

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200018



AA
610
KOP
0002

611
KON
DOK
11/1/2002 A-

270

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

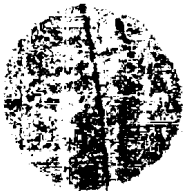
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝ ΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ



ΔΔ
610
KON
0002

611
KON
0000
11/1/2000 A



270

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ

Η ΠΥΘΑΓΟΡΕΙΑ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΑΡΧΑΙΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΝΕΥΤΟΝΙΑΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΡΧΑΙΩΝ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΡΧΑΙΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ

ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

ΑΙΔΑΚΤΟΡΙΑ



252.....2^ο 4



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ, ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Η Επίκουρος Καθηγήτρια Παναγιώτα Άννα Δαλαβάγκα

Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ

ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΗ Ή ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ-γ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Ι. ΚΟΝΤΟΜΕΡΚΟΥ

ΙΑΤΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

1. Οθων Β. Κωτούλας , Καθηγητής Ανατομίας , Ιστολογίας , Εμβρυολογίας . *(Επβλέπων Καθηγητής)*
2. Γιωτάνα Δαλαβάγκα , Επίκουρος Καθηγήτρια Ανατομίας , Ιστολογίας , Εμβρυολογίας .
3. Πατρώνα Βεζυράκη , Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας .



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

1. Οθων Β. Κωτούλας , Καθηγητής Ανατομίας , Ιστολογίας , Εμβρυολογίας . *(Επιβλέπων Καθηγητής)*
2. Σταύρος Κωσταντόπουλος , Καθηγητής Πνευμονολογίας .
3. Μάριος Μαρσέλος , Καθηγητής Φαρμακολογίας .
4. Άγγελος Ευαγγέλου , Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας .
5. Γιωτάννα Δαλαβάγκα , Επίκουρος Καθηγήτρια Ανατομίας , Ιστολογίας , Εμβρυολογίας .
6. Πατρώνα Βεζυράκη , Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας .
7. Χαράλαμπος Αγγελίδης , Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας .



" Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής
από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα "
(Νόμος 5343/32 , άρθρο 202 , παράγραφος 2)



ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ



ΒΙΒΛΙΑ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣ ΑΓΓΛΙΚΑ

ΕΙΣ ΓΑΛΛΙΚΑ

ΕΙΣ ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ

Στον Καθηγητή κ. Όθωνα Κωτούλα

ΕΙΣ ΙΤΑΛΙΚΑ

ΕΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΑΡΑΒΙΚΑ

ΕΙΣ ΠΕΡΣΙΚΑ

ΕΙΣ ΚΑΤΑΛΑΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΣΠΑΝΙΑΚΑ

ΕΙΣ ΡΟΥΜΑΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΣΛΑΒΙΚΑ

ΕΙΣ ΚΡΕΤΤΙΚΑ

ΕΙΣ ΑΡΜΕΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΕΒΡΑΙΑΚΑ

ΕΙΣ ΚΑΤΑΛΑΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΣΠΑΝΙΑΚΑ

ΕΙΣ ΚΡΕΤΤΙΚΑ

ΕΙΣ ΑΡΜΕΝΙΚΑ

ΕΙΣ ΕΒΡΑΙΑΚΑ



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ :

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .	9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .	17
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .	21
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ :	23
Κεφάλαιο 1^ο : ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ : ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .	
1-1 : Γενικά στοιχεία για το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Τα είδη των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .	25
1-2 : Η προέλευση , εξέλιξη και διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .	39
1-3 : Η μορφολογία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο και οι γενικοί ιστοχημικοί χαρακτήρες τους .	46
1-4 : Η μορφολογία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. 58	
1-5 : Οι λειτουργικές ιδιότητες των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .	72
1-6 : Οι Υποδοχείς Επιφανείας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .	88
1-7 : Η έννοια της ενεργοποίησης των μακροφάγων και οι εκδηλώσεις της .	101
Κεφάλαιο 2^ο : Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ .	
2-1 : Ο ρόλος του μακροφάγου στην οικονομία του φυσιολογικού οργανισμού .	123
2-2 : Ο ρόλος του μακροφάγου στην πρωτογενή άμυνα του οργανισμού .	133
2-3 : Ο ρόλος του μακροφάγου στην φλεγμονώδη αντίδραση και στην ανοσολογική απόκριση .	140
2-4 : Ο ρόλος του μακροφάγου στις χρόνιες και στις εκφυλιστικές παθήσεις .	149
Κεφάλαιο 3^ο : Ο ΝΕΥΡΟ-ΕΝΔΟΚΡΙΝΟ-ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ .	157
Κεφάλαιο 4^ο : Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ (ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ) ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .	
4-1 : Γενικά για το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου και για τις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου .	167
4-2 : Οι Ελεύθερες Ρίζες οξυγόνου και τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα .	171
Κεφάλαιο 5^ο : Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ (ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ) ΡΙΖΩΝ ΑΖΩΤΟΥ .	
5-1 : Γενικά για το Νιτρικό Οξείδιο και τις άλλες Δραστικές Ρίζες Αζώτου .	183
5-2 : Το Νιτρικό Οξείδιο και τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα .	190



Κεφάλαιο 6° : Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΞΙΝΗΣ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ .

6-1 : Γενικά για την Οξίνη Φωσφατάση και τα άλλα Λυσοσωματικά Ένζυμα	197
6-2 : Η Οξίνη Φωσφατάση και τα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα	199

Κεφάλαιο 7° : ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ (ΑΓΓΕΛΙΟΦΟΡΩΝ) .

7-1 : Εισαγωγικά στοιχεία	203
7-2 : Η Οδός της Αδενυλικής Κυκλάσης – Κυκλικού AMP – Εξαρτημένης από το Κυκλικό AMP Πρωτεϊνικής Κινάσης A	207
7-3 : Η Οδοί της Φωσφολιπάσης C – Διακυλογλυκερόλης – Πρωτεϊνικής Κινάσης C και Φωσφολιπάσης C – Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης – Ασβεστίου	209
7-4 : Η Οδός της Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης – Ενδοκυττάριου Ασβεστίου	213
7-5 : Η Οδός της Γουανυλικής Κυκλάσης – Κυκλικού GMP – Εξαρτημένης από το Κυκλικό GMP Πρωτεϊνικής Κινάσης	216
7-6 : Η Οδός της Φωσφολιπάσης A2 – Αραχιδονικού Οξέος – Εικοσανοειδών	218
7-7 : Η Οδός των Πρωτεϊνικών Κινασών της Τυροσίνης	221
7-8 : Οι Παράγοντες Μεταγραφής NFκB	226
7-9 : Οι Οδοί Μεταγωγής Μηνύματος στα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα	228

Κεφάλαιο 8° : ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΜΕΛΕΤΗΘΟΥΝ .

8-1 : Ενδοτοξίνες (Λιποπολυσακχαρίτες)	235
8-2 : Αδρεναλίνη (επνεφρίνη)	250
8-3 : Νιτοπαμίνη	259
8-4 : Σεροτονίνη (5-υδρόξυ-τρυπταμίνη)	262
8-5 : Ισταμίνη (υδρόξυ-τυραμίνη)	266
8-6 : Δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή	272
8-7 : Ινσουλίνη	282
8-8 : Γλυκαγόνη	289
8-9 : Προσταγλανδίνες	293
8-10 : Νευροπεπτιδίο Υ	312
8-11 : 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D3	316
8-12 : Ιντερφερόνη - γ	323

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ : 339**Κεφάλαιο 9° : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .**

9-1 : Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	341
9-2 : Οργάνωση πειραμάτων	341

Κεφάλαιο 10° : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .

10-1 : Υλικά και όργανα εργαστηρίου	345
10-2 : Βιοχημικές και μορφολογικές μέθοδοι	347

Κεφάλαιο 11° : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .

11-1 : Βιοχημικά Αποτελέσματα	359
11-2 : Μορφολογικές Παρατηρήσεις	495

Κεφάλαιο 12° : ΣΥΖΗΤΗΣΗ .

Ανάλυση ως προς την μετρούμενη βιοχημική παράμετρο	513
Συζήτηση των συνολικών βιοχημικών αποτελεσμάτων με βάση τις επιδράσεις της κάθε μιας πειραματικής ουσίας και στους τρεις τύπους μακροφάγων ως προς την ίδια βιοχημική παράμετρο	515
Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς τον τύπο της επίδρασης (αύξηση ή μείωση) σε κάθε μια βιοχημική παράμετρο	540
Συζήτηση των ευρημάτων μελετημένα ως προς τους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτών που διαμεσολαβούν την δράση των πειραματικών ουσιών	551
Συζήτηση των μορφολογικών παρατηρήσεων	563
Η σημασία των ευρημάτων μας στην Ιατρική και την Βιολογία	574
	579



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .	581
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ) .	583
SUMMARY (ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ) .	585
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .	587



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή έγινε στο Εργαστήριο Ανατομίας , Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου υπό την διεύθυνση του Καθηγητή κ. Όθωνα Κωτούλα , τον οποίο ευχαριστώ θερμά για το αμέριστο ενδιαφέρον , την λεπτομερή καθοδήγηση και την αρωγή και συμπαράστασή του σε όλη την διάρκεια της εργασίας .

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Δόνο για την βοήθεια και για την πολύτιμη καθοδήγησή του στα ζητήματα του χειρισμού των πειραματοζώων .

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παναγιώτα-Άννα Δαλαβάγκα για τις πολύτιμες συμβουλές τις οποίες μου προσέφερε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ελισάβετ-Ουρανία Τζόνσον για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις της σχετικά με την ανάλυση και παρουσίαση των δεδομένων .

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα κ. Στέφανο Καλαμίδα για το ενδιαφέρον και την ηθική του συμπαράσταση , την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την ανάπτυξη των βιοχημικών τεχνικών και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του στην συζήτηση των αποτελεσμάτων .

Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη του ΕΔΤΠ του Εργαστηρίου κ.κ. Χριστόδουλο Οικονόμου και Κατερίνα Βούρδα , για την σημαντική βοήθειά τους στα τεχνικό μέρος της μελέτης αυτής και για την συμπαράστασή τους .



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συμπεριφορά των μεταμορφωμένων... Η ΕΙΣΑΓΩΓΗ... Η συμπεριφορά των μεταμορφωμένων...

Τέτοια είναι η περίπτωση... Η συμπεριφορά των μεταμορφωμένων...

Επομένως, η συμπεριφορά... Η συμπεριφορά των μεταμορφωμένων...



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συμμετοχή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην φλεγμονή και την ανοσία είναι γνωστή και καλά τεκμηριωμένη . Αρχικά επικρατούσε η αντίληψη ότι τα κύτταρα αυτά λειτουργούσαν κατά τρόπο αυτόνομο και ότι επιτελούσαν λειτουργίες που δεν χρειαζόνταν ρύθμιση , όπως η φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών , ιστικών ρακών και φλεγμονωδών υπολειμμάτων και η παρουσίαση των επεξεργασμένων αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα .

Σήμερα είναι αποδεκτή η ύπαρξη ενός ενιαίου ρυθμιστικού συστήματος της ομοιοστασίας και αλλοστασίας , στον οποίο συμμετέχουν το Νευρικό , Ενδοκρινικό και Ανοσοποιητικό σύστημα και που ονομάζεται Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικός άξονας . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συμπεριλήφθηκαν στον ενιαίο αυτόν μηχανισμό σαν κύτταρα τα οποία επηρέαζαν την λειτουργία του Νευρικού και του Ενδοκρινικού συστήματος μέσω της έκκρισης κυτταροκινών και άλλων βιοδραστικών παραγόντων . Σήμερα υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα ίσως αλληλεπιδρούν αμφίδρομα με τον Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικό άξονα και ότι πιθανώς μέσω αυτού ρύθμιζαν την λειτουργία τους .

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ανιχνευτούν Νευροενδοκρινικές επιδράσεις στην λειτουργία των μακροφάγων και να κατανοηθεί ο ρόλος τους στην φλεγμονή και την ανοσία .



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Οι συντομογραφίες που ακολουθούν είναι οι συντομογραφίες που έχουν οριστεί για τους σκοπούς της παρούσας έκδοσης.

- CAMP : Καρδιακή Μυοκίνηση
- DAG : Διγλυκερίδια
- EDTA : Εθιλοδιαιτινικό Τριεξικό Οξύ
- FCS : Φυσιολογικό ορό (Fetal Calf Serum)
- GKN : Γλυκονικό Νάτριο
- H₂O₂ : Υδρογόνου Περσουλφάτο
- IL-1 : Ιντερλευκίνη 1
- IBFy : Ιντερλευκίνη Β
- INOS : Ινσουλίνη
- IP₁ : Τυροσίνη
- KDE : Κιτρίνη
- LYB₂ : Λευκοκυττάρια Β₂
- LPS : Λιποπολυσακχαρίνη (Lipopolysaccharide)
- MAPK/ERK1/2 : Μικροσωματικές πρωτεΐνες από Μικροσωματική Πρωτεϊνική Κινηση (Mitogen-Activated Protein Kinase)
- MB : Μυοβλαστική
- MD, M₂, M₁ : Μυοβλαστική διαφοροποίηση
- NAIP/α-βιταμίνη : Νουκλεοπρωτεΐνη Α-βιταμίνης
- NFKB : Νουκλεοπρωτεΐνη Κινηση Β
- NO : Νιτρώξιο
- O₂ : Οξυγόνο
- NPY : Νευροπепτινίνη Υ
- PAP : Πρωτεΐνη Αιμοπεριτρίνης
- PBS : Φυσιολογικό ορό (Phosphate Buffered Saline)
- PGE₂ : Προσταγλάνδιν Ε₂
- PIP2 : Φωσφολιπιδική Φωσφοινωσιτόλη
- PKA : Πρωτεϊνική Κινηση Α (Εξαρτημένη από την 3', 5' - Κυκλική Ανοφοκυβωτική Αδενοσίνη Πρωτεϊνική Κινηση)
- PKC : Πρωτεϊνική Κινηση C
- PLA₂ : Φωσφολιπιδάση Α₂
- TGF β : Τρανσφορμινική Παράγονση Β
- VEA : Β-Αμοινοεξ-13-Οξικός Εστέρας της Φαρβόλης
- WGA-1649 : Καλλικρεγινικό οξύ (WGA-1649) από Merck Institute από 1979
- WGA : Καλλικρεγινικό οξύ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .

Οι κυριότερες συντομογραφίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στο κείμενο αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι (με αλφαβητική σειρά) οι εξής :

cAMP :	3'- 5' - Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη .
DAG :	Διάκυλο-γλυκερόλη .
EDTA :	Αιθυλενοδιαμmino-Τετραοξικό Οξύ .
FCS :	Ορός εμβρύου μόσχου .
GKN :	Διάλυμα Γλυκόζης , χλωριούχου καλίου και χλωριούχου νατρίου .
H ₂ O ₂ :	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου .
IL-1 :	Ιντερλευκίνη-1 .
INFγ :	Ιντερφερόνη-γ .
iNOS :	Επαγομένη Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου .
IP ₃ :	Τριφωσφορική Ινοσιτόλη .
kDa :	Kilodaltons .
LTB ₄ :	Λευκοτριένη Β ₄ .
LPS :	Λιποπολυσακχαρίτης (Ενδοτοξίνη) .
MAP-Κινάσες :	Ενεργοποιούμενες από Μιτογόνα Πρωτεϊνικές Κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases) .
MB :	Μοριακό Βάρος .
mg , μg , ml :	χιλιοστόγραμμα , μικρογραμμάρια , κυβικά εκατοστά .
NADPH-Οξειδάση :	Οξειδάση του Αναχθέντος Νικοτινάμιο-Αδένινο-Διφωσφο- νουκλεοτιδίου .
NFκB :	Πυρηνικός Παράγοντας κB .
NO :	Νιτρικό Οξείδιο .
O ₂ ⁻¹ :	Ανιόν Υπεροξειδίου .
NPY :	Νευροπεπτίδιο Υ .
PAF :	Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων .
PBS :	Ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (Phosphate-Buffered Saline) .
PGE ₂ :	Προσταγλανδίνη E ₂ .
PIP ₂ :	Διφωσφορική Φωσφατιδυλ-Ινοσιτόλη .
PKA :	Πρωτεϊνική Κινάση Α (Εξαρτημένη από την 3'- 5' - Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη Πρωτεϊνική Κινάση) .
PKC :	Πρωτεϊνική Κινάση C .
PLA ₂ :	Φωσφολιπάση A ₂ .
PLC :	Φωσφολιπάση C .
PMA :	12'-Μυριστικός-13'-Οξικός Εστέρας της Φορβόλης .
RPMI-1640 :	Καλλιεργητικό υλικό Roswell Park Memorial Institute αριθ. 1640
TNFα :	Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων τύπου -α .



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΝ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΝΟΝΩΝ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΡΜΗΝΕΥΣΕΩΣ



Κεφάλαιο 1-1 . Γενικά στοιχεία για το σύστημα των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων . Τα είδη των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων .

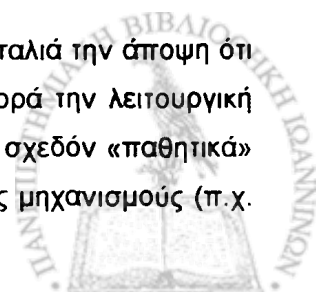
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα αποτελούν ένα σύστημα κυττάρων με διάχυτη εντόπιση σε όλο το σώμα . Είναι κύτταρα με διαφορετικό φαινότυπο αλλά κοινή προέλευση και κοινό γονότυπο . Εμφανίζουν κατά κανόνα έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Τα κύτταρα του συστήματος αυτού συμμετέχουν σε μια σειρά μηχανισμών του οργανισμού , με κύριο σκοπό τους την αντιμετώπιση της εισβολής και παρουσίας στο σώμα ανεπιθύμητων βακτηρίων , ιών , παρασίτων , ξένων σωμάτων και άλλων επιβλαβών παραγόντων . Σε παλαιότερα συγγράμματα αναφέρονται ως «ιστιοκύτταρα» .

Θεωρείται ότι όλα τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα προέρχονται από κοινό κυτταρικό πρόγονο στον μυελό των οστών . Αφού περάσουν από το στάδιο του μονοκυττάρου , οπότε κυκλοφορούν στο αίμα , θα μεταναστεύσουν στους ιστούς . Εκεί εγκαθίστανται και αποκτούν τα ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους που ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του κάθε ιστού και στην λειτουργία για την οποία προορίζονται . Η μετανάστευση και εγκατάσταση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στους ιστούς συνήθως αρχίζει στην ενδομήτρια ζωή , αμέσως μόλις ο νεοσχηματιζόμενος ιστός αποκτήσει αγγειακό δίκτυο και αιματική κυκλοφορία . Στην συνέχεια ο πληθυσμός αυτός των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων θεωρείται ότι ανανεώνεται με συνεχή είσοδο νέων μονοκυττάρων από το αίμα . Τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα εντοπίζονται σχεδόν σε κάθε ιστό και όργανο του σώματος . Παρά την ποικίλλουσα μορφολογία τους διατηρούν ορισμένα κοινά στοιχεία , όπως π.χ. τον ενιαίο και μάλλον απλής μορφής πυρήνα . Τα κοινά μορφολογικά και λειτουργικά στοιχεία τους επιτρέπουν τον διαχωρισμό τους από άλλα φαγοκύτταρα , δηλαδή από άλλα είδη κυττάρων που έχουν επίσης έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα , όπως π.χ. τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα .

Ο κυριότερος εκπρόσωπος της οικογένειας των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων είναι τα ιστικά μακροφάγα . Τα μακροφάγα των ιστών ανακαλύφθηκαν από τον το 1884 από τον Eli Metchnikoff , ο οποίος διαπίστωσε ότι τα μεγάλα αυτά κύτταρα φαγοκυττάρωναν με ευκολία βακτηρίδια και ξένα σώματα . Ο Metchnikoff διατύπωσε την άποψη ότι η φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα αποτελούσε έναν σημαντικό μηχανισμό άμυνας απέναντι στους μικροοργανισμούς , την κυτταρική ανοσία . Μαζί με τον Paul Ehrlich , τον θεμελιωτή της χυμικής ανοσίας , μοιράστηκαν το βραβείο Nobel το 1908 για την μεγάλη τους συμβολή στην διαλεύκανση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού . Το 1924 ο Aschoff κατέταξε τα μακροφάγα στο Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα , ένα ευρύτατο σύστημα κυττάρων που περιλάμβανε τα δικτυοκύτταρα , τα ενδοθηλιακά κύτταρα , τους ινοβλάστες , τα μακροφάγα , τα μονοκύτταρα και άλλα κύτταρα . Όμως το 1969 έγινε ο διαχωρισμός των μονοκυττάρων και μακροφάγων από το Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα και επινοήθηκε ο όρος «Σύστημα των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων» που περιλάμβανε όλα τα συγγενή προς τα μακροφάγα κύτταρα . Ο όρος «Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα» τείνει να καταργηθεί .

Παρά το ότι ο Lurie (1942) και ο Mackaness (1962) διατύπωσαν ήδη από παλιά την άποψη ότι τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να ρυθμίζονται όσον αφορά την λειτουργική τους κατάσταση , τα κύτταρα αυτά θεωρήθηκαν για πολλά χρόνια ότι συμμετείχαν σχεδόν «παθητικά» στους αμυντικούς μηχανισμούς του σώματος με μη-ειδικούς και μη-ρυθμιζόμενους μηχανισμούς (π.χ.



φαγοκυττάρωση) . Για τους περισσότερους ερευνητές τα μακροφάγα τότε αποτελούσαν τους «εκκαθαριστές» ή «ρακοσυλλέκτες» του σώματος (scavenger cells) που απλώς επιτελούσαν την εκκαθάριση των φλεγμονωδών εστιών από τα ιστικά ράκη και τα κατεστραμμένα μικρόβια . Όμως κατά το τέλος της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκε εξαιρετικά η έρευνα για τα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα και στα επόμενα χρόνια διευρύνθηκαν πολύ οι γνώσεις μας για την ρυθμιζόμενη λειτουργία τους και την ενεργητική , κατευθυνόμενη και πολύπλευρη συμμετοχή τους στους φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς . (North, 1978 , Cline, 1978 , Nathan και συν, 1980 , Ogmundsdottir και Weir, 1980 , Nelson, 1981 , Forster και Landy, 1981 , Johnston, 1988 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το σύστημα των Μονοπύρρηνων Φαγοκυττάρων περιλαμβάνει κύτταρα με κοινή προέλευση και ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά , τα οποία εντοπίζονται σε όλα σχεδόν τα όργανα και τους ιστούς του σώματος . Σημαντικοί εκπρόσωποι του συστήματος αυτού είναι τα μονοκύτταρα του αίματος και τα μακροφάγα του συνδετικού ιστού και των ορογόνων κοιλοτήτων του σώματος (π.χ. της περιτοναϊκής και υπεζωκοτικής κοιλότητας) . Εκτός όμως από αυτά , υπάρχουν και πολλά άλλα είδη μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων , όπως είναι τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer), τα μακροφάγα του μυελού των οστών, τα μικρογλοιακά κύτταρα (μακροφάγα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος), τα πνευμονικά μακροφάγα (τα οποία περιλαμβάνουν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού), τα μεσαγγειακά κύτταρα (μακροφάγα του συνδετικού ιστού ο οποίος υπάρχει ανάμεσα στα τριχοειδή του αγγειώδους σπειράματος των νεφρικών σωματίων του Malpighi) , τα μακροφάγα των αρθρικών υμένων , τα μακροφάγα των οστών (οστεοκλάστες) και τέλος τα μακροφάγα της μήτρας , του όρχη , των λεμφαδένων , του σπλήνα και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα . Αν και υπάρχουν μακροφάγα σε πολλά ακόμα όργανα του σώματος , τα περισσότερα από αυτά αποτελούν στην πραγματικότητα μακροφάγα του συνδετικού ιστού (ιστιοκύτταρα) . Τέτοια είναι τα μακροφάγα της υπενδοθηλιακής στοιβάδας των μεγάλων αγγείων και τα μακροφάγα του χορίου και του υποβλεννογονίου χιτώνα των κοίλων σπλάχνων . Επίσης στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα μακροφάγα του συνδετικού ιστού της καρδιάς , μια ιδιαίτερη κατηγορία κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα B-MAC-5 και CD-45 αλλά δεν εκφράζουν Μη-ειδική Εστεράση και αντιγόνα MHC-II (Spencer και Fabre , 1990) . Μια κατηγορία κυττάρων για τα οποία ακόμα δεν υπάρχει πλήρης συμφωνία εάν πρέπει να ενταχθούν στο σύστημα των Μονοπύρρηνων Φαγοκυττάρων είναι τα Δικτυοκύτταρα , για τα οποία θα γίνει στην συνέχεια ειδική αναφορά . Από όσο έχουν ήδη αναφερθεί γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία από Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα (Forster και Landy, 1981 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Weinberg και Athens , 1993 , Sigal και Ron, 1994) . Αν και τα μακροφάγα του συνδετικού ιστού και των ορογόνων κοιλοτήτων έχουν μελετηθεί περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο είδος μονοπύρρηνου φαγοκυττάρου δεν θα γίνει εδώ κάποια ιδιαίτερη μνεία σε αυτά , αφού το μεγαλύτερο μέρος των δεδομένων που θα αναφερθούν στα επόμενα κεφάλαια αφορά ακριβώς αυτά τα είδη των μακροφάγων . Αμέσως παρακάτω θα γίνει ειδική αναφορά σε ορισμένα άλλα είδη

μονοπύρηνων φαγοκυττάρων για τα οποία υπάρχουν πολύ ενδιαφέροντα στοιχεία που αναδεικνύουν την λειτουργική τους ιδιαιτερότητα .

1. Τα μονοκύτταρα όχι μόνο αποτελούν την μορφή με την οποία τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα , αλλά εκφράζουν και το στάδιο της μετάβασής από τις άωρες κυτταρικές μορφές του μυελού των οστών στις ώριμες μορφές μακροφάγων των ιστών . Προέρχονται από τα προμνοκύτταρα του μυελού των οστών . Παραμένουν στην αιματική κυκλοφορία για λίγες ώρες (συνήθως λιγότερες από 24 ώρες , αν και αυτό διαφέρει ανάμεσα στα ζωικά είδη) πριν την μετανάστευσή τους στους ιστούς . Αποτελούν το 3 - 5 % των λευκοκυττάρων του αίματος και για να διατηρηθεί ο αριθμός τους σταθερός παράγονται καθημερινά από τον μυελό των οστών 10^8 μονοκύτταρα ανά kg βάρους σώματος . Τα μονοκύτταρα έχουν ιδιαίτερη μορφολογία . Εμφανίζουν σφαιρικό σχήμα με διάμετρο περίπου 20 - 25 μm και σχετικά αραιοχρωματικό , ευμεγέθη , ωσειδή πυρήνα με εντομή (ή εναλλακτικά νεφροειδή ή μηννοειδή πυρήνα) ο οποίος καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος . Στα άλλα είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων η αναλογία των όγκων πυρήνα / κυτταροπλάσματος είναι πιο μικρή . Το κυτταρόπλασμα υπάρχει περισσότερο προς το μέρος της εντομής του πυρήνα . Αν και τα μονοκύτταρα έχουν κοκκιώδες κυτταρόπλασμα , που οφείλεται στην ύπαρξη λυσοσωμάτων , έχουν όμως λιγότερα και μικρότερα λυσοσώματα από τα μακροφάγα και λιγότερα λυσοσωματικά ένζυμα . Πιθανώς έχουν και λιγότερα μιτοχόνδρια . Επίσης τα μονοκύτταρα έχουν ιδιαίτερη ιστοχημική εντόπιση και κατανομή της Μη-ειδικής Εστεράσης στο κυτταρόπλάσμα τους , καθώς και διαφορετικούς υποδοχείς και αντιγόνα στην επιφάνειά τους από τα άλλα κύτταρα του συστήματος . Για παράδειγμα τα μονοκύτταρα εκφράζουν λιγότερο τους Υποδοχείς Μαννόζης-Φουκόζης από ότι τα ιστικά μακροφάγα (Mokoenen και Gordon, 1985) , όπως εκφράζουν λιγότερο τα Ia-αντιγόνα επιφανείας . Τέλος τα μονοκύτταρα δεν έχουν ανεπτυγμένα τα ίδια ενζυμικά συστήματα με τα άλλα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα . Παράδειγμα τέτοιας διαφοράς είναι το ότι τα μονοκύτταρα εκφράζουν την Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase) λιγότερο από τα μακροφάγα ενώ εκφράζουν πολύ πιο έντονα την Μυελοϋπεροξειδάση . Ίσως αυτό εξηγεί το γεγονός ότι ενώ τα μονοκύτταρα παράγουν την ίδια ποσότητα $\text{O}_2^{\cdot -}$ με τα μακροφάγα εντούτοις παράγουν λιγότερο H_2O_2 (Nakagawara, 1981) , ενώ μετά την μετατροπή τους σε μακροφάγα (όπου θα αυξηθεί η έκφραση της Δισμουτάσης και θα μειωθεί η έκφραση της Μυελοϋπεροξειδάσης) παράγουν μεγάλες ποσότητες H_2O_2 (Cohen και συν., 1996) . Όλα τα μονοκύτταρα δεν έχουν τις ίδιες ιδιότητες , αλλά αντιθέτως παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια , πράγμα που ενδεχομένως σχετίζεται με τον ιστό στον οποίο είναι προορισμένα να μεταναστεύσουν και να εγκατασταθούν . (Forster και Landy, 1981 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

2. Τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) εντοπίζονται στα κολποειδή του ήπατος . Πολύ συχνά επικάθονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτείνοντας τις προσεκβολές τους στον χώρο του Disse . Άλλοτε βρίσκονται ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα . Μπορεί να εντοπιστούν κοντά σε κύτταρα Ito και κύτταρα Pit . Είναι πιο άφθονα κοντά στα πυλαία διαστήματα παρά κοντά στις κεντρικές φλέβες . Αποτελούν το 15% του συνόλου των κυττάρων του ήπατος και τα πολυπληθέστερα καθηλωμένα μακροφάγα του συστήματος . Κατά κύριο λόγο προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος . Ίσως κατά μικρό ποσοστό προέρχονται από την τοπική μιτωτική διαίρεση άλλων κυττάρων Kupffer , αν και έχει προταθεί ότι τα κύτταρα Pit αποτελούν προδρομικά στάδιά τους . Εξαιτίας της εντόπισής τους

μέσα στον αυλό των κοιλιοειδών έρχονται σε άμεση επαφή με τα στοιχεία του αίματος . Τα κύτταρα Kupffer είναι επιφορτισμένα με την αφαίρεση των μικροοργανισμών, τοξινών, καρκινικών κυττάρων, ξένων σωμάτων και μη-υγιών ερυθροκυττάρων από το αίμα της πυλαίας φλέβας . Εκφράζουν στην επιφάνειά τους πολλούς υποδοχείς όπως υποδοχείς για το Συμπλήρωμα, Fc-υποδοχείς, υποδοχείς Μαννόζης-Φουκόζης (MFR-υποδοχείς), υποδοχείς για τον PAF, υποδοχείς για Λιποπρωτείνες (Scavenger Receptors) και για Απολιποπρωτεΐνη C, υποδοχείς τρανσφερρίνης, υποδοχείς CD-14 και CD-33 και τέλος υποδοχείς Ιντερφερόνης-γ . Επίσης τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν χαρακτηριστική εικόνα στην ιστοχημική χρώση για Υπεροξειδάση, αφού σε αντίθεση με άλλες μορφές ώριμων μακροφάγων δίνουν έντονη ιστοχημική αντίδραση για το ένζυμο στο Κοκκίωδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στην Περιπυρηνική Δεξαμενή . Το λυσοσωματικό σύστημα των κυττάρων Kupffer είναι πολύ καλά ανεπτυγμένο .

Τα κύτταρα Kupffer είναι δραστηρότατα φαγοκύτταρα και για διαλυτές ουσίες και για μικροοργανισμούς . Εκτός από την έντονη ικανότητά τους να απομακρύνουν τις ενδοτοξίνες (LPS) από την κυκλοφορία με ενδοκύτωση, τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι συμμετέχουν στην δημιουργία της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης εκκρίνοντας την Ιντερλευκίνη-6 (IL-6) η οποία και διεγείρει τα ηπατοκύτταρα για την παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης . Επίσης τα κύτταρα Kupffer παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου και Αζώτου ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH και NO), Εικοσανοειδή (PGD_2 , PGE_2 , TXA_2 , LTB_4 , LTC_4 και LTE_4), Κολλαγενάση, β-Γλυκουρονιδάση, Καθεψίνες, Ινωδονεκτίνη, Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου, Παράγοντες του Συμπληρώματος, Λυσοζύμη, Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), Ιντερλευκίνη-1 (IL-1), Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (TNFα), Ιντερφερόνη-α (INF-α) και Ιντερφερόνη-β (INF-β) .

Ειδικά σε ότι αφορά την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου, τα κύτταρα Kupffer παράγουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$ παρά H_2O_2 γιατί εκφράζουν ασθενώς την Δισμουτάση του Υπεροξειδίου, ενώ στερούνται Μυελοϋπεροξειδάσης και για αυτό δεν φαίνεται να παράγουν HOCl . Όμως η παραγωγή των κυτταροκινών IL-6 και TNF-α είναι ακόμα πιο σημαντικές ιδιότητες των κυττάρων Kupffer, διότι συσχετίζονται με συστηματικές αντιδράσεις σε λοιμώξεις και νεοπλασίες . Η IL-6 που εκκρίνεται από διεγερμένα ηπατικά μακροφάγα όχι μόνο επάγει την παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από τα ηπατοκύτταρα αλλά επίσης προάγει την διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα . Ο TNF-α παράγεται από τα διεγερμένα κύτταρα Kupffer και προκαλεί την ενεργοποίηση και συσσώρευση στο ήπαρ των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων του αίματος και την παρακρινική ενεργοποίηση των υπολοίπων μη-διεγερμένων κυττάρων Kupffer και των ενδοθηλιακών κυττάρων . Επίσης ο TNFα προκαλεί την ανάπτυξη πυρετού, αναιμίας, ανορεξίας και καχεξίας, την λύση των νεοπλασματικών κυττάρων και την Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη . Οι εκκριτικές δραστηριότητες των ηπατικών μακροφάγων συνοδεύονται και από μια άλλη σημαντική ιδιότητα, την ικανότητα παρουσίασης των αντιγόνων στα Τ-λεμφοκύτταρα, με την οποία οδηγούν στην δημιουργία ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης .

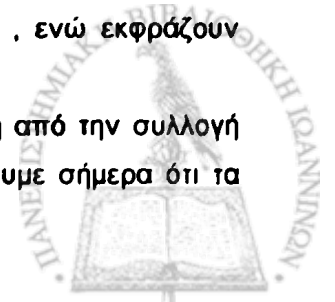
Οι πολλαπλές βιολογικές δραστηριότητες των κυττάρων Kupffer επιτρέπουν την συμμετοχή τους σε πολυάριθμες διεργασίες εκτός από την κάθαρση της κυκλοφορίας από τους μικροοργανισμούς και τα καρκινικά κύτταρα . Έτσι συμμετέχουν στην ρύθμιση της λειτουργίας των ηπατοκυττάρων, στην ρύθμιση της αιματικής κυκλοφορίας στο ήπαρ κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων (με

την παραγωγή νιτρικού οξειδίου και μικρών ποσοτήτων προστακυκλίνης) , στην αναδιαμόρφωση του ηπατικού παρεγχύματος (remodelling) μετά από φλεγμονές , στην ρύθμιση της αιμοποίησης και της πήκτικότητας του αίματος , στην καταστροφή των γηρασμένων ερυθροκυττάρων , στον μεταβολισμό του σιδήρου και της χολερυθρίνης , και σε πολλές άλλες δραστηριότητες . Οι επιδράσεις τους όμως δεν είναι πάντοτε ευνοϊκές , αφού τα ενεργοποιημένα ηπατικά μακροφάγα κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι δυνατόν να προκαλέσουν καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος (μέσω παραγωγής Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου και Λυσοσωματικών Ενζύμων) καθώς και την ανάπτυξη ίνωσης και κίρρωσης μέσω της παραγωγής ουδέτερων πρωτεασών και των παραγόντων IL-1, TGF- β , και TNF α . Αυτό συμβαίνει στην αλκοολική κίρρωση του ήπατος , στην ηπατοπάθεια από τετραχλωράνθρακα , στην αμοιβάδωση και σε άλλες παθήσεις . Τέλος έχει προταθεί η συμμετοχή των κυττάρων αυτών στην Ιδιοπαθή Αιμοχρωμάτωση και στην απόρριψη ηπατικών μοσχευμάτων . (Matsuo και συν.,1985, Laskin και συν.,1988, Wake και συν., 1989, Decker, 1990 , Lewis και McGee, 1992 , Weinberg και Athens , 1993 , Winwood και Arthur , 1993) .

3 . Τα πνευμονικά μακροφάγα περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες κυττάρων : α. Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , β. Τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού , γ. Τα δενδριτικά μακροφάγα , και δ. Τα ενδοαγγειακά μακροφάγα . Η συνύπαρξη των τεσσάρων αυτών ειδών μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στον πνεύμονα είναι πολύ ενδιαφέρουσα , γιατί τα κύτταρα αυτά διαφέρουν στην μορφολογία τους , στην εντόπισή τους , στις ιδιότητές τους και στην ειδική λειτουργία για την οποία είναι προορισμένα στο πλαίσιο της αμυντικής λειτουργίας του πνεύμονα . Είναι σημαντικό το ότι η δομή του πνεύμονα είναι τέτοια ώστε τα κύτταρα αυτά έρχονται συνεχώς σε άμεση επαφή με ρύπους και μικροοργανισμούς , τους οποίους πρέπει να αντιμετωπίζουν χωρίς να αλλοιωθεί η ευαίσθητη και λεπτή δομή των πνευμονικών κυψελίδων . Για τις δύο πρώτες τουλάχιστον κατηγορίες μακροφάγων έχει ήδη αποδειχθεί ότι προέρχονται από τα μονοκύτταρα , αλλά και από προϋπάρχοντα όμοια μακροφάγα , που πολλαπλασιάζονται τοπικά με μιτωτική διαίρεση υπό την επίδραση του παράγοντα CSF που εκκρίνουν οι ινοβλάστες .

α. Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εντοπίζονται στον εσωτερικό χώρο των κυψελίδων , στο όριο μεταξύ του τοιχώματος της κυψελίδας και του ατμοσφαιρικού αέρα και καλύπτονται μόνο από ένα λεπτό στρώμα Επιφανειοδραστικού Παράγοντα (lung surfactant) . Επειδή αποτελούν γραμμή άμυνας των αεροφόρων οδών έχουν αναπτύξει ισχυρές φαγοκυτταρικές και μικροβιοκτόνες ιδιότητες . Σε υλικό προερχόμενο από βρογχοκυψελιδική έκπλυση , αποτελούν το 90% των κυττάρων του εκπλύματος . Μορφολογικά είναι μεγάλα κύτταρα , διαμέτρου 15-50 μ m , με χαρακτηριστικές ώριμων μακροφάγων και έντονη την ιστοχημική αντίδραση της Μη-ειδικής Εστεράσης . Επίσης δίνουν θετική την ιστοχημική αντίδραση PAS (Υπεριωδικό Οξύ-Schiff) . Τα λυσοσώματά τους δίνουν έντονα θετική την αντίδραση Ώξινης Φωσφατάσης . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι κυρίως αμυντικά και όχι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα . Έτσι παρουσιάζουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (και μέσω Fc-υποδοχέων και μη-εξαρτώμενη από τους Fc-υποδοχείς) και αθρόα παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου και κυταροκινών (TNF α , INF- α και INF- β) , ενώ εκφράζουν ασθενώς τα αντιγόνα MHC τάξεως II .

Επειδή η συλλογή των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων είναι πιο εύκολη από την συλλογή των άλλων πνευμονικών μακροφάγων έχουν μελετηθεί καλύτερα . Έτσι γνωρίζουμε σήμερα ότι τα



βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν στην επιφάνειά τους Fc-υποδοχείς για τις ανοσοσφαιρίνες IgG, IgE και IgA, που επιτρέπουν στα κύτταρα αυτά την σύνδεση των περισσότερων αντιγόνων. Οι Fc-υποδοχείς για τις IgG ανοσοσφαιρίνες είναι και των τριών τύπων (FcγR-I, FcγR-II και FcγR-III). Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επίσης φέρουν στην επιφάνειά τους ειδικά μόρια IgG και IgA, για την φαγοκυττάρωση μη-οψωνοποιημένων παραγόντων. Έχει αποδειχτεί ότι τα κύτταρα αυτά επίσης είναι εξοπλισμένα με υποδοχείς CR-1, CR-3 και CR-4 για τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος C_{3b} και C_{4b}, οι οποίοι υποδοχείς επίσης συμμετέχουν στην διαδικασία φαγοκυττάρωσης οψωνοποιημένων σωματιδίων. Τέλος τα μακροφάγα αυτά διαθέτουν υποδοχείς για τις λεκτίνες (lectins) των μικροβίων, οι οποίοι επίσης συμμετέχουν στις διαδικασίες φαγοκυττάρωσης. Εκτός όμως από τους υποδοχείς που συσχετίζονται με την φαγοκυττάρωση τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν και υποδοχείς για κυταροκίνες που τα ενεργοποιούν (π.χ. IL-1, IL-2, TNF-α και INF-γ), για κυταροκίνες που τα καταστέλλουν (IL-4 και IL-10) και τέλος για αυξητικούς παράγοντες (π.χ. GM-CSF, CSF-1 και TGF-β). Ορισμένες από αυτές τις κυταροκίνες παράγονται από τα ίδια τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και έτσι ασκείται αυτοκρινική και παρακρινική ρύθμισή τους. Τέλος, ανιχνεύονται στην επιφάνεια των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων και διάφορα άλλα μόρια, όπως αντιγόνα CD-11, CD-71 (υποδοχέας Τρανσφερίνης), CD-18 και CD-54 (μόριο προσκόλλησης ICAM-1).

Όταν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διεγείρονται από ενδοτοξίνη, INF-γ ή από την εισπνοή σωματιδίων πυριτίου παράγουν μεγάλες ποσότητες εικοσανοειδών, κυρίως TXA₂ και LTB₄ αλλά σε μικρότερες ποσότητες και PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} και 5-HETE. Τα εικοσανοειδή αυτά όχι μόνο οδηγούν στην ανάπτυξη έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης και διεγείρουν τα παρακείμενα μακροφάγα για την παραγωγή TNFα και IL-1, αλλά επίσης διεγείρουν την υπερπλασία των ινοβλαστών και την ανάπτυξη ουλώδους συνδετικού ιστού στο πνευμονικό παρέγχυμα. Μετά από διέγερση με TNFα, INF-γ ή LTB₄ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παράγουν επίσης μεγάλες ποσότητες O₂⁻¹, H₂O₂ και OH που είναι ιδιαίτερα σημαντικές ουσίες στην καταστροφή μικροοργανισμών, όπως φαίνεται από τους ασθενείς με Χρόνια Κοκκιωματώδη Νόσο. Όμως τα κύτταρα αυτά μπορούν να διεγείρουν και τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα μέσω της έκκρισης των κυταροκινών IL-6, IL-8, PDGF και TGF-β. Όλες οι παραπάνω παράμετροι των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων είναι διαταραγμένες στους καπνιστές και στους ασθενείς με Σαρκοείδωση και Διάμεση Πνευμονική Ίνωση. (Hocking και Golde, 1979a, Hocking και Golde, 1979b, Lewis και McGee, 1992, Wizemann και Laskin, 1994, Lohmann-Matthes και συν., 1994, Nicod, 1996).

β. Τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού εντοπίζονται στον μεσοκυψελιδικό και περιβρογχικό συνδετικό ιστό και είναι μικρά κύτταρα. Έχουν τους μορφολογικούς χαρακτήρες των μονοκυττάρων. Δίνουν ασθενή την ιστοχημική αντίδραση Μη-ειδικής Εστεράσης. Έχουν μεικτές ιδιότητες αμυντικών και αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Σε σύγκριση με τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι εξίσου αποτελεσματικά στην φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων, λιγότερο αποτελεσματικά στην ανεξάρτητη από Fc-υποδοχείς φαγοκυττάρωση και στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και κυταροκινών, ενώ πιο αποτελεσματικά στην παρουσίαση αντιγόνου, στην έκφραση αντιγόνων MHC τάξεως II, στην παραγωγή IL-1 και IL-6 και στην χημειοταξία. Ειδικά σε ότι αφορά την παραγωγή O₂⁻¹, H₂O₂ και TNFα, τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού

όχι μόνο είναι λιγότερο αποτελεσματικά αλλά επίσης διαθέτουν και διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Wizemann και Laskin, 1994).

γ. Τα δενδριτικά κύτταρα και τα κύτταρα του Langerhans του πνεύμονα ενδεχομένως αποτελούν το ίδιο κύτταρο σε δύο διαφορετικά στάδια ωρίμανσης. Έχουν τους ίδιους χαρακτήρες με τα δενδριτικά κύτταρα του σπλήνα και τα κύτταρα Langerhans του δέρματος. Δεν είναι απολύτως εξακριβωμένο ακόμα αν πράγματι είναι μακροφάγα. Τα δενδριτικά κύτταρα πρωτοεμφανίζονται στον πνεύμονα πριν από το τέλος της κύησης και είναι ενεργά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αμέσως μετά τον τοκετό. Εντοπίζονται στον διάμεσο πνευμονικό ιστό αλλά και μεταξύ των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων και στερούνται φαγοκυτταρικής δράσης και Fc-υποδοχέων, ενώ αντιθέτως εκφράζουν έντονα τα αντιγόνα MHC τάξεως I και II, καθώς και το μόριο προσκόλλησης (Adhesion molecule) ICAM-1. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα ικανά στην διέγερση των CD-8 κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα Langerhans έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής στους ιστούς. Εμφανίζουν στο κυτταρόπλασμά τους τα χαρακτηριστικά σωμάτια Birbeck. Είναι ασθενή φαγοκύτταρα αλλά έχουν ανεπτυγμένη την ικανότητα κίνησης και συχνά μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες για να παρουσιάσουν το αντιγόνο που ενδοκύττωσαν. Ο κύριος σκοπός τους είναι η διέγερση των T-λεμφοκυττάρων μνήμης κατά των αντιγόνων στα οποία έχει ξαναεκτεθεί ο πνευμονικός ιστός.

δ. Τα ενδοαγγειακά μακροφάγα εντοπίζονται προσκολλημένα επάνω στο ενδοθήλιο των τριχοειδικών αγγείων του πνεύμονα αλλά δεν είναι μονοκύτταρα. Παρουσιάζουν μορφολογία ιστικών μακροφάγων και έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Ο ρόλος τους είναι να καταστρέφουν τους βλαπτικούς παράγοντες που εισέρχονται στον πνεύμονα από την αιματική κυκλοφορία.

4. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος χωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά είδη: α. τα μικρογλοιακά κύτταρα, β. τα μακροφάγα του χοριοειδούς πλέγματος, γ. τα μακροφάγα των λεπτομηνίγγων και δ. τα περιαγγειακά μακροφάγα του ΚΝΣ. Έχει αποδειχθεί ότι και τα τέσσερα αυτά είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων προέρχονται από τα μονοκύτταρα που μεταναστεύουν μέσα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας CD4, που τα κάνει ευάλωτα στην εισβολή από τον ιό HIV. Από πλευράς μορφολογίας και εκκριτικής δραστηριότητας τα τέσσερα αυτά είδη μακροφάγων του ΚΝΣ παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος που μεταναστεύουν στο ΚΝΣ κατά το τέλος της κύησης και σταδιακά μετατρέπονται από στρογγυλά κύτταρα σε μικρά κύτταρα με πολυάριθμες και πολυσχιδείς διακλαδώσεις. Ανάλογα με την εντόπισή τους στο ΚΝΣ αποκτούν διαφορετική μορφή και έτσι τα μικρογλοιακά κύτταρα χωρίζονται σε Ακτινωτά (radial) στην φαιά ουσία, Επιμήκη (longitudinal) στην λευκή ουσία και Συμπαγή (compact) στις περικολιακές περιοχές. Ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αν τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται τοπικά ή εάν ανανεώνονται με την είσοδο νέων μονοκυττάρων. Τα μικρογλοιακά κύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους ορισμένα αντιγόνα και υποδοχείς των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, όπως το αντιγόνο F4/80, Fc-υποδοχείς και CR3-υποδοχείς. Ανάμεσα στις λειτουργίες τους κατά την εμβρυϊκή ηλικία είναι η φαγοκυττάρωση των νεκρών νευρώνων και των νευριτών τους και η παραγωγή IL-1 που προκαλεί πολλαπλασιασμό των μικρογλοιακών κυττάρων και νεοαγγειογένεση. Στον ενήλικα ο ρόλος των

μικρογλοιακών κυττάρων δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, αν και για ορισμένες ομάδες όπως εκείνων της οπίσθιας υπόφυσης είναι γνωστό ότι ειδικώς φαγοκυτταρώνουν τις υπερμεγέθεις αποφυάδες των νευρικών κυττάρων. Στα υπόλοιπα μικρογλοιακά κύτταρα δεν έχει αποδοθεί κάποιος ρόλος και θεωρούνται ανενεργά μέχρι την στιγμή που θα αντιμετωπίσουν κάποιο βλαπτικό παράγοντα, όπως εισβολή μικροοργανισμών. Τότε θα αντιδράσουν σαν ιστικά μακροφάγα. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι μακροφάγα με σημαντική ομοιότητα με τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζονται και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα.

Τα μακροφάγα του χοριοειδούς πλέγματος εντοπίζονται σε δύο θέσεις, είτε μέσα στον συνδετικό ιστό του χοριοειδούς πλέγματος (stromal macrophages) ή επάνω στο κυβικό επιθήλιο των πλεγμάτων (Kolmer cells ή epiplexus cells). Και οι δύο αυτές κατηγορίες μακροφάγων εκφράζουν αντιγόνα MHC τάξεως II. Η πρώτη κατηγορία προορίζεται κυρίως για να αποτρέψει την είσοδο μικροοργανισμών στο ΚΝΣ και την έκθεση των αντιγόνων του ΚΝΣ στα λεμφοκύτταρα του αίματος. Η δεύτερη κατηγορία (τα κύτταρα Kolmer) φαίνεται ότι κυρίως καθαρίζει τις κοιλίες από κατεστραμμένα κυτταρικά και ιστικά στοιχεία που αποπίπτουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τα μακροφάγα τα οποία ανευρίσκονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενδεχομένως προέρχονται από αυτά τα κύτταρα Kolmer.

Τα μακροφάγα των λεπτομηνίγγων είτε εντοπίζονται ελεύθερα στον υπαραχνοειδή χώρο ή είναι καθηλωμένα επάνω στην χοριοειδή μήνιγγα. Έχουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Σε αντίθεση με τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν τα περισσότερα αντιγόνα επιφανείας και τους υποδοχείς που εκφράζουν τα ιστικά μακροφάγα. Τα μακροφάγα των λεπτομηνίγγων εμποδίζουν την είσοδο μικροοργανισμών από το αίμα στο ΚΝΣ και την είσοδο αντιγόνων του ΚΝΣ στο αίμα.

Τα περιαγγειακά μακροφάγα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος εντοπίζονται στην βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου των αγγείων του ΚΝΣ. Δεν έχουν πολλές ομοιότητες με τα μικρογλοιακά κύτταρα. Παρουσιάζουν τους μορφολογικούς χαρακτήρες και τα αντιγόνα επιφανείας των ιστικών μακροφάγων. Θεωρείται πιθανό ότι διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ΚΝΣ και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Από όλα τα παραπάνω είδη των μακροφάγων του ΚΝΣ, τα μικρογλοιακά φαίνεται ότι διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο. Μετά από ανοικτούς τραυματισμούς του ΚΝΣ τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται και μαζί με μονοκύτταρα που μεταναστεύουν στον τόπο της ιστικής καταστροφής απομακρύνουν τους κατεστραμμένους νευρώνες με φαγοκυττάρωση. Επίσης εκκρίνουν Ιντερλευκίνη-1 η οποία προκαλεί πολλαπλασιασμό των μικρογλοιακών κυττάρων και δημιουργία νέων αγγείων. Αυτά οδηγούν στην επαναφορά της ομοιόστασης του νευρικού ιστού και στην αποκατάσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η μετανάστευση μονοκυττάρων από το αίμα δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί η ικανότητα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων να φτάνουν σε εστίες εγκεφαλικών μεταστάσεων και μέσα από άθικτο φραγμό. Επίσης τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν στους δύο μηχανισμούς εκφύλισης των διατμημένων νευριτών του ΚΝΣ (Wallerian degeneration και Retrograde degeneration). Τέλος τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα περιαγγειακά μακροφάγα συμμετέχουν και στην ανοσολογικής αιτιολογίας καταστροφή του ΚΝΣ, π.χ. στην Αυτοάνοση Αλλεργική Εγκεφαλίτιδα και στην Πολλαπλή Σκλήρυνση, λόγω της ικανότητάς τους να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα. (Schackert και συν., 1988, Dhib-Jalbut και McFarlin, 1989, Perry και Gordon, 1991, Lewis και McGee, 1992).

5. **Μακροφάγα του περιφερικού νευρικού συστήματος** . Εντοπίζονται στα περιφερικά νευρικά γάγγλια και στα νεύρα . Στα περιφερικά νευρικά γάγγλια τα μακροφάγα είναι άφθονα και παρουσιάζουν την τυπική αστεροειδή ή πολυγωνική μορφή και τα αντιγόνα επιφανείας των ώριμων ιστικών μακροφάγων και εκφράζουν επίσης αντιγόνα MHC τάξεως II . Οι προσεκβολές της επιφάνειας των μακροφάγων αυτών περιβάλλουν τους νευρίτες των γαγγλιακών κυττάρων . Στα περιφερικά νεύρα τα μακροφάγα εντοπίζονται διάσπαρτα κατά μήκος των νευρώνων και πιθανώς εξυπηρετούν την απομάκρυνση των νευριτών που καταστρέφονται κατά την ανάπτυξη του νεύρου . Κατά την διάρκεια τραυματισμών των περιφερικών νεύρων τα μακροφάγα συμμετέχουν στην εκφύλιση των διατηρημένων νευρώνων , στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Schwann και στην αναγέννηση του κατεστραμμένου νεύρου . (Petty και Gordon, 1991 , Lewis και McGee, 1992) .

6. Τα **μακροφάγα του μυελού των οστών (resident bone marrow macrophages)** είναι κύτταρα επιφορτισμένα με σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην αιμοποίηση . Τα μακροφάγα αυτά αποτελούν τμήμα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών και έρχονται σε άμεση επαφή με τα αναπτυσσόμενα αιμοποιητικά κύτταρα , τα οποία και επηρεάζουν γιατί παράγουν κυτταροκίνες . Έχει αποδειχτεί ότι τα μακροφάγα του μυελού των οστών παράγουν παράγοντες όπως M-CSF, GM-CSF, G-CSF, Ερυθροποιητίνη, IL-1, TNF- α , IL-6 και Ακτιβίνη (Actinin) , οι οποίοι προάγουν την αύξηση και διαφοροποίηση των βλαστών της ερυθροκυτταρικής και λευκοκυτταρικής σειράς , αλλά και άλλες κυτταροκίνες που έχουν διαφορετικές επιδράσεις στην αιμοποίηση (π.χ. MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, TGF- β και INF- α) . Τα μακροφάγα του μυελού των οστών έχουν διαφορετικούς φαινοτύπους αντιγόνων και υποδοχέων επιφανείας από τα μονοκύτταρα και τα ιστικά μακροφάγα . Έτσι δεν εκφράζουν τους C3B και CD14-υποδοχείς , ούτε το αντιγόνο επιφανείας Mac-1 , ενώ αντιθέτως εκφράζουν αρκετά έντονα τους Υποδοχείς Ερυθροβλαστών, τον FcR-I-υποδοχέα και τα αντιγόνα CD16 και CD31 . Αυτός ο φαινότυπος προφανώς εξυπηρετεί την ιδιαίτερη λειτουργία τους .

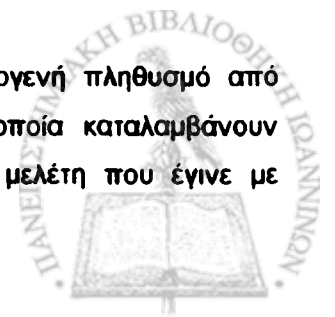
Τα μακροφάγα του μυελού των οστών προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος και όταν θα εγκατασταθούν στις μυελικές κοιλότητες (όπου θα αποτελούν το 1-2% των κυττάρων) οι αποφυάδες τους θα δημιουργήσουν ένα τρισδιάστατο πλέγμα πάνω στο οποίο αναπτύσσονται τα αιμοποιητικά κύτταρα . Η ανανέωση των μακροφάγων αυτών γίνεται με εισροή νέων μονοκυττάρων από το αίμα . Τα μακροφάγα του μυελού των οστών συνήθως δημιουργούν συσσωματώματα , που χαρακτηριστικά εκφράζουν τα αντιγόνα επιφανείας F4/80 και Ia , καθώς και ιστοχημική δραστηριότητα Μη-ειδικής Εστεράσης και Ώξινης Φωσφατάσης . Από απόψεως μορφολογίας , τα μακροφάγα αυτά έχουν την παρόμοια εμφάνιση στο οπτικό μικροσκόπιο με τα περισσότερα άλλα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα .

Υπό κανονικές συνθήκες τα μακροφάγα παράγουν μικρές ποσότητες από ορισμένες μόνο κυτταροκίνες . Όταν στο σώμα υπάρχει μια εστία φλεγμονής ή λοίμωξης , τα μακροφάγα έρχονται σε επαφή με μικροβιακές τοξίνες , με ολόκληρους μικροοργανισμούς , με προϊόντα ιστικής καταστροφής ή με τους χυμικούς (humoral) μεσολαβητές της φλεγμονής . Τότε τα μακροφάγα ενεργοποιούνται για την παραγωγή ακόμα μεγαλύτερης ποσότητας και ποικιλίας κυτταροκινών , ώστε να υπάρξει μαζική παραγωγή των αιμοποιητικών κυττάρων που θα συμμετάσχουν στην φλεγμονώδη ή ανοσολογική αντίδραση . Μεταξύ αυτών σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι IL-1(που διεγείρει την παραγωγή άλλων αιμοποιητικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες και δρα συνεργιστικά μαζί τους στην ανάπτυξη των αιμοποιητικών βλαστών) , ο TNF α (που επίσης δρα έμμεσα ή άμεσα

στην αιμοποίηση) και οι Φλεγμονώδεις Πρωτεΐνες των Μακροφάγων (MIP-1α, MIP-1β και MIP-2, που επηρεάζουν την ανάπτυξη της κοκκιοκυτταρικής και μονοκυτταρικής σειράς δρώντας συνεργιστικά με τους άλλους αιμοποιητικούς παράγοντες). Εκτός από την έκκριση των κυτταροκινών, τα μακροφάγα διαθέτουν και άλλους τρόπους για να προάγουν την αιμοποίηση, οι οποίοι εξαρτώνται από την άμεση επαφή των μακροφάγων με τις βλάστες. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα του μυελού συνδέονται με τις αναπτυσσόμενες ερυθροβλάστες και σχηματίζουν το ερυθροβλαστικό νησίδιο (erythroblastic islet). Οι ερυθροβλάστες παραμένουν συνδεδεμένες με το μακροφάγο μέχρι την αποβολή του πυρήνα τους. Η σύνδεση του μακροφάγου με τους ερυθροβλάστες γίνεται κατά κύριο λόγο μέσω του ειδικού Ερυθροβλαστικού Υποδοχέα (EbR) και κατά δεύτερο λόγο μέσω του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα Sialoadhesin. Τα μακροφάγα φαίνεται ότι ασκούν τροφικό ρόλο και ότι υποστηρίζουν την ανάπτυξη των ερυθροβλαστών με την τοπική έκκριση Ερυθροποιητίνης, Ακτιβίνης και του Ιστικού Αναστολέα των Μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) ενώ στο τέλος φαγοκυτταρώνουν τους αποβαλλόμενους πυρήνες. Τα μακροφάγα έρχονται σε επαφή και με τις άωρες μορφές των κοκκιοκυττάρων, δημιουργώντας ισχυρές συνδέσεις με αυτά μέσω ειδικών μορίων (κυρίως με την μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη Sialoadhesin, που αναγνωρίζει γλυκολιπίδια και σιαλογλυκοπρωτεΐνες των κοκκιοκυττάρων) και υποβοηθούν τον πολλαπλασιασμό τους. Τέλος έχει αποδειχτεί ότι τα μακροφάγα του μυελού των οστών συνδέονται με τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα και προάγουν την αύξηση του μεγέθους και διαφοροποίησή τους μέσω των εκκρινόμενων Ιντερλευκινών IL-3 και IL-6. (Crocker και Gordon, 1985, Crocker και συν., 1988, Lewis και McGee, 1992).

7. Τα μακροφάγα του γαστρεντερικού σωλήνα είναι διανεμημένα στο λεπτό και στο παχύ έντερο, κυρίως στο χόριο του βλεννογόνου αλλά και στον εντερικό λεμφικό ιστό (πλάκες του Peyer). Η δράση αυτών των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι αμυντική και μπορούν να φαγοκυτταρώσουν με ευκολία μικροοργανισμούς που εισέρχονται στο εντερικό τοίχωμα και να εμποδίσουν την διείσδυσή τους στο αίμα. Ταυτόχρονα, μπορούν να παρουσιάσουν τα αντιγόνα των μικροβίων αυτών στα λεμφοκύτταρα και να διεγείρουν μια ειδική ανοσολογική αντίδραση. Μια άλλη λειτουργία που επιτελούν τα μακροφάγα του χορίου είναι να φαγοκυτταρώνουν τα αλλοιωμένα επιθηλιακά κύτταρα της κορυφής των εντερικών λαχνών (Han και συν., 1993). Μακροφάγα υπάρχουν και σε άλλες θέσεις των εντέρων και πιο συγκεκριμένα στον ορογόνο χιτώννα και ανάμεσα στον επιμήκη και στην κυκλωτήρνη στοιβάδα του μυϊκού χιτώννα (κοντά στο πλέγμα του Auerbach). Ειδικά τα μακροφάγα που εντοπίζονται στην περιοχή του πλέγματος του Auerbach είναι διαφορετικά από τα άλλα ιστικά μακροφάγα, τόσο στην μορφολογία (αστεροειδή κύτταρα με 4-6 πολυσιχιδείς προσεκβολές) όσο και στους λειτουργικούς δείκτες τους. Ενώ εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας και υποδοχείς των ώριμων μακροφάγων καθώς και αντιγόνα MHC τάξεως II, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στερούνται κάθε ενδοκυττωτικής δραστηριότητας και με ιστοχημικές τεχνικές δεν εκφράζουν Λυσοζύμη. Συνθετάση των Προσταγλανδινών και Ώξινη Φωσφατάση, είναι δηλαδή ανενεργά κύτταρα. Δεν είναι γνωστός ο σκοπός της στενής τους τοπογραφικής εντόπισης με τα κύτταρα Cajal στα πλέγματα του Auerbach (Mikkelsen, 1995).

8. Τα σπληνικά μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό από πολλά και διαφορετικά είδη μακροφάγων και δένδριτικών κυττάρων τα οποία καταλαμβάνουν συγκεκριμένες ανατομικές θέσεις στον σπλήνα. Σε μια ανοσοϊστοχημική μελέτη που έγινε με



ανθρώπινους σπλήνες διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν πολλοί υποπληθυσμοί μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με διαφορετικούς φαινοτύπους αντιγόνων επιφανείας και υποδοχέων (Buckley και συν., 1987). Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι στον ερυθρό πολφό του σπλήνα υπάρχουν δύο μεγάλοι υποπληθυσμοί με ομοιόμορφη κατανομή στις δοκίδες του ερυθρού πολφού (οι οποίοι δεν έχουν κανένα αντιγόνο επιφανείας κοινό μεταξύ τους) καθώς και δύο μικροί υποπληθυσμοί, από τους οποίους ο ένας περιλαμβάνει τα κύτταρα που επενδύουν τα κολποειδή (θετικά για δείκτη OKM-5) ενώ ο άλλος περιλαμβάνει κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες μέσα στις δοκίδες. Στην περιφερική ζώνη (marginal zone) του σπλήνα τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εκφράζουν ορισμένα από τα αντιγόνα και τους υποδοχείς των μακροφάγων του ερυθρού πολφού αλλά επίσης και κάποια διαφορετικά αντιγόνα και υποδοχείς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ένας από τους υποπληθυσμούς μακροφάγων της περιφερικής ζώνης που εκφράζουν τους δείκτες επιφανείας Leu-3a, Leu-3b και 63-D3. Αυτά τα κύτταρα διατάσσονται σε πυκνές ομάδες γύρω από τα αρτηρίδια της περιφερικής ζώνης και θυμίζουν πολύ τα «σπληνικά ελλειψοειδή» (splenic ellipsoids ή έλυτρα Schweigger-Seidel) που συμμετέχουν στον εγκλωβισμό και την φαγοκυττάρωση των αντιγόνων του αίματος. Τέλος, στον λευκό πολφό του σπλήνα όπου υπάρχουν δύο διαφορετικές ζώνες, οι ζώνες των T-λεμφοκυττάρων και των B-λεμφοκυττάρων, παρουσιάζεται επίσης μια ποικιλία από είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Συγκεκριμένα, στην ζώνη των T-λεμφοκυττάρων τα τοπικά δενδριτικά κύτταρα (Δακτυλοειδώς Αναστομούμενα Δικτυοκύτταρα, Interdigitating Reticulum cells) χωρίζονται σε δύο υποπληθυσμούς με μεγάλες διαφορές των δεικτών επιφανείας, ανάλογα με το εάν διατάσσονται γύρω από αρτηρίδια ή όχι. Τέλος στην ζώνη των B-λεμφοκυττάρων υπάρχουν τρεις υποπληθυσμοί μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από τους οποίους ο ένας αποτελείται από τα μακροφάγα των βλαστικών κέντρων του λευκού πολφού (Tingible Body Macrophages) που έχουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και διαφορετικούς δείκτες επιφανείας από τους δύο υποπληθυσμούς δενδριτικών κυττάρων της B-λεμφοκυτταρικής ζώνης.

9. Τα μακροφάγα των αρθρικών υμένων είναι μεγάλα κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα και πολυάριθμα σφαιρικά ή σωληνοειδή λυσοσώματα (πρωτογενή και δευτερογενή). Επίσης έχουν άφθονα μιτοχόνδρια, κυστίδια της συσκευής Golgi και δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτύου. Το σχήμα των μακροφάγων είναι ακανόνιστο, με προσεκβολές ποικίλου μήκους και πλάτους μεταξύ των οποίων υπάρχουν εσοχές της μεμβράνης. Ο πυρήνας έχει σφαιρικό ή ωειδές σχήμα και διαθέτει ένα έντονα διακριτό πυρήνιο. Από άποψη μορφολογίας τα μακροφάγα του αρθρικού υμένα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα περιτοναϊκά μακροφάγα και ελάχιστη ομοιότητα με τα μονοκύτταρα του αίματος από τα οποία προέρχονται (Mohamed-Ali και συν., 1995). Στην επιφάνειά τους τα κύτταρα αυτά εκφράζουν αντιγόνα HLA-DR, HLA-DQ και CD-68.

10. Τα μακροφάγα του όρχη φαίνεται ότι αναπτύσσονται στον άνθρωπο κατά την 16^η-20^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής με διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων που εμφανίζονται στον όρχη κατά την 7^η εβδομάδα κύησης. Εντοπίζονται στον συνδετικό ιστό ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάκια και έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα Leydig. Τα μακροφάγα του όρχη επηρεάζουν την παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig μέσω των κυτταροκινών TNFα και IL-1. Η επίδραση αυτή είναι παρόμοια με αυτήν που εξασκούν τα μακροφάγα της ωοθήκης στην έκκριση προγεστερόνης και οιστρογόνων από τα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης που προκαλούν τα ωοθηκικά

μακροφάγα μέσω της έκκρισης TNF α και IL-1 . Η διαφορά είναι ότι τα μακροφάγα της ωθήκης παρουσιάζουν μεταβολές του αριθμού τους κατά τα στάδια του καταμήνιου κύκλου ενώ ο αριθμός των μακροφάγων του όρχη παραμένει σταθερός . Τα μακροφάγα του όρχη έχουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και επίσης θεωρούνται υπεύθυνα για την φαγοκυττάρωση των γηρασμένων κυττάρων Leydig , που θα επιτρέψει την ανανέωση των ορμονοπαραγωγών κυττάρων . Επίσης είναι υπεύθυνα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του όρχη (σύφιλη, φυματίωση, βλεννόρροια, ορχίτιδα από τον ιό της παρωτίτιδας κλπ) . Σε λοιμώξεις από τον ιό HIV τα μακροφάγα είναι τα πολυπληθέστερα κύτταρα που συρρέουν στο τόπο της φλεγμονώδους αντίδρασης . Τέλος , τα μακροφάγα του όρχη φαίνεται να συμμετέχουν στην παθογένεια της αυτοάνοσης αλλεργικής ορχίτιδας . (Hutson, 1994) .

11. Τα Μεσαγγειακά κύτταρα είναι μακροφάγα του συνδετικού ιστού ανάμεσα που υπάρχει ανάμεσα στα αρτηρίδια του νεφρικού σωματιδίου του Malpighi . Αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των κυττάρων του μεσαγγείου. Έχουν αστεροειδές σχήμα. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη Ia-αντιγόνων , Fc-υποδοχέων και C₃-υποδοχέων στην επιφάνειά τους . Έχουν έντονη φαγοκυτταρική δράση και παράγουν Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου και προσταγλανδίνες . (Baud και συν., 1983) . Επίσης έχουν παρατηρηθεί στα τοιχώματα των κοιλιοειδών του φλοιού και μυελού των επινεφριδίων ένας πληθυσμός μονοπύρηνων φαγοκυττάρων που προέρχονται από μετανάστευση μονοκυττάρων του αίματος και ονομάζονται μακροφάγα των επινεφριδίων . Χωρίζονται σε δύο υποπληθυσμούς : εκείνα που έχουν τους μορφολογικούς χαρακτήρες ώριμων μακροφάγων και έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και εκείνα που έχουν μορφολογικούς και ιστοχημικούς χαρακτήρες μονοκυττάρων και χαμηλή φαγοκυτταρική δραστηριότητα . (Surleff και Papadimitriou , 1981) .

12. Ειδική μνεία θα πρέπει να γίνει για ορισμένες κατηγορίες κυττάρων του συστήματος των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων , που περιλαμβάνουν τα Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells) , τα κύτταρα Langerhans του δέρματος , τα Δακτυλοειδώς Αναστομούμενα Δικτυοκύτταρα (Interdigitating Reticulum cells) και τέλος τα Πεπλοφόρα κύτταρα (Veiled cells).

Τα Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells) είναι αντιγονοπαρασυστασιακά κύτταρα με μικρή φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Η προέλευσή τους από τα πρόδρομα (βλαστικά) κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς έχει αμφισβητηθεί από πολλούς , συνήθως όμως εξετάζονται μαζί με τα άλλα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα και να διεγείρουν έτσι την ειδική ανοσολογική απόκριση . Εντοπίζονται στους λεμφαδένες , στις αμυγδαλές , στον θύμο , στους αρθρικούς υμένες , στην καρδιά και αλλού . Η μορφολογία τους είναι χαρακτηριστική. Έχουν συνήθως ανώμαλο σχήμα με πολυάριθμες επιμήκεις προσεκβολές του κυτταροπλάσματος , ένα πυρήνα επίσης με ακανόνιστο σχήμα και άφθονα πυκνοχρωματικά σφαιρικά μιτοχόνδρια . Τα Δενδριτικά κύτταρα έχουν ορισμένες λειτουργικές ομοιότητες με τα μονοκύτταρα αλλά είναι σχεδόν ανέκανα να φαγοκυτταρώσουν και δεν δίνουν τις ιστοχημικές αντιδράσεις Μη-ειδικής Εστεράσης και Υπεροξειδάσης , ενώ αντιθέτως είναι δέκα ως εκατό φορές ικανότερα στην παρουσίαση αντιγόνου και εκφράζουν πολύ πιο έντονα τα αντιγόνα επιφανείας MHC τάξεως II . Στο κυτταρόπλασμά τους εμφανίζουν μία μοναδική περιοχή με δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (λυσσοσωματική περιοχή) που εντοπίζεται κοντά στον πυρήνα και πολυάριθμα σωμάτια (κοκκία) Birbeck , που αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα των Δενδριτικών κυττάρων . Επειδή τα σωμάτια Birbeck εμφανίζονται και στα κύτταρα Langerhans, στα Δακτυλοειδώς Αναστομούμενα Δικτυοκύτταρα

και στα Πεπλοφόρα κύτταρα (Veiled cells) , έχει θεωρηθεί ότι και αυτοί οι τρεις τύποι κυττάρων αποτελούν στάδια διαφοροποίησης των Δενδριτικών κυττάρων . Συγκεκριμένα , ενώ τα κύτταρα Langerhans αποτελούν την ώριμη και καλά διαφοροποιημένη μορφή του ίδιου κυττάρου , τα Δακτυλοειδώς Αναστομούμενα Δικτυοκύτταρα και τα Πεπλοφόρα κύτταρα αποτελούν τις πιο άωρες μορφές τους . Τα Δακτυλοειδώς Αναστομούμενα Δικτυοκύτταρα (Interdigitating Reticulum cells) εντοπίζονται κυρίως στις θυμοεξαρτώμενες περιοχές του σπλήνα , αλλά και σε περιοχές του ίδιου του θύμου αδένου και στην παραφλοιώδη μοίρα των λεμφαδένων ενώ τα Πεπλοφόρα κύτταρα (Veiled cells) κυρίως στην λέμφο των λεμφαγγείων , αλλά και μέσα στους ίδιους τους λεμφαδένες . Εκφράζουν πολύ έντονα τα αντιγόνα επιφανείας MHC τάξεως II και είναι ικανά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα . Τα κύτταρα Langerhans επίσης είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που εντοπίζονται κυρίως στην επιδερμίδα . Αποτελούν το 2 - 8% του συνόλου των κυττάρων της επιδερμίδας και προέρχονται από τον μυελό των οστών , αλλά υφίστανται και έναν περιορισμένο μιτωτικό πολλαπλασιασμό αφού εγκατασταθούν στο δέρμα . Στην επιδερμίδα επίσης υπάρχουν πολλά Δενδριτικά κύτταρα θετικά για το αντιγόνο Thy-1 , τα οποία προέρχονται από τον μυελό των οστών αλλά δεν σχετίζονται με τα κύτταρα Langerhans . Τα κύτταρα Langerhans έχουν πολύ μεγάλη ομοιότητα με τα Δενδριτικά κύτταρα στο οπτικό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και μάλιστα εμφανίζουν και τα χαρακτηριστικά σωμάτια (κοκκία) του Bierbec . Υπάρχουν όμως στην επιδερμίδα και κύτταρα που μοιάζουν με τα Langerhans αλλά στερούνται των σωματίων Bierbec . Αυτά ονομάζονται Αδιευκρίνιστα κύτταρα (Indeterminate cells) . Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα Langerhans αλλά και τα Αδιευκρίνιστα κύτταρα εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη μεγάλη ποικιλία αντιγόνων , όπως Ia-αντιγόνα , αντιγόνα HLA , αντιγόνα Mac-1, Mac-2 και Mac-3 . Επίσης εκφράζουν Fc-υποδοχείς και CR3-υποδοχείς . Τα κύτταρα Langerhans , όπως και τα ιστικά μακροφάγα που εκφράζουν Ia-αντιγόνα , είναι σε θέση να διεγείρουν τα T-λεμφοκύτταρα και να τα καταστήσουν κυτταροτοξικά . Για αυτό τα κύτταρα Langerhans θεωρούνται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη δερματικής υπερευαισθησίας κατά αντιγόνων , στην αντιμετώπιση των ιογενών λοιμώξεων και νεοπλασιών του δέρματος και στην απόρριψη δερματικών μοσχευμάτων . (Forster και Landy, 1981 , Shimada και Katz, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Spencer και Fabre, 1990 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ .

Από όλα τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι υπάρχει σημαντική ετερογένεια μεταξύ των διαφόρων ειδών μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , η οποία αφορά τόσο τα μορφολογικά όσο και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους . Η ετερογένεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης (Forster και Landy, 1981) . Ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της ετερογένειας φαίνεται από τα αποτελέσματα μιας ανοσοιστοχημικής μελέτης (Roholl και συν., 1988) η οποία έγινε σε έντεκα είδη μακροφάγων χρησιμοποιώντας δεκατρία διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα κατά αντιγόνων επιφανείας . Διαπιστώθηκε ότι τα έντεκα είδη μακροφάγων παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τα αντιγόνα που εξέφραζαν . Μόνο τα μακροφάγα των κόλπων και της μυελώδους μοίρας των λεμφαδένων είχαν σημαντική ομοιότητα στα αντιγόνα τα οποία εξέφραζαν . Επίσης παρουσιάστηκε μια μικρή ομοιότητα

μεταξύ πνευμονικών και εγκεφαλικών μακροφάγων . Όλα τα υπόλοιπα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εξέφραζαν διαφορετικά αντιγόνα . Ειδικά οι οστεοκλάστες παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές στα μονοκλωνικά αντισώματα που εξέφραζαν , σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

Αυτή η ετερογένεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων εξυπηρετεί ώστε να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον τους και στις λειτουργικές αναγκαιότητες που προκύπτουν από την ανατομική τους εντόπιση . Όλα τα είδη μακροφάγων έχουν κοινό γονότυπο και προέρχονται από κοινό κυτταρικό πρόγονο , δηλαδή από τις μονοβλάστες του μυελού των οστών . Όμως διαθέτουν μια ιδιαίτερη προσαρμοστικότητα και έτσι αναπτύσσουν τον ιδιαίτερο φαινότυπό τους , που εξυπηρετεί τον σκοπό για τον οποίο αποικίζουν έναν συγκεκριμένο ιστό ή όργανο .



Κεφάλαιο 1-2 . Η προέλευση , εξέλιξη και διαφοροποίηση των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων .

Η ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα που εδράζονται στους διάφορους ιστούς προέρχονται από πρόδρομες κυτταρικές μορφές που αναπτύσσονται στον μυελό των οστών . Αυτές ονομάζονται **μονοβλάστες** . Οι μονοβλάστες προέρχονται από **αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (stem cells)** που είναι προορισμένα (committed) για να διαφοροποιηθούν προς αυτή την κατεύθυνση . Υπάρχει όμως και η άποψη ότι οι μονοβλάστες προέρχονται από ένα ακόμα πιο άωρο κύτταρο που αποτελεί τον κοινό πρόγονο των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων . Το κύτταρο αυτό ονομάζεται **GM-CFU (Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit)** και διαφοροποιείται προς μονοβλάστες ή προς μυελοβλάστες . Οι μονοβλάστες αποτελούν τις πιο άωρες μορφές μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Οι μονοβλάστες του μυελού των οστών πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε **προμονοκύτταρα** τα οποία ωριμάζουν τελικά σε **μονοκύτταρα** . Ο συνολικός χρόνος ο οποίος απαιτείται για να διαφοροποιηθεί ένα κύτταρο GM-CFU σε ώριμα μονοκύτταρα μέσα στον μυελό των οστών είναι έξη ημέρες . (Forster και Landy, 1981 , Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

Τα μονοκύτταρα παραμένουν στον μυελό των οστών για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και στην συνέχεια εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος , όπου παραμένουν για λίγες ώρες ή ημέρες ανάλογα με το ζωικό είδος . Για παράδειγμα , στους επίμους ο χρόνος ημιζωής των μονοκυττάρων στην κυκλοφορία είναι 18 ώρες ενώ στον άνθρωπο είναι τρεις ημέρες (Johnston, 1988) . Στην συνέχεια τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στους ιστούς και εκεί διαφοροποιούνται και μετατρέπονται σε ώριμα **μακροφάγα** . Είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα αποτελούν έναν εξαιρετικά ανομοιογενή πληθυσμό κυττάρων και φαίνεται ότι κάθε υποπληθυσμός τους είναι προορισμένος για να μεταναστεύσει σε έναν συγκεκριμένο ιστό ή όργανο και να το αποικίσει . Κατά την ωρίμανση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα , τα κύτταρα αποκτούν ένα ειδικό φαινότυπο που ανταποκρίνεται στην λειτουργία που θα επιτελέσουν στον ιστό όπου εγκαθίστανται . Αυτά τα μακροφάγα είναι πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα και συνήθως δεν πολλαπλασιάζονται . Ένα μικρό μέρος των μακροφάγων (περίπου 2-3% του συνόλου) έχουν την ικανότητα περιορισμένου αριθμού μιτωτικών διαιρέσεων με αποτέλεσμα να υπάρχει και μικρού βαθμού τοπική δημιουργία μακροφάγων . Τα ώριμα μακροφάγα έχουν σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής στους ιστούς , περίπου τρεις μήνες και στην συνέχεια πεθαίνουν και αποδομούνται . (Forster και Landy, 1981 , Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

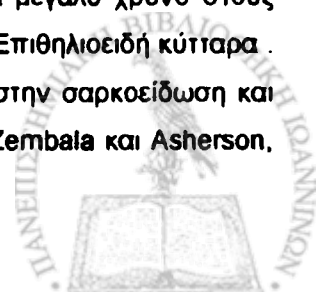
Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των μονοκυττάρων και μακροφάγων τα κύτταρα αυτά προοδευτικά αποκτούν ορισμένους δείκτες ωρίμανσης . Συγκεκριμένα , εκτός από τις μορφολογικές τους αλλαγές εκφράζουν και μια σειρά από αντιγόνα και υποδοχείς στην επιφάνειά τους , ενώ ταυτοχρόνως εκφράζουν και νέα κυτταροπλασματικά ένζυμα , που όλα μαζί αντικατοπτρίζουν τις νέες λειτουργικές ιδιότητες που έχουν αποκτήσει τα μακροφάγα . Έτσι διαπιστώνουμε ότι κατά την ωρίμανση και διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε μακροφάγα υπάρχει στο κυτταρόπλασμα προοδευτική αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης , της Μη-ειδικής

Εστεράσης και της Λυσοζύμης ενώ ελαττώνεται η δραστηριότητα Υπεροξειδάσης στο κυτταρόπλασμα. Οι μονοβλάστες, οι οποίες αποτελούν τα πιο άωρα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, δεν διαφέρουν μορφολογικά από τις μυελοβλάστες (τα πρόδρομα κύτταρα των κοκκιοκυττάρων). Δίνουν όμως ασθενώς θετικές τις ιστοχημικές αντιδράσεις της Λυσοζύμης και της Μη-ειδικής Εστεράσης και εκφράζουν Fc-υποδοχείς για τις IgG ανοσοσφαιρίνες. Τα προμονοκύτταρα έχουν χαρακτηριστική μορφολογία. Έχουν πυρήνα σχετικά μικρό ο οποίος διαθέτει βαθειά εντομή και κυτταρόπλασμα με άφθονα αζουρόφιλα κοκκία (λυσοσώματα). Εκτός από τους Fc-υποδοχείς για τις IgG ανοσοσφαιρίνες εκφράζουν επίσης υποδοχείς για τον παράγοντα C3b του συμπληρώματος και το αντιγόνο επιφανείας LFA-1, ενώ δίνουν πιο έντονες ιστοχημικές αντιδράσεις της Λυσοζύμης και της Μη-ειδικής Εστεράσης. Τα προμονοκύτταρα παρουσιάζουν επίσης δραστηριότητα Υπεροξειδάσης και Ώξινης Φωσφατάσης στο κυτταρόπλασμά τους. Όταν τα προμονοκύτταρα ωριμάσουν σε μονοκύτταρα θα μειωθεί ελαφρά η διάμετρός τους, θα αυξηθεί το μέγεθος του πυρήνα και θα μετατραπεί το σχήμα του σε νεφροειδές ή πεταλοειδές και θα επιταθεί η έκφραση όλων των υποδοχέων επιφανείας και η δραστηριότητα όλων των κυτταροπλασματικών ενζύμων εκτός από την Υπεροξειδάση, η οποία θα μειωθεί. Εκτός από το αντιγόνο LFA-1 τα μονοκύτταρα εκφράζουν και τα αντιγόνα Mac-1 και p150,95. Όταν ωριμάσουν σε μακροφάγα η έκφραση των αντιγόνων αυτών γίνεται ακόμα εντονότερη. (Forster και Landy, 1981, Hogg και συν., 1986, Miller και συν., 1986, Zembala και Asherson, 1989, Lewis και McGee, 1992).

Ωστόσο η εξέλιξη και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων συχνά παίρνει μια διαφορετική τροπή. Εάν σε κάποιο σημείο του σώματος υπάρξει μια φλεγμονώδης αντίδραση, τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε **Επιθηλιοειδή κύτταρα**. Επίσης είναι δυνατόν να ενωθούν πολλά μακροφάγα μεταξύ τους με την διαδικασία της κυτταρικής σύντηξης (cellular fusion) και να δημιουργήσουν πολυπύρρηνα **Γιγαντοκύτταρα**. Ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για να διαφοροποιηθούν και να εξελιχθούν τα μονοκύτταρα του αίματος σε μακροφάγα και στην συνέχεια σε Επιθηλιοειδή κύτταρα και Γιγαντοκύτταρα είναι περίπου 1 ως 3 εβδομάδες (Adams, 1976, Sigal και Ron, 1994).

Τα Επιθηλιοειδή κύτταρα μοιάζουν επιφανειακά με τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως π.χ. στην μορφολογία, στην πραγματικότητα όμως διαθέτουν πολλούς από τους δείκτες των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, όπως π.χ. Fc-υποδοχείς και C3b-υποδοχείς. Τα επιθηλιοειδή κύτταρα παραμένουν στους ιστούς για μεγάλα χρονικά διαστήματα και συμμετέχουν στην δομή των κοκκιωμάτων. (Adams, 1976, Sigal και Ron, 1994).

Τα Γιγαντοκύτταρα έχουν πολλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα και σχηματίζονται από την σύντηξη των μακροφάγων χωρίς περαιτέρω κυτταροπλασματική διαίρεση. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα **Γιγαντοκύτταρα τύπου Langhans**, με σχετικά λίγους πυρήνες τοποθετημένους στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος και τα **Γιγαντοκύτταρα τύπου Ξένου Σώματος** που διαθέτουν πολλούς πυρήνες διασκορπισμένους σε όλο το κυτταρόπλασμα. Τα Γιγαντοκύτταρα έχουν ασθενέστερη φαγοκυτταρική δράση από τα μακροφάγα αλλά παραμένουν για μεγάλο χρόνο στους ιστούς, συμμετέχοντας στην δημιουργία των κοκκιωμάτων, όπως ακριβώς τα Επιθηλιοειδή κύτταρα. Κοκκιώματα σχηματίζονται σε πολλές παθήσεις όπως π.χ. στην φυματίωση, στην σαρκοειδωση και στις διάφορες πνευμονοκονιώσεις. (Adams, 1976, Forster και Landy, 1981, Zembala και Asherson, 1989, Lewis και McGee, 1992, Sigal και Ron, 1994).



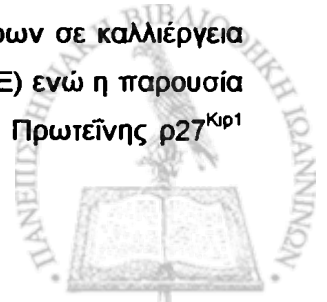
Ο ΧΥΜΙΚΟΣ (HUMORAL) ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Η παραγωγή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων γίνεται με ταχύτατους ρυθμούς λόγω της ευρείας κατανομής τους στους ιστούς και του όχι ιδιαίτερα μεγάλου χρόνου ημιζωής τους , που είναι μέχρι 3-4 μήνες συνολικά . Έτσι σε πειραματόζωα (μύες) με βάρος μόλις λίγων δεκάδων γραμμαρίων παράγονται καθημερινά περίπου $1,5 \times 10^6$ μονοκύτταρα , τα οποία γρήγορα θα εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών και μετατρέπονται σε μακροφάγα των ιστών . Ο χυμικός έλεγχος της παραγωγής των νέων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων γίνεται κυρίως από ορισμένες γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες, τις CSF-κυτταροκίνες (Colony Stimulating Factors) GM-CSF και M-CSF , που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα , τους ινοβλάστες , τα T-λεμφοκύτταρα και από τα μακροφάγα του μυελού των οστών . Οι κυτταροκίνες αυτές είναι σημαντικές για την παραγωγή νέων μονοκυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες . Όμως σε καταστάσεις έντονης φλεγμονής ή σήψης τα T-λεμφοκύτταρα παράγουν και την Ιντερλευκίνη-3 (IL-3) η οποία επίσης προάγει την δημιουργία νέων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα της φλεγμονώδους εστίας παράγουν IL-1 και TNF α που διεγείρουν τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα για αυξημένη έκκριση CSF-κυτταροκινών . Οι GM-CSF και M-CSF επιδρούν τόσο στον πολλαπλασιασμό των άωρων βλαστικών κυττάρων και μονοβλαστών όσο και στην διαφοροποίηση των προμονοκυττάρων σε μονοκύτταρα . (Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Sigal και Ron, 1994) .

Εκτός από τις κυτταροκίνες που αναφέρονται παραπάνω υπάρχουν και άλλες κυτταροκίνες που επηρεάζουν ποικιλοτρόπως τον πολλαπλασιασμό των άωρων βλαστικών κυττάρων , όπως οι Tumor Necrosis Factor β (TNF- β) , Transforming Growth Factor β (TGF- β) και οι τρεις Ιντερφερόνες . Σχετικά πρόσφατα περιγράφηκε η επίδραση των δύο Φλεγμονωδών Πρωτεϊνών των Μακροφάγων ή Macrophage Inflammatory Proteins (MIP-1 και MIP-2) στο άωρο βλαστικό κύτταρα GM-CFU . Έχει διαπιστωθεί ότι οι MIP-1 και MIP-2 δρουν σε συνεργασία με τους υπόλοιπους CSF-παράγοντες και επιταχύνουν τον πολλαπλασιασμό των άωρων βλαστικών κυττάρων GM-CFU στον μυελό των οστών (Broxmeyer και συν., 1989) .

Για την μορφολογική και την λειτουργική ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ώριμα μακροφάγα είναι απαραίτητες και άλλες ουσίες . Μεταξύ αυτών οι πιο σημαντικές είναι τα διάφορα Ρετινοειδή και η Καλσιτριόλη . Η υδροκορτιζόνη και τα άλλα γλυκοκορτικοειδή δεν φαίνεται να συμμετέχουν σημαντικά σε αυτές τις διαδικασίες . (Koeffler και συν., 1984 , Rouis και συν., 1985) . Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χορήγηση υδροκορτιζόνης ή δεξαμεθαζόνης in vitro σε καλλιέργειες μονοκυττάρων παρεμποδίζει την φυσιολογική ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα , αφού αναστέλλει την ανάπτυξη του λυσοσωματικού δικτύου , την αύξηση της κυτταρικής πρωτεΐνης , την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας Όξινης Φωσφατάσης και την ανάπτυξη αντινεοπλασματικής δραστηριότητας (Rinehart και συν., 1982) .

Έχει αποδειχθεί ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα πολλαπλασιάζονται μιτωτικά υπό τον έλεγχο εξωγενών παραγόντων . Έτσι η επαφή ανθρώπινων μονοκυττάρων σε καλλιέργεια με ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την έκφραση του γονιδίου της Κυκλίνης-E (Cyclin-E) ενώ η παρουσία της κυτταροκίνης M-CSF κατέστειλε την έκφραση του γονιδίου της Ανασταλτικής Πρωτεΐνης p27^{Kip1}



(Antonou και συν., 1997) . Ο συνδυασμός των εξωγενών αυτών επιδράσεων στα δύο γονίδια του μονοκύτταρου επέτρεπε στο μονοκύτταρο να ξεκινήσει τις διεργασίες της μιτωτικής διαίρεσης .

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ IN VITRO .

Κατά την in vitro εξέλιξη και διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , οι πιο χαρακτηριστικές αλλαγές αφορούν την μορφολογία τους . Όταν τεθούν σε καλλιέργεια τα μονοκύτταρα του αίματος, αρχικά διατηρούν την σφαιρικότητά τους (έστω και μερικώς) και εμφανίζουν σχήμα στρογγυλό με έντονες εντομές και αναδιπλώσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης . Με την πάροδο των ημερών τα κύτταρα αυτά απλώνονται και γίνονται πιο επίπεδα . Το σχήμα τους γίνεται πιο ακανόνιστο , ενώ το μέγεθός τους αυξάνει σημαντικά και ταυτοχρόνως αυξάνει η αναλογία επιφάνειας κυτταροπλάσματος προς πυρήνα . Οι πτυχώσεις της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνονται και γίνονται πιο έντονες , ενώ στο κυτταρόπλασμα είναι ορατά περισσότερα κοκκία και σταγονίδια λιπιδίων . Από τις πρώτες ημέρες είναι εμφανής ο σχηματισμός λίγων επιθηλιοειδών κυττάρων . Στο τέλος της πρώτης εβδομάδας είναι ορατά τα πρώτα γιγαντοκύτταρα . Οι παραπάνω μορφολογικές μεταβολές γίνονται εντονότερες και ταχύτερες εάν τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα καλλιεργηθούν παρουσία Ιντερφερόνης- γ ή Καλσιτριόλης . (Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) .

Κατά την ωρίμαση και την διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων εκτός από την μορφολογία μεταβάλλονται και οι δραστηριότητες πολλών ενζύμων . Έτσι αυξάνει η δραστηριότητα των ενζύμων Ώξινη Φωσφατάση , β -Γλυκουρονιδάση , β -Γλυκοσαμινιδάση και 5'-Νουκλεοτιδάση και μειώνεται η δραστηριότητα της Λυσοσωματικής Υπεροξειδάσης . Επίσης αυξάνει η έκκριση άλλων ενζύμων , όπως η Λυσοζύμη και ο Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου . Ένα ένζυμο που θεωρείται δείκτης ωρίμασης και διαφοροποίησης των μακροφάγων είναι η Τρανσγλουταμινάση (Macrophage Tissue Transglutaminase) , η οποία αρχικά στα μονοκύτταρα εκφράζεται ασθενώς αλλά όταν αυτά αποκτήσουν φαινότυπο ώριμου μακροφάγου αυξάνει την δραστηριότητά της κατά 50 φορές . Το ένζυμο αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί δημιουργεί του ισοπεπτιδικούς δεσμούς που συνδέουν μεταξύ τους τα μόρια των Fc-υποδοχέων ή άλλων μορίων της επιφάνειας των μακροφάγων . Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι κατά την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα αυξάνεται σημαντικά η δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης και στην συνέχεια κατά την διαφοροποίησή τους σε επιθηλιοειδή κύτταρα μειώνεται λίγο η δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , αλλά πάντοτε εκφράζονται ορισμένα χαρακτηριστικά ισοένζυμα του ενζύμου αυτού . Αυτά τα συγκεκριμένα λίγα ισοένζυμα της Ώξινης Φωσφατάσης αποτελούν ιδιαίτερο γνώρισμα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και διατηρούνται κατά την ωρίμασή τους (Radzun και συν., 1982) .

Επίσης , κατά την διαφοροποίηση και ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων αυξάνει η έκφραση των υποδοχέων και των αντιγόνων επιφάνειας στην κυτταρική μεμβράνη τους . Έτσι , αυξάνει η έκφραση των Fc-υποδοχέων για την IgG-ανοσοσφαιρίνη και των υποδοχέων για τις πρωτεΐνες του Συμπληρώματος . Επίσης αυξάνει η έκφραση των υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης και των υποδοχέων Τρανσφερρίνης . Τέλος αυξάνει και η έκφραση των αντιγόνων LFA-1 , Mac-1 και p150.95 (Hogg και συν., 1986 , Miller και συν., 1986) , ενώ αντιθέτως μειώνεται η έκφραση του υποδοχέα CD-14 και των αντιγόνων 1-D5 και HLA-DR (Lewis και McGee, 1992) .



Τέλος, η διαφοροποίηση και ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση της ικανότητας παραγωγής O_2^{-1} και H_2O_2 . Αυτή η προοδευτική μείωση της ικανότητας παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου αφορά μόνο την σύγκριση των μονοκυττάρων με τα μακροφάγα που δεν έχουν υποστεί προηγουμένως ενεργοποίηση, ενώ αντιθέτως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^{-1} και H_2O_2 . Έτσι, κατά την σύγκριση των μονοκυττάρων με τα μακροφάγα, τα Επιθηλιοειδή κύτταρα και τα Γιγαντοκύτταρα παρατηρείται έντονη μείωση της παραγωγής O_2^{-1} , ενώ η παραγωγή H_2O_2 παρουσιάζει μια παροδική αύξηση και στην συνέχεια μειώνεται. Η μείωση της ικανότητας παραγωγής O_2^{-1} και H_2O_2 συνοδεύεται από την αύξηση της δραστηριότητας Δισμουτάσης του Υπεροξειδίου και μείωση της δραστηριότητας Μυελοϋπεροξειδάσης, Καταλάσης και Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης. Επίσης κατά την ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μειώνεται η ικανότητα παραγωγής της Ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και λευκοτριένης LTC₄. (Nakagawara και συν., 1981, Zembala και Asherson, 1989, Lewis και McGee, 1992, Sigal και Ron, 1994).

ΤΑ ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα πρώτα μακροφάγα εμφανίζονται σε ορισμένους ιστούς και όργανα ήδη από την εμβρυϊκή ηλικία. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα με χαρακτηριστές μακροφάγων που εμφανίζονται στον πνεύμονα των επίμυων από την αρχή της εμβρυογένεσής του. Αυτά ίσως να μην προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος, αφού εμφανίζονται στον πνεύμονα μεγάλο χρονικό διάστημα πριν από την μετανάστευση των πρώτων μονοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά (**premedullary macrophages**) αποτελούν τον πρώτο πληθυσμό φαγοκυττάρων που αναπτύσσεται στον πνεύμονα του επίμυος. Έχουν την τυπική μορφολογία των μακροφάγων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα λυσοσωματικά ένζυμα, τους μεμβρανικούς υποδοχείς και τα αντιγόνα επιφανείας των μακροφάγων. Θεωρούνται ως ώριμα μακροφάγα γιατί είναι ικανά να φαγοκυτταρώσουν οψωνοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια, μη-οψωνοποιημένα σωματίδια, ανοσοσυμπλέγματα, βακτήρια και μύκητες, ενώ ανταποκρίνονται σε ουσίες που επηρεάζουν τα μακροφάγα με τον ίδιο τρόπο (Sorokin και συν., 1989, Sorokin και Hoyt, 1992). Μακροφάγα που δεν προέρχονται από τον μυελό των οστών έχουν επίσης ανιχνευτεί και στις εμβρυϊκές καταβολές του εγκεφάλου και του ήπατος των επίμυων. Όπως και τα εμβρυϊκά μακροφάγα του πνεύμονα έτσι και αυτά φαίνεται να προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μεσεγχύματος τα οποία αποικίζουν την εμβρυϊκή καταβολή του οργάνου και στην συνέχεια πολλαπλασιάζονται τοπικά (Sorokin και συν., 1992a). Όταν αργότερα θα αρχίσει η εμβρυϊκή αιμοποίηση, στην αρχή από εξωμυελικές εστίες και αργότερα από τον μυελό των οστών, θα αρχίσει ο αποικισμός των οργάνων με άλλα μονοκύτταρα που βεβαιωμένα έχουν δημιουργηθεί στον μυελό των οστών. Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα από τα οποία θεωρείται ότι προέρχονται τα μακροφάγα του εμβρυϊκού πνεύμονα περιγράφονται ως γωνιώδη κύτταρα του μεσεγχύματος (**angular cells**). Αυτά υφίστανται μια βραχεία περίοδο μεταμόρφωσης (**transformation**) και ωρίμασης (**maturation**) και εξελίσσονται σε μακροφάγα (Sorokin και συν., 1992b). Κατά την διαδικασία αυτή γίνονται μεγαλύτερα και στρογγυλότερα, μεταβάλλονται τα κεντριόλιά τους, αυξάνεται το μέγεθος της συσκευής Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου και αποκτούν πολυάριθμα λυσοσώματα και άλλα κυστίδια. Η καλλιέργεια αυτών των μεσεγχυματικών κυττάρων με CSF-κυτταροκίνες επιταχύνει και επιτείνει την μετατροπή

τους σε μακροφάγα . Τα εμβρυϊκά μεσεγγυματικά κύτταρα που μετατρέπονται σε μακροφάγα είναι όλα προορισμένα (committed) για να ωριμάσουν αποκλειστικά σε μακροφάγα και δεν μπορούν να εξελιχθούν προς άλλη κατεύθυνση , όπως π.χ. σε κοκκιόκύτταρα (Sogokin και συν., 1992c) .

Στους ιστούς των ανθρώπινων εμβρύων έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μακροφάγων από την 13^η εβδομάδα εμβρυϊκής ζωής , τα οποία όμως είναι ακόμα άωρα και δεν εκφράζουν ορισμένους βασικούς δείκτες ωρίμασης και λειτουργικότητας . Ωριμα μακροφάγα θα ανιχνευθούν μετά την 16^η εβδομάδα της κύησης . Έχει διαπιστωθεί ότι τα εμβρυϊκά μακροφάγα του ανθρώπου παρουσιάζουν μια σημαντική ποικιλομορφία στα αντιγόνα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους και ότι η περίοδος ωρίμασης των μακροφάγων διαφέρει από όργανο σε όργανο . Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι το ανθρώπινο έμβρυο διαθέτει από νωρίς πληθυσμούς άωρων μακροφάγων που στερούνται ακόμα ορισμένων από τα βασικά λειτουργικά αντιγόνα που υφίστανται στα μακροφάγα των ενηλίκων (Oliver, 1990) .

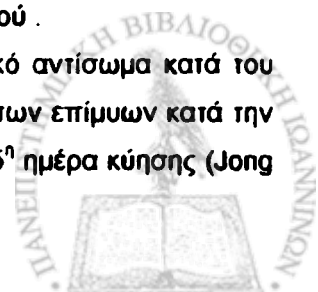
Τα εμβρυϊκά μακροφάγα παρουσιάζουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Για τον σκοπό αυτό είναι εξοπλισμένα με τους κατάλληλους υποδοχείς επιφανείας και με ένα καλά ανεπτυγμένο λυσοσωματικό σύστημα . Έχει προταθεί ότι τα μακροφάγα συμμετέχουν στην δημιουργία των οργάνων φαγοκυτταρώνοντας του παλαιούς ιστούς που πρέπει να αντικατασταθούν και επιτρέποντας την αναμόρφωση (remodeling) των οργάνων . Επίσης η ύπαρξη ώριμων μακροφάγων στον πλακούντα , τα οποία εκφράζουν αντιγόνα ιστοσυμβατότητας MHC τάξεως II και Fc-υποδοχείς για τις IgG-ανοσοσφαιρίνες , παρουσιάζουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τα T-λεμφοκύτταρα , οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά τα εμβρυϊκά μακροφάγα συνεισφέρουν στην προστασία του κηήματος από λοιμώξεις (Sutton και συν., 1989) .

ΝΕΩΤΕΡΕΣ ΑΠΟΦΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ . ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER .

Επειδή τα κύτταρα Kupffer έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την εμβρυολογική προέλευσή τους , θα χρησιμεύσουν ως ένα τυπικό πρότυπο που θα συμβάλλει στην παροχή απαντήσεων σε πολλά ερωτήματα σχετικά με την προέλευση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και του τρόπου αποικισμού των ιστών με τα κύτταρα αυτά .

Είναι γνωστό ότι στο ήπαρ των εμβρύων των επίμυων εμφανίζονται τα πρώτα μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) στα κολποειδή ήδη από την 11^η ημέρα κύησης , ενώ τα πρώτα μονοκύτταρα παρουσιάζονται στην κυκλοφορία την 17^η ημέρα κύησης και ο μυελός των οστών σχηματίζεται την 19^η ημέρα της κύησης . Επίσης τα εμβρυϊκά κύτταρα Kupffer έχουν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και τελείως χαρακτηριστική κατανομή της Υπεροξειδάσης στο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στην Πυρηνική Μembrάνη , δηλαδή χαρακτήρες ώριμων κυττάρων Kupffer και όχι μονοκυττάρων του αίματος . Τα παραπάνω συνιστούν ισχυρή ένδειξη ότι τα κύτταρα Kupffer αρχικά στην εμβρυϊκή ζωή δεν προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος . Μετά την γέννηση όμως έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα Kupffer προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα μονοκύτταρα . Η ανανέωση του πληθυσμού των ηπατικών μακροφάγων δεν γίνεται μόνο με την μετανάστευση νέων μονοκυττάρων στον ηπατικό ιστό , γιατί τα κύτταρα Kupffer έχουν μεγάλη ικανότητα τοπικού πολλαπλασιασμού .

Ένας ειδικός υποπληθυσμός μακροφάγων (θετικός για το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του αντιγόνου ER-HR3) με διαφορετική λειτουργική σημασία εμφανίζεται στο ήπαρ των επίμυων κατά την 13^η ημέρα της κύησης και στον μεσεγγυματικό αραιό συνδετικό ιστό κατά την 15^η ημέρα κύησης (Jong



και συν., 1994a , Jong και συν., 1994b) . Τα μακροφάγα αυτά φαίνεται πως συσχετίζονται με την εμβρυϊκή εξωμυελική ηπατική αιμοποίηση . Μετά τον τοκετό προοδευτικά εξαφανίζονται από το ήπαρ ενώ αυξάνονται στον μυελό των οστών . Πρέπει να ασκούν όμως και άλλες λειτουργίες στα ενήλικα άτομα και για αυτό εντοπίζονται στον ερυθρό πολφό του σπλήνα , στον φλοιό του θύμου και ορισμένων λεμφαδένων και στο δέρμα (τα κύτταρα Langerhans είναι θετικά για το αντιγόνο ER-HR3) . Είναι αξιοπερίεργο το ότι ενώ τα μονοκύτταρα του αίματος είναι θετικά για το αντιγόνο ER-HR3 , ποτέ δεν ξαναεμφανίζονται ηπατικά μακροφάγα θετικά για το αντιγόνο αυτό μετά την γέννηση , παρά την βεβαιωμένη μετανάστευση μονοκυττάρων από το αίμα στο ήπαρ .

Στα ανθρώπινα έμβρυα εμφανίζονται κύτταρα Kupffer στο ήπαρ από την 17^η εβδομάδα κύησης , καθώς και το ότι αυξάνεται ελαφρά ο αριθμός τους και η ικανότητά τους να παράγουν Λυσοζύμη μέχρι τον τοκετό . Δεν έχει διευκρινιστεί αν η αύξηση της παραγωγής Λυσοζύμης από τα κύτταρα Kupffer οφείλεται σε ωρίμαση του ίδιου πληθυσμού ηπατικών μακροφάγων ή οφείλεται σε αντικατάσταση από διαφορετικό πληθυσμό κυττάρων ή αν συμβαίνει ένας συνδυασμός των δύο αυτών ενδεχομένων . (Crofton και συν., 1978 , Wake και συν., 1989 ; Cope και Dilly, 1990) .



Κεφάλαιο 1-3 . Η μορφολογία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στο Οπτικό Μικροσκόπιο και οι γενικοί ιστοχημικοί χαρακτήρες τους .

ΓΕΝΙΚΑ

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα έχουν μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων , οι οποίοι προσιδιάζουν στις ειδικές λειτουργικές ιδιότητες που αποκτούν τα κύτταρα αυτά ανάλογα με την ανατομική τους εντόπιση στον οργανισμό . Αντιθέτως , οι αποκλίσεις των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών είναι σχετικά περιορισμένες .

Οι περισσότερες από τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει με το οπτικό μικροσκόπιο αφορούν τα μονοκύτταρα του αίματος ή τα μακροφάγα από την περιτοναϊκή κοιλότητα ή τον πνεύμονα , συνήθως με την βοήθεια των χρώσεων Giemsa , May-Grunwald-Giemsa και Wright .

ΟΙ ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Το πιο αρχέγονο κύτταρο της μονοκυτταρικής σειράς είναι η **μονοβλάστη** . Η μονοβλάστη είναι ένα κύτταρο του μυελού των οστών που δύσκολα εντοπίζεται και δεν παρατηρείται ποτέ εκτός των μυελικών χώρων . Δεν υπάρχουν πολύ σαφή μορφολογικά κριτήρια που να μας επιτρέπουν την αναγνώριση των μονοβλαστών και τον βέβαιο διαχωρισμό τους από τις πρόδρομες μορφές των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων . Θεωρείται ότι οι μονοβλάστες έχουν διάμετρο περίπου 14 μm , έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα , στρογγυλό πυρήνα (με λεπτές νηματοειδείς δομές χρωματίνης) και ένα ή δύο πυρήνια . Στο κυτταρόπλασμά τους διακρίνονται πολυάριθμα σφαιρικά ή ατρακτοειδή μιτοχόνδρια και σπανίως κενοτόπια . Ένα ακόμα χαρακτηριστικό γνώρισμά τους μπορεί να θεωρηθεί η ακινησία τους και η αδυναμία τους να προσκολληθούν σε υάλινες και πλαστικές επιφάνειες , το οποίο γίνεται αντιληπτό σε κυτταροκαλλιέργειες μονοβλαστών . (Weinberg και Athens , 1993) .

Το επόμενο καλά μελετημένο κύτταρο είναι το **προμονοκύτταρο** . Από τις πρόδρομες μορφές των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων αυτή είναι που έχει μελετηθεί περισσότερο . Τα προμονοκύτταρα είναι μεγαλύτερα από τα ώριμα μονοκύτταρα και από τα περιτοναϊκά μακροφάγα που μόλις έχουν απομονωθεί από την περιτοναϊκή κοιλότητα , είναι όμως μικρότερα από τα περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν διατηρηθεί σε κυτταροκαλλιέργεια για 24 ώρες . Συγκεκριμένα , σε πειράματα με μονοπύρηννα φαγοκύτταρα Ελβετικών Μυών διαπιστώθηκε ότι ενώ τα προμονοκύτταρα έχουν διάμετρο 14-20 μm , τα μονοκύτταρα του αίματος έχουν διάμετρο 11-14 μm και τα περιτοναϊκά μακροφάγα που μόλις απομονώθηκαν έχουν διάμετρο 11-18 μm (Van Furth και συν., 1970) . Στον άνθρωπο τα προμονοκύτταρα έχουν διάμετρο 11-13 μm , όταν τα μονοκύτταρα του αίματος έχουν διάμετρο 10-12 μm (Weinberg και Athens , 1993) . Ο πυρήνας των προμονοκυττάρων είναι πολύ μεγάλος , αραιοχρωματικός και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του κυττάρου . Συνήθως είναι στρογγυλός με μία αβαθή εντομή ή μια μικρή αναδίπλωση . Περιέχει ένα εμφανές πυρήνιο . Μέσα στο κυτταρόπλασμα των προμονοκυττάρων , το οποίο είναι σχετικά βασεόφιλο με την χρώση Wright αλλά χρωματίζεται έντονα κυανό με την χρώση Giemsa , υπάρχουν πολύ λίγα κοκκία , κυστίδια ή κενοτόπια . Τα οργανίδια αυτά συνήθως εντοπίζονται κοντά στον πυρήνα . Σπάνια διακρίνονται σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμά τους . Η κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων

αυτών παρουσιάζει ελάχιστες πτυχώσεις (ruffling) και μερικές ευμεγέθεις δακτυλοειδείς προεκβολές . (Van Furth και συν., 1970 , Van Furth και συν., 1979) .

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι τα προμονοκύτταρα παρουσιάζουν τέσσερις χαρακτηριστικές μορφολογικές διαφορές από τα άλλα είδη ώριμων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

α. Το μέγεθος (μέγιστη διάμετρος) του προμονοκυττάρου είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των ώριμων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Επίσης η αναλογία όγκων πυρήνα / κυτταροπλάσματος (V_{π}/V_{κ}) είναι διαφορετική , αφού στα προμονοκύτταρα $V_{\pi}/V_{\kappa} > 1$, στα μονοκύτταρα $V_{\pi}/V_{\kappa} = 1$ και στα μακροφάγα $V_{\pi}/V_{\kappa} < 1$.

β. Η κυτταρική μεμβράνη των προμονοκυττάρων παρουσιάζει ελάχιστη πτύχωση (ruffling) ενώ είναι ορατές λίγες ευμεγέθεις δακτυλοειδείς προεκβολές (Finger-like projections) .

γ. Σπάνια παρουσιάζει ο πυρήνας τους την τυπική νεφροειδή ή πεταλοειδή εικόνα που παρουσιάζει ο πυρήνας των μονοκυττάρων και μακροφάγων .

δ. Στο κυτταρόπλασμά τους υπάρχουν πολύ λίγα κυστίδια , κοκκία και κενोटόπια .

ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Σε επιχρίσματα φλεβικού αίματος στα οποία έχει γίνει η χρώση May-Grunwald-Giemsa τα μονοκύτταρα αποτελούν το 5% (3-8%) του συνόλου των λευκοκυττάρων . Είναι μεγάλα κύτταρα με διάμετρο περίπου 9-12 μm in vivo αλλά in vitro (σε επιχρίσματα) η διάμετρός τους είναι συχνά μεγαλύτερη από 15 μm επειδή κατά την διαδικασία μονιμοποίησης τα μονοκύτταρα αποπλατύνονται . Επίσης στα επιχρίσματα περιφερικού αίματος που έχουν επεξεργαστεί με χρώση May-Grunwald-Giemsa συνήθως είναι ογκωδέστερα από τα λεμφοκύτταρα και από τα πολυμορφοπύρηνια . Τα μόνα κύτταρα που δεν διακρίνονται εύκολα από τα μονοκύτταρα είναι τα μεγάλα λεμφοκύτταρα . Πρέπει να σημειωθεί ότι τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών είναι λίγο μικρότερα σε μέγεθος από εκείνα του αίματος (Weinberg και Athens , 1993) .

Το σχήμα των μονοκυττάρων είναι στρογγυλό αλλά σε μεγάλες μεγεθύνσεις διακρίνονται στην περιφέρειά τους πολυάριθμα ψευδοπόδια που συμμετέχουν στην φαγοκυττάρωση και στις αμοιβαδοειδείς κινήσεις και επίσης πολυάριθμες πτυχώσεις (ruffling) της κυτταρικής μεμβράνης . Το σχήμα αυτό διατηρείται και στα μονοκύτταρα που εξαγγειώνονται και μεταναστεύουν στους ιστούς ή κινούνται προς φλεγμονώδεις εστίες . Σε τέτοιες περιπτώσεις αυξάνει η πτύχωση της μεμβράνης .

Τα μονοκύτταρα διαθέτουν έκκεντρο πυρήνα με σχήμα νεφροειδές ή πεταλοειδές ή τέλος στρογγυλό με μια χαρακτηριστική εντομή . Ο πυρήνας τους είναι ευμεγέθης αλλά έχει ομοιόμορφη αραιή και λεπτοκοκκιώδη διάταξη της χρωματίνης μέσα στο πυρηνόπλασμα . Χρωματίζεται έντονα ιώδης ή μελανός με τις χρώσεις May-Grunwald-Giemsa και Wright , με αποτέλεσμα τότε να μην φαίνεται αραιοχρωματικός . Συχνά ο πυρήνας αυτός καταλαμβάνει περισσότερο από το 50% του συνολικού όγκου του μονοκυττάρου . Αν και τα μονοκύτταρα διαθέτουν ένα ή περισσότερα πυρήνια , με την χρώση May-Grunwald-Giemsa και με το οπτικό μικροσκόπιο αυτά είναι σπανίως ορατά . (Van Furth και συν., 1970 , Bloom και Fawcett, 1975 , Van Furth και συν., 1979 , Zembala και Asherson, 1989) .

Το κυτταρόπλασμα των μονοκυττάρων είναι αραιοχρωματικό με απόχρωση υποκύανη με την χρώση Giemsa και τεφρή ή κυανότεφρη με την χρώση Wright . Στο αραιοχρωματικό κυτταρόπλασμά

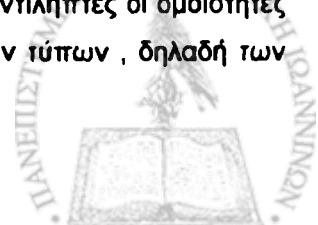
τους εμφανίζουν πολυάριθμα μικρά κοκκία , μεγάλα κοκκία που δίνουν ασθενή αζουρόφιλη αντίδραση καθώς και κενोटόπια . Τα πολυάριθμα αυτά σωματίδια δίνουν στο κυτταρόπλασμα των μονοκυττάρων την εμφάνιση κονιοποιημένης ύαλου (ground glass appearance) (Weinberg και Athens , 1993) . Έχει αποδειχθεί ότι τα μεγάλα κοκκία των μονοκυττάρων δίνουν ισχυρές τις ιστοχημικές αντιδράσεις για Υπεροξειδάση , Μυελοϋπεροξειδάση , Μη-ειδική Εστεράση και Οξίνη Φωσφατάση . Τα κενोटόπια συχνά δίνουν έντονη χρωματική αντίδραση σε χρώση με Ουδέτερο Ερυθρό (Neutral Red supravital staining) . Τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών έχουν λιγότερα μικρά και μεγάλα κοκκία από ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος . (Bloom και Fawcett , 1975 , Zembala και Asherson , 1989 , Lewis και McGee, 1992 , Stevens και Lowe, 1993 , Weinberg και Athens, 1993 , Sigal και Ron, 1994) . Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαπιστώθηκαν από την καλλιέργεια των μονοκυττάρων ενδεχομένως διαφέρουν από τα χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα , αφού έχει διαπιστωθεί ότι η καλλιέργεια μονοκυττάρων επάνω σε μονοστοιβάδες ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη διαφορετικής κυτταρικής μορφολογίας από ότι η καλλιέργεια σε τεχνητά (πλαστικά ή υάλινα) υποστρώματα (Schumann και συν., 1989) .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα μακροφάγα διαθέτουν μια ποικιλία παρουσιαστικών στο σπτικό μικροσκόπιο , ανάλογα με την περιοχή του σώματος από την οποία έχουν απομονωθεί . Έτσι τα κύτταρα Kupffer διαφέρουν μορφολογικά από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα μεσαγγειακά μακροφάγα ή τα μικρογλοιακά κύτταρα . Διαθέτουν όμως ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά τα οποία αποκτούν κατά την ωρίμασή τους από το στάδιο του μονοκυττάρου . Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η αύξηση του μεγέθους τους , η αύξηση της πτύχωσης (ruffling) της κυτταρικής τους μεμβράνης , η δημιουργία πολλών ψευδοποδίων , η μείωση της αναλογίας πυρήνα / κυτταροπλάσματος (λόγω της αύξησης του μεγέθους του κυττάρου χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους του πυρήνα) , η πλήρης εξαφάνιση της βασεοφιλίας του κυτταροπλάσματος που χαρακτηρίζει τα προμονοκύτταρα , η αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των αζουρόφιλων κοκκίων στο κυτταρόπλασμα καθώς και η πιο συχνή εμφάνιση σταγονιδίων λίπους (lipid droplets) . Τα στοιχεία αυτά εμφανίζονται όχι μόνο σε φυσιολογικά μακροφάγα αλλά και σε κυτταρικές σειρές μονοβλαστών που έχουν διαφοροποιηθεί in vitro σε ώριμα μακροφάγα (Rigby και συν., 1984) . Έτσι τελικά τα περισσότερα είδη μακροφάγων έχουν ορισμένα σταθερά και κοινά μορφολογικά στοιχεία , τα οποία συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα .

1. Το σχήμα τους : ανώμαλο πολυγωνικό ή αστεροειδές , με πολυάριθμες προεκβολές
2. Το σχήμα του πυρήνα τους : ωοειδές με εντομή ή νεφροειδές ή πεταλοειδές .
3. Η συνήθως έκκεντρη θέση του πυρήνα τους .
4. Η υποκύανη απόχρωση του κυτταροπλάσματος και η έντονα αζουρόφιλη αντίδραση των κυτταροπλασματικών κοκκίων με την χρώση Wright , καθώς και τα πολυάριθμα κενोटόπια.
5. Η σπογγοειδής μορφή της χρωματίνης του πυρήνα με την χρώση Wright .

Στην συνέχεια θα γίνει αναφορά στα κοινά και στα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυριότερων ειδών μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Για να γίνουν ευκολότερα αντιληπτές οι ομοιότητες και διαφορές τους θα δοθεί αρχικά η περιγραφή των δύο πιο χαρακτηριστικών τύπων , δηλαδή των



μακροφάγων του συνδετικού ιστού και των περιτοναϊκών μακροφάγων , ενώ στην συνέχεια θα γίνει αναφορά και σε ορισμένους άλλους τύπους μακροφάγων .

Τα μακροφάγα του συνδετικού ιστού συνήθως ανευρίσκονται μεταξύ των δεσμίδων των κολλαγόνων ινών , έχουν σχήμα αστεροειδές ή ατρακτοειδές και μοιάζουν αρκετά με ινοβλάστες . Τα μακροφάγα αυτά ονομάζονται ιστοκύτταρα (histiocytes) και αποτελούν «καθλωμένα» μακροφάγα , δηλαδή δεν είναι ούτε ενεργοποιημένα κύτταρα ούτε μονοκύτταρα που μεταναστεύουν στους ιστούς είτε για να τους αποικίσουν ή για να συμμετέχουν σε φλεγμονώδη αντίδραση . Για τον λόγο αυτό τα ιστοκύτταρα διαφέρουν μορφολογικά από τα προαναφερθέντα είδη μακροφάγων . Το σχήμα τους είναι αστεροειδές ή ατρακτοειδές και η κυτταρική τους μεμβράνη δεν παρουσιάζει πολλές πτυχώσεις και αναδιπλώσεις . Τα ιστοκύτταρα διαθέτουν μικρούς και σχετικά πυκνοχρωματικούς πυρήνες , το κυτταρόπλασμά τους είναι ανομοιογενές λόγω των πολλών μικρών κυστιδίων και ανισομεγεθών κοκκίων που περιέχει . Τα μιτοχόνδριά τους είναι συσσωρευμένα σε μια περιοχή γύρω από το κεντρόσωμα του ιστοκυττάρου . (Bloom και Fawcett, 1975) .

Τα περιτοναϊκά μακροφάγα είναι ευμεγέθη κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα , ακανόνιστο πολυγωνικό σχήμα και η διάμετρος συνήθως κυμαίνεται από 12-18 μμ αλλά συχνά είναι και μεγαλύτερα . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα που μόλις έχουν απομονωθεί από την περιτοναϊκή κοιλότητα διατηρούν ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μονοκυττάρων του αίματος , αν όμως παραμείνουν πολλές ώρες σε κυτταροκαλλιέργεια αποπλατύνονται και αυξάνουν την επιφάνεια και την διάμετρό τους . Σε γενικές γραμμές διαθέτουν μεγάλο πυρήνα με αραιή χρωματίνη , ο οποίος καταλαμβάνει λιγότερο από το 50% του συνολικού όγκου του κυττάρου , με σχήμα πεταλοειδές ή νεφροειδές ή στρογγυλό με βαθιά εντομή , τοποθετημένο άλλοτε κεντρικά και άλλοτε έκκεντρα στο κυτταρόπλασμα . Με τις χρώσεις May-Grunwald-Giemsa και Wright ο πυρήνας χρωματίζεται έντονα ιώδης . Μέσα στον πυρήνα διακρίνονται ένα ή δύο πυρήνια . Μέσα στο αραιοχρωματικό κυτταρόπλασμα , που συνήθως βάφεται άτονα κυανό , υποκύανο ή κυανότεφρο , διακρίνονται πολυάριθμα κοκκία μικρού και μεγάλου μεγέθους καθώς και πολλά κυστίδια και κενοτόπια . Τα προαναφερθέντα αυτά οργανίδια αυξάνονται με την πάροδο της ηλικίας του μακροφάγου . Επίσης διακρίνονται σταγονίδια λίπους . Τα περισσότερα από αυτά τα οργανίδια εντοπίζονται στο κέντρο του μακροφάγου και κοντά στον πυρήνα . Η συνολική εικόνα που προσδίδουν τα στοιχεία αυτά στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου είναι της αδρής κοκκίωσης , σε αντίθεση με την λεπτοκοκκιώδη υφή του μονοκυττάρου . Αν και το γενικό σχήμα αυτών των μακροφάγων είναι στρογγυλό , η κυτταρική μεμβράνη τους δημιουργεί πολυάριθμες αναδιπλώσεις , πτυχώσεις και ψευδοπόδια , που δίνουν στο κύτταρο εξαιρετικά ανώμαλη παρυφή . (Cohn και Benson, 1965 , Van Furth και συν., 1970 , Morland και Kaplan, 1977 , Van Furth και συν., 1979 , Sigal και Ron , 1994 , Mohamed-Ali και συν., 1995) . Εκτός από τις προαναφερθείσες πληροφορίες που αφορούν κύτταρα που έχουν βαφεί με την χρώση May-Grunwald-Giemsa , ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις έχουν γίνει και με μικροσκόπηση Αντίθεσης Φάσης (Phase Contrast) . Με την τεχνική αυτή διαπιστώθηκαν πολλές από τις μορφολογικές μεταβολές που συμβαίνουν σε μακροφάγα σε καλλιέργεια . Συγκεκριμένα τα περιτοναϊκά μακροφάγα που μόλις έχουν απομονωθεί από την περιτοναϊκή κοιλότητα έχουν σχετικά στρογγυλό σχήμα , πυρήνα κεντρικά τοποθετημένο και με βαθιά εντομή , πολυάριθμα μιτοχόνδρια διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα και κοκκία λυσοσωματικής φύσης κοντά στον πυρήνα . Επίσης παρουσιάζουν

δεξαμενές του Ενδοπλασματικού Δικτύου στο περιφερικό κυτταρόπλασμα (Cohn και Benson, 1964) . Μετά από πάροδο 24 ωρών τα περιτοναϊκά μακροφάγα αυξάνουν την διάμετρό τους και γίνονται πολύ πιο αποπλατυσμένα . Στο κυτταρόπλασμά τους αυξάνει ο αριθμός των κοκκίων γύρω από τον πυρήνα . Επίσης αυξάνει ο αριθμός και το μέγεθος των μιτοχονδρίων στο περιφερικό κυτταρόπλασμα και εμφανίζονται τα πρώτα σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα . Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας τα μακροφάγα αναπτύσσουν επιμήκη ψευδοπόδια και πολλές ακόμα προεκβολές της κυτταρικής τους μεμβράνης , ενώ τα κοκκία του κυτταροπλάσματός τους συχνά συσσωρεύονται σε μια ομάδα . Μετά από 72 ώρες καλλιέργειας τα περιτοναϊκά μακροφάγα έχουν αυξήσει ακόμα περισσότερο την διάμετρο και την επιφάνειά τους , εμφανίζουν περισσότερα μεγάλα ψευδοπόδια και επίσης αυξάνουν τον αριθμό των λυσοσωματικών κοκκίων τους . Τα ψευδοπόδια των κυτάρων αυτών είναι πολύ λεπτά και επιμήκη και περιέχουν πολλά μιτοχόνδρια . Επίσης στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων αυτών εμφανίζονται πολυάριθμα σταγονίδια λίπους , τα οποία συσσωρεύονται κυρίως σε μία θέση κοντά στο πυρήνα , διαμετρικά αντίθετη από την θέση συσσώρευσης των λυσοσωματικών κοκκίων . Μετά από 6 ημέρες σε καλλιέργεια τα περιτοναϊκά μακροφάγα αρχίζουν να αποκτούν χαρακτηρισες Επιθηλιοειδών κυτάρων , ενώ μετά από 11 ημέρες ορισμένα από αυτά εμφανίζουν χαρακτηρισες Γιγαντοκυτάρων . (Cohn και Benson, 1965) .

Μια άλλη χαρακτηριστική μορφολογία των μακροφάγων είναι αυτή που παρουσιάζουν τα μακροφάγα του μυελού των οστών (resident bone marrow macrophages ή stromal macrophages) . Αυτά οποία έχουν ακανόνιστο σχήμα και η διάμετρός τους είναι συχνά μεγαλύτερη από 25 μm . Όπως και τα άλλα είδη μακροφάγων έχουν έναν ευμεγέθη πυρήνα ο οποίος είναι τοποθετημένος έκκεντρα στο κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει σχήμα είτε νεφροειδές ή στρογγυλό με μια βαθιά εντομή . Επειδή ο πυρήνας τους παρουσιάζει την τυπική αραιή και λεπτή διάταξη της χρωματινής που εμφανίζουν όλα τα μακροφάγα , είναι εμφανή τα πυρήνια (συνήθως ένα ή δύο) . Μέσα στο άφθονο κυτταρόπλασμά τους διακρίνεται η συσκευή Golgi πλησίον του πυρήνα , πολλά κυστίδια στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος και πολυάριθμα μικρά κοκκία καθώς και μεγάλα αζουρόφιλα κοκκία κατανεμημένα ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα . Τα περισσότερα από τα οργανίδια που διακρίνονται με το οπτικό μικροσκόπιο είναι συγκεντρωμένα προς το κέντρο του κυτάρου . Η κυτταροπλασματική μεμβράνη παρουσιάζει σημαντικού βαθμού πτύχωση καθώς και αρκετές ευμεγέθεις προεκβολές και αναδιπλώσεις , κυρίως όμως εμφανίζει λεπτές και επιμήκεις αποφυάδες . Αν όμως τα κύτταρα αυτά διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργεια για διάστημα μεγαλύτερο από 48 ώρες γίνονται στρογγυλά και οι πτυχώσεις και αποφυάδες της μεμβράνης τους εξαφανίζονται ενώ το μέγεθός τους γίνεται λίγο μικρότερο . (Crocker και Gordon, 1985 , Lewis και McGee , 1992) .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν επίσης μελετηθεί εκτενώς ως προς την μορφολογία τους , τόσο *in situ* σε βιοψίες πνεύμονα όσο και *ex vivo* μετά από βρογχοκυψελιδική έκπλυση και επικόλληση σε ιστολογικό πλακίδιο . Διαπιστώθηκε ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι μεγάλα κύτταρα , με διάμετρο 15 μm ή και αρκετά μεγαλύτερη (μέχρι 50 μm) . Μετά από χρώση τους με Giemsa ή Wright το κυτταρόπλασμα αποκτά υποκύανη, τεφρή ή κυανότεφρη απόχρωση και περιέχει πολυάριθμα αζουρόφιλα κοκκία και κενοτόπια , ενώ διαπιστώνεται η ύπαρξη πυκνοχρωματικού πυρηνίου μέσα στον λιγότερο πυκνοχρωματικό πυρήνα . Συχνά ο πυρήνας έχει ιδιαίτερα περιφερική (έκκεντρη) εντόπιση . Η αναλογία των όγκων πυρήνα προς κυτταροπλάσματος ποικίλλει , αλλά

συνήθως είναι 1 προς 3 ($V_{π}/V_{κ}=1/3$) . Σε αρκετές περιπτώσεις τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν πολλά κενοτόπια και αποκτούν φυσαλιδώδη μορφή . Άλλοτε παρατηρούνται μακροφάγα τα οποία περιέχουν κοκκία ποικίλου μεγέθους και περιεχομένου , που είναι προφανώς λυσοσωματικής φύσης και περιέχουν τα υπολείμματα των σωματιδίων και ιστών που φαγοκυτταρώθηκαν . Συχνά τα κοκκία αυτά οφείλονται σε συσσωρεύσεις Επιφανειοδραστικού Παράγοντα (Surfactant) στο κυτταρόπλασμα . (Hocking και Golde, 1979 , Weinberg και Athens , 1993 , Lohmann-Matthes και συν., 1994) .

Ένας ακόμα τύπος μονοκύτταρου φαγοκυττάρου που έχει ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά στο οπτικό μικροσκόπιο είναι τα κύτταρα Kupffer , για τα οποία θα γίνει εδώ μια σύντομη αναφορά . Τα κύτταρα αυτά έχουν μελετηθεί μορφολογικά τόσο *in situ* σε βιοψίες ήπατος όσο και *ex vivo* μετά από ενζυμική πέψη του ηπατικού παρεγχύματος (π.χ. με Κολλαγενάση ή με Προνάση) . Τα κύτταρα Kupffer έχουν νεφροειδή πυρήνα και άφθονο κυτταρόπλασμα . Μέσα στο κυτταρόπλασμά τους υπάρχουν πολυάριθμα κοκκία , που είναι κυρίως λυσοσώματα . Σε πολλά από αυτά τα κοκκία περιέχεται υλικό που δίνει έντονη αντίδραση με την χρώση PAS , ενώ άλλα κοκκία περιέχουν μεγάλες ποσότητες άμορφης κηροειδούς ουσίας . Σε βιοψίες ήπατος φαίνεται ότι είναι αποπλατυσμένα κύτταρα και ότι από την περιφέρειά τους ξεκινούν ευμεγέθεις προεκβολές (ψευδοπόδια) οι οποίες συνήθως προβάλλουν στον αυλό των κολποειδών και δίνουν στα κύτταρα Kupffer αστεροειδές σχήμα . Τα κύτταρα που μελετώνται σε βραχύχρονες κυτταροκαλλιέργειες μετά από ενζυματική πέψη του ήπατος έχουν πιο στρογγυλό σχήμα και θυμίζουν αρκετά τα μονοκύτταρα . Η κυτταρική τους μεμβράνη παρουσιάζει πτυχώσεις (ruffling) και ο πυρήνας τους είναι έκκεντρα τοποθετημένος . Το κυτταρόπλασμά τους είναι ωχρο και τα λυσοσωματικά και φαγοσωμικά κοκκία είναι συγκεντρωμένα προς το κέντρο του κυττάρου . Ο ευμεγέθης πυρήνας τους είναι σχετικά ωχρός , με σχήμα νεφροειδές ή στρογγυλό με βαθιά εντομή και περιέχει ένα πυκνοχρωματικό πυρήνιο . Το κυτταρόπλασμα είναι επίσης ωχρο και φυσαλιδώδες , επειδή περιέχει πολλά κενοτόπια και κυτταροπλασματικά έγκλειστα . (Melly και συν., 1972 , Smedsrod και συν., 1985 , Burf και συν., 1993 , Weinberg και Athens , 1993) .

Ωστόσο είναι αντιληπτό ότι τα μακροφάγα που προέρχονται από ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό δεν είναι όλα όμοια μεταξύ τους , αλλά ότι μπορεί να εμφανίζουν μορφολογικές διαφορές που να συσχετίζονται με την ειδική ανατομική θέση τους μέσα στο όργανο ή τον ιστό . Έτσι τα μακροφάγα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος δεν είναι όλα όμοια μεταξύ τους αλλά εμφανίζουν χαρακτηριστικές μορφολογικές διαφορές : έτσι μέσα στο ΚΝΣ υπάρχουν τέσσερις υποκατηγορίες μακροφάγων , δηλαδή τα μικρογλοιακά κύτταρα , τα μακροφάγα του χοριοειδούς πλέγματος , τα μακροφάγα των λεπτομηνίγγων και τα περιαγγειακά μακροφάγα . Τα μακροφάγα των χοριοειδών πλεγμάτων και των λεπτομηνίγγων χαρακτηριστικά έχουν στρογγυλό σχήμα χωρίς μεγάλα ψευδοπόδια , διάμετρο περίπου 10 - 15 μm και μορφολογικά μοιάζουν με μονοκύτταρα , ενώ τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν αστεροειδές σχήμα , με ελάχιστο κυτταρόπλασμα γύρω από τον πυρήνα τους (διάμετρος 5 -7 μm) και εξαιρετικά επιμήκεις προεκβολές με διακλαδώσεις , που δίνουν πολύ μεγαλύτερη διάμετρο (έως 40 μm) και εξαιρετικά πολύπλοκο σχήμα που θυμίζει τα δενδριτικά κύτταρα (Perry και Gordon, 1991 , Lee και συν., 1993) . Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται και στον πνεύμονα , όπου επίσης υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες μακροφάγων , δηλαδή τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού , τα δενδριτικά μακροφάγα και τα ενδοαγγειακά μακροφάγα του

πνευμονικού παρεγχύματος . Χαρακτηριστικά τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν τους μορφολογικούς χαρακτήρες των ώριμων μακροφάγων , τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού έχουν μορφολογικούς χαρακτήρες μονοκυττάρων . Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται επίσης στα μακροφάγα του τοιχώματος του εντέρου , όπου διαπιστώνεται ότι τα μακροφάγα του ορογόνου χιτώνα έχουν σχήμα ιδιαίτερα επίμηκες , κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα με εντομή και λίγες λεπτές και επιμήκεις αποφυάδες , ενώ τα μακροφάγα στο ύψος του Μυεντερικού πλέγματος του Auerbach στον μυϊκό χιτώνα δεν είναι επιμήκη αλλά αποπλατυσμένα με ανώμαλο περίγραμμα , οι πυρήνες τους είναι κεντρικά τοποθετημένοι και ωοειδείς με βαθειά εντομή και τέλος εμφανίζουν πολυάριθμες και πολυσχιδείς προεκβολές του κυτταροπλάσματος που τους δίνουν ένα αστεροειδές σχήμα (Mikkelsen, 1995) . Κανένας από τους δύο αυτούς τύπους δεν μοιάζει ιδιαίτερα με τα μακροφάγα της βλεννογόνιας μυϊκής στοιβάδας του εντέρου , τα οποία είναι πολυγωνικά κύτταρα με μεγάλη διάμετρο (15-30 μm) , ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα , ωοειδή ή στρογγυλό πυρήνα και πολυάριθμα μεγάλα φαγοσώματα και λυσοσώματα (Han και συν., 1993) . Τέλος , μορφολογικές διαφορές παρουσιάζουν και οι τρεις υποπληθυσμοί των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων που εντοπίζονται στο ενδοθήλιο των κολποειδών των επινεφριδίων . I. Στις εξωτερικές στοιβάδες του φλοιού των επινεφριδίων τα κύτταρα είναι μικρά , με διάμετρο 10-15μm και έχουν ασθενή φαγοκυτταρική δράση . Ο πυρήνας τους είναι στρογγυλός ή ωοειδής , η χρωματίνη τους ωχρή και κροκυδωμένη και το κυτταρόπλασμά τους λίγο . II. Στην εσωτερική στοιβάδα του φλοιού και στον μυελό των επινεφριδίων τα κύτταρα είναι μεγάλα , με διάμετρο 15-20 μm και έντονη φαγοκυτταρική δράση . Ο πυρήνας είναι ευμεγέθης και τοποθετημένος κεντρικά ή ελάχιστα έκκεντρα . Το σχήμα του πυρήνα είναι νεφροειδές και περιβάλλεται από άφθονο αζουρόφιλο κυτταρόπλασμα που περιέχει πολυάριθμα κοκκία και κενοτόπια . III. Σε όλες τις στοιβάδες του φλοιού και του μυελού παρατηρούνται μεγάλα μακροφάγα (15-20μm) με ωοειδή πυρήνα και άφθονο κυανότεφο κυτταρόπλασμα , πολυάριθμα λυσοσωματικά κοκκία , κυστίδια και κενοτόπια . Τα κύτταρα αυτά είναι σχετικά σπάνια . (Surleff και Paradimitiou, 1981) .

ΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ .

Κατά την ενεργοποίηση (activation) των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων εμφανίζονται πολλές μορφολογικές μεταβολές οι οποίες αντικατοπτρίζουν την μεταβολή της λειτουργικής τους κατάστασης . Οι διαφοροποιήσεις αυτές στην μορφολογία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι παραπλήσιες τόσο στα φλεγμονώδη (inflammatory-elicited-stimulated) όσο και στα ενεργοποιημένα (activated-immune) μακροφάγα , όμως στην τελευταία αυτή κατηγορία οι μεταβολές είναι πιο έντονες και συνεπώς πιο εμφανείς .

Κατά την in vivo διέγερση των περιτοναϊκών μακροφάγων επίμυων με υγρή παραφίνη ή την in vivo ενεργοποίησή τους με ενδοτοξίνη παρατηρούνται οι παρακάτω μεταβολές στην μορφολογία των κυττάρων . (Morland και Kaplan, 1977) .

1. Τα μη-διεγερμένα (φυσιολογικά) περιτοναϊκά μακροφάγα από επίμυες έχουν πολυγωνικό ή ακανόνιστο σχήμα, μικρού ή μέτριου βαθμού αποπλάτυση και λίγα κυτταροπλασματικά κοκκία . Αν και παρουσιάζουν μικρού βαθμού πτύχωση (ruffling) της κυτταρικής τους μεμβράνης , η παρυφή τους είναι ανώμαλη διότι εμφανίζουν μεγάλες αναδιπλώσεις και βαθιές αύλακες , καθώς και επιμήκεις λεπτές προεκβολές (ψευδοπόδια) .

2. Τα φλεγμονώδη (elicited) περιτοναϊκά μακροφάγα των επίμυων αποκτούν σχήμα ατρακτοειδές ή πολύ λεπτό και επίμηκες . Εκτός από την επιμήκυνση των κυττάρων αυξάνει επίσης ο βαθμός της πτύχωσης της κυτταρικής μεμβράνης , κυρίως στις άκρες των μεγάλων ψευδοποδίων . Ταυτόχρονα με την αύξηση της πτύχωσης της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνονται επίσης οι αυλακώσεις και οι αναδιπλώσεις της . Στο κυτταρόπλασμα δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού ή του μεγέθους των κοκκίων .

3. Τα ενεργοποιημένα (activated) περιτοναϊκά μακροφάγα εξακολουθούν να είναι πολυγωνικά ή να διαθέτουν ακανόνιστο σχήμα , αλλά παρουσιάζουν πολύ μεγάλη αύξηση των διαμέτρων και της επιφάνειάς τους . Αυτό οφείλεται κατά ένα μέρος στην αποπλάτυνση του ίδιου του κυττάρου και κατά ένα άλλο μέρος στην de novo πρωτεϊνοσύνθεση και την υπερτροφία του μακροφάγου . Ταυτοχρόνως με την αύξηση του μεγέθους και της επιφάνειας του κυττάρου έχουμε και αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των κοκκίων και κυστιδίων του κυτταροπλάσματος . Αν και αυξάνεται η πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης , μειώνεται ο αριθμός των μεγάλων αναδιπλώσεων και αυλακώσεων .

Φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα δημιουργούνται *in vitro* και από την ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) έγχυση γαλακτώματος τριολεινης σε Tween-20/HBSS (Williams και Mayhew, 1973) . Σε αυτή την σειρά πειραμάτων , όπου χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μορφομετρικής ανάλυσης σε εικόνες οπτικού μικροσκοπίου , διαπιστώθηκε ότι η διέγερση των μακροφάγων προκαλούσε αλλαγή στην διάμετρο και το μέγεθος των κυττάρων αυτών . Συγκεκριμένα τα διεγερμένα κύτταρα αύξαναν την διάμετρο τους από 9.0 μm σε 11.0 μm , ενώ ταυτόχρονα εμφανιζόταν και ένας δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός με διάμετρο 7.6 μm . Αυτός ο νέος πληθυσμός οφειλόταν στην εισροή στην περιτοναϊκή κοιλότητα μονοκυττάρων από το αίμα . Στα ίδια πειράματα διαπιστώθηκε ότι η διέγερση των μακροφάγων προκαλούσε όχι μόνον αύξηση του αριθμού των λυσοσώμικων κοκκίων που περιείχε κάθε κύτταρο αλλά και αύξηση του αριθμού των μακροφάγων που περιείχαν ευμεγέθη κοκκία που να είναι ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο (Williams και Mayhew, 1973) . Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την *in vivo* διέγερση των μακροφάγων με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση Freund's Complete Adjuvant , όπου διαπιστώθηκε πάλι η αύξηση της διαμέτρου και του όγκου των περιτοναϊκών μακροφάγων , η εμφάνιση ενός νέου πληθυσμού κυττάρων με μικρή διάμετρο (μονοκύτταρα που μετανάστευσαν στην περιτοναϊκή κοιλότητα προσφάτως) και η αύξηση του αριθμού των λυσοσωματικών κοκκίων μεγάλου μεγέθους (Mayhew και Williams, 1974a , Mayhew και Williams, 1974b) . Επίσης στις μελέτες αυτές η μορφομετρική ανάλυση έδειξε ότι μεταβλήθηκε και το σχήμα των μακροφάγων , αφού αυτά έγιναν πιο σφαιρικά (μειώθηκε ο αριθμός των τριγωνικών ή πολυγωνικών κυττάρων) και με λιγότερες ανωμαλίες της παρυφής της κυτταρικής τους μεμβράνης (προεκβολές, ψευδοπόδια, βοθρία) . Τέλος έγιναν και οι πυρήνες τους λιγότερο ανισοδιαμετρικοί και πιο σφαιρικοί (Mayhew και Williams, 1974b) .

Εκτός όμως από τις μορφολογικές μεταβολές που προκαλεί η *in vivo* ενεργοποίηση των μακροφάγων , έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχες αλλαγές μετά από *in vitro* ενεργοποίηση των κυττάρων με προσθήκη ενδοτοξίνης στο καλλιεργητικό υλικό . Συγκεκριμένα , τα περιτοναϊκά αυτά μακροφάγα εμφανίζονται πολύ μεγαλύτερα και πιο αποπλάτυσμένα από τα φυσιολογικά . Η κυτταρική τους μεμβράνη εμφανίζει πολύ έντονη πτύχωση , αύξηση του αριθμού των ψευδοποδίων και μείωση του αριθμού των ευμεγεθών αναδιπλώσεων και αυλάκων . Στο κυτταρόπλασμά τους εμφανίζονται πολυάριθμα κοκκία , κυστιδία και κενोटόπια . Αν όμως η ενεργοποίηση των μακροφάγων με την

προσθήκη ενδοτοξίνης γίνει σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς Ορό Εμβρύου Μόσχου (FCS) τότε ούτε αυξάνει η πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης ούτε ο αριθμός και το μέγεθος των κοκκίων και κυστιδίων . (Morland και Kaplan, 1977) . Παρόμοιες μορφολογικές μεταβολές παρουσιάζονται κατά την *in vitro* ενεργοποίηση μακροφάγων του μυελού των οστών με ενδοτοξίνη . Αυτά τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ήταν πολύ μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά και το σχήμα τους ήταν πιο στρογγυλό . Στην αλλαγή του σχήματος συνέβαλλε το ότι παρουσίαζαν λιγότερα και πιο μικρά ψευδοπόδια . Μέσα στο κυτταρόπλασμά τους υπήρχαν περισσότερα και μεγαλύτερα κοκκία . Όμως η πιο χαρακτηριστική μορφολογική μεταβολή που συνόδευε την ενεργοποίηση των μακροφάγων με ενδοτοξίνη ήταν η συσσωρευση και συσσωμάτωσή τους σε αποικίες των 50-60 κυττάρων (Cooper και συν., 1984) . Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι οι μορφολογικές μεταβολές εξαρτώνται εν μέρει και από τον παράγοντα ενεργοποίησης . Έτσι , έχει παρατηρηθεί ότι περιτοναϊκά μακροφάγα από επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά Θειογλυκολλικός ζυμός (Thioglycollate broth) είναι μεγαλύτερα και πιο αποπλατυσμένα και με περισσότερα κενोटόπια από μακροφάγα που διεγέρθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μυκοβακτηριδίου BCG ή που δεν διεγέρθηκαν καθόλου (Nathan και Root, 1977) . Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται *in vitro* με ενδοτοξίνη δημιουργούν πολύ λεπτά και επιμήκη ψευδοπόδια ενώ αν τα ίδια κύτταρα ενεργοποιηθούν *in vitro* με μουραμυλδιπεπτίδια (MDP) τα ψευδοπόδια που δημιουργούνται είναι πιο πολλά αλλά βραχύτερα και παχύτερα . (Pabst και Johnston, 1980) .

ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς μεταβολές της ιστοχημικής εντόπισης και δραστηριότητας πολλών μεμβρανικών , κυτταροπλασματικών και λυσοσωματικών ενζύμων τους , μεταξύ των οποίων η Μη-ειδική Εστεράση , η Υπεροξειδάση και η Ώξινη Φωσφατάση . Αυτό συμβαίνει επειδή τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία από υδρολυτικά ένζυμα , όπως η Ώξινη Φωσφατάση , η β-Γαλακτοσιδάση , η 5'-Νουκλεοτιδάση , η Λυσοζύμη , η α-Ναφθυλοβουτυλική Εστεράση και η Υπεροξειδάση και οι δραστηριότητές τους μεταβάλλονται ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης και την λειτουργική κατάσταση του φαγοκυττάρου . Από αυτές , η Υπεροξειδάση και η Μη-ειδική Εστεράση έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για την ιστοχημική αναγνώριση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων όσο και για τον διαχωρισμό τους από τα κοκκιόκυτταρα (Yam και συν., 1971) .

Επίσης έχουν μελετηθεί και οι ιστοχημικές αντιδράσεις PAS και Sudan Black B . Έτσι διαπιστώθηκε ότι με την χρώση PAS τα μονοκύτταρα δίνουν ασθενή θετική αντίδραση ενώ τα μακροφάγα δεν δίνουν αντίδραση (εκτός εάν προηγουμένως έχουν επιτελέσει φαγοκυττάρωση) , ενώ με την Sudan Black B και τα δύο είδη κυττάρων δίνουν ασθενή θετική αντίδραση .

Ορισμένες από τις ιστοχημικές παρατηρήσεις έχουν γίνει με οπτικό μικροσκόπιο , ενώ κάποιοι άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν τεχνικές προσαρμοσμένες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο . Εδώ θα γίνει μια σύντομη αναφορά στα αποτελέσματα και από τα δύο είδη πειραμάτων .

1. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ ΏΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ . Η διαδικασία ωρίμασης των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων περιλαμβάνει όχι μόνον την αύξηση της διαμέτρου τους και του αριθμού των κοκκίων στο κυτταρόπλασμά τους , αλλά ταυτοχρόνως και την αύξηση της Ώξινης Λυσοσωματικής Φωσφατάσης που ανιχνεύεται με ιστοχημικές μεθόδους στο κυτταρόπλασμα . Έχει

διαπιστωθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης εντοπίζεται μέσα στο λυσοσωματικό του δίκτυο , ενώ μικρό μέρος της δραστηριότητας μπορεί να εντοπιστεί και σε κυστίδια της συσκευής Golgi και σε στοιχεία του ενδοπλασματικού δικτύου , τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή του ενζύμου αυτού (Cohn και συν., 1966) . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα που μόλις έχουν απομονωθεί παρουσιάζουν μικρή ιστοχημική αντίδραση Ώξινης Φωσφατάσης μέσα σε μικρά κοκκία στην περιπυρηνική περιοχή . Μετά όμως από 24 ώρες καλλιέργειας τα μακροφάγα αυτά παρουσίαζαν αύξηση της ιστοχημικής δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , η οποία εντοπιζόταν σε νεοσχηματιζόμενα μεγάλα κοκκία που επίσης εντοπιζόνταν στην περιπυρηνική περιοχή και στο κυτταρικό κέντρο . Αντιθέτως τα πινοκυττωτικά κυστίδια και τα μιτοχόνδρια παρέμεναν αρνητικά για το ένζυμο αυτό (Cohn και Benson, 1965) . Η περιγραφή αυτή των λυσοσωμάτων ως σφαιρικών ή ελλειψοειδών σωματιδίων (κοκκίων) τα οποία περιέχουν Ώξινη Φωσφατάση έχει διατηρηθεί ως τις μέρες μας , παρά το ότι είναι αποδεκτό ότι τα λυσοσώματα των μακροφάγων αποτελούν ένα δίκτυο από αναστομούμενους και μάλλον σωληνοειδούς μορφής χώρους (Swanson και συν., 1987) .

Τα φυσιολογικά βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν πολυάριθμα κοκκία θετικά για Ώξινη Φωσφατάση (Hocking και Golde , 1979) , αλλά σε καπνιστές και ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα ο αριθμός των κοκκίων αυτών αυξάνεται . Τα ηπατικά (Kupffer) μακροφάγα είναι πάντα γεμάτα με κοκκία θετικά για Ώξινη Φωσφατάση (Smetsrod και συν., 1985) . Επίσης τα μακροφάγα του μυελού των οστών έχουν έντονη ιστοχημική δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης στα κοκκία τους (Crocker και Gordon, 1985) .

Η δραστηριότητα των λυσοσωμικών ενζύμων των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και ιδιαίτερα της Ώξινης Φωσφατάσης αυξάνουν μετά από την *in vivo* ή *in vitro* διέγερση τους (Morland και Kaplan, 1977) . Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι μετά από την φαγοκυττάρωση σωματιδίων *zymosan* από ενεργοποιημένα *in vivo* με BCG βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα λυσοσώματα των κυττάρων αυτών παρουσιάζουν σημαντική μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης (Cohn και Wiener, 1963) . Αυτό οφείλεται κυρίως στην μεταφορά του ενζύμου στα φαγοσώματα . Τέλος , υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι μετά από την διέγερση μονοκυττάρων με β -VLDL αλλάζει η ιστοχημική κατανομή της Ώξινης Φωσφατάσης στα κύτταρα αυτά (Jones και συν., 1991) . Συγκεκριμένα ενώ αυξάνει η συνολική δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης στο μακροφάγο , αυτή εντοπίζεται για μικρό χρονικό διάστημα στα πρωτογενή και δευτερογενή λυσοσώματα και γρήγορα μεταφέρεται στα σωληνοειδή λυσοσώματα και στις δεξαμενές του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου .

2. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ ΜΗ-ΕΙΔΙΚΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ .

