbibe A, Vial D, Touqui L. Phospholipase A₂ and acute respiratory distress syndrome. *Prog Surg* 1997; 24:79-87.
27. Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:1-2.
28. Nielson DW, Lewis MB. Calcium increases in pulmonary alveolar fluid in lambs at birth. *Pediatr Res* 1988; 24:322-325.
29. Touqui L, Arbibe L. A role for phospholipase A₂ in ARDS pathogenesis. *Mol Med Today* 1999; 5:244-249.



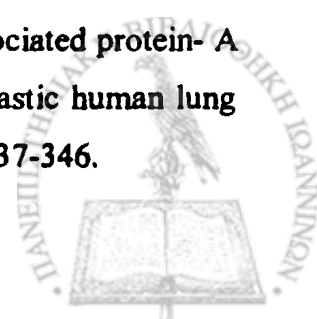
30. Niewoehner DE, Rice K, Sinha AA, Wangenstein D. Injurious effects of lysophosphatidylcholine on barrier properties of alveolar epithelium. *J Appl Physiol* 1987; 63:1979-1986.
31. Lindhal M, Hede AR, Tagesson C. Lysophosphatidylcholine increases airway and capillary permeability in the isolated perfused rat lung. *Exp Lung Res* 1986; 11:1-12.
32. Holm BA, Keicher L, Liu M, Sokolowsky J, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant by phospholipases. *J Appl Physiol* 1991; 71:317-321.
33. Capper EA, Marsall LA. Mammalian phospholipases A₂: mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* 2001; 40:167-197.
34. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntire TM, Prescott SAM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991; 266:16667-16673.
35. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early, intermediate and late phases of ARDS. *Int Care Med* 1998; 24:296-303.
36. Farr RS, Cox CP, Wardlow ML, Jorgensen R. Preliminary studies of an acid labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 1980; 15:318-330.
37. Rautanen M. Catalytic activity of phospholipase A₂ in serum in experimental fat embolism in pigs. *Eur J Surg* 1997; 163:449-456.
38. Notter RH, Tabak SA, Mavis RD. Surface properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J Lipid Res* 1980; 1:10-22.
39. King RJ, MacBeth MC. Interaction of the lipid and protein components of pulmonary surfactant. Role of phosphatidylglycerol and calcium. *Biochim Biophys Acta* 1981; 647:159-168.
40. Suzuki Y. Effect of protein, cholesterol and phosphatidylglycerol on the surface activity of the lipid-protein complex reconstituted from pig pulmonary surfactant. *J Lipid Res* 1982; 23:62-69.
41. Suzuki Y, Nakai E, Ohkawa K. Experimental studies on the pulmonary surfactant. Reconstitution of surface-active material. *J Lipid Res* 1982; 23:53-61.
42. Gluck L, Kulovich MV, Eidelman AI, Cordero L, Khazin AF. Biochemical development of surface activity in mammalian lung. IV. Pulmonary lecithin



- synthesis in the human fetus and newborn and etiology of the respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 1972; 6:81-99.
43. Hallman M, Feldman BH, Kirkpatrick E, Gluck L. Absence of phosphatidylglycerol (PG) in respiratory distress syndrome in the newborn. Study of the minor surfactant phospholipids in newborns. *Pediatr Res* 1977; 1:714-772.
 44. Hallman M, Spragg R, Harrel JM, Moser KM. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 1982; 7:673-683.
 45. Bangham AD, Morley CJ, Phillips MC. The physical properties of an effective lung surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1979; 573:552-556.
 46. Colacicco G, Basu MK. *J Coll Interface Sci* 1977; 61:516-518.
 47. Hildebran JN, Goerke J, Clements JA. Pulmonary surface film stability and composition. *J App Physiol* 1979; 47:604-611.
 48. Tanaka Y, Takei T, Kanazawa Y. Lung surfactants. II. Effects of fatty acids, triacylglycerols and protein on the activity of lung surfactant. *Chem Pharm Bull* 1983; 31:4100-4109.
 49. Stanley L. Robbins, MD, Ramzi S, Cotran, MD. Sec Ed.
 50. West JB. *Respiratory Physiology- the essentials*, 3rd edition.
 51. Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. *Pulmonary diseases and disorders*, 3rd Edition, McGraw-Hill, USA, 1998.
 52. Wright JR, Clemens JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:426-444.
 53. Keough KMW. Physical chemistry of pulmonary surfactant in the terminal air spaces. *Pulmonary surfactant: From molecular biology to clinical practice*. Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, (eds) Amsterdam: Elsevier, 1992:109-164.
 54. Battenburg JJ. *Surfactant Therapy for Lung Disease*. Robertson B, Taeusch HW, (eds) Marcel Dekker Inc, NY, 1995.
 55. von Neergaard K. Neue Auffassungen ueber einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhanging von der Oberflachenspannung in den alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 1929; 66:373-394.