Η Μη-Ειδική Εστεράση είναι ένα ένζυμο της εξωτερικής επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης των μακροφάγων και μονοκυττάρων , ενώ αντιθέτως η Υπεροξειδάση εντοπίζεται μέσα σε λυσοσωματικά κοκκία (Πρωτογενή Λυσοσώματα) , μαζί με την Ώξινη Φωσφατάση και την Αρυλο-Σουλφατάση . Η Εστεράση και η Υπεροξειδάση έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Τα προμονοκύτταρα και τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών είναι θετικά για την Μη-Ειδική Εστεράση αλλά και για την α -Ναφθυλεστεράση (Εστεράση-2) . Επίσης , τα κύτταρα αυτά είναι θετικά για Υπεροξειδάση , ειδικά στην περιπυρηνική περιοχή του κυτταροπλάσματος . (Van Furth και συν., 1970 , Van Furth και συν., 1979) . Στους μονοβλάστες η δραστηριότητα Υπεροξειδάσης εντοπίζεται κυρίως σε κοκκία του κυτταροπλάσματος και σε μικρότερο βαθμό στον πυρηνικό φάκελο και στο

κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο (Van der Meer και συν., 1979) . Στα προμονοκύτταρα η δραστηριότητα της Υπεροξειδάσης εμφανίζεται κυρίως σε πολυάριθμα κυτταροπλασματικά κυστίδια τα οποία εντοπίζονται στο κεντρικό κυτταρόπλασμα , κοντά στις «πύλες» του πυρήνα και σε μικρότερο βαθμό στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο , στο πυρηνικό περίβλημα και στην συσκευή Golgi . Στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος καθώς και στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών τα κυστίδια με δραστηριότητα Υπεροξειδάσης γίνονται λιγότερα , ενώ στα ώριμα μακροφάγα που εξελίχθηκαν από μονοκύτταρα ο αριθμός των κυστιδίων με δραστηριότητα Υπεροξειδάσης είναι ακόμα μικρότερος αν και ανιχνεύεται ακόμα μικρή δραστηριότητά της στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο και στην συσκευή Golgi . Η ίδια ακριβώς μείωση των θετικών για Υπεροξειδάση κοκκίων και κυστιδίων παρατηρείται στα ώριμα περιτοναϊκά μακροφάγα , στα ώριμα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , καθώς και σε μακροφάγα που διατηρήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια . (Van Furth και συν., 1970 , Zembala και Asherson, 1989) . Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι η ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων συνοδεύεται από την εξαφάνιση του πληθυσμού των κοκκίων που είναι θετικά για Υπεροξειδάση και την ανάπτυξη ενός νέου πληθυσμού που είναι αρνητικός για Υπεροξειδάση .

Στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος υπάρχει η ίδια αναλογία κυττάρων θετικών για Μη-ειδική Εστεράση και Υπεροξειδάση , όπως και στα μονοκύτταρα του μυελού των οστών . Αν τα μονοκύτταρα διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργεια , εμφανίζεται προόδευτική μείωση του ποσοστού των κυττάρων με θετική ιστοχημική αντίδραση για τα ένζυμα αυτά . Αντιθέτως , στα περιτοναϊκά μακροφάγα διαπιστώθηκε ότι ενώ όλα τα κύτταρα είναι θετικά για Μη-ειδική Εστεράση , μόνο ένα μικρό ποσοστό των μακροφάγων αυτών είναι θετικά για Υπεροξειδάση (Van Furth και συν., 1979) . Σε γενικές γραμμές η δραστηριότητα Μη-ειδικής Εστεράσης αυξάνει με την ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και μειώνεται ξανά μόνο στο στάδιο του επιθηλιοειδούς κυττάρου ή του γιγαντοκυττάρου (Zembala και Asherson, 1989) .

Τα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα δίνουν πάντοτε έντονα θετική την αντίδραση της Μη-ειδικής Εστεράσης (Hocking και Golde , 1979) . Επίσης τα μακροφάγα του μυελού των οστών έχουν έντονη ιστοχημική δραστηριότητα Μη-ειδικής Εστεράσης (Crocker και Gordon, 1985) . Τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) είναι πάντα γεμάτα με κυστίδια θετικά για Υπεροξειδάση (Smedsrod και συν., 1985) . Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι ενώ σε άλλα είδη κυττάρων η δραστηριότητα Υπεροξειδάσης έχει ανιχνευτεί και στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στον Πυρηνικό Περίβλημα (nuclear envelope) , στα μονοκύτταρα αυτή ανιχνεύεται μόνο μέσα σε κυστίδια (Winwood και Arthur, 1993 , Burf και συν., 1993) .

Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι κατά την ανάπτυξη των κοκκιωματωδών φλεγμονωδών αντιδράσεων αλλάζει το ποσοστό των θετικών για Υπεροξειδάση μονοπύρηνων φαγοκυττάρων του κοκκιώματος : Έτσι ενώ σε υποδόρια κοκκιώματα τα μακροφάγα ή θα είναι δίνουν θετική αντίδραση μέσα στα κοκκία τους ή θα είναι τελείως αρνητικά για Υπεροξειδάση , σε ενδοπεριτοναϊκές φλεγμονές τα κοκκιώματα περιέχουν ταυτόχρονα τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς μακροφάγων . Οι τρεις αυτοί πληθυσμοί είναι 1) τα μη-διεγερμένα μακροφάγα , που εμφανίζουν την δραστηριότητα στο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στο Πυρηνικό Περίβλημα , 2) τα διεγερμένα μακροφάγα , που είτε είναι αρνητικά για το ένζυμο ή παρουσιάζουν θετική αντίδραση στα κοκκία τους και 3) τα μακροφάγα που εμφανίζουν δραστηριότητα Υπεροξειδάσης και στα τρία παραπάνω κυτταρικά διαμερίσματα (Daems

και Brederoo, 1973 , Van der Rhee και συν., 1979a, 1979b, 1979c) . Θεωρούμε ότι οι τρεις αυτοί πληθυσμοί μακροφάγων αντιπροσωπεύουν στάδια στην διαδικασία ωρίμασης και ενεργοποίησης των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων στην φλεγμονώδη εστία . Όμως ακόμα και τα διεγερμένα με Ενδοτοξίνη (LPS-activated) περιτοναϊκά μακροφάγα μπορούν να αποκτήσουν ξανά την δραστηριότητα Υπεροξειδάσης στο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στον Πυρηνικό Περίβλημα , εάν τεθούν σε κυτταροκαλλιέργεια και τους επιτραπεί να προσκολληθούν σε επιφάνειες καλυμμένες με ινική (fibrin) ή πλαστικό (Bodel και συν., 1978) .



Κεφάλαιο 1-4. Η μορφολογία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο .

ΓΕΝΙΚΑ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Η δομή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στο υποκυτταρικό επίπεδο (δηλαδή στο επίπεδο των κυτταρικών οργανιδίων) έχει μελετηθεί σε μεγάλη έκταση κατά τις δεκαετίες του 1960 και 1970 , τόσο με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης όσο και το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης . Μέσα από τις μελέτες αυτές έγινε αντιληπτό ότι η λεπτή δομή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων εξαρτάται από την ανατομική τους εντόπιση , από τον βαθμό ωρίμασης και διαφοροποίησής τους , από την λειτουργική τους κατάσταση και τον βαθμό διέγερσης (ενεργοποίησης) τους και τέλος από τις τεχνικές και τις μεθόδους απομόνωσης και μονιμοποίησής τους . Ωστόσο πάντα υπάρχουν ορισμένα σταθερά και αναλλοίωτα μορφολογικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Τα στοιχεία αυτά είναι τα παρακάτω (Bloom και Fawcett, 1975 , Lewis και McGee, 1994) :

1. ΠΥΡΗΝΑΣ : Έκκεντρα τοποθετημένος με ποικίλο μέγεθος και σχήμα . Χρωματίνη διατεταγμένη σε λεπτά συσσωματώματα τα οποία διατάσσονται κοντά στην πυρηνική μεμβράνη . Αυτά τα συσσωματώματα έχουν λεπτοκοκκιώδη υφή στα ώριμα μακροφάγα και στερούνται της χαρακτηριστικά έντονης συμπύκνωσης που έχει η χρωματίνη στην περιφέρεια του πυρήνα των μονοκυττάρων . Ανάμεσα στα συσσωματώματα της χρωματίνης διαφαίνονται οι πυρηνικοί πόροι .
2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ : Περιέχει καλά ανεπτυγμένη συσκευή Golgi κοντά στον πυρήνα , δεξαμενές του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου διασκορπισμένες ανομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα , πολυάριθμα ευμεγέθη μιτοχόνδρια, λυσοσώματα , κυστίδια και κενοτόπια . Τα λυσοσώματα είναι ηλεκτρονιοσκειρά (electron-dense) και συχνά φαίνονται να συντήκονται με τα φαγοσώματα και τα πινοκυττωτικά κυστίδια και να δημιουργούν δευτερογενή λυσοσώματα , τα οποία περιέχουν φαγοκυτταρωμένο υλικό σε ποικίλες φάσεις πέψης και αποδόμησης . Ο κυτταροσκελετός των μακροφάγων αποτελείται από μικρονημάτια και μικροσωληνίσκους που περιβάλλουν τον πυρήνα και επεκτείνονται ακτινωτά προς την περιφέρεια του κυττάρου , δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο και πυκνό πλέγμα που καταλήγει στα νημάτια ακτίνης ακριβώς κάτω από την κυτταρική μεμβράνη .
3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ : Η επιφάνεια των μακροφάγων παρουσιάζει πολυάριθμες ανωμαλίες , όπως μικρολάχνες (microvilli) , ψευδοπόδια (pseudopods) , πτυχώσεις (ruffles) , αυλακώσεις (ridges) , βοθρία (pits) , εγκολεασμούς (invaginations) και υπομεμβρανικές φυσαλίδες (surface blebs) .

Ένα στοιχείο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την μελέτη των μακροφάγων είναι ότι το λυσοσωματικό δίκτυο των κυττάρων αυτών δεν αποτελείται μόνο από σφαιρικές κυστιδικές δομές αλλά και από ένα δίκτυο επικοινωνούντων σωληνοειδών σχηματισμών , όπως ακριβώς η συσκευή Golgi δεν αποτελείται μόνο από στοιβές παράλληλων επίμηκων σωληνοειδών δεξαμενών αλλά και από ένα σύστημα κυστιδίων . Αυτό σημαίνει ότι η αναγνώριση συγκεκριμένων υποκυτταρικών δομών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι ιδιαίτερα δυσχερής χωρίς την βοήθεια ειδικών ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών τεχνικών . Ιδιαίτερα σημαντικό για την μελέτη του λυσοσωματικού συστήματος των μακροφάγων είναι το γεγονός ότι τα λυσοσώματα συντάσσονται σε ένα δίκτυο σωληνοειδών σχηματισμών με εξωτερική διάμετρο 75 nm και μήκος πολλών μm , οι οποίοι φέρονται παράλληλα με

τους κυτταροπλασματικούς μικροσωληνίσκους και τα μικρονημάτια και έτσι ακτινοβολούν από το κυτταρικό κέντρο προς την κυτταρική μεμβράνη (Swanson και συν., 1987). Όταν τα μικρονημάτια και οι μικροσωληνίσκοι του κυτταροσκελετού των μακροφάγων παραβλάπτονται, τότε παρατηρείται καταστροφή των σωληνοειδών σχηματισμών του λυσοσωματικού δικτύου και κατακερματισμός του σε άθροισμα κυστιδίων. Επίσης είναι γνωστό ότι μακροφάγα που διαφοροποιούνται *in vitro*, από καλλιέργειες των πρόδρομων μορφών του μυελού των οστών, δεν έχουν καθόλου σφαιρικά λυσοσώματα ενώ όλο το λυσοσωματικό τους δίκτυο βρίσκεται με την μορφή των αναστομούμενων σωληνοειδών σχηματισμών. Αν όμως η καλλιέργεια γίνει παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σουκρόζης, η πινοκύτωση αυτής της οσμωτικά δραστηρικής ουσίας θα οδηγήσει την μετατροπή των λυσοσωμάτων από την σωληνοδικτυωτή (tubulo-reticular) στην σφαιρική τους μορφή (Knapp και Swanson, 1990). Στα περιτοναϊκά μακροφάγα επίσης υπάρχει ανεπτυγμένο ένα τέτοιο σωληνοειδές σύστημα λυσοσωμάτων. Αυτό το σύστημα αποτελεί το σημείο σύγκλισης της φαγοκυτταρικής και της πινοκυττωτικής οδού, δηλαδή το αμέσως προηγούμενο στάδιο πριν την είσοδο των ενδοκυττωμένων υλικών στα κλασσικά σφαιρικά φαγολυσοσώματα (Rabinowitz και συν., 1992). Όταν δεν υπάρχει έντονη πρόσληψη ουσιών με ενδοκύτωση, αυτό το εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα διακλαδιζομένων και αναστομούμενων δεξαμενών παίρνει μορφή επιστοιβαγμένων παράλληλων μεμβρανών.

Ένα άλλο ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο για την μελέτη του λυσοσωματικού συστήματος των μακροφάγων είναι ότι οι ιστοχημικές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των τμημάτων του μέσω της αντίδρασης που δίνουν οι λυσοσωματικές Υδρολάσες του, είναι επιρρεπείς σε ένα σφάλμα: εάν έχει προηγηθεί φαγοκυτταρική δραστηριότητα είναι πιθανό τα λυσοσώματα να μην πια περιέχουν ένζυμα και έτσι να μην δίνουν καμία αντίδραση (Cohn και Wiener, 1963a, Cohn και Wiener, 1963b).

Στην συνέχεια θα γίνει μια σύντομη αναφορά στην λεπτή δομή των κυριότερων ειδών μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, κυρίως όπως αυτή γίνεται αντιληπτή με την βοήθεια του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (Transmission Electron Microscope).

ΑΡΧΕΓΟΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ : ΜΟΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Οι **μονοβλάστες** είναι σφαιρικά κύτταρα μετρίου μεγέθους, που εντοπίζονται μόνο στο μυελό των οστών. Έχουν έναν μεγάλο στρογγυλό πυρήνα, ο οποίος εμφανίζει λεπτοκοκκιώδη δομή λόγω των νηματιών χρωματίνης. Ο πυρήνας συχνά περιέχει δύο ευμεγέθη πυρήνια. Στο κυτταρόπλασμα διακρίνουμε πολυάριθμα μικρά μιτοχόνδρια, με σχήμα σφαιρικό ή επίμηκες. Οι μονοβλάστες φαίνεται να στερούνται πινοκυττωτικών κυστιδίων και κενοτοπίων. Η συσκευή Golgi τους είναι αρκετά μικρή. Τέλος, στο κυτταρόπλασμα διακρίνουμε πολυάριθμα ριβοσώματα και διάσπαρτες δεξαμενές του Ενδοπλασματικού Δικτύου. (Van der Meer και συν., 1979, Weinberg και Athens, 1993).

Τα **προμονοκύτταρα** διακρίνονται από την ύπαρξη χαρακτηριστικών κυτταροπλασματικών κοκκίων, τα οποία διαφοροποιούν τα κύτταρα αυτά από τις πρόδρομες μορφές των κοκκιοκυττάρων. Είναι μεγάλα κύτταρα, με διάμετρο 14-20 μm , δηλαδή μεγαλύτερα από τα μονοκύτταρα και τα άωρα μακροφάγα. Διαθέτουν πυρήνα μετρίου ή μεγάλου μεγέθους, ο οποίος περιέχει 1-2 πυρήνια και η χρωματίνη του παρουσιάζει χαρακτηριστική συμπύκνωση στην περιφέρεια του πυρήνα (κάτω από την πυρηνική μεμβράνη). Το σχήμα του πυρήνα είναι ωειδές με χαρακτηριστική εντομή και όχι νεφροειδές ή πεταλοειδές. Ο δείκτης όγκου Πυρήνα/ όγκου Κυτταροπλάσματος ($V_{\text{H}}/V_{\text{K}}$) είναι συνήθως

μεγαλύτερος της μονάδας ($V_n/V_k > 1$). Η κυτταρική μεμβράνη τους είναι ελαφρώς πτυχωμένη. Μέσα στο κυτταρόπλασμα τους διακρίνουμε πολυάριθμα διάσπαρτα ριβοσώματα και πολυριβοσώματα, άφθονο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο, μέτριο αριθμό μιτοχονδρίων και μια ευμεγέθη συσκευή Golgi. Διακρίνουμε επίσης πολυάριθμα δεμάτια μικρονηματίων που διατάσσονται γύρω από τον πυρήνα, καθώς και μικρό αριθμό κοκκίων και κυστιδίων που διατάσσονται γύρω από την συσκευή Golgi. Η κυτταρική μεμβράνη των προμονοκυττάρων εμφανίζει προεκβολές και ψευδοπόδια που σχετίζονται με την κίνηση και την φαγοκυτταρική - πινοκυττωτική δραστηριότητα τους. Κατά την ωρίμαση των προμονοκυττάρων σε μονοκύτταρα αυξάνεται η συμπύκνωση της χρωματινής στην περιφέρεια του πυρήνα, ο πυρήνας γίνεται νεφροειδής ή πεταλοειδής, μειώνεται ο αριθμός των ριβοσωμάτων και η ποσότητα του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου και τέλος αυξάνεται ο αριθμός των μιτοχονδρίων, των κυστιδίων και των λυσοσωματικών κοκκίων. (Van Furth και συν., 1970, Van der Meer και συν., 1979, Weinberg και Athens, 1993, Lewis και McGee, 1994).

ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα πιο χαρακτηριστικά στοιχεία της λεπτής δομής των μονοκυττάρων είναι τα ακόλουθα: (Sutton και Weiss, 1966, Hirsch και Fedorko, 1968, Bloom και Fawcett, 1975, Van der Rhee και συν., 1979a, Van der Rhee και συν., 1979c, Zembala και Asherson, 1989, Stevens και Lowe, 1993, Weinberg και Athens, 1993, Lewis και McGee, 1994).

1. ΠΥΡΗΝΑΣ. Ο πυρήνας των μονοκυττάρων έχει νεφροειδές σχήμα ή είναι ωοειδής με μια βαθιά εντομή και μοιάζει να καταλαμβάνει περίπου το ήμισυ του κυττάρου ($V_n/V_k = 1$). Παρουσιάζει μια χαρακτηριστική συμπύκνωση της χρωματινής στην περιφέρειά του, ενώ στο κέντρο του πυρήνα υπάρχει άφθονη αραιή χρωματίνη. Συνήθως διαθέτει 1-2 πυρήνια, τα οποία περιβάλλονται από χρωματίνη (nucleolar-associated chromatin). Συχνά όμως τα πυρήνια δεν είναι ευκρινώς ορατά. Οι Πυρηνικοί Πόροι είναι εμφανείς. Γύρω από τον πυρήνα συχνά εντοπίζονται δεσμίδες από μικροϊνίδια (perinuclear fibril bundles).

2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ. Το κυτταρόπλασμα των μονοκυττάρων είναι άφθονο και περιέχει πολυάριθμα κυστιδία, κενοτόπια, μικρά μιτοχόνδρια και κυτταροπλασματικά κοκκία. Τα κοκκία των μονοκυττάρων έχουν διάμετρο 0.005 ως 0.2 μm και είναι πυκνά (electron-dense), ομοιογενή και περιβάλλονται από μεμβράνη. Τα μεγάλα κοκκία των 0.2 μm αντιστοιχούν στα αζουρόφιλα κοκκία της φωτονικής μικροσκοπίας. Μερικά κοκκία είναι σφαιρικά και περιβάλλονται από άλω ενώ άλλα έχουν ωοειδές ή κορνοειδές σχήμα. Το Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Κ.Ε.Δ.) των μονοκυττάρων αποτελείται από αραιές και διάσπαρτες δεξαμενές με τυχαία διάταξη. Μερικές φορές οι δεξαμενές του Κοκκιώδους Δικτύου συνεχονται με δεξαμενές του Άκοκκου Ενδοπλασματικού Δικτύου. Κοντά στον πυρήνα μερικές δεξαμενές του Κ.Ε.Δ. φέρονται κυκλοτερώς γύρω από την παρυφή του πυρήνα. Τα μονοκύτταρα διαθέτουν πολυάριθμα ριβοσώματα τα οποία κατά άλλους είναι ελεύθερα και κατά άλλους διατάσσονται σε πολυριβοσώματα. Άκοκκο Ενδοπλασματικό Δίκτυο δεν παρατηρείται συχνά. Μέσα στο κυτταρόπλασμα διακρίνουμε πολλούς μικροσωληνίσκους. Στην περιφέρεια του κυττάρου συνήθως διακρίνονται μερικά μικρά ψευδοπόδια. Η θεμέλια ουσία του κυτταροπλάσματος των μονοκυττάρων έχει λεπτοκοκκιώδη υφή και μέτρια πυκνότητα.

3. ΣΥΣΚΕΥΗ GOLGI. Η συσκευή Golgi είναι ευμεγέθης και καλά αναπτυγμένη στα μονοκύτταρα και συνήθως εντοπίζεται κοντά στον πυρήνα και συγκεκριμένα στο σημείο της εντομής του ή της

πύλης του (εάν είναι νεφροειδής) . Συχνά εντοπίζεται κοντά στα κεντριόλια . Το σχήμα της ποικίλλει . Συχνά είναι πολυκεντρική και οι δεξαμενές της δεν παρουσιάζουν διάταξη . Την συσκευή Golgi περιβάλλουν πολυάριθμα κυστίδια με διάμετρο 50-200 μμ , που αποτελούν τμήματα της συσκευής Golgi και του Άκοκκου Ενδοπλασματικού Δικτύου . Επίσης την περιβάλλουν μικροτινοκυτιτωτικά κυστίδια . Γύρω από την συσκευή παρατηρείται η διέλευση πολλών μικροσωληνίσκων , οι οποίοι προέρχονται από την περιοχή των κεντριολίων . Αυτοί οι μικροσωληνίσκοι έρχονται σε επαφή με πολλά παρακείμενα κυστίδια και επιμήκη κοκκία .

4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ . Τα μιτοχόνδρια των μονοκυττάρων είναι λίγα, μικρά και σφαιρικά ή ωοειδή ή ελαφρώς επιμήκη . Εντοπίζονται συνήθως στην περιφέρεια του μονοκυττάρου . Η θεμέλια ουσία τους είναι πυκνή και δεν περιέχει κοκκία , ενώ οι ακρολοφίες τους (cristae) είναι καλά αφορισμένες .

Αν τα μονοκύτταρα τεθούν σε κυτταροκαλλιέργεια για διάστημα μερικών ωρών , σύντομα θα εμφανίσουν μορφολογικές μεταβολές (Sutton και Weiss, 1966 , Van der Rhee και συν., 1979) . Τέτοιες μεταβολές είναι οι εξής :

1. Η εμφάνιση μιας λεπτής ζώνης εκτοπλάσματος κάτω από την κυτταρική μεμβράνη .
2. Η αύξηση του αριθμού και του μήκους των ψευδοποδίων .
3. Η δημιουργία πυκνών κυπελλοειδών εισολκών (caveolae) στην κυτταρική μεμβράνη .
4. Η αύξηση του Άκοκκου Ενδοπλασματικού Δικτύου .
5. Η αύξηση του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου , με ταυτόχρονη διάταξή του σε παράλληλες αποπλατυσμένες δεξαμενές ή σε ατρακτοειδή κυστίδια .
6. Η αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λυσοσωμάτων .
7. Η εμφάνιση Δεματίου (bundle) Μικρονηματίων . Αυτό αποτελείται από 5-8 παράλληλα μικρονημάτια που διασχίζουν το κυτταρόπλασμα και έρχονται σε επαφή με τα λυσοσώματα και μιτοχόνδρια .
8. Η λέπτυνση της ζώνης ετεροχρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα .
9. Η αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων .
10. Η αύξηση του αριθμού των πολυριβοσωμάτων .

Μονοκύτταρα που καλλιεργούνται μαζί με ενδοθηλιακά κύτταρα αποκτούν ωοειδές ή σφαιρικό σχήμα και η μεμβράνη τους σχηματίζει πολυάριθμες δακτυλοειδείς προεκβολές στα σημεία όπου τα παρακείμενα κύτταρα έρχονται σε επαφή . Ο αριθμός των κυστιδίων τους αυξάνεται σημαντικά . Γενικά αποκτούν γρήγορα χαρακτήρες μακροφάγων . (Schumann και συν., 1989) .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Τα περιτοναϊκά μακροφάγα των επίμυων έχουν μελετηθεί αναλυτικά ως προς την δομή τους στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο . Αυτό οφείλεται : α) στην αναγνώριση της μεγάλης σημασίας τους για την ανοσοφυσιολογία του οργανισμού , β) στην ευκολία απομόνωσής τους σε μεγάλο αριθμό και γ) στην δυνατότητα διατήρησής τους σε κυτταροκαλλιέργεια . (Cohn και Benson, 1965, Cohn και συν., 1966a , Cohn και συν., 1966b , Cohn και συν., 1966c , Carr και Carr, 1970 , Brederoo και Daems, 1972 , Daems και Brederoo, 1973) . Το σχήμα των περιτοναϊκών μακροφάγων περιγράφεται συνήθως ως ακανόνιστο πολυγωνικό ή αστεροειδές ή τέλος ως σχήμα «τηγανητού αυγού» . Αυτό όμως αφορά εκείνες τις περιπτώσεις όπου τα μακροφάγα μονιμοποιήθηκαν in situ στους ιστούς ή in vitro στις κυτταροκαλλιέργειες . Εκεί αποπλατύνονται και επιπεδώνονται . Μακροφάγα που μονιμοποιήθηκαν ex vivo (π.χ. απευθείας στο εναιώρημα του περιτοναϊκού εκπλύματος) έχουν σχήμα σφαιρικό .

1. ΠΥΡΗΝΑΣ : Ο πυρήνας των περιτοναϊκών μακροφάγων συνήθως είναι στρογγυλός με μια βαθειά εντομή ή έχει σχήμα νεφροειδές ή πεταλοειδές . Μερικές φορές είναι τέτοιο το σχήμα του ώστε ο πυρήνας μοιάζει «αναδιπλωμένος» . Η θέση του στο κυτταρόπλασμα είναι ελαφρώς έκκεντρη , ενώ μπορεί να περιέχει μέχρι και δύο πυρήνια . Κάπως σπανιότερα στον πυρήνα των περιτοναϊκών μακροφάγων έχουν παρατηρηθεί και «σφαιρίδια» (sphaeridia) , «πυρηνικά σωμάτια» (nuclear bodies) , «πυρηνικές γέφυρες» (nuclear bridges) και «πυρηνικές φυσαλίδες» (nuclear blebs) (Daems και Bredereo, 1973) . Το πυρηνικό περίβλημα είναι διάτρητο από πολλούς πυρηνικούς πόρους .

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ : Το κυτταρόπλασμα των περιτοναϊκών μακροφάγων διαθέτει μέτρια ποσότητα Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου . Αυτό συνήθως διατάσσεται στην περιφέρεια του κυτάρου . Συγκεκριμένα , το Κ.Ε.Δ. εντοπίζεται στην ζώνη κάτω από την κυτταρική μεμβράνη , εκεί όπου δεν υπάρχουν άλλα οργανίδια εκτός από άφθονα μικρονημάτια . Έχει την μορφή παράλληλων επιμηκών δεξαμενών που επικοινωνούν . Αν και τα περισσότερα ριβοσώματα είναι καθλωμένα στις μεμβράνες του Κ.Ε.Δ. υπάρχουν επίσης και μικρές συσσωρεύσεις από ελεύθερα ριβοσώματα . Επίσης διακρίνονται πολλά μικροπινοκυττωτικά κυστίδια με ανώμαλο περίγραμμα (bristle-coated vesicles) με διάμετρο 1000 Å . Τέλος έχουν παρατηρηθεί στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων αυτών δεμάτια μικρονηματίων με πάχος 130 Å , τα οποία και σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο στην περιοχή μεταξύ του πυρήνα και του Κ.Ε.Δ. . Μέσα σε αυτό το δίκτυο των μικροϊνιδίων δεν υπάρχουν άλλα οργανίδια .

2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ : Η κυτταρική μεμβράνη των περιτοναϊκών μακροφάγων έχει δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά : α. είναι εξαιρετικά ανώμαλη και β. διαθέτει πολυάριθμα βοθρία (lacunae) , μικρολάχνες ποικίλου μεγέθους και λεπτές δακτυλοειδείς προεκβολές . Αυτές οι προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης είναι πιο εμφανείς στα άωρα περιτοναϊκά μακροφάγα και χαρακτηρίζονται από την έλλειψη των κυτταροπλασματικών οργανιδίων στο εσωτερικό τους . Ένας ακόμα ιδιαίτερος χαρακτήρας της επιφάνειας των περιτοναϊκών μακροφάγων είναι οι «βρογχοειδείς σχηματισμοί» (loop-like structures) που εμφανίζονται εκεί που έρχονται σε επαφή δύο παρακείμενα μακροφάγα . Οι σχηματισμοί αυτοί αφορίζονται από δύο κυτταρικές μεμβράνες , ανάμεσα στις οποίες παραμένει σταθερή απόσταση 400 Å , ακριβώς στην μέση της οποίας παρατηρείται μια ηλεκτρονιοσκοπική γραμμή . Μελέτες με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης έδειξαν ότι όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα προσκολλώνται σε υάλινες επιφάνειες γίνονται επίπεδα και αναπτύσσουν στην επιφάνειά τους πολυάριθμες ανωμαλίες , όπως π.χ. λεπτές δακτυλοειδείς προεκβολές , αβαθείς αύλακες και λεπτά «πέπλα» (veils) κυτταροπλάσματος (Carr και Carr, 1970) . Χρησιμοποιώντας κάποιες ειδικές τεχνικές μονιμοποίησης και υψηλές μεγεθύνσεις διαπιστώθηκε ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα διαθέτουν στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης τους και ορισμένα άλλα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Bredereo και Daems, 1972) . Συγκεκριμένα , στην μεμβράνη των περιτοναϊκών μακροφάγων έχουν παρατηρηθεί σχηματισμοί που ονομάζονται Λαβύρινθοι (Labyrinths) , οι οποίοι αποτελούν λοβώδη συμπλέγματα από πόρους οι οποίοι διακλαδίζονται και αλληλοσυνδέονται , δημιουργώντας ένα πολύπλοκο δίκτυο . Οι πόροι των Λαβυρίθων επενδύονται από κυτταρική μεμβράνη , ενώ οι αυλοί τους συνεχονται μερικές φορές με τον εξωκυττάριο χώρο και άλλοτε με ανεξάρτητα συστήματα πόρων . Αυτοί οι δαιδαλώδεις εγκολεασμοί της επιφάνειας του κυτάρου έχουν κάποια λειτουργική σύνδεση με το εσωτερικό του κυτάρου , ίσως με το Ενδοπλασματικό Δίκτυο αφού

εμφανίζουν ιστοχημική δραστηριότητα Υπεροξειδάσης . Λαβύρινθοι εμφανίζονται μόνο στα κύτταρα που είναι σε κατάσταση ηρεμίας και ουδέποτε στα ενεργοποιημένα μακροφάγα . Αντιθέτως , δύο άλλοι σχηματισμοί που εμφανίζονται στα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα , το Κυτταρικό Επένδυμα και οι Ελμινθοειδείς Δομές , είναι σπάνια στα φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα .

4. ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ : Τα λυσοσώματα των περιτοναϊκών μακροφάγων που έχουν διατηρηθεί σε κυτταροκαλλιέργεια για διάστημα 24 ωρών παρουσιάζουν μερικά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά . Γενικά το λυσοσωματικό σύστημα των μακροφάγων αποτελείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο κυστιδίων και σωλήνων . Μέσα στο κυτταρόπλασμα διακρίνονται πολλά διαφορετικά είδη κυστιδίων , τα οποία αποτελούν λυσοσώματα , φαγοσώματα και ενδοσώματα , ειδικότερα πινοσώματα . Τα φαγοσώματα και τα ενδοσώματα εντοπίζονται κοντά στην περιφέρεια του κυτάρου . Τα λυσοσώματα διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή λυσοσώματα , από τα οποία τα πρωτογενή λυσοσώματα συνήθως βρίσκονται στο κέντρο του κυτάρου , κοντά στην συσκευή Golgi και στον πυρήνα . Η εμφάνιση των λυσοσωμάτων αυτών είναι συνήθως χαρακτηριστική , με ομοιόμορφη πυκνοχρωματική χρώση του περιεχομένου τους η οποία δικαιολογεί την ονομασία «Πυκνά Κοκκία» . Το μέγεθος και ο αριθμός των λυσοσωμάτων , φαγοσωμάτων και άλλων συγγενών οργανιδίων μεταβάλλεται , ανάλογα με την φαγοκυτταρική δραστηριότητα του περιτοναϊκού μακροφάγου . Στις περιπτώσεις εκείνες που τα λυσοσώματα είναι αραιοχρωματικά ή ανομοιογενή , συνήθως έχει προηγηθεί έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Σε μακροφάγα που προέρχονται απευθείας από την περιτοναϊκή κοιλότητα (χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια) επικρατούν τα πυκνά (electron-dense) λυσοσώματα έναντι των κυστιδίων . Τα κοκκία αυτά ποικίλουν σε μέγεθος και σε πυκνότητα και συσσωρεύονται γύρω από την συσκευή Golgi . Τα περισσότερα από αυτά τα πυκνά λυσοσώματα έχουν μάλλον ομοιογενή θεμέλια ουσία . Ορισμένα άλλα λυσοσώματα έχουν πολυκυστιδιακή δομή . Τέλος στο κυτταρόπλασμα εντοπίζονται και πολυάριθμα μικρά πινοκυττωτικά κυστίδια και μικρά πυκνά κοκκία .

Στα περιτοναϊκά μακροφάγα επίσης υπάρχει ανεπτυγμένο ένα σωληνοδίκτυωτό σύστημα λυσοσωμάτων (tubuloreticular lysosomal network ή prelysosomal compartment) , το οποίο αποτελείται από σωληνοειδείς σχηματισμούς που διακλαδίζονται και αναστομώνονται μεταξύ τους . Αντιστοιχούν στο τελικό στάδιο της διαδικασίας ενδοκύττωσης , δηλαδή το αμέσως προηγούμενο στάδιο πριν από την είσοδο των φαγοκυττωμένων και ενδοκυττωμένων σωματιδίων στα τελικά πυκνά λυσοσώματα , όπου θα συμπληρωθεί η πέψη τους (Rabinowitz και συν., 1992) .

5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ - ΣΥΣΚΕΥΗ GOLGI : Τα περιτοναϊκά μακροφάγα διαθέτουν ένα μέτριο αριθμό μιτοχονδρίων και μια σχετικά μικρή συσκευή Golgi . Τα μιτοχόνδρια των περιτοναϊκών μακροφάγων είναι σφαιρικά ή σαν βραχείες ράβδοι και το μέγεθός τους είναι πολύ μικρό (διάμετρος μέχρι 0.3 μm) . Είναι διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα χωρίς κάποια συγκεκριμένη κατανομή , αν και είναι λίγο περισσότερα από την ίδια πλευρά του πυρήνα που ευρίσκεται και το Κ.Ε.Δ. Αντιθέτως η συσκευή Golgi εντοπίζεται πάντα στην πλευρά της εντομής του πυρήνα και αρκετά κοντά σε αυτόν . Σε ένα μακροφάγο είναι δυνατό να παρατηρηθούν πολλές συσκευές Golgi τοποθετημένες ακτινωτά γύρω από τα κεντριόλια . Η συσκευή αυτή αποτελείται από μια άθροιση ολιγάριθμων επιμηκών δεξαμενών , τοποθετημένων παράλληλα . Από τις άκρες των δεξαμενών αυτών φαίνονται να εκβλαστάνουν και να αποχωρίζονται πολυάριθμα κυστίδια με λείο και ομαλό τοίχωμα . Τα κυστίδια αυτά προέρχονται από τις μεμβράνες της συσκευής Golgi και παρατηρούνται και στις δύο επιφάνειές της . Γύρω από τις

δεξαμενές και τα κυστίδια της συσκευής Golgi συχνά ανευρίσκονται πολλοί μικροσωληνίσκοι . Οι δεξαμενές του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου δεν φαίνονται να επικοινωνούν με αυτές της συσκευής Golgi .

Όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα παραμείνουν σε κυτταροκαλλιέργεια , διαφοροποιούνται και μεταβάλλεται η μορφολογία τους (Cohn και συν., 1966c) . Έτσι , ανάλογα με την περιεκτικότητα του καλλιεργητικού υγρού σε ορό (fetal calf serum) , παρουσιάζεται μικρή ή μεγάλη αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των λυσοσωμάτων , των πινοκυττωτικών κυστιδίων , των κυστιδίων της συσκευής Golgi (όχι όμως των δεξαμενών της) , των κενοτοπίων και τέλος των μιτοχονδρίων .

ΗΠΑΤΙΚΑ (KURFFER) ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Τα κύτταρα Kurffer έχουν μελετηθεί με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (S.E.M.) και έχει διαπιστωθεί η διαφορετική μορφολογία της επιφάνειάς τους σε σχέση με εκείνη των ενδοθηλιακών κυττάρων (Motta, 1975) . Συγκεκριμένα τα κύτταρα Kurffer στερούνται «πόρων» και «θυρίδων» και έτσι δεν έχουν την διάτρητη εικόνα (sieve plate) των ενδοθηλιακών κυττάρων . Το σχήμα τους είναι αστεροειδές με πολλαπλές λεπτές προεκβολές της επιφάνειάς τους , η οποία γίνεται έτσι σχετικά ανώμαλη . Όμως συχνά διακρίνουμε και πιο πολύπλοκες δομές στην επιφάνειά τους , όπως οι Ελμινθοειδείς Δομές (Worm-like Structures) στην επιφάνεια του κυττάρου προς τον αυλό των κολποειδών . Αυτές οι Ελμινθοειδείς Δομές αποτελούν έναν μικρολαβύρινθο ο οποίος δημιουργείται από τις πολυάριθμες βραχείες μικρολάχνες , εισολκές , εκκολπώσεις και πτυχώσεις της επιφάνειας του κυττάρου Kurffer . Έτσι τα ηπατικά μακροφάγα αποκτούν πολύ μεγάλη επιφάνεια στην κυτταρική τους μεμβράνη . Τα υπόλοιπα στοιχεία της δομής των κυττάρων Kurffer δεν διαφέρουν σημαντικά από την δομή των υπόλοιπων μακροφάγων . Ο πυρήνας τους είναι νεφροειδής , τοποθετημένος έκκεντρα και περιέχει ένα πυρήνιο . Η κυτταρική μεμβράνη τους έχει πολλαπλές προεκβολές καθώς και ψευδοπόδια . Διαθέτουν άφθονα κυστίδια , κενοτόπια , λυσοσώματα , μιτοχόνδρια και Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο . (Melly και συν., 1972 , Smedsrod και συν., 1985 , Burf και συν., 1993) .

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν ακανόνιστο πολυγωνικό ή στρογγυλό ή επίμηκες σχήμα και διάμετρο 15-50 μm . Ο πυρήνας τους είναι πολύμορφος , καταλαμβάνει περίπου το 25% του κυτταροπλάσματος και είναι τοποθετημένος έκκεντρα . Συνήθως περιέχει ένα εμφανές πυρήνιο . Η συσκευή Golgi είναι καλά αναπτυγμένη . Τα μιτοχόνδριά τους είναι σχετικώς λίγα , όπως επίσης τα ελεύθερα ριβοσώματα και τα κοκκία γλυκογόνου . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν μέτρια ποσότητα Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου και πολύ περιορισμένο Άκοκκο Ενδοπλασματικό Δίκτυο . Αντιθέτως , μέσα στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται άφθονα λυσοσώματα , φαγοσώματα και κυτταροπλασματικά έγκλειστα , με πυκνή θεμέλια ουσία και διάμετρο μέχρι 0.5 μm . Μέσα στα κυτταροπλασματικά έγκλειστα παρατηρούνται μεμβρανικές δομές , εικόνες μυελίνης και βελονοειδείς σχηματισμοί . Η κυτταρική μεμβράνη των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων παρουσιάζει ιδιαίτερα έντονη πτύχωση και πολλά ψευδοπόδια . (Hocking και Golde, 1979 , Stevens και Lowe, 1993 , Lewis και McGee, 1994) .



ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ .

Τα μακροφάγα του συνδετικού ιστού χαρακτηρίζονται από την διαφορετική μορφολογία του ίδιου του κυττάρου (σχήμα αστεροειδές ή ατρακτοειδές) και του πυρήνα τους (μικρός και ατρακτοειδής πυρήνας με πυκνή χρωματίνη) . Κοντά στον πυρήνα του βρίσκεται το Κυτόκεντρο (Cytocentrum) , το οποίο περιέχει το ζεύγος των κάθετων κεντριολίων . Κοντά στον πυρήνα παρατηρείται επίσης η συσκευή Golgi . Τα μιτοχόνδρια των μακροφάγων του συνδετικού ιστού είναι μικρά σε μήκος και συνήθως διατάσσονται σε πυκνούς σχηματισμούς γύρω από την περιφέρεια του Κυτόκεντρου . Το κυτταρόπλασμα των μακροφάγων αυτών είναι εξαιρετικά ανομοιογενές εξαιτίας της πληθώρας των λυσοσωματικών κοκκίων και κυστιδίων του . (Bloom και Fawcett, 1975) .

ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μονοπύρνα φαγοκύτταρα με ειδική μορφολογία . Το κυτταρικό σώμα είναι πολύ μικρό και από αυτό εκβλαστάνουν ακτινωτά πολλές αποφυάδες που καταλήγουν σε λεπτές διακλαδώσεις . Αυτές επικαλύπτονται από πολλές μικροσκοπικές προεξοχές , δίνοντας μια εικόνα ψηκτροειδή στις αποφυάδες . Ο πυρήνας τους είναι επίσης πολύ μικρός , με σχήμα ωοειδές ή ατρακτοειδές και ενίοτε με εντομή . Εντοπίζεται κεντρικά στο κυτταρόπλασμα και η χρωματίνη του διατάσσεται σε αδρά συσσωματώματα κάτω από την πυρηνική μεμβράνη . Η συσκευή Golgi είναι τοποθετημένη στον ένα πόλο του πυρήνα . Το Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο έχει την μορφή λεπτών και επιμήκων δεξαμενών . Επίσης στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται λυσοσωματικά πυκνά κοκκία , σταγονίδια λίπους και κοκκία λιποφουσκίνης . Τέλος , ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι η μεγάλη πτύχωση της κυτταρικής τους μεμβράνης , η οποία τους προσδίδει πολύ μεγάλη επιφάνεια για επαφή με άλλα κύτταρα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα . Η επιφάνειά τους είναι περίπου διπλάσια ως τριπλάσια από το δεύτερο σε επιφάνεια μονοπύρνο φαγοκύτταρο , δηλαδή το κύτταρο Kupffer . (Perry και Gordon, 1991) .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΤΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ .

Τα μακροφάγα του τοιχώματος του εντέρου παρουσιάζουν πολύ σημαντικές μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους ανάλογα με την ανατομική τους εντόπιση . Έτσι τα μακροφάγα του ορογόνου χιτώνα είναι ατρακτοειδή , με μήκος 50-90 μm και πλάτος 5-20 μm , ενώ διαθέτουν 3-5 επιμήκεις και λεπτές αποφυάδες , παράλληλες με τον άξονα του κυττάρου , οι οποίες διχάζονται . Ο πυρήνας τους είναι ωοειδής , πυκνός και διαθέτει αβαθή εντομή . Παρατηρούνται πολλά λυσοσώματα και διάφορα κυστίδια . Τα μακροφάγα του πλέγματος του Auerbach είναι πιο λεπτά , με μήκος 40-90 μm και πλάτος 5-15 μm , ενώ διαθέτουν 4-6 μεγάλες αποφυάδες που φέρονται ακτινωτά και δίνουν στο κύτταρο αστεροειδή εμφάνιση . Ο πυρήνας τους είναι ωοειδής , πυκνός και διαθέτει βαθιά εντομή . Διαθέτουν λίγα λυσοσώματα και κυστίδια . Και τα δύο προαναφερθέντα είδη μακροφάγων έχουν λίγα και μικρά μιτοχόνδρια , ελάχιστο Άκοκκο Ενδοπλασματικό Δίκτυο , λίγο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και πολλά βοθρία στην κυτταρική τους μεμβράνη . (Mikkelsen, 1995)

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΤΩΝ ΚΟΛΠΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ .

Στα κολποειδή των επινεφριδίων παρατηρούμε τρεις χαρακτηριστικούς τύπους μονοπύρνων φαγοκυττάρων . Ο πρώτος τύπος αποτελείται από μικρά κύτταρα με ασθενή φαγοκυτταρική δράση .



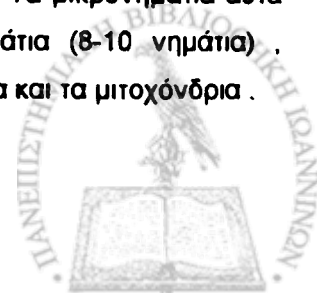
Διαθέτουν στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα που φέρει μικρή εντομή και κροκυδωμένη χρωματίνη με μικρή τάση διάταξης στην περιφέρεια του πυρήνα . Στο λιγοστό κυτταρόπλασμα τους διακρίνονται ελάχιστες διάσπαρτες δεξαμενές του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου , λίγα μιτοχόνδρια και μία συσκευή Golgi με ατελή ανάπτυξη . Ο δεύτερος τύπος αποτελείται από μεγάλα κύτταρα που παρουσιάζουν έντονη φαγοκυτταρική δράση . Ο πυρήνας τους είναι νεφροειδής ή ωοειδής με πολύ βαθιά εντομή και διαθέτει λεπτά νημάτια χρωματίνης που συνήθως συσσωρεύονται στην περιφέρεια του πυρήνα . Το κυτταρόπλασμα είναι άφθονο και περιέχει μια καλά αναπτυγμένη συσκευή Golgi τοποθετημένη κοντά στην εντομή του πυρήνα και πολυάριθμα λυσοσωματικά κοκκία και κυστίδια . Τέλος , ο τρίτος τύπος κυττάρων αποτελείται από μεγάλα κύτταρα με έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Ο πυρήνας τους είναι στρογγυλός ή ωοειδής . Το κυτταρόπλασμα τους περιέχει άφθονα λυσοσώματα , ενδοσώματα και υπολειμματικά σωμάτια ποικίλου μεγέθους . Επίσης παρατηρούνται πολυάριθμα μιτοχόνδρια , πολλαπλές δεξαμενές του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου και μια καλά αναπτυγμένη συσκευή Golgi . (Surleff και Papadimitriou, 1981) .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΠΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ IN VITRO ΑΠΟ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα ώριμα μακροφάγα που διαφοροποιήθηκαν in vitro (από μονοκύτταρα που διατηρήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια) ή με υποδόρια εμφύτευση ειδικών πλαστικών υποστρωμάτων , παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία μεταβάλλονται ανάλογα με την διάρκεια της παραμονής τους στην κυτταροκαλλιέργεια ή τον χρόνο εμφύτευσης του πλαστικού τεμαχίου . (Cohn και Benson, 1964 , Sutton και Weiss, 1966 , Van der Rhee και συν., 1979a-1979b-1979c) .

1. ΠΥΡΗΝΑΣ : Ο πυρήνας έχει σχήμα νεφροειδές ή πεταλοειδές . Αρχικά η χρωματίνη των μακροφάγων παρουσιάζει μεγάλα και αδρά συσσωματώματα , ενώ είναι χαρακτηριστικά διαταγμένη στην περιφέρεια του πυρήνα (margination) . Τα πυρήνια είναι ευκρινώς ορατά . Προοδευτικά ο δακτύλιος της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα λεπταίνει . Αν τα μακροφάγα διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργεια ακόμα 72 ώρες , η χρωματίνη δεν σχηματίζει πλέον συσσωματώματα και η όψη της γίνεται λεπτοκοκκιώδης , με ομοιόμορφη και ομοιογενή κατανομή μέσα στον πυρήνα . Τα πυρήνια γίνονται ιδιαίτερα ευδιάκριτα .

2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ : Στο κυτταρόπλασμα παρατηρείται προοδευτική αύξηση του αριθμού των φαγοσωμάτων και των πινοκυττωτικών κυστιδίων , καθώς επίσης και λυσοσώματα του τύπου των υπολειμματικών σωμάτων (residual bodies) . Επίσης εμφανίζονται και λίγα μικροπινοκυττωτικά κυστίδια με οδοντωτό περίγραμμα (bristle-coated vesicles) . Το μέγεθος της συσκευής Golgi δεν αλλάζει , μεταβάλλεται όμως το σχήμα της . Το Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο προσλαμβάνει δύο διαφορετικές μορφές , είτε (α) των μακρών και παράλληλων αποπλατυσμένων δεξαμενών ή (β) των συρρεόντων κυστιδίων τα οποία έχουν διάφορα μεγέθη και αραιοχρωματικό περιεχόμενο . Επίσης παρατηρείται αύξηση του αριθμού και μεγέθους των ψευδοποδίων καθώς και αύξηση του αριθμού των πυκνών κυπελλοειδών εισολκών (dense cuplike indentations - caveolae) της κυτταρικής μεμβράνης . Τέλος αυξάνει σημαντικά ο αριθμός των μικρονηματίων στο κυτταρόπλασμα . Τα μικρονημάτια αυτά είναι μονήρη ή φέρονται σε παράλληλες δεσμίδες (3-4 νημάτια) και δεμάτια (8-10 νημάτια) , ακτινοβολώντας ως την κυτταρική μεμβράνη και περιβάλλοντας τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια .



3. ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ : Τα λυσοσώματα αυξάνουν σε αριθμό και μειώνονται σε μέγεθος . Υπάρχουν λυσοσώματα διασκορπισμένα σε όλο το κυτταρόπλασμα , αλλά τα μικρότερα και πυκνότερα (Dense Granules) εντοπίζονται κυρίως στο κέντρο του κυτάρου . Επίσης παρατηρείται μια ειδική μορφή λυσοσωματικού κοκκίου , το οποίο ονομάστηκε από τον Carr (1968) «κοκκίο μακροφάγου» ή «ιστιοκυτταρικό κοκκίο» (macrophage granule) . Το ιστιοκυτταρικό κοκκίο έχει διάμετρο 280 nm και σφαιρικό σχήμα . Το περιεχόμενό του δεν είναι ιδιαίτερα πυκνοχρωματικό και περιβάλλεται από μια διαυγαστική άλω . Ειδικά σε ότι αφορά τα μακροφάγα που διαφοροποιούνται in vitro από πρόδρομες μορφές του μυελού των οστών , η μορφή του λυσοσωματικού τους συστήματος εξαρτάται από τις ειδικές συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας . Αν η ανάπτυξή τους γίνει σε απλό καλλιεργητικό υγρό (κρυσταλλοειδές διάλυμα) τα λυσοσώματά τους είναι κυλινδρικά και δημιουργούν έναν σύστημα από σωληνοειδείς σχηματισμούς που αναστομώνονται και διακλαδίζονται (Knapp και Swanson, 1990) . Αν όμως υπάρχουν και ωσμωτικά δραστικές ουσίες (όπως π.χ. πρωτεΐνες από εμβρυϊκό ορό μόσχου ή σουκρόζη) τα λυσοσώματα γίνονται σφαιρικά και μόλις επιτελεσθεί η πέψη και αποδόμηση των ουσιών επαναδημιουργείται το αρχικό δίκτυο σωληνοειδών σχηματισμών .

4. ΚΥΤΟΚΕΝΤΡΟ : Το Κυτόκεντρο , δηλαδή η περιοχή που βρίσκεται κοντά στον ένα πόλο του πυρήνα και στην οποία υπάρχουν τα δύο κεντριόλια του κυτάρου , αυξάνει συνεχώς σε μέγεθος και σε περιεκτικότητα κυστιδίων , τα οποία αναστομώνονται και δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο . Επίσης εμφανίζονται προοδευτικά πολυάριθμες αναστομώσεις μεταξύ της συσκευής Golgi και του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου . Και η συσκευή Golgi αποκτά διαφορετική μορφολογία , αφού οι δεξαμενές της γίνονται πολύ αποπλάτυσμένες και διατάσσονται ακτινωτά γύρω από τα κεντριόλια .

ΩΨΙΜΕΣ ΜΟΡΦΕΣ : ΕΠΙΘΗΛΙΟΕΙΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΓΙΓΑΝΤΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα Επιθηλιοειδή κύτταρα και τα Γιγαντοκύτταρα αναπτύσσονται όχι μόνο σε φλεγμονώδεις εστίες (κοκκιώματα) αλλά και ως όψιμο εξελικτικό στάδιο των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων τα οποία διατηρούνται σε κυτταροκαλλιέργεια .

Τα Επιθηλιοειδή κύτταρα είναι μεγάλα , πολυγωνικά και εφάπτονται μεταξύ τους ώστε να δίνουν την εντύπωση καλυπτικού επιθηλίου . Τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους είναι τα ακόλουθα (Sutton και Weiss, 1966 , Van der Rhee και συν., 1979a) .

1. ΠΥΡΗΝΑΣ : Η χρωματίνη είναι λεπτοκοκκιώδης και ομοιόμορφα κατανεμημένη σε όλο το πυρηνόπλασμα . Τα πυρήνια είναι ευδιάκριτα και υπάρχουν πολυάριθμοι Πυρηνικοί Πόροι .

2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ : Το κυτταρόπλασμα περιέχει πληθώρα οργανιδίων και κυρίως ευμεγέθη κενοτόπια με ομοιόμορφη κατανομή στην περιφέρεια του κυτάρου και διαυγές «υγρό» περιεχόμενο . Μέσα σε αυτά τα μεγάλα κενοτόπια εναιωρείται κατακερματισμένο στερεό υλικό , που πιθανώς αποτελεί υπόλειμμα φαγοκυτταρικής δραστηριότητας . Εκτός από τα κενοτόπια υπάρχουν και πολυάριθμα επιμήκη μιτοχόνδρια (μήκος 2.0 μm ή μεγαλύτερα) με πυκνή θεμέλια ουσία , δεξαμενές Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου διασκορπισμένες στο κυτταρόπλασμα , ελεύθερα ριβοσώματα και πολυριβοσώματα . Πολύ μεγάλο μέγεθος καταλαμβάνει και η συσκευή Golgi , με αύξηση τόσο των δεξαμενών όσο και των κοκκίων . Κοντά στην συσκευή εντοπίζονται και κυστίδια με λείο τοίχωμα και κοκκιώδη πυρήνα στο εσωτερικό τους . Τα μιτοχόνδρια των Επιθηλιοειδών Κυττάρων είναι λεπτά και επιμήκη . Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος διασχίζεται από μικρονημάτια διαμέτρου 50-60

A^o, είτε μονήρη ή σε δεσμίδες. Τα περισσότερα δεμάτια φέρονται ακτινωτά προς την περιφέρεια του κυτάρου, εκτός από ένα δακτυλοειδές δεμάτιο που αποτελείται από μικρονημάτια πάχους 100 A^o και περιβάλλει το Κυτόκεντρο. Η κυτταρική μεμβράνη είναι ανώμαλη και χαρακτηρίζεται από την αφθονία των ψευδοποδίων και των Πυκνών Κυπελλοειδών Εισολκών (caveolae). Σε ότι αφορά τα ψευδοπόδια των Επιθηλιοειδών Κυττάρων έχουν ποικίλη μορφολογία, που κυμαίνεται από λεπτές και επιμήκεις προεξοχές της κυτταρικής μεμβράνης μέχρι βραχύτατες προεξοχές με ανώμαλο σχήμα που περιέχουν μεγάλο αριθμό μικροκυστιδίων. Οι Πυκνές Κυπελλοειδείς Εισολκές σε μεγάλη μεγέθυνση φαίνεται να αποτελούν λυσοσώματα τα οποία έχουν συντηχθεί με την κυτταρική μεμβράνη και έχουν εξωκυτταρώσει το περιεχόμενό τους στον μεσοκυττάριο χώρο. Τέλος, στις περιοχές όπου τα Επιθηλιοειδή Κύτταρα έρχονται σε επαφή μεταξύ τους παρατηρούνται πολυάριθμες λεπτές δακτυλοειδείς προεκβολές μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών τους.

3. ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ: Τα επιθηλιοειδή κύτταρα χαρακτηρίζονται από τα πολυάριθμα λυσοσώματά τους, που έχουν διάφορα μεγέθη και σχήματα. Διακρίνονται τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά είδη λυσοσωμάτων: α) Ομοιογενή κοκκία με ποικίλη διάμετρο και πυκνότητα, β) Κοκκία ποικίλης διαμέτρου και πυκνότητας, τα οποία περιέχουν τυχαία ή ομοκεντρικά διατεταγμένες μεμβράνες, γ) Πολυκυστιδιακά σωμάτια (multivesicular bodies) ποικίλης διαμέτρου, δ) Μεγάλα κρυσταλλοειδή έγκλειστα. Εκτός από τα άφθονα λυσοσώματα υπάρχουν επίσης τα τεράστια κενοτόπια που συνήθως αποτελούν τα Υπολειμματικά Σωμάτια, τα οποία παραμένουν μετά το πέρας της φαγοκυτταρικής διαδικασίας. Τα Επιθηλιοειδή Κύτταρα στερούνται δευτερογενών λυσοσωμάτων και ιστοκυτταρικών κοκκίων. Αυτά αντικαθίστανται από άλλα σφαιρικά ή ωοειδή κοκκία, με διάμετρο 340 nm και λεπτοκοκκιώδες περιεχόμενο, που περιβάλλονται από πολύ λεπτή διαυγαστική άλω.

Τα Γιγαντοκύτταρα είναι μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας σχετικά τεράστιας μάζας κυτταροπλάσματος που περιέχει μέχρι και 100 πυρήνες. Το σχήμα τους είναι συνήθως ωοειδές. Χωρίζονται σε Γιγαντοκύτταρα τύπου Langhans (με 5 ως 15 πυρήνες, τοποθετημένους στην περιφέρεια του κυτάρου σε μηνοειδή ή δακτυλοειδή διάταξη) και σε Γιγαντοκύτταρα τύπου Ξένου Σώματος (με 30 ως 60 πυρήνες, τοποθετημένους κεντρικά στο κυτταρόπλασμα). Τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους είναι τα ακόλουθα (Sutton και Weiss, 1966, Van der Rhee και συν., 1979a).

1. ΠΥΡΗΝΑΣ: Ο κάθε πυρήνας έχει σχήμα στρογγυλό ή ωοειδές, αλλά συχνά παρουσιάζονται εντομές ή αναδιπλώσεις σε αυτούς. Συνήθως περιέχει 1-3 ευδιάκριτα πυρήνια και πολυάριθμους ανοικτούς Πυρηνικούς Πόρους. Η χρωματίνη παρουσιάζει έντονη συμπύκνωση σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ η ελάχιστη χρωματίνη που απομένει έχει λεπτοκοκκιώδη υφή και κατανέμεται ομοιόμορφα στον υπόλοιπο πυρήνα.

2. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ: Το κυτταρόπλασμα περιέχει πολυάριθμα οργανίδια, κυρίως μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και κενοτόπια. Το Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε όλο το κυτταρόπλασμα, με την μορφή αποπλατυσμένων δεξαμενών ποικίλου μεγέθους. Το Άκοκκο Ενδοπλασματικό Δίκτυο επίσης κατανέμεται σε όλο το κυτταρόπλασμα, με την μορφή κυστιδίων και μικρών κενοτοπίων. Με δυσκολία εντοπίζονται λίγα μικρονημάτια στο κυτταρόπλασμα, αλλά θα αυξηθεί ο αριθμός τους με την πάροδο των ημερών. Στο κέντρο του γιγαντοκυττάρου παρατηρούνται μερικά ζεύγη κεντριολίων. Κοντά στην περιφέρεια του γιγαντοκυττάρου υπάρχει μια ευρεία ζώνη

εκτοπλάσματος στην οποία δεν υπάρχουν κυτταρικά οργανίδια , αλλά ακριβώς έξω από την ζώνη αυτή η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει πολλά μικρά και κυματοειδή ψευδοπόδια . Διακρίνονται πολλά ελεύθερα ριβοσώματα σε όλο το γιγαντοκύτταρο .

3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ : Τα μιτοχόνδρια είναι πολυάριθμα και έχουν τήν μορφή βραχέων και λεπτών ραβδίων , ενώ σε μερικές περιπτώσεις έχουν νηματοειδή μορφή . Η θεμέλια ουσία τους συνήθως είναι μάλλον πυκνοχρωματική . Με την πάροδο των ημερών τα μιτοχόνδρια αυξάνονται σε αριθμό και αλλάζουν μορφολογία . Ορισμένα γίνονται πιο στρογγυλά ή ωσειδή και ταυτοχρόνως αναπτύσσονται μορφές δακτυλιοειδείς ή γωνιώδεις . Η θεμέλια ουσία τους γίνεται ακόμα πιο πυκνή .

4. ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ : Υπάρχει αφθονία λυσοσωμάτων , ποικίλου μεγέθους και πυκνότητας . Επίσης παρατηρούνται ευμεγέθη διαυγή κενοτόπια . Με την πάροδο των ημερών μειώνεται ο αριθμός και η πολυμορφία των λυσοσωμάτων , με αποτέλεσμα στην πλειοψηφία τους να είναι μικρά Πυκνά Κοκκία . Ταυτοχρόνως ενώ αυξάνονται σε αριθμό τα κυστίδια και τα μικροπιννοκυττωτικά κυστίδια στην βάση των ψευδοποδίων , μειώνονται τα κενοτόπια . Με την πάροδο των ημερών αυξάνεται πάλι ο αριθμός και το μέγεθος των κενοτοπίων , αλλά ο αριθμός τους εξαρτάται από το είδος του γιγαντοκυττάρου (π.χ. τα μεγάλα Γιγαντοκύτταρα τύπου Langhans έχουν λίγα κοκκία , ενώ στα Γιγαντοκύτταρα τύπου Ξένου Σώματος είναι πολυάριθμα και ετερογενή) .

5. ΚΥΤΟΚΕΝΤΡΟ : Ανάλογα με το είδος του γιγαντοκυττάρου το Κυτόκεντρο μπορεί να περιέχει από ένα μέχρι και δώδεκα ζεύγη κεντριολίων (Διπλοσώματα) , πολλούς ή λίγους μικροσωληνίσκους και μια πολύπλοκη συσκευή Golgi με πολυάριθμα κυστίδια, δεξαμενές και κοκκία .

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΟΥ ΣΥΝΟΔΕΥΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

Τόσο η *in vitro* όσο και η *in vivo* ενεργοποίηση των μακροφάγων οδηγεί πάντα στην εμφάνιση ορισμένων χαρακτηριστικών μορφολογικών μεταβολών . Τέτοιες μεταβολές αφορούν κυρίως τρεις παραμέτρους : το μέγεθος του κυττάρου , τον αριθμό των λυσοσωματικών πυκνών κοκκίων στην κεντρόσφαιρα και τέλος τον αριθμό , το σχήμα και το μέγεθος των μιτοχονδρίων . Ωστόσο υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι οι μορφολογικές μεταβολές που συνοδεύουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι στην πραγματικότητα περισσότερες και πιο πολύπλοκες . (Cohn και συν., 1966) .

Τέσσερις ημέρες μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ενδοτοξίνης σε επίμυες , παρατηρείται σημαντική αύξηση του μεγέθους των περιτοναϊκών μακροφάγων , χωρίς όμως ταυτόχρονη σημαντική μεταβολή στο μέγεθος ή το σχήμα του πυρήνα . Η δομή του πυρήνα επίσης διατηρείται σταθερή . Οι περισσότερες μεταβολές που παρατηρούνται αφορούν οργανίδια στην κεντρόσφαιρα του κυττάρου . Επίσης παρατηρείται αύξηση του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου γενικά στην περιφέρεια του μακροφάγου και ειδικότερα στην περιοχή ανάμεσα στον πυρήνα και την πλησιέστερη παρυφή του κυττάρου . Στις περιοχές αυτές όπου παρατηρείται η αύξηση των δεξαμενών του Κοκκιώδους Δικτύου εμφανίζονται επίσης πολυάριθμα σταγονίδια λίπους . Η κεντρόσφαιρα του μακροφάγου είναι αρκετά μεγαλύτερη και περιέχει πολυάριθμα πυκνά κοκκία που αφορίζονται σαφώς από μεμβράνη και τα οποία είναι σαφώς μεγαλύτερα από τα κοκκία των μη-ενεργοποιημένων μακροφάγων . Εκτός από την αύξηση του αριθμού τους (τρεις ως δέκα φορές) και του μεγέθους τους , τα κοκκία εμφανίζουν επίσης μεγάλη ποικιλία στην πυκνότητά τους και στην δομή τους : με χρώση οσμίου διαπιστώνεται ότι άλλα κοκκία έχουν ομοιογενή θεμέλια ουσία ενώ άλλα περιέχουν κυστιδικές δομές . Η συσκευή Golgi

παρουσιάζει σημαντική αύξηση του μεγέθους της και της πολυπλοκότητάς της . Πιο συγκεκριμένα η συσκευή αποτελείται τώρα από πολλές στοιβές παράλληλων δεξαμενών , συνήθως οκτώ ή εννέα . Γύρω από τις δεξαμενές υπάρχουν πολλά αραιοχρωματικά κυστίδια . Τέλος υπάρχουν σημαντικές μεταβολές και στα μιτοχόνδρια , που αφορούν τον αριθμό τους και πιθανώς και το μήκος τους .

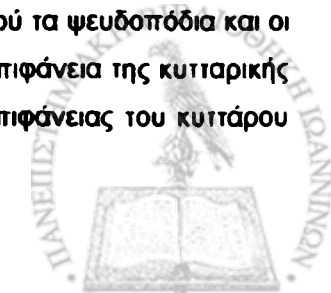
Κατά την δεκαετία του 1970-1980 οι Williams και Mayhew εκτίμησαν και εξέφρασαν ποσοτικά τις μορφολογικές μεταβολές της διέγερσης και ενεργοποίησης των μακροφάγων , χρησιμοποιώντας τεχνικές μορφομετρικής ανάλυσης σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας . Σε μία μελέτη της *in vivo* ενεργοποίησης των περιτοναϊκών μακροφάγων με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση γαλακτώματος τριολείνης στα πειραματόζωα , διαπιστώθηκαν οι παρακάτω μεταβολές της λεπτής δομής των μακροφάγων (Williams και Mayhew , 1973) :

1. Αύξηση του μέσου μεγέθους των κυττάρων . Παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση τόσο της μέσης κυτταρικής διαμέτρου όσο και της μέσης κυτταρικής επιφάνειας .
2. Αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λυσοσωματικών κοκκίων .
3. Αύξηση του λόγου (πηλίκου) όγκου κυττάρου προς επιφάνεια κυττάρου (V_c/S_c) , δηλαδή τάση του μακροφάγου να γίνει πιο σφαιρικό . Αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση του όγκου του κυττάρου .
4. Μείωση του λόγου (πηλίκου) όγκου πυρήνα προς επιφάνεια πυρήνα (V_n/S_n) , δηλαδή ο πυρήνας αποκτά πιο ανώμαλο σχήμα . Αυτό οφείλεται στην πολύ μεγάλη αύξηση της επιφάνειας και της πτύχωσης της πυρηνικής μεμβράνης που υπερκαλύπτει την αύξηση του όγκου του πυρήνα .
5. Διατήρηση σταθερού του λόγου (πηλίκου) όγκων πυρήνα προς κυτταροπλάσματος (V_n/V_c) . Αυτό οφείλεται στην ταυτόχρονη μεταβολή και των δύο παραμέτρων , δηλαδή στην παράλληλη αύξηση των όγκων του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα .

Σε μία άλλη μελέτη των μορφολογικών μεταβολών που συνοδεύουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων , οι Williams και Mayhew εκτίμησαν μορφομετρικά την επίδραση του Freund's Complete Adjuvant (εκχύλισμα *Mycobacterium butyricum*) στην ενεργοποίηση των μακροφάγων (Mayhew και Williams, 1974a , Mayhew και Williams, 1974b) . Διαπιστώθηκε ότι τα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα παρουσίαζαν σημαντική αύξηση της διαμέτρου τους και του όγκου τους , ενώ παράλληλα εμφανίζεται και ένας πληθυσμός μικρών μακροφάγων , ο οποίος αποτελείται από μονοκύτταρα που μετανάστευσαν πρόσφατα στην περιτοναϊκή κοιλότητα και άρχισαν να διαφοροποιούνται . Επίσης οι συγγραφείς επισήμαναν ότι :

1. Το μέγεθος του πυρήνα παρουσιάζει μια μικρή αύξηση , η οποία συμβαδίζει με την αύξηση του όγκου του κυτταροπλάσματος . Έτσι τελικά το πηλίκο των όγκων πυρήνα / κυτταροπλάσματος παραμένει σταθερό ($V_n/V_c = 1/3$) . Δηλαδή , ο πυρήνας του περιτοναϊκού μακροφάγου καταλαμβάνει σταθερά το 24-25% του συνολικού όγκου του μακροφάγου . Όμως ταυτόχρονα εμφανίζεται μείωση της επιφάνειάς του πυρήνα κατά 20% . Έτσι τείνει να γίνει σφαιρικότερος και λιγότερο ανισοδιαμετρικός . Επίσης ο πυρήνας των ενεργοποιημένων μακροφάγων δεν παρουσιάζει τόσο βαθιά εντομή όσο ο πυρήνας των ήρεμων κυττάρων .

2. Η κυτταρική μεμβράνη δεν παρουσιάζει τόσο έντονη ανωμαλία , αφού τα ψευδοπόδια και οι προεκβολές της δεν είναι έντονες και τα βοθρία γίνονται πιο αβαθή . Η μέση επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μειώνεται από $573 \mu\text{m}^2$ σε $415 \mu\text{m}^2$. Αυτή η μεγάλη μείωση της επιφάνειας του κυττάρου



σε συνδυασμό με την αύξηση του κυτταρικού όγκου σημαίνει ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα τείνουν επίσης να γίνουν σφαιρικότερα .

3. Τα λυσοσωματικά κοκκία είναι πιο ευμεγέθη . Ενώ καταλαμβάνουν στα μη-ενεργοποιημένα μακροφάγα το 6% του συνολικού κυτταρικού όγκου , στα ενεργοποιημένα κύτταρα καταλαμβάνουν το 9.5% του συνολικού κυτταρικού όγκου . Ωστόσο ο απόλυτος αριθμός λυσοσωματικών κοκκίων ανά κύτταρο και η αναλογία λυσοσωματικών κοκκίων ανά μm^3 όγκου κυτταροπλάσματος είναι μειωμένα , δηλαδή τα μακροφάγα αυτά περιέχουν λιγότερα αλλά μεγαλύτερα λυσοσώματα .

4. Ο απόλυτος αριθμός των μιτοχονδρίων αυξάνει παράλληλα με την αύξηση του όγκου του κυττάρου , με αποτέλεσμα η αναλογία μιτοχονδρίων ανά μm^3 όγκου κυτταροπλάσματος να παραμένει σταθερή . Ο απόλυτος αριθμός ριβοσωμάτων ανά κύτταρο παρουσιάζει επίσης μια ελάχιστη αύξηση .

Μελέτες με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης έδειξαν ότι τα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα που προσκολλώνται σε υάλινες επιφάνειες παρουσιάζουν (όπως τα μη-ενεργοποιημένα) λεπτές δακτυλοειδείς προεκβολές και λεπτά «πέπλα» κυτταροπλάσματος (Carr και Carr, 1970) . Τα ενεργοποιημένα κύτταρα όμως παρουσιάζουν και άλλα χαρακτηριστικά , όπως είναι η μεταβολή του σχήματός τους σε πολυγωνικό ή επίμηκες ή κυρτό , η εμφάνιση πολυάριθμων βοθρίων (pits) καθώς και μικρών προεξοχών ακαθόριστου σχήματος στην επιφάνειά τους , ενώ τέλος δεν εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές βαθιές αύλακες (ridges) των μη-ενεργοποιημένων μακροφάγων .

Χρησιμοποιώντας ειδικές τεχνικές ταχείας μονιμοποίησης των περιτοναϊκών μακροφάγων τα οποία είχαν απομονωθεί από στείρα περιτοναϊκά εξιδρώματα , διαπιστώθηκε ότι πολλά από αυτά τα κύτταρα εμφάνιζαν ένα κυτταρικό επένδυμα (cell coat) με πάχος 630 \AA , το οποίο χωριζόταν σε τρεις παράλληλες στοιβάδες από μια ηλεκτρονιοσκερή μεσαία ζώνη (Brederoo και Daems, 1972 , Daems και Brederoo, 1973) . Αυτό το κυτταρικό επένδυμα ήταν ιδιαίτερα εμφανές σε σημεία όπου έρχονταν σε επαφή δύο ή περισσότερα μακροφάγα ενός συσσωματώματος και σπανιότερα στις ελεύθερες επιφάνειες των κυττάρων . Ταυτόχρονα υπήρχε σαφής μείωση του αριθμού των μικρολαχνών στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων και μείωση των μικροπινοκυττωτικών κυστιδίων στο κυτταρόπλασμά τους . Επίσης τα εξιδρωματικά περιτοναϊκά μακροφάγα εμφανίζουν και Ελμινθοειδείς Δομές (Worm-like Structures) με πάχος 1250 \AA σε περιοχές όπου υπάρχει εγκολεασμός και αναδίπλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης τους . Οι Ελμινθοειδείς Δομές έχουν σωληνοειδή μορφή , άλλοτε είναι μονήρεις και άλλοτε πολλαπλές , ενώ η λεπτή δομή τους θυμίζει την λεπτή δομή του κυτταρικού επενδύματος . Τέλος έχει διαπιστωθεί ότι τα εξιδρωματικά περιτοναϊκά μακροφάγα στερούνται των μεμβρανικών Λαβυρίνθων (Labyrinths) οι οποίοι αφθονούν στα φυσιολογικά (μη-ενεργοποιημένα) περιτοναϊκά μακροφάγα . (Brederoo και Daems, 1972 , Daems και Brederoo, 1973) .



Κεφάλαιο 1-5 . Οι λειτουργικές ιδιότητες των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συμμετέχουν σε πολυάριθμες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες του ανθρωπίνου σώματος . Αυτό επιτυγχάνεται με μια πλεκάδα από διάφορες λειτουργικές ικανότητες ή ιδιότητες τις οποίες έχουν τα κύτταρα αυτά και οι οποίες τους επιτρέπουν την συμμετοχή στα αντίστοιχα φαινόμενα .

Ένας συνοπτικός πίνακας των λειτουργικών ιδιοτήτων των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων θα παρουσιαστεί εδώ , ώστε να γίνει αντιληπτό το πλήθος και η πολυπλοκότητα των ιδιοτήτων αυτών .

ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

1. Φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων , CR-υποδοχέων ή άλλων υποδοχέων (π.χ. Μαννόζης-Φουκόζης) .
2. Ενδοκυττάρια καταστροφή φαγοκυτταρωμένων σωματιδίων .
3. Εξωκυττάρια καταστροφή μικροβίων .
4. Χημειοτακτική κίνηση .
5. Έκκριση (ενζύμων , δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου ή αζώτου , κυτταροκινών , λιπιδίων κ.λ.π)
6. Επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων
7. Αναγνώριση και έλεγχος (καταστροφή) των καρκινικών κυττάρων

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι τα διάφορα είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχουν διαφορετικές ικανότητες ή σύμφωνα με άλλους έχουν τις ίδιες ιδιότητες ανεπτυγμένες σε διαφορετικό βαθμό . Αυτές εκφράζονται ανάλογα (1) με την ιδιαίτερη ανατομική εντόπιση και (2) με τον βαθμό ενεργοποίησής τους .

ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αποτελούν ιδιαίτερα ικανά φαγοκύτταρα σε ότι αφορά τα ευμεγέθη σωματίδια ή καταστάσεις υψηλού σωματιδιακού φόρτου . Φαγοκυτταρώνουν εύκολα μικροοργανισμούς (βακτήρια , ιούς , μύκητες και πρωτόζωα) , ιστικά ράκη , γηρασμένα κύτταρα και σωματιδιακό υλικό . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα μπορούν αρχικά να κινούνται προς τους στόχους αυτούς ακολουθώντας την κλίση πυκνότητας των χημειοτακτικών μορίων που προέρχονται από αυτά . Στην συνέχεια το φαγοκύτταρο προεκβάλλει ψευδοπόδια που περιβάλλουν περιοχές του στόχου οι οποίες παρουσιάζουν ειδικά μόρια αναγνώρισης , τις οψωνίνες . Τα ψευδοπόδια αυτά θα περικλείσουν τον στόχο από όλες τις πλευρές και θα τον "εσωτερικεύσουν" (engulfment - interiorization) στο φαγοκύτταρο μέσα σε ένα "φαγόσωμα" . Σε αυτή την διαδικασία τα ψευδοπόδια λειτουργούν σαν φερμουάρ που κουμπώνει γύρω από το μικρόβιο . Επίσης όμως υπάρχει και η "σπειροειδής φαγοκύττωση" (coiling phagocytosis) όπου το μακροφάγο περιβάλλει το σωματίδιο που θα φαγοκυτταρώσει με ένα ιδιαίτερα επίμηκες και ελικοειδές ψευδοπόδιο . Αυτό συμβαίνει π.χ. με τον μικροοργανισμό *Legionella pneumophila* ο οποίος δεν φαγοκυτταρώνεται με τον συνήθη τρόπο .

Οι οψωνίνες μπορεί να είναι μόρια διαφόρων ειδών αλλά κυρίως τον ρόλο αυτό διαδραματίζουν οι IgG-ανοσοσφαιρίνες και παράγωγα του τρίτου παράγοντα του συμπληρώματος (C3) . Στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν αυτές τις οψωνίνες . Επίσης πολλοί μικροοργανισμοί ενεργοποιούν τις οδούς του συμπληρώματος και δημιουργούν παράγοντες που τα οψωνοποιούν . Εξάλλου και τα ίδια τα μακροφάγα εκκρίνουν παράγοντες του συμπληρώματος οι οποίοι καλύπτουν και οψωνοποιούν τον στόχο της φαγοκυττάρωσης . Τέλος τα

μακροφάγα διαθέτουν ορισμένους άλλους υποδοχείς που αναγνωρίζουν και συνδέουν πολυσακχαρικές ομάδες στο τοίχωμα σωματιδίων . κυττάρων και μικροοργανισμών χωρίς να προηγηθεί οψωνοποίηση . Τέτοιοι είναι και οι υποδοχείς Μαννόζης-Φουκόζης και ορισμένοι άλλοι . (Lewis και McGee, 1992) .

Η προεκβολή των ψευδοποδίων για την επίτευξη της φαγοκυττάρωσης αποτελεί ένα φαινόμενο τελείως τοπικό , στο οποίο συμμετέχει μόνο ένα τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και του παρακείμενου κυτταροπλάσματος . Στην συνέχεια ακολουθεί η κίνηση λυσοσωμάτων προς την βάση του φαγοσώματος και η σύντηξη του φαγοσώματος με τα λυσοσώματα . Τέλος ακολουθεί η κένωση του περιεχομένου των λυσοσωμάτων (δηλαδή των υδρολυτικών ενζύμων) μέσα στο φαγοσωμικό κυστίδιο . Σε όλες αυτές τις διαδικασίες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η ακτίνη , μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού .

Μία ανεπαρκής φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων δημιουργεί σημαντική ελάττωση της άμυνας του οργανισμού και προδιαθέτει κυρίως σε βακτηριακές λοιμώξεις . Για παράδειγμα οι διαβητικοί έχουν μεγάλη ευπάθεια σε σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις , που πιθανώς οφείλεται στην μείωση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μακροφάγων τους (Sima και συν., 1988) . Επίσης οι αλκοολικοί έχουν ευπάθεια στις βακτηριδιακές λοιμώξεις , η οποία οφείλεται σε δυσλειτουργία των μακροφάγων τους , τα οποία αδυνατούν να φαγοκυτταρώσουν μέσω Fc-υποδοχέων (Gomez και συν., 1994) .

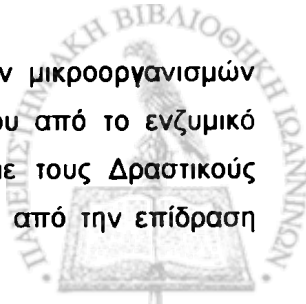
Όταν η φαγοκυττάρωση γίνεται μέσω των Fc-υποδοχέων συνοδεύεται από ταυτόχρονη έκλυση Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και εικοσανοειδών , ενώ όταν γίνεται μέσω των υποδοχέων για τον παράγοντα C3 του συμπληρώματος δεν εκλύονται ούτε Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου ούτε εικοσανοειδή . Για τον λόγο αυτό μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν τους υποδοχείς CR3 και CR4 για να εισέλθουν στο εσωτερικό των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , όπως η *Legionella* και τα *Mycobacteria* , δεν καταστρέφονται από την Οξειδωτική Έκρηξη και παρασιτούν ανενόχλητα στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων (Hauschildt και Kleine, 1995) . Αντιθέτως η σύνδεση οψωνοποιημένων με iC3b μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* με τους υποδοχείς οδηγεί στην καταστροφή των μικροβίων .

Τέλος τα μακροφάγα διαθέτουν και υποδοχέα για τον παράγοντα C5a . Η συμμετοχή του στην φαγοκυττάρωση συνοδεύεται από έκκριση της Ιντερλευκίνης IL-1 .

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΜΕΝΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα καταστρέφουν με διάφορους μηχανισμούς τα μικρόβια , σωματίδια και κύτταρα που έχουν φαγοκυτταρώσει . Όταν τα κύτταρα αυτά έχουν ενεργοποιηθεί από INF γ , TNF α ή IL-1 , καταστρέφουν το φαγοκυτταρωμένο υλικό με μεγαλύτερη ευκολία . Υπάρχουν κάποιες διαφορές στους μηχανισμούς με τους οποίους τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα επιτυγχάνουν αυτήν την λυτική δράση τους . Αυτό εξηγεί ορισμένα παράδοξα φαινόμενα , όπως το ότι μόνο τα μονοκύτταρα είναι ικανά να καταστρέψουν τον μύκητα *Candida albicans* ενώ τα μακροφάγα δεν είναι . Αυτό οφείλεται στην έλλειψη της παραγωγής Μυελο-Υπεροξειδάσης από τα μακροφάγα . Έτσι τα μακροφάγα είναι ικανά να καταστρέψουν τον μύκητα *Candida pseudotropicalis* , αφού δεν απαιτείται δράση της Υπεροξειδάσης για την ενδοκυττάρια λύση του .

Ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς ενδοκυττάριας καταστροφής των μικροοργανισμών που έχουν φαγοκυτταρωθεί είναι η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από το ενζυμικό σύστημα της NADPH-οξειδάσης η έκκρισή τους μέσα στο φαγόσωμα . Μαζί με τους Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου παράγονται και αλογονίδια (halides) όπως ο Υποχλωρίτης, από την επίδραση



της Μυελοϋπεροξειδάσης . Κατά την ωρίμαση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα παρατηρείται μείωση της μικροβιοκτόνου ικανότητας των κυττάρων αυτών , που έχει αποδοθεί μερικώς στην μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης Οξειδωτικής Έκρηξης και μερικώς στην μειωμένη δραστηριότητα της Λυσοσωματικής Μυελοϋπεροξειδάσης . Επίσης οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου προκαλούν την παροδική αλκαλοποίηση των φαγοκυτταρικών κυστιδίων μέχρι που το pH να φτάσει περίπου 7.8 - 8.0 όπου ενεργοποιούνται οι Ουδέτερες Πρωτεάσες και οι Κατιονικές Πρωτεΐνες και καταστρέφουν τους φαγοκυτταρωμένους μικροοργανισμούς . Οι Ουδέτερες Πρωτεάσες (π.χ. Ελαστάση , Κολλαγενάση και Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου) είναι σημαντικά αντιμικροβιακά ένζυμα που δρουν πριν από την οξίνιση του φαγοσώματος και από την υδρόλυση με τα Ώξινα Λυσοσωματικά Ένζυμα .

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός ενδοκυττάριας καταστροφής των μικροοργανισμών οφείλεται στην δράση των όξινων λυσοσωματικών ενζύμων , δηλαδή είναι μη-εξαρτημένος από το οξυγόνο . Τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν τις Λιπάσες, τις Δεοξυριβονουκλεάσες, τις Φωσφατάσες, τις Σουλφατάσες και τις Πολυσακχαριδάσες . Μέσα στα λυσοσώματα υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση εκτός από τα ένζυμα που αναφέρθηκαν . Τέτοιες είναι και οι Ντεφενσίνες (Defensins) οι οποίες αποτελούν μια ομάδα μικρών κατιονικών πρωτεϊνών (29-43 αμινοξέων) με αντιμικροβιακές ιδιότητες . Οι Ντεφενσίνες έχουν απομονωθεί από λυσοσώματα βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων των κονίκλων . Άλλες τέτοιες κατιονικές πρωτεΐνες είναι οι Σερπροσιδίνες (Serprocidins) που περιλαμβάνουν την Καθεψίνη G και την Ελαστάση , καθώς και το αντιβιοτικό Azurocidin που καταστρέφει τα Gram(-) μικρόβια συνδεδεμένο στα μόρια του LPS . Τέλος είναι γνωστό ότι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν και ορισμένες άλλες κατιονικές πρωτεΐνες , μεταξύ άλλων Λυσοζύμη , BPI-Πρωτεΐνη και Υπεροξειδάση , οι οποίες έχουν δράση και αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική . (Lewis και McGee, 1992 , Hauschildt και Kleine, 1995) .

Το φαγόσωμα που περιέχει το φαγοκυτταρωμένο μικροβιακό , σωματιδιακό ή κυτταρικό υλικό δεν είναι ικανό να προκαλέσει από μόνο του την λύση και πέψη του περιεχομένου του . Για αυτό ενώνεται με πρωτογενή λυσοσώματα που περιέχουν όξινα υδρολυτικά ένζυμα , δημιουργώντας ένα δευτερογενές λυσοσώμα . Ο μηχανισμός της ένωσης αυτής (ή αλλιώς σύντηξης - fusion) δεν είναι καλά διευκρινισμένος . Η καταστροφή όμως του υλικού που έχει φαγοκυτταρωθεί είναι αδύνατη χωρίς αυτήν .

Αν και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν πολλά είδη μικροβίων με ευκολία , υπάρχουν ορισμένοι άλλοι μικροοργανισμοί που παρασιτούν και πολλαπλασιάζονται στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών . Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα είδη *Mycobacteria* , *Trypanosoma* , *Salmonella* , *Listeria* , *Toxoplasma* , *Brucella* , *Leishmania* , *Chlamydia* , *Rickettsia* , *Legionella* και ο ιός HIV . Ο HIV συνδέεται με τον υποδοχέα CD-4 στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου και εισέρχεται στο εσωτερικό του και συγκεκριμένα στον πυρήνα όπου πολλαπλασιάζεται . Το *Mycobacterium tuberculosis* παράγει σουλφολιπίδια και άλλες ουσίες που αναστέλλουν την σύνδεση του φαγοσώματος με τα πρωτογενή λυσοσώματα και έτσι αποφεύγει την επαφή του με τα λυσοσωματικά ένζυμα και την καταστροφή του . Τα είδη *Leishmania* και *Mycobacterium lepraemyium* επιζούν στο εσωτερικό των δευτερογενών λυσοσωμάτων επειδή έχουν ανθεκτικό στα υδρολυτικά ένζυμα τοίχωμα . Τα μικρόβια παρασιτούν στο εσωτερικό των μη-ενεργοποιημένων μακροφάγων αλλά μετά την ενεργοποίηση του φαγοκυττάρου είτε θα κατασταλεί ο πολλαπλασιασμός τους ή θα καταστραφούν .



ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ασκούν την εξωκυτάρια μικροβιοκτόνο και κυτταροτοξική δράση τους μέσω της παραγωγής και έκκρισης πολυάριθμων ουσιών . Η μεγάλη διάρκεια ζωής των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε συνδυασμό με την παρατεταμένη βιοσυνθετική τους ικανότητα επιτρέπουν μακροχρόνια αντιμικροβιακή δράση τους . (Lewis και McGee, 1992)

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου (π.χ. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} και OH^{\cdot}) μέσω της Οξειδωτικής Έκρηξης που προκαλείται από την διέγερση του ενζυμικού συμπλέγματος της NADPH-Οξειδάσης (Nathan και Root, 1977, Pabst και Johnston, 1980 , Rosen και συν., 1995) . Όλοι έχουν έντονη αντιμικροβιακή δράση αλλά ο πιο δραστήσιμος από αυτούς είναι η Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot}) που απαιτεί την ύπαρξη Fe^{+2} για να παραχθεί και είναι ιδιαίτερα οξειδωτική . Οι πιθανότεροι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν είναι μέσω αύξησης της διαπερατότητας της μικροβιακής μεμβράνης και καταστροφής των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσού και του βακτηριακού DNA . Η αυξημένη έκκρισή τους αποτελεί κριτήριο ενεργοποίησης των μακροφάγων . Οι ίδιοι αυτοί Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου είναι υπεύθυνοι και την αντινεοπλασματική δραστηριότητα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Nathan και συν., 1980) . Συχνά το $O_2^{\cdot-}$ αντιδρά με μόρια Νιτρικού Οξειδίου και δημιουργεί το Υπεροξειονιτρικό Ανιόν που καταστρέφει τα περισσότερα είδη μικροοργανισμών .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Αζώτου . Μεταξύ αυτών των ουσιών περιλαμβάνονται το Νιτρικό Οξείδιο (NO^{\cdot}) , η ρίζα Νιτρικού Διοξειδίου (NO_2^{\cdot}) , η Νιτρώδης ρίζα και η Νιτρική ρίζα (NO_2^{\cdot} και NO_3^{\cdot}) . Για την παραγωγή τους είναι υπεύθυνη η Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου που επιτελεί μια οξειδωτική αντίδραση πέντε ηλεκτρονίων επί της L-Αργινίνης και του NADPH , με την συνέργεια της Τετραυδροβιοπτερίνης και του FAD . Αυτοί οι Δραστικοί Μεταβολίτες Αζώτου καταστρέφουν όχι μόνο μικρόβια αλλά και καρκινικά κύτταρα . Επίσης μπορούν να εκκριθούν και μέσα στα φαγοσώματα του μακροφάγου . Ο μηχανισμός δράσης τους φαίνεται ότι περιλαμβάνει την αναστολή των μιτοχονδριακών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσού που περιέχουν δεσμούς σιδήρου-θείου . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διεγείρονται για έκκριση Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου υπό την επίδραση Ιντερφερόνης- γ , ενδοτοξίνης , λιπoteichoϊκού οξέος και μουραμυλο-διπεπτιδίων , ενώ ορισμένες άλλες ουσίες (π.χ. οι κυτταροκίνες TGF- β και MDF) καταστέλλουν την έκκρισή τους (Nathan και Hibbs, 1991) .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν στον εξωκυττάριο χώρο τα λυσοσωματικά τους ένζυμα που περιλαμβάνουν όξινης υδρολάσες και ουδέτερες πρωτεάσες . Τέτοια ένζυμα είναι η Κολλαγενάση, η Ελαστάση, ο Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου, η Ώξινη Φωσφατάση, η β -Γλυκουρονιδάση, η Καθεψίνη κ.α. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουν σημαντική καταστροφή τόσο των μικροοργανισμών όσο και καρκινικών κυττάρων και φυσιολογικών ιστών . Μετά από την διέγερση ή ενεργοποίηση των μακροφάγων παρουσιάζεται ακόμα μεγαλύτερη έκκριση ενζύμων . Ήδη από την δεκαετία του 1960 είχε διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων με BCG προκαλούσε αυξημένη απελευθέρωση Ώξινων Υδρολασών στο πλάσμα , όπως Ώξινης Φωσφατάσης και β -Γλυκουρονιδάσης (Saito και Sutter, 1965) . Τα φλέγμονώδη μακροφάγα επίσης παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή και έκκριση Ώξινης Φωσφατάσης, Καθεψίνης-D, β -Γλυκουρονιδάσης και β -Γλυκοσαμινιδάσης (Schnyder και Baggolini, 1978) . Η διέγερση των μακροφάγων όχι μόνο προκαλεί την έκκριση των ενζύμων που φυλάσσονται στα λυσοσώματα αλλά και την παραγωγή νέων ποσοτήτων τους . Ορισμένα από αυτά τα εκκρινόμενα ένζυμα προκαλούν την υδρόλυση παραγόντων του Συμπληρώματος και των Κινινών ,

δημιουργώντας έτσι περαιτέρω διέγερση του μακροφάγου και έκκριση περισσότερων ενζύμων (Morland και Kaplan, 1977, North, 1978, Bonney και συν., 1978, Wahl και συν., 1979, Nathan και συν., 1980, Cooper και συν., 1984, Johnston, 1988).

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εμφανίζουν κυτταροτοξική επίδραση σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα με τα οποία έρχονται σε επαφή μέσω μορίων LFA-1. Ο μηχανισμός της εξωκυττάριας λύσης των ενδοθηλίων είναι ακόμα άγνωστος αλλά φαίνεται ότι δεν προϋποθέτει την φαγοκυττάρωσή τους (Peri και συν., 1990). Είναι πιθανό ότι παρόμοιοι μηχανισμοί συμμετέχουν και στην εξωκυττάρια λύση μικροβίων.

Τέλος τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα έχουν και έμμεση ιστατική δράση, αφού παράγουν INFα και INFβ Ιντερφερόνες που ενισχύουν την αντίσταση του οργανισμού κατά των ιογενών λοιμώξεων.

ΧΗΜΕΙΟΤΑΚΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ - ΧΗΜΕΙΟΤΑΞΙΑ.

Ο όρος "χημειοταξία" σημαίνει την προσανατολισμένη και κατευθυνόμενη κίνηση του κυττάρου προς μια αυξανόμενη κλίση πυκνότητας μιας "χημειοτακτικής ουσίας". Η ουσία αυτή συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη του φαγοκυττάρου και προκαλεί μεταβολές στον κυτταροσκελετό οι οποίες οδηγούν στην προσανατολισμένη κίνησή του κυττάρου. Η ικανότητα των λευκοκυττάρων να αντιδρούν στους χημειοτακτικούς παράγοντες είναι ζωτική για την άμυνα του οργανισμού. Σε αυτήν τη διαδικασία διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο η σύνδεση του παράγοντα με τον ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα του. Έχουν απομονωθεί και μελετηθεί οι υποδοχείς για διάφορους χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως π.χ. τα N-φορμυλιωμένα πεπτιδία, η πρωτεΐνη του συμπληρώματος C5a και η λευκοτριένη LTB₄. Αυτοί οι υποδοχείς υφίστανται ρύθμιση ως προς τον αριθμό τους στην επιφάνεια του κυττάρου. Μετά την σύνδεσή τους με τον υποκαταστάτη τους διεγείρουν διάφορες οδούς μεταγωγής μηνύματος οι οποίες ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα και επιτρέπουν την σύνδεσή τους με ενδοθηλιακά κύτταρα, την αλλαγή του κυτταρικού προσανατολισμού, τις μεταβολές του κυτταροσκελετού που οδηγούν στην αλλαγή του σχήματος του κυττάρου και τέλος την κίνηση του κυττάρου προς την εστία έκλυσης του χημειοτακτικού παράγοντα.

Επίσης υπάρχουν και ορισμένες άλλες ουσίες με ιδιαίτερη χημειοτακτική δράση στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η Ιντερλευκίνη IL-8 και οι χημειοκίνες MIP-1, MCP-1 και RANTES (Hauschildt και Kleine, 1995). Ακόμα και το μόριο της Ινσουλίνης δρα χημειοτακτικά για τα μακροφάγα, γεγονός που ίσως σχετίζεται με την παθογένεια του Σακχαρώδους Διαβήτη (Leiter, 1987).

Το συνθετικό χημειοτακτικό πεπτιδίο N-φορμυλ-μεθειονυλ-λευκυλ-φαινυλαναλανίνη (FMLP) έχει μελετηθεί εκτενώς και ο υποδοχέας του στα λευκοκύτταρα επίσης έχει απομονωθεί και περιγραφεί. Ο υποδοχέας αυτός εντοπίζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και η σύνδεσή του με τον υποκαταστάτη του προκαλεί όχι μόνο χημειοτακτική κίνηση αλλά επίσης και Οξειδωτική Έκρηξη και απελευθέρωση των λυσοσωματικών ενζύμων. Ο προσανατολισμός κατά την χημειοτακτική κίνηση επιτυγχάνεται εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης υποδοχέων στην πλευρά του κυττάρου που προπορεύεται. Ο FMLP-υποδοχέας υπάρχει σε δύο λειτουργικές καταστάσεις, τις καταστάσεις υψηλής και χαμηλής συγγένειας για το FMLP οι οποίες ρυθμίζονται από μία γουανινο-πρωτεΐνη. Οι υποδοχείς των N-φορμυλιωμένων πεπτιδίων έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχει διαπιστωθεί ότι μετά την πλήρωσή τους ακολουθεί η ενδοκύττωσή τους.

Μετά την σύνδεση του χημειοτακτικού παράγοντα στον υποδοχέα του αναπτύσσεται "εξοικείωση" του υποδοχέα και προκαλείται μειωμένη χημειοταξία κατά την έκθεση στην ίδια συγκέντρωση της ίδιας ουσίας . Τέλος υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί τερματισμού της χημειοταξίας , μεταξύ των οποίων δύο πολύ σημαντικοί μηχανισμοί είναι η εξωκυτάρια υδρόλυση του υποκαταστάτη των υποδοχέων και η πέψη του μέσα στα λυσοσώματα μετά από ενδοκύτωση . Επίσης η αύξηση του κυταροπλασματικού cAMP που ακολουθεί την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μετά από έκθεση σε χημειοτακτικούς παράγοντες δρα κατασταλτικά στην περαιτέρω ενεργοποίηση του κυττάρου και αμβλύνει τις αντιδράσεις χημειοταξίας . (Lewis και McGee, 1992)

Εκτός από τους FMLP-υποδοχείς υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς χημειοτακτικών παραγόντων που έχουν μελετηθεί καλά , όπως οι υποδοχείς για τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος iC3b και C5a και ο υποδοχέας για την INF- γ , καθώς και πολλοί άλλοι . Αν και είναι όλοι διαφορετικοί μεταξύ τους έχουν μία κοινή επίδραση , την αυξημένη υδρόλυση των φωσφοινοσιτιδίων και την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) . Μέσα σε χρόνο 5" sec προκαλείται αθρόα υδρόλυση των φωσφοινοσιτιδίων και αύξηση του κυταροπλασματικού Ca^{+2} , διέγερση της PKC και ακολουθούν οι μεταβολές του σχήματος των κυττάρων , της αποκοκκίωσης των λυσοσωμάτων και της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Ταυτόχρονα όμως προκαλείται ενεργοποίηση της Αδενυλικής Κυκλάσης και παραγωγή cAMP και ταυτοχρόνως καταστολή της δράσης της φωσφοδιεστεράσης που υδρολύει το κυκλικό φωσφονουκλεοτίδιο . Έτσι δημιουργούνται τα υψηλά κυταροπλασματικά επίπεδα cAMP που είναι απαραίτητα για την απενεργοποίηση του κυττάρου μέσω μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης .

Μετά την σύνδεση του υποδοχέα με τον υποκαταστάτη του τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα πρέπει να προσκολληθούν σε μια στερεή επιφάνεια για να αναπτύξουν χημειοτακτική κίνηση . Συνήθως αυτή είναι η στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων που επαλείφουν το εσωτερικό των αγγείων . Για την σύνδεση των κυττάρων αυτών μεταξύ τους χρησιμοποιούνται τα μόρια LFA-1 , MAC-1 και p150,95 στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων και τα μόρια ICAM-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων . Μετά την προσκόλλησή τους στο αγγειακό ενδοθήλιο τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εισέρχονται με τον μηχανισμό της διαπίδωσης στους περιαγγειακούς ιστούς και κινούνται προς την φλεγμονώδη εστία .

Διαταραχές στην χημειοτακτική ικανότητα των μονοκυττάρων και μακροφάγων οδηγούν σε πολύ σημαντικές διαταραχές της άμυνας του οργανισμού και σε επικίνδυνες λοιμώξεις .

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ .

Τις αντιγονικές ουσίες που εισέρχονται στο σώμα προσλαμβάνουν διάφορα είδη κυττάρων και τις παρουσιάζουν στα T-λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα NK . Τα κύτταρα που αναλαμβάνουν την παρουσίαση αντιγόνου στα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα μπορεί να είναι Δενδρική κύτταρα που εκφράζουν μόρια HLA-II στην επιφάνειά τους , μονοπύρηννα φαγοκύτταρα ή τέλος B-λεμφοκύτταρα . (Lewis και McGee, 1992) .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τις αντιγονικές ουσίες με την βοήθεια των Fc-υποδοχέων αλλά και με μηχανισμούς ανεξάρτητους των Fc-υποδοχέων . Η παρουσίαση των αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα αποτελεί μία από τις κυριότερες λειτουργίες που επιτελούν τα μακροφάγα και με τον τρόπο αυτό διευκολύνουν την έναρξη και ευοδώνουν την διεκπεραίωση της κυτταρικής ανοσίας κατά των διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών . Μετά την πρόσληψη των αντιγονικών ουσιών ακολουθεί η επεξεργασία τους και ειδικά στην περίπτωση των πρωτεϊνικών αντιγόνων δημιουργούνται πεπτιδία

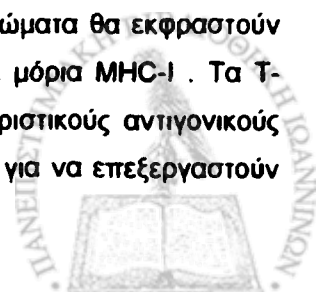
που μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη . Εκεί τοποθετούνται δίπλα στα μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC-II) των γονιδιακών τόπων DR , DP και DQ και παρουσιάζονται μαζί με αυτά στα T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν μόρια CD-4 στην επιφάνειά τους . Αυτά τα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν μόρια CD-4 στην επιφάνειά τους ονομάζονται Βοηθητικά (Helper T-cells) . Αν και το 90% της ποσότητας των αντιγόνων που προσλαμβάνονται από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αποδομούνται , το ποσοστό που παρουσιάζεται στα λεμφοκύτταρα έχει 1000 φορές μεγαλύτερη αντιγονικότητα από ότι τα αντιγόνα που κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα . (Unanue και Allen, 1987 , Nicod, 1996) .

Η επεξεργασία ενδογενών αντιγόνων (φυσιολογικών κυτταροπλασματικών ή πυρηνικών μορίων) οδηγεί στην δημιουργία πεπτιδίων που να παρουσιάζονται στην επιφάνεια των μονοπύρηννων φαγοκυττάρων μαζί με μόρια MHC-I αντί για μόρια MHC-II . Αυτά τα πεπτίδια παρουσιάζονται στα Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια CD-8 (Cytolytic T-cells) και που αντιδρούν παράγοντας ένζυμα , λεμφοκίνες και Περφορίνη . (Hauschildt και Kleine, 1995) .

Έχει προταθεί ότι υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί οι οποίοι ελέγχουν την επεξεργασία των αντιγόνων που θα παρουσιαστούν μαζί με τα μόρια Ιστοσυμβατότητας MHC-I και MHC-II . Οι περισσότερες ενδογενείς πρωτεΐνες αποδομούνται με μη-λυσosomalικούς πρωτεολυτικούς μηχανισμούς . Τέτοιος είναι ο μηχανισμός που περιλαμβάνει το σύστημα της κυτταροπλασματικής ουβικουϊτίνης (ubiquitin) , όπου όλες οι πρωτεΐνες που πρέπει να επεξεργαστούν υπόκεινται σε πρωτεόλυση από συγκεκριμένες πρωτεάσες αφού πρώτα συζευχθούν με την ουβικουϊτίνη . Πολλές από αυτές τις Πρωτεάσες είναι εξαρτημένες από το ATP και έχουν συνενωθεί σε ένα μεγάλο ενζυματικό σύμπλεγμα (Proteasome) . Τα πεπτίδια που δημιουργούνται από το Πρωτεάσωμα μεταφέρονται μέσω των ειδικών μορίων μεταφοράς TAP-1 και TAP-2 στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και από εκεί στην επιφάνεια του κυττάρου . Για τις εξωγενείς πρωτεΐνες φαίνεται ότι αφού εγκλειστούν μέσα σε ενδοσωματικά κυστίδια υφίστανται περιορισμένη λύση από τις πρωτεάσες των κυστιδίων και στην συνέχεια αυτή ολοκληρώνεται από όξινες πρωτεάσες που περιέχονται στα κυστίδια της συσκευής Golgi με τα οποία γινόταν σύντηξη (fusion) . Όμως υπάρχουν και ορισμένες πρωτεΐνες που δεν απαιτούν πρωτεόλυση αλλά μόνο "ξεδίπλωμα" για να γίνουν αντιγονικές . Στην συνέχεια τα αποδομημένα αντιγόνα και τα επεξεργασμένα πεπτίδια που προέρχονται από αυτά μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το βήμα αυτό είναι ουσιώδες για την πλήρη επεξεργασία τους που θα ακολουθηθεί από την έκφρασή τους στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου .

Όπως έχει ήδη επισημανθεί , για να εκφραστεί ένα αντιγόνο μαζί με μόρια MHC-I συνήθως έχει ενδογενή προέλευση . Δεν είναι απαραίτητο να συντεθούν νέα μόρια MHC-I . Ορισμένοι έχουν υποστηρίξει ότι η σύνδεση των αντιγόνων με τα μόρια MHC-I πραγματοποιείται πριν ακόμα απελευθερωθούν από το ενδοπλασματικό δίκτυο . Συχνά η έκφραση αντιγόνων σε συνδυασμό με μόρια MHC-I έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του μακροφάγου που τα παρουσιάζει από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα .

Τα αντιγόνα που φαγοκυτταρώνονται και αποδομούνται μέσα σε ενδοσώματα θα εκφραστούν μαζί με μόρια MHC-II στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων και σπανίως μαζί με μόρια MHC-I . Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αυτό το σύμπλεγμα επειδή παρουσιάζει χαρακτηριστικούς αντιγονικούς επίτοπους . Μερικά εξωγενή αντιγόνα χρειάζονται την αρωγή του μορίου CD74 για να επεξεργαστούν



και παρουσιαστούν ικανοποιητικά . Σε κάθε περίπτωση τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν και κυτταροκίνες οι οποίες θα επιδράσουν στα Τ-λεμφοκύτταρα , ασκώντας τις ρυθμιστικές επιδράσεις που είναι απαραίτητες για την αντίδραση στο παρουσιαζόμενο αντιγόνο . Η αλληλεπίδραση του ειδικού υποδοχέα του Τ-λεμφοκυττάρου με το σύμπλεγμα αντιγόνου-μορίου MHC-II δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την ενεργοποίησή του . Για τον σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η παραγωγή της Ιντερλευκίνης IL-1 από το μονοπύρρηνο φαγοκύτταρο , η οποία όχι μόνο προκαλεί την επιθυμητή ενεργοποίηση αλλά επίσης προάγει την αύξηση και ωρίμαση των Τ-λεμφοκυττάρων και επάγει την έκφραση των υποδοχέων για την Ιντερλευκίνη IL-2 .

ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα χαρακτηρίζονται από μία σημαντική εκκριτική δραστηριότητα , που περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση όχι μόνο ενζύμων αλλά και πολλών άλλων βιολογικά δραστικών ουσιών . Τα κύτταρα αυτά συνθέτουν και απελευθερώνουν πάνω από εκατό διαφορετικές ουσίες , από το πολύ απλό Ανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{-1}) μέχρι το πολύπλοκο μόριο της Ινωδονεκτίνης που έχει MB 440 kDa . Η εντυπωσιακή αυτή βιοσυνθετική δραστηριότητά τους χαρακτηρίζεται από τα παρακάτω σημεία :

α. Οι εκκρινόμενες ουσίες έχουν μεγάλο εύρος βιολογικών δραστηριοτήτων , από την επαγωγή της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης μέχρι την πρόκληση απόπτωσης ή κυτταρικής λύσης .

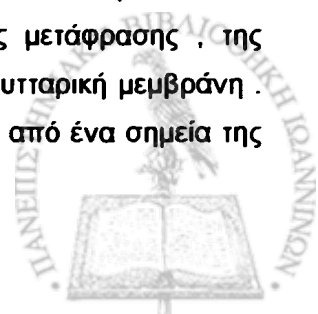
β. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν τόσο στο εξωκυττάριο χώρο όσο και στον ενδοκυττάριο χώρο (δηλαδή μέσα στα φαγοσώματα) .

γ. Οι ουσίες που παράγονται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συχνά έχουν περισσότερες από μία βιολογικές δραστηριότητες .

δ. Ορισμένες από τις ουσίες αυτές δρουν μόνο σε συνεργασία με κάποιες άλλες για να πετύχουν βιολογικό αποτέλεσμα .

ε. Οι περισσότερες από τις ουσίες που εκκρίνονται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγονται και από άλλα είδη κυττάρων .

Η έκκριση των πρωτεϊνικών βιοδραστικών μορίων από μακροφάγα και μονοκύτταρα περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών βημάτων . Αρχικά τα μόρια αυτά παράγονται μέσα στο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στην συνέχεια υφίστανται γλυκοζυλίωση . Ακολουθεί η μετατόπισή τους (translocation) στο εσωτερικό του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου και η μεταφορά τους στις δεξαμενές του δικτύου Golgi από όπου θα μεταφερθούν με κυστίδια στην κυτταρική μεμβράνη . Εκεί γίνεται σύντηξη των μεμβρανών του εκκριτικού κυστιδίου με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και ακολουθεί η εξωκύτωση του περιεχομένου του . Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ορισμένες ουσίες όπως π.χ. η Λυσοζύμη και η Απολιποπρωτεΐνη Ε παράγονται συνεχώς (constitutive secretion) από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα , ενώ άλλες ουσίες έχουν παραγωγή ρυθμιζόμενη ή επαγόμενη (regulated / induced secretion) . Η ρύθμισή αλλά και η επαγωγή της εκκριτικής δραστηριότητας των κυττάρων αυτών μπορεί να ασκείται σε πολυάριθμα επίπεδα , όπως π.χ. της μεταγραφής , της μετάφρασης , της επεξεργασίας , της συγκέντρωσης στα εκκριτικά κυστίδια και της μεταφοράς στην κυτταρική μεμβράνη . Επίσης μπορεί να υπάρχει ρύθμιση της εκκριτικής δραστηριότητας σε περισσότερα από ένα σημεία της διαδικασίας αυτής .



Η χρήση ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (2D-SDS PAGE) έδειξε ότι τα φυσιολογικά ανθρώπινα μονοκύτταρα και τα μονοκύτταρα της κυτταρικής σειράς U937 συνθέτουν και εκκρίνουν τουλάχιστον είκοσι εμφανώς διαφορετικές πρωτεΐνες, με διαφορετικά Μοριακά Βάρη και Ισοηλεκτρικά Σημεία. Μετά από ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη αυξάνεται η παραγωγή τουλάχιστον δώδεκα πρωτεϊνών με ΜΒ μεταξύ 12 και 46 kDa, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των μονοκυττάρων και που δεν περιλαμβάνουν την IL-1 ή τον TNFα (Ranuska και συν., 1988). Η έντονη βιοσυνθετική δραστηριότητα των ενεργοποιημένων μονοκύτταρων φαγοκυττάρων περιλαμβάνει επίσης την παραγωγή μιας σειράς πρωτεϊνών με Μ.Β. μεταξύ 28 και 87 kDa και αδιευκρίνιστη λειτουργία που παραμένουν στο κυτταρόπλασμα χωρίς να εκκρίνονται (Largen και Tannenbaum, 1986).

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένα από τα βιοδραστικά μόρια που εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα. (Nathan και συν., 1980, Lewis και McGee, 1992).

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

1. ENZYMA

- α. Λυσοζύμη.
- β. Λυσοσωματικές Ώξινες Υδρολάσες (Πρωτεάσες, Λιπάσες, Δεοξυριβονουκλεάσες, Γλυκοσιδάσες, Σουλφατάσες, Φωσφατάσες)
- γ. Ουδέτερες Πρωτεάσες (Κολλαγενάση, Ελαστάση, Μυελινάση, Μετατρεπτικό Ένζυμο Αγγειοτενσίνης, Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου, Κυτταρολυτική Πρωτεϊνάση).
- δ. Λιπάσες (Λιποπρωτεϊνική Λιπάση, Φωσφολιπάση A2).
- ε. Αργινάση.

2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ

- α. Ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6, IL-8).
- β. Ιντερφερόνες (INFα, INFβ)
- γ. Αυξητικοί Παράγοντες (PDGF, FGF, TGFβ).
- δ. Αιμοποιητικοί Παράγοντες και Παράγοντες Δημιουργίας Αποικιών (Ερυθροποιητίνη, GM-CSF, M-CSF, FIM).
- ε. Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (TNFα).

3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

- α. Αναστολείς Πρωτεασών (α2-μακροσφαιρίνη, αναστολέας α1-αντιτριψίνης, αναστολέας κολλαγενάσης, κ.α.).
- β. Αναστολείς Φωσφολιπασών.
- γ. Αναστολείς Ιντερλευκίνης-1.

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

- α. Κλασσικής Οδού (C1, C2, C3, C4, C5).
- β. Εναλλακτικής Οδού (Παράγοντας Β, Παράγοντας D, Προπερδίνη).
- γ. Δραστικά Παράγωγα (C3a, C3b, C5a, Bb).
- δ. Αναστολείς (Αναστολέας C3b, Παράγοντας β-1H).

5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΕΩΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ

- α. Ιστικός Παράγοντας Πήξης.
- β. Ενεργοποιητής της Προθρομβίνης.
- γ. Παράγοντες Πήξης II, VII, IX, X και XIII.
- δ. Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου.
- ε. Αναστολέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου.

6. ΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ

- α. Ανιόν Υπεροξειδίου, Υπεροξειδίο του Υδρογόνου, Ρίζα Υδροξυλίου, Ανιόν Υδροξυλίου.
- β. Νιτρικό Οξείδιο, Υπεροξεονιτρικό Ανιόν.

7. ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΗ (ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥ)

- α. Παράγωγα της Κυκλο-οξυγενάσης (PGE₂, TXA₂, TXB₂, PGF_{2a} και PGI).
- β. Παράγωγα της Λιπο-οξυγενάσης (LTA₄, LTB₄, LTC₄, HPETE και HETE).
- γ. Αραχιδονικό Οξύ και Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF).

8. ΆΛΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

- α. Θρομβοσπονδίνη, Απτοσφαιρίνη και Νεοπτερίνη.
- β. Ινωδονεκτίνη και Λιπρονεκτίνη.
- γ. Λιποκορτίνη και Απολιποπρωτεΐνη E.
- δ. Φερριτίνη, Τρανσφερρίνη, Τρανσκοβαλαμίνη II και Γλουταθειόνη.

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα μπορούν να συμμετέχουν ενεργά στην φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία του οργανισμού μέσα από την πλούσια εκκριτική



δραστηριότητά τους . Στην συνέχεια θα αναφερθούν με συντομία ορισμένα βασικά στοιχεία τα οποία αφορούν την σημαντική αυτή ικανότητα των μονοκυττάρων και μακροφάγων . (Lewis και McGee, 1992)

Η ΕΚΚΡΙΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥΣ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Η Λυσοζύμη αποτελεί χαρακτηριστικό προϊόν των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και προκαλεί την λύση του τοιχώματος ορισμένων βακτηριδίων . Επειδή πολύ λίγα βακτήρια είναι ευαίσθητα στην δράση της Λυσοζύμης έχει αμφισβητηθεί ο αντιμικροβιακός της ρόλος . Επίσης δεν είναι γνωστά άλλα φυσικά υποστρώματα της δράσης της εκτός από αυτούς τους μικροβιακούς πολυσακχαρίτες . Εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα και μονοκύτταρα ενώ τα προμονοκύτταρα και οι μονοβλάστες εκκρίνουν ελάχιστη λυσοζύμη . Η έκκριση αυτή είναι συνεχής και σε μεγάλες ποσότητες .

Τα μακροφάγα επίσης παράγουν μεγάλες ποσότητες Ώξινων Λυσοσωματικών Υδρολασών , τις οποίες απελευθερώνουν στα φαγοσώματα και στον εξωκυττάριο χώρο . Η έκκριση των υδρολασών αυτών ακολουθεί την διέγερση του φαγοκυττάρου από ένα εξωτερικό παράγοντα , όπως η σύνδεση αντιγόνου στους Fc-υποδοχείς , η έκθεση σε κυταροκίνες ή τέλος η έκθεση σε μικροβιακά προϊόντα . Οι όξινες λυσοσωματικές υδρολάσες αποδομούν το τοίχωμα των μικροοργανισμών , το κολλαγόνο και άλλα στοιχεία του συνδετικού ιστού , την βασική μεμβράνη των επιθηλίων και επίσης υδρολύουν τις ανοσοσφαιρίνες , τις κινίνες και τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος . Όλες αυτές οι υδρολάσες είναι δραστικές μόνο σε όξινο pH .

Οι Ουδέτερες Πρωτεάσες περιλαμβάνουν περιλαμβάνουν την Ελαστάση , την Κολλαγενάση , τον Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου , το Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτενσίνης και την Πρωτεάση της Κυστεΐνης , που είναι δραστικά μόνο σε ουδέτερο pH . Η έκκρισή τους υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο κατά την ενεργοποίηση του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου . Τα μακροφάγα σε κατάσταση ηρεμίας παράγουν ελάχιστες ποσότητες Ουδέτερων Πρωτεασών , ενώ τα φλεγμονώδη μακροφάγα εκκρίνουν πολύ μεγάλες ποσότητες . Η απελευθέρωση των ενζύμων αυτών αποτελεί διαδικασία δύο βημάτων . Κατά το πρώτο βήμα τα μακροφάγα "ευαισθητοποιούνται" με την επίδραση κυταροκινών ή ενδοτοξίνης , ενώ στο δεύτερο βήμα διεγείρεται η έκλυση των πρωτεασών υπό την επίδραση ακετυλιωμένων πρωτεϊνών , ενδοτοξινών ή μετά από φαγοκυττάρωση κάποιου σωματιδίου . Η έκκριση των πρωτεασών διακόπτεται υπό την επίδραση της α2-μακροσφαιρίνης . Εκτός από την α2-μακροσφαιρίνη , τα μακροφάγα εκκρίνουν επίσης και αναστολείς χαμηλού και μέσου Μοριακού Βάρους για την Πλασμίνη , τον αναστολέα της α1-Αντιθρυψίνης , αναστολείς για την Κολλαγενάση και τον Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου και αναστολείς των Φωσφολιπασών . Όλες οι πρωτεάσες δεν έχουν μικροβιοκτόνο δράση . Ειδικά η Ελαστάση και η Κολλαγενάση δεν διαθέτουν οι ίδιες κάποια αντιμικροβιακή δραστηριότητα , δρουν όμως σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα για να επιτύχουν τον σκοπό αυτό .

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥΣ .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εκκρίνουν πολλούς παράγοντες της κλασικής και της εναλλακτικής οδού ενεργοποίησης του συμπληρώματος (C1, C2, C3, C4, C5, Παράγοντας Β, Παράγοντας D, C3a, C3b, C5a, Παράγοντας Bb και Προπερδίνη) . Επίσης εκκρίνουν ορισμένους αναστολείς των πρωτεϊνών αυτών (Αναστολέας C3b και β-1H) . Ο παράγοντας C1 εκκρίνεται από τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τα μονοκύτταρα ενώ οι παράγοντες C2 και C4 από τα μονοκύτταρα , τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα μακροφάγα του γάλακτος και των ορογόνων

υμένων . Η Προπερδίνη και οι παράγοντες Β και D παράγονται από τα μονοκύτταρα , τα μακροφάγα του γάλακτος και των ορογόνων υμένων . Ο C3-παράγοντας εκκρίνεται από όλα τα είδη μονοπύρηνων φαγοκυττάρων ενώ η ρυθμιστική πρωτεΐνη C4br δεν παράγεται από κανένα . Τα ενεργοποιημένα με $\text{INF-}\gamma$ μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών . Αν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εκτεθούν σε ενδοτοξίνες ή προσβληθούν από *Listeria* ή BCG επίσης εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αυτών των παραγόντων . Έχει αναφερθεί ότι οι αδρενεργικοί και χολινεργικοί αγωνιστές επηρεάζουν την παραγωγή και έκκριση των παραγόντων αυτών . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για τους παράγοντες του συμπληρώματος , με τους οποίους συμμετέχουν στην φαγοκυττάρωση οψωνοποιημένων μικροβίων . Ο παράγοντας C5a προκαλεί έκκριση λεμφοκινών και Ώξινων Υδρολασών από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Επίσης οι παράγοντες C3a και C5a προκαλούν την χημειοτακτική τους κίνηση ενώ ο παράγοντας Bb καταστέλλει την χημειοταξία και οδηγεί σε μορφολογικές μεταβολές των μακροφάγων . Η συμμετοχή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην συνολική παραγωγή πρωτεϊνών του συμπληρώματος είναι μικρή , αλλά η τοπική παραγωγή των ουσιών αυτών στις φλεγμονώδεις εστίες γίνεται από τα μακροφάγα και έχει μεγάλη βιολογική σημασία . (Zembala και Asherson, 1989) .

ΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .

Κατά την διέγερση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από ορισμένους παράγοντες , όπως είναι οι μικροοργανισμοί και οι τοξίνες τους , παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , OH^{\cdot} , κ.λ.π.) . Η παραγωγή των βιοδραστικών αυτών μορίων απαιτεί την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου για τον μεταβολισμό των σακχάρων μέσω της Παρακαμπτηρίου Οδού των Μονοφωσφορικών Εξοζών ή αλλιώς της Οδού των Φωσφορικών Πεντοζών (Hexose Monophosphate Shunt) . Αυτή η μεταβολική διαδικασία αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου ονομάζεται Οξειδωτική Έκρηξη ή Αναπνευστική Έκρηξη (Respiratory Burst) και έχει ως κύριο σκοπό την δημιουργία Ελευθέρων Ριζών και όχι την παραγωγή ενέργειας . Για την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου είναι υπεύθυνο το σύμπλεγμα της NADPH Οξειδάσης που ενεργοποιείται μέσω της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) . Επειδή όμως η αντίδραση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην διέγερση είναι ταχύτατη υποστηρίζεται ότι δεν είναι απαραίτητη η σύνθεση νέων μορίων του συμπλέγματος της NADPH Οξειδάσης . Υπάρχουν πολλά είδη ερεθισμάτων ικανά να διεγείρουν την Οξειδωτική Έκρηξη των μακροφάγων , όπως η φαγοκυττάρωση και η έκθεση σε μικροβιακά προϊόντα ή σε κυτταροκίνες (Cooper και συν., 1984 , Lewis και McGee, 1992 , Wizenmann και Laskin, 1992) .

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΤΟΥ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΗ) .

Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων παράγονται μεγάλες ποσότητες εικοσανοειδών , δηλαδή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος . Τα μόρια αυτά ανήκουν στα Αυτακοειδή και αποτελούν Χημικούς Διαμεσολαβητές της Φλεγμονής . Τα εικοσανοειδή που παράγονται από τα μακροφάγα περιλαμβάνουν την Προστακυκλίνη (PGI) , Προσταγλανδίνες (PGE_1 , PGE_2 , PGD_2 και PGF_{2a}) , Θρομβοξάνες (TXA_2 και TXB_2) και Λευκοτριένες (LTA_4 , LTB_4 και LTC_4) . Πρώτη ύλη για την παραγωγή τους αποτελούν τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τα υπεύθυνα ένζυμα (Φωσφολιπάση A_2 , Κυκλο-οξυγενάση και Λιπο-οξυγενάση) υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση . Τα εκκρινόμενα εικοσανοειδή δρουν αυτοκρινικά και παρακρινικά στα άλλα λευκοκύτταρα . Ειδικά η PGE_2

συμμετέχει στους αυτορυθμιστικούς μηχανισμούς των μακροφάγων , ασκώντας αρνητική παλίνδρομη επίδραση στην ενεργοποίησή τους μέσω της οδού του Κυκλικού AMP . Όμως και οι υπόλοιπες επιδράσεις των εικοσανοειδών που δεν ασκούνται στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αλλά σε άλλους ιστούς και κύτταρα έχουν μεγάλη βιολογική σημασία στην φλεγμονή και την ανοσία . Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν την χημειοταξία των λευκοκυττάρων , τις μεταβολές της διαπερατότητας των αγγείων , τις μεταβολές της διαμέτρου των αγγείων και των βρόγχων και την υπερπηκτικότητα . (Zembala και Asherson, 1989) .

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν εικοσανοειδή μόνο μετά από την διέγερσή τους από κάποιο παράγοντα (π.χ. φαγοκυττάρωση σωματιδίων *zymosan* ή *latex*) που προκαλεί αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} και ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) . (Nathan και συν., 1980, Aderem και συν., 1986 , Lewis και McGee, 1992) .

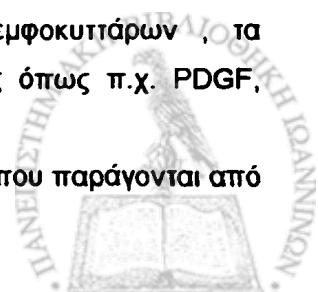
ΕΚΚΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν πρωτεΐνες που ανήκουν στους Παράγοντες Πήξης . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συνθέτουν και απελευθερώνουν διαφορετικούς Παράγοντες Πήξης ανάλογα με το ζωικό είδος από το οποίο προέρχονται και από την ανατομική τους θέση . Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που έχουν μελετηθεί εκτενώς συνθέτουν κυρίως τον Ιστικό Παράγοντα (Tissue Factor) ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνειά τους . Ο ενεργός Ιστικός Παράγοντας δρα σε συνεργασία με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και επιτείνει τη ικανότητα του Παράγοντα VIII να ενεργοποιεί την Εξωγενή Οδό Πήξης . Όταν τα μονοκύτταρα διεγερθούν από παράγοντες όπως η ενδοτοξίνη , τα ανοσοσυμπλέγματα και η πρωτεΐνη του Συμπληρώματος C5a , αυξάνεται η παραγωγή του Ιστικού Παράγοντα κατά τρόπο χρονοεξαρτώμενο και δόσοεξαρτώμενο . Η βιοσύνθεση και μεταφορά του Ιστικού Παράγοντα στην κυτταρική μεμβράνη απαιτεί μόλις δύο ώρες και προϋποθέτει την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} και μεταβολές στα επίπεδα των Κυκλικών Νουκλεοτιδίων και στην δράση των Φωσφολιπασών . Άλλοι παράγοντες πήξης που είναι γνωστό ότι εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα είναι ο Ενεργοποιητής της Προθρομβίνης και οι Παράγοντες II , VII , IX , X και XIII . Οι πρόδρομες μορφές των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων παράγουν επίσης Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου και έναν αναστολέα του (Μινακτιβίνη) , ενώ τα ώριμα μακροφάγα παράγουν κυρίως την Ουροκινάση . Η ουροκινάση συνδέεται στους ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των μονοκυττάρων και προκαλεί αύξηση του μεγέθους τους και της κινητικότητάς τους .

ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ .

Μετά την αναγνώριση των αντιγόνων που τους παρουσιάζονται τα λεμφοκύτταρα είναι επιρρεπή στην επίδραση κυτταροκινών που προκαλούν την ενεργοποίησή τους . Οι κυτταροκίνες αυτές συνήθως παράγονται από μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που με αυτό τον τρόπο είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και τον ρυθμιστικό έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης . Εκτός όμως από εκείνες τις κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων , τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα επίσης εκκρίνουν ορισμένους αυξητικούς παράγοντες όπως π.χ. PDGF, TGF- α , TGF- β , IGF και b-FGF .

Στον πίνακα που ακολουθεί θα παρουσιαστούν οι κυριότερες κυτταροκίνες που παράγονται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .



ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΠΟΥ ΕΚΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Κυτταροκίνη	Άλλες ονομασίες της	Διεγέρτης έκκρισης	Βιολογική Δράση της
INF α	Άλλες ονομασίες της INF τύπου I	Ιοί , βακτήρια	Ισοστατική , αντιμικροβιακή , αυξάνει την έκφραση των αντιγόνων MHC-II και την δράση των Κυττάρων NK .
M-CSF	MGF, CSF-1, MGI-1M	LPS, IL-1	Προάγει την δημιουργία αποικιών από μακροφάγα , ισοστατική δράση , επάγει την έκκριση Ενεργοποιητή Πλασμινογόνου , PGE $_2$, IL-1 , INF γ , TNF α
GM-CSF	NIF-T, CSF-2 , MGI-1GM	LPS, IL-1, TNF α	Προάγει την δημιουργία αποικιών από μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα , προστατεύει από βακτηριακές και παρασιτικές λοιμώξεις , επιτείνει τις λειτουργίες των κοκκιοκυττάρων , επάγει την έκκριση O $_2$ ⁻¹ , PGE $_2$, IL-1 , TNF α
G-CSF	DF, CSF β , MGI-2	LPS, IL-1	Προάγει την δημιουργία αποικιών από κοκκιοκύτταρα , συντελεί στην διαφοροποίηση και επιτείνει τις λειτουργικές ιδιότητες των κοκκιοκυττάρων .
TNF α	Καχεκίνη	LPS, IL-1, IL-2, M-CSF	Προκαλεί νέκρωση των νεοπλασμάτων , σηπτική καταπληξία , πυρετό και καχεξία , ευοδώνει την αντίδραση Οξείας Φάσης , έχει αντιπαρασιτική δράση , επάγει την έκκριση IL-1, IL-6 και GM-CSF και την έκφραση MHC-I , MHC-II και ICAM-1 .
IL-1	BAF, ETAF, LAF	LPS, IL-2, TNF α και η παρουσίαση αντιγόνου	Επάγει την έκκριση IL-2, IL-4, IL-6 και TNF α Προκαλεί πυρετό , ύπνο REM και προάγει την Αντίδραση Οξείας Φάσης . Επάγει την παραγωγή PGE $_2$ και κολλαγενάσης και την απορρόφηση του οστίτη και του χονδριτη ιστού
IL-6	BSF-2 , INF β 2 , HSF	IL-1 , TNF α , PDGF	Προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος , επάγει την έκφραση υποδοχέων IL-2R από τα T-λεμφοκύτταρα , την έκκριση ανοσοσφαιρινών από τα B-λεμφοκύτταρα , την Παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από τα ηπατοκύτταρα και την ανάπτυξη πυρετού .
PDGF	PDGF-I , PDGF-II	LPS, Θρομβίνη, Λεκτίνες και zymosan .	Επάγει την έκκριση IL-1 και την έκφραση υποδοχέων για IL-1, INF γ , INF β , PGE $_2$ και LDL . Επιτείνει την μεταφορά αμινοξέων , την σύνθεση κολλαγόνου , την έκφραση των ογκογονιδίων c-myc και c-fos , την αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης , την χημειοταξία και τον πολλαπλασιασμό των μεσεγγυματικών κυττάρων
TGF β	Δεν υπάρχει	Άγνωστο ακόμα	Αναστολή όλων των επιδράσεων της IL-2 και ορισμένων επιδράσεων των EGF, FGF και PDGF . Ευοδώνει την επούλωση και την ίνωση , την έκφραση των ιντεγκρινών και την κυτταρική διαφοροποίηση .

Ο Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (TNF) είναι η πρώτη κυτταροκίνη που περιγράφηκε . Έχει αποδειχθεί ότι ειδικά τα μακροφάγα παράγουν τον TNF α (καχεκίνη) ο οποίος προκαλεί την καχεξία που συνοδεύει τις νεοπλασματικές και παρασιτικές νόσους . Ο TNF α παρουσιάζει 28% ομολογία δομής με τον TNF β (λεμφοτοξίνη) , αλλά ο υποδοχέας τους είναι κοινός . Στον άνθρωπο τα μόρια του TNF α ενώνονται σε τριμερή ενώ κάθε μονομερές έχει MB 17 kDa και αποτελείται από 167 αμινοξέα . Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TNF α εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια MHC . Όταν τα μακροφάγα διεγείρονται από ενδοτοξίνες και άλλα μικροβιακά προϊόντα ή από κυτταροκίνες (IL-1, IL-2, GM-CSF κ.α.) παράγουν μεγάλες ποσότητες TNF α που προκαλεί αιμορραγική νέκρωση των όγκων , καχεξία , πυρεξία , σηπτική καταπληξία

(septic shock syndrome) , παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης , γαλακτική οξέωση , απορρόφηση του οστίτη ιστού, υπερπλασία των ινοβλαστών και διαταραχές της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες προκαλούν υπερπηκτικότητα και Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη . Ο TNFα καταστρέφει ή καταστέλλει την ανάπτυξη πολλών παρασίτων και παρουσιάζει ταυτόχρονα κυταροστατική και κυταροτοξική δράση κατά πολλών ειδών νεοπλασματικών κυττάρων . Ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα . Τέλος επάγει την έκκριση των κυταροκινών IL-1, IL-6 και GM-CSF και την έκφραση των μορίων ICAM-1 (CD54) . (Sherry και Cerami , 1988 , Simpson και συν.,1994) .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που έρχονται σε επαφή με ιούς , βακτήρια , καρκινικά κύτταρα ή με ξένα κύτταρα παράγουν την Ιντερφερόνη INFα , η οποία έχει ιστατικές και αντιμιτωτικές επιδράσεις . Εκτός από αυτά προκαλεί και αυξημένη έκφραση των μορίων MHC-II στην επιφάνεια των μακροφάγων και επίσης αυξάνει την δραστηριότητα των κυττάρων NK .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που διεγείρονται από ενδοτοξίνες ή Ιντερλευκίνη IL-1 εκκρίνουν τους Παράγοντες Δημιουργίας Αποικιών (CSF) M-CSF, GM-CSF και G-CSF . Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν την δημιουργία λευκοκυτταρικών αποικιών καθώς και την ωρίμαση και διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων και την επίταση των λειτουργικών τους ικανοτήτων . Επίσης ευοδώνουν την παραγωγή κυταροκινών και ενζύμων από τα κύτταρα αυτά . (Lewis και McGee, 1992) . Όμως μακροφάγα που έχουν επωαστεί in vitro με τον παράγοντα M-CSF φαίνεται ότι καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και αυτή η επίδραση τους επιτρέπει να ασκούν έναν επιπλέον ανοσορυθμιστικό ρόλο (Wing και συν., 1986) .

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα παράγουν τις Ιντερλευκίνες IL-1 , IL-6 και IL-8 . Από αυτές τις Ιντερλευκίνες η IL-1 παρουσιάζει την σημαντικότερη ανοσορυθμιστική δράση γιατί ελέγχει την έκκριση των κυταροκινών IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 και TNFα . Η IL-1 αποτελεί μια οικογένεια πολυπεπτιδίων με πολλαπλές βιολογικές δράσεις που περιλαμβάνουν την επίταση των ανοσολογικών δραστηριοτήτων των κυττάρων NK , των Τ-λεμφοκυττάρων και Β-λεμφοκυττάρων , την υπερπλασία των ινοβλαστών , την χημειοτακτική κίνηση μονοκυττάρων , πολυμορφοπυρήνων και λεμφοκυττάρων . Επίσης προκαλεί ουδετεροφιλία στο αίμα και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων στους ιστούς . Η IL-1 προκαλεί την παραγωγή PGE₂ , πρωτεϊνών Οξείας Φάσης και Κολλαγενάσης , ενώ συσχετίζεται με την ανάπτυξη πυρεξίας , υπότασης και Ύπνου Βραδέων Κυμάτων . Επίσης προάγει την απορρόφηση του οστίτη ιστού και του χόνδρου και την υπερπλασία των πρόδρομων μυελοκυττάρων στον μυελό των οστών . Τέλος δρα σε συνέργεια με την INFγ και την IL-2 για την επίταση των αντινεοπλασματικών δραστηριοτήτων των κυττάρων NK . Η IL-6 παράγεται επίσης από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα αλλά και από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα , ινοβλάστες και ορισμένα είδη νεοπλασματικών κυττάρων . Η έκκρισή της διεγείρεται από άλλες κυταροκίνες όπως η IL-1 , ο TNFα και ο PDGF . Τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την IL-4 , η οποία καταστέλλει την έκκριση της IL-6 . Η IL-6 κυρίως προκαλεί μεταβολές στον ρυθμό παραγωγής των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από τα ηπατοκύτταρα . Επίσης προκαλεί υπερπλασία των άωρων και ώριμων Τ-λεμφοκυττάρων και την έκφραση υποδοχέων για την IL-2 στην επιφάνειά τους . Έχει προταθεί από ορισμένους ερευνητές ότι η IL-6 μπορεί να επιτείνει τον πολλαπλασιασμό όλων των κυττάρων του αίματος και να προκαλέσει την διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από αυτά . Η IL-8 εκκρίνεται όχι μόνο από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα αλλά και από τα λεμφοκύτταρα , ηπατοκύτταρα , ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες του δέρματος . Η κυταροκίνη αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση και χημειοτακτική κίνηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων ενώ αναστέλλει την έκκριση Ιντερφερόνης-γ από τα κύτταρα NK . Η έκφραση του γονιδίου της IL-8 στα μονοκύτταρα ρυθμίζεται από την δράση των LPS, PGE₂ , IL-1 , TNFα και INFγ . (Lewis και McGee, 1992)

Τα μακροφάγα επίσης παράγουν τον Αυξητικό Παράγοντα TGFβ των τύπων 1, 2 και 3 . Ο TGFβ έχει πολυάριθμες ιδιότητες όπως την καταστολή όλων των επιδράσεων της IL-2 καθώς και της έκφρασης των υποδοχέων IL-2R . Επίσης δρα χημειοτακτικά για τα μονοκύτταρα και τους ινοβλάστες . Ο παράγων TGFβ επάγει την έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου τύπων I, III και IV , καθώς επίσης προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την παραγωγή Κολλαγενάσης . Για τους παραπάνω λόγους έχει θεωρηθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επούλωση και την ίνωση . Ο TGFβ ασκεί κατασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων , επιθηλιακών κυττάρων , κερατινοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων . Επίσης καταστέλλει την παραγωγή και έκκριση Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από τα μακροφάγα (Nathan και Hibbs, 1991) . Τέλος επηρεάζει την έκφραση των Ιντεγκρινών και καταστέλλει τις επιδράσεις ορισμένων άλλων αυξητικών παραγόντων , όπως οι EGF, PDGF και FGF .

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και διηθούν τα συμπαγή νεοπλάσματα σε μεγάλους αριθμούς και να προκαλούν την λύση των καρκινικών κυττάρων . Αυτός έχει θεωρηθεί ότι αποτελεί τον κύριο μηχανισμό άμυνας απέναντι στην νεοπλασία .

Είναι γνωστό ότι σε *in vitro* συνθήκες (κυτταροκαλλιέργειες) τα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται από την ενδοτοξίνη ή από κυτταροκίνες και καταστρέφουν (λύουν) τα νεοπλασματικά κύτταρα . Δεν είναι ακόμα καλά κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο τα μακροφάγα και μονοκύτταρα αναγνωρίζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα μετά την άμεση επαφή τους (Fidler, 1985) . Έχουν όμως περιγραφεί τρεις μηχανισμοί με τους οποίους τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ελέγχουν και καταστέλλουν τα καρκινικά κύτταρα .

1. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥΣ . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω χημικών διαμεσολαβητών που επιδρούν σε όλα τα κύτταρα που υπόκεινται σε μιτωτική διαίρεση . Τέτοιοι χημικοί διαμεσολαβητές περιλαμβάνουν την IL-1 , τον TNFα , την PGE₂ και πολλές άλλες ουσίες που ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί . Αυτή η αντιμιτωτική δράση δεν προϋποθέτει την επαφή των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων με τα καρκινικά κύτταρα και επιτελείται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα .

2. ΜΗ-ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ . Τα μακροφάγα είναι ικανά να ασκούν άμεση κυτταροτοξική δράση κατά των νεοπλασματικών κυττάρων , η οποία δεν εξαρτάται από την παρουσία αντισωμάτων ή από φαγοκυτταρικές διεργασίες . Η επίδραση αυτή είναι βραδεία (απαιτεί 1 ως 3 ημέρες για να ολοκληρωθεί) και προϋποθέτει την άμεση επαφή του μακροφάγου με το νεοπλασματικό κύτταρο . Μετά την αναγνώριση του καρκινικού κυττάρου-στόχου από το μακροφάγο ακολουθεί σύνδεση των δύο κυττάρων και έκκριση κυτταροτοξικών ουσιών , όπως ο TNFα , οι Πρωτεάσες Σερίνης και διάφοροι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου και Αζώτου . (Nathan και Hibbs, 1991 , Lewis και McGee, 1992) .

3. ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ADCC) . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν την Εξαρτημένη από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητα για να καταστρέφουν τα νεοπλασματικά κύτταρα που έχουν καλυφθεί από ανοσοσφαιρίνες . Η τυπική μορφή αυτής της κυτταροτοξικής αντίδρασης από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα επιτελείται ταχύτατα και απαιτεί κάλυψη των κυττάρων-στόχων από πολυκλωνικά αντισώματα . Το Fab τμήμα των ανοσοσφαιρινών συνδέεται με αντιγόνα της επιφάνειας του καρκινικού κυττάρου ενώ το Fc τμήμα συνδέεται με τους ειδικούς υποδοχείς των μακροφάγων . Η σύνδεση του FcR-II υποδοχέα του μακροφάγου με τις ανοσοσφαιρίνες που καλύπτουν το νεοπλασματικό κύτταρο προκαλεί την έκκριση των λυτικών ουσιών οι οποίες θα το καταστρέψουν δηλαδή Ουδέτερες Πρωτεάσες , TNFα , Πρωτεΐνες του Συμπληρώματος και

Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου και Αζώτου . Η κυτταροτοξική αυτή αντίδραση εμφανίζεται μόνο στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και δεν προϋποθέτει την φαγοκυττάρωση του καρκινικού κυττάρου , ούτε και την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) . (Nathan και συν., 1980 , Lewis και McGee, 1992) .

Επίσης τα μακροφάγα χρησιμοποιούν και άλλους μηχανισμούς , οι οποίοι ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως . Ένας αναερόβιος μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων αφορά την έκκριση Αργινάσης από τα μακροφάγα , η οποία στερεί την αργινίνη από τα νεοπλασματικά κύτταρα . Ενδεχομένως κάποιο ρόλο στην αντινεοπλασματική δραστηριότητα των μακροφάγων να διαδραματίζουν και πρωτεΐνες όπως οι Ντεφενσίνες και οι Σεπροσιδίνες .

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι και τα νεοπλασματικά κύτταρα εκκρίνουν ουσίες που καταστέλλουν την αντινεοπλασματική δράση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , όπως π.χ. μειώνοντας την χημειοταξία και την φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα .



Κεφάλαιο 1-6 . Οι υποδοχείς επιφανείας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα βιοσυνθέτουν περισσότερα από εκατό διαφορετικά είδη μορίων και έτσι αποτελούν τα κύτταρα με την μεγαλύτερη βιοσυνθετική δραστηριότητα μέσα στο σώμα . Από αυτά τα μόρια ορισμένα εκκρίνονται στον μεσοκυττάριο χώρο ενώ άλλα αποτελούν δομικά στοιχεία του κυττάρου . Ανάμεσα στα δομικά στοιχεία περιλαμβάνονται και οι υποδοχείς επιφανείας των κυττάρων αυτών .

Οι Υποδοχείς Επιφανείας που διαθέτουν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα στην επιφάνειά τους ανταποκρίνονται στις πολλαπλές λειτουργίες στις οποίες τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να συμμετέχουν και στον βιολογικό και λειτουργικό ρόλο τον οποίο είναι προορισμένα να επιτελούν . Έτσι τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς επιφανείας που συσχετίζονται με την ικανότητά τους να φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς , να ενεργοποιούν τα Τ-λεμφοκύτταρα , να ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες ή από μόρια-διεγέρτες , να ενδοκυττώνουν και να μεταβολίζουν τοξίνες ή άλλα μόρια (π.χ. λιποπρωτεΐνες) και να ανταποκρίνονται σε ενδοκρινικές και παρακρινικές ορμονικές επιδράσεις . Αυτοί οι υποδοχείς εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και είναι συνήθως πρωτεϊνικής φύσεως . Τα μόρια που συνδέονται με τους υποδοχείς αυτούς ονομάζονται Υποκαταστάτες (Ligands) . Συνήθως υπάρχει μόνο ένας υποκαταστάτης για κάθε υποδοχέα . (Lewis και McGee, 1992) .

Επίσης , εκτός από τους υποδοχείς υπάρχουν και άλλα χαρακτηριστικά μόρια στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων που δεν συνδέονται με Υποκαταστάτες αλλά έχουν άλλο λειτουργικό σκοπό και συμμετέχουν σε άλλες βιολογικές δράσεις . Τα μόρια αυτά ονομάζονται **Αντιγόνα Επιφανείας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων** ή αλλιώς **Δείκτες Επιφανείας (Surface Markers)** . Εξετάζονται μαζί με τους υποδοχείς επιφανείας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων επειδή χρησιμεύουν στην ανοσοιστοχημική αναγνώριση του τύπου των κυττάρων . Έτσι με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τους υποδοχείς και τους δείκτες στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι σήμερα δυνατό να διαχωριστούν τα κύτταρα αυτά από άλλα με παρόμοια μορφολογία στο οπτικό μικροσκόπιο . Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως η λειτουργία και η βιολογική σημασία όλων των αντιγόνων επιφανείας των κυττάρων αυτών . Επίσης δεν είναι εύκολο να μελετηθούν όλες οι πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες παράγονται από τα μακροφάγα και τοποθετούνται στην κυτταρική τους μεμβράνη γιατί ορισμένες από αυτές ανανεώνονται με ταχύτατους ή μεταβαλλόμενους ρυθμούς (Karlan και συν., 1979) .

Έτσι τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εκφράζουν ένα πλήθος από διαφορετικά μόρια στην επιφάνειά τους που επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή τους με μικροοργανισμούς , κύτταρα και μακρομόρια . Μέσα στα πλαίσια των φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αυτά τα μόρια αποτελούν τους διαμεσολαβητές των βιολογικών δραστηριοτήτων τους , επιτρέποντας την ενδοκύττωση , την πρόσδεση σε άλλα κύτταρα ή υποστρώματα , την έναρξη εκκριτικών δραστηριοτήτων και τέλος την γενικότερη ενεργοποίηση του κυττάρου .



Στην συνέχεια παρατίθεται ένας συνοπτικός πίνακας που περιέχει τους κυριότερους υποδοχείς και τα αντιγόνα της επιφάνειας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Τα αναφερόμενα μόρια αποτελούν μόνο ένα τμήμα από το πλήθος των μορίων της επιφάνειας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Είναι εμφανές ότι αυτή η πληθώρα διαφορετικών υποδοχέων και αντιγόνων επιφάνειας επιτρέπει την ενεργό συμμετοχή τους σε πολυάριθμες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες . (Gordon και συν., 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

1. Υποδοχείς για το Fc-τμήμα των IgG-ανοσοσφαιρινών . (Υποδοχείς FcR-I , FcR-II και FcR-III) .
2. Υποδοχείς για το Fc-τμήμα των IgA και IgE ανοσοσφαιρινών
3. Υποδοχείς για τους παράγοντες του συμπληρώματος C3b, C3bi, C5a και C1q .
4. Υποδοχείς για Κυτταροκίνες , όπως οι Ιντερλευκίνες (IL-1, IL-2, IL-3 και IL-4) , οι Ιντερφερόνες (INFα, INFβ και INFγ) , οι Παράγοντες Ανάπτυξης Αποικιών (M-CSF και GM-CSF) και οι κυτταροκίνες MAF, MIF, LIF και MFF .
5. Υποδοχείς για μικρά μόρια και πεπτιδία όπως η 1,25-διυδροξυ-Βιταμίνη D , η Ουσία P , οι Ενδορφίνες, οι Εγκεφαλίνες , η ACTH , τα Μουραμυλ-διπεπτιδία και τα Ν-φορμυλιωμένα πεπτιδία
6. Υποδοχείς για την Τρανσφερρίνη και την Λακτοφερρίνη .
7. Υποδοχείς για Λιποπρωτείνες , όπως η LDL και οι Απολιποπρωτείνες Β και Ε .
8. Υποδοχείς για Λιπίδια , όπως οι προσταγλανδίνες, οι λευκοτριένες, οι θρομβοζάνες και ο PAF .
9. Υποδοχείς για τους Παράγοντες Πήξης , όπως το ινωδογόνο, το ινώδες και ο Παράγοντας VII .
10. Υποδοχείς για Ινωδολυτικούς Παράγοντες , όπως η α1-αντιθρομβίνη και η Ηπαρίνη .
11. Υποδοχείς για την Ινωδονεκτίνη και την Λαμίνη .
12. Υποδοχείς για πλάγιες αλυσούς Μαννόζης-Φουκόζης .
13. Υποδοχείς για την α2-Μακροσφαιρίνη .
14. Υποδοχείς για ορμόνες , νευρομεταβιβαστές και αυτακοειδή όπως η Ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, η Αγγειοτενσίνη, η Ισταμίνη, η Σεροτονίνη , η Ακετυλοχολίνη και η Αδρεναλίνη (α1- και β2-υποδοχείς)
15. Υποδοχείς για Λιποπολυσακχαρίτες (Ενδοτοξίνες) , όπως ο CD-14.
16. Αντιγόνα Επιφάνειας CD-4 .
17. Αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας Τύπου I (MHC Class-I molecules) .
18. Αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας Τύπου II (MHC Class-II molecules) .
19. Αντιγόνα της κατηγορίας των Ιντεγκρινών (Integrins) όπως τα LFA-1 και gp-150,95 .
20. Μόρια ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) που διαμεσολαβούν την προσκόλληση κυττάρων .

Στην συνέχεια θα δοθούν αναλυτικές λεπτομέρειες για ορισμένα είδη Υποδοχέων και Αντιγόνων που εντοπίζονται στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και έχουν μεγάλη βιολογική σημασία .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ Fc-ΤΜΗΜΑ ΤΩΝ IgG-ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς επιφάνειας που συνδέουν το Fc-τμήμα των IgG-ανοσοσφαιρινών . Αυτοί περιλαμβάνουν τους υποδοχείς FcR-I (CD-64) , FcR-II (CDw-32) και FcR-III (CD-16) . Οι υποδοχείς αυτοί έχουν ανιχνευθεί να εκφράζονται ταυτοχρόνως σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού , περιτοναϊκά μακροφάγα και μονοκύτταρα (Anderson και συν., 1990 , Lohmann-Matthes και συν., 1994) .

Από τους προαναφερθέντες μόνο ο υποδοχέας FcR-I είναι υψηλής συγγένειας για τις μονομερείς ανοσοσφαιρίνες . Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι ο FcR-I υποδοχέας εκφράζεται εντονότερα στα ιστικά μακροφάγα παρά στα μονοκύτταρα , πιθανώς για να προφυλάσσεται από την άσκοπη σύνδεση με τις ανοσοσφαιρίνες του πλάσματος . Όταν τα μακροφάγα ενεργοποιηθούν από Ιντερφερόνη-γ επάγεται η έκφραση των υποδοχέων αυτών σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό . Ο FcR-I έχει MB 72 kDa και είναι γλυκοπρωτεΐνη με μονή πεπτιδική αλυσίδα . Μια μορφολογική ιδιαιτερότητα του FcR είναι ότι διαθέτει τρεις εξωκυτταρικές μοίρες αντί για δύο . Πιθανώς αυτή η τρίτη μοίρα του προσδίδει την υψηλή συγγένεια για τις μονομερείς IgG . Συνδέει τις ανοσοσφαιρίνες IgG1 και IgG3 με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι τις IgG4 και IgG2 . Εκτός από την φαγοκυττάρωση οι FcR-I υποδοχείς

επίσης συμμετέχουν στην Εξαρτημένη από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητα (ADCC) και στην διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης . (Zembala και Asherson, 1989) .

Σε αντίθεση με τον FcR-I που συνδέει μονομερείς ανοσοσφαιρίνες , οι FcR-II και FcR-III υποδοχείς συνδέουν κυρίως ανοσοσυμπλέγματα . Επιπλέον συνδέουν μόνο τα ανοσοσυμπλέγματα που αποτελούνται από IgG1 και IgG3 ανοσοσφαιρίνες . Και οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στις γλυκοπρωτεΐνες , με MW αντίστοιχα 42 kDa και 50-70 kDa . Για τον FcR-II έχει αποδειχθεί ότι στον άνθρωπο κωδικοποιείται από τρία γονίδια με σημαντική ομολογία στην ενδοκυττάρια μοίρα τους αλλά διαφορές στην εξωκυττάρια μοίρα τους . Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν τρία διαφορετικά μόρια FcR-II (A, B και C) τα οποία έχουν παρόμοια ικανότητα δέσμησης των IgG ανοσοσφαιρινών αλλά ενεργοποιούν διαφορετικές οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων . Ο υποδοχέας είναι συνδεδεμένος στον κυτταροσκελετό του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου . Ο υποδοχέας FcR-III είναι διαφορετικός από τους υπόλοιπους υποδοχείς γιατί συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας ομάδας φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI-anchor) και έτσι στερείται κυτταροπλασματικής μοίρας . Έτσι ο υποδοχέας αυτός δεν προκαλεί δημιουργία Δεύτερων Μηνυτόρων . Η σύνδεσή του στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης του προσδίδει υψηλή κινητικότητα . Όταν ένα ανοσοσυμπλέγμα συνδεθεί με ένα μόριο FcR-III παρατηρείται μετακίνηση και συσσώρευση πολλών ακόμα μορίων υποδοχέα στην ίδια θέση . Ο FcR-III λείπει από τα μονοκύτταρα ενώ εκφράζεται σε διαφορετικό βαθμό στα διάφορα είδη μακροφάγων . Τα μακροφάγα του σπλήνα χρησιμοποιούν αυτόν τον υποδοχέα για την κάθαρση της κυκλοφορίας από γηρασμένα ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια που οψωνοποιήθηκαν με IgG ενώ τα κύτταρα Kupffer χρησιμοποιούν τους CR-υποδοχείς για την κάθαρση της κυκλοφορίας από κύτταρα οψωνοποιημένα με C3 . (Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) .

Όλοι οι προαναφερθέντες υποδοχείς συμμετέχουν στα φαινόμενα της ενδοκύττωσης και της διαμεμβρανικής μεταγωγής μηνυμάτων μέσω γέννησης Δεύτερων Μηνυτόρων . Ένα παράδειγμα αποτελεί το ότι για τους FcR-υποδοχείς που συνδέουν τις ανοσοσφαιρίνες IgG2a και IgG2b έχει προταθεί ότι δρουν μέσω άμεσης ενεργοποίησης της Κινάσης της Καζείνης (CK-II) και της Φωσφολιπάσης A2 (PLA2) ενώ ταυτόχρονα προκαλούν έμμεση ενεργοποίηση της Αδενυλικής Κυκλάσης (Suzuki, 1991) . Οι υποδοχείς FcR είναι δομικά όμοιοι σε μονοκύτταρα και σε κυτταρικές σειρές με ιδιότητες μονοπύρηνων φαγοκυττάρων όπως τα κύτταρα U937 και HL-60 , στα οποία επίσης εξυπηρετούν την φαγοκυττάρωση (Frey και Engelhardt, 1987) . Επίσης οι FcR-υποδοχείς συμμετέχουν στην έκφραση Εξαρτημένης από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητας (ADCC) στην κυτταρική σειρά U937 που έχει ιδιότητες μονοκυττάρων (Lattick και συν., 1980) . Η δυσλειτουργία των FcR-υποδοχέων των μακροφάγων , όπως συμβαίνει στους αλκοολικούς , οδηγεί στην ανάπτυξη θανατηφόρων υποτροπιαζόντων βακτηριακών λοιμώξεων (Gomez και συν., 1994) .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ .

Τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα διαθέτουν στην επιφάνειά τους τρεις τύπους υποδοχέων για τους παράγοντες του Συμπληρώματος . Αυτοί είναι οι CR1 (CD-35) που αναγνωρίζει τον παράγοντα C3b και πιθανώς τον C4 , ο CR3 (Mac-1 ή CD-11b/CD-18) που μάλλον αναγνωρίζει τον παράγοντα C3bi και ο CR4 για τον οποίο ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί ο Υποκαταστάτης . Οι υποδοχείς για τις πρωτεΐνες του Συμπληρώματος εξυπηρετούν την ενδοκύττωση οψωνοποιημένων σωματιδίων . Ένα

παράδειγμα είναι η φαγοκυττάρωση του οψωνοποιημένου με συμπλήρωμα *Mycobacterium tuberculosis* από την συνδυασμένη δράση των CR1 και CR3 υποδοχέων (Schlesinger και συν., 1990).

Ο υποδοχέας CR1 είναι γλυκοπρωτεΐνη με τέσσερεις αλλότυπους (A, B, C και D) των οποίων τα Μοριακά Βάρη κυμαίνονται μεταξύ 160-250 kDa . Κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 1 μαζί με άλλα γονίδια (π.χ. της IL-2) που χαρακτηρίζονται από την αλληλουχία 61 αμινοξέων που δημιουργεί τις SCR-έλικες . Οι CR3 και CR4 αποτελούν ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των Ιντεγκρινών και αποτελούνται από μια κοινή β-αλυσίδα με MB 95 kDa και μία α-αλυσίδα . Η β-αλυσίδα κωδικοποιείται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 21 . Η α-αλυσίδα του CR3 έχει MB 165 kDa και το γονίδιο της είναι κωδικοποιημένο στο χρωμόσωμα 16 . Η α-αλυσίδα του CR4 έχει MB 150 kDa . Ο υποδοχέας CR1 συνδέει ανοσοσυμπλέγματα στην επιφάνεια των μακροφάγων αλλά πρέπει να ενεργοποιηθούν τα κύτταρα για να γίνει ενδοκύτωση . Ο υποδοχέας CR3 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και στα λυσοσωματικά κοκκία των μονοκυττάρων και σε μικρότερο βαθμό των μακροφάγων . Διαθέτει μια αλληλουχία 200 αμινοξέων ομόλογη με αλληλουχίες πρωτεϊνών που συνδέουν το κολλαγόνο . Επίσης διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης του παράγοντα iC3b η οποία χαρακτηρίζεται από την αλληλουχία αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος . Τέλος διαθέτει τρεις ακόμα περιοχές για την σύνδεση των β-γλυκανών , των αντιγόνων του Ιστοπλάσματος (*Histoplasma capsulatum*) και των λιποπολυσακχαριτών (ενδοτοξινών) των Gram (-) μικροβίων . Έτσι ο CR3 υποδοχέας διαθέτει πολλαπλές ικανότητες δέσμευσης μορίων . Ο CR4 υποδοχέας έχει μεγάλη δομική ομοιότητα με τον CR3 και εκφράζεται κυρίως από τα ιστικά μακροφάγα . Διαθέτει περιοχές σύνδεσης των παραγόντων του συμπληρώματος iC3b και C3dg καθώς και των αντιγόνων του *Histoplasma capsulatum* . (Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) :

Όταν τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα είναι σε κατάσταση ηρεμίας δεν εκφράζουν τους υποδοχείς CR1 στην επιφάνειά τους αλλά κάτω από την κυτταρική μεμβράνη τους . Όταν ενεργοποιηθούν από LPS ή IL-1 οι υποδοχείς μεταναστεύουν στην επιφάνεια του κυττάρου . Αυτοί οι CR1 υποδοχείς διαμεσολαβούν μόνο την ενδοκύτωση και όχι φαγοκυτταρικές διεργασίες ή την έναρξη της Οξειδωτικής Έκρηξης . Μετά από την διέγερση του κυττάρου , π.χ. από επαφή με Ινωδονεκτίνη , οι υποδοχείς CR1 συμμετέχουν και στην φαγοκυττάρωση και στην Οξειδωτική Έκρηξη . Συχνά δρουν συνεργικά με τους υποδοχείς για τις IgG-ανοσοσφαιρίνες . Στον άνθρωπο υπάρχουν ενδείξεις ότι οι υποδοχείς CR1 συμμετέχουν στην απομάκρυνση κυττάρων και μικροβίων που έχουν οψωνοποιηθεί με C3b . Επειδή όμως τα ερυθροκύτταρα κυρίως είναι οψωνοποιημένα με iC3b δεσμεύονται από τον υποδοχέα CR3 ενώ τα μικρόβια που οψωνοποιούνται από τον παράγοντα C3b μέσω της εναλλακτικής οδού ενεργοποίησης του συμπληρώματος δεσμεύονται από τον CR1 υποδοχέα . (Zembala και Asherson, 1989) .

Οι υποδοχείς CR3 μοιάζουν με τους CR1 στο ότι σε κανονικές συνθήκες εντοπίζονται μέσα στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και μεταναστεύουν στην επιφάνεια των κυττάρων μόνο μετά από ενεργοποίηση του φαγοκυττάρου . Δεσμεύουν κυρίως τον καθηλωμένο παράγοντα iC3b που οψωνοποιεί ερυθροκύτταρα και σωματίδια αλλά δεν προκαλούν φαγοκυττάρωση ή διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης αν το κύτταρο δεν έχει προηγουμένως ενεργοποιηθεί από επαφή με Ινωδονεκτίνη ή Εστέρες Φορβόλης . Είναι πιθανό να υπάρχουν δύο υποκατηγορίες CR3 υποδοχέων , οι συνδεδεμένοι με την ακτίνη του κυτταροσκελετού και οι μη-συνδεδεμένοι . Μόνο οι υποδοχείς που

είναι συνδεδεμένοι με την ακτίνη μπορούν να προκαλέσουν την φαγοκυττάρωση των δεσμευμένων σωματιδίων ή κυττάρων . Τέλος είναι ενδιαφέρον το ότι ο CR3-υποδοχέας διαθέτει πολλούς αντιγονικούς επίτοπους που αναγνωρίζονται από διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα , όπως τα M1/70, OKM-1, OKM-9, OKM-10 και IB-4 (Wright και συν., 1983) .

Οι υποδοχείς CR4 δεσμεύουν τον παράγοντα iC3b ο οποίος έχει καθηλωθεί στην επιφάνεια των οψωνοποιημένων κυττάρων και σωματιδίων . Είναι σταθερά συνδεδεμένοι με τον κυτταροσκελετό και δεν μετακινούνται μέσα στην κυτταρική μεμβράνη . Δρουν συνδυαστικά με τους ευκίνητους CR3 υποδοχείς και είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της φαγοκυττάρωσης των ήδη δεσμευμένων σωματιδίων και κυττάρων .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν κυτταροκίνες . Επίσης διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν την παρουσία κυτταροκινών . Οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομολογία . Ορισμένοι από τους υποδοχείς κυτταροκινών είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες ενώ άλλοι φαίνεται να προκαλούν άμεσα την διέγερση Κινασών .

Ορσμένες από τις κυτταροκίνες για τις οποίες τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς όπως η INF γ και ο TNF α , είναι συνδεδεμένες με την ενεργοποίηση τους και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση πολυάριθμων βιολογικών φαινομένων . Για παράδειγμα η σύνδεση της INF γ με τον υποδοχέα της στην επιφάνεια των μακροφάγων προκαλεί αυξημένη παραγωγή Ελευθέρων ριζών Οξυγόνου και Αζώτου και αυξημένη έκφραση των αντιγόνων MHC-II . Στον πίνακα που ακολουθεί παραθέτονται ορισμένες από τις πιο χαρακτηριστικές επιδράσεις που σχετίζονται με την διέγερση των υποδοχέων κυτταροκινών . (Lewis και McGee, 1992) .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ .		
ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΠΗΓΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ
IL-1	Μακροφάγα	Έκκριση IL-1, TNF α και CSF .
IL-3	T-λεμφοκύτταρα	Κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση , ενεργοποίηση .
IL-4	T-λεμφοκύτταρα , NK-cells	Αυξημένη έκφραση MHC-II, επαγωγή του Fc-υποδοχέα της IgE και παρουσίαση αντιγόνων στα T-λεμφοκύτταρα .
M-CSF	Μακροφάγα , Ινοβλάστες	Κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση , επαγωγή ενζύμων .
GM-CSF	T-λεμφοκύτταρα , Ινοβλάστες , Μακροφάγα .	Κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση , πιθανή συμμετοχή στην ενεργοποίηση των μακροφάγων .
TNF α	Μακροφάγα	Έκκριση IL-1, PAF και PGE $_2$, αυξημένη χημειοταξία .
INF α	Λευκοκύτταρα .	Ιστατική δράση , συμμετοχή στην ενεργοποίηση .
INF β	Ινοβλάστες	Ιστατική δράση , συμμετοχή στην ενεργοποίηση .
INF γ	T-λεμφοκύτταρα , NK-cells	Ιστατική δράση , ενεργοποίηση των μακροφάγων .
TGF β παύση της	Αιμοπετάλια , μακροφάγα .	Χημειοταξία , έκκριση Αυξητικών Παραγόντων , ενεργοποίησης των μακροφάγων .

Από τον πίνακα αυτόν φαίνεται το πλήθος των επιδράσεων των κυτταροκινών που απαιτούν την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων στην επιφάνεια των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων για να πραγματοποιηθούν .

Ο Παράγοντας Δημιουργίας Αποικιών GM-CSF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών των μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων . Ο Παράγοντας Δημιουργίας Αποικιών

M-CSF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών των μονοκυττάρων και συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μακροφάγων . Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων PAF (ένα φωσφολιπιδικό μόριο με μεγάλη βιολογική δράση ως Αυτακοειδές) διεγείρει την χημειοταξία των μακροφάγων και τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες . Ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται πολύ πιο έντονα μετά από ενεργοποίηση του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου με ενδοτοξίνη και ταυτοχρόνως αυξάνει και η ευαισθησία του , δηλαδή διαθέτει μηχανισμό ρύθμισης (Liu και συν., 1992) .

Η Ιντερφερόνη- γ μεταξύ πολλών άλλων επιδράσεων επάγει και την έκφραση των υποδοχέων της Ιντερλευκίνης IL-2 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και στην μονοκυτταρική σειρά U937 (Rambaldi και συν., 1987) . Ο παράγοντας CSF-1 προκαλεί έντονο πολλαπλασιασμό των άωρων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Η Ιντερλευκίνη IL-3 ενεργοποιεί τα μακροφάγα και προκαλεί αυξημένη έκφραση των μορίων MHC-II και LFA-1 στην επιφάνειά της . Επίσης αυξάνει την έκφραση του mRNA της Ιντερλευκίνης IL-1 . Τέλος η Ιντερλευκίνη IL-4 επηρεάζει την παραγωγή άλλων κυτταροκινών από τα μακροφάγα , όπως των IL-1 , IL-6 και TNF α .

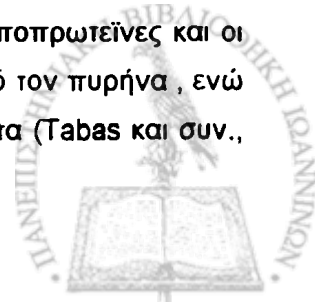
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ .

Τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς λιποπρωτεϊνών που τους επιτρέπουν την πρόσληψη και τον μεταβολισμό των LDL-λιποπρωτεϊνών . Οι μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιεί το μακροφάγο για τον σκοπό αυτό είναι πολύ διαφορετικοί από τους μηχανισμούς πρόσληψης που χρησιμοποιούν άλλα κύτταρα , όπως οι ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα . (Goldstein και συν., 1980 , Traber και Kayden, 1980 , Fogelman και συν., 1988) .

Στην επιφάνεια των μακροφάγων υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι υποδοχέων λιποπρωτεϊνών : (1) οι LDL-υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις απολιποπρωτεΐνες E και B-100 , (2) οι β -VLDL υποδοχείς που αναγνωρίζουν μόνο τις απολιποπρωτεΐνες E και (3) οι υποδοχείς ακετυλο-LDL λιποπρωτεϊνών (Scavenger Receptors) . Οι τελευταίοι αναγνωρίζουν μια μεγάλη ποικιλία αλλοιωμένων λιποπρωτεϊνών , κυρίως τις ακετυλιωμένες LDL-λιποπρωτεΐνες (δηλαδή ακετυλιωμένες στις λυσίνες των απολιποπρωτεϊνών τους) και ορισμένα Πολυανιόντα (polyanions) και σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης . (Via και συν., 1985)

Ο LDL-υποδοχέας συνδέει τις απολιποπρωτεΐνες B-100 και E , αλλά υφίσταται έντονη ρύθμιση και δεν επιτρέπει την συσσώρευση λιπιδίων μέσα στο κύτταρο . Είναι κυρίως υπεύθυνος για την διατήρηση της ομοιόστασης της κυτταρικής χοληστερόλης . Αντιθέτως ο β -VLDL υποδοχέας δεν υφίσταται ρύθμιση από τα επίπεδα της κυτταρικής χοληστερόλης και μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση χοληστερόλης μέσα στα μακροφάγα . Ο β VLDL-υποδοχέας είναι εξαρτημένος από το Ca^{+2} και συνδέεται με τις LDL-λιποπρωτεΐνες με σταθερά $Kd \approx 54,8 \times 10^{-9} M$. Η κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων φέρει περίπου 8000-19000 τέτοιους υποδοχείς ανά κύτταρο (Koo και συν., 1986) . Τα Μοριακά Βάρη των LDL- και β VLDL- υποδοχέων κυμαίνονται γύρω στα 125 kDa .

Τα μακροφάγα έχουν την ικανότητα να χειρίζονται με διαφορετικό τρόπο τις λιποπρωτεΐνες που έχουν ενδοκυττώσει , ανάλογα με το είδος και μέγεθός τους . Έτσι οι LDL-λιποπρωτεΐνες και οι μικρού μεγέθους β VLDL-λιποπρωτεΐνες μεταβολίζονται στα λυσοσώματα γύρω από τον πυρήνα , ενώ τα μεγάλα μόρια β VLDL-λιποπρωτεϊνών μεταβολίζονται σε περιφερικά λυσοσώματα (Tabas και συν.,



1991) . Αυτό οφείλεται στην υψηλή συγγένεια των υποδοχέων λιποπρωτεϊνών για τις πολυάριθμες απολιποπρωτεϊνες E των μεγάλων μορίων βVLDL .

Οι ακετυλιωμένες LDL-λιποπρωτεϊνες προσλαμβάνονται από ένα υποδοχέα με Μοριακό Βάρος περίπου 250 kDa , τον ακετυλο-LDL υποδοχέα (Scavenger Receptor) . Η δράση του καταστέλλεται όταν τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα ενεργοποιηθούν από λιποπολυσακχαρίτη (Van Lenten και συν., 1985) . Έχουν περιγραφεί δύο υποκατηγορίες τέτοιων υποδοχέων , ο τύπος I και ο τύπος II , που διαφέρουν στην δομή του ενδοκυτταρικού καρβόξυ-τελικού άκρου του μορίου . Όμως έχει διαπιστωθεί ότι και οι δύο αυτές υποκατηγορίες έχουν παρόμοια ικανότητα δέσμευσης και ενδοκυττάρωσης των ακετυλιωμένων LDL-λιποπρωτεϊνών . Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί των μακροφάγων μπορούν να δεσμεύουν τις ενδοτοξίνες του πλάσματος , οδηγώντας στην ενδοκύττωσή τους (Hampton και συν., 1991) .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ AGE .

Οι Υποδοχείς AGE (Advanced Glycosylation Endproducts) αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις πρωτεϊνες του εξωκυττάρου χώρου που αντέδρασαν με την γλυκόζη και έχουν μετατραπεί σε Προϊόντα Υψηλής Γλυκοζυλίωσης . Αυτό συμβαίνει όταν πρωτεϊνες όπως το κολλαγόνο υποστούν γλυκοζυλίωση αρχικά με αντίδραση Amadori και στην συνέχεια ακολουθήσουν οι αργές μη-ενζυματικές αντιδράσεις αντικατάστασης και συμπύκνωσης . Τα Προϊόντα Υψηλής Γλυκοζυλίωσης είναι βιολογικά δραστικές ουσίες οι οποίες προκαλούν την ανάπτυξη διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και σχετίζονται με ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η γήρανση . Όμως οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν και τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεϊνες ακόμα και μετά την διάνοιξη των δακτυλίων της γλυκόζης , δηλαδή υπάρχει ελαστικότητα στην αναγνώριση του υποκαταστάτη . Υποδοχείς AGE έχουν εντοπιστεί στα μονοκύτταρα , στα κύτταρα Kupffer και στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Υπάρχουν περίπου 10^5 υποδοχείς AGE / κύτταρο , που έχουν Σταθερά Συγγένειας (affinity constant) $K_a \approx 1,75 \times 10^7 / M$. (Vlassara και συν., 1986) .

Οι Υποδοχείς AGE διαμεσολαβούν την ενδοκύττωση των πρωτεϊνών που έχουν γλυκοζυλιωθεί και στην αποδόμησή τους . Επιπλέον η διαδικασία αυτή οδηγεί στην έκκριση IL-1 και TNFα . Όμως ο TNFα δρα αυτοκρινικά στα μακροφάγα και προκαλεί την αυξημένη πρόσληψη , ενδοκύττωση και αποδόμηση των γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών μέσω των Υποδοχέων AGE . (Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΥΠΟΥ ΛΕΚΤΙΝΩΝ (LECTIN-LIKE RECEPTORS)

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνικών υποδοχέων οι οποίοι μοιάζουν με Λεκτίνες και αναγνωρίζουν ολιγοσακχαρίδια που καταλήγουν σε φουκόζη, μαννόζη, σιαλικό οξύ , N-ακετυλογλυκοσαμίνη ή γαλακτόζη . Η αναγνώριση των σακχάρων αυτών έχει μεγάλη σημασία για τις αλληλεπιδράσεις των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων με άλλα κύτταρα και με μικροοργανισμούς . Η έκφραση των υποδοχέων τύπου λεκτινών στην επιφάνεια των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων αλλάζει και κατά την ωρίμαση του κυττάρου και κατά την ενεργοποίησή του . Επίσης η σύνδεση πολυσακχαριτών και γλυκοπρωτεϊνών που φέρουν υπολείμματα (residues) μαννόζης-φουκόζης ή γαλακτόζης στους υποδοχείς τους συχνά προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοκύτταρου φαγοκυττάρου .

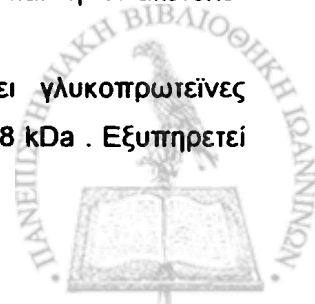
Τα περιτοναϊκά μακροφάγα, τα κύτταρα Kupffer και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης με MB περίπου 175 kDa, με τους οποίους συνδέουν γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν ολιγοσακχαρίτες με πολλαπλές ομάδες μαννόζης. Τέτοιοι υποδοχείς όμως δεν υπάρχουν στα κύτταρα U937 και J774 ή σε άλλες καρκινικές σειρές με ιδιότητες μακροφάγων. Στα μονοκύτταρα του ανθρώπου επίσης δεν υπάρχουν υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης αλλά μετά από κυτταροκαλλιέργεια λίγων ωρών αναπτύσσονται και εκφράζονται σε ικανοποιητικό βαθμό. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα φλεγμονώδη μακροφάγα (inflammatory, elicited, stimulated) εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (activated, immune) δεν τους εκφράζουν. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι φλεγμονώδη μακροφάγα που επωάζονται με INF γ παρουσιάζουν μείωση της έκφρασης (down-regulation) των υποδοχέων μαννόζης-φουκόζης ενώ αντιθέτως αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων FcR και των αντιγόνων επιφανείας MHC-II. Η δεξαμεθαζόνη σε δόσεις που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων επίσης εμποδίζει την μείωση των υποδοχέων αυτών. Έτσι οι υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης αποτελούν δείκτες της ενεργοποίησης των μακροφάγων και της ωρίμασής τους, αφού πάντοτε μειώνονται κατά την ενεργοποίηση και αυξάνουν κατά την ωρίμαση. (Mokoena και Gordon, 1985, Zembala και Asherson, 1989).

Οι υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης (mannosyl-fucosyl residue receptors) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην φαγοκυττάρωση βακτηριδίων και μυκήτων και στην απομάκρυνση αλλοιωμένων μακρομορίων και γηρασμένων κυττάρων από την κυκλοφορία. Τα αλλοιωμένα μακρομόρια και τα κύτταρα που έχουν "γεράσει" χαρακτηρίζονται από την μη-ενζυματική γλυκοζυλίωσή τους λόγω σύνδεσης με την γλυκόζη του αίματος και την δημιουργία χαρακτηριστικών γλυκοπρωτεϊνών. Αυτές οι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούν τους υποκαταστάτες του υποδοχέα μαννόζης-φουκόζης. Εκτός από την ενδοκύττωση του υποκαταστάτη είναι πιθανό να προκληθεί η διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης ή κάποιας άλλης εξωκυττάριας κυτταρολυτικής διεργασίας και η έκκριση μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος. Μετά την ενδοκύττωση του συμπλέγματος μορίου-υποδοχέα παρατηρείται όξινη του ενδοσώματος, διάσπαση του συμπλέγματος και ανακύκλωση των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων. (Peters, 1987).

Εκτός από τους υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης έχουν ανιχνευτεί και μελετηθεί στα μακροφάγα και άλλοι υποδοχείς τύπου λεκτινών. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι οι εξής:

1. Ο υποδοχέας β-Γλυκανών που αναγνωρίζει τις β-1,3-D-γλυκάνες του τοιχώματος των μυκήτων. Έχει εντοπιστεί στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, βρογχοκυψελιδικά και περιτοναϊκά μακροφάγα. Επίσης ανιχνεύεται και σε κάποιες κυτταρικές σειρές μακροφάγων μετά από in vitro ωρίμαση με ρετινοϊκό οξύ και καλσιτριόλη. Εξυπηρετεί την φαγοκυττάρωση σωματιδίων zymosan χωρίς προηγούμενη οψωνοποίηση. (Janusz και συν., 1986). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι η σύνδεση μη-οψωνοποιημένων σωματιδίων zymosan στους υποδοχείς β-γλυκανών των μακροφάγων προκαλεί την έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων, όπως η Γαλακτική Αφυδρογενάση και η N-ακετυλο-Γλυκοσαμινιδάση (Tapper και Sundler, 1995).

2. Ο υποδοχέας φουκόζης των κυττάρων Kupffer που αναγνωρίζει γλυκοπρωτεΐνες συζευγμένες με L-φουκόζη σε β-θέσεις. Αποτελείται από υπομονάδες με MB 77-88 kDa. Εξυπηρετεί την ενδοκύττωση.



3. Ο υποδοχέας γαλακτόζης των κυττάρων Kurpfer έχει MB 30 kDa και είναι εξαρτημένος από το Ca^{+2} . Παρουσιάζει πέντε υπομονάδες και συνδέεται χαλαρά με την κυτταρική μεμβράνη. Εξυπηρετεί τις διαδικασίες ενδοκύττωσης. Ένας άλλος πολύ σημαντικός υποδοχέας είναι εκείνος που ανιχνεύεται στα μακροφάγα του μυελού των οστών, έχει MB 180 kDa και αναγνωρίζει σιαλιωμένα γαγγλιοσίδια όπως το GD1a. Εξυπηρετεί την σύνδεση των μακροφάγων με τα ερυθροκύτταρα αλλά όχι την φαγοκυττάρωση.

4. Ο υποδοχέας της 6-Φωσφορικής Μαννόζης (Mannose-6-Phosphate Receptor) που εντοπίζεται με δύο μορφές: η μία έχει υψηλό Μοριακό Βάρος (215 kDa) και δεν είναι εξαρτημένη από τα κατιόντα ενώ η άλλη έχει χαμηλό MB (46 kDa) και είναι εξαρτημένη από τα κατιόντα. Και οι δύο μορφές εξυπηρετούν την ενδοκυτταρική και μεσοκυτταρική μετακίνηση των λυσοσωματικών υδρολασών, αναγνωρίζοντας τις ομάδες της 6-φωσφορικής μαννόζης στις οποίες οι υδρολάσες καταλήγουν.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΙΑ ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΥΤΑΚΟΕΙΔΗ.

Στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχουν εντοπιστεί ειδικοί υποδοχείς για πολλές ορμόνες πεπτιδικής και στεροειδικής φύσεως, καθώς και για τα διάφορα αμινικά ή λιπιδικά αυτακοειδή. (Gordon και συν., 1988).

Ανάμεσα στις ορμόνες για τις οποίες τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα διαθέτουν υποδοχείς είναι η Ινσουλίνη, η Γλυκαγόνη, η Παραθορμόνη, η Καλσιτονίνη και η Αδρεναλίνη. Για την Αδρεναλίνη και την Νοραδρεναλίνη υπάρχουν δύο είδη αδρενεργικών υποδοχέων, οι $\alpha 1$ -υποδοχείς και οι $\beta 2$ -υποδοχείς. Επίσης υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς για τα γλυκοκορτικοειδή, όπως η κορτιζόλη και η κορτικοστερόνη (Weib και συν., 1978). Έχουν ανιχνευθεί και υποδοχείς για την Καλσιτριόλη.

Στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχουν ανιχνευθεί και υποδοχείς για τα διάφορα αυτακοειδή όπως η Ισταμίνη, η Σεροτονίνη, η Βραδυκινίνη, η Προσταγλανδίνη PGE_2 , η Λευκοτριένη LTB_4 και ο Ενεργοποιητής των Αιμοπεταλίων (PAF). Κάθε ένας από αυτούς τους υποδοχείς συνδέεται με ένα σύστημα Δεύτερων Μηνυτόρων, μέσω του οποίου ασκεί την βιολογική του δράση. Ειδικά για τον PAF ο υποδοχέας του εκφράζεται πιο έντονα μετά από έκθεση του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου σε ενδοτοξίνη και ταυτοχρόνως αυξάνει και η ευαισθησία του υποδοχέα λόγω αύξησης του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} , δηλαδή υπόκειται και σε μηχανισμό ρύθμισης (Liu και συν., 1992). Προσφάτως έχει μελετηθεί ακόμα ένας υποδοχέας στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, ο υποδοχέας PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor). Μεταξύ των υποκαταστατών του περιλαμβάνονται και μεταβολίτες της PGD_2 όπως η 15-δεόξυ- PGJ_2 και άλλα λιπαρά οξέα. Ο PPAR γ υποδοχέας των μονοκυττάρων συσχετίζεται με την καταστολή της ενεργοποίησής τους, την διακοπή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και Κυτταροκινών και την μειωμένη έκφραση πολλών άλλων γονιδίων (Ricote και συν., 1998, Jiang και συν., 1998).

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ (ADHESION MOLECULES)

Στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και μακροφάγων υπάρχουν πολυάριθμα μόρια προσκόλλησης (adhesion molecules) που χρησιμεύουν στην προσκόλληση των κυττάρων αυτών στο



αγγειακό ενδοθήλιο και επιτρέπουν την μετανάστευσή τους (migration) στους ιστούς . Τέτοια μόρια είναι για παράδειγμα τα CD11b/CD18 (CR3) , CD62 , CD11a/CD18 (LFA-1) και CD49d/CD29 (VLA-4) , που ανευρίσκονται επίσης στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων και των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων .

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι υποδοχείς προσκόλλησης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . (Lewis και McGee, 1992 , Zembala και Asherson, 1989) .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ (ADHESION MOLECULES) ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .					
CD4	CD9	CD11a	CD11b	CD11c	CDw12
CD13	CD14	CD15	CD16	CD17	CD18
CD19	CD23	CD25	CD29	CD31	CDw32
CD33	CD34	CD35	CD36	CD37	CD43
CD44	CD45	CD45RA	CD45RB	CD45RO	CD46
CD47	CD48	CDw49d	CDw50	CDw52	CD53
CD54	CD55	CD58	CD59	CD63	CD64
CDw65	CD68	CD71	CD74	CDw78	

Η φλεγμονώδης διέγερση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων οδηγεί στην αυξημένη προσκόλλησή τους με το ενδοθήλιο μέσω των μορίων LFA-1 που εκφράζουν στην επιφάνειά τους και έτσι προκαλείται η αυξημένη διήθηση των ιστών που φλεγμαίνονται από μονοκύτταρα και μακροφάγα . Τα μόρια αυτά ανήκουν σε μια οικογένεια υποδοχέων της επιφάνειας των λευκοκυττάρων που ονομάζονται Ιντεγκρίνες (Integrins) . Οι Ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μία α-υπομονάδα και μία β-υπομονάδα . Η α-υπομονάδα είναι κοινή ενώ η β-υπομονάδα διαφέρει και επιτρέπει τον διαχωρισμό σε τρεις υποκατηγορίες , τις β1- , β2- και β3-Ιντεγκρίνες . Στις β2-Ιντεγκρίνες περιλαμβάνονται τα μόρια LFA-1 (CD11a/CD18) , Mac-1 ή CR3 (CD11b/CD18) και ρ150,95 (CD11c/CD18) που όλα έχουν πολύ μεγάλη βιολογική σημασία γιατί μεσολαβούν την φαγοκυττάρωση σωματιδίων και την δημιουργία Οξειδωτικής Έκρηξης . Η συγγενής έλλειψη αυτών των Ιντεγκρινών από τα λευκοκύτταρα οδηγεί σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και θάνατο . Η Ιντεγκρίνη LFA-1 εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα του αίματος ενώ οι CR3 και ρ150,95 είναι χαρακτηριστικές των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων . Το μόριο LFA-1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των μονοκυττάρων και είναι απαραίτητο για την σύνδεσή τους στο ενδοθήλιο , την διαπίδυση στους ιστούς και την χημειοταξία . Τα μόρια CR3 (Mac-1) και ρ150,95 εντοπίζονται αντίστοιχα στην κυτταρική μεμβράνη των μονοκυττάρων του αίματος και μέσα στα λυσοσωματικά κοκκία των ιστικών μακροφάγων . Έχουν ιδιαίτερη σημασία για την φαγοκυττάρωση επειδή συνδέουν σωματίδια οψωνοποιημένα με τον παράγοντα του Συμπληρώματος iC3b . Επίσης είναι απαραίτητα για την σύνδεση των λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα , προκειμένου να γίνει η διαπίδυση στους ιστούς . Το μόριο LFA-1 επιπλέον χρησιμοποιείται από τα μονοκύτταρα για να εξασθενήσει τα τοιχώματα των καρκινικών κυττάρων πριν προκαλέσει την λύση τους με άλλους μηχανισμούς . (Hogg και συν., 1981 , Miller και συν., 1986 , Keizer και συν., 1987 , Zembala και Asherson, 1989) .

Στις β1-Ιντεγκρίνες περιλαμβάνεται το μόριο VLA-4 (CD49d/CD29) των μονοκυττάρων που συνδέεται με την Ινωδονεκτίνη (όπως και το μόριο VLA-5) και με τον κυτταρικό υποδοχέα VCAM-1 . Η VLA-4 Ιντεγκρίνη είναι υποδοχέας τόσο της επιφάνειας των κυττάρων όσο και της μεσοκυττάριας θεμέλιας ουσίας . Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των β1-Ιντεγκρινών είναι ένας υποδοχέας των

μονοκυττάρων που συνδέει το Ινωδογόνο , την Ινωδονεκτίνη και την Βιτρονεκτίνη και μοιάζει με τον υποδοχέα CDw41 (IIbIIIa) των αιμοπεταλίων . Ο συγκεκριμένος υποδοχέας είναι σημαντικός για την φαγοκυττάρωση σωματιδίων που έχουν οψωνοποιηθεί με Ινωδονεκτίνη αλλά δεν έχει μελετηθεί ακόμα εκτενώς η δομή του .

Εκτός από τις Ιντεγκρίνες υπάρχουν και άλλοι παρόμοιοι υποδοχείς επιφάνειας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Δύο ακόμα οικογένειες τέτοιων μορίων είναι η Ig-οικογένεια και οι Υποδοχείς για τις Σελεκτίνες (Selectins) . Οι υποδοχείς των πιο γνωστών Σελεκτινών (MeI-14/LAM-1 , ELAM-1 και PADGEM) ρυθμίζουν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθήλια στους φλεγμονώδεις ιστούς . Η Σελεκτίνη PADGEM (ή GMP-140 ή CD62) εμφανίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και αιμοπεταλίων που διεγέρθηκαν από παράγοντες πήξεως και προκαλεί την προσκόλληση των μονοκυττάρων σε αυτά .

Η Ig-οικογένεια υποδοχέων περιλαμβάνει τα μόρια LFA-3 (CD58) , ICAM-1 (CD54) και τα αντιγόνα MHC τύπου I και II . Οι περισσότεροι από αυτούς τους υποδοχείς έχουν μια κοινή αλληλουχία 90-100 αμινοξέων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Τ-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων . Το μόνο από τα μόρια αυτής της οικογένειας που έχει κάποιες διαφορές στην δομή του είναι το ICAM-1 , ένας πολύ σημαντικός υποδοχέας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων για την παθοφυσιολογία της φλεγμονής . Ο υποδοχέας ICAM-1 έχει MW 90 kDa χρησιμεύει για την επικόλληση των μονοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και σε άλλα είδη κυττάρων . Επίσης συνδέει μόρια LFA-1 . Όταν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα διεγερθούν από ενδοτοξίνες , TNFα , Ιντερφερόνη-γ ή Ιντερλευκίνη-1 , επάγουν την έκφραση του μορίου προσκόλλησης CD54 (ICAM-1) και έτσι προσκολλώνται πιο εύκολα στο αγγειακό ενδοθήλιο . (Lewis και McGee, 1992 , Zembala και Asherson, 1989) .

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και μακροφάγων ανιχνεύονται πολυάριθμα μόρια τα οποία διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων αυτών με το περιβάλλον τους . Από αυτά τα μόρια ορισμένα είναι υποδοχείς Αυξητικών Παραγόντων , άλλα είναι ένζυμα ή υποδοχείς Μορίων Προσκόλλησης ενώ άλλα είναι υποδοχείς που αναγνωρίζουν ειδικούς Υποκαταστάτες με μεγάλη σημασία για την δράση των μακροφάγων . Κατά την διαφοροποίηση ή την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων γίνονται ορισμένες αλλαγές σε αυτό το "μωσαϊκό" της επιφάνειάς τους , οι οποίες καθορίζονται από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος και από τον γενετικό προγραμματισμό του κυττάρου .

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τύπου I και II (MHC-I και MHC-II) . Τα MHC-II που παράγονται από την έκφραση των γονιδιακών τόπων -DR, -DP και -DQ εκφράζονται από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα κατά τρόπο ασυνεχή . Έτσι τα μονοκύτταρα εκφράζουν συνεχώς τα αντιγόνα HLA-DR και σε υψηλή πυκνότητα ενώ λιγότερα από το 50 % των μονοκυττάρων εκφράζουν τα HLA-DP και HLA-DQ και σε χαμηλές πυκνότητες . Μετά από έκθεση σε Ιντερφερόνη-γ αυξάνεται σημαντικά η έκφραση των HLA-DR αντιγόνων και σε μικρότερο βαθμό των HLA-DP και HLA-DQ .



Τα μακροφάγα επίσης εκφράζουν την γλυκοπρωτεΐνη CD4 στην κυτταρική μεμβράνη τους . Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά αντιγόνα της μεμβράνης των Τ-λεμφοκυττάρων και η λειτουργική σημασία του στα μακροφάγα είναι ακόμα άγνωστη .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους και πολλά άλλα είδη μορίων που είναι χαρακτηριστικά και δεν εκφράζονται από άλλα κύτταρα . Τα μόρια αυτά φαίνεται ότι εξυπηρετούν ειδικές λειτουργίες των μακροφάγων και μονοκυττάρων . Ένας τέτοιο μόριο είναι και ο υποδοχέας CD-14 , μια γλυκοπρωτεΐνη με 356 αμινοξέα και MB 55 kDa , που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας πλάγιας ομάδας φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (Wright και συν., 1990) . Μια μορφή του ίδιου υποδοχέα είναι και η πρωτεΐνη του πλάσματος sCD-14 που χρησιμεύει στην μεταφορά φωσφολιπιδίων στο αίμα (Yu και συν., 1997) . Ο CD-14 υποδοχέας εκφράζεται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και των μακροφάγων σε υψηλές συγκεντρώσεις και αποτελεί καλό δείκτη των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον CD-14 υποδοχέα εντοπίζεται στον μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 , εκεί όπου κωδικοποιούνται οι κυτταροκίνες GM-CSF , CSF-1 , IL-3 και IL-5 και οι υποδοχείς για τους παράγοντες CSF-1 και PDGF . Οι δράσεις των παραπάνω υποδοχέων και παραγόντων συσχετίζονται και πιθανώς απαιτείται η συνδυασμένη έκφραση των γονιδίων τους (Lewis και McGee, 1992) . Εκτός από την σύνδεση και απομάκρυνση των ενδοτοξινών και την ενεργοποίηση των μακροφάγων ο υποδοχέας CD-14 χρησιμεύει και στην αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων (Devitt και συν., 1998) .

Το μονοκλωνικό αντίσωμα F4/80 αναγνωρίζει μια χαρακτηριστική πρωτεΐνη με MB 160 kDa που αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης όλων των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Αν και έχει εντοπιστεί σε όλα τα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς η λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι ακόμα άγνωστη (Hume και συν., 1983 , Gordon και συν., 1988) .

Ένα άλλο μόριο που είναι χαρακτηριστικό για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι το αντιγόνο CD68 που είναι ειδικός δείκτης για την σειρά αυτή . Το αντιγόνο αυτό φαίνεται ότι εντοπίζεται μέσα σε κυτταροπλασματικά κοκκία . Αντιθέτως το αντιγόνο CD33 δεν είναι ειδικός δείκτης για τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αλλά ανιχνεύεται και στις βλάστες όλων των μυελοκυττάρων . Αποτελεί μια πρωτεΐνη με MB 67 kDa . Η λειτουργία του δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως . Εκφράζεται όμως και στα μακροφάγα του σπλήνα , του πνεύμονα , στα κύτταρα Kupffer , στα μακροφάγα του χορίου των βλεννογόνων και στα κύτταρα Langerhans . Το αντιγόνο CD36 που λέγεται και υποδοχέας Θρομβοσπονδίνης (Thrombospondin) είναι μια πρωτεΐνη με MB 85 kDa που εκφράζεται κυρίως στα μονοκύτταρα αλλά και στα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα . Στα αιμοπετάλια το ίδιο αντιγόνο ονομάζεται πρωτεΐνη gpIb . Ο υποδοχέας της Θρομβοσπονδίνης χρησιμεύει στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ασθενών με ελονοσία για την φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που έχουν προσβληθεί από *Plasmodium falciparum* . (Zembała και Asherson, 1989) .

ΑΛΛΑ ΜΟΡΙΑ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγιναν μελέτες για τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν πολυάριθμες πρωτεΐνες και



γλυκοπρωτεΐνες με ποικίλα Μοριακά Βάρη (συνήθως 34-310 kDa) που εμφάνιζαν διαφορετικούς ρυθμούς παραγωγής και ανανέωσης και άγνωστη βιολογική δράση (Karlan και συν., 1979) . Σήμερα αρκετές από αυτές έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς αλλά ακόμα ανακαλύπτονται καινούργια μόρια στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και μακροφάγων τα οποία διαδραματίζουν νέους βιολογικούς ρόλους . Πολλά από τα καινούργια μόρια τα γνωρίζουμε μόνο από τα μονοκλωνικά αντισώματα με τα οποία ανιχνεύονται , όπως π.χ. τα Ki-M2 , Ki-M8 , 25F-9 , 27E-10 , RM31 , RFD-1 και RFD-7 . Ορισμένες γλυκοπρωτεΐνες που είναι χαρακτηριστικές για τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα , όπως αυτές που δεσμεύονται από τις λεκτίνες RCA1 , Jacalin και PNA , είναι ακόμα άγνωστες τόσο από πλευράς λειτουργίας όσο και δομής (Irimuga και συν., 1987 , Urdiales-Viedma και συν., 1995) . Η ισολεκτίνη Pa-4 που συνδέεται με αδιευκρίνιστες γλυκοπρωτεΐνες των 70-150 kDa χρησιμοποιείται ως δείκτης της ωρίμασης και ενεργοποίησης των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων (Irimuga και συν., 1987) . Επίσης σήμερα χρησιμοποιούνται στην διαγνωστική κυτταρολογία μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία ανιχνεύουν μόρια της κυτταρικής μεμβράνης των φυσιολογικών και νεοπλασματικών μονοκύτταρων φαγοκυττάρων με αδιευκρίνιστο βιολογικό ρόλο (Roholl και συν., 1988) .



Κεφάλαιο 1-7 . Η έννοια της ενεργοποίησης των μακροφάγων και οι εκδηλώσεις της .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .

Κατά την δεκαετία του 1960 οι Mackaness και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η αποτελεσματική αντίσταση του οργανισμού στα ενδοκυττάρια παράσιτα απαιτούσε την παρουσία ευμεγέθων και εξαιρετικά δραστήριων μακροφάγων , τα οποία ονόμασε "ενεργοποιημένα" μακροφάγα . Τα μακροφάγα αυτά ήταν οι φορείς της επίκτητης ανοσίας προς το ενδοκυττάριο παράσιτο (π.χ. *Mycobacteria*, *Brucella*, *Listeria* κ.α.) αλλά και προς άλλους μικροοργανισμούς . Επίσης διαπίστωσαν ότι αυτή η μη-ειδική ανοσία ήταν πολύ παροδική και απαιτούσε την συμμετοχή ουσιών που εκκρίνονταν από τα Τ-λεμφοκύτταρα .

Περισσότερα στοιχεία για την σημασία της "ενεργοποίησης" των μακροφάγων προέκυψαν από τις μελέτες των Hibbs και Remington και των Evans και Alexander . Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συμμετείχαν εκτός από την μη-ειδική προστασία κατά των ενδοκυττάρων παρασίτων και στην εκλεκτική καταστροφή καρκινικών κυττάρων . Αυτή ακριβώς η παρατήρηση οδήγησε ορισμένους ερευνητές να ορίσουν την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σαν μια κατάσταση αυξημένης αντιμικροβιακής και αντινεοπλασματικής δραστηριότητας των κυττάρων αυτών . (Kamovsky και Lazdins, 1978 , North, 1978 , Cohn, 1978 , Adams και Hamilton, 1984) .

Γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι η ενεργοποίηση είχε ορισμένες διαβαθμίσεις και ότι τα μακροφάγα που τελούσαν σε μία βαθμίδα ενεργοποίησης παρουσίαζαν διαφορετικές ιδιότητες από όσα τελούσαν σε άλλη βαθμίδα ενεργοποίησης . Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι διάφορες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vivo* και την *in vitro* ενεργοποίηση των μακροφάγων οδηγούσαν σταθερά σε διαφορετικές βαθμίδες ενεργοποίησης . Επίσης αποδείχτηκε ότι με μεταβολές στον χρόνο έκθεσης στις ουσίες αυτές ή με την χρήση ορισμένων άλλων διεγερτών ήταν δυνατή η μετάβαση των μακροφάγων από μία βαθμίδα ενεργοποίησης σε κάποια άλλη . Τέλος διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση ενός πληθυσμού μακροφάγων από έναν διεγέρτη συχνά αφορούσε ορισμένες μόνο παραμέτρους της λειτουργίας του μακροφάγου . Έτσι δημιουργήθηκε η ανάγκη μελέτης του μηχανισμού ενεργοποίησης των μακροφάγων .

Είναι γνωστό ότι στο υποκυτταρικό επίπεδο απαιτείται μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διεργασία από πολλά διαδοχικά βήματα οδών σήμανσης , ενζυματικών αντιδράσεων και πρωτεϊνοσύνθεσης ώστε να αποκτήσουν τα μακροφάγα την ικανότητα καταστροφής νεοπλασματικών κυττάρων απουσία αντισώματος που ονομάζεται MTC-κυτταροτοξικότητα (Adams και Hamilton, 1984) . Όμως αποδείχτηκε ότι τα άωρα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα που συρρέουν στις φλεγμονώδεις εστίες αποκτούν πολύ ευκολότερα αυτή την αντικαρκινική δραστηριότητα από ότι τα καθηλωμένα ιστικά μακροφάγα (resident macrophages) τα οποία προϋπήρχαν στην φλεγμονώδη εστία . Με *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα άωρα αυτά μακροφάγα είναι πιο ευαίσθητα στην ανταπόκριση σε διεγέρτες όπως η Ιντερφερόνη-γ και ονομάστηκαν για τον λόγο αυτό "Ανταποκρινόμενα Μακροφάγα" (Responsive Macrophages) . Αν και τα κύτταρα αυτά στα οποία έχει επίδραση η INF-γ δεν έχουν ακόμα κυτταρολυτικές ικανότητες , είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην επίδραση ενός δεύτερου διεγέρτη όπως η Ενδοτοξίνη (LPS) . Για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν "Ευαίσθητοποιημένα Μακροφάγα" (Primed Macrophages) ή "Φλεγμονώδη" (Inflammatory) ή "Διεγερμένα" (Stimulated) . Μετά από την επίδραση του LPS ή άλλου δεύτερου διεγέρτη μεταπίπτουν σε μία άλλη λειτουργική κατάσταση στην οποία ονομάζονται "Ενεργοποιημένα Μακροφάγα" (Activated Macrophages) ή "Ανοσα" (Immune) .



Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό το γιατί σήμερα χρησιμοποιούνται οι όροι "Μη-Ενεργοποιημένο", "Ευαίσθητοποιημένο" και "Ενεργοποιημένο" αντί των παλαιότερων όρων "καθλωμένο" ή "μεταναστευτικό" για να περιγράψουν τις ποικίλες και σχετικά δυσδιάκριτες λειτουργικές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ένα μακροφάγο. Στην συνέχεια θα αναλυθούν οι λεπτομέρειες που αφορούν την ονοματολογία των κυττάρων στα διάφορα στάδια ενεργοποίησης.

Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΑ.

Με τον γενικό όρο "ενεργοποίηση" (activation) ενός κυττάρου εννοείται η διαδικασία μεταβολής του φαινοτύπου του κυττάρου, δηλαδή τα βιολογικά φαινόμενα που θα οδηγήσουν σε μακροχρόνια μεταβολή του κυτταρικού φαινότυπου (Kaczmarek και Kaminska, 1989). Τέτοιες μεταβολές προκαλούν διάφορες εκδηλώσεις στα κύτταρα που ενεργοποιούνται, όπως την αιφνίδια εισαγωγή στον μιτωτικό κύκλο ή την επαγωγή της διαφοροποίησης άωρων κυττάρων ή τέλος την έναρξη ειδικών λειτουργιών σε ώριμα κύτταρα. Έτσι η "ενεργοποίηση" είναι ένας ευρύτατος όρος που περικλείει διαφορετικά φαινόμενα ανάλογα με το είδος των κυττάρων στα οποία αναφέρεται.

Ενεργοποίηση ενός μονοπύρηνου φαγοκυττάρου ονομάζεται η διαδικασία συνολικής μεταβολής της λειτουργικής του κατάστασης με σκοπό την επίταση των λειτουργικών του ιδιοτήτων, την αύξηση των βιολογικών του δραστηριοτήτων και την μεγιστοποίηση της συμμετοχής του στην φλεγμονή, την ανοσία και την ανοσορύθμιση. Σύμφωνα με έναν άλλο ορισμό η ενεργοποίηση των μακροφάγων πρέπει να εννοηθεί ως απόκτηση της ικανότητας να πραγματοποιούν μια πολύπλοκη λειτουργία, όπως π.χ. διαπίδυση και χημειοταξία, φαγοκυττάρωση, επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων, ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων, καταστροφή μικροοργανισμών ή νεοπλασματικών κυττάρων κ.λ.π. Η ικανότητα εκτέλεσης αυτών των πολύπλοκων λειτουργιών εξαρτάται από την απόκτηση ειδικών λειτουργικών ικανοτήτων, οι οποίες με την σειρά τους εξαρτώνται από την μεταβολή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων.

Ως προς τον βαθμό της ενεργοποίησής τους τα μακροφάγα είναι δυνατό να υφίστανται σε μία από τις παρακάτω τέσσερις λειτουργικές καταστάσεις:

1. ΜΗ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (Resident macrophages ή quiescent macrophages). Αυτά τα κύτταρα δεν έχουν έρθει σε επαφή με κάποιο διεγέρτη και παραμένουν σε κατάσταση "ηρεμίας", δηλαδή ακίνητα και αδρανή από ανοσολογικής απόψεως. Η εκκριτική, αντιγονοπαρουσιαστική, αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική τους δραστηριότητα είναι ελάχιστη. Διαθέτουν όμως πολυάριθμους υποδοχείς που τους επιτρέπουν την ταχεία ανταπόκριση σε κάθε διεγέρτη. Τέτοιοι είναι οι Fc-υποδοχείς, οι CR-υποδοχείς, οι υποδοχείς Μαννόζης-Φουκόζης, οι υποδοχείς χημειοτακτικών πεπτιδίων και οι υποδοχείς Ινωδονεκτίνης. Τα μακροφάγα επίσης διαθέτουν άλλους μηχανισμούς με τους οποίους αναγνωρίζουν και ενδοκυττώνουν σωματιδιακό υλικό και γηρασμένα κύτταρα (π.χ. ερυθροκύτταρα ή επιθηλιακά κύτταρα) χωρίς να είναι σε κατάσταση ενεργοποίησης. Επίσης τα μη-ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν διαρκώς Λυσοζύμη και Λιποπρωτεϊνική Λιπάση. Έτσι συμμετέχουν συνεχώς σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες.

2. ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (Responsive macrophages). Είναι τα άωρα μονοκύτταρα και μακροφάγα που συρρέουν σε μια φλεγμονώδη εστία και ανταποκρίνονται ταχύτατα στην ενεργοποίηση από κάποιο διεγέρτη, σε αντίθεση με τα ιστικά μακροφάγα που προϋπήρχαν της φλεγμονής και τα οποία αντιδρούν αργά και υποτονικά στην ενεργοποίησή τους. Έτσι η επώαση "ανταποκρινόμενων" μακροφάγων με Ιντερφερόνη-γ τα μετατρέπει σε "ευαίσθητοποιημένα" μακροφάγα, τα οποία όταν

διεγερθούν με LPS μετατρέπονται ταχύτατα σε "ενεργοποιημένα" κύτταρα και αποκτούν κυτταροτοξικές ιδιότητες . Στην πράξη η διαβάθμιση των "ανταποκρινόμενων" μακροφάγων είναι δύσχρηστη και δεν μπορεί να εξυπηρετήσει κάποιον συγκεκριμένο σκοπό , με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται .

3. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ή ΔΙΕΓΕΡΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ή ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (Inflammatory macrophages ή Stimulated macrophages ή Primed macrophages) . Μια πλειάδα από διεγέρτες είναι σε θέση να μεταβάλλουν την λειτουργική κατάσταση του μακροφάγου , μετατρέποντάς το σε φλεγμονώδες μακροφάγο . Σε αυτή την βαθμίδα ενεργοποίησης παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση ορισμένων μεμβρανικών υποδοχέων (π.χ. Fc-υποδοχείς, υποδοχείς μαννόζης-φουκόζης) . Η σύνδεση των υποκαταστατών με τους υποδοχείς προκαλεί διαφορετικές αντιδράσεις στα φλεγμονώδη μακροφάγα παρά στα μη-ενεργοποιημένα μακροφάγα , για παράδειγμα την έκκριση διαφορετικών ουσιών . Τα φλεγμονώδη μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση Ουδέτερων Πρωτεασών (Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου, Ελαστάση, Κολλαγενάση κ.α.) , πρωτεϊνών του Συμπληρώματος (C1, C2, C3, C4, C5 κ.α.) , παραγόντων πήξεως και Ιντερλευκίνης-1 . Οι ουσίες αυτές είναι απαραίτητες για την λειτουργία των μακροφάγων στις φλεγμονώδεις εστίες , για την ανάπτυξη συστηματικών αντιδράσεων και για την διέγερση άλλων κυττάρων (πολυμορφοπύρηνων , ενδοθηλιακών , ινοβλαστών κ.α.) που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη αντίδραση . Τα φλεγμονώδη μακροφάγα παράγουν λιγότερα εικοσανοειδή από τα μη-ενεργοποιημένα , πιθανώς επειδή τα εικοσανοειδή εκτός από χημικοί μεσολαβητές της φλεγμονής (αυτακοειδή) είναι και υπεύθυνα για τον μηχανισμό αυτορύθμισης των μακροφάγων μέσω του cAMP . Σε αυτή την λειτουργική κατάσταση τα φλεγμονώδη μακροφάγα δεν έχουν ακόμα αναπτύξει τις κυτταροτοξικές ιδιότητες που έχουν τα πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα .

4. ΑΝΟΣΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ή ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (Immune macrophages ή Activated Macrophages) . Όταν τα μη-ενεργοποιημένα ιστικά μακροφάγα ή τα φλεγμονώδη μακροφάγα εκτεθούν σε ορισμένους βιοδραστικούς παράγοντες (προϊόντα μικροοργανισμών ή T-λεμφοκυττάρων, κυταροκίνες κ.α.) μετατρέπονται σε "ενεργοποιημένα μακροφάγα" και παρουσιάζουν την μέγιστη ανοσολογική τους δράση . Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα έχουν μικρότερη εκκριτική δραστηριότητα από τα φλεγμονώδη , εκκρίνουν διαφορετικές ουσίες και εκφράζουν διαφορετικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους . Η κυτταροτοξικότητά τους όμως και η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα είναι πολύ μεγάλη . Έτσι όταν κάποιο μακροφάγο ενεργοποιηθεί από ενδοτοξίνη (LPS) ή κάποια κυταροκίνη (INF- γ , GM-CSF ή IL-4) θα παρουσιάσει μείωση της έκφρασης των υποδοχέων μαννόζης-φουκόζης και FcR-II , ενώ θα αυξηθεί η έκφραση των υποδοχέων FcR-I και των αντιγόνων MHC τάξεως II . Ταυτόχρονα θα αυξηθεί η αντιγονοπαρουσιαστική δραστηριότητά τους και θα μεταβληθεί το φάσμα της εκκριτικής τους δραστηριότητας : συνολική μείωση της έκκρισης , παύση της έκκρισης Ουδέτερων Πρωτεασών και έναρξη παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (H_2O_2 , O_2^{-1} , OH^{\cdot} , OH^{-1}) , Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου (NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , NO_2^{-1}) , Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (TNF α), Τρανσκοβαλαμίνης και Απολιποπρωτεΐνης E . Τέλος υπάρχει σημαντική μεταβολή στην ποσότητα και στο είδος των εικοσανοειδών που παράγονται). Όλες αυτές οι μεταβολές δίδουν στο μονοπύρηνο φαγοκύτταρο ένα νέο φαινότυπο με αυξημένη αντιμικροβιακή και αντινεοπλασματική δραστηριότητα .

Οι σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φλεγμονωδών και ενεργοποιημένων μακροφάγων έχουν επαληθευτεί σε πολλούς τύπους πειραμάτων . Για παράδειγμα τα φλεγμονώδη μακροφάγα είναι λεπτά και επιμήκη , με πολλές αυλακώσεις και λάχνες , ελάχιστη πτύχωση της μεμβράνης τους και λίγα λυσοσωματικά κοκκία . Αντιθέτως τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα είναι μεγαλύτερα και πιο

αποπλατυσμένα, με λίγες αυλακώσεις αλλά έντονη πτύχωση και πολλά λυσοσωματικά κοκκία. Επίσης τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσίαζαν εντονότερη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και μεγαλύτερες δραστηριότητες των λυσοσωματικών τους ενζύμων (Mofland και Karlan, 1977). Από άλλες μελέτες είναι γνωστό ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν περισσότερο H_2O_2 από τα φλεγμονώδη μακροφάγα (Nathan και Root, 1977). Τα περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί in vivo με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) ή *Corynebacterium parvum* είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν μια έντονη κυτταροτοξικότητα κατά νεοπλασματικών κυττάρων, όπως π.χ. λύση λευχαιμικών κυττάρων μέσω των Fc-υποδοχέων τους (με ADCC). Αντιθέτως τα φλεγμονώδη μακροφάγα που διεγέρθηκαν με έγχυση θειογλυκολλικού ζυμού ενδοπεριτοναϊκά δεν καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα με ADCC, δηλαδή δεν είναι κυτταροτοξικά (Nathan και συν., 1980). Τέλος, από άλλες μελέτες είναι γνωστό ότι τα φλεγμονώδη και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην σύνθεση πρωτεϊνών. Κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί με BCG ή *Propionibacterium acnes* παρουσίαζαν μικρότερη πρωτεϊνοσυνθετική δράση από φλεγμονώδη μακροφάγα που είχαν διεγερθεί με θειογλυκολλικό ζυμό ή ζυμό πεπτονών. Τα φλεγμονώδη μακροφάγα δεν παρουσίαζαν μεταβολές στο πρωτεϊνοσυνθετικό τους προφίλ μετά από μια επώαση 48 ωρών με LPS, ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσίαζαν αρκετές μεταβολές στην σύνθεση των επιμέρους πρωτεϊνών μετά από επώαση με LPS (Largen και Tappenberg, 1986).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνεται ένα παράδειγμα του συνόλου των διαφορετικών ιδιοτήτων που διέπουν τα μακροφάγα σε τρεις διαφορετικές βαθμίδες ενεργοποίησης.

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΕ ΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Αναπτοκρινόμενα	Ευαίσθητοποιημένα	Ενεργοποιημένα
Δεν εκφράζουν τα Ia-αντιγόνα	Εκφράζουν έντονα τα Ia-αντιγόνα	Εκφράζουν ασθενώς τα Ia-αντιγόνα
Δεν εκφράζουν τα μόρια LFA-1	Εκφράζουν έντονα τα μόρια LFA-1	Εκφράζουν έντονα τα μόρια LFA-1
Δεν εκκρίνουν TNFα	Δεν εκκρίνουν TNFα	Εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες TNFα
Δεν εκκρίνουν H_2O_2 και O_2^{-1}	Εκκρίνουν άφθονο H_2O_2 και O_2^{-1}	Εκκρίνουν άφθονο H_2O_2 και O_2^{-1}
Δεν συνδέουν καρκινικά κύτταρα	Συνδέουν καρκινικά κύτταρα	Συνδέουν καρκινικά κύτταρα
Διαιρούνται μιτωτικά.	Δεν διαιρούνται (τελικά κύτταρα)	Δεν διαιρούνται (τελικά κύτταρα)
Δεν παρουσιάζουν αντιγόνα	Παρουσιάζουν αντιγόνα	Δεν παρουσιάζουν αντιγόνα
Δεν είναι κυτταροτοξικά	Δεν είναι κυτταροτοξικά	Είναι κυτταροτοξικά
Δεν είναι μικροβιοκτόνα	Είναι μικροβιοκτόνα	Είναι μικροβιοκτόνα

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ.

Η ανάλυση του μηχανισμού ενεργοποίησης των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων αναπτύχθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά την ανακάλυψη των ειδικών δεικτών της ενεργοποίησής τους. Με την χρήση αυτών των δεικτών που αναγνωρίζονται εύκολα και μπορούσαν να εκτιμηθούν ποσοτικά στάθηκε δυνατό να οριστούν με ακρίβεια οι ιδιότητές τους που διέκριναν τα μακροφάγα κάθε βαθμίδας ενεργοποίησης. Μεταξύ αυτών των δεικτών περιλαμβάνονται η έκκριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και η έκφραση μεμβρανικών αντιγόνων και υποδοχέων. Έγινε πολύ γρήγορα αντιληπτό ότι ορισμένες παράμετροι παρουσίαζαν αύξηση με την ενεργοποίηση ενώ ορισμένες άλλες μειώνονταν. Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι μεταβολές ορισμένων από αυτές τις παραμέτρους είναι απευθείας ανάλογες των μεταβολών της ικανότητας των μακροφάγων να επιτελούν πολύπλοκες διεργασίες. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC-II (Ia-αντιγόνων) στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων που αυξάνεται παράλληλα και ανάλογα με την ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα. Ένα

άλλο παράδειγμα είναι ότι η αύξηση της έκφρασης του μορίου LFA-1 στην μεμβράνη των μακροφάγων είναι παράλληλη και ανάλογη της ικανότητας έκκρισης TNFα και Πρωτεασών της Σερίνης . (Lewis και McGee , 1992) .

Έχουν προταθεί πολλές παράμετροι σαν δείκτες του βαθμού ενεργοποίησης των μακροφάγων και ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται και η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , η έκφραση των Υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης (Mokoenka και Gordon, 1985) , η αναγνώριση ορισμένων χαρακτηριστικών γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των ενεργοποιημένων μακροφάγων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Ishimura και συν., 1987) και η μέτρηση των μεταβολών της παραγωγής του mRNA της Λυσοζύμης με in situ Υβριδισμό (Keshav και συν., 1991) . Ωστόσο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ανάλογα με τον διεγέρτη μπορεί ορισμένες παράμετροι να επηρεάζονται ή να μην επηρεάζονται , επειδή υπάρχουν διαφορές στις οδούς Δευτέρων Μηνυτών που χρησιμοποιούν για την ενεργοποίηση του μακροφάγου . Η ενεργοποίηση εξάλλου αποτελεί μεταβολή της λειτουργικής κατάστασης του μονοκύτταρου φαγοκυττάρου για την επίτευξη ενός σκοπού , ο οποίος μπορεί να επιτυγχάνεται και χωρίς την μεταβολή της παραμέτρου που επιλέξαμε να μετρήσουμε . Τέλος , για καθαρά πρακτικούς λόγους πρέπει ένα κριτήριο εκτίμησης της ενεργοποίησης των μακροφάγων να είναι εύκολα αναγνωρίσιμο και άμεσα μετρήσιμο χωρίς χρονοβόρες ή πολύπλοκες τεχνικές . Τέτοια κριτήρια προτάθηκαν κατά το τέλος της δεκαετίας του 1970 και ορισμένα από αυτά χρησιμοποιούνται ακόμα ευρύτητα (North, 1978 , Cohn, 1978 , Kamonisky και Lazdins, 1978 , Adams και Hamilton, 1984) . Έκτοτε έχουν προστεθεί και μερικά ακόμα κριτήρια . Στον πίνακα που ακολουθεί θα παρουσιαστούν τα κυριότερα από αυτά .

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ : Αύξηση του μεγέθους των κυττάρων , στρογγυλοποίηση και επιπέδωση του κυττάρου , αύξηση της πύχωσης της κυτταρικής μεμβράνης , αύξηση του αριθμού και μεγέθους των λυσοσωματικών κοκκίων , μείωση του αριθμού των ψευδοποδιών .
2. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ : Αύξηση της έκφρασης των Ia-αντιγόνων και του αντιγόνου F4/80 , μείωση της έκφρασης της gp160 και του υποδοχέα για τον CSF-1 .
3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ : Αύξηση της κυτταρικής πρωτεΐνης , αύξηση της κατανάλωσης σακχάρου και οξυγόνου , μείωση του κυτταρικού ATP , αύξηση της παραγωγής γαλακτικού οξέος , αύξηση της έκφρασης γονιδίων (μεταγραφή και μετάφραση) .
4. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ : Αύξηση της παραγωγής και έκκρισης Όξινων Υδρολασών και Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής και έκκρισης των περισσότερων Ουδέτερων Πρωτεασών και της 5-Νουκλεοτιδάσης , πλήρης καταστολή της δραστηριότητας Υπεροξειδάσης .
5. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ : Αύξηση της παραγωγής και έκκρισης O_2^{-1} , H_2O_2 και NO .
6. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ : Αυξημένη έκκριση TNFα , IL-1 , IL-6 , IL-8 , PDGF , INFα και INFβ .
7. ΛΙΠΙΔΙΑ : Αύξηση της ικανότητας έκκρισης αραχιδονικού οξέος , εικοσανοειδών και PAF .

Από αυτά τα κριτήρια κανένα δεν μπορεί να θεωρηθεί απόλυτος δείκτης της ενεργοποίησης των μακροφάγων και για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η χρήση ενός συνδυασμού μερικών διαφορετικών μεταξύ τους παραμέτρων για την ορθή εκτίμηση των μεταβολών της λειτουργικής τους κατάστασης . Εναλλακτικά θα πρέπει να εκτιμάται η ικανότητα καταστροφής μικροβίων , ενδοκυττάρων παρασίτων ή νεοπλασματικών κυττάρων , αφού οι δραστηριότητες αυτές αντιπροσωπεύουν το άθροισμα πολλών επιμέρους ιδιοτήτων . Έχει προταθεί η χρήση της in vitro κυτταροτοξικής δράσης τους (δηλαδή της ικανότητας να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα) και της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου

αποπλατυσμένα, με λίγες αυλακώσεις αλλά έντονη πτύχωση και πολλά λυσοσωματικά κοκκία. Επίσης τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσίαζαν εντονότερη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και μεγαλύτερες δραστηριότητες των λυσοσωματικών τους ενζύμων (Morland και Karlan, 1977). Από άλλες μελέτες είναι γνωστό ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν περισσότερο H_2O_2 από τα φλεγμονώδη μακροφάγα (Nathan και Root, 1977). Τα περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί in vivo με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) ή *Corynebacterium parvum* είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν μια έντονη κυτταροτοξικότητα κατά νεοπλασματικών κυττάρων, όπως π.χ. λύση λευχαιμικών κυττάρων μέσω των Fc-υποδοχέων τους (με ADCC). Αντιθέτως τα φλεγμονώδη μακροφάγα που διεγέρθηκαν με έγχυση θειογλυκολλικού ζυμού ενδοπεριτοναϊκά δεν καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα με ADCC, δηλαδή δεν είναι κυτταροτοξικά (Nathan και συν., 1980). Τέλος, από άλλες μελέτες είναι γνωστό ότι τα φλεγμονώδη και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην σύνθεση πρωτεϊνών. Κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί με BCG ή *Propionibacterium acnes* παρουσίαζαν μικρότερη πρωτεϊνοσυνθετική δράση από φλεγμονώδη μακροφάγα που είχαν διεγερθεί με θειογλυκολλικό ζυμό ή ζυμό πεπτονών. Τα φλεγμονώδη μακροφάγα δεν παρουσίαζαν μεταβολές στο πρωτεϊνοσυνθετικό τους προφίλ μετά από μια επώαση 48 ωρών με LPS, ενώ τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσίαζαν αρκετές μεταβολές στην σύνθεση των επιμέρους πρωτεϊνών μετά από επώαση με LPS (Largen και Tannenbaum, 1986).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνεται ένα παράδειγμα του συνόλου των διαφορετικών ιδιοτήτων που διέπουν τα μακροφάγα σε τρεις διαφορετικές βαθμίδες ενεργοποίησης.

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΕ ΤΡΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Αναπτοκρινόμενα	Ευαίσθητοποιημένα	Ενεργοποιημένα
Δεν εκφράζουν τα Ia-αντιγόνα	Εκφράζουν έντονα τα Ia-αντιγόνα	Εκφράζουν ασθενώς τα Ia-αντιγόνα
Δεν εκφράζουν τα μόρια LFA-1	Εκφράζουν έντονα τα μόρια LFA-1	Εκφράζουν έντονα τα μόρια LFA-1
Δεν εκκρίνουν TNF α	Δεν εκκρίνουν TNF α	Εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες TNF α
Δεν εκκρίνουν H_2O_2 και O_2^{-1}	Εκκρίνουν άφθονο H_2O_2 και O_2^{-1}	Εκκρίνουν άφθονο H_2O_2 και O_2^{-1}
Δεν συνδέουν καρκινικά κύτταρα	Συνδέουν καρκινικά κύτταρα	Συνδέουν καρκινικά κύτταρα
Διαιρούνται μιτωτικά.	Δεν διαιρούνται (τελικά κύτταρα)	Δεν διαιρούνται (τελικά κύτταρα)
Δεν παρουσιάζουν αντιγόνα	Παρουσιάζουν αντιγόνα	Δεν παρουσιάζουν αντιγόνα
Δεν είναι κυτταροτοξικά	Δεν είναι κυτταροτοξικά	Είναι κυτταροτοξικά
Δεν είναι μικροβιοκτόνα	Είναι μικροβιοκτόνα	Είναι μικροβιοκτόνα

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ.

Η ανάλυση του μηχανισμού ενεργοποίησης των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων αναπτύχθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά την ανακάλυψη των ειδικών δεικτών της ενεργοποίησής τους. Με την χρήση αυτών των δεικτών που αναγνωρίζονταν εύκολα και μπορούσαν να εκτιμηθούν ποσοτικά στάθηκε δυνατό να οριστούν με ακρίβεια οι ιδιότητές τους που διέκριναν τα μακροφάγα κάθε βαθμίδας ενεργοποίησης. Μεταξύ αυτών των δεικτών περιλαμβάνονται η έκκριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και η έκφραση μεμβρανικών αντιγόνων και υποδοχέων. Έγινε πολύ γρήγορα αντιληπτό ότι ορισμένες παράμετροι παρουσίαζαν αύξηση με την ενεργοποίηση ενώ ορισμένες άλλες μειώνονταν. Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι μεταβολές ορισμένων από αυτές τις παραμέτρους είναι απευθείας ανάλογες των μεταβολών της ικανότητας των μακροφάγων να επιτελούν πολύπλοκες διεργασίες. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC-II (Ia-αντιγόνων) στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων που αυξάνεται παράλληλα και ανάλογα με την ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα. Ένα

άλλο παράδειγμα είναι ότι η αύξηση της έκφρασης του μορίου LFA-1 στην μεμβράνη των μακροφάγων είναι παράλληλη και ανάλογη της ικανότητας έκκρισης TNFα και Πρωτεασών της Σερίνης . (Lewis και McGee , 1992) .

Έχουν προταθεί πολλές παράμετροι σαν δείκτες του βαθμού ενεργοποίησης των μακροφάγων και ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται και η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , η έκφραση των Υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης (Mokoena και Gordon, 1985) , η αναγνώριση ορισμένων χαρακτηριστικών γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των ενεργοποιημένων μακροφάγων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Irimura και συν., 1987) και η μέτρηση των μεταβολών της παραγωγής του mRNA της Λυσοζύμης με in situ Υβριδισμό (Keshav και συν., 1991) . Ωστόσο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ανάλογα με τον διεγέρτη μπορεί ορισμένες παράμετροι να επηρεάζονται ή να μην επηρεάζονται , επειδή υπάρχουν διαφορές στις οδούς Δευτέρων Μηνυτών που χρησιμοποιούν για την ενεργοποίηση του μακροφάγου . Η ενεργοποίηση εξάλλου αποτελεί μεταβολή της λειτουργικής κατάστασης του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου για την επίτευξη ενός σκοπού , ο οποίος μπορεί να επιτυγχάνεται και χωρίς την μεταβολή της παραμέτρου που επιλέξαμε να μετρήσουμε . Τέλος , για καθαρά πρακτικούς λόγους πρέπει ένα κριτήριο εκτίμησης της ενεργοποίησης των μακροφάγων να είναι εύκολα αναγνωρίσιμο και άμεσα μετρήσιμο χωρίς χρονοβόρες ή πολύπλοκες τεχνικές . Τέτοια κριτήρια προτάθηκαν κατά το τέλος της δεκαετίας του 1970 και ορισμένα από αυτά χρησιμοποιούνται ακόμα ευρύτατα (North, 1978 , Cohn, 1978 , Kamovsky και Lazdins, 1978 , Adams και Hamilton, 1984) . Εκτοτε έχουν προστεθεί και μερικά ακόμα κριτήρια . Στον πίνακα που ακολουθεί θα παρουσιαστούν τα κυριότερα από αυτά .

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ : Αύξηση του μεγέθους των κυττάρων , στρογγυλοποίηση και επιπέδωση του κυττάρου , αύξηση της πύκνωσης της κυτταρικής μεμβράνης , αύξηση του αριθμού και μεγέθους των λυσοσωματικών κοκκίων , μείωση του αριθμού των ψευδοποδιών .
2. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ : Αύξηση της έκφρασης των Ia-αντιγόνων και του αντιγόνου F4/80 , μείωση της έκφρασης της gp160 και του υποδοχέα για τον CSF-1 .
3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ : Αύξηση της κυτταρικής πρωτεΐνης , αύξηση της κατανάλωσης σακχάρου και οξυγόνου , μείωση του κυτταρικού ATP , αύξηση της παραγωγής γαλακτικού οξέος , αύξηση της έκφρασης γονιδίων (μεταγραφή και μετάφραση) .
4. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ : Αύξηση της παραγωγής και έκκρισης Όξινων Υδρολασών και Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής και έκκρισης των περισσότερων Ουδέτερων Πρωτεασών και της 5-Νουκλεοτιδάσης , πλήρης καταστολή της δραστηριότητας Υπεροξειδάσης .
5. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ : Αύξηση της παραγωγής και έκκρισης O_2^{-1} , H_2O_2 και NO .
6. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ : Αυξημένη έκκριση TNFα , IL-1 , IL-6 , IL-8 , PDGF , INFα και INFβ .
7. ΛΙΠΙΔΙΑ : Αύξηση της ικανότητας έκκρισης αραχιδονικού οξέος , εικοσανοειδών και PAF .

Από αυτά τα κριτήρια κανένα δεν μπορεί να θεωρηθεί απόλυτος δείκτης της ενεργοποίησης των μακροφάγων και για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η χρήση ενός συνδυασμού μερικών διαφορετικών μεταξύ τους παραμέτρων για την ορθή εκτίμηση των μεταβολών της λειτουργικής τους κατάστασης . Εναλλακτικά θα πρέπει να εκτιμάται η ικανότητα καταστροφής μικροβίων , ενδοκυττάρων παρασίτων ή νεοπλασματικών κυττάρων , αφού οι δραστηριότητες αυτές αντιπροσωπεύουν το άθροισμα πολλών επιμέρους ιδιοτήτων . Έχει προταθεί η χρήση της in vitro κυτταροτοξικής δράσης τους (δηλαδή της ικανότητας να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα) και της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου

ως αξιόπιστα κριτήρια για την εκτίμηση της ενεργοποίησης των μακροφάγων σε μελέτες εκτίμησης νέων μεθόδων αντιμετώπισης του καρκίνου (Deodhar και Bama, 1986).

Η ικανότητα εκτίμησης της ενεργοποίησης των μακροφάγων είναι σημαντική επειδή επιτρέπει την διαπίστωση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων διέγερσης της αντινεοπλασματικής δραστηριότητας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, στην οποία στηρίζεται κατά μεγάλο βαθμό η προσπάθεια "ανοσοθεραπείας" του καρκίνου (Deodhar και Bama, 1986). Έχει ήδη προταθεί και μελετηθεί η χρήση της ανασυνδυασμένης INF γ για την αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του κακοήθους μελανώματος, με την παρατήρηση ότι προάγει την αντινεοπλασματική δράση των μακροφάγων (Jaffe και Herberman, 1988).

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν από μια μεγάλη ποικιλία ουσιών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται μικροβιακά προϊόντα, κυτταροκίνες, φυτικά προϊόντα, ορμόνες και πολλά άλλα. Στην συνέχεια θα αναφερθούν ορισμένα παραδείγματα τέτοιων ουσιών.

Οι πρώτες μελέτες της ενεργοποίησης των μακροφάγων ανέφεραν την *in vivo* ενεργοποίηση σε ζώα που έπασχαν από λοιμώξεις με *Mycobacteria*, *Listeria*, *Brucella* ή *Toxoplasma*. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα μακροφάγα ενεργοποιούνται από συγκεκριμένα μόρια του κυτταροπλάσματος ή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροβίων και ότι η ενεργοποίηση θα μπορούσε να επιτευχθεί και *in vitro*. Με την πάροδο των ετών έγινε αντιληπτό ότι και πολλές μη-μικροβιακές ουσίες (π.χ. ορισμένες Κυτταροκίνες και ιδιαίτερα Λεμφοκίνες που προέρχονταν από T-Λεμφοκύτταρα) επίσης ενεργοποιούσαν τα μακροφάγα. Προοδευτικά προστέθηκαν πολλές μη-αντιγονικές και μη-ανοσολογικές ουσίες στον κατάλογο των ενεργοποιητών των μακροφάγων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και ορισμένα πολυανιόντα (π.χ. το dsRNA), ορμόνες του σώματος, αλλοιωμένες λιποπρωτεΐνες και τα κροκυδωμένα ανοσοσυμπλέγματα που περιείχαν IgG2b. Η μεγάλη αυτή ποικιλία των παραγόντων που μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα δεν είναι δυνατό να αναλυθεί, θα δοθούν όμως χαρακτηριστικά παραδείγματα από τις διάφορες κατηγορίες.

Τα Gram(+) μικρόβια διαθέτουν ένα ισχυρό τοίχωμα που μεταξύ άλλων περιέχει Πεπτιδογλυκάνες και Λιπoteιχοϊκά Οξέα. Και τα δύο αυτά συστατικά είναι αρκετά ισχυροί ενεργοποιητές των μακροφάγων και έχουν μελετηθεί εκτενώς *in vitro* για τις επιδράσεις τους. (Hauschildt και Kleine, 1995).

Τα Λιπoteιχοϊκά Οξέα (LTA) είναι μεγάλα και πολύπλοκα μόρια που αποτελούνται από ένα "σκελετό" φωσφορικής πολυγλυκερόλης στον οποίο συνδέεται μια επαναλαμβανόμενη πολυσακχαριτική ομάδα. Τα Λιπoteιχοϊκά Οξέα προκαλούν αυξημένη έκκριση κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-8 και TNF α), Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου και λυσοσωματικών ενζύμων και αύξηση της κυτταροτοξικότητας των μακροφάγων. Οι Πεπτιδογλυκάνες είναι μεγάλα μόρια που αποτελούνται από τον πολυμερισμό των διμερών μορίων N-Ακετυλομουραμικού Οξέος-N-Ακετυλογλυκοσαμίνης, στα οποία προστίθενται πλάγιες ολιγοπεπτιδικές ομάδες. Η μικρότερη μερική δομή των Πεπτιδογλυκανών που ενεργοποιεί τα μακροφάγα είναι το Μουραμυλο-διπεπτιδίο (MDP), δηλαδή το N-ακετυλομουράμυλο-αλανυλογλουταμικό οξύ. Το MDP προκαλεί αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας στα μακροφάγα και αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC-II, αυξημένη έκκριση κυτταροκινών (IL-1, IL-6 και IL-8), Νιτρικού Οξειδίου, προσταγλανδινών και λυσοσωματικών ενζύμων και τέλος αυξημένη κυτταροτοξική δραστηριότητα. Το MDP προκαλεί αυτά τα φαινόμενα μέσω της διέγερσης της PLA $_2$ και της PKC. Ένα

παράδειγμα της δράσης του MDP αφορά στην παραγωγή H_2O_2 : όταν φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα ενεργοποιηθούν με MDP παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα παραγωγής H_2O_2 και O_2^{1-} μετά από διέγερση με ουσίες που επηρεάζουν την PKC , το οποίο σημαίνει ότι το MDP αυξάνει το διαθέσιμο για διέγερση ποσό της Κινάσης στα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Pabst και Johnston, 1980) .

Είναι γνωστό ότι τα πολυσακχαριτικά στοιχεία της κάψας του Πνευμονιόκοκκου ενεργοποιούν τα μακροφάγα με την ίδια δραστηριότητα που τα ενεργοποιούν και οι ζωντανοί πνευμονιόκοκκοι ή η ενδοτοξίνη των Gram(-) μικροβίων . Οι πολυσακχαρίτες της κάψας του Πνευμονιόκοκκου προκαλούν την παραγωγή και έκκριση TNFα από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και για τον λόγο αυτό θεωρούνται υπεύθυνοι για το σύνδρομο Σηπτικής Καταπληξίας που συνοδεύει πολλές λοβώδεις πνευμονίες (Simpson και συν., 1994) .

Επίσης ορισμένα κυτταροπλασματικά συστατικά των Gram(+) μικροβίων τα οποία ονομάζονται Εξωτοξίνες (Exotoxins) διεγείρουν τα μακροφάγα , αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα προαναφερθέντα μεμβρανικά συστατικά τους . Τέτοια συστατικά του κυτταροπλάσματος είναι οι εξωτοξίνες SEB , SEC₂ , SED και SEE (Εντεροτοξίνες) , οι εξωτοξίνες ETA και ETB (Ερυθρογόνες τοξίνες) , η τοξίνη TSST-1 και η Α-Εξωτοξίνη της *Pseudomonas aeruginosa* . (Hauschildt και Kleine , 1995) .

Τα Gram(-) μικρόβια διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη ένα εξαιρετικά ισχυρό ενεργοποιητή των μακροφάγων που ονομάζεται Ενδοτοξίνη ή Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide ή LPS) . Τα μόρια αυτά αποτελούν σημαντικά συστατικά του τοιχώματος των Gram(-) μικροβίων , επειδή προσδίδουν σταθερότητα στο τοίχωμά τους και προστασία από ορισμένα αντιβιοτικά ή από μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή . Οι ενδοτοξίνες αποτελούνται από τρεις περιοχές με διαφορετική δομή και λειτουργία , δηλαδή από το Λιπίδιο Α , τον πολυσακχαριτικό πυρήνα και το Ο-αντιγόνο . Το Λιπίδιο Α (που αποτελεί το τμήμα του μορίου της ενδοτοξίνης που ενεργοποιεί τα μακροφάγα) αποτελείται από ομάδες β-D-Γλυκοσαμίνης συνδεδεμένες με 1,6-δεσμούς , στις οποίες συνδέονται διάφορες ακυλομάδες . Ο πολυσακχαριτικός πυρήνας περιέχει τον KDO-μονοσακχαρίτη και διάφορες επτοπυρανόζες . Τέλος το Ο-αντιγόνο είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δύο έως οκτώ μονοσακχαριτών και μπορεί να περιέχει πολλά ακόμα συστατικά (αμινοσακχαρίτες , δεοξυσακχαρίτες , φωσφοσακχαρίτες κ.α.) . Η ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS οδηγεί σε πολλές εκδηλώσεις , όπως την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου , την παραγωγή κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNFα, κ.α.) και την αυξημένη αντινεοπλασματική δράση τους . Απαιτείται ελάχιστος χρόνος έκθεσης των μακροφάγων στην ενδοτοξίνη για να ενεργοποιηθούν . Συνήθως λίγα λεπτά επαφής των κυττάρων με τον LPS είναι αρκετά για να επιτευχθεί μέγιστη ενεργοποίηση του μακροφάγου , π.χ. για παραγωγή TNFα (Gallay και συν., 1993).

Στην μεμβράνη των Gram(-) μικροβίων υπάρχουν επίσης διάφορα άλλα αντιγονικά μόρια , όπως τα Μεμβρανικά Λιποπεπτιδία και οι OMP-F Πορίνες . Πολλά από αυτά τα μόρια προκαλούν ενεργοποίηση των μακροφάγων με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση μορίων MHC-II , την έκκριση κυτταροκινών , την αυξημένη φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών και την έντονη κυτταροτοξική δράση . Επίσης όμως υπάρχουν και ορισμένα άλλα μόρια στις μεμβράνες τους τα οποία καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων με διάφορους έμμεσους μηχανισμούς . Τα Μυκοβακτηρίδια , οι Ακτινομύκητες και διάφορα άλλα βακτήρια τα οποία δεν ανήκουν ούτε στα Gram(+) ούτε στα Gram(-) μικρόβια περιέχουν επίσης ορισμένα μόρια πεπτιδικής ή πολυσακχαριτικής φύσης που ενεργοποιούν τα

μακροφάγα . Παραδείγματα αποτελούν η Φυματίνη (Tuberculin) , τα Μουραμυλο-διπεπτιδία (MDP) και τα πολυμερή Αραβινογαλακτάνης με πλάγιες αλυσίδες (υποκαταστάτες) Μυκολικού οξέος (Hauschildt και Kleine , 1995) . Ήδη από την δεκαετία του 1970 είναι γνωστή η ικανότητα του MDP από το *Mycobacterium smegmatis* να ενεργοποιεί τα μακροφάγα σε κυτταροκαλλιέργειες . Συγκεκριμένα είχε αποδειχτεί ότι το MDP προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του μακροφάγου με αποτέλεσμα την αποπλάτυνση και επιπέδωση των κυτάρων , την αυξημένη προσκόλλησή τους στον πυθμένα των τρυβλίων , την παραγωγή Κολλαγενάσης , την έκκριση ενός αυξητικού παράγοντα με δραστηριότητα FGF , την έκκριση προσταγλανδινών (μεταξύ των οποίων και PGE₂) και την αύξηση του κυτταροπλασματικού cAMP (Wahl και συν., 1979) .

Ίσως η πιο χαρακτηριστική από τις ουσίες που προκαλούν ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι η Ιντερφερόνη-γ , που αποτελεί τον ισχυρότερο από τους ενεργοποιητές των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Η καλλιέργεια μακροφάγων με INF-γ προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής H₂O₂ και O₂⁻¹ , αύξηση της ικανότητας καταστροφής ενδοκυττάρων παρασίτων όπως το *Toxoplasma* και η *Leishmania* και επίσης προκαλεί αύξηση του μεγέθους τους , αλλαγή του σχήματός τους και πολλές χαρακτηριστικές μεταβολές της μορφολογίας τους (Nathan και συν.,1983 , Murray και συν.,1985 , Freund και Pick,1985) . Η INF-γ είναι δραστική τόσο in vitro όσο και in vivo και μπορεί να χορηγηθεί σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και δοσολογιών (από 0.01 ως 250 U/ml) . Ενεργοποιεί τα μακροφάγα για αντιμικροβιακή και κυτταροστατική δραστηριότητα . Η INF-γ προκαλεί την ανάπτυξη κυτταροτοξικής δραστηριότητας από τα μακροφάγα είτε σε συνδυασμό με έναν άλλο διεγέρτη (π.χ. ενδοτοξίνη) ή με δύο αλληλοδιάδοχες επώσεις , αρχικά με χαμηλή και στην συνέχεια με υψηλή δόση INF-γ (Ruco και Meltzer,1978 , Ruco,1981) . Η χορήγηση INF-γ στα μακροφάγα επίσης προκαλεί αύξηση της φαγοκυττάρωσης μέσω Fc-υποδοχέων , αύξηση της παραγωγής IL-1 και της έκφρασης των Ia-αντιγόνων και πολλές ακόμα μεταβολές (Brandwein,1986 , Junji και συν.,1987 , Schneider και συν., 1987) .

Τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν και από ορισμένες ορμόνες του σώματος . Η ορμόνη της υπόφυσης Μελατονίνη ενεργοποιεί τα ανθρώπινα μονοκύτταρα για αυξημένη παραγωγή και έκκριση IL-1 , H₂O₂ , O₂⁻¹ και NO[•] , με αποτέλεσμα υψηλή αντινεοπλασματική δραστηριότητα . Τέλος η Μελατονίνη προκαλεί μετατόπιση (translocation) της PKC στα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα , από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη . Η PKC διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση από την Μελατονίνη και φάνηκε να ελέγχει τις υπόλοιπες παραμέτρους που αναφέρθηκαν (Morrey και συν., 1994) . Επίσης έχει αναφερθεί ότι η Αυξητική Ορμόνη και η Προλακτίνη ενεργοποιούν τα μακροφάγα για παραγωγή H₂O₂ μετά από διέγερση σε PMA (Warwick-Davies και συν., 1995) . Η ικανότητα αυτή της Αυξητικής Ορμόνης και της Προλακτίνης να ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα για υψηλή παραγωγή H₂O₂ διαμεσολαβείται από άγνωστο ακόμα μηχανισμό Δεύτερων Μηνυτόρων . Η Αυξητική Ορμόνη δεν παρουσιάζει συνέργεια με τον LPS στην παραγωγή H₂O₂ . Αντιθέτως αν σε μονοκύτταρα που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί με LPS χορηγηθεί Αυξητική Ορμόνη , παρουσιάζεται καταστολή της διέγερσης του παράγοντα NFκB και μείωση της έκκρισης TNFα από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα (Haeflner και συν., 1997) . Τέλος έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση των μακροφάγων και από τα γλυκοκορτικοειδή . Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με υψηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης για μικρό χρονικό διάστημα ή με μικρές δόσεις δεξαμεθαζόνης για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί την ενεργοποίησή τους , έτσι ώστε να παράγουν πολύ μεγάλες ποσότητες IL-1β και NO[•] μετά από διέγερση με LPS (Broug-

Holub και Kraal, 1996) . Η Καλσιτριόλη (1,25-διϋδροξυ-Βιταμίνη D3) δεν είναι ορμόνη αλλά προκαλεί ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων . Συγκεκριμένα η Καλσιτριόλη προκαλεί αυξημένη παραγωγή H_2O_2 από τα μονοκύτταρα και οδηγεί τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα σε αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης , αυξημένη έκφραση των Fc-υποδοχέων τους και σε ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας κατά των καρκινικών σειρών B-16 και L929 . Τέλος προκαλεί την σύντηξη των μακροφάγων σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα (Abe και συν.,1984 , Cohen και συν.,1986) .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να προέλθει και από την επαφή τους με λιποπρωτεΐνες , κυρίως με LDL και ακετυλιωμένη LDL . Η επώαση μακροφάγων με LDL-λιποπρωτεΐνες οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής και έκκρισης β-Γλυκουρονιδάσης , PGE_2 και άλλων εικοσανοειδών (Kelley και συν.,1988) . Επίσης η ενδοκύττωση βVLDL από τα μακροφάγα προκαλεί αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε Ώξινη Φωσφατάση και μεταβολές στην κατανομή του ενζύμου στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια (Jones και συν., 1991) . Είναι πιθανό ότι αυτή η ενεργοποίηση των μακροφάγων από τις λιποπρωτεΐνες συμβάλλει ενεργά στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης . Ωστόσο τα ενεργοποιημένα από LDL-λιποπρωτεΐνες μακροφάγα είναι διαφορετικά από τα άλλα ενεργοποιημένα μακροφάγα : παράγουν ειδικές πρωτεΐνες για να αντέχουν την υποξία και το βιολογικό stress , όπως π.χ. την πρωτεΐνη ORP150 (Tsukamoto και συν., 1996) . Μετά από φαγοκυττάρωση οξειδωμένης LDL , τα μακροφάγα παρουσιάζουν αρχικά μια παροδική αύξηση των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων που ακολουθείται από παρατεταμένη μείωση του επιπέδου του μεταβολισμού τους (DeVries και συν., 1998) . Τα ενεργοποιημένα από LDL-λιποπρωτεΐνη μακροφάγα είναι αδρανή στην περαιτέρω διέγερση με LPS και μετά από χορήγηση ενδοτοξίνης δεν παρουσιάζουν ούτε κινητοποίηση του παράγοντα NFκB , ούτε έκκριση TNFα και IL-1β (Ohlsson και συν., 1996) .

Ένα φυσικό τετραπεπτιδίο που ονομάζεται Τουφτσίνη (Tuftsin) αποτελεί επίσης ισχυρό διεγέρτη των μακροφάγων . Η Τουφτσίνη είναι το τετραπεπτιδίο Θρεονίνη-Λυσίνη-Προλίνη-Αργινίνη (Thr-Lys-Pro-Arg) και προέρχεται από την επίδραση μιας Ενδοκαρβόξυ-Πεπτιδάσης και της Λευκοκινινάσης επάνω στην γ-σφαιρίνη του ορού Λευκοκινίνη (Najjar και Fridkin, 1983) . Η Τουφτσίνη προκαλεί αυξημένη χημειοταξία και φαγοκυττάρωση και έντονη αντινεοπλασματική δράση στα μακροφάγα που ενεργοποιεί .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ενεργοποιούνται από πολυπεπτιδία που αποτελούν προϊόντα της διάσπασης του κολλαγόνου αλλά και από συνθετικά πολυπεπτιδία της μορφής (Pro-Pro-Gly)₅ . Όταν τα μακροφάγα επωαστούν με τέτοια πολυπεπτιδία ενεργοποιούνται και παράγουν μεγάλες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 , παρουσιάζουν έντονη χημειοτακτική κίνηση , εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες Ζελατινάσης και Ελαστάσης και αναπτύσσουν κυτταροτοξικότητα κατά των νεοπλασματικών κυττάρων των σειρών N1S1 , L2 και RBL-1 . Τα παραπάνω δείχνουν ότι τα προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου προκαλούν περαιτέρω ενεργοποίηση των μακροφάγων και συμβάλλουν έτσι στην παράταση της διάρκειας των φλεγμονωδών αντιδράσεων του πνεύμονα (Laskin και συν., 1994) .

Ο πολυσακχαρίτης Ώξινη Αραβινογαλακτάνη , που έχει MB 75 kDa και προέρχεται από το φυτό *Echinacea purpurea* , είναι αποτελεσματικός ενεργοποιητής των μακροφάγων *in vivo* και *in vitro* . Προκαλεί αντινεοπλασματική δράση των μακροφάγων , αυξημένη ικανότητα καταστροφής της *Leishmania* και άλλων παρασίτων και αυξημένη παραγωγή των κυτταροκινών TNFα, IL-1 και INF-β2 . Η ικανότητα ενεργοποίησης αφορά μόνο τα μακροφάγα και όχι τα λεμφοκύτταρα . (Luettig και συν.,1989) .

Τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW-264 φαγοκυτταρώνουν βακτηριακό DNA . Ορισμένες από τις αλληλουχίες του βακτηριακού DNA προκαλούν την διέγερση του παράγοντα μεταγραφής NFκB και την ενεργοποίηση του μακροφάγου . Το ίδιο αποτέλεσμα προκαλούν και ορισμένες συνθετικές αλυσίδες νουκλεοτιδίων με δομή διπλής έλικας . Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των μακροφάγων * είναι η μεταγραφή του mRNA για τον TNFα , την IL-1β , τον Αναστολέα του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου και την iNOS (Stacey και συν., 1996) .

Η χρήση ενός συνθετικού παραγώγου που ονομάζεται CL-246,738 (Τριϋδροχλωρική-3,6-Bis-[2-πιπεριδινό-αιθόξυ]-ακρινιδίνη) οδηγεί στην δημιουργία μακροφάγων με έντονη αντινεοπλασματική δράση . Η δράση αυτή οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή Ουδέτερων Πρωτεασών από τα μακροφάγα και όχι στην αυξημένη έκκριση Αργινάσης ή H₂O₂ (Shang-Wang και συν., 1985) .

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται και μετά από φαγοκυττάρωση ανόργανων υλικών . Είναι γνωστό ότι η επώαση βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με ίνες αμιάντου (χρυσοσίλη ή κροκιδολίτη) επί 48 ώρες προκαλεί την αυξημένη παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Το Νιτρικό Οξείδιο συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της Διάμεσης Πνευμονικής Ίνωσης , η οποία αποτελεί συχνή συνέπεια της αμιαντώσεως (Thomas και συν., 1994) . Τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW-264.7 ενεργοποιούνται από την φαγοκυττάρωση σωματιδίων πυριτίου (silica) και παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση TNFα αλλά όχι Νιτρικού Οξειδίου . Η αυξημένη παραγωγή TNFα μπορεί να προκαλέσει την φλεγμονώδη διήθηση και ίνωση της περιοχής όπου τα μακροφάγα έρχονται σε επαφή με το πυρίτιο (Claudio και συν., 1995) .

Για την δημιουργία "φλεγμονωδών" ή "ευαίσθητοποιημένων" μακροφάγων , in vitro ή in vivo , έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες ουσίες ερεθιστικές ή μη-ερεθιστικές . Για παράδειγμα η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση καζεΐνης ή θειογλυκολλικού ζωμού ή ζωμού πεπτονών (proteose-peptone broth) ή καραγενίνης οδηγεί στην δημιουργία φλεγμονωδών μακροφάγων τα οποία χαρακτηρίζονται από : α) μεγάλο μέγεθος , β) αυξημένη ικανότητα επικόλλησης σε γυάλινες και πλαστικές επιφάνειες , γ) αυξημένη πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης , δ) επιμήκη ψευδοπόδια και ε) αύξηση των λυσοσωματικών τους κοκκίων και κυστιδίων . Στα ίδια περίπου αποτελέσματα οδηγεί και η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση λιγότερο ερεθιστικών παραγόντων όπως ελαίου παραφίνης (mineral oil) ή γλυκερόλης ή διαλύματος Γλυκαγόνης ή υπέρτονου διαλύματος NaCl . Ορισμένες από τις ουσίες που αναφέρθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν και in vitro για την δημιουργία φλεγμονωδών μακροφάγων , αλλά συνήθως χρησιμοποιούνται σωματίδια zymosan (Ogundsdottir και Weir, 1980) . Η μελέτη της χρήσης διάφορων τέτοιων διεγερτών (Θειογλυκολλικό ζωμό , ζωμό πεπτονών ή διαλύματος τοιχωμάτων Στρεπτοκόκκου A) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι όλα τα φλεγμονώδη μακροφάγα είχαν παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες μεταβολές στις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν . Έτσι παρουσίαζαν όλα μείωση της δραστηριότητας α-Μαννοσιδάσης και αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , β-Γλυκουρονιδάσης και N-Ακετυλο-β-Νευραμινιδάσης , αλλά μόνο τα διεγερμένα με Θειογλυκολλικό ζωμό εμφάνιζαν αύξηση της κυτταρικής πρωτεΐνης και μόνο τα διεγερμένα με ζωμό πεπτονών εμφάνιζαν μείωση της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης , ενώ τα διεγερμένα με Στρεπτόκοκκο A μακροφάγα δεν εμφάνιζαν την αύξηση του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου που εμφάνιζαν τα άλλα κύτταρα (Snyder και Baggiolini, 1978) . Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι μετά από επώαση με PMA τα φλεγμονώδη μακροφάγα που είχαν διεγερθεί με Καζεΐνη παρουσίαζαν πολύ μεγαλύτερη παραγωγή H₂O₂ από εκείνα που διεγέρθηκαν με Θειογλυκολλικό ζωμό (Nathan και Root, 1977) .

ΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ .

Παρά την μεγάλη ποικιλία φαινομένων που προκαλεί η ενεργοποίηση στα διάφορα είδη κυττάρων, το βιολογικό υπόβαθρο της ενεργοποίησης είναι κοινό (Kaczmarek και Kaminska, 1989) . Ένας εξωτερικός διεγέρτης (π.χ. νευρομεταβιβαστής ή αυξητικός παράγοντας) συνδέεται με τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς και προκαλεί την δημιουργία Δεύτερων Μηνυτόρων στο εσωτερικό του κυττάρου , οι οποίοι θα προκαλέσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων . Τα γονίδια αυτά (όπως π.χ. της Αποκαρβοξυλάσης της Ορνιθίνης ή τα ογκογονίδια c-myc και c-fos) είναι υπεύθυνα για την έναρξη πολλών φαινομένων που θα οδηγήσουν στην φαινοτυπική μεταβολή του κυττάρου που ενεργοποιήθηκε . Τα γονίδια που αναφέρθηκαν προηγουμένως εκφράζονται πάντα μετά από διέγερση μακροφάγων με ενδοτοξίνης , αλλά αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος από το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων . (Kaczmarek και Kaminska, 1989) .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων αποτελεί την απόκτηση της ικανότητας να πραγματοποιούν μια πολύπλοκη λειτουργία , δηλαδή την απόκτηση ειδικών λειτουργικών ικανοτήτων που με την σειρά τους εξαρτώνται από την μεταβολή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων . Η ενεργοποίηση των μακροφάγων έχει περιορισμένη χρονική διάρκεια , απαιτεί πολλαπλά βήματα για να πραγματοποιηθεί και φαίνεται ότι κάθε βήμα υφίσταται ρύθμιση από μηχανισμούς που επάγουν ή καταστέλλουν την διαδικασία αυτή . Από αυτά τα στοιχεία φαίνεται το μέγεθος της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που διέπουν την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και η αναγκαιότητα της μελέτης και κατανόησης της διαδικασίας αυτής .

Ήδη από τις πρώτες μελέτες που έγιναν για την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με το μοντέλο της in vitro ανάπτυξης κυτταροτοξικότητας κατά νεοπλασματικών κυττάρων , διαπιστώθηκε ότι αποτελούσε διαδικασία δύο διακριτών βημάτων . Κατά το πρώτο βήμα έπρεπε τα μακροφάγα να γίνουν "ευαισθητοποιημένα" ή "ενεργοποιημένα" ώστε να είναι ικανά να συνδέουν τα καρκινικά κύτταρα . Όμως για να τα καταστρέψουν χρειαζόταν να διεγερθούν , ώστε να εκκρίνουν λυτικές ουσίες όπως π.χ. οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου , οι Κυτταρολυτικές Πρωτεάσες Σερίνης ή ο TNFα . Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα ήταν επίσης ικανά να καταστρέφουν νεοπλασματικά κύτταρα με δύο επιπλέον μηχανισμούς , μια ταχεία μορφή Εξαρτημένης από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητας (αποτελεσματική μόνο για ορισμένα είδη κυττάρων) και μία βραδεία μορφή Εξαρτημένης από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητας (που ήταν αποτελεσματική για όλα τα είδη νεοπλασματικών κυττάρων) . Αυτό όμως σήμαινε ότι η ενεργοποίηση μπορούσε να οδηγεί κάθε φορά στην έκφραση διαφορετικών γονιδίων και διαφορετικών ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου , με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολλών κυτταροτοξικών αντιδράσεων που εξελίσσονται σε διαφορετικές χρονούς , έχουν διαφορετικούς ρυθμούς και προσβάλλουν διαφορετικούς στόχους . Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει δοθεί έμφαση στην ανάλυση των μοριακών και γονιδιακών μηχανισμών που διέπουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων . Η σύνδεση των διεγερτών (όπως π.χ. LPS ή INFγ) στους υποδοχείς τους προκαλεί την παραγωγή πολλών Δεύτερων Μηνυτόρων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την λειτουργία ενζυμικών συστημάτων και την έκφραση πολλών γονιδίων . Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διενεργούνται ταυτόχρονα σε πολλά επίπεδα .



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

Υπάρχουν πολυάριθμες κυτταροκίνες που προκαλούν ή απλά συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων . Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι Ιντερφερόνες INFα, INFβ και INFγ , οι Ιντερλευκίνες IL-1, IL-2, IL-4 και IL-6 και ο παράγοντας TNFα . (Lewis και McGee , 1992) .

Η Ιντερφερόνη INF-γ συνδέεται με έναν υποδοχέα υψηλής συγγένειας στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων , ο οποίος διαθέτει μια μικρή εξωκυτάρια μοίρα (το αμινο-τελικό του άκρο) και μια μεγάλη ενδοκυτάρια μοίρα (το καρβοξυ-τελικό του άκρο , το οποίο αποτελείται από πάνω από 200 αμινοξέα) . Η σύνδεση της INF-γ με τον υποδοχέα της προκαλεί μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα την ενεργοποίηση της αντλίας Na^+/K^+ (Na^+/K^+ Antiport) με αποτέλεσμα εισροή ιόντων Na^+ στο κυτταρόπλασμα και αύξηση του pH του κυτταροπλάσματος . Στην συνέχεια προκαλείται αυξημένη υδρόλυση της PIP_2 (Διφωσφορικής Φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης) και παραγωγή DAG (Διακυλο-γλυκερόλης) , IP_3 (Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης) και IP_4 (Τετραφωσφορικής Ινοσιτόλης) . Τα δύο τελευταία φωσφο-ινοσιτίδια προκαλούν αύξηση του ιονισμένου Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα . Αυτή η αύξηση του Ca^{2+} προκαλεί την μετατόπιση (Translocation) της PKC (Πρωτεϊνικής Κινάσης C) κοντά στην κυτταρική μεμβράνη , όπου και ενεργοποιείται από την DAG . Η PKC συμμετέχει στην φωσφορυλίωση πολλών υποστρωμάτων και αποτελεί ένζυμο-κλειδί στις οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων που ενεργοποιούν τα μακροφάγα . Η INF-γ προκαλεί επίσης την αυξημένη εισροή ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα με επιβραδυνόμενο μηχανισμό , ο οποίος δεν προκαλεί την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων αυτών . Επίσης προκαλεί αύξηση της ικανότητας της Πρωτεϊνικής Κινάσης C να φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της . Όλοι οι προαναφερθέντες Δεύτεροι Μηνυτορες προκαλούν και άμεσες επιδράσεις στα μακροφάγα εκτός από την ενεργοποίηση περαιτέρω συστημάτων Δεύτερων Μηνυτόρων . Παράδειγμα αποτελεί η αντλία Na^+/K^+ που προκαλεί αυξημένη μεταγραφή του mRNA του γονιδίου που κωδικοποιεί τα μόρια MHC-II και του γονιδίου JE (που κωδικοποιεί την κυτταροκίνη MCP-1) .

Η Ιντερλευκίνη IL-1 επίσης διαθέτει υποδοχείς υψηλής συγγένειας στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων . Όταν η IL-1 συνδέεται στον υποδοχέα της προκαλείται ενεργοποίηση μιας G-πρωτεΐνης στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης του μακροφάγου και πυροδοτούνται ταυτόχρονα πολλαπλές οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων , με αποτέλεσμα την αύξηση του cAMP , την εισροή ιόντων Na^+ στο κυτταρόπλασμα και την αύξηση του ενδοκυτταρίου pH , την διέγερση Κινασών Σερίνης-Θρεονίνης , την μετατόπιση της PKC κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και την αυξημένη υδρόλυση της PIP_2 . Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η αλληλουχία των γεγονότων αυτών , αλλά όλα οδηγούν στην αυξημένη έκφραση ορισμένων γονιδίων του μακροφάγου . (Lewis και McGee , 1992) .

Ενδιαφέρον έχουν ακόμα δύο μηχανισμοί ενεργοποίησης των μακροφάγων από κυτταροκίνες . Οι παράγοντες TNFα και TNFβ συνδέονται με κοινό μεμβρανικό υποδοχέα στην επιφάνεια των μακροφάγων , ο οποίος έχει ιδιόμορφη δομή . Η σύνδεση των TNFα και TNFβ στον υποδοχέα τους προκαλεί μεταβολές στην ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης , αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , διέγερση της PLA_2 (Φωσφολιπάσης A_2) , φωσφορυλίωση σε θέσεις σερίνης μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης των 26 kDa , αύξηση του cAMP και τέλος μετατόπιση και ενεργοποίηση της PKC . Ο παράγοντας CSF-1 διαθέτει έναν υποδοχέα υψηλής συγγένειας που αποτελεί προϊόν του ογκογονιδίου c-fms και παρουσιάζει δομή και δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης . Έτσι μοιάζει με τους υποδοχείς της Ινσουλίνης και των Αυξητικών Παραγόντων PDGF και EGF . Όταν ο CSF-1 συνδέεται στον υποδοχέα του , αυτός αυτοφωσφορυλιώνεται και φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεΐνες που προκαλούν

ενεργοποίηση της αντλίας Na^+/K^+ , αύξηση του Ca^{2+} του κυτταροπλάσματος , διέγερση της PLCγ (Φωσφολιπάση Cγ) , καθώς επίσης φωσφορυλιώνει δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα που δεν συσχετίζονται με διέγερση Δεύτερων Μηνυτόρων .

Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες (LPS , λιποπολυσακχαρίτες) των Gram (-) μικροοργανισμών ανήκουν στους κυριότερους ενεργοποιητές των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Οι ενδοτοξίνες αποτελούν πολύπλοκα μόρια που οφείλουν την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα μακροφάγα στο Λιπίδιο A , ένα τμήμα τους που περιέχει 2,3-γλυκοσαμίνη . Όταν το μόριο του LPS είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη του ορού LBP (μια πρωτεΐνη των 60 kDa) μπορεί να ενωθεί εύκολα με τον υποδοχέα CD-14 της κυτταρικής μεμβράνης των μακροφάγων (μια γλυκοπρωτεΐνη με MB 55 kDa) . Επίσης έχει αποδειχθεί ότι το μόριο του LPS συνδέεται απευθείας με το σύμπλεγμα CD11/CD18 στην μεμβράνη των μακροφάγων . Τέλος είναι γνωστό ότι και ο υποδοχέας για την ακετυλιωμένη LDL συνδέει τις ενδοτοξίνες , αλλά χωρίς να οδηγεί στην ενεργοποίηση του μακροφάγου . Όταν το μόριο του LPS συνδεθεί με τον υποδοχέα CD-14 , ο οποίος είναι συζευγμένος με μια Gp-πρωτεΐνη , προκαλείται ενεργοποίηση της PLC με αποτέλεσμα την υδρόλυση της PIP_2 και την δημιουργία IP_3 , IP_4 και DAG . Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι ενδοτοξίνες μπορεί να ενεργοποιούν την PLC και με άλλους μηχανισμούς εκτός από Gp-πρωτεΐνες . Τα φωσφοϊνοσιτίδια IP_3 και IP_4 προκαλούν αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ η DAG ενεργοποιεί με την σειρά της την PKC . Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίηση της Καλπαΐνης , μιας εξαρτημένης από το ασβέστιο Ουδέτερης Πρωτεάσης που διασπά την PKC και απελευθερώνει την καταλυτική υπομονάδα της . Η PKC προκαλεί την φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών , μεταξύ των οποίων οι κυριότερες είναι τρεις που έχουν MB \approx 28 , 33 και 68 kDa (ή σύμφωνα με άλλους ερευνητές 40, 42 και 68 kDa) . Ειδικά η πρωτεΐνη των 68 kDa σχετίζεται με την αυξημένη έκκριση εικοσανοειδών στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα και έχει αποδειχθεί ότι κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων από τις ενδοτοξίνες υφίσταται εστεροποίηση με Μυριστικό Οξύ (myristoylation) ώστε να είναι πιο επιρρεπής στην φωσφορυλίωση από την PKC . Όμως υπάρχουν πολλά ακόμα υποστρώματα της δράσης της PKC . Μεταξύ αυτών ιδιαίτερη σημασία έχουν οι MAP-Κινάσες MAPK-1 και MAPK-2 . Όταν τα ένζυμα αυτά φωσφορυλιωθούν από την PKC διεγείρονται και φωσφορυλιώνουν άλλα ένζυμα και πεπτιδία απαραίτητα για την ενεργοποίηση των μακροφάγων . Όταν τα μόρια του LPS συνδεθούν με τους CD-14 υποδοχείς των μακροφάγων ενεργοποιούνται και ορισμένες Κινάσες Τυροσίνης που δεν αποτελούν οι ίδιες τμήματα υποδοχέων (Non-receptor Tyrosine Kinases) όπως οι Src-Κινάσες και οι Hck-Κινάσες . Αυτές οι Κινάσες Τυροσίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς ενεργοποίησης των μακροφάγων από την ενδοτοξίνη . Εκτός από τις επιδράσεις στις οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων που ήδη αναφέρθηκαν , οι ενδοτοξίνες προκαλούν κάποιες άλλες επιδράσεις με άγνωστη συνεισφορά στην ενεργοποίηση των μακροφάγων . Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η διέγερση της αντλίας Na^+/H^+ (αντλία πρωτονίων) με αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταροπλασματικού pH . Η ενεργοποίηση της αντλίας αυτής πιθανώς επιτελείται μέσω φωσφορυλίωσής της από την PKC . Ένα ακόμα παράδειγμα είναι η επιπλέον αύξηση της DAG μέσω υδρόλυσης της Φωσφατιδυλ-χολίνης , μηχανισμός που είναι πιο αργός αλλά παραγωγικότερος από εκείνον της PLC . (Hauschildt και Kleine, 1995) .

Παρόμοιους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων με τον LPS για την ενεργοποίηση των μακροφάγων χρησιμοποιεί και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) , δηλαδή διέγερση των ενζύμων PLC και PKC , αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και της DAG , διέγερση της

αντλίας Na^+/H^+ και τέλος φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών . Ο PAF και ο LPS διαθέτουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων που δρουν όμως με διαφορετικές ταχύτητες . Οι επιδράσεις του PAF ξεκινούν ταχύτατα και ολοκληρώνονται σε λίγα λεπτά , ενώ οι ίδιες επιδράσεις από τον LPS ξεκινούν μέσα σε λίγα λεπτά και ολοκληρώνονται μετά από λίγες ώρες .

Ενδέχεται όμως για ορισμένες επιμέρους λειτουργίες των μακροφάγων να ενεργοποιούνται από τον PAF μέσω διαφορετικών οδών μεταγωγής μηνύματος , όπως π.χ. μέσω της οδού της PLA_2 ή των Κινασών της Tyrosίνης .

Οι ενδοτοξίνες προκαλούν επίσης έκφραση πολλών γονιδίων . Μέσα σε λιγότερο από μισή ώρα έχει ολοκληρωθεί η μεταγραφή του mRNA πολλών τέτοιων γονιδίων , όπως για παράδειγμα του γονιδίου "KC" που κωδικοποιεί μια κυταροκίνη και του γονιδίου "JE" . Στην περίπτωση του JE-γονιδίου , η έναρξη της μεταγραφής του οφείλεται σε μηχανισμό που εξαρτάται από την υδρόλυση της PIP_2 , την δημιουργία Φωσφοϊνοσιτιδίων και την αύξηση του κυταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ στην περίπτωση του KC-γονιδίου ο μηχανισμός έναρξης της μεταγραφής είναι τελείως διαφορετικός και ανεξάρτητος αυτών των φαινομένων . Οι ενδοτοξίνες επίσης προκαλούν την μεταγραφή των ογκογονιδίων c-fos, c-myc, c-fms και c-fgr .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από την IL-1 συνοδεύεται σταθερά από την φωσφορυλίωση της κυταροπλασματικής πρωτεΐνης pp65 . Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση αυτή δεν επιτελείται από κάποια από τις γνωστές Κινάσες , δηλαδή από τις PKC, PKA, PKG ή την Ca^{2+} /CAM-PK (Εξαρτημένη από Ca^{2+} και Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση) . (Adams, 1989) .

Μια οδός Δεύτερων Μηνυτόρων που διαδραματίζει σχετικά μικρό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι η οδός του cGMP . Το cGMP πιθανώς σχετίζεται με τις μεταβολές της χημειοτακτικής και φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των ενεργοποιημένων μακροφάγων (Ogundsdottir και Weir, 1980)

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ ΠΟΥ ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Έμφαση έχει δοθεί στις οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων , επειδή συμμετέχουν στον έλεγχο και την ρύθμιση της διαδικασίας ενεργοποίησης .

Η προσταγλανδίνη PGE_2 αποτελεί έναν σημαντικό αναστολέα της ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών . Αποδείχτηκε ότι δρα μέσω ενός ειδικού υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων , με τον οποίο αφού ενωθεί προκαλεί αύξηση του cAMP . Το cAMP προκαλεί αφενός ενεργοποίηση της PKA (cAMP-Dependent Protein Kinase) και αφετέρου καταστολή της λειτουργίας της αντλίας Na^+/H^+ (Na^+/K^+ antiport) . Επίσης είναι γνωστό ότι τα συμπλέγματα $\alpha 2$ -Μακροσφαιρίνης/Πρωτεασών οδηγούν στην καταστολή της λειτουργίας των μακροφάγων επειδή προκαλούν την παραγωγή και έκκριση PGE_2 από τα κύτταρα αυτά , η οποία δρα αυτοκρινικά και οδηγεί στην αύξηση του cAMP και την καταστολή της αντλίας Na^+/H^+ . (Lewis και McGee , 1992) . Υπάρχει μια μελέτη που δείχνει ότι μικρές αυξήσεις του οδηγούν σε επίταση της παραγωγής NO από μακροφάγα ενεργοποιημένα με $\text{INF-}\gamma$. Μόνο μεγάλες αυξήσεις του cAMP καταστέλλουν την παραγωγή του NO στα μακροφάγα αυτά (Mullet και συν., 1997) . Εκτός από την PGE_2 , η αύξηση του cAMP συμμετέχει στον μηχανισμό τερματισμού της ενεργοποίησης των μακροφάγων μέσω Αδενοσίνης (Adenosine) . Τα μακροφάγα διαθέτουν $\text{A}_{2\beta}$ -υποδοχείς Αδενοσίνης συνδεδεμένους με την Αδενυλική Κυκλάση . Σε καταστάσεις υποξίας η Αδενοσίνη αυξάνει το cAMP των ενεργοποιημένων μακροφάγων και οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης της iNOS και των αντιγόνων MHC-II , καθώς και της παραγωγής $\text{TNF}\alpha$ και IL-1 (Xaus και συν., 1999) . Τα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα επίσης παράγουν μικρές ποσότητες νοραδρεναλίνης , που επιδρά στους $\beta 2$ -αδρενεργικούς

υποδοχείς των ίδιων κυττάρων που την παράγουν (αυτοκρινικά) ή των παρακείμενων μακροφάγων και προκαλείται αύξηση του cAMP και καταστολή της έκκρισης του TNFα (Spengler και συν., 1994).

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός καταστολής της λειτουργίας των μακροφάγων είναι εκείνος που αφορά στην ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν Πυρηνικούς Παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, δηλαδή ευοδώνουν ή καταστέλλουν την έκφραση άλλων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά που κωδικοποιούν τους Πυρηνικούς Παράγοντες ανήκουν στην οικογένεια των "Immediate Early Genes" και ενεργοποιούνται από την σύνδεση υποκαταστατών σε ορισμένους υποδοχείς, όπως στους υποδοχείς για το Μαλονυλ-BSA και τον παράγοντα TNFα.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΟΔΩΝ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ.

Αρκετές από τις οδούς των Δεύτερων Μηνυτόρων παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιτρέπουν στην μία οδό να ευοδώνει ή να καταστέλλει την άλλη, με αποτέλεσμα επίταση ή καταστολή της ενεργοποίησης των μακροφάγων. Το φαινόμενο αυτό έρχεται να συμπληρώσει το γεγονός ότι μία ουσία που ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα μπορεί να διεγείρει ταυτόχρονα περισσότερες από μια οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων.

Η οδός του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} επηρεάζει την δραστηριότητα της PKC, δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για την μέγιστη δραστηριότητά της. Αυτό το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους: (Lewis και McGee, 1992, Woodgett, 1994, Hauschildt και Kleine, 1995).

- α) με την δημιουργία επιπλέον ποσοτήτων DAG μέσω διέγερσης εξαρτημένων από το Ca^{2+} Φωσφολιπασών εκτός της PLC.
- β) με την μετατόπιση της PKC από το κυτταράπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη (όπου υπάρχουν τα υποστρώματα της δράσης της).
- γ) με την διέγερση άλλων εξαρτημένων από το Ca^{2+} ενζύμων, τα οποία επιδρούν στα υποστρώματα της PKC και τα καθιστούν πιο επιρρεπή στην φωσφορυλίωση.
- δ) με την ενεργοποίηση της εξαρτημένης από το Ca^{2+} Ουδέτερης Πρωτεάσης Καλπαΐνη (Calpain) η οποία διασπά την PKC και απελευθερώνει την ενεργό καταλυτική υποομάδα.
- ε) με την πρόκληση μεταβολών στην ίδια την PKC (covalent enzyme modification) που αυξάνουν την δραστηριότητά της.

Αντίστοιχα η οδός της Φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) - Αραχιδονικού Οξέος επηρεάζει πολλές άλλες οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων μέσω της δημιουργίας της προσταγλανδίνης PGE_2 . Η PGE_2 προκαλεί την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την παραγωγή cAMP, το οποίο διεγείρει την PKA. Η Κινάση αυτή φωσφορυλιώνει πολλά ενζυμικά μόρια και μεταβάλλει τις δραστηριότητές τους. Επίσης η αύξηση του cAMP συνδυάζεται με αναστολή της δραστηριότητας της μεμβρανικής αντλίας Na^+/K^+ . Συνολικά οι επιδράσεις της PGE_2 προκαλούν την καταστολή της ενεργοποίησης των μακροφάγων, στα πλαίσια ενός μηχανισμού αυτορρύθμισης της δραστηριότητας των κυττάρων αυτών. Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανακάλυψη ότι τα μόρια του LPS που προκαλούν ενεργοποίηση των μακροφάγων επίσης διεγείρουν την δραστηριότητα των Φωσφοδιεστερασών που αποδομούν το cAMP, προστατεύοντας το κύτταρο από την κατασταλτική επίδραση της PGE_2 και τον μηχανισμό αυτορρύθμισης. (Lewis και McGee, 1992).

Τέλος, έχει ενδιαφέρον ότι η οδός της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) προκαλεί άμεση έναρξη της μεταγραφής γονιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων με INFγ προκαλεί

έκφραση των γονιδίων γ .1 και HLA-DR και ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω της PKC . Την μεταγραφή του mRNA του γονιδίου γ .1 μπορεί να προκαλέσει και η PKA . Φαίνεται ότι οι δύο αυτές Κινάσες προκαλούν την έναρξη της γονιδιακής έκφρασης φωσφορυλιώνοντας τον Παράγοντα Μεταγραφής AP-1 . (Fan και συν.,1988) .

Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων απαιτεί και προϋποθέτει την αυξημένη έκφραση πολλών γονιδίων . Όμως έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών δεν παύει να υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο ο οποίος είναι δυνατό να επιτελείται σε πολλά επίπεδα , όπως π.χ. κατά την μεταγραφή , μετά την μεταγραφή , κατά την μετάφραση ή μετά την μετάφραση . Ένα παράδειγμα της ρύθμισης αυτής είναι το ακόλουθο : Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τα Ia-αντιγόνα (μόρια MHC-II) μετά από ενεργοποίηση των μακροφάγων με $INF\gamma$ ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής του mRNA . Αντίστοιχα όταν καταστέλλεται η ενεργοποίηση των μακροφάγων μετά από επίδραση $INF\alpha$ ή $INF\beta$ ή Δεξαμεθαζόνης , καταστέλλεται και η έκφραση των Ia-αντιγόνων πάλι στο επίπεδο της μεταγραφής του mRNA (Fertsch και συν.,1987 , Fertsch-Ruggio και συν.,1988) .

Ορισμένα γονίδια υπόκεινται σε ρύθμιση σε πολλαπλά επίπεδα ταυτόχρονα , από τα οποία ένα είναι το κύριο σημείο ελέγχου . Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα MHC-II και την κυτταροκίνη TNF α . Ορισμένα περιληπτικά στοιχεία για την ρύθμιση των γονιδίων αυτών θα δοθούν στην συνέχεια .

Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα MHC-II επιτείνεται από την Ιντερφερόνη- γ και καταστέλλεται από τις ενδοτοξίνες και την προσταγλανδίνη PGE_2 . Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα αλλά το κύριο επίπεδο ρύθμισης είναι κατά την μεταγραφή . Έχουν μελετηθεί τρεις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (boxes) οι οποίες ονομάστηκαν Περιοχές (regions) X , Y και W και βρίσκονται περίπου 160 νουκλεοτίδια πριν το σημείο έναρξης μεταγραφής του γονιδίου MHC-II . Αν και οι τρεις αυτές αλληλουχίες διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους για την ορθή και πλήρη μεταγραφή του γονιδίου , ειδικά η Περιοχή Y είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου από την Ιντερφερόνη- γ . Η $INF\gamma$ επάγει την γονιδιακή έκφραση μέσω του παράγοντα NF $\gamma\gamma$ (Nuclear Factor $\gamma\gamma$) , ενός πεπτιδίου που όταν συνδεθεί δίπλα στην περιοχή Y προκαλεί την έναρξη της μεταγραφής . Αντίστοιχα και η PGE_2 φαίνεται ότι καταστέλλει την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης παρεμποδίζοντας (με μηχανισμό ακόμα όχι πλήρως εξακριβωμένο) τον παράγοντα NF $\gamma\gamma$ να συνδεθεί με το DNA κοντά στην Περιοχή Y .

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την κυτταροκίνη TNF α έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει διαπιστωθεί ότι στον προαγωγέα (promoter region) του γονιδίου υπάρχουν τέσσερις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ικανές να αναγνωρίσουν τον Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B , μία αλληλουχία ικανή να αναγνωρίσει τον Παράγοντα Μεταγραφής SP-1 , μία αλληλουχία με σημαντική ομολογία νουκλεοτιδίων προς την Περιοχή Y (Y-Box) του γονιδίου που κωδικοποιεί τα αντιγόνα MHC-II και τέλος μία αλληλουχία "TTATTTAT" που υπάρχει και σε προαγωγείς άλλων κυτταροκινών . Αυτή η τελευταία αλληλουχία θεωρείται ότι ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου του TNF α στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης , διασπώντας άμεσα το mRNA που έχει μεταγραφεί πριν την μετάφρασή του . Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με ενδοτοξίνη προκαλείται η έκφραση του γονιδίου του TNF α ταυτόχρονα μέσω του Παράγοντα NF κ B και ενός άλλου παράγοντα που συνδέεται με το Y-Box του προαγωγέα . Η αλληλουχία "TTATTTAT" που αναφέρθηκε

σχετίζεται με την επίταση της έκφρασης του γονιδίου , αλλά ο μηχανισμός που οδηγεί σε αυτή την επίταση διαμεσολαβείται από άλλη οδό Δεύτερων Μηνυτόρων , κοινή για τις ενδοτοξίνες και την Ιντερφερόνη- γ .

Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων επάγονται τουλάχιστον εκατό γονίδια που κωδικοποιούν τις ουσίες που εκκρίνονται από αυτά , καθώς και άγνωστος αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς και άλλα μόρια της κυτταρικής μεμβράνης , δομικά μόρια του κυτταροσκελετού και λειτουργικά ένζυμα του κυτταροπλάσματος . Είναι ευνόητο ότι πολλά από τα γονίδια αυτά ελέγχονται ομαδικά από τους ίδιους μηχανισμούς και τις ίδιες οδούς Μεταγωγής Μηνύματος . Η ταυτόχρονη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πολλών γονιδίων δημιουργεί ορισμένες ομάδες γονιδίων με παράλληλη έκφραση χωρίς όμως να αποτελούν Συνεργειώματα (Operons) . Αυτή η ομαδοποίηση εξυπηρετεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων , αφού επιτρέπει την ανάπτυξη δύο διαφορετικών βαθμίδων ενεργοποίησης (τα Διεγερμένα ή Φλεγμονώδη κύτταρα και τα Ενεργοποιημένα ή Άνοσα κύτταρα) με διαφορετικές λειτουργικές ικανότητες και δραστηριότητες . Αν δεν υπήρχε ομαδική ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων θα ήταν εξαιρετικά πολύπλοκη η διαδικασία ενεργοποίησης , αφού θα έπρεπε για κάθε ένα διαφορετικό διεγέρτη να υπήρχε ξεχωριστή οδός Δεύτερου Μηνύτορα που να οδηγεί στην έκφραση κάθε γονιδίου , καθώς επίσης να υπάρχουν άλλες οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων που να καταστέλλουν την έκφραση κάθε γονιδίου μετά από την επίδραση ουσιών που καταστέλλουν την ενεργοποίηση του μακροφάγου . Ωστόσο εξαιτίας της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που διέπουν την γονιδιακή έκφραση στα μακροφάγα είναι δυνατό ορισμένες ουσίες που ενεργοποιούν ή που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων να επηρεάζουν μόνο συγκεκριμένα γονίδια ενώ τα άλλα να μην εκφράζονται καθόλου . Ένα παράδειγμα αποτελεί το ότι τα Μουράμυλο-διπεπτιδία (τα οποία είναι ενεργοποιητές των μακροφάγων) οδηγούν μεταξύ άλλων στην παραγωγή του Αυξητικού Παράγοντα FGF αλλά όχι της INF α , ενώ τα συνθετικά πολυανιόντα Poly-IC/LC που είναι επίσης ενεργοποιητές των μακροφάγων , οδηγούν στην παραγωγή της INF α αλλά όχι του FGF (Stevenson και συν., 1985) .

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων προκαλεί την αλλαγή πολλών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους . Ένα παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη των μακροφάγων που προέρχονται από τον μυελό των οστών . Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσιάζουν μορφολογικές μεταβολές (αύξηση του μεγέθους τους , στρογγυλοποίηση και αποπλάτυνση) , αυξημένη έκφραση Fc-υποδοχέων , αυξημένη φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων , ενεργοποίηση της Παρακαμπτηρίου Οδού των Μονοφωσφορικών Εξοζών , αυξημένη παραγωγή H₂O₂ και O₂⁻¹ , αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση , αυξημένη παραγωγή Ώξινης Φωσφατάσης , Γαλακτικής Αφυδρογονάσης , Καθεψίνης-D και Νικοτιναμινοδινουκλεοτιδάσης (Cooper και συν., 1984) . Η ενδοτοξίνη ειδικά έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της ενεργοποίησης τόσο in vitro όσο και in vivo . Διαπιστώθηκε ότι χορηγώντας LPS τα περιτοναϊκά μακροφάγα γίνονται πάντα μεγαλύτερα και πιο αποπλάτυσμένα , με περισσότερα λυσοσωματικά κοκκία και κυστίδια , αλλά μόνο μετά από in vivo χορήγηση παρατηρείται αύξηση της πτύχωσης (ruffling) των κυττάρων . Επίσης ενώ η in vitro ενεργοποίηση προκαλούσε αύξηση των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης , β -Γλυκουρονιδάσης και Καθεψίνης , η in vivo ενεργοποίηση αύξανε επιπλέον και την δραστηριότητα της Ν-Ακετυλο-Γλυκοσαμινιδάσης (Morland και Kaplan, 1977) . Μια άλλη ιδιότητα που προκαλεί η ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS είναι η αύξηση της

ικανότητας έκκρισης αραχιδονικού οξέος, κέτο-PGF_{1α}, PGE₂, LTC, HETE και άλλων εικοσανοειδών μετά από διέγερση (Aderem και συν., 1986). Επίσης η ενεργοποίηση μονοκυττάρων με LPS προκαλεί την αυξημένη σύνθεση και έκκριση πολλών πρωτεϊνών, από τις οποίες φαίνεται να ξεχωρίζουν δώδεκα πρωτεΐνες με MW μεταξύ 12 και 46 kDa (Panuska και συν., 1988). Τέλος, ο LPS προκαλεί την έκκριση πολλών κυτταροκινών από τα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, μεταξύ των οποίων και οι TNFα, MIP-2, IL-1β και IL-6. Αυτή η σθρόα παραγωγή κυτταροκινών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα του πνεύμονα είναι υπεύθυνη για τις έντονες φλεγμονώδεις αντιδράσεις που ακολουθούν την πνευμονία από Gram(-) μικρόβια και οι οποίες προοδευτικά θα οδηγήσουν σε Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) (Xing και συν., 1994).

Αντίστοιχες φαινοτυπικές μεταβολές παρατηρούνται και μετά από ενεργοποίηση με άλλους παράγοντες. Η ενδοφλέβια χορήγηση ζώντων μυκοβακτηριδίων BCG σε επίμυες οδηγεί στην αύξηση των δραστηριοτήτων των λυσοσωματικών ενζύμων στα περιτοναϊκά μακροφάγα τους και συγκεκριμένα αύξηση των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης, β-Γλυκουρονιδάσης και Καθεψίνης. Η χορήγηση ενδοτοξίνης σε αυτά τα μακροφάγα που ήταν ήδη ενεργοποιημένα με BCG προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή Ώξινων Υδρολασών (Saito και Suter, 1965, Saito και Suter, 1965). Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με φυματίωση εκφράζουν την iNOS και παράγουν Νιτρικό Οξείδιο, ενώ τα ίδια κύτταρα από υγιείς ανθρώπους σπανίως θα εκφράσουν την iNOS (Nicholson και συν., 1996). Ένας άλλος γνωστός και ισχυρός ενεργοποιητής των μακροφάγων είναι η Ιντερφερόνη-γ. Η καλλιέργεια μακροφάγων με INF-γ προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής H₂O₂ και O₂⁻¹, αύξηση της ικανότητας καταστροφής ενδοκυττάρων παρασίτων όπως το *Toxoplasma* και η *Leishmania*, αύξηση της ικανότητας καταστροφής μικροβίων όπως η *Listeria* και η *Salmonella*, και τέλος πολλές χαρακτηριστικές μεταβολές της μορφολογίας τους (Nathan και συν., 1983, Murray και συν., 1985, Freund και Pick, 1985, Schaffner, 1985, Schaffner και Rellstab, 1988). Η INF-γ είναι δραστική τόσο in vitro όσο και in vivo και γι'αυτό μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλέβια σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή από νεοπλασίες αφού ενεργοποιεί τα μακροφάγα για αντιμικροβιακή και κυτταροστατική δραστηριότητα (Nathan και συν., 1985). Η επώαση των μακροφάγων με INF-γ προκαλεί επίσης αύξηση της φαγοκυττάρωσης μέσω Fc-υποδοχέων, αύξηση της παραγωγής IL-1 και της έκφρασης των Ia-αντιγόνων, παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και πολλές ακόμα μεταβολές (Brandwein, 1986, Jungi και συν., 1987, Schneider και συν., 1987, Stuehr και Marletta, 1987). Με την πάροδο της ηλικίας του ατόμου τα μακροφάγα του γίνονται λιγότερο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από INF-γ (Davilla και συν., 1990).

Όλα τα είδη μακροφάγων δεν είναι το ίδιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση. Έτσι τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού είναι πιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα και όταν επωαστούν με LPS επιτείνουν την χημειοταξία και την φαγοκυττάρωση, παράγουν περισσότερο H₂O₂ και O₂⁻¹ και μειώνουν σημαντικά την παραγωγή TNFα (Wizemann και Laskin, 1994). Αυτή η διαφορά είναι πιθανό να οφείλεται στην συνεχή έκθεση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων σε διάφορα παθογόνα και ρύπους του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα την μόνιμη κατάσταση "διέγερσης".

Όταν τα μακροφάγα ενεργοποιούνται μέσω INFγ παρατηρείται η μεταγραφή και έκφραση πολλών γονιδίων, όπως του γ.1 γονιδίου, των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιγόνα HLA-DR και των γονιδίων D3 και C7. Αυτή η επίδραση της INFγ στα ενεργοποιημένα μακροφάγα φαίνεται ότι επιτελείται μέσω της PKC (Fan και συν., 1988, Hamilton και συν., 1989).

Η αλλαγή του φαινοτύπου των μακροφάγων που ακολουθεί την ενεργοποίησή τους πολύ συχνά οφείλεται σε μεταβολές των επιμέρους στοιχείων των οδών μεταγωγής μηνύματος οι οποίες διαμεσολαβούν τις λειτουργίες των μακροφάγων υπό κανονικές συνθήκες. Έτσι τα μακροφάγα περνούν σε κατάσταση "ετοιμότητας". Όταν τα φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα ενεργοποιηθούν από MDP ή από LPS, προκαλείται "αύξηση" της ικανότητας διέγερσης της PKC. Έτσι αν σε αυτά τα ενεργοποιημένα μακροφάγα χορηγηθεί PMA ή Zymosan, δηλαδή ουσίες που διεγείρουν την PKC, παρατηρείται μια πολύ μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου που οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ (Pabst και Johnston, 1980). Η ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS αυξάνει την ικανότητα έκκρισης εικοσανοειδών μετά από διέγερση (Aderem και συν., 1986). Κατά τον ίδιο τρόπο η χρήση του LPS για την ενεργοποίηση των μακροφάγων της σειράς P388D1 οδηγεί στην αυξημένη έκλυση προσταγλανδινών μετά από διέγερση με PAF. Φαίνεται ότι όταν ο LPS ενεργοποιεί τα κύτταρα P388D1 επιτείνει και ενισχύει την έκφραση των οδών Δεύτερων Μηνυτόρων που χρησιμοποιεί ο PAF για να προκαλέσει την έκκριση εικοσανοειδών, δηλαδή τις οδούς της PLA_2 και των Κινασών της Τυροσίνης. Η PKC δεν αποτελεί την μόνη οδό μεταγωγής μηνύματος από τον PAF (Glaser και συν., 1990).

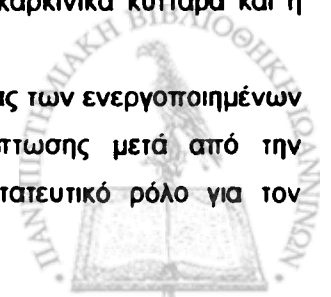
Η επίτευξη μιας κατάστασης "ετοιμότητας" επιτυγχάνεται μόνο με την ενεργοποίηση. Αντιθέτως με την φλεγμονώδη διέγερση των μακροφάγων επέρχεται μια κατάσταση χαμηλής ή άτονης αντίδρασης σε ένα δεύτερο ερέθισμα. Παραδείγματα αυτής της μειωμένης αντιδραστικότητας των διεγερμένων μακροφάγων είναι τα ακόλουθα. Τα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα εκκρίνουν πολύ λιγότερες Ώξινες Υδρολάσες και προσταγλανδίνες μετά από επώαση με zymosan, συγκρινόμενα με φυσιολογικά περιτοναϊκά κύτταρα (Bonney και συν., 1978). Επίσης τα φλεγμονώδη μακροφάγα που διεγέρθηκαν με θειογλυκολλικό ζυμό παρουσιάζουν πολύ μικρότερη ικανότητα αύξησης της πρωτεϊνοσυνθετικής τους δραστηριότητας μετά από έκθεση σε LPS, συγκρινόμενα με τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Largen και Tannenbaum, 1986). Είναι πιθανό ότι αυτό το φαινόμενο, ότι η φλεγμονώδης διέγερση καθιστά τα μακροφάγα λιγότερο ευαίσθητα σε ένα δεύτερο ερέθισμα, να εξηγεί την παρατήρηση ορισμένων ερευνητών σχετικά με τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) και την αδυναμία παραγωγής H_2O_2 από αυτά. Δηλαδή τα κύτταρα Kupffer πρέπει να θεωρούνται "φλεγμονώδη" και "διεγερμένα" λόγω της συνεχούς επαφής τους με μικροοργανισμούς, τοξίνες και σωματίδια που εισέρχονται στην πυλαία κυκλοφορία και για αυτό δεν αντιδρούν στην δεύτερη διέγερσή τους για παραγωγή H_2O_2 (Ding και Nathan, 1988). Επίσης τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού είναι πιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα και όταν επωαστούν με LPS μεταβάλλουν έντονα τον φαινότυπό τους. Αυτή η διαφορά είναι πιθανό να οφείλεται στην συνεχή έκθεση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων σε μικροοργανισμούς και κόνεις με αποτέλεσμα την μόνιμη κατάσταση "φλεγμονώδους διέγερσης" και την αδυναμία ανταπόκρισής τους σε άλλα μικρά ερεθίσματα (Wizemann και Laskin, 1994).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ.

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων αποτελεί μία προσωρινή φαινοτυπική μεταβολή. Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους τα μακροφάγα δεν παραμένουν μόνιμα σε κατάσταση ενεργοποίησης. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η καταστροφή φυσιολογικών κυττάρων του σώματος από τα κυτταροτοξικά μακροφάγα. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με INF γ και LPS συνδέονται μέσω των LFA-1 Ιντεγκρινών στα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλούν την

καταστροφή τους (Peri και συν., 1990) . Τα λυσοσωματικά ένζυμα που εκκρίνονται από τα μακροφάγα συχνά προκαλούν σημαντική ιστική βλάβη στους υγιείς ιστούς που βρίσκονται κοντά στην εστία μιας λοίμωξης . Είναι επίσης γνωστό ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως οι TNFα και IL-1 , που προκαλούν σύνδρομα όπως η καρκινική καχεξία και η σηπτική καταπληξία (Sigal και Ron, 1994) . Είναι φανερό ότι το φαινόμενο της ενεργοποίησης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι ωφέλιμο μόνο όταν ελέγχεται ως προς την ένταση και την διάρκειά του . Για τους λόγους αυτούς τα μακροφάγα διαθέτουν μηχανισμούς αυτοπεριορισμού της ενεργοποίησής τους , οι οποίοι λειτουργούν με την αρχή της Αρνητικής Παλίνδρομης Ρύθμισης (**negative feedback**) . Ο κυριότερος μηχανισμός αφορά στην παραγωγή της προσταγλανδίνης PGE₂ . Η ένωση της PGE₂ με τον υποδοχέα της στην επιφάνεια των μακροφάγων προκαλεί διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξηση του κυτταρικού cAMP . Η αύξηση του cAMP είναι γνωστό ότι καταστέλλει την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου (H₂O₂ , O₂⁻¹ , NO κ.α.) και των κυτταροκινών IL-1 και TNFα (Wahl και συν., 1979 , Gemsa και συν.,1979 , Smith και συν.,1980 , Lim και συν.,1983 , Brandwien,1986 , Papiemik και συν.,1986 , Kammer, 1988 , Renz και συν.,1988 , Figueiredo και συν.,1990 , Raddassi και συν.,1993) . Ο μηχανισμός της αυτοκρινικής και παρακρινικής καταστολής της ενεργοποίησης μέσω της PGE₂ δεν είναι μοναδικός . Τα ενεργοποιημένα με LPS μονοπύρηννα φαγοκύτταρα επίσης παράγουν μικρές ποσότητες νοραδρεναλίνης , η οποία επιδρά στους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς των ίδιων κυττάρων που την παράγουν ή των παρακείμενων μακροφάγων και οδηγούν στην αύξηση του cAMP και στην καταστολή της έκκρισης του TNFα . Τα ίδια κύτταρα διαθέτουν και α2-υποδοχείς , στους οποίους η σύνδεση της νοραδρεναλίνης προκαλεί την επίταση της έκκρισης TNFα . (Spengler και συν.,1994) . Είναι πιθανό ότι εκτός από τους δύο προαναφερθέντες μηχανισμούς αυτορρύθμισης υπάρχουν και άλλοι οι οποίοι ακόμα δεν έχουν εντοπιστεί ή είναι γνωστοί αλλά απαιτούν ακόμα διερεύνηση (όπως π.χ. η αυτορρύθμιση μέσω έκκρισης IL-10 ή TGF-β2 και ο ρόλος των συμπλεγμάτων α2-μακροσφαιρίνης-πρωτεασών) . Παράδειγμα αποτελεί ο TGF-β1 που καταστέλλει την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων από την IL-2 και αποτρέπει την ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας στα μακροφάγα , χωρίς να επηρεάζει την ενεργοποίησή τους από την INF-γ (Espinoza-Delgado και συν.,1994) . Όμως η ύπαρξη τέτοιων μηχανισμών δεν έχει πάντα το επιθυμητό προστατευτικό αποτέλεσμα . Έχει αποδειχθεί ότι τα μονοκύτταρα των ασθενών με συστηματική σήψη (σηψαιμία) έχουν καταστολή ορισμένων σημαντικών λειτουργιών τους , όπως π.χ. της έκφρασης αντιγόνων HLA-DR και της έκκρισης TNFα , με αποτέλεσμα ανοσοανεπάρκεια και επιλοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα . Φαίνεται πιθανό ότι η ανοσοκαταστολή των μονοκυττάρων είναι αποτέλεσμα της υπερβολικής ενεργοποίησής τους από τους μικροοργανισμούς , τις τοξίνες τους και τις κυτταροκίνες τους οργανισμού . Για τους ασθενείς αυτούς απαιτείται η τεχνητή επανενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων τους με έγχυση INF-γ (Dietrich-Docke και συν.,1997) . Επίσης υπάρχουν εξωγενή μόρια που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων . Τέτοια είναι τα γλυκοκορτικοειδή που εκκρίνουν τα επινεφρίδια καθώς και τα προϊόντα που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς ή τους νεοπλασματικούς ιστούς που τα μακροφάγα προσπαθούν να καταστρέψουν . Παράδειγμα τέτοιας ουσίας είναι η πρωτεΐνη TDP που εκκρίνουν ορισμένα καρκινικά κύτταρα και η οποία μοιάζει με την P-15E πρωτεΐνη των ρετροϊών .

Εάν δεν επιτυγχάνεται ο ικανοποιητικός περιορισμός της δραστηριότητας των ενεργοποιημένων μακροφάγων , επέρχεται η Απόπτωσή τους . Ο μηχανισμός της Απόπτωσης μετά από την παρατεταμένη ενεργοποίηση διαμεσολαβείται από την PKC και έχει προστατευτικό ρόλο για τον



οργανισμό . Οι ουσίες που έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν στα μακροφάγα παράλληλη ενεργοποίηση και έναρξη των διαδικασιών Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου είναι η Ιντερφερόνη- γ και ο παράγοντας M-CSF , ενώ η απόπτωσή τους ολοκληρώνεται μέσα σε 24 ώρες (Munh και συν., 1995) .



Κεφάλαιο 2-1 . Ο ρόλος του μακροφάγου στην οικονομία του φυσιολογικού οργανισμού .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συμμετέχουν καθημερινά σε πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος , πέρα από την σημαντική τους συμμετοχή στην άμυνα του οργανισμού και στην ανοσολογική επιτήρηση . Ανάμεσα σε αυτές τις λειτουργίες οι κυριότερες αφορούν στην απομάκρυνση γηρασμένων ή κατεστραμμένων κυττάρων , στην αιμοποίηση , στην αιμόσταση και στην ιστική επούλωση .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ .

Η αιμοποίηση αποτελεί μια πολύπλοκη φυσιολογική διεργασία κατά την οποία από ένα αρχέγονο πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο δημιουργούνται πολλές διαφορετικές σειρές αιμοποιητικών κυττάρων που αυξάνονται και διαφοροποιούνται ταυτόχρονα . Η διεργασία αυτή προϋποθέτει την καλή λειτουργία των βασικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος (κύτταρα του αιμοποιητικού στρώματος - Hemopoietic Stroma cells) . Τα μακροφάγα προέρχονται από τις αρχέγονες βλάστες του μυελού των οστών και ορισμένα από αυτά διαφοροποιούνται και επιστρέφουν στον μυελό για να γίνουν μέρος του Αιμοποιητικού Στρώματος . Υπάρχουν άφθονα μακροφάγα στον αιμοποιητικό, τα οποία προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος . Τα μακροφάγα του αιμοποιητικού στρώματος ονομάζονται Μυελικά Μακροφάγα (Resident Bone Marrow Macrophages) , έχουν ιδιαίτερο φαινότυπο και διαφέρουν από τα περισσότερα άλλα είδη μονοπύρηννων φαγοκυττάρων . Αποτελούν το 1% του συνόλου των εμπύρηννων κυττάρων στον μυελό των οστών και με τις αποφυάδες τους σχηματίζουν ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο . Μέσα σε αυτό το δίκτυο τα Μυελικά Μακροφάγα έρχονται σε στενή επαφή με όλα τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα . Ο πιο χαρακτηριστικός τέτοιος σχηματισμός είναι το Ερυθροβλαστικό Νησίδιο (Erythroblastic Island) το οποίο σχηματίζεται από την στενή επαφή των μακροφάγων με τις ερυθροβλάστες . Αυτός ο ανατομικός σχηματισμός εξασφαλίζει την ρυθμιζόμενη παροχή κυτταροκινών στις ερυθροβλάστες . Οι κυτταροκίνες είναι απαραίτητες για την αύξηση και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων , όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα . (Lewis και McGee, 1992)

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΚΥΤΤΑΡΟ-ΣΤΟΧΟΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ
M-CSF	Κοκκιοκύτταρα , μακροφάγα	Αύξηση , διαφοροποίηση
GM-CSF	Κοκκιοκύτταρα , μακροφάγα , ηωσινόφιλα , μεγακαρυοκύτταρα	Αύξηση , διαφοροποίηση
G-CSF	Κοκκιοκύτταρα , μακροφάγα , βλαστικά κύτταρα	Αύξηση , διαφοροποίηση , διέγερση δραστηριοτήτων
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ	Ερυθροκύτταρα	Αύξηση , διαφοροποίηση
IL-1	Βλαστικά κύτταρα	Διέγερση δραστηριοτήτων
IL-6	T- και B-λεμφοκύτταρα , μακροφάγα , κοκκιοκύτταρα , μεγακαρυοκύτταρα , βλαστικά κύτταρα	Αύξηση , διαφοροποίηση , διέγερση δραστηριοτήτων
TNFα	Κοκκιοκύτταρα , μακροφάγα , ερυθροκύτταρα , βλαστικά κύτταρα , μονοκύτταρα	διέγερση δραστηριοτήτων , αναστολή της κυτταρικής αύξησης , διέγερση δραστηριοτήτων
ΑΚΤΙΒΙΝΗ	Ερυθροκύτταρα	Διαφοροποίηση
MIP-1 / MIP-2	Κοκκιοκύτταρα , μακροφάγα	Διέγερση δραστηριοτήτων
TGFB	Μακροφάγα , βλαστικά κύτταρα	Αναστολή της κυτταρικής αύξησης
INFα	Μακροφάγα	Αναστολή της κυτταρικής αύξησης

Ορισμένες από αυτές τις κυτταροκίνες παράγονται σε μεγάλα ποσά μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων από επαφή με ενδοτοξίνη, άλλες κυτταροκίνες ή την φαγοκυττάρωση. Το ίδιο συμβαίνει με τα Τ-λεμφοκύτταρα, που εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες κυτταροκινών μετά την ενεργοποίησή τους. Έτσι επιτυγχάνεται η συνδυασμένη διέγερση της αιμοποίησης κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων. Αντιθέτως όταν δεν υπάρχει κάποια φλεγμονώδης διέγερση τα κύτταρα του στρώματος παράγουν συνεχώς ελάχιστες ποσότητες κυτταροκινών, όπως M-CSF, IL-6 και IL-7.

Τα μακροφάγα εκκρίνουν τρεις κυτταροκίνες που είναι σημαντικές για την αιμοποίηση, δηλαδή τις IL-1, TNF α και MIP. Η IL-1 δεν έχει δραστηριότητα Αυξητικού Παράγοντα αλλά επηρεάζει έμμεσα την αύξηση και διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων με δύο τρόπους: 1. Προκαλεί την έκκριση Αυξητικών Παραγόντων (GM-CSF, IL-6 κ.α) από τους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και 2. Προάγει τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων δρώντας σε συνεργασία με τους Αυξητικούς Παράγοντες IL-3, G-CSF και M-CSF. Για τον λόγο αυτό η IL-1 είχε ονομαστεί και "Αιμοποιητίνη-1". Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του χρόνου ημιζωής των mRNA που μεταγράφονται υπό την επίδραση των Αυξητικών Παραγόντων. Ταυτοχρόνως όμως η IL-1 καταστέλλει την παραγωγή μυελικών κυττάρων μέσω παραγωγής PGE $_2$ και καταστέλλει την ερυθροποίηση μέσω της παραγωγής TNF α και της παρεμπόδισης της δράσης της IL-7. Επιπλέον τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν και IL-1 και τον Αναστολέα της IL-1 μετά από διέγερση με ενδοτοξίνη, αλλά εκκρίνουν μικρές ποσότητες των ίδιων κυτταροκινών και σε συνθήκες ηρεμίας. Έτσι τα μακροφάγα έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην αιμοποίηση τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και σε συνθήκες φλεγμονωδών νόσων ή λοιμώξεων.

Ο παράγοντας TNF α επίσης στερείται άμεσης δράσης Αυξητικού Παράγοντα, προκαλεί όμως πολλές έμμεσες επιδράσεις (θετικές και αρνητικές) στην αιμοποίηση. Ο TNF α προκαλεί την έκκριση των M-CSF, G-CSF, GM-CSF και IL-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα. Από μόνος του καταστέλλει την ανάπτυξη των πρόδρομων κυττάρων της ερυθρής και της κοκκιοκυτταρικής σειράς, ενώ σε συνδυασμό με την IL-3 και τον GM-CSF προάγει την αύξηση των βλαστικών κυττάρων. Η *in vivo* χορήγηση TNF α προκαλεί καταστολή της ερυθροποίησης αλλά θεωρείται βέβαιο ότι ο παράγοντας αυτός συμμετέχει σε πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της αιμοποίησης. Ο TNF α όπως και η IL-1 συχνά συνδέονται στην επιφάνεια των μακροφάγων και "παρουσιάζονται" στα άλλα κύτταρα κατά την διάρκεια της επαφής τους και των αλληλεπιδράσεών τους. (Lewis και McGee, 1992)

Η οικογένεια των πρωτεϊνών MIP (Macrophage Inflammatory Proteins) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες MIP-1 α , MIP-1 β και MIP-2 που παράγονται από τα μακροφάγα. Έχουν MW 6000-8000 kDa και είναι υπεύθυνες για πολλά τοπικά φλεγμονώδη φαινόμενα. Κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων και λοιμώξεων εκκρίνονται από τα μακροφάγα σε μεγάλες ποσότητες. Από μόνες τους δεν έχουν καμία δραστηριότητα Αυξητικού Παράγοντα, αλλά σε συνδυασμό με μικρές ποσότητες παραγόντων CSF έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες MIP-1 β και MIP-2 αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων μορφών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων και ιδιαίτερα των κυττάρων CFU-GM (Broxmeyer και συν., 1989). Αντιθέτως η πρωτεΐνη MIP-1 α , η οποία παράγεται συνεχώς από τα

μακροφάγα , καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων . Αυτό επιτρέπει ρυθμιστικές επιδράσεις στην αιμοποίηση . (Lewis και McGee, 1992) .

Ένας άλλος σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας στην αιμοποίηση είναι η άμεση επαφή και οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του αιμοποιητικού στρώματος και των βλαστικών κυττάρων του μυελού (cell-to-cell interactions) . Η άμεση επαφή προϋποθέτει προσκόλληση των κυττάρων αυτών μεταξύ τους με την βοήθεια ειδικών υποδοχέων για αντιγόνα και για λεκτίνες που υπάρχουν στην επιφάνειά τους . Τα μακροφάγα του μυελού διαθέτουν δύο χαρακτηριστικούς γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς που επιτρέπουν την προσκόλληση ερυθροβλαστικών κυττάρων επάνω τους , τον Ερυθροβλαστικό Υποδοχέα (EbR) και την Sialoadhesin . Η γλυκοπρωτεΐνη Sialoadhesin διαμεσολαβεί την προσκόλληση των μυελικών μακροφάγων στα κύτταρα της μονοβλαστικής σειράς και σε μικρότερο βαθμό της ερυθρής σειράς . Τέλος ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την αιμοποίηση είναι η ύπαρξη της Θεμέλιας Ουσίας του Στρώματος (Stromal Matrix) , η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα του στρώματος και αποτελείται από Κολлагόνο , Ινωδοεκτίνη , Αιμονεκτίνη , Λαμινίνη , Γλυκοσαμινογλυκάνες και Θρομβοσπονδίνη . Η προσκόλληση των στρωματικών και βλαστικών κυττάρων πάνω στο υπόστρωμα αυτό είναι απαραίτητη για την διεκπεραίωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους . (Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee, 1992) .