56. Pattle RE. Properties function and origin of the alveolar lining fluid. *Nature* 1955; 175:1125.
57. van Golde LMG, Butenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: Biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 1988; 68: 374-455.
58. Nunn JF. *Nunn's Applied Respiratory Physiology*. Butterworth-Heinemann, 1993.
59. King RJ. Pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1982; 53:1-8.
60. King RJ, Klements JA. Surface active materials from dog lung II. Composition and physiological correlations. *Am J Physiol* 1972; 223:L715-L726.
61. Sanders RL. The composition of pulmonary surfactant. *Lung development: Biological and clinical Perspectives*. Farrel PM, eds.
62. Rooney SA. The surfactant system and lung phospholipids biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1985; 53:1-8
63. Gluck L, Motoyama EK, Smits HL, Kulovits MV. The biochemical development of surface activity in mammalian lung. I. The surface -active phospholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the in the lung of the developing rabbit fetus. *Pediatr Res* 1967; 1:237-246.
64. Gluck L, Kulovits MV, Borer RC, Benner PH, Anderson GG, Spellacy WN. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obst Gynecol* 1971; 109:440-445.
65. Vos T, Eistetter H, Scaffer K, Engel J. Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36: structural homology with the complement factor Clq. *J Mol Biol* 1988; 201:219-227.
66. Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, Hawgood S, Clements JA. Studies of the structure of lung surfactant surfactant protein SP- A. *Am J Physiol* 1989; 257:L421-L429.
67. Hawgood S. Pulmonary surfactant apoproteins: A review of protein and genomic structure. *Am J Physiol* 1989; 257:L13-L22.
68. Possmayer F. The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:749-752.
69. Broers JL, Jensen SM, Travis WD, Pass H, Whittset JA, Singh G, Katyal SL, Gazdar AF, Minna JD, Linnoila RI. Expression of surfactant associated protein- A and Clara cell 10 kilodalton mRNA in neoplastic and non neoplastic human lung tissue as detected by in situ hybridization. *Lab Invest* 1992; 337:337-346.



70. Hawgood S. The hydrophilic surfactant protein SP- A: molecular biology, structure and function. In: Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam, Elsevier 1992:33-54.
71. Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1991; 266:3068-3073.
72. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:75-81.
73. Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ. Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 1991; 39:1331-1336.
74. Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:1010-1014.
75. Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA. Surfactant associated protein inhibits phospholipids secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 1987; 63:692-698.
76. Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs LG, Clements JA. Surfactant apoprotein Mr=26000-36000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem* 1987; 63:692-698.
77. Tzuzuki A, Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A- mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993; 265:L193-L199.
78. Haagsman HP, Casals C, De Haas CGM. Endocytosis of surfactant protein A (SP-A) and lipids by type II cells studied by laser flow cytometry. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:A145.
79. Weaver TE, Whitsett JA. Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *Am J Physiol* 1989; 257:L100-L108.
80. Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver TE, Pilot-Matias T, Fox JL, Whitsett JA. c-DNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant associated proteolipid SPL (Phe). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:4007-4011.



81. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 2002; 347:2141-2148.
82. Phelps DS, Floros J. Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:939- 942.
83. Robertson B, Kobayashi T, Ganzuka M, Grossman G, Li WZ, Suzuki Y. Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant associated protein SP- B. *Pediatr Res* 1991; 30:239-243.
84. Grossman G, Suzuki Y, Robertson B, Kobayashi T, Berggren P, Li WZ, Song GW, Sun B. Pathophysiology of neonatal lung injury induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant associated protein SP- B. *Pediatr Res* 1991; 30:239-243.
85. Horowitz AD, Moussavian B, Witsert JA. Roles of SP-A, SP-B, SP-C, in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1996; 270:L69-L79.
86. Persson A, Rust K, Chang D. CP-4: a pneumocyte- derived collagenous surfactant- associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins. *Biochemistry* 1988; 27:8576-8584.
87. Lu JH, Wiedemann H, Holmskov U, Thiel S, Timpl R, Reid KB. Structural similarity between lung surfactant protein D and conglutinin – 2 distinct, C type lectins containing collagen like sequences. *Eur J Biochem* 1993; 215:793-799.
88. Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y, Orgasavara Y, van Golde LM, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP- D) in type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1589-1597.
89. Crouch E, Rust K, Persson A, Mariencheck W, Moxley M, Longmore W. Primary translation products of pulmonary Surfactant protein- D. *Am J Physiol* 1991; 260: L247-L253.
90. Floros J, Phelps SD. Pulmonary surfactant protein: structure expression, and its role in innate host defence. In: *Update of intensive care medicine. Surfactant*, vol 6, 2002. Edited by Intensive Care Unit of University Hospital of Ioannina, Editor: Nakos G.



91. Matalon S, Reilly P, Hickman- Davis JM, Lekka ME, Nakos G. In: Update of intensive care medicine Surfactant, vol 6, 2002. Edited by Intensive Care Unit of University Hospital of Ioannina, Editor: Nakos G.
92. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: State of the art. *Eur Respir J* 1999; 13:1455-1476.
93. Crouch E. Collectins and pulmonary host defence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:177-201.
94. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:521-554.
95. Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciralo G, Whitsett JA. Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:429-440.
96. Suabe A, Panos RJ, Voelker DR. Alveolar type II cells isolated after silica-induced lung injury in rats have increased surfactant protein A (SP-A) receptor activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4:264-72.
97. Chroneos ZC, Abdulrasulnia R, Whitsett JA, Rice WR, Shepherd VL. Purification of a cell- surface receptor for surfactant protein A. *J Biol Chem* 1996; 271:16375-95.
98. Hansen S, Holmskov U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. *Immunobiology* 1998; 199:165-199:189.
99. Liz S, de Mello D, Phelps DS, Koltun WA, Page M, Floros J. Both human SP-A1 and SP-A 2 genes are expressed in small and large intestine. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20:367-386.
100. Bourbon JR, Chailley Heu B. Surfactant proteins in the digestive tract, mesentery and other organs: evolutionary significance. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 2001; 129:151-161.
101. Paananen R, Glumoff V, Halman M. Surfactant protein A and D expression in the porcine Eustachian tube. *FEBS Lett* 1999; 452:141-144.
102. Update of intensive care Medicine, Surfactant, Vol 6, 2002. Edited by Intensive Care Unit of University Hospital of Ioannina, Editor: Nakos G.
103. Batenburg JJ, Longmore WJ, van Golde LMG. The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1978; 529:160-170.



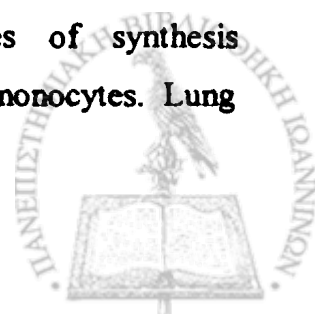
104. Mims LC, Zee P. Utilization of glycerol by the newborn mammalian lung. *Biol Neonate* 1971; 18:356-362.
105. Farrel PM, Bourbon JR. Fatal lung surfactant lipid synthesis from glycogen during organ culture. *Biochim Biophys Acta* 1986; 878:159-167.
106. Maniscalco WM, Stremmel W, Heeney-Cambell M. Uptake of palmitic acid by rabbit alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1990; 259:L206-L212.
107. Chander A, Reicherter J, Fisher AB. Degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by isolated rat granular pneumonocytes and reutilization for surfactant synthesis. *J Clin Invest* 1987; 79:1133-1138.
108. Geppert EF, Elstein KH. Short term regulation of fatty acid synthesis in isolated alveolar type II cells from adult rat lung: effects of free fatty acids and hormones. *Exp Lung Res* 1983; 4:281-291.
109. Maniscalco WM, Finkelstein JN, Parkhurst AB. De novo fatty acid synthesis by freshly isolated alveolar type II epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1983; 751:462-469.
110. Yeh YY. Substrate utilization for phosphatidylcholine synthesis by type II pneumonocytes of neonatal rats. *Pediatr Res* 1991; 30:55-61.
111. Rooney SA. Fatty acid biosynthesis in developing fetal lung. *Am J Physiol* 1989; 257:L195-L201.
112. Patterson CE, Davis KS, Rhoades RA. Regulation of fetal disaturated phosphatidylcholine synthesis by de novo palmitate supply. *Biochim Biophys Acta* 1988; 617:60-69.
113. Jobe A, Beegami M, Sarton-Miller I. The in vitro labelling with acetate and palmitate of lung phospholipids from developing and adult rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1980; 617:65-75.
114. Batenburg JJ, Whitsett JA. Levels of mRNA coding for lipogenic enzymes in rat lung upon fasting and refeeding and during perinatal development. *Biophys Acta* 1989; 1006:329-334.
115. Zeisel SH. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Ann Rev Nutr* 1981; 1:95-121.
116. Fisher AB, Chander A, Dodia C, Reichster J, Kleinzeller A. Choline transport by lung epithelium. *Am J Respir Cel Mol Biol* 1989; 1:455-462.