Τα μακροφάγα συμμετέχουν σε πολλές τέτοιες διαδικασίες , από τις οποίες η πιο χαρακτηριστική είναι το Ερυθροβλαστικό Νησίδιο . Ο σχηματισμός αυτός αποτελείται από ένα κεντρικό μακροφάγο που περιβάλλεται από ερυθροβλάστες και αρχέγονα κύτταρα CFU-E . Τα CFU-E κύτταρα υφίστανται μέχρι 4 μιτωτικές διαιρέσεις κατά την διάρκεια της επαφής τους με τα μακροφάγα . Το Ερυθροβλαστικό Νησίδιο χρησιμεύει για την φαγοκυττάρωση των αποβαλλόμενων πυρήνων των ερυθροβλαστών και την ανακύκλωση του σιδήρου προς τα αναπτυσσόμενα ερυθροκύτταρα . Κυρίως όμως χρησιμεύει για την σταθερή παροχή ορισμένων Αυξητικών Παραγόντων στους ερυθροβλάστες , όπως για παράδειγμα η Ερυθροποιητίνη , η Ακτιβίνη (Activin) και ο Ιστικός Αναστολέας των Μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) . Τέλος τα μακροφάγα του Νησιδίου χρησιμεύουν για την προώθηση των Δικτυοερυθροκυττάρων προς την κυκλοφορία και για την διαμόρφωση της Θεμέλιας Ουσίας του Αιμοποιητικού Στρώματος . Όμως εκτός από τα κύτταρα της ερυθρής σειράς , τα μακροφάγα του αιμοποιητικού στρώματος έρχονται σε επαφή και προσκολλώνται σε πρόδρομες μορφές των λευκοκυττάρων , δημιουργώντας τα "Μυελοειδή Νησίδια" (Myeloid Islets) . Τα λευκοκύτταρα που συνήθως έρχονται σε στενή ανατομική επαφή με τα μακροφάγα είναι τα μονοκύτταρα , ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα που διανύουν τα τελικά στάδια ωρίμασής τους . Ειδικά κατά την διάρκεια λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια ή παράσιτα διαπιστώνονται πολυάριθμα Μυελοειδή Νησίδια που αποτελούνται αποκλειστικά από μονοκύτταρα φαγοκύτταρα . Όταν πολλαπλασιάζονται τα άωρα κοκκιοκύτταρα του μυελού παρουσιάζουν παροδική ανάπτυξη ισχυρών επαφών (cell-to-cell contacts) με τα μακροφάγα του στρώματος , ενώ μετά το τέλος των μιτωτικών διαιρέσεων δημιουργούνται πάλι επαφές που διαρκούν μεγάλο χρονικό διάστημα . Ο ρόλος των επαφών αυτών δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί . Τέλος τα μακροφάγα του μυελού των οστών έρχονται σε επαφή με τα μεγακαρυοκύτταρα και υποστηρίζουν την ανάπτυξη τους με την έκκριση κυτταροκινών . (Lewis και McGee, 1992) .

Η in vitro επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των πρόδρομων μορφών των αιμοποιητικών κυττάρων (βλαστών) απαιτεί την παρουσία ορισμένων CSF-Αυξητικών Παραγόντων (Colony

Stimulating Factors) που εκκρίνονται από τα μακροφάγα, τα κύτταρα του μεσεγχύματος και τα T-λεμφοκύτταρα. Οι παράγοντες CSF επιδρούν απευθείας στα βλαστικά κύτταρα και προάγουν την επιβίωση, αύξηση και διαφοροποίησή τους. Οι παράγοντες αυτοί δρουν τοπικά μέσα στον μυελό των οστών. Συνήθως ο GM-CSF συνδέεται στις γλυκοσαμινογλυκάνες του στρώματος και έτσι δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα, ενώ οι άλλοι παράγοντες κυκλοφορούν στο αίμα. Ο παράγοντας GM-CSF εκκρίνεται από τα φυσιολογικά ανθρώπινα μακροφάγα και μονοκύτταρα. Αντιθέτως ο παράγοντας G-CSF εκκρίνεται από μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με ενδοτοξίνη, το οποίο αποτελεί ένα μηχανισμό αύξησης της αιμοποίησης κατά την διάρκεια του stress της ενδοτοξιναιμίας. Ο παράγοντας GM-CSF προκαλεί την ανάπτυξη αποικιών μακροφάγων, κοκκιοκυττάρων και ηωσινοφίλων όταν αυτός χορηγηθεί σε καλλιέργειες πρόδρομων (άωρων) αιμοποιητικών κυττάρων. Επίσης προκαλεί πολλές μεταβολές της λειτουργικής κατάστασης των ώριμων μακροφάγων, όπως την επίταση της φαγοκυττάρωσης μέσω Fc-υποδοχέων και την αύξηση του Οξειδωτικού Μεταβολισμού κατά την διάρκεια της Οξειδωτικής Έκρηξης στα περιτοναϊκά μακροφάγα. Τα μακροφάγα που εκτίθενται σε ενδοτοξίνη παράγουν GM-CSF αλλά και TNF α και IL-1. Οι ουσίες αυτές επιδρούν στα T-λεμφοκύτταρα και προκαλούν την παραγωγή GM-CSF και IL-3, που προάγουν την αιμοποίηση. Ειδικά η IL-3 (Multi-CSF) επιδρά σε πολλά επίπεδα της αιμοποίησης, δηλαδή και στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και στα κύτταρα CFU (Colony Forming Units) αλλά και σε λιγότερο άωρες μορφές κυττάρων. Όμως οι κυτταροκίνες TNF α και IL-1 που παράγονται από τα μακροφάγα επιδρούν και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, δηλαδή στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας με την σειρά τους την έκκριση G-CSF και GM-CSF. Ενδεχομένως τα στρωματικά κύτταρα και ιδιαίτερα τα μακροφάγα του μυελού των οστών να παράγουν και άλλες ουσίες που να ρυθμίζουν την βασική λευκοποίηση. Ο παράγοντας M-CSF που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ασκεί ρυθμιστικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων εκτός από τις επιδράσεις του στην παραγωγή μονοκυττάρων. Έτσι ο M-CSF προκαλεί με άμεσο τρόπο την αναστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων ενώ ταυτοχρόνως προκαλεί έμμεσα, μέσω έκκρισης IL-1, την επίταση του πολλαπλασιασμού τους (Wing και συν., 1986).

Με τους Παράγοντες CSF τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα επίσης ρυθμίζουν την ανάπτυξη των πρόδρομων μορφών της ερυθρής σειράς. Ο παράγοντας GM-CSF σε συνδυασμό με την Ερυθροποιητίνη προκαλούν την δημιουργία αποικιών από τα πρόδρομα κύτταρα των τύπων BFU-E και CFU-GEMM. Έχει διαπιστωθεί ότι εκτός από την παραγωγή GM-CSF, τα μακροφάγα εκφράζουν και το γονίδιο της Ερυθροποιητίνης. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα μακροφάγα του μυελού των οστών (Στρωματικά) παράγουν Ερυθροποιητίνη συνεχώς και έτσι αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της αιμοποίησης στους ενήλικες, ενώ η Ερυθροποιητίνη που εκκρίνεται από τους νεφρούς συμβάλλει στην ερυθροποίηση μόνο σε συνθήκες αυξημένης ανάγκης (ερυθροποιητικό stress). Όμως τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συμβάλλουν στην ερυθροποίηση και με έναν άλλο μηχανισμό. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του σπλήνα και υφίστανται λυσοσωματική αποδόμηση για να απελευθερωθεί ο σίδηρος από την αίμη τους. Αυτός ο σίδηρος αφού συνδεθεί με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των μακροφάγων θα μεταφερθεί στους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών. (Lewis και McGee, 1992).



Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ .

Η συμμετοχή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην αιμόσταση δεν συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες , αλλά θα εξεταστεί στο σημείο αυτό γιατί αποτελεί μια λειτουργία που δεν συσχετίζεται με την άμυνα του οργανισμού ή με τις χρόνιες νόσους , καταστάσεις για τις οποίες θα γίνει μνεία σε ξεχωριστά κεφάλαια . Είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εκκρίνουν πολλούς Παράγοντες Πήξης , όπως τον Ιστικό Παράγοντα (Tissue Factor - Θρομβοπλαστίνη) , τους Παράγοντες II , VII , IX , X και XIII , έναν Ενεργοποιητή της Προθρομβίνης (Προθρομβινάση) , τον Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου και τέλος τον Αναστολέα του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου (Minactinin) και διάφορες Ινωδολυσίνες . Δηλαδή τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν όλους τους βασικούς παράγοντες που διεγείρουν τους μηχανισμούς θρόμβωσης και θρομβόλυσης . Με την έκκριση όλων των παραπάνω ουσιών (αλλά και των Θρομβοξανίων και του PAF) τα μακροφάγα συμμετέχουν στους μηχανισμούς αιμόστασης κατά την διάρκεια φλεγμονωδών παθήσεων , με αποτελέσματα συχνά επιβαρυντικά για τον οργανισμό .

Όταν ο οργανισμός υποστεί μια πολύ έντονη καταπόνηση συχνά ενεργοποιεί το σύστημα πήξης του αίματος και οδηγείται σε Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη . Τέτοιες καταπονήσεις μπορούν να είναι ένας βαρύς τραυματισμός , μια συστηματική λοίμωξη , ένα εκτεταμένο έγκαυμα , η οξεία παγκρεατίτιδα , η πρόωρη αποκόλληση του πλακούντα ή τέλος η νεοπλασία . Τυπικά παραδείγματα αποτελούν η Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη που προκαλείται από συμπαγείς όγκους και από σηψαιμία από μηνιγγιτιδόκοκκο . Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται από μικροβιακά προϊόντα ή ανοσοσυμπλέγματα ή καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν τον Ιστικό Παράγοντα (Θρομβοπλαστίνη) και πιθανώς και άλλους παράγοντες πήξης . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού ή του πνεύμονα καθώς και τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα ασθενών με Ερυθρηματώδη Λύκο , Ελκωτική Κολίτιδα , νόσο του Crohn ή σηψαιμία από μηνιγγιτιδόκοκκο εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες Ιστικού Παράγοντα και υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης παραγωγής του Ιστικού Παράγοντα από τα κύτταρα αυτά και της υπερπηκτικότητας του αίματος που εμφανίζουν οι ασθενείς .

Επίσης είναι γνωστό ότι τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IL-1 και TNF α , οι οποίες προκαλούν την παραγωγή Ιστικού Παράγοντα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα . Τέλος είναι σημαντικό για την θρομβογένεση ότι οι κυτταροκίνες αυτές καταστέλλουν την επίδραση της Πρωτεΐνης C στα ενδοθηλιακά κύτταρα και έτσι καταστέλλουν έναν από τους φυσιολογικούς αντιπηκτικούς μηχανισμούς . (Lewis και McGee, 1992) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΚΑΘΑΡΗ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΙΚΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ .

Μια από τις σημαντικότερες φυσιολογικές λειτουργίες που επιτελούν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα είναι η κάθαρση της αιματικής κυκλοφορίας από τα διάφορα είδη "ανεπιθύμητων" σωματιδίων , μικροβίων , κυττάρων και μορίων . Από τις αρχές του αιώνα μας είχε ήδη αναγνωριστεί η σπουδαιότητα των μονοκυττάρων και μακροφάγων του ήπατος και του σπλήνα (τα οποία τότε περιλαμβάνονταν στο Δικτυοενδοθηλιακό Σύστημα) στην φαγοκυττάρωση και απομάκρυνση των μικροβίων από την αιματική κυκλοφορία . Είναι γνωστό ότι τα μικρόβια απομακρύνονται κυρίως από τα μακροφάγα του ήπατος και σε μικρότερο βαθμό από τα σπληνικά μακροφάγα , αλλά τα τελευταία συμμετέχουν και σε άλλες διεργασίες που συσχετίζονται με την καταστροφή μικροβίων , όπως π.χ.

την σύνθεση αντισωμάτων . Τα μακροφάγα των ιστών , όπως για παράδειγμα του βρογχοκυψελιδικού επιθηλίου ή του εντερικού βλεννογόνου , απομακρύνουν μικρόβια που πέρασαν απευθείας στους ιστούς παρακάμπτοντας την κυκλοφορία . Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς συνήθως μέσω των Fc-υποδοχέων ή των CR-υποδοχέων . Μικροοργανισμοί οψωνοποιημένοι με IgG ή C3 φαγοκυτταρώνονται κυρίως από σπληνικά μακροφάγα ενώ μικροοργανισμοί οψωνοποιημένοι με IgM φαγοκυτταρώνονται από ηπατικά μακροφάγα . Αν όμως τα μικρόβια δεν έχουν οψωνοποιηθεί τότε αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα μέσω υποδοχέων τύπου λεκτινών , όπως είναι οι υποδοχείς Μαννόζης-Φουκόζης και οι υποδοχείς Γλυκανών . Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται και στην απομάκρυνση οψωνοποιημένων ερυθροκυττάρων σε αιμολυτικές αναιμίες . Με παρόμοιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται και η απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων από την κυκλοφορία ή τους ιστούς , ενώ η κάθαρση της κυκλοφορίας από σωματιδιακό υλικό εξαρτάται περισσότερο από τους υποδοχείς Ινωδοεκτίνης και σε μικρότερο βαθμό από τους υποδοχείς AGE . Με ενδοκύτωση απομακρύνονται και οι ενδοτοξίνες (LPS) των Gram (-) μικροβίων . Στην λειτουργία αυτή σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν ο υποδοχέας CD-14 και ο υποδοχέας των Ακετυλο-LDL-λιποπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης των μακροφάγων . (Cline , 1978 , Hocking και Golde , 1979 , Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Wright και συν.,1990 , Hampton και συν.,1991) .

Εκτός από την κυκλοφορία , μικροοργανισμοί και σωματιδιακό υλικό (όπως η αιθάλη και οι διάφορες κόνεις) συσσωρεύονται και στους πνεύμονες . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και σε μικρότερο βαθμό τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού αναλαμβάνουν την φαγοκυττάρωση και απομάκρυνση του υλικού αυτού . Ειδικά σε ότι αφορά τις κόνεις , η προσπάθεια των μακροφάγων του πνεύμονα να τις φαγοκυτταρώσουν και απομακρύνουν συχνά οδηγεί σε χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο πνευμονικό παρέγχυμα (Πνευμονοκονιώσεις) , όπως συμβαίνει στην σιλίκωση , στην αμιάντωση και σε άλλες περιπτώσεις . (Cline , 1978 , Hocking και Golde , 1979 , Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα μακροφάγα απομακρύνουν τα γηρασμένα κύτταρα από την κυκλοφορία και τα κατεστραμμένα κύτταρα από τους ιστούς . Ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων από την κυκλοφορία , που επιτυγχάνεται με φαγοκυττάρωση καθώς αυτά περνούν μέσα από τον σπλήνα . Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα μακροφάγα αναγνωρίζουν τα γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί απολύτως , θεωρείται όμως ότι σχετίζεται με την αναγνώριση των ιδιαίτερων πολυσακχαριτικών ομάδων που εκφράζονται στην επιφάνειά τους . Άλλες θεωρίες υποστηρίζουν ότι τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν προοδευτική απώλεια σιαλικού οξέος και κατιόντων , ότι παρουσιάζουν μεταβολές στα σάκχαρα και τις πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη τους , ότι παρουσιάζουν μεγάλες ποσότητες φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης τους ή τέλος ότι με την πάροδο του χρόνου έχουν συνδέσει αρκετή IgG ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνειά τους ώστε να αναγνωριστούν από τους Fc-υποδοχείς των μακροφάγων σαν οψωνοποιημένα κύτταρα . Όταν φαγοκυτταρωθούν τα ερυθροκύτταρα από τα μακροφάγα θα υποστούν αποδόμηση και θα απελευθερωθεί ο σίδηρος από την αίμη τους . Αυτός ο σίδηρος θα μεταφερθεί από τα μακροφάγα στους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών . Τέλος έχει διατυπωθεί η άποψη ότι και τα γηρασμένα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια

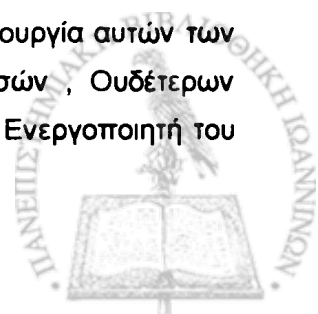
απομακρύνονται από την κυκλοφορία με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν για τα ερυθροκύτταρα . Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι εκτός από την απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων από την κυκλοφορία τα μακροφάγα αναλαμβάνουν και την απομάκρυνση των άχρηστων στοιχείων από τους αναπτυσσόμενους ιστούς του εμβρύου . Έτσι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που εμφανίζονται από νωρίς στους ιστούς και τα όργανα του εμβρύου , είναι υπεύθυνα για την φαγοκυττάρωση και απομάκρυνση των άωρων σχηματισμών ώστε να αντικατασταθούν από τους ωριμότερους εμβρυϊκούς ιστούς . Επίσης τα μακροφάγα αναλαμβάνουν την φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών επιθηλιακών κυττάρων , όπως π.χ. τα αποπτωτικά επιθήλια του εντερικού βλεννογόνου . Έχει αποδειχθεί ότι τα αποπτωτικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα CD-14 των μακροφάγων και ότι μέσω του υποδοχέα αυτού δίνεται το σήμα έναρξης της φαγοκυττάρωσης του νεκρωτικού κυττάρου χωρίς την ταυτόχρονη έναρξη μιας φλεγμονώδους αντίδρασης (Cline , 1978 , Johnston, 1988 , Zembala και Asherson, 1989 , Lewis και McGee , 1992 , Han και συν., 1993 , Devitt και συν., 1998) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ .

Μετά από τραυματισμούς ή φλεγμονές τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συρρέουν στις εστίες της ιστικής καταστροφής . Εκεί εκκρίνουν Κολλαγενάση , Ελαστάση και άλλα ένζυμα που επιτρέπουν την απομάκρυνση των ιστικών ρακών από την εστία της καταστροφής . Ταυτοχρόνως εκκρίνουν κυτταροκίνες και Αυξητικούς Παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την δημιουργία νεοαγγείωσης , με σκοπό την ανάπτυξη καινούργιου συνδετικού ιστού . Η δραστηριότητα αυτή είναι το επακόλουθο κάθε μορφής ιστικής βλάβης . όχι μόνο λοιμώδους αιτιολογίας αλλά και μετά από επίδραση μηχανικών , θερμικών ή χημικών παραγόντων . Κατά συνέπεια τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συμμετέχουν στην προσπάθεια αποκατάστασης ιστικών ελλειμμάτων ή διαταραχών σε μεγάλη ποικιλία καταστάσεων , που κυμαίνονται από αποστηματικές κοιλότητες και εγκαύματα μέχρι εστίες οστεοαρθρίτιδας ή απλές θλάσεις μυών .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διηθούν τους φλεγμαινόντες ή τραυματισμένους ιστούς επειδή έλκονται χημειοτακτικά από ουσίες που εκκρίνουν τα αιμοπετάλια και τα πολυμορφοπύρρηνα , καθώς και από προϊόντα της ιστικής νέκρωσης . Τα πρώτα μακροφάγα που καταφτάνουν στην εστία είναι υπεύθυνα για την έκκριση του παράγοντα F.I.M. ο οποίος προκαλεί μονοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα (αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων στο διπλάσιο έως τριπλάσιο) και έτσι εξασφαλίζεται η συνεχής μετανάστευση νέων μονοκυττάρων στην εστία .

Μια πολύ σημαντική λειτουργία των μακροφάγων για την ιστική επούλωση είναι η φαγοκυττάρωση των υπολειμμάτων της ιστικής καταστροφής . Αυτά μπορούν να είναι νεκρωτικά ή ρευστοποιημένα ιστικά στοιχεία , νεκροί μικροοργανισμοί και λευκά αιμοσφαίρια , ξένα σώματα , υπόλοιπα αιμορραγιών και εξιδρωμάτων , θρόμβοι , εναποθέσεις ινικής ή ανοσοσυμπλεγμάτων . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ασκούν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και απομακρύνουν αυτά τα στοιχεία από τις εστίες της βλάβης . Τα ίδια τα μακροφάγα συμμετέχουν στην δημιουργία αυτών των υπολειμμάτων με την παραγωγή και έκκριση Οξινων Λυσοσωματικών Υδρολασών , Ουδέτερων Πρωτεασών , Ιστικού Αναστολέα των Μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) και τέλος του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου . (Schaffer και Nanney, 1996) .



Τα μακροφάγα παράγουν πολλές κυτταροκίνες που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επούλωσης όπως IL-1, TNFα, PDGF, TGFβ, bFGF και INFα. Οι παράγοντες IL-1, TNFα και PDGF προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών *in situ* και διεγείρουν την έκκριση κολλαγόνου, κολλαγόνου και υαλουρονικού οξέος από αυτά. Ο TNFα επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση ενώ ο παράγοντας PDGF είναι χημειοτακτικό ερέθισμα για τους ινοβλάστες και τα ουδετερόφιλα. Ο TGFβ αποτελεί χημειοτακτικό ερέθισμα για τους ινοβλάστες, προάγει τον πολλαπλασιασμό τους καθώς και την σύνθεση κολλαγόνου, ινωδονεκτίνης και πρωτεογλυκανών αλλά προάγει και την συσσώρευση ενεργοποιημένων μονοκυττάρων στην φλεγμονώδη εστία. Επίσης ευοδώνει τους μηχανισμούς της νεοαγγειογένεσης (angiogenesis). Ο παράγοντας bFGF επίσης προάγει την σύνθεση κολλαγόνου, ινωδονεκτίνης και πρωτεογλυκανών και εμπλέκεται ενεργά στην δημιουργία νεοαγγείωσης, αφού προκαλεί την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων στις περιοχές σύνθεσης κολλαγόνου και την οργάνωσή τους σε σωληνοειδείς σχηματισμούς. Οι παραπάνω κυτταροκίνες διεγείρουν τα κύτταρα του συνδετικού ιστού για την δημιουργία κοκκιώδους ιστού (granulation tissue) ο οποίος προοδευτικά θα μετατραπεί σε κανονικό συνδετικό ιστό με λιγότερα αγγειακά και κυτταρικά στοιχεία, μέσω μιας διαδικασίας ανάπλασης (remodeling) στην οποία συμμετέχουν τα μακροφάγα. Όμως ταυτόχρονα με τους παράγοντες που προάγουν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την διέγερση της λειτουργίας τους, υπάρχουν και άλλοι που συντέλούν στην απομάκρυνση των φλεγμονωδών κυττάρων και την διακοπή της λειτουργίας των ινοβλαστών, ώστε να αποφεύγονται υπερβολικές αντιδράσεις ίνωσης και νεοαγγείωσης. Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν την φαγοκυττάρωση και την παραγωγή λυσοσωματικών ενζύμων και μεταλλοπρωτεϊνών για την διάσπαση και απορρόφηση των πλεοναζόντων ινωτικών στοιχείων. Οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες των μακροφάγων ενεργοποιούνται από την Πλασμίνη ή την Στρωμελυσίνη και συμμετέχουν ενεργά στην αργή απορρόφηση του κολλαγόνου και των άλλων συστατικών της θεμέλιας ουσίας του ουλώδους ιστού. Στις περιπτώσεις χρόνιων φλεγμονωδών νόσων δημιουργούνται υπερβολικές εναποθέσεις συνδετικού ιστού. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η Διάμεση Πνευμονική Ίνωση, το Σκληρόδερμα, η Κίρρωση του Ήπατος και το Χηλοειδές. (Zembala και Asherson, 1989, Schaffer και Nanney, 1996).

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα του ΚΝΣ και του ΠΝΣ (μικρογλοιακά κύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα) συμμετέχουν στις διαδικασίες ιστικής επούλωσης μετά από τραυματισμούς. Ωστόσο οι μορφές των αντιδράσεων επούλωσης είναι διαφορετικές επειδή στο περιφερικό Ν.Σ. υπάρχει αναγέννηση των αισθητικών νευραξόνων (nerve regeneration) ενώ στο κεντρικό Ν.Σ. δεν υπάρχει αναγέννηση των νευραξόνων. Έτσι όταν συμβεί ένας τραυματισμός στο ΚΝΣ με ρήξη αγγείων θα παρατηρηθεί μετανάστευση μονοκυττάρων στον νευρικό ιστό, τα οποία αναπτύσσουν τον φαινότυπο «ενεργοποιημένου μικρογλοιακού κυττάρου» μαζί με τα πραγματικά μικρογλοιακά κύτταρα. Αυτός ο πληθυσμός μονοκύτταρων φαγοκυττάρων απομακρύνει την υπολείμματα της ιστικής βλάβης, εκκρίνει IL-1 για να υπάρξει νεοαγγειογένεση και πολλαπλασιασμός των νευρογλοιακών κυττάρων και τέλος θα αναλάβει την απομάκρυνση των νευρώνων που εκφυλίζονται ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία νευροτοξικών μεταβολιτών. Στο περιφερικό Ν.Σ. η διατομή ενός νεύρου προκαλεί εκφύλιση των νευραξόνων περιφερικά (Wallerian degeneration) και κεντρικά της διατομής (retrograde degeneration) και δεν διαταράσσεται ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Ωστόσο υπάρχει μετανάστευση μονοκυττάρων

από το αίμα . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα απομακρύνουν ταχύτατα τους εκφυλισμένους νευράξονες χωρίς να φαγοκυτταρώνουν τα συναπτικά κομβία και προκαλούν υπερπλασία των νευρογλοιακών κυττάρων . Οι νευράξονες των οποίων τα σώματα των νευρικών κυττάρων εντοπίζονται στον νωτιαίο μυελό δεν εκφυλίζονται αλλά αντίθετα υφίστανται αναγέννηση . (Zembala και Asherson , 1989 , Perry και Gordon , 1992 , Lotan και Schwartz, 1994 , Lewis και McGee , 1994) .

Τέλος τα μακροφάγα συμμετέχουν στην ανάπτυξη των οστών (**bone remodelling**) με την έκκριση κυτταροκινών και Αυξητικών Παραγόντων που προάγουν την απορρόφηση των οστικών δοκίδων από τους οστεοκλάστες και την δημιουργία νέων οστικών δοκίδων από τους οστεοβλάστες . Σε αυτή την διαδικασία συμμετέχει και η 1,25-Vit.D3 , η οποία αυξάνει την δραστηριότητα των οστεοκλαστών αλλά και επαιξάνει την δημιουργία των καινούργιων οστεοκλαστών από πρόδρομα κύτταρα μυελομονοκυτταρικής προέλευσης . Η αναδόμηση των οστών αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία , η οποία επιτελείται καθημερινά , με σκοπό την αύξηση της αντοχής και την επιδιόρθωση μικροσκοπικών βλαβών του ερειστικού συστήματος αλλά και την ομοιοστασία του ασβεστίου του αίματος .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΒΙΤΑΜΙΝΗ D₃ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα επηρεάζονται από την 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃ (1,25-Vit.D3) σε πολλές από τις λειτουργίες τους . Ταυτοχρόνως τα κύτταρα αυτά αποτελούν πηγές παραγωγής της 1,25-Vit.D3 σε πολλές καταστάσεις . Είναι πιθανό ότι υπό ορισμένες συνθήκες η 1,25-Vit.D3 που εκκρίνεται από τα μακροφάγα να επηρεάζει φυσιολογικές λειτουργίες όπως η μυελοποίηση , η ανάπτυξη των οστών και η περιοδική ανάπτυξή τους (remodeling) και η λειτουργία των T- και Β-λεμφοκυττάρων . Τέτοιες καταστάσεις αυξημένης παραγωγής 1,25-Vit.D3 είναι η σαρκοειδωση , η φυματίωση , η νόσος του Hansen και διάφορα άλλα κοκκιωματώδη νοσήματα , καθώς και η συστηματική λοίμωξη από *Candida* . Ειδικά όμως η περίπτωση της παραγωγής 1,25-Vit.D3 από τα μακροφάγα των σαρκοειδικών κοκκιωμάτων είναι πολύ χαρακτηριστική και οδηγεί σε ένα από τα σταθερά συμπτώματα της σαρκοειδωσης , τον συνδυασμό υπερασβεσταιμίας/υπερασβεστιουρίας χωρίς νεφρική παθολογία . (Barbour και συν.,1981 , Adams και συν.,1983 , Kozeny και συν., 1984 , Abe και συν., 1984 , Adams και Gacad, 1985 , Zembala και Asherson , 1989) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ .

Μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα υπάρχουν και στους γονάδες (όρχεις και ωοθήκες) όπως ακριβώς και σε όλα τα υπόλοιπα όργανα . Όμως η λειτουργία των μακροφάγων εκεί δεν είναι μόνον αμυντική . Τα μακροφάγα του όρχη παράγουν TNFα και IL-1 , οι οποίες προκαλούν μεταβολές της έκκρισης τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig . Επίσης τα μακροφάγα του όρχη φαίνεται να συμμετέχουν στον μεταβολισμό των ανδρογόνων και ιδιαίτερα στον μεταβολισμό της τεστοστερόνης . Παρομοίως τα μακροφάγα των ωοθηκών επηρεάζουν την έκκριση προγεστερόνης από τα κοκκιώδη κύτταρα της θήκης του ωχρού σωματίου , με την παραγωγή πολυπεπτιδικών μορίων με MB μεταξύ 26 - 41 kDa , που ανήκουν στις Κυβερνίνες . Οι κυτταροκίνες TNFα και IL-1 επίσης προκαλούν μεταβολές στην έκκριση στεροειδών από τα κύτταρα της ωοθήκης . Όμως εκτός από τις επιδράσεις στην ενδοκρινική λειτουργία των γονάδων , τα μακροφάγα ασκούν και την κλασσική αμυντική τους λειτουργία κατά των

μικροοργανισμών . Επιπλέον σε ορισμένα ζωικά είδη τα μακροφάγα των όρχεων αναλαμβάνουν την απομάκρυνση των γηρασμένων σπερματοζωαρίων , ενώ στον άνθρωπο η λειτουργία αυτή επιτελείται από τα κύτταρα Sertoli . Τέλος φαίνεται ότι τα μακροφάγα των όρχεων σχετίζονται με την πλήρη έλλειψη αναγνώρισης της ιστοσυμβατότητας στον όρχη , που έχει ως αποτέλεσμα οι αντιδράσεις απόρριψης μοσχεύματος να μην παρατηρούνται στο όργανο αυτό . (Hutson, 1994) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .

Κατά τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος μεταναστεύουν μονοκύτταρα από το αίμα προς τους αναπτυσσόμενους ιστούς . Εκεί τα μονοκύτταρα και τα άωρα μικρογλοιακά κύτταρα (που επίσης ανήκουν στα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα) φαγοκυτταρώνουν και απομακρύνουν τους νευρώνες που πεθαίνουν και τις άχρηστες νευρικές απολήξεις (νευρίτες) . Τα κύτταρα αυτά επίσης παράγουν IL-1 , η οποία ευοδώνει την ανάπτυξη των νευρογλοιακών κυττάρων και την αγγειογένεση , καθώς και άλλων Αιζητικών Παραγόντων που ευοδώνουν την ανάπτυξη των αστροκυττάρων . Στο ΚΝΣ των ενηλίκων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η φυσιολογική λειτουργία των μικρογλοιακών κυττάρων . Τα μικρογλοιακά κύτταρα των περικοιλιακών περιοχών του ΚΝΣ φαίνεται ότι ασκούν αμυντικές δραστηριότητες ενώ τα μικρογλοιακά κύτταρα του παρεγχύματος του ΚΝΣ (που προστατεύονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) φαίνονται αδρανή από βιοσυνθετικής και από αντιγονοπαρουσιαστικής άποψης . Ωστόσο τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι δραστήρια φαγοκύτταρα και διαθέτουν FcR-υποδοχείς και CR-υποδοχείς . Μία από τις φυσιολογικές φαγοκυτταρικές λειτουργίες που επιτελούν είναι η φαγοκυττάρωση των άκρων των νευραξόνων των κυττάρων του υποθαλάμου που φέρονται στην οπίσθια υπόφυση και εκκρίνουν την Ωκυτοκίνη και την Αντιδιουρητική Ορμόνη . Η φαγοκυττάρωση των άκρων των νευραξόνων αυτών πιθανώς ρυθμίζει την ορμονική έκκριση .



Κεφάλαιο 2-2 . Ο ρόλος του μακροφάγου στην πρωτογενή άμυνα του οργανισμού

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αποτελούν τους σπουδαιότερους φορείς της πρωτογενούς άμυνας του οργανισμού . Για τον σκοπό αυτό βρίσκονται στρατηγικά τοποθετημένα στις πύλες εισόδου του σώματος , σε θέσεις ελέγχου της αιματικής και λεμφικής κυκλοφορίας αλλά και διάσπαρτα στους ιστούς . Οι ιδιότητες που τα καθιστούν ικανά να επιτελέσουν αυτό τον σημαντικό σκοπό είναι η φαγοκυττάρωση και καταστροφή εξωκυττάρων μικροοργανισμών (όπως π.χ. *S. pneumoniae* και *E. coli*) , η λύση των ενδοκυττάρων παρασίτων (όπως π.χ. *Mycobacteria* , *Toxoplasma* , *Leishmania* , *Trypanosoma* , *Listeria* και πολλοί μύκητες) και τέλος η ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια λύση των καρκινικών κυττάρων (Cline, 1978 , Johnston , 1988) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη άμυνα του οργανισμού απέναντι σε λοιμώδεις παράγοντες όπως τα βακτήρια , οι ιοί , οι μύκητες , τα πρωτόζωα και τα παράσιτα . Όμως η επίτευξη αυτού του στόχου απαιτεί την ταυτόχρονη χρήση πολλών ιδιοτήτων των μακροφάγων . Τα κύτταρα αυτά μπορούν να προκαλέσουν την καταστροφή των μικροοργανισμών από μόνα τους ή να διεγείρουν τα Τ-λεμφοκύτταρα για να καταστρέψουν τα μικρόβια . Όταν τα μακροφάγα αναλαμβάνουν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα από μόνα τους θεωρείται ότι ασκούν μη-ειδική άμυνα (non-specific immunity) . Αυτή απαιτεί την αρχική ευαισθητοποίηση (priming) των μακροφάγων από μια κυτταροκίνη (INF- γ) που θα προκαλέσει την αυξημένη έκφραση των αντιγόνων MHC-II στην επιφάνειά τους και στην συνέχεια μια δεύτερη διέγερση από έναν παράγοντα όπως οι μικροβιακές ενδοτοξίνες , που θα μετατρέψει τα ευαισθητοποιημένα μακροφάγα σε ενεργοποιημένα . Στον ζώντα οργανισμό η INF- γ παράγεται από άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όταν αυτά έρθουν σε επαφή με ιούς ή με μυκοβακτηρίδια . Τα μακροφάγα που ευαισθητοποιούνται από την κυτταροκίνη αυτή αποκτούν την ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου στα CD-4 λεμφοκύτταρα . Μετά την ενεργοποίησή τους αποκτούν επιπλέον ικανότητες , όπως την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου , την καταστροφή ενδοκυττάρων παρασίτων και μυκήτων και τέλος την λύση καρκινικών κυττάρων . (Nathan και συν., 1980 , Nathan και Hibbs , 1991 , Lewis και McGee, 1992) .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα κινούνται χημειοτακτικά προς τις εστίες της λοίμωξης ακολουθώντας την αύξηση της συγκέντρωσης ουσιών όπως οι ενδοτοξίνες , τα ανοσοσυμπλέγματα , μικροβιακά προϊόντα και προϊόντα καταστροφής του κολλαγόνου . Παραμένουν στις εστίες της λοίμωξης υπό την επίδραση ενός Παράγοντα Αναστολής της Μετανάστευσης (Migration Inhibition Factor) ο οποίος εκκρίνεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα . Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα που μετανάστευσαν χημειοτακτικά στην εστία της λοίμωξης φαγοκυττάρωνουν τους υπεύθυνους μικροοργανισμούς και τους καταστρέφουν με μηχανισμούς εξαρτημένους από το οξυγόνο ή μη-εξαρτημένους από το οξυγόνο . Αυτό συμβαίνει επειδή όλοι οι μικροοργανισμοί δεν είναι ευαίσθητοι στους ίδιους μικροβιοκτόνους μηχανισμούς . Οι εξαρτημένοι από το οξυγόνο μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παραγωγή και έκκριση Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 και OH^{\cdot}) κατά την

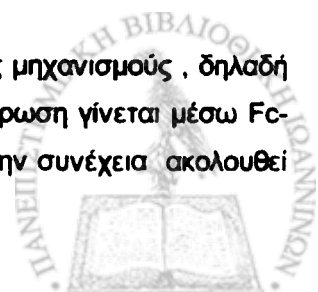
Οξειδωτική Έκρηξη . Οι ρίζες αυτές καταστρέφουν πολλά πρωτόζωα όπως το *Trypanosoma* και το *Toxoplasma* , καθώς και άλλους μικροοργανισμούς . Η οξειδωση των αλογόνων οδηγεί στην δημιουργία των αλογονιδίων (*halides*) τα οποία αποδομούν τα νουκλεοτίδια και τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα των μικροβίων και τους φονεύουν ταχύτατα .

Υπάρχουν όμως και μικροοργανισμοί που καταστρέφονται από μη-εξαρτημένους από το οξυγόνο μηχανισμούς . Τέτοιοι είναι η οξίνιση του pH των φαγοσώματων σε τιμές $pH < 5$, η οποία επιτυγχάνεται με την σύντηξη του φαγοσώματος με τα πρωτογενή λυσοσώματα και ολοκληρώνεται μέσα σε 15' λεπτά . Τα Οξινά Λυσοσωματικά Ένζυμα (Οξινές Υδρολάσες) του λυσοσώματος συνεισφέρουν σημαντικά στην λύση και καταστροφή των μικροβίων αυτών , επειδή ενεργοποιούνται πλήρως στο όξινο pH . (Nathan και συν., 1980 , Lewis και McGee, 1992)

Ορισμένοι μικροοργανισμοί διαθέτουν τρόπους διαφυγής από τους μικροβιοκτόνους μηχανισμούς των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το *Mycobacterium tuberculosis* που εκκρίνει ουσίες που εμποδίζουν την σύντηξη φαγοσώματος - λυσοσώματος , καθώς και τα είδη *Leishmania* και *M. lepraemurium* των οποίων το τοίχωμα αποτελείται από συστατικά ανθεκτικά στις Οξινές Υδρολάσες και τα άλλα ένζυμα των μακροφάγων .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αποτελούν σημαντικούς φορείς αντιμετώπισης των ιογενών λοιμώξεων . Με την έντονη φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα τα μακροφάγα απομακρύνουν τα σωματίδια του ιού από την κυκλοφορία ταχύτατα . Επίσης καταστρέφουν με ADCC τα κύτταρα του σώματος που εκφράζουν αντιγόνα του ιού επειδή έχουν προσβληθεί και αποτελούν εστίες αναπαραγωγής του , μειώνοντας έτσι τις δυνατότητες πολλαπλασιασμού του . Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα αυξάνουν την ισοστατική δραστηριότητα του σώματος . Τέλος τα μακροφάγα επεξεργάζονται και παρουσιάζουν τα αντιγόνα των ιών στα T-λεμφοκύτταρα , συμμετέχοντας έτσι στην δημιουργία ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης . Αν όμως το μακροφάγο δεν ανταποκριθεί στην ιογενή λοίμωξη ικανοποιητικά είναι πιθανό να αποτελέσει το ίδιο θέση πολλαπλασιασμού του ιού . Αυτό συμβαίνει με την λοίμωξη από τον ιό HIV-1 . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα αποτελούν κύριους στόχους του HIV-1 όπως και τα CD4(+) T-λεμφοκύτταρα . Όταν ο ιός HIV-1 προσβάλλει ένα άωρο μονοκύτταρο το οποίο μπορεί να παρουσιάσει μιτωτική διαίρεση , παρατηρείται πολλαπλασιασμός του ιού όταν το κύτταρο ενεργοποιηθεί . Αν ο ιός HIV-1 προσβάλλει ένα ώριμο μακροφάγο που αδυνατεί να διαιρεθεί μιτωτικά τότε η ενεργοποίηση του μακροφάγου καταστέλλει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιού (Bernstein και συν., 1991) . Όταν ο HIV-1 προσβάλλει T-λεμφοκύτταρα , η ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου οδηγεί στον πολλαπλασιασμό του ιού . Τα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται με διάφορους μηχανισμούς , ακόμα και από H_2O_2 που παράγεται στο εσωτερικό τους και ενεργοποιεί τον Παράγοντα Μεταγραφής NFκB , με αποτέλεσμα μεταγραφή του γονιδιώματος του ιού (Schreck και συν., 1991) . Από μελέτες φαίνεται ότι τα μονοκύτταρα είναι πιο ανθεκτικά στην προσβολή από ορισμένους ιούς σε σχέση με τα ώριμα μακροφάγα και επίσης ότι τα μονοκύτταρα αδρανοποιούν ευκολότερα τους ιούς από τα ώριμα μακροφάγα (Soderberg-Naucler και συν., 1997) .

Τα μακροφάγα απομακρύνουν τους ιούς από την κυκλοφορία με τρεις μηχανισμούς , δηλαδή με φαγοκυττάρωση ή με πινοκύτωση ή με ιοπηξία (*virophexis*) . Η φαγοκυττάρωση γίνεται μέσω Fc-υποδοχέων , CR-υποδοχέων ή υποδοχέων γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών . Στην συνέχεια ακολουθεί



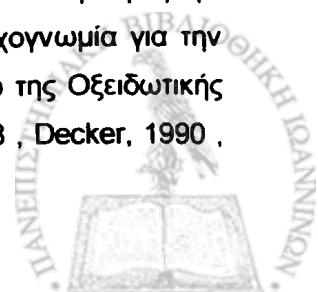
η λυσοσωματική αποδόμηση του ιού , η παρουσίαση των αντιγόνων του ιού στα λεμφοκύτταρα , η ενεργοποίηση των T- και B- λεμφοκυττάρων και των NK-κυττάρων και η παραγωγή κυτταροκινών (INFα, TNFα και IL-6) που θα επιτείνουν περαιτέρω την άμυνα του οργανισμού . Επίσης εκκρίνουν ουσίες όπως η Αργινάση και οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου που καταστρέφουν όσα κύτταρα χρησιμοποιούνται για την αναπαραγωγή του ιού .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ .

Τα μακροφάγα είναι τοποθετημένα σε όλες τις πιθανές θέσεις εισόδου των μικροβίων (όπως οι βλεννογόνοι , το βρογχοκυψελιδικό επιθήλιο , οι λεμφαδένες , το ήπαρ και ο σπλήνας) και είναι εξοπλισμένα με μια σημαντική ποικιλία αντιμικροβιακών μηχανισμών . Επιπλέον υπάρχουν άλλα μακροφάγα τοποθετημένα σε καίριες θέσεις μέσα στους ιστούς και άλλα μακροφάγα που περιβάλλουν τα αγγεία ή τις ορογόνες επιφάνειες . Τέλος σε κάθε περίπτωση αυξημένης ανάγκης μακροφάγων είναι δυνατή η ταχεία μετανάστευσή τους από την κυκλοφορία με την μορφή μονοκυττάρων .

Τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα των διάφορων ιστών και οργάνων παρουσιάζουν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες . Έτσι τα ανθρώπινα μακροφάγα του βρογχοκυψελιδικού επιθηλίου παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα όταν έρθουν σε επαφή με στελέχη *Pseudomonas* και *Listeria* . Όταν όμως τα μονοκύτταρα ενεργοποιηθούν με INFγ παράγουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από ότι τα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Τα μονοκύτταρα του αίματος του ανθρώπινου ομφάλιου λώρου φαγοκυτταρώνουν στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus* Ομάδος Α με την ίδια ευκολία που τα φαγοκυτταρώνουν τα μονοκύτταρα του φλεβικού αίματος αλλά παρουσιάζουν μικρότερη μικροβιοκτόνο δραστηριότητα .

Τα σημαντικότερα ίσως είδη μακροφάγων στην πρωτογενή άμυνα του οργανισμού κατά των βακτηριακών λοιμώξεων είναι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τα κύτταρα Kupffer . Οι αεραγωγοί του πνεύμονα διαθέτουν άφθονα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα οποία ασκούν ιδιαίτερα έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα . Αν και διαθέτουν Fc-υποδοχείς και CR-υποδοχείς για οψωνοποιημένα μικρόβια , χρησιμοποιούν κυρίως υποδοχείς λεκτινών ή άλλων υποκαταστατών . Επίσης τα κύτταρα αυτά είναι εξοπλισμένα με «κυτταροφιλική» IgG-ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνειά τους , η οποία μπορεί να συνδέσει την Πρωτεΐνη Α του τοιχώματος των σταφυλοκόκκων και να οδηγήσει στην ενδοκύτωση του μικροοργανισμού . Συνήθως τα Gram (+) μικρόβια φαγοκυτταρώνονται από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ευκολότερα από ότι τα Gram (-) μικρόβια . Είναι ενδιαφέρον ότι ακόμα και σε κατάσταση ηρεμίας τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν τον υψηλότερο οξειδωτικό μεταβολισμό (κατανάλωση O₂) από οποιοδήποτε άλλο μακροφάγο . Τα κύτταρα Kupffer , όπως και τα μακροφάγα του πνεύμονα , έρχονται σε συνεχή επαφή με μικροοργανισμούς και με τις τοξίνες τους και για τον λόγο αυτό έχουν θεωρηθεί ότι είναι σε μόνιμη φλεγμονώδη διέγερση . Τα κύτταρα Kupffer διαθέτουν καλά αναπτυγμένο φαγοσωματικό-λυσοσωματικό σύστημα και ασκούν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα , κυρίως μέσω υποδοχέων για λεκτίνες αλλά και των CR-υποδοχέων . Ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου, υπάρχει μια διχογνωμία για την ικανότητα των κυττάρων Kupffer να παράγουν αυτές τις βιοδραστικές ουσίες μέσω της Οξειδωτικής Έκρηξης . (Hocking και Golde 1979 , Matsuo και συν., 1985 , Ding και Nathan, 1988 , Decker, 1990 , Lohmann-Matthes και συν., 1994) .



Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα καταστρέφουν βακτήρια αφού τα φαγοκυτταρώσουν ή και χωρίς φαγοκυττάρωση. Για να φαγοκυτταρωθεί ένα βακτήριο είναι απαραίτητη η αναγνώριση του, η οποία συνήθως απαιτεί την ύπαρξη υποδοχέων. Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι εξής: α) FcR-υποδοχείς που αναγνωρίζουν βακτήρια οψωνοποιημένα με αντισώματα, β) CR-υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα βακτήρια που οψωνοποιήθηκαν με πρωτεΐνες του συμπληρώματος, γ) ο υποδοχέας CD14 που αναγνωρίζει τα μόρια των ενδοτοξινών (LPS), δ) ο υποδοχέας ακετυλιωμένων LDL-λιποπρωτεϊνών (scavenger receptor) που επίσης αναγνωρίζει τα μόρια του LPS, ε) Λεκτίνες (Lectins) οι οποίες αναγνωρίζουν ομάδες από πολυσακχαρίτες στην επιφάνεια των μικροβίων (ή αν είναι λεκτίνες των μικροβίων, αναγνωρίζουν τις πολυσακχαριτικές ομάδες στην επιφάνεια των μακροφάγων), στ) Ιντεγκρίνες (Integrins) όπως οι LFA-1 και gp150,95, που επίσης αναγνωρίζουν πολυσακχαριτικές ομάδες. Μετά την αναγνώριση των βακτηρίων απαιτείται η διέγερση των φαγοκυττάρων για να υπάρξει φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρια καταστροφή τους ή για να ακολουθήσει η εξωκυττάρια λύση των μικροοργανισμών. Αυτή η διέγερση επιτυγχάνεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων και οι λεμφοκίνες, τα μικροβιακά προϊόντα και η έκθεση σε C5a ή ινωδονεκτίνη.

Συνοπτικά, οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα για την καταστροφή των βακτηρίων είναι οι εξής: α) Για την καταστροφή φαγοκυτταρωμένων βακτηριδίων: Οξίνιση του pH του φαγοσώματος, Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου, Υποχλωρίτης, Λυσοζύμη, Οξίνες Λυσοσωματικές Υδρολάσες, Νεοπτερίνη, Κατιονικές Πρωτεΐνες (Λυσοζύμη, Ντεφενσίνες MCP-1 και MCP-2), β) Για την καταστροφή των μη-φαγοκυτταρωμένων βακτηριδίων: Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου και Αζώτου, Παράγοντες του Συμπληρώματος, Κυτταροκίνες. Ειδική μνεία θα γίνει μόνο για την Νεοπτερίνη και τις Κατιονικές Πρωτεΐνες. Η Νεοπτερίνη αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη στην μετατροπή του GTP σε φυλλικό οξύ και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Είναι πιθανό ότι τα μακροφάγα παράγουν Νεοπτερίνη καταναλώνοντας την τρυπτοφάνη που είναι απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων ή επειδή η οξειδωμένη μορφή της είναι αναστολέας του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος στα μικρόβια. Οι Κατιονικές Πρωτεΐνες είναι «φυσικά αντιβιοτικά» οι οποίες δρουν βέλτιστα σε pH μεταξύ 7.0 και 8.0, καταστρέφοντας τις μεμβράνες των βακτηρίων. Έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Η λυσοζύμη διασπά τους β1-4 δεσμούς μεταξύ N-ακετυλογλυκοσαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος στις πεπτιδογλυκάνες ενώ άλλες δρουν παρεκτοπίζοντας το Ca^{+2} που σταθεροποιεί τους δεσμούς μεταξύ μορίων LPS στο τοίχωμα των Gram(-) μικροοργανισμών.

ΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ.

Ορισμένα μικρόβια που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να επιζούν στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων και να αναπτύσσονται εκεί ονομάζονται «ενδοκυττάρια παράσιτα». Παραδείγματα τέτοιων οργανισμών είναι η *Salmonella typhimurium* που παρασιτεί ευκαιριακά και τα διάφορα είδη μυκοβακτηριδίου (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* κ.α.) που παρασιτούν υποχρεωτικά. Αυτά τα μικρόβια καταστρέφονται μόνο όταν τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα στο οποίο παρασιτούν υποστεί ενεργοποίηση. Ο ρόλος των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων είναι διπλός: αναλαμβάνουν τα ίδια την καταστροφή των παρασίτων με φαγοκυττάρωση ή παρουσιάζουν τα αντιγόνα του παρασίτου στα T-λεμφοκύτταρα για να δημιουργήσουν ειδική ανοσολογική αντίδραση εναντίον του. Ορισμένα από τα ενδοκυττάρια παράσιτα (*Leishmania*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* κ.α.) φαγοκυτταρώνονται από τα

μακροφάγα αλλά δεν καταστρέφονται . Για να αποκτήσουν αντιμικροβιακή δράση τα μακροφάγα θα πρέπει να ενεργοποιηθούν από τα Τα-λεμφοκύτταρα μέσω λεμφοκινών όπως η INF- γ και ο TNF β . Τότε τα μακροφάγα παράγουν μεγάλες ποσότητες Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου που είναι ιδιαίτερα τοξικές για τα παράσιτα . Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι το Νιτρικό Οξείδιο έχει πολύ μεγάλη αντιπαρασιτική δράση . Οι λεμφοκίνες που ενεργοποιούν τα μακροφάγα προέρχονται από τα βοηθητικά CD4(+) Τα-λεμφοκύτταρα τύπου T_H1 , αλλά υπάρχουν και CD4(+) λεμφοκύτταρα τύπου T_H2 που καταστέλλουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και εμποδίζουν την δράση τους στην φόνευση των παρασίτων .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ .

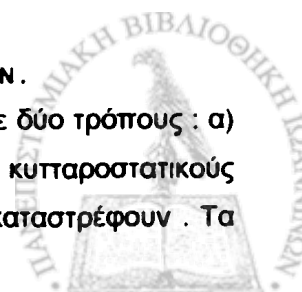
Οι βλεννογόνοι διαθέτουν ένα δικό τους αμυντικό σύστημα που υπάγεται στο ανοσοποιητικό σύστημα και συνεργάζεται με αυτό . Το αποτελούν κυρίως οι λεμφικοί ιστοί που είναι τοποθετημένοι εντός των σιελογόνων , δακρυϊκών και μαζικών αδένων καθώς και εντός της γαστρεντερικής , της ουρογεννητικής και της αναπνευστικής οδού . Μέσα σε αυτούς τους λεμφικούς ιστούς υπάρχουν και πολλά μακροφάγα . Τα μακροφάγα του επιθηλίου των βλεννογόνων εκτός από την μη-ειδική φαγοκυτταρωτική δράση επιτελούν έναν σημαντικό σκοπό με την φαγοκυττάρωση , επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγονικών ουσιών στα λεμφοκύτταρα και έτσι συμμετέχουν στην έναρξη ανοσολογικών αντιδράσεων , ιδιαίτερα στις πλάκες του Peyer . Όμως υπάρχουν μακροφάγα και στο χόριο των βλεννογόνων , τα οποία συχνά είναι ενεργοποιημένα . Τα μακροφάγα του χορίου φαγοκυτταρώνουν , επεξεργάζονται και παρουσιάζουν αντιγονικές ουσίες , παράγουν και εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως IL-1 , IL-6 και TNF α και επίσης ασκούν μη-ειδική φαγοκυτταρωτική δράση . Τέλος τα μακροφάγα του χορίου των βλεννογόνων συχνά αποτελούν τους ξενιστές μέσα στους οποίους αναπτύσσονται ιοί όπως ο CMV και ο HIV . (Sigal και Ron, 1994) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα δεν διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για αντιγόνα και έτσι αδυνατούν να αναγνωρίσουν αντιγόνα . Διαθέτουν όμως Fc-υποδοχείς και αναγνωρίζουν κύτταρα οψωνοποιημένα με IgG ανοσοσφαιρίνες , τα οποία στην συνέχεια καταστρέφουν με ADCC . Ωστόσο τα μακροφάγα αναγνωρίζουν και καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα ακόμα και χωρίς την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων και αυτή η ιδιότητα είναι πολύ σημαντική για την ανοσολογική επιτήρηση (immune surveillance) κατά της εμφάνισης νεοπλασματικών κυττάρων . Ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τον μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό . Έχει προταθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν απλές διαταραχές των πρωτεϊνών , πολυσακχαριτών ή φωσφολιπιδίων των μεμβρανών τους (σαν αυτές που παρουσιάζουν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα) και ότι οι μεταβολές αυτές αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς τύπου λεκτινών στα μακροφάγα (Nathan και συν., 1980 , Fidler, 1985 , Lewis και McGee, 1992) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αντιμετωπίζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα με δύο τρόπους : α) με κυτταρολυτικούς μηχανισμούς που καταστρέφουν το καρκινικό κύτταρο , β) με κυτταροστατικούς μηχανισμούς που αναστέλλουν την αύξηση του καρκινικού κυττάρου χωρίς να το καταστρέφουν . Τα



μακροφάγα ευαισθητοποιούνται για την καταστροφή νεοπλασματικών κυττάρων σε δύο περιπτώσεις :

1) όταν τα μακροφάγα φέρουν ολόκληρα μόρια αντισώματος στην επιφάνειά τους (Armed Macrophages) τα οποία αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια του νεοπλασματικού κυττάρου , και

2) όταν τα μακροφάγα είναι ενεργοποιημένα (Activated Macrophages) .

Η σύνδεση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με τα καρκινικά κύτταρα δεν προϋποθέτει την ύπαρξη ανοσοσφαιρινών ή την οψωνοποίηση με συμπλήρωμα . Τα μακροφάγα χρησιμοποιούν και υποδοχείς τύπου λεκτινών ή άλλους υποδοχείς για να συνδεόνται με τα καρκινικά κύτταρα .

Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα , είτε γίνεται με μηχανισμούς εξαρτημένους από αντισώματα (Antibody-dependent cellular cytotoxicity , ADCC) είτε γίνεται με μηχανισμούς ανεξάρτητους αντισωμάτων (π.χ. με την απευθείας επαφή μακροφάγων και νεοπλασματικών κυττάρων και με την έκκριση ειδικών ουσιών) και είναι πάντα εκλεκτική . Έτσι καταστρέφονται μόνο νεοπλασματικά κύτταρα του σώματος χωρίς να βλάπτονται τα φυσιολογικά .

Όταν τα μακροφάγα αναλαμβάνουν την αντικαρκινική κυτταροτοξική δραστηριότητα από μόνα τους (δηλαδή χωρίς την βοήθεια των λεμφοκυττάρων) θεωρείται ότι ασκούν μη-ειδική κυτταρική άμυνα (non-specific cell-mediated cytotoxicity) . Αυτή η δραστηριότητα παρατηρείται μόνο από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και χαρακτηρίζεται από δύο ιδιότητες : 1) είναι αποτελεσματική για μια μεγάλη ποικιλία νεοπλασματικών κυττάρων και 2) δεν απαιτεί την φαγοκυττάρωση των κυττάρων αυτών . Για την επίτευξη αυτής της αντινεοπλασματικής δραστηριότητας τα μακροφάγα διαθέτουν πολυάριθμους μηχανισμούς . (Nathan και συν., 1980 , Lewis και McGee, 1992) .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα μέσω :

1. Παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου .
2. Έκκρισης TNFα και IL-1.
3. Έκκρισης Παράγοντων του Συμπληρώματος (όπως π.χ. C5a , C6 , C7 , C8 , C9) που πολυμερίζονται και δημιουργούν τα «Συμπλέγματα MAC» (Membrane Attack Complexes) τα οποία καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες του κυττάρου-στόχου .
4. Έκκρισης Ουδέτερων Πρωτεασών Σερίνης που χαρακτηρίζονται ως «Κυτταρολυτικές Πρωτεάσες» .
5. Έκκρισης Αργινάσης και άλλων ενζύμων .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα ασκούν κυτταροτοξική δραστηριότητα και με την παραγωγή και έκκριση άλλων ουσιών , όπως για παράδειγμα οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου (O_2^{-1} , H_2O_2 , OH^{\cdot}) και τα Αλογονίδια (OI^{-1} , OCl^{-1} , OBr^{-1}) , το Νιτρικό Οξείδιο και το Υπεροξειονιτρικό Ανιόν . Από αυτές τις ουσίες ορισμένες προσβάλλουν τις κυτταρικές μεμβράνες ή δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου-στόχου , άλλες καταστρέφουν τα μιτοχονδριακά του ένζυμα (όπως π.χ. το Νιτρικό Οξείδιο καταστρέφει την Ακονιτάση) και άλλες επιδρούν στα νουκλεϊκά οξέα του πυρήνα (όπως το H_2O_2 που καταστρέφει τις διπλές έλικες DNA) . Τα μονοκύτταρα διαθέτουν και το λυσοσωματικό ένζυμο Μυελο-υπεροξειδάση με αποτέλεσμα να παράγουν και υποχλωρίτη ($HOCl$) . Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων κατά την διάρκεια αντιδράσεων ADCC γίνεται κυρίως μέσω των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου .

Τα ενεργοποιημένα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν την κυτταροκίνη TNFα που έχει υψηλή βιοδραστικότητα . Ο TNFα συνδέεται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των καρκινικών κυττάρων και μέσω της διέγερσης της PKC προκαλεί τον θάνατό τους ή την αναστολή της αύξησης και του πολλαπλασιασμού τους . Επίσης όταν ο TNFα δρα σε συνδυασμό με την INFα

ασκεί ισχυρές κυτταροστατικές επιδράσεις . Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι μια μορφή του TNF α παραμένει ενωμένη με την κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων και έτσι προκαλεί την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που έρχονται σε άμεση επαφή με τα μακροφάγα .

Η έκκριση IL-1 από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συνεισφέρει σημαντικά στην αντιμετώπιση των νεοπλασιών . επειδή η κυτταροκίνη αυτή : α) επαυξάνει την ικανότητα των NK-κυττάρων να συνδέονται με τα καρκινικά κύτταρα για να τα καταστρέψουν , β) επιτείνει την δραστηριότητα της IL-2 στην δημιουργία LAK-κυττάρων (Lymphokine Activated Killer cells) και στον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων , γ) αποτελεί χημειοτακτικό διεγέρτη των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων , οδηγώντας στην διήθηση των νεοπλασμάτων από αυτά . Η διέγερση των T-λεμφοκυττάρων με IL-1 είναι απαραίτητη μετά από την παρουσίαση αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων από τα μακροφάγα .

Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα κατά των νεοπλασματικών κυττάρων χωρίς κάποια εξωγενή διέγερση . Είναι πιθανό ότι αυτή η "αυτόματη" κυτταροτοξικότητα των μονοκυττάρων οφείλεται στην συνεχή έκθεσή τους σε μικροβιακά προϊόντα (LPS , MDP , κ.λ.π.) ή κυτταροκίνες (INF γ , IL-2 , TNF α , κ.α.) που επάγουν την αντισπλασματική δραστηριότητά τους . Τα ανθρώπινα περιτοναϊκά μακροφάγα είναι ικανά να αναπτύξουν σημαντική κυτταροτοξική δραστηριότητα όταν διεγερθούν εξωγενώς . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα από υγιείς ανθρώπους παρουσιάζουν ελάχιστη κυτταροτοξικότητα αλλά σημαντική κυτταροστατική δράση . Αν όμως διεγερθούν με κυτταροκίνες ή ενδοτοξίνη θα αναπτύξουν και κυτταροτοξικότητα .

Είναι φανερό ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα διαθέτουν πολλούς και ισχυρούς μηχανισμούς για την αντιμετώπιση των νεοπλασμάτων . Όμως παρά το ότι τα συμπαγή νεοπλάσματα διηθούνται από πολύ νωρίς με μεγάλους πληθυσμούς μακροφάγων , συχνά δεν εμφανίζεται περιορισμός τους . Σε παθολογοανατομικά παρασκευάσματα διαπιστώνουμε την ύπαρξη πολυάριθμων μακροφάγων (TAM , Tumor Associated Macrophages) που διηθούν το νεόπλασμα χωρίς να φαίνεται ότι ασκούν κυτταροτοξικές ή κυτταροστατικές επιδράσεις . Ορισμένοι ερευνητές διατυπώνουν την άποψη ότι αυτά τα μακροφάγα επιτείνουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με την έκκριση Αυξητικών Παραγόντων που ευοδώνουν την αύξησή τους και ευνοούν την νεοαγγειογένεση , αλλά και με την καταστολή της λειτουργίας των NK-κυττάρων και των λεμφοκυττάρων . Αυτό συμβαίνει επειδή τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν ουσίες που εξουδετερώνουν τους αντισπλασματικούς μηχανισμούς των μακροφάγων ενώ ταυτόχρονα διατηρούν τους ευοδωτικούς μηχανισμούς (π.χ. έκκριση Αυξητικών Παραγόντων) .

Οι πολυάριθμοι μηχανισμοί με τους οποίους τα μακροφάγα μπορούν να αντιμετωπίσουν τα νεοπλασματικά κύτταρα έκαναν πολλούς ερευνητές να αναζητήσουν μεθόδους ενεργοποίησης των μακροφάγων TAM , με σκοπό την επαναφορά της κυτταροτοξικής τους δράσης . Μεταξύ των μεθόδων που δοκιμάστηκαν περιλαμβάνονται η παρεντερική χορήγηση κυτταροκινών (INF- α , INF- γ , GM-CSF , TNF α) και η παρεντερική χορήγηση Μουραμυλ-Διπεπτιδίων (MDP , MTP-PE) ή κυτταροκινών ή CRP εγκλεισμένων μέσα σε λιποσώματα . (Fidler, 1985 , Deodhar και Barna, 1986) .



Κεφάλαιο 2-3 . Ο ρόλος του μακροφάγου στην φλεγμονώδη αντίδραση και στην ανοσολογική απόκριση .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι οι φορείς της πρωτογενούς άμυνας του οργανισμού κατά των λοιμώξεων και των νεοπλασιών . Όμως η αμυντική τους ικανότητα είναι εξαιρετικά ευρεία . Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα συμμετέχουν τόσο σε ευρείες και μη-ειδικές κατά οποιουδήποτε βλαπτικού παράγοντα φυσικής , χημικής ή βιολογικής προέλευσης (δηλαδή στην φλεγμονώδη αντίδραση) όσο και σε εξαιρετικά εξειδικευμένες αντιδράσεις κατά ενός αντιγονικού ή αλλεργιογόνου παράγοντα (δηλαδή στην ανοσολογική αντίδραση) . Η συμμετοχή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην ανοσολογική αντίδραση προϋποθέτει την χρήση όλων των ιδιοτήτων που εξυπηρετούν την φλεγμονώδη αντίδραση , καθώς επιπλέον και άλλες δύο ιδιότητες : α) την επεξεργασία και την παρουσίαση αντιγόνου στα Τ-Λεμφοκύτταρα και β) την έκκριση κυτταροκινών που ενεργοποιούν τα Τ-Λεμφοκύτταρα . (Cline, 1978 , Johnston, 1988) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΑΣ ΦΑΣΗΣ .

Η Αντίδραση Οξείας Φάσης αφορά στην παραγωγή και έκκριση στην κυκλοφορία των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης ως αρχική αντίδραση στο τραύμα , στην λοίμωξη , στην νεοπλασία ή στην ανοσολογική διαταραχή . Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη πυρετού , ταχυκαρδίας , καταπληξίας και στην αυξημένη κυκλοφορία ορισμένων πρωτεϊνών στο αίμα , όπως η C-Αντιδρώσα Πρωτεΐνη (CRP) , το Α-Αμυλοειδές του ορού και το Ινωδογόνο . Η κύρια πηγή παραγωγής αυτών των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης είναι το ήπαρ . Η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών από τα κύτταρα του ήπατος ρυθμίζεται από κυτταροκίνες που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα στην φλεγμονώδη εστία . Συγκεκριμένα , τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε αυτή την ρύθμιση επειδή εκκρίνουν TNF α , IL-1 και IL-6 . Η IL-1 δρα στο θερμορυθμιστικό κέντρο του υποθαλάμου και προάγει την έκκριση της PGE $_2$, οδηγώντας έτσι στην εκδήλωση του πυρετού . Η IL-1 σε συνδυασμό με την TNF α προκαλεί αυξημένο καταβολισμό των πρωτεϊνών των γραμμωτών μυών και αρνητικό ισοζύγιο αζώτου , με αποτέλεσμα την μυαλγία και την απώλεια της μυϊκής ισχύος που συνοδεύουν την οξεία λοίμωξη και την νεοπλασία . Η IL-6 και ο TNF α διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση των καταβολικών δραστηριοτήτων στα ηπατοκύτταρα οι οποίες θα οδηγήσουν ενδεχομένως στην ανάπτυξη του Συνδρόμου Καρκινικής Καχεξίας , δηλαδή την αυξημένη σύνθεση των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης και την μειωμένη σύνθεση όλων των υπόλοιπων πρωτεϊνών . Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με νεοπλασίες του παχέος εντέρου υπάρχει αυξημένη παραγωγή της IL-6 , η οποία προκαλεί αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες (IL-1 , IL-6 και TNF α) που προκαλούν την παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από τα ηπατοκύτταρα και ταυτοχρόνως ορισμένα προϊόντα της Αντίδρασης Οξείας Φάσης επηρεάζουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα . Ένα παράδειγμα αποτελεί το Ινωδογόνο . Η πέψη του Ινωδογόνου από την Πλασμίνη οδηγεί στην δημιουργία δύο πεπτιδίων που ονομάζονται Ινωδοπεπτιδία D και E . Τα πεπτιδία αυτά επιδρούν στα μονοκύτταρα προκαλώντας καταστολή της παραγωγής IL-6 . Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα ίδια τα

μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν ορισμένες πρωτεΐνες Οξεία Φάσης , όπως για παράδειγμα τον Αναστολέα της α1-Πρωτεάσης , την Τρανσφερρίνη , τους Παράγοντες του Συμπληρώματος C3 και C4 και τον Παράγοντα Β . (Sigal και Ron, 1994) .

ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ Η ΟΞΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συνήθως είναι από τα πρώτα αμυντικά κύτταρα του σώματος που θα αντιμετωπίσουν έναν εξωγενή βλαπτικό παράγοντα . Αυτός ο παράγοντας μπορεί να είναι κάποιος μικροοργανισμός , ανόργανη ύλη (πυρίτιο , αμίαντος κ.α.) ή τέλος το αποτέλεσμα χημικών ή μηχανικών ή θερμικών επιδράσεων στους ιστούς . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αντιδρούν με ένα στερεότυπο τρόπο ανεξάρτητα από την μορφή αυτού του εξωγενούς παράγοντα , με σκοπό την απομάκρυνση του βλαπτικού παράγοντα και των κατεστραμμένων ιστών και την αποκατάσταση της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του ιστού (ομοιοστασίας) . Αυτή η στερεότυπη αντίδραση στην οποία συμμετέχουν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ονομάζεται Οξεία Φλεγμονώδης Αντίδραση . Στην Οξεία Φλεγμονή συμμετέχουν επίσης τα ουδετερόφιλα φαγοκύτταρα , τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδικών αγγείων , τα αιμοπετάλια , οι ινοβλάστες και σε μικρότερο βαθμό τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα φαγοκύτταρα . Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα συνεργάζονται με τα κύτταρα αυτά ή συμπληρώνουν την δράση τους . Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα μεταναστεύουν χημειοτακτικά προς τις εστίες της φλεγμονής , διεγείρομενα από ουσίες όπως ο C5a , η θρομβίνη , η καλλικρεΐνη , ο PAF , ο PDGF , ο TGFβ , η β-θρομβοσφαιρίνη , τα N-φορмуλιωμένα πεπτιδία των μικροβίων , τα προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου και η ινωδονεκτίνη .

Ο συνηθέστερος ρόλος τον οποίο διαδραματίζουν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα στην εστία της φλεγμονής είναι της φαγοκυττάρωσης και καταστροφής του βλαπτικού παράγοντα και στην συνέχεια της απομάκρυνσης των υπολειμμάτων της αντίδρασης . Για την απομάκρυνση μικροβίων , ξένων σωμάτων , κατεστραμμένων ιστών (συνδετικού , επιθηλιακού , κλπ) , νεκρών φαγοκυττάρων και υπολειμμάτων αιμορραγιών ή εξιδρωμάτων , τα μακροφάγα χρησιμοποιούν την φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρια καταστροφή τους . Αυτή επιτυγχάνεται με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ , ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ Ή ΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

1. Φαγοκυττάρωση και αύξηση του pH του ενδοσώματος .
2. Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου και Αζώτου (O_2^{-1} , H_2O_2 , OH^{\cdot} , NO^{\cdot} , NO_3^{-2}) .
3. Υποχλωρίτης (μόνο στα μονοκύτταρα , τα οποία διαθέτουν Μυελο-υπεροξειδάση) .
4. Ουδέτερες Πρωτεάσες (Πρωτεάσες Σερίνης , Μεταλλοπρωτεάσες κ.λ.π.) .
5. Ώξινες Λυσοσωματικές Υδρολάσες .
6. Λυσοζύμη και Κατιονικές Πρωτεΐνες (Ντεφενσίνες , BPI-Πρωτεΐνη κ.λ.π.) .

Όμως τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν ορισμένους από τους μηχανισμούς αυτούς και για την καταστροφή μικροοργανισμών και νεοπλασματικών κυττάρων έξω από το φαγοκύτταρο , χωρίς να προηγηθεί η φαγοκυττάρωσή τους . Με αυτόν τον τρόπο τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αναλαμβάνουν την πρώτη γραμμή προστασίας των ιστών από μικρόβια και νεοπλασίες . Όμως αν παραταθεί η Φλεγμονώδης αντίδραση για αρκετό χρόνο ή αν επεκταθεί πέρα από την πρώτη γραμμή άμυνας στον αγγειακό χώρο , τότε τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αναλαμβάνουν την μετατροπή της σε Ανοσολογική αντίδραση , παρουσιάζοντας τα φαγοκυτταρωμένα αντιγονικά στοιχεία

των μικροβίων ή των καρκινικών κυττάρων στα λεμφοκύτταρα . Η φαγοκυττάρωση και η παρουσίαση αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα είναι ίσως οι σπουδαιότεροι μηχανισμοί με τους οποίους τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις .

Επίσης τα μακροφάγα συμμετέχουν στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση και μέσω των εκκριτικών τους ιδιοτήτων . Για παράδειγμα μέσω της παραγωγής IL-1 προκαλείται πολλαπλασιασμός και ενεργοποίηση των ινοβλαστών και των λεμφοκυττάρων , διήθηση των ιστών από ουδετερόφιλα φαγοκύτταρα , πυρετός λόγω παραγωγής PGE₂ στον υποθάλαμο και τέλος επίταση της έκκρισης των Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από τα ήπατοκύτταρα . Μέσω της παραγωγής IL-6 από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αυξάνεται η παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα , ενώ αποτελεί το κύριο ερέθισμα για την παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης από το ήπαρ . Ο παράγοντας TNF προκαλεί τις απαραίτητες καταβολικές αντιδράσεις για την εξοικονόμηση ενέργειας για την φλεγμονώδη αντίδραση (γλυκογονόλυση , λιπόλυση κ.λ.π) και ταυτοχρόνως προκαλεί πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών , παραγωγή κυτταροκινών από το ήπαρ και τέλος αυξάνει την φαγοκυτταρική δραστηριότητα των ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων . Τα μονοκύτταρα και μακροφάγα συνθέτουν και Παράγοντες Πήξης (Παράγοντες IX, X, V, VII, Προθρομβίνη και Ιστικό Παράγοντα) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην θρόμβωση των αγγείων της φλεγμονώδους ή τραυματικής εστίας . Επίσης τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν πρωτεΐνες του Συμπληρώματος (C1 - C5, Προπερδίνη, Παράγοντες Β και D) που χρησιμεύουν στην οψωνοποίηση ξένων σωμάτων , στην λύση ορισμένων μικροβίων και στην διέγερση της χημειοταξίας των φαγοκυττάρων . Η οψωνοποίηση γίνεται κυρίως από τους παράγοντες C3b και C3bi ενώ τα οψωνοποιημένα σωμάτια αναγνωρίζονται από τους CR1-υποδοχείς των φαγοκυττάρων . Η λύση των μικροοργανισμών και κυττάρων-στόχων γίνεται από τα συμπλέγματα MAC (Membrane Attack Complexes) που σχηματίζονται από τον πολυμερισμό των παραγόντων C9 και C5b678 , ενώ η χημειοταξία προκαλείται από τους παράγοντες C3a και C5a . Οι παράγοντες C3a και C5a ονομάζονται αναφυλατοξίνες επειδή εκτός από την χημειοταξία των φαγοκυττάρων προκαλούν και αποκοκκίωση (degranulation) των μαστοκυττάρων και βασεόφιλων , με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ισταμίνης και σεροτονίνης . Η χημειοτακτική μετανάστευση των φαγοκυττάρων σχετίζεται και με ένα άλλο προϊόν των μακροφάγων , την Ινωδονεκτίνη . Τέλος πολύ σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση διαδραματίζει και η παραγωγή διαφόρων εικοσανοειδών (Προσταγλανδινών , Λευκοτριενίων και Θρομβοξανίων) από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα . Τα εικοσανοειδή είναι κύριοι διαμεσολαβητές πολλών φλεγμονωδών φαινομένων , όπως π.χ. τα αγγειοκινητικά φαινόμενα . Η PGI₂ προκαλεί έντονη αγγειοδιαστολή και αναστέλλει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και την θρόμβωση , ενώ η TXA₂ δρα αντίθετα και προκαλεί συγκόλληση των αιμοπεταλίων και αγγειοσύσπαση . Η PGD₂ προκαλεί αγγειοσύσπαση και αναστολή της θρόμβωσης , η PGE₂ είναι ισχυρός αγγειοδιαστολέας και χημικός διαμεσολαβητής του πόνου και του πυρετού με ταυτόχρονη έντονη κατασταλτική επίδραση στα φλεγμονώδη και ανοσολογικά φαινόμενα . Η LTB₄ ενεργοποιεί τα ανθρώπινα μονοκύτταρα , ουδετερόφιλα και NK-κύτταρα ενώ οι LTC₄, LTD₄ και LTE₄ προκαλούν αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα . Τέλος τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και ιδίως τα διεγερμένα μακροφάγα είναι ικανά να παράγουν και εκκρίνουν τον Ενεργοποιητή των Αιμοπεταλίων (PAF) . Ο PAF έχει πολλές και σημαντικές λειτουργίες στην φλεγμονώδη και ανοσολογική αντίδραση . Μεταξύ αυτών οι σημαντικότερες είναι : 1. Η ενεργοποίηση

και συγκόλληση των αιμοπεταλίων , 2. Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων για χημειοταξία και διαπίδυση στους ιστούς και για παραγωγή Οξινων Λυσοσωματικών Υδρολασών και Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , 3. Η δημιουργία εξιδρωμάτων λόγω αγγειόσπασμου και αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας , 4. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων . Από τα παραπάνω στοιχεία γίνεται εύκολα αντιληπτή η μεγάλη σημασία της έκκρισης PAF από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα . (Sigal και Ron, 1994)

ΒΛΑΠΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συμμετέχουν και άμεσα και έμμεσα στην παθοφυσιολογία της φλεγμονώδους αντίδρασης . Αυτό δεν είναι πάντοτε ωφέλιμο για τον οργανισμό . Ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η φλεγμονώδης αντίδραση του πνεύμονα μετά από ενδοτοξιναιμία . Επειδή τα μακροφάγα του πνεύμονα ενεργοποιούνται από την ενδοτοξίνη που κυκλοφορεί στο αίμα κατά την διάρκεια της ενδοτοξιναιμίας , σηπαιμίας και σηπτικής καταπληξίας , παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερη φαγοκυτταρική και χημειοτακτική δραστηριότητα και παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , TNFα και Λυσοσωματικών Ενζύμων . Αυτή η αντίδραση συχνά γίνεται υπερβολική και οδηγεί στην ανάπτυξη παρεγχυματικής βλάβης στον πνεύμονα και τελικά αναπνευστικής ανεπάρκειας (Wizemann και Laskin, 1994 , Sigal και Ron, 1994) . Κατά παρόμοιο τρόπο τα μονοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί συχνά ασκούν κυτταροτοξικές επιδράσεις σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Peri και συν., 1990) και τα κύτταρα Kupffer που ενεργοποιήθηκαν ασκούν βλαπτικές επιδράσεις στο ήπαρ (Winwood και Arthur, 1993) . Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι σε παρατεταμένες φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές αντιδράσεις , όπως π.χ. σε νεοπλασίες ή σε χρόνιες λοιμώξεις , η παρατεταμένη παραγωγή TNFα από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα οδηγεί στην απώλεια βάρους και μυϊκής μάζας και στην εμφάνιση κακουχίας , αδυναμίας και καχεξίας που οδηγούν προοδευτικά στον θάνατο . Οι επιδράσεις αυτές έδωσαν στον TNFα την ονομασία Καχεκτίνη (Cachectin) . (Sherry και Cerami, 1988)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Μετά την παρέλευση της Οξείας Φάσης μιας φλεγμονώδους αντίδρασης υπάρχει προοδευτική αντικατάσταση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων) από μονοκύτταρα , λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα . Έτσι ενώ στην αρχή οι ιστοί διηθούνται κυρίως από πολυμορφοπύρηννα , μετά από τις πρώτες 48 ώρες το κυρίαρχο κυτταρικό στοιχείο είναι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα . Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι τα μακροφάγα μεταναστεύουν στους ιστούς βραδύτερα από τα ουδετερόφιλα , έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στην φλεγμονώδη εστία και τέλος ότι τα χημειοτακτικά τους ερεθίσματα είναι συνήθως προϊόντα της δράσης των ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων . Αυτή η αλλαγή της σύστασης του κυτταρικού πληθυσμού που διηθεί την εστία της φλεγμονής οριοθετεί την αρχή της ανάπτυξης χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης .

Σκοπός της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης είναι να περιοριστεί η εξάπλωση της βλάβης και απαλειφθεί το αίτιο της φλεγμονής . Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα που διηθούν την φλεγμονώδη εστία διαδραματίζουν τριπλό ρόλο :

1. Καθαρίζουν την εστία από τα υπολείμματα των εξιδρωμάτων , τα νεκρωτικά ιστικά στοιχεία καθώς και τα κατεστραμμένα μικρόβια και τα νεκρά ουδετερόφιλα .



2. Ρυθμίζουν την ένταση , την διάρκεια και την πορεία της ανοσολογικής αντίδρασης των λεμφοκυττάρων μέσω της παρουσίασης αντιγόνου και της έκκρισης κυτταροκινών (TNFα , IL-1 , IL-6 , TGFβ , κ.α.π) και προσταγλανδίνης PGE2 .

3. Ελέγχουν την πορεία της διαδικασίας ιστικής εππούλωσης , μέσω έκκρισης κυτταροκινών που επηρεάζουν την λειτουργία των ινοβλαστών και άλλων παρεγχυματικών κυττάρων .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν Πρωτεάσες και Υδρολάσες , οι οποίες διασπούν την θεμέλια ουσία του συνδετικού ιστού της φλεγμονώδους εστίας για να επιτύχουν πληρέστερη απομάκρυνσή του . Ταυτόχρονα φαγοκυτταρώνουν τα υπολείμματα των φλεγμονωδών αντιδράσεων και τους μικροοργανισμούς που παρέμειναν στην εστία . Ανάλογα με το είδος των κυτταροκινών και των άλλων χημικών διαμεσολαβητών της φλεγμονής που εκκρίνουν , καθορίζουν αν η εξέλιξη θα είναι προς την ομαλή εππούλωση ή την υπερβολική εππούλωση (π.χ. ινώδεις ταινίες ή χηλοειδή) ή τέλος προς την Αντίδραση Υπερευαισθησίας Επιβραδυνόμενου Τύπου (Delayed-type Hypersensitivity Reaction) με συμμετοχή των λεμφοκυττάρων . Συχνά τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αντικαθιστούν τα λεμφοκύτταρα στην φλεγμονώδη εστία και συμμετέχουν στην δημιουργία μεγάλων κοκκιωμάτων , δηλαδή των χαρακτηριστικών σχηματισμών μιας ειδικής χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης που ονομάζεται Κοκκιωματώδης Φλεγμονή .

Η συνεχής συσσώρευση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε μία εστία χρόνιας φλεγμονής επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους . 1. Συνεχής προσέλευση νέων μονοκυττάρων από την κυκλοφορία , τα οποία ακολουθούν χημειοτακτικά ερεθίσματα όπως τα προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου και της Ινωδονεκτίνης , την Θρομβίνη , τον παράγοντα C5a , τις Ουδετεροφιλικές Κατιονικές Πρωτεΐνες και πολλές κυτταροκίνες . 2. In situ πολλαπλασιασμός των μονοκυττάρων με μιτωτική διαίρεση . 3. Καθήλωση των μακροφάγων στην φλεγμονώδη εστία με αυξημένη επιβίωση .

Μια από τις πιο σημαντικές για την χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση κυτταροκίνες είναι ο TGFβ (Transforming Growth Factor-β) που προκαλεί την αυτοκρινική και παρακρινική ενεργοποίηση των μακροφάγων , την καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων , την χημειοτακτική κίνηση ινοβλαστών προς την φλεγμονώδη εστία , την διέγερση των ινοβλαστών για σύνθεση ινωδονεκτίνης , κολλαγόνου και άλλων συστατικών της θεμέλιας ουσίας του συνδετικού ιστού και τέλος την γένεση νέων αγγείων στους ιστούς που σχηματίζονται .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΚΟΚΚΙΩΜΑΤΩΔΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΕΣ .

Κοκκίωμα ονομάζεται ο οργανωμένος ιστολογικός σχηματισμός που παρατηρείται σε εστίες χρόνιας φλεγμονής και αποτελείται από μια συσσώρευση μονοπύρηνων φαγοκυττάρων που περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα . Τα φαγοκύτταρα που παρατηρούνται σε ένα κοκκίωμα είναι κυρίως Επιθηλιοειδή κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα που διήθησαν την φλεγμονώδη εστία και μακροφάγα , αλλά ορισμένες φορές υπάρχουν και Γιγαντοκύτταρα . Τα κοκκιώματα σχηματίζονται σε φλεγμονώδεις εστίες που είτε περιβάλλουν υλικά μη-απορροφήσιμα (θραύσματα ύαλου , νάιλον ράβματα , πυρίτιο , ταλκ) ή περιέχουν μικροοργανισμούς που προκαλούν αντιδράσεις κυτταρικής υπερευαισθησίας (Mycobacteria , Brucella , Histoplasma κ.λ.π.) . Η δημιουργία κοκκιωμάτων περιορίζει την φλεγμονώδη εστία , εμποδίζει την διασπορά της σε παρακείμενους ιστούς και τέλος επιτρέπει την καλύτερη παρουσίαση αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα . Ένα παράδειγμα

αποτελεί η Φυματώδης Λέπτρα , όπου τα κοκκιώματα περιέχουν πολυάριθμα CD4(+) T-λεμφοκύτταρα που αλληλεπιδρούν με τα μακροφάγα του κοκκιώματος . Έτσι και τα μακροφάγα ενεργοποιούνται από την INF γ των λεμφοκυττάρων και τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και καταστρέφουν με ευκολία τα μυκοβακτηρίδια . Επίσης τα μακροφάγα ορισμένων κοκκιωμάτων εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IL-1 και άλλων κυτταροκινών που ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα στα οποία έχει παρουσιαστεί αντιγόνο , ενώ σε άλλα κοκκιώματα τα μακροφάγα εκκρίνουν PGE $_2$, INF α και INF β , ουσίες που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων . (Adams, 1976 , Zembala και Asherson, 1989) .

Η δραστηριότητα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μιας εστίας κοκκιωμάτους φλεγμονής επίσης προκαλεί ιστική βλάβη και ίνωση στις περιοχές που περιβάλλουν την εστία . Όμως αυτές οι διεργασίες άλλοτε συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη περιχαράκωση του αιτίου της αντίδρασης και άλλοτε οδηγούν στην ταχύτερη διασπορά της νόσου ή στην καταστροφή της λειτουργικότητας του οργάνου όπου εντοπίζεται η φλεγμονή . (Adams, 1976)

Η ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Μια από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι η ικανότητά τους να παρουσιάζουν αντιγόνα (antigen presentation) στα T- και B-λεμφοκύτταρα . Μεταξύ των ειδών των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην αντιγονοπαρουσιαστική τους δραστηριότητα . Έτσι τα κύτταρα Langerhans , τα δενδριτικά κύτταρα , τα μακροφάγα του ομφάλιου λώρου και τα μονοκύτταρα του αίματος είναι πολύ αποτελεσματικά στην παρουσίαση αντιγόνου , ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν ελάχιστη τέτοια δραστηριότητα και τα περιτοναϊκά μακροφάγα έχουν μέτρια δραστηριότητα , όπως και τα μακροφάγα του φθαρτού και τα μικρογλοιακά κύτταρα . Τα μακροφάγα που εκτίθενται σε INF γ , INF α_2 ή LPS παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου , λόγω της ενεργοποίησής τους .

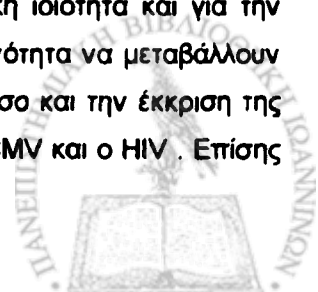
Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συμμετέχουν ενεργητικά στις δραστηριότητες παρουσίασης αντιγόνου στα λεμφοκύτταρα , οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές αφού ούτε τα βοηθητικά ούτε τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα από μόνα τους . Η διαδικασία της παρουσίασης αντιγόνων περιλαμβάνει τις επιμέρους διεργασίες αναγνώρισης και ενδοκύτωσης του αντιγόνου , επεξεργασίας του , σύνδεσης με μόρια MHC-II και παρουσίασής του στα CD4 και CD8 λεμφοκύτταρα . Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα ενδοκυττώνουν τα ογκώδη αντιγονικά μόρια και τα επεξεργάζονται μέσα στα ενδοσώματα . Στην συνέχεια εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα μόρια (πεπτιδία) που θα δημιουργήσουν ανοσολογική αντίδραση , συνδεδεμένα με μόρια MHC-II (HLA-D) του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας . Τα βοηθητικά CD4 T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα που θα τους παρουσιαστούν μαζί με μόρια MHC-II (HLA-D) και ενεργοποιούνται , με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους και την ταυτόχρονη έκκριση INF γ . Η INF γ προκαλεί την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και οδηγεί στην έκκριση IL-1 . Η κυτταροκίνη αυτή διεγείρει την έκκριση IL-2 από τα T-λεμφοκύτταρα αλλά και την ταυτόχρονη έκφραση του υποδοχέα IL-2R στην επιφάνειά τους , οδηγώντας έτσι στην αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων . Επίσης τα T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IL-4 και IL-6 που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων . (Unanue και Allen, 1987 , Sigal και Ron, 1994)



Υπάρχουν και άλλα είδη κυττάρων εκτός από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα που εκφράζουν μόρια MHC-II στην επιφάνειά τους και είναι ικανά να παρουσιάσουν αντιγόνα . Αυτά περιλαμβάνουν τα Β-λεμφοκύτταρα , τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου . Τα Β-λεμφοκύτταρα επίσης αναγνωρίζουν αντιγόνα χωρίς αυτά να τους παρουσιαστούν από κάποιο άλλο κύτταρο . Όμως τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα , εκτός από την έκκριση των IL-1 και TNF α που είναι απαραίτητα για την διέγερση των Β-λεμφοκυττάρων , είναι ικανά να παρουσιάσουν το ίδιο αντιγόνο και σε Τ- και σε Β-λεμφοκύτταρα , με αποτέλεσμα την συντονισμένη ανάπτυξη ανοσολογικής αντίδρασης .

Η επεξεργασία των αντιγόνων και η σύνδεσή τους με τα μόρια MHC-II (HLA-D) στην επιφάνεια των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία . Κατά την επαφή των κυττάρων αυτών με κάποιο αντιγόνο (είτε με την μορφή ενός μεμονωμένου μορίου ή στην επιφάνεια ενός μικροοργανισμού) ένα τμήμα της μεμβράνης του φαγοκυττάρου μετατρέπεται σε εισολκή . Η εισολκή αυτή μεγαλώνει , δημιουργεί μία κοιλότητα που περικλείει το αντιγόνο και μετατρέπεται σε ενδόσωμα που εσωτερικεύει αυτό το μόριο . Μαζί με το αντιγονικό μόριο εσωτερικεύονται και τα μόρια MHC-II που εκφράζονται στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου . Υπό την επίδραση Πρωτεασών (Ουδέτερων Πρωτεασών , Λυσοσωματικών Πρωτεασών Κυστεΐνης , Πρωτεασών Ασπαρτικού οξέος , Πρωτεασών Θειολών κ.α.) και της ταυτόχρονης όξινσης του pH του ενδοσώματος από μία Αντλία Πρωτονίων , τα μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια υφίστανται αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών τους , κατακερματισμό και αποδιάταξη της στερεοδομής των τμημάτων τους (unfolding) , με αποτέλεσμα την δημιουργία ολιγοπεπτιδίων (μήκους 8 ως 12 αμινοξέων) τα οποία συνδέονται με τα μόρια MHC-II . Στην συνέχεια το ενδόσωμα μεταφέρεται πάλι στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου (Endosome Recycling) , όπου τα αντιγονικά ολιγοπεπτιδία εκφράζονται μαζί με τα μόρια MHC-II . Η διάρκεια της διαδικασίας επεξεργασίας των αντιγόνων μπορεί να είναι από μία ως πολλές ώρες , που εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων ή των σωματιδίων που πρέπει να υποστούν πρωτεόλυση . Μία πολύ ενδιαφέρουσα λεπτομέρεια αποτελεί το ότι αναλόγως αν τα αντιγονικά πεπτιδία ενωθούν με μόρια HLA-DR ή HLA-DQ μπορεί να προκληθούν δύο αντίθετες μεταξύ τους επιδράσεις στην ανοσολογική αντίδραση , όπως ο πολλαπλασιασμός βοηθητικών ή κατασταλτικών Τ-λεμφοκυττάρων . Μια άλλη ενδιαφέρουσα εκδοχή είναι ότι τα μόρια MHC-II που συνυπάρχουν με το αντιγόνο στο ενδόσωμα κατά την φάση επεξεργασίας του πιθανώς να το προστατεύουν από την πλήρη πρωτεόλυση . (Uhanue και Allen, 1987 , Nicod, 1996) .

Τα αντιγόνα των ιών παρουσιάζονται μέσω μιας άλλης διαδικασίας . Συγκεκριμένα τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς εκφράζουν το γονιδιακό υλικό των ιών και τα ριβοσώματά τους συνθέτουν τις πρωτεΐνες των ιών . Οι πρωτεΐνες αυτές υφίστανται μερική πρωτεόλυση και συνδέονται σε μόρια MHC-I , μαζί με τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων . Τα κύτταρα εκείνα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες των ιών μαζί με μόρια MHC-I αποτελούν στόχους για τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και έτσι καταστρέφονται οι δεξαμενές πολλαπλασιασμού των ιών . Η παρουσίαση αντιγόνου είναι πολύ σημαντική ιδιότητα και για την ανάπτυξη ανοσίας κατά των ιογενών λοιμώξεων . Όμως οι ιοί έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τόσο την έκφραση των αντιγόνων MHC στην επιφάνεια των μακροφάγων , όσο και την έκκριση της IL-1 και των άλλων κυτταροκινών . Αυτό συμβαίνει με πολλούς ιούς όπως ο CMV και ο HIV . Επίσης



είναι δυνατόν κατά την παρουσίαση του αντιγόνου τα μακροφάγα να μολύνουν τα λεμφοκύτταρα με τον ιό . Επίσης τα μακροφάγα που ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα με την έκκριση IL-1 προκαλούν την έκφραση του γονιδιώματος και τον πολλαπλασιασμό του ιού μέσα στον πυρήνα του λεμφοκυττάρου . (Zembala και Asherson, 1989) .

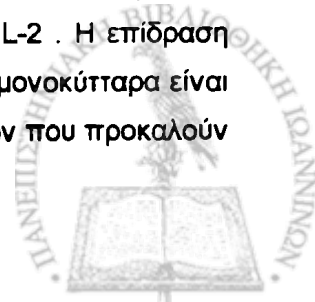
Η ικανότητα επεξεργασίας και σύνδεσης ενός αντιγόνου με μόρια MHC-II δεν αρκεί για να προκληθεί ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων . Τα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , αν και εκφράζουν HLA-DR και HLA-DQ , δεν ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα στα οποία παρουσιάζουν τα αντιγόνα . Αυτό οφείλεται στην χαμηλή έκκριση IL-1 , στην έκκριση του αναστολέα IL-1RA και τέλος στην έκκριση PGE₂ . (Nicod , 1996) .

Η ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (IMMUNOREGULATION) .

Τα μονοκύτταρα του αίματος ασκούν και ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις , οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τον οργανισμό . Αυτές αφορούν συνήθως στην καταστολή σκελών του ανοσοποιητικού συστήματος και μπορούν να είναι είτε άμεσες ή έμμεσες (όταν τα μονοκύτταρα διεγείρουν άλλα κύτταρα που ασκούν τις κατασταλτικές επιδράσεις) . Ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις ασκούν και άλλα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα , που όμως δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς . Για τα μονοκύτταρα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πολλοί πληθυσμοί , ανάλογα με το αν εκφράζουν τους υποδοχείς FcR- και CR- και τα μόρια MHC-II , που έχουν διαφορετικές ανοσορρυθμιστικές δραστηριότητες . Επίσης είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων μεταβάλλει αυτές τους τις δραστηριότητες . (Zembala και Asherson, 1989) .

ΑΜΕΣΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ . Τα μονοκύτταρα εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες των προσταγλανδινών PGE₁ και PGE₂ , οι οποίες ασκούν κατασταλτικές επιδράσεις στα λεμφοκύτταρα μέσω διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξησης του Κυκλικού AMP . Ειδικά η PGE₂ , η οποία εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα , έχει αυτοκρινική και παρακρινική κατασταλτική δράση τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα ίδια τα μακροφάγα . Όμως τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν και μικρές ποσότητες νοραδρεναλίνης , η οποία επίσης δρα με αυτοκρινικό τρόπο και προκαλεί διέγερση ή καταστολή παρακείμενων μακροφάγων ανάλογα με την σύνδεσή της σε α2- ή β2-αδρενεργικούς υποδοχείς . Επίσης τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα εκκρίνουν πολλές κυτταροκίνες (TNFα , IL-1 , IL-3 , IL-6 κ.λ.π) οι οποίες ασκούν διεγερτικές ή κατασταλτικές επιδράσεις στα λεμφοκύτταρα και στα NK-κύτταρα . Εκτός από τις ήδη γνωστές κυτταροκίνες έχουν ανακαλυφθεί και άλλες μονοκίνες που ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί , αλλά η ανοσορρυθμιστική τους δράση περιγράφεται με τον γενικό όρο SIRS (soluble immune response suppressor) .

ΕΜΜΕΣΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ . Τα μονοκύτταρα συμμετέχουν άμεσα στην δημιουργία κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων (suppressor T-cells) . Ιδιαίτερα τα μονοκύτταρα που διαθέτουν FcγR-υποδοχείς είναι απαραίτητα για την δημιουργία πληθυσμού κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων τα οποία αναστέλλουν την παραγωγή ανοσοσφαιρινών , τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων που έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνα και τέλος την έκκριση IL-2 . Η επίδραση αυτή των μονοκυττάρων διαμεσολαβείται από μονοκίνες και προσταγλανδίνες . Τα μονοκύτταρα είναι πιθανό ότι συμμετέχουν και στην δημιουργία κυτταροτοξικών CD4(+) λεμφοκυττάρων που προκαλούν



την καταστροφή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων , ή στην δημιουργία ενός άλλου πληθυσμού T-Λεμφοκυττάρων που εκκρίνει ουσίες που καταστέλλουν την παρουσίαση αντιγόνων .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ .

Τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα είναι ικανά να παρουσιάζουν αυτοαντιγόνα στα λεμφοκύτταρα και να τα ενεργοποιούν με κυτταροκίνες , ή αντιθέτως να καταστέλλουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω έκκρισης PGE_2 . Έτσι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές από τις παθήσεις αυτοανοσολογικής αιτιολογίας στον άνθρωπο . Εδώ θα αναφερθούν ορισμένα μόνο παραδείγματα .

Στην Ρευματοειδή αρθρίτιδα τα μακροφάγα καθώς και άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων στα T-Λεμφοκύτταρα , κυρίως αντιγόνων από ιούς που διαθέτουν επιτόπους με μεγάλη ομοιότητα προς επιτόπους των εγγενών αντιγόνων του σώματος . Η ανοσολογική αντίδραση που οργανώνεται και εξαπλώνεται στους περιαγγειακούς χώρους των αρθρικών υμένων χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη νεοαγγείωσης , την υπερπλασία των μεσοθηλιακών κυττάρων των αρθρικών υμένων , την μετακίνηση T-Λεμφοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό B-Λεμφοκυττάρων . Τα μακροφάγα συμμετέχουν στην καταστροφή των αρθρικών επιφανειών με την έκκριση Οξίνων Υδρολασών και Ουδέτερων Πρωτεασών . Επίσης παρουσιάζουν αντιγόνα στα T-Λεμφοκύτταρα , εκκρίνουν κυτταροκίνες (π.χ. IL-1, IL-6, TNFα) που προκαλούν την ενεργοποίηση των B- και T-Λεμφοκυττάρων , την ανάπτυξη νεοαγγείωσης και επίσης την μετανάστευση ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων από την κυκλοφορία , τα οποία συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις του αρθρικού υμένα .

Στον Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα κάθαρσης των IgG-ανοσοσυμπλεγμάτων μέσω FcR υποδοχέων . Επίσης τα μονοκύτταρα των ασθενών παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση αντιγόνων MHC-II και υπάρχει μειωμένη αναλογία HLA-DR(+) μονοκυττάρων στο αίμα . Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο αυτά τα μονοκύτταρα συμμετέχουν στην ανάπτυξη αντι-DNA αντισωμάτων .

Στην Θυρεοειδίτιδα του Hashimoto τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν , επεξεργάζονται και παρουσιάζουν κάποιο αδιευκρίνιστο αυτοαντιγόνο της μεμβράνης των θυρεοκυττάρων , το οποίο αποτελεί το έναυσμα της ενεργοποίησης των T-Λεμφοκυττάρων . Έτσι ο Θυρεοειδής διηθείται από T- και B-Λεμφοκύτταρα , πλασματοκύτταρα και μακροφάγα . Τα λεμφοκύτταρα διεγείρονται από την IL-1 των φαγοκυττάρων και συχνά συσσωρεύονται σε λεμφοζίδια . Σήμερα μελετάται ακόμα ο ρόλος των μακροφάγων στην δημιουργία των αυτοαντισωμάτων κατά της Θυρεοσφαιρίνης .

Τα μακροφάγα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της Σαρκοειδωσης . Σε αυτήν την πάθηση έχουν ανιχνευτεί αυτοαντισώματα που αντιδρούν με T-Λεμφοκύτταρα . Το χαρακτηριστικό κοκκίωμα της Σαρκοειδωσης αποτελείται από μακροφάγα , επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα που περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα , μονοκύτταρα και ινοβλάστες . Έχει προταθεί ότι στο κέντρο του κοκκιώματος υπάρχουν τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που παράγουν τις κυτταροκίνες που προκαλούν τις υπόλοιπες παθολογοανατομικές εκδηλώσεις .



Κεφάλαιο 2-4 . Ο ρόλος του μακροφάγου στις χρόνιες και εκφυλιστικές παθήσεις

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της αθηρωματώδους πλάκας στο τοίχωμα των αγγείων , αν και ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα ίδια κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς ικανούς να σταματήσουν την εξέλιξη της αθηρωματώσεως . Για τον λόγο αυτό ερευνάται ακόμα η πραγματική συμμετοχή των μακροφάγων στην εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα , όπως και τα περισσότερα άλλα είδη κυττάρων , διαθέτουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για τις LDL-λιποπρωτεΐνες με τους οποίους προσλαμβάνουν τις μικρές ποσότητες χοληστερόλης που τους είναι απαραίτητες . Αυτός ο υποδοχέας προσλαμβάνει και τις βVLDL-λιποπρωτεΐνες . Ο υποδοχέας υψηλής συγγένειας παρουσιάζει καταστολή της λειτουργίας του σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις λιποπρωτεϊνών . Όμως τα μακροφάγα διαθέτουν επιπλέον και έναν υποδοχέα χαμηλής συγγένειας για τις ακετυλιωμένες LDL-λιποπρωτεΐνες (Scavenger Receptor) , ο οποίος αναγνωρίζει και προσλαμβάνει τις οξειδωμένες , ακετυλιωμένες ή ακετο-ακετυλιωμένες μορφές-LDL-λιποπρωτεϊνών . Αυτός ο υποδοχέας προσλαμβάνει συνεχώς τις LDL-λιποπρωτεΐνες , χωρίς αυτοπεριορισμό . Τα μακροφάγα επίσης προσλαμβάνουν και συμπλέγματα λιποπρωτεϊνών μαζί με αρτηριακές πρωτεογλυκάνες ή αποδιαταγμένο κολλαγόνο . Έτσι τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα μετατρέπονται προοδευτικά σε "αφρώδη κύτταρα" (foam cells) . Τα ίδια τα μακροφάγα εκκρίνουν ουσίες που μπορούν να οξειδώσουν τις φυσιολογικές λιποπρωτεΐνες και να τις μετατρέψουν σε πιο βλαβερές μορφές , οι οποίες προσλαμβάνονται και ευκολότερα . (Seljelid, 1986 , Angelin και συν., 1986 , Kelley και συν., 1988 , Lewis και McGee , 1994 , DeVries και συν., 1998) .

Δεν είναι ακόμα κατανοητό γιατί τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στην υπενδοθηλιακή περιοχή αλλά έχει προταθεί ότι στις περιοχές όπου υπάρχει βλάβη του ενδοθηλίου λόγω στροβιλώδους ροής του αίματος , όπως σε διακλαδώσεις αγγείων , τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα . Σύμφωνα με άλλους η υπερχοληστεριναιμία και η συσσώρευση οξειδωμένης LDL-λιποπρωτεΐνης στο υπενδοθήλιο προκαλούν βιοχημικές διαταραχές των ενδοθηλιακών κυττάρων που «αναγνωρίζονται» από τα μονοκύτταρα . Η διαπίδυση των μονοκυττάρων μέσω του ενδοθηλίου προς το υπενδοθήλιο γίνεται χημειοτακτικά , εξαιτίας της ύπαρξης ουσιών όπως τα προϊόντα αποδόμησης κολλαγόνου και Ινωδονεκτίνης , Θρομβίνης , Ελαστίνης , PDGF , Αιμοπεταλιακού Παράγοντα PF-4 , TNFα και κάποιων άλλων ουσιών που εκκρίνονται από τα λεία μυϊκά κύτταρα . Η ταχεία ανταπόκριση των μονοκυττάρων σε αυτά τα χημειοτακτικά ερεθίσματα υποδηλώνει ότι είναι μερικώς ενεργοποιημένα . Όταν τα μονοκύτταρα φτάσουν στον υπενδοθηλιακό χώρο συνδέονται με τα μόρια Λαμίνινης και Ελαστίνης της θεμέλιας ουσίας . Στην συνέχεια αρχίζουν την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών μέσω των υποδοχέων τους . Αυτές οι λιποπρωτεΐνες υφίστανται λυσοσωματική διάσπαση , από μια Υδρολάση Εστέρων ή από μια Μη-ειδική Ώξινη Λιπάση . Η χοληστερόλη που προκύπτει είτε μεταβολίζεται από το φαγοκύτταρο ή μετατρέπεται από το ένζυμο ACAT σε εστέρες που αποθηκεύονται σε σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα ή τέλος απελευθερώνεται και συνδέεται σε HDL-λιποπρωτεΐνες . Επίσης τα μακροφάγα χρησιμοποιούν Ουδέτερες Υδρολάσες Εστέρων για την διάσπαση της αποθηκευμένης χοληστερόλης στα σταγονίδια . Αυτή η χοληστερόλη συνήθως

απομακρύνεται από τα μακροφάγα συνδεδεμένη με HDL-λιποπρωτεΐνες . (Zembala και Asherson, 1989 , Nelken και συν.,1991 , Van der Wal και συν.,1992 , Simionescu και Simionescu, 1993 , Ross, 1993 , Weylich και συν.,1996) .

Τα μακροφάγα συνήθως ανιχνεύονται σε μικρούς αριθμούς στις ανθρώπινες αθηρωματώδεις πλάκες , ενώ σε πειραματικά μοντέλα της νόσου αποτελούν τον επικρατέστερο κυτταρικό τύπο . Τα κύτταρα αυτά φαγοκυτταρώνουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων και χοληστερόλης και όταν πεθάνουν αυτά τα συστατικά εναποτίθενται στο αγγειακό τοίχωμα , δημιουργώντας το «κηροειδές» (Ceroid) . Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συμμετέχουν στην γένεση της αθηρωματώδους πλάκας και με άλλους τρόπους , οι οποίοι συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα .

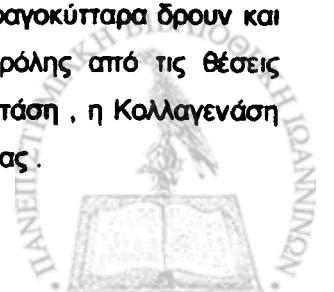
Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

1. Παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξειγόνου , οι οποίοι οξειδώνουν τις LDL-λιποπρωτεΐνες και έτσι τις μετατρέπουν σε πιο εύληπτες μορφές . Επίσης εκκρίνουν Λιποπρωτεϊνική Λιπάση , η οποία συμμετέχει στην πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών από τα μακροφάγα .
2. Μεταφέρουν τις ακετυλωμένες LDL-λιποπρωτεΐνες στο υπενδοθήλιο .
3. Εκκρίνουν κυτταροκίνες που προσελκύουν άλλα μονοκύτταρα , ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα στο υπενδοθήλιο (PDGF, FGF, IL-1 κ.α.) .
4. Εκκρίνουν Αυξητικούς Παράγοντες που προκαλούν πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών . Επίσης εκκρίνουν άλλους παράγοντες που ευνοούν την νεοαγγειογένεση στην βάση της αθηρωματώδους πλάκας .
5. Εκκρίνουν Ουδέτερες Πρωτεάσες (Κολλαγενάση , Ελαστάση) που προκαλούν την νέκρωση των στοιχείων της αθηρωματώδους πλάκας και συμμετέχουν στην δημιουργία ανευρυσμάτων και στην δημιουργία προϊόντων αποδόμησης του κολλαγόνου τα οποία οδηγούν σε θρομβώσεις .
6. Με την οξείδωση των LDL-λιποπρωτεϊνών αυτές μετατρέπονται σε αντιγονικά μόρια , εξαιτίας των επιδράσεων στις ομάδες Λυσίνης των μορίων Απολιποπρωτεΐνης-B . Αυτή η αντιγονικότητα των LDL-λιποπρωτεϊνών σε συνδυασμό με τις εκκρινόμενες κυτταροκίνες προκαλούν την διήθηση της αθηρωματώδους πλάκας από λεμφοκύτταρα .

Επίσης έχει προταθεί ότι επειδή τα αφρώδη κύτταρα προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος κάποτε εγκαταλείπουν το αρτηριακό τοίχωμα και ότι κατά την επανείσοδό τους στην κυκλοφορία προκαλούν βλάβες στο ενδοθήλιο . Αυτή η ενδοθηλιακή βλάβη είναι που προκαλεί την συγκόλληση και επικόλληση αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα και επιπλέον επιτρέπει την εισροή περισσότερων λιπιδίων στο υπενδοθήλιο .

Η παρουσία των μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων στην αθηρωματώδη πλάκα κατατάσσει την αθηρωμάτωση στις φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές παθήσεις από άποψη παθοφυσιολογίας . Τα T-λεμφοκύτταρα είναι βοηθητικά (CD4) ή κυτταροτοξικά (CD8) . Η παρουσίαση αντιγονικών τμημάτων των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών στα λεμφοκύτταρα από τα μακροφάγα θα μπορούσε να εξηγήσει την ανεύρεση αντισωμάτων κατά λιποπρωτεϊνών στο αίμα , καθώς και την σημαντική εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος στην αθηρωματώδη πλάκα .

Αντιθέτως , έχει προταθεί από άλλους ερευνητές ότι τα μονοκύτταρα δρουν και ευεργετικά επειδή μπορούν να απομακρύνουν το πλεόνασμα της χοληστερόλης από τις θέσεις βλάβης του έσω χιτώνα των αγγείων . Επίσης εκκρίνουν ένζυμα , όπως η Λιπάση , η Κολλαγενάση και η Ελαστάση , που επιταχύνουν την απορρόφηση της αθηρωματώδους πλάκας .



ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .

Τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα που μεταναστεύουν στο ΚΝΣ μετά από κάποιο συμβάν που αναιρεί τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό , είναι κύτταρα που μπορούν να παρουσιάσουν αντιγόνα σε Τ-λεμφοκύτταρα . Για τον λόγο αυτό ενοχοποιούνται στην παθογένεια των Αλλεργικών Εγκεφαλοπαθειών και ορισμένων άλλων παθήσεων . Επίσης τα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν και στην αντίδραση του ΚΝΣ σε τραυματισμούς , με λειτουργία αμυντική κατά των λοιμώξεων αλλά και απομάκρυνσης των εκφυλιζόμενων ή νεκρωτικών νευρώνων .

Έχει προταθεί από πολλούς η συμμετοχή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (Πολλαπλή Σκλήρυνση) . Συγκεκριμένα τα μακροφάγα θεωρούνται υπεύθυνα για την παρουσίαση αντιγόνου στα Αυτοδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό . Αυτά τα Τ-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα μακροφάγα και με τα μικρογλοιακά κύτταρα του Κ.Ν.Σ. και προκαλείται ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , τα οποία και συμμετέχουν στην καταστροφή της μυελίνης των νευραξόνων . Επίσης προκαλείται οίδημα του εγκεφάλου από την φλεγμονώδη - ανοσολογική αντίδραση , με αποτέλεσμα μεγαλύτερες διαταραχές λειτουργικότητας . (Dhib-Jalbut και McFarlin, 1989 , Perry και Gordon, 1991) .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα του Κ.Ν.Σ. είναι υπεύθυνα σε μεγάλο βαθμό για τις επιπλοκές της λοίμωξης με τον ιό HIV-1 στο ΚΝΣ . Όταν ο HIV-1 προσβάλλει τα μονοκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου προκαλείται η παραγωγή νευροτοξικών ουσιών όπως οι κυτταροκίνες TNFα και IL-1β , τα εικοσανοειδή LTB₄ και LTD₄ , ο PAF και η Λιποξίνη LXA₄ . Αυτές οι ουσίες προκαλούν τον θάνατο των νευρώνων , την καταστροφή της μυελίνης και την αντιδραστική αστροκυττάρωση στον εγκεφαλικό φλοιό . Για την παραγωγή αυτών των νευροτοξινών απαιτείται η αλληλεπίδραση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με τα αστρογλοιακά κύτταρα . (Genis και συν., 1992) .

ΤΑ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΤΟ ΕΜΦΥΣΗΜΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΟΣ .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση της αιθάλης και των άλλων προϊόντων του καπνίσματος από το αναπνευστικό επιθήλιο . Επίσης τα μακροφάγα αυτά αναλαμβάνουν τον καθαρισμό των σκονών που προέρχονται από επαγγελματικούς χώρους όπως τα ορυχεία (άνθρακα , αμιάντου , πυριτίου , βηρυλλίου) και τα εργοτάξια . Οι περισσότερες ανόργανες σκόρες οδηγούν στην δημιουργία Πνευμονοκονιώσεων , δηλαδή κοκκιωματωδών φλεγμονών με την συνεπακόλουθη ανάπτυξη Διάμεσης Πνευμονικής Ίνωσης . Ο καπνός του τσιγάρου όμως οδηγεί στην ανάπτυξη εμφυσήματος , επειδή περιέχει ένα πλήθος οργανικών και ανόργανων συστατικών καθώς και Ελεύθερων Ριζών . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των καπνιστών έχουν μειωμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης μικροβίων , αλλά αυξημένη παραγωγή Ελασάσης , Κολλαγενασης και Ώξινων Λυσοσωματικών Υδρολασών . Επίσης παράγουν λιγότερη α1-Αντιθρυψίνη (τον αναστολέα της α1-πρωτεάσης της σερίνης , ο οποίος αναστέλλει την Ελασάση και δρα προστατευτικά κατά του εμφυσήματος) και περισσότερες Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου . Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι τα μακροφάγα παράγουν αυξημένες ποσότητες α1-Αντιθρυψίνη η οποία όμως δεν εκκρίνεται από αυτά . Έτσι η συνολική επίδραση των μακροφάγων οδηγεί στην ανάπτυξη ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης και στην καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων . (Hocking και Golde, 1979 , Cotran και συν., 1989 , Zembala και Asherson, 1989) .

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΥΝΟΔΕΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Υπάρχουν αρκετές παθήσεις που συνδυάζονται με την μερική ή πλήρη δυσλειτουργία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Cline, 1978 , Johnston, 1988 , Sima και συν., 1988 , Baldwin και συν., 1990 , Gomez και συν., 1994) . Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί σημαντικά μειωμένη χημειοτακτική δραστηριότητα των μονοκυττάρων σε ασθενείς με εκτεταμένα εγκαύματα , σακχαρώδη διαβήτη , νόσο των Chediak-Higashi , νεοπλασίες και AIDS . Τα νεογνά και ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή εμφανίζουν όχι μόνο μειωμένη χημειοταξία αλλά και μειωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα των μονοκυττάρων τους .

Η σπληνεκτομή συνδυάζεται με διαταραχές της λειτουργίας των μακροφάγων , εκτός από τις διαταραχές στην λειτουργία των λεμφοκυττάρων . Σε αυτό οφείλεται και η μεγάλη συχνότητα της σηψαιμίας στους ασθενείς που έχουν υποστεί σπληνεκτομή . Σε μία μελέτη της λειτουργίας των περιτοναϊκών μακροφάγων διαπιστώθηκε ότι 24 ώρες μετά από σπληνεκτομή και για διάστημα μίας εβδομάδας τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν φυσιολογική παραγωγή $O_2^{\cdot -}$, αρκετά χαμηλή παραγωγή NO , μικρή καθυστέρηση στην φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών *E. coli* , αλλά σημαντική δυσχέρεια στην ενδοκυττάρια καταστροφή τους . Επίσης τα μακροφάγα αυτά εμφανίζουν μεγάλη αύξηση της έκκρισης TNF α (McCarthy και συν., 1995) . Επίσης οι βαριοί τραυματισμοί (π.χ. κλειστά κατάγματα με μείζονα αιμορραγία) προκαλούν διαταραχές στην λειτουργία των μακροφάγων του σπλήνα . Σε μία μελέτη αποδείχτηκε ότι 24 ώρες μετά από τραυματισμό τα σπληνικά μακροφάγα παρουσιάζουν μειωμένη αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα και μειωμένη έκκριση TNF α , IL-6 και H_2O_2 , ενώ μία εβδομάδα μετά τον τραυματισμό τα σπληνικά μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση TNF α , IL-6 , PGE $_2$, H_2O_2 και NO . Ενώ η αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα παραμένει χαμηλή (McCartier και συν., 1998) .

Μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα εμφανίζεται στα μακροφάγα ασθενών Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο , Μονοκυτταρική Λευχαιμία , Σακχαρώδη Διαβήτη , Αλκοολική Κίρρωση του ήπατος ή τέλος με συγγενή έλλειψη του αντιγονικού συμπλέγματος CD11/CD18 στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων . Η μεγαλύτερη όμως έκπτωση της αντιμικροβιακής λειτουργίας εμφανίζεται στους ασθενείς με Χρόνια Κοκκιωματώδη Νόσο (CGD) , οι οποίοι παρουσιάζουν πλήρη έλλειψη της δραστηριότητας NADPH-Οξειδάσης και κατά συνέπεια δεν παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου . Το αποτέλεσμα της αδυναμίας των μακροφάγων να φονεύσουν τα φαγοκυτταρωμένα μικρόβια είναι η δημιουργία αποστημάτων σε όλους τους ιστούς και τα όργανα που περιέχουν μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και σε ασθενείς των οποίων τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν συγγενή έλλειψη της Μυελοϋπεροξειδάσης . Σε ασθενείς με προχωρημένες νεοπλασίες , με AIDS ή με σύνδρομο Wiscott-Aldrich υπάρχει επιπλέον και μια σημαντική έκπτωση της αντικαρκινικής και κυτταροτοξικής δραστηριότητας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Υπάρχουν πολλές ακόμα παθήσεις που συνδυάζονται με διαταραχές της λειτουργίας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Μεταξύ αυτών υπάρχουν και δύο πολύ ενδιαφέρουσες : 1) η **Μαλακοπλακία** , μία επίκτητη κοκκιωματώδης πάθηση που συνήθως προσβάλλει τους ουρητήρες και χαρακτηρίζεται από τα ευμεγέθη Μακροφάγα του Hansemann (*Hansemann macrophages*) τα οποία παρατηρούνται εντός του κοκκιώματος κατά την παθολογοανατομική εξέταση , και 2) η **Πυώδης Ιδρωταδενίτιδα** (*Hydradenitis suppurativa*) , μία βαριά σταφυλοκοκκική λοίμωξη των μασχαλαίων

λεμφαδένων όπου τα μακροφάγα αδυνατούν να φαγοκυτταρώσουν ή να καταστρέψουν με άλλο τρόπο τους μικροοργανισμούς, λόγω των πολλαπλών λειτουργικών διαταραχών τους. (Sigal και Ron, 1994).

Στον παρακάτω πίνακα διακρίνουμε ορισμένα συνήθη αίτια δευτεροπαθούς δυσλειτουργίας των μονοκυττάρων. (Sigal και Ron, 1994)

• ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗ ΑΙΤΙΑ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

- 1. Αίτια μειωμένης ικανότητας προσκόλλησης στο αγγειακό ενδοθήλιο (Adherence defect) .
- Φάρμακα : σαλικυλικά , τετρακυκλίνες , στεροειδή .
- Αιθανόλη .
- 2. Αίτια μειωμένης ικανότητας φαγοκυττάρωσης (Phagocytosis defect) .
- Κάπνισμα .
- Συστηματική σήψη .
- 3. Αίτια μειωμένης φαγοκυτταρικής δραστηριότητας .
- Φάρμακα : Αδρενεργικοί παράγοντες , κολχικίνη , πενικιλλαμίνη-D , αμφοτερικίνη-B .
- Νοσήματα : Σακχαρώδης διαβήτης , ιλαρά , σύνδρομο Down , νεοπλασίες , κίρρωση του ήπατος .
- Οξύ Stress : Συστηματική σήψη , εκτεταμένα εγκαύματα , χειρουργικές επεμβάσεις , κρίση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας , οξεία αλλεργική αντίδραση .
- 4. Αίτια μειωμένης αντιμικροβιακής και κυτταροτοξικής δραστηριότητας .
- Φάρμακα : Αδρενεργικοί παράγοντες .
- Έκθεση σε ακτινοβολία .
- Νοσήματα : Σύνδρομο Down , νεοπλασίες , συστηματική σήψη .
- Έλλειψη Βιταμίνης B12 , έλλειψη σιδήρου .

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα συμμετέχουν και σε νοσήματα εναπόθεσης σφιγγολιπιδίων, όπως η νόσος του Gaucher και η νόσος των Niemann-Pick. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα στην νόσο του Gaucher δεν εκφράζουν το ένζυμο Γλυκοκερεβροσιδάση και έτσι με την φαγοκυττάρωση συσσωρεύουν σφιγγολιπίδια και μετατρέπονται σε «κύτταρα Gaucher». Τα μακροφάγα του Gaucher παρουσιάζουν μειωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Στην νόσο των Niemann-Pick (ή Sea-blue histiocyte syndrome) φαίνεται ότι τα μακροφάγα παρουσιάζουν έλλειψη του ενζύμου Σφιγγομυελινάση με αποτέλεσμα την συσσώρευση σφιγγολιπιδίων στο εσωτερικό τους.

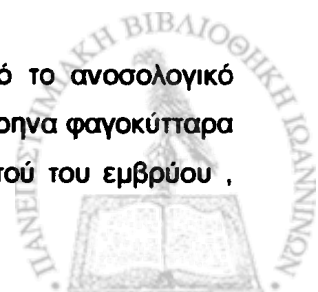
Η αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων στο αίμα είναι σχετικά συχνή αλλά συνήθως δεν εκτιμάται κλινικά και δεν αξιολογείται για διαγνωστικούς σκοπούς. Στην συνέχεια ακολουθεί ένας πίνακας που απαριθμεί τις συνηθέστερες αιτίες αύξησης των μονοκυττάρων στο αίμα. (Wallach, 1992, Sigal και Ron, 1994).

ΑΙΤΙΑ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ .

1. Λοιμώδη αίτια : Φυματίωση , Βρουκέλλωση , Λοιμώδη Ενδοκαρδίτιδα , Ελονοσία , Τύφος , Κάλα Αζάρ , Τρυπανοσωμίαση .
2. Φλεγμονώδη αίτια : Σαρκοειδωση , Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος , Ελκωτική Κολίτιδα , Νόσος του Crohn , Ρευματοειδής Αρθρίτιδα .
3. Νεοπλασματικά αίτια : Νόσος του Hodgkin , Μυελοδυσπλαστική Αναιμία , Οξεία και Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία .
4. Άλλα αίτια : Αποδρομή ουδετεροπενίας , περίοδος αμέσως μετά από σπληνεκτομή .

Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΙΣ ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΕΚΤΡΩΣΕΙΣ .

Οι εμβρυϊκοί ιστοί είναι ανοσογονικοί και η απόρριψη του εμβρύου από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας του είναι πιθανή εφόσον αυτά έρθουν σε επαφή. Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα της μητέρας είναι ικανά να οδηγήσουν στην καταστροφή του τροφοβλαστικού ιστού του εμβρύου,



μέσω της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , Ουδέτερων Πρωτεασών και Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (TNF α) . Όμως κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ένας τύπος κυττάρων του Φθαρτού αναλαμβάνει την καταστολή της λειτουργίας των μακροφάγων , αλλά και των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων , των NK-κυττάρων και των LAK-κυττάρων . Τα κύτταρα αυτά του φθαρτού δεν είναι ούτε μακροφάγα ούτε λεμφοκύτταρα , έχουν μικρό μέγεθος , κυτταροπλασματικά κοκκία και Fc-υποδοχείς και εμποδίζουν την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και TNF α από τα μακροφάγα της περιοχής όπου εμφυτεύτηκε το έμβρυο .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΥΤΗ ΕΝΔΑΓΓΕΙΑΚΗ ΠΗΞΗ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί ως υπεύθυνα για την εμφάνιση Διάχυτης Ενδαγγειακής Πήξης κατά την διάρκεια βαριών λοιμώξεων και νεοπλασιών . Αυτή η επίδρασή τους οφείλεται στην ικανότητά τους όταν ενεργοποιηθούν να παράγουν Θρομβοπλαστίνη , Προθρομβίνη , Προθρομβινάση , τον Ενεργοποιητή του Παράγοντα Χ και τους Παράγοντες Πήξης V , VII , IX και X . Επίσης η έκκριση της κυτταροκίνης TNF α σχετίζεται με την πάθηση αυτή , αλλά ο μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως . (Zembala και Asherson, 1989) .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΑ ΔΙΑΜΕΣΗ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ .

Στην Οξεία Διάμεση Νεφρίτιδα το παρέγχυμα του νεφρού είναι διηθημένο από μακροφάγα , Τ-λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα . Όταν ένα αλλοαντιγόνο ή τροποποιημένο αυτοαντιγόνο παρουσιαστεί στα CD4(+) Τ-λεμφοκύτταρα προκαλεί την παραγωγή λεμφοκινών που ενεργοποιούν τα μακροφάγα του ιστού . Αυτά τα μακροφάγα εκκρίνουν λυσοσωματικά ένζυμα και Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου που οδηγούν σε ιστική βλάβη . Επίσης εκκρίνουν PAF και κυτταροκίνες όπως IL-1 , TNF α , GM-CSF και άλλες που διεγείρουν τα υπόλοιπα λευκοκύτταρα για Αντιδράσεις Υπερευαισθησίας Τύπου IV . Τέλος αναπτύσσονται στο νεφρικό παρέγχυμα και κοκκιώματα με επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα . Οι επιδράσεις αυτές των μακροφάγων έχουν ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή του επιθηλίου των νεφρικών σωληναρίων .

ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ .

Έχει αποδειχθεί ότι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I (Νεανικός Διαβήτης) . Η πάθηση αυτή αποτελεί μια ανοσολογική αντίδραση κατά των β-κυττάρων των Νησιδίων του παγκρέατος (νησιδία Langerhans) . Πιθανολογείται ότι οφείλεται σε μια αρχική φλεγμονώδη αντίδραση των β-κυττάρων , λόγω ιογενούς λοίμωξης ή λόγω έκθεσης σε κάποια τοξίνη . Τα μακροφάγα του παγκρεατικού παρεγχύματος παρουσιάζουν τα αντιγόνα των β-κυττάρων σε Τ-λεμφοκύτταρα , με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανοσολογικής αντίδρασης (αυτοανοσίας) . Η καταστροφή των νησιδίων οφείλεται στην δράση των κυτταροτοξικών CD8(+) Τ-λεμφοκυττάρων αλλά εν μέρει και στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , Νιτρικού Οξειδίου και Λυσοσωματικών Ενζύμων από τα μακροφάγα που συρρέουν στον παγκρεατικό ιστό που φλεγμαίνει . Επίσης οι κυτταροκίνες IL-1 και TNF α που παράγονται από τα μακροφάγα ασκούν απευθείας κυτταροτοξική επίδραση στα β-κύτταρα των νησιδίων . (Leiter, 1987 , Zembala και Asherson, 1989 , Ihm και Yoon, 1990 , Baek και Yoon, 1991 , Kronke και συν., 1993) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟ ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαθέτουν Fc-υποδοχείς χαμηλής συγγένειας για τις IgE-ανοσοσφαιρίνες (FcER) . Αυτοί οι υποδοχείς συνδέουν διάφορα αλλεργιογόνα και προκαλούν την ενεργοποίηση των μακροφάγων , με αποτέλεσμα την έκκριση β-Γλυκουρονιδάσης , εικοσανοειδών και PAF , δηλαδή διαμεσολαβητές φλεγμονώδους αντίδρασης . Από αυτές τις ουσίες , τα διάφορα εικοσανοειδή που εκκρίνονται (LTB₄ , PGF_{2a} και TXB₂) και ο PAF προκαλούν και βρογχόσπασμο και την χημειοτακτική προσέλευση λευκοκυττάρων στον πνευμονικό ιστό . Τα αλλεργιογόνα που έχουν φαγοκυτταρωθεί από μακροφάγα στον πνεύμονα μπορούν να παρουσιαστούν σε λεμφοκύτταρα , με αποτέλεσμα ανάπτυξη αντιδράσεων επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας . Τέλος υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επηρεάζουν και την λειτουργία των μαστοκυττάρων . (Zembala και Asherson, 1989 , Barnes και συν., 1998) .

ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Η ΣΗΠΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΛΗΞΙΑ .

Πολλές από τις εκδηλώσεις και τις επιπλοκές της σηπτικής καταπληξίας (Septic Shock) έχουν αποδοθεί στις κυτταροκίνες που απελευθερώνουν τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Από αυτές οι IL-1 και INFα/β διαδραματίζουν μικρό ρόλο ενώ τον σημαντικότερο διαδραματίζει ο TNFa . Η παραγωγή TNFa από τα μακροφάγα οδηγεί στην ανάπτυξη πυρετού , υπότασης , κακουχίας , αιμορραγιών και μεταβολικής οξέωσης . Στον TNFa αποδίδεται και η εμφάνιση Διάχυτης Ενδαγγειακής Πήξης και των νεφρικών και πνευμονικών επιπλοκών . (Zembala και Asherson, 1989) .

Επίσης τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν ρόλο στην παθογένεια του Συνδρόμου Τοξικής Καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome) που οφείλεται στην παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα που έχουν εκτεθεί σε μια τοξίνη ορισμένων στελεχών S. aureus .

ΟΙ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Με τους όρους Ιστιοκυττάρωση (Histiocytosis) και Δικτυοκυττάρωση (Reticulosis) εννοούμε τις σπανιότερες μορφές νεοπλασματικής νόσου των μονοπύρηννων φαγοκυττάρων ή των συγγενικών τους κυττάρων όπως τα Δικτυοκύτταρα και τα κύτταρα Langhans (Cline, 1978 , Cotran και συν., 1989 , Weinberg και Athens, 1993) . Όπως για όλα τα κύτταρα αιμοποιητικού και λεμφοποιητικού συστήματος έτσι και τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα μπορούν να υποστούν καρκινική εξαλλαγή σε οποιοδήποτε στάδιο ωρίμασης , από το ώριμο μακροφάγο μέχρι και την άωρη μονοβλάστη . Οι συνηθέστερες από τις νεοπλασίες των μονοπύρηννων φαγοκυττάρων είναι η Οξεία Μονοβλαστική Λευχαιμία , ορισμένες μορφές Μυελομονοκυτταρικής Λευχαιμίας , το Δικτυοκυτταρικό Σάρκωμα ή Ιστιοκυτταρικό Λέμφωμα και ορισμένες άλλες μορφές . Οι Ιστιοκυτταρώσεις αποτελούν πολύ σπάνιες παθήσεις στις οποίες το νεοπλασματικό κύτταρο είναι μια ώριμη μορφή μακροφάγου . Οι συνηθέστερες Ιστιοκυτταρώσεις είναι η νόσος Hand-Schuller-Christian , η νόσος Letterer-Siwe , το Ηωσινοφιλικό Κοκκίωμα των Οστών και η Ιστιοκυττάρωση Χ . Η κλινική και η εργαστηριακή εικόνα των παθήσεων αυτών παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία και εξαρτάται κυρίως από τις εκκριτικές και φαγοκυτταρικές δραστηριότητες των μακροφάγων που έχουν υποστεί την εξαλλαγή .



Κεφάλαιο 3 . Ο Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικός άξονας .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Από την αρχή της δεκαετίας του 1980 άρχισαν να παρουσιάζονται μελέτες που υποδεικνυαν ότι το νευρικό , το ενδοκρινικό και το ανοσολογικό σύστημα είναι συνδεδεμένα λειτουργικά . Κάθε ένα από αυτά συστήματα παράγει ουσίες (π.χ. ορμόνες , νευρομεταβιβαστές , κυτταροκίνες) που τροποποιούν ή ρυθμίζουν την λειτουργία των άλλων δύο . Συχνά όμως και τα τρία συστήματα παράγουν κοινές ή παρόμοιες ουσίες , που τους επιτρέπουν να επιτυγχάνουν τον λειτουργικό τους στόχο . Επίσης , τα κύτταρα των οργάνων του κάθε συστήματος φέρουν υποδοχείς με τους οποίους αναγνωρίζουν τις ουσίες που παράγονται από τα άλλα συστήματα και ανταποκρίνονται σε αυτές . Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αμφίδρομη επικοινωνία και αλληλεπίδραση μεταξύ των συστημάτων αυτών . (Orpenheim και Shevach , 1990) .

Ως αποτέλεσμα της λειτουργικής ενότητας των τριών συστημάτων είναι το ότι η σωματική και η ψυχολογική καταπόνηση (stress) προκαλούν νευροενδοκρινικές μεταβολές που τροποποιούν και διαταράσσουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος . Έτσι αυτό συμμετέχει στην παθογένεια και επηρεάζει την έκβαση παθήσεων όπως ο καρκίνος , οι λοιμώξεις , η αλλεργία , τα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα κ.α. (Sigal και Ron ,1994) . Επίσης , η ύπαρξη αμφίδρομης επικοινωνίας και αλληλεπίδρασης μεταξύ των τριών συστημάτων επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα να συμμετέχει στην ομοίωση , καθοδηγώντας την τροποποίηση των λειτουργιών όλων των οργάνων του σώματος ώστε να υπάρχει μια συνολική προσαρμογή στην φλεγμονή ή την λοίμωξη (Husband, 1995) .

Ο ΝΕΥΡΟ-ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ .

Το νευρικό σύστημα και το ενδοκρινικό σύστημα εμφανίζουν τόσο λειτουργική όσο και ανατομική συσχέτιση . Η παραγωγή ορμονών από τους ενδοκρινείς αδένες ρυθμίζεται από την υπόφυση , η οποία εντοπίζεται στην βάση του εγκεφάλου και συνδέεται ανατομικά με το φαιό φύμα του υποθάλαμου δια του υποφυσιακού μίσχου (χοάνης) . Η υπόφυση αποτελείται από τρεις λοβούς (πρόσθιο , διάμεσο και οπίσθιο) . Ο υποθάλαμος παράγει ειδικά πεπτιδία που ονομάζονται Εκλυτικοί Παράγοντες (Releasing Factors) με τους οποίους ρυθμίζει την παραγωγή των υποφυσιακών ορμονών του πρόσθιου λοβού , οι οποίες ελέγχουν την λειτουργία των υπόλοιπων ενδοκρινών αδένων . Ορισμένες από τις υποφυσιακές ορμόνες αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (Orpenheim και Shevach , 1990) .

ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ .			
ΟΡΜΟΝΗ	M.B. (Daltons)	ΟΡΓΑΝΟ - ΣΤΟΧΟΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ
Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος (ACTH)	4.500	Επινεφρίδια	Σύνθεση και απελευθέρωση των κορτικοστεροειδών ορμονών του φλοιού των επινεφριδίων
Θυρεοειδοτρόπος (TSH)	28.000	Θυρεοειδής	Σύνθεση και απελευθέρωση της θυροξίνης και τριιωδοθυρονίνης
Αυξητική Ορμόνη (GH)	21.500	Ήπαρ	Απελευθέρωση σωματομεδινών
Ωχρινοτρόπος (LH)	29.000	Γονάδες	Σύνθεση και απελευθέρωση των στεροειδών ορμονών του φύλου
Ωθυλακιοτρόπος (FSH)	29.000	Γονάδες	Σύνθεση και απελευθέρωση των στεροειδών ορμονών του φύλου

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ρυθμιστικού μηχανισμού που αφορά το νευρικό, ενδοκρινικό και ανοσοποιητικό σύστημα είναι την επίδραση του ψυχικού stress στην ανοσολογική αντίδραση. Το ψυχολογικό stress προκαλεί την παραγωγή της Εκλυτικής Ορμόνης της Κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο. Η CRH προκαλεί την παραγωγή της Φλοιοεπινεφριδιοτρόπου Ορμόνης (ACTH) και των Ενδορφινών από την υπόφυση και η ACTH προκαλεί την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια. Τα γλυκοκορτικοειδή και οι ενδορφίνες τροποποιούν την αμυντική λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία με την σειρά τους παράγουν κυτταροκίνες που επηρεάζουν την λειτουργία της υπόφυσης και του υποθαλάμου (Oppenheim και Shevach, 1990).

Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγουν ορμόνες και χημικούς μεταβιβαστές που μέχρι πρόσφατα αποδίδονταν αποκλειστικά στο νευροενδοκρινικό σύστημα. Η πρώτη διαπίστωση αυτού του φαινομένου έγινε το 1980 από τους Blalock και Smith, που εντόπισαν την παραγωγή ACTH και γ-Ενδορφίνης, δηλαδή των προϊόντων έκφρασης του γονιδίου της Προ-οπινομελανοκορτίνης (POMC), από λεμφοκύτταρα. Το 1986 διαπιστώθηκε από τους Westly και συν. ότι τα σπληνοκύτταρα εκφράζουν επίσης το mRNA της POMC και κατά το ίδιο έτος η ομάδα των Lolait και συν. ανακοίνωσε την έκφραση του mRNA του γονιδίου της POMC από τα σπληνικά μακροφάγα. Τέλος, παρατηρήθηκε και ανακοινώθηκε κατά το 1986 από τους Smith και συν. ότι τα λευκοκύτταρα παράγουν ACTH και ενδορφίνες ανταποκρινόμενα όχι μόνο σε ιογενείς λοιμώξεις αλλά και στο μόριο της CRH, όπως ακριβώς και τα κύτταρα της υπόφυσης. Αυτά αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος από τις δημοσιεύσεις που οδήγησαν την έρευνα προς την αναζήτηση αλληλεπιδράσεων και ενισχυών ρυθμιστικών μηχανισμών μεταξύ νευροενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος (Oppenheim και Shevach, 1990, Reichlin, 1993, Sigal και Ron, 1994). Εκτός από την ACTH και τις ενδορφίνες, αποδείχτηκε ότι τα λευκοκύτταρα παράγουν και άλλες ορμόνες, όπως Θυρεοτρόπο Ορμόνη (TSH) και Αυξητική Ορμόνη (GH), Προλακτίνη (PRL), Χοριακή Γοναδοτροπίνη (CG), Ωκυτοκίνη, Σωματοστατίνη και πολλές ακόμα.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΑ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα λευκοκύτταρα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική τους μεμβράνη με τους οποίους αναγνωρίζουν και ανταποκρίνονται στις ορμόνες και τους χημικούς μεταβιβαστές που εκκρίνονται τόσο από τα νευροενδοκρινικά όργανα όσο και από άλλα λευκοκύτταρα που έχουν συσσωρευτεί στις εστίες φλεγμονής ή ανοσολογικής αντίδρασης. Υπάρχουν πολυάριθμες ανακοινώσεις για τον εντοπισμό τέτοιων υποδοχέων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Gordon και συν., 1988, Oppenheim και Shevach, 1990), όπως είναι οι υποδοχείς ACTH, β-Ενδορφίνης, Εγκεφαλίνης, Αυξητικής Ορμόνης (GH), Ινσουλίνης, Γλυκαγόνης, Γλυκοκορτικοειδών, Νευροτενσίνης, Ουσίας P (Substance P), Επινεφρίνης, Αγγειοδραστικού Εντερικού Πεπτιδίου (V.I.P.) και άλλοι. Οι υποδοχείς αυτοί είναι λειτουργικοί και συνδέονται λειτουργικά με μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων (Second Messengers) που επιτρέπουν την τροποποίηση των δραστηριοτήτων των λευκοκυττάρων. Ένα παράδειγμα που αναδεικνύει την σημασία ύπαρξης τέτοιων υποδοχέων στην ανοσολογική αντίδραση αφορά την ύπαρξη υποδοχέων β-Ενδορφινών και Εγκεφαλινών στα λεμφοκύτταρα και στα πολυμορφοπύρρηνα. Τα λευκοκύτταρα που συρρέουν στις φλεγμονώδεις εστίες διεγείρονται και παράγουν β-Ενδορφίνη και Met-Εγκεφαλίνη (Met-Enkephalin) οι οποίες δρουν χημειοτακτικά, προ-

καλώντας την μετανάστευση και συσσώρευση ακόμα περισσότερων ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στην εστία της φλεγμονής (Van Erps και Saland , 1984) .

Ένα άλλο φαινόμενο που συμβάλλει στην κατανόησή του λόγο ύπαρξης νευροενδοκρινικών υποδοχέων στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι το ότι τα πρωτογενή (θύμος , μυελός οστών) και δευτερογενή (σπλήνας , λεμφαδένες , πλάκες Peyer , αμυγδαλές) λεμφοποιητικά όργανα νευρώνονται από μεταγαγγλιακές αδρενεργικές ίνες καθώς και νευρικές ίνες που περιέχουν πεπτιδικούς νευρομεταβιβαστές (Husband , 1995) . Οι ίνες αυτές έρχονται σε στενή τοπογραφική σχέση με τα μακροφάγα , τα δικτυοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα και έτσι τα κύτταρα αυτά εκτίθενται στους εκκρινόμενους νευρομεταβιβαστές . Στον μυελό των οστών διανέμονται νευρίτες που περιέχουν νοραδρεναλίνη , ενώ στον θύμο διανέμονται συμπαθητικοί νευρίτες από το άνω αυχενικό γάγγλιο που περιέχουν νοραδρεναλίνη , Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) , Ουσία P και Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο (VIP) . Στα δευτερογενή λεμφοποιητικά όργανα διανέμονται μεταγαγγλιακές ίνες από το συμπαθητικό στέλεχος που περιέχουν νοραδρεναλίνη , αλλά οι ίνες που φτάνουν στον λευκό πολφό του σπλήνα περιέχουν και Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) , Ουσία P, Νευροτενσίνη, Σωματοστατίνη, Χολοκυστοκινίνη, Εγκεφαλίνες και Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο (Sigal και Ron, 1994).

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΑ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Μετά την σύνδεσή τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος , οι ορμόνες προκαλούν λειτουργικές μεταβολές στους μηχανισμούς δράσης των κυττάρων αυτών . Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να αφορούν μόνο ένα είδος λευκοκυττάρων ή και όλα . Επίσης , μία συγκεκριμένη ορμόνη είναι δυνατόν να προκαλεί περισσότερες από μια διαφορετικές επιδράσεις στο ίδιο κύτταρο .

Έτσι αναφέρθηκε ήδη ότι οι β-Ενδορφίνη και Met-Εγκεφαλίνη προκαλούν χημειοτακτικές αντιδράσεις στα T-λεμφοκύτταρα και στα πολυμορφοπύρηνια (Van Erps και Saland , 1984) και ότι αυξάνουν την παραγωγή Ιντερφερόνης-γ από τα T-λεμφοκύτταρα (Brown και Van Erps , 1986) . Η Θυρεοειδοτρόπος Ορμόνη αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα , η Αυξητική Ορμόνη αυξάνει την παραγωγή Κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων , η Ινσουλίνη αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων μετά από αντιγονική έκθεση , ενώ η Ουσία P διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και αυξάνει την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates) από τα πολυμορφοπύρηνια φαγοκύτταρα (Oppenheim και Shevach , 1990) . Η ACTH καταστέλλει την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα και την παραγωγή Ιντερφερόνης-γ από τα σπληνοκύτταρα , καθώς επίσης μειώνει την κυτταροτοξική επίδραση των μακροφάγων στα καρκινικά κύτταρα . Ορισμένες από τις επιδράσεις αυτές οφείλονται στην μεταβολή του αριθμού των μεμβρανικών υποδοχέων CD₂ και CD₃ των λεμφοκυττάρων από την ACTH . Τέλος , σημαντικές διαταραχές της ανοσίας προκαλούνται από την Προλακτίνη , η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων , την παραγωγή Ιντερφερόνης-γ και τον πολλαπλασιασμό των B- και T-λεμφοκυττάρων . Αυτό εξηγεί και την ανικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος ασθενών με υπερπρολακτιναιμία να αντιμετωπίσει παράσιτα όπως η *Listeria* (Sigal και Ron , 1994) .



Εκτός από τις πεπτιδικές ορμόνες που αναφέρθηκαν παραπάνω και οι στεροειδείς ορμόνες επίσης τροποποιούν τις λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι γνωστό ότι η ενδοφλέβια χορήγηση υδροκορτιζόνης προκαλεί παροδική κοκκιοκυττάρωση, λεμφοπενία και μονοκυτταροπενία. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν την αναστολή του παλλαπλασιασμού των Β- και Τ-λεμφοκυττάρων μετά από επίδραση μιτογόνων και σε υψηλές δόσεις (in vivo) καταστέλλουν την παραγωγή αντισωμάτων και προκαλούν ατροφία του βλαστικού κέντρου των λεμφοζιδίων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (σπλήνας και λεμφαδένες). Όταν χορηγηθούν in vitro καταστέλλουν την παραγωγή Ιντερλευκίνης-2 και Ιντερφερόνης-γ από τα Τ-λεμφοκύτταρα, την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 από τα μονοκύτταρα και την κυτταροτοξική δράση των Κυττάρων Φυσικών Φονέων (NK-cells) και των μονοκυττάρων της σειράς U-937. Στα μακροφάγα τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την έκφραση των αντιγόνων του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας τάξεως II, υποδοχέων Fc και την ικανότητα παρουσίασης των φαγοκυτταρωμένων αντιγόνων. Αυτές αποτελούν μόνο ένα μικρό τμήμα από τις δημοσιευμένες επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στα λευκοκύτταρα (Oppenheim και Shevach, 1990, Greenspan, 1991, Sigal και Ron, 1994).

Ο συνδυασμός των επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών και της ACTH στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εξηγεί και το γιατί το σωματικό stress και ο ημερήσιος (κίρκαδιανός) κύκλος της λειτουργίας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-φλοιού επινεφριδίων, δύο φαινόμενα που προκαλούν μεταβολές στα επίπεδα ACTH και γλυκοκορτικοειδών στο αίμα, μπορούν να μεταβάλλουν την ένταση της φλεγμονώδους ή της ανοσολογικής αντίδρασης (Syvalahti, 1987, Greenspan, 1991, Chrousos και Gold, 1992, Johnson και συν., 1992, Reichlin, 1993, Chrousos, 1995).

Μια άλλη κατηγορία στεροειδών ορμονών, τα Φυλετικά Στεροειδή (ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεσταγόνα), έχουν επίσης ισχυρή επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, οι φυλετικές ορμόνες του θήλεος ασκούν σημαντική ανοσοδιεγερτική επίδραση, έτσι ώστε να υπάρχει ο Φυλετικός Διμορφισμός (Sexual Dimorphism) της έντασης της ανοσολογικής απόκρισης: τα θήλεα κατά την αναπαραγωγική ηλικία έχουν καλύτερη άμυνα κατά των λοιμώξεων, παράγουν περισσότερες ανοσοσφαιρίνες, τα λεμφοκύτταρά τους ανταποκρίνονται ταχύτερα στα μιτογόνα και στα αντιγόνα και ταυτοχρόνως έχουν υψηλότερες πιθανότητες να νοσήσουν από αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα ή να απορρίψουν ένα μόσχευμα. Ωστόσο τα οιστρογόνα και τα προγεσταγόνα καταστέλλουν ορισμένες άλλες παραμέτρους της ανοσίας (λειτουργία Τ-λεμφοκυττάρων και Κυττάρων Φυσικών Φονέων, έκλυση ορμονών του θύμου) ενώ τα ανδρογόνα φαίνεται να ασκούν κατασταλτική δράση σε όλο το ανοσοποιητικό. Η κύηση καταστέλλει το κυτταρικό σκέλος της ανοσίας χωρίς να μεταβάλλει το χυμικό σκέλος (humoral immunity). Αυτή η καταστολή του κυτταρικού σκέλους της ανοσίας είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της απόρριψης των εμβρυϊκών αντιγόνων από τον οργανισμό της μητέρας. Στον άνθρωπο η ανοσοκαταστολή αυτή γίνεται πιο έντονη κατά το 2^ο και 3^ο τρίμηνο της κύησης, όπου μειώνεται ο αριθμός των Τc- και Th-λεμφοκυττάρων και η αντι-ιική άμυνα, ατροφεί ο θύμος αδένας και αυξάνει η ευπάθεια των γυναικών στις ιογενείς λοιμώξεις (ιλαρά, ανεμυελογιά, ερυθρά, έρπητς ζωστήρας, γρίππη, πολιομυελίτιδα, κ.α.). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί και η επίδραση του ανοσοποιητικού στις γονάδες. Η απλασία του θύμου και η θυμεκτομή σε νεογνική ηλικία προκαλούν αντίστοιχα απλασία και ατροφία των ωθηκών, ενώ η μεταμόσχευση θυμοκυττάρων ή σπληνοκυττάρων στα πειραματόζωα αναστρέφει την ατροφία των ωθηκών. Τέλος, ο ευνουχισμός των αρ-

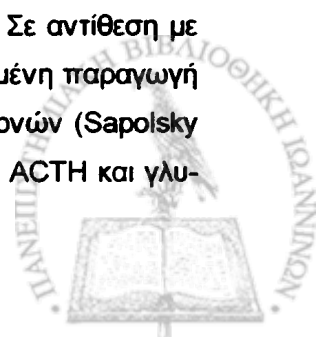
σενικών πειραματοζών προκαλεί και την αύξηση του αριθμού των υποδοχέων οιστρογόνων στα θυμοκύτταρα και καθυστερεί σημαντικά την εκφύλιση του θύμου αδένος με την πάροδο της ηλικίας . (Greenspan , 1991 , Sigal και Ron , 1994) .

Όπως έχει ήδη αναφερθεί , τα όργανα και οι ιστοί του ανοσοποιητικού συστήματος διαθέτουν πλούσια συμπαθητική νεύρωση . Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική αντίδραση (λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα) διαθέτουν β_2 -αδρενεργικούς υποδοχείς που συνδέονται με το σύστημα Δεύτερου Μηνύτορα της Αδενυλικής Κυκλάσης - Κυκλικού AMP - Πρωτεϊνικής Κινάσης A . Έτσι η νοραδρεναλίνη συνδέεται και ασκεί σημαντικές ρυθμιστικές επιδράσεις στα κύτταρα αυτά , όπως π.χ. στην παραγωγή αντισωμάτων , στην απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων , στην χημειοταξία , στην κυτταροτοξικότητα , στον πολλαπλασιασμό και στην παραγωγή Ιντερφερονών (Koorman και συν., 1973 , Boume και συν., 1974 , Nowell και συν., 1977 , Ikegami, 1977, Kammer, 1988 , Dumont και συν., 1989) . Όμως τα κύτταρα αυτά διαθέτουν επίσης υποδοχείς και για πεπτιδικούς νευρομεταβιβαστές , όπως η Ουσία P . Η Ουσία P επιτείνει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων , την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης IgA από τα B-λεμφοκύτταρα , προάγει την χημειοταξία στα πολυμορφοπύρρηνα φαγοκύτταρα και την φαγοκυττάρωση στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (Sigal και Ron , 1994) . Δύο άλλοι πεπτιδικοί νευρομεταβιβαστές , η Σωματοστατίνη και το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο , προκαλούν ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα από την Ουσία P . Επίσης το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις πλάκες Peyer τις οποίες νευρώνει , ρυθμίζοντας την ανταλλαγή λεμφοκυττάρων με την αιματική κυκλοφορία . Τέλος , η Μπομπεσίνη (Bombesin) και η Ουσία P διεγείρουν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος *in vitro* για αυξημένη κυτταροτοξικότητα κατά νεοπλασματικών κυττάρων-στόχων (van Tol και συν., 1990) .

ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ .

Ορισμένα φαινόμενα που συνοδεύουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι και τα λευκοκύτταρα παράγουν νευροενδοκρινικές ορμόνες και τα νευροενδοκρινικά όργανα διαθέτουν λειτουργικούς υποδοχείς για τις κυτταροκίνες του ανοσοποιητικού συστήματος . Γρήγορα αποδείχτηκε ότι αυτό συνέβαινε . Τα νευροενδοκρινικά όργανα όχι απλώς αντιδρούν στις κυτταροκίνες , αλλά μπορούν και να τις παράγουν (Reichlin, 1993 , Husband, 1995 , Chrousos, 1995) .

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτό της Ιντερλευκίνης-1 (IL-1) , μιας κυτταροκίνης που παράγεται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα . Τα κύτταρα του θερμορρυθμιστικού κέντρου του πρόσθιου υποθαλάμου διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την IL-1 και αντιδρούν στην κυτταροκίνη με πρόκληση πυρετού . Επίσης , η IL-1 προκαλεί και ύπνο βραδένων κυμάτων και υποφυσιακή έκκριση ACTH με αύξηση της κορτικοστερόνης στο αίμα . Η επίδραση της IL-1 στα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης είναι άμεση , αφού έχει αποδειχτεί *in vitro* ότι η προσθήκη Ιντερλευκίνης-1 σε καλλιέργειες υποφυσιοκυττάρων προκαλεί την αύξηση της παραγωγής ACTH , GH , TSH και LH , ενώ ταυτοχρόνως καταστέλλει την παραγωγή Προλακτίνης (Bernton και συν., 1987) . Σε αντίθεση με τα *in vitro* πειράματα , η *in vivo* χορήγηση IL-1 σε πειραματόζωα προκάλεσε την αυξημένη παραγωγή CRH από τον υποθάλαμο , χωρίς να μεταβληθεί η παραγωγή των υποφυσιακών ορμονών (Sapolsky και συν., 1987) . Έτσι είναι δύσκολο να αποδώσει κανείς την αύξηση της παραγωγής ACTH και γλυ-



κορτικοειδών αμιγώς σε επίδραση στον υποθάλαμο ή στην υπόφυση (Besedovsky και συν., 1986, Lupton, 1987) και ενδεχομένως και τα δύο όργανα να διαθέτουν υποδοχείς για την IL-1.