117. Hallman M, Bry K, Hoppu K, Lappi M, Pohjavuory M. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326:1233-1239.
118. Bleasdale JE, Maberry MC., Quirk JG. Myoinositol homeostasis in foetal rabbit lung. *Biochem J* 1982; 206:43-52.
119. Hallman M, Slivka S, Wosniak P, Sills J. Perinatal development of myoinositol uptake into lung cells: Surfactant phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in the rabbit. *Pediatr Res* 1986; 20:179-185.
120. Mason RJ, Nellenbogen J. Synthesis of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by freshly isolated rat alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 795:392-402.
121. den Breegen JN, Batenburg J, van Golde LMG. The species of acyl-CoA in subcellular fraction of type II cells isolated from adult lung and their incorporation into phosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1002:277-282.
122. Haagsman HP, Schuurmans EAJM, Batenburg JJ, van Golde LMG. Synthesis of phosphatidylcholine in ozone-exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung. Is glycerophosphate acyltransferase a rate-limiting enzyme? *Exp Lung Res* 1988; 14:1-17.
123. Feldman DA, Rounsifer ME, Charles L, Weinhold PA. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase in rat lung: Relationship between cytosolic and membrane forms. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045:49-57.
124. Weinhold PA, Rounsifer ME, Williams SE, Brubaker PG, Feldman DA. CTP: Phosphoryl choline cytidyltransferase in rat lung. The effect of free fatty acids on the translocation of activity between microsomes and cytosol. *J Biol Chem* 1984; 259:10315-10321.
125. Weinhold PA, Rounsifer ME, Charles L, Feldman DA. Characterization of cytosolic forms of CTP: choline-phosphate cytidyltransferase in lung isolated alveolar type II cells, A549 cell and HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1006:299-310.
126. Battenburg JJ. Surfactant Therapy for Lung Disease. Robertson B, Taeusch HW (eds) Marcel Dekker Inc, NY, 1995.



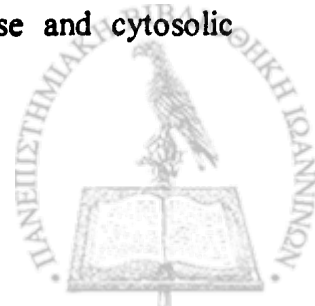
127. Battenburg JJ, Longmore WJ, Klazinga W, van Golde LMG. Lysolecithin acyltransferase and lysolecithin: Lysolecithin acyltransferase in adult rat lung alveolar type II epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1979; 573:136-144.
128. Post M, Schuurmans EAJM, Battenburg JJ, van Golde LMG. Mechanisms involved in the synthesis of of disaturated phosphatidylcholine by alveolar type II cells isolated from adult rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1983; 750:68-77.
129. Fisher AB, Dodia C, Chander A, Jain MA. A competitive inhibitor of phospholipase A₂ decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung. *Biochem J* 1992; 288:407-411.
130. Chander A, Fisher AB, Strauss JF. Role of an acidic compartment in synthesis of disaturated phosphatidylcholine by rat granular pneumocytes. *Biochem J* 1982; 208:651-658.
131. Nijseen JG, Roosenboom CFP, van den Bosh H. Identification of a calcium-independent phospholipase A₂ in rat lung cytosol and differentiation from acetylhydrolase for 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether). *Biochim Biophys Acta* 1986; 876:611-618.
132. Fisher AB, Dodia C. Role of acidic Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in synthesis of lung dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Am J Physiol* 1997; 272:L238-L243.
133. Fisher AB, Dodia C, Chander A. Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A₂ by surfactant protein A. *Am J Physiol* 1994; 267:L335-L341.
134. Fisher AB, Dodia C. Role of phospholipase A₂ enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes. *J Lipid Res* 1996; 37:1057-1064.
135. Akiba S, Dodia C, Chen X, Fisher AB. Characterization of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in degradation of bovine lung. *Comp Biochem Physiol B* 1998; 120:393-404.
136. Battenburg JJ, Klazinga W, van Golde LMG. Regulation and location of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in type II cells isolated from fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1985; 833:17-24.
137. Blaesdale JE, Tyler NE, Snyder JM. Subcellular sites of synthesis phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in type II pneumocytes. *Lung* 1985; 163:345-359.



138. Hass MA, Longmore WJ. Regulation of lung surfactant cholesterol metabolism by serum lipoproteins. *Lipids* 1980; 15:401-406.
139. Baatz JE, Elledge B, Whitsett JA. Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry* 1990; 29:6714-6720.
140. Chander A, Fisher AB. Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol* 1990; 258:L241-L253.
141. Wright JR, Dobbs LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Ann Rev Physiol* 1991; 53:395-414.
142. Suwabe A, Mason RJ, Smith D, Firestone JA, Browning MD, Velker DR. Pulmonary surfactant secretion is regulated by physical state of extra cellular phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1992; 267:19884-19890.
143. Ikegami M, Lewis JF, Tabor B, Rider ED, Jobe AH. Surfactant protein-A metabolism in preterm ventilated lambs. *Am J Physiol* 1992; 262:L765-L772.
144. Rooney SA, Gobran LI, Umstead TM, Phelps DS. Secretion of surfactant protein-A from rat type II pneumonocytes. *Am J Physiol* 1993; 265:L586-L590.
145. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Eijk M, van Buel BM, van Golde LM, Haagsman HP. Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. *Biochem J* 1991; 274:115-119.
146. Liu L. Regulation of lung surfactant secretion by phospholipase A₂. *J Cell Biochemistry* 1999; 72:103-110.
147. Wright JR. Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *Am J Physiol* 1990; 259:L1-L12.
148. Veldhuizen RAW, Inchley K, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Degradation of surfactant associated protein-B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 1993; 295:141-147.
149. Rider ED, Ikegami M, Jobe AH. Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *Am J Physiol* 1992; 263:L201-L209.
150. Young SL, Wright JR, Clements JA. Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. *J Appl Physiol* 1989; 66:1336-1342.
151. Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JA. Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1006:237-245.



152. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85:5566-5570.
153. Ryan RM, Morris RE, Rice W, Ciruolo G, Whitsett JA. Binding and up take of pulmonary surfactant Protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:429-440.
154. Breslin JS, Weaver TE. Binding, uptake, and localization of surfactant protein-B in isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1992; 262:L699-707.
155. Bates SR, Fisher AB. Degradation of surfactant protein-B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993; 265:L448-L445.
156. Bates SR, Beers MF, Fisher AB. Binding and uptake of surfactant protein-B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1992; 263:L333-L341.
157. Pinto RA, Wright JR, Lesikar D, Benson BJ, Clements JA. Uptake of pulmonary surfactant protein-C into adult rat lung lamellar bodies. *J Appl Physiol* 1993; 74:1005-1011.
158. Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. 1998: *Pulmonary diseases and Disorders*, 3rd Edition, McGraw-Hill, USA.
159. Baudouin SV. Exogenous Surfactant Replacement in ARDS- One Day, Someday, or Never? *N Engl J Med* 2004; 351:853-855.
160. Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 1990; 269:228-238.
161. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269:13057-13060.
162. Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:175-189.
163. Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:1-2.
164. Six DA, Dennis E. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:1-19.
165. Gijon MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukocyte Biol* 1999; 65:330-336.



166. Berk PD, Stump DD. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* 1999; 192:17-31.
167. Austin SC, Funk CD. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostagland Other Lipid Mediat* 1999; 58:231-252.
168. Bingham III CO, Austen KF. Phospholipase A₂ enzymes in eicosanoid generation. *Proc Assoc Am Phys* 1999; 111:516-524.
169. Devilier P, Baccard N, Advenier C. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res* 1999; 40:3-13.
170. Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondac GC. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:168-173.
171. Balsinde J, Balboa MA, Dennis A. Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D1 macrophages via sphingomyelin synthesis. *J Biol Chem* 1997; 272:29317-29321.
172. Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1441:229-236.
173. Peplow PV. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A₂ inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostagland Leukot Essent Fat Acid* 1999; 61:65-82.
174. Tjoelker LW, Stafforini D. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:102-123.
175. Stephens WW, Walker JL, Myers W. *Pathol Bacteriol* 1898; 5:279-301.
176. Fairbairn D. *J Biol Chem* 1945; 157: 663644
177. Wittcoff H, Reinold, New York, 1951, pp. 1-564.
178. Henrikson RL, Krueger ET, Keim PS. *J Biol Chem* 1945; 252:4913-4921.
179. Dufton MJ, Hider RC. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur J Biochem* 1983; 137:545-551.
180. Dennis A. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:S32-S35.