Εκτός από την Ιντερλευκίνη-1 υπάρχουν πολλά ακόμα παραδείγματα κυτταροκινών που επηρεάζουν την λειτουργία των νευροενδοκρινικών οργάνων, όπως η Ιντερλευκίνη-2 (IL-2), η Ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο Παράγοντας Νέκρωσης των Ογκών (TNF α), η Ιντερφερόνη- γ (INF- γ) και η Ιντερφερόνη- α (INF- α) (Reichlin, 1993, Lotan και Schwartz, 1994, Husband, 1995, Chrousos, 1995). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η *in vitro* και *in vivo* επίδραση του TNF- α στα κύτταρα του υποθαλάμου, που προκαλεί την παραγωγή CRH σε μεγάλες ποσότητες (Bernardini και συν., 1990). Οι κυτταροκίνες επηρεάζουν έμμεσα ή άμεσα την λειτουργία όλων των νευρώνων. Έτσι δεν είναι παράδοξο το ότι κατά την διάρκεια της φάσης μέγιστης παραγωγής αντισωμάτων μιας ανοσολογικής αντίδρασης, μεταβάλλονται τα επίπεδα νοραδρεναλίνης και σεροτονίνης στον υποθάλαμο, στον ιππόκαμπο και στον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας (Oppenheim και Shevach, 1990, Sigal και Ron, 1994), ούτε το ότι μετά από την χορήγηση μιας αντιγονικής ουσίας παρατηρείται ταυτόχρονη μεταβολή της περιεκτικότητας του λεμφικού ιστού και του υποθαλάμου σε κατεχολαμίνες, που συνοδεύεται από ηλεκτροεγκεφαλικές ενδείξεις μεταβολής του ρυθμού εκπόλωσης των νευρώνων του υποθαλάμου (Husband, 1995) και άλλες διαταραχές της εγκεφαλικής λειτουργίας (Reichlin, 1993).

Η παραγωγή κυτταροκινών και χημικών μεσολαβητών της φλεγμονής από κύτταρα του νευρικού συστήματος έχει αποδοθεί κυρίως στα μικρογλοιακά κύτταρα (που ανήκουν στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα) και στα αστροκύτταρα (Reichlin, 1993, Lotan και Schwartz, 1994, Chrousos, 1995). Επίσης, μονοκύτταρα που μεταναστεύουν από το αίμα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα του τοιχώματος των εγκεφαλικών αγγείων συμμετέχουν στην παραγωγή των ουσιών αυτών. Τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα παράγουν κυρίως IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TGF- β , b-FGF και TNF- α , ενώ τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα παράγουν κυρίως IL-1 και IL-6. Επίσης υπάρχουν και νευρώνες που εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως η νευρολευκίνη (Neuroleukin) και η IL-1 (Reichlin, 1993). Η διέγερση του ανομοιογενούς αυτού κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να γίνει από μικροβιακές τοξίνες ή αντιγόνα ή προϊόντα ιστικής καταστροφής που είτε δημιουργήθηκαν μέσα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα ή φτάνουν από την περιφέρεια με την αιματική κυκλοφορία. Επίσης είναι δυνατό να επιταθεί από την παραγωγή διαφόρων CSF-παραγόντων από τα αστροκύτταρα. Η παραγωγή κυτταροκινών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα προκαλεί ποικίλες διαταραχές της ανοσίας στην περιφέρεια, όπως καταστολή της λειτουργίας των Β-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, παραγωγή Πρωτεϊνών Οξείας Φάσης στο ήπαρ και αύξησης της Ιντερλευκίνης-6 στο αίμα.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΟΥΝ ΤΟΝ ΝΕΥΡΟ-ΕΝΔΟΚΡΙΝΟ-ΑΝΟΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΑΞΟΝΑ.

Η έκθεση πειραματοζώων σε σωματικό stress (περιστροφή, εμβάπτιση σε παγωμένο νερό, ηλεκτροσόκ, στέρση ύπνου) ή ψυχικό stress (περιορισμός κίνησης, αλλαγή κλουβιού, απομόνωση, έντονος θόρυβος) προκαλεί μεταβολές των παραμέτρων λειτουργίας του ανοσοποιητικού του συστήματος, όπως η παραγωγή ανοσοσφαιρινών και ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων. Όμως υπάρχουν και κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι, πέρα από την απλή επιδημιολογική παρατήρηση ότι η απώλεια προσφιλούς προσώπου συνδέεται με αυξημένη θνητότητα και θνησιμότητα από νεοπλασίες και λοιμώξεις, υπάρχουν και ορισμένες πιο εξειδικευμε-

νες ανακοινώσεις που αναδεικνύουν τον ιδιαίτερο ρόλο του ψυχικού stress στην καταστολή ή στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Syvalahti, 1987, Sigal και Ron, 1994). Έτσι, κατά την διάρκεια μιας ιδιαίτερα δύσκολης εξεταστικής περιόδου οι φοιτητές της Ιατρικής σχολής του Ohio παρουσίασαν μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων τους και καταστολή της λειτουργίας των Κυττάρων Φυσικών Φονέων και της παραγωγής Ιντερφερόνης- γ . Οι κάτοικοι του Los Angeles παρουσίασαν λίγες ώρες μετά τον μεγάλο σεισμό αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και των Κυττάρων Φυσικών Φονέων και στρατιώτες που συμμετείχαν για τρεις ημέρες σε ασκήσεις με πραγματικά πυρά παρουσίασαν αύξηση της παραγωγής Ιντερφερόνης. Άνδρες και γυναίκες που έχασαν τον σύντροφό τους παρουσίασαν μειωμένη δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων τους, ακόμα και όταν δεν υπήρχαν έντονες διαταραχές των ορμονικών επιπέδων τους. Άνδρες και γυναίκες που βρίσκονται σε διάσταση ή που έχουν πάρει διαζύγιο παρουσιάζουν αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις από τον ιό Epstein-Barr. Καταθλιπτικοί ασθενείς που νοσηλεύονται σε ψυχιατρικά ιδρύματα έχουν καταστολή της λειτουργίας των λεμφοκυττάρων τους, σε σύγκριση με εξωτερικούς ασθενείς που πάσχουν επίσης από κατάθλιψη. Τέλος, υπερήλικες με βαρεία κατάθλιψη παρουσίασαν μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και της δραστηριότητας των Κυττάρων Φυσικών Φονέων. Όλα τα παραπάνω ευρήματα εξηγούνται από τις επιδράσεις του stress α) στην παραγωγή CRH, ACTH, Ενδορφινών, Αυξητικής Ορμόνης και γλυκοκορτικοειδών, β) στην έκλυση νοραδρεναλίνης και πεπτιδικών νευρομεταβιβαστών από τις συμπαθητικές ίνες που νευρώνουν τα λεμφικά όργανα και γ) στα επίπεδα των κατεχολαμινών στο αίμα (Syvalahti, 1987, Chrousos και Gold, 1992, Johnson και συν., 1992, Chrousos, 1995). Μέσα από αυτούς τους μηχανισμούς αναζητείται η εξήγηση των επιδράσεων του νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικού άξονα στην παθογένεια και την εξέλιξη των αυτοάνοσων ρευματικών νοσημάτων όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος και το σύνδρομο Sjogren (Johnson και Moutsopoulos, 1992).

Έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με φλεγμονώδεις παθήσεις ή συστηματική σήψη παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα Θυρεοειδοτρόπου Ορμόνης, Τριιωδοθυρονίνης και Θυροξίνης. Αυτό οφείλεται στην επίδραση των IL-1, IL-6 και TNF- α στην έκκριση TSH. Επίσης, ασθενείς με σηψαιμία ή με εκτεταμένα εγκαύματα ή πολυτραυματίες εμφανίζουν αμηνόρροια, ανωορρηξία, αναστολή της παραγωγής των γοναδοτροπινών, μειωμένη σπερματογένεση και πτώση των επιπέδων τεστοστερόνης στο αίμα. Οι ίδιες καταστάσεις (σήψη, εγκαύματα, τραύμα) οδηγούν και σε γενικευμένη καταστολή της κυτταρικής ανοσίας, η οποία περιλαμβάνει την καταστολή της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (Green και Faist, 1988). Είναι πιθανό ότι οι ίδιοι μηχανισμοί που προκαλούν την διαταραχή της λειτουργίας των γονάδων (κυτταροκίνες και ορμόνες του stress) θα συμμετέχουν και στην πρόκληση της ανοσοκαταστολής. Το ίδιο ακριβώς πιθανολογείται και για την έντονη ανοσοκαταστολή που εμφανίζουν οι αθλητές αγωνισμάτων αντοχής που κάνουν ιδιαίτερα έντονη προπόνηση (Fitzgerald, 1988).

Εκτός από τις προαναφερθείσες κλινικές μελέτες, η αλληλεπίδραση του νευρικού και του ανοσοποιητικού συστήματος διαφαίνεται και από μια ακόμα σειρά παρατηρήσεων, που αφορούν τις επιδράσεις βλαβών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος στην ανοσολογική αντίδραση (Sigal και Ron, 1994). Οι αλλοιώσεις του πρόσθιου υποθαλάμου συσχετίζονται με μείωση του αριθμού των θυμοκυττάρων και σπληνοκυττάρων και καταστολή της λειτουργικότητας των Κυττάρων Φυσικών Φονέων

και της παραγωγής αντισωμάτων . Αλλοιώσεις του μέσου και οπίσθιου υποθαλάμου συσχετίζονται με μείωση του αριθμού των T- και B-λεμφοκυττάρων και της αναλογίας CD₄/CD₈ -λεμφοκυττάρων . Αντιθέτως , οι αλλοιώσεις του Επιχειλίου Συστήματος προκαλούν διέγερση και επίταση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος , όπως διέγερση του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων και αύξηση των θυμοκυττάρων και σπληνοκυττάρων . Αλλοιώσεις της κοιλιακής μοίρας του Δικτυωτού Σχηματισμού του Προμήκους καταστέλλουν τις Αντιδράσεις Επιβραδυνόμενης Ευαισθησίας , ενώ οι βλάβες της ραχιαίας μοίρας του Δικτυωτού Σχηματισμού τις επιτείνουν .

ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Υπάρχουν πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές που αποδεικνύουν ότι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα , όπως ακριβώς και τα άλλα λευκοκύτταρα , δέχονται νευροενδοκρινικές επιδράσεις και ότι μέσω των ειδικών υποδοχέων που διαθέτουν ανταποκρίνονται σε αυτές και τροποποιούν τις λειτουργίες τους . Στο σημείο αυτό θα γίνει μια περιληπτική αναφορά στις κυριότερες μελέτες που τεκμηριώνουν την νευροενδοκρινική ρύθμιση των λειτουργιών των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα συνδέουν την αδρεναλίνη και την νοραδρεναλίνη με τους ειδικούς β₂-αδρενεργικούς υποδοχείς που διαθέτουν , με αποτέλεσμα την αύξηση του Κυκλικού AMP στο κυτταρόπλασμα (Nowell και συν., 1977 , Ikegami, 1977 , Abrass και συν., 1985) . Οι κατεχολαμίνες επηρεάζουν την χημειοταξία και την παραγωγή πρωτεϊνών του Συμπληρώματος (Koorman και συν., 1973 , Larrin και Whaley, 1982) . Η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη αναστέλλουν την ικανότητα της INF-γ να διεγείρει τα μακροφάγα για καταστροφή κυττάρων προσβεβλημένων από τον ιό HSV ή καρκινικών κυττάρων (Koff και Dupegan, 1985 , Koff και Dupegan, 1986) και επίσης καταστέλλουν την ικανότητα των μακροφάγων να σκοτώνουν μυκοβακτηρίδια και να παράγουν TNF-α μετά από διέγερση με ενδοτοξίνη (Bernudez και συν., 1990) . Το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτιδίο ενισχύει την κατασταλτική επίδραση της νοραδρεναλίνης στην ενεργοποίηση των μακροφάγων (Koff και Dupegan, 1985) . Τέλος έχει προταθεί ότι η νοραδρεναλίνη μπορεί να συμμετέχει αυτοκρινικά στον μηχανισμό ρύθμισης της παραγωγής TNF-α από ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα (Spengler και συν., 1994) . Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω των α₂-αδρενεργικών και β-αδρενεργικών υποδοχέων που διαθέτουν τα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα των επίμυων . Η ενεργοποίηση των μακροφάγων δεν οδηγεί μόνο στην παραγωγή TNF-α , αλλά παράλληλα οδηγεί και στην παραγωγή νοραδρεναλίνης , η οποία καταστέλλει αυτοκρινικά την παραγωγή TNF-α .

Η σεροτονίνη προκαλεί διέγερση της παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου , μεταβολές της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας καθώς και καταστολή της έκφρασης των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με INF-γ (Silverman και συν., 1985 , Sternberg και συν., 1986 , Sternberg και συν., 1987) .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την ισταμίνη (Diaz και συν., 1970 , Ooi, 1982) . Η ισταμίνη προκαλεί μεταβολές στην παραγωγή πρωτεϊνών του συμπληρώματος και λυσοσωματικών ενζύμων (Ooi, 1982, Cluzel και συν., 1990) , ήπιες μεταβολές της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας και έντονη καταστολή της έκφρασης των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με INF-γ (Sternberg και συν., 1986 , Sternberg και συν., 1987) . Η ισταμίνη μπορεί τέλος να προκαλέσει η ίδια την ενεργοποίηση των μακροφάγων (Vignola και συν., 1994) .

Η ντοπαμίνη προκαλεί ήπιες μεταβολές της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας και της έκφρασης των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με INF- γ (Stemberg και συν., 1986, Stemberg και συν., 1987), καθώς και μεταβολές στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και TNF- α από ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα (Hasko και συν., 1996).

Τα μονοκύτταρα του αίματος διαθέτουν υποδοχείς Σωματοστατίνης και Γλυκαγόνης (Bhathena και συν., 1981). Η Σωματοστατίνη καταστέλλει πλήρως την ικανότητα των μακροφάγων να καταστρέφουν Μυκοβακτηρίδια και μειώνει σημαντικά την παραγωγή TNF- α μετά από διέγερση με ενδοτοξίνη (Bermudez και συν., 1990).

Η Νευροτενσίνη έχει ανοσοδιεγερτικό χαρακτήρα και επιτείνει σημαντικά τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των ενεργοποιημένων με INF- γ μακροφάγων, αλλά από μόνη της δεν ενεργοποιεί τα κύτταρα αυτά (Koff και Dupegan, 1985). Η Νευροτενσίνη επίσης επιτείνει την παραγωγή και έκκριση IL-1 από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη ή zymosan, αλλά από μόνη της δεν προκαλεί την παραγωγή IL-1 (Lemaire, 1988).

Η ACTH καταστέλλει την ικανότητα των μακροφάγων να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα μετά από διέγερση με INF- γ (Koff και Dupegan, 1985). Η Αυξητική Ορμόνη (GH) επίσης επιδρά στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και προκαλεί *in vitro* την ταχεία εξέλιξή τους σε γιγαντοκύτταρα που έχουν χαρακτηριστικές οστεοκλαστών (Guicheux και συν., 1998). Η GH επίσης καταστέλλει την παραγωγή και έκκριση TNF α από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα, μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του παράγοντα NF κ B (Haeflner και συν., 1997).

Τα μονοκύτταρα του αίματος διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την ινσουλίνη (Schwartz και συν., 1975, Bhathena και συν., 1981). Τα μονοκύτταρα των παχύσαρκων διαβητικών ασθενών εμφανίζουν σημαντική μείωση του αριθμού των υποδοχέων ινσουλίνης σε σχέση με υγιείς ανθρώπους (Bar και συν., 1976). Η Ινσουλίνη καταστέλλει την έκφραση των Fc-υποδοχέων στα μακροφάγα και την φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων (Rhodes, 1975, Muschel και συν., 1977). Επίσης προκαλεί μείωση της Εξαρτημένης από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητας (ADCC) των μακροφάγων (Bar και συν., 1977). Η Ινσουλίνη καταστέλλει την ικανότητα των μακροφάγων να καταστρέφουν Μυκοβακτηρίδια και να παράγουν TNF- α μετά από διέγερση με ενδοτοξίνη (Bermudez και συν., 1990).

Είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για τα γλυκοκορτικοειδή (Werb, 1978, Werb και συν., 1978, Ozaki και συν., 1982). Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή και απελευθέρωση Δραστικών Ριζών Οξυγόνου και Ουδέτερων Πρωτεασών και την έκφραση των Ια-αντιγόνων (Werb και συν., 1978, Schultz και συν., 1985, Fertsch και συν., 1987). Σε χαμηλές δόσεις και για σύντομες επωάσεις, η δράση των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να είναι διεγερτική για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, όπως π.χ. να προκαλείται αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και Ιντερλευκίνης-1 (Brough-Holub και Kraal, 1996).

Εκτός από τα γλυκοκορτικοειδή και τα φυλετικά στεροειδή έχουν αναφερθεί να ασκούν ρυθμιστικές επιδράσεις στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Έτσι, η *in vivo* χορήγηση Οιστραδιόλης σε πειραματόζωα προκαλεί σημαντική αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας του Δικτυοενδοθηλιακού Συστήματος, ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση Οιστραδιόλης και ενδοτοξίνης προκαλεί ιδιαίτερα σημαντική αύξηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας (Dobson και Kelly, 1973). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η *in vitro* χορήγηση Προγεστερόνης σε καλλιέργειες μακροφάγων επίμυων ή σε κυτταρικές σειρές μα-

κροφάγων που έχουν ενεργοποιηθεί με INF- γ ή ενδοτοξίνη , προκαλεί καταστολή της δραστηριότητας της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου (Miller ., 1996) .

Ακόμα και στερολικές ουσίες όπως η καλσιτριόλη (1 α ,25-Διυδόξυ-Βιταμίνη D₃) προκαλούν ποικίλες μεταβολές στην λειτουργία των μακροφάγων , όπως στην σύντηξή τους σε γιγαντοκύτταρα , στην έκφραση Fc-υποδοχέων , στην κυτταροτοξική δράση και τέλος στην παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (Abe και συν., 1984 , Cohen και συν., 1986) .

Έχει αποδειχθεί ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα παράγουν και εκκρίνουν νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη όταν διεγείρονται από ενδοτοξίνες (Spengler και συν., 1994) . Η παραγωγή αυτών των ενδογενών κατεχολαμινών από τα μακροφάγα είναι σημαντική γιατί οδηγεί στην αυτοκρινική ρύθμιση της παραγωγής TNF α μετά από την αρχική επίδραση του LPS .

Τέλος , μια ακόμα ενδιαφέρουσα πληροφορία είναι ότι τα μακροφάγα του σπλήνα εκφράζουν το γονίδιο της Προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC) και παράγουν ACTH και Ενδορφίνες , κυρίως β -Ενδορφίνη (Lolait και συν., 1986) .



Κεφάλαιο 4. Η παραγωγή του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) και των άλλων Δραστικών Μεταβολιτών (Ελεύθερων Ριζών) Οξυγόνου .

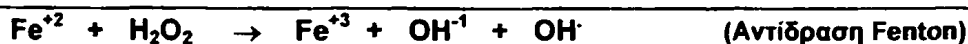
Κεφάλαιο 4-1 . Γενικά για το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου και για τις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ .

Με τον όρο «Ελεύθερη Ρίζα» εννοούμε άτομα ή μόρια που έχουν τουλάχιστον ένα ελεύθερο (ασύζευκτο) ηλεκτρόνιο στην στοιβάδα σθένους τους . Οι Ελεύθερες Ρίζες μπορούν να έχουν φύση κατιόντος , ανιόντος ή ουδέτερη , αλλά είναι πάντα εξαιρετικά δραστικές ουσίες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους . Συνήθως παράγονται από την ομολυτική σχάση (*homolytic fission*) ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δύο ατόμων που σχημάτιζαν ένα μόριο . Η πραγματοποίηση της αντίδρασης δημιουργίας των Ελεύθερων Ριζών απαιτεί έναν εξωγενή Εναρκτή (*initiator*) , όπως η υπεριώδης ακτινοβολία , η ακτινοβολία-γ ή οι ατμοσφαιρικοί ρύποι , αν και η σημαντικότερη βιολογική πηγή είναι οι μονοσθενείς οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των κύτταρων που συμπεριλαμβάνουν το οξυγόνο (Lunec, 1990) .

Το οξυγόνο είναι η συνηθέστερη και αφθονότερη Ελεύθερη Ρίζα με βιολογική σημασία . Στην μοριακή του μορφή είναι μία δίρριζα που διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια , το καθένα σε διαφορετικό τροχιακό αλλά με παράλληλα spin . Για να αντιδράσει το οξυγόνο με οργανικές ενώσεις πρέπει να προσλάβει μεγάλο ποσό ενέργειας , ώστε να αναστραφεί το spin του ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου . Η πρόσληψη ενέργειας από το οξυγόνο προκαλεί την μετατόπιση του ενός ηλεκτρονίου σε υψηλότερο τροχιακό με ταυτόχρονη αντιστροφή του spin του , δημιουργώντας έτσι το Οξυγόνο Ελεύθερης Κατάστασης (*Singlet oxygen*, 1O_2) , που είναι ιδιαίτερα δραστικό .

Η μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου δημιουργεί μια άλλη ρίζα , το Ανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{-1}) που διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο . Το O_2^{-1} είναι ιδιαίτερα ασταθές και έχει χρόνο ημιζωής λίγων msec , αλλά ισχυρή αναγωγική δράση . Στο όξινο περιβάλλον των κυττάρων μετατρέπεται στο Πρωτονιωμένο Ανιόν Υπεροξειδίου (*Perhydroxyl radical*, OH_2^{\cdot}) που έχει ισχυρή οξειδωτική δράση . Σε υδατικά διαλύματα το Ανιόν Υπεροξειδίου μετατρέπεται αυτόματα σε Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (H_2O_2) με μια αντίδραση Δισμουτάσης (*dismutation reaction*) , σύμφωνα με την γενική αντίδραση : $O_2^{-1} + O_2^{-1} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Όμως στα βιολογικά υγρά και σε φυσιολογικό pH η αντίδραση αυτή είναι αργή , που επιτρέπει στο O_2^{-1} να συμμετέχει σε αναγωγικές αντιδράσεις , όπως είναι π.χ. η αναγωγή του Fe^{+3} των μεταλλοπρωτεϊνών όπως η φερριτίνη : $Fe^{+3} + O_2^{-1} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$. Η αναγωγή του σιδήρου των μεταλλοπρωτεϊνών είναι μια σημαντική αντίδραση , διότι αν υπάρχει ικανή ποσότητα H_2O_2 , αυτή θα αντιδράσει με τον Fe^{+2} και μέσω μιας αντίδρασης Fenton θα δώσει την εξαιρετικά δραστική Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot}) καθώς και ανιόν υδροξυλίου (OH^{-1}) . Εναλλακτικά μπορεί να σχηματιστεί Ρίζα Υδροξυλίου και με την αναγωγή του H_2O_2 από το O_2^{-1} (αντίδραση Haber - Weiss) .



Την αντίδραση Fenton δίνουν εκτός από τον Fe^{+2} και ο Cu^{+1} και το Mn^{+2} . Σήμερα είναι παραδεκτό ότι οι οξειδωτικές επιδράσεις του H_2O_2 διαμεσολαβούνται από τα στοιχεία (μέταλλα)

μετάπτωσης . Το H_2O_2 δεν είναι Ελεύθερη Ρίζα , διότι δεν έχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην στοιβάδα σθένους του και κατά συνέπεια είναι λιγότερο δραστικό από τις Ελεύθερες Ρίζες του Οξυγόνου . Είναι όμως ιδιαίτερα σημαντικό μόριο επειδή διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες και συνδέεται εκλεκτικά με ενδοκυττάρια φωσφολιπίδια , μεταλλοπρωτεΐνες , υδατάνθρακες και το DNA και δίνει επιτόπου την αντίδραση Fenton , δημιουργώντας in situ Ρίζα Υδροξυλίου και προκαλώντας την καταστροφή του υποστρώματος . (Lunec, 1990 , Nahum και Sznajder, 1992) . Τέλος , ορισμένες Υπεροξειδάσες όπως η Μυελοϋπεροξειδάση (Myeloperoxidase) και η Ηωσινοφιλική Υπεροξειδάση (Eosinophilic Peroxidase) καταλύουν την αντίδραση του H_2O_2 με αλογονίδια (halides, Cl^- , Br^- , I^-) και οδηγούν στην δημιουργία οξειδωτικών παραγόντων όπως ο Υποχλωρίτης ($HOCl$) και ο Υποϊωδίτης (HOI) , που είναι ιδιαίτερα δραστικοί και προσβάλλουν εύκολα τις αμινικές ομάδες . Οι ίδιες Υπεροξειδάσες καταλύουν την οξείδωση του θειοκυανικού ανιόντος (SCN^-) σε υποθειοκυανικό ανιόν ($OSCN^-$) από το H_2O_2 . Η αντίδραση αυτή είναι σημαντική γιατί το υποθειοκυανικό ανιόν είναι υπεύθυνο για την καταστροφή των βακτηριδίων στο μητρικό γάλα , στην σίελο και στα δάκρυα (Nahum και Sznajder, 1992) .

Όταν αναφερόμαστε στις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου εννοούμε μόρια όπως το Οξυγόνο Απλής Κατάστασης (1O_2 , Singlet Oxygen) , το Ανιόν Υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$, Superoxide Anion) , το Διανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{2-}) , το Προτονιωμένο Ανιόν Υπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και την Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot}) , που διαθέτουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα . Όμως βιολογική δραστηριότητα έχουν και μόρια όπως το Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H_2O_2) και το ανιόν Υδροξυλίου (OH^{\cdot}) που δεν είναι Ελεύθερες Ρίζες , συμμετέχουν όμως στα ίδια βιολογικά φαινόμενα . Για τον λόγο αυτό έχουν παρουσιαστεί στην διεθνή βιβλιογραφία οι όροι Reactive Oxygen Intermediates και Reactive Oxygen Species , που αποδίδονται ως «Δραστικοί Μεταβολίτες του Οξυγόνου» . Στον ευρύτερο αυτόν όρο περιλαμβάνονται και τα παράγωγα του οξυγόνου που δεν ανταποκρίνονται στα φυσικοχημικά κριτήρια της «Ελεύθερης Ρίζας» αλλά που έχουν συγγενή προέλευση και δράση .

Η ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .

Οι Ελεύθερες Ρίζες του Οξυγόνου και ιδιαίτερα η Ρίζα Υδροξυλίου παρουσιάζουν μεγάλη βιολογική δραστηριότητα , αντιδρώντας εύκολα με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα , τους υδατάνθρακες , τα νουκλεϊκά οξέα και τους υδατάνθρακες . (Lunec, 1990) .

Όλα τα βιολογικά υλικά και ιδιαίτερα οι μεμβράνες περιέχουν μια ποικιλία από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα , τα οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην επίδραση των Ελεύθερων Ριζών . Επειδή στην αλειφατική αλυσίδα τους περιέχουν μια χαρακτηριστική δομή με διπλούς δεσμούς που διακόπτονται από μεθυλενικές ομάδες , αποτελούν το υπόστρωμα της δράσης πολλών ριζών όπως της Ρίζας Υδροξυλίου , που προκαλούν αντιδράσεις αφαίρεσης ατόμων υδρογόνου (hydrogen abstraction) και δημιουργίας υπεροξειδίων (lipid peroxides) .

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτιδία επίσης αποτελούν υπόστρωμα οξειδωτικών αντιδράσεων από τους Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου . Ο κύριος στόχος των μεταβολιτών του οξυγόνου είναι τα αρωματικά αμινοξέα , η κυστεΐνη , η προλίνη και οι δισουλφιδικοί δεσμοί . Αυτό σημαίνει ότι εξωκυττάρια πρωτεΐνες όπως οι IgG-ανοσοσφαιρίνες , η αλβουμίνη και το κολλαγόνο είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην οξειδωτική καταστροφή , πράγμα το οποίο εξηγεί την συμμετοχή των Ελευθέρων

Ριζών Οξυγόνου σε παθήσεις όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα , το Εμφύσημα , το Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων (ARDS) και ο Καταρράκτης .

Ένας από τους μηχανισμούς καρκινογένεσης θεωρείται και η διάσπαση των μονών και διπλών αλυσίδων του DNA από τις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου , που οδηγεί στην μετάλλαξη του γενετικού υλικού . Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί στην πρόκληση «αντιδράσεων Fenton» από το H_2O_2 και τα μεταλλικά ιόντα , που οδηγεί στην δημιουργία Ρίζας Υδροξυλίου . Το H_2O_2 μπορεί να παράγεται και τοπικά , από την αλληλεπίδραση του DNA με τις Ημικιόνες (Semiquinones) του καπνού των τσιγάρων . Επίσης οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου αντιδρούν με τις βάσεις Θυμίνη και Γουανίνη , με αποτέλεσμα να παράγεται 8-Υδρόξυ-Δεοξυγουανοσίνη .

Οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου προκαλούν την διάσπαση πολυμερών υδατανθράκων όπως το Υαλουρονικό Οξύ , με αποτέλεσμα να ενέχονται στην παθογένεια της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας . Επίσης οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και μαννόζη και οι δεόξυ-σακχαρίτες υφίστανται αυτό-οξειδωση , με αποτέλεσμα την δημιουργία H_2O_2 , O_2^{-1} και οξοαλδευδών , που προκαλούν την ανάπτυξη διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών (protein cross-linking) . Η σειρά αυτή των αντιδράσεων συσχετίζεται με την παθογένεια των επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη και του εμφυσήματος .

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι το H_2O_2 μπορεί να ενεργοποιήσει τον παράγοντα μεταγραφής NFκB και να οδηγήσει ένα κύτταρο στην μεταγραφή και έκφραση των γονιδίων του (Barnes και Karin, 1997) .

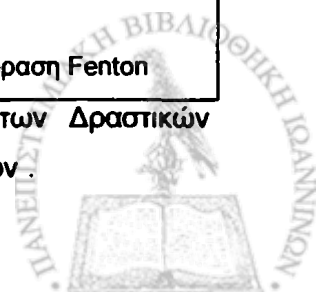
Η IN VIVO ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .

Η μονοθενής αναγωγή του οξυγόνου σε Ανιόν Υπεροξειδίου είναι μια συνηθισμένη και χρήσιμη αντίδραση στον μεταβολισμό των θηλαστικών , με την προϋπόθεση ότι είναι ελεγχόμενη . Το σώμα των θηλαστικών διαθέτει πολυάριθμους μηχανισμούς με τους οποίους περιορίζει την δημιουργία ή εξουδετερώνει την δράση τέτοιων Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου , ώστε να αποφεύγονται οι βλαπτικές επιδράσεις τους . Τέτοιοι μηχανισμοί απεικονίζονται στον πίνακα που ακολουθεί . (Lunec, 1990 , Nahum και Sznajder, 1992) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ IN VIVO ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ .

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ .
Δισμουτάση του Υπεροξειδίου	$2 O_2^{-1} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Καταλάση	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης	$HOOH + GSH \rightarrow HOH + GSSG$ (για το H_2O_2)
» » »	$ROOH + 2 GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$ (για υδρούπεροξειδία)
ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ .
Κερουλοπλασμίνη (CP)	$CP-Cu^{+2} + O_2^{-1} \rightarrow CP-Cu^{+1} + O_2$
Βιταμίνη C	Εξουδετερώνει το H_2O_2 και το OH^{\cdot}
Βιταμίνη E	Εξουδετερώνει τα Υπεροξειδία των λιπιδίων
Αλβουμίνη	Εξουδετερώνει το O_2^{-1}
Λακτοφερρίνη	Δεσμεύει τον Fe^{+2} σε όξινο pH , εμποδίζει την αντίδραση Fenton

Οι παραπάνω μηχανισμοί είναι επίσης πολύτιμοι στην εξουδετέρωση των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου που παράγονται κατά την διάρκεια παθολογικών καταστάσεων .



Η έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες-Χ, ακτινοβολία-γ) προκαλεί την δημιουργία Ρίζας Υδροξυλίου από την ομολυτική σχάση των μορίων νερού του κυττάρου καθώς και την δημιουργία $O_2^{\cdot -}$ από τα μόρια οξυγόνου του κυττάρου. Οι δύο αυτές Ελεύθερες Ρίζες σε συνεργασία καταστρέφουν το κυτταρικό DNA, οδηγώντας κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις σε καρκινογένεση.

Η εισαγωγή ορισμένων χημικών ουσιών στο σώμα όπως είναι ο τετραχλωράνθρακας, οι ημικιόνες του καπνού των τσιγάρων και τα εντομοκτόνα του τύπου των τετραϋδροπυριδινών, επιφέρει την συμμετοχή τους σε οξειδοαναγωγικούς κύκλους (Redox cycles), οι οποίοι οδηγούν στην δημιουργία Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου.

Λευκοκύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα, τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα φαγοκύτταρα μπορούν να διεγερθούν και να παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου, όπως το $O_2^{\cdot -}$, το H_2O_2 , το OH και το HOCl (Υποχλωρίτης). Η διαδικασία παραγωγής των μεταβολιτών του οξυγόνου από τα λευκοκύτταρα μέσω οξείδωσης της γλυκόζης και αυξημένης κατανάλωσης του οξυγόνου ονομάζεται Οξειδωτική ή Αναπνευστική Έκρηξη (Respiratory Burst). Η Οξειδωτική Έκρηξη μεταβολίζει οξειδωτικά την γλυκόζη μέσω της Παρακαμπτηρίου Οδού των Μονοφωσφορικών Εξαζών (Hexose monophosphate shunt) και διεγείρεται από παράγοντες όπως είναι τα μικροβιακά παράγωγα, τα ανοσοσυμπλέγματα, ο Παράγοντας C5a του Συμπληρώματος, τα εικοσανοειδή, τα οψωνοποιημένα σωματίδια και οι λεκτίνες. Η Οξειδωτική Έκρηξη απαιτεί την ενεργοποίηση του μεμβρανικού ενζύμου NADPH-Οξειδάση. Η NADPH-Οξειδάση αποτελεί ένα πολύπλοκο ενζυμικό σύμπλεγμα που αποτελείται από το Κυτόχρωμα b_{558} , μια Rac-GTP-πρωτεΐνη, και δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που ονομάζονται p67 και p47. Το Κυτόχρωμα b_{558} αποτελεί μια διμερή αιμοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από τις υπομονάδες gp91^{nox} και p22^{nox}. Η αιμοπρωτεΐνη αυτή συνδέεται με FAD (Φλαβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο). Όταν διεγερθεί η δραστηριότητα NADPH-Οξειδάσης μεταναστεύουν οι δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες p47 και p67 και η Rac-πρωτεΐνη στην κυτταρική μεμβράνη και συνδέονται με το Κυτόχρωμα b_{558} . Το Κυτόχρωμα b_{558} συνδέει NADPH και μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στο οξυγόνο, δημιουργώντας $O_2^{\cdot -}$ (Rosen και συν, 1995). Επειδή η NADPH-Οξειδάση εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη οι Ελεύθερες Ρίζες εκκρίνονται προς τον εξωκυττάριο χώρο, εκτός εάν παράγονται από τμήμα της μεμβράνης που συμμετέχει στην δημιουργία φαγοσώματος (οπότε οι ρίζες εκκρίνονται μέσα στο φαγόσωμα). Η συγγενής διαταραχή στην διέγερση της NADPH-Οξειδάσης των ουδετερόφιλων πολυμορφοπυρήνων οδηγεί στην Χρόνια Κοκκιωματώδη Νόσο (Chronic Granulomatous Disease).

Κατά την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων παράγονται εικοσανοειδή, δηλαδή οξειδωτικοί μεταβολίτες του αραχιδονικού (εικοσιτετραενοϊκού) οξέος. Τέτοιες ουσίες είναι οι προσταγλανδίνες, οι λευκοτριένες, οι θρομβοξάνες και τα υδροξυ-εικοσιτετραενοϊκά οξέα (HETE). Κατά την διάρκεια των οξειδωτικών αντιδράσεων σχηματισμού των εικοσανοειδών παράγονται πολλές Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου. Επίσης είναι πιθανό ότι οι λευκοτριένες και τα HETE διεγείρουν την Οξειδωτική Έκρηξη.

Όταν όργανα ή ιστοί που ισχαιμούν αρχίσουν να αιματώνονται ξανά εμφανίζονται ορισμένα σημεία λειτουργικής και ιστολογικής βλάβης του οργάνου που δεν ήταν εμφανή κατά την φάση της ισχαιμίας. Αυτές οι διαταραχές που συνοδεύουν την ισχαιμία και επαναιμάτωση οφείλονται κατά ένα μέρος σε Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (Nahum και Sznajder, 1992). Συγκεκριμένα, κατά την ισχαιμία

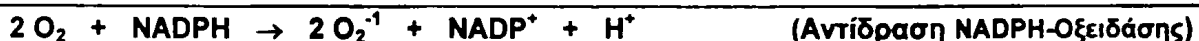
καταστέλλεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την συνεχή αποφωσφορυλίωση ATP και συσσώρευση AMP, το οποίο καταβολίζεται σε αδενοσίνη και υποξανθίνη. Κατά την επαναιμάτωση η Οξειδάση της Ξανθίνης θα μετατρέψει την υποξανθίνη σε ουρικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα O_2^{-1} το οποίο θα αντιδράσει με ιόντα σιδήρου και θα μετατραπεί σε OH-μέσω αντίδρασης Fenton, αλλά και σε H_2O_2 που είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό στους ισχαιμικούς ιστούς (Link και Riley, 1988, Tsimoyannis και συν, 1990).

Κεφάλαιο 4-2. Οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου και τα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα.

Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

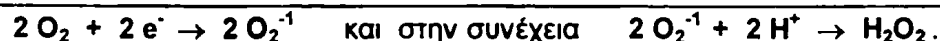
Όταν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διεγερθούν από έναν παράγοντα, όπως για παράδειγμα από την φαγοκυττάρωση ενός μικροοργανισμού ή άλλου ξένου σώματος, παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, ενεργοποίηση του μεμβρανικού ενζύμου NADPH-Οξειδάση, οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης από την Παρακαμπτήρια Οδό των Μονοφωσφορικών Εξοζών (Hexose Monophosphate Shunt) και τελικά παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών του Οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται Οξειδωτική Έκρηξη ή Αναπνευστική Έκρηξη (Respiratory Burst). Η παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου είναι ιδιαίτερα έντονη στα Ενεργοποιημένα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα. Μάλιστα η παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) και Ανιόντος Υπεροξειδίου (O_2^{-1}) από τα Ενεργοποιημένα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα είναι μια χαρακτηριστική τους ιδιότητα που έχει θεωρηθεί βιοχημικό κριτήριο της ενεργοποίησής τους (Kamovsky και Lazdins, 1978). Εκτός από H_2O_2 και O_2^{-1} , τα μακροφάγα παράγουν και 1O_2 , OH $^{\cdot}$ και HOCl. Μεταβολές στην παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου παρατηρούνται όχι μόνο στα Ενεργοποιημένα μακροφάγα (activated, immune) αλλά και στα Φλεγμονώδη ή Διεγερμένα μακροφάγα (inflammatory, stimulated, elicited). (Fantone και Ward, 1982).

Η NADPH-Οξειδάση ουσιαστικά αποτελεί ένα σύμπλεγμα ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από ενδομεμβρανική και κυτταροπλασματική μοίρα και περιέχει φλαβοπρωτεΐνες και το Κυτόχρωμα b-245 (Evered και συν., 1985, Zembala και Asherson 1989). Όταν φωσφορυλιωθεί και ενεργοποιηθεί, η κυτταροπλασματική μοίρα καταλύει μια αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου:



Επειδή το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, οι παραγόμενες Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου είτε διαχέονται στον εξωκυττάριο χώρο ή συγκεντρώνονται μέσα στα φαγοσώματα.

Η NADPH-Οξειδάση προκαλεί την δημιουργία Ανιόντος Υπεροξειδίου και Πρωτονιωμένου Ανιόντος Υπεροξειδίου (O_2^{-1} και HO_2^{\cdot}). Το H_2O_2 που παράγεται από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα σχηματίζεται έμμεσα από την επίδραση της Δισμουτάσης του Υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase) στο O_2^{-1} , (Nathan και Root, 1977). Έτσι η δημιουργία του H_2O_2 θα ακολουθεί την γενική αντίδραση:



Στα φαγοκύτταρα είναι σπάνια η αυτόματη (μη-ενζυμική) Αντίδραση Δισμουτάσης, διότι το pH του κυτταροπλάσματος δεν την επιτρέπει. Είναι όμως συχνή η απευθείας δημιουργία H_2O_2 από το O_2 με διπλή αντίδραση αναγωγής, όπως προκαλείται από την δράση της Οξειδάσης της Γλυκόζης. Σε

ότι αφορά την παραγωγή της Ρίζας Υδροξυλίου από τα μακροφάγα, αυτή επιτυγχάνεται και με τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss αλλά και από την αντίδραση του οξυγόνου με τα Λιπιδικά Υδροϋπεροξειδία. Τέλος η δημιουργία του Υποχλωρίτη (HOCl) επιτυγχάνεται από την δράση της Λυσοσωματικής Μυελοϋπεροξειδάσης των μονοκυττάρων στο H_2O_2 και το Cl^- και το παραγόμενο HOCl αποτελεί μια σπουδαία και ισχυρότατη αντιμικροβιακή ουσία. (Fantone και Ward, 1982).

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι σχεδόν όλα τα είδη μονοκύτταρων φαγοκυττάρων είναι ικανά να διεγερθούν για οξειδωτικό μεταβολισμό μέσω της Παρακαμπτηρίου Οδού των Μονοφωσφορικών Εξοζών, δίνοντας γένεση σε Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου. Έτσι, έχει παρατηρηθεί παραγωγή H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ από περιτοναϊκά μακροφάγα (Nathan και Root, 1977, Johnston και συν., 1978, Cohen και συν., 1981), μονοκύτταρα (Nakagawara και συν., 1981, Tarsi-Tsuk και Levy, 1990), μακροφάγα που διαφοροποιήθηκαν *in vitro* από μονοβλάστες και μυελομονοκύτταρα (Cooper και συν., 1984), ηπατικά μακροφάγα ή κύτταρα Kupffer (Matsuo και συν., 1985, Laskin και συν., 1988), βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Laskin και συν., 1994, Witzemann και Laskin, 1994). Ορισμένες εργασίες αναφέρουν ότι τα Ηπατικά μακροφάγα (Kupffer) δεν παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου (Leray και συν., 1985). Ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη ο τύπος του πειραματοζώου, η τεχνική απομόνωσης των κυττάρων, η διαδικασία ενεργοποίησης και η μέθοδος μέτρησης των μεταβολιτών του οξυγόνου μπορούν να επηρεάσουν ή να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα πειραμάτων αυτού του είδους. Σε γενικές γραμμές όμως τα ηπατικά μακροφάγα παράγουν μικρότερες ποσότητες H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ από ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα (Laskin και συν., 1988). Μια πιθανή εξήγηση της μειωμένης ικανότητας των κυττάρων Kupffer να παράγουν είναι ότι η συνεχής έκθεσή τους σε LPS και γηρασμένα ερυθροκύτταρα καταστέλλει τις οξειδωτικές αντιδράσεις τους ώστε να βλάπτεται το ηπατικό παρέγχυμα (Ding και Nathan, 1988).

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται για παραγωγή H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ από μια σειρά διαφορετικούς διεγέρτες. Εδώ όμως πρέπει να διευκρινιστεί ότι η ενεργοποίηση (activation) των μακροφάγων δεν είναι ικανή να οδηγήσει από μόνη της στην παραγωγή των Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων ισοδυναμεί με την προετοιμασία ή «ευαισθητοποίηση» (priming) των κυττάρων αυτών για αυξημένο οξειδωτικό μεταβολισμό. Στην συνέχεια απαιτείται ένα δεύτερο βήμα, η διέγερση (triggering) των μακροφάγων από ουσίες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο Ca^{+2} (π.χ. ιονοφόρο A23187 ή Ιονομυκίνη) ή ουσίες που διεγείρουν την Πρωτεϊνική Κινάση C (π.χ. PMA ή DAG). Ο σκοπός του βήματος της διέγερσης είναι η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την NADPH-Οξειδάση (NADPH Oxidase) και προκαλεί την Αναπνευστική ή Οξειδωτική Έκρηξη (Respiratory Burst). Η Οξειδωτική Έκρηξη προκαλείται επίσης και όταν ενεργοποιημένα μακροφάγα φαγοκυτταρώσουν σωματίδια *zymosan* ή ανοσοσυμπλέγματα ή οψωνοποιημένα ερυθροκύτταρα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παραγωγή των Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου είναι πάντα μια διαδικασία δύο διακριτών βημάτων (Nathan και Root, 1977, Cohen και συν., 1981).

Τα περιτοναϊκά μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν *in vivo* για αυξημένη παραγωγή H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εναιωρήματος BCG ή *Corynebacterium parvum* ή καζείνης (Nathan και Root, 1977, Johnston και συν., 1978) ή από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Θειογλυκολλικού ζυμού ή ενδοτοξίνης (Johnston και συν., 1978, Cohen και συν., 1981). Και τα

κύτταρα Kupffer ενεργοποιούνται *in vivo* από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση BCG και παράγουν αυξημένες ποσότητες Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (Matsuo και συν., 1985) . Τέλος τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού ενεργοποιούνται *in vivo* από ενδοφλέβια χορήγηση ενδοτοξινών και παρουσιάζουν σημαντική έκκριση H_2O_2 και O_2^{-1} (Wizemann και Laskin, 1994) .

Τα περιτοναϊκά μακροφάγα και τα μακροφάγα της σειράς J774.1 ενεργοποιούνται *in vitro* από την βακτηριδιακή ενδοτοξίνη (LPS) ή τα μυκοβακτηριδιακά Μουραμυλ-διπεπτιδία (MDP) για αυξημένη παραγωγή O_2^{-1} (Pabst και Johnston, 1980) . Έχει αποδειχθεί ότι όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα ή τα κύτταρα της σειράς PU5-1.8F7 επωαστούν *in vitro* με συνδυασμό MDP και σεροτονίνης παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση Δραστικών Ριζών Οξυγόνου , λόγω αλληλεπίδρασης στον υποδοχέα του διπεπτιδίου (Silverman και συν., 1985) . Επίσης τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που διαφοροποιήθηκαν από προμονοκύτταρα σε κυτταροκαλλιέργεια μπορούν να ενεργοποιηθούν *in vitro* από LPS (Cooper και συν., 1984) . Τα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται *in vitro* από λιποτειχοϊκό Οξύ (LTA) της στρεπτοκοκκικής κυτταρικής μεμβράνης για αυξημένο οξειδωτικό μεταβολισμό (Tarsi-Tsuk και Levy, 1990) . Τέλος , μια παρατήρηση με μεγάλη σημασία για την παθοφυσιολογία των χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων του πνεύμονα είναι ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα σε κυτταροκαλλιέργεια ενεργοποιούνται από τα προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου και από συνθετικά πολυπεπτιδία κολλαγόνου και εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες O_2^{-1} και H_2O_2 (Laskin και συν., 1994) . Επειδή οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου και τα λυσοσωματικά ένζυμα που εκκρίνουν τα μακροφάγα προκαλούν συνεχή διάσπαση του ιστικού κολλαγόνου , τα μακροφάγα της φλεγμονώδους εστίας θα είναι συνεχώς ενεργοποιημένα .

Μία από τις κυριότερες ουσίες που ενεργοποιούν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα για αυξημένη παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου και αυξημένη αντιμικροβιακή δράση είναι η Ιντερφερόνη- γ (Nathan και συν., 1983 , Freund και Pick, 1985) . Η Ιντερφερόνη- γ ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, επιδρώντας κυρίως στην παραγωγή H_2O_2 (Murray και συν., 1985 , Nathan και συν., 1985, Schaffner και Rellstab, 1988) . Επειδή αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση κατά ενδοκυττάρων παρασίτων (π.χ. *Toxoplasma*, *Leishmania* και *Listeria*) και ενεργοποιεί την παραγωγή H_2O_2 από ανοσοκατασταλμένα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (π.χ. από ασθενείς με προχωρημένες νεοπλασίες ή μετά από παρατεταμένη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών) έχει αξιολογηθεί η κλινική χρησιμοποίηση της λεμφοκίνης αυτής (Murray και συν., 1985 , Nathan και συν., 1985, Schaffner και Rellstab, 1988 , Jaffe και Herberman, 1988) . Σε αντίθεση με την Ιντερφερόνη- γ , η Ιντερφερόνη- β καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα (Boraschi και συν., 1983) .

Η διέγερση (triggering) της Οξειδωτικής Έκρηξης επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους , από τους οποίους οι συνηθέστεροι είναι η έκθεση των μακροφάγων σε PMA ή άλλο ενεργοποιητή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C , η φαγοκυττάρωση σωματιδίων zymosan ή συσσωματωμάτων (aggregates) ανοσοσφαιρινών ή οψωνοποιημένων ερυθροκυττάρων και τέλος η έκθεση σε A23187 ή Ιονομυκίνη ή άλλες ουσίες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο . Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί συνδυασμοί μιτογόνων ουσιών , όπως η WGA (Wheat Germ Agglutinin) μαζί με Κυτοχλασίνη-E και η Con-A (Concanavalin-A) μαζί με Κυτοχλασίνη-B . Ένας ακόμα σπουδαίος διεγέρτης της Οξειδωτικής

Έκρηξης είναι ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) ο οποίος προκαλεί σημαντική έκκριση O_2^{-1} από τα περιτοναϊκά μακροφάγα (Hartung, 1983). Επίσης έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η πρόκληση έντονης οξειδωτικής δραστηριότητας από τον Παράγοντα C5a του Συμπληρώματος, η οποία οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων O_2^{-1} από τα περιτοναϊκά και τα ηπατικά μακροφάγα (Laskin και συν., 1988). Τα δύο αυτά φαινόμενα έχουν μεγάλη σημασία στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής αφού ο C5a και ο PAF παράγονται σε μεγάλες ποσότητες στις φλεγμονώδεις εστίες. Δεν πρέπει όμως να δημιουργηθεί η εντύπωση ότι κάθε βιοδραστική ή μιτογόνο ουσία ενεργοποιεί την Οξειδωτική Έκρηξη. Για παράδειγμα η Ενδοθηλίνη και ο Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (PDGF), δύο ουσίες με μιτογόνο δραστηριότητα και κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης, δεν προκαλούν την παραγωγή O_2^{-1} από τα μονοκύτταρα (Bath και συν., 1990).

Πολλοί ερευνητές είχαν αμφισβητήσει την ικανότητα των κυττάρων Kupffer να αναπτύσσουν Οξειδωτική Έκρηξη και να παράγουν O_2^{-1} ή H_2O_2 . Σήμερα όμως υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις που δείχνουν ότι τα κύτταρα Kupffer πρέπει να αφεθούν μερικές μέρες σε καλλιέργεια χωρίς διεγέρτες για να «ηρεμήσουν» και στην συνέχεια αποκτούν οξειδωτικό μεταβολισμό. Όταν τα κύτταρα Kupffer φαγοκυτταρώσουν σωματίδια *zymosan* in vitro χωρίς προηγούμενη ενεργοποίησή τους, παρατηρείται διέγερση της NADPH-Οξειδάσης, έντονος οξειδωτικός μεταβολισμός και παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων O_2^{-1} (Bhatnagar, 1981, Ding και Nathan, 1988). Η ικανότητα αυτή των μακροφάγων του ήπατος να αντιδρούν στην φαγοκυττάρωση με αυξημένη έκκριση Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση οφείλεται μάλλον στο ότι τα κύτταρα Kupffer εκτίθενται συνεχώς σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα και σε βακτηριακές ενδοτοξίνες που φέρονται από την πυλαία φλέβα και έτσι είναι πάντα σε κατάσταση «ενεργοποίησης» (Ding και Nathan, 1988, Decker, 1990).

Τα μονοκύτταρα του αίματος είναι ικανά να παράγουν μεγάλες ποσότητες Ανιόντος Υπεροξειδίου χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση αλλά μόνο με διέγερση από PMA ή *zymosan*. Κατά την in vitro ωρίμαση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα παρατηρείται αρχικά μια παροδική αύξηση της ικανότητας αυτής που όμως χάνεται κατά την διαφοροποίηση του μακροφάγου σε επιθηλιοειδές κύτταρο (Nakagawara και συν., 1981). Έτσι τα ώριμα μακροφάγα παράγουν σχετικά μικρές ποσότητες μεταβολιτών οξυγόνου χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση ενώ τα επιθηλιοειδή κύτταρα έχουν υποτυπώδη οξειδωτικό μεταβολισμό. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα Δισμουτάσης του Υπεροξειδίου (SOD) αυξάνεται σημαντικά κατά την ωρίμαση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και αυτό εξηγεί γιατί τα μονοκύτταρα παράγουν κυρίως O_2^{-1} ενώ τα μακροφάγα παράγουν κυρίως H_2O_2 . Επίσης η in vitro ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα από την 1,25-διυδροξυ-Βιταμίνη D_3 (καλσιτριόλη) συνοδεύεται από αυξημένη ικανότητα παραγωγής H_2O_2 χωρίς προηγούμενη διαφοροποίηση (Cohen και συν., 1986). Η επίδραση της Βιταμίνης D_3 στα μονοκύτταρα είναι εξίσου ισχυρή και παρατεταμένη με την επίδραση που προκαλεί η διαφοροποίηση με Ιντερφερόνη- γ και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Βιταμίνη D_3 προκαλεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί από την ικανότητα της Βιταμίνης D_3 να ενεργοποιεί in vitro τα μονοκύτταρα για αυξημένη καταστροφή μυκοβακτηριδίων *M.tuberculosis* και παράλληλα να αυξάνει σημαντικά την παραγωγή O_2^{-1} (Rook και συν., 1986). Και σε αυτή την μελέτη η επίδραση της βιταμίνης ήταν εξίσου ισχυρή με την επίδραση της Ιντερφερόνης- γ .

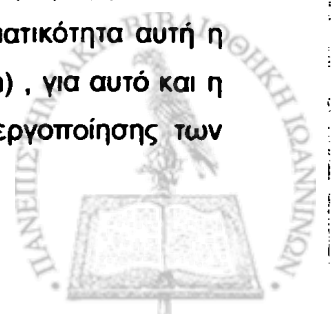
Τέλος, μακροφάγα των κυτταρικών σειρών J774.1, PU5-1.8 και P388D1 είναι ικανά να παράγουν Ανιόν Υπεροξειδίου μετά από έκθεση σε PMA ή φαγοκυττάρωση σωματιδίων zymosan, χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση (Johnston και συν., 1978). Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν O_2^{-1} σε ποσότητες περίπου όμοιες με αυτές που εκκρίνουν μονοκύτταρα που διεγείρονται με παρόμοια μέσα, αλλά αρκετά χαμηλότερες από αυτές που εκκρίνουν τα ώριμα μακροφάγα. Επίσης όλα τα κύτταρα που εξετάστηκαν στην μελέτη αυτή παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή O_2^{-1} μετά από διέγερση με φαγοκυττάρωση zymosan παρά με έκθεση σε PMA. Ορισμένες διαφορές στις ποσότητες O_2^{-1} που εκκρίνονται από τα κύτταρα των τριών σειρών (J774.1, PU5-1.8, P388D1) είναι αναμενόμενες αφού προέρχονται από διαφορετικούς τύπους μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Ακόμα και στο ίδιο όργανο τα μακροφάγα δύο διαφορετικών τύπων θα έχουν διαφορετική ικανότητα παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου. Έτσι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των επίμυων εκκρίνουν περισσότερο H_2O_2 και O_2^{-1} από τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού του ίδιου πειραματοζώου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση LPS (Wizemann και Laskin, 1994).

Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται για παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από ενδοκρινικές ορμόνες που εκκρίνονται από την υπόφυση. Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι η επώαση μονοκυττάρων με 10^{-10} M Μελατονίνη οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή O_2^{-1} και H_2O_2 και ότι η Μελατονίνη δρα συνεργικά με τον LPS προκαλώντας ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή O_2^{-1} και H_2O_2 (Morrey και συν., 1994). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι μονοκύτταρα που επωάζονται με Αυξητική Ορμόνη ή με Προλακτίνη ενεργοποιούνται για αυξημένη παραγωγή H_2O_2 και ανταποκρίνονται ευκολότερα στην διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C με πολύ υψηλή παραγωγή H_2O_2 .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Οι μηχανισμοί Δεύτερων Μηνυτάρων που διέπουν την παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου από τα μακροφάγα δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί πλήρως, είναι γνωστά όμως πολλά επιμέρους στοιχεία για αυτούς.

Η παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα είναι μια διαδικασία δύο βημάτων ((Nathan και Root, 1977, Cohen και συν., 1981). Στο πρώτο βήμα το φαγοκύτταρο «ευαισθητοποιείται» (priming) και αποκτά αυξημένη ικανότητα παραγωγής H_2O_2 και O_2^{-1} αλλά δεν παρουσιάζει οξειδωτικό μεταβολισμό. Στο δεύτερο βήμα το φαγοκύτταρο «διεγείρεται» (triggering) και ενεργοποιείται ο οξειδωτικός μεταβολισμός του, με αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O_2 και O_2^{-1} . Ουσιαστικά μόνο το δεύτερο βήμα (διέγερση) είναι απαραίτητο για την παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου, διότι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της Οξειδωτικής Έκρηξης ως ανταπόκριση σε κάποιο ερέθισμα (π.χ. στην φαγοκυττάρωση). Το πρώτο βήμα απλώς προετοιμάζει και ενισχύει τους οξειδωτικούς μηχανισμούς, ώστε να προκαλέσουν μεγαλύτερη παραγωγή O_2^{-1} και H_2O_2 όταν το μακροφάγο έρθει σε επαφή με το κατάλληλο ερέθισμα. Στην πραγματικότητα αυτή η «ευαισθητοποίηση» του μακροφάγου αντιστοιχεί στην Ενεργοποίησή του (Activation), για αυτό και η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου αποτελεί ένα από τα κριτήρια ενεργοποίησης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Kamovsky και Lazdins, 1978).



Δεν έχει διευκρινιστεί με ποιόν ακριβώς τρόπο η Ενεργοποίηση των μακροφάγων τα καθιστά ικανά να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου ως ανταπόκριση σε κάποιο ερέθισμα , αλλά πρέπει να υποθέσουμε ότι ανεξαρτήτως από τον παράγοντα που προκαλεί την Ενεργοποίηση (Ιντερφερόνη- γ , Λιπτοπαλυσσαχαρίτες, επαφή με ολόκληρους μικροοργανισμούς ή με καρκινικά κύτταρα κ.α.) τελικά κινητοποιούνται ορισμένοι κοινοί μηχανισμοί που είναι θεμελιώδεις για να αλλάξει η λειτουργική κατάσταση του μακροφάγου . Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η έκφραση ορισμένων γονιδίων , η μετατόπιση (translocation) πρωτεϊνών από ένα κυτταρικό διαμέρισμα σε ένα άλλο και η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων ενζύμων ή δομικών πρωτεϊνών . Φαίνεται ότι ένας ή περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για την αυξημένη σύνθεση και έκκριση H_2O_2 και O_2^{-1} .

Ένας πιθανός τρόπος με τον οποίο η Ενεργοποίηση του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου μπορεί να το «ευαισθητοποιήσει» για αυξημένη παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι ενδοτοξίνες επάγουν την παραγωγή δύο όξινων πρωτεϊνών με MB 42kDa και 68kDa , τις πρωτεΐνες MacMARCKS και MARCKS όπως και ότι προκαλούν την σύνδεσή τους με μυριστικό οξύ και την μετατόπισή τους (translocation) στην κυτταρική μεμβράνη (Aderem και συν., 1988 , Rosen και συν., 1989 , Li και Aderem 1992) . Επειδή αφενός αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν τα φυσικά υποστρώματα της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και διαμεσολαβούν ορισμένους σημαντικούς μηχανισμούς της ενεργοποίησης και αφετέρου η παραγωγή H_2O_2 και O_2^{-1} απαιτεί την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C , είναι πιθανό ότι η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών σε μεγάλες ποσότητες κατά την ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη να διευκολύνει την παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου όταν αργότερα το μακροφάγο διεγερθεί από κάποιο ερέθισμα . Σε αυτήν την υπόθεση συνηγορεί και το ότι η διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης και παραγωγής O_2^{-1} από το PMA και τα ανοσοσυμπλέγματα συνοδεύεται από την φωσφορυλίωση δύο κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από τις οποίες η μία είναι όξινη πρωτεΐνη με MB 42 kDa , πιθανότατα η πρωτεΐνη MacMARCKS (Kiyotaki και Bloom , 1984) .

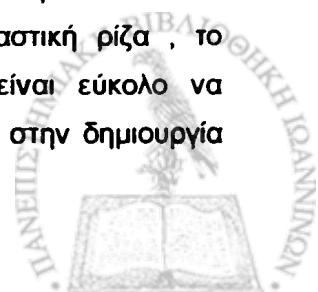
Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο η Ενεργοποίηση του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου μπορεί να το «ευαισθητοποιήσει» για αυξημένη παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου στηρίζεται στην παρατήρηση ότι η ενεργοποίηση με Ιντερφερόνη- γ προκαλεί την συσσώρευση Διακυλογλυκερόλης (DAG) στα μακροφάγα και ότι αυξάνει την ικανότητα του μακροφάγου να παράγει Διακυλογλυκερόλη όταν σε δεύτερο χρόνο διεγερθεί από κάποιο ερέθισμα (Sebaldt και συν., 1990) . Όμως η DAG είναι ο φυσικός ενεργοποιητής της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Bell, 1986) και κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με INF- γ έχουμε πάντα διέγερση της PKC (Fan και συν., 1988) . Ενδεχομένως η συσσώρευση της DAG στα ενεργοποιημένα με INF- γ μακροφάγα τα καθιστά ικανότερα να παράγουν H_2O_2 και O_2^{-1} μετά από διέγερση από κάποιο ερέθισμα , αφού θα ενεργοποιείται περισσότερο η PKC .

Ένας ακόμα μηχανισμός με τον οποίο η Ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να τα ευαισθητοποιεί για αυξημένη παραγωγή H_2O_2 και O_2^{-1} αφορά την έκφραση γονιδίων . Είναι γνωστό ότι η ενδοτοξίνη και η Ιντερφερόνη- γ προκαλούν την έκφραση ορισμένων κοινών γονιδίων με άγνωστο βιολογικό ρόλο , όπως τα γονίδια JE , KC , D3 , D5 , C7 , καθώς και τα ογκογονίδια c-fos και c-myc (Introna και συν., 1986 , Tannenbaum και Hamilton, 1989 , Hamilton και συν., 1989) . Ένας μηχανισμός με τον οποίον επιτυγχάνεται η αυξημένη γονιδιακή έκφραση από τις ενδοτοξίνες είναι η

ενεργοποίηση Κινασών της Τυροσίνης οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAP-Κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases) , οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν πολλά άλλα ένζυμα (Weinstein και συν., 1991 , Weinstein και συν., 1992 , Pelech και Sanghera, 1992 , Dong και συν., 1993) . Είναι πιθανό ότι κατά την Ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων εκφράζονται εντονότερα τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα ή πρωτεΐνες απαραίτητες για την Οξειδωτική Έκρηξη . Εναλλακτικά , μπορεί κατά την αλληλουχία ενεργοποιήσεων των Κινασών να φωσφορυλιώνονται και να ενεργοποιούνται πρωτεΐνες απαραίτητες για την Οξειδωτική Έκρηξη χωρίς να είναι απαραίτητη η έκφραση γονιδίων .

Το δεύτερο βήμα στην παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου είναι η «διέγερση» (triggering) των ενζύμων της Παρακαμπτηρίου Οδού των Μονοφωσφορικών Εξοζών και η έναρξη της Οξειδωτικής Έκρηξης (respiratory burst) . Το βήμα αυτό απαιτεί την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Δεν είναι γνωστό με ποιόν τρόπο ακριβώς η PKC διεγείρει την Οξειδωτική Έκρηξη αλλά θεωρείται πιθανό ότι αυτό οφείλεται στην φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης με MB 31.500 kDa , του Κυτοχρώματος-b245 (Cytochrome-b245) που αποτελεί τμήμα του συμπλέγματος της NADPH-Οξειδάσης (Evered και συν., 1986) . Αυτό διευκολύνεται από το ότι ίδια η ενεργοποίηση της PKC από την DAG προκαλεί την μετατόπισή της (translocation) από το κυτταρόπλασμα στις κυτταρικές μεμβράνες , εκεί όπου εντοπίζεται και το σύμπλεγμα της NADPH-Οξειδάσης (May και συν., 1985 , Wolf και συν., 1985a, Wolf και συν., 1985b , Zembala και Asherson, 1989) . Η Διακυλογλυκερόλη αυξάνει την συγγένεια της PKC για το Ca^{+2} , το οποίο είναι απαραίτητο για την δράση της Κινάσης (Nishizuka, 1992) . Επίσης η παρουσία Ca^{+2} επιταχύνει και επιτείνει την σύνδεση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C με τις κυτταρικές μεμβράνες και αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητά της , χωρίς όμως να προκαλεί το ίδιο την ενεργοποίηση της PKC . Έτσι οι ουσίες που προκαλούν την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για την ενεργοποίηση της PKC από την DAG και έτσι προκαλούν «ευαισθητοποίηση» των κυττάρων στην επίδραση ουσιών που διεγείρουν την PKC (May και συν., 1985 , Wolf και συν., 1985a, Wolf και συν., 1985b , Scully και συν., 1986) .

Η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στα μακροφάγα επιτυγχάνεται κυρίως από την δράση Φωσφολιπασών που οδηγούν στην παραγωγή DAG (Nishizuka, 1992 , Nakamura και Nishizuka , 1994) . Τέτοιες Φωσφολιπάσες είναι η Φωσφολιπάση C (που οδηγεί στην άμεση παραγωγή DAG) και η Φωσφολιπάση D (που οδηγεί στην έμμεση δημιουργία DAG, μέσω φωσφατιδικού οξέος) . Επίσης η PKC μπορεί να ενεργοποιηθεί από την Φωσφολιπάση A_2 η οποία προκαλεί την δημιουργία cis-ακόρεστων λιπαρών οξέων (π.χ. λινολεϊκό, αραχιδονικό) και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης , που όλα ενεργοποιούν την Κινάση C . Η in vitro διέγερση της Κινάσης C συνήθως επιτυγχάνεται με τους Μυριστικούς Εστέρες της Φορβόλης (PMA) . Ένα ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στα μακροφάγα από τους Μυριστικούς Εστέρες της Φορβόλης οδηγεί στην παραγωγή όχι μόνο Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου αλλά και Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου (π.χ. Νιτρικό Οξείδιο) που επίσης έχει σημαντική βιολογική δράση και που όταν αντιδράσει με τους μεταβολίτες του οξυγόνου δημιουργεί μια εξαιρετικά βιοδραστική ρίζα , το Υπεροξεονιτρικό Ανιόν (Li και συν., 1996) . Από τα παραπάνω στοιχεία είναι εύκολο να κατανοήσουμε την πολύπλοκη συμμετοχή των μηχανισμών Δεύτερων Μηνυτόρων στην δημιουργία της Οξειδωτικής Έκρηξης από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα .



Το Λιποτειχοϊκό Οξύ (LTA) του *Streptococcus faecalis* προκαλεί την παραγωγή Ανιόντος Υπεροξειδίου από τα μονοκύτταρα, όπως ακριβώς και η Ιονομυκίνη (που αυξάνει το ενδοκυττάριο Ca^{+2}) και το PMA (που διεγείρει άμεσα την PKC). Το LTA προκαλεί την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} των μονοκυττάρων σε 1-2 λεπτά και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος από την δράση της PLA_2 μέσα σε 15-20 λεπτά. Η χήλωση του Ca^{+2} με EGTA και η αναστολή της Φωσφολιπάσης A_2 με Ινδομεθακίνη ή με Κινακρίνη (quinacrine) αναστέλλουν την παραγωγή O_2^{-1} υπό την επίδραση του LTA ενώ δεν επηρεάζουν την παραγωγή του O_2^{-1} υπό την επίδραση του PMA. Φαίνεται ότι η πρόκληση Οξειδωτικής Έκρηξης από το LTA απαιτεί την διέγερση της PKC, η οποία επιτυγχάνεται από την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} και την ενεργοποίηση της PLA_2 (Tarsi-Tsuk και Levy, 1990). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή O_2^{-1} από μονοκύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνες ουσίες όπως η Κονκαναβαλίνη-A εξαρτάται από την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} και συνεπώς αν το Ca^{+2} χηλωθεί με EGTA μειώνεται η παραγωγή O_2^{-1} (Scully και συν., 1986).

Τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) παράγουν O_2^{-1} μετά από φαγοκυττάρωση σωματιδίων *zymosan* ή ανοσοσυμπλεγμάτων (Vieweg και Leslie, 1987, Decker, 1990). Ένα από τα πρώτα ενδοκυττάρια γεγονότα μετά από την φαγοκυττάρωση σωματιδίων *zymosan* είναι η παροδική αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} που ακολουθείται από μία δεύτερη παρατεταμένη αύξηση του Ca^{+2} και από την Οξειδωτική Έκρηξη. Η χήλωση του Ca^{+2} με EGTA και η καλλιέργεια των κυττάρων Kupffer σε θρεπτικό υλικό χωρίς ασβέστιο φαίνεται να αναστέλλουν την παραγωγή χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) από την έκκριση Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου, ενώ η αναστολή της Φωσφολιπάσης A_2 με Ινδομεθακίνη δεν επηρεάζει τον οξειδωτικό μεταβολισμό (Birmelin και Decker, 1983). Ούτε η χορήγηση δεξαμεθαζόνης που αναστέλλει την Φωσφολιπάση A_2 μέσω λιποκορτινών, αναστέλλει την παραγωγή O_2^{-1} από τα κύτταρα Kupffer μετά από διέγερση με *zymosan* ή με PMA (Dieter και συν., 1986). Επίσης η παραγωγή Ανιόντος Υπεροξειδίου δεν φαίνεται να εξαρτάται από την διέγερση της μεμβρανικής αντλίας Na^+/K^+ αφού μετά από διέγερση με *zymosan* ή PMA τα κύτταρα Kupffer παράγουν την ίδια ποσότητα O_2^{-1} εάν τους χορηγηθεί αμιλορίδη ή εάν καλλιερηθούν σε θρεπτικό υλικό χωρίς Na^+ (Dieter και συν., 1987). Σε μία μεταγενέστερη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας που είχε διαπιστώσει αρχικά την εξάρτηση της παραγωγής O_2^{-1} από το ασβέστιο ανακαλύφθηκε ότι η χήλωση του εξωκυττάρου Ca^{+2} με EGTA, η χήλωση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} με TMB-8 και η καλλιέργεια των κυττάρων Kupffer σε θρεπτικό υλικό χωρίς ασβέστιο δεν επηρεάζουν την παραγωγή O_2^{-1} (Dieter και συν., 1988). Στην τελευταία αυτή μελέτη αντί για μέτρηση της χημειοφωταύγειας μετρήθηκε άμεσα το παραγόμενο O_2^{-1} . Από όλα τα παραπάνω τελικά διαφαίνεται ότι η ενεργοποίηση της NADPH-Οξειδάσης και η Οξειδωτική Έκρηξη εξαρτώνται από την ενεργοποίηση της Φωσφολιπάσης C η οποία δημιουργεί την διακυλογλυκερόλη που στην συνέχεια διεγείρει την Πρωτεϊνική Κινάση C και οδηγεί στην παραγωγή O_2^{-1} (Decker, 1990).

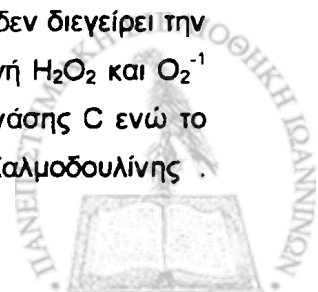
Τα προαναφερθέντα πειράματα αφορούσαν παραγωγή O_2^{-1} από κύτταρα Kupffer που δεν είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί. Η παραγωγή O_2^{-1} από κύτταρα Kupffer που είχαν ενεργοποιηθεί *in vivo* με βακτηρική ενδοτοξίνη φαίνεται να διέπεται από σχετικά διαφορετικούς μηχανισμούς. Έτσι στα ενεργοποιημένα ηπατικά μακροφάγα η έκκριση Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου οφείλεται στην διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C από το αραχιδονικό οξύ (Mayer και Spitzer, 1994). Οι αναστολείς της Φωσφολιπάσης A_2 και της PKC εμποδίζουν την παραγωγή O_2^{-1} από τα κύτταρα αυτά

ενώ αντιθέτως η χορήγηση αραχιδονικού οξέος την διεγείρει και την επιτείνει . Οι Κινάσες της Τυροσίνης και οι μεταβολίτες της Κυκλο-οξυγενάσης και Λιπο-Οξυγενάσης δεν επηρεάζουν καθόλου την Οξειδωτική Έκρηξη .

Τα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα παράγουν σημαντικές ποσότητες H_2O_2 και O_2^{-1} όταν διεγερθούν με το ιονοφόρο ασβεστίου A23187 ή zymosan . Ταυτοχρόνως παράγουν σημαντικές ποσότητες PGE_2 το οποίο δρα αυτοκρινικά και παρακρινικά και καταστέλλει την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου μέσω αύξησης του cAMP , εμποδίζοντας έτσι την υπερπαραγωγή H_2O_2 και O_2^{-1} (Weidemann και συν.,1978 , Smith και συν.,1980) . Η διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης από το A23187 καταστέλλεται από τους ειδικούς αναστολείς της Φωσφολιπάσης A_2 και της Λιπο-οξυγενάσης , από τους αναστολείς της Φωσφοδιεστεράσης και από τα συνθετικά ανάλογα του cAMP , ενώ δεν επηρεάζεται από τους αναστολείς της Κυκλο-οξυγενάσης (Lim και συν.,1983) . Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι στα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} διεγείρει την Πρωτεϊνική Κινάση C μέσω κάποιου παραγώγου του αραχιδονικού οξέος ή κάποιου μεταβολίτη του από την οδό της Λιπο-οξυγενάσης ενώ ουσίες που αυξάνουν το cAMP όπως η PGE_2 καταστέλλουν αυτή την διαδικασία διέγερσης . Οι αναστολείς της Φωσφοδιεστεράσης προκαλούν την αύξηση του cAMP και στα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και καταστέλλουν έτσι την παραγωγή H_2O_2 μετά από διέγερση με zymosan (Dent και συν.,1994) το οποίο δείχνει ότι οι κατασταλτικές επιδράσεις της οδού του cAMP στην Οξειδωτική Έκρηξη είναι κοινές για πολλά είδη μακροφάγων . Εκτός από την διέγερση της παραγωγής H_2O_2 και O_2^{-1} , η οδός του cAMP καταστέλλει και την γενικότερη ενεργοποίηση των μακροφάγων (Tannenbaum και Hamilton,1989) .

Πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη το είδος του πειραματοζώου όταν γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνητικών ομάδων . Έτσι , υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι στα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα από μύες CF-1 η παραγωγή O_2^{-1} αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή αλλά όχι από τους ειδικούς αναστολείς της Φωσφολιπάσης A_2 οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι στα κύτταρα αυτά η δράση των γλυκοκορτικοειδών δεν επιτυγχάνεται μέσω Λιποκορτινών (Schultz και συν.,1985) . Επίσης δεν είναι δυνατή η σύγκριση με άλλα πειράματα όπου η διέγερση της Οξειδωτικής Έκρηξης επιτεύχθηκε με ιονοφόρο A23187 (που ενεργοποιεί μέσω ασβεστίου την Φωσφολιπάση A_2) διότι στα πειράματα των Schultz και συνεργατών χρησιμοποιήθηκε zymosan (που ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C) ή PMA (που διεγείρει απευθείας την PKC) .

Ο Ενεργοποιητής των Αιμοπεταλίων (PAF) διεγείρει την παραγωγή O_2^{-1} από φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα και ο Ανταγωνιστής της Καλμοδουλίνης W-7 μειώνει τα επίπεδα του παραγόμενου Ανιόντος Υπεροξειδίου (Hartung,1983) . Η προσθήκη PAF σε καλλιέργειες φυσιολογικών μονοκύτταρων φαγοκυττάρων επίσης προκαλεί την έκκριση Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου καθώς και την παραγωγή Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης (IP_3) και Διακυλογλυκερόλης (Huang και συν.,1988) . Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι το PMA προκαλεί την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου όπως ακριβώς προκαλεί και ο PAF , ενώ το Ιονοφόρο A23187 δεν διεγείρει την Οξειδωτική Έκρηξη . Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο PAF προκαλεί την παραγωγή H_2O_2 και O_2^{-1} μέσω διέγερσης της οδού Φωσφολιπάσης C - Διακυλογλυκερόλης - Πρωτεϊνικής Κινάσης C ενώ το κυτταροπλασματικό Ca^{+2} απλώς ευοδώνει την λειτουργία της PKC μέσω της Καλμοδουλίνης .



Πράγματι έχει διαπιστωθεί ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα διαθέτουν δύο τύπους υποδοχέων για τον PAF και ότι η σύνδεση του PAF στους υποδοχείς ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C και οδηγεί στην παραγωγή IP_3 , IP_4 και DAG (Petric και συν., 1988). Επίσης προκαλείται η φωσφορυλίωση τεσσάρων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες φωσφορυλιώνονται και όταν τα μακροφάγα διεγερθούν με PMA ή LPS.

Έχει αποδειχθεί ότι το Νιτρικό Οξειδίο αναστέλλει την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από τα Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, επιδρώντας απευθείας σε κάποια υποομάδα της NADPH-Οξειδάσης (Clancy και συν., 1992). Είναι πιθανό να συμβαίνει το ίδιο και στα μακροφάγα.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου που παράγονται και εκκρίνονται από τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού κατά μικροοργανισμών και κατά καρκινικών κυττάρων (Nathan και συν., 1980, Nathan, 1982). Ωστόσο αυτή η ιδιότητα των μακροφάγων να παράγουν Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου φθίνει με την ηλικία του οργανισμού (Alvarez και συν., 1995). Έχει όμως αποδειχθεί ότι η απώλεια της ικανότητας των μακροφάγων για παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου σε γηρασμένα πειραματόζωα μπορεί να διορθωθεί με μεταμόσχευση ιστού υπόφυσης από νεαρά πειραματόζωα (Davila και συν., 1990).

Η παραγωγή H_2O_2 , O_2^{-1} και OH από τα ενεργοποιημένα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα είναι ένας σημαντικός αντιμικροβιακός μηχανισμός (Johnston, 1978). Έχει διαπιστωθεί ότι αυτοί οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην καταστροφή διαφόρων μικροοργανισμών και ενδοκυττάρων παρασίτων όπως *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium* και *Leishmania* (Murray και συν., 1985, Lepay και συν., 1985, Rook και συν., 1986, Mauel και Buchmuller-Rouiller, 1987, Schaffner και Reilstab, 1988, McNeely και Turco, 1990). Η ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση, γιατί ορισμένα ενδοκυττάρια παράσιτα διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς με τους οποίους προστατεύονται από τις χαμηλές δόσεις των Δραστικών Μεταβολιτών του Οξυγόνου (Mauel και Buchmuller-Rouiller, 1987, McNeely και Turco, 1990). Επίσης, σε ότι αφορά τα ευκαιριακά παθογόνα *Mycobacterium avium* και *intracellulare*, το H_2O_2 που παράγεται από τα μονοκύτταρα δρα παρακρινικά και προκαλεί την Απόπτωση των μονοκυττάρων που έχουν προσβληθεί από τα μικρόβια αυτά (Laochumroonvoragong και συν., 1996). Η Απόπτωση των μονοκυττάρων είναι ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός του σώματος γιατί αποτρέπει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων και οδηγεί στην ταχεία και μαζική καταστροφή μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών. Η ικανότητα των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου να καταστρέφουν μικρόβια στον εξωκυττάριο χώρο παρεμποδίζεται από την παρουσία των ερυθρών αιμοσφαιρίων τα οποία δεσμεύουν τις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου και τις αδραντοποιούν (Kim και συν., 1996). Όμως όταν οι μικροοργανισμοί φαγοκυτταρωθούν, οι Ελεύθερες Ρίζες που εκκρίνονται μέσα στο φαγόσωμα είναι ιδιαίτερα τοξικές και δρουν ανεμπόδιστες. Οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου προκαλούν επίσης την αλκαλοποίηση του pH του φαγώσματος, δίνοντας την ευκαιρία σε Ουδέτερες Πρωτεάσες να ενεργοποιηθούν και να δράσουν στις μικροβιακές πρωτεΐνες. Τέλος στην καταστροφή των μικροοργανισμών συμμετέχουν και τα προϊόντα της Λυσοσωματικής Μυελοϋπεροξειδάσης των μονοκυττάρων (Brunk και Cadenas,

1988, Hauschildt και Kleine, 1995). Η ικανότητα παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 κατά την φαγοκυττάρωση δεν περιορίζεται στα μακροφάγα που προαναφέρθηκαν. Την ίδια ικανότητα έχουν και τα μεσαγγειακά μακροφάγα του νεφρού (Baud και συν., 1983).

Η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου είναι επίσης ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός καταστροφής καρκινικών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι τόσο τα φλεγμονώδη (inflammatory, elicited) όσο και τα ενεργοποιημένα (activated, immune) μακροφάγα όταν διεγερθούν με PMA παράγουν σημαντικές ποσότητες H_2O_2 , το οποίο είναι υπεύθυνο για την in vitro καταστροφή καρκινικών κυττάρων-στόχων (Nathan και συν., 1979a, Nathan και συν., 1979b). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που έρχονται σε επαφή με οψωνοποιημένα καρκινικά κύτταρα διεγείρονται αυτόματα (χωρίς την μεσολάβηση του PMA) και παράγουν μεγάλες ποσότητες H_2O_2 , το οποίο στην συνέχεια καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα (Nathan και Cohn, 1980). Η in vivo ενεργοποίηση των μονοκυττάρων με παρεντερική χορήγηση Ιντερφερόνης- γ οδηγεί στην ενεργοποίησή τους και στην αυξημένη παραγωγή H_2O_2 που είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους η INF- γ έχει προταθεί ως επικουρικό φάρμακο στην θεραπεία των καρκινοπαθών (Nathan και συν., 1985, Jaffe και Herberman, 1988). Η παρεντερική χορήγηση INF- γ διεγείρει την παραγωγή H_2O_2 και από τα ιστικά μακροφάγα που συσσωρεύονται στην νεοπλασματική εστία ή που αντιμετωπίζουν ευκαιριακά παθογόνα, μια ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική αφού έχει δείχθει ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν ουσίες που καταστέλλουν την δράση της NADPH-Οξειδάσης και εμποδίζουν την παραγωγή H_2O_2 από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Tsunawaki και Nathan, 1986).

Η παραγωγή H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ και OH από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα έχει συσχετιστεί με πολλές ακόμα παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η καταστροφή του αρθρικού υμένα στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Hoffstein και συν., 1988) και η διαιώνιση της φλεγμονώδους αντίδρασης και της ιστικής βλάβης στις φλεγμονώδεις πνευμονοπάθειες (Laskin και συν., 1994). Ανάμεσα στα κύτταρα που μπορούν να καταστραφούν από την επίδραση των διάφορων Ελευθέρων Ριζών είναι και τα ίδια τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Forman και συν., 1987).

Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η συμμετοχή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου στην παθοφυσιολογία της Διάμεσης Πνευμονικής Ίνωσης που ακολουθεί την αμιάντωση (Simeonova και Luster, 1995). Όχι μόνο οι ίνες αμιάντου διεγείρουν την Οξειδωτική Έκρηξη από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, αλλά επίσης οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου εκτός από την καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος δρουν παρακρινικά και διεγείρουν την παραγωγή TNF- α και IL-1 από τα παρακείμενα μακροφάγα, οι οποίες ουσίες επιτείνουν την φλεγμονώδη αντίδραση. Αυτή η ικανότητα των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου να διεγείρουν τα μακροφάγα για παραγωγή TNF- α και IL-1 είναι ένα μόνο από τα παραδείγματα της επίδρασης των ουσιών αυτών στην μεταγωγή μηνυμάτων. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι το H_2O_2 προκαλεί την παραγωγή εικοσανοειδών από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, διεγείροντας την Φωσφολιπάση A_2 μέσω μιας οδού ανεξάρτητης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Sprott και συν., 1990). Ένα άλλο παράδειγμα της επίδρασης του H_2O_2 στην μεταγωγή μηνυμάτων είναι η ικανότητά του να ενεργοποιεί τον Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B και να καταστέλλει την ενεργοποίηση του Παράγοντα Μεταγραφής AP-1. Έτσι το H_2O_2 που παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα ενεργοποιεί τον Παράγοντα NF κ B των T-λεμφοκυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον ιό HIV-1 και προκαλούν την μεταγραφή του γονιδιώματος του ιού και κατά

συνέπεια τον πολλαπλασιασμό του (Schreck και συν., 1991, Meyer και συν., 1993, Kaii και Forman, 1996). Μετά από Οξειδωτικό Stress (π.χ. έκθεση σε H_2O_2) τα μακροφάγα αποπλάτυνονται. Αυτή η μεταβολή της μορφολογίας τους διαμεσολαβείται από τρεις MAP-Κινάσες, τις p38, p42 και p44, που προκαλούν την έκφραση του γονιδίου *egr-1* (Ogura και Kitamura, 1998). Οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 διεγείρουν άμεσα και την JNK-Κινάση, τις GTP-πρωτείνες Ras και Rac και τέλος ορισμένες Φωσφατάσες της Tyrosίνης (Finkel, 1998).

Επίσης είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα του αίματος παράγοντας H_2O_2 καταστέλλουν την διέγερση των NK-κυττάρων (Natural Killer cells) αλλά είναι αδιευκρίνιστος ακόμα ο τρόπος με τον οποίο το H_2O_2 των μονοκυττάρων επηρεάζει τα NK-κύτταρα (Hellstrand και συν., 1994). Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου διεγείρουν άμεσα το κυτταροπλασματικό ένζυμο Γουανυλική Κυκλάση και έτσι μόρια όπως το H_2O_2 και το $O_2^{\cdot-}$ είναι δυνατόν να προκαλέσουν την αύξηση του cGMP στα κύτταρα-στόχους, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση μηχανισμών μέσω της Εξαρτημένης από το cGMP Πρωτεϊνικής Κινάσης ή μέσω Εξαρτημένων από το cGMP Διαύλων Ιόντων (Waldman και Murad, 1987).



Κεφάλαιο 5 . Η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και άλλων Ελεύθερων (Δραστικών) Ριζών Αζώτου .

Κεφάλαιο 5-1 . Γενικά για το Νιτρικό Οξείδιο και τις άλλες Δραστικές Ρίζες Αζώτου .

ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Το Νιτρικό Οξείδιο (NO) είναι ένα μικρό αλλά ιδιαίτερα βιοδραστικό μόριο με πολλαπλές και σημαντικές επιδράσεις στο σώμα και συμμετοχή σε πολλούς φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς . Η τεράστια σημασία του για τις λειτουργίες του σώματος είναι δυσανάλογη με το μικρό του μέγεθος και την απλή του χημική δομή . Υπό κανονικές συνθήκες το Νιτρικό Οξείδιο είναι αέριο με μικρό χρόνο ημιζωής και υψηλή χημική δραστηριότητα χάρις στο ασύζευκτο (μονήρες) ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του ηλεκτρονιακή στοιβάδα . Δεν πρέπει να το συγχέουμε με το Νιτρώδες Οξείδιο (N_2O) , το αέριο που χρησιμοποιείται στην αναισθησιολογία . Ωστόσο , το Νιτρικό Οξείδιο ανευρίσκεται στην διεθνή βιβλιογραφία και με ένα άλλο όνομα , ως Ενδοθηλιακός Αγγειοχαλαρωτικός Παράγοντας (EDRF , Endothelial-Derived Relaxing Factor) .

- Το Νιτρικό Οξείδιο οφείλει την βιολογική δραστηριότητά του και την τοξικότητά του στο ελεύθερο (ασύζευκτο / μονήρες) ηλεκτρόνιο της εξωτερικής του στοιβάδας (στοιβάδα σθένους) . Αυτή η δομή του το καθιστά μια Ελεύθερη Ρίζα (Free Radical) του αζώτου , ή σύμφωνα με άλλη ονοματολογία έναν Δραστικό Μεταβολίτη του Αζώτου (Reactive Nitrogen Intermediate , RNI) .

Ανάμεσα στις πολλαπλές βιολογικές επιδράσεις του Νιτρικού Οξειδίου (NO) , οι τρεις σημαντικότερες είναι η δράση του ως νευρομεταβιβαστής , η δράση του ως αγγειοχαλαρωτικός παράγοντας και η χρησιμοποίησή του από τα λευκοκύτταρα για την καταστροφή μικροοργανισμών και νεοπλασματικών κυττάρων , χωρίς ωστόσο να υποτιμώνται άλλες επιδράσεις , όπως η συμμετοχή στην στύση του πέους και στην αναστολή της ενεργοποίησης και συγκόλλησης των αιμοπεταλίων . (Snyder και Bredt, 1992 , Kiechle και Malinski, 1993) .

ΔΟΜΗ , ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ .

Το Νιτρικό Οξείδιο (Nitric Oxide, NO^\cdot) ανήκει σε μία ευρύτερη οικογένεια ουσιών που ονομάζονται Μονοξειδία του Αζώτου (Nitrogen Monoxides) και περιλαμβάνει επίσης το Κατιόν Νιτροσονίου (Nitrosonium Cation, NO^+) και το Ανιόν Νιτροξυλίου (Nitroxyl Anion, NO^-) . Και οι τρεις αυτές οι ουσίες αποτελούν Οξειδοαναγωγικές Χημικές Οντότητες (Redox species) , δηλαδή μορφές με τις οποίες το Μονοξείδιο του Αζώτου συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις . Οι ιδιότητές τους φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα ((Stamler και συν., 1992) .

ΜΟΡΙΟ ΑΖΩΤΟΥΧΑΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΜΗΚΟΣ ΔΕΣΜΟΥ (Å^0)	N-O STRETCH (cm^{-1}) (ΔΟΝΗΣΗ ΤΑΣΗΣ ΔΕΣΜΟΥ)
ΝΙΤΡΙΚΟ ΟΞΕΙΔΙΟ (NO^\cdot)	2+	1,15	1840
ΑΝΙΟΝ ΝΙΤΡΟΣΟΝΙΟΥ (NO^+)	3+	0,95	2300
ΚΑΤΙΟΝ ΝΙΤΡΟΞΥΛΙΟΥ (NO^-)	1+	1,26	1290

Το Νιτρικό Οξείδιο είναι αέριο άχρωμο και άοσμο . Δύσκολα συμπυκνώνεται και υγροποιείται . Το σημείο ζέσεώς του είναι $-151,7^\circ\text{C}$, το σημείο τήξεώς του είναι $-163,6^\circ\text{C}$ και ο αριθμός οξειδωσής του είναι +2 . Τα δύο άτομα ενώνονται μεταξύ τους με έναν διπλό ομοιοπολικό δεσμό . Το NO

διαθέτει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο $2p-\pi$ αντιδεσμικό τροχιακό (antibonding orbital). Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο τροχιακό αυτό οδηγεί στην δημιουργία του Ανιόντος Νιτροξυλίου, με αύξηση του μήκους του δεσμού N-O και μείωση της δόνησης τάσης του δεσμού. Η αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από το τροχιακό αυτό οδηγεί στην δημιουργία του Κατιόντος Νιτροσονίου με μείωση του μήκους του δεσμού N-O και αύξηση της δόνησης τάσης. Από τα τρία Μονοξειδία του Αζώτου, μόνο το Νιτρικό Οξείδιο διαθέτει ουδέτερο ηλεκτρικό φορτίο, μια ιδιότητά που εξηγεί την ευκολία διάχυσής του σε υδατικά διαλύματα και μέσα από φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Ωστόσο, το NO είναι ένα αέριο σχετικά δυσδιάλυτο στο νερό.

Το Νιτρικό Οξείδιο έχει υψηλή χημική δραστηριότητα και οι σημαντικότερες από τις αντιδράσεις που δίνει είναι με την Δίρριζα του Οξυγόνου (dioxygen) στις οξειδοαναγωγικές της μορφές (O_2 , O_2^{-1} και O_2^{-2}) και με τα ιόντα των Στοιχείων Μετάπτωσης (π.χ. Fe, Cu, Co και Mn). Επίσης το NO μπορεί να αντιδράσει και με μια μεγάλη ποικιλία από άλλες ελεύθερες ρίζες.

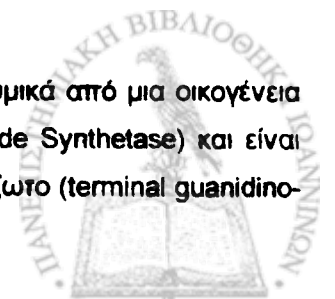
Η αντίδραση του NO με το O_2 γίνεται και στην αέρια φάση και σε υδατικά διαλύματα και αποτελεί μια πολύπλοκη αντίδραση δεύτερης τάξης ως προς το NO. Το Νιτρικό Οξείδιο αντιδρά επίσης με το Ανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{-1}) και δίνει το Υπεροξεονιτρικό Ανιόν (Peroxynitrite, $OOONO^{-1}$), μια ιδιαίτερα τοξική ρίζα με μεγάλη βιολογική σημασία. Το NO δημιουργεί εύκολα ενώσεις με τα ιόντα των Στοιχείων (Μετάλλων) Μετάπτωσης, ακόμα και με εκείνα που περιλαμβάνονται στις μεταλλοπρωτεΐνες (π.χ. τον σίδηρο της αίμης της αιμοσφαιρίνης). Το Νιτρικό Οξείδιο αντιδρά με τον Fe^{+2} της αιμοσφαιρίνης πολύ ευκολότερα από ότι αντιδρά το O_2 και επίσης συνδέεται με τις (Fe^{+3})-πορφυρίνες και δημιουργεί σύμπλοκα $Fe^{+3}NO$ που μετατρέπονται γρήγορα σε $Fe^{+2}NO^+$. Ωστόσο, ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον έχει η αντίδραση του NO με τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου σε ένζυμα όπως η Ακονιτάση, η Αναγωγή των Ριβονουκλεοτιδίων και τα μιτοχονδριακά ένζυμα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε τέτοιες αντιδράσεις οφείλεται μερικώς η κυτταροτοξική δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων, τα οποία παράγουν NO που ενώνεται με τα μιτοχονδριακά αναπνευστικά ένζυμα των κυττάρων-στόχων και σχηματίζει σιδηρο-δινιτριζολυλο-διθειολικά συμπλέγματα. Μετά την συνένωση του Νιτρικού Οξειδίου και του Στοιχείου Μετάπτωσης, το NO του συμπλέγματος μπορεί να συμπεριφέρεται σαν ρίζα NO^{+1} ή NO^{-1} , δίνοντας γένεση σε νέες αντιδράσεις με ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα (electrophiles). (Stamler και συν., 1992).

Το Κατιόν Νιτροσονίου μπορεί να υπάρχει σε ελεύθερη μορφή σε όξινα υδατικά διαλύματα αλλά όχι σε ασθενώς όξινα ή ουδέτερα διαλύματα. Στις ουδέτερες συνθήκες ορισμένες νιτροξοενώσεις λειτουργούν ως φορείς του NO^{+1} . Τέτοιες ενώσεις είναι οι νιτροσαμίνες, οι θειονιτρίτες, οι αλκυλονιτρίτες και τα δύο οξείδια του διαζώτου (N_2O_3 και N_2O_4). Το NO^{+1} δίνει αντιδράσεις προσθήκης και υποκατάστασης με οργανικά μόρια που διαθέτουν θειολικές ομάδες ή αρωματικούς δακτυλίους (Stamler και συν., 1992).

Το Ανιόν Νιτροξυλίου δίνει αντιδράσεις κυρίως στην αέρια φάση, αλλά και σε υδατικά διαλύματα μπορεί να ενωθεί με τον Fe^{+3} της αίμης και με θειολικές ομάδες σε ποικίλες πρωτεΐνες.

ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ.

Στα σπονδυλωτά ζώα, τα Μονοξειδία του Αζώτου παράγονται ενζυμικά από μια οικογένεια ενζύμων που λέγονται Συνθετάσες του Νιτρικού Οξειδίου (NOS, Nitric Oxide Synthetase) και είναι ομόλογες της Αναγωγάσης του Κυτοχρώματος P450. Το τελικό γουανιδινο-άζωτο (terminal guanidino-



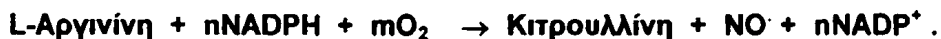
nitrogen) της Αργινίνης υφίσταται οξειδωση με πέντε ηλεκτρόνια και την συνεργεία του αναχθέντος Νικοτινάμιδο-αδένινο-φωσφοδινουκλεοτιδίου (NADPH) και Φλαβινών (flavins) . Επίσης είναι απαραίτητη η παρουσία Θειολών και της Τετραϋδρο-βιοπτερίνης για την αντίδραση .

Η αντίδραση σύνθεσης του NO ξεκινά με την αναγωγή του Fe^{+3} της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και την ενεργοποίηση δύο μορίων O_2 . Ένα ζεύγος ατόμων οξυγόνου εισέρχεται στο μόριο της Αργινίνης και δημιουργείται NO και Κιτρουλλίνη (Citulline) . Ενδιάμεσο βήμα στην οξειδωτική αντίδραση είναι η δημιουργία N-Υδρόξυ-Αργινίνης . Από την N-Υδρόξυ-Αργινίνη μπορεί να σχηματιστεί και NO^{-1} ως προϊόν οξειδωσης με τέσσερα ηλεκτρόνια , αλλά στην συνέχεια θα μετατραπεί σε NO με συζευγμένες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις , ή ακόμα να σχηματιστεί NO^{+1} . Ο εναλλακτικός σχηματισμός των NO^{-1} και NO^{+1} αντί για Νιτρικό Οξείδιο παρεμποδίζει την δημιουργία των τοξικών ριζών NO_2^{\cdot} και $OONO^{\cdot}$ οι οποίες καταστρέφουν λιπίδια και σουλφυδρυλικές ομάδες .

Η μορφή του Μονοξειδίου του Αζώτου που απελευθερώνεται από τα κύτταρα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί απόλυτα , αλλά φαίνεται πως είναι το Νιτρικό Οξείδιο . Επίσης είναι πιθανό τα κύτταρα να παράγουν και S-νιτροζο-κυστεΐνη . Στο πλάσμα όμως ανευρίσκονται και S-νιτροζο-θειόλες συνδεδεμένες με αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες . Αυτές οι S-νιτροζο-πρωτεΐνες αποτελούν μια παρακαταθήκη NO , ώστε με την διάσπαση και επανασύνδεση των νιτροζοθειολικών ομάδων να διατηρείται η συγκέντρωση του NO στο αίμα σταθερή . Επίσης , αυτή η παρακαταθήκη του NO στις S-νιτροζο-θειόλες εξυπηρετεί την μεταφορά του και παρατείνει την διάρκεια ζωής του , ενώ ταυτοχρόνως δεν επιτρέπει την αντίδρασή του με το οξυγόνο και την δημιουργία άλλων τοξικών ελεύθερων ριζών του αζώτου (Stamler και συν., 1992) .

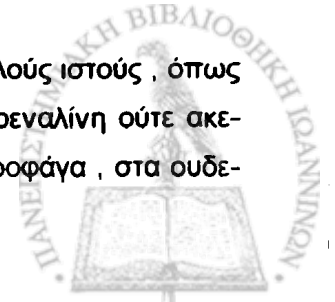
ΟΙ ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ .

Οι Συνθετάσες του Νιτρικού Οξειδίου έχουν κατά τα 2/3 της πεπτιδικής τους αλυσίδας (προς το Καρβόξυ-τελικό άκρο του μορίου) κοινές αλληλουχίες αμινοξέων και ομόλογη δομή με την Αναγωγή του Κυτοχρώματος P450 . Το 1/3 της πεπτιδικής αλυσίδας του ενζύμου προς το Αμινοτελικό άκρο του μορίου είναι χαρακτηριστικό για κάθε μία ισομορφή της NOS . Οι Συνθετάσες του Νιτρικού Οξειδίου καταλύουν την αντίδραση :



Όλες οι NOS απαιτούν τέσσερεις επικουρικούς παράγοντες (co-factors) για να δράσουν : Μονονουκλεοτίδιο της Φλαβίνης , Φλάβινο-Αδένινο-Δινουκλεοτίδιο , Αίμη (σίδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX) και Τετραϋδροβιοπτερίνη . Επίσης , όλες οι NOS διαθέτουν μια περιοχή Φωσφορυλίωσης , όπου μπορούν να φωσφορυλιωθούν από την Πρωτεϊνική Κινάση A , από την Πρωτεϊνική Κινάση C ή από την Εξαρτημένη από Ca^{+2} /Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση . Τέλος , κατά την διέγερση της δραστηριότητας της Συνθετάσης απαιτείται και η ενεργοποίηση του μηχανισμού μεταφοράς της L-Αργινίνης μέσα στα κύτταρα , ώστε να διατηρηθεί σταθερή η ποσότητα του ενζυμικού υποστρώματος . Εάν υπάρχει έλλειψη L-Αργινίνης στα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας , έχει διαπιστωθεί ότι η NOS μπορεί να δράσει και ως Αναγωγή του Κυτοχρώματος P450 ή ως NADPH-Διαφοράση .

Δραστηριότητα Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου έχει διαπιστωθεί σε πολλούς ιστούς , όπως στο ενδοθήλιο , στην παρεγκεφαλίδα , σε νεύρα που δεν περιέχουν ούτε νοραδρεναλίνη ούτε ακετυλοχολίνη , στην Οπίσθια Υπόφυση (Νευροϋπόφυση) , στο μυοκάρδιο , στα μακροφάγα , στα ουδε-

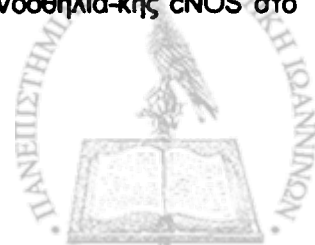


τερόφιλα , στον νεφρό , στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα και στον γαστρικό βλεννογόνο (Kiehle και Malinski, 1993).

Έχουν περιγραφεί τρεις ισομορφές της Συνθεάσης του Νιτρικού Οξειδίου (NOS) , οι οποίες διακρίνονται από τα τρία διαφορετικά γονίδια που τις κωδικοποιούν , από την κυτταρική / ιστική εντόπισή τους και από την ευαισθησία του ενζύμου σε διέγερση με ασβέστιο . Έτσι διακρίνουμε την Επαγόμενη Συνθεάση του Νιτρικού Οξειδίου (Inducible-NOS , iNOS) και τις δύο ισομορφές της Συνεχούς Έκφρασης Συνθεάσης του Νιτρικού Οξειδίου (Constitutive-NOS , cNOS) .

Η Επαγόμενη Συνθεάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) εντοπίζεται στα μακροφάγα , στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και στα ηπατοκύτταρα (Nussler και συν., 1995) και δεν απαιτεί το ασβέστιο για την ενεργοποίησή της . Η δραστηριότητά της επάγεται από παράγοντες όπως η ενδοτοξίνη , η Ιντερλευκίνη-1β , ο Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (TNF-α) και η Ιντερφερόνη-γ , οδηγώντας στην συνεχόμενη παραγωγή ποσοτήτων NO της τάξεως του ημολι μέχρι την αδρανοποίηση και καταστροφή του ενζύμου . Ο συνδυασμός ενδοτοξίνης και κυτταροκινών οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη έκφραση του mRNA της iNOS , ενώ αντιθέτως η επαγωγή της iNOS καταστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή . Η συνεργεία ενδοτοξινών και κυτταροκινών στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της iNOS εξηγεί το πως οι κυτταροκίνες επιτείνουν την αντιμικροβιακή δράση των μακροφάγων . Πρόσφατα ανιχνεύθηκε η έκφραση του γονιδίου της iNOS και σε μυοκαρδιακά και λεία μυϊκά κύτταρα . Ο κλωνισμός του γονιδίου της iNOS σε μακροφάγα της σειράς RAW-264.7 επέτρεψε την καλύτερη μελέτη του ενζύμου . Σήμερα γνωρίζουμε ότι η iNOS είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο . Το μονομερές της iNOS έχει MB 130 kDa και είναι αδρανές , ενώ η δημιουργία ενός διμερούς με MB 250 kDa συνοδεύει την διέγερση του ενζύμου . Επίσης γνωρίζουμε ότι η iNOS είναι συνδεδεμένη με ένα μόριο Καλμοδουλίνης , αλλά δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές του Ca^{+2} . Εκτός από την θέση σύνδεσης της Καλμοδουλίνης διαθέτει και μια θέση Φωσφορυλίωσης από Κινάσες . Τέλος η iNOS έχει ομολογία δομής 43% με την Αναγωγάση του Κυτοχρώματος P450 (Kiehle και Malinski, 1993) . Το γονίδιο της iNOS εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 17 (Vallance και Collier , 1994) .

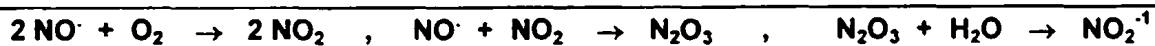
Η Συνεχούς Έκφρασης Συνθεάση του Νιτρικού Οξειδίου (cNOS) έχει δύο ισομορφές που απομονώθηκαν αντίστοιχα στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου (κυρίως στην παρεγκεφαλίδα) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα . Και οι δύο ισομορφές εξαρτώνται από το ασβέστιο και την Καλμοδουλίνη για την λειτουργία τους και οδηγούν στην παραγωγή NO σε ποσότητες της τάξεως του ημολι . Μόρια όπως η Τριφωσφορική-5'-Αδενοσίνη (ATP) , η Θρομβίνη , η Ακετυλοχολίνη , η Βραδυκίνη και η Ουσία P αυξάνουν το ενδοκυττάριο Ca^{+2} και ενεργοποιούν το ένζυμο , οδηγώντας π.χ. σε εξαρτημένη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή και έτσι η σύνθεση NO από την cNOS ρυθμίζεται από το ασβέστιο (αλλά και από τα ανάλογα της L-Αργινίνης , που αναστέλλουν την είσοδο της L-Αργινίνης στα κύτταρα) . Η εγκεφαλική ισομορφή της cNOS έχει MB 160 kDa και διαθέτει μία θέση σύνδεσης με την Καλμοδουλίνη και μία θέση φωσφορυλίωσης από Κινάσες Σερινών -Θρεονινών . Η ενδοθηλιακή ισομορφή της cNOS έχει MB 133 kDa , είναι Μεμβρανικό (membrane-bound) ένζυμο και διαθέτει μια ειδική αλληλουχία πρόσδεσης του Μυριστικού Οξέος κοντά στο Άμινο-τελικό άκρο της . Το γονίδιο της Εγκεφαλικής cNOS εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12 , ενώ της Ενδοθηλιακής cNOS στο χρωμόσωμα 7 (Vallance και Collier , 1994) .



ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ .

Το Νιτρικό Οξείδιο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη ουσία , αφού μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έχει ήδη μεταβολιστεί σε νιτρικές και νιτρώδεις ρίζες . Στα βιολογικά υγρά ο χρόνος ημιζωής του είναι μικρός , κατά ορισμένους συγγραφείς 6"-10" δευτερόλεπτα ενώ κατά άλλους 10"-60" δευτερόλεπτα (Snyder και Bredt, 1992 , Kiechle και Malinski, 1993) Μπορεί όμως ο χρόνος αυτός να παραταθεί εάν το NO βρεθεί μακριά από ιστούς και σε περιβάλλον οξυγόνου . Επίσης , το Νιτρικό Οξείδιο μπορεί να αντιδράσει με Θειόλες στην επιφάνεια πρωτεϊνών του πλάσματος (π.χ. τα σουλφυδρύλια στην επιφάνεια της αλβουμίνης) και να σχηματίσει S-νιτροζοθειόλες , που αποτελούν μια «αποθήκη» για το NO (Nitric Oxide pool) και αυξάνουν τον χρόνο ημιζωής του στο πλάσμα .

Το Νιτρικό Οξείδιο μεταβολίζεται από το οξυγόνο και το νερό και μετατρέπεται σε νιτρώδη ανιόντα (NO_2^-) σύμφωνα με την ακόλουθη αλληλουχία τριών αντιδράσεων :



Όμως ο ενδιάμεσος μεταβολίτης N_2O_3 μπορεί να αντιδράσει και με αμινοξέα ή άλλες αζωτούχες ενώσεις και να δώσει επίσης νιτρώδη ανιόντα . Αν το Νιτρικό Οξείδιο αντιδράσει με το Ανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{-1}) θα δημιουργηθούν νιτρικά ανιόντα (NO_3^-) , με ενδιάμεσο προϊόν την ασταθή ρίζα ONO_2^{-1} .

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί με τους οποίους η Αιμοσφαιρίνη συμμετέχει στην απενεργοποίηση του NO . Ο ένας μηχανισμός αφορά την απλή δέσμευση του Νιτρικού Οξειδίου από την Αιμοσφαιρίνη με την δημιουργία Νιτροζο-αιμοσφαιρίνης . Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την ταχύτατη αντίδραση του Νιτρικού Οξειδίου με την Οξυαιμοσφαιρίνη , με αποτέλεσμα να παράγεται Μεθαιμοσφαιρίνη ενώ το NO μετατρέπεται σε νιτρικά ανιόντα (NO_3^-) . Οι δύο αυτοί μηχανισμοί να είναι πολύ σημαντικοί για την οικονομία του οργανισμού , διότι παρεμποδίζουν την βλαπτική επίδραση του NO στους ιστούς . Όμως από την άλλη φαίνεται ότι κατά την διάρκεια σηπτικών φλεγμονωδών αντιδράσεων (π.χ. στην βακτηριακή περιτονίτιδα) η αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να διαταράσσει την αμυντική λειτουργία του οργανισμού με την αδρανοποίηση του Νιτρικού Οξειδίου και με την παρεμπόδιση της δημιουργίας της αντιμικροβιακής Υπεροξεονιτρικής ρίζας (Kim και συν., 1996) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ .

Τα Μονοξειδία του Αζώτου έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την δραστηριότητα των πρωτεϊνών μέσω αντιστρεπτών αντιδράσεων με λειτουργικές ομάδες όπως ο σίδηρος και οι Θειόλες . Ένα τυπικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της Γουανυλικής Κυκλάσης από την σύνδεση του NO με τον σίδηρο της αίμης , που οδηγεί στην αύξηση του cGMP . Η αγγειοδιαστολή και η αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται ακριβώς από αυτήν την διέγερση της Γουανυλικής Κυκλάσης (Guanosine 5'-Triphosphate Pyrophosphate Lyase). Ο ακριβής μηχανισμός της διέγερσης του ενζύμου δεν είναι ακριβώς γνωστός , αλλά πιθανολογείται ότι η σύνδεση του NO προκαλεί αλλαγή στην στερεοδομή του ενζύμου , όπως ακριβώς το O_2 προκαλεί αλλαγή της στερεοδομής της αιμοσφαιρίνης . Ο πιο πιθανός μηχανισμός είναι ότι η σύνδεση του Νιτρικού Οξειδίου στον σίδηρο της Αίμης που περιέχει η Κυκλάση προκαλεί την μετακίνηση της Αίμης έξω από το επίπεδο της Πορφυρίνης , με αποτέλεσμα την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του καταλυτικού

κέντρου του μορίου και την ενεργοποίηση του ενζύμου (Waldman και Murad, 1987, Stamler και συν., 1992, Kiechle και Malinski, 1993, Schmidt και συν., 1993, Vallance και Collier, 1994, Hobbs και Ignarro, 1996).

Το NO αντιδρά με την Αίμη που περιέχουν πολλά πρωτεϊνικά μόρια και σχηματίζει νιτροζο-αίμη. Αυτό συμβαίνει όχι μόνο στην περίπτωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης αλλά και της Κυκλοοξυγενάσης (Salvemini και Masferrer, 1996), της Λιπooξυγενάσης και του Κυτοχρώματος P450.

Η νιτροζυλίωση των ελεύθερων Θειολών (S-Νιτροζυλίωση) επίσης επηρεάζει την λειτουργία ορισμένων ενζύμων. Τέτοιο ένζυμο είναι η Κασπάση-3 (Mannick και συν., 1999). Η νιτροζυλίωση των Θειολών στην επιφάνεια κυττάρων μπορεί να εξηγήσει ορισμένες μεταβολές στην λειτουργία των λείων μυϊκών ινών και ορισμένες αντιμικροβιακές δραστηριότητες.

Τέλος, ένας ακόμα μηχανισμός δράσης των Μονοξειδίων του Αζώτου είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας ενζύμων μέσω S-Νιτροζυλίωσης της 5'-Διφωσφορικής Ριβοσυλο-τρανσφεράσης, η οποία προκαλεί την ADP-Ριβοζυλίωση των σουλφυδρυλικών ομάδων των ενζύμων αυτών και έτσι επηρεάζει την δράση τους. Ένα παράδειγμα ενζύμου που ρυθμίζεται με αυτόν τον τρόπο είναι η αναστολή της λειτουργίας της 3-Φωσφορικής Αφυδρογονάσης της Γλυκεραλδεύδης από το NO.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ.

Το Νιτρικό Οξείδιο συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες. Ένα μέρος των φαινομένων στα οποία διαδραματίζει ρόλο είναι τα ακόλουθα (Snyder και Bredt, 1992, Kiechle και Malinski, 1993, Vallance και Collier, 1994):

1. Το NO προκαλεί την εξαρτημένη από τα ενδοθήλια αγγειοδιαστολή. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών και αρτηριδίων παράγουν NO, ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα των φλεβών δεν εκφράζουν δραστηριότητα Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και έτσι η αγγειοδιαστολή αφορά μόνο τις αρτηρίες και τα αρτηρίδια (Vallance και Collier, 1994). Έχει προταθεί όμως και η παραγωγή του NO και έμμεσα από την ενζυμική οξείδωση της αμμωνίας που δημιουργεί ο μεταβολισμός των βενζολικών παραγώγων της L-Αργινίνης, τα οποία παράγωγα επίσης προκαλούν αγγειοδιαστολή (Thomas και Ramwell, 1988).

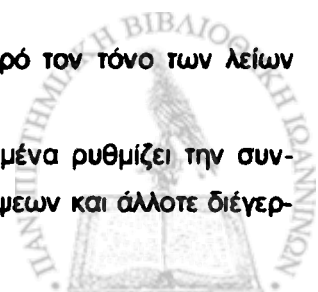
2. Το NO διαμεσολαβεί την κυτταροτοξική επίδραση των ενεργοποιημένων μακροφάγων κατά των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και κατά μικροοργανισμών όπως η *Leishmania*, τα *Mycobacteriae*, τα διάφορα *Plasmodia* και ορισμένοι μύκητες. Εκτός από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα παράγουν Νιτρικό Οξείδιο.

3. Το NO αναστέλλει την συγκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν δραστηριότητα NOS και παράγουν τα ίδια Νιτρικό Οξείδιο, το οποίο δρα συνεργιστικά με την Προστακυκλίνη και το NO που παράγουν τα ενδοθήλια και έτσι αναστέλλεται πιο αποτελεσματικά η συγκόλληση των αιμοπεταλίων.

4. Το NO που παράγεται στον άνθρωπο από τα νευρικά πλέγματα του πέους επιδρά στο σπραγγώδες σώμα και επιτρέπει την σύση.

5. Το NO ρυθμίζει την βασική αρτηριακή πίεση διατηρώντας σταθερό τον τόνο των λείων μυϊκών ινών των αρτηριών και αρτηριδίων.

6. Το NO έχει συσχετιστεί με την διαδικασία της μνήμης. Συγκεκριμένα ρυθμίζει την συναπτική λειτουργία προκαλώντας άλλοτε καταστολή της λειτουργίας των συναψών και άλλοτε διέγερ-



ση της λειτουργίας τους . Αυτή η τροποποίηση της νευρομεταβίβασης οδηγεί στην εκλεκτική ενίσχυση και οδωση συγκεκριμένων συναπτικών κυκλωμάτων μεταξύ των νευρώνων και στην δημιουργία των Μνημονικών Εγγραμμάτων (Μνημονικών Ιχνών) που εξηγούν την μακροχρόνια μνήμη.

7. Το Νιτρικό Οξείδιο επίσης δρα σαν Δεύτερος Μηνύτορας (Second Messenger) στους νευρώνες που συμμετέχουν στην νευρομεταβίβαση μέσω Γλουταμικού οξέος (Glutamate) . Όταν το Γλουταμικό οξύ συνδεθεί στους NMDA-υποδοχείς των νευρώνων προκαλεί την διάνοιξη των διαύλων Ca^{+2} (Calcium ion channels) . Με την αύξηση του Ca^{+2} στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων διεγείρεται η cNOS και παράγεται NO , το οποίο διεγείρει την παραγωγή cGMP .

8. Το NO είναι υπεύθυνο για την νευρωνοτοξικότητα στις οριακά ισχαιμικές περιοχές , που εμφανίζεται μετά από Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια .

9. Το NO ρυθμίζει την μικροκυκλοφορία στα νεφρικά σπειράματα (σωμάτια του Malpighi) και στον νεφρικό μυελό .

10. Το NO ρυθμίζει την αντιστοιχία αερισμού-αιμάτωσης στο πνευμονικό παρέγχυμα . Τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα παράγουν NO που ελέγχει τον τόνο των λείων μυϊκών ινών των πνευμονικών αγγείων και των βρογχιολίων .

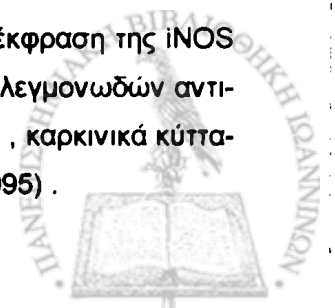
11. Το NO διατηρεί τον τόνο και την διάμετρο των στεφανιαίων αγγείων . Επειδή οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες και οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες καταστέλλουν την δραστηριότητα της NOS , είναι πιθανό ότι η διαταραχή στην ρύθμιση της λειτουργίας των στεφανιαίων αγγείων σε διαβητικούς και αθηροσκληρωτικούς ασθενείς οφείλεται μερικώς στην έλλειψη παραγωγής του NO . Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι εάν δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα Τετραϋδρο-βιοπτερίνης (που αποτελεί σημαντικό επικουρικό παράγοντα στην σύνθεση NO από την Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου) η cNOS δυσλειτουργεί και αντί για NO παράγει H_2O_2 . Το H_2O_2 έχει μικρή αγγειοδιασταλτική δράση αλλά ταυτοχρόνως προκαλεί σημαντική οξειδωτική βλάβη στο τοίχωμα των στεφανιαίων αγγείων (Cosentino και Katusic , 1995) .

12. Στα επινεφρίδια παράγεται Νιτρικό Οξείδιο από ένα πυκνό πλέγμα νευρώνων που διαχέονται στον μυελό του οργάνου και οι οποίοι ρυθμίζουν την παραγωγή της αδρεναλίνης .

13. Στο γαστρεντερικό σωλήνα το NO παράγεται από τους νευρώνες του Μυεντερικού Πλέγματος του Auerbach και συμμετέχει στην ρύθμιση της εντερικής περιστασης . Επίσης το NO παρεμποδίζει τον πυλωρόσπασμο σε νεογνά με Υπερτροφική Πυλωρική Στένωση .

14. Ένα ακόμα φαινόμενο που σχετίζεται με το Νιτρικό Οξείδιο αφορά την επαγωγή της δραστηριότητας iNOS στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων . Κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων ή λοιμώξεων , οι κυτταροκίνες και οι ενδοτοξίνες προκαλούν την έκφραση της iNOS από τις λείες μυϊκές ίνες των αρτηριών και έτσι παράγονται μεγάλες ποσότητες NO που μειώνει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα (Vallance και Collier, 1994) . Η σημασία αυτού του φαινομένου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως , αλλά ενδεχομένως η προκαλούμενη αγγειοδιαστολή συμβάλλει στην δημιουργία εξιδρωμάτων .

15. Οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, TNF, INF- γ) και η ενδοτοξίνη επάγουν την έκφραση της iNOS και στα ηπατοκύτταρα . Η παραγωγή NO από τα ηπατοκύτταρα κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων ή λοιμώξεων τους προσφέρει σημαντική προστασία απέναντι σε μικρόβια , καρκινικά κύτταρα και ενδοκυττάρια παράσιτα (π.χ. το Plasmodium falciparum) (Nussler και συν., 1995) .



16. Τέλος, το Νιτρικό Οξειδίο έχει συσχετιστεί με τον κατακερματισμό του DNA (DNA fragmentation), την συμπύκνωση της χρωματίνης (Chromatin condensation) και τελικά με την κυτταρική Απόπτωση (Apoptosis), τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα μακροφάγα (Albina και συν., 1993, Nussler και συν., 1995). Όμως το Νιτρικό Οξειδίο επίσης ρυθμίζει την κυτταρική Απόπτωση, αφού έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί την S-Νιτροζυλίωση και αδρανοποίηση της Κασπάσης-3, δηλαδή ενός ενζύμου που διαμεσολαβεί την αποπτωτική οδό του Fas (Mannick και συν., 1999).

Από τις λειτουργίες αυτές είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς την μεγάλη σημασία που έχει για τον οργανισμό το μικρό αυτό μόριο. Ορισμένες από τις λειτουργίες του το κατατάσσουν στους Νευρομεταβιβαστές (neurotransmitters), παρά το ότι ούτε περικλείεται σε συναπτικά κυστίδια, ούτε υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς για αυτό στους μετασυναπτικούς νευρώνες. Ένα σημείο με σπουδαία κλινική σημασία είναι ότι το NO έχει ενοχοποιηθεί ως ένας από τους βασικούς παράγοντες που προκαλούν την αγγειοδιαστολή και υπόταση που συνοδεύει την ενδοτοξιναιμία και την σηπτική καταπληξία (Thiemermann και Vane, 1990). Η δεξαμεθαζόνη και τα άλλα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την επαγωγή της iNOS και έτσι μειώνουν την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου και προλαμβάνουν την υπόταση που προκαλούν οι ενδοτοξίνες κατά την σηπτική καταπληξία (Kiechle και Malinski, 1993).

Κεφάλαιο 5-2 . Το Νιτρικό Οξειδίο και τα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα .

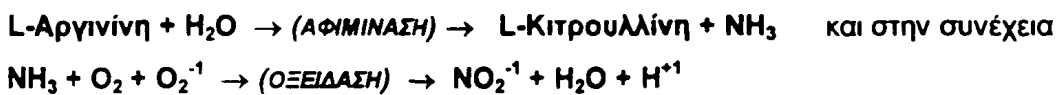
Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Η ανακάλυψη του Νιτρικού Οξειδίου ως βιολογικά δραστικό μόριο με αγγειοδιασταλτική, αντιμικροβιακή και νευροδιαβιβαστική δράση οφείλεται ουσιαστικά στις μελέτες που έγιναν στα μακροφάγα για να συσχετιστεί η αυξημένη παραγωγή νιτρικών και νιτρωδών ριζών (NO_3^{-1} , NO_2^{-1}) με την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα (Snyder και Bredt, 1992).

Μια από τις πρώτες παρατηρήσεις που έγιναν ήταν ότι και τα φυσιολογικά και τα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα μπορούν να διεγερθούν από παράγοντες όπως οι ενδοτοξίνες (LPS) και τα ζωντανά μυκοβακτηρίδια (*Mycobacterium bovis*, BCG) και να παράγουν μεγάλες ποσότητες νιτρικών και νιτρωδών ριζών (Stuehr και Marletta, 1985). Τα μακροφάγα αντιδρούσαν στους παράγοντες αυτούς και *in vivo* και *in vitro*. Γρήγορα διαπιστώθηκε ότι οι λεμφοκίνες και ιδιαίτερα η Ιντερφερόνη- γ αύξαναν την παραγωγή των νιτρικών και νιτρωδών ριζών στα περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνταν με ενδοτοξίνη ή μυκοβακτηρίδια, αλλά ταυτόχρονα προκαλούσαν και οι ίδιες την αυξημένη παραγωγή των ριζών NO_3^{-1} και NO_2^{-1} (Stuehr και Marletta, 1987). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η δράση αυτή απαιτούσε την συχνή ανανέωση του καλλιεργητικού υλικού και ότι είχε διάρκεια 36 - 42 ώρες. Το επόμενο βήμα προς την ανακάλυψη της παραγωγής του NO από τα μακροφάγα ήταν η ανακάλυψη ότι για την παραγωγή των νιτρικών και νιτρωδών ριζών από μακροφάγα της σειράς RAW-264.7 που ενεργοποιήθηκαν από LPS και INF- γ , η L-Αργινίνη αποτελούσε το απαραίτητο και αναντικατάστατο υπόστρωμα (Iyengar και συν., 1987). Στην μελέτη αυτή όχι απλώς διαπιστώθηκε ότι χωρίς L-Αργινίνη τα μακροφάγα δεν μπορούσαν να συνθέσουν τα νιτρικά/νιτρώδη, αλλά επίσης ότι η αντίδραση παραγωγής τους πάντα χρησιμοποιούσε μόνο το τελικό γουανιδο-άζωτο της L-Αργινίνης και ότι κατά την διαδικασία παραγωγής η Αργινίνη μετατρέπεται σε L-Κιτρουλλίνη. Τέλος, οι Iyengar

και συνεργάτες απέδειξαν ότι η μετατροπή της L-Αργινίνης σε L-Κιτρουλλίνη και νιτρικά δεν οφειλόταν στο Ανιόν Υπεροξειδίου (O_2^{-1}), ούτε συσχετιζόταν με την Οξειδωτική Έκρηξη (Respiratory Burst).

Μια πρώτη ερμηνεία που δόθηκε για την αλληλουχία των αντιδράσεων που οδηγούσαν στην μετατροπή της L-Αργινίνης σε L-Κιτρουλλίνη και νιτρικά/νιτρώδη από τα μακροφάγα δεν περιλάμβανε το NO (Hibbs και συν., 1987). Οι Hibbs και συνεργάτες μελετούσαν την αναστολή των μιτοχονδριακών αναπνευστικών ενζύμων, της σύνθεσης του DNA και της λειτουργίας της Ακονιτάσης (ενός ενζύμου του κύκλου του Krebs) σε καρκινικά κύτταρα από ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά μακροφάγα. Διατύπωσαν την άποψη ότι τα μακροφάγα προκαλούσαν την αναστολή αυτών των ζωτικών λειτουργιών στα κύτταρα-στόχους μέσω μιας οδού μεταβολισμού της L-Αργινίνης που περιλάμβανε την δράση δύο ενζύμων, της Αφιμινάσης της Αργινίνης (L-Arginine Deiminase) και μίας Οξειδάσης, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:

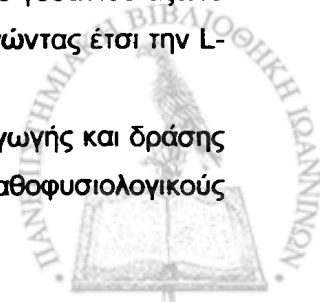


Σύμφωνα δηλαδή με την υπόθεση των Hibbs και συνεργατών, τα νιτρώδη που σχηματίζονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα οφείλονται στην δημιουργία αμμωνίας από την L-Αργινίνη με την δράση της Αφιμινάσης και η αμμωνία στην συνέχεια μετατρέπεται σε NO_2^{-1} με την δράση της Οξειδάσης. Οι συγγραφείς απέδωσαν την κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων σε αυτά τα νιτρώδη ή σε κάποιον ενδιάμεσο μεταβολίτη που δημιουργείται κατά την διάρκεια αυτών των αντιδράσεων.

Γρήγορα όμως έγινε αντιληπτό ότι το βιοδραστικό μόριο που παρήγαγαν τα μακροφάγα από την L-Αργινίνη ήταν το Νιτρικό Οξείδιο (Marletta και συν., 1988). Οι Marletta και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι κατά την *in vitro* ενεργοποίηση των RAW-264.7 μακροφάγων με LPS και INF- γ ενεργοποιούνταν ενζυμικά συστήματα εξαρτημένα από το NADPH, που οξειδώναν τα γουανιδοάζωτα της Αργινίνης και παρήγαγαν NO. Το Νιτρικό Οξείδιο μεταβολιζόταν σε N_2O_3 και N_2O_4 , τα οποία υδρολύονταν σε νιτρικές και νιτρώδεις ρίζες. Η ερευνητική αυτή ομάδα απέδωσε στο NO όχι μόνο αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση, αλλά και την ιδιότητα του ενδοκυττάριου μηνύτορα.

Σε σύντομο χρονικό διάστημα οι γνώσεις για τον μηχανισμό παραγωγής και δράσης του Νιτρικού Οξειδίου και για τον μηχανισμό επαγωγής της iNOS είχαν αυξηθεί σημαντικά (Nathan και Hibbs, 1991, Goenka και συν., 1998). Έτσι έγινε γνωστό ότι η iNOS των μακροφάγων διεγείρεται από μικροβιακά παράγωγα (LPS, MDP, Πρωτεΐνη-A κ.α.) και από κυτταροκίνες (TNF- α , TNF- β , INF- α , INF- β , INF- γ , IL-1, κ.α.). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η iNOS καταστέλλεται από κάποιες κυτταροκίνες (π.χ. Transforming Growth Factors TGF- β 1, TGF- β 2 και TGF- β 3). Από την μελέτη του μηχανισμού δράσης της iNOS των μακροφάγων διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί για υπόστρωμα την L-Αργινίνη (ή εναλλακτικά την L-Ομοαργινίνη) και με την συνέργεια του διοξυγόνου (O_2) και του NADPH δημιουργεί την ασταθή ρίζα NO_2^{-1} , η οποία παρουσία H_2O και O_2 μετατρέπεται αυτόματα σε NO (Νιτρικό Οξείδιο). Αυτή η οξειδωτική αντίδραση απαιτεί πέντε ηλεκτρόνια, από τα οποία τα δύο χορηγεί η Τετραϋδρο-βιοπτερίνη, η οποία στην συνέχεια ανάγεται σε Βιοπτερίνη. Το γουανιδο-άζωτο της L-Αργινίνης που οξειδώνεται αντικαθιστάται από ένα άτομο οξυγόνου, δημιουργώντας έτσι την L-Κιτρουλλίνη.

Κατά την διάρκεια των μελετών για την διαπίστωση των μηχανισμών παραγωγής και δράσης του Νιτρικού Οξειδίου προέκυψαν στοιχεία που το συνέδεαν με σπουδαίους παθοφυσιολογικούς



μηχανισμούς . Έτσι το μικρό αυτό μόριο άρχισε να συμπεριλαμβάνεται στην παθογένεια πολλών φλεγμονωδών παθήσεων αφού διαπιστώθηκε ότι προκαλούσαν παραγωγή NO εκτός από τα μικροβιακά παράγωγα και τις κυτταροκίνες (Nathan και Hibbs, 1991) ακόμα και ανόργανα μόρια όπως ο αμιάντος (Thomas και συν., 1994) . Αυτή η τελευταία παρατήρηση έχει μεγάλη κλινική σημασία , γιατί δίνει μια εξήγηση για τον μηχανισμό δημιουργίας της Διάμεσης Πνευμονικής Ίνωσης που ακολουθεί την έκθεση σε ίνες αμιάντου και τις άλλες Πνευμονοκοκινώσεις . Κλινική σημασία έχει επίσης η παρατήρηση ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα χάνουν την ικανότητά τους να παράγουν Νιτρικό Οξειδίο με την πάροδο της ηλικίας του ατόμου , ένα φαινόμενο που αφορά όχι μόνο το NO αλλά και τις Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (Alvarez και συν., 1995) . Μια άλλη σημαντική διαπίστωση είναι ότι μετά από σπληνεκτομή τα περιτοναϊκά μακροφάγα χάνουν την ικανότητά τους να παράγουν Νιτρικό Οξειδίο όταν επωάζονται με συνδυασμό ενδοτοξίνης και Ιντερφερόνης- γ (και συν., 1995) . Αυτή η εκλεκτική ανικανότητα ενεργοποίησης των μακροφάγων για παραγωγή NO ενδεχομένως εξηγεί την υψηλή θνησιμότητα από βακτηριαιμία και σηψαιμία που ακολουθεί την σπληνεκτομή . Τέλος , εκτός από το ίδιο το Νιτρικό Οξειδίο που παράγουν τα μακροφάγα και ορισμένοι από τους μεταβολίτες του είναι βιοδραστικοί , όπως π.χ. τα οξείδια του διαζώτου N_2O_3 και N_2O_4 που αντιδρούν με αμινικές ομάδες και δημιουργούν νιτροζαμίνες (Kosaka και συν., 1989) .

Τα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα Κινασών της Τυροσίνης , που ενεργοποιούν δύο Φωσφολιπάσες-C (PLC) που διεγείρουν τα ισοένζυμα α , β 1 και δ της PKC . Αυτά τα ισοένζυμα της PKC φωσφορυλιώνουν τον ΙκΒ-αναστολέα και έτσι ενεργοποιούν τον παράγοντα NF κ B , επάγοντας την έκφραση της iNOS (Chen και συν., 1998) .

Η επαγωγή της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και η παραγωγή NO τελικά οδηγούν το μακροφάγο στον Προγραμματισμένο Κυτταρικό Θάνατο (Apoptosis) . Αυτό φαίνεται από το ότι η ενεργοποίηση της iNOS και η παραγωγή NO στα μακροφάγα συνοδεύονται από κατακερματισμό του DNA (DNA fragmentation) , Πυρηνική και Κυτταροπλασματική Συμπύκνωση (Nuclear-Cytoplasmic Condensation) και εμφάνιση πρόδρομων Αποπτωτικών Σωματιδίων (Apoptotic bodies) και άλλων σημείων του κυτταρικού θανάτου (Albina και συν., 1993) .

Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Με βάση τις μέχρι σήμερα γνώσεις μας για την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα μακροφάγα , έχει προταθεί ο ακόλουθος μηχανισμός μεταγωγής μηνύματος για την ενεργοποίηση της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου (Wu και Thiemeemann, 1996 , Barnes και Karin, 1997) .

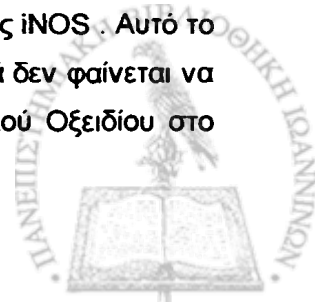
1. Τα μόρια του LPS (ή κάποιου άλλου μικροβιακού παραγώγου) ενώνονται με τους CD14-υποδοχείς (ή τους αντίστοιχους υποδοχείς για τα άλλα παράγωγα) στην επιφάνεια των μακροφάγων , τα ενεργοποιούν και προκαλούν την παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-1, TNF α και INF- γ , ή άλλων μορίων όπως ο PAF.
2. Οι κυτταροκίνες και ο PAF διαχέονται στα παρακείμενα μακροφάγα και συνδέονται με τους ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους , προκαλώντας την ενεργοποίηση Κινασών της Τυροσίνης .
- 3 . Οι Κινάσες της Τυροσίνης ενεργοποιούν τον Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B , ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα και συνδέεται με το DNA του μακροφάγου , στην περιοχή του Προαγωγέα του γονιδίου της iNOS .
4. Μεταγράφεται το mRNA της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και εκφράζεται έτσι η iNOS , που αρχίζει να μετατρέπει την L-Αργινίνη σε NO και L-Κιτρουλλίνη .

Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι οι Κινάσες της Τυροσίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ενεργοποίηση του NFκB και στην έναρξη της μεταγραφής του mRNA της iNOS, αλλά και στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ίδιας της Συνθετάσης αμέσως μετά την παραγωγή της. Έχει διαπιστωθεί ότι στα RAW-264.7 μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS και INF- γ , η έκφραση του γονιδίου της iNOS συνοδεύεται από φωσφορυλίωση των Τυροσινών των νεοσχηματιζόμενης Συνθετάσης (Pan και συν., 1996). Αυτό δεν είναι περίεργο αφού είναι γνωστό ότι η NOS διαθέτει θέσεις για φωσφορυλίωση από διάφορες Κινάσες (π.χ. από τις Protein Kinase A, Protein Kinase C και Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II). Είναι πιθανό ότι και η Πρωτεϊνική Κινάση C ρυθμίζει την δραστηριότητα της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου με φωσφορυλίωση, αφού έχει αποδειχτεί ότι η ενεργοποίηση της PKC με Μυριστικό Εστέρα της Φορβόλης (PMA) συμμετέχει και συμβάλλει στην διαδικασία παραγωγής NO από φλεγμονώδη μακροφάγα χωρίς όμως να είναι αρκετή για να την προκαλέσει από μόνη της (Li και συν., 1996, Jun και συν., 1996).

Στα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) έχει διαπιστωθεί ο ακόλουθος μηχανισμός: Όταν τα κύτταρα Kupffer έρθουν σε επαφή με νεοπλασματικά κύτταρα μέσω υποδοχέων CD18/ICAM-1 προκαλείται οξειδωτικό stress που οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής NFκB και επίσης αυξάνεται το ενδοκυττάριο Ca²⁺. Ο παράγοντας NFκB μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση του γονιδίου iNOS και την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Kurose και συν., 1997).

Η δραστηριότητα της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Ο έλεγχος αυτός ασκείται από πολλές ορμόνες του σώματος αλλά και από ενδογενείς μηχανισμούς του ίδιου του μακροφάγου. Ένα παράδειγμα ενδογενούς ρύθμισης της δραστηριότητας της iNOS είναι ο αυτορρυθμιστικός μηχανισμός που ασκείται από την PGE₂. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν μεγάλες ποσότητες NO αλλά και PGE₂, η οποία δρα αυτοκρινικά και παρακρινικά και έτσι αυξάνει το cAMP στα μακροφάγα, αναστέλλοντας την δραστηριότητα της iNOS και διακόπτοντας την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου (Raddassi και συν., 1993). Όμως μελέτες που έγιναν σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς ANA-1 που ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη- γ έδειξαν ότι η αύξηση του cAMP από χορήγηση PGE₂ ή Τοξίνης Χολέρας προκαλούσε επαγωγή της iNOS και αύξηση της παραγωγής NO από τα μακροφάγα. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγούσε η χορήγηση Dibutyryl-cAMP ή Sp-cAMP στα ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα ANA-1 (Mullet και συν., 1997). Δηλαδή ουσίες που προκαλούσαν αύξηση του cAMP οδηγούσαν σε επαγωγή της iNOS και επίταση της παραγωγής NO. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι η χορήγηση πολύ μεγάλων ποσοτήτων cAMP (πάνω από 100 μ M) κατέστρεφε την iNOS και μείωνε την παραγωγή NO. Δηλαδή το cAMP έχει δόσοεξαρτώμενη και διφασική επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου.

Ένας ακόμα αυτορρυθμιστικός μηχανισμός έχει περιγραφεί για την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα μακροφάγα (Vodonotz και συν., 1994). Η ενεργοποίηση μακροφάγων με Ιντερφερόνη- γ προκαλεί την συνεχή παραγωγή NO για διάστημα μέχρι 6 ημέρες, ενώ η προσθήκη ενδοτοξίνης (LPS) στις κυτταροκαλλιέργειες προκαλεί την απενεργοποίηση της iNOS μέσα σε 3 ημέρες και η επίδραση αυτή της ενδοτοξίνης αποκαθίσταται μόνο με την σύνθεση νέας iNOS. Αυτό το χαρακτηριστικό φαινόμενο που προκαλεί η ενδοτοξίνη δεν έχει εξηγηθεί ακόμα, αλλά δεν φαίνεται να οφείλεται σε καταστροφή της Συνθετάσης, ούτε σε επίδραση του ίδιου του Νιτρικού Οξειδίου στο ένζυμο παραγωγής του.



Η δραστηριότητα της iNOS και η παραγωγή NO από τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ρυθμίζεται από πολλές ενδοκρινικές ορμόνες . Έτσι , όταν τα γλυκοκορτικοειδή χορηγηθούν in vitro σε χαμηλές δόσεις και για σύντομο διάστημα επώασης , προκαλούν διέγερση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , ενώ όταν χορηγηθούν σε μεγάλες δόσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλούν καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου (Broug-Holub και Kraal , 1996) . Η Προγεστερόνη , όταν χορηγηθεί in vitro σε μυελικά μακροφάγα ή σε μακροφάγα των σειρών RAW-264.7 και J-774 που ενεργοποιήθηκαν με INF- γ και LPS , προκαλεί δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη καταστολή της δραστηριότητας της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου και της παραγωγής NO (Miller και συν., 1996) . Φαίνεται όμως ότι και η Ντοπαμίνη καταστέλλει την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, μέσω των D₁- και D₂- ντοπαμινεργικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους (Hasko και συν., 1996) . Τέλος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται για παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από την υποφυσιακή ορμόνη Μελαντονίνη . Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι η επώαση μονοκυττάρων με 10⁻¹⁰ M Μελαντονίνη οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή NO και ότι η Μελαντονίνη δρα συνεργικά με την ενδοτοξίνη για ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή NO (Morrey και συν., 1994) .

Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα Μονοκύτταρα Φαγοκύτταρα έχει συσχετιστεί με την αντιμικροβιακή δράση κατά μιας πλειάδας παθογόνων μικροοργανισμών , όπως π.χ. τα *Cryptococcus neoformans* , *Schistosoma mansoni* , *Leishmania major* , *Toxoplasma gondii* και τα *Mycobacterium tuberculosis* και *leprae* . Υποθέτουμε ότι η δράση αυτή οφείλεται στην αναστολή σημαντικών ενζύμων όπως η Ακονιτάση (Drapier και Hibbs, 1996) , η Αναγωγάση των Ριβονουκλεοτιδίων και τα μιτοχονδριακά αναπνευστικά ένζυμα (Totges και Wilson, 1996) αλλά ο μόνος ειδικός στόχος του Νιτρικού Οξειδίου που έχει αποδειχτεί με βεβαιότητα είναι η Φερρεδοξίνη του *Clostridium pasteurianum* (Nathan και Hibbs, 1991) . Επίσης έχει πιθανολογηθεί ότι το NO αντιδρά με O₂⁻¹ και δημιουργεί το Υπεροξεονιτρικό Ανιόν , που διακρίνεται για την μεγάλη του τοξικότητα . Ανεξάρτητα όμως από τον μηχανισμό δράσης του , το Νιτρικό Οξείδιο που παράγεται από τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη ή Ιντερφερόνη- γ μακροφάγα είναι σίγουρα ένας σημαντικός φορέας της αντιμικροβιακής δράσης των κυττάρων αυτών κατά μικροβίων όπως η *Leishmania* και το *Toxoplasma* (Adams και συν., 1990 , Liew και συν., 1990) . Επίσης είναι χαρακτηριστικό ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με ενεργό φυματίωση εκφράζουν πάντοτε το γονίδιο της iNOS και παράγουν NO τα ίδια κύτταρα από πνεύμονες υγιών ανθρώπων σπανίως εκφράζουν την iNOS (Nicholson και συν., 1996) .

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η PKC συμμετέχει στην έκφραση της iNOS μέσω της φωσφορυλίωσης του αναστολέα I κ B του παράγοντα NF κ B (Barnes και Karin, 1997) . Η διάσπαση του συμπλέγματος I κ B - NF κ B προκαλεί μετανάστευση του NF κ B στον πυρήνα και μεταγραφή του γονιδίου της iNOS . Τα μακροφάγα της σειράς B10R που διαθέτουν λειτουργική PKC παράγουν NO και είναι ανθεκτικά στα Μυκοβακτηρίδια . Τα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς B10S που δεν εκφράζουν λειτουργική PKC και παράγουν ελάχιστα NO προσβάλλονται εύκολα από Μυκοβακτηρίδια (Olivier και συν., 1998) .

Η κυτταροτοξική δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων κατά των καρκινικών κυττάρων (π.χ. κατά των καρκινικών σειρών L-10, K-562 και L-1210) έχει επίσης αποδοθεί στο Νιτρικό Οξείδιο

(Hibbs και συν., 1987, Hibbs και συν., 1988). Το NO δρα στερώντας τα καρκινικά κύτταρα από Fe^{+2} , αναστέλλοντας βασικά ένζυμα, όπως π.χ. την Αναγωγή των Ριβονουκλεοτιδίων, τα μιτοχονδριακά αναπνευστικά ένζυμα (NADH-Ubiquinone Oxireductase, Succinate-Ubiquinone Oxireductase κ.α.), την Ακονιτάση (ένζυμο του κύκλου του Krebs) και τέλος παρεμποδίζοντας την σύνθεση του DNA. Τα μακροφάγα ασκούν την δράση αυτή είτε έχουν ενεργοποιηθεί με συνδυασμό μυκοβακτηριδίων και ενδοτοξίνης ή με συνδυασμό Ιντερφερόνης- γ και ενδοτοξίνης (Hibbs και συν., 1987, Hibbs και συν., 1988, Takema και συν., 1991). Ωστόσο, στην περίπτωση της ενεργοποίησης των μακροφάγων με τον συνδυασμό LPS και INF- γ διαπιστώθηκε ότι γρήγορα τα μακροφάγα έχαναν την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα και ήταν απαραίτητο να ενεργοποιηθούν πάλι με LPS και INF- γ για να ανακτήσουν την αντικαρκινική τους δράση (Takema και συν., 1991). Αυτό πιθανώς σχετίζεται με το φαινόμενο απενεργοποίησης της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου από την ενδοτοξίνη που έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως (Vodonotz και συν., 1994). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση πως τα μονοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν επαγωγή της iNOS και την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO από νεοπλασματικά κύτταρα μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνουν (Konig και συν., 1996).

Το Νιτρικό Οξείδιο έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την NADPH-Οξειδάση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και έτσι μειώνει την παραγωγή του O_2^{-1} . Είναι πιθανό ότι το NO αναστέλλει και την NADPH-Οξειδάση των μακροφάγων μέσω του ίδιου μηχανισμού (Clancy και συν., 1992).

Το Νιτρικό Οξείδιο επίσης επηρεάζει την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα, δρώντας παρακρινικά και αυτοκρινικά. Έχει αποδειχθεί ότι το NO που παράγεται από τα μακροφάγα αναστέλλει *in vivo* και *in vitro* την παραγωγή TNF α από μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα της κυτταρικής σειράς J-774 που είχαν ενεργοποιηθεί με ενδοτοξίνη (Iuvone και συν., 1996). Ο μηχανισμός αυτού του αυτορρυθμιστικού φαινομένου (negative feedback regulation) δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα. Αντιθέτως, το Νιτρικό Οξείδιο αυξάνει την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 από μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα της σειράς RAW-264.7 που ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με συνδυασμό ενδοτοξίνης και INF- γ (Hill και συν., 1996). Αυτός ο μηχανισμός αυτοενίσχυσης (positive feedback) της παραγωγής Ιντερλευκίνης-1 έχει αποδοθεί στην ικανότητα του NO να διεγείρει την Γουανυλική Κυκλάση και να αυξάνει το cGMP.

Και τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) παράγουν NO, το οποίο φαίνεται ότι συμμετέχει στην ρύθμιση της αιματικής ροής στο ήπαρ (Decker, 1990).

Υπάρχουν όμως αναφορές στην βιβλιογραφία που αναφέρουν ότι το Νιτρικό Οξείδιο το οποίο παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι ικανό να προκαλέσει την Απώπωσή τους (Albina και συν., 1993). Όμως τα μακροφάγα διαθέτουν ένα μηχανισμό προστασίας στην δράση του Νιτρικού Οξειδίου, ο οποίος διαμεσολαβείται από την Κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2). Η επαγωγή της COX-2 στα ενεργοποιημένα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα επιτυγχάνεται μέσω του Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B, ο οποίος επάγει και την Σύνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) (Barnes και Karin, 1997). Η ταυτόχρονη επαγωγή των δύο ενζύμων COX-2 και iNOS από τον παράγοντα NF κ B είναι ωφέλιμη για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, γιατί κάποιο από τα παράγωγα της COX-2 προστατεύει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα από την Απώπωση (Von Knethen και Brune, 1997). Όμως και η PKC προστατεύει τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα από την Απώπωση που προκαλεί το Νιτρικό Οξείδιο. Η PKC ασκεί αυτήν την δράση μέσω αναστολής της δραστηριότητας των Κινάσων p38 MAP-Κινάση και JNK/SAPK Κινάση (Jun και συν., 1999). Όμως είναι πιθανό το Νιτρικό Οξείδιο να ασκεί και ρυθμιστικό

έλεγχο στην Απόπτωση , αφού μέσω της S-Νιτροζυλίωσης αναστέλλει την Κασπάση-3 (Mannick και συν., 1999) .

Η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από μακροφάγα έχει ενοχοποιηθεί ως η αιτία της καταστολής του πολλαπλασιασμού των σπληνικών λεμφοκυττάρων μετά από in vivo χορήγηση μορφίνης . Έχει αποδειχθεί ότι μετά από υποδόρια χορήγηση μορφίνης σε πειραματόζωα τα σπληνικά μακροφάγα τους παράγουν Νιτρικό Οξείδιο το οποίο καταστέλλει την ικανότητα των σπληνικών λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται μετά από έκθεση σε μιτογόνες ουσίες (Fecho και συν., 1994) .

Ένας ακόμα σπουδαίος και πολύπλοκος ρόλος του Νιτρικού Οξειδίου που παράγεται από τα μακροφάγα αφορά την συμμετοχή του στα φαινόμενα της αθηρωμάτωσης . Οι οξειδωμένες LDL-λιποπρωτείνες μεταβάλλουν την παραγωγή του NO από τα μακροφάγα και επηρεάζουν την βιωσιμότητά τους , φαινόμενα που συσχετίζονται με την δημιουργία των αθηρωματικών πλακών και που επηρεάζουν τον τόνο των στεφανιαίων αγγείων (Matthys και συν., 1996 , Yang και συν., 1996) .



Κεφάλαιο 6 . Η παραγωγή Ώξινης Φωσφατάσης και άλλων λυσοσωματικών ενζύμων .

Κεφάλαιο 6-1 . Γενικά για την Ώξινη Φωσφατάση και τα άλλα λυσοσωματικά ένζυμα .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .

Ένα από τα σημαντικότερα κυτταρικά οργανίδια είναι τα λυσοσώματα , τα οποία επιτελούν την πεπτική λειτουργία του κυττάρου . Αυτή μπορεί να πραγματοποιείται για να θρέψει τα κύτταρα ή για να καταστρέψει οτιδήποτε αναγνωρίζεται από το κύτταρο σαν «ξένο σώμα» . Αυτό μπορεί να είναι είτε ένας εξωγενής βλαπτικός παράγοντας (π.χ. ένα μικρόβιο) ή ένα συστατικό του ίδιου του κυττάρου που έχει αλλοιωθεί . Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η πεπτική λειτουργία επιτυγχάνεται με την βοήθεια των λυσοσωματικών ενζύμων . Οι κυριότερες κατηγορίες λυσοσωματικών ενζύμων φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Dingle και Fell, 1969) .

ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ .

1. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΟΥΝ ΟΜΑΔΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΦΩΣΦΟΡΟ .

Νουκλεοτιδουλοτρανσφεράσες .

2. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΕΣΤΕΡΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ .

Υδρολάσες καρβοξυλεστέρων , αιθυλεστέρων , θεικών εστέρων , φωσφορικών μονοεστέρων και διεστέρων .

3. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΓΛΥΚΟΖΥΛ-ΕΝΩΣΕΙΣ .

Υδρολάσες γλυκοσιδίων (D-γλυκοσυλ-ενώσεων) και S-γλυκοσυλ-ενώσεων .

4. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ-ΑΖΩΤΟΥ .

Υδρολάσες πεπτιδουλοαμινοξέων (α-καρβοξυπεπτιδο-αμινοξέων) , διπεπτιδίων και πεπτιδουλοπεπτιδίων .

5. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΜΗ-ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥΣ ΔΕΣΜΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ-ΑΖΩΤΟΥ .

Υδρολάσες γραμμικών αμιδίων .

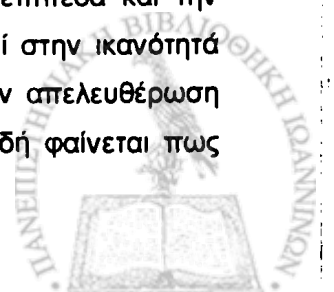
6. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΣΕ ΑΝΥΔΡΙΤΕΣ ΟΞΕΩΝ .

Υδρολάσες ανυδριτών που περιέχουν φωσφορλομάδα .

7. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΔΕΣΜΟΥΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ-ΑΖΩΤΟΥ .

Τα λυσοσωματικά ένζυμα είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται στις μεμβράνες του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου με την μορφή προδρόμων ενζύμων και στην συνέχεια μεταφέρονται στο εσωτερικό του Κοκκιώδους Ενδοπλασματικού Δικτύου . Εκεί αποκτούν έναν Ιχνηθέτη Αναγνώρισης (Recognition Marker) που θα επιτρέψει την μεταφορά τους στα λυσοσώματα . Ο Ιχνηθέτης αυτός είναι συνήθως η 6'-Φωσφορική Μαννόζη . Από τον αυλό του Κ.Ε.Κ. μεταφέρονται με κυστίδια στην Συσκευή Golgi , όπου υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία . Μετά την διέλευσή τους από την συσκευή Golgi συσκευάζονται σε άλλα κυστίδια και μεταφέρονται στα λυσοσώματα . Αυτή η διαδικασία είναι κοινή για όλα σχεδόν τα λυσοσωματικά ένζυμα (Kornfeld και Mellman, 1989) .

Η δημιουργία νέων λυσοσωμάτων και η παραγωγή νέων λυσοσωματικών ενζύμων ρυθμίζεται από ορμόνες όπως η ινσουλίνη , η γλυκαγόνη και τα γλυκοκορτικοειδή (Kotoulas και συν., 1977 , Aronson, 1980 , Kotoulas, 1981 , Kotoulas, 1983 , Maintas και συν., 1993) . Η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοκορτικοειδών οφείλεται εν μέρει στην ικανότητά της να επηρεάζει τα επίπεδα και την δραστηριότητα των λυσοσωματικών ενζύμων . Αυτή η ιδιότητά τους έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να σταθεροποιούν τις λυσοσωματικές μεμβράνες και έτσι να αποτρέπουν την απελευθέρωση των όξινων υδρολασών στον εξωκυττάριο χώρο , παρά το ότι τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται πως



προάγουν την σύνθεση λυσοσωματικών ενζύμων και την δημιουργία νέων λυσοσωμάτων (Dingle και Fell, 1969).

Η ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ.