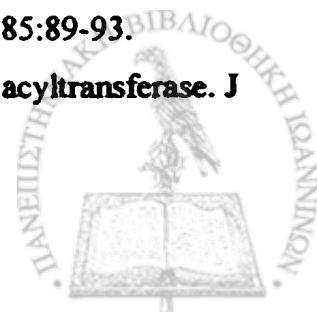
181. Kramer RM, Hession C, Johansen B, Hayes G, McGray P, Chow EP, Tizard R, Pepinsky RB. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1989; 264:5768-5775.
182. Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P. Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* 1989; 5335-5338.
183. Alonso F, Henson PM, Leslie CC. A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1986; 878:273-280.
184. Kramer RM, Chevani GC, Deykin A, Pritzker CR, Deykin D. Solubilization and properties of Ca²⁺-dependent human platelet phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1986; 878:394-403.
185. Loo RW, Conde-Frieboes K, Reynolds LJ, Dennis EA. Activation, inhibition and regiospecificity of lysophospholipase activity of the 85kDa cytosolic group IV phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997; 272:19214-19219.
186. Mosior MD, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem* 1998; 273:2184-2191.
187. Dennis EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269:13057-13060.
188. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂: classification and characterization. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1488:1-19.
189. Henson PM. Release of vaso active amines induced by anti platelet antibody in the presence and absence of complement. *J Immunol* 1970; 104:924-934.
190. Siraganian RP, Osler AG. Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J Immunol* 1971; 106:1244-1251.
191. Benevise J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boulet C, Polonsky J. Semisynthese et structure propose du facteur activant les plaquettes (PAF): PAF-acether un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. *Comptes Rend de l'Acad des Sc (Paris)* 1979; 289:1037-1040.



192. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet activating factor.: evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-phosphocholine as the active components. *J Biol Chem* 1979; 254:9355-9358.
193. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Muirhead EE. Antihypertensive activity of an alkyl ether analogue of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90:1194-1200.
194. Beneviste J, Henson PM, Cohrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet activating factor. *J Exp Med* 1972; 136:1356-1377.
195. Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J, Pinckard RN. Identification of platelet-activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 1980; 255:5514-5516.
196. McManus LM. Pathobiology of platelet activating factors. *Path Immun Res* 1986; 5:104-117.
197. Pinckard RN, Ludwig JC, MacManus L. Platelet activating factors. Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Edited by Galin JJ, Goldstein IM, Snyderman R. Raven Press, LTD. New York 1988;139-167.
198. Ludwig JC, Pinckard RN. Diversity in the chemical structures of neutrophil-derived platelet activating factors. In: *New horizons in Platelet Activating Factor Research*, edited by Winslow CM, Lee JL, Wiley J & Sons, New York, 1987;59-71.
199. Mueller HW, O' Flaherty JT, Wykle RL. The molecular species distribution of platelet-activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259:14554-14559.
200. Pinckard RN, Jackson EM, Hoppens C, Weintraub ST, Ludwig JC, MacManus LM, Mott GE. Molecular heterogeneity of platelet activating factor produced by stimulated by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122:325-332.
201. Albert DH, Snyder F. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A₂ and acetyl transferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J Biol Chem* 1983; 258:97-102.
202. Wyckle RL, Olson SC, O' Flaherty JT. Biochemical pathways of platelet activating factor synthesis and breakdown. *Adv Inflam Res* 1986; 11:71-81.



203. Wyckle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet activating lipid. *J Biol Chem* 1980; 255:10256-10260.
204. Lee T-C. Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine: acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 1985; 260:10952-10955.
205. Renooij W, Snyder R. Biosynthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochem Biophys Acta* 1981; 663:545-556.
206. Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:1-3.
207. Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1441:229-236.
- 208. Blank ML, Lee TC, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (A hypotensive and platelet activating lipid). *J Biol Chem* 1981; 256:175-178.
209. Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet activating-factor. *Feder Proc* 1983; 42:3120-3122.
210. Kramer RM, Patton GM, Pritzker CR, Deykin DM. Metabolism of platelet activating factor in human platelets. Transacylase-mediated synthesis of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem* 1984; 259:13316-13320.
211. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor Acetylhydrolases. *J Biol Chem* 1997; 272:17895-17898.
212. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA. Mammalian platelet activating factor acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301:161-173.
213. Hatori M, Arai H, Noue K. Purification and characterization of bovine brain platelet activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1993; 268:18758-18753.
214. Ho YS, Swedson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS. Brain acetylhydrolase that inactivates platelet activating factor is a G-protein like trimer. *Nature* 1997; 385:89-93.
215. Aron L, Jones S, Fielding CJ. Human plasma lecithine cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 1978; 253:7220-7222.



216. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Trong HL, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamanda Y, McIntyre TM, Prescott SM, Gray PW. Anti-inflammatory properties of a platelet activating factor acetylhydrolase, *Nature* 1995; 374:549-552.
217. Matsuzawa A, Hatori K, Aoki J, Arai H, Inoue K. Protection against oxidative stress-induced cell death by intra cellular platelet activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem* 1997; 272:32315-32320.
218. Reiner O, Sapir T. Abnormal cortical development; towards elucidation of the LIS1 gene product function. *Int J Mol Med* 1998; 1:849-853.
219. Albrecht U, Abu-Issa R, Ratz B, Hattori M, Aoki J, Arai H, Inoue K, Eichele G. Platelet activating factor-acetylhydrolase expression and activity suggests a link between neuronal migration and platelet activating factor. *Dev Biol* 1996; 180:579-593.
220. Many H, Aoki J, Watanabe M, Adachi T, Asou H, Inoue Y, Arai H, Inoue K. Switching of platelet activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem* 1998; 273:18567-18572.
221. Blank ML, Lee TC, Fitzgerald V, Snyder F. A specific acetyl hydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensine and platelet activating factor. *J Biol Chem* 1981; 257:175-178
222. Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Feder Proc* 1983; 42:3120-3122.
223. Kramer RM, Patton GM, Pritzker CR, Deykin DM. Metabolism of platelet-activating factor in human platelets. Transacylase-mediated synthesis of 1-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem* 1984; 259:13316-13320.
224. Shukla D. Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB J* 1992; 6:2296-2301.
225. Ihida K, Predescu D, Czekay RP, Palade GE. Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Sci* 1999; 112:285-295.
226. Henson PM, Barnes PJ, Banks-Schlegel SP. NHLBI workshop summary. Platelet-activating factor: role in pulmonary injury and dysfunction and blood abnormalities. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:726-731.



227. Tanaka T, Minamino H, Unezaki U, Tsukatani A, Tokumura A. Formation of platelet-activating factor-like phospholipids by Fe²⁺/ascorbate/EDTA-induced lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1166:264-274.
228. Tanaka T, Limori M, Tsukatani A, Takamura A. Platelet-aggregating effects of platelet-activating factor-like phospholipids formed by oxidation of phosphatidylcholines containing an sn-2-polyunsaturated fatty acyl group. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1210:202-208.
229. Frey B, Haupt R, Alms S, Holzman G, Koning T, Kern H, Kox W, Rustow B, Schlame M. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress. *J Lipid Res* 2000; 41:1145-1153.
230. Prevost MC, Cariven C, Simon MF, Chap H, Douste-Blazy L. Platelet activating factor (PAF-acether) is released into rat pulmonary alveolar fluid as a consequence of hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:58-63.
231. Stenton SC, Court EN, Kingston WP, Goadby P, Kelly CA, Duddridge M, Ward C, Hendrick DJ, Ward EH. Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1990; 3: 408-413.
232. Cuss FM, Dixon CMS, Barness BJ. Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1986; 2:189-192.
233. Rubin AH, Smith LJ, Patterson R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1145-1151.
234. Nakos G, Kitsioulis EI, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1504-1510.
235. Kitsioulis EI, Nakos G, Lekka ME. Differential determination of Phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates. *J Lipid Res* 1999; 40:2346-2356.
236. Triggiani M, de Marino V, Sofia M, Faraone S, Ambrosio G, Carratu L, Marome G. Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:94-100.
237. Ambrosio G, Oriente A, Napoli C, Palombo G, Chiariello M, Triggiani M. Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1994; 93:2408-2416.



238. Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991; 266:11095-11113.
239. 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; 1532:60-66.
240. Pinkard RN, Ludwig JC, Mcmanus LM. Platelet activating factors. *Inflammation: Basic Principles and clinical correlates*. Edited by Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R. Raven Press, Ltd., N York, 1988.
241. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Argyropoulos D, Baltas G, Kotsifaki H, Diamanti-Kipiotti A. Identification of a new endogenous platelet-activating factor-like molecule in gingival crevicular fluid. *Biochem J* 1998; 330:791-794.
242. Evans TW, Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of platelet activating factor on airway vascular permeability: possible mechanism. *J Appl Physiol* 1987; 63:479-84.
243. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
244. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917.
245. Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234:466-468.
246. Bossant MJ, Ninio E, Delautier D, Benveniste J. Bioassay of paf-acether by rabbit platelet aggregation. *Methods Enzymol* 1990; 187:125-130.
247. Goddu RF, LeBlanc NF, Wright CM. Spectrophotometric determination of esters and anhydrides by Hydroxamic acid reaction. *Anal Chem* 1955; 27:1251-1255.
248. Kates M. *Techniques of lipidology. Isolation analysis and identification of lipids*. Edited by Work TS, Work E, London, 1972: 360.
249. Batzti S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta* 1973; 298:1015-1019.
250. Morrison RW, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964; 5:600-608.
251. Preparation of the Fatty acid Methyl esters, In: *IUPAC Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 6th Edition, Pergamon Press.