Η Ώξινη Φωσφατάση (Φωσφοϋδρολάση των Ορθοφωσφορικών Μονοεστέρων, E.C. 3.1.3.2.) αποτελεί ένα χαρακτηριστικό λυσοσωματικό ένζυμο και υπάρχει σε όλα τα λυσοσώματα. Μάλιστα, η ανακάλυψη των λυσοσωμάτων από τον DeDune το 1949 οφείλεται ακριβώς στην μελέτη της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου. Ωστόσο μπορεί να υπάρχει Ώξινη Φωσφατάση και εκτός λυσοσωμάτων, όπως π.χ. στα μιτοχόνδρια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα πολυκυστιδιακά σωμάτια. (Dingle και Fell, 1969).

Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης έχει εντοπιστεί σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αλλά κλινική σημασία έχουν κυρίως οι δραστηριότητες που προέρχονται από τον προσάτη και από τα λευκοκύτταρα. Υπάρχουν πολλά ισoenζυμα της Ώξινης Φωσφατάσης, που φαίνεται ότι διαφέρουν κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε σιαλικό οξύ. Όλα τα ισoenζυμα έχουν MB 100 -120 kDa, δρουν σε όξινο pH και αναστέλλονται από τον Hg^{+2} , τον Pb^{+3} , τα φθοριούχα ιόντα και το Τρυγικό Οξύ (L-Tartrate). Η Ώξινη Φωσφατάση των ηπατικών λυσοσωμάτων εμφανίζει βέλτιστο pH λειτουργίας στην περιοχή του 5,4, αλλά έχει διαπιστωθεί ότι το ίδιο ένζυμο δρα βέλτιστα και σε χαμηλότερο pH ανάλογα με τον ιστό προέλευσής του. Έτσι ισoenζυμο που απομονώθηκε από τον σπλήνα έχει μέγιστη δραστηριότητα σε pH 3,0 - 4,8, ενώ το πλακουντιακό ισoenζυμο σε pH 4,0 - 4,4. (Dingle και Fell, 1969).

Η Ώξινη Φωσφατάση απελευθερώνει φώσφορο από μία ποικιλία φυσικών και συνθετικών υποστρωμάτων (φωσφομονοεστέρων ή φωσφοπρωτεϊνών) μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και η 2'-φωσφορική γλυκερόλη, η 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη, η 1',6'-διφωσφορική φρουκτόζη, η φωσφορική p-νιτροφαινόλη και το φωσφορικό ναφθύλιο. Σε όλα αυτά τα υποστρώματα η Ώξινη Φωσφατάση δρα υδρολύοντας τον εστερικό δεσμό της ορθοφωσφορικής ομάδας. Επίσης, το σπληνικό ισoenζυμο διασπά και τον πυροφωσφορικό δεσμό, υδρολύοντας την τριφωσφορική αδενοσίνη και την διφωσφορική αδενοσίνη. Όμως κανένα ισoenζυμο της Ώξινης Φωσφατάσης δεν επιδρά σε φωσφοδιεστέρες. (Dingle και Fell, 1969).

Από τις πρώτες ήδη μελέτες της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης έγινε αντιληπτό ότι το ένζυμο αυτό υπήρχε σε δύο μορφές: είτε διαλυτό στο εσωτερικό των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, όπου εκδήλωνε μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα, ή συνδεδεμένο στις μεμβράνες των οργανιδίων (π.χ. λυσοσωματικές ή μιτοχονδριακές μεμβράνες) όπου ήταν σχετικά ανενεργό (Gianetto και DeDune, 1955, Appelmans και συν., 1955, Wattiaux και DeDune, 1956). Η αρχική υπόθεση ήταν πως το ένζυμο συντίθεται με την διαλυτή μορφή του, μεταφέρεται στα λυσοσώματα και στην συνέχεια συνδέεται στις μεμβράνες τους.

Πρόσφατες βιοχημικές μελέτες που ακολούθησαν τον κλωνισμό του γονιδίου της ανθρώπινης Ώξινης Φωσφατάσης έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό συντίθεται αρχικά σαν πρωτεΐνη της μεμβράνης των λυσοσωμάτων (integral membrane protein). Το πρόδρομο μόριο της Ώξινης Φωσφατάσης μεταφέρεται δια μέσου της συσκευής Golgi, χωρίς να αποκτήσει τον ιχνηθέτη αναγνώρισης δηλαδή το μόριο της 6'-φωσφορικής μαννόζης. Στην συνέχεια μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη και από

εκεί με ενδοκύττωση στα πυκνά λυσοσώματα (dense lysosomes) ως μεμβρανική πρωτεΐνη . Στα λυσοσώματα υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση και αφαίρεση της ενδομεμβρανικής και της κυτταροπλασματικής μοίρας του πρόδρομου ενζύμου . Το υπόλοιπο μόριο αποτελεί την ώριμη μορφή του ενζύμου , που διαχέεται στο εσωτερικό του λυσοσώματος και είναι πλήρως δραστικό . (Kornfeld και Mellman, 1989) .

Κεφάλαιο 6-2 . Η Όξινη Φωσφατάση και τα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα .

ΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Τα λυσοσώματα των μακροφάγων περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία από ένζυμα , ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται και τα εξής : Όξινη Φωσφατάση , β-Γαλακτοσιδάση , β-Γλυκουρονιδάση , Καθεψίνη-D , N-ακετυλο-Γλυκοσαμινιδάση , α-Μαννοσιδάση , διάφορες Λιπάσες και διάφορες Πεπτιδάσες (Morland και Kaplan, 1977 , Schnyder και Baggiolini, 1978 , Cooper και συν.,1984 , Jackman και συν.,1995) . Τα ένζυμα αυτά ανιχνεύονται στα περιτοναϊκά μακροφάγα , στα ηπατικά μακροφάγα (Smetsrod και συν.,1985) , στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , στα σπληνικά μακροφάγα και σε όλα τα ώριμα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Κατά την ωρίμαση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα αυξάνουν όχι μόνο το μέγεθος του κυττάρου και ο αριθμός των μιτοχονδρίων αλλά και ο αριθμός των λυσοσωμάτων . Το ίδιο συμβαίνει και κατά την *in vitro* καλλιέργεια των άωρων μακροφάγων παρουσία 50% ορού εμβρύου μύσχου (FCS) . Η δημιουργία νέων λυσοσωμάτων συνοδεύεται από *de novo* σύνθεση λυσοσωματικών ενζύμων όπως η Όξινη Φωσφατάση , η β-Γλυκουρονιδάση και η Καθεψίνη . Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την αύξηση του μεγέθους της συσκευής Golgi , του αριθμού των κυστιδίων που εκβλαστάνουν από την συσκευή και τέλος της πινοκυττωτικής δραστηριότητας (Cohn και Benson, 1965a , Cohn και Benson, 1965b , Cohn και συν.,1966 , Dingle και Fell, 1969) . Η ιστοχημική μελέτη των μακροφάγων με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξε ότι μετά από την έναρξη της πινοκύττωσης οι όξινες υδρολάσες που παράγονται στο Κοκκιώδες Ενδοπλασματικό Δίκτυο μεταφέρονται ταχύτατα (μέσα σε 30 λεπτά) στην συσκευή Golgi και αφού την διασχίσουν μεταφέρονται στα πρωτογενή λυσοσώματα και στην συνέχεια στα πινοκυττωτικά κυστίδια . Επίσης κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων παράγονται μεγάλες ποσότητες από όξινες υδρολάσες και μεταφέρονται στα λυσοσώματα ή εκκρίνονται (Cohn και Benson, 1965a , Saito και Sutter, 1965 , Morland και Kaplan, 1977 , Reiner και συν.,1981) . Όλα μαζί αυτά τα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το λυσοσωματικό σύστημα δεν λειτουργεί με άκαμπτο τρόπο αλλά ανταποκρίνεται ευέλικτα στις τρέχουσες ανάγκες του κυττάρου .

Μετά την συγχώνευση των πρωτογενών λυσοσωμάτων με τα πινοκυττωτικά κυστίδια ή τα φαγοσώματα δημιουργούνται τα δευτερογενή λυσοσώματα . Έτσι τα ένζυμα που περιέχονται στα πρωτογενή λυσοσώματα των μακροφάγων καταλήγουν στα δευτερογενή λυσοσώματα . Επειδή τα μακροφάγα είναι μακρόβια κύτταρα και εκτελούν ενδοκύττωση κατά ασυνεχή τρόπο , οι όξινες υδρολάσες μπορεί να ακολουθήσουν δύο πορείες . Αν οι ενδοκυττωτικές διεργασίες συνεχιστούν , τα προϋπάρχοντα δευτερογενή λυσοσώματα θα συγχωνευτούν με τα νέα πινοκυττωτικά κυστίδια για να χρησιμοποιηθούν ξανά τα ένζυμά των λυσοσωμάτων . Τα δευτερογενή λυσοσώματα μπορούν επίσης

να συγχωνευτούν με μεγάλα φαγοσώματα και να αδειάσουν τις υδρολάσες τους σε αυτά . Αν οι ενδοκυττωτικές διεργασίες σταματήσουν για αρκετό χρόνο τα λυσοσωματικά ένζυμα θα αποδομηθούν και τα λυσοσώματα θα μετατραπούν σε υπολειμματικά σωμάτια (residual bodies) . ((Cohn και Benson, 1965b , Dingle και Fell, 1969) .

Η ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Κατά την διερεύνηση του λυσοσωματικού συστήματος των μακροφάγων που ξεκίνησε στην δεκαετία του 1960 , η Οξίνη Φωσφατάση αποτέλεσε έναν από τους κύριους βιοχημικούς και ιστοχημικούς δείκτες αναγνώρισης και μελέτης της λειτουργίας των οργανιδίων αυτών . Διαπιστώθηκε ότι τα μακροφάγα είχαν διαφορετική δραστηριότητα του ενζύμου ανάλογα με τον ιστό προέλευσής τους και με την λειτουργική τους κατάσταση . Έτσι , τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είχαν υψηλότερη δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης από τα περιτοναϊκά μακροφάγα , ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που προέρχονταν από πειραματόζωα προσβεβλημένα από βακίλλους BCG είχαν υψηλότερη δραστηριότητα από εκείνα που προέρχονταν από υγιή πειραματόζωα (Cohn και Wiener, 1963a) . Πάντοτε η Οξίνη Φωσφατάση προερχόταν από τα λυσοσώματα των μακροφάγων , αν και ένα μικρό μέρος της δραστηριότητας του ενζύμου εντοπιζόταν διάχυτα σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα . Όταν τα μακροφάγα εκτέθηκαν σε μικροοργανισμούς ή zymosan τα οποία προκάλεσαν έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα , υπήρξε προοδευτική μεταφορά της Οξίνης Φωσφατάσης από τα λυσοσώματα στα φαγοσώματα και μικρού βαθμού εξωκύτωση του ενζύμου στον περικυττάριο χώρο . Μέσα σε δύο ώρες το μεγαλύτερο τμήμα της δραστηριότητας του ενζύμου βρισκόταν στα φαγοσώματα , ενώ με μορφολογικά , ιστοχημικά και βιοχημικά κριτήρια τα λυσοσώματα εμφανίζονταν άδεια από ένζυμο (Cohn και Wiener, 1963b) . Η αύξηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης λόγω σύνθεσης νέων ποσοτήτων ενζύμου διαπιστώθηκε και κατά την *in vitro* ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και κατά την ενεργοποίησή τους *in vivo* από βακτηριακή ενδοτοξίνη (Cohn και Benson, 1965a) . Επίσης , αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης λόγω παραγωγής νέου ενζύμου παρατηρήθηκε και μετά από διέγερση της πινocyττωτικής δραστηριότητας των μακροφάγων (Cohn και Benson, 1965b , Cohn και συν., 1965) . Σε μία άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση μυκοβακτηριδίων BCG σε πειραματόζωα όχι μόνο αύξησε την λυσοσωματική Οξίνη Φωσφατάση των περιτοναϊκών μακροφάγων , αλλά επίσης αύξησε και την δραστηριότητα του ενζύμου στο πλάσμα και στο ήπαρ (Saito και Suter, 1965a) . Μάλιστα τα επίπεδα της Οξίνης Φωσφατάσης στο πλάσμα αποτελούσαν αξιόπιστο δείκτη της ευαισθησίας του πειραματόζωου στην χορήγηση ενδοτοξίνης , χωρίς όμως να επιβεβαιωθεί η προέλευση του ενζύμου από τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα (Saito και Suter, 1965b) . Πολύ γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι η έκκριση Οξίνης Φωσφατάσης και άλλων λυσοσωματικών ενζύμων από τα μακροφάγα ήταν ένας από τους κύριους μηχανισμούς ιστικής βλάβης στις χρόνιες φλεγμονές (Page και συν., 1974) . Μία σειρά πειραμάτων που διεξήχθησαν για να επιβεβαιώσουν την συμμετοχή των όξινων υδρολασών των μακροφάγων στις χρόνιες φλεγμονές έδειξαν ότι : α) η *in vitro* έκθεση μακροφάγων σε γλυκοπεπτιδογλυκάνες του τοιχώματος του Στρεπτόκοκκου-Α προκαλούσε αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης των μακροφάγων και αυξημένη έκκριση Οξίνης Φωσφατάσης στο καλλιεργητικό υλικό . Η έκκριση του ενζύμου ξεκινούσε σε μία ώρα και ολοκληρωνόταν σε τέσσερις ώρες , ενώ αφορούσε μέχρι και το

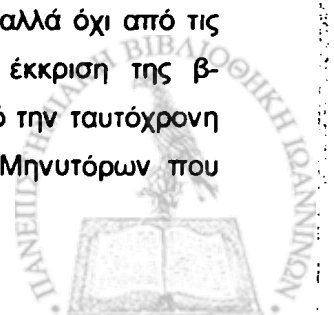
80% της συνολικής ποσότητας του ενζύμου . β) η *in vitro* έκθεση μακροφάγων σε λιποπυρολυσακχαρίτη από Σαλμονέλλα ή ομογενοποιημένα άλλων Gram(-) βακτηρίων οδηγούσε σε αυξημένη σύνθεση και έκκριση Ώξινης Φωσφατάσης , που διαρκούσε τουλάχιστον 72 ώρες . γ) η *in vitro* έκθεση των μακροφάγων σε ανοσοσυμπλέγματα ή σωματίδια αμιάντου ή πυριτίου οδηγούσε σε παρόμοια αύξηση της σύνθεσης και έκκρισης Ώξινης Φωσφατάσης . (Page και συν., 1974) .

Η διαπίστωση της ικανότητας επαγωγής της σύνθεσης και έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων από τα μακροφάγα καθώς και η αναγνώριση της συμμετοχής του φαινομένου αυτού στην παθογένεια των φλεγμονωδών αντιδράσεων οδήγησαν στην μελέτη των μηχανισμών που διέπουν των διαδικασιών αυτών . Γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι κάθε λυσοσωματικό ένζυμο του μακροφάγου αντιδρούσε διαφορετικά στην ενεργοποίηση από ένα συγκεκριμένο διεγέρτη και ότι το ίδιο ένζυμο αντιδρούσε διαφορετικά κατά την *in vivo* ή την *in vitro* διέγερση του μακροφάγου ή μετά από διαφορετικούς χρόνους ενεργοποίησης των κυττάρων (Morland και Kaplan, 1977) . Ωστόσο η Ώξινη Φωσφατάση φαινόταν να αντιδρά πάντα με αυξημένη παραγωγή και έκκριση , ανεξαρτήτως του τρόπου διέγερσης των μακροφάγων (Morland και Kaplan, 1977 , Schnyder και Baggiolini, 1978) με αποτέλεσμα να θεωρηθεί ένα βιοχημικό κριτήριο της ενεργοποίησης των μακροφάγων (Kamovsky και Lazdiņš, 1978) . Ένα παράδειγμα αυτής της συμπεριφοράς της Ώξινης Φωσφατάσης των μακροφάγων είναι το ότι μετά από την ενεργοποίηση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων με ενδοτοξίνη , οι μόνες όξινες υδρολάσες που αυξάνονται είναι η Ώξινη Φωσφατάση και η Καθεψίνη , αλλά η αύξηση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης είναι πολύ πιο έντονη (Cooper και συν., 1984) .

Η παραγωγή Ώξινης Φωσφατάσης αυξάνεται μετά από έκθεση σε πολλά και διαφορετικά είδη διεγερτών . Ένας από αυτούς είναι και οι λιποπρωτείνες . Έτσι όταν τα μακροφάγα φαγοκυτταρώσουν VLDL-λιποπρωτείνες αυξάνουν την παραγωγή Ώξινης Φωσφατάσης και ταυτόχρονα μεταβάλλεται η εντόπισή του ενζύμου μέσα στα κυτταρικά οργανίδια , δηλαδή μεταβάλλεται το ποσοστό του ενζύμου που εντοπίζεται στα σφαιρικά και σωληνοειδή λυσοσώματα , στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε άλλα σωματίδια (Jones και συν., 1991) . Η κατανομή του ενζύμου στα μακροφάγα που φαγοκυττάρωσαν VLDL-λιποπρωτείνες συχνά μοιάζει με τις κατανομές που παρατηρήθηκαν σε μακροφάγα τα οποία προέρχονται από αθηρωματικές πλάκες .

Υπάρχουν ορισμένες μελέτες που δείχνουν ότι τα μονοκύτταρα διαθέτουν έναν ιδιαίτερο και χαρακτηριστικό συνδυασμό ισοενζύμων Ώξινης Λυσοσωματικής Φωσφατάσης και ότι ο συγκεκριμένος αυτός συνδυασμός ισοενζύμων παρουσιάζεται και στα ιστικά μακροφάγα και τα επιθηλιοειδή κύτταρα (Radzun και συν., 1980 , Radzun και συν., 1982) .

Η σύνθεση και έκκριση της Ώξινης Φωσφατάσης φαίνεται ότι δεν εξαρτάται από την φαγοκυττάρωση (Schnyder και Baggiolini, 1978 , Hsueh και συν., 1979) ούτε από την ταυτόχρονη παραγωγή προσταγλανδινών από τα μακροφάγα (Hsueh και συν., 1979) . Η συμπεριφορά της Ώξινης Φωσφατάσης δεν μπορεί να γενικευτεί και για άλλες όξινες υδρολάσες , αφού η έκκριση της Ν-ακετυλο-Γλυκοσαμινιδάσης έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται από την φαγοκυττάρωση αλλά όχι από τις προσταγλανδίνες (Bonney και συν., 1978 , Tapper και Sandler, 1995) . Η έκκριση της β-Γλυκουρονιδάσης από μακροφάγα ενεργοποιημένα με λιποπρωτείνες εξαρτάται από την ταυτόχρονη παραγωγή προσταγλανδινών (Kelley και συν., 1988) . Οι μηχανισμοί Δεύτερων Μηνυτών που



ενεργοποιούν και ελέγχουν την σύνθεση και έκκριση της Οξίνης Φωσφατάσης και των άλλων όξινων υδρολασών δεν έχουν ακόμα πλήρως διερευνηθεί .

Τα γλυκοκορτικοειδή όπως η Υδροκορτιζόνη και η Δεξαμεθαζόνη επιδρούν αρνητικά στην αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης και στην αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων , γεγονός που συνοδεύουν την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα (Rinehart και συν., 1982) . Έτσι , τα γλυκοκορτικοειδή δεν επιτρέπουν στα μονοκύτταρα να παράγουν τις πολύ μεγάλες ποσότητες Οξίνης Φωσφατάσης που χαρακτηρίζουν την ωρίμασή τους , ούτε επιτρέπουν την αύξηση του λυσοσωματικού δικτύου αλλά αντιθέτως ευοδώνουν την ανάπτυξη κυστιδίων και κενοτοπίων .

Σήμερα η μελέτη της Οξίνης Φωσφατάσης των μακροφάγων έχει εντοπιστεί κυρίως στην ιστοχημική ανίχνευση του ανθεκτικού στο L-τρουγικό οξύ ισοενζύμου της , που χαρακτηρίζει τα ώριμα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και τα κύτταρα που συγγενεύουν με αυτά (π.χ. οστεοκλάστες) και επίσης εφαρμόζεται στην διαγνωστική αιματολογία για την ταξινόμηση ορισμένων λευχαιμιών (Japckila και συν., 1978 , Snipes και συν., 1986) .



Κεφάλαιο 7 . Οι Μηχανισμοί Μεταγωγής Μηνύματος (Οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων) .

Κεφάλαιο 7-1 . Εισαγωγικά στοιχεία .

ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ .

Στους πολυκυττάριους οργανισμούς η επίτευξη της αύξησης , της διαφοροποίησης , της ομοιόστασης και του μεταβολισμού θα ήταν αδύνατη χωρίς την ικανότητα συνεργασίας και ρύθμισης μεταξύ των κυττάρων . Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ απομακρυσμένων οργάνων και ιστών επιτυγχάνεται συνήθως μέσω χημικών ουσιών (ορμονών, αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών , αυτακοειδών και νευρομεταβιβαστών) που διακινούνται σε όλο το σώμα . Οι ουσίες αυτές επιτρέπουν την επικοινωνία και τον συντονισμό μεταξύ απομακρυσμένων ιστών και επειδή αποτελούν τους αγγελιαφόρους του σώματος ονομάζονται **Μηνύτορες** (Messengers ή Signaling Molecules) . Συχνά οι Μηνύτορες δεν μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων για να ασκήσουν τις βιολογικές τους επιδράσεις , επειδή είναι μεγάλα υδατοδιαλυτά μόρια . Για τον λόγο αυτό υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων ειδικά μόρια που λέγονται **Μεμβρανικοί Υποδοχείς** . Οι Μηνύτορες ενώνονται με τους Υποδοχείς που ανιχνεύουν την άφιξη και παρουσία αυτών των Μηνυτόρων και διασφαλίζουν την επίτευξη της ειδικής βιολογικής δράσης τους . Όμως υπάρχουν και λιποδιαλυτοί Μηνύτορες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και ενώνονται με **Κυτταροπλασματικούς Υποδοχείς** που ανιχνεύουν την παρουσία αυτών των Μηνυτόρων και διασφαλίζουν την επίτευξη της βιολογικής δράσης τους , μεταφέροντας τους Μηνύτορες στον πυρήνα . Η ύπαρξη υποδοχέων είναι απαραίτητη για την λειτουργία των Μηνυτόρων και ο Μηνύτορας που συνδέεται με ένα συγκεκριμένο υποδοχέα αποτελεί τον **Υποκαταστάτη** του (Ligand) . Έτσι ο κάθε υποδοχέας διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης του Υποκαταστάτη του και μία περιοχή-τελεστή (effector domain) με την οποία επιτυγχάνει μια ειδική βιολογική λειτουργία που «μεταφέρει» στο εσωτερικό του κυττάρου το μήνυμα της σύνδεσης Υποκαταστάτη-Υποδοχέα . Ο τελικός αποδέκτης αυτού του μηνύματος είναι ο στόχος τον οποίο ο Μηνύτορας προορίζεται να επηρεάσει . Ο στόχος αυτός μπορεί να έχει ποικίλλουσα βιολογική υφή . Συνήθως αποτελεί μηχανισμό για την επίτευξη συγκεκριμένου βιολογικού έργου . Με την βοήθεια της περιοχής-τελεστή ο υποδοχέας μπορεί :

(1) να επηρεάζει απευθείας τον μηχανισμό-στόχο ή να ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη-τελεστή (effector protein) η οποία θα επηρεάσει τον μηχανισμό-στόχο ή

(2) να ενεργοποιήσει μόρια που ονομάζονται **Μετατροπείς** (Transducers) που δημιουργούν ένα δεύτερο (ενδοκυττάριο) σήμα δια του σχηματισμού άλλων μορίων που ονομάζονται διαμεσολαβητές . Αυτοί οι διαμεσολαβητές θα επιδράσουν τελικά στον στόχο . Όταν η επίτευξη της βιολογικής επίδρασης του Μηνύτορα απαιτεί την δράση ενός διαμεσολαβητή που θα επηρεάσει τον στόχο , ο διαμεσολαβητής αυτός συνεχίζει την μεταγωγή του μηνύματος πέρα από το φυσικό όριο που αποτελεί η κυτταρική μεμβράνη και προς το εσωτερικό του κυττάρου . Για τον λόγο αυτό ο διαμεσολαβητής ονομάζεται **Δεύτερος Μηνύτορας** (Second Messenger) . (Ganong, 1989 , Damell και συν., 1990 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Όταν ο υποδοχέας επηρεάζει απευθείας τον μηχανισμό-στόχο , τότε συνήθως η περιοχή-τελεστής παρουσιάζει κάποια ενζυμική δραστηριότητα (π.χ. δραστηριότητα Κινάσης) ή ελέγχει την

λειτουργία ενός Διαύλου Ιόντων (Ligand-gated Ion Channels) . Έτσι υπάρχουν υποδοχείς με δραστηριότητα Κινάσης της Tyrosίνης (υποδοχείς ινσουλίνης, λεμφοκινών, EGF, PDGF, κ.α.) ή Κινάσης Σερίνης-Θρεονίνης (υποδοχείς TGF-β) που δρουν φωσφορυλιώνοντας δομικές ή ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή άλλα ένζυμα . Επίσης υπάρχουν υποδοχείς με δραστηριότητα Γουανυλικής Κυκλάσης (υποδοχείς των Κολπικών Νατριουρητικών Πεπτιδίων) που δρουν παράγοντας Κυκλικό GMP και πιθανώς κάποιοι υποδοχείς με δραστηριότητα Φωσφατάσης της Tyrosίνης . Τέλος υπάρχουν υποδοχείς που ρυθμίζουν την λειτουργία Διαύλων Ιόντων (Νικοτινικοί υποδοχείς Ακετυλοχολίνης, Α-υποδοχείς GABA και 5-HT₃-Σεροτονινεργικοί υποδοχείς) που όταν ενεργοποιηθούν μεταβάλλουν το ηλεκτρικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης ή την ιοντική σύνθεση του κυτταροπλάσματος . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Ορισμένοι μεμβρανικοί υποδοχείς είναι λειτουργικά και ανατομικά συζευγμένοι με ειδικές πρωτεΐνες που συνδέουν την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και που ονομάζονται G-πρωτεΐνες . Τέτοιοι υποδοχείς υπάρχουν για τις βιοδραστικές αμίνες , για τα εικοσανοειδή και πολλές πεπτιδικές ορμόνες και δρουν δια της ενεργοποίησης Μετατροπέων (Transducers) οι οποίοι με την σειρά τους δημιουργούν Δεύτερους Μηνύτορες . Οι Μετατροπείς αυτοί μπορεί να είναι ένζυμα (Αδενυλική Κυκλάση, Γουανυλική Κυκλάση, Φωσφολιπάση A₂ , Φωσφολιπάση C, Φωσφολιπάση D) ή Διαύλοι Ιόντων (K⁺ , Na⁺ ή Ca²⁺) ή τέλος να είναι πρωτεΐνες-μεταφοράς (transport proteins) . Όλοι οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες ανήκουν στην ίδια οικογένεια υδρόφοβων πρωτεϊνών και έχουν μια κοινή χαρακτηριστική δομή : η ενδοκυττάρια και η εξωκυττάρια μοίρα τους χωρίζονται από μια περιοχή (membrane-spanning domain) που αποτελείται από επτά τμήματα με δομή α-Έλικας . (Darnell και συν., 1990 , Goodman-Gilman και συν., 1996) . Για το σύστημα αυτό των G-πρωτεϊνών , των Μετατροπέων και των Δεύτερων Μηνυτόρων θα γίνει αναλυτική αναφορά στην συνέχεια .

Όπως ήδη αναφέρθηκε , εκτός από τους μεμβρανικούς Υποδοχείς υπάρχουν και οι Κυτταροπλασματικοί Υποδοχείς . Αυτοί εντοπίζονται σε διαλυτή μορφή στο κυτταρόπλασμα και σε αυτούς συνδέονται οι στεροειδικές ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή , αλατοκορτικοειδή , ορμόνες του φύλου) , οι θυρεοειδικές ορμόνες, τα ρετινοειδή και η Βιταμίνη D . Επειδή οι Κυτταροπλασματικοί Υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που συνδέονται άμεσα με το DNA και ρυθμίζουν την μεταγραφή ειδικών γονιδίων , ανήκουν στην οικογένεια των Παραγόντων Μεταγραφής (Transcription Factors) . Οι Υποδοχείς αυτοί είναι διμερή που αποτελούνται από δύο όμοιες ή διαφορετικές υπομονάδες (ομοδιμερή / ετεροδιμερή) και συνδυάζονται στην δημιουργία ενός συμπλέγματος με τρεις λειτουργικές περιοχές : Η περιοχή κοντά στο καρβόξυ-τελικό άκρο του μορίου τους συνδέεται με τον Μηνύτορα (ορμόνη) . Αυτή καταστέλλει την λειτουργικότητα του υποδοχέα όταν δεν είναι συνδεδεμένος με την ορμόνη . Η περιοχή κοντά στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου τους δεν έχει μελετηθεί ικανοποιητικά , αλλά θεωρείται ότι επηρεάζει την ικανότητα του υποδοχέα να ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων . Η κεντρική περιοχή είναι εκείνη που συνδέεται με το DNA , σε μία περιοχή του που ευνοεί την έναρξη ή την διακοπή της μεταγραφής του γονιδίου . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .



ΟΙ G-ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ .

Σε πολλές περιπτώσεις για να ενεργοποιηθεί ένας Μετατροπέας και να παραχθεί ένας Δεύτερος Μηνύτορας μετά την σύνδεση του Μηνύτορα-Υποκαταστάτη στον Μεμβρανικό Υποδοχέα θα απαιτηθεί η δράση μιας G-πρωτεΐνης (Guanine nucleotide Regulatory Proteins) .

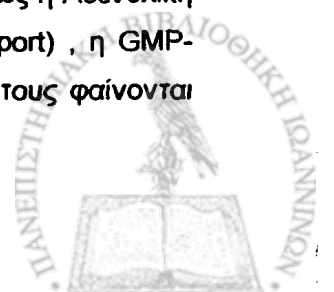
Οι G-πρωτεΐνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών με ομόλογη δομή που συνδέουν την Τριφωσφορική Γουανοσίνη (GTP) . Όλες οι G-πρωτεΐνες έχουν κοινή μορφή , αποτελούν δηλαδή ένα ετεροτριμερές από τρεις υπομονάδες α , β και γ . Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 21 διαφορετικές α -υπομονάδες , 4 διαφορετικές β -υπομονάδες και 6 διαφορετικές γ -υπομονάδες . Οι α -υπομονάδες έχουν MB 39 - 46 kDa , οι β -υπομονάδες 37 kDa και οι γ -υπομονάδες 8 kDa . Οι β - και γ -υπομονάδες είναι στενά συνδεδεμένες και λειτουργούν ως ενιαία λειτουργική οντότητα . Το ίδιο βγ-σύμπλεγμα μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαφορετικές G-πρωτεΐνες . Αντιθέτως η α -υπομονάδα είναι χαρακτηριστική μιας μόνο G-πρωτεΐνης και για αυτό χρησιμεύει για την ταξινόμηση των G-πρωτεϊνών . Οι α -υπομονάδες διαθέτουν μια θέση σύνδεσης υψηλής συγγένειας για τα φωσφονουκλεοτίδια της γουανίνης GTP και GDP , μία θέση σύνδεσης του υποδοχέα , μια θέση σύνδεσης του Μετατροπέα καθώς και μία θέση σύνδεσης με το βγ-σύμπλεγμα . Επίσης οι α -υπομονάδες έχουν μια περιοχή με ενζυμική δραστηριότητα GTPάσης , που υδρολύει τον πυροφωσφορικό δεσμό της τελικής φωσφορικής ομάδας του GTP και το μετατρέπει σε GDP . (Hamett και Klaus, 1988 , Helper και Gilman, 1992) .

Αν και οι G-πρωτεΐνες δεν περιέχουν περιοχές που θα μπορούσαν να συνδέονται με λιπιδικές διπλοστοιβάδες , είναι σταθερά συνδεδεμένες με τις κυτταρικές μεμβράνες . Αυτό οφείλεται στους πρενυλικούς υποκαταστάτες των γ -υπομονάδων και στους μυριστικούς υποκαταστάτες των α -υπομονάδων που δρουν σαν άγκυρες και συγκρατούν τις G-πρωτεΐνες στις μεμβράνες .

Όταν η α -υπομονάδα είναι συνδεδεμένη με το GDP παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την βγ-υπομονάδα και το τριμερές είναι ανενεργό . Όταν η α -υπομονάδα είναι συνδεδεμένη με το GTP μειώνεται η συγγένεια για την βγ-υπομονάδα και το τριμερές διασπάται σε δύο ενεργά τμήματα , την α -υπομονάδα και το βγ-σύμπλεγμα . Η α -υπομονάδα έχει την κύρια βιολογική δράση . Το βγ-σύμπλεγμα μπορεί να επηρεάζει την λειτουργία των G-πρωτεϊνών και των Μετατροπέων .

Σήμερα ο μηχανισμός δράσης των G-πρωτεϊνών θεωρείται ότι είναι ο εξής : η σύνδεση του Υποκαταστάτη με τον Υποδοχέα προκαλεί την ταχεία αποδέσμευση του GDP και την δέσμευση GTP στην α -υπομονάδα της G-πρωτεΐνης , με αποτέλεσμα την διάσπαση του ετεροτριμερούς και την ενεργοποίηση της α -υπομονάδας . Αυτή επηρεάζει την λειτουργία του Μετατροπέα ώστε δημιουργείται ένας Δεύτερος Μηνύτορας που μεταφέρει το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου . Όταν η α -υπομονάδα προκαλέσει την υδρόλυση του GTP σε GDP με την εγγενή δράση GTPάσης που διαθέτει . Τότε η α -υπομονάδα ξανασυνδέεται με το βγ-σύμπλεγμα και ξαναδημιουργείται ένα ανενεργό ετεροτριμερές . (Hamett και Klaus, 1988 , Helper και Gilman, 1992) .

Οι G-πρωτεΐνες συνδέονται με μια σειρά από διαφορετικούς Μετατροπέις , όπως η Αδενυλική Κυκλάση , η Φωσφολιπάση- C_{β} , οι δίαυλοι Ca^{+2} ή K^{+} , η αντλία Na^{+}/H^{+} (Na^{+}/H^{+} antiport) , η GMP-Φωσφοδιαστεράση και άλλοι . Οι πιο χαρακτηριστικές G-πρωτεΐνες και οι ιδιότητές τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .



G-πρωτεΐνη	Τυπικός Υποδοχέας	Επίδραση στον Μετατροπέα
G _S -πρωτεΐνη	β-Αδρενεργικός / Γλυκαγόνης	↑ Αδενυλικής Κυκλάσης και ↑ Διαύλων Ca ⁺²
G _{α1} -πρωτεΐνη	Υποδοχέας όσφρησης	↑ Αδενυλικής Κυκλάσης
G _i -πρωτεΐνη	Μουσκαρνικός Χολνεργικός	↑ Αδενυλικής Κυκλάσης και ↓ Διαύλων K ⁺
G _o -πρωτεΐνη	α ₂ -Αδρενεργικός	↑ Φωσφολιπάσης C _β και ↓ Διαύλων Ca ⁺²
G _t -πρωτεΐνη	Υποδοχέας Ροδοψίνης	↑ GMP-Φωσφοδιαστεράσης
G _q ή G _p -πρωτεΐνη	α ₁ -Αδρενεργικός	↑ Φωσφολιπάσης C _β
G ₁₃ -πρωτεΐνη	?	↑ Αντλίας Na ⁺ /H ⁺

Στην πραγματικότητα όμως υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες G-πρωτεϊνών που επηρεάζουν διαφορετικούς Μετατροπείς και προκαλούν την δημιουργία μιας μεγάλης ποικιλίας Δεύτερων Μηνυτόρων . Μια G-πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάζει δύο διαφορετικούς Μετατροπείς (έναν με την α-υπομονάδα και άλλον με το βγ-σύμπλεγμα) . Τέλος ένας Μετατροπέας μπορεί να δημιουργεί περισσότερους από έναν Δεύτερους Μηνυτόρες , όπως π.χ. η Φωσφολιπάση C_β δημιουργεί και την Διακυλογλυκερόλη και την Τριφωσφορική Ινοσιτόλη . (Harnett και Klaus, 1988 , Heizer και Gilman, 1992) .



Κεφάλαιο 7-2 . Η οδός της Αδενυλικής Κυκλάσης - Κυκλικού AMP - Εξαρτημένης από το Κυκλικό AMP Πρωτεϊνικής Κινάσης A .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Ο ρόλος του Κυκλικού Αδενοσινω-Μονοφωσφορικού Οξέος (cAMP) στην λειτουργία των ιστών και οργάνων που βρίσκονται υπό ορμονικό έλεγχο είχε γίνει αποδεκτός από την δεκαετία του 1960 , δηλαδή από την εποχή της ανακάλυψής του από τους Sutherland και Rall . Πολύ γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι η ουσία αυτή παραγόταν από όλους σχεδόν τους ιστούς εκτός από τα ερυθροκύτταρα και ότι διαμεσολαβούσε την δράση πάρα πολλών ορμονών (Butcher, 1968) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ cAMP .

Το cAMP αποτελεί έναν Δεύτερο Μηνύτορα που παράγεται από την Αδενυλική Κυκλάση που επέχει θέση Μετατροπέα . Αυτή είναι ένα ένζυμο της κυτταρικής μεμβράνης που είναι συνδεδεμένο ανατομικά και λειτουργικά με G-πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την λειτουργία του . Οι G-πρωτεΐνες με την σειρά τους είναι συνδεδεμένες με ειδικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς , όπως π.χ. οι αδρενεργικοί υποδοχείς και οι υποδοχείς των Προσταγλανδινών-E (Limbird, 1981) . Η Αδενυλική Κυκλάση (ATP pyrophosphate-lyase [cyclizing] , E.C. 4.6.1.1) είναι ένα μεμβρανικό ένζυμο με MB: 120 - 150 kDa , εξαρτημένο λειτουργικά από το Mn^{+2} , που μετατρέπει το ATP σε cAMP και απελευθερώνει πυροφωσφορικές ομάδες . Διακρίνουμε πέντε ισομορφές του ενζύμου που χωρίζονται σε δύο οικογένειες ανάλογα με την ευαισθησία τους στην Καλμοδουλίνη και το Ca^{+2} (Tang και Gilman, 1992) . Το μόριο της Αδενυλικής Κυκλάσης διαθέτει θέση σύνδεσης με τις α-υποομάδες των G-πρωτεϊνών , που ρυθμίζουν την λειτουργία της . Η Αδενυλική Κυκλάση ενεργοποιείται από τις G_s -πρωτεΐνες (π.χ. β-αδρενεργικοί υποδοχείς) και καταστέλλεται από τις G_i -πρωτεΐνες (π.χ. α₂-αδρενεργικοί υποδοχείς) . Οι G_i -πρωτεΐνες ασκούν ισχυρότερη δράση από τις G_s -πρωτεΐνες , γιατί επηρεάζουν την Αδενυλική Κυκλάση και με την α-υποομάδα και με την βγ-υποομάδα τους (Berridge, 1985 , Levitzki, 1988 , Tang και Gilman, 1992) .

Το cAMP που παράγεται μετά από την σύνδεση Υποκαταστάτη-Υποδοχέα (π.χ. επινεφρίνης-αδρενεργικού υποδοχέα) και την ενεργοποίηση της Αδενυλικής Κυκλάσης μέσω μιας G_s -πρωτεΐνης , συνεχίζει την μεταγωγή του μηνύματος πέρα από την κυτταρική μεμβράνη προς το εσωτερικό του κυττάρου και διαχέεται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα . Εκεί θα συνδεθεί και θα ενεργοποιήσει μια ειδική Κινάση Σερίνης-Θρεονίνης , την Πρωτεϊνική Κινάση A ή Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση (PKA, cAMP-Dependent Protein Kinase) που διαμεσολαβεί τις βιολογικές επιδράσεις του cAMP ή εναλλακτικά θα αποδομηθεί από την cAMP-Φωσφοδιεστεράση (η οποία διασπά τον 3'-5' φωσφορικό δεσμό και μετατρέπει το cAMP σε 5'-AMP).

Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ A (ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ cAMP ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ) .

Η Πρωτεϊνική Κινάση A (PKA) είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο ρυθμιστικές (R) και δύο καταλυτικές (C) υποομάδες (Regulatory-Catalytic Subunits) με MB 48 και 40.8 kDa αντίστοιχα . Οι δύο ρυθμιστικές υπομονάδες είναι ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς , ενώ κάθε μια καταλυτική υποομάδα συνδέεται με μία ρυθμιστική υποομάδα . Το τετραμερές είναι ανενεργό , αλλά όταν ενωθούν δύο μόρια cAMP στις δύο ρυθμιστικές R-υπομονάδες , τότε αυτές υφίστανται

αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή τους με αποτέλεσμα να αποχωριστούν από αυτές οι δύο καταλυτικές C-υπομονάδες. Τότε οι καταλυτικές υπομονάδες καθίστανται πλέον ενεργές και φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα της Κινάσης σε θέσεις σερίνης. Αυτό γίνεται με μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας από το ATP, υπό την παρουσία Mg^{2+} . Έχουν προσδιοριστεί δύο ισοένζυμα της PKA με βάση τους δύο διαφορετικούς τύπους ρυθμιστικών R-υπομονάδων (R-I και R-II). Είναι γνωστό ότι μόνο οι R-II υπομονάδες έχουν την ικανότητα της αυτοφωσφορυλίωσης, ενώ οι R-I υπομονάδες διαθέτουν θέσεις για σύνδεση υψηλής συγγένειας με Mg-ATP. Υπάρχουν επίσης τρεις διαφορετικοί τύποι C-υπομονάδων (Ca, Cβ και Cγ), από τους οποίους η Ca-υπομονάδα εκφράζεται σε όλα τα είδη κυττάρων ενώ οι άλλες δύο εκφράζονται μόνο σε ορισμένους ιστούς. (Taylor, 1989, Taylor και συν., 1990, Taylor και συν., 1993, Woodgett, 1994).

Η Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση επιτελεί φωσφορυλίωση διαφόρων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (όπως π.χ. ένζυμα) σε θέσεις σερίνης που εντοπίζονται σε αλληλουχίες όπως Arg-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly ή Arg-Thr-Lys-Arg-Ser-Gly ή Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu. Τέτοιες αλληλουχίες υπάρχουν σε ένζυμα όπως η Λιπάση των Τριγλυκεριδίων, η Συνθετάση του Γλυκογόνου και η Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου αλλά και σε πρωτεΐνες όπως ο Αναστολέας της Φωσφοπρωτεϊνικής Φωσφατάσης, η Τροπονίνη-1 και Φωσφολαμβάνη. Όλα τα παραπάνω αποτελούν τυπικά υποστρώματα της PKA. Η PKA επίσης φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί έναν Δίαυλο Ca^{2+} στην μεμβράνη των κυττάρων του μυοκαρδίου. Τέλος η PKA προκαλεί την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση αδιευκρίνιστων ακόμα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την σύνθεση DNA και με την κυτταρική διαίρεση και αύξηση, καθώς επίσης και την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων c-fos και c-myc και των Src-Κινασών της Τυροσίνης (Greengard, 1978, Hunter, 1987, Dumont και συν., 1989, Cohen, 1992). Όμως η ενεργοποίηση των υποστρωμάτων δεν μπορεί να είναι μόνιμη. Έτσι ενώ η Πρωτεϊνική Κινάση A ενεργοποιεί ή αναστέλλει τα ένζυμα-στόχους με φωσφορυλίωση, η απενεργοποίηση των ενζύμων αυτών επιτυγχάνεται με την αποφωσφορυλίωσή τους από τις τέσσερις Πρωτεϊνικές Φωσφατάσες (Protein Phosphatases) Pp-1, Pp-2a, Pp-2b και Pp-2c. (Cohen, 1992).

Η οδός του cAMP μπορεί να επιδράσει απευθείας στην έκφραση ορισμένων γονιδίων μέσω της PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding Protein), ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται με την πρωτεΐνη CRB. Το σύμπλεγμα θα συνδεθεί στην περιοχή CRE (Cyclic AMP Response Element) του προαγωγέα του γονιδίου που είναι ρυθμιζόμενο από αυτήν την οδό. Η σύνδεση του συμπλέγματος CREB-CRB επάνω στον προαγωγέα του γονιδίου προκαλεί την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου (Schmid και συν., 1993).



Κεφάλαιο 7-3 . Οι οδοί της Φωσφολιπάσης C - Διακυλογλυκερόλης - Πρωτεϊνικής Κινάσης C και Φωσφολιπάσης C - Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης - Ασβεστίου .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Στο τέλος της δεκαετίας του 1940 απομονώθηκαν για πρώτη φορά τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια από τον Folch . όμως πέρασαν είκοσι χρόνια ακόμα για να αρχίσει να γίνεται αντιληπτός ο ρόλος τους στην Μεταγωγή Μηνυμάτων καθώς και η συμβολή της Φωσφολιπάσης C και άλλων Φωσφολιπασών στην γένεση του Μηνύματος .

Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτός ο μηχανισμός μεταγωγής μηνυμάτων διαμεσολαβεί την δράση πολλών ορμονών και άλλων παραγόντων όπως της Αδρεναλίνης (μέσω α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων) , της Ακετυλοχολίνης (μέσω M_1 -μουσκαρινικών υποδοχέων) , της Ισταμίνης (μέσω H_1 -υποδοχέων) , της Σεροτονίνης (μέσω $5HT_2$ -υποδοχέων) , του Ενεργοποιητή των Αιμοπεταλίων (PAF) , της Αγγειοτενσίνης-II και πολλές άλλων . (Nishizuka, 1984 , Bertidge, 1985) .

- Η ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ C ΚΑΙ Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ .

Ορισμένοι Κυτταροπλασματικοί Υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι μέσω G_q ή G_p -πρωτεϊνών με το ένζυμο Φωσφολιπάση- $C_{\beta 1}$ ($PLC_{\beta 1}$) , που επέχει θέση μετατροπέα . Η $PLC_{\beta 1}$ ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια Φωσφολιπασών-C που έχουν ως ειδικό υπόστρωμα την Διφωσφορική Φωσφατιδυλο-Ινοσιτόλη (PIP_2) . Η σύνδεση Υποκαταστάτη-Υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας G-πρωτεΐνης που με την σειρά της ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση- $C_{\beta 1}$. Όταν ενεργοποιηθεί μέσω της G-πρωτεΐνης , η Φωσφολιπάση- $C_{\beta 1}$ υδρολύει την 4,5-Διφωσφορική Φωσφατιδυλο-Ινοσιτόλη (PIP_2) με αποτέλεσμα την δημιουργία δύο Δεύτερων Μηνυτόρων , της Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης (IP_3) και της Διακυλογλυκερόλης (DAG) . Κατά ένα μικρό μέρος παράγεται ένας ακόμα Δεύτερος Μηνυτορας που επηρεάζει την οδό του ασβεστίου , η Τετραφωσφορική Ινοσιτόλη (IP_4) . (Asaoka και συν., 1992 , Liscovitch, 1992 , Nishizuka, 1992 , Nakamura και Nishizuka, 1994 , Toker, 1998) .

Εκτός από την Φωσφολιπάση $PLC_{\beta 1}$ και η Φωσφολιπάση $PLC_{\beta 2}$ ενεργοποιείται από G-πρωτεΐνες , αλλά από την $\beta\gamma$ -υποομάδα τους . Υπάρχει και μια άλλη ομάδα Φωσφολιπασών-C που συμμετέχει στην δημιουργία Δεύτερων Μηνυτόρων , οι Φωσφολιπάσες- $C_{\gamma 1}$ και $-C_{\gamma 2}$ ($PLC_{\gamma 1}$ και $PLC_{\gamma 2}$) αλλά αυτές δεν σχετίζονται με G-πρωτεΐνες . Οι Φωσφολιπάσες- $C_{\gamma 1}$ και $-C_{\gamma 2}$ ανταποκρίνονται σε ενεργοποίηση από Κινάσες της Τυροσίνης που συνήθως αποτελούν τμήμα των υποδοχέων Αυξητικών Παραγόντων . Τέλος δεν έχει οριστικά διευκρινιστεί αν υπάρχει λειτουργική συσχέτιση των Φωσφολιπασών- C_{δ} (PLC_{δ}) με τις G-πρωτεΐνες . (Asaoka και συν., 1992 , Liscovitch, 1992 , Nishizuka, 1992 , Nakamura και Nishizuka, 1994) .

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ - ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C .

Η υδρόλυση της PIP_2 δημιουργεί δύο Δεύτερους Μηνυτορες , την IP_3 και την DAG . Στην IP_3 θα γίνει αναφορά μαζί με την Οδό του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} , με την οποία και συσχετίζεται λειτουργικά . Εδώ θα γίνει αναφορά στον ρόλο που διαδραματίζει η 1,2-sn-DAG , ένα λιπόφιλο μόριο που αποτελεί τον φυσικό διεγέρτη της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Υπάρχουν πολλά διαφορετικά μόρια

Διακυλογλυκερόλης, με ποικίλα μήκη αλειφατικών αλυσίδων και διαμορφώσεις. Έχει αποδειχτεί ότι τα μόνα σημαντικά δομικά στοιχεία της DAG για την ενεργοποίηση της Κινάσης C αποτελούν η 1,2-sn-διαμόρφωση (δηλαδή η ύπαρξη των δύο εστερικών δεσμών οξυγόνου στις θέσεις 1' και 2') και η ομάδα υδροξυλίου στην θέση sn-3. Το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της DAG ως Δεύτερου Μηνύτορα και για αυτό τον λόγο διακυλογλυκερόλες με βραχείες αλειφατικές αλυσίδες (π.χ. 1-ολεοϋλ-2-ακετυλ-γλυκερόλη, 1,2-διοκτανοϋλ-γλυκερόλη) είναι εξίσου δραστικές με εκείνες που διαθέτουν μεγάλες αλυσίδες (π.χ. 1-στεαροϋλ-2-αραχιδοϋλ-). Αντιθέτως οι 2,3-sn- DAG και 1,3-sn- DAG, όπως εκείνες που δημιουργούνται από την Λιποπρωτεϊνική Λιπάση ή από άλλες Λιπάσες, δεν ενεργοποιούν την Πρωτεϊνική Κινάση C (Bell, 1986, Nishizuka, 1986). Ας σημειωθεί εδώ ότι η 1-στεαροϋλ-2-αραχιδοϋλ-γλυκερόλη είναι η πιο συνηθισμένη στην φύση.

Ο σκοπός της δημιουργίας DAG από την δράση της Φωσφολιπάσης C είναι η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C. Όμως η διέγερση της Φωσφολιπάσης C είναι βραχύχρονη και έτσι αρχικά παράγεται μικρή ποσότητα DAG η οποία και μεταβολίζεται ταχύτατα. Στην συνέχεια όμως ακολουθεί μια δεύτερη φάση παρατεταμένης παραγωγής DAG σε μεγαλύτερες ποσότητες. Αυτή η δεύτερη φάση οφείλεται σε ενεργοποίηση άλλης Φωσφολιπάσης που δρα σε διαφορετικά υποστρώματα (Asaoka και συν., 1992, Nishizuka, 1992, Nakamura και Nishizuka, 1994). Συγκεκριμένα μπορεί να δημιουργηθεί DAG και από την Φωσφατιδύλ-χολίνη και σε μικρότερο βαθμό από την Φωσφατιδύλ-αιθανολαμίνη, με την δράση της Φωσφολιπάσης-D. Η Φωσφολιπάση-D είτε μετατρέπει την Φωσφατιδύλ-χολίνη σε Φωσφατιδικό οξύ που στην συνέχεια θα μεταβληστεί σε DAG ή εναλλακτικά μετατρέπει την Φωσφατιδύλ-χολίνη σε PIP₂ που θα μεταβληστεί σε DAG. Επίσης, μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η Πρωτεϊνική Κινάση-C μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσα από άλλη οδό που χρησιμοποιεί την Φωσφατιδύλ-χολίνη (PC), την οδό της Φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂). Η ενεργοποίηση της PLA₂ θα προκαλέσει την υδρόλυση της φωσφατιδύλ-χολίνης και την δημιουργία cis-ακόρεστων λιπαρών οξέων (π.χ. λινολεϊκό, αραχιδοϊκό κ.α.) και Λύσο-PC. Τόσο τα cis-ακόρεστα λιπαρά οξέα όσο και η Λύσο-PC προκαλούν την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, διότι αυξάνουν την συγγένεια του ενζύμου για το Ca⁺² με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ενεργοποίησή του και από ελάχιστες ποσότητες DAG και Ca⁺². Επίσης η Πρωτεϊνική Κινάση C με την σειρά της ενεργοποιεί την PLA₂ για αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων και Λύσο-PC. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.

Η ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ C.

Αν και αρχικά η Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC) θεωρήθηκε μία ακόμα απλή Κινάση, μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1980 διαπιστώθηκε ότι αποτελούσε μια ολόκληρη οικογένεια Κινάσεων, που περιλάμβανε τρεις ομάδες και τουλάχιστον δέκα είδη ενζύμων (Isakov, 1988, Newton, 1997). Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν MB που κυμαίνονται από 67 έως 83 kDa, διαφορετική εξάρτηση από το Ca⁺² για την λειτουργία τους, διαφορετική ευαισθησία στην ενεργοποίηση από την Φωσφατιδύλ-σερίνη (PS), την Λύσο-Φωσφατιδύλ-χολίνη (λύσο-PC), την DAG και τα cis-Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα και τέλος διαφορετική ιστική εντόπιση. Ορισμένα από τα στοιχεία τους φαίνονται στον παρακάτω αναλυτικό πίνακα (Nishizuka, 1988, Nishizuka, 1992, Asaoka και συν., 1992, Woodgett, 1994, Nakamura και Nishizuka, 1994).

ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΡΚΚ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ .

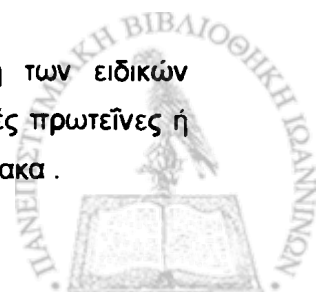
ΟΜΑΔΑ - ΕΙΔΟΣ	ΑΜΙΝΟΞΕΑ / ΜΒ (kDa)	ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ	ΙΣΤΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ
c-PKC α	672 76,799 kDa	PS, Ca ⁺² , DAG, cis-ΑΛΟ, λυσο-PC	Σε όλους τους ιστούς
c-PKC β-I	671 76,790 kDa	PS, Ca ⁺² , DAG, cis-ΑΛΟ, λυσο-PC	Σε μερικούς ιστούς
c-PKC β-II	673 76,933 kDa	PS, Ca ⁺² , DAG, cis-ΑΛΟ, λυσο-PC	Στους περισσότερους ιστούς
c-PKC γ	697 78,366 kDa	PS, Ca ⁺² , DAG, cis-ΑΛΟ, λυσο-PC	Μόνο στο ΚΝΣ
n-PKC δ	673 77,517 kDa	PS, DAG	Σε όλους τους ιστούς
n-PKC ε	737 83,474 kDa	PS, DAG, cis-ΑΛΟ	Στο ΚΝΣ (κυρίως) και αλλού
n-PKC η (L)	683 77,972 kDa	Θειική Χοληστερόλη	Δέρμα, πνεύμονες και καρδιά
n-PKC θ	707 81,571 kDa	?	Γραμμωτούς (σκελετικούς) μύες
a-PKC ζ	592 67,740 kDa	PS, cis-ΑΛΟ	Σε όλους τους ιστούς
a-PKC λ (I)	586 67,200 kDa	?	Όρχεις, ωοθήκες, νεφρός, ΚΝΣ .

Οι τρεις οικογένειες της ΡΚΚ είναι οι Κλασσικές (c-PKC) , οι Νέες (n-PKC) και οι Άτυπες (a-PKC) . Όλες τους είναι Κινάσες Σερίνης-Θρεονίνης , που η ενζυμική τους δραστηριότητα εντοπίζεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο του μορίου τους ενώ στο αμινο-τελικό άκρο τους εντοπίζεται η περιοχή σύνδεσης της Διακυλογλυκερόλης . Οι Κλασσικές ΡΚΚ έχουν μελετηθεί καλύτερα . Γνωρίζουμε ότι για να ενεργοποιηθεί μια cPKC είναι απαραίτητο να συνδεθεί με Ca⁺² , που θα επιτρέψει την Μετατόπισή της (translocation) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη . Εκεί θα ενωθεί με Φωσφατιδυλσερίνη (PS) και DAG (που υπάρχουν σε αφθονία στην λιπιδική διπλοστοιβάδα) και θα υποστεί αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή της , με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της . Ταυτοχρόνως η σύνδεση της DAG με την ΡΚΚ αυξάνει την συγγένεια της Κινάσης για το Ca⁺² με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ενεργοποίησή της με ελάχιστες ποσότητες Ca⁺² . Όμως η ΡΚΚ μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί με μια διαδικασία μερικής πρωτεόλυσης από την Καλπαϊνη (Calpain) . Στην περίπτωση αυτή η Κινάση θα ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από το Ca⁺² και την DAG , αρκεί να έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη (May και συν., 1985 , Wolf και συν., 1985a , Wolf και συν., 1985b , Bell, 1986 , Nishizuka , 1986 , Woodgett, 1994) .

ΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C .

Η Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC) έχει συσχετιστεί με μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών του ενδοκρινικού , εξωκρινικού , νευρικού , μυϊκού και ανοσοποιητικού συστήματος . Τέτοιες διεργασίες είναι η σύνθεση και έκκριση ορμονών, η έκκριση νευρομεταβιβαστών, η σύσπασση ή χάλαση των λείων μυών, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, η παραγωγή Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου και Αζώτου , η απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων και αυτακοειδών και άλλες . Επίσης η ΡΚΚ συμμετέχει στις μεταβολικές διεργασίες (π.χ. λιπογένεση, γλυκογονόλυση), στην έκφραση γονιδίων (π.χ. Ν-Ακετυλ-Τρανσφεράση της Σεροτονίνης, Αποκαρβοξυλάση της Ορνιθίνης, Αποκαρβοξυλάση της Ιστιδίνης, Πρόλακτίνης, Καλσιτονίνης, κ.α.) και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Weinstein, 1983 , Nishizuka, 1986 , Nishizuka, 1992) .

Η επίτευξη όλων αυτών των διεργασιών οφείλεται στην φωσφορυλίωση των ειδικών πρωτεϊνών που αποτελούν τα υποστρώματα της ΡΚΚ και που μπορεί να είναι δομικές πρωτεΐνες ή ένζυμα . Ορισμένες από τις πρωτεΐνες-στόχους της ΡΚΚ φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .



ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C .

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	ΕΝΖΥΜΑ
EGF-Υποδοχέας	ΑΤΡάση Μεταφοράς Ca^{+2}	Κινάση της Φωσφορυλάσης
Υποδοχέας Ινσουλίνης	Na^+/K^+ ΑΤΡάση	Συνθετάση του Γλυκογόνου
Υποδοχέας Τρανσφερρίνης	Πρωτεΐνες Διαύλων Na^+	Φωσφοφρουκτοκινάση
Υποδοχέας Σωματομεδίνης C	Μεταφορέας Γλυκόζης (Transporter)	NADPH Οξειδάση
Υποδοχέας Ιντερλευκίνης-2	Συναπτική Πρωτεΐνη B-50	Κυτόχρωμα P450
Υποδοχέας Ακετυλοχολίνης	Αντιγόνα HLA	DNA Μεθυλάση
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ	ΆΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	Γουανυλική Κυκλάση
Ελαφρές αλυσιοι Μυοσίνης	Ριβοσωμική Πρωτεΐνη S6	Υδροξυλάση της Τυροσίνης
Τροπονίνη-T, Τροπονίνη-I	Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης	Κινάση Αλύσεων Μυοσίνης
Βινκουλίνη (Vinculin)	Πρωτεΐνη pp60 ^{SRC}	MAP-Κινάσες
Φιλαμίνη (Filamin)	MARCKS-Πρωτεΐνη	85 kDa Φωσφολιπάση A2

Όπως φαίνεται η PKC φωσφορυλιώνει μια σειρά από διαφορετικά υποστρώματα ανάμεσα στα οποία και Μεμβρανικούς Υποδοχείς (π.χ. υποδοχείς EGF και Τρανσφερρίνης) , κυτταροπλασματικά ένζυμα (π.χ. Συνθετάση του Γλυκογόνου, Κινάση Ελαφρών Αλύσεων Μυοσίνης) καθώς και άλλες μεμβρανικές ή κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (π.χ. πρωτεΐνη MARCKS, πρωτεΐνη c-src, ριβοσωμική πρωτεΐνη S-6) . (Nishizuka, 1986 , Aderem, 1992 , Li και Aderem, 1992 , Nakamura και Nishizuka, 1994 , Woodgett, 1994) . Όμως πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι πολυάριθμες βιολογικές επιδράσεις της PKC είναι πιθανό να οφείλονται στην ικανότητά της να επιδρά με άλλα συστήματα Δεύτερων Μηνυτόρων , όπως με την οδό της Αδενυλικής Κυκλάσης - cAMP - PKA (Nishizuka, 1984 , Nishizuka, 1986) ή με τις οδούς των MAP-Κινασών και της οδού Φωσφολιπάσης A₂ - αραχιδονικού οξέος - εικοσανοειδών . Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ενεργοποίηση της 85-kDa κυτταροπλασματικής Φωσφαλιπάσης A₂ από την PKC , που οδηγεί στην δημιουργία βιολογικά δραστικών μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος .(Nishizuka, 1992 , Nakamura και Nishizuka, 1994) .

Η ρύθμιση της λειτουργίας της PKC γίνεται μέσω πολλών μηχανισμών . Η ρυθμιστική περιοχή της PKC διαθέτει δύο ειδικές θέσεις C1 και C2 στις οποίες συνδέονται αντίστοιχα η DAG ή το PMA και το Ca^{+2} και τα Όξινα Φωσφολιπίδια (όπως η Φωσφατιδυλ-Σερίνη) . Η σύνδεση των στοιχείων αυτών είναι απαραίτητη για την λειτουργία της PKC . Επίσης υπάρχουν και τα ψευδοϋποστρώματα (pseudo-substrates) τα οποία συνδέονται στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου . Για να ενεργοποιηθεί η PKC θα πρέπει να συνδεθούν στις θέσεις C1 και C2 η DAG , το Ca^{+2} και η Φωσφατιδυλ-Σερίνη , ώστε να απομακρυνθούν τα ψευδοϋποστρώματα από την Κινάση . Τέλος , για να ενεργοποιηθεί το ένζυμο θα πρέπει να φωσφορυλιωθεί στις θέσεις Thr500 και Thr641 από την Κινάση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC-Kinase) και να αυτοφωσφορυλιωθεί στην θέση Ser660 . (Newton, 1997) .



Κεφάλαιο 7-4 . Η οδός της Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης - ενδοκυττάριου Ca^{+2} :

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Η σύνδεση ενός Μηνύτορα με τον Μembrανικό Υποδοχέα του συχνά οδηγεί στην αύξηση του κυτταροπλασματικού ιονισμένου Ca^{+2} με αποτέλεσμα να επακολουθήσει μία κυτταρική αντίδραση (π.χ. έκκριση, σύσπαση κ.α.) . Αυτό το ιονισμένο Ca^{+2} μπορεί να προέλθει είτε από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω διαύλων ιόντων ή από τις ενδοκυττάριες αποθήκες (Berridge, 1985) . Η είσοδος Ca^{+2} από τον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς όπως μέσω μιας Ca^{+2} -ΑΤΡάσης της κυτταρικής μεμβράνης ή μέσω μιας συσκευής ανταλλαγής Ca^{+2}/Na^{+} ή τέλος μέσω των ειδικών Διαύλων Ca^{+2} (Voltage-sensitive Ca^{+2} channels) . Όμως οι μηχανισμοί αυτοί δεν εμπίπτουν στην κατηγορία των Μηχανισμών Δεύτερων Μηνυτόρων . Στην συνέχεια θα γίνει αναφορά στο σύστημα των Δεύτερων Μηνυτόρων που προκαλεί την απελευθέρωση Ca^{+2} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου και στον τρόπο με τον οποίο το ίδιο το Ca^{+2} επηρεάζει τις κυτταρικές λειτουργίες . Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το ιονισμένο Ca^{+2} έχει δύο ιδιαιτερότητες ως Δεύτερος Μηνύτορας : 1. Δεν μπορεί να συντεθεί ούτε να διασπαστεί και έτσι ο μόνος τρόπος αυξομείωσής του στο κυτταρόπλασμα είναι ο «εγκλεισμός» του σε ιδιαίτερα υποκυτταρικά διαμερίσματα . 2. Επειδή το κυτταρόπλασμα περιέχει έναν μεγάλο αριθμό ουσιών που συνδέουν το ιονισμένο Ca^{+2} , όπως πρωτεΐνες και φωσφορικές ομάδες , απαιτείται η αθρόα απελευθέρωση τεράστιων ποσοτήτων του ιόντος για να επιτευχθεί ακόμα και μικρή αύξηση της συγκέντρωσής του στο κυτταρόπλασμα . (Dawson, 1990) .

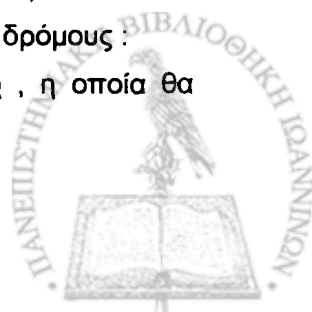
Η ΤΡΙΦΩΣΦΟΡΙΚΗ ΙΝΟΣΙΤΟΛΗ ΚΑΙ Η ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΥ Ca^{+2} .

Η υδρόλυση της Διφωσφορικής Φωσφατιδυλ-Ινοσιτόλης (PIP_2) από την Φωσφολιπάση C (PLC) οδηγεί στην δημιουργία 1,4,5-Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης (IP_3) και Διακυλογλυκερόλης (DAG) . Εκτός από την 1,4,5- IP_3 υπάρχει και η 1,3,4- IP_3 αλλά η τελευταία δεν παράγεται από την δράση της Φωσφολιπάσης C , δεν φαίνεται να κινητοποιεί το Ca^{+2} και μάλλον δεν αποτελεί Δεύτερο Μηνύτορα . (Dawson, 1990 , Michell, 1992) . Αντιθέτως η IP_4 αποτελεί Δεύτερο Μηνύτορα .

Η IP_3 είναι ένα υδρόφιλο μόριο που διαχέεται ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα και μεταξύ άλλων φτάνει και στο ενδοπλασματικό δίκτυο . Εκεί δεσμεύεται από μια ειδική πρωτεΐνη-υποδοχέα στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου , η οποία ονομάζεται IP_3 -Υποδοχέας . Ο IP_3 -Υποδοχέας αποτελεί ένα ομοτετραμερές από τέσσερις υπομονάδες με MW 313 kDa και διαδραματίζει ρόλο Διαύλου Ca^{+2} μέσω των τμημάτων κοντά στο καρβόξυ-τελικό άκρο του , που έχουν διάταξη α-έλικας και διαπερνούν την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου . Η λειτουργία του ρυθμίζεται από τα επίπεδα Ca^{+2} , από τα κυκλικά νουκλεοτίδια και από την Πρωτεϊνική Κινάση A . Η σύνδεση της IP_3 με τον υποδοχέα της προκαλεί αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα και διάνοιξη του διαύλου Ca^{+2} . Έτσι προκαλείται αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} . (Taylor και Marshall, 1992) .

Τελικά η IP_3 αποσυνδέεται από τον υποδοχέα και μπορεί να ακολουθήσει τρεις δρόμους :

1. Να αποφωσφορυλιωθεί από 5'-Φωσφατάσες ώστε να μεταβολιστεί σε Ινοσιτόλη , η οποία θα αποτελέσει την πρώτη ύλη για την δημιουργία PIP_2 .



2. Να μεταβολιστεί στον ανενεργό μεταβολίτη 1,3,4-IP₃ με την δράση μιας Κινάσης και μιας 5'-Φωσφατάσης .

3. Να φωσφορυλιωθεί από IP₃-3'-Κινάσες ώστε να μεταβολιστεί διαδοχικά σε IP₄ , IP₅ ή IP₆ . Αυτές οι IP₃-3'-Κινάσες είναι εξαρτημένες από το Ca⁺² και την Καλμοδουλίνη και για αυτό η αύξηση του Ca⁺² διεγείρει τον μεταβολισμό της IP₃ . Από τους πιθανούς μεταβολίτες της IP₃ η 1,3,4,5-Τετραφωσφορική Ινοσιτόλη (IP₄) είναι πολύ σημαντική αφενός επειδή δημιουργείται και αποδομείται ταχύτατα , ακολουθώντας τις αυξομειώσεις της IP₃ , αφετέρου επειδή θεωρείται ότι ρυθμίζει την επαναπρόσληψη του Ca⁺² από το ενδοπλασματικό δίκτυο . Επίσης έχει προταθεί ότι η IP₄ είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο και την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου ανεξάρτητα από το ενδοπλασματικό δίκτυο . Αντιθέτως , οι ρόλοι των IP₅ και IP₆ είναι ακόμα άγνωστοι αν και είναι γνωστό ότι αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά (Berridge και Irvine, 1989 , Dawson, 1990) .

Η σύνδεση της IP₃ με το υποδοχέα της προκαλεί την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων Ca⁺² από το εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου , με μηχανισμό «Όλο ή Ουδέν» . Στην συνέχεια το ενδοπλασματικό δίκτυο θα επανπροσλάβει το Ca⁺² με την βοήθεια μιας Ca⁺²-ATPάσης της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου , η οποία έχει MB περίπου 100 kDa . Στην διαδικασία αυτή συμμετέχουν η IP₃ και η IP₄ ή κατά άλλους ένα ένζυμο που συσχετίζεται με το Κυτόχρωμα P450 . Ένα τμήμα του Ca⁺² που αποθηκεύεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο συνδέεται με ειδικές πρωτεΐνες (π.χ. Endoplasmic και Calsequestrin) .

Μια άλλη πιθανή αποθήκη ιονισμένου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι το Ασβεστιόσωμα (Calciosome) αλλά η συσχέτισή του με τις φωσφορικές ινοσιτόλες είναι ακόμα άγνωστη . Επίσης θεωρείται ότι ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην αύξηση του ενδοκυττάρου Ca⁺² είναι πολύ μικρός και δεν συσχετίζεται με τις φωσφορικές ινοσιτόλες . Οι μηχανισμοί διακίνησης του ασβεστίου μέσα από τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και τα διαμερίσματα του μιτοχονδρίου ενδεχομένως εξυπηρετούν μόνο την διατήρηση σταθερών επιπέδων Ca⁺² μέσα στο μιτοχόνδριο και όχι στο κυτταρόπλασμα . (Berridge και Irvine, 1989 , Rasmussen , 1989, Dawson, 1990 , Taylor και Marshall, 1992) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟ Ca⁺² .

Το ενδοκυττάριο Ca⁺² ρυθμίζει την κυτταρική δραστηριότητα με πολλούς μηχανισμούς , από τους οποίους ο σημαντικότερος περιλαμβάνει την Καλμοδουλίνη . Η Καλμοδουλίνη είναι μια πρωτεΐνη με MB 17 kDa που μπορεί να δεσμεύσει μέχρι τέσσερα μόρια Ca⁺² . Το μόριό της έχει σχήμα αλτήρα (dumbbell-shaped) και η δέσμευση του Ca⁺² γίνεται σε ειδικές θέσεις των διευρυσμένων άκρων του μορίου που ονομάστηκαν από τους Kretsinger και Nockolds ως «EF-Hands» ή «Calmodulin folds» . Η Καλμοδουλίνη επηρεάζει την δραστηριότητα πολλών ενζύμων , είτε με αλλοστερική ρύθμιση ή επειδή αποτελεί τμήμα του μορίου τους . Η δέσμευση ενός ζεύγους ιόντων Ca⁺² από την Καλμοδουλίνη αλλάζει την στερεοδιαμόρφωσή της , με αποτέλεσμα την έκθεση υδρόφοβων επιφανειών του μορίου της , οι οποίες συνδέονται με τα ένζυμα που θα επηρεάσει . Τέτοια ένζυμα είναι οι τέσσερις Εξαρτημένες από την Καλμοδουλίνη Κινάσες (Calmodulin-Dependent Protein Kinases I, II, III και IV) , η Εξαρτημένη από την Καλμοδουλίνη ATPάση της κυτταρικής μεμβράνης (Ca⁺²/Calmodulin-Dependent ATPase) και οι Κινάσες των Ελαφρών Αλύσεων Μυοσίνης (Myosin Light-Chain Kinase family) . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η Εξαρτημένη από την Καλμοδουλίνη Κινάση II (Multifunctional

Calmodulin-Dependent Protein Kinase) , ένα ένζυμο με ευρεία ιστική εντόπιση το οποίο είναι υπεύθυνο για την φωσφορυλίωση της Κινάσης του Πυρουβικού , της Υδροξυλάσης της Τυροσίνης , της Συναψίνης-I , της Φωσφολαμβάνης και πολλών άλλων ενζύμων και δομικών πρωτεϊνών . Η Εξαρτημένη από την Καλμοδουλίνη Κινάση II μετά την δέσμευση Ca^{+2} αυτοφωσφορυλιώνεται και γίνεται ενεργή ακόμα και στην απουσία ασβεστίου (Schulman και Lou, 1989 , Woodgett, 1994) . Η Καλμοδουλίνη επίσης φαίνεται να επηρεάζει την συγγένεια του υποδοχέα της Ινσουλίνης για την Ινσουλίνη (Lamer, 1990) .

Ένα ακόμα ένζυμο του οποίου η ενεργοποίηση εξαρτάται από το Ca^{+2} είναι η Πρωτεϊνική Κινάση C (Rasmussen, 1989) . Έχει αποδειχθεί ότι το ιονισμένο Ca^{+2} είναι απαραίτητο τόσο για την Μετατόπιση (translocation) της Κινάσης από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη όπου και ενεργοποιείται , όσο και για την εξασφάλιση της μέγιστης δραστηριότητας του ενζύμου αυτού . (May και συν.,1985 , Wolf και συν., 1985a , Wolf και συν.,1985b , Nishizuka, 1992 , Nakamura και Nishizuka, 1994) .



Κεφάλαιο 7-5 . Η οδός της Γουανυλικής Κυκλάσης - Κυκλικού GMP (cGMP) - Εξαρτημένης από το cGMP Πρωτεϊνικής Κινάσης .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΙΚΟΥ GMP (cGMP) .

Μερικοί Μηνύτορες (ορμόνες και νευρομεταβιβαστές , όπως το Νιτρικό Οξείδιο και το Κολπικό Νατριουρητικό Πεπτίδιο) προκαλούν την αύξηση του Κυκλικού Γουανοσινο-Μονοφωσφορικού Οξέος (cGMP) στο κυτταρόπλασμα , μέσω διέγερσης Υποδοχέων οι οποίοι διεγείρουν το μεμβρανικό ένζυμο Γουανυλική Κυκλάση . Στην πραγματικότητα υπάρχουν πολλές Γουανυλικές Κυκλάσες που αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων .

Οι Γουανυλικές Κυκλάσες υφίστανται με δύο μορφές , τις διαλυτές στο κυτταρόπλασμα και τις συνδεδεμένες στις μεμβράνες του κυττάρου όπως την κυτταροπλασματική , τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi κ.α. . Οι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα μορφές είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες με συνολικό MB 150 kDa και δύο χωριστές περιοχές με δραστηριότητα Γουανυλικής Κυκλάσης . Αντιθέτως οι μεμβρανικές μορφές είναι μονομερείς πρωτεΐνες με MB 120-180 kDa στις οποίες το αμινο-τελικό άκρο είναι εξωκυττάριο και διαδραματίζει ρόλο υποδοχέα , ενώ το καρβόξυ-τελικό άκρο είναι ενδοκυττάριο και περιέχει την θέση της ενζυμικής δραστηριότητας της Γουανυλικής Κυκλάσης . Και οι δύο μορφές φαίνεται ότι εξαρτώνται από το Ca^{2+} και συχνά συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο . (Waldman και Murad, 1987 , Harper, 1988 , Schulz και συν., 1991 , Schmidt και συν.,1993) .

Η διαλυτή (κυτταροπλασματική) μορφή της Γουανυλικής Κυκλάσης διαθέτει μια ομάδα αίμης και ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες , που συμμετέχουν στον μηχανισμό ενεργοποίησής της . Το Νιτρικό Οξείδιο επιδρά στην ομάδα αίμης απευθείας και προκαλεί την ενεργοποίηση του ενζύμου (Waldman και Murad, 1987, Schulz και συν., 1991 , Schmidt και συν.,1993) . Εκτός από το Νιτρικό Οξείδιο είναι πολύ πιθανό ότι και οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου ενεργοποιούν την Γουανυλική Κυκλάση . Τέλος έχει προταθεί ότι και το αραχιδονικό οξύ και τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων που προκύπτουν από τον μεταβολισμό του μπορούν να ενεργοποιήσουν απευθείας την Γουανυλική Κυκλάση (Waldman και Murad, 1987) . Η ικανότητα του αραχιδονικού οξέος να διεγείρει την Γουανυλική Κυκλάση των T-λεμφοκυττάρων και μέσω αυτής την παραγωγή INF- γ έχει ήδη αποδειχθεί (Johnson και συν.,1986) .

Το cGMP που παράγεται από την δράση της Γουανυλικής Κυκλάσης διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και δεσμεύεται από δύο τύπους πρωτεϊνών : την Εξαρτημένη από το cGMP-Πρωτεϊνική Κινάση και τους Εξαρτημένους από το cGMP Διαύλους Ιόντων . Εάν δεν επιτευχθεί η σύνδεση αυτή το cGMP θα μεταβληθεί από τις cGMP-Φωσφοδιεστεράσες προς 5'-GMP . Υπάρχουν έξη διαφορετικές οικογένειες (τύποι) τέτοιων Φωσφοδιεστερασών , από τις οποίες οι δύο είναι ειδικές για το cGMP και οι τέσσερις μη-ειδικές , αλλά όλες επηρεάζονται από το cGMP (Schmidt και συν., 1993) . Έτσι η μη-ειδική Φωσφοδιεστεράση τύπου-II διεγείρεται από το cGMP αλλά υδρολύει κυρίως το cAMP , ενώ η μη-ειδική Φωσφοδιεστεράση τύπου-III καταστέλλεται από το cGMP αλλά υδρολύει κυρίως το cAMP με αποτέλεσμα η παραγωγή του ενός κυκλικού νουκλεοτιδίου να ρυθμίζει τα επίπεδα



του άλλου . Οι Φωσφοδιαστεράσες τύπου V και VI είναι οι ειδικές για το cGMP (Schmidt και συν.,1993) .

Το cGMP έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να δράσει απευθείας σε Διαύλους Na^+ στις μεμβράνες των ραβδίων και κωνίων του αμφιβληστροειδούς και να προκαλέσει αυξημένη είσοδο Na^+ (Harper, 1988 , Schmidt και συν.,1993) . Όμως οι Διάυλοι αυτοί δεν αποτελούν τον κύριο στόχο του cGMP .

Ο κύριος στόχος του cGMP είναι η διέγερση της Εξαρτημένης από το cGMP Πρωτεϊνικής Κινάσης (cGMP -PK) . Υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου αυτού . Η cGMP-PK τύπου I είναι διαλυτή στο κυτταρόπλασμα , έχει ευρεία κατανομή στους ιστούς και αποτελείται από δύο υπομονάδες (I_A και I_B) με MB 78 kDa η κάθε μια , από τις οποίες η I_A -υπομονάδα παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το cGMP . Η cGMP-PK τύπου II είναι συνδεδεμένη με τις κυτταρικές μεμβράνες και δεν παρουσιάζει ευρεία ιστική κατανομή , ενώ συνιστά ένα μονομερές μόριο με MB 86 kDa . Και οι δύο μορφές της cGMP-PK απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου φωσφόρου και Mg^{+2} για να δράσουν και εάν αυτοφωσφορυλιωθούν αυξάνουν την συγγένειά τους προς το cAMP αλλά όχι προς το cGMP . (Schmidt και συν.,1993 , Woodgett, 1994) .

Οι δύο τύποι cGMP-PK φωσφορυλιώνουν διάφορες πρωτεΐνες-στόχους . Ορισμένες από αυτές αποτελούν επίσης στόχο της δραστηριότητας της Εξαρτημένης από το cAMP Πρωτεϊνικής Κινάσης (PKA) . Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες-υποστρώματα είναι και οι α_1/β -υπομονάδες του Διαύλου Ca^{+2} των μυοκαρδιακών κυττάρων, το G-υπόστρωμα (G-substrate) των κυττάρων Purkinje , την cGB-PDE Φωσφοδιεστεράση του πνεύμονα και την Φωσφολαμβάνη (Phospholamban) . (Schmidt και συν.,1993) .



Κεφάλαιο 7-6 . Η οδός της Φωσφολιπάσης A_2 - Αραχιδονικού Οξέος - Εικοσανοειδών .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Είναι γνωστό ότι η Φωσφολιπάση A_2 αποτελεί βασικό ένζυμο στην οδό βιοσύνθεσης των εικοσανοειδών (προσταγλανδινών, λευκοτριενίων, θρομβοξανών, κ.α.) . Μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1980 άρχισε να διαφαίνεται η πιθανότητα ότι η οδός της Φωσφολιπάσης A_2 - Αραχιδονικού Οξέος - εικοσανοειδών αποτελούσε μια οδό Δεύτερων Μηνυτόρων . Μέχρι σήμερα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί απόλυτα αν μπορούν να θεωρηθούν το αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολίτες του ως Δεύτεροι Μηνυτορες , ενώ είναι απολύτως βέβαιο ότι οι ίδιες ουσίες αποτελούν εξωκυττάριους Μηνυτορες για τους οποίους υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη . Οι μεταβολίτες του Αραχιδονικού Οξέος ασκούν σημαντικές αυτοκρινικές και παρακρινικές επιδράσεις και συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής , γεγονός που τους κατατάσσει στις «Αυτακοειδείς Ουσίες» . Στην συνέχεια θα αναφερθούν εκτός από τα κύρια σημεία αυτής της οδού και όσα στοιχεία συνηγορούν στην δράση της ως οδό Δεύτερων Μηνυτόρων .

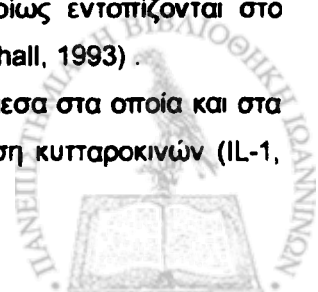
Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A_2 .

Το αραχιδονικό οξύ παράγεται κυρίως από την διάσπαση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και συγκεκριμένα της Φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνης , της Φωσφατιδυλ-χολίνης και σε μερικά είδη κυττάρων της Φωσφατιδυλ-ινουσιτόλης . Συνήθως το αραχιδονικό οξύ είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση των γλυκεροφωσφολιπιδίων , δηλαδή αποτελεί το 2-ακύλιο του φωσφολιπιδίου . Αυτό το γεγονός εξηγεί το γιατί οι Φωσφολιπάσες A_2 απελευθερώνουν το αραχιδονικό οξύ από τις κυτταρικές μεμβράνες και όχι οι Φωσφολιπάσες A_1 . Ωστόσο το αραχιδονικό οξύ που ελευθερώνεται από τις κυτταρικές μεμβράνες και περνά στο κυτταρόπλασμα σύντομα ξαναδεσμεύεται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών με την δράση των Άκυλο-τρανσφερασών . Τέτοιες Άκυλο-τρανσφεράσες διαδραματίζουν συχνά σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των ελεύθερων επιπέδων αραχιδονικού οξέος σε κύτταρα όπως τα μακροφάγα (Kroneg, 1981) . Όμως ο κύριος ρυθμιστής των επιπέδων αραχιδονικού οξέος στα κύτταρα είναι οι Φωσφολιπάσες A_2 . (Irvine, 1982 , Piomelli, 1993) .

ΟΙ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A_2 .

Οι Φωσφολιπάσες A_2 είναι sn-2-Άκυλ-Υδρολάσες που υδρολύουν και διασπούν τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων (όπου συνήθως εντοπίζεται το αραχιδονικό οξύ) και το απελευθερώνουν . Ταυτόχρονα δημιουργούν και ένα λύσο-φωσφολιπίδιο . Όλες οι Φωσφολιπάσες A_2 (PLA_2) ανήκουν στην ίδια οικογένεια ενζύμων παρά τις διαφορές τους . Έτσι αναγνωρίζουμε σήμερα τέσσερις διαφορετικές PLA_2 , από τις οποίες οι τρεις έχουν MB 14 kDa και η μία έχει MB 85 kDa . Οι 14 kDa PLA_2 χαρακτηρίζονται ως τύποι I, II και III και διαφέρουν τόσο στην δομή τους όσο και στην εντόπισή τους . Οι τύποι I και III δεν θα μας απασχολήσουν , γιατί κυρίως εντοπίζονται στο παγκρεατικό υγρό και στο δηλητήριο της μέλισσας αντίστοιχα . (Mayer και Marshall, 1993) .

Η 14 kDa PLA_2 τύπου II εντοπίζεται σε διάφορα είδη κυττάρων , ανάμεσα στα οποία και στα αιμοπετάλια . Επιπλέον εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μετά από επίδραση κυταροκινών (IL-1,



IL-6 και TNF) σε φλεγμονώδη κύτταρα . Παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε ουδέτερο pH και είναι εξαρτημένη από το Ca^{+2} , ενώ τα κύρια υποστρώματά της είναι η Φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη και η Φωσφατιδυλ-σερίνη . Η συμμετοχή της στην παραγωγή αραχιδονικού οξέος μέσα στα κύτταρα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως .

Η 85 kDa PLA₂ εντοπίζεται σε διάφορα είδη κυττάρων , ανάμεσα στα οποία τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα . Παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε ουδέτερο pH και είναι εξαρτημένη από το Ca^{+2} . Η 85 kDa PLA₂ παρουσιάζει προτίμηση σε υποστρώματα που διαθέτουν αραχιδονικό οξύ εστεροποιημένο στην sn-2 θέση . Δύο ακόμα κύρια χαρακτηριστικά της είναι ότι : 1. Παρουσιάζει μια ειδική αλληλουχία 45 αμινοξέων όμοια με την αλληλουχία αμινοξέων στην θέση δέσμευσης του Ca^{+2} στην Πρωτεϊνική Κινάση C . 2. Όπως και η Πρωτεϊνική Κινάση C , όταν η PLA₂ συνδεθεί με το Ca^{+2} παρουσιάζει Μετατόπιση (translocation) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη όπου και είναι ενεργή . (Mayer και Marshall, 1993) . Είναι πολύ πιθανό ότι η 85 kDa PLA₂ φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την Πρωτεϊνική Κινάση C , άμεσα ή έμμεσα δια των MAP-Κινασών (Nakamura και Nishizuka, 1994) . Αυτή η 85 kDa PLA₂ μπορεί να ανταποκρίνεται σε εξωτερικά ερεθίσματα , απελευθερώνοντας αραχιδονικό οξύ .

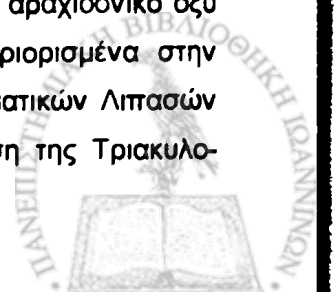
Οι PLA₂ μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά από την σύνδεση Υποκαταστατών-Υποδοχέων με δύο τρόπους . Ο ένας τρόπος διαμεσολαβείται από την PLC ενώ ο άλλος δεν απαιτεί την μεσολάβηση της PLC . Έτσι υπάρχουν αναφορές για την απευθείας διέγερση της τύπου II PLA₂ των 14kDa μέσω G-πρωτεϊνών . Η PLA₂ των 85kDa επίσης μπορεί να ενεργοποιηθεί απευθείας μέσω G-πρωτεϊνών , συνήθως όμως η διέγερσή της είναι έμμεση : η σύνδεση του Μηνύτορα με τον Υποδοχέα διεγείρει την Φωσφολιπάση C, η οποία με την σειρά της προκαλεί την παραγωγή DAG και την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Η PKC διεγείρει την 85kDa-PLA₂ άμεσα ή μέσω των MAP-Κινασών . Τέλος η δράση των Φωσφολιπασών A₂ ελέγχεται και ρυθμίζεται από τις οδούς του Ca^{+2} και του cAMP . (Mayer και Marshall, 1993) .

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί η ύπαρξη ακόμα δύο ειδικών τύπων PLA₂ . Αυτές δεν είναι εξαρτημένες από το Ca^{+2} και παρουσιάζουν προτίμηση σε υποστρώματα που διαθέτουν αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση . Η μία είναι ένα μικροσωμικό ένζυμο του μυοκαρδίου με MB 40 kDa ενώ η άλλη είναι κυτταροπλασματικό ένζυμο των αιμοπεταλίων με MB 58 kDa . (Mayer και Marshall, 1993) .

ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η Φωσφολιπάση-C μπορεί να παράγει Αραχιδονικό Οξύ απευθείας από την Φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη και όχι μέσω ενεργοποίησης της Φωσφολιπάσης A₂ όπως αναπτύχθηκε παραπάνω . Σε αυτό συμβάλλει και το γεγονός ότι η Φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη σε πολλούς ιστούς είναι πλούσια σε αραχιδονικό οξύ . Αρχικά θα δημιουργηθεί Διακυλο-γλυκερόλη , από την οποία θα απελευθερωθεί το αραχιδονικό με την επίδραση μιας Λιπάσης της Διακυλο-γλυκερόλης .

Τα Ουδέτερα Λιπίδια όπως η Τριακυλο-γλυκερόλη είναι όχι μόνο φτωχά σε αραχιδονικό οξύ αλλά και λιγότερα από τα φωσφολιπίδια , όμως ενδέχεται να συμβάλλουν περιορισμένα στην παραγωγή του αραχιδονικού οξέος , μέσω των κυτταροπλασματικών και λυσοσωματικών Λιπασών των Ουδέτερων Λιπιδίων . Συγκεκριμένα υπάρχει μια κυτταροπλασματική Λιπάση της Τριακυλο-



γλυκερόλης, που ελέγχεται από το cAMP και το Ca^{*2} , που πιθανώς συμβάλει στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. (Irvine, 1982).

Άλλες οδοί παραγωγής του αραχιδονικού οξέος περιλαμβάνουν την απελευθέρωσή του από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια με την συνδυασμένη δράση μιας Φωσφολιπάσης A_1 και μιας Λυσοφωσφολιπάσης ή μέσω μιας διαδικασίας σουλφολύσης (Irvine, 1982).

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A_2 ΩΣ ΟΔΟΣ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ.

Υπάρχουν κάποια στοιχεία μας επιτρέπουν να κατατάσσουμε την οδό της Φωσφολιπάσης A_2 - αραχιδονικού οξέος στις Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος. Το πρώτο από αυτά είναι ότι η παραγωγή του αραχιδονικού οξέος μπορεί να αυξάνεται ταχύτατα ως απόκριση σε ένα εξωκυττάριο ερέθισμα, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Το δεύτερο στοιχείο είναι ότι το αραχιδονικό οξύ και ορισμένοι μεταβολίτες του επηρεάζουν άλλους μηχανισμούς του κυττάρου, προκαλώντας έτσι την βιολογική αντίδραση στο εξωτερικό ερέθισμα.

Οι δύο μορφές της Φωσφολιπάσης A_2 (14kDa και 85kDa) μπορούν να διεγερθούν άμεσα από G-πρωτεΐνες ή έμμεσα από την Φωσφολιπάση C. Η PLC δημιουργεί DAG η οποία διεγείρει την PKC, η οποία είτε διεγείρει άμεσα την PLA_2 ή φωσφορυλιώνει τις MAP-Κινάσες, οι οποίες θα διεγείρουν την PLA_2 (Mayer και Marshall, 1993, Piomelli, 1993). Έχει διαπίστωθεί η άμεση διέγερση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων της 85kDa- PLA_2 με ορμόνες (TRH), νευρομεταβιβαστές (Σεροτονίνη μέσω 5-HT₂ υποδοχέων και Γλουταμικό Οξύ μέσω mGluR1 υποδοχέων), αυξητικούς παράγοντες (b-FDGF) και κυτταροκίνες (INF- α , INF- γ) (Piomelli, 1993). Είναι όμως δυνατόν η παραγωγή του αραχιδονικού οξέος μετά από διέγερση μεμβρανικού υποδοχέα να οφείλεται και στην συνδυασμένη δράση της PLC και της Λιπάσης της DAG.

Στην συνέχεια, το παραγόμενο αραχιδονικό οξύ επηρεάζει άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς και οδηγεί στην κυτταρική αντίδραση. Είναι γνωστό ότι το αραχιδονικό οξύ, τα υδροϋπεροξειδία του αραχιδονικού οξέος, τα ενδοϋπεροξειδία του (PGG₂ και PGH₂) και μερικοί μεταβολίτες του (κυρίως οι λευκοτριένες) διεγείρουν άμεσα την Γουανυλική Κυκλάση και οδηγούν στην παραγωγή cGMP σε μια πλειάδα ιστών, π.χ. μυοκάρδιο, πνεύμονας, νεφρός, ήπαρ, αιμοπετάλια, σπλήνας κ.α. (Waldman και Murgad, 1987). Μέσω αυτής της διέγερσης της Γουανυλικής Κυκλάσης από το αραχιδονικό οξύ και τις λευκοτριένες θεωρείται ότι προκαλεί η IL-2 την παραγωγή INF- γ από τα T-λεμφοκύτταρα (Johnson και συν., 1986). Επίσης έχει αποδειχτεί ότι η Πρωτεϊνική Κινάση C μπορεί να ενεργοποιηθεί από τα cis-ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό οξύ καθώς και από τα λύσο-φωσφολιπίδια που θα δημιουργηθούν από την δράση της PLA_2 (Liscovitch, 1992, Nakamura και Nishizuka, 1994).

Συνοψίζοντας θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ο παραπάνω μηχανισμός μεταγωγής σήματος λειτουργεί ως εξής: Μετά την σύνδεση Υποκαταστάτη-Υποδοχέα (π.χ. ορμόνης-μεμβρανικού υποδοχέα) ενεργοποιούνται G-πρωτεΐνες και από αυτές διεγείρεται η Φωσφολιπάση A_2 που επέχει θέση μετατροπέα. Με την δράση της απελευθερώνεται αραχιδονικό οξύ που λειτουργεί ως Δεύτερος Μηνύτορας. Το αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολίτες του επηρεάζουν άλλους μηχανισμούς-στόχους.



Κεφάλαιο 7-7 . Η οδός των Πρωτεϊνικών Κινασών της Τυροσίνης .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Ένας μεγάλος αριθμός ουσιών όπως π.χ. η Ινσουλίνη και οι διάφοροι Αυξητικοί Παράγοντες , διαθέτουν υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη με ενδογενή δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης . Το αποτέλεσμα της σύνδεσης Μηνύτορα-Υποδοχέα είναι η αυτοφωσφορυλίωση του Υποδοχέα . Αυτό τον ενεργοποιεί και τον καθιστά ικανό να φωσφορυλιώσει διάφορες πρωτεΐνες-στόχους .

Εκτός όμως από τους Υποδοχείς με δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης (RTK , Receptor Tyrosine Kinases) υπάρχουν και κυτταροπλασματικές Κινάσες της Τυροσίνης (Non-Receptor Tyrosine Kinases) , που επίσης συμμετέχουν σε μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνύματος . Τέλος , και στις Φωσφατάσες της Τυροσίνης (Tyrosine Phosphatases) έχουν αποδοθεί τέτοιοι ρόλοι .

ΟΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ .

Όλες οι Μembranικές Κινάσες της Τυροσίνης (RTK) χαρακτηρίζονται από το ότι διαθέτουν μια εξωκυττάρια μοίρα (αμινο-τελικό άκρο) που διαδραματίζει ρόλο υποδοχέα και μια ενδοκυττάρια μοίρα (καρβόξυ-τελικό άκρο) που διαθέτει δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης . Όταν συνδεθεί ένας Υποκαταστάτης με την εξωκυττάρια μοίρα προκαλείται αυτοφωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας μοίρας (Yeung και συν.,1987, Yarden και Ulrich, 1988, Arai και συν.,1990, Cadena και Gill, 1992, Fantl και συν.,1993, Woodgett, 1994) . Επίσης σε πάρα πολλές περιπτώσεις Μembranικών Κινασών της Τυροσίνης , η σύνδεση του Υποκαταστάτη με τον Υποδοχέα προκαλεί τον διμερισμό των Κινασών .

Η αυτοφωσφορυλίωση της Κινάσης σε συγκεκριμένες θέσεις τυροσίνης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του και την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα για άλλες πρωτεΐνες-υποστρώματα . Οι τυροσίνες της Κινάσης που φωσφορυλιώθηκαν δρουν ως θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνών αυτών . Οι συγκεκριμένες θέσεις τυροσίνης που αυτοφωσφορυλιώνονται στον RTK-υποδοχέα καθορίζουν την θέση δέσμευσης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου (Pazin και Williams, 1992 , Fantl και συν.,1993) . Έτσι η αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα PDGF , ο οποίος έχει δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης , δημιουργεί τρεις χωριστές θέσεις δέσμευσης για τα τρία διαφορετικά ένζυμα που φωσφορυλιώνονται από το υποδοχέα αυτόν . Ταυτοχρόνως , για να συνδεθούν οι πρωτεΐνες-στόχοι σε αυτές τις αυτοφωσφορυλιωμένες θέσεις του υποδοχέα πρέπει να διαθέτουν την ειδική αλληλουχία αμινοξέων «SH2» (Yarden και Ulrich, 1988 , Carpenter, 1992 , Pazin και Williams, 1992 , Cadena και Gill, 1992) .

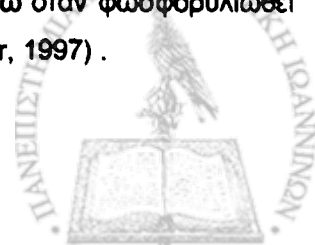
Οι ενεργοποιημένες Μembranικές Κινάσες Τυροσίνης φωσφορυλιώνουν μια σειρά από πρωτεΐνες , όπως π.χ. τις pp60c-src, p21ras , Grb-2 και S6-Ριβοσωμική Κινάση . Μεταξύ των στόχων της δράσης των Κινασών Τυροσίνης είναι και άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στις οδούς Μεταγωγής Μηνύματος , όπως η 3'-Κινάση της Φωσφατιδυλ-Ινοσιτόλης (PI-3'-Kinase) , ο Παράγοντας Διέγερσης των GTPασών (GTPase Activating Factor) και η Φωσφολιπάση-Cγ (PLCγ) , που δίνουν γένεση σε άλλους Δεύτερους Μηνύτορες και ενεργοποιούν μηχανισμούς που θα οδηγήσουν στην κυτταρική αντίδραση (Pike και συν.,1982, Pazin και Williams, 1992 , Carpenter, 1992 , Fantl και συν.,1993) . Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του ενζύμου PI-3'-Kinase από τον PDGF-υποδοχέα προκαλεί την φωσφορυλίωση της Ras-πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει στην ενεργοποίηση της Raf-1-Πρωτεϊνικής

Κινάσης, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τις MAP-Κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases) και την έκφραση των *c-fos* ογκογονιδίων, οδηγώντας τελικά στην μιτογένεση. Η PLC γ , που είναι ανενεργή εάν δεν φωσφορυλιωθεί από μια Κινάση Τυροσίνης, είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων και την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, που τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας της Ινσουλίνης που φωσφορυλιώνει μια ειδική πρωτεΐνη, την IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1), η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την PI-3'-Kinase και θέτει σε κίνηση πολλούς μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνύματος (Pazin και Williams, 1992). Από τα παραπάνω είναι κατανοητό ότι ουσίες που δρουν ως υποκαταστάτες και διαθέτουν υποδοχείς με δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης προκαλούν την ταυτόχρονη ενεργοποίηση πολλών διαφορετικών οδών Δεύτερων Μηνυτόρων. Αυτό εξηγεί τις πολυάριθμες και σημαντικές βιολογικές επιδράσεις τους. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται ορισμένοι από τους Μηνυτόρες που διαθέτουν υποδοχείς με δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης, καθώς και τα υποστρώματα της ενζυμικής δράσης τους.

<u>ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ</u>	<u>ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΝΕΙ Η ΚΙΝΑΣΗ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ</u>
EGF (Epidermal Growth Factor)	PI-3'-Kinase, PI-4'-Kinase, PI-5'-Kinase, GAP, PLC- γ
PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	PI-3'-Kinase, GAP, PLC- γ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ	IRS-1, PI-3'-Kinase, p15FABP, Ecto-ATPase, ERK-Kinase
HGF (Hepatocyte Growth Factor)	PI-3'-Kinase, GAP, PLC- γ , SRC-Kinase
FGF (Fibroblast Growth Factor)	PLC- γ , Raf-1-Kinase, ERK-Kinase, S6-Ribosomal Kinase
MCSF-1 (Macrophage Colony Stimulating Factor)	PI-3'-Kinase, <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i>

ΟΙ p21-RAS ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ.

Η οικογένεια των ογκογονιδίων *ras* κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p21 οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμεσολάβηση των αντιδράσεων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αύξησης και διαφοροποίησης οι οποίες προκαλούνται από την επίδραση των αυξητικών παραγόντων. Ανάμεσα στις p21ras πρωτεΐνες περιλαμβάνονται και οι τρεις πρωτεΐνες Ha, Ki και N, που είναι GTPάσες. Οι πρωτεΐνες αυτές διαμεσολαβούν την κυτταρική μίτωση και διαφοροποίηση που προκαλούνται από την επίδραση του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGF), του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα (NGF), της Ινσουλίνης και πολλών άλλων. Οι p21ras πρωτεΐνες, που συνήθως εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, παρουσιάζουν δραστηριότητα GTPάσης μόνο όταν είναι συνδεδεμένες με το GTP. Η ενεργοποίηση των p21ras πρωτεϊνών μπορεί να γίνει από την GAP (GTPase Activating Protein), η οποία φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από Μεμβρανικές Κινάσες της Τυροσίνης. Ένας άλλος ενεργοποιητής των p21ras πρωτεϊνών είναι οι GNRP-πρωτεΐνες (Guanine Nucleotide Releasing Proteins), που προκαλούν την ανταλλαγή του GDP με GTP. (Fantl και συν., 1993, Woodgett, 1994). Με την σειρά τους οι p21ras-πρωτεΐνες ενεργοποιούν την Raf-1-Κινάση (MEK-Κινάση), μια Κινάση Σερίνης-Θρεονίνης που φωσφορυλιώνει τις MAP/ERK-Κινάσες (MEK), που έχουν ως υπόστρωμα τις MAP-Κινάσες. Η Raf-1-Κινάση πιθανώς ενεργοποιηθεί και από την PKC, ενώ όταν φωσφορυλιωθεί από την PKA αναστέλλεται η δράση της (Woodgett, 1994, Morrison και Cutler, 1997).



ΟΙ MAP-ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΥΝΗΜΑΤΩΝ .

Οι MAP-Κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases) αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές των μηχανισμών κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης . Οι πιο γνωστές ισομορφές τους είναι οι MAP-1 (ERK-1) και MAP-2 (ERK-2) Κινάσες . Επίσης υπάρχουν και άλλες τέτοιες Κινάσες , όπως η p38 MAP-Κινάση , η JNK/SAPK (cJun-N-terminal Kinase/Stress-activated Kinase) , οι ERK-3 , ERK-5 , Mxi2 και άλλες . Οι MAP-Κινάσες χαρακτηρίζονται από το ότι ενεργοποιούνται μόνο αν φωσφορυλιωθούν σε θέσεις Σερίνης και σε θέσεις Τυροσίνης . Για τις ERK-1 και ERK-2 Κινάσες είναι γνωστά τα ειδικά ένζυμα που τις ενεργοποιούν (οι MAPK/ERK-Κινάσες MEK1 και MEK2) που με την σειρά τους ενεργοποιούνται από Raf-1-Κινάση (MEKK) . Όπως ήδη αναφέρθηκε η Raf-1-Κινάση ενεργοποιείται από τις p21ras πρωτεΐνες . Αυτή η πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων ενεργοποιείται από πολλούς διαφορετικούς Μηνύτορες όπως η Ινσουλίνη , η Οιστραδιόλη , η IL-2 , η Ενδοθηλίνη-1 , ο PDGF και ο EGF . (Pelech και Sanghera, 1992 , Davis, 1993 , Morrison και Cutler, 1997) .

Οι ενεργοποιημένες MAP-Κινάσες φωσφορυλιώνουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων στο κυτταρόπλασμα και στην επιφάνεια του κυτάρου . Επίσης , όταν οι MAP-Κινάσες ενεργοποιηθούν υφίστανται μετατόπιση (translocation) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα , όπου και εντοπίζονται ορισμένες πρωτεΐνες που αποτελούν υποστρώματά τους . Μεταξύ των υποστρωμάτων των Κινάσων αυτών είναι : 1) Τα ίδια τα ένζυμα που προκαλούν την ενεργοποίησή τους (Raf-1 και MEK) . 2) Η Ριβοσωμικές S6-Κινάσες . 3) Η Πρωτεϊνική Φωσφατάση PP-1 . 4) Η κυτταροπλασματική Φωσφολιπάση A_2 . 5) Ο EGF-υποδοχέας . 6) Μέσα στον πυρήνα οι Παράγοντες Μεταγραφής c-Myc, c-Fos και c-Jun (Pulverer και συν., 1991 , Pelech και Sanghera, 1992 , Davis, 1993) .

ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ .

Οι κυτταροπλασματικές Κινάσες της Τυροσίνης (Non-Receptor Tyrosine Kinases) αποτελούν μια ευρύτατη κατηγορία ενζύμων που στην πραγματικότητα μπορούν να έχουν εντόπιση μεμβρανική , κυτταροπλασματική ή πυρηνική αλλά δεν σχετίζονται ποτέ με Υποδοχείς στην επιφάνεια των κυτάρων . Συμμετέχουν στους μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνυμάτων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό . Επίσης συμμετέχουν στους μηχανισμούς αλλαγής του κυτταρικού σχήματος και στην σύνδεση κυτάρου - ιστικού υποστρώματος . Τέλος ορισμένες από αυτές τις Κινάσες ασκούν κατασταλτικές επιδράσεις στην κυτταρική αύξηση . Ένα παράδειγμα συμμετοχής των κυτταροπλασματικών Κινάσων Τυροσίνης στους Μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνύματος είναι η φωσφορυλίωση της PLCγ στα κύτταρα NK , που οδηγεί στην δημιουργία DAG και IP_3 (Ting και συν., 1992) . Οι κυτταροπλασματικές Κινάσες της Τυροσίνης χωρίζονται σε επτά οικογένειες : Src, Csk, Fak, Syk, Jak, Fps και Abl . (Cantley και συν., 1991, Woodgett, 1994) .

Η οικογένεια Src περιλαμβάνει τις Κυτταροπλασματικές Κινάσες Src, Yrk, Hck, Fck, Blk και άλλες . Τα ένζυμα αυτά εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος , ιδίως στα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα . Εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο κυτταρόπλασμα . Διαθέτουν αλληλουχία SH2 για φωσφορυλίωση από Μεμβρανικές Κινάσες της Τυροσίνης , θέσεις για φωσφορυλίωση από άλλες κυτταροπλασματικές Κινάσες Τυροσίνης αλλά και θέσεις για φωσφορυλίωση από τις PKA και PKC . Για να ενεργοποιηθεί μια Src-Κινάση είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωσή της και από Κινάσες Τυροσίνης και από τις PKA και PKC . Οι Κινάσες

αυτές φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς επιφανείας των κυττάρων του αιμοποιητικού , τις Μembrανικές Κινάσες της Tyροσίνης , πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού , την Φωσφολιπάση Cy και την GAP . Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση μηχανισμών μίτωσης , αλλαγής του κυτταρικού σχήματος και προσκόλλησης σε ιστικά υποστρώματα . (Cantley και συν.,1991, Woodgett, 1994) .

Η οικογένεια Csk περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες Tyροσίνης που εκφράζονται σε όλα τα είδη κυττάρων . Περιέχουν την αλληλουχία SH2 για φωσφορυλίωση από Μembrανικές Κινάσες Tyροσίνης και όταν ενεργοποιηθούν φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις Src-Κινάσες , που αποτελούν το μοναδικό τους υπόστρωμα .

Η οικογένεια Fak περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες Tyροσίνης οι οποίες φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από τις Src-Κινάσες . Αν και είναι οι πολυπληθέστερες Κινάσες ο ρόλος του δεν είναι ακόμα γνωστός . Πιθανολογείται ότι δρουν στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού .

Η οικογένεια Syk περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες Tyροσίνης που εκφράζονται μόνο στα λεμφοκύτταρα και συμμετέχουν στον μηχανισμό ενεργοποίησής τους .

Η οικογένεια Jak περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες Tyροσίνης με μεμβρανική και κυτταροπλασματική εντόπιση , που εκφράζονται σε πολλά είδη κυττάρων . Αρχικά είχαν συσχετιστεί με μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από τις Ιντερφερόνες INF-α και INF-γ αλλά στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι διαμεσολαβούν και τις επιδράσεις πολλών Ιντερλευκινών (IL-3, IL-5, IL-6, IL-10) .

Η οικογένεια Abl περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες Tyροσίνης με πυρηνική εντόπιση . Διαθέτουν αλληλουχία SH2 και όταν φωσφορυλιωθούν από Μembrανικές Κινάσες της Tyροσίνης ενεργοποιούνται και συνδέονται απευθείας στο DNA , προκαλώντας αναστολή της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού .

Τέλος , η οικογένεια Fps περιλαμβάνει Κυτταροπλασματικές Κινάσες με αλληλουχίες SH2 . Οι Fps-Κινάσες εκφράζονται στα κύτταρα του αιμοποιητικού και είναι ιδιαίτερα άφθονες στα μακροφάγα . Όταν ενεργοποιηθούν φωσφορυλιώνουν τα ίδια υποστρώματα με τις Src-Κινάσες . (Cantley και συν.,1991, Woodgett, 1994) .

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ .

Οι Φωσφατάσες Tyροσίνης (Protein Tyrosine Phosphatases) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων που πρόσφατα έχουν συμπεριληφθεί από ορισμένους ερευνητές στις Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος . Έχουν άμεση σχέση και επίδραση με τις Κινάσες Tyροσίνης . Πολλές από αυτές διαθέτουν μια εξωκυττάρια μοίρα που διαδραματίζει ρόλο Υποδοχέα και μία ενδοκυττάρια μοίρα (το καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου) που περιέχει την ενζυμική δραστηριότητα Φωσφατάσης Tyροσίνης . Ορισμένες από αυτές τις Φωσφατάσες διαθέτουν μια αλληλουχία SH2 που τους επιτρέπει να συνδέουν τις πρωτεΐνες που έχουν φωσφορυλιωθεί σε θέσεις tyροσίνης και να τις αποφωσφορυλιώσουν . (Tonks και Charbonneau, 1989 , Walton και Dixon, 1993) .

Ένα τυπικό παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας CD-45 των λευκοκυττάρων , ο οποίος είναι ιδιαίτερα άφθονος στα T- και B-λεμφοκύτταρα . Αποτελεί μια πρωτεΐνη με MB 180 - 220 kDa , της οποίας το γλυκοζυλιωμένο αμινο-τελικό άκρο είναι ο υποδοχέας , ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο στο εσωτερικό του κυττάρου περιέχει δύο θέσεις με δραστηριότητα Φωσφατάσης της Tyροσίνης, από τις

οποίες η μία φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την Πρωτεϊνική Κινάση C . Όταν ο CD-45 υποδοχέας διεγερθεί αποφωσφορυλιώνει τις Κινάσες p56-Lck και p59-Fyn , οι οποίες ενεργοποιούνται και επιδρούν σε άλλα υποστρώματα .

Μερικές Φωσφατάσες της Τυροσίνης , όπως οι PTP-MEG1 και PTP-H1 , εντοπίζονται συνδεδεμένες με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού , τις οποίες και αποφωσφορυλιώνουν προκειμένου να διαμεσολαβήσουν αλλαγές στην μορφή του κυτταροσκελετού και το σχήμα του κυττάρου .

Η δραστηριότητα των Φωσφατασών Τυροσίνης ρυθμίζεται από Κινάσες Τυροσίνης , από την Πρωτεϊνική Κινάση C και από την Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση A .

Υπάρχουν πάνω από 40 διαφορετικές Φωσφατάσες της Τυροσίνης και κάθε μία επιδρά σε διαφορετικά υποστρώματα . Ο βιολογικός τους ρόλος δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως , όμως θεωρείται πιθανό ότι ο τελικός τους στόχος είναι η μεταβολή της έκφρασης γονιδίων . (Tonks και Charbonneau, 1989 , Walton και Dixon, 1993) .



Κεφάλαιο 7-8 . Οι Παράγοντες Μεταγραφής NF-κB .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα συχνά προκαλούν την μεταβολή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων στα κύτταρα , που έχει ως αποτέλεσμα την αντίδραση προσαρμογής των κυττάρων στους εξωτερικούς παράγοντες . Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων επιτυγχάνεται από ειδικούς παράγοντες που συνδέονται απευθείας με τον Προαγωγέα των γονιδίων (Promoter region) και συνήθως επαυξάνουν την ταχύτητα μεταγραφής και την ποσότητα του εκφραζόμενου mRNA . Ένας τέτοιος Παράγοντας Μεταγραφής είναι ο NF-κB , ο οποίος υπάρχει στα περισσότερα είδη κυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη και την ανοσολογική αντίδραση .

Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ NF-κB .

Ο παράγοντας μεταγραφής NF-κB (Nuclear Factor κB) αρχικά ανακαλύφθηκε ως ρυθμιστής της έκφρασης της κ-ελαφράς αλυσού των ανοσοσφαιρινών στα Β-λεμφοκύτταρα , γρήγορα όμως διαπιστώθηκε η ύπαρξή του και στα Τ-λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα HeLa . Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του είναι επαγόμενη από διάφορους παράγοντες όπως οι ενδοτοξίνες (LPS) και οι Μυριστικοί Εστέρες της Φορβόλης (PMA) . Η επαγωγή του είναι ταχύτατη και δεν απαιτεί de novo σύνθεσή του (Sen και Baltimore, 1986) . Σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πολλές και διαφορετικές NF-κB πρωτεΐνες , ότι ο παράγοντας αυτός εκφράζεται στα περισσότερα είδη κυττάρων καθώς επίσης ότι επηρεάζει και επηρεάζεται από διάφορες οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων , όπως της Φωσφολιπάσης A₂ και της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . (Lenardo και Baltimore, 1989) .

Ο παράγοντας NF-κB είναι ένα ετεροδιμερές που συνήθως αποτελείται από δύο υπομονάδες, την p65 (relA) και την p50 . Υπάρχουν όμως και άλλες υπομονάδες , όπως p52, rel, relB και v-rel . Σε αυτή η μορφή ο NF-κB είναι ενεργός και εντοπίζεται στον πυρήνα . Στην ανενεργή του μορφή ο NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι συνδεδεμένος με τους αναστολείς του , τις πρωτεΐνες IκBa και IκBβ . Οι IκB αναστολείς εμποδίζουν την μετατόπισή του (translocation) στον πυρήνα . Όταν ένα κύτταρο διεγερθεί οι IκB αναστολείς φωσφορυλιώνονται από συγκεκριμένες ένζυμα (π.χ. Κινάσες όπως η Casein Kinase-II) και αποδομούνται , με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NF-κB και την μετατόπισή του τον πυρήνα . Εκεί ο NF-κB συνδέεται με το DNA στην περιοχή του Προαγωγέα ενός γονιδίου και προκαλεί την έκφρασή του . Ταυτοχρόνως όμως προκαλεί και την έκφραση του αναστολέα IκBa , επειδή ο προαγωγέας του γονιδίου του IκBa διαθέτει περιοχή αναγνώρισης του NF-κB . Έτσι μόλις ο αναστολέας συντεθεί θα εισέλθει στον πυρήνα και θα συνδεθεί με τον NF-κB αναστέλλοντας την δράση του και επαναφέροντάς τον στο κυτταρόπλασμα . Επειδή η σύνθεση του άλλου αναστολέα IκBβ δεν επάγεται από τον NF-κB , σε κύτταρα που εκφράζουν κυρίως αυτόν τον αναστολέα η σύνδεση NF-κB - DNA είναι παρατεταμένη . (Baueerle και Baltimore, 1988 , Urban και συν., 1991 , Barnes και Karin, 1997) .

Η σύνδεση του NF-κB με το DNA γίνεται μέσω της p65 υπομονάδας του (Urban και συν., 1991) . Όμως ο NF-κB δεν συνδέεται με οποιοδήποτε Προαγωγέα γονιδίου αλλά μόνο με εκείνους που έχουν μια ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται από την 65 υπομονάδα (Lenardo και Baltimore, 1989) .



Η ενεργοποίηση του Παράγοντα Μεταγραφής NF-κB απαιτεί την ενεργοποίηση ενός ενζύμου που θα φωσφορυλιώσει και θα αποδομήσει τον IκB αναστολέα. Αυτό επιτυγχάνεται από πολλούς διαφορετικούς ενεργοποιητές, οι οποίοι δρουν μέσω διαφορετικών Οδών Μεταγωγής Μηνύματος. Τέτοιοι ενεργοποιητές είναι οι Κυτταροκίνες, οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου, οι διεγέρτες της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, ορισμένοι ιοί και άλλοι παράγοντες, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ NF-κB

1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ : Παράγοντας Νέκρωσης των Ογκων (TNFα), Ιντερλευκίνη-1β.
2. ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ ΤΗΣ PKC : Μυριστικοί Εστέρες της Φορβόλης (PMA), Ενεργοποιητές των Αιμοπεταλίων (PAF).
3. ΙΟΙ : Ιός Epstein-Barr, Κυτταρομεγαλοϊός (CMV), Ρινοϊοί, Αδενοϊοί, Ιός της Γρίππης.
4. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ : Ενδοτοξίνη (LPS), H_2O_2 , O_2^{-1} , Μιτογόνα (π.χ. PHA), Υπεριώδης (UV) ακτινοβολία.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο παράγοντας μεταγραφής NF-κB επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν Κυτταροκίνες, Υποδοχείς Επιφανείας (Surface Receptors), Μόρια Προσκόλλησης (Adhesion Molecules), ένζυμα που είναι απαραίτητα για την φλεγμονώδη αντίδραση (π.χ. Επαγόμενη Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου, Φωσφολιπάση A_2 και Κυκλο-Οξυγενάση-2) και πολλών άλλων πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ NF-κB

1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ : Παράγοντας Νέκρωσης των Ογκων (TNFα), Ιντερλευκίνες IL-1β, IL-2, IL-6 και IL-8, MIP-1a (Φλεγμονώδης Πρωτεΐνη των Μακροφάγων -1a).
2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ : Υποδοχέας T-λεμφοκυττάρων, Υποδοχέας Ιντερλευκίνης-2.
3. ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗΣ : ICAM-1, VCAM-1, E-Σελεκτίνη (E-Selectin).
4. ΕΝΖΥΜΑ : Επαγόμενη Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS), Κυκλο-Οξυγενάση-2 (COX-2), 5'-Λιπο-Οξυγενάση, Κυτταροπλασματική Φωσφολιπάση A_2 (PLA₂).
5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (COLONY STIMULATING FACTORS) : GM-CSF, M-CSF, G-CSF.

Τρία πολύ σημαντικά στοιχεία για τον NF-κB είναι ότι : 1. Μπορεί να ενεργοποιηθεί από τους Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου που εκκρίνονται στις φλεγμονώδεις εστίες (Schreck και συν., 1991, Meyer και συν., 1993, Kaul και Forman, 1996), 2. Προκαλεί την ταυτόχρονη έκφραση πολλαπλών πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην φλεγμονώδη αντίδραση και ταυτόχρονα ενεργοποιούν τον NF-κB σε παρακείμενα κύτταρα (Heller και Kronke, 1994, Barnes και Karin, 1997), 3. Προκαλεί την έκφραση ενζύμων όπως η Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου, η Κυκλο-Οξυγενάση-2, η 5'-Λιπο-Οξυγενάση και η Φωσφολιπάση A_2 που συμμετέχουν και σε οδούς Μεταγωγής Μηνύματος.

Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κB μέσα από δύο οδούς : 1. Με την απευθείας σύνδεση στην p65 υπομονάδα του NF-κB, που εμποδίζει τον Παράγοντα Μεταγραφής να συνδεθεί στο DNA και να προκαλέσει την μεταγραφή των γονιδίων, 2. Επάγοντας την σύνθεση του αναστολέα IκB. (Barnes και Karin, 1997).



Κεφάλαιο 7-9 . Οι Οδοί Μεταγωγής Μηνύματος στα Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα .

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΥΛΙΚΗΣ ΚΥΚΛΑΣΗΣ - ΚΥΚΛΙΚΟΥ AMP - ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ Α .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς στην μεμβράνη τους (π.χ. αδρενεργικούς, νοτοπαμινεργικούς και υποδοχείς για τις προσταγλανδίνες PGE₁ και PGE₂) που είναι συνδεδεμένοι με την Αδενυλική Κυκλάση (Remold O'Donnell, 1974, Ikegami, 1977, Remold O'Donnell και Alpert, 1979, Lavis και συν., 1980, Verghese και Snyderman, 1983, Decker, 1990). Τα μακροφάγα αυτά επίσης παρουσιάζουν δραστηριότητα Φωσφοδιεστεράσης, η οποία διασπά το cAMP που παράγεται και συμμετέχει ενεργά στην ρύθμιση αυτής της οδού (Lim και συν., 1981, Okonogi και συν., 1991, Dent και συν., 1994). Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν δραστηριότητα Φωσφοδιεστεράσης τύπου PDE₄, που αυξάνει το cAMP και οδηγεί στην αναστολή της παραγωγής Αραχιδονικού Οξέος (Germain και συν., 1998). Τέλος τα μακροφάγα διαθέτουν μια Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση (PKA) η οποία διαμεσολαβεί την δράση του cAMP (Hunt και συν., 1984).

Η διέγερση της οδού Αδενυλικής Κυκλάσης - cAMP - PKA μπορεί να γίνεται έμμεσα και όχι μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων και των G-πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η ένωση του υποδοχέα Fcγ2aR της επιφάνειας των μακροφάγων με ανοσοσυμπλέγματα ενεργοποιεί την CK-II Κινάση της Καζεΐνης (Casein Kinase-II), η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση αυξάνει την παραγωγή του cAMP. Επίσης η ένωση ανοσοσυμπλεγμάτων με τον υποδοχέα Fcγ2bR των μακροφάγων ενεργοποιεί την PLA₂, παράγεται προσταγλανδίνη PGE₂ που ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση και αυξάνεται το cAMP. Τελικά ενεργοποιείται η PKA (Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση) που επιδρά στην δραστηριότητα ενζύμων και στην έκφραση γονιδίων μέσα στα μακροφάγα (Suzuki, 1991). Αύξηση του cAMP προκαλεί και η Αδενοσίνη, αφού τα μακροφάγα διαθέτουν A_{2B}-υποδοχείς Αδενοσίνης συνδεδεμένους με την Αδενυλική Κυκλάση. Σε καταστάσεις υποξικού stress η Αδενοσίνη αυξάνει το cAMP των μακροφάγων και αναστέλλει την έκφραση της iNOS και των αντιγόνων MHC-II, καθώς και της παραγωγής TNFα και IL-1 (Xaus και συν., 1999).

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των ινδικών χοιριδίων εκφράζουν δραστηριότητα PLA₂-II, η οποία γίνεται μεγαλύτερη μετά από επώαση των μακροφάγων αυτών με LPS. Ουσίες που αυξάνουν το κυτταρικό cAMP αναστέλλουν την δραστηριότητα της PLA₂-II τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα (Vial και συν., 1998).

Όταν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διεγείρονται ή ενεργοποιούνται παράγουν ανάμεσα σε άλλα και προσταγλανδίνη PGE₂, η οποία δρα αυτοκρινικά και παρακρινικά αυξάνοντας το cAMP στα ενεργοποιημένα κύτταρα (Wahl και συν., 1979, Gemsa και συν., 1979, Lim και συν., 1983). Αυτή η αύξηση του cAMP έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει πολλές λειτουργίες των μακροφάγων, όπως την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Weidemann και συν., 1978, Smith και συν., 1980, Lim και συν., 1983), την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 (Brandwein, 1986, Kammer, 1988), την παραγωγή TNFα (Renz και συν., 1988), την έκφραση των Ia-αντιγόνων (Pariemik και συν., 1986, Figueiredo και συν., 1990) και τέλος την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Raddassi και συν., 1993). Ωστόσο το cAMP δεν καταστέλλει πάντα τις λειτουργίες των μακροφάγων. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμποδίζει την καταστολή των λειτουργιών τους από άλλους παράγοντες ή και τις διεγείρει (Koorman και συν., 1973, Muschel και συν., 1977, Wahl και συν., 1977). Αυτή η ποικιλία αντιδράσεων μπορεί να οφείλεται στο

ότι το cAMP και η PKA ενώ καταστέλλουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων τα οποία είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μακροφάγων, ταυτοχρόνως φαίνεται να διεγείρουν τον Παράγοντα Μεταγραφής NF-kB (Tannenbaum και Hamilton, 1989, Muroi και Suzuki, 1993). Μελέτες που έγιναν σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς ANA-1 που ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη- γ έδειξαν ότι η ήπια αύξηση του cAMP (μετά από χορήγηση PGE₂ ή Cholera Toxin) προκαλούσε επαγωγή της iNOS και αύξηση της παραγωγής NO από τα μακροφάγα. (Mullet και συν., 1997). Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγούσε και η χορήγηση μικρών δόσεων Dibutyl-gly-cAMP στα μακροφάγα ANA-1. Δηλαδή ουσίες που προκαλούσαν μικρή αύξηση του cAMP οδηγούσαν σε επαγωγή της iNOS και επίταση της παραγωγής NO. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι η χορήγηση πολύ μεγάλων ποσοτήτων cAMP (πάνω από 100 μ M) προκαλούσε το αντίθετο αποτέλεσμα κατέσπελλε την iNOS και μείωνε την παραγωγή NO. Αυτό σημαίνει ότι το cAMP έχει δόσοεξαρτώμενη και διφασική επίδραση στην έκφραση ή λειτουργία ορισμένων ενζύμων.

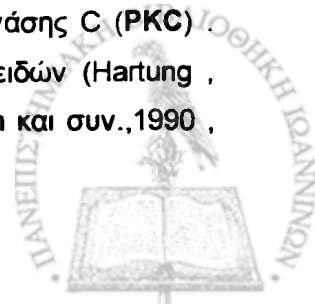
Όταν σε μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS χορηγηθούν το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο (Vasoactive Intestinal Peptide - VIP) ή ο Υποφυσιακός Πολυπεπτιδικός Ενεργοποιητής της Αδενυλικής Κυκλάσης (Pituitary Adenylate Cyclase-activating polypeptide - PACAP) παρατηρείται η αναστολή της παραγωγής TNF α και επίταση της παραγωγής IL-10 (Delgado και συν., 1998, Delgado και συν., 1999). Η αύξηση της παραγωγής IL-10 διαμεσολαβείται από την οδό του cAMP, αφού η PKA φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding Protein), ο οποίος θα συνδεθεί στην περιοχή CRE του προαγωγέα του γονιδίου της IL-10. Η μείωση της παραγωγής TNF α δεν διαμεσολαβείται αποκλειστικά από την οδό cAMP - PKA - CREB - CRE, αλλά και από μία άλλη οδό ανεξάρτητη του cAMP.

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΓΟΥΑΝΥΛΙΚΗΣ ΚΥΚΛΑΣΗΣ - ΚΥΚΛΙΚΟΥ GMP.

Η διέγερση των μακροφάγων προκαλεί διέγερση της Γουανυλικής Κυκλάσης και αύξηση των επιπέδων cGMP στο κυτταρόπλασμα (Smith και συν., 1980, Birmelin και Decker, 1984). Η αύξηση του cGMP φαίνεται να προκαλεί την αυξημένη φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων (Rhodes, 1975), την αυξημένη χημειοταξία των μονοκυττάρων (Gallin και συν., 1978) και την αυξημένη παραγωγή TNF α (Renz και συν., 1988). Επίσης έχει προταθεί ότι ο τρόπος με τον οποίο το Νιτρικό Οξείδιο προκαλεί την παρακρινική ενεργοποίηση των μακροφάγων με αύξηση της παραγωγής IL-1 από τα κύτταρα αυτά είναι μέσω της διέγερσης της Γουανυλικής Κυκλάσης και της αύξησης των επιπέδων cGMP στο μακροφάγο (Hill και συν., 1996).

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ C, ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΪΝΟΣΙΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα διαθέτουν Φωσφολιπάση C με ειδικότητα για την Φωσφατιδυλινοσιτόλη (Wightman και συν., 1981). Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από INF- γ ή PAF οδηγεί στην διέγερση αυτής της Φωσφολιπάσης C και την παραγωγή IP₃ και DAG, που με την σειρά τους προκαλούν την αύξηση του κυτταρικού Ca⁺² και την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC). Τελικά προκαλείται η παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και εικοσανοειδών (Hartung, 1983, Huang και συν., 1988, Prpic και συν., 1988, Sebaldt και συν., 1990, Hursh και συν., 1990, Asmis και συν., 1994).



Ειδικά η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{*2} αποτελεί ένα από τα πρώτα γεγονότα που θα συνοδέψουν την φαγοκυττάρωση ή την διέγερση του μακροφάγου από άλλους παράγοντες και αποτελεί μηχανισμό που συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες (Birmelin και Decker, 1983, Scully και συν., 1986, Conrad και Rink, 1986, Kimura και συν., 1988, Dieter και συν., 1988, Tarsi-Tsuk και Levy, 1990, Hishikawa και συν., 1991, Zimmerli και συν., 1996). Ένας από τους πολλούς μηχανισμούς με τους οποίους πιθανώς δουλεύει το κυτταροπλασματικό Ca^{*2} στα μακροφάγα είναι με την διέγερση της Εξαρτημένης από το Ca^{*2} /Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση των Ελαφρών Αλύσεων Μυοσίνης (MLC-Kinase), η οποία φωσφορυλιώνει την Μυοσίνη-II των μακροφάγων και ρυθμίζει την χημειοταξία τους (Wilson και συν., 1991). Η ανοσοκατασταλτική επίδραση της Κυκλοσπορίνης Α στα μακροφάγα έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στην ικανότητά της να αναστέλλει την σύνδεση της IP_3 στους υποδοχείς της και έτσι παρεμποδίζει την απελευθέρωση Ca^{*2} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες του (Misra και συν., 1998). Όταν τα περιτοναιικά μακροφάγα των επίμυων επωαστούν με ακετυλιωμένη-LDL λιποπρωτεΐνη εμφανίζουν παραγωγή Αραχιδονικού οξέος, που προκαλεί αύξηση του κυτταρικού Ca^{*2} . Η αύξηση του Ca^{*2} προκαλεί ενεργοποίηση κάποιων Κινασών της Τυροσίνης και είναι αναγκαία για την παραγωγή TNF α (Pollaud-Chefion και συν., 1998).

Εκτός από την Φωσφολιπάση-C που υδρολύει την PIP_2 , τα μακροφάγα φαίνεται ότι διαθέτουν και μια Φωσφολιπάση-C που υδρολύει την Φωσφατιδυλ-χολίνη. Αυτή η Φωσφολιπάση σχετίζεται με την ενεργοποίηση της p38 MAP-Κινάσης και της JNK MAP-Κινάσης (c-jun-N-terminal Kinase), που ενεργοποιούν τους παράγοντες NF κ B και AP-1 (Rawadi και συν., 1999). Τα μακροφάγα που έρχονται σε επαφή με LPS παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα κάποιων Κινασών της Τυροσίνης, που με την σειρά τους ενεργοποιούν δύο Φωσφολιπάσες -C (για τις Φωσφατιδυλ-inositόλη και Φωσφατιδυλ-χολίνη αντίστοιχα). Αυτές οι δύο PLC γ ενεργοποιούν την PKC, η οποία ενεργοποιεί τον παράγοντα NF κ B και προκαλεί έκφραση της iNOS (Chen και συν., 1998). Τα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιούνται από LPS επίσης διαθέτουν μια Φωσφολιπάση-C που υδρολύει την Φωσφατιδυλ-χολίνη (PC-PLC γ). Αυτή η PC-PLC γ παράγει DAG που ενεργοποιεί την PKC ζ . Η PKC ζ φωσφορυλιώνει την MAPK-Κινάση, που στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις p42/p44 MAP-Κινάσες (ERK1 και ERK2). Έτσι στα ενεργοποιημένα με LPS βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η PC-PLC γ είναι υπεύθυνη για την διέγερση των p42/p44 MAP-Κινασών (Monick και συν., 1999).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C.

Η διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C είναι ένα σημαντικό βήμα στην αλληλουχία γεγονότων που προκαλεί η ενεργοποίηση των μακροφάγων από διάφορους παράγοντες (ενδοτοξίνες, zymosan, Ιντερφερόνες INF- β και INF- γ) (Wightman και Raetz, 1984, Radzioch και Varesio, 1988, Fan και συν., 1988, Sprot και συν., 1990). Η διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C προκαλεί στα μακροφάγα μια πλειάδα φαινομένων, όπως παραγωγή εικοσανοειδών (Dieter και συν., 1986, Geisel και συν., 1991), Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Dieter και συν., 1987, Mayer και Spitzer, 1994), Νιτρικού Οξειδίου (Jun και συν., 1996), αυξημένη ενδοκύτωση και μορφολογικές μεταβολές (Nilsson και συν., 1989), έκφραση γονιδίων (Fan και συν., 1988) και τέλος παραγωγή G-πρωτεϊνών (Daniel-Issakani 1989). Η PKC προκαλεί την έκφραση της iNOS στα ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα, μέσω της διέγερσης του παράγοντα NF κ B (Olivier και συν., 1998). Επίσης τα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα

παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα Κινασών της Τυροσίνης , οι οποίες ενεργοποιούν δύο Φωσφολιπάσες-C (PLC) που ενεργοποιούν τα ισοένζυμα α , β 1 και δ της PKC . Αυτά τα ισοένζυμα της PKC διεγείρουν τον παράγοντα NF κ B και επάγουν την έκφραση της iNOS (Chen και συν., 1998) . Επίσης η PKC προστατεύει τα RAW 264.7 μακροφάγα από την Απόπτωση που προκαλεί το Νιτρικό Οξείδιο (Nitric Oxide - mediated apoptosis) . Η επίδραση αυτή της PKC οφείλεται στην αναστολή των Οδών Μεταγωγής Μηνύματος της p38 MAP-Κινάσης και της Κινάσης JNK/SAPK (cJun-N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase) και της Πρωτεάσης CPP-32 (Jun και συν., 1999) . Η PKC ζ των ανθρώπινων βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων ενεργοποιεί την MAPK-Κινάση , που στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις p42/p44 MAP-Κινάσες (Monick και συν., 1999) .

Ορισμένες από τις επιδράσεις της PKC στα μακροφάγα οφείλονται στην φωσφορυλίωση των ειδικών πρωτεϊνών MARCKS και MacMARCKS , ενώ άλλες επιδράσεις μπορεί να διαμεσολαβούνται από την φωσφορυλίωση άλλων υποστρωμάτων (Kiyotaki και Bloom, 1984 , Aderem και συν., 1988 , Rosen και συν., 1989 , Aderem, 1992 , Li και Aderem, 1992) . Τέλος η PKC ελέγχει την δραστηριότητα της PLD (Φωσφολιπάσης-D) που διαμεσολαβεί τις επιδράσεις του υποδοχέα της α 2-Μακροσφαιρίνης (Misra και Pizzo , 1998) .

Η ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A_2 - ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .

Τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα διαθέτουν μια κυτταροπλασματική Φωσφολιπάση A_2 η οποία υδρολύει ειδικά το αραχιδονικό οξύ από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια (Wightman και συν., 1981, Emilsson και Sundler , 1986 , Ulevitch και συν., 1988 , Leslie και συν., 1988 , Leslie, 1990 , Leslie και Channon, 1990 , Leslie, 1991 , Kramer και συν., 1991) . Επίσης διαθέτουν Ακυλο-τρανσφεράσες που συμμετέχουν στην ρύθμιση του επιπέδου του αραχιδονικού οξέος (Kronef και συν., 1981) . Τα μακροφάγα διαθέτουν και εναλλακτική οδό παραγωγής του αραχιδονικού οξέος μέσω Φωσφολιπάσης C (Moscat και συν., 1986). Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων επάγεται η έκφραση της Κυκλο-οξυγενάσης COX-2 , που συμμετέχει στην δημιουργία εικοσανοειδών (Lee και συν., 1992) .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των ινδικών χοιριδίων εκφράζουν δραστηριότητα PLA $_2$ -II , η οποία γίνεται μεγαλύτερη μετά από επώαση των κυτάρων αυτών με LPS . Η δραστηριότητα της PLA $_2$ -II σχετίζεται με την παραγωγή TNF α , αλλά όχι αιτιολογικά . Ουσίες που αυξάνουν το κυτταρικό cAMP αναστέλλουν την δραστηριότητα της PLA $_2$ -II και την παραγωγή TNF α , τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα (Vial και συν., 1998) . Στα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW 264.7 η διέγερση της PKC β προκαλεί ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής PLA $_2$ και αυξημένη παραγωγή εικοσανοειδών (Lin και Chen , 1998) .

Η οδός του αραχιδονικού οξέος συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες των μακροφάγων , όπως στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και λυσοσωματικών ενζύμων υπό την επίδραση διαφόρων διεγερτών (Kelley και συν., 1988 , Tarsi-Tsuk και Levy, 1990) . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα των επίμυων που επωαστούν με ακετυλιωμένη-LDL λιποπρωτεΐνη εμφανίζουν δραστηριότητα PLA $_2$ και παραγωγή Αραχιδονικού οξέος , που προκαλεί αύξηση του κυτταρικού Ca $^{+2}$ και παραγωγή TNF α (Pollaud-Cherion και συν., 1998) . Επίσης η οδός του Αραχιδονικού οξέος ρυθμίζει την ανάπτυξη της κυτταροτοξικότητας στα μακροφάγα (Drysdale και Shin, 1981 , Schultz και συν., 1985 , Voth και συν., 1987) . Η αύξηση του cAMP αναστέλλει την δράση της PLA $_2$ και την παραγωγή Αραχιδονικού Οξέος

(Germain και συν., 1998) . Η ενεργοποίηση της PLA_2 απαιτεί την επίδραση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και καταστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή σε πολλαπλά επίπεδα (Aderem και συν., 1986 , Gewert και Sandler, 1995) . Τέλος το αραχιδονικό οξύ συμμετέχει στην ρύθμιση των επιπέδων ιονισμένου Ca^{+2} στο μακροφάγο , πιθανώς δρώντας πάνω σε μια Ca^{+2}/ATP άση (Randiamampita και Trautmann, 1990) . Μια τέτοια Ca^{+2}/ATP άση έχει περιγραφεί στα ουδετερόφιλα φαγοκύτταρα (Klemperer , 1985) .

Είναι πολύ πιθανό ότι οι υποδοχείς $FC\gamma 2bR$ στην επιφάνεια των μακροφάγων προκαλούν την άμεση διέγερση της PLA_2 , με αποτέλεσμα την παραγωγή PGE_2 και την έμμεση διέγερση Εξαρτημένης από το cAMP Πρωτεϊνικής Κινάσης (Suzuki, 1991) .

Η ΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ .

Η διέγερση των μακροφάγων από ενδοτοξίνη προκαλεί την ενεργοποίηση των Κινασών της Τυροσίνης και την φωσφορυλίωση των MAP-Κινασών , μια διαδικασία απαραίτητη για την παραγωγή TNFα και Νιτρικού Οξειδίου (Weinstein και συν., 1991 , Weinstein και συν., 1992 , Dong και συν., 1993 , Novogrodsky και συν., 1994) . Εκτός από τις p42 και p44 MAP-Κινάσες , η ενδοτοξίνη ενεργοποιεί και την p38 MAP-Κινάση , η οποία ενεργοποιεί το γονίδιο *junB* , του οποίου το προϊόν είναι μια πρωτεΐνη που προκαλεί την μεταγραφή πολλών άλλων γονιδίων (Fujihara και συν., 1998) . Τα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιούνται από LPS διαθέτουν μια μορφή PLCγ που υδρολύει φωσφατιδυλ-χολίνη και παράγει DAG , ενεργοποιώντας την PKCζ . Η PKCζ φωσφορυλιώνει την MAPK-Κινάση , που στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις p42/p44 MAP-Κινάσες (ERK1 και ERK2) (Monick και συν., 1999) .

Οι ενδοτοξίνες και οι Ιντεγκρίνες (Integrins) ενεργοποιούν επίσης τις κυτταροπλασματικές Κινάσες της Τυροσίνης Src και Fak , που είναι αντίστοιχα απαραίτητες για την παραγωγή TNFα και Ιντερλευκίνης-1β (English και συν., 1993, Lin και συν., 1994) . Ωστόσο υπάρχουν και εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των μακροφάγων , αφού έχει αποδειχτεί ότι και χωρίς την ενεργοποίηση των Src-Κινασών της Τυροσίνης επιτυγχάνεται ικανοποιητική αντίδραση των μακροφάγων στον LPS και παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου , Ιντερλευκινών IL-1 και IL-6 και TNF-α (Meng και Lowell , 1997) . Είναι γνωστό ότι μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα της Raf-1-Κινάσης , που οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MAP-Κινασών και παραγωγή TNFα . Ταυτοχρόνως υπάρχει ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής NFκB ο οποίος επιτείνει σημαντικά την παραγωγή TNFα δρώντας μέσω ανεξάρτητης οδού μεταγωγής μηνύματος . (Hambleton και συν., 1995) .

Μετά από Οξειδωτικό Stress τα μακροφάγα έχουν την τάση να αποπυκνώνονται . Η μεταβολή αυτή της μορφολογίας τους διαμεσολαβείται από τις MAP-Κινάσες p38 , p42 (ERK1) και p44 (ERK2) , που προκαλούν την έκφραση του γονιδίου *egr-1* (Ogura και Kitamura, 1998) . Επίσης η p38 MAP-Κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον Παράγοντα μεταγραφής NFκB και τον παράγοντα AP-1 στα μακροφάγα της σειράς RAW 264.7 μετά από έκθεση σε λιπιδρωτεΐνες από *Mycoplasma* . Στα ίδια κύτταρα η JNK MAP-Κινάση (c-jun-N-terminal-Kinase) αναστέλλει μόνο τον AP-1 . Η διέγερση του NFκB και του AP-1 οδηγούν στην παραγωγή των TNFα και IL-1β . (Rawadi και συν., 1999) .

Έχει αποδειχθεί ότι κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με ενδοτοξίνη ή Ιντερφερόνη-γ φωσφορυλιώνεται η Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) από Κινάσες της Τυροσίνης . Αυτή η

φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της πλήρους δραστικότητας του ενζύμου και ρυθμίζεται από Φωσφατάσες της Τυροσίνης (Pan και συν., 1996) .

Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα εκφράζουν δύο παραπλήσιους τύπους Src-Κινασών Τυροσίνης , την Csk-Κινάση και την Lsk-Κινάση . Παρά τις ομοιότητές τους , η Csk-Κινάση Τυροσίνης εκφράζεται συνεχώς στα μονοκύτταρα και η έκφρασή της επιτείνεται μόνο από την INF γ ενώ η Lsk-Κινάση εκφράζεται μόνο μετά από διέγερση του μονοκυττάρου με IL-3 ή IL-4 (Musso και συν., 1994) . Επίσης γνωρίζουμε ότι το ένζυμο PI-3'-Κινάση το οποίο αποτελεί ένα από τα κύρια υποστρώματα της δραστηριότητας των Κινασών της Τυροσίνης , συμμετέχει στον μηχανισμό της φαγοκυττάρωσης και πινोकύτωσης (Araki και συν., 1996) . Τέλος , οι Κινάσες της Τυροσίνης συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων PAF στα μακροφάγα (Chao και συν., 1992) .

ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ NF- κ B .

Η διέγερση των μακροφάγων από ενδοτοξίνη (LPS) ή βακτηριακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Παραγόντων Μεταγραφής NF- κ B και στην συνέχεια την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου , TNF α και IL-1 β (Shakhon και συν., 1990 , Hambleton και συν., 1995 , Stacey και συν., 1996 , Denlinger και συν., 1998) . Επίσης οι Δραστικοί Μεταβολίτες Οξυγόνου έχουν την ικανότητα άμεσης διέγερσης του παράγοντα NF κ B (Barnes και Karin , 1997 , Finkel , 1998) .

Στην διαδικασία της ενεργοποίησης των παραγόντων NF- κ B στα μακροφάγα φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και η PKA (Muroi και Suzuki, 1993) . Ο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η PKA ενεργοποιεί τον παράγοντα NF κ B είναι η φωσφορυλίωση του αναστολέα I κ B σε θέσεις σερίνης , που προκαλεί διάσπαση του συμπλέγματος NF κ B-I κ B .

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ορισμένες ουσίες καταστέλλουν την παραγωγή TNF α από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα εμποδίζοντας την μετατόπιση (translocation) του παράγοντα NF κ B στον πυρήνα του κυττάρου . Έτσι μέσα από την αναστολή της ενεργοποίησης του NF κ B η οξειδωμένη LDL καταστέλλει την έκκριση TNF α και IL-1 β από ανθρώπινα μακροφάγα (Ohlsson και συν., 1996) και η Αυξητική Ορμόνη (GH) καταστέλλει την έκκριση TNF α από ανθρώπινα μονοκύτταρα (Haeflner και συν., 1997) .

Η παραγωγή H $_2$ O $_2$ από τα μακροφάγα δρα αυτοκρινικά και παρακρινικά , προκαλώντας την έκφραση των παραγόντων NF- κ B από τα παρακείμενα μακροφάγα (Kaul και Forman , 1996) . Έχει αποδειχθεί ότι όταν τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) έρχονται σε επαφή με νεοπλασματικά κύτταρα , προκαλείται οξειδωτικό stress από το οποίο ενεργοποιείται ο παράγοντας NF- κ B . Στην συνέχεια ο παράγοντας NF- κ B μεταναστεύει στον πυρήνα και επάγει το γονίδιο iNOS με αποτέλεσμα την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Kurose και συν., 1997) .

Η σύνδεση των μονοκυττάρων με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια οδηγεί στην έκκριση της Χημειοκίνης MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) και της IL-8 . Η διαδικασία αυτή απαιτεί την σύνδεση της P-Selectin της επιφάνειας των αιμοπεταλίων με τον μονοκυτταρικό υποδοχέα PSGL-1 καθώς και την έκκριση της πρωτεΐνης RANTES από τα αιμοπετάλια , η οποία επίσης συνδέεται με ειδικό υποδοχέα στα μονοκύτταρα . Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοκυττάρου από τα δύο αυτά σήματα διαμεσολαβείται από τον Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B (Weyrich και συν., 1996) .



Τα μακροφάγα της σειράς RAW 264.7 ενεργοποιούνται από λιποπρωτεΐνες του *Mycoplasma fermentans* και παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα των MAP-Κινάσών τους, οι οποίες Κινάσες φωσφορυλιώνουν τον Παράγοντα μεταγραφής NFκB και τον παράγοντα AP-1. Η διέγερση του NFκB οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων για τις κυτταροκίνες TNFα και IL-1β: (Rawadi και συν., 1999).

ΟΙ ΔΙΑΥΛΟΙ ΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Στις μεμβράνες των οργανιδίων που αποθηκεύουν Ca^{2+} τα μακροφάγα εμφανίζουν υποδοχείς για τις Ινοσπόλες IP_3 και IP_4 . Δεν είναι ακόμα γνωστό αν τα μακροφάγα διαθέτουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς που να συνδέονται απευθείας με Διαύλους Ιόντων, αν και υπάρχουν αναφορές ότι διαθέτουν νικοτινικούς υποδοχείς Ακετυλοχολίνης (Gordon και συν., 1988). Έτσι δεν γνωρίζουμε αν υπάρχουν Σεροτονινεργικοί υποδοχείς 5-HT3 στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων, οι οποίοι ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια διαύλων (Isuperfamily) με τους νικοτινικούς υποδοχείς και που ρυθμίζουν την διέλευση των ιόντων Na^+ και K^+ . Επίσης δεν γνωρίζουμε αν στα μακροφάγα υπάρχουν Αδρενεργικοί ή Νοταμινεργικοί υποδοχείς που να συνδέονται άμεσα με διαύλους ιόντων Ca^{2+} . (Barnard, 1992, Jan και Jan, 1997).



Κεφάλαιο 8-1. Ενδοτοξίνες (Λιποπολυσακχαρίτες) .

8-1-1. Γενικά στοιχεία για τις ενδοτοξίνες .

Με τον όρο ενδοτοξίνες εννοούμε τους λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής επιφάνειας των αρνητικών κατά Gram [Gram (-)] βακτηριδίων . Για τον λόγο αυτό , οι όροι ενδοτοξίνη και Λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι πρακτικά συνώνυμοι .

Ανάμεσα στα Gram(-) βακτηρίδια που περιέχουν ενδοτοξίνες είναι τα *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus mirabilis* , *Serratia marcescens* , *Vibrio cholerae* , *Hemophilus influenzae* , *Neisseria gonorrhoeae* , *Shigella flexneri* , ποικίλα στελέχη της *Salmonella* (*abortus*, *enteritidis*, *typhosa*, *typhimurium*, *minnesota*) και άλλα .

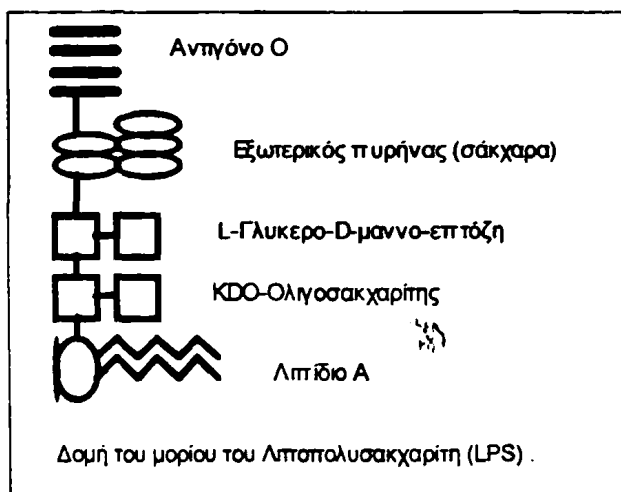
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ .

Η εξωτερική στοιβάδα της εξωτερικής μεμβράνης των περισσότερων Gram(-) αποτελείται από ένα ιδιαίτερο μόριο , που ονομάζεται Λιπίδιο A (Lipid A) και είναι διαφορετικό από τις συνήθεις λιπιδικές δομές των κυτταρικών μεμβρανών . Το Λιπίδιο A αντί για sn-1,2-διακυλογλυκερόλη περιέχει 2,3-διακυλογλυκοσαμίνη . Επίσης , οι ακυλομάδες του Λιπιδίου A είναι κατά 2 ως 6 άτομα άνθρακα βραχύτερες από εκείνες των συνήθων μεμβρανικών λιπιδίων και επιπλέον περιέχουν ένα υποκαταστάτη υδροξυλίου στην θέση R-3 . Αυτή η δομή του Λιπιδίου A καθιστά την εξωτερική μεμβράνη των βακτηριδίων ανθεκτική στην δράση των φωσφολιπασών . Αντιθέτως , η εσωτερική στοιβάδα της εξωτερικής μεμβράνης και οι δύο στοιβάδες της εσωτερικής μεμβράνης των Gram(-) βακτηριδίων αποτελούνται από κοινά μεμβρανικά γλυκεροφωσfolιπίδια .

Το Λιπίδιο A αποτελεί τμήμα ενός μεγαλύτερου μορίου , του Λιποπολυσακχαρίτη (LPS) . Συγκεκριμένα , ο LPS συνδέεται με την βακτηριδιακή μεμβράνη μέσω του Λιπιδίου A . Οι δομές τόσο του Λιπιδίου A όσο και ολόκληρου του μορίου του λιποπολυσακχαρίτη , καθώς και οι οδοί της βιοσύνθεσής τους , έχουν περιγραφεί αναλυτικά (Raetz , 1990 , Rietschel και Brade H., 1992) .

Στο μόριο του LPS η θέση 6 του Λιπιδίου A είναι γλυκοσυλιωμένη με ένα ολιγοσακχαρίτη που ονομάζεται «πυρήνας» . Ο πυρήνας αποτελείται

από δύο μέρη , τον εσωτερικό και τον εξωτερικό πυρήνα . Ο εσωτερικός πυρήνας αποτελείται από τον ολιγοσακχαρίτη 3-δεόξυ-D-μαννο-οκτοϋλοπυρανοσονικό οξύ (KDO-ολιγοσακχαρίτης) που συνδέεται απευθείας με το Λιπίδιο A και με την L-γλυκερο-D-μαννο-επτόζη . Ο εξωτερικός πυρήνας του LPS αποτελείται από σάκχαρα όπως η γλυκόζη , η γαλακτόζη και η N-ακετυλογλυκοσαμίνη ή άλλες εξόζες . Τέλος , τα περισσότερα είδη LPS διαθέτουν ένα ακόμα ολιγοσακχαρίτη , το



Αντιγόνο Ο , συνδεδεμένο με την τελευταία ομάδα γλυκόζης του πυρήνα . Αυτό το Αντιγόνο Ο μπορεί να είναι ένας τετρασακχαρίτης έως και οκτασακχαρίτης , που επαναλαμβάνεται από 20 μέχρι και 40

φορές και έχει μεγάλη ποικιλομορφία . Αποτελεί έναν ετεροπολυσακχαρίτη που περιέχει μεγάλη ποικιλία υποομάδων (π.χ. ουδέτερα σάκχαρα, αμινοσακχαρίτες, δεόξυ-σάκχαρα, φωσφοσακχαρίτες κ.α.) και ακετυλικούς ή μεθυλικούς υποκαταστάτες (Rietschel και συν., 1994 , Hauschildt και Kleine, 1995) . Το Αντιγόνο O προσδίδει στο βακτηρίδιο την ικανότητα να διαφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα , ταυτοχρόνως όμως είναι και εξαιρετικά ανοσοδιεγερτικό . Ορισμένα στελέχη Gram (-) βακτηριδίων δεν έχουν τέτοιο αντιγόνο συνδεδεμένο στο μόριο του LPS , όπως π.χ. το στέλεχος K-12 ή το στέλεχος B του *E.coli* , διότι έχουν χάσει την ικανότητά σύνθεσής του . Η σύνθεση του Αντιγόνου-O είναι ανεξάρτητη της σύνθεσης του υπόλοιπου μορίου του LPS και η έλλειψή του δεν αφαιρεί την λοιμογόνο ικανότητα από ένα μικρόβιο . Έτσι , διακρίνουμε δύο τύπους λιποπολυσακχαριτών : τους S-λιποπολυσακχαρίτες οι οποίοι διαθέτουν Αντιγόνο O και τους R-λιποπολυσακχαρίτες οι οποίοι δεν διαθέτουν Αντιγόνο O (Hauschildt και Kleine, 1995) .

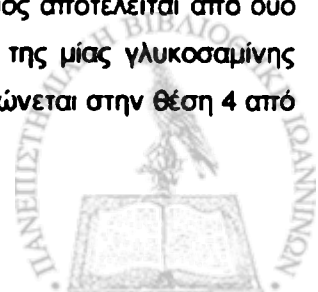
Ο εσωτερικός πυρήνας του μορίου του LPS περιέχει δύο ή τρεις KDO-ολιγοσακχαρίτες και δύο ή τρεις L-γλυκερο-D-μαννο-επτόζες , που προσφέρουν αντίστοιχα σταθερότητα στην εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου και ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα και τα υδρόφοβα φάρμακα (Rietschel και συν., 1994) . Ωστόσο , επειδή έχει πολλούς φωσφορικούς υποκαταστάτες αποκτά έντονο αρνητικό φορτίο (όπως και το Λιπίδιο A) και αποτελεί τον στόχο κατιονικών φαρμάκων όπως η Πολυμυξίνη .

Η δομή των KDO-ολιγοσακχαριτών , με οκτώ άτομα άνθρακα , είναι ανύπαρκτη στο ζωικό βασίλειο και εμφανίζεται σπάνια μόνο στο φυτικό βασίλειο . Όμως αυτή δεν είναι η μόνη ιδιαιτερότητα του μορίου του Λιποπολυσακχαρίτη . Επίσης ασυνήθιστος είναι ο τρόπος σύνδεσης των δύο γλυκοσαμινών του Λιπιδίου A , με μία γέφυρα οξυγόνου (σε β-διαμόρφωση) ανάμεσα στον άνθρακα 1 της μίας γλυκοσαμίνης και στον άνθρακα 6 της άλλης . Τέτοιοι δεσμοί συνήθως αναπτύσσονται μεταξύ των ανθράκων 1 και 4 ή σπανιότερα μεταξύ των ανθράκων 1 και 3 . Ο 1,6-δεσμός υπάρχει μόνο στα Gram (-) βακτήρια .

Το Λιπίδιο A του Λιποπολυσακχαρίτη είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του βακτηριδίου και επίσης είναι χαρακτηριστικό του είδους του βακτηριδίου (δηλαδή διαφορετικό για κάθε μικροβιακό στέλεχος) . Επίσης , έχει παρατηρηθεί ότι τα εντερικά Gram(-) βακτηρίδια έχουν συμμετρικά ακυλιωμένο το Λιπίδιο A , ενώ τα μη-εντερικά συνήθως το έχουν ασύμμετρα ακυλιωμένο . Τέλος , Gram(-) βακτήρια που αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (*N.gonorrhoeae* , *P.aeruginosa*) έχουν Λιπίδια A ακυλιωμένα με λιπαρά οξέα με βραχείες αλυσίδες .

ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΟΥ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ .

Τα Gram(-) βακτήρια συνθέτουν το μόριο του Λιποπολυσακχαρίτη ξεκινώντας από ένα μόριο του σακχάρου N-ακετυλογλυκοσαμίνη . Από αυτό συνθέτουν μία άλλη ουσία , που μοιάζει με το φωσφατιδικό οξύ και λέγεται Λιπίδιο X και από αυτό ένα μόριο Λιπιδίου X ενωμένου με διφωσφορική ουριδίνη (UDP-2,3-diacyl-GlcN) . Το Λιπίδιο X είναι ένα μόριο φωσφορικής α-D-γλυκοσαμίνης , ακυλιωμένη στις θέσεις 2 και 3 με R-3-υδρόξυ-μυριστικό οξύ . Η συμπύκνωση του UDP-2,3-diacyl-GlcN με το Λιπίδιο X θα οδηγήσει στην παραγωγή ενός δισακχαρίτη , ο οποίος αποτελείται από δύο γλυκοσαμίνες ενωμένες μέσω μιας γέφυρας οξυγόνου από τον άνθρακα 1 της μίας γλυκοσαμίνης στον άνθρακα 6 της άλλης . Στην συνέχεια , ο δισακχαρίτης αυτός φωσφορυλιώνεται στην θέση 4 από μία 4'-Κινάση και μετατρέπεται στο Λιπίδιο IV_A .



Ταυτοχρόνως , από την συμπύκνωση της 5-φωσφορικής αραβινόζης με το φωσφοενολοπυρουβικό οξύ και την προσθήκη της μονοφωσφορικής κυτιδίνης , προκύπτει το γλυκονουκλεοτίδιο CMP-KDO . Αυτό το μόριο μεταφέρεται στο Λιπίδιο IV_A μέσω μίας Τρανσφεράσης , η οποία γλυκοσυλιώνει στο Λιπίδιο IV_A δύο μόρια KDO-ολιγοσακχαρίτη . Το σύμπλεγμα υφίσταται ακυλίωση και το Λιπίδιο IV_A μετατρέπεται σε Λιπίδιο A . Στην συνέχεια θα προστεθούν στους KDO-ολιγοσακχαρίτες και τα υπόλοιπα σάκχαρα του εσωτερικού και του εξωτερικού πυρήνα του Λιποπολυσακχαρίτη . Το τελευταίο βήμα στην σύνθεση του LPS είναι η ανεξάρτητη βιοσύνθεση του Αντιγόνου-O , το οποίο αφού πολυμεριστεί θα μεταφερθεί αυτούσιο και θα προστεθεί στην τελευταία ομάδα γλυκόζης του εξωτερικού πυρήνα .

Σχεδόν όλα τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό των λιποπολυσακχαριτών εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης του τοιχώματος του Gram (-) βακτηριδίου και μετά την σύνθεσή του , το μόριο του LPS μεταφέρεται στην εξωτερική μεμβράνη όπου και παγιδεύεται . Ο μηχανισμός της μεταφοράς είναι ακόμα άγνωστος , αλλά πιθανώς να συμμετέχουν μορφώματα της κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζονται «γέφυρες Bayer» ή κάποιες πρωτεΐνες που λέγονται Πορίνες (porins) .

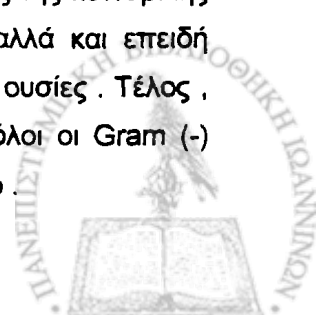
ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ .

Λόγω της μεγάλης ερευνητικής σημασίας των ενδοτοξινών , διατίθενται παρασκευάσματα LPS στο εμπόριο με την μορφή λυοφιλοποιημένων κόνεων . Η επεξεργασία απομόνωσης και καθαρισμού των μορίων αυτών έχει μεγάλη πρακτική σημασία , γιατί μπορεί να αλλοιώσει την αντιγονικότητά τους ή την ανοσοδιεγερτικότητά τους . Έτσι , υπάρχουν αναφορές ότι ενδοτοξίνες που εκχυλίστηκαν με βουτανόλη είναι πιο ανοσοδιεγερτικά από παρασκευάσματα που εκχυλίστηκαν με φαινόλη (Pabst και Johnston, 1980) .

Το πλήρες μόριο του Λιποπολυσακχαρίτη , με την μορφή μονομερούς , είναι αδιάλυτο στο νερό και στους οργανικούς διαλύτες . Για την εκχύλιση του LPS από τα μικροβιακά τοιχώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδατικά διαλύματα φαινόλης (ιδίως όταν ο LPS δεν είναι συνδεδεμένος με Αντιγόνο-O) , μείγμα χλωροφορμίου/φαινόλης/πτετρελαϊκού αιθέρα ή τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA) .

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΩΝ .

Ανάμεσα στις πολλαπλές και πολύπλοκες βιολογικές επιδράσεις που έχει η ενδοτοξίνη , οι πιο σημαντικές είναι το χαρακτηριστικό σύνδρομο σηπτικής καταπληξίας , η ενεργοποίηση του καταρράκτη αντιδράσεων του συμπληρώματος και η μη-ειδική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος . Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους ασθενείς με νόσους του ήπατος , που έχουν μειωμένη κάθαρση των ενδοτοξινών από το αίμα λόγω δυσλειτουργίας των κυττάρων Kupffer (Tanikawa και Sata , 1990) . Όμως οι ενδοτοξίνες έχουν μεγάλη σημασία και για την βιολογία του ίδιου του μικροοργανισμού που τις παράγει , όχι μόνο σαν ένα ουσιώδες στοιχείο της δομής της κυτταρικής του μεμβράνης , χαρίζοντάς της μεγάλη σταθερότητα και μικρή διαπερατότητα , αλλά και επειδή αποτελούν ένα είδος αμυντικής «θωράκισης» απέναντι σε ένζυμα και σε αντιβιοτικές ουσίες . Τέλος , οι ενδοτοξίνες είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των βακτηριδίων , και όλοι οι Gram (-) μικροοργανισμοί που στερούνται λιποπολυσακχαρίτη έχουν δυσχερή αναδιπλασιασμό .



Κατά την διάρκεια της σήψης από Gram (-) βακτηρίδια, η απελευθέρωση στην κυκλοφορία των λιποπολυσακχαριτών προκαλεί ενεργοποίηση μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού συνδρόμου σηπτικής καταπληξίας (septic shock ή endotoxin-induced shock) που χαρακτηρίζεται αρχικά από μειωμένη πνευματική διαύγεια, υπόταση, υπερπυρεξία, ρίγη, ταχυκαρδία, ταχύπνοια και πολύ σύντομα επιπλέκεται από υποθερμία, κυάνωση, ολιγουρία, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, μεταβολική οξέωση, δύσπνοια και μυοκαρδιακή δυσλειτουργία και τελικά καταλήγει σε σύνδρομο ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων (Multiple Organ Failure Syndrome) με νεφρική, καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια (Parillo J.E., 1993). Τα Gram(+) βακτηρίδια, που στερούνται ενδοτοξίνης, δεν προκαλούν τέτοια φαινόμενα, εκτός από τον *Staphylococcus aureus* που προκαλεί σύνδρομο τοξικής καταπληξίας [Toxic Shock Syndrome] μέσω μίας εξωτοξίνης του και από τον *Streptococcus pneumoniae* που προκαλεί ένα σύνδρομο σηπτικής καταπληξίας που οφείλεται στην διέγερση των μακροφάγων από το πολυσακχαρικό περίβλημα του πνευμονιοκόκκου και την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων TNF (Simpson και συν., 1994).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι περισσότερες από τις βιολογικές δραστηριότητες που προκαλεί ο LPS οφείλονται στο Λιπίδιο A. Έτσι, για παράδειγμα, ο LPS και το Λιπίδιο A είναι εξίσου ισχυροί ενεργοποιητές των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων, προκαλώντας την παραγωγή και έκκριση Ιντερλευκίνης-1 (IL-1), Παράγοντα Νέκρωσης των Ογκών (TNF), Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) και άλλων χημικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Άλλες ουσίες που εκκρίνονται από τον οργανισμό ως απόκριση στην ενδοτοξίνη ή το Λιπίδιο A είναι η Ιντερλευκίνη-2, η Ιντερλευκίνη-6, η Ιντερλευκίνη-8, τα εικοσανοειδή (προσταγλανδίνες, λευκοτριένες, θρομβοξάνες και άλλα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος), οι Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου και Αζώτου (Reactive Oxygen/Nitrogen Intermediates) καθώς και διάφοροι Παράγοντες Διέγερσης Αποικιών (Colony Stimulating Factors). Επίσης, ενεργοποιούνται οι αντιδράσεις καταρράκτη των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και των παραγόντων πήξεως. Όταν οι παραπάνω ουσίες εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες, έχουν ευνοϊκή επίδραση στην γενικευμένη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην καταστροφή μικροβίων (ή και καρκινικών κυττάρων). Αντιθέτως, η υπερβολική έκκρισή τους οδηγεί σε καταστροφικά φαινόμενα. (Hauschildt και Kleine, 1995).

Συγκεκριμένα, για την πρόκληση αγγειοδιαστολής και υπότασης από τις ενδοτοξίνες, έχει διευκρινιστεί ότι εκτός από την Προστακυκλίνη (PGI) συμμετέχει και το Νιτρικό Οξείδιο (NO) που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από την έγχυση LPS και το οποίο προκαλεί παρατεταμένη πτώση της μέσης αρτηριακής πίεσης (Thiemermann και Vane, 1990).

Πάντως, αν και είναι γνωστό ότι οι περισσότερες από τις βιολογικές επιδράσεις του LPS οφείλονται στο Λιπίδιο A και ότι το O-αντιγόνο δεν είναι απαραίτητο για την εκδήλωση λοιμογόνου δραστηριότητας από ένα μικρόβιο, είναι ενδιαφέρον ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα κατά του Λιπιδίου A δεν προστατεύουν τα πειραματόζωα από την ενδοτοξίνη, αφού δεν βελτιώνουν την επιβίωσή τους και δεν μειώνουν την παραγωγή IL-6 και TNFα. Αντιθέτως, τα μονοκλωνικά αντισώματα κατά του O-αντιγόνου είναι προστατευτικά, αφού επηρέαζαν όλες τις προαναφερθείσες παραμέτρους (Baumgartner και συν., 1990). Αυτό ίσως να υποδηλώνει ότι το O-αντιγόνο συμμετέχει στην αναγνώριση του LPS από το κύτταρο-στόχο. Κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμα αποδειχθεί και δεν είναι δυνατό να το υποθέσουμε, αφού υπάρχουν και κάποιες κλινικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι το

μονοκλωνικό IgM αντίσωμα κατά του Λιπιδίου A (HA-1A) βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών με σηπτική καταπληξία (ανασκοπούνται στο Wolff , 1991) .

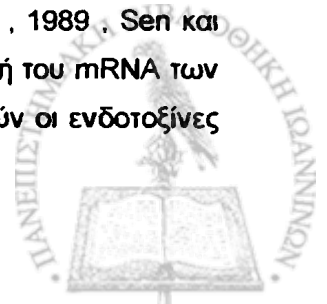
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΩΝ

Είναι γνωστό ότι οι λιποπολυσακχαρίτες πρέπει να απελευθερωθούν από το βακτηριακό τοίχωμα για να είναι δραστικοί , είτε κατά την λύση του μικροβίου ή κατά τον πολλαπλασιασμό του . Όμως , ακόμα και η ελεύθερη ενδοτοξίνη δεν μπορεί να επιδράσει άμεσα σε όλα τα είδη κυττάρων και φυσιολογικών μηχανισμών του οργανισμού-ξενιστή . Τα πολυσυστηματικά φαινόμενα που προκαλεί ο LPS οφείλονται στην επίδρασή του σε συγκεκριμένα κύτταρα-μεσολαβητές , τα οποία «διεγείρονται» και παράγουν ουσίες ικανές να επηρεάζουν πολλά άλλα είδη κυττάρων και μηχανισμών . Συνήθως , τον ρόλο του μεσολαβητή παίζει το μονοπύρρηνο φαγοκύτταρο .

Σε ότι αφορά τον μηχανισμό δράσης των ενδοτοξινών , υπάρχουν δύο βασικά ερωτήματα : Εάν υπάρχουν «υποδοχείς» για αυτές (στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα) και με ποιόν τρόπο η ένωση του μορίου του λιποπολυσακχαρίτη με τον υποτιθέμενο υποδοχέα οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση άλλων κυτταρικών μηχανισμών . Για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα έχει προταθεί ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο επιχειρήθηκε να απαντηθούν οι ερωτήσεις αυτές .

Ο μηχανισμός αφορά την ύπαρξη μίας γλυκοπρωτεΐνης του πλάσματος με M.B. 60 kDa , της LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) και ενός υποδοχέα στην επιφάνεια των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων , του CD14 . Ο LPS κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη LPB και το σύμπλεγμα των δύο ουσιών συνδέεται σταθερά με τον υποδοχέα CD14 στην επιφάνεια των μακροφάγων (Schumann και συν., 1990 , Wright και συν., 1990) . Ο CD14 υποδοχέας είναι μία γλυκοπρωτεΐνη των 55 kDa , που συνδέεται στην μεμβράνη του μακροφάγου μέσω μίας «άγκυρας» φωσφατιδυλο-ινοσιτολο-γλυκάνης . Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον CD14 υποδοχέα βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 5 . Η διέγερση του υποδοχέα θα ενεργοποιήσει το μονοπύρρηνο φαγοκύτταρο για παραγωγή των ουσιών-μεσολαβητών της φλεγμονής (Wright και συν., 1990, Rietschel και Brade , 1992 , Hauschildt και Kleine, 1995) . Είναι πιθανό ο υποδοχέας CD14 να μην ενεργοποιεί τον πυρήνα απευθείας , αλλά επιτρέποντας σε έναν άλλο υποδοχέα να συνδέσει επίσης την ενδοτοξίνη , ο οποίος δεύτερος υποδοχέας θα ενεργοποιήσει τον πυρήνα του μακροφάγου (Rietschel και συν., 1994) . Αυτή η υπόθεση προκύπτει από ορισμένα πειράματα που δείχνουν ότι ο υποδοχέας CD14 δεν συμμετέχει στην μεταγωγή μηνυμάτων (Kitchens και συν., 1992) .

Ένα σημαντικό βήμα στην διαδικασία διέγερσης των κυττάρων από τον LPS είναι η ενεργοποίηση του Παράγοντα Μεταγραφής NFκB . Στην κυτταρική σειρά 70Z/3 (που εκφράζει φαινότυπο Β-λεμφοκυττάρου) , ο LPS προκαλεί την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C , που φωσφορυλιώνει (έμμεσα ή άμεσα) την πρωτεΐνη-αναστολέα ΙκB και απελευθερώνει τον παράγοντα NFκB . Στην συνέχεια ο NFκB μεταναστεύει από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και προκαλεί την σύνθεση του mRNA των κάππα-αλυσίδων ανοσοσφαιρινών (Lenardo και Baltimore , 1989 , Sen και Baltimore , 1986) . Οι μυριστικοί εστέρες της φορβόλης επίσης προκαλούν μεταγραφή του mRNA των κάππα-αλυσίδων , που είναι ταχύτερη αλλά όχι τόσο παρατεταμένη όπως προκαλούν οι ενδοτοξίνες και δεν οδηγούν τελικά στην παραγωγή ανοσοσφαιρίνης .



Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο παράγοντας NFκB δεν ανευρίσκεται αποκλειστικά στα Β-λεμφοκύτταρα, αλλά υπάρχει και σε άλλα είδη κυττάρων (Sen και Baltimore, 1986, Lenardo και Baltimore, 1989). Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενδοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν, μέσω ενεργοποίησης της Φωσφολιπάσης C και παραγωγής διακυλογλυκερόλης, την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και την ενεργοποίηση του NFκB μέσω δύο οδών ταυτοχρόνως.

Ορισμένα από τα πρόδρομα λιπίδια του LPS, όπως το Λιπίδιο A, το Λιπίδιο X και το Λιπίδιο IV_A μπορούν να διεγείρουν απευθείας την Πρωτεϊνική Κινάση C των μακροφάγων RAW 264.7 (Wightman και Raetz, 1984). Οι ίδιες ουσίες προκαλούν την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από RAW 264.7 μακροφάγα και από φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα. Για την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος, είναι απαραίτητο τα λιπίδια να διαθέτουν ένα υδροξύ-μυριστικό υποκαταστάτη στην θέση 3 του μορίου τους. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι λιπτοπολυσακχαρίτες δεν διεγείρουν την Πρωτεϊνική Κινάση C (Mohri και συν., 1990).

Όμως, ο λιπτοπολυσακχαρίτης δεν προκαλεί πάντα την πλήρη ενεργοποίηση των μακροφάγων. Έτσι, τα περιτοναϊκά μακροφάγα των μυών δεν ενεργοποιούνται από τον LPS για την παραγωγή εικοσανοειδών, αν όμως επωαστούν αρχικά με LPS και στην συνέχεια με εστέρες φορβόλης ή με PAF θα παράγουν μεγάλες ποσότητες εικοσανοειδών. Επίσης, οι εστέρες φορβόλης και ο PAF προκαλούν σχετικά μικρή παραγωγή εικοσανοειδών αν δεν έχει προηγηθεί επώαση με ενδοτοξίνη. Δηλαδή, αντί για ενεργοποίηση ο LPS προκαλεί μια διαδικασία «προετοιμασίας» ή «ευαισθητοποίησης» των μακροφάγων (macrophage priming), τα οποία γίνονται πιο ευαίσθητα στην επίδραση των εστέρων της φορβόλης ή του PAF ή της αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Aderem και συν., 1986, Aderem, 1988, Glaser και συν., 1990).

Έχει αποδειχτεί ότι κατά την προετοιμασία (ευαισθητοποίηση) των μακροφάγων με LPS παράγεται μία όξινη πρωτεΐνη με MB 68 kDa και εστεροποιείται με μυριστικούς υποκαταστάτες και αποκτά αυξημένη ευαισθησία για την φωσφορυλίωση από την Πρωτεϊνική Κινάση C (Aderem, 1988, Aderem και συν., 1988), την οποία Κινάση ενεργοποιούν στην συνέχεια οι εστέρες της φορβόλης. Και ο LPS προκαλεί φωσφορυλίωση της όξινης 68 kDa -πρωτεΐνης, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό και με πολύ αργότερο ρυθμό, γιατί δεν είναι ισχυρός ενεργοποιητής της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Rosen και συν., 1989). Άρα, ενώ ο LPS δεν είναι ικανός να προκαλέσει μόνος του την πλήρη ενεργοποίηση των μακροφάγων, είναι απαραίτητος για την διαδικασία αυτή, αφού: α) προκαλεί την παραγωγή της 68 kDa-πρωτεΐνης, β) προσθέτει τον μυριστικό υποκαταστάτη στην όξινη 68 kDa-πρωτεΐνη, που είναι απαραίτητος για να μεταναστεύσει η πρωτεΐνη κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, γ) επιταχύνει και επαυξάνει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης από την Πρωτεϊνική Κινάση C, δ) διαφοροποιεί το είδος της φωσφορυλίωσης της όξινης 68 kDa -πρωτεΐνης, αφού προκαλεί την φωσφορυλίωση ενός ακόμα φωσφοπεπτιδίου (Phosphopeptide-3) της πρωτεΐνης αυτής, το οποίο δεν επηρεάζεται από τους εστέρες της φορβόλης (Rosen και συν., 1989).

Έτσι, σύμφωνα με τις προαναφερθείσες ομάδες ερευνητών (Aderem και συν., 1988, Rosen και συν., 1989), ο LPS προκαλεί την παραγωγή της πρωτεΐνης των 68 kDa και στην συνέχεια την προσθήκη μυριστικού οξέος στην πρωτεΐνη αυτή, η οποία μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη όπου εντοπίζεται η Πρωτεϊνική Κινάση C. Η Κινάση φωσφορυλιώνει την 68 kDa -πρωτεΐνη, η οποία

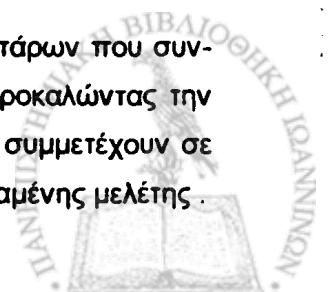
στην συνέχεια διαχέεται ξανά στο κυτταρόπλασμα για να ασκήσει την βιολογική της δράση . Είναι πιθανό ότι αυτή η δράση αφορά και την ενεργοποίηση του NFκB . Στην όλη αυτή διαδικασία ο LPS συμμετέχει και με την απευθείας ευόδωση της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Wightman και Raetz , 1984) . Η 68 kDa-πρωτεΐνη είναι σήμερα γνωστή με το όνομα «Πρωτεΐνη MARCKS» (Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate) και αποτελεί ειδικό υπόστρωμα της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Η Πρωτεΐνη MARCKS συνδέει την καλμοδουλίνη και το ασβέστιο και προκαλεί πολλαπλές βιολογικές επιδράσεις , μεταξύ των οποίων και η ενεργοποίηση των μακροφάγων . Η MARCKS ρυθμίζει την αντιστρεπτή σύνδεση μεταξύ της ακτίνης του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής μεμβράνης . Η φωσφορυλίωση της MARCKS-πρωτεΐνης από την Πρωτεϊνική Κινάση C προκαλεί την αποδέσμευσή της από την κυτταρική μεμβράνη και οδηγεί σε μείζονες αλλαγές στον κυτταροσκελετό .

Όμως και το αντίθετο φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί . Έχει δηλαδή αναφερθεί ότι οι μυριστικοί εστέρες της φορβόλης μπορούν να προκαλέσουν την «ευασθητοποίηση» των μακροφάγων της σειράς U937 (macrophage priming) , για αυξημένη ευαισθησία απέναντι στην παρουσία της ενδοτοξίνης (Daniel-Issakani και συν., 1989) . Συγκεκριμένα , η καλλιέργεια των κυτάρων U937 με τον μυριστικό εστέρα της φορβόλης προκαλούσε την ωρίμανσή τους σε μονοκύτταρα ικανά να ανταποκρίνονται στον LPS με παραγωγή IL-1β , ενώ κανονικά τα U937 δεν ανταποκρίνονται στον LPS . Η διαδικασία ωρίμανσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του α-ισοενζύμου της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC-α) και την φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών , που οδηγούν στην de novo πρωτεϊνοσύνθεση της G-πρωτεΐνης Gi₂ . Η Gi₂ - πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την δράση του λιποπολυσακχαρίτη , ο οποίος συνδέεται λειτουργικά μαζί της και προκαλεί την φωσφορυλίωσή της , σαν ενδιάμεσο βήμα στην επαγωγή του mRNA της IL-1β .

Σε μία αρκετά παλαιότερη εργασία , επίσης παρατηρήθηκε η ανάγκη «ευασθητοποίησης» των μακροφάγων στην επίδραση του LPS , για την ανάπτυξη κυτταροτοξικής δράσης από αυτά . Η ευασθητοποίηση στον LPS μπορούσε να επιτευχθεί από προηγούμενη έκθεση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε λεμφοκίνες ή σε μυκοβακτηρίδια BCG (Ruco και Meltzer , 1978 , Meltzer , 1981) . Επίσης , σε μία πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ένα παρόμοιο φαινόμενο , όπου ένα γλυκολιπίδιο της μεμβράνης των μυκοβακτηριδίων , η διμυκολική τρεχαλόζη (trehalose dimycolate) , προκαλούσε ευασθητοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων απέναντι στην δράση των ενδοτοξινών , με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυτταροστατικής δράσης (Raddassi και συν., 1993) . Ίσως ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτά τα φαινόμενα ευασθητοποίησης απέναντι στον LPS και ανάπτυξης κυτταροτοξικότητας είναι η από παλαιά παρατηρημένη ικανότητα που αποκτούν τα ευασθητοποιημένα μακροφάγα να εκκρίνουν αμέσως μεγάλες ποσότητες λυσοσωματικών όξινων υδρολασών , μόλις έρθουν σε επαφή με ίχνη ενδοτοξίνης (Saito και Suter , 1965) .

8-1-2. Οι Ενδοτοξίνες και τα Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα .

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα μακροφάγα αποτελούν έναν τύπο κυττάρων που συνδέουν τις ενδοτοξίνες και αλλάζουν την δραστηριότητά τους (ενεργοποιούνται) , προκαλώντας την παραγωγή ουσιών που επηρεάζουν την λειτουργία ολόκληρου του σώματος . Έτσι συμμετέχουν σε βασικές παθοφυσιολογικές αντιδράσεις . Για αυτό έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης .



Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας επάνω στην αλληλεπίδραση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και των λιποπολυσακχαριτών αφορά την μελέτη των ενδοκυττάρων μηχανισμών οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την σύνδεση του μορίου του LPS με το μακροφάγο. Μεγάλο τμήμα της βιβλιογραφίας ασχολείται με τους μεσολαβητές των φλεγμονωδών αντιδράσεων που παράγονται από τα μακροφάγα και την δράση τους στο σώμα.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα μακροφάγα διαθέτουν στην επιφάνειά τους έναν γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα με M.B. 55 kDa, τον CD14 υποδοχέα, που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου με μία «άγκυρα» φωσφατιδυλο-ιννοσιτολο-γλυκάνης (Wright και συν., 1990). Ο υποδοχέας αυτός συνδέει το σύμπλεγμα LPS-LPB και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μακροφάγου και την παραγωγή TNF α , IL-1 β ή άλλων παραγόντων-μεσολαβητών της φλεγμονής (Wright και συν., 1990, Kitchens και συν., 1992, Hauschildt και Kleine, 1995). Ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί εάν ο υποδοχέας CD14 προκαλεί ο ίδιος την ενεργοποίηση του μακροφάγου, ή αν διευκολύνει την αλληλεπίδραση του λιποπολυσακχαρίτη με ένα άλλο μόριο υπεύθυνο για την μεταγωγή μηνυμάτων. Σε αυτή την υπόθεση μας οδηγεί το ότι τα μακροφάγα μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον LPS χωρίς να συνδέονται με τον υποδοχέα CD14 και επίσης από το ότι συνθετικά ανάλογα του LPS αναστέλλουν την επαγωγή του NF κ B και της IL-1 β , χωρίς να αναστέλλουν την σύνδεση του LPS στον υποδοχέα του (Kitchens και συν., 1992). Ανεξάρτητα όμως από τον μηχανισμό αυτό, έχει αποδειχθεί ότι αρκούν μόλις λίγα λεπτά έκθεσης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στην ενδοτοξίνη για να επιτευχθεί η μέγιστη διέγερσή τους (Gallay και συν., 1993). Αυτό οφείλεται στο ότι το σύμπλεγμα LPS-LPB συνδέεται στον CD14-υποδοχέα σε 1' λεπτό μόλις και η ενδοκυττάρωσή του αρχίζει σε 5' λεπτά και μεγιστοποιείται μέσα σε 10'-15' λεπτά. Αρκεί λοιπόν μια ολιγόλεπτη επαφή με την ενδοτοξίνη για να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς του μακροφάγου και να επιτύχει μετά από λίγες ώρες την μέγιστη διέγερσή του.

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα συνδέουν και προσλαμβάνουν τα μόρια του LPS και με άλλους υποδοχείς εκτός από τον CD-14 υποδοχέα. Ένα παράδειγμα είναι ο υποδοχέας των ακετυλιωμένων LDL-λιποπρωτεϊνών (Scavenger receptors). Η παραγωγή TNF α απαιτεί την σύνδεση του LPS με τον CD-14 υποδοχέα, ενώ η παραγωγή IL-1 μπορεί να γίνει και μέσω άλλων υποδοχέων εκτός από τον CD-14 (Hampton και συν., 1991, Netea και συν., 1998). Οι CD-14 υποδοχείς επίσης διαμεσολαβούν την αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων, χωρίς να προκαλούν παραγωγή TNF α , που σημαίνει ότι ο υποδοχέας συνδέεται με δύο διαφορετικές Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος (Devitt και συν., 1998).

Υπάρχουν ορισμένες μελέτες που δείχνουν ότι ένα σημαντικό βήμα στον μηχανισμό ενεργοποίησης του μακροφάγου από τον Λιποπολυσακχαρίτη είναι η επαγωγή του Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B, που οδηγεί στην μεταγραφή των γονιδιωμάτων των TNF α και IL-1 β (Shakhon και συν., 1990, Kitchens και συν., 1992, Muroi και Suzuki, 1993). Σε μια από αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι στην διαδικασία επαγωγής του NF κ B από τις ενδοτοξίνες συμμετέχει ενεργά και η οδός του cAMP - Πρωτεϊνικής Κινάσης A. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι στα μακροφάγα της σειράς J774 ο LPS ενεργοποιεί την Πρωτεϊνική Κινάση A, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τον παράγοντα NF κ B (Muroi και Suzuki, 1993).

Ένα άλλο σημαντικό βήμα στην διαδικασία ενεργοποίησης του μακροφάγου από τους λιποπολυσακχαρίτες είναι και η διέγερση των Πρωτεϊνικών Κινασών της Τυροσίνης . Συγκεκριμένα , έχει διαπιστωθεί ότι η επίδραση του LPS σε μακροφάγα της σειράς RAW 264.7 και σε περιτοναϊκά μακροφάγα μυών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση Κινασών της Τυροσίνης (μέσα σε 5 ως 15 λεπτά) και την φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών (Weinstein και συν., 1991) ; ανάμεσα στις οποίες και οι MAP-Κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases) p41 και p44 (Weinstein και συν., 1992) . Η ενεργοποίηση των Κινασών της Τυροσίνης από την ενδοτοξίνη και η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είχε ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος , ενώ οι αναστολείς των Κινασών της Τυροσίνης κατέστειλαν την παραγωγή εικοσανοειδών από την επίδραση του LPS . Το ίδιο αποτέλεσμα με τον λιποπολυσακχαρίτη είχε και το λιπίδιο A , ενώ η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C από μυριστικούς εστέρες φορβόλης (που προκαλεί παραγωγή εικοσανοειδών) οδηγεί μεν στην διέγερση Πρωτεϊνικών Κινασών Τυροσίνης , αλλά που φωσφορυλιώνουν διαφορετικές πρωτεΐνες από εκείνες που προκαλεί η επίδραση του LPS . Αν και οι εστέρες φορβόλης προκαλούν την ίδια φωσφορυλίωση των MAP-Κινασών p41/p44 με τις ενδοτοξίνες , δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση των Κινασών της Τυροσίνης από τον LPS απαιτεί την μεσολαβητική δράση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Weinstein και συν., 1992) .

Αντιθέτως , έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των Πρωτεϊνικών Κινασών της Τυροσίνης είναι ένα σημαντικό και απαραίτητο βήμα στην εκδήλωση των βιολογικών δραστηριοτήτων των μακροφάγων , μετά από την έκθεσή τους στον LPS . Έτσι , η hck-Κινάση της Τυροσίνης (που ανήκει στις src-Κινάσες της Τυροσίνης) ενεργοποιείται κατά την επίδραση του LPS στα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς BAC1.2F5 και η ενεργοποίησή της είναι απαραίτητη για την παραγωγή TNF (English και συν., 1993) . Δεν είναι γνωστό ποιες πρωτεΐνες αποτελούν το υπόστρωμα της δράσης της hck-Κινάσης της Τυροσίνης , είναι όμως πιθανό ότι ανάμεσα σε αυτές είναι και οι MAP-Κινάσες 1 και 2 . Αυτό προκύπτει από το ότι στα περιτοναϊκά μακροφάγα μυών που ενεργοποιούνται από LPS , η αύξηση της παραγωγής TNF συμβαδίζει με την αύξηση της δραστηριότητας των MAP-Κινασών , μετά την φωσφορυλίωσή τους από Κινάσες της Τυροσίνης (Dong και συν., 1993) . Η αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων που προκύπτει , δηλαδή ότι ο LPS προκαλεί την ενεργοποίηση Κινασών της Τυροσίνης , που με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAP-Κινάσες , που με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν κάποιες άλλες πρωτεΐνες , που προκαλούν την παραγωγή TNFα και άλλων ουσιών , έχει αποδειχτεί πειραματικά : Η χορήγηση τυρφοστινών (Typhostins , αναστολείς των Κινασών Τυροσίνης) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της p42 MAP-Κινάσης και την αναστολή της παραγωγής TNFα από περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS (Novogrodsky A. et al, 1994) . Επίσης , οι τυρφοστινές προκαλούν την μειωμένη παραγωγή TNFα in vivo , μετά από χορήγηση LPS . Τέλος , οι τυρφοστινές αναστέλλουν και την παραγωγή γιτρικού οξειδίου από τα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα . Σε μία άλλη μελέτη , η Γενιστεΐνη (Genistein, αναστολέας των Κινασών Τυροσίνης) προκαλούσε καταστολή της ικανότητας των ευαισθητοποιημένων από LPS μακροφάγων να παράγουν μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος μετά από διέγερση με PAF (Glaser και συν., 1990) .

Μία ακόμα έμμεση πηγή πληροφοριών για την συσχέτιση της ενεργοποίησης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από τους λιποπολυσακχαρίτες και την διέγερση των Κινασών της



Τυροσίνης προέρχεται από πειράματα που έγιναν με την διτερπενοειδή ουσία Ταξόλη (Taxol) και τα συνθετικά ανάλογά της, που έχουν αποδειχτεί ισχυροί ενεργοποιητές των μακροφάγων. Η ταξόλη φαίνεται να λειτουργεί συνδεδεμένη με τον υποδοχέα των λιποπολυσακχαριτών και προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση των Κινάσων της Τυροσίνης και την έκφραση του γονιδίου του TNF α (Manthey και συν., 1993). Λιπίδια που ανταγωνίζονται την σύνδεση του LPS με τον υποδοχέα CD14 καταστέλλουν τις προαναφερθείσες επιδράσεις της ταξόλης.

Ένα ακόμα σημαντικό βήμα στην διαδικασία ενεργοποίησης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από τους Λιποπολυσακχαρίτες είναι η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων και της σύνθεσης πρωτεϊνών (Largen και Tannenbaum, 1986, Panuska και συν., 1988). Ο LPS προκαλεί την επαγωγή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων μέσω διαφόρων οδών μεταγωγής μηνύματος και μάλιστα η έκφραση αυτή των γονιδίων υπόκειται σε ποικίλους μηχανισμούς ρύθμισης.

Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι ο Λιποπολυσακχαρίτης προκαλεί την ταχεία έκφραση των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-myc στα περιτοναϊκά μακροφάγα, πιθανώς μέσω ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Introna και συν., 1986). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο LPS προκαλεί στα μακροφάγα την μεταγραφή του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων (D3, D5, D8, C7) που σχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση (αφού επάγονται και από την Ιντερφερόνη- γ). Η επαγωγή των γονιδίων από τον LPS γίνεται μέσω τριών διαφορετικών οδών, που όλες καταστέλλονται από τα γλυκοκορτικοειδή (Hamilton και συν., 1989). Είναι αξιοπρόσεκτο ότι η επαγωγή των ίδιων γονιδίων από την Ιντερφερόνη- γ δεν επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι ο LPS προκαλεί στα περιτοναϊκά μακροφάγα την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων JE και KC, καθώς επίσης και των γονιδίων της IL-1 και του TNF (Tannenbaum και Hamilton, 1989). Η έκφραση των γονιδίων JE και του TNF καταστέλλονται από την αύξηση του cAMP, ενώ τα άλλα δύο γονίδια δεν επηρεάζονται από το cAMP.

Ένα ακόμα πολύ σημαντικό γονίδιο του οποίου η έκφραση επάγεται στα μακροφάγα μετά από ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη είναι αυτό που κωδικοποιεί μια όξινη πρωτεΐνη με MB 68 kDa που συνδέεται με το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη, την MARCKS-πρωτεΐνη (Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate), που αποτελεί ένα ειδικό υπόστρωμα της Πρωτεϊνικής Κινάσης C. Η MARCKS προκαλεί πολλαπλές βιολογικές επιδράσεις, μεταξύ των οποίων και η ενεργοποίηση των μακροφάγων, ρυθμίζοντας την αντιστρεπτή σύνδεση μεταξύ της ακτίνης του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής μεμβράνης (Aderem, 1988, Aderem και συν., 1988, Rosen και συν., 1989). Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS, η MARCKS παράγεται και αποκτά έναν μυριστικό υποκαταστάτη, ο οποίος προκαλεί την μετανάστευσή της στην κυτταρική μεμβράνη, στο σημείο επαφής κυτταροσκελετού και μεμβράνης, όπου εντοπίζεται και η Πρωτεϊνική Κινάση C. Η φωσφορυλίωση της MARCKS-πρωτεΐνης από την Πρωτεϊνική Κινάση C προκαλεί την αποδέσμευσή της από την κυτταρική μεμβράνη και οδηγεί τον κυτταροσκελετό σε μείζονες δομικές αλλαγές. Όμως οι ενδοτοξίνες προκαλούν την επαγωγή της σύνθεσης μιας ακόμα πρωτεΐνης με MB 42 kDa. Αυτή η 42-kDa πρωτεΐνη είναι χαρακτηριστική για τα μακροφάγα και ονομάζεται MacMARCKS (Li και Aderem, 1992). Η MacMARCKS πρωτεΐνη είναι επίσης υπόστρωμα της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, συνδέει επίσης την καλμοδουλίνη και το ασβέστιο, έχει παρόμοια δομή με την πρωτεΐνη MARCKS και όταν αποκτήσει τον μυριστικό υποκαταστάτη της μεταναστεύει επίσης στην κυτταρική μεμβράνη. Επειδή εμφανίζεται χαρακτηριστικά σε μα-

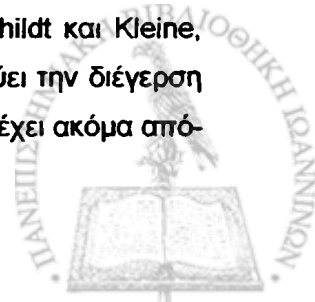
κροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με ενδοτοξίνη , είναι πιθανό ότι συμμετέχει στην διαδικασία ενεργοποίησης από τον LPS (Li και Aderem, 1992) .

Ένα επίσης πολύ σημαντικό ένζυμο , του οποίου η έκφραση επάγεται από την επίδραση των ενδοτοξινών στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , είναι η Κυκλοοξυγενάση COX-2 (Mitogen-Inducible Cyclooxygenase) , που αποτελεί το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή προσταγλανδινών στα ενεργοποιημένα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (Lee και συν., 1992) . Η έκφραση της COX-2 στα μακροφάγα μετά από την επίδραση του Λιποπολυσακχαρίτη αναστέλλεται πλήρως από την δεξαμεθαζόνη .

Ωστόσο , το φαινόμενο της επαγωγής έκφρασης γονιδίων μετά από επίδραση LPS στα μακροφάγα είναι αρκετά πολύπλοκο . Η πολυπλοκότητα οφείλεται στο ότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον LPS συνοδεύεται από εκλεκτική αύξηση της έκφρασης ορισμένων μόνο γονιδίων , ενώ καταστέλλεται η έκφραση άλλων γονιδίων που επίσης σχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση . Έτσι , έχει παρατηρηθεί ότι μετά από ενδοτραχειακή χορήγηση LPS σε επίμυες , τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν εκλεκτική σύνθεση και έκφραση ορισμένων κυτταροκινών (TNF α , MIP-2 , IL-1 β , IL-6) ενώ άλλες κυτταροκίνες (TGF- β 1 , RANTES) δεν εκφράζονται (Ching και συν., 1994) . Εξάλλου , η ενεργοποίηση με LPS προκαλεί την καταστολή της έκφρασης του mRNA των Ia-αντιγόνων στην επιφάνεια των περιτοναϊκών μακροφάγων , ενώ τα ίδια αντιγόνα επάγονται κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με Ιντερφερόνη- γ (Koerner και συν., 1987) . Επίσης , ο LPS προκαλεί την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της Επαγομένης Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) , ενώ ταυτοχρόνως προκαλεί μέσα σε 72 ώρες και την απενεργοποίηση του ίδιου ενζύμου (Vodonotz και συν., 1994) . Τέλος , θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση που έχει ο Λιποπολυσακχαρίτης στην έκφραση γονιδίων και την σύνθεση πρωτεϊνών από τα μακροφάγα , εξαρτάται από την λειτουργική κατάσταση (status) του κυττάρου κατά την στιγμή της επίδρασης του LPS . Έτσι , οι ενδοτοξίνες προκαλούν την επαγωγή και σύνθεση διαφορετικών πρωτεϊνών στα ενεργοποιημένα (activated / immune) περιτοναϊκά μακροφάγα από ότι στα φλεγμονώδη (διεγερμένα / inflammatory / elicited) ή στα φυσιολογικά (resident) μακροφάγα (Largen και Tannenbaum , 1986) . Μάλιστα , είναι χαρακτηριστικό ότι και τα φυσιολογικά και τα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα παρουσίαζαν την έκφραση των ίδιων σχεδόν πρωτεϊνών μετά από την επίδραση του LPS .

Εκτός από τα παραπάνω φαινόμενα , οι ενδοτοξίνες προκαλούν επίσης την ενεργοποίηση και άλλων μηχανισμών μεταγωγής μηνυμάτων στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα , κινητοποιώντας συστήματα δεύτερων αγγελιοφόρων (Adams, 1989 , Decker, 1990 , Hauschildt και Kleine, 1995) . Ανάμεσα σε αυτά , ένα από τα πιο σημαντικά είναι το σύστημα Φωσφολιπάσης C - Διακυλογλυκερόλης - Πρωτεϊνικής Κινάσης C .

Υπάρχουν αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία που υποστηρίζουν ότι οι ενδοτοξίνες προκαλούν την ενεργοποίηση της Φωσφολιπάσης C , η οποία διασπά την Διφωσφορική Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP $_2$) σε Διακυλογλυκερόλη (DAG) και Τριφωσφορική Ινοσιτόλη (IP $_3$) (Hauschildt και Kleine, 1995) . Η DAG είναι ο φυσικός διεγέρτης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C ενώ η IP $_3$ ενισχύει την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C μέσω της αύξησης του ενδοκυττάρου Ca $^{+2}$. Ωστόσο , δεν έχει ακόμα από-



δειχθεί με βεβαιότητα ότι η ενεργοποίηση της Κινάσης C γίνεται μέσω Φωσφολιπάσης C και Διακυλογλυκερόλης και όχι μέσω κάποιας άλλης οδού .

Τα μονοκύρηνα φαγοκύτταρα μπορούν να διεγερθούν από τον LPS και από τα πρόδρομα λιπίδια των λιποπολυσακχαριτών , δηλαδή από το Λιπίδιο A , το Λιπίδιο X και το Λιπίδιο IV_A , που ενεργοποιούν την Πρωτεϊνική Κινάση C στα μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW 264.7 και προκαλούν την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος τόσο στα κύτταρα RAW 264.7 όσο και στα φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα μυών (Wightman και Raetz , 1984) . Επίσης , έχει διαπιστωθεί και από άλλους ότι στα περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS , η διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την παραγωγή και έκκριση μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (Geisel και συν. , 1991) . Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι στα κύτταρα της σειράς HL-60 ο LPS δεν ενεργοποιεί την Πρωτεϊνική Κινάση C και ότι η επαγωγή του γονιδίου του TNF οφείλεται μάλλον στην ενεργοποίηση της Φωσφολιπάσης A2 και την αυτοκρινική επίδραση των λευκοτριενίων , ανεξάρτητα από την δράση της PKC (Mohi και συν. , 1990) . Ταυτόχρονα , παρατηρήθηκε ότι ένας αναστολέας της Πρωτεϊνικής Κινάσης C , ο H-7 , δεν παρεμπόδιζε την ενεργοποίηση των μακροφάγων της κυτταρικής σειράς PD3881 από τον LPS (Glaser και συν. , 1990) . Ως συμπέρασμα από τις παραπάνω αντικρουόμενες εργασίες , θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι πρέπει να υπάρχουν περισσότερες από μία οδοί ενεργοποίησης των μονοκύρηνων φαγοκυττάρων και ότι η Πρωτεϊνική Κινάση C εμπλέκεται σε μία μόνο από αυτές .

Τέλος , ένα άλλο σύστημα δεύτερων αγγελιοφόρων που φαίνεται να ενεργοποιείται στα μακροφάγα από την επίδραση των ενδοτοξινών είναι αυτό του cAMP - Πρωτεϊνικής Κινάσης A . Ο LPS προκαλεί την ενεργοποίηση μιας κυτταροπλασματικής Φωσφοδιεστεράσης που καταστέλλει την αύξηση του cAMP στα μακροφάγα (Okonogi και συν. , 1991) . Αυτή η καταστολή του cAMP είναι πολύ σημαντική , αφού έχει δείχθει ότι σε μακροφάγα της σειράς J774 που διεγείρονται με LPS η ίδια η Πρωτεϊνική Κινάση A ενεργοποιεί τον παράγοντα NFκB (Muroi και Suzuki , 1993) . Η δράση αυτής της Φωσφοδιεστεράσης είναι επίσης σημαντική διότι η ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον LPS προκαλεί και την παραγωγή PGE₂ , η οποία καταστέλλει τα μακροφάγα μέσω αύξησης του cAMP (Raddassi και συν. , 1993) .

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ

Οι ενδοτοξίνες ασκούν μία πλειάδα από επιδράσεις στα μακροφάγα , ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησής τους . Οι κυριότερες επιδράσεις , που έχουν μεγάλη σημασία για τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της φλεγμονής και της ανοσίας, αφορούν μεταβολές στην έκκριση βιολογικά δραστικών ουσιών . Ωστόσο τα μακροφάγα υφίστανται και άλλες επιδράσεις από τον LPS , που δεν αφορούν την έκκριση ουσιών .

Ο LPS προκαλεί σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στα περιτοναϊκά μακροφάγα , τόσο in vivo όσο και in vitro (Morland και Kaplan , 1977) . Συγκεκριμένα , η in vivo χορήγηση ενδοτοξίνης προκαλεί την αύξηση του μεγέθους και της επιφάνειας των μακροφάγων , αύξηση των λεπτών πτυχώσεων της κυτταρικής μεμβράνης και αύξηση των κοκκίων και των κενοτοπιών στο κυτταρόπλασμα . Το ίδιο αποτέλεσμα προκαλεί και η καλλιέργεια των μακροφάγων με LPS παρουσία 20% FCS στο καλλιεργητικό υλικό , ενώ η καλλιέργεια με LPS αλλά χωρίς FCS προκαλούσε αύξηση του μεγέθους

των μακροφάγων , με ταυτόχρονη εξαφάνιση της πύκνωσης της μεμβράνης και μείωση των κοκκίων και κενοτοπιών . Επίσης , είναι ενδιαφέρον ότι ο LPS προκαλεί στα μακροφάγα την ταχύτατη αναδιοργάνωση των μικρονηματίων της ακτίνης , που πιθανώς αποτελεί τμήμα της οδού μεταγωγής μηνυμάτων (Shinji και συν., 1991) .

Ο LPS προκαλεί την αύξηση των φαινομένων της φαγοκυττάρωσης μετά από *in vivo* χορήγησή του , ενώ μετά από την καλλιέργεια των περιτοναϊκών μακροφάγων με ενδοτοξίνη και FCS αυξάνεται η φαγοκυττάρωση μέσω υποδοχέων συμπληρώματος , ενώ δεν επηρεάζεται η φαγοκυττάρωση μέσω Fc-υποδοχέων (Morland και Kaplan , 1977) . Αν στο καλλιεργητικό υλικό δεν υπάρχει FCS , τότε η φαγοκυττάρωση δεν μεταβάλλεται ή μειώνεται . Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις μιας άλλης ομάδας , η οποία διαπίστωσε σταθερή αύξηση της φαγοκυττάρωσης από την δράση της ενδοτοξίνης (Cooper και συν., 1984) , καθώς και σε μερική αντίθεση με την παρατήρηση ότι ο LPS προκαλεί αυξημένη φαγοκυττάρωση στα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού , αλλά όχι στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Wizemann και Laskin , 1994) . Ωστόσο αποτελεί πάγια άποψη το ότι η ενδοτοξίνη προκαλεί την ενεργοποίηση των φαγοκυτταρικών δραστηριοτήτων σε όλα τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα του Δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (Dobson και Kelley, 1973) και την αύξηση του αριθμού των Fc-υποδοχέων (Abe και συν., 1984) .

Οι λιποπολυσακχαρίτες καταστέλλουν την έκφραση ενός ειδικού υποδοχέα για τις τροποποιημένες LDL-λιποπρωτεΐνες , ο οποίος ονομάζεται «scavenger receptor» (Van Lenten και συν., 1985) . Επίσης , οι λιποπολυσακχαρίτες έχουν αναφερθεί να προκαλούν την καταστολή της έκφρασης του Ια-αντιγόνου , που ανήκει στα μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξεως II , αλλά η σημασία του φαινομένου αυτού δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί (Koerner και συν., 1987) . Αντιθέτως , οι λιποπολυσακχαρίτες προκαλούν την αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα του PAF (Platelet Activating Factor) στην επιφάνεια των μακροφάγων της κυτταρικής σειράς IC-21 , καθώς και την αυξημένη ευαισθησία των υποδοχέων αυτών στην σύνδεση με τον PAF (Liu και συν., 1992) .

Όμως , το φαινόμενο με την μέγιστη σημασία για τον οργανισμό είναι η επαγωγή της σύνθεσης και η αύξηση της έκκρισης βιολογικά δραστικών ουσιών από τα μακροφάγα , μετά την έκθεσή τους στις ενδοτοξίνες . Τα ενεργοποιημένα από LPS μονοπύρνα φαγοκύτταρα παράγουν μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ουσιών (Largen και Tannenbaum , 1986 , Panuska και συν., 1988) , ορισμένες από τις οποίες φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα .

Ουσίες που παράγονται από τα μακροφάγα μετά την διέγερσή τους από Λιποπολυσακχαρίτη .

Πρωτεΐνες :

Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (TNF) , Ιντερλευκίνη-1 , Ιντερλευκίνη-6 , Ιντερλευκίνη-8 , Φλεγμονώδης Πρωτεΐνη των Μακροφάγων - 2 (Macrophage Inflammatory Protein - 2) , Ώξινες Λυσοσωματικές Υδρολάσες , Ουδέτερες Πρωτεάσες .

Δραστικές Ρίζες :

Ανιόν Υπεροξειδίου , Υπεροξειδίου του Υδρογόνου , Νιτρικό Οξείδιο .

Λιπίδια :

Προσταγλανδίνη E₂ , Προσταγλανδίνη F_{1a} , Θρομβοξάνη A₂ , Θρομβοξάνη B₂ , Λευκοτριέν C , Προστακυκλίνη (PGI₂) , Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) .

Ανάμεσα στις πιο σημαντικές από τις ουσίες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα είναι οι Κυτταροκίνες . Η πιο καλά μελετημένη κυτταροκίνη που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα είναι ο Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (TNFα) , για τον οποίο υπάρχουν πολλές

αναφορές στον μηχανισμό επαγωγής του από τον LPS (Tannenbaum και Hamilton , 1989 , Shakhov και συν., 1990 , English και συν., 1993 , Dong και συν., 1993 , Xing και συν., 1994) . όπως επίσης υπάρχουν και πολλές δημοσιεύσεις για την συμμετοχή του σε καταστάσεις όπως η σηπτική καταπληξία , η καρκινική καχεξία , η αντιμικροβιακή και αντινεοπλασματική άμυνα του οργανισμού , οι αντιδράσεις G.V.H. (Graft versus Host) στις μεταμοσχεύσεις μυελού , κ.α. (Shemy και Cerami , 1988 , Beutler και Cerami , 1988 , Cerami και Beutler , 1988 , Nestel και συν., 1992) . Μία άλλη κυτταροκίνη που έχει αποδειχτεί ότι εκκρίνεται μετά από την έκθεση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στον LPS είναι η Ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) , η οποία επίσης έχει μεγάλη σημασία στα φλεγμονώδη και στα ανοσολογικά φαινόμενα (Bayne και συν., 1986 , Tannenbaum και Hamilton , 1989 , Rose και συν., 1994 , Xing και συν., 1994) . Τα μακροφάγα παράγουν και άλλες κυτταροκίνες μετά από ενεργοποίηση με LPS , ορισμένες από τις οποίες είναι γνωστές από την βιολογική τους δράση αλλά δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί (Mathison και συν., 1983) .

Τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα επίσης παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες λυσοσωματικών ενζύμων μετά από την έκθεσή τους σε ενδοτοξίνες , όπως για παράδειγμα Ώξινη Φωσφατάση , β-Γλυκουρονιδάση , β-Γαλακτοσιδάση , Καθεψίνη-D και N-Ακέτυλο-Γλυκοσαμινιδάση (Saito και Suter , 1965 , Morland και Kaplan , 1977 , Cooper και συν., 1984) . Επίσης αυξάνεται και η παραγωγή πρωτεασών και άλλων κυτταροπλασματικών ενζύμων , όπως η Κολλαγενάση (Wahl και συν., 1977) και η Γαλακτική Αφυδρογονάση .

Μία από τις χαρακτηριστικότερες επιδράσεις του LPS στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα , που είναι υπεύθυνη και για ένα σημαντικό μέρος της αντιμικροβιακής και αντινεοπλασματικής δράσης των κυττάρων αυτών , είναι η αύξηση της παραγωγής Δραστικών Ριζών Οξυγόνου και Αζώτου (Reactive Oxygen/Nitrogen Intermediates) . Σε ότι αφορά την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου , ο ρόλος του LPS είναι να προκαλεί την ευαισθητοποίηση - ενεργοποίηση του μακροφάγου , το οποίο στην συνέχεια μπορεί να διεγερθεί από ένα δεύτερο ερέθισμα και μέσα από την ενεργοποίηση της NADPH-Οξειδάσης να προκαλέσει το φαινόμενο της Οξειδωτικής Έκρηξης (Respiratory Burst) και την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Johnston , 1978 , Pabst και Johnston , 1980 , Nathan , 1982 , Cooper και συν., 1984 , Mauel και Buchmuller-Roiller , 1987 , Wizemann και Laskin , 1994) . Σε ότι αφορά την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου , η επίδραση του LPS αποτελεί διαδικασία ενός βήματος , προκαλώντας την επαγωγή του γονιδίου της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) στα μακροφάγα (Stuehr και Marietta , 1985 , Iyengar και συν., 1987 , Hibbs και συν., 1988 , Raddassi και συν., 1993) . Μάλιστα , ο LPS προκαλεί και την απενεργοποίηση της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου μέσα σε 72 ώρες (Vodovotz και συν., 1994) .

Οι λιποπολυσακχαρίτες προκαλούν επίσης και την παραγωγή εικοσανοειδών (μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος) από τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Η διαδικασία αυτή είναι επίσης μια διαδικασία δύο βημάτων , όπου ο LPS προκαλεί την ευαισθητοποίηση του μακροφάγου και στην συνέχεια ένας δεύτερος διεγέρτης προκαλεί την παραγωγή των εικοσανοειδών , μέσω ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Aderem και συν., 1986 , Glaser και συν., 1990 , Geisel και συν., 1991) .

Μέσα από μία ποικιλία μηχανισμών , οι ενδοτοξίνες ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα φέρνουν σε κατάσταση υψηλής μικροβιοστατικής / κυτταροτοξικής / αντινεοπλασματικής δράσης (Weinberg και συν., 1978 , Ruco και Meltzer , 1978 , Drysdale και Shin , 1981 , Meltzer , 1981) .

Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση των σηπτικών ασθενών σε υψηλές δόσεις ενδοτοξινών προκαλεί την καταστολή της λειτουργίας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων τους, μία κατάσταση που μπορεί να αποβεί μοιραία εάν δεν αποκαταστήσουμε με Ιντερφερόνη- γ την απευαισθητοποίηση και καταστολή των μακροφάγων που προκάλεσε ο LPS (Docke και συν., 1997).

Όμως η ικανότητα των μακροφάγων να ανταποκρίνονται στον LPS με παραγωγή ποσοτήτων TNFa ή O_2^{-1} μειώνεται με την ηλικία του οργανισμού (Davila και συν., 1990, Alvarez και συν., 1995). Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην έλλειψη κάποιων υποφυσιακών παραγόντων, λόγω γήρανσης των ενδοκρινών αδένων.



Κεφάλαιο 8-2 . Αδρεναλίνη (Επινεφρίνη) .

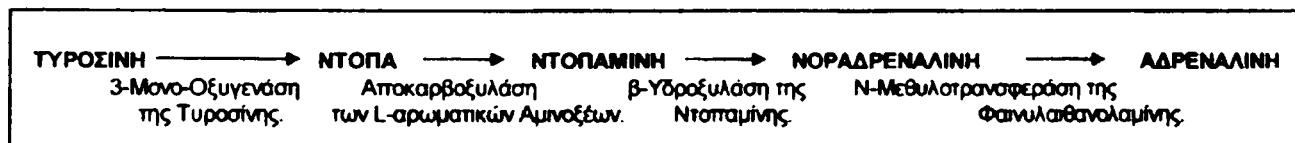
8-2-1. Γενικά στοιχεία για την αδρεναλίνη .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ .

Η αδρεναλίνη (επινεφρίνη) , η νοραδρεναλίνη (νορεπινεφρίνη) και η ντοπαμίνη , αποτελούν μία οικογένεια βιοδραστικών ουσιών , αμινικής προέλευσης , που λέγονται κατεχολαμίνες . Οι κατεχολαμίνες έχουν κοινή βασική δομή , που βασίζεται στην δομή της φαινυλαιθυλαμίνης . Αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο υποκατεστημένο με δύο ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 3 και 4 (δακτύλιος κατεχόλης) , και μια πλάγια αλυσίδα αιθυλαμίνης που ξεκινά από την θέση 1 του δακτυλίου . Στην περίπτωση της αδρεναλίνης ο β-άνθρακας της πλάγιας αλυσίδας είναι επίσης υποκατεστημένος με ομάδα υδροξυλίου , ενώ το άζωτο της πλάγιας αλυσίδας φέρει μία μεθυλική ομάδα για υποκαταστάτη .

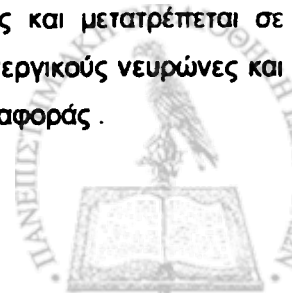
Οι κατεχολαμίνες παράγονται από τους αδρενεργικούς και ντοπαμινεργικούς νευρώνες , από τα συμπαθητικά γάγγλια και από τα χρωμιόφιλα κύτταρα (chromaffin cells) του μυελού των επινεφριδίων . Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα στις κατεχολαμίνες που παράγονται από τα επινεφρίδια και ιδιαίτερα στην αδρεναλίνη (επινεφρίνη) που είναι η βασικότερη κατεχολαμίνη που παράγουν και διοχετεύουν στην κυκλοφορία τα επινεφρίδια του ανθρώπου . Όμως, στην κυκλοφορία διοχετεύεται και μέρος της νοραδρεναλίνης που εκκρίνουν οι νευρικές απολήξεις .

Η βιοσύνθεση της αδρεναλίνης από τυροσίνη απεικονίζεται στον ακόλουθο πίνακα , στον οποίο αναφέρονται εκτός από τα ενδιάμεσα στάδια και τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις σύνθεσής της (Greenspan, 1991) .



Η τυροσίνη μετατρέπεται σε ντόπα (Διυδρόξυ-φαινυλαλανίνη) από την 3-Μono-Οξυγενάση της Τυροσίνης (Υδροξυλάση της Τυροσίνης) με την συνεργεία της τετραυδροβιοπτερίνης . Στην συνέχεια η ντόπα μετατρέπεται σε ντοπαμίνη από την Αποκαρβοξυλάση των L-αρωματικών αμινοξέων , με την βοήθεια της φωσφορικής πυριδοξάλης . Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα . Όμως η ντοπαμίνη μεταφέρεται μέσα σε κυστίδια , όπου υδροξυλιώνεται στον β-άνθρακα σε νοραδρεναλίνη από την β-Υδροξυλάση της Ντοπαμίνης , με την συνεργεία του ασκορβικού οξέος . Τέλος η νοραδρεναλίνη υφίσταται μεθυλίωση στην αμινομάδα της από την N-Μεθυλοτρανσφεράση της Φαινυλαιθανολαμίνης , με την βοήθεια της S-αδενοσυλομεθειονίνης .

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι η τυροσίνη , που αποτελεί την πρόδρομη ουσία από την οποία συνθέτονται οι κατεχολαμίνες , προέρχεται από την διαιτητικά προσλαμβανόμενη φαινυλαλανίνη , η οποία υδροξυλιώνεται στο ήπαρ από την Υδροξυλάση της Φαινυλαλανίνης και μετατρέπεται σε τυροσίνη . Αυτή στην συνέχεια μεταφέρεται από την κυκλοφορία στους αδρενεργικούς νευρώνες και στα χρωμιόφιλα κύτταρα , όπου συγκεντρώνεται με μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς .



Σε όλη αυτή την σειρά των αντιδράσεων , η ταχύτητα της παραγωγής αδρεναλίνης εξαρτάται από τον ρυθμό υδροξυλίωσης της τυροσίνης . Η Υδροξυλάση της Τυροσίνης ενεργοποιείται με φωσφορυλίωσή της από Κινάσες , όπως η Πρωτεϊνική Κινάση Α (Εξαρτημένη από το Κυκλικό AMP Πρωτεϊνική Κινάση) , φαινόμενο που ακολουθεί την αδρενεργική διέγερση των επινεφριδίων από συμπαθητικές νευρικές απολήξεις . Ακόμα , η Υδροξυλάση της Τυροσίνης ενεργοποιείται όταν φωσφορυλιωθεί από την Πρωτεϊνική Κινάση C ή από την Εξαρτημένη από το Ασβέστιο και την Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση . Επίσης , η Υδροξυλάση της Τυροσίνης απενεργοποιείται από τα κατεχολικά προϊόντα της αντίδρασής της , με μηχανισμό παλίνδρομης αρνητικής ρύθμισης .

ΣΧΕΣΗ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΩΝ .

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που ελέγχει τον ρυθμό σύνθεσης της αδρεναλίνης και την ποσότητα της αποθηκευμένης ουσίας στα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων , είναι η παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων . Αυτές οι ορμόνες μεταφέρονται , με το ενδοεπινεφριδιακό αγγειακό δίκτυο , στα χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων και επάγουν την σύνθεση της Ν-Μεθυλοτρανσφεράσης της Φαινυλαιθανολαμίνης , της Υδροξυλάσης της Τυροσίνης και της β-Υδροξυλάσης της Ντοπαμίνης . Ειδικά η Ν-Μεθυλοτρανσφεράση της Φαινυλαιθανολαμίνης υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες μόνο στα χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού , και για την επαγωγή της απαιτούνται πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών . Έτσι , στον άνθρωπο και στα ανώτερα θηλαστικά , σε κάθε κατάσταση παρατεταμένου σωματικού ή ψυχικού stress , η αυξημένη παραγωγή κορτικοτροπίνης οδηγεί έμμεσα στην αύξηση του ρυθμού παραγωγής αδρεναλίνης .

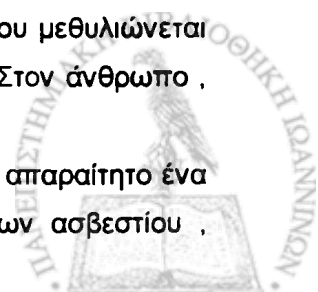
Όμως τα γλυκοκορτικοειδή και οι κατεχολαμίνες έχουν μία ακόμα σχέση : τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν (επάγουν) την παραγωγή β-αδρενεργικών υποδοχέων , μέσω των ειδικών θέσεων σύνδεσης (Glucocorticoid Responsive Elements) στο γονίδιο του β-υποδοχέα (Levitzki, 1988) .

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ , ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΩΝ .

Οι κατεχολαμίνες αποθηκεύονται σε κυτταροπλασματικά κυστίδια , διαμέτρου 0,05 ως 0,20 μm όπως αποκαλύπτονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο . Τα κυστίδια αυτά περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις κατεχολαμινών συνδεδεμένων με τριφωσφορική αδενοσίνη , ειδικών πρωτεϊνών που λέγονται Χρωμογρανίνες , β-Υδροξυλάσης της Ντοπαμίνης , ασκορβικού οξέος , Εγκεφαλινών (Preproenkephalin , Met-Enkephalin και Leu-Enkephalin) και άλλων πεπτιδίων , όπως το Νευροπεπτίδιο Υ (Neuropeptide Υ) . Από τις Χρωμογρανίνες , η αφθονότερη είναι η Χρωμογρανίνη Α , μια όξινη πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία που πιθανολογείται όμως ότι σχετίζεται με την αποθήκευση ή την έκκριση των ορμονών στα κοκκία (Ganong, 1989 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Στον μυελό των επινεφριδίων υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι κυττάρων , που αποθηκεύουν αντίστοιχα κυρίως νοραδρεναλίνη ή αδρεναλίνη στα κυστίδιά τους . Εκείνα που περιέχουν αδρεναλίνη , διαθέτουν στο κυτταρόπλασμά τους το ένζυμο Ν-Μεθυλοτρανσφεράση της Αιθανολαμίνης . Η νοραδρεναλίνη των κυστιδίων διαχέεται στο κυτταρόπλασμα , όπου μεθυλιώνεται και μετατρέπεται σε αδρεναλίνη , η οποία στην συνέχεια επανέρχεται στα κυστίδια . Στον άνθρωπο , το 80% των κατεχολαμινών των επινεφριδίων είναι αδρεναλίνη .

Για την έκκριση της αποθηκευμένης κατεχολαμίνης από τους νευρώνες είναι απαραίτητο ένα δυναμικό ενεργείας που προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου ,



σύντηξη της κυστιδικής μεμβράνης με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και εξωκυττάρωση της αποθηκευμένης ουσίας . Στα χρωμόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων , αντί για δυναμικό ενεργείας είναι απαραίτητη η επίδραση της ακετυλοχολίνης (που εκκρίνεται από τις απολήξεις των προγαγγλιακών ινών που νευρώνουν τον αδένα) στους νικοτινικούς υποδοχείς των χρωμόφιλων κυττάρων . Η ακετυλοχολίνη προκαλεί την αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και την εισροή ιόντων ασβεστίου που θα οδηγήσουν στην εξωκυττάρωση των κατεχολαμινών .

Το 70% της νοραδρεναλίνης και αδρεναλίνης στο πλάσμα είναι συζευγμένες με θειικές ρίζες . Η συζευγμένες κατεχολαμίνες είναι βιολογικά αδρανείς . Η ελεύθερη νοραδρεναλίνη του πλάσματος έχει φυσιολογικές τιμές 300-600 pg/ml (1,8-3,6 nM/Lt) , ενώ η ελεύθερη αδρεναλίνη έχει φυσιολογική τιμή περίπου 30 pg/ml (0.16 nM/Lt) αλλά μετά από επινεφριδεκτομή εξαφανίζεται πλήρως από το πλάσμα . Ο χρόνος ημιζωής των ελεύθερων κατεχολαμινών στο πλάσμα είναι περίπου δύο λεπτά της ώρας . Αυτές ή μεταβολίζονται ή θα επαναπροσλαμβάνονται ενεργητικά από τους νευρώνες (ο μηχανισμός επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης από τους νευρώνες είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός απομάκρυνσής της από τον εξωκυττάριο χώρο και επιτυγχάνεται με ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς) . Μόνο ένα ελάχιστο ποσοστό των κατεχολαμινών θα αποβληθεί ως έχει στα ούρα .

Τόσο η νοραδρεναλίνη όσο η αδρεναλίνη μπορούν να αποδομηθούν με δύο ξεχωριστές μεταβολικές οδούς . Η πρώτη οδός αφορά την οξειδωτική απαμίωση από την Μονοάμινο-Οξειδάση προς 3,4-διυδροξυ-φαινυλογλυκολαλδεϋδη , ενώ η δεύτερη αφορά την μεθυλίωση από την Κατεχολ-Ο-Μεθυλοτρανσφεράση προς νορμετανεφρίνη και μετανεφρίνη . Τελικά και οι δύο οδοί καταλήγουν στον σχηματισμό 3-μεθόξυ-4-υδροξυ-φαινυλοαιθυλενο-γλυκόλη και 3-μεθόξυ-4-υδροξυ-μανδελικού οξέος . Παρά το ότι καταλήγουν στους ίδιους μεταβολίτες , οι δύο οδοί είναι σαφώς διακριτές . Η Μονοάμινο-Οξειδάση εντοπίζεται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων των αδρενεργικών νευρώνων και μεταβολίζει την νοραδρεναλίνη που επαναπροσλαμβάνεται ενεργητικά από τις νευρικές απολήξεις , μέσω κυτταροπλασματικών Πρωτεϊνών-Μεταφορέων (transporters) . Αντιθέτως η Κατεχολ-Ο-Μεθυλοτρανσφεράση υπάρχει σε αφθονία στους νεφρούς , στο ήπαρ και αλλού , όχι όμως στις νευρικές απολήξεις , και μεταβολίζει τις κατεχολαμίνες που κυκλοφορούν στο πλάσμα (Greenspan, 1991) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΩΝ .

Η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη δρουν μέσω ειδικών υποδοχέων που ονομάζονται αδρενεργικοί υποδοχείς και χωρίζονται σε α_1 - , α_2 - , β_1 - , β_2 - και β_3 -υποδοχείς . Και οι πέντε αυτές κατηγορίες υποδοχέων έχουν παρόμοια δομή και διανέμονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα . Για τους α_1 - και τους α_2 - υποδοχείς υπάρχουν επιπλέον από τρεις υποκατηγορίες , που συμβολίζονται α_{1A} - , α_{1B} - , α_{1D} - , α_{2A} - , α_{2B} - και α_{2C} - υποδοχείς . Υπάρχουν δηλαδή συνολικά έξη υποκατηγορίες α -υποδοχέων , τα γονίδια των οποίων εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα .

Οι α_1 -υποδοχείς εντοπίζονται στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων , του γαστρεντερικού και του ουροποιογεννητικού συστήματος, στον εγκεφαλικό φλοιό και στην παρεγκεφαλίδα, στο ήπαρ και στο μυοκάρδιο . Οι α_2 -υποδοχείς διανέμονται στα β -κύτταρα του παγκρέατος , στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων , στα αιμοπετάλια , στον εγκέφαλο , στον νωτιαίο μυελό και στις νευρικές απολήξεις . Οι β_1 -υποδοχείς εντοπίζονται στο μυοκάρδιο , στο ερεθισματοαγωγό σύστημα της καρδιάς και στα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής . Οι β_2 -υποδοχείς διανέμονται σε όλες τις λείες μυϊκές ίνες , στους

σκελετικούς μύες και στο ήπαρ . Ο β_3 -υποδοχέας έχει ανακαλυφθεί σχετικά πρόσφατα , αλλά ήδη έχει απομονωθεί το γονίδιό του και έχει μελετηθεί η συγγενεία του για τους αδρενεργικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές . Εκφράζεται έντονα στο λευκό λίπος και στο φαιό λίπος των τρωκτικών , είναι όμως άγνωστη ακόμα η συμμετοχή του στην διαδικασία λιπόλυσης στον άνθρωπο .

Όλοι οι αδρενεργικοί υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες , μέσω των οποίων επικοινωνούν με το σύστημα των Δεύτερων Αγγελιαφόρων που είναι υπεύθυνο για την δράση τους . Έχει διαπιστωθεί ότι οι αδρενεργικοί υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στις G-πρωτεΐνες και στους Δεύτερους Αγγελιαφόρους με τους οποίους είναι συζευγμένες (Levitzki, 1988) .

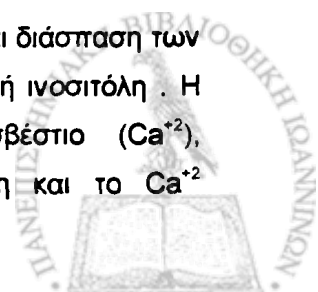
Έτσι , οι α_1 -υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι με Gq-πρωτεΐνες συνήθως (σπανιότερα με Gi- ή Go-πρωτεΐνες) και λειτουργικά συζευγμένες συνήθως με την Φωσφολιπάση C_β , την οποία ενεργοποιούν προκαλώντας απελευθέρωση Ca^{*2} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και αύξηση του ενδοκυττάριου ιονισμένου ασβεστίου . Όμως μπορούν να δράσουν και συζευγμένες με τις Φωσφολιπάσες D και A2 , ή και απευθείας στους διαύλους Ca^{*2} . Στην περίπτωση της Φωσφολιπάσης A2 θα παραχθούν μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος , ενώ στην περίπτωση της Φωσφολιπάσης D θα παραχθεί φωσφατιδικό οξύ , το οποίο μεταβολίζεται σε διακυλογλυκερόλη .

Οι α_2 - υποδοχείς είναι συνήθως συνδεδεμένοι με την Αδενυλική Κυκλάση μέσω των Gi-πρωτεϊνών , και η διέγερσή τους οδηγεί κατά κανόνα σε μείωση του cAMP . Επίσης , οι α_2 - υποδοχείς μπορούν να είναι συζευγμένοι απευθείας με διαύλους K^+ (μέσω Gi-πρωτεϊνών , όπως στους νευρώνες του μωεντερικού πλέγματος) ή με διαύλους Ca^{*2} (μέσω Go-πρωτεϊνών , όπως στις λείες μυϊκές ίνες) ή και με τις Φωσφολιπάσες C και A2 . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Οι β_1 - , β_2 - και β_3 -υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι πάντοτε με Gs-πρωτεΐνες , μέσω των οποίων διεγείρουν την Αδενυλική Κυκλάση . Έτσι , η διέγερση των υποδοχέων αυτών οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP . Επιπλέον , οι β_1 -υποδοχείς του μυοκαρδίου και των σκελετικών μυών λειτουργούν επηρεάζοντας και τους διαύλους Ca^{*2} στην σαρκοπλασματική μεμβράνη , επίσης μέσω των Gs-πρωτεϊνών τους . Για τους β_2 - και β_3 -υποδοχείς δεν έχει διαπιστωθεί να δρουν και με άλλη οδό εκτός του cAMP . (Goodman-Gilman και συν., 1996) . Οι β -αδρενεργικοί υποδοχείς και των τριών κατηγοριών φαίνεται να έχουν κοινή δομή , στην οποία τα κύρια χαρακτηριστικά είναι οι επτά ενδομεμβρανικές περιοχές (transmembrane spanning domains) και η ενδοκυττάρια περιοχή I_3 (I_3 -intracellular domain) όπου γίνεται η σύνδεση υποδοχέα και G-πρωτεΐνης (Levitzki, 1988) .

Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνονται οι επιδράσεις των κατεχολαμινών μέσω του cAMP είναι η ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (cAMP-Dependent Protein Kinase) . Η κινάση αυτή ενεργοποιείται κατά την σύνδεσή της με το cAMP και με την σειρά της φωσφορυλιώνει άλλα ένζυμα , τα οποία είτε ενεργοποιούνται (Κινάση της Φωσφορυλάσης , Λιπάση των Τριγλυκεριδίων) ή απενεργοποιούνται (Συνθετάση του Γλυκογόνου) (Hunter, 1987, Taylor, 1989). Επίσης , η Πρωτεϊνική Κινάση A μπορεί να φωσφορυλιώσει μη-ενζυμικές πρωτεΐνες , όπως π.χ. την τροπονίνη και την φωσφολαμβάνη (phospholamban) στο μυοκάρδιο .

Οι α_1 -υποδοχείς προκαλούν , μέσω της Φωσφολιπάσης C , την υδρόλυση και διάσπαση των φωσφοινοσιτιδίων της κυτταρικής μεμβράνης σε διακυλογλυκερόλη και τριφωσφορική ινοσιτόλη . Η τριφωσφορική ινοσιτόλη με την σειρά της αυξάνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο (Ca^{*2}), απελευθερώνοντας το από το ενδοπλασματικό δίκτυο . Η διακυλογλυκερόλη και το Ca^{*2}



ενεργοποιούν την Πρωτεϊνική Κινάση C (Protein Kinase C) , την Κινάση των Ελαφρών Αλύσεων Μυοσίνης (Myosin Light-chain Kinase) και την Εξαρτημένη από το Ασβέστιο και την Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση (Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase) και άλλα ένζυμα , μέσω των οποίων τελικά ασκούν τις επιδράσεις τους οι α_1 -υποδοχείς . Επίσης , το Ca^{2+} μπορεί να ενεργοποιήσει διαύλους K^+ , όπως συμβαίνει στις λείες μυϊκές ίνες του γαστρεντερικού σωλήνα .

ΟΙ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΕΣ ΩΣ ΝΕΥΡΟΜΕΤΑΒΙΒΑΣΤΕΣ .

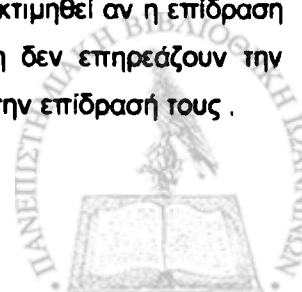
Ο χημικός νευρομεταβιβαστής στα τελικά κομβία πολλών νευρώνων του Κ.Ν.Σ. και των περισσότερων μεταγαγγλιακών συμπαθητικών νευρώνων είναι η νοραδρεναλίνη . Αυτή αποθηκεύεται μέσα σε κυστίδια των τελικών κομβίων , που στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζουν πυκνοχρωματικό πυρήνα (granulated vesicles) και χωρίζονται μορφολογικά σε δύο πληθυσμούς (με διαμέτρους 40 και 75 nm αντίστοιχα) . Η αποθήκευση των κατεχολαμινών και τριφωσφορικής αδενοσίνης μέσα στα κυστίδια είναι ενεργητική διαδικασία , που απαιτεί την δράση μίας Εξαρτημένης από το ATP Τρανσλοκάσης των Πρωτονίων (ATP-dependent Proton Translocase) .

Η αδρεναλίνη δεν αποτελεί νευρομεταβιβαστή στις μεταγαγγλιακές ίνες . Επίσης , και στο Κ.Ν.Σ. δεν είναι συχνή η ύπαρξη νευρώνων που να χρησιμοποιούν ως νευρομεταβιβαστή την αδρεναλίνη . Με την χρήση ευαίσθητων ανοσοϊστοχημικών τεχνικών ανίχνευσης της Ν-Μεθυλοτρανσφεράσης της Φαινυλαιθανολαμίνης έχει διαπιστωθεί ότι στο ΚΝΣ οι νευρώνες που περιέχουν αδρεναλίνη εντοπίζονται κυρίως στον Μυελικό Δικτυωτό Σχηματισμό , και συνάπτονται με πυρήνες της γέφυρας και του διεγκεφάλου , επεκτεινόμενοι μέχρι τον παρακοιλιακό πυρήνα του θαλάμου . Η φυσιολογική τους σημασία είναι ακόμα άγνωστη .

Η μετάδοση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του νευράξονα θα προκαλέσει την διάνοιξη των διαύλων ιόντων ασβεστίου στο τελικό κομβίο και την σύντηξη των κυστιδίων με την κυτταρική μεμβράνη . Μετά την έκκριση του νευρομεταβιβαστή στην συναπτική σχισμή , αυτός θα επιδράσει στους αδρενεργικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα , προκαλώντας πάλι ένα δυναμικό ενεργείας , και στην συνέχεια απομακρύνεται από την συναπτική χώρα , είτε με ενεργητική επαναπρόσληψη από το συναπτικό κομβίο και μεταβολισμό από την Μονοάμινο-Οξειδάση , ή με διάχυση και πρόσληψή του από άλλους ιστούς που θα τον μεταβολίσουν με την Κατεχολ-Ο-Μεθυλοτρανσφεράση . (Ganong, 1989) .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΩΝ .

- 1 . Οι κατεχολαμίνες αποτελούν νευρομεταβιβαστές του Κεντρικού και Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .
- 2 . Η απελευθέρωση κατεχολαμινών στην κυκλοφορία μιμείται την επίδραση της έκκρισής τους στην συναπτική σχισμή από τους αδρενεργικούς νευρώνες .
- 3 . Η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη διεγείρουν το Κ.Ν.Σ. , προκαλώντας κεφαλαλγία , τρόμο , αυξημένη εγρήγορση , φόβο και ευερεθιστότητα . Επίσης , σε ταχεία ενδοφλέβια έγχυση προκαλούν διέγερση του αναπνευστικού κέντρου και ταχύπνοια , αλλά είναι δύσκολο να εκτιμηθεί αν η επίδραση αυτή είναι έμμεση ή άμεση . Πάντως , η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη δεν επηρεάζουν την αιματική ροή προς τον εγκέφαλο διότι τα εγκεφαλικά αγγεία δεν συσπώνται με την επίδρασή τους .



4 . Η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη προκαλούν σημαντικές μεταβολικές επιδράσεις , που περιλαμβάνουν την γλυκογονόλυση στο ήπαρ και στον γραμμωτό μυϊκό ιστό , την υπεργλυκαιμία , την κινητοποίηση των λιπαρών οξέων , την αύξηση του γαλακτικού οξέος στην κυκλοφορία και την διέγερση του βασικού μεταβολικού ρυθμού . Η γλυκογονόλυση μπορεί να επιτευχθεί και μέσω β -υποδοχέων (που αυξάνουν το Κυκλικό AMP) και μέσω α -υποδοχέων (που αυξάνουν το ενδοκυττάριο ιονισμένο ασβέστιο) και οφείλεται στην ενεργοποίηση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου και στην απενεργοποίηση της Συνθετάσης του Γλυκογόνου . Επίσης , οι κατεχολαμίνες προκαλούν αυξημένη έκκριση ινσουλίνης και γλυκαγόνης μέσω β -υποδοχέων , και αναστολή της έκκρισης των ορμονών αυτών μέσω α -υποδοχέων . Η αύξηση του βασικού μεταβολικού ρυθμού και η θερμιδογόνος δράση είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού της δερματικής αγγειοσυστολής , της αυξημένης μυϊκής δραστηριότητας και της οξειδωσης του γαλακτικού οξέος και των λιπιδίων (τα οποία κινητοποιούνται από την Λιπάση των Τριγλυκεριδίων) . (Butcher, 1968 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

5 . Οι κατεχολαμίνες επηρεάζουν έντονα το καρδιαγγειακό σύστημα . Ασκούν την δράση τους στην καρδιά μέσω β_1 - και β_2 -υποδοχέων στον φλεβόκομβο και στον κολποκοιλιακό κόμβο , στο δεμάτιο του His και στις ίνες του Purkinje και στο μυοκάρδιο κόλπων και κοιλιών , ενώ στα αγγεία (αρτηρίες και φλέβες) μέσω α_1 -, α_2 - και β_2 -υποδοχέων . Ασκούν θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση στο μυοκάρδιο μέσω β_1 -υποδοχέων και επίσης αυξάνουν την διεγερσιμότητα του μυοκαρδίου , οδηγώντας σε έκτακτες συστολές ή άλλες αρρυθμίες . Η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη προκαλούν αγγειοσυστολή σε όλα τα αγγεία μέσω α_1 -υποδοχέων , όταν χορηγηθούν με ταχεία ενδοφλέβια έγχυση . Αντιθέτως , αν χορηγηθεί η αδρεναλίνη με αργή έγχυση προκαλεί (μέσω β_2 -υποδοχέων) αγγειοδιαστολή στα αγγεία των σκελετικών μύων και του ήπατος και πτώση των συνολικών αγγειακών αντιστάσεων . Η αργή έγχυση νοραδρεναλίνης σε πειραματόζωα θα προκαλέσει αύξηση της αρτηριακής πίεσης , διέγερση των τασεούποδοχέων και αντιδραστική βραδυκαρδία . Η αδρεναλίνη αντιθέτως προκαλεί υπέρταση και αύξηση της πίεσης παλμού χωρίς αντιδραστική βραδυκαρδία . Τέλος , στα στεφανιαία αγγεία οι κατεχολαμίνες προκαλούν αγγειοδιαστολή , που εξισορροπεί την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που προκαλούν στο μυοκάρδιο .

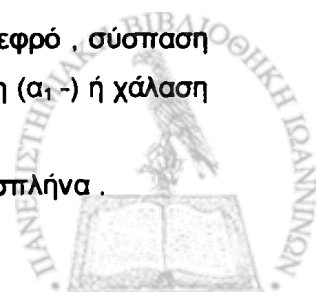
6. Η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη προκαλούν κινητοποίηση καλίου από το ήπαρ και παροδική υπερκαλιαιμία . Στην συνέχεια , μέσω β_2 -υποδοχέων , μεταφέρουν το κάλιο μέσα στις γραμμωτές μυϊκές ίνες και προκαλούν ήπια υποκαλιαιμία .

7. Στον γαστρεντερικό σωλήνα , οι κατεχολαμίνες προκαλούν χάλαση των λείων μυϊκών ινών που είναι υπεύθυνες για τον τόνο και την κινητικότητά του ενώ ταυτοχρόνως προκαλούν σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των σφιγκτήρων του . Η δράση τους αυτή μεσολαβείται και από τους α -υποδοχείς και από τους β -υποδοχείς . Στους πνεύμονες , μέσω β_2 -υποδοχέων , προκαλούν χάλαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων , αποσυμφόρηση του βλεννογόνου και μείωση των βρογχικών εκκρίσεων .

8. Οι κατεχολαμίνες προκαλούν σύσπαση του ακτινωτού μυός της ίριδας (μυδρίαση) και των ανελκτήρων μυών των τριχών (ανόρθωση τριχών) .

9. Στο ουροποιογεννητικό σύστημα προκαλούν αυξημένη έκκριση ρενίνης από τον νεφρό , σύσπαση του τριγώνου και του σφιγκτήρα της κύστης , αυξημένο τόνο του ουρητήρα , σύσπαση (α_1 -) ή χάλαση (β_2 -) του μομητρίου και εκσπερμάτιση (α_1 -υποδοχείς) .

10. Η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη προκαλούν σύσπαση της ινώδους κάψας του σπλήνα .



11. Οι κατεχολαμίνες προκαλούν καταστολή πολλών λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα πρώτα στοιχεία που επιβεβαιώνουν αυτή την δράση των κατεχολαμινών είχαν γίνει αντιληπτά ήδη στα μέσα της δεκαετίας του 1970 (Boume και συν., 1974), ενώ σήμερα γνωρίζουμε ότι η επίδραση αυτή των κατεχολαμινών αφορά και το χυμικό (humoral) και το κυτταρικό σκέλος της ανοσίας (Kammer, 1988).

12. Οι κατεχολαμίνες μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στον ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μέσω μεταβολών του cAMP (Dumont και συν., 1989).

8-8-2. Η αδρεναλίνη και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα.

Οι πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση των κατεχολαμινών σε συγκεκριμένους αδρενεργικούς υποδοχείς στα μακροφάγα εμφανίζονται στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Οι μελέτες αυτές κυρίως επικεντρώθηκαν στην μελέτη της Αδενυλικής Κυκλάσης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και της μέτρησης των επιπέδων του cAMP μετά από την χορήγηση αδρενεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών, αλλά και προσταγλανδινών και ξανθινών (Koorman και συν., 1973, Remold-O'Donnell, 1974, Ikegami, 1977, Remold-O'Donnell και Alpert, 1979, Lavis και συν., 1980, Nowell και συν., 1977). Όλες οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα διαθέτουν β₂-αδρενεργικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, οι οποίοι προκαλούσαν την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του ενδοκυττάρου cAMP. Επίσης, έδειξαν ότι υπάρχει ένας μηχανισμός απευαισθητοποίησης (desensitization) των αδρενεργικών υποδοχέων, που τους καθιστά λιγότερο ευαίσθητους στο να επιδρούν στην Αδενυλική Κυκλάση μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στις κατεχολαμίνες. Σε μία μόνο εργασία (Lavis V.R. και συν., 1980) φάνηκαν αποτελέσματα σχετικά διαφορετικά, αφού η ισοπροτερενόλη και η αδρεναλίνη είχαν μάλλον ασθενή επίδραση στην Αδενυλική Κυκλάση των μονοκυττάρων του αίματος και των (άωρων) κυττάρων P388D1. Γενικά φάνηκε ότι οι υποδοχείς των μακροφάγων έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την νοραδρεναλίνη παρά για την αδρεναλίνη (Ikegami, 1977) και ότι ο τύπος των υποδοχέων και ο αριθμός τους ανά κύτταρο δεν αλλάζει μετά την ενεργοποίηση του μακροφάγου (Nowell και συν., 1977). Τέλος, σε μία από αυτές τις εργασίες έχουμε και την πρώτη απόδειξη της λειτουργικής σημασίας των β-αδρενεργικών υποδοχέων, αφού αποδείχτηκε ότι η αδρεναλίνη παρεμπόδιζε την καταστολή της χημειοταξίας των μακροφάγων από την επίδραση του MIF (Migration Inhibition Factor) που εκκρίνουν τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και διατηρούσε την χημειοταξία των μακροφάγων στα φυσιολογικά επίπεδα (Koorman και συν., 1973).

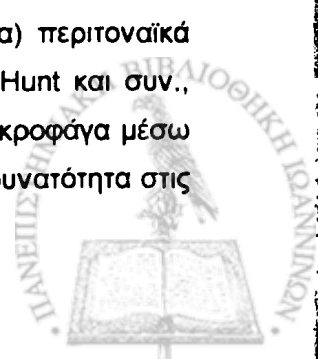
Ένα από τα ζητήματα με τις περισσότερες αντιφάσεις υπήρξε η παρουσία και δεύτερου είδους των αδρενεργικών υποδοχέων στην επιφάνεια των μακροφάγων. Σε μία εργασία των αρχών της δεκαετίας του 1980 αναφέρεται ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα του ινδικού χοιριδίου διαθέτουν ειδικούς β-αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι διεγείρουν την Αδενυλική Κυκλάση και αυξάνουν τα επίπεδα cAMP των μακροφάγων, αλλά ταυτοχρόνως διαθέτουν και α₂- υποδοχείς που καταστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση και την παραγωγή του cAMP (Verghese και Snyderman, 1983). Η ύπαρξη δύο διαφορετικών αδρενεργικών υποδοχέων στα ίδια κύτταρα, με αντίθετες επιδράσεις στην Αδενυλική Κυκλάση, ίσως υποδηλώνει μηχανισμό αυτορρύθμισης. Οι β-υποδοχείς φαίνεται να επικρατούν

λειτουργικά των α_2 - υποδοχέων στα περιτοναϊκά μακροφάγα του ινδικού χοιριδίου , όμως η αδρεναλίνη σε χαμηλές δόσεις μπορεί να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τους α -υποδοχείς παρά προς τους β -υποδοχείς . Τέλος , στην εργασία αυτή οι ερευνητές παρουσίασαν έμμεσα στοιχεία για την λειτουργική σύνδεση της Αδενυλικής Κυκλάσης και των αδρενεργικών υποδοχέων μέσω εξαρτημένων από το GTP πρωτεϊνών . Σε μια πρόσφατη εργασία αποδείχτηκε ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη σε μικρές ποσότητες (Sprengler και συν., 1994) . Αυτά τα δεδομένα ίσως εξηγούν γιατί τα μακροφάγα διαθέτουν ταυτόχρονα και α_2 -αδρενεργικούς υποδοχείς και β_1 -αδρενεργικούς υποδοχείς , αφού έτσι είναι δυνατή η αυτοκρινική ρύθμιση ορισμένων λειτουργιών του ενεργοποιημένου μακροφάγου , όπως η ρύθμιση της παραγωγής TNF α .

Στα περιτοναϊκά μακροφάγα επίμυων (ενεργοποιημένα *in vivo* με BCG) διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν β -αδρενεργικοί υποδοχείς , οι οποίοι συνδέουν την αδρεναλίνη και την νοραδρεναλίνη , με K_d αντίστοιχα 1×10^{-5} M και $2,5 \times 10^{-5}$ M (Abrass και συν., 1985) . Κάθε ένα ενεργοποιημένο μακροφάγο φαίνεται να διαθέτει περίπου 1300 υποδοχείς στην επιφάνειά του , οι οποίοι προκαλούν έντονη διέγερση της δραστηριότητας της Αδενυλικής Κυκλάσης . Οι υποδοχείς αυτοί έχουν λειτουργική σημασία στον έλεγχο της φαγοκυττάρωσης , αφού η διέγερσή τους με μεταπρωτερενόλη προκαλεί την δόσοεξαρτώμενη μείωση της ικανότητας των μακροφάγων να φαγοκυτταρώνουν συσσωματώματα ανοσοσφαιρινών .

Για τα ανθρώπινα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα πιθανώς να υπάρχουν διαφορές από τους επίμυες στον τύπο αδρενεργικών υποδοχέων που εκφράζουν . Συγκεκριμένα , διαπιστώθηκε ότι η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη προκαλούν αυξημένη παραγωγή του παράγοντα C2 του συμπληρώματος από μονοκύτταρα υγιών ανθρώπων (Larrin και Whaley , 1982) . Αυτή η επαγωγή της σύνθεσης του παράγοντα C2 φάνηκε να είναι αποτέλεσμα της διέγερσης α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων . Αυτό προέκυπτε από το ότι την δράση των κατεχολαμινών μιμείτο ο α -αγωνιστής φαινυλεφρίνη αλλά όχι ο β -αγωνιστής ισοπρεναλίνη , καθώς επίσης από το ότι η δράση των κατεχολαμινών αναστελλόταν από την πραζοσίνη (α_1 -αναστολέας) , αλλά όχι από την προπρανολόλη (β -αναστολέας) ή την νοχιμβίνη (α_2 -αναστολέας) . Οι ερευνητές όμως δεν απέκλεισαν την πιθανότητα ύπαρξης και β -υποδοχέων στα μονοκύτταρα , που όμως δεν είχαν σχέση με την ρύθμιση της παραγωγής του συμπληρώματος . Οι κατεχολαμίνες προκαλούσαν επίσης επαγωγή της σύνθεσης των παραγόντων C3, C4, C5 και βιΗ του συμπληρώματος , της προπερδίνης , του παράγοντα Β και του C3b-αναστολέα , όταν χορηγούνταν *in vitro* στα ανθρώπινα μονοκύτταρα . Αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα νευροενδοκρινικής ρύθμισης της παραγωγής πρωτεϊνών του συμπληρώματος από τα μακροφάγα , ιδίως όταν αυτά βρίσκονται σε ιστούς με πλούσια συμπαθητική νεύρωση (π.χ. ήπαρ, σπλήνας κ.α.) .

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς των μακροφάγων είναι πιθανό να ασκούν τις δράσεις τους στα μακροφάγα μέσω της Εξαρτημένης από το cAMP Πρωτεϊνικής Κινάσης Α (cAMP-Dependent Protein Kinase) , της οποίας η δραστηριότητα είναι αυξημένη στα φλεγμονώδη (διεγερμένα) περιτοναϊκά μακροφάγα επίμυων , σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (μη-διεγερμένα) μακροφάγα (Hunt και συν., 1984 , Kammer , 1988) . Μια τέτοια λειτουργική επίδραση των κατεχολαμινών στα μακροφάγα μέσω της Πρωτεϊνικής Κινάσης Α θα είχε μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον , αφού θα έδινε την δυνατότητα στις



κατεχολαμίνες να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων μέσω της διέγερσης του Παράγοντα Μεταγραφής NFκB, όπως συμβαίνει στα μακροφάγα της σειράς J774 (Muroi και Suzuki).

Ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι μετά την ωρίμανση των μονοκυττάρων της σειράς U-937 από άωρα σε ώριμα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, ο β-αγωνιστής ισοπροτερενόλη παρουσιάζει πλέον μειωμένη ικανότητα πρόκλησης παραγωγής cAMP χωρίς να είναι εμφανής κάποια μείωση των αδρενεργικών υποδοχέων (Gesparch και συν., 1985). Είναι πιθανό ότι οι κατεχολαμίνες επηρεάζουν την διαδικασία ωρίμανσης των φυσιολογικών μονοκυττάρων σε μακροφάγα μέσω του cAMP.

Οι κατεχολαμίνες αποτελούν ορμόνες συνδεδεμένες με την παθοφυσιολογία της αντίδρασης του οργανισμού στην σωματική και ψυχολογική καταπόνηση (stress). Για τον λόγο αυτό και μελετήθηκαν οι κατεχολαμίνες ως προς την ικανότητά τους να επηρεάζουν την αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δραστηριότητα των μακροφάγων, αφού είναι γνωστό ότι οι συνθήκες stress προκαλούν ανοσοκαταστολή. Διαπιστώθηκε ότι η νοραδρεναλίνη, σε δόσεις μεγαλύτερες από 10^{-7} M προκαλούσε πλήρη καταστολή της ικανότητας των φλεγμονωδών μακροφάγων μυών να διεγείρονται από την Ιντερφερόνη-γ και να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα (Koff και Dunegan, 1985). Παραδόξως, σε δόσεις μεταξύ 10^{-8} M και 10^{-10} M, η νοραδρεναλίνη προκαλούσε μικρή αλλά πολύ σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των μακροφάγων. Επίσης, σε πολύ υψηλές δόσεις Ιντερφερόνης-γ, η νοραδρεναλίνη αδυνατούσε να καταστείλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Η δράση αυτή της νοραδρεναλίνης ασκείται μέσω αύξησης του Κυκλικού AMP. Η ταυτόχρονη προσθήκη στις καλλιέργειες των μακροφάγων νοραδρεναλίνης και Αγγειοδραστικού Εντερικού Πεπτιδίου VIP (Vasoactive Intestinal Peptide, ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων που δρα συνεργικά με την νοραδρεναλίνη στην αύξηση του cAMP στο Κ.Ν.Σ.) προκαλούσε ακόμα μεγαλύτερη καταστολή της κυτταροτοξικής ικανότητας των μακροφάγων. Η ίδια ομάδα ερευνητών διαπίστωσε, σε κατοπινή μελέτη, ότι τόσο η νοραδρεναλίνη όσο και η αδρεναλίνη προκαλούσαν σημαντική καταστολή της ικανότητας φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων μυών να ενεργοποιούνται από την Ιντερφερόνη-γ και να καταστρέφουν κύτταρα προσβεβλημένα από τους ιούς του απλού έρπητα HSV-1 και HSV-2 (Koff και Dunegan, 1986). Η δραστηριότητα αυτή των κατεχολαμινών συνδυαζόταν με σημαντική αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων cAMP στα μακροφάγα.

Η αδρεναλίνη επηρεάζει την ενεργοποίηση των ανθρώπινων μακροφάγων όπως ακριβώς και τα μακροφάγα των επίμυων. Σε μία μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα τα οποία διαφοροποιήθηκαν *in vitro* από μονοκύτταρα υγιών ανθρώπων, διαπιστώθηκε ότι η αδρεναλίνη εμποδίζει σημαντικά την ενεργοποίησή τους από τον Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (TNFα) για καταστροφή μυκοβακτηριδίων *M. Avium* (Bernudez και συν., 1990). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η αδρεναλίνη προκαλούσε καταστολή της έκφρασης υποδοχέων TNF στην επιφάνεια μακροφάγων που είχαν ενεργοποιηθεί με Ιντερφερόνη-γ, όπως επίσης προκαλούσε καταστολή της παραγωγής TNF από μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη (LPS). Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η αδρεναλίνη προκαλούσε καταστολή της ενεργοποίησης των ανθρώπινων μακροφάγων, ανεξάρτητα από την φύση του ενεργοποιητή (TNF, Ιντερφερόνη-γ ή LPS).



Κεφάλαιο 8-3 : Ντοπαμίνη .

Κεφάλαιο 8-3-1 : Γενικά στοιχεία για την Ντοπαμίνη .

ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ :

Η ντοπαμίνη (3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθυλαμίνη) είναι η πρόδρομος κατεχολαμίνη της νοραδρεναλίνης και παράγεται από την ντόπα (διυδροξυ-φαινυλαιθανολαμίνη) με την δράση του κυτταροπλασματικού ενζύμου Αποκαρβοξυλάση των L-αρωματικών Αμινοξέων , το οποίο λέγεται και Ντόπα-Αποκαρβοξυλάση , με την συνέργεια της φωσφορικής πυριδοξάλης (Greenspan, 1991) . Στην συνέχεια αποθηκεύεται σε κυτταροπλασματικά κυστίδια , τα οποία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζουν πυκνοχρωματικό πυρήνα (granulated vesicles) . Η αποθήκευση της ντοπαμίνης στα κυστίδια γίνεται με την βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων (transporter proteins) . Για την έκκριση της ντοπαμίνης είναι απαραίτητη η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} .

Η ντόπα παράγεται από την τυροσίνη με την επίδραση της Υδροξυλάσης της Τυροσίνης και την συνεργεία της τετραϋδροβιοπτερίνης . Όμως η ντοπαμίνη που παράγεται στο επόμενο βήμα αναστέλλει την δραστηριότητα της Υδροξυλάσης της Τυροσίνης , με μηχανισμό αρνητικής παλινδρομής ρύθμισης (negative feedback regulation) .

Η ντοπαμίνη μπορεί είτε να μεταβολιστεί σε νοραδρεναλίνη από την β-Υδροξυλάση της Ντοπαμίνης ή να αποδομηθεί από την Κατεχολαμινο-Ο-Μεθυλοτρανσφεράση (COMT) ή από την Μονοαμινο-Οξειδάση (MAO) . Τα δύο σημαντικότερα προϊόντα αποδόμησης της ντοπαμίνης είναι το 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ (DOPAC) και το 3-μεθόξυ-4-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ (HVA) . Σημαντικές ποσότητες ντοπαμίνης απεκκρίνονται στα ούρα χωρίς να μεταβολιστούν ή να αποδομηθούν .

Η ντοπαμίνη απελευθερώνεται στο πλάσμα από τον μυελό των επινεφριδίων , από τα συμπαθητικά γάγγλια και από τα άλλα στοιχεία του αυτόνομου νευρικού συστήματος . Το 95% της ντοπαμίνης στο πλάσμα είναι συζευγμένη με θειικές ρίζες (sulfate conjugates) . Η συζευγμένη ντοπαμίνη είναι βιολογικά αδρανής . Η ελεύθερη ντοπαμίνη του πλάσματος έχει επίπεδα περίπου 35 pg/ml (0,23 nM/Lt) . Ο χρόνος ημιζωής της ελεύθερης ντοπαμίνης στο πλάσμα είναι πολύ βραχύς (1 ως 3 λεπτά της ώρας) . (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .

ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ .

Η ντοπαμίνη , αν και μπορεί να δράσει και σε αδρενεργικούς υποδοχείς , διαθέτει ειδικούς ντοπαμινεργικούς υποδοχείς που σχεδόν πάντα είναι συζευγμένοι με το σύστημα της Αδενυλικής Κυκλάσης - Κυκλικού AMP . Διακρίνουμε πέντε τύπους υποδοχέων (D1, D2 , D3 , D4 και D5 υποδοχείς) που όλοι είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες (Goodman-Gilman και συν., 1996) . Οι D3, D4 και D5 υποδοχείς έχουν περιγραφεί σχετικά πρόσφατα και δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς . Με βάση την δομή του καρβοξυτελικού άκρου των υποδοχέων , το είδος της G-πρωτεΐνης που συνδέεται μαζί τους, την επίδρασή τους στο cAMP και την ιστική τους εντόπιση , οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς έχουν χωριστεί σε δύο οικογένειες : την D1-οικογένεια υποδοχέων (D1-Receptor Family) που περιλαμβάνει τους D1 και D5 υποδοχείς και την D2-οικογένεια υποδοχέων (D2-Receptor Family) που περιλαμβάνει τους υποδοχείς D2, D3 και D4 . Οι D1-υποδοχείς συνδέονται με μία Gs-πρωτεΐνη και η ενεργοποίησή τους

από την ντοπαμίνη προκαλεί διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και αυξημένη παραγωγή Κυκλικού AMP . Σε σχετικά λίγες περιπτώσεις δρουν και μέσω ενεργοποίησης της Φωσφολιπάσης C προκαλώντας την αύξηση του Ca^{*2} και την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Οι D2-υποδοχείς συνδέονται με μία Gi-πρωτεΐνη και η ενεργοποίησή τους από την ντοπαμίνη προκαλεί αναστολή της Αδενυλικής Κυκλάσης και μειωμένη παραγωγή Κυκλικού AMP . Μπορούν όμως να δράσουν και μέσω των διαύλων (ion channels) K^{+} και Ca^{*2} . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ .

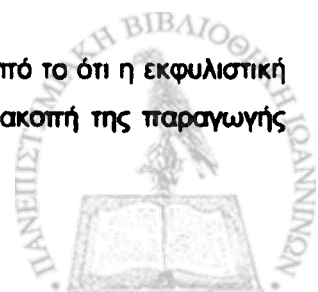
Η ντοπαμίνη είναι ένας από τους κατεχολαμινικούς νευρομεταβιβαστές στο κεντρικό νευρικό σύστημα . Κυρίως παράγεται από νευρώνες της Μέλαινας Ουσίας του εγκεφάλου , των οποίων οι νευράξονες ακολουθούν το Μελαινορραβδωτό Δεμάτιο προς το Ραβδωτό Σώμα των βασικών γαγγλίων , δηλαδή τον Κερκοφόρο Πυρήνα και την Καλύπτρα (που είναι υπεύθυνα για τις αδρές εκούσιες κινήσεις του σώματος) . Ο ρόλος της ντοπαμίνης που εκκρίνεται στο Ραβδωτό σώμα είναι κατασταλτικός , ανταγωνίζεται δηλαδή την διεγερτική επίδραση των χολινεργικών νευρώνων . Η ντοπαμίνη αποτελεί τον σημαντικότερο νευρομεταβιβαστή του εξωπυραμιδικού συστήματος (τουλάχιστον για τον άνθρωπο και τα ανώτερα θηλαστικά) . Όμως ντοπαμινεργικοί υποδοχείς εντοπίζονται και σε άλλες θέσεις του εγκεφαλικού φλοιού .

Η ντοπαμίνη , εκτός από την ιδιότητά της να είναι ένας κατασταλτικός νευρομεταβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα , έχει και σημαντικές φαρμακολογικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991 , Goodman-Gilman και συν.,1996) .

1. Ασκήι θετική ινότροπη και (ήπια) χρονότροπη δράση στο μυοκάρδιο , μέσω των $\beta 1$ -αδρενεργικών υποδοχέων . Μέσω D1-ντοπαμινεργικών υποδοχέων και διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης προκαλεί αγγειοδιαστολή των στεφανιαίων αγγείων . (Goodman-Gilman και συν.,1996) .
2. Προκαλεί την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης από τις νευρικές απολήξεις του συμπαθητικού , ενισχύοντας έτσι περισσότερο την δράση της στο μυοκάρδιο .
3. Αυξάνει την συστολική αρτηριακή πίεση χωρίς να επηρεάζει ιδιαίτερα την διαστολική πίεση . Επίσης , διατηρεί σταθερές τις συνολικές αγγειακές αντιστάσεις , μειώνοντάς τις στους νεφρούς και στο έντερο (αγγειοδιαστολή νεφρικών και μεσεντερικών αγγείων) και αυξάνοντάς τις ελαφρώς στο υπόλοιπο σώμα . Επίσης , σε υψηλές δόσεις ενεργοποιεί και τους $\alpha 1$ -αδρενεργικούς υποδοχείς των αγγείων και προκαλεί αγγειοσύσπαση (Goodman-Gilman και συν.,1996) .
4. Σε χαμηλές δόσεις προκαλεί αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης , αύξηση της αιματικής ροής στους νεφρούς και αυξημένη απέκκριση νατρίου μέσω ειδικών D1-ντοπαμινεργικών υποδοχέων . Σε πολύ υψηλές δόσεις όμως , προκαλεί αγγειοσύσπαση της νεφρικής αρτηρίας μέσω διέγερσης $\alpha 1$ -αδρενεργικών υποδοχέων .

Η φυσιολογική δράση και σημασία της ντοπαμίνης στην κυκλοφορία δεν είναι ακόμα πλήρως εξακριβωμένη αλλά δεν πρέπει να σχετίζεται με το κεντρικό νευρικό σύστημα , αφού η ντοπαμίνη δεν περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό .

Η σημασία της ντοπαμίνης ως νευρομεταβιβαστής του ΚΝΣ φαίνεται από το ότι η εκφυλιστική καταστροφή της Μέλαινας Ουσίας του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή της παραγωγής



ντοπαμίνης και την εμφάνιση της Νόσου του Parkinson και από το ότι οι D2-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας .

Κεφάλαιο 8-3-2 . Η Ντοπαμίνη και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Υπάρχουν πολύ λίγες εργασίες που να αναφέρονται στην επίδραση της ντοπαμίνης στην λειτουργία των μακροφάγων . Σε καμία από αυτές δεν μελετήθηκε η επίδραση της ντοπαμίνης σε μακροφάγα σε κατάσταση ηρεμίας , αλλά πάντα μετά από ενεργοποίηση με Ιντερφερόνη-γ ή με ενδοτοξίνη .

Όταν φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα μυών ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη-γ , διαπιστώθηκε ότι η ντοπαμίνη δεν είχε καμία επίδραση στην ικανότητά τους να σκοτώνουν κύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό του απλού έρπητα (Koff και Dunegan , 1986) . Αυτό σε αντίθεση με τις δύο άλλες κατεχολαμίνες , νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη , που προκαλούσαν σημαντική καταστολή της κυτταροτοξικότητας των μακροφάγων . Το γεγονός αυτό είναι μη-αναμενόμενο , αφού τόσο η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη όσο και η ντοπαμίνη δρουν συνήθως μέσω αύξησης του κυκλικού AMP .

Σε μία άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα μυελικής προέλευσης , ενεργοποιημένα με Ιντερφερόνη-γ , η ντοπαμίνη ήταν ικανή να προκαλέσει αναστολή της έκφρασης του αντιγόνου Ia μόνο σε πολύ υψηλές δόσεις , ενώ αντίθετα η σεροτονίνη ήταν ισχυρός αναστολέας της έκφρασης του Ia-αντιγόνου (Stemberg και συν., 1986) .

Ένα χρόνο αργότερα διαπιστώθηκε ότι η ντοπαμίνη ήταν ισχυρός αναστολέας της φαγοκυττάρωσης στα ενεργοποιημένα από Ιντερφερόνη-γ μυελικά μακροφάγα . Επίσης , διαπιστώθηκε ότι και η σεροτονίνη και η ισταμίνη επηρέαζαν την φαγοκυττάρωση στα μακροφάγα αυτά (Stemberg και συν., 1987) .

Από τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσε να δημιουργηθεί η υπόνοια ότι τα μακροφάγα δεν διαθέτουν ντοπαμινεργικούς υποδοχείς , αλλά δρουν με μη-ειδικό τρόπο σε υποδοχείς άλλων αμινών . Μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν αναφορές για την ύπαρξη ντοπαμινεργικών υποδοχέων στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (Gordon και συν., 1988) , αν και υπήρχαν πολλές εργασίες οι οποίες τεκμηρίωναν υποδοχείς για άλλες αμίνες . Ακόμα και μέχρι σήμερα (1997) δεν έχει αποδειχθεί άμεσα η ύπαρξη τους . Ωστόσο , μια μελέτη του 1996 έδωσε αρκετά έμμεσα στοιχεία ώστε να είναι δυνατόν να πούμε ότι τα ενεργοποιημένα από ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα μυών εκφράζουν D1- και D2-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς (Hasko και συν., 1996) . Συγκεκριμένα , οι D2-υποδοχείς των ενεργοποιημένων μακροφάγων καταστέλλουν την παραγωγή TNF-α και νιτρικού οξειδίου από τα κύτταρα αυτά , ενώ οι D1-υποδοχείς επηρεάζουν μόνο την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (αλλά όχι την παραγωγή TNF-α) . Επειδή όμως τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από την χρήση ειδικών D1- και D2- ντοπαμινεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών και δεν συνοδεύτηκαν από ιστοχημική αναζήτηση ντοπαμινεργικών υποδοχέων , οι ίδιοι οι συγγραφείς απέφυγαν να συμπεράνουν ότι η δράση της ντοπαμίνης στα μακροφάγα ασκείται απαραίτητως μέσω ειδικών υποδοχέων ντοπαμίνης .



Κεφάλαιο 8-4 . Σεροτονίνη .

Κεφάλαιο 8-4-1. Γενικά στοιχεία για την Σεροτονίνη .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ .

Η Σεροτονίνη (5-υδρόξυ-τρυπταμίνη) ονομάζεται αναλυτικά 3-(β-αμινοαιθυλο)-5-υδρόξυ-ινδόλη και είναι μια ουσία που αφθονεί σε ποικίλους ιστούς πολλών διαφορετικών ειδών του Ζωικού και του Φυτικού βασιλείου . Στον άνθρωπο , το 90% της ενδογενούς σεροτονίνης ανευρίσκεται στα Εντεροχρωμιόφιλα κύτταρα (Enterochromaffin cells) του γαστρεντερικού σωλήνα και το υπόλοιπο 10% στα αιμοπετάλια και στο κεντρικό νευρικό σύστημα . Σε άλλα ζωικά είδη υπάρχει σεροτονίνη και στα κοκκία των μαστοκυττάρων . Η Σεροτονίνη των Χρωμιόφιλων κυττάρων και των νευρώνων παράγεται *in situ* από την τρυπτοφάνη ενώ τα αιμοπετάλια την προσλαμβάνουν από τον περιβάλλοντα χώρο . Η πρόσληψη της Σεροτονίνης από τα αιμοπετάλια γίνεται κατά την διόδό τους από τα αγγεία του εντέρου , όπου η Σεροτονίνη αφθονεί λόγω της έκκρισής από τα Χρωμιόφιλα κύτταρα . (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .

Η σύνθεση της Σεροτονίνης από την τρυπτοφάνη είναι διαδικασία δύο βημάτων . Η τρυπτοφάνη αρχικά υδροξυλιώνεται σε 5-υδρόξυ-τρυπτοφάνη από την 5-Υδροξυλάση της Τρυπτοφάνης και στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε 5-υδρόξυ-τρυπταμίνη από την Αποκαρβοξυλάση των L-Αρωματικών Αμινοξέων και αποθηκεύεται σε κοκκία , με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που οδηγεί στην αποθήκευση των κατεχολαμινών σε κοκκία . (Goodman-Gilman και συν., 1996)

Η αποδόμηση της εκκρινόμενης Σεροτονίνης γίνεται από την Μονοάμινο-Οξειδάση , αρχικά προς 5-υδρόξυ-ινδολο-ακεταλδεΐδη και στην συνέχεια προς 5-υδρόξυ-ινδολοξικό οξύ , που είναι ο κύριος μεταβολίτης και αποβάλλεται στα ούρα σαν γλυκουρονίδιο . Καθημερινά στο ανθρώπινο σώμα παράγονται και αποδομούνται περίπου 10 mg σεροτονίνης . Επίσης υπάρχει και ένας μηχανισμός ενεργητικής επαναπρόσληψης της Σεροτονίνης από τους νευρώνες και τα αιμοπετάλια , με την βοήθεια μιας πρωτεΐνης-μεταφοράς (5-HT transporter protein) .

ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ .

Έχουν περιγραφεί τρεις κύριοι τύποι σεροτονινεργικών υποδοχέων , που συμβολίζονται ως 5-HT₁, 5-HT₂ και 5-HT₃ , αλλά με μεθόδους Μοριακής Βιολογίας έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ακόμα τύποι υποδοχέων που συμβολίζονται ως 5-HT₄ , 5-HT₅ , 5-HT₆ και 5-HT₇ . Επιπλέον , οι υποδοχείς 5-HT₁ έχουν χωριστεί σε έξη υποκατηγορίες , που συμβολίζονται με τα γράμματα από Α ως F (5-HT_{1A} ως 5-HT_{1F}) , ενώ οι 5-HT₂ υποδοχείς χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες , που συμβολίζονται με τα γράμματα από Α ως C (5-HT_{2A} ως 5-HT_{2C}) . Αυτή η πολύπλοκη ονοματολογία προκύπτει από πειράματα σύνδεσης φαρμακολογικών υποκατασταστών στους υποδοχείς σεροτονίνης σε διάφορους ιστούς . Ωστόσο είναι ελάχιστοι οι αγωνιστές ή οι ανταγωνιστές των υποδοχέων αυτών που συνδέονται ειδικά σε ένα μόνο τύπο υποδοχέα όπως π.χ.: η κετανσερίνη , που είναι εκλεκτικός 5-HT₂ ανταγωνιστής . Όλοι οι 5-HT₁ και 5-HT₂ υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες , ενώ οι 5-HT₃ υποδοχείς συνδέονται με διαύλους ιόντων Na⁺/K⁺ (Na⁺/K⁺ ion channels) και μοιάζουν δομικά με τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης . Οι πρωτοταγείς δομές των 5-HT₁ και 5-HT₂ υποδοχέων

είναι γνωστές από την ανάλυση των γονιδιωμάτων τους , και έχουν παρόμοια δομή με άλλους μεμβρανικούς υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες . Οι 5-HT1 υποδοχείς συνδέονται λειτουργικά με την Αδενυλική Κυκλάση ή την ρύθμιση της λειτουργίας διαύλων K^+ ή Ca^{+2} ενώ όλοι οι 5-HT2 υποδοχείς συνδέονται με την Φωσφολιπάση C (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Η κατανόηση των φυσιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων της σεροτονίνης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την γνώση των μηχανισμών Δεύτερων Μηνυτόρων που ενεργοποιεί κάθε τύπος σεροτονινεργικού υποδοχέα . Έτσι , η καρδιακή ινότροπος δράση και η άμεση αγγειοδιασταλτική δράση διαμεσολαβούνται από 5-HT1A υποδοχείς , που καταστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση και την παραγωγή cAMP και επηρεάζουν τους διαύλους K^+ και Ca^{+2} . Η έμμεση αγγειοδιασταλτική δράση μεσολαβείται από τους 5-HT2C υποδοχείς στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων , που ενεργοποιούν την Φωσφολιπάση C και οδηγούν στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Endothelial-Derived Relaxing Factor) . Και οι 5-HT2B υποδοχείς των λείων μυϊκών ινών ενεργοποιούν την Φωσφολιπάση C , προκαλώντας αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου . Οι 5-HT3 υποδοχείς που εντοπίζονται στα αυτόνομα νεύρα ή στο ΚΝΣ (στα κέντρα του πόνου και του εμέτου) δρουν μέσω του διαύλου ιόντων Na^+/K^+ . Οι 5-HT4 υποδοχείς του Μυεντερικού Πλέγματος δρουν ενεργοποιώντας την Αδενυλική Κυκλάση και αυξάνοντας το cAMP . Τέλος , οι 5-HT1B και οι 5-HT1D υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την αναστολή της απελευθέρωσης νοραδρεναλίνης στις απολήξεις των συμπαθητικών νεύρων , δρουν μέσω αναστολής της Αδενυλικής Κυκλάσης και πιθανώς να ενεργοποιούν ταυτοχρόνως και τον δίαυλο ιόντων καλίου .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΕΡΟΤΟΝΙΝΗΣ .

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η σεροτονίνη έχει δύο σημαντικούς ρόλους , αφού αφενός είναι νευρομεταβιβαστής στους σεροτονινεργικούς (τρυπταμινεργικούς) νευρώνες και αφετέρου αποτελεί πρόδρομο ουσία της επιφυσιικής ορμόνης Μελαντονίνης .

Πιο συγκεκριμένα , η σεροτονίνη ανιχνεύεται στους νευρώνες εννέα περίπου πυρήνων της Γέφυρας και του ανώτερου Προμήκου Μυελού . Από αυτούς τους πυρήνες , οι πιο κεφαλικοί συνάπτονται με τον Πρόσθιο Εγκέφαλο μέσω των σεροτονινεργικών νευρώνων , ενώ οι πιο κοιλιακοί προσεκβάλουν τους νευρώνες τους μέσα από τον Προμήκη και τον Νωτιαίο Μυελό . Ο Μέσος Πυρήνας της Ραφής είναι υπεύθυνος για την σεροτονινεργική νεύρωση του Επιχείλιου συστήματος (Limbic system) , ενώ ο Ραχιαίος Πυρήνας της Ραφής για την σεροτονινεργική νεύρωση του Φλοιού και του Ραβδωτού Σώματος . Σε πολλές περιοχές που δέχονται σεροτονινεργική νεύρωση , ο νευρομεταβιβαστής αυτός έχει κατασταλτική επίδραση .

Ανάμεσα στις πολλές λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στους σεροτονινεργικούς νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος είναι η αίσθηση του πόνου , ο ύπνος , η συναισθηματική διάθεση και η συμπεριφορά , η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της θερμοκρασίας , κ.α. Επίσης , είναι γνωστό ότι τα υποθαλαμικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκκριση υποφυσιοτρόπων ορμονών (CRH, GnRH, TRH κλπ) ελέγχονται εν μέρει από σεροτονινεργικούς νευρώνες . Ωστόσο , η εξωγενής (παρεντερική) χορήγηση σεροτονίνης δεν προκαλεί φαρμακολογικές επιδράσεις στο ΚΝΣ , γιατί η ουσία αυτή δεν διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό .



Η σεροτονίνη όμως έχει φαρμακολογικές επιδράσεις και στο περιφερικό νευρικό σύστημα , αφού διεγείρει ή καταστέλλει αισθητικές και αυτόνομες νευρικές απολήξεις , ανάλογα με το είδος των υποδοχέων που διαθέτει η νευρική απόληξη . Αυτό εξηγεί την ικανότητά της να προκαλεί αίσθημα κνησμού ή πόνου και να συμμετέχει σε καρδιοαγγειακά αντανακλαστικά και στην διέγερση του αναπνευστικού συστήματος . Αν χορηγηθεί εξωγενώς σεροτονίνη σε υψηλές δόσεις , προκαλεί εκπόλωση των νευρώνων των αυτόνομων γαγγλίων , αλλά και των κυττάρων του μυελού των επινεφριδίων (με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κατεχολαμινών στην κυκλοφορία) .

Η φυσιολογική σημασία της παραγωγής σεροτονίνης από τα Χρωμιόφιλα κύτταρα του εντέρου δεν είναι ακόμα τελείως γνωστή . Είναι όμως πιθανό ότι συμμετέχει στην ρύθμιση της κινητικότητας του λεπτού εντέρου . Η σεροτονίνη εκκρίνεται συνεχώς από τα Χρωμιόφιλα κύτταρα αλλά η έκκρισή της επιτείνεται από τον μηχανικό ερεθισμό , την υπερτονικότητα του εντέρου , την νοραδρεναλίνη και από το πνευμονογαστρικό νεύρο . Η υπερπαραγωγή σεροτονίνης σε Καρκινοειδή όγκο του γαστρεντερικού σωλήνα (νεοπλασία των Χρωμιόφιλων κυττάρων) οδηγεί σε εμφάνιση διαρροϊκού συνδρόμου και επώδυνο σπασμό του εντέρου και σε ορισμένες περιπτώσεις και σε καρδιοαναπνευστικές διαταραχές . Η τοπική εφαρμογή σεροτονίνης στο παχύ έντερο μπορεί να προκαλέσει σπασμό ή χάλαση του κυκλοτερούς και του επιμήκους μυϊκού χιτώνα , δρώντας αντίστοιχα στο μεντερικό πλέγμα του Auerbach ή απευθείας στις λείες μυϊκές ίνες .

Η σεροτονίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος . Σε θέσεις αγγειακού τραυματισμού γίνεται συσσώρευση και συγκόλληση αιμοπεταλίων τα οποία απελευθερώνουν σεροτονίνη , ADP, Θρομβοξανή ΤΧΑ₂ και άλλες ουσίες που σχετίζονται με την πήξη του αίματος . Η εκκρινόμενη σεροτονίνη συνδέεται στους 5-HT₂ υποδοχείς της μεμβράνης των παρακείμενων αιμοπεταλίων και τα ενεργοποιεί , με αποτέλεσμα την συσσώρευση και συγκόλληση όλο και περισσότερων αιμοπεταλίων . Η συνεργεία της σεροτονίνης με το κολλαγόνο και την Θρομβοξανή ΤΧΑ₂ επιταχύνει και επιτείνει περισσότερο τον σχηματισμό θρόμβου . Όμως η θρομβογένεση δεν είναι ο μόνος τρόπος με τον οποίο η σεροτονίνη συμμετέχει στην αιμόσταση . Μπορεί επίσης να δράσει απευθείας στις λείες μυϊκές ίνες του τραυματισμένου αγγείου και να προκαλέσει την σύσπασή τους , τον περιορισμό του αυλού του αγγείου και την αιμόσταση . Εκτός όμως από τις περιπτώσεις αγγειακού τραυματισμού , τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν σεροτονίνη και σε θέσεις φλεγμονής και ιστικής καταστροφής , αφού συρρέουν εκεί μαζί με τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα .

Η εξωγενής (παρεντερική) χορήγηση σεροτονίνης προκαλεί ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις στο καρδιαγγειακό και στο αναπνευστικό σύστημα . Έτσι , στο αναπνευστικό σύστημα προκαλείται αύξηση του κατά λεπτό αναπνευστικού ρυθμού και όγκου , ενώ στους ασθματικούς ασθενείς προκαλείται βρογχόσπασμος . Στην καρδιά η σεροτονίνη προκαλεί θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση , αλλά σε μεγάλες δόσεις προκαλεί βραδυκαρδία και υπόταση ενεργοποιώντας το στεφανιαίο αντανακλαστικό των Bezold-Jarisch . Η επίδραση της στα αγγεία είναι πολύπλοκη , σε γενικές γραμμές όμως προκαλεί αγγειοσύσπασση των σπλαχνικών, νεφρικών, πνευμονικών και εγκεφαλικών αγγείων δρώντας άμεσα στις λείες μυϊκές ίνες τους και αγγειοδιαστολή των αρτηριδίων των γραμμωτών μυών (με έμμεσο τρόπο , προκαλώντας την παραγωγή νιτρικού οξειδίου και προσταγλανδινών από τα ενδοθηλιακά τους κύτταρα) . Η αγγειοσυσπαστική επίδραση της σεροτονίνης στα σπλαχνικά αγγεία , σε συνδυασμό με την συμμετοχή της στην θρομβογένεση και

την ικανότητά της να αυξάνει την αρτηριακή πίεση μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων , την κάνει πολύ σημαντική σε καταστάσεις βαρέων τραυματισμών και αιμορραγιών .

Κεφάλαιο 8-4-2. Σεροτονίνη και Μονοπύρρηνα Φαγοκύτταρα .

Οι πολυάριθμες φυσιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις της σεροτονίνης και ιδιαίτερα η δυνατότητα συμμετοχής της σε καταστάσεις σωματικού stress (τραυματισμοί, αιμορραγίες, φλεγμονές) οδήγησαν στην αναζήτηση σεροτονινεργικών επιδράσεων στο σύστημα των Μονοπύρρηνων Φαγοκυττάρων . Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν μεγάλη ποικιλία στις επιδράσεις της σεροτονίνης , η οποία άλλοτε ενεργοποιούσε , άλλοτε κατέστειλε και άλλοτε δεν επηρέαζε καθόλου τα μακροφάγα .

Από τις πρώτες παρατηρήσεις για την επίδραση της σεροτονίνης στα μακροφάγα *in vitro* έγιναν σε κύτταρα της ιστιοκυτταρικής σειράς PU5-1.8-F7 και έδειξαν ότι η σεροτονίνη ενεργοποιούσε τα κύτταρα αυτά προς την κατεύθυνση της αυξημένης παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου , δρώντας μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων για τα Μουράμυλο-Διπεπτιδία (M.D.P.) , τα οποία είναι γνωστοί ενεργοποιητές των μακροφάγων (Silverman και συν., 1985) . Η σεροτονίνη δεν είχε καμία επίδραση σε κύτταρα που στερούνταν υποδοχέων για τα M.D.P.. Είχαν βέβαια προηγηθεί και άλλες μελέτες (Gallin και συν., 1978) για την επίδραση της σεροτο-νίνης στα μονοκύτταρα , οι οποίες είχαν δείξει ότι η σεροτονίνη , αυξάνοντας το ενδοκυττάριο cGMP , προ-καλούσε αυξημένη χημειοταξία των ανθρώπινων μονοκυττάρων (η οποία καταστέλλεται από την αύξηση του cAMP) . Στις παλαιότερες εργασίες όμως δεν αντιμετωπίστηκε η σεροτονίνη σαν ουσία που επηρέαζε την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών *in vivo* , αλλά απλά σαν μία ουσία η οποία επηρέαζε τα επίπεδα των κυκλικών νουκλεοτιδίων .

Σε μία μεταγενέστερη εργασία , διαπιστώθηκε ότι η σεροτονίνη δεν επηρέαζε καθόλου την ικανότητα των φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων μυών να ενεργοποιούνται από την Ιντερφερόνη- γ για να καταστρέψουν κύτταρα προσβεβλημένα από τον ιό του Απλού Έρπητα (H.S.V.) , ενώ αντίθετα οι κατεχολαμίνες προκαλούσαν έντονη καταστολή της κυτταροτοξικότητας (Koff και Dunegan, 1986) . Κατά το ίδιο έτος μία άλλη εργασία έδειξε ότι η σεροτονίνη προκαλούσε καταστολή της έκφρασης του αντιγόνου Ia στην επιφάνεια μυελικής προέλευσης μακροφάγων μυών , που είχαν ενεργοποιηθεί από Ιντερφερόνη- γ (Sternberg και συν., 1986) . Η επίδραση αυτή της σεροτονίνης ήταν ειδική (άλλες μονοαμίνες δεν παρουσίαζαν παρά ελάχιστη επίδραση στην αντιγονική έκφραση) και φαινόταν να πραγματοποιείται μέσω 5-HT₂ υποδοχέων . Η ίδια ερευνητική ομάδα σε μία άλλη δημοσίευσή της διαπίστωσε ότι η σεροτονίνη επηρέαζε και την φαγοκυττάρωση σωματιδίων latex από μυελικά μακροφάγα ενεργοποιημένα με Ιντερφερόνη- γ (Sternberg και συν., 1987) . Η επίδραση της σεροτονίνης γινόταν μέσω ειδικών τρυπταμινικών υποδοχέων και εξαρτώνταν από τον βαθμό ενεργοποίησης των κυττάρων : σε μακροφάγα ενεργοποιημένα από χαμηλές δόσεις Ιντερφερόνης- γ , η σεροτονίνη αύξανε την φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα , ενώ σε κύτταρα ενεργοποιημένα από υψηλές δόσεις Ιντερφερόνης- γ η σεροτονίνη δρούσε κατασταλτικά . Την ίδια επίδραση παρουσίαζε και η ισταμίνη , δρώντας όμως σε ισταμινικούς και όχι σεροτονινεργικούς υποδοχείς .



Κεφάλαιο 8-5. Ισταμίνη (Υδροξυ-τυραμίνη) .

8-5-1. Γενικά στοιχεία για την Ισταμίνη .

ΔΟΜΗ , ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ .

Η ισταμίνη αποτελείται από έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία αμινομάδα , μέσω δύο μεθυλενικών ομάδων . Έτσι , το αναλυτικό της όνομα είναι 2-(4-ιμιδαζόλυ)-αιθυλαμίνη ή αλλιώς β-αμινοαιθυλ-ιμιδαζόλη . Υπάρχουν και πολλές άλλες συνθετικές ή φυσικές ουσίες που έχουν δράση παρόμοια με την ισταμίνη , αλλά όλες έχουν κοινή δομή . Συγκεκριμένα έχουν έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο που συνδέεται με μία 2-αμινοαιθυλική πλάγια αλυσίδα .

Η ισταμίνη υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών . Επίσης, συναντάται ευρύτατα σε όλο το ζωικό βασίλειο , σε πολλά φυτά καθώς και σε ορισμένα βακτήρια . Στον άνθρωπο , ιδιαίτερα αυξημένη είναι η συγκέντρωση της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό , στο δέρμα , στον εντερικό βλεννογόνο και στους πνεύμονες . Η συγκέντρωση της ισταμίνης στο πλάσμα και σε άλλα υγρά του σώματος (πλην του Ε.Ν.Υ.) είναι αρκετά χαμηλή . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Η ισταμίνη που προσλαμβάνεται με την τροφή ή που παράγεται από την χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα μεταβολίζεται και αποβάλλεται ταχέως . Για αυτό η ισταμίνη που βρίσκεται στους ιστούς παράγεται όλη *in situ* . Τα κύτταρα των θηλαστικών παράγουν την ουσία αυτή από την ιστοιδίνη , με την βοήθεια του ειδικού (και επαγόμενου) ενζύμου Αποκαρβοξυλάση της L-Ιστιδίνης . Στην συνέχεια η ισταμίνη αποθηκεύεται σε κοκκία με pH 5.5 , όπου συνδέεται με ιοντικούς δεσμούς με άλλα στοιχεία των κοκκίων (όπως οι πρωτεάσες και οι πρωτεογλυκάνες της ηπαρίνης ή της θειικής χονδροϊτίνης) . Η κύρια αποθήκη ισταμίνης στους ιστούς είναι τα κοκκία των Μαστοκυττάρων , ενώ για το αίμα είναι τα κοκκία των Βασεόφιλων λευκοκυττάρων . Τα κύτταρα αυτά συνθέτουν ισταμίνη με πολύ αργούς ρυθμούς και δύσκολα την απελευθερώνουν . Άλλες θέσεις αποθήκευσης είναι τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας και του γαστρικού βλεννογόνου , ορισμένοι νευρώνες στο Κ.Ν.Σ. και κύτταρα σε ιστούς που υφίστανται αύξηση ή επούλωση . Εδώ η σύνθεση και η απελευθέρωση της ισταμίνης γίνονται με ταχύτερους ρυθμούς . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Ο μεταβολισμός και η αποδόμηση της ισταμίνης γίνονται κυρίως με δύο οδούς . Η πιο σημαντική απαιτεί μεθυλίωση του ιμιδαζολικού δακτυλίου , από την Ν-Μεθυλοτρανσφεράση της Ισταμίνης , προς Ν-Μέθυλο-ισταμίνη και στην συνέχεια μετατροπή του σε Μέθυλο-ιμιδάζολο-Οξικό οξύ από την Μονοαμινο-Οξειδάση . Στην δεύτερη οδό η ισταμίνη υφίσταται οξειδωτική απαμίνωση από την Διάμινο-Οξειδάση . Και στις δύο περιπτώσεις , ο τελικός μεταβολίτης είναι το ριβοσίδιο του ιμιδάζολο-οξικού οξέος , που είναι βιολογικά αδρανές και αποβάλλεται στα ούρα .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ .

Μελετώντας την σύγχρονη βιβλιογραφία , διαπιστώνουμε ότι περιγράφονται τρεις τύποι ισταμινικών υποδοχέων , συσχετισμένοι ο καθένας με διαφορετικές φυσιολογικές επιδράσεις . Οι Η1-υποδοχείς είναι εκείνοι που σχετίζονται με την σύσπαση του εντέρου και τον βρογχόσπασμο , ενώ οι Η2-υποδοχείς σχετίζονται κυρίως με την γαστρική έκκριση . Ορισμένες λειτουργίες απαιτούν την συνδυασμένη δράση Η1- και Η2-υποδοχέων , όπως η υπόταση μετά από την χάλαση των μικρών

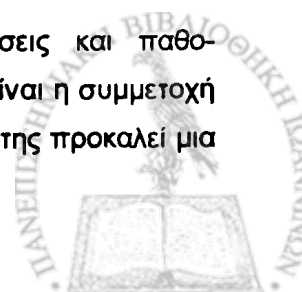
αγγείων . Τέλος , υπάρχουν αναφορές και για ένα τρίτο είδος υποδοχέων , τους H3-υποδοχείς που αρχικά ανιχνεύθηκαν μόνο σε προσυναπτικούς νευρώνες των ισταμινεργικών νευρικών οδών του Κ.Ν.Σ. , σήμερα όμως είναι γνωστό ότι κατανέμονται ευρύτατα στο σώμα , συμμετέχοντας σε συστήματα αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) . Οι υποδοχείς αυτοί είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες και προκαλούν την μείωση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} . Σχετίζονται με την αναστολή της έκκρισης ισταμίνης από τους ισταμινεργικούς νευρώνες , με την πρόκληση υπνηλίας , με την αναστολή της σύσπασης του ειλεού , με την χάλαση των βρόγχων , με την αναστολή της έκκρισης γαστρίνης , και τέλος με την αναίρεση της αγγειοσύσπασης που προκαλεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Οι ισταμινικοί υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης έχουν απομονωθεί και κλωνιστεί πρόσφατα , αλλά οι μηχανισμοί δράσης τους ήταν ήδη από παλιότερα γνωστοί από μελέτες με ειδικούς ισταμινικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές . Έτσι , γνωρίζουμε ότι και οι τρεις τύποι υποδοχέων είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες . Η επίδραση της ισταμίνης στους H1-ισταμινικούς υποδοχείς των κυτταροπλασματικών μεμβρανών ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C μέσω μιας G-πρωτεΐνης . Η Φωσφολιπάση C οδηγεί στην παραγωγή Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης (IP₃) και Διάκυλογλυκερόλης (DAG) . Η IP₃ προκαλεί κινητοποίηση ιόντων ασβεστίου από ενδοκυττάρια αποθήκες (ενδοπλασματικό δίκτυο) , το οποίο με την σειρά του ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση A₂ και την Εξαρτημένη από Ασβέστιο και Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση (Ca^{+2} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase) , ενώ η DAG ενεργοποιεί την Πρωτεϊνική Κινάση C . Η παλαιότερη άποψη ότι οι H1-υποδοχείς μπορούν να δράσουν μέσω αύξησης του Κυκλικού GMP μάλλον εγκαταλείπεται . Για τους H2-υποδοχείς είναι καλά τεκμηριωμένο ότι δρουν μέσω διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξησης του Κυκλικού AMP , το οποίο με την σειρά του ενεργοποιεί την Εξαρτημένη από το Κυκλικό AMP Πρωτεϊνική Κινάση (Πρωτεϊνική Κινάση A) και μειώνει το ενδοκυττάριο ιονισμένο ασβέστιο . Και οι H3-υποδοχείς δρουν μέσω μείωσης του ενδοκυττάρια ασβεστίου , αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό με ποιόν ακριβώς μηχανισμό την επιτυγχάνουν . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Ένα παράδειγμα συνδυασμένης δράσης των H1- και H2-υποδοχέων είναι ο μηχανισμός της αγγειοδιαστολής . Η ισταμίνη δρα απευθείας στους H2-υποδοχείς των λείων μυϊκών ινών των μικρών αγγείων , που προκαλεί την μείωση του Ca^{+2} μέσω αύξησης του cAMP . Όμως η ισταμίνη δρα ταυτόχρονα και στους H1-υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων , όπου προκαλεί αύξηση του Ca^{+2} και ενεργοποίηση της Φωσφολιπάσης A₂ και της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου , που προκαλούν την παραγωγή δύο αγγειοδιασταλτικών ουσιών , της Προστακυκλίνης και του Νιτρικού Οξειδίου . Τα μεγάλα αγγεία διαθέτουν όμως H1-υποδοχείς στις λείες μυϊκές ίνες τους και έτσι η ισταμίνη προκαλεί την αύξηση του ενδοκυττάρια Ca^{+2} και την διέγερση της Κινάσης των Ελαφρών Αλυσίδων Μυοσίνης (Ca^{+2} /Calmodulin-dependent myosin light chain kinase) που οδηγεί στην αγγειοσύσπαση .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ .

Η ενδογενής ισταμίνη σχετίζεται με πολλαπλές φυσιολογικές επιδράσεις και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς . Η πιο σημαντική επίδραση της ενδογενούς ισταμίνης είναι η συμμετοχή της στους μηχανισμούς αναφυλαξίας και αλλεργίας . Επίσης , η εξωγενής χορήγησή της προκαλεί μια πλειάδα φαινομένων από πολλά συστήματα . (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .



Ήδη από το 1927 ο Lewis εισήγαγε την υπόθεση ότι κατά τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας, η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος προκαλούσε την έκλυση μιας ουσίας με τις ιδιότητες της ισταμίνης, που προκαλούσε εκδηλώσεις όπως αγγειοδιαστολή, οίδημα, καύσο και κνησμό.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα σημαντικότερα κύτταρα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμεσης υπερευαισθησίας είναι τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα λευκοκύτταρα, που αποτελούν και τις μεγαλύτερες αποθήκες ισταμίνης στο σώμα. Η ισταμίνη ευρίσκεται αποθηκευμένη μέσα στα εκκρινικά τους κοκκία, χαλαρά συνδεδεμένη με ένα σύμπλεγμα πρωτεΐνης-ηπαρίνης. Στα ίδια κοκκία υπάρχουν και ορισμένες άλλες βιοδραστικές ουσίες (Ηωσινοφιλικός Χημειοτακτικός Παράγοντας, Ουδετεροφιλικός Χημειοτακτικός Παράγοντας) και πολλά υδρολυτικά ένζυμα (β-γλυκουρονιδάση, εξωγλυκοσιδάσες, πρωτεάσες) καθώς και Υπεροξειδάση και Δισμουτάση του Υπεροξειδίου. Όταν ένα ειδικό αντιγόνο συνδεθεί με τις IgE -ανοσοσφαιρίνες στην επιφάνεια του μαστοκυττάρου ή βασεοφίλου, γειτονικά μόρια IgE γεφυρώνονται μεταξύ τους και αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση Κινασών Tyrosίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν άλλες κινάσες καθώς και τις Φωσφολιπάσες Cγ1 και Cγ2. Η παραγωγή Τριφωσφορικής Ινοσιτόλης από τις Φωσφολιπάσες οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και την εξωκυττάρωση των κοκκίων, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ισταμίνης.

Επίσης, υπάρχει πολύ υψηλή παραγωγή ισταμίνης σε ιστούς που υφίστανται ταχεία ανάπτυξη ή ανάπτυξη, όπως οι εμβρυϊκοί ιστοί, οι τραυματισμένοι ιστοί, το αναγεννώμενο ηπατικό παρέγχυμα, οι νεοπλασματικοί ιστοί και ο μυελός των οστών. Πιθανολογείται ότι αυτή η ισταμίνη συμμετέχει στις αναβολικές λειτουργίες. Επίσης, σε ότι αφορά την παραγωγή και έκκριση ισταμίνης σε περιοχές τραυματισμού ή ιστικής βλάβης, είναι πιθανό ότι αυτή συμμετέχει (μαζί με διάφορες άλλες αυτακοειδείς ουσίες) στην ρύθμιση της αιματικής παροχής προς τις περιοχές αυτές.

Η ισταμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην γαστρική έκκριση αφού παράγεται από κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου (κύτταρα APUD - νευροενδοκρινικό κυτταρικό σύστημα) και συνδέεται στους H₂ - ισταμινικούς υποδοχείς των τοιχωματικών ή οξυντικών κυττάρων (Parietal cells). Εκεί ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση των οξυντικών κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την διέγερση της αντλίας πρωτονίων (H⁺/K⁺-ATPάση) και την παραγωγή υδροχλωρικού οξέος. Στον άνθρωπο η παραγωγή αυτή υδροχλωρίου συνοδεύεται και από αυξημένη παραγωγή πεψίνης.

Η ισταμίνη που εκκρίνεται στους ιστούς ερεθίζει τα αισθητικά νεύρα και προκαλεί αίσθημα κνησμού και πόνου. Επίσης φαίνεται να υπάρχουν και ισταμινεργικές περιοχές του εγκεφάλου, όπου η ισταμίνη λειτουργεί ως νευρομετεβιβαστής, όπως π.χ. η υπόφυση, ο υποθάλαμος, ο ρινεγκέφαλος (Επιχείλιο σύστημα) καθώς και ορισμένες περιοχές του φλοιού. Κάποιες από αυτές ίσως να επιτελούν την ρύθμιση της υποφυσιακής λειτουργίας. Τέτοιες περιοχές είναι ο πρόσθιος και ο οπίσθιος λοβός της υπόφυσης και οι παρακείμενες περιοχές του υποθαλάμου. Άλλες περιοχές συσχετίζονται με την αίσθηση του πόνου, την δίψα, την εγρήγορση και την υπνηλία.

Στον άνθρωπο και στα περισσότερα ζώα, η ισταμίνη προκαλεί σημαντική αγγειοδιασταλτική δράση, που αφορά κυρίως τα πολύ λεπτά αγγεία. Η δράση αυτή ασκείται μέσω των H₁- και H₂-υποδοχέων και αφορά όλα τα μικρά αγγεία που διατηρούν τις περιφερικές αντιστάσεις στο σώμα (αρτηριόλια, μεταρτηριόλια και προτριχοειδικούς σφιγκτήρες). Οι H₁-υποδοχείς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι και προκαλούν ταχεία και βραχυχρόνια αγγειοδιαστολή, ενώ οι λιγότερο ευαίσθητοι H₂-

υποδοχείς προκαλούν όψιμη και παρατεταμένη αγγειοδιαστολή . Το αποτέλεσμα της μικτής επίδρασης είναι η έντονη ερυθρότητα και θερμότητα στο ανώτερο τμήμα του σώματος (κεφαλή και κορμός) , η πτώση των περιφερικών αντιστάσεων και η υπόταση . Στα δύο τελευταία συνεισφέρει και η αύξηση της τριχοειδικής διαβατότητας στην οποία συντελεί η ισταμίνη μέσω H1-υποδοχέων , με αποτέλεσμα την εξίδρωση πλάσματος και λευκωμάτων προς τον εξωαγγειακό χώρο και την δημιουργία οιδημάτων . Η δράση αυτή της ισταμίνης δεν ασκείται ακριβώς στα τριχοειδή , αλλά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των μετατριχοειδικών φλεβιδίων τα οποία συσπώνται έντονα . Σε ορισμένα είδη ζώων όπως τα τρωκτικά , προκαλείται σύσπαση των μεγάλων αρτηριών .

Η ισταμίνη έχει και φαρμακολογικές επιδράσεις στην καρδιακή λειτουργία και στην αρτηριακή πίεση . Στην καρδιά ασκεί άμεσα θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση μέσω H2-υποδοχέων , που προκαλούν αύξηση του ενδοκυττάριου ιονισμένου ασβεστίου με αποτέλεσμα την ισχυρότερη μυϊκή συστολή και την ταχύτερη επαναπόλωση του φλεβόκομβου . Επίσης , λόγω της υπότασης έχουμε και έμμεση αύξηση της ισχύος και ταχύτητας της μυοκαρδιακής συστολής . Η υπόταση όπως έχει ήδη αναφερθεί , οφείλεται στην συνολική μείωση των αντιστάσεων των περιφερικών μικρών αγγείων .

Τέλος , η ισταμίνη προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών ινών σε διάφορα όργανα (βρόγχους, μήτρα, έντερο , κ.α.) . Ιδιαίτερη σημασία έχει η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων , που οδηγεί σε έντονο βρογχόσπασμο στους ασθματικούς και άλλους πνευμονοπαθείς ασθενείς . Η δράση αυτή διαμεσολαβείται από τους H1-υποδοχείς .

8-5-2. Η ισταμίνη και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Η μελέτη των επιδράσεων της ισταμίνης στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα έχει ξεκινήσει μέσα στην δεκαετία του 1970 . Σε μία από τις πρώτες μελέτες , διαπιστώθηκε ότι τα διάφορα είδη μη-διεγερμένων μακροφάγων των ινδικών χοιριδίων παρουσιάζουν υποδοχείς για την ισταμίνη (Diaz και συν., 1979) . Συγκεκριμένα , στην επιφάνειά τους εκφράζονται ειδικοί H1-υποδοχείς , με τους οποίους τα μακροφάγα συνδέουν ερυθροκύτταρα επικαλυμμένα με ισταμίνη . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν ιδιαίτερα έντονη έκφραση των H1-υποδοχέων , τα περιτοναϊκά μακροφάγα λιγότερο έντονη έκφραση των ίδιων υποδοχέων και τα αιματικά μονοκύτταρα ακόμα λιγότερο .

Σε μία μεταγενέστερη μελέτη , διαπιστώθηκε ότι τα φυσιολογικά και τα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα μυών εκφράζουν H2-ισταμινικούς υποδοχείς και ότι μέσω αυτών των υποδοχέων η ισταμίνη προκαλεί καταστολή της παραγωγής του μονομερούς προδρόμου μορίου Pro-C5 του πέμπτου παράγοντα του συμπληρώματος C5 (Οοί , 1982) .

Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 μελετήθηκε και η επίδραση της ισταμίνης σε μακροφάγα προερχόμενα από τον μυελό των οστών , που είχαν ενεργοποιηθεί με Ιντερφερόνη-γ . Διαπιστώθηκε ότι ως προς την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας Ia η ισταμίνη προκαλούσε μία ασθενή κατασταλτική επίδραση στα ενεργοποιημένα μακροφάγα , σε αντίθεση με την κατά εκατό φορές πιο ισχυρή επίδραση της σεροτονίνης στα ίδια κύτταρα (Sternberg και συν., 1987) . Η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι ως προς την φαγοκυττάρωση σωματιδίων latex η ισταμίνη έχει μια ισχυρή επίδραση , η οποία ασκείται μέσω H1-υποδοχέων . Συγκεκριμένα , η ισταμίνη ευόδωνε την φαγοκυττάρωση όταν τα μακροφάγα είχαν ενεργοποιηθεί με χαμηλές δόσεις Ιντερφερόνης-γ (1unit/ml) ενώ προκαλούσε

καταστολή της φαγοκυττάρωσης σε μακροφάγα ενεργοποιημένα με υψηλές δόσεις (50 units/ml) Ιντερφερόνης- γ (Sternberg και συν., 1987). Η προσθήκη Η1-ισταμινικών αναστολέων καταργούσε τις επιδράσεις της ισταμίνης στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, ενώ η χρήση αναστολέων των Η2-υποδοχέων δεν τα επηρέαζε καθόλου.