252. Gas Liquid Chromatography of Fatty acid Methyl Esters In: IUPAC Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 6th Edition, Pergamon Press.
253. Kates M. Techniques of lipidology. Isolation analysis and identification of lipids. Edited by Work TS, Work E, London, 1972:pg 360.
254. Gunther A, Rupert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Surfactant alteration and replation in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001; 2:353-364.
255. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther M. Alteration of Fatty Acid Profiles in Different Pulmonary Surfactant Phospholipids in Acute Respiratory Distress Syndrome and Severe Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:95-100.
256. Pison U, Seeger W, Buchhorn M, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhof H, Schmit Neuerburg KP. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1033-1039.
257. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA III, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991; 88:1976-1981.
258. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early, intermediate and late phases of ARDS. *Int Care Med* 1998; 24:296-303.
259. Gunther A, Rupert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Suffactant alteration and and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001; 2:352-364.
260. Fisher AB. Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol* 1990; 258:L241-L251.
261. Wright JR, Dodds LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Ann Rev Physiol* 1991; 53:395-414.
262. Oyarzun MJ, Clements JA. Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators and prostaglandins in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:879-891.
263. Frankel RA, Narahara H, Eguchi H, Toyoshima K, Johnston JM. Metabolism of hexadecanol by rat type II pneumonocytes. *Biochem Biophys Res Com* 1993; 196:885-891.



264. Chander A, Reicherter J, Fischer AB. Degradation of dipalmitoyl phosphatidylcholine by isolated rat granular pneumocytes and reutilization for surfactant synthesis. *J Clin Invest* 1987; 79:1133-1138.
265. Kikkawa Y, Smith F. Cellular and biochemical aspects of pulmonary surfactant in health and disease. *Lab Invest* 1983; 49:122-139.
266. Said SI, Avery ME, Davis RK. Pulmonary surface activity in induced pulmonary edema. *J Clin Invest* 1965; 44:458-464.
267. Faridy EE, Permutt S, Riley RL. Effect of ventilation on surface forces in excised dogs' lung. *J Appl Physiol* 1966; 21:1453-1462.
268. Hallman M, Spragg R, Harell JH. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982; 70:673-683.
269. Ryan SF, Liao DF, Bell ALL. Correlation of lung compliance and quantities of surfactant phospholipids after acute alveolar injury from N-nitroso-N-methylurethane in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:200-204.
270. Baughman RP, Stein E, MacGee J, Rashkin M, Sahebajami H. Changes in fatty acids in phospholipids of the bronchoalveolar fluid in bacterial pneumonia and in Adult Respiratory Distress Syndrome. *Clin Chem* 1984; 30:521-523.
271. Evans TW, Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanism. *J Appl Physiol* 1987; 63:479-484.
272. Sakai A, Chang S, Voelkel NF. Importance of vasoconstriction in lipid mediator-induced pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1989; 66:2667-2674.
273. Lee WL, Downey GP. Leukocyte Elastase Physiological Functions and Role in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:896-904.
274. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002; 30:S294 -S301.
275. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1991; 266:16667-16673.
276. Hite RD, Seeds MC, Jacinto RB, Balasubramanian R, Waite M, Bass D. Hydrolysis of surfactant-associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipase A₂. *Am J Physiol* 1998; 275:L740-L747.



277. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol* 1991; 71:317-321.
278. Arbibe L, Vial D, Rosinski I, Chupin I, Havet N, Huerre M, Vargaftig BB, Touqui L. Endotoxin induces expression of type II phospholipase A₂ in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolydacharide-induced type II phospholipase A₂ synthesis. *J Immunol* 1997; 159:391-400.
279. Nevalainen, TJ, Haapamaki MM Gronroos, JM. Roles of phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1488:83-90.
280. Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Ueno M, Chikazawa Y, Ono T, Hori Y. Crucial role of group II Phospholipase A₂ in oleic acid induced acute lung injury in rabbits. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 160:1292-1302.