Η ισταμίνη δεν επηρεάζει μόνο τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Έχει δειχθεί *in vitro* ότι επηρεάζει και τα φυσιολογικά (μη-ενεργοποιημένα) ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, δρώντας μέσω Η1-ισταμινικών υποδοχέων και προκαλώντας αυξημένη παραγωγή και έκκριση της β -Γλυκουρονιδάσης (Cluzel και συν., 1990). Επίσης διαπιστώθηκε και από άλλους ερευνητές ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα από φυσιολογικούς υγιείς ανθρώπους, όταν καλλιεργηθούν *in vitro* με ισταμίνη χωρίς άλλη τεχνητή ενεργοποίηση (από ενδοτοξίνη ή Ιντερφερόνη- γ), υφίστανται ενεργοποίηση (Vignola και συν., 1994). Συγκεκριμένα, η ισταμίνη προκαλεί στα μακροφάγα αυτά αυξημένη έκφραση των Μορίων Προσκόλλησης (Adhesion Molecules) LFA-1 και ICAM-1, του υποδοχέα χαμηλής συγγένειας της IgE-ανοσοσφαιρίνης CD23b και αύξηση της παραγωγής και έκκρισης Ινωδονεκτίνης. Η επίδραση αυτή της ισταμίνης είναι ειδική, ασκείται μέσω των Η1-ισταμινικών υποδοχέων και απαιτεί πρωτεϊνοσύνθεση.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ισταμίνη ασκεί τις επιδράσεις της στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα μελετήθηκε στα κύτταρα της σειράς P388D1 τα οποία έχουν φαινότυπο ενεργοποιημένου μακροφάγου. Διαπιστώθηκε ότι η ισταμίνη, σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που ανευρίσκονται σε θέσεις φλεγμονωδών αντιδράσεων, προκαλεί ταχύτατη και παροδική αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, το οποίο προέρχεται από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες και όχι από τον εξωκυττάριο χώρο (Ohno και συν., 1991). Η επίδραση αυτή της ισταμίνης διαμεσολαβείται από έναν Η1-υποδοχέα και προκαλεί σημαντική αύξηση του Κυκλικού GMP αλλά όχι του Κυκλικού AMP. Οι Η2-υποδοχείς δεν φαίνεται να συμμετέχουν καθόλου στις επιδράσεις αυτές της ισταμίνης στο ενδοκυττάριο ασβέστιο και το Κυκλικό GMP.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον έχουν τα αποτελέσματα τα οποία διαπίστωσε μια άλλη ερευνητική ομάδα, χρησιμοποιώντας φυσιολογικά και λευχαιμικά ανθρώπινα μονοκύτταρα και μακροφάγα (Migossay και συν., 1994). Αναλυτικότερα, τα λευχαιμικά μονοκύτταρα THP-1 παρουσίαζαν αυξημένη δραστηριότητα της Αδενυλικής Κυκλάσης και αυξημένη παραγωγή Κυκλικού AMP όταν επωάζονταν με ισταμίνη ή με Η2-ισταμινικούς αγωνιστές, ενώ οι Η1-αγωνιστές είχαν πολύ ασθενή επίδραση. Επίσης, οι Η2-ανταγωνιστές προκαλούσαν μείωση της επίδρασης της ισταμίνης στην Αδενυλική Κυκλάση, ενώ οι Η1-ανταγωνιστές είχαν πάλι ασθενή επίδραση. Αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη Η2-υποδοχέων στα κύτταρα αυτά. Όμως η ωρίμανση των THP-1 μονοκυττάρων σε μακροφάγα με την βοήθεια *trans*-ρετινοϊκού οξέος, συνοδευόταν από μειωμένη ικανότητα της ισταμίνης να αυξάνει την δραστηριότητα της Αδενυλικής Κυκλάσης μέσω του Η2-υποδοχέα. Επίσης, χρησιμοποιώντας φυσιολογικά ανθρώπινα μονοκύτταρα από υγιείς εθελοντές, η ισταμίνη προκαλούσε αυξημένη παραγωγή Κυκλικού AMP, ενώ όταν αυτά ωρίμαζαν προοδευτικά σε μακροφάγα η ισταμίνη παρουσίαζε μειωμένη ικανότητα διέγερσης της παραγωγής Κυκλικού AMP. Αλλά και στα φυσιολογικά βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, η ικανότητα διέγερσης της παραγωγής του κυκλικού νουκλεοτιδίου από την ισταμίνη ήταν πάρα πολύ χαμηλή. Η ωρίμανση των λευχαιμικών μονοκυττάρων σε μακροφάγα, αν και επηρέαζε την ικανότητα της ισταμίνης να διεγείρει την παραγωγή cAMP, δεν είχε

καμία επίδραση σε άλλες λειτουργίες της . Έτσι η ισταμίνη προκαλούσε σημαντική καταστολή της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα λευχαιμικά μακροφάγα και μάλιστα μέσω των H₂-υποδοχέων της . Αντιθέτως , η ισταμίνη δεν επηρέαζε καθόλου την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα φυσιολογικά βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , ενώ άλλες ουσίες που αύξαναν το cAMP προκαλούσαν σημαντική καταστολή της παραγωγής H₂O₂ . Η μελέτη της έκφρασης του mRNA των H₂-υποδοχέων και της πυκνότητας των H₂-υποδοχέων στα κύτταρα έδειξε μειωμένη έκφραση των υποδοχέων μόνο στα ώριμα φυσιολογικά μακροφάγα . Συνολικά , τα αποτελέσματα αυτά έδειχναν ότι κατά την διαδικασία ωρίμανσης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , προέκυπτε μειωμένη λειτουργικότητα των H₂-ισταμινικών υποδοχέων ως προς την παραγωγή cAMP . Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε δείξει και μια προηγούμενη μελέτη (Gespach και συν., 1985) , με κύτταρα της σειράς U-937 (ιστιοκυτταρικό λέμφωμα) που έχουν φαινότυπο μονοβλάστης ή άωρου μονοκυττάρου . Διαπιστώθηκε ότι μετά την διαφοροποίηση του άωρου U-937 κυττάρου σε ώριμο U-937 μονοκύτταρο (με την βοήθεια ρετινοϊκού οξέος) μειώνεται σημαντικά η ικανότητα παραγωγής Κυκλικού AMP μετά από διέγερση με ισταμίνη , παρά το ότι τα U-937 κύτταρα εκφράζουν H₂-ισταμινικούς υποδοχείς και πριν και μετά την διαφοροποίησή τους . Είναι πιθανό ότι αυτοί οι H₂-ισταμινικοί υποδοχείς σχετίζονται αιτιολογικά με την διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης . Σίγουρα όμως το φαινόμενο της μειωμένης ικανότητας παραγωγής cAMP είναι χαρακτηριστικό της ωρίμανσης , αφού μειώνεται τόσο η βασική παραγωγή του νουκλεοτιδίου όσο και η παραγωγή του μετά από επίδραση Προσταγλανδίνης PGE₁ ή Ισοπρωτερενόλης στα U-937 μονοκύτταρα .

Τέλος έχει διαπιστωθεί και από μια άλλη ερευνητική ομάδα (Hellstrand και συν., 1994) ότι τα ανθρώπινα μονοκύτταρα εκφράζουν H₂-υποδοχείς ισταμίνης και ότι η *in vitro* διέγερση αυτών των H₂-υποδοχέων καταστέλλει την παραγωγή H₂O₂ από τα μονοκύτταρα .



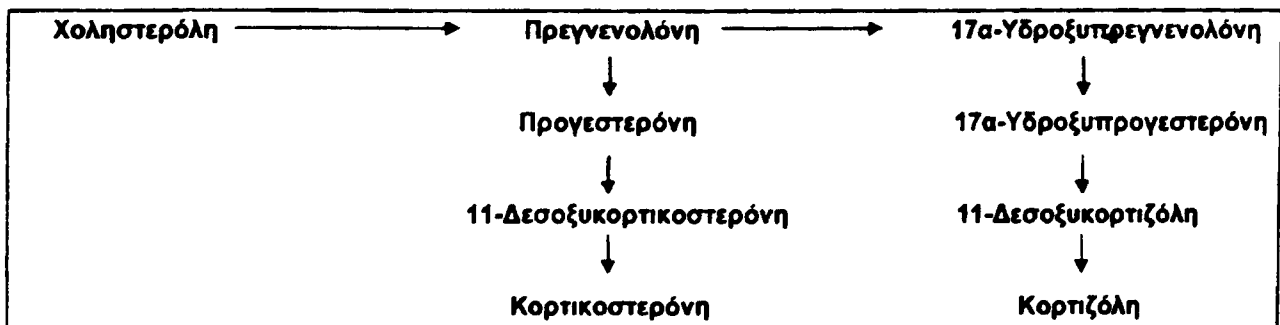
Κεφάλαιο 8-6 : Δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή .

8-6-1. Γενικά στοιχεία για τα γλυκοκορτικοειδή .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ .

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ουσίες που συνθέτονται στον φλοιό των επινεφριδίων και περιέχουν 21 άτομα άνθρακα στο μόριό τους , το οποίο παρουσιάζει ένα πυρήνα κυκλοπεντανο-υπερουδρο-φαινανθρενίου . Στην θέση 17 του D-δακτυλίου τους παρουσιάζουν μια ομάδα υδροξυλίου και μια πλάγια αλυσίδα με δύο άτομα άνθρακα (κετονο-αλκοολική ομάδα) . Στην θέση 11 του C-δακτυλίου παρουσιάζουν μια ομάδα υδροξυλίου . Στην θέση 3 του A-δακτυλίου παρουσιάζουν μια κετονική ομάδα . Επίσης , στην θέση 4.5 του A-δακτυλίου τους παρουσιάζουν έναν διπλό δεσμό . Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι κοινά σε όλα τα γλυκοκορτικοειδή και απαραίτητα για την βιολογική τους δράση (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Η χοληστερόλη, που αποτελεί πρόδρομο ουσία απαραίτητη για την βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών , προσλαμβάνεται κατά 60 - 80% εξωγενώς με την βοήθεια ειδικών υποδοχέων για τις LDL- λιποπρωτείνες ενώ το υπόλοιπο 20 - 40% συντίθεται σε μόνο στα επινεφρίδια , από οξικό . Οι LDL-λιποπρωτείνες μεταφέρονται από τους υποδοχείς στο εσωτερικό των επινεφριδιακών κυττάρων και εκεί η χοληστερόλη εστεροποιείται και αποθηκεύεται με την μορφή σταγονιδίων λίπους . Για να ξεκινήσει η διαδικασία της στεροειδογένεσης , απελευθερώνεται η χοληστερόλη από τα σταγονίδια λίπους με την βοήθεια του ενζύμου Υδρολάση των Εστέρων Χοληστερόλης και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια από μια πρωτεΐνη - φορέα στερολών . Στα μιτοχόνδρια η χοληστερόλη υφίσταται μια σειρά από ενζυματικές τροποποιήσεις από οξειδάσες που περιέχουν το κυτόχρωμα P-450 . Μετατρέπεται διαδοχικά σε πρεγνενολόνη (πρόδρομο ουσία της δεσοξυκορτικοστερόνης , της κορτικοστερόνης και της 18-υδροξυκορτικοστερόνης) και σε 17^α-υδροξυπρεγνενολόνη (πρόδρομο ουσία της 11-δεσοξυκορτιζόλης και της κορτιζόλης) . Η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη καταλύεται από την Δεσμολάση της Χοληστερόλης (P450SCC) , ενώ η μετατροπή της πρεγνενολόνης σε 17^α-υδροξυπρεγνενολόνη καταλύεται από την 17^α-Υδροξυλάση και γίνεται στο άκκοκο ενδοπλασματικό δίκτυο . (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .



Η πρεγνενολόνη και η 17^α-υδροξυπρεγνενολόνη μετατρέπονται στο άκκοκο ενδοπλασματικό δίκτυο σε προγεστερόνη και 17^α-υδροξυπρογεστερόνη αντίστοιχα , από την Αφυδρογονάση των 3β-Υδροξυστεροειδών . Στην συνέχεια , η 21β-Υδροξυλάση καταλύει την μετατροπή τους σε 11-

δεσοξυκορτικοστερόνη και 11-δεσοξυκορτιζόλη . Τα γλυκοκορτικοειδή αυτά μεταφέρονται ξανά στα μιτοχόνδρια και εκεί μετατρέπονται σε κορτικοστερόνη και κορτιζόλη από την 11β-Υδροξυλάση και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία .

Το γεγονός ότι η προγεστερόνη και η 17^α-υδροξυπρογεστερόνη αποτελούν τις άμεσες πρόδρομες ουσίες των γλυκοκορτικοειδών εξηγεί και την υψηλή συγγένεια που έχουν για τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στην επιφάνεια των μακροφάγων (Werb και συν., 1978 , Ozaki και συν., 1982) . Επειδή όμως στερούνται την 11β-υδροξυλομάδα , δεν έχουν γλυκοκορτικοειδική δράση .

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ . Η ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗ (ACTH) ΚΑΙ Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) .

Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται συνεχώς και εκκρίνονται στο αίμα χωρίς να αποθηκεύονται . Ο έλεγχος του ρυθμού βιοσύνθεσής τους γίνεται από τον υποθάλαμο και την υπόφυση , μέσω της Κορτικοτροπίνης ή Φλοιοεπινεφριδιοτρόπου Ορμόνης (ACTH) . Η σύνθεσή τους παρουσιάζει διακυμάνσεις οι οποίες ακολουθούν ένα καθορισμένο ημερήσιο (κίρκαδιανό) κύκλο . Η ACTH ρυθμίζει τόσο την βασική έκκριση των γλυκοκορτικοειδών όσο και την επταυξημένη έκκρισή τους σε κατά-στάσεις σωματικής ή ψυχολογικής καταπόνησης (stress) .

Η ACTH είναι ένα πολυπεπτιδίο με 39 αμινοξέα διαταγμένα σε μονή αλυσίδα . Προέρχεται από την διάσπαση ενός μεγαλύτερου πεπτιδίου , της Προοπιομελανοκορτίνης , που εκκρίνεται από τα βασεόφιλα (κορτικότροπα) κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης . Τα πρώτα 23 αμινοξέα της ACTH φαίνεται να περικλείουν όλη την δραστική περιοχή της και είναι κοινά σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί . Ο χρόνος ημιζωής της ACTH στο αίμα είναι περίπου 10' λεπτά αλλά είναι ακόμα άγνωστο σε ποια όργανα ή ιστούς γίνεται η αδρανοποίησή της . (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .

Η ρύθμιση της έκκρισης της ACTH γίνεται από τον υποθάλαμο και το κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω νευροδιαβιβαστών και της Εκλυτικής Ορμόνης της Κορτικοτροπίνης (CRH) . Η CRH είναι ένα πεπτιδίο με 41 αμινοξέα διατεταγμένα σε μονή αλυσίδα . Παράγεται κυρίως από τους νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου αλλά και από άλλες θέσεις του φλοιού και του ρινεγκεφάλου , καθώς και από τον πλακούντα , το πάγκρεας , το έντερο και τα επινεφρίδια . Η CRH μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης με τα πυλαία αγγεία . Εκεί επιδρά στα βασεόφιλα (κορτικότροπα) κύτταρα της υπόφυσης , αυξάνοντας τόσο το κυκλικό AMP όσο και το ενδοκυττάριο ασβέστιο , προκαλώντας έτσι αυξημένη μεταγραφή του mRNA της Προοπιομελανοκορτίνης . Η δράση της CRH στην έκκριση ACTH ενισχύεται από την Αντιδιουρητική Ορμόνη , την Ωκυτοκίνη και από τους β-διεγέρτες , ενώ καταστέλλεται από την Σωματοστατίνη .

Η συνολική νευροενδοκρινική ρύθμιση της έκκρισης CRH , ACTH και γλυκοκορτικοειδών περιλαμβάνει τρεις μηχανισμούς :

1. Η βασική έκκριση των γλυκοκορτικοειδών γίνεται σε 9 - 10 ώσεις ανά 24ωρο , που οφείλονται σε αντίστοιχες ώσεις στην έκκριση των CRH και ACTH . Αυτές οι ώσεις δεν είναι ρυθμικές . Ακολουθούν όμως έναν κύκλο με περίοδο 24 ωρών και αυτός ο ρυθμός έκκρισης ονομάζεται κίρκαδιανός ρυθμός (circadian rhythm) . Ο κίρκαδιανός ρυθμός ελέγχεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα και συγκεκριμένα από τον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου) και είναι σταθερός . Είναι δυνατόν όμως να διαταραχθεί από αλλαγές στις συνήθειες διατροφής και ύπνου , από αλλαγές στον χρόνο έκθεσης στο φως και στο σκότος , από σωματικό και ψυχικό stress και τέλος από ποικίλες παθήσεις , όπως π.χ. ο

αλκοολισμός, η νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια, οι παθήσεις της υπόφυσης ή των επινεφριδίων, κ.α.. Με τον κερκαδιανό ρυθμό έκκρισης επιτυγχάνονται τα υψηλότερα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία κατά τις πρώτες πρωινές ώρες και κατά την διάρκεια των γευμάτων. (Ganong, 1989).

2. Έκκριση ACTH και γλυκοκορτικοειδών έχουμε και ως αντίδραση στο σωματικό stress, όπως για παράδειγμα σε υπογλυκαιμία, τραυματισμούς, βαρείες παθήσεις και σε μείζονες χειρουργικές επεμβάσεις. Μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας από την έναρξη του stress ξεκινά η αντίδραση από το κεντρικό νευρικό σύστημα, αυξάνοντας αρχικά την υποθαλαμική έκκριση CRH, στην συνέχεια την υποφυσιακή έκκριση ACTH και τελικά την επινεφριδιακή έκκριση γλυκοκορτικοειδών. Συγκεκριμένα, η παραγωγή CRH από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου κατά την διάρκεια stress, ελέγχεται δια προσαγωγών ινών από άλλες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως από τον αμυγδαλοειδή πυρήνα (φόβος, άγχος, αδημονία), από τον δικτυωτό σχηματισμό και τις αισθητικές οδούς του πόνου (εγκαύματα, τραυματισμοί), από τους πιεσοϋποδοχείς και τον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας, κ.α.

3. Τα υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών στο αίμα καταστέλλουν την έκκριση CRH και ACTH μέσω μηχανισμού αρνητικής παλινδρομής ρύθμισης (negative feedback). Η καταστολή ασκείται ταυτόχρονα και στον υποθάλαμο και στην υπόφυση, με δύο διακριτούς μηχανισμούς: έναν άμεσο μηχανισμό (ταχείας επέλευσης και παροδικό) που δεν σχετίζεται με κυτταροπλασματικούς υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, καθώς και έναν επιβραδυνόμενο μηχανισμό (βραδείας επέλευσης και μεγάλης διάρκειας) που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οδηγεί στην μειωμένη μεταγραφή του mRNA της προοπιομελανοκορτίνης. (Greenspan, 1991).

Η ACTH συνδέεται με τους υποδοχείς υψηλής συγγένειας στην επιφάνεια των κυττάρων της στηλιδωτής στοιβάδας (zona fasciculata) των επινεφριδίων και ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση μέσω Gs-πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρου κυκλικού AMP και την επακόλουθη ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (cAMP-dependent Protein Kinase). Η τελευταία φωσφορυλιώνει την Υδρολάση των Εστέρων Χοληστερόλης (Cholesterol Esterase) και αυξάνει έτσι την δραστηριότητά της, προκαλώντας την αύξηση της διαθέσιμης ελεύθερης χοληστερόλης. Επίσης, προσλαμβάνεται και χοληστερόλη από την κυκλοφορία μέσω LDL-υποδοχέων. Η χοληστερόλη μεταφέρεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, όπου χρησιμοποιείται από το ένζυμο P450_{SCC} για την βιοσύνθεση πρεγνενολόνης και των παραγώγων της. Μακροχρονίως η ACTH αυξάνει την σύνθεση όλων των ενζύμων που περιέχουν το κυτόχρωμα P450 και που συμμετέχουν στην παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών. (Goodman-Gilman και συν., 1996).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν πολυάριθμες και ποικίλες φυσιολογικές δράσεις, οι οποίες φαίνονται ότι ασκούνται μέσα από κοινό μοριακό μηχανισμό. Η συνένωση της ορμόνης με έναν υποδοχέα οδηγεί σε ρύθμιση (επαγωγή ή καταστολή) της έκφρασης ειδικών γονιδίων.

Η στεροειδής ορμόνη εισέρχεται στο κύτταρο και συνδέεται σε μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη - υποδοχέα. Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των Πυρηνικών Υποδοχέων (Nuclear Receptors) οι οποίοι περιλαμβάνουν τους υποδοχείς των κορτικοστεροειδών ορμονών, των γεννητικών ορμονών (ανδρογόνων, οιστρογόνων, προγεσταγόνων), των θυρεοειδικών ορμονών, της βιταμίνης D, και των ρετινοειδών. Περιλαμβάνουν δύο πολύ σημαντικά

τμήματα : το ένα είναι στο καρβοξυτελικό άκρο και συνδέει την ορμόνη , το άλλο είναι μια αλληλουχία 70 αμινοξέων που περιέχει δύο θέσεις σύνδεσης ψευδαργύρου (zinc-fingers) και συνδέεται στην ειδική θέση του μορίου του DNA που λέγεται GRE . Ο υποδοχέας του γλυκοκορτικοειδούς στην ανενεργή μορφή του είναι συνδεδεμένος με άλλες πρωτεΐνες , δημιουργώντας έτσι ένα σύμπλοκο . Ανάμεσα σε αυτές είναι οι πρωτεΐνες Θερμικού Shock HSP-70 και HSP-90 , καθώς και μια ανοσοφυλλίνη (immunophylline) των 56 kDa . Η ένωση του γλυκοκορτικοειδούς στον υποδοχέα τον ενεργοποιεί και οδηγεί στην απομάκρυνση των HSP-70 και HSP-90 , ενώ το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα υποδοχέα-γλυκοκορτικοειδούς μεταναστεύει στον πυρήνα . Η παλαιότερη άποψη ότι για την μετανάστευση του συμπλόκου είναι απαραίτητη η σύνδεσή του με πρωτεΐνες-αποδοχείς (acceptors) έχει εγκαταλειφθεί .

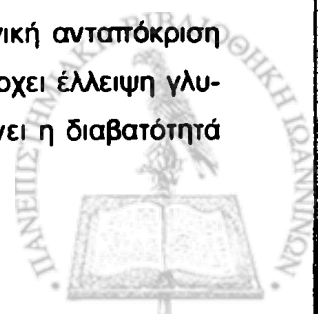
Το σύμπλεγμα υποδοχέα-στεροειδούς συνδέεται με τις ειδικές βραχείες περιοχές του DNA , που βρίσκονται μέσα στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων των γλυκοκορτικοειδών . Οι περιοχές αυτές εκφράζουν πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν την δράση των γλυκοκορτικοειδών στον συγκεκριμένο ιστό και ονομάζονται GRE (Glucocorticoid Responsive Elements) . Τα GRE επάγουν την έκφραση των γονιδίων αυτών και έτσι γίνεται η μεταγραφή μορίων mRNA που μεταφράζονται στις ειδικές πρωτεΐνες (όπως π.χ. οι λιποκορτίνες) που διαμεσολαβούν την αντίδραση του ιστού στην στεροειδική ορμόνη . Αν και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών ορμονών είναι παρόμοιοι στα διάφορα είδη κυττάρων , τα γονίδια που εκφράζονται και οι πρωτεΐνες που παράγονται είναι αρκετά διαφορετικές . Επίσης , σε ορισμένες περιπτώσεις η ένωση γλυκοκορτικοειδούς-υποδοχέα-GRE προκαλεί καταστολή της έκφρασης γονιδίων . Έτσι και οι αντιδράσεις των ιστών και κυττάρων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία . (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες δρουν και με άλλους μηχανισμούς , εκτός από αυτούς που ασκούνται μέσω των ειδικών κυτταροπλασματικών υποδοχέων και που απαιτούν έκφραση γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών . Ένα παράδειγμα αποτελεί ο μηχανισμός ταχείας αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της έκκρισης ACTH από τα γλυκοκορτικοειδή . Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά , γεγονός που αποκλείει την πιθανότητα να απαιτεί γονιδιακή έκφραση . Πιθανολογείται ότι οφείλεται σε άμεση επίδραση της ορμόνης στην κυτταρική μεμβράνη και ειδικότερα σε μεμβρανικούς υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών .

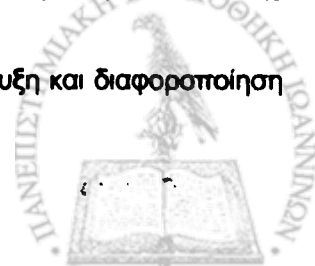
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ .

Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς και στα όργανα είναι οι εξής :

1. Μεταβολικές επιδράσεις : Τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών , υδατανθράκων και λιπών . Αυξάνουν τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και την ηπατική νεογλυκογένεση , προκαλώντας υπεργλυκαιμία) . Ασκούν αντιϊνσουλινική δράση στους περιφερικούς ιστούς , εκτός της καρδιάς και του εγκεφάλου . Τέλος αυξάνουν τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα καθώς και την παραγωγή κετονοσωμάτων στους διαβητικούς .
2. Επιδράσεις στα αγγεία : Τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα για την φυσιολογική ανταπόκριση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων στις κατεχολαμίνες , με αποτέλεσμα όταν υπάρχει έλλειψη γλυκοκορτικοειδών τα αγγεία να χάνουν τον τόνο τους , να διαστέλλονται και να αυξάνει η διαβατότητά τους .



3. **Επιδράσεις στο Νευρικό σύστημα :** Η έλλειψη γλυκοκορτικοειδών προκαλεί παθολογικά βραδέα κύματα στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα , διαταραχές προσωπικότητας και αυξημένη ευαισθησία στα οσφρητικά και γευστικά ερεθίσματα . Είναι πιθανό ότι τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν άμεσα την διεγερσιμότητα των νευρώνων , μέσω ειδικών υποδοχέων .
4. **Επίδραση στους νεφρούς :** Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ήπια αλατοκορτικοειδική δράση , μειώνοντας τα επίπεδα Αντιδιουρητικής Ορμόνης στο πλάσμα και αυξάνοντας τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης και την αποβολή ύδατος . Επίσης , προκαλούν αυξημένη νεφρική αποβολή ιόντων Ca^{2+} .
5. **Επιδράσεις στο αίμα και στον λεμφικό ιστό :** Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών προκαλεί ήπια λεμφοπενία , ηωσινοπενία και βασεοπενία , αυξάνει όμως τα υπόλοιπα έμμορφα στοιχεία του αίματος , προκαλώντας έτσι ουδετεροφιλία , μονοκυττάρωση , λευκοκυττάρωση , θρομβοκυττάρωση και ερυθροκυττάρωση . Επίσης , αναστέλλοντας την παραγωγή Ιντερλευκίνης-2 από τα T-λεμφοκύτταρα και τις μιτωτικές διεργασίες των λεμφοκυττάρων , προκαλεί την υποστροφή του μεγέθους του θύμου και των λεμφαδένων .
6. Η παρουσία γλυκοκορτικοειδών είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία των γραμμικών μυών .
7. **Αντίδραση στο stress :** Όταν ο άνθρωπος ή τα ζώα εκθέτονται σε κάποια μορφή έντονης σωματικής ή ψυχικής καταπόνησης αυξάνει η παραγωγή ACTH και τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα, μια αντίδραση απαραίτητη για την επιβίωση .
8. **Αντιφλεγμονώδης και ανοσοκατασταλτική δράση :** Σε μεγάλες δόσεις , τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν έντονη αντιφλεγμονώδη δράση . Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην ιδιότητά τους να αναστέλλουν την δράση των ινοβλαστών , την δημιουργία οιδημάτων , την συστηματική αντίδραση στις βακτηριακές τοξίνες και την τοπική ιστική βλάβη . Τα παραπάνω οφείλονται στο ότι τα γλυκοκορτικοειδή : α) Αναστέλλουν την δραστηριότητα της Φωσφολιπάσης A2 , εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή προσταγλανδινών , λευκοτριενίων και θρομβοξανίων , που αποτελούν ισχυρούς χημικούς διαμεσολαβητές της φλεγμονής . β) Σταθεροποιούν τις λυσοσωματικές μεμβράνες των κοκκιοκυττάρων , εμποδίζοντας την απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων στην φλεγμονώδη εστία . γ) Επιβραδύνουν την πρωτεολυτική δράση της Κολλαγενάσης στους φλεγμαίνοντες ιστούς . δ) Αναστέλλουν την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 , εμποδίζοντας έτσι την εμφάνιση του πυρετού . Επίσης , αναστέλλουν την παραγωγή Ιντερλευκίνης-2 , Ιντερλευκίνης-3 , Ιντερλευκίνης-6 , GM-CSF , Ιντερφερόνης-γ και TNF-α . ε) Αρχικά αυξάνουν και στην συνέχεια μειώνουν τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών στο αίμα . στ) Μειώνουν τον αριθμό των λεμφοκυττάρων του αίματος , αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους . Επίσης αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών . ζ) Μειώνουν την έκφραση των μορίων ELAM-1 και ICAM-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων , που είναι απαραίτητα για την μετανάστευση των λευκοκυττάρων μέσα από το αγγειακό τοίχωμα προς την φλεγμονώδη εστία .
9. **Αντιαλλεργική δράση :** Τα γλυκοκορτικοειδή παρεμποδίζουν την απελευθέρωση της ισταμίνης και της λευκοτριένης LTC4 από τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα , όπως συμβαίνει στις αλλεργικές αντιδράσεις , στην ατοπία , στο άσθμα και γενικά σε αντιδράσεις επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας .
10. Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση , ανάπτυξη και διαφοροποίηση των εμβρυϊκών ιστών και οργάνων .



ΔΕΞΑΜΕΘΑΖΟΝΗ :

Εκτός από τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόλη , κορτικοστερόνη , δεοξυκορτικοστερόνη , κορτιζόνη , κ.α.) υπάρχουν και συνθετικά κορτικοστεροειδή με ευρεία χρήση στην θεραπευτική . Τέτοια είναι η πρεδνιζόνη , η πρεδνιζολόνη , η 9^α-φθοροκορτιζόλη , η τριαμκινολόνη και η δεξαμεθαζόνη . Η δεξαμεθαζόνη αποτελεί το πιο ισχυρό από τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή , αφού είναι 25 ως 30 φορές ισχυρότερο από την κορτιζόλη , το δραστικότερο από τα φυσικά παράγωγα . Επίσης , η δεξαμεθαζόνη στερείται τελείως αλατοκορτικοειδούς δράσης . Ο χρόνος ημιζωής της στο πλάσμα είναι 110 ως 210 λεπτά αλλά το βιολογικό της αποτέλεσμα διαρκεί από 36 ως 54 ώρες .

Κεφάλαιο 8-6-2 . Γλυκοκορτικοειδή και Μονοπύρηννα Φαγοκύτταρα .**ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ .**

Οι πρώτες αναφορές για την ύπαρξη υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , προέρχονται από τους Werb και συν. , 1978 . Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν ειδικοί υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών , υψηλής συγγένειας , στην επιφάνεια των ακέραιων και ζωντανών μονοπύρηνων φαγοκυττάρων του ανθρώπου , του μυός και του κόνικλου , όπως δείχνει ο ακόλουθος πίνακας (Werb και συν., 1978a) :

ΠΗΓΗ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΕΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ / ΚΥΤΤΑΡΟ	Kd (nM)
Μονοκύτταρα αίματος / άνθρωπος .	Δεξαμεθαζόνη	9.000	7.7
Φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα / μυς	Τριαμκινολόνη	6.100	2.1
Φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα / μυς .	Δεξαμεθαζόνη	4.300	3.7
Κύτταρα P388D1 (κυτταρική σειρά) / μυς .	Δεξαμεθαζόνη	4.200	4.0
Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα / κόκκλος .	Τριαμκινολόνη	4.500	2.6
Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα / κόκκλος .	Δεξαμεθαζόνη	4.600	1.8

Στην ίδια αυτή μελέτη διαπιστώθηκε ότι : α) Τα φυσιολογικά (μη-διεγερμένα) μονοπύρηννα φαγοκύτταρα έχουν περισσότερους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών από τα φλεγμονώδη (διεγερμένα) . β) Οι υποδοχείς αυτοί συνδέουν πολλά φυσικά και συνθετικά γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόνη , κορτιζόλη , κορτικοστερόνη , δεξαμεθαζόνη , τριαμκινολόνη , κορτεξολόνη) και την προγεστερόνη , όχι όμως την οιστραδιόλη , την τεστοστερόνη και την διυδροτεστοστερόνη . γ) Υπάρχει ικανοποιητική σύνδεση ορμόνης - υποδοχέα στις φυσιολογικά απαντώμενες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών . δ) Οι υποδοχείς αυτοί μεταφέρουν το συνδεδεμένο στεροειδές από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα . ε) Η κυτταρική σειρά μακροφάγων P388D1 , της οποίας τα κύτταρα έχουν φαινότυπο «ενεργοποιημένου» μακροφάγου , διαθέτει υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών όμοιους με εκείνους των υπόλοιπων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και μάλιστα σε αριθμό ανά κύτταρο παρόμοιο με τα φλεγμονώδη (διεγερμένα) μακροφάγα . Αυτές οι παρατηρήσεις για τους υποδοχείς στα κύτταρα P388D1 αναλύθηκαν και επεκτάθηκαν κατά πολύ σε παράλληλη δημοσίευση της ίδιας ομάδας το ίδιο χρόνο (Werb και συν., 1978b) .

Σε μια κατοπινή εργασία (Ozaki και συν., 1982) διαπιστώθηκαν ειδικοί υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και σε μονοκύτταρα από υγιείς ανθρώπους , οι οποίοι συνδέουν φυσικά και συνθετικά γλυκοκορτικοειδή και προγεστερόνη , όχι όμως οιστραδιόλη , ανδρογόνα και αλατοκορτικοειδή . Το ενδιαφέρον όμως στοιχείο αυτής της μελέτης ήταν ότι η σύγκριση με ασθενείς

που έπασχαν από Διάμεση Πνευμονική Ίνωση έδειξε πως ενώ υγιείς και ασθενείς παρουσίαζαν τον ίδιο αριθμό υποδοχέων ανά κύτταρο στα μονοκύτταρα του αίματος, τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών είχαν πολύ λιγότερους υποδοχείς ανά κύτταρο σε σχέση με τους υγιείς. Το στοιχείο αυτό αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη συσχέτισης μεταξύ αριθμού υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών και παθογένειας των πνευμονικών νόσων.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ.

Το 1980 δημοσιεύθηκαν δύο μελέτες που αφορούσαν τον μηχανισμό δράσης των γλυκοκορτικοειδών στα λευκοκύτταρα, εισάγοντας την άποψη ότι η αντιφλεγμονώδης δράση των ουσιών αυτών οφειλόταν στην ικανότητά τους να επάγουν την σύνθεση μιας ομάδας πρωτεϊνών που ανέστειλλαν την δραστηριότητα της Φωσφολιπάσης A₂ και κατά συνέπεια την παραγωγή εικοσανοειδών. Η πρώτη μελέτη (Hirata και συν., 1980) συσχέτισε την αναστολή της χημειοταξίας των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων από τα γλυκοκορτικοειδή με την επαγωγή μιας ομάδας πρωτεϊνών (μεγέθους περίπου 40.000 daltons) που ανέστειλλαν την Φωσφολιπάση A₂. Η δεύτερη μελέτη (Blackwell και συν., 1980) διαπίστωνε την αναστολή του ίδιου ενζύμου από μια πρωτεΐνη με μέγεθος περίπου 15.000 daltons, που παραγόταν συνεχώς από τα περιτοναϊκά λευκοκύτταρα. Μετά από την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών η πρωτεΐνη αυτή παρουσίαζε ταχύτατη απελευθέρωση από τα κύτταρα μέσα σε 30 ως 90 λεπτά και επανασύνθεση σε μεγάλες ποσότητες μέσα σε 3 ως 4 ώρες. Την πρωτεΐνη αυτή την ονόμασαν Μακροκορτίνη.

Μέσα στην επόμενη δεκαετία η ομάδα αυτή των πρωτεϊνών που ονομάστηκαν Λιποκορτίνες, μελετήθηκε πολύ και πιστοποιήθηκε η ικανότητα τους να αναστέλλουν την παραγωγή των χημικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Έτσι, βρέθηκε ότι πρωτεΐνες της οικογένειας των λιποκορτινών αναστέλλουν *in vitro* την δραστηριότητα της Φωσφολιπάσης A₂ των διεγερμένων βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων (Eggsafo και συν., 1988) με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή εικοσανοειδών αλλά και την μειωμένη παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου (Maridonneau-Parini και συν., 1989). Στα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) επίσης διαπιστώθηκε αναστολή της παραγωγής εικοσανοειδών από τα γλυκοκορτικοειδή, όχι όμως και της παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου (Dieter και συν., 1986). Η επίδραση της δεξαμεθαζόνης αποδόθηκε στην παρουσία μιας πρωτεΐνης (μεγέθους 40.000 daltons), που ταυτοποιήθηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα RM23 ως Λιποκορτίνη. Η δεξαμεθαζόνη φαίνεται ότι αναστέλλει ειδικά την ενδοκυττάρια Φωσφολιπάση A₂ των 85 kDa που διαθέτουν τα μακροφάγα (Gewert και Sandler, 1995). Σε μία άλλη δημοσίευση (Schultz και συν., 1985) οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η δεξαμεθαζόνη και η υδροκορτιζόνη αναστέλλουν και την Φωσφολιπάση A₂ και την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου, αλλά συμπέραναν ότι τα δύο φαινόμενα δεν συσχετίζονται, αφού χρησιμοποιώντας άλλους ειδικούς αναστολείς της Φωσφολιπάσης A₂ (μεπακρίνη, 4-βρωμοφαινακυλο-βρωμίδιο κ.α.) δεν διαπιστώθηκε μειωμένη παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου. Τέλος σε μια άλλη εργασία (Schaffner και Rellstab, 1988) αναφέρεται ότι η δεξαμεθαζόνη δεν αναστέλλει την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ανιόντος υπεροξειδίου από ανθρώπινα μονοκύτταρα, ούτε όταν αυτά είναι σε ηρεμία, ούτε μετά από ενεργοποίηση με Ιντερφερόνη-γ ή μετά από έκθεση σε *Listeria monocytogenes*. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα δεν επιτρέπουν να καθορίσουμε με βεβαιότητα εάν υπάρχει ή όχι επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και με ποιόν βιοχημικό μηχανισμό επιτυγχάνεται.

Η *in vitro* και *in vivo* αναστολή της παραγωγής προσταγλανδινών από τα μακροφάγα μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδών είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα . Αυτή φαίνεται να χαρακτηρίζει τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα , αφού τα γλυκοκορτικοειδή δεν αναστέλλουν την *in vivo* παραγωγή εικοσανοειδών από άλλα κύτταρα με υποδοχείς στεροειδών , τα οποία επίσης παράγουν λιποκορτίνες (Sebaldt και συν., 1990) . Ωστόσο , δεν αποτελεί τον μόνο μηχανισμό για την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών . Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την μεταγραφή του mRNA της Ιντερλευκίνης IL-1 β σε διεγερμένα από λιποπολυσακχαρίτη (LPS) μονοκύτταρα της σειράς U-937 , όπως επίσης ότι μειώνουν την σταθερότητα του mRNA αυτού (Lee και συν., 1988) . Επίσης , έχει διαπιστωθεί ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την έκφραση γονιδίων τα οποία μεταφράζονται μετά από ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων επίμυων μετά από ενεργοποίησή τους με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ή Ιντερφερόνη- γ (Hamilton και συν., 1989, Nagumi και Hamilton, 1990). Τέλος , η δεξαμεθαζόνη παρεμποδίζει την έκφραση των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων καταστέλλοντας την μεταγραφή του mRNA των αντιγόνων αυτών (Fertsch και συν., 1987, Fertsch-Ruggio και συν., 1988) . Αυτού του είδους οι ανασταλτικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση γονιδίων μπορεί να αποτελούν σημαντικότερες αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες από την απλή αναστολή της Φωσφολιπάσης A2 και της παραγωγής εικοσανοειδών .

Μία αξιοπεριεργή επίδραση της δεξαμεθαζόνης στα μακροφάγα , που αποτελεί συνδυασμό της επίδρασης στην παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος και της αναστολής της έκφρασης γονιδίων , είναι η εξής : Η δεξαμεθαζόνη φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της Κυκλοοξυγενάσης COX-2 (Lee και συν., 1992) . Η COX-2 (Mitogen-Inducible Cyclooxygenase) αποτελεί μια ξεχωριστή μορφή της Κυκλο-οξυγενάσης , που επάγεται στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα μετά από την έκθεσή τους στον Λιποπολυσακχαρίτη και είναι το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή εικοσανοειδών στα μακροφάγα αυτά .

Φυσικά πρέπει να αναφερθεί ότι η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα δεν αφορά μόνο τους αντιμικροβιακούς και κυτταροστατικούς τους μηχανισμούς . Ουσίες όπως η κορτιζόλη , η κορτικοστερόνη και η δεξαμεθαζόνη ασκούν γενικότερες μεταβολικές διαταραχές στα μακροφάγα , οι οποίες μπορούν να ευθύνονται μερικώς για την καταστολή της ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών . Έτσι , η επώαση φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων με γλυκοκορτικοειδή για 96 ώρες προκαλεί μια προοδευτική και δοσοεξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής αύξησης και της πρωτεϊνοσύνθεσης , μείωση του μεγέθους των κυττάρων με ταυτόχρονη αύξηση των κενοτοπίων τους και τέλος μείωση της μεταβολικής τους δραστηριότητας (πρόσληψης γλυκόζης , παραγωγής γαλακτικού και διοξειδίου του άνθρακα) και μείωση της οξίνισης του καλλιεργητικού υλικού τους (Norton και Munck , 1980) . Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες εργασίες , με την εξαίρεση της μη αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης , τόσο σε φυσιολογικά και φλεγμονώδη μακροφάγα επίμυων και ινδικών χοιριδίων , όσο και σε κύτταρα P388D1 (τα οποία εκφράζουν φαινότυπο ενεργοποιημένων μακροφάγων) και σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Werb και συν., 1978 , Werb , 1978) .

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν αναστολή της Φωσφολιπάσης A2 (μέσω των Λιποκορτινών) και μειωμένη έκκριση εικοσανοειδών (προσταγλανδινών, λευκοτριενίων, θρομβοξανίων και άλλων

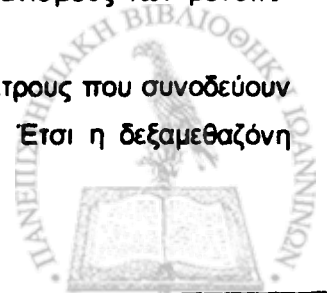


παραγώγων του αραχιδονικού οξέος) που είναι από τους βασικότερους χημικούς διαμεσολαβητές της φλεγμονής (Stenson και Parker, 1980). Ορισμένοι άλλοι ερευνητές (Maridonneau-Papini και συν., 1989, Schultz και συν., 1985) αναφέρουν επίσης αναστολή της παραγωγής Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates) που έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της τοπικής ιστικής καταστροφής (Fantone και Ward, 1982), ενώ άλλοι (Dieter και συν., 1986, Schaffner και Rellstab, 1988) αμφισβητούν τέτοια επίδραση. Αξίζει να αναφερθεί εδώ μια διαπίστωση πάνω στο φαινόμενο αυτό: Ενώ τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την αντιμικροβιακή δράση των μακροφάγων κατά οποιοδήποτε μικροοργανισμού, δεν εμποδίζουν την ενεργοποίησή τους από την Ιντερφερόνη- γ ή από διεγερμένα T-Λεμφοκύτταρα (Schaffner, 1985). Τα ενεργοποιημένα αυτά μακροφάγα φονεύουν όμως μόνο ορισμένα μικρόβια (*Listeria*, *Salmonella*) ενώ δεν είναι δραστικά απέναντι σε άλλα (*Aspergillus*, *Nocardia*). Αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η δεξαμεθαζόνη δεν επηρέαζε την παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου από μονοκύτταρα που είχαν εκτεθεί σε *Listeria*, ενώ η χορήγηση Ιντερφερόνης- γ αύξησε την παραγωγή τους στο πενταπλάσιο (Schaffner και Rellstab, 1988), οδήγησε στην εξήγηση ότι τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν μόνο τους μη-οξειδωτικούς αντιμικροβιακούς μηχανισμούς των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και όχι την παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου. Έτσι εξηγείται ότι μακροφάγα που είχαν κατασταλεί αρχικά με δεξαμεθαζόνη και στην συνέχεια ενεργοποιηθεί με Ιντερφερόνη, φόνευαν μόνο μικρόβια ευαίσθητα σε οξειδωτικούς μηχανισμούς (που δεν είχαν επηρεαστεί από το γλυκοκορτικοειδές).

Ωστόσο και η αναστολή της έκφρασης γονιδίων από τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να σχετίζεται με τον περιορισμό της τοπικής ιστικής βλάβης, αφού έχει διαπιστωθεί ότι οι ουσίες αυτές αναστέλλουν την παραγωγή και έκκριση ουδέτερων πρωτεϊνών, όπως π.χ. η Κολλαγενάση, η Ελαστάση και ο Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου σε φλεγμονώδη μακροφάγα από διάφορες ανατομικές θέσεις (περιτοναϊκά, βρογχοκυψελιδικά, μονοκύτταρα) και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα P388D1 (Werb, 1978, Werb και συν., 1978). Τα γλυκοκορτικοειδή δεν επηρεάζουν ούτε την έκκριση Λυσοζύμης ούτε την φαγοκυττάρωση, όπως φαίνεται στις ίδιες εργασίες, αναστέλλουν όμως τις ουδέτερες πρωτεϊνάσες κατά τρόπο ειδικό, αντιστρεπτό, χρονοεξαρτώμενο και δόσοεξαρτώμενο. Η έναρξη του βιολογικού τους αποτελέσματος φαίνεται μέσα σε 2 ως 5 ώρες και ο βαθμός αναστολής της έκκρισης κάθε μιας πρωτεϊνάσης είναι διαφορετικός (ο Ενεργοποιητής του Πλασμινογόνου αναστέλλεται σχεδόν πλήρως, ενώ τα άλλα δύο ένζυμα μερικώς).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή δεν επηρεάζουν την φαγοκυττάρωση από τα φλεγμονώδη μακροφάγα. Διαπιστώθηκε όμως (Waipen και Vogel, 1985) ότι η περαιτέρω ενεργοποίηση φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων με Ιντερφερόνη- γ τα κάνει ευαίσθητα στην επίδραση των γλυκοκορτικοειδών, και μάλιστα ότι μετά από την επώαση με δεξαμεθαζόνη εμφανίζεται αύξηση της Fc-φαγοκυτταρικής τους δραστηριότητας (δηλαδή φαγοκυττάρωσης μέσω υποδοχέα ανοσοσφαιρινών). Την ίδια στιγμή η επώαση ενεργοποιημένων από Ιντερφερόνη- γ φλεγμονωδών μακροφάγων με δεξαμεθαζόνη προκαλεί μείωση της έκφρασης του αντιγόνου Ia στην επιφάνεια των κυττάρων. Έχουμε δηλαδή πρόκληση δύο αντίθετων φαινομένων από την ίδια ουσία, που υποδηλώνει ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επηρεάζουν ταυτόχρονα πολλούς ανεξάρτητους μηχανισμούς των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, τον καθένα με διαφορετικό τρόπο.

Η δεξαμεθαζόνη ασκεί αντίθετες επιδράσεις σε δύο διαφορετικές παραμέτρους που συνοδεύουν την ωρίμαση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και την ενεργοποίησή τους. Έτσι η δεξαμεθαζόνη



εμποδίζει την εξαφάνιση των υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης (οι οποίοι χαρακτηρίζουν τα άωρα μονοκύτταρα) και καταστέλλει την παραγωγή του Ενεργοποιητή του Πλασμινιγόνου (που χαρακτηρίζει τα ώριμα και ενεργοποιημένα μακροφάγα) και έτσι συνολικά καταστέλλεται η ωρίμαση των μονοκυττάρων (Mokoeana και Gordon, 1985). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από μια άλλη μελέτη που δείχνει ότι η υδροκορτιζόνη και η δεξαμεθαζόνη αναστέλλουν την ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα αναστέλλοντας την αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων, την αύξηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης και της 5-Νουκλεοτιδάσης και την αύξηση της κυτταρικής πρωτεΐνης. Αντιθέτως προκάλεσαν αύξηση του αριθμού των κυστιδίων και κενοτοπίων στα μονοκύτταρα (Rinehart και συν., 1982). Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την σαφή τάση να εμποδίζουν την ωρίμαση των μονοκυττάρων και την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στους αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακούς και κυτταροστατικούς μηχανισμούς των μακροφάγων δεν είναι πάντα κατασταλτικές. Έχει αναφερθεί ότι η βραχύχρονη *in vitro* έκθεση βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων σε χαμηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης τα ενεργοποιεί, έτσι ώστε η κατοπινή διέγερσή τους με ενδοτοξίνη να τα κάνει ικανά να παράγουν ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες νιτρικού οξειδίου και Ιντερλευκίνης-1β (Broug-Holub και Kraal, 1996). Αντιθέτως, η χρήση μακρόχρονης επώασης με υψηλή δόση γλυκοκορτικοειδούς οδηγεί στην καταστολή της έκκρισης νιτρικού οξειδίου και Ιντερλευκίνης-1β. Οι συγγραφείς απέδωσαν το εύρημα τους στην διαφορετική συγγένεια των θέσεων σύνδεσης του συμπλέγματος κορτικοστεροειδούς-υποδοχέα στο DNA για το σύμπλεγμα αυτό. Οι θέσεις αυτές λέγονται Glucocorticoid Responsive Elements (GRE) και μπορούν να ευωδώνουν ή να αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων του γλυκοκορτικοειδούς. Έτσι, οι χαμηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης προκαλούσαν εκλεκτική σύνδεση στα θετικά GRE, με αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση των γονιδίων της Ιντερλευκίνης-β και της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου, ενώ η αύξηση της δόσης ή του χρόνου επώασης προκαλούσε σύνδεση του συμπλέγματος γλυκοκορτικοειδούς-υποδοχέα και με αρνητικά GRE, με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Ωστόσο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν την αύξηση της μεταγραφής του mRNA της πρωτεΐνης IκB στα μονοκύτταρα. Η IκB συνδέεται στον παράγοντα NFκB και τον εμποδίζει να προκαλέσει την έκφραση της iNOS (Bames και Karin, 1997).



Κεφάλαιο 8-7. Ινσουλίνη .

8-7-1. Γενικά στοιχεία για την ινσουλίνη .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ .

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτιδίο που αποτελείται από δύο διαφορετικές αλυσίδες αμινοξέων (Α- και Β- αλυσίδα) που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς . Στον άνθρωπο , η ινσουλίνη έχει Μοριακό Βάρος 5808 Daltons και η Α-αλυσίδα αποτελείται από 21 αμινοξέα , ενώ η Β-αλυσίδα αποτελείται από 30 αμινοξέα . Και οι δύο αλυσίδες εμφανίζουν περιοχές με διάταξη α-έλικας . Οι μεμονωμένες α- και β- αλυσίδες είναι βιολογικά αδρανείς (Greenspan, 1991) .

Από είδος σε είδος παρουσιάζονται μικρές διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων στο μόριο της ινσουλίνης (π.χ. η ανθρώπινη ινσουλίνη διαφέρει από την χοίρειο κατά ένα μόνο αμινοξύ) . Αυτές οι διαφορές δεν επηρεάζουν την βιολογική της δραστηριότητα σε ετερόλογα είδη , την καθιστούν όμως αντιγονική και προάγουν τον σχηματισμό αντί-ινσουλινικών αντισωμάτων . Αυτό εξηγεί και την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη βοός ή χοίρου που χορηγείται υποδορίως στους διαβητικούς ασθενείς (Ganong, 1989 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

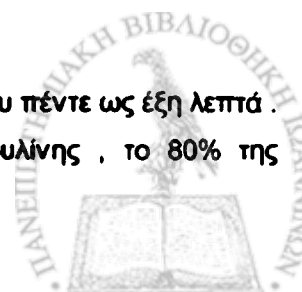
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ινσουλίνη έχει απομονωθεί στον άνθρωπο . Εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 και αποτελείται από δύο ιντρόνια και τρία εξόνια .

Η ινσουλίνη συνθέτεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των Β-κυττάρων του παγκρέατος και στην συνέχεια μεταφέρεται στην συσκευή Golgi , όπου αθροίζεται σε κοκκία που περιβάλλονται από μεμβράνη . Μέσα στα κοκκία τα μόρια της ινσουλίνης σχηματίζουν εξαμερή μαζί με δύο μόρια Zn^{2+} και κρυσταλλώνονται . Αυτά τα κοκκία κινούνται προς την κυτταρική μεμβράνη με ένα μηχανισμό που απαιτεί την συμμετοχή των μικροσωληνίσκων . Η μεμβράνη των κοκκίων συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη , με αποτέλεσμα την εξωκύτωση του περιεχομένου τους . Η ινσουλίνη στην συνέχεια διαπερνά την βασική μεμβράνη μεταξύ των Β-κυττάρων και των τριχοειδών και εισέρχεται στην αιματική κυκλοφορία μέσα από τις θυρίδες του ενδοθηλίου (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .

Όπως και άλλες ορμόνες που συνθέτονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο , η ινσουλίνη αρχικά συνθέτεται με την μορφή ενός μεγάλου προδρόμου μορίου , της Προ-προϊνσουλίνης (Preproinsulin) . Μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο αφαιρείται μία αλληλουχία-οδηγός 23 αμινοξέων και το υπόλοιπο πεπτιδίο μεταφέρεται στην συσκευή Golgi , όπου διπλώνεται και σχηματίζονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί , δημιουργώντας έτσι την Προϊνσουλίνη . Στην Προϊνσουλίνη η Α- και η Β-αλυσίδα είναι ενωμένες μεταξύ τους σε ένα γραμμικό μόριο , μέσω ενός πεπτιδίου 31 αμινοξέων που λέγεται C-πεπτιδίο . Το C-πεπτιδίο έχει και αυτό μικρή βιολογική δραστηριότητα ινσουλίνης . Μέσα στα κοκκία των Β-κυττάρων υπάρχουν ενδοπεπτιδάσες (όπως οι Ενδοπρωτεάσες PC2 / PC3 και η καλλικρεΐνη) που απομακρύνουν το C-πεπτιδίο και μετατρέπουν έτσι την Προϊνσουλίνη σε ινσουλίνη . Η μέτρηση του C-πεπτιδίου στο πλάσμα είναι ένας καλός δείκτης της παραγωγής ινσουλίνης από τα β-κύτταρα .

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

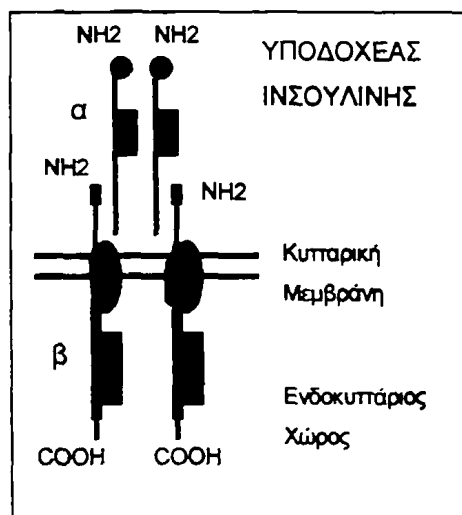
Ο χρόνος ημιζωής της ινσουλίνης στο ανθρώπινο πλάσμα είναι περίπου πέντε ως έξη λεπτά . Αν και όλοι σχεδόν οι ιστοί έχουν την δυνατότητα αποδόμησης της ινσουλίνης , το 80% της



εκκρινόμενης ορμόνης μεταβολίζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς, ενώ σημαντικό μέρος της ορμόνης αποδομείται στους μύες. Έχουν περιγραφεί τρεις διαφορετικοί τρόποι αδρανοποίησης της ινσουλίνης. Ο ένας αφορά την ενζυματική πρωτεόλυση των πεπτιδικών αλυσίδων μέσα στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα, ενώ οι άλλοι δύο αφορούν την διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες μεταξύ τους. Ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στην διαδικασία μεταβολισμού της ινσουλίνης είναι η Ηπατική Γλουταθειονική Τρανσυδρογονάση της Ινσουλίνης (Hepatic Glutathione Insulin Transhydrogenase) που σπάει το μόριο της ινσουλίνης σε α- και β-αλυσίδες. Επίσης σημαντικά ένζυμα στον μεταβολισμό της ορμόνης είναι μια μικρή οικογένεια από Θειολικές Μεταλλοπρωτεϊνάσες (Goodman-Gilman και συν., 1996).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

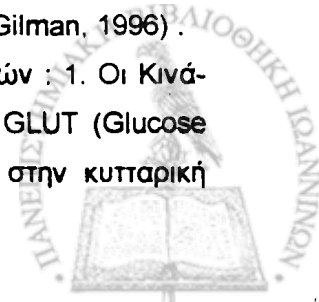
Η ινσουλίνη ασκεί μία πλειάδα από διαφορετικές μεταβολικές επιδράσεις, από τις οποίες κάποιες πραγματοποιούνται σε δευτερόλεπτα ή λεπτά και κάποιες μετά από πολλές ώρες. Δηλαδή, η ινσουλίνη ενεργοποιεί πολλούς διαφορετικούς ενδοκυττάριους μηχανισμούς, οι οποίοι έχουν ως κοινή αφετηρία την σύνδεση του μορίου της με τον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης. Ο μεμβρανικός υποδοχέας της ινσουλίνης έχει απομονωθεί και κλωνοποιηθεί, και έτσι σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι μία σύμπλοκη γλυκοπρωτεΐνη με Μοριακό Βάρος περίπου 340.000 Daltons. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι ένα τετραμερές, που αποτελείται από δύο α- και δύο β- γλυκοπρωτεϊνικές αλυσίδες, με Μοριακά Βάρη 135.000 και 95.000 Daltons αντίστοιχα. Οι α-αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους και με τις β-αλυσίδες με δισουλφιδικούς δεσμούς (Pike και συν., 1986). Στις α-υπομονάδες, που βρίσκονται εξολοκλήρου εξωκυτάρια, βρίσκονται οι περιοχές που συνδέουν την ινσουλίνη. Στις β-υπομονάδες, που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, υπάρχουν περιοχές (μέσα στο κύτταρο) με δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης, που ενεργοποιούν τους ενδοκυττάριους μηχανισμούς.



Όταν η ινσουλίνη συνδέεται με τις α-υπομονάδες του υποδοχέα της, διεγείρονται οι περιοχές των β-υπομονάδων που έχουν δραστηριότητα Κινάσων Τυροσίνης και αρχικά αυτοφωσφορυλιώνονται, ενώ στην συνέχεια αρχίζουν να φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες και ένζυμα (κινάσες, φωσφατάσες, κ.α.) (Fantl και συν., 1993). Η πρώτη πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνεται είναι μια κυταροπλασματική πρωτεΐνη με Μ.Β. 185.000 Daltons, η IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1). Η πρωτεΐνη IRS-1 χρησιμεύει στην σύνδεση άλλων πρωτεϊνών με Περιοχές SH2 (Src Homology 2 domains), όπως η 3'-Κινάση των Φωσφοϊνοσιτιδίων (PI-3-Kinase) και η Grb2-πρωτεΐνη. Η

3'-Κινάση ενεργοποιεί άλλα ένζυμα που έχουν μιτογόνο δραστηριότητα. Η Grb2-πρωτεΐνη προκαλεί την σύνδεση της Ras-ογκοπρωτεΐνης με GTP και με την Raf-1 Κινάση, η οποία ενεργοποιεί τις MAP-Κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases), που έχουν μιτογόνο δράση (Goodman-Gilman, 1996).

Παλαιότερα είχαν προταθεί δύο μηχανισμοί για την δράση των Κινάσων αυτών: 1. Οι Κινάσες της Τυροσίνης φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες όπως τους Μεταφορείς Γλυκόζης GLUT (Glucose Transporters), την τρανσφερρίνη και διάφορους υποδοχείς που μεταναστεύουν στην κυτταρική



μεμβράνη και διευκολύνουν την είσοδο ουσιών στο κύτταρο . 2. Οι Κινάσες της Τυροσίνης φωσφορυλιώνουν την Φωσφολιπάση C , η οποία δημιουργεί τους Δεύτερους Μηνύτορες (διακυλογλυκερόλη, φωσφορική ινοσιτόλη, φωσφατιδυλο-ινοσιτολο-γλυκάνη) που ενεργοποιούν τα υπόλοιπα ενζυμικά συστήματα , όπως π.χ. την Πρωτεϊνική Κινάση C και άλλες κινάσες ή φωσφατάσες , που με την σειρά τους ενεργοποιούν άλλα ένζυμα . Έτσι, η Ακετυλοσυνένζυμο-Καρβοξυλάση και η Ριβοσωμική Πρωτεΐνη S6 ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση , ενώ η Συνθετάση του Γλυκογόνου και η Πυρουβική Αφυδρογονάση ενεργοποιούνται με την αποφωσφορυλίωσή τους . Οι δύο θεωρίες αυτές ενσωματώθηκαν μερικώς στα καινούργια δεδομένα (Lamer, 1990 , O'Brien και Granner , 1991) .

Η αυτοφωσφορυλίωση των β-υπομονάδων του υποδοχέα σε θέσεις τυροσίνης είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της δραστηριότητάς του στην φωσφορυλίωση άλλων υποστρωμάτων (αυτοκαταλυτική δράση) . Αν όμως ο υποδοχέας φωσφορυλιωθεί σε θέσεις σερίνης ή θρεονίνης από την Πρωτεϊνική Κινάση C ή την Πρωτεϊνική Κινάση A , η δραστηριότητα του υποδοχέα της ινσουλίνης καταστέλλεται (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Οι επιδράσεις της ινσουλίνης μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες , ανάλογα με την ταχύτητα με την οποία επιτελούνται και τον μηχανισμό που τις διαμεσολαβεί . Έτσι , διακρίνουμε τις ταχείες επιδράσεις , που πραγματοποιούνται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα ή λεπτά και οφείλονται στην διάνοιξη διαύλων ιόντων και στην φωσφορυλίωση πρωτεϊνών (π.χ. η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα από τον Μεταφορέα Γλυκόζης) , τις ενδιάμεσες επιδράσεις που πραγματοποιούνται σε λίγες ώρες και απαιτούν την επαγωγή ή αναστολή γονιδίων (π.χ. η επαγωγή της Αποκαρβοξυλάσης της Ορνιθίνης και της Αμινοτρανσφεράσης της Τυροσίνης και η αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου της Φωσφοενολοπυρουβικής Καρβοξυκινάσης) και τέλος τις όψιμες αντιδράσεις , που πραγματοποιούνται σε πολλές ώρες ή και ημέρες και απαιτούν την κυτταρική υπερπλασία και διαφοροποίηση .

Όταν συνδεθούν μόρια ινσουλίνης στους υποδοχείς , οι γειτονικοί υποδοχείς συμπλησιάζουν και συσσωματώνονται (aggregation) και το συσσωμάτωμα ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται σε λυσοσώματα , όπου και διασπάται ή ανακυκλώνεται και τελικά επιστρέφει στην μεμβράνη . Έτσι , ο χρόνος ημιζωής του υποδοχέα ινσουλίνης στην μεμβράνη των κυττάρων είναι περίπου 7 ώρες .

Σχεδόν όλα τα είδη κυττάρων των θηλαστικών διαθέτουν υποδοχείς ινσουλίνης . Ωστόσο , υπάρχουν μεγάλες διαφορές στον αριθμό των υποδοχέων , αφού κυμαίνεται από 40 υποδοχείς ανά κύτταρο για τα ερυθρά αιμοσφαίρια , ως 300.000 υποδοχείς ανά κύτταρο για τα ηπατοκύτταρα και τα λιποκύτταρα . Ο αριθμός των υποδοχέων ινσουλίνης και η συγγένειά τους για το μόριο της ινσουλίνης μεταβάλλονται και ρυθμίζονται από παράγοντες όπως η άσκηση , η επάρκεια τροφής και επιδράσεις από άλλες ορμόνες . Έτσι , τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης προκαλούν μείωση του αριθμού των υποδοχέων της , ενώ τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης προκαλούν αυξημένη συγγένεια για το μόριό της . Η παρατεταμένη νηστεία αυξάνει τον αριθμό των υποδοχέων ανά κύτταρο , ενώ η παχυσαρκία και η Ακρομεγαλία (υπερέκκριση Αυξητικής Ορμόνης) τους μειώνουν . Η συγγένεια των υποδοχέων για την ινσουλίνη αυξάνει σε υποκορτιζολισμό , ενώ μειώνεται σε υπερκορτιζολισμό .

Τέλος , πρέπει να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας της ινσουλίνης ανήκει σε μία ευρύτερη οικογένεια υποδοχέων που διαθέτουν δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης (Receptor Associated Tyrosine Kinases) . Την οικογένεια αυτή αποτελούν οι υποδοχείς των Αυξητικών Παραγόντων (Growth Factors) , όπως ο Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) , ο

Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) , ο Παράγοντας Διέγερσης Αποικιών-1 (Colony Stimulating Factor-1, CSF-1) και ο Ινσουλινόμορφος Αυξητικός Παράγοντας (IGF-1) .

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Μέσα στο πλάσμα υπάρχουν πολλές ουσίες με ινσουλινική δραστηριότητα , εκτός της ίδιας της ινσουλίνης . Για παράδειγμα , μόνο ένα μικρό μέρος της πρόσληψης της γλυκόζης στον λιπώδη ιστό οφείλεται στην δράση της ινσουλίνης . Το υπόλοιπο της δράσης οφείλεται σε άλλες ουσίες , όπως οι Ινσουλινόμορφοι Αυξητικοί Παράγοντες (Insulin-like Growth Factors , IGF-1 και IGF-2) , η Προϊνσουλίνη και μια πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζεται Μη-καταστέλλομενη Ινσουλινόμορφη πρωτεΐνη (NSILP) (Greenspan, 1991 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Οι Ινσουλινόμορφοι Αυξητικοί Παράγοντες IGF-1 και IGF-2 είναι σωματομεδίνες , δηλαδή πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες , που πιθανώς διαμεσολαβούν κάποιες από τις δραστηριότητες της Αυξητικής Ορμόνης . Η δομή τους μοιάζει με αυτήν της προϊνσουλίνης και το μοριακό βάρος τους είναι περίπου 7500 Daltons . Σε αντίθεση με την ινσουλίνη , παράγονται και από άλλους ιστούς εκτός από το πάγκρεας . Ο υποδοχέας της ινσουλίνης παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον υποδοχέα της IGF-1 , ενώ ο υποδοχέας της IGF-2 είναι αρκετά διαφορετικός . Για τον λόγο αυτό , είναι πιθανό ότι η επίδραση της ινσουλίνης στην κυτταρική αύξηση (υπερπλασία) και διαφοροποίηση ασκείται μέσω του υποδοχέα του IGF-1 . (Bobik και Campbell, 1993 , LeRoith, 1997) .

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΑ ΟΡΓΑΝΑ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ .

Οι επιδράσεις της ινσουλίνης είναι κυρίως μεταβολικές . Οι πιο σημαντικές από τις επιδράσεις αυτές συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ .

1. Αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και ιόντων καλίου από τα λιποκύτταρα .
2. Αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων και φωσφορικής γλυκερόλης .
3. Αυξημένη αποθήκευση τριγλυκεριδίων .
4. Ενεργοποίηση της Λιποπρωτεϊνικής Λιπάσης , αναστολή της κυτταρικής Ινσουλινοευαίσθητης Λιπάσης .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΜΥΙΚΟ ΙΣΤΟ .

1. Αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης , ιόντων καλίου , αμινοξέων και κετονοσωμάτων από τις μυϊκές ίνες .
2. Αυξημένη σύνθεση γλυκογόνου και αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών από τα ριβοσώματα .
3. Μειωμένος καταβολισμός πρωτεϊνών .
4. Μειωμένη απελευθέρωση αμινοξέων που συμμετέχουν στην γλυκονογένεση .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ .

1. Μειωμένη παραγωγή κετονοσωμάτων .
2. Αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων .
3. Μειωμένη γλυκονογένεση και μειωμένη παραγωγή γλυκόζης .
4. Αυξημένη σύνθεση γλυκογόνου .

ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ .

1. Αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη (πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση) και γενικότερη αναβολική δράση .



Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνουμε εύκολα ότι η συνολική επίδραση της ινσουλίνης στο σώμα είναι η αποθήκευση των θρεπτικών ουσιών με την μορφή γλυκογόνου , πρωτεϊνών , τριγλυκεριδίων και VLDL-λιποπρωτεϊνών . Για να επιτύχει τον σκοπό αυτό επιδρά σε μία σειρά από ενζυμικά συστήματα , επάγοντας και διεγείροντας την Συνθετάση του Γλυκογόνου , την Λιποπρωτεϊνική Λιπάση , την Γλυκοκινάση , την Εξοκινάση-II και τα Ριβοσωμικά ένζυμα , ενώ καταστέλλει τα γλυκονεογενετικά και γλυκογονολυτικά ένζυμα , την Ενδοκυττάρια Ινσουλινουευσίσθητη Λιπάση , την Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου και άλλα καταβολικά ένζυμα . (O'Brien και Granper, 1991) .

Η κυριότερη από τις επιδράσεις της ινσουλίνης αφορά την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα . Η διεργασία αυτή επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό Υποβοηθούμενης Διάχυσης (Facilitated Diffusion) , ο οποίος απαιτεί την μεσολάβηση έξι ειδικών μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών με M.B. 50 kDa , που λέγονται Μεταφορείς Γλυκόζης (Glucose Transporters) . Οι Μεταφορείς GLUT1 ως GLUT5 διευκολύνουν την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα , ενώ ο GLUT7 ανευρίσκεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου . Η ινσουλίνη όχι μόνο προάγει την σύνθεσή τους , αλλά επίσης προκαλεί την μετακίνησή τους (translocation) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη όπου γίνονται λειτουργικοί (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Επίσης , η ινσουλίνη επιδρά στα α-κύτταρα του παγκρέατος , όπου καταστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης . Έμμεσα ή άμεσα όμως , δρα σε όλα τα είδη κυττάρων του σώματος .

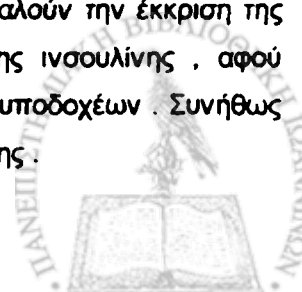
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ .

Ένας φυσιολογικός ενήλικας εκκρίνει καθημερινά περίπου 40 μονάδες (287ημοι) ινσουλίνης , με αποτέλεσμα στο περιφερικό φλεβικό αίμα του νήστεως να υπάρχουν μέχρι 70×10^6 μονάδες ανά ml (502 ημοι/Lt) ινσουλίνης όπως μετρώνται με RIA .

Η έκκριση της ινσουλίνης επηρεάζεται από μία ποικιλία παραγόντων , που είτε επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ή επιδρούν στο cAMP των β-κυττάρων του παγκρέατος . Ωστόσο , επειδή για την έκκριση της ινσουλίνης είναι απαραίτητα τα ιόντα Ca^{+2} και K^+ , είναι πιθανό ότι παράγοντες που αυξάνουν το ενδοκυττάριο Ca^{+2} προκαλούν την αυξημένη έκκριση ινσουλίνης .

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκκριση της ινσουλίνης είναι τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος , η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη των β-νησιδίων του παγκρέατος μέσω του Μεταφορέα Γλυκόζης GLUT-2 . Η γλυκόζη διεγείρει μία Γλυκοκινάση και μεταβάλλει την αναλογία ATP/ADP , που προκαλεί την αναστολή των Εξαρτημένων από το ATP Διαύλων K^+ και την εκπόλωση της μεμβράνης , ανοίγοντας έτσι τους διαύλους ασβεστίου (Ca^{+2}) . Το αποτέλεσμα της αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου είναι η έκκριση της ινσουλίνης που έχει ήδη συντεθεί και η σύνθεση νέων ποσοτήτων της ορμόνης . Η μαννόζη αποτελεί επίσης ισχυρό διεγέρτη της έκκρισης ινσουλίνης , όπως και η φρουκτόζη σε μικρότερο βαθμό . Τέλος , ορισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λευκίνη, κ.α.) και τα β-κετοξέα είναι επίσης ισχυροί διεγέρτες της έκκρισης ινσουλίνης .

Επίσης , ουσίες που προκαλούν την αύξηση του cAMP (π.χ. οι β-αδρενεργικοί αγωνιστές, η γλυκαγόνη, η θεοφυλλίνη και άλλοι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης) προκαλούν την έκκριση της ινσουλίνης . Ειδικά οι κατεχολαμίνες παίζουν διττό ρόλο στην έκκριση της ινσουλίνης , αφού αναστέλλουν την έκκριση της μέσω α_2 -υποδοχέων και την διεγείρουν μέσω β_2 -υποδοχέων . Συνήθως η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη προκαλούν αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης .



Η έκκριση ινσουλίνης βρίσκεται υπό νευρική ρύθμιση . Το δεξιό πνευμονογαστρικό νεύρο νευρώνει τα νησίδια του παγκρέατος και προκαλεί την έκκριση ινσουλίνης μέσω της ακετυλοχολίνης , η οποία ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C και αυξάνει έτσι το ενδοκυττάριο ασβέστιο . Αντιθέτως , οι κλάδοι των συμπαθητικών νεύρων προκαλούν την αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης , μέσω της νοραδρεναλίνης . Έτσι , καταστάσεις stress που προκαλούν διέγερση του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. υποθερμία, υποξία, τραυματισμοί και εγκαύματα) προκαλούν καταστολή της έκκρισης ινσουλίνης μέσω α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων . (Ganong , 1989 , Greenspan , 1991) .

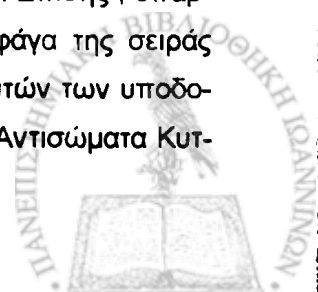
Η έκκριση της ινσουλίνης βρίσκεται υπό ορμονικό έλεγχο . Εντερικές ορμόνες όπως η γαστρίνη , η χολοκυστοκίνη (CCK) , η σεκρετίνη , η γλυκαγόνη και το Γαστρικό Ανασταλτικό Πεπτίδιο (Gastric Inhibitory Peptide, GIP) διεγείρουν την έκκριση της ινσουλίνης , ενώ αντιθέτως η σωματοστατίνη την καταστέλλει . Από όλες αυτές τις ορμόνες , το GIP φαίνεται να αποτελεί τον ισχυρότερο διεγέρτη και ίσως τον κύριο ρυθμιστή της έκκρισης (Greenspan, 1991) .

Τέλος , πρέπει να αναφερθεί ότι η μακροχρόνια και έντονη υπεργλυκαιμία , όπως και η υπερέκκριση ινσουλίνης από οποιαδήποτε αιτιολογία , οδηγεί αρχικά στην υπερτροφία των β -κυττάρων του παγκρέατος και στην συνέχεια στην λειτουργική εξάντλησή τους (β -cell exhaustion) , η οποία ακολουθείται από υδρωπική ή υαλοειδή εκφύλιση τους και τέλος στην νέκρωσή τους .

8-7-2. Η ινσουλίνη και τα Μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Η ανίχνευση υποδοχέων ινσουλίνης στην επιφάνεια των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία (Blecher και Goldstein, 1977 , Bautista και συν., 1987 , όπως αναφέρονται στην ανασκόπηση των Gordon και συν., 1988) . Επίσης , δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ανίχνευση υποδοχέων ινσουλίνης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων του αίματος στον άνθρωπο , όπου διαπιστώθηκε όχι μόνο η ύπαρξή τους , αλλά και η μεταβολή του αριθμού και της συγγένειας των υποδοχέων αυτών για τον υποκαταστάτη τους στον σακχαρώδη διαβήτη , στην παχυσαρκία και στον υποσιτισμό (Schwartz και συν., 1975 , Bar και συν., 1976 , Bhathena και συν., 1981) . Ο αριθμός των υποδοχέων ινσουλίνης στα ανθρώπινα μονοκύτταρα υπολογίστηκε ότι είναι 15.000 - 28.000 υποδοχείς ανά κύτταρο (Bar και συν., 1976) αλλά εξαρτάται και από την ωριμότητα των μονοκυττάρων : η ωρίμανση των μονοκυττάρων με καλσιτριόλη (Βιταμίνη D_3) ή με υδροκορτιζόνη αυξάνει την σύνδεση της ινσουλίνης στους μονοκυτταρικούς υποδοχείς , ενώ η ωρίμανση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων με Ρετινοϊκό οξύ μειώνει την σύνδεση της ινσουλίνης (Rouis και συν., 1985) .

Εξάλλου , υπάρχουν αρκετές εργασίες που διαπιστώνουν την συμμετοχή αυτών των υποδοχέων της ινσουλίνης σε φυσιολογικές διεργασίες στα μακροφάγα . Κάποιες μελέτες αναφέρουν την ανασταλτική επίδραση που έχει η ινσουλίνη στην έκφραση των Fc-υποδοχέων στα φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα (Rhodes, 1975) και στην φαγοκυττάρωση μέσω του Fc-υποδοχέα στα φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα και στα μακροφάγα J774.2 (Muschel και συν., 1977) . Επίσης , υπάρχουν εργασίες που διαπιστώνουν την ύπαρξη υποδοχέων ινσουλίνης στα μακροφάγα της σειράς P388D₁ , στα σπληνικά μακροφάγα και στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και ότι μέσω αυτών των υποδοχέων ασκείται η κατασταλτική επίδραση που έχει η ινσουλίνη στην Εξαρτημένη από Αντισώματα Κυτταροτοξικότητα (ADCC) των μακροφάγων (Bar και συν., 1977) .



Ο μηχανισμός δράσης της Ινσουλίνης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της PI-3-Κινάσης (3-Κινάσης των Φωσφοϊνοσιτιδίων) . Έχει αποδειχθεί ότι η PI-3-Κινάση των μακροφάγων συμμετέχει στους μηχανισμούς των Φαγοκύτωσης μέσω Fc-υποδοχέων και της μακροπνοκύτωσης . Το ένζυμο αυτό δεν συμμετέχει στην δημιουργία των ψευδοποδίων , αλλά στην σύγκλεισή τους σε ενδοσώματα (Araki και συν.,1996) . Ωστόσο η Ινσουλίνη φαίνεται να προκαλεί τα αντίθετα αποτελέσματα .

Η ινσουλίνη φάνηκε να έχει ισχυρή επίδραση στις λειτουργίες των ανθρώπινων μονοκυττάρων που καλλιεργήθηκαν για επτά ημέρες και διαφοροποιήθηκαν *in vitro* σε ώριμα μακροφάγα . Συγκεκριμένα , η ινσουλίνη προκαλεί μείωση του αριθμού των υποδοχέων TNF στα μακροφάγα καθώς και μειωμένη παραγωγή TNF από τα μακροφάγα και μειωμένη ικανότητα φόνευσης και λύσης των Μυκοβακτηριδίων στελέχους *M. avium* (Bermudez και συν., 1990) .

Ωστόσο , τα αποτελέσματα μιας μελέτης για την επίδραση της ινσουλίνης πάνω στα μονοκύτταρα του αίματος δεν έδειξαν κάποια ανταπόκριση στην ορμόνη (Lavis και συν., 1980) . Πιο συγκεκριμένα , η ινσουλίνη δεν φάνηκε να επηρεάζει ούτε την δραστηριότητα της Αδενυλικής Κυκλάσης στα ανθρώπινα μονοκύτταρα και στα μονοκύτταρα της κυτταρικής σειράς P388D1 , ούτε την μετατροπή γλυκόζης σε γλυκογόνο (γλυκογονογένεση) στα κύτταρα αυτά . Τέλος , η ινσουλίνη δεν φάνηκε να επηρεάζει ούτε την Εξαρτημένη από Αντισώματα Κυτταροτοξικότητα (ADCC) των μονοκυττάρων . Είναι πιθανό ότι στα μονοκύτταρα οι υποδοχείς της ινσουλίνης δεν συμμετέχουν ακόμα στις φυσιολογικές διεργασίες , ενώ ενεργοποιούνται μετά την ωρίμανση του μονοκυττάρου σε ιστικό μακροφάγο . Έτσι δεν είναι περίεργο ότι στα διαβητικούς επίμυες Wistar-BB με χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης υπήρχε σημαντική καταστολή της φαγοκυττάρωσης και καταστροφής του σταφυλόκοκκου από τα ώριμα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , ενώ η θεραπεία με ινσουλίνη διόρθωνε σε μεγάλο βαθμό αυτή την δυσλειτουργία των μακροφάγων (Sima και συν.,1988) .



Κεφάλαιο 8-8 . Γλυκαγόνη .

8-8-1. Γενικά στοιχεία για την Γλυκαγόνη .

ΔΟΜΗ , ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ .

Η Γλυκαγόνη είναι ένα γραμμικό πολυπεπτιδίο που στον άνθρωπο έχει μοριακό βάρος 3.485 Daltons και περιέχει 29 αμινοξέα . Παρουσιάζει σημαντική ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων της με αρκετές άλλες πολυπεπτιδικές ορμόνες , όπως η Σεκρετίνη (Secretin), το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτιδίο (Vasoactive Intestinal Peptide) και το Γαστρεντερικό Ανασταλτικό Πολυπεπτιδίο (Gastrointestinal Inhibitory Polypeptide) . Επίσης , το γονίδιο που κωδικοποιεί την γλυκαγόνη έχει απομονωθεί και στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 .

Το μόριο της γλυκαγόνης από όλα τα είδη θηλαστικών έχει σχεδόν την ίδια δομή . Μάλιστα , είναι ακριβώς το ίδιο στον άνθρωπο , τα βοοειδή , τον χοίρο και τον επίμου .

Η γλυκαγόνη εντοπίζεται στο πάγκρεας και στον εντερικό βλεννογόνο , μαζί με ένα συγγενές μόριο που ονομάζεται Γλυκεντίνη (Glicentin) . Η γλυκεντίνη έχει μερική δραστηριότητα γλυκαγόνης και το καρβόξυ-τελικό άκρο της είναι ένα μόριο γλυκαγόνης που έχει επταυξηθεί κατά ένα οκταπεπτιδίο στο καρβόξυ-τελικό του άκρο (Greenspan, 1991) .

Η ανθρώπινη γλυκαγόνη παράγεται από τα Α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος (παγκρεατική γλυκαγόνη) και από τα L-κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου (εντερο-γλυκαγόνη) . Η εντερογλυκαγόνη είναι λίγο διαφορετική από το παγκρεατικό μόριο αφού στο καρβόξυτελικό άκρο της είναι επταυξημένη κατά ένα εξαπεπτιδίο .

Η ανθρώπινη Προ-προγλυκαγόνη είναι ένα πολυπεπτιδίο με 179 αμινοξέα , που περιέχει ένα μόριο γλυκεντίνης στο άμινο-τελικό του άκρο , ένα μόριο γλυκαγόνης και δύο ακόμα πεπτιδία (GLP-1 και GLP-2) που έχουν δομή παρόμοια με την γλυκαγόνη αλλά άγνωστη λειτουργία . Η γλυκαγόνη ανιχνεύεται στο κέντρο των κοκκίων των Α-κυττάρων , ενώ η γλυκεντίνη ανιχνεύεται στην περιφέρεια των ίδιων κοκκίων (Ganong, 1989 , Greenspan, 1991) .

Ο χρόνος ημιζωής της γλυκαγόνης στην κυκλοφορία είναι περίπου 5 - 10 λεπτά της ώρας (κατά άλλους 3 - 6 λεπτά . Σε υγιείς νήστευσι ανθρώπους η γλυκαγόνη έχει μέση τιμή στο πλάσμα 75 pg/ml (25 pmol/Lt) , αλλά μόνο το 30-40% είναι πραγματικά γλυκαγόνη , λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης που δίνουν η προγλυκαγόνη , η γλυκεντίνη και τα πεπτιδία GLP-1 και GLP-2 . Επειδή η γλυκαγόνη εκκρίνεται στην πυλαία φλέβα και φέρεται απευθείας στο ήπαρ , τα επίπεδά της στο περιφερικό αίμα είναι σχετικά χαμηλά , εκτός από τους ασθενείς με κίρρωση του ήπατος όπου υπάρχει μειωμένη ηπατική αποδόμηση . Αντιθέτως , στο αίμα της πυλαίας φλέβας έχει πολύ υψηλά επίπεδα (300 - 500 pg/ml ή 100 - 166 pmol/Lt) . Επίσης , η έκκριση της γλυκαγόνης υφίσταται ρύθμιση και συχνά υπάρχουν αυξημένα επίπεδα γλυκαγόνης στο αίμα μετά από την διέγερση της έκκρισής της .

Αποδομείται σε πολλούς ιστούς , αλλά κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς και στο πλάσμα . Η πρωτεολυτική αφαίρεση της ιστιδίνης από το αμινοτελικό άκρο της στερεί την βιολογική της δραστηριότητα (Greenspan, 1991) .



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ .

Η γλυκαγόνη δρα μέσω κυτταροπλασματικών υποδοχέων , οι οποίοι έχουν εντοπιστεί σε διάφορους ιστούς . Το μοριακό βάρος των υποδοχέων αυτών είναι περίπου 60 kDa και η φύση τους είναι γλυκοπρωτεϊνική , όμως δεν έχουν απομονωθεί ακόμα (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Όταν η παγκρεατική γλυκαγόνη συνδέεται στους υποδοχείς των ηπατοκυττάρων προκαλεί ενεργοποίηση της Αδενυλικής Κυκλάσης μέσω Gs-πρωτεϊνών , αυξάνοντας έτσι το cAMP και ενεργοποιώντας έτσι την Πρωτεϊνική Κινάση Α (cAMP-Dependent Protein Kinase) . Και η εντερογλυκαγόνη συνδέεται στους υποδοχείς των ηπατοκυττάρων και ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση , αλλά έχει μόλις το 10 - 20 % της δραστικότητας του παγκρεατικού μορίου .

Η γλυκαγόνη δρα και μέσω άλλων υποδοχέων στο ηπατοκύτταρο , προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση της Φωσφολιπάσης C , παραγωγή διακυλογλυκερόλης και τριφωσφορικής ινοσιτόλης και αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} . Έχει αποδειχθεί ότι η Γλυκαγόνη συνδέεται σε δύο τύπους υποδοχέων , τους GR-1 (λειτουργούν μέσω PLC) και τους GR-2 (δρουν μέσω Αδενυλικής Κυκλάσης) . Η σύνδεση της Γλυκαγόνης στους GR-1 υποδοχείς προκαλεί ενεργοποίηση της PLC και της PKC και απευαισθητοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση των GR-2 υποδοχέων . Η φυσιολογική σημασία αυτής της επίδρασης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη . (Murphy και συν., 1987) .

Όταν ενεργοποιείται η Πρωτεϊνική Κινάση Α , φωσφορυλιώνει άλλα ένζυμα . Η φωσφορυλίωση της Φωσφορυλάσης την ενεργοποιεί (αυξάνοντας την γλυκογονόλυση) ενώ η φωσφορυλίωση της Συνθετάσης του Γλυκογόνου την αδρανοποιεί (μειώνοντας την επανασύνθεση του γλυκογόνου) . Η Πρωτεϊνική Κινάση Α φωσφορυλιώνει επίσης ένα ένζυμο με αμφίδρομη δραστηριότητα κινάσης/φωσφατάσης (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase) που ρυθμίζει και την γλυκογονόλυση και την γλυκονογένεση .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ .

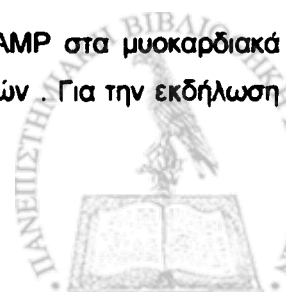
Η γλυκαγόνη έχει κυρίως μεταβολική δράση , προκαλώντας γλυκογονόλυση , γλυκονογένεση, λιπόλυση και κετογένεση . Ο κύριος φυσιολογικός της ρόλος είναι να εξασφαλίζει την προσφορά ενέργειας στους ιστούς στο διάστημα ανάμεσα στα γεύματα .

1. Η γλυκαγόνη προκαλεί γλυκογονόλυση (στο ήπαρ , αλλά όχι στους γραμμωτούς μύες) και υπεργλυκαιμία . Στην γλυκογονόλυση συμμετέχει η οδός του cAMP - Πρωτεϊνικής Κινάσης Α .

2. Η γλυκαγόνη αυξάνει την γλυκονογένεση (από αμινοξέα) στο ήπαρ και αυξάνει τον μεταβολικό ρυθμό . Στην διαδικασία αυτή συμμετέχει και η αναστολή της δραστηριότητας ενός βασικού για την γλυκόλυση ενζύμου , της Φωσφοφρουκτοκινάσης-1 , όπως επίσης η αυξημένη μεταγραφή γονιδίου του ενζύμου Φωσφοένολο-πυρουβική-καρβοξυκινάση .

3. Η γλυκαγόνη αυξάνει την παραγωγή κετονοσωμάτων , μειώνοντας το ηπατικό μαλόλυλο-συνένζυμο Α και την δυνατότητα μετατροπής (εστεροποίησης) των λιπαρών οξέων ξανά σε τριγλυκερίδια και αυξάνοντας την οξειδωσή τους σε κετονοσώματα . Στην αυξημένη κετογένεση συμμετέχει και η αύξηση της λιπόλυσης την οποία προκαλεί η γλυκαγόνη .

4. Στο μυοκάρδιο ασκεί θετική ινóτροπη δράση , αυξάνοντας το cAMP στα μυοκαρδιακά κύτταρα , χωρίς παράλληλα να αυξάνει την διεγερσιμότητα των κυττάρων αυτών . Για την εκδήλωση της δράσης αυτής απαιτούνται πολύ μεγάλες δόσεις εξωγενούς γλυκαγόνης .



5. Η γλυκαγόνη διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης , της ινσουλίνης και της παγκρεατικής σωματοστατίνης .

6. Τμήμα της δραστηριότητας που αποδίδεται στην γλυκαγόνη στην πραγματικότητα ίσως οφείλεται στα πεπτίδια GLP-1 και GLP-2 , των οποίων η παραγωγή αυξάνεται μετά από γεύματα . Είναι γνωστό ότι το τμήμα 7-37 του GLP-1 είναι ισχυρότατος διεγέρτης της έκκρισης ινσουλίνης , με πολλαπλάσια ισχύ σε σχέση με την ίδια την γλυκαγόνη .

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ .

Η ρύθμιση της έκκρισης της γλυκαγόνης γίνεται κυρίως από μεταβολικές παραμέτρους . Έτσι , η παρουσία ορισμένων αμινοξέων (γλυκογονικά αμινοξέα : αλανίνη, σερίνη, γλυκίνη, κυστεΐνη, θρεονίνη) μετά από γεύμα πλούσιο σε πρωτεΐνες , προκαλεί αυξημένη έκκριση γλυκαγόνης .

Η έκκριση της γλυκαγόνης αναστέλλεται από την υπεργλυκαιμία , αλλά για την αναστολή είναι απαραίτητη και η παρουσία της ινσουλίνης . Επίσης , η αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των κετονοσωμάτων οδηγεί στην μειωμένη έκκριση γλυκαγόνης .

Ορμόνες όπως η χολοκυστοκίνη-παγκρεατοζυμίνη , η γαστρίνη και η κορτιζόλη αυξάνουν την έκκριση γλυκαγόνης , ενώ ουσίες όπως η σωματοστατίνη και η σεκρετίνη την καταστέλλουν .

Η διέγερση των συμπαθητικών νεύρων του παγκρέατος προκαλεί , μέσω β-υποδοχέων και αύξησης του cAMP, αυξημένη έκκριση γλυκαγόνης . Αν και η διέγερση των α-αδρενεργικών υποδοχέων στα Α-κύτταρα προκαλεί ελάττωση της έκκρισης γλυκαγόνης , η δράση των β-υποδοχέων υπερισχύει της δράσης των α-υποδοχέων και το τελικό αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ορμονική έκκριση . Όμως και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα (πνευμονογαστρικό νεύρο) προκαλεί έκκριση της γλυκαγόνης , μέσω της ακετυλοχολίνης .

Οι διάφορες μορφές καταπόνησης του σώματος , όπως π.χ. η έντονη μυϊκή άσκηση , η αιτία ή παρατεταμένη νηστεία , οι λοιμώξεις και η ψυχολογική καταπόνηση , οδηγούν επίσης σε αυξημένη έκκριση γλυκαγόνης λόγω συμπαθητικής διέγερσης και αύξησης της κορτιζόλης του πλάσματος .

8-8-2. Η Γλυκαγόνη και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Η Γλυκαγόνη είναι μία ορμόνη που έχει κυρίως μεταβολική δράση και για τον λόγο αυτό δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα σαν παράγοντας που θα τροποποιούσε την δράση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων .

Υπάρχουν κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές για ύπαρξη ειδικών υποδοχέων γλυκαγόνης στην επιφάνεια των μακροφάγων (Blecher και Goldstein (1977) , όπως αναφέρεται από τους Gordon και συν., 1988) . Επίσης , έχει ανιχνευθεί η ύπαρξη ειδικών υποδοχέων γλυκαγόνης στην επιφάνεια των μονοκυττάρων του αίματος στον άνθρωπο (Bathena S.J., 1981) . Ωστόσο είναι ελάχιστες οι μελέτες για την ύπαρξη κάποιων φυσιολογικών ή φαρμακολογικών επιδράσεων της γλυκαγόνης στην λειτουργία των μακροφάγων .

Σε μία τέτοια μελέτη διερευνήθηκε η πιθανότητα επίδρασης της γλυκαγόνης στην Αδενυλική Κυκλάση των περιτοναϊκών μακροφάγων επίμυων . Δεν διαπιστώθηκε επίδραση της γλυκαγόνης στην δραστηριότητα της Αδενυλικής Κυκλάσης ή στα επίπεδα του cAMP (Smith και συν., 1980) .



Σε μία άλλη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της γλυκαγόνης στην ικανότητα των ανθρώπινων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων να φονεύουν φαγοκυτταρωμένα μυκοβακτηρίδια (*M. avium*) μετά από διέγερση με TNF (Bermudez και συν., 1990). Διαπιστώθηκε ότι η γλυκαγόνη δεν είχε καμία επίδραση στην μικροβιοκτόνο δράση των μακροφάγων, αν και στην ίδια μελέτη γίνεται αναφορά στην ικανότητα της γλυκαγόνης να μειώνει τον αριθμό των υποδοχέων TNF στην επιφάνεια των κυττάρων.



Κεφάλαιο 8-9 . Προσταγλανδίνες .

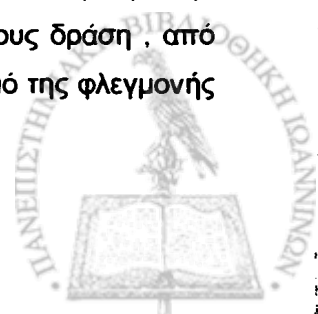
8-9-1. Γενικά στοιχεία για τις προσταγλανδίνες και τα άλλα εικοσανοειδή .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ , ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ .

Οι προσταγλανδίνες και οι άλλοι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια παραγώγων των λιπαρών οξέων με σημαντικές βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις . Με ένα όνομα μπορούν να χαρακτηριστούν «εικοσανοειδή» λόγω της δομής τους : αποτελούν όλες παράγωγα του αραχιδονικού οξέος , το οποίο περιέχει είκοσι άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του και τέσσερεις διπλούς δεσμούς και για τον λόγο αυτό συμβολίζεται ως 20:4 .

Ονοματολογία και συμβολισμοί για προσταγλανδίνες , λευκοτριένες και θρομβοξάνες : Τα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος χωρίζονται σε ορισμένες βασικές κατηγορίες , ανάλογα με το ειδικό ενζυμικό σύστημα που συμμετέχει στην βιοσύνθεσή τους . Η πρώτη ομάδα των εικοσανοειδών είναι οι προσταγλανδίνες (prostaglandins) που διαθέτουν όλες έναν όμοιο κυκλοπεντανικό δακτύλιο . Συμβολίζονται με το πρόθεμα PG- που ακολουθείται από ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου από το Α ως το J (PGA ως PGJ) , ανάλογα με τους υποκαταστάτες που συνδέονται στις θέσεις C9 και C11 του κυκλοπεντανικού δακτυλίου τους . Επίσης φέρουν έναν αριθμητικό δείκτη , ο οποίος φανερώνει τον αριθμό των διπλών δεσμών στην αλειφατική τους αλυσίδα (π.χ. PGD₁ , PGE₂) . Ωστόσο , οι προσταγλανδίνες είναι αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους , αφού οι PGE και PGD είναι υδροξυκετόνες , οι PGF είναι 1,3-διόλες , οι PGG και PGH είναι κυκλικά ενδοϋπεροξειδία και οι PGA , PGB και PGC είναι ακόρεστες κετόνες . Η δεύτερη ομάδα εικοσανοειδών είναι οι θρομβοξάνες (thromboxanes) που χαρακτηρίζονται από έναν δακτύλιο οξάνης/οξετάνης (oxan:oxetane ring) αντί για κυκλοπεντανικό δακτύλιο . Συμβολίζονται με το πρόθεμα TX- και ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου μαζί με αριθμητικό δείκτη για τους διπλούς δεσμούς (π.χ. TXA₂ , TXB₂) . Η τρίτη ομάδα των εικοσανοειδών αποτελείται από έναν μόνο μόριο , την προστακυκλίνη (prostacyclin , PGI₂) έχει σημαντική διαφορά στην δομή και την δράση της από τις προσταγλανδίνες και τις θρομβοξάνες . Η τέταρτη ομάδα είναι οι λευκοτριένες (leukotrienes) που οφείλουν το όνομά τους στο χαρακτηριστικό τριενικό υποκαταστάτη (-C₅H₁₁), που τους προσδίδει ιδιαίτερο φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες . Το πρόθεμα LT- ακολουθείται από ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου (από Α έως Ε) και έναν αριθμητικό δείκτη που υποδηλώνει τον αριθμό των διπλών δεσμών του μορίου .

Τα εικοσανοειδή , όπως θα φανεί στις επόμενες παραγράφους , έχουν δράση αυτοκρινική , παρακρινική και ενδοκρινική . Αυτό σημαίνει ότι επιδρούν και στα ίδια κύτταρα που τις παράγουν και σε παρακείμενα κύτταρα στα οποία φτάνουν με διάχυση από την μεσοκυττάρια ουσία και τέλος σε πολύ απομακρυσμένα κύτταρα στα οποία μεταφέρονται με το αίμα . Ωστόσο , επειδή η δράση τους είναι κυρίως παρακρινική και ο χρόνος ζωής τους είναι μικρός , τα εικοσανοειδή έχουν συμπεριληφθεί σε μία κατηγορία ουσιών που ονομάζονται αυτακοειδή και περιλαμβάνουν και την ισταμίνη , την σεροτονίνη και την βραδυκινίνη . Τα αυτακοειδή χαρακτηρίζονται από την τοπική τους δράση , από τον βραχύ χρόνο ημιζωής τους αλλά κυρίως από την συμμετοχή τους στον μηχανισμό της φλεγμονής (Davies και συν., 1984 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .



ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Οι προσταγλανδίνες και τα συγγενή τους βιοδραστικά λιπίδια , που συλλήβδην ονομάζονται εικοσανοειδή , προέρχονται όλα από το ίδιο πρόδρομο μόριο , το αραχιδονικό οξύ . Το αραχιδονικό οξύ είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με είκοσι άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του και τέσσερις διπλούς δεσμούς με *cis*-διαμόρφωση , στις θέσεις 5-6 , 8-9 , 11-12 και 14-15 (*cis*-5,8,11,14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ) . Το αραχιδονικό οξύ (20:4) είτε προσλαμβάνεται διαιτητικά ή συνθέτεται από το λινολεϊκό οξύ (18:2) με ενδιάμεσο παράγωγο το διομο-γ-λινολεϊκό οξύ (20:3) . Επειδή στα θηλαστικά το λινολεϊκό οξύ δεν μπορεί να συντεθεί *de novo* είναι απαραίτητη η διαιτητική του πρόσληψη (Sigal , 1991 , Greenspan , 1991) .

Οι προσταγλανδίνες και τα άλλα εικοσανοειδή δεν αποθηκεύονται μέσα στα κύτταρα αλλά παράγονται και εκκρίνονται ταχύτατα . Ο ρυθμός παραγωγής τους εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του αραχιδονικού οξέος . Το αραχιδονικό οξύ βρίσκεται «αποθηκευμένο» σε φωσφολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες και σε άλλους εστέρες λιπιδίων και απελευθερώνεται υπό την επίδραση Φωσφολιπασών , τις οποίες ενεργοποιούν διάφοροι διεγέρτες . Τέτοιοι διεγέρτες είναι π.χ. οι ενδοτοξίνες , το *zymosan* και ο PAF . Η απελευθέρωση και η απομάκρυνση του αραχιδονικού οξέος από τα γλυκεροφωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται από την Φωσφολιπάση A₂ ή από την Φωσφολιπάση C σε συνδυασμό με την Λιπάση των Διγλυκεριδίων , που σπάνε τον sn-2 εστερικό δεσμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων . Στην περίπτωση της Φωσφολιπάσης A₂ διασπάζεται άμεσα ο sn-2 εστερικός δεσμός του φωσφολιπιδίου (συνήθως φωσφατιδυλική αιθανολαμίνη ή φωσφατιδυλική χολίνη) . Αντιθέτως η Φωσφολιπάση C σπάζει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό και δημιουργεί ένα 1,2-διγλυκερίδιο , από το οποίο αφαιρεί το αραχιδονικό οξύ η Λιπάση των Διγλυκεριδίων (μαζί με μία Λιπάση Μονογλυκεριδίων) . Η ενεργοποίηση των Φωσφολιπασών A₂ ή C , που είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις μεμβράνες , οφείλεται είτε στην ένωση των διεγερτών με ειδικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες ή στην αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ (Irvine , 1982 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Από την στιγμή που απελευθερώνεται το αραχιδονικό οξύ , μπορεί να οξειδωθεί από τα ένζυμα τριών διαφορετικών μεταβολικών οδών : (1) την οδό της Κυκλοοξυγενάσης , (2) την οδό της Λιπooξυγενάσης ή (3) την οδό του Κυτοχρώματος P-450 (Επooξυγενάση) . Επειδή τα διαφορετικά είδη κυττάρων δεν διαθέτουν τα ίδια ενζυμικά συστήματα , παράγουν διαφορετικούς μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος . Έτσι τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν κυρίως PGE₂ και PGI₂ , τα αιμοπετάλια παράγουν κυρίως TXA₂ και 12-HETE , ενώ αντιθέτως ο πνεύμονας , ο σπλήνας και τα μακροφάγα παράγουν σχεδόν όλα τα διαφορετικά είδη των εικοσανοειδών (Samuelsson και συν., 1978 , Irvine, 1982 , Greenspan, 1991 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ .

1. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ .

Οι προσταγλανδίνες παράγονται από το αραχιδονικό οξύ υπό την επίδραση μικροσωμιακών ενζύμων . Το πρώτο από αυτά είναι η Κυκλοοξυγενάση (Prostaglandin Endoperoxide Synthase , Συνθετάση των Ενδοϋπεροξειδίων Προσταγλανδινών) , που υφίσταται σαν δύο διακριτά ισoenζυμα που συμβολίζονται COX-1 και COX-2 . Η COX-1 εκφράζεται συνεχώς από τα κύτταρα , ενώ η COX-2 επάγεται στα κύτταρα υπό την επίδραση Αυξητικών Παραγόντων και Κυτταροκινών . Η επαγωγή της

COX-2 αναστέλλεται από την δεξαμεθαζόνη και άλλα γλυκοκορτικοειδή . Κάθε μία από αυτές τις Κυκλοοξυγενάσες έχει δύο διαφορετικές ενζυματικές δράσεις . Η πρώτη είναι η δραστηριότητα της Συνθετάσης Ενδοϋπεροξειδίων που οξυγονώνει και κυκλοποιεί το αραχιδονικό οξύ και το μετατρέπει σε PGG , ενώ η δεύτερη είναι η δραστηριότητα Υπεροξειδάσης που μετατρέπει την PGG σε PGH .

Το αρχικό βήμα στην βιοσύνθεση των προσταγλανδινών από το αραχιδονικό οξύ , είναι η πρόσληψη δύο μορίων οξυγόνου (O_2) με την βοήθεια της Κυκλοοξυγενάσης και η δημιουργία του ασταθούς ενδοϋπεροξειδίου PGG₂ , του οποίου η C15-υδρουπεροξυομάδα ανάγεται σε υδροξυλική ομάδα από την υπεροξειδάση , δίνοντας γένεση στο ασταθές ενδοϋπεροξειδίο PGH₂ . Στην συνέχεια το ενδοϋπεροξειδίο αυτό μπορεί να μεταβλιστεί σε κάποια προσταγλανδίνη ή σε προστακυκλίνη ή σε θρομβοξάνη TXA₂ . Από το ενδοϋπεροξειδίο PGH₂ συνήθως παράγονται οι προσταγλανδίνες PGE₂ ή PGD₂ , ανάλογα με ποια ισομεράση διαθέτει ο συγκεκριμένος ιστός . Στην συνέχεια , η PGE₂ μπορεί να μεταβλιστεί σε PGF₂ από την 9-Κετοαναγωγή της Προσταγλανδίνης E .

Σε ότι αφορά τις PGA , PGB και PGC , αυτές αποτελούν τα μη - ενζυμικά παράγωγα της PGE που σχηματίζονται κατά τις διαδικασίες εκχύλισης της και πιθανώς δεν υφίστανται στην φύση .

2. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΚΥΚΛΙΝΗΣ .

Το ενδοϋπεροξειδίο PGH₂ μπορεί να μεταβλιστεί από την Συνθετάση των Θρομβοξανίων στην βιολογικά δραστική TXA₂ , η οποία είναι ασταθής ουσία και υδρολύεται αυτόματα μέσα σε 30 - 60 δευτερόλεπτα , δίνοντας γένεση στην βιολογικά αδρανή TXB₂ . Το ίδιο μικροσωματικό ένζυμο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή δύο άλλων μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος , συγκεκριμένα της μαλονοδιαλδεΰδης και του 12-υδρόξυ-επταδεκατριενοϊκού οξέος , που όμως έχουν άγνωστη βιολογική σημασία (Samuelsson και συν., 1978) .

Κυρίως τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα διαθέτουν την Συνθετάση των Θρομβοξανίων και παράγουν θρομβοξάνες . Αντιθέτως τα ενδοθηλιακά κύτταρα , οι ινοβλάστες , τα λεία μυϊκά κύτταρα αλλά και τα μακροφάγα διαθέτουν το ένζυμο Συνθετάση της Προστακυκλίνης , με την οποία μετατρέπουν το PGH₂ σε προστακυκλίνη PGI₂ . Η προστακυκλίνη είναι βιολογικά δραστική και έχει τις αντίθετες φαρμακολογικές επιδράσεις από την TXA₂ . Είναι επίσης ασταθής ουσία και μέσα σε 3 - 6 λεπτά υδρολύεται αυτόματα σε 6-κετο- PGF_{1α} (Samuelsson και συν., 1978).

Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΕΠΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ (ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P450) .

Το αραχιδονικό οξύ μπορεί να μεταβλιστεί από τα μικροσωματικά ένζυμα (μονοοξυγενάσες) του κυτοχρώματος P450 , που επίσης ονομάζονται και Εποξυγενάσες . Τα ένζυμα αυτά προκαλούν την ω-οξειδωση του αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή ποικίλων εποξειδίων καθώς και άλλων μεταβολιτών με πολύπλοκες βιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις (αγγειακές , νεφρικές και ενδοκρινικές) αλλά με άγνωστη συμμετοχή στις φυσιολογικές δραστηριότητες του οργανισμού .

Η ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ .

Η τρίτη οδός μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος επιτελείται από τις Λιποοξυγενάσες , οι οποίες αποτελούν μια οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων που οξυγονώνουν πολυενικά λιπαρά οξέα σε σημεία όπου δύο cis- διπλοί δεσμοί χωρίζονται από μεθυλενική ομάδα . Οι Λιποοξυγενάσες ενσωματώνουν ένα μόριο οξυγόνου στην πολυακόρεστη αλειφατική αλυσίδα του αραχιδονικού οξέος συνήθως στις θέσεις C5 ή C12 ή C15 , δημιουργώντας εκεί μία υδρόξυ-υπεροξομάδα . Το τελικό

αποτέλεσμα είναι η δημιουργία κάποιου υδρόξυ-υπερόξυ-εικοσιτετραενοϊκού μεταβολίτη (5-HPETE , 12-HPETE ή 15-HPETE) , ο οποίος είναι ασταθής και μετατρέπεται ταχύτατα από τις κυτταρικές Υπεροξειδάσες ή και αυτόματα στον αντίστοιχο υδρόξυ-εικοσιτετραενοϊκό μεταβολίτη (5-HETE , 12-HETE ή 15-HETE) . Αυτοί οι τελευταίοι είναι βιολογικά δραστικοί και μεταβολίζονται σε παράγωγα που επίσης είναι βιοδραστικά (Sigal , 1991) .

Ωστόσο , το κεντρικό και σημαντικότερο βήμα σε όλη αυτή την βιοσυνθετική οδό είναι η ενεργοποίηση των Λιπooξυγενασών . Μόνο η 5-Λιπooξυγενάση συμβάλλει στην δημιουργία των Λευκοτριενίων , ενώ οι υπόλοιπες λιπooξυγενάσες οδηγούν στην δημιουργία των Λιποξινών (Lipoxins) και των βιολογικά δραστικών άλλων τριυδρο-εικοσιτετραενοϊκών οξέων . Η ενεργοποίηση της 5-Λιπooξυγενάσης απαιτεί την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , την συνένωση του ενζύμου με την ειδική FLAP-πρωτεΐνη (Five-Lipoxygenase Activating Protein) και την σύνδεση του συμπλόκου με τις κυτταρικές μεμβράνες (Sigal , 1991) . Αφού το αραχιδονικό οξύ μετατραπεί σε 5-HPETE από την 5-Λιπooξυγενάση , στην συνέχεια αφυδατώνεται σε Λευκοτριένη A_4 (LTA₄) από μία Δευδράση (LTA-Synthase) . Η LTA₄ είναι ένα 5,6-εποξειδίο που είτε υδρολύεται σε LTB₄ από την Υδρολάση των Εποξειδίων (Epoxyde Hydrolase) ή μετατρέπεται στην πεπτιδολευκοτριένη LTC₄ με την προσθήκη του τριπεπτιδίου γλουταθειόνη από το ένζυμο Γλουταθειονική-S-Τρανσφεράση (Glutathione-S-Transferase) . Η αφαίρεση του γλουταμικού οξέος από γ-Γλουταμυλική-Τρανσπεπτιδάση (γ-Glutamyl-Transpeptidase) οδηγεί στον σχηματισμό της LTD₄ . Τέλος , η αφαίρεση μιας γλυκινικής ομάδας από μία Διπεπτιδάση οδηγεί στον σχηματισμό της LTE₄ , ενώ η προσθήκη πάλι γλουταμικού οξέος στην LTE₄ δημιουργεί την LTF₄ .

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Οι προσταγλανδίνες καταβολίζονται ταχύτατα στο σώμα , εξαιτίας αποδομητικών ενζύμων σε διάφορα όργανα του σώματος όπως οι πνεύμονες , οι νεφροί , ο σπλήνας , ο λιπώδης ιστός και το έντερο . Έτσι για παράδειγμα , σχεδόν το 97% μιας ενδοφλέβιας δόσης PGE₂ έχει αποδομηθεί μέσα σε 90 δευτερόλεπτα . Το μικροαγγειακό δίκτυο του πνεύμονα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αποδόμηση των προσταγλανδινών , αλλά και των λευκοτριενίων . Αντιθέτως , οι θρομβοξάνες και η προστακυκλίνη υφίστανται ταχύτατη αυτόματη υδρόλυση στο αίμα .

Αρχικά , η υδροξυλική ομάδα στον C15 (που είναι υπεύθυνη για την βιολογική δραστηριότητα των εικοσανοειδών) οξειδώνεται σε κετονομάδα από την 15-Υδρόξυ-Αφυδρογονάση των Προσταγλανδινών (PGDH) . Στην συνέχεια προσθέτονται δύο υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις C13 και C14 από την Δ^{13} -Αναγωγή των Προσταγλανδινών , με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός 13,14-διυδρόξυ-15-κέτο-εικοσανοειδούς . Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας . Από το σημείο αυτό υπάρχουν τρεις διαφορετικές μεταβολικές οδοί για την περαιτέρω αποδόμηση των προσταγλανδινών . Η μία οδός αφορά την δημιουργία αδρανών διυδρόξυ-εικοσανοειδών υπό την επίδραση της 15-Κετοαναγωγής των Προσταγλανδινών . Οι άλλες δύο οδοί αφορούν αντίστοιχα την β-οξείδωση και την ω-οξείδωση των εικοσανοειδών και την δημιουργία πολωμένων δικαρβοξυλικών οξέων που αποβάλλονται ελεύθερα στα ούρα . Η β-οξείδωση και η ω1-οξείδωση καταλύονται από τις Μονοοξυγενάσες του Κυτοχρώματος P450 στα κύτταρα του νεφρού και του ήπατος και καταβολίζουν σχεδόν όλα τα εικοσανοειδή (Greenspan , 1991 , Sigal , 1991) .

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν όλες τις γνωστές οδούς παραγωγής των εικοσανοειδών , διότι παρεμποδίζουν την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις κυτταρικές μεμβράνες . Αυτό συμβαίνει επειδή τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών εξαρτημένων από το Ca^{2+} , που λέγονται Λιποκορτίνες . Οι Λιποκορτίνες αναστέλλουν την Φωσφολιπάση A_2 και έτσι δεν επιτρέπουν την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος και κατά συνέπεια δεν παράγονται μεταβολίτες ούτε από την οδό της Κυκλοοξυγενάσης , ούτε από τις οδούς της Επιοξυγενάσης και της Λιπooξυγενάσης . Επίσης , τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την έκφραση της Κυκλοοξυγενάσης-2 .

Αντιθέτως , τα σαλικυλικά (μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη) αναστέλλουν μόνο την παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανίων , αφού ακετυλιώνουν και αδρανοποιούν την Κυκλοοξυγενάση κατά μη-αναστρέψιμο τρόπο . Ιδιαίτερα έντονη είναι η αναστολή της Κυκλοοξυγενάσης των αιμοπεταλίων , με αποτέλεσμα την διακοπή της παραγωγής TXA_2 . Επειδή όμως τα αιμοπετάλια δεν διαθέτουν πυρήνα είναι αδύνατη η αποκατάσταση της παραγωγής θρομβοξανίων με την de novo παραγωγή Κυκλοοξυγενάσης . Αντιθέτως , η παραγωγή λευκοτριενίων δεν επηρεάζεται από τα σαλικυλικά .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Τα εικοσανοειδή προκαλούν μια πλειάδα από διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις , που όλες φαίνονται να προκαλούνται από την αύξηση είτε του cAMP ή του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Για αυτό και οι συσταλτικές ή χαλαρωτικές επιδράσεις των εικοσανοειδών στις λείες μυϊκές ίνες του αγγειακού , ουροποιογεννητικού , αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος μπορούν αντίστοιχα είτε να ανασταλούν με αναστολείς διαύλων του ασβεστίου (calcium channel blockers) ή να επιταθούν με αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης . Όλες αυτές οι επιδράσεις απαιτούν την συνένωση του μορίου του εικοσανοειδούς με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες . Έχουν ανιχνευτεί μέχρι σήμερα έξη τύποι υποδοχέων για τις προσταγλανδίνες , δύο τύποι υποδοχέων για τις θρομβοξάνες και τρεις τύποι υποδοχέων για τις λευκοτριένες , όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα .

ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΜΥΝΗΤΟΡΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙ
DP	PGD ₂	Διέγερση Αδενυλικής Κυκλάσης , αύξηση του cAMP .
FP	PGF _{2a}	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
EP1	PGE1/PGE2	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
EP2	PGE1/PGE2	Διέγερση Αδενυλικής Κυκλάσης , αύξηση του cAMP .
EP3	PGE1/PGE2	Καταστολή Αδενυλικής Κυκλάσης , μείωση του cAMP .
EP4	PGE1/PGE2	Διέγερση Αδενυλικής Κυκλάσης , αύξηση του cAMP .
IP	PGI ₂	Διέγερση Αδενυλικής Κυκλάσης , αύξηση του cAMP .
TP (non-platelet)	TXA ₂	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
TP (platelet)	TXA ₂	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
LTB ₄ -receptor	LTB ₄	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
LTC ₄ -receptor	LTC ₄	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .
LTD ₄ / LTE ₄ -receptor	LTD ₄ , LTE ₄	Φωσφολιπάση C , παραγωγή IP ₃ και DAG , αύξηση Ca^{+2} .

Οι υποδοχείς των προσταγλανδινών χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες (DP, FP, EP και IP) ανάλογα με τον αγωνιστή που συνδέουν, αλλά οι EP-υποδοχείς χωρίζονται με την σειρά τους σε τέσσερις τύπους (EP1, EP2, EP3 και EP4). Επίσης, οι υποδοχείς των θρομβοξανών χωρίζονται σε δύο τύπους, ανάλογα με την εντόπισή τους ή όχι στα αιμοπετάλια (TP-non-platelet και TP-platelet).

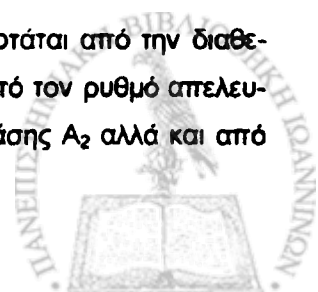
Οι προσταγλανδίνες των σειρών PGE, PGD και PGI συνήθως προκαλούν την αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP. Τα ενδοκρινικά όργανα που λειτουργούν μέσω της αύξησης του cAMP ανταποκρίνονται στις παραπάνω προσταγλανδίνες. Αυτές ασκούν στον Θυρεοειδή αδένα την ίδια επίδραση με την TSH και στα Ωχρά Σωμάτια των ωθηκών την ίδια επίδραση με την LH. Οι ίδιες προσταγλανδίνες επηρεάζουν και άλλους βιολογικούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από το cAMP, όπως την λιπόλυση. Ωστόσο, οι PGE₁ και PGE₂ μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να προκαλέσουν την αναστολή της Αδενυλικής Κυκλάσης και συνεπώς την μείωση του ενδοκυττάριου cAMP, ή ακόμα να δράσουν μέσω της Φωσφολιπάσης C και να προκαλέσουν την παραγωγή IP₃ και DAG και την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺. Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο στην κατανόηση της πολυπλοκότητας του μηχανισμού δράσης των προσταγλανδινών της σειράς E είναι ότι η PGE₁ δρα και μέσω των IP-υποδοχέων (δηλαδή των υποδοχέων της PGI₂), ενώ η PGE₂ δρα και μέσω των IP- και των DP-υποδοχέων. (Samuelsson και συν., 1978, Goodman-Gilman και συν., 1996).

Τα λευκοτριένια, τα θρομβοξανία, τα ενδοϋπεροξειδία και η PGF_{2α} δρουν πάντα μέσω της Φωσφολιπάσης C και προκαλούν την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca²⁺), η οποία συνήθως προκαλεί την σύσπασση των λείων μυϊκών ινών, όπως συμβαίνει π.χ. στο μυομήτριο μετά από την επίδραση της PGF_{2α} ή στα αρτηρίδια μετά από την επίδραση της TXA₂.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΙΔΩΝ.

Η παραγωγή και η δραστηριότητα των εικοσανοειδών βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση. Έτσι, ορισμένα είδη εικοσανοειδών προκαλούν την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις κυτταρικές μεμβράνες και την συνεπακόλουθη αυξημένη παραγωγή τους, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μηχανισμού θετικής παλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback regulation) που προάγει την δημιουργία τους. Για παράδειγμα, οι λευκοτριένες προκαλούν την αυξημένη παραγωγή θρομβοξανών από τα περιτοναϊκά μακροφάγα. Επίσης και οι θρομβοξανές προκαλούν την αύξηση της παραγωγής τους από τα αιμοπετάλια, με τον ακόλουθο μηχανισμό: η σύνδεση της TXA₂ με τους TP-υποδοχείς ενεργοποιεί την Φωσφολιπάση C και προκαλεί την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺ και στην συνέχεια την εξωκυττάρωσή του. Το εξωκυττάριο ασβέστιο προάγει την συγκόλληση άλλων αιμοπεταλίων, που με την σειρά τους ενεργοποιούνται και εκκρίνουν TXA₂. Ταυτοχρόνως, σε ορισμένα είδη κυττάρων η αυξημένη παραγωγή κάποιων εικοσανοειδών μπορεί να προκαλέσει μείωση του αριθμού ή της ευαισθησίας των υποδοχέων για τα μόρια αυτά. Τέλος, η αύξηση του cAMP από προσταγλανδίνες (όπως η PGE₂) μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της Φωσφολιπάσης A₂ και την διακοπή της παραγωγής προσταγλανδινών, δηλαδή σε μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback regulation).

Η παραγωγή των προσταγλαδινών και των άλλων εικοσανοειδών εξαρτάται από την διαθεσιμότητα ελεύθερου αραχιδονικού οξέος, η οποία με την σειρά της εξαρτάται από τον ρυθμό απελευθέρωσής του από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια με την δράση της Φωσφολιπάσης A₂ αλλά και από



την ταχύτητα επανασύνδεσής του στις μεμβράνες με την δράση της Ακυλοτρανσφεράσης (Kroneg και συν. , 1981 . Irvine , 1982) . Η κυτταροπλασματική Φωσφολιπάση A_2 των 85 kDa είναι κυρίως υπεύθυνα για την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος , αφού έχει εκλεκτική επίδραση σε φωσφολιπίδια με sn-2 αραχιδονικό υποκαταστάτη . Το ένζυμο αυτό εξαρτάται από το ενδοκυττάριο Ca^{+2} για την μεταγωγή του (translocation) από το κυτταρόπλασμα στις μεμβράνες όπου ενεργοποιείται . Διάφοροι νευρομεταβιβαστές όπως η ντοπαμίνη , η νοραδρεναλίνη , η αδενοσίνη , η ακετυλοχολίνη και η σεροτονίνη προκαλούν αύξηση του κυτταρικού Ca^{+2} και έτσι , λόγω της αυξημένης μεταγωγής του ενζύμου στην μεμβράνη , επιτείνουν την δράση της Φωσφολιπάσης A_2 (Piomelli , 1993) . Επίσης , παράγοντες όπως οι Ιντερφερόνες INF α και INF γ και η σεροτονίνη μπορούν να διεγείρουν άμεσα την PLA $_2$ και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος . Αντιθέτως , παράγοντες που αναστέλλουν την δράση των G-πρωτεϊνών της οικογένειας G_0 / G_i (π.χ. η τοξίνη του κοκκύτη) αναστέλλουν την δραστηριότητα της Φωσφολιπάσης A_2 και την παραγωγή εικοσανοειδών . Τέλος , παράγοντες που διεγείρουν την Πρωτεϊνική Κινάση C προκαλούν αυξημένη παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος , γιατί η PKC φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MAP-κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases) , που με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την PLA $_2$ (Piomelli , 1993) .

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Σχεδόν όλα τα είδη των κυττάρων από όλα τα ζωικά είδη παράγουν κάποιους από τους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος (προσταγλανδίνες , θρομβοξανές ή λευκοτριένες) , οι οποίοι είναι ζωτικής σημασίας για την αιμόσταση , την φλεγμονή και την επούλωση . Ωστόσο οι ουσίες αυτές συμμετέχουν και σε πολλές άλλες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες , που αναφέρονται περιληπτικά στον ακόλουθο πίνακα .

ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

PGD $_2$, PGE $_2$, PGI $_2$.

Αύξηση του cAMP .
Αγγειοδιαστολή
Κυτταροπροστατευτική δράση .
Μειωμένη συγκόλληση λευκοκυττάρων .
Μειωμένος πολσμος Τ-λεμφοκυττάρων .
Μειωμένη παραγωγή IL-1 και IL-2 .
Μειωμένη συγκόλληση αιμοπεταλίων .
Μειωμένη μετανάστευση λεμφοκυττάρων .
Μειωμένη έκφραση αντιγόνων DR .
Αύξηση ρυθμού σπειραματικής διήθησης .
Επιδράσεις στο Κ.Ν.Σ. (ύπνος, πυρετός, κ.α.)

PGF $_{2a}$.

Αγγειοσύσπαση .
Βρογχόσπασμος .
Σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγωγών .
Σύσπαση των λείων μυϊκών ινών της μήτρας .
Λύση του Ωχρού Σωματίου των ωοθηκών .

LTB $_4$.

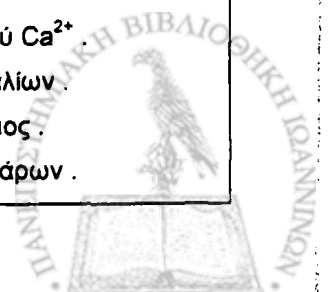
Αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} .
Αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα .
Χημειοτακτική δράση .
Αυξημένη συγκόλληση λευκοκυττάρων .
Αυξημένος πολσμος Τ-λεμφοκυττάρων .
Αυξημένη παραγωγή IL-1 και IL-2 .
Αυξημένη παραγωγή Ιντερφερόνης- γ .
Αυξημένη κυτταροτοξική δράση NK-cells .

LTC $_4$, LTD $_4$.

Αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα .
Αυξημένη παραγωγή Ιντερφερόνης- γ .
Βρογχόσπασμος .

TXA $_2$.

Αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} .
Αυξημένη συγκόλληση αιμοπεταλίων .
Αγγειοσύσπαση - βρογχόσπασμος .
Αυξημένος πολσμός λεμφοκυττάρων .



1. **Επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα** . Αρκετές από τις προσταγλανδίνες καθώς και η Προστακυκλίνη προκαλούν αγγειοδιαστολή ενεργοποιώντας την Αδενυλική Κυκλάση . Ειδικά η Προστακυκλίνη , που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα , είναι ισχυρή αγγειοδιασταλτική ουσία αλλά υφίσταται ταχύτατη αποδόμηση . Και η PGE_2 παράγεται επίσης από το αγγειακό ενδοθήλιο και συμμετέχει στην ρύθμιση της αιματικής ροής στην μικροκυκλοφορία , προκαλώντας συνήθως αγγειοδιαστολή . Συνολικά , οι PGE_2 και PGI_2 μειώνουν τις αγγειακές αντιστάσεις και προκαλούν υπόταση . Οι PGE_2 και PGI_2 επίσης αναστέλλουν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων , αλλά ο ρόλος τους στην ρύθμιση της πήξης του αίματος και της δημιουργίας θρόμβων είναι σχετικά μικρός , αφού δεν επηρεάζουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο ή την αποκοκκίωσή τους (Davies και συν., 1984) . Παρόλα αυτά όμως , συνθετικά ανάλογα των PGE_2 και PGI_2 αναστέλλουν την πρόοδο της αθηρωμάτωσης . Αντιθέτως , η TXA_2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην θρομβογένεση προκαλώντας την συγκόλληση των αιμοπεταλίων , αλλά και ισχυρή αγγειοσύσπαση . Η αναστολή της Κυκλοοξυγενάσης των αιμοπεταλίων προκαλεί μικρή διαταραχή στην αιμόσταση , πιθανώς γιατί υπάρχουν και άλλες οδοί που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια εκτός από τις θρομβοξάνες . Ωστόσο , η αύξηση των TXA_2 και TXB_2 στα ούρα συνοδεύει σταθερά τις παθήσεις όπως η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και η ισχαιμία του μυοκαρδίου σε οξύ έμφραγμα ή σε ασταθή στηθάγχη .

Τέλος , οι λευκοτριένες LTC_4 και LTD_4 έχουν επίσης σημαντικές επιδράσεις στην αιματική κυκλοφορία , αφού προκαλούν εξίδρωση πλάσματος προς τον εξωαγγειακό χώρο (Davies και συν., 1984) , υπόταση και ισχυρή αγγειοσύσπαση των στεφανιαίων , πνευμονικών και μεσεντερικών αρτηριών (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

2. **Κυτταροπροστατευτική δράση** . Οι PGE_1 , PGE_2 και PGI_2 έχουν κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες . Για παράδειγμα , οι PGE προσταγλανδίνες προστατεύουν τον γαστρικό βλεννογόνο τόσο με την αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP όσο και με την σταθεροποίηση των αιμοπεταλίων και την καταστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών , εικοσανοειδών , PAF και κυταροκινών από τα λευκά αιμοσφαίρια . Επίσης αυξάνουν την έκκριση γαστρικής βλέννης και επιταχύνουν τις διαδικασίες επούλωσης των πεπτικών ελκών . Όλες αυτές οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις τελικά προστατεύουν τα αγγεία του γαστρικού βλεννογόνου από τις διαβρωτικές ιδιότητες του γαστρικού υγρού .

3. **Επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα** . Η PGE_2 είναι ισχυρή βρογχοδιασταλτική ουσία . Αντιθέτως οι PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$ και TXA_2 αποτελούν ισχυρές βρογχοσυσπαστικές ουσίες , που μαζί με τον PAF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του βρογχικού άσθματος . Στην παθογένεια του αλλεργικού άσθματος επίσης συμμετέχουν και οι λευκοτριένες LTC_4 , LTD_4 και LTE_4 , που όλες μαζί αποτελούν τον παράγοντα SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) , που εκκρίνεται από τα μαστοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα του αίματος μετά από έκθεση σε αντιγόνα . Οι λευκοτριένες όχι μόνο προκαλούν βρογχόσπασμο , αλλά επιπλέον προάγουν την παραγωγή βλέννης από το αναπνευστικό επιθήλιο και προκαλούν οίδημα του βρογχικού βλεννογόνου και συντελούν έτσι στην απόφραξη των αεροφόρων οδών . Τέλος , οι PGD_2 και $PGF_{2\alpha}$ προκαλούν ισχυρή σύσπαση των αρτηριών και φλεβών του πνευμονικού παρεγχύματος , περιορίζοντας την πνευμονική αιματική ροή .

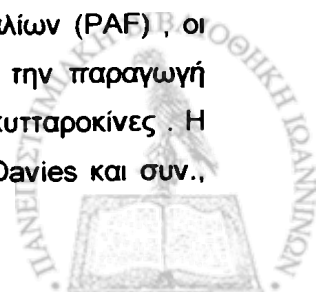
4. **Επιδράσεις στο ουροποιητικό σύστημα** . Τόσο η φλοιώδης όσο και η μυελώδης μοίρα των νεφρών παράγουν προσταγλανδίνες . Ιδιαίτερα μεγάλη παραγωγή εικοσανοειδών έχει η μυελώδης μοίρα των νεφρών , η οποία παράγει όχι μόνο προσταγλανδίνες αλλά και λευκοτριένες , υδρόξυ-

εικοσιτετραενοϊκά οξέα και εποξειδία της οδού του κυτοχρώματος P450 , που όλα μαζί συντελούν στην τοπική ρύθμιση της αιμοδυναμικής του νεφρού , καθώς επίσης της σπειραματικής διήθησης και της σωληναριακής λειτουργίας . Αντιθέτως , ο νεφρικός φλοιός παράγει κυρίως PGE₂ και PGI₂ , που προκαλούν αυξημένη έκκριση ρενίνης , δρώντας σε συνδυασμό με τις κατεχολαμίνες . Επίσης , τα μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρικών σπειραμάτων (που ανήκουν στο σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων) παράγουν μικρές ποσότητες TXA₂ , η οποία έχει ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση . Ωστόσο , ο ρόλος των παραπάνω εικοσανοειδών φαίνεται ότι γίνεται ιδιαίτερα σημαντικός μόνο κατά την οριακή λειτουργία των νεφρών (γήρας, νεφρική ανεπάρκεια, κ.α.) και όχι σε υγιείς ανθρώπους . Επίσης , σε σπειραματονεφρίτιδες και σε αντιδράσεις απόρριψης νεφρικού μοσχεύματος , η διήθηση του νεφρού από μακροφάγα και μονοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων TXA₂ , η οποία προκαλεί ενδονεφρική αγγειοσύσπασση και καταστέλλει την νεφρική λειτουργία .

Οι προσταγλανδίνες PGE₁ , PGE₂ και PGI₂ αυξάνουν την σπειραματική διήθηση προκαλώντας αγγειοδιαστολή στα νεφρικά αγγεία και αυξημένη σπειραματική ροή αίματος , και έτσι αυξάνουν την απέκκριση νατρίου , καλίου και ύδατος . Επίσης ενισχύουν την επίδραση της Αντιδιουρητικής Ορμόνης στην Αδενυλική Κυκλάση και πιθανώς αναστέλλουν την επαναρρόφηση νατρίου από τα Άπω Εσπειραμένα Σωληνάρια . Ακόμα , η PGE₂ συμμετέχει στην ρύθμιση της νεφρικής απέκκρισης του φωσφόρου αναιρώντας την αναστολή της επαναρρόφησης PO₄³⁻ που προκαλεί η Παραθορμόνη στο Εγγύς Εσπειραμένο Σωληνάριο και τέλος αναστέλλει και την επαναρρόφηση του χλωρίου .

5 . Επιδράσεις στο Γαστρεντερικό Σύστημα . Εκτός από την άμεση προστατευτική δράση κατά του πεπτικού έλκους που ασκούν η PGE₁ και η PGE₂ στον βλεννογόνο του στομάχου , οι PGI₂ και PGE₂ είναι επίσης αναστολείς της έκκρισης υδροχλωρικού οξέος και πεψίνης από τα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου . Εκτός από την PGI₂ , όλα τα υπόλοιπα εικοσανοειδή και ιδιαίτερα οι λευκοτριένες συσχετίζονται με την παθοφυσιολογία δύο φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου , της Ελκώδους Κολίτιδας και της Κοκκιωματώδους Κολίτιδας του Crohn . Σε αυτό συνηγορεί και το ότι τα εικοσανοειδή αυτά προκαλούν επώδυνο σπασμό του εντερικού σωλήνα και βλεννώδη διάρροια .

6 . Επιδράσεις στο Ανοσοποιητικό σύστημα . Τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν την ικανότητα παραγωγής όλων των ειδών εικοσανοειδών , ενώ αντιθέτως τα λεμφοκύτταρα δεν παράγουν κανένα εικοσανοειδές εκτός από το ίδιο το αραχιδονικό οξύ . Όμως τα εικοσανοειδή είναι σημαντικοί ρυθμιστές των λειτουργιών των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Kunkel , 1988) . Η PGE₂ αναστέλλει την διαφοροποίηση των άωρων Β-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και έτσι καταστέλλει την παραγωγή ανοσοσφαιρινών και την Χυμική Ανοσία (Humoral Immunity) . Η ίδια η PGE₂ καταστέλλει την παραγωγή λυσοσωματικών ενζύμων και ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα μακροφάγα . Επίσης , οι προσταγλανδίνες PGE₂ και PGI₂ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων , αναστέλλουν την έκκριση των Ιντερλευκινών IL-1 και IL-2 και την έκφραση αντιγόνων MHC-II στην επιφάνεια των μακροφάγων και εμποδίζουν την ανάπτυξη των λεμφοκυτταρικών κλώνων . Τις αντίθετες επιδράσεις έχουν οι λευκοτριένες , η θρομβοξάνη TXA₂ και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) , οι οποίες ουσίες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυτταρικών κλώνων , την παραγωγή Ιντερλευκινών IL-1 και IL-2 και Ιντερφερόνης-γ και την έκφραση υποδοχέων για τις κυτταροκίνες . Η LTB₄ ειδικά έχει πολλαπλές επιδράσεις και στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (Davies και συν.,



1984). Όλες αυτές οι επιδράσεις των εικοσανοειδών και του PAF έχουν διαπιστωθεί και *in vivo*, σε αντιδράσεις Οξείας Απόρριψης Μοσχευμάτων και στην παθογένεια της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

7. Επιδράσεις στο Γεννητικό Σύστημα του Θήλεος. α) Ωθήκες. Οι προσταγλανδίνες παράγονται από τα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας της θήκης του ωοθυλακίου, υπό την επίδραση των γοναδοτροπινών και η παραγωγή τους γίνεται μέγιστη κατά την ωοθυλακιόρρηξη. Αν και σε πολλά είδη ζώων η $PGF_{2\alpha}$ προκαλεί την λύση του ωχρού σωματίου, κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί στον άνθρωπο. β) Σάλπιγγες. Οι ωαγωγοί παράγουν και $PGF_{2\alpha}$ και PGE_2 , που αντίστοιχα προκαλούν σύσπασση και χάλαση του ισθμού των σαλπίγγων και την σύσπασση της επιμήκους μυϊκής στοιβάδας τους. Έτσι, οι δυο αυτές προσταγλανδίνες συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταφοράς του ωαρίου από τις ωοθήκες στην μήτρα. γ) Μήτρα. Η $PGF_{2\alpha}$ συσπά το μυομήτριο και *in vitro* και *in vivo* ενώ η PGE_2 συσπά το μυομήτριο *in vivo* αλλά το χαλαρώνει *in vitro* και η PGI_2 προκαλεί πάντα χάλαση του μυομητρίου. Ο βαθμός των επιδράσεων αυτών εξαρτάται από την φάση του κύκλου και από την ύπαρξη ή όχι εγκυμοσύνης. Γενικά, η συγκέντρωση των προσταγλανδινών στο αρνιακό υγρό αυξάνει με την εγκυμοσύνη και πιθανώς συσχετίζεται με την πρόκληση έναρξης του τοκετού. Οι προσταγλανδίνες PGE_2 και PGI_2 προκαλούν την μείωση των αγγειακών αντιστάσεων που χαρακτηρίζει την κύηση, ενώ η αύξηση της TXA_2 έχει συσχετιστεί με την αύξηση των αγγειακών αντιστάσεων και την υπέρταση που εμφανίζονται κατά την προεκλαμψία.

8. Επιδράσεις στο Γεννητικό Σύστημα του Άρρενος. Το γόνιμο σπέρμα περιέχει περίπου 400 $\mu g/ml$ PGE_2 και $PGF_{2\alpha}$ καθώς και άλλων προσταγλανδινών, ενώ δεν περιέχει καθόλου λευκοτριένια ή θρομβοξάνια. Αν και ο ρόλος των προσταγλανδινών στο σπέρμα είναι ακόμα αδιευκρίνιστος, η χαμηλή συγκέντρωσή τους καθιστά το σπέρμα μη-γόνιμο. Οι περισσότερες από αυτές τις προσταγλανδίνες παράγονται στις σπερματοδόχες κύστεις, ενώ οι όρχεις και ο προστάτης συνθέτουν πολύ μικρές ποσότητες. Ωστόσο, η τεστοστερόνη των όρχεων προάγει την παραγωγή και έκκριση των προσταγλανδινών.

9. Επιδράσεις στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Ορισμένα εικοσανοειδή επηρεάζουν την έκκριση των ορμονών του ΚΝΣ. Έτσι, η LTC_4 διεγείρει την έκκριση LHRH ενώ οι PGE_1 και PGE_2 αναστέλλουν την έκκριση αυξητικής ορμόνης και προλακτίνης και επιτείνουν την έκκριση της ACTH. Οι PGI_2 και PGE_2 ευαισθητοποιούν τα αισθητικά νεύρα μειώνοντας τον ουδό αντίληψης του πόνου (Davies και συν., 1984). Επίσης, στα περιφερικά συμπαθητικά νεύρα οι PGE_1 και PGE_2 αναστέλλουν την έκκριση νοραδρεναλίνης από τις νευρικές απολήξεις. Στο υποθαλαμικό κέντρο της θερμορύθμισης οι ίδιες αυτές προσταγλανδίνες (PGE_1 και PGE_2) συσχετίζονται με την παθοφυσιολογία του πυρετού. Είναι μάλιστα γνωστό ότι το Ενδογενές Πυρογόνο (Ιντερλευκίνη-1) προκαλεί την τοπική παραγωγή της PGE_2 και την αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος (Davies και συν., 1984). Τέλος, μετά από ενδοεγκεφαλική έγχυσή της σε πειραματόζωα η προσταγλανδίνη PGD_2 προκαλεί υπνηλία και φυσιολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα ύπνου.

10. Επιδράσεις στα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Τα εικοσανοειδή κατατάσσονται στα αυτακοειδή επειδή επηρεάζουν την λειτουργία των κυττάρων του αίματος που συμμετέχουν στην τραυματική και στην φλεγμονώδη αντίδραση. Η PGI_2 που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ενώ η TXA_2 που παράγεται από τα αιμοπεταλία την προάγει. Η PGE_2 αναστέλλει την διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα, τον

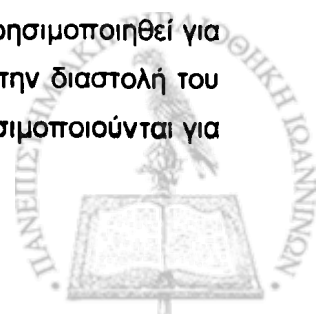
πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή λεμφοκινών και τέλος την απελευθέρωση οξίνων υδρολασών από τα πολυμορφοπύρρηνα . Η LTB_4 αποτελεί ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα αιματικά μονοκύτταρα , τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα . Επίσης προκαλεί την συγκόλληση των λευκοκυττάρων , την επικόλληση των πολυμορφοπυρήνων στο ενδοθήλιο και την διενδοθηλιακή μετανάστευσή τους στον εξωαγγειακό χώρο (transendothelial migration) , καθώς και παραγωγή και απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων και ελευθέρων ριζών οξυγόνου . Στην διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης δημιουργείται οίδημα από τις λευκοτριένες σε συνδυασμό με την αγγειοδιασταλτική δράση των προσταγλανδινών . Εκτός από τις λευκοτριένες και η 12-HETE έχει ισχυρή χημειοτακτική επίδραση στα λευκοκύτταρα . Οι LTB_4 , PGI_2 και PGE_2 προκαλούν τον έντονο πόνο , το οίδημα και την υπεραλγησία στις θέσεις της φλεγμονώδους αντίδρασης , όπως ακριβώς προκαλούν η ισταμίνη και η βραδυκινίνη . Τέλος , παρά την ισχυρή επίδραση των εικοσανοειδών στους μηχανισμούς ανοσίας και την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική επίδραση των αναστολέων της παραγωγής τους (Μη - Στεροειδικών Αντιφλεγμονωδών φαρμάκων) , η χρήση των φαρμάκων αυτών δεν επηρεάζει την ευπάθεια του οργανισμού στις λοιμώξεις .

11 . Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος τον οποίο διαδραματίζουν το αραχιδονικό οξύ και όλοι οι μεταβολίτες του είναι αυτός του μεταβιβαστή μηνυμάτων (Piomelli , 1993) . Τα εικοσανοειδή μπορούν να δράσουν και σαν ενδοκυττάριο Δεύτερο Μηνύτορες και σαν παρακρινικοί χημικοί μεσολαβητές της φλεγμονής (αυτακοειδή) . Για την δράση τους ως αυτακοειδή έχει ήδη γίνει αναφορά . Ως Δεύτερο Μηνύτορες (Second Messengers) , τα εικοσανοειδή επηρεάζουν και την λειτουργία διαύλων ιόντων (ion channels) και την λειτουργία ενζύμων . Ένα παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση των διαύλων K^+ στα νευρικά κύτταρα από τις λευκοτριένες , που προκαλεί την αναστολή της έκκρισης νευρομεταβιβαστών όπως το Γλουταμικό Οξύ (Piomelli , 1993) . Σε άλλα νευρικά κύτταρα οι λευκοτριένες αναστέλλουν την δράση της Εξαρτημένης από Ασβέστιο και Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνικής Κινάσης II (Ca^{+2} /Calmodulin - dependent Protein Kinase II) , η οποία συμμετέχει στην ρύθμιση του μηχανισμού έκκρισης στους νευρώνες . Την ίδια Πρωτεϊνική Κινάση αναστέλλει το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ στα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος . Επίσης , στα μακροφάγα που ενεργοποιούνται από PAF έχει αποδειχτεί πως το αραχιδονικό οξύ αποτελεί τον δεύτερο μηνύτορα που προκαλεί την εξωκυττάρωση Ca^{+2} , διεγείροντας μια Ca^{+2} -ATPάση (Randriamampita και Trautmann, 1990) . Τα εποξειδία του αραχιδονικού οξέος και η PGE_2 αναστέλλουν την δραστηριότητα της Na^+/K^+ -ATPάσης στους νεφρούς και στον εγκέφαλο (Piomelli , 1993) . Τέλος , έχει αποδειχτεί ότι το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ και η λευκοτριένη LTC_4 αποτελούν τους δεύτερους μηνύτορες που διαμεσολαβούν την επαγωγή της παραγωγής της Ιντερφερόνης- γ από Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με Ιντερλευκίνη-2 (Johnson και συν., 1986) .

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ .

Επειδή ακριβώς οι ουσίες αυτές ασκούν μια μεγάλη ποικιλία από επιδράσεις στους ιστούς και στα όργανα , έχει αρχίσει τελευταία η εισαγωγή τους στην θεραπευτική πολλών παθήσεων .

1. Θεραπευτική έκτρωση , πρόκληση τοκετού . Οι προσταγλανδίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση θεραπευτικής έκτρωσης στο 2^ο τρίμηνο (π.χ. σε μύλη κύηση) και για την διαστολή του τραχηλικού στομίου πριν από μαιευτικές ή γυναικολογικές επεμβάσεις . Επίσης , χρησιμοποιούνται για την πρόκληση τοκετού σε τελειόμηνη φυσιολογική κύηση .



2. Προστασία γαστρικού βλεννογόνου . Συνθετικά ανάλογα των προσταγλανδινών της σειράς E χρησιμοποιούνται για την προστασία του γαστρικού βλεννογόνου σε ασθενείς που λαμβάνουν Μη-Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη για μεγάλο χρονικό διάστημα .

3. Ισχαιμία του μυοκαρδίου . Η χρήση της προστακυκλίνης και των συνθετικών αναλόγων της μελετάται στην θεραπεία του Οξέος Εμφράγματος του Μυοκαρδίου , αλλά τα σκευάσματα είναι ακόμα στο στάδιο των πειραματικών μελετών .

4. Αποθήκευση αιμοπεταλίων - αιμοκάθαρση . Οι PGE₁ και PGI₂ χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της συλλογής και αποθήκευσης αιμοπεταλίων για μεταγγίσεις , για την αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια αιμοκάθαρσης και εξωσωματικής κυκλοφορίας και για αντιπηκτική αγωγή σε ασθενείς που κάνουν αιμοδιάλυση και έχουν αντένδειξη για την ηπαρίνη .

5. Ανικανότητα . Η τοπική έγχυση PGE₁ στα σπραγγώδη σώματα του πέους ασθενών με ανικανότητα που δεν οφείλεται σε αγγειοπάθεια προκαλεί ικανοποιητική στύση για τρεις ώρες , χωρίς τις παρενέργειες της παπαβερίνης .

6. Αύξηση αιματικής ροής στον πνεύμονα . Οι PGE₁ και PGI₂ χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της αιματικής ροής στους πνεύμονες παιδιών με συγγενείς κυανωτικές καρδιοπάθειες ή με ανοικτό Βοτάλλειο πόρο , μέχρι να είναι εφικτή η χειρουργική θεραπεία της νόσου τους .

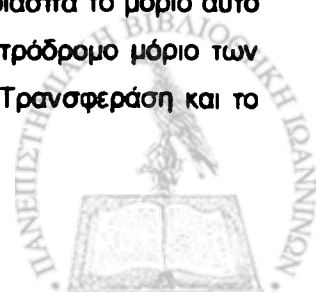
8-9-2 . Άλλες λιπιδικές ουσίες που συσχετίζονται με τα εικοσανοειδή .

Υπάρχουν και δύο ακόμα κατηγορίες ουσιών λιπιδικής φύσης οι οποίες συσχετίζονται με τα εικοσανοειδή από βιοχημική και λειτουργική άποψη και που επίσης ανήκουν στα αυτακοειδή . Η μία κατηγορία περιλαμβάνει μια μικρή οικογένεια φωσφολιπιδίων που ονομάζονται Ενεργοποιητές των Αιμοπεταλίων , ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις Λιποξίνες . Λόγω της σχέσης τους με τα εικοσανοειδή θα γίνει μια σύντομη αναφορά και σε αυτά .

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PLATELET ACTIVATING FACTOR , PAF) .

Ο PAF αποτελεί μια ομάδα από φωσφολιπίδια με γενικό τύπο 1-Ο-Άλκυλο-2-Ακέτυλο-sn-γλυκερο-3-Φωσφορική Χολίνη , όπου η αλκυλομάδα που συνδέεται με αιθερικό δεσμό στην θέση 1 της γλυκερόλης μπορεί να έχει από 12 ως 18 άτομα άνθρακα .

Όπως τα εικοσανοειδή , ο PAF παράγεται και εκκρίνεται μόνο μετά από την διέγερση των κυττάρων που τον συνθέτουν , δηλαδή τα αιμοπετάλια , τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα , τα μονοκύτταρα , τα ηωσινόφιλα , τα μαστοκύτταρα , τα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού και τα ενδοθηλιακά κύτταρα . Τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται από ανοσοσυμπλέγματα , χημειοτακτικά πεπτιδία , αυτακοειδή , κολλαγόνο ή θρομβίνη και τέλος από την σύνδεση αντιγόνων στους IgE-υποδοχείς της επιφάνειας των μαστοκυττάρων . Ο PAF παράγεται από την 1-Ο-Άλκυλο-2-Αραχιδονο-Γλυκεροφωσφορική Χολίνη των κυτταρικών μεμβρανών . Η Φωσφολιπάση A₂ διασπά το μόριο αυτό σε Λύσο-PAF και σε αραχιδονικό οξύ (το οποίο αραχιδονικό οξύ αποτελεί το πρόδρομο μόριο των εικοσανοειδών) . Στην συνέχεια ο Λύσο- PAF ακετυλιώνεται από την Ακετυλο-Τρανσφεράση και το



Ακετυλο-Συνένζυμο-Α και δημιουργείται ο PAF . Η απενεργοποίηση του PAF επιτελείται στο πλάσμα από μια Ακετυλο-Υδρολάση και μία Ακετυλο-Τρανσφεράση .

Ο PAF έχει πολλαπλές φαρμακολογικές επιδράσεις στον οργανισμό , που οφείλονται στην σύνδεση του PAF σε ειδικούς υποδοχείς , που μέσω G-πρωτεϊνών οδηγούν στην ενεργοποίηση των Φωσφολιπασών A₂ , C και D , στην παραγωγή IP₃ και DAG και στην αύξηση του ενδοκυττάρου Ca⁺² .

1) Προκαλεί σημαντική αγγειοδιαστολή και υπόταση , αλλά συσπά εκλεκτικά τα στεφανιαία και τα πνευμονικά αγγεία . 2) Όπως και άλλα αυτακοειδή (ισταμίνη, βραδυκινίνη κ.α.) προκαλεί αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και εξίδρωση πλάσματος στον εξωαγγειακό χώρο . 3) Προκαλεί την ενεργοποίηση , συσώρευση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση TXA₂ . 4) Προκαλεί την σύσπασση των λείων μυϊκών ινών του αναπνευστικού , ουροποιογεννητικού και γαστρεντερικού σωλήνα . 5) Εκτός από σύσπασση των βρόγχων , ο PAF προκαλεί και αυξημένη έκκριση βλέννας από τους βρόγχους και οίδημα και συμφόρηση του αναπνευστικού βλεννογόνου . 6) Προκαλεί μείωση της αιματικής ροής στον νεφρό και της σπειραματικής διήθησης . 7) Τέλος , ο PAF έχει σημαντικές επιδράσεις στα λευκοκύτταρα του αίματος : Αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τα ουδετερόφιλα , ηωσινόφιλα και μονοκύτταρα και προάγει συγκόλλησή τους , την επικόλλησή τους στο αγγειακό τοίχωμα και την διαπίδυση τους προς την φλεγμονώδη εστία . Επίσης , ο PAF ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα για αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και λυσοσωματικών ενζύμων . Για όλα τα παραπάνω θεωρείται πολύ σημαντικό αυτακοειδές , με βασικό ρόλο στην φλεγμονή , στις αγγειίτιδες , στην αναφυλαξία και στην σηπτική καταπληξία (Sigal και Ron, 1994 , Goodman-Gilman και συν., 1996) .

ΟΙ ΛΙΠΟΞΙΝΕΣ (LIPOXINS) .

Οι Λιποξίνες ανήκουν και αυτές στα εικοσανοειδή και παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις Λευκοτριένες . Παράγονται από το αραχιδονικό οξύ , με διαδοχική οξυγόνωση της αλειφατικής του αλυσίδας στις θέσεις C₁₅ και C₅ από την 15-Λιπooξυγενάση και την 5-Λιπooξυγενάση αντίστοιχα . Η αλληλοδιαδοχή αυτή των αντιδράσεων δημιουργεί αρχικά το 15-HETE και στην συνέχεια το 5-Υδρουπερόξυ-15-Υδρόξυ-EETE , που αυτόματα μετατρέπεται στο εποξειδίο 5,6-Επόξυ-Τετραένη . Το εποξειδίο αυτό υδρολύεται από τις Υδρολάσες των Εποξειδίων και δίδει γένεση στις Λιποξίνες LXA₄ και LXB₄ . Οι Λιποξίνες έχουν σημαντική διαφορά από τις Λευκοτριένες και στην δομή τους (διαθέτουν τέσσερις συζευγμένους διπλούς δεσμούς) και στις επιδράσεις τους .

Η έντονη βιοδραστικότητά τους τις καθιστά σημαντικές στην παθογένεια της φλεγμονής . Η LXA₄ προκαλεί ενεργοποίηση , χημειοταξία (chemotaxis) και χημιοκινησία (chemokinesis) των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων , αλλά δεν προκαλεί την συγκόλλησή τους στα ενδοθήλια . Επίσης αναστέλλει την μετανάστευση των λευκοκυττάρων προς τις φλεγμονώδεις εστίες και αναστέλλει την in vitro κυτταροτοξικότητα των NK-κυττάρων . Εκτός από τις παραπάνω ρυθμιστικές επιδράσεις στα κύτταρα της φλεγμονής , η LXA₄ προκαλεί έντονη αγγειοδιαστολή και βρογχόσπασμο και τέλος προάγει την παραγωγή και έκκριση προσταγλανδινών από άλλα κύτταρα . Η LXB₄ επίσης προκαλεί αναστολή της in vitro κυτταροτοξικότητας των NK-κυττάρων και βρογχόσπασμο , αλλά σε αντίθεση με την άλλη Λιποξίνη προκαλεί αγγειοσύσπασση . Για τους παραπάνω λόγους δεν θεωρείται



περιέργο ότι στα βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα ασθενών με σαρκοειδωση ή βακτηριακές πνευμονίες υπάρχουν μεγάλες ποσότητες λιποξινών . (Sigal και Ron , 1994) .

8-9-3 . Τα εικοσανοειδή και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Επειδή όλοι οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της φλεγμονής και στην ανοσολογική αντίδραση , έχει μελετηθεί εκτενώς η σχέση τους με το σύστημα των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων (Stenson και Parker , 1980).

ΟΙ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΙΣ A₂ ΚΑΙ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ .

Η πρόδρομη ουσία όλων των προσταγλανδινών , λευκοτριενών , ΗETE , θρομβοξανών και της προστακυκλίνης είναι το αραχιδονικό οξύ , το οποίο είναι αποθηκευμένο στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών . Όταν τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται (π.χ. από ενδοτοξίνη ή zymosan) παράγουν μεγάλες ποσότητες εικοσανοειδών . Αυτό συμβαίνει επειδή διεγείρεται η PLA₂ (Φωσφολιπάση A₂) και αρχίζει να αποσπά μόρια αραχιδονικού οξέος από την sn-2 θέση του μορίου των φωσφολιπιδίων (Sigal, 1991) . Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τέσσερις ισομορφές PLA₂ , από τις οποίες οι τρεις έχουν MB 14 kDa (τύποι I, II και III) και η τέταρτη έχει MB 85 kDa (Τύπος IV) (Mayer και Marshall , 1993) . Η 85-kDa PLA₂ είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι δρα εκλεκτικά σε φωσφολιπίδια που έχουν συνδεδεμένο αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση του μορίου τους , είναι πιο δραστήρια σε ουδέτερο pH και έχει εντοπιστεί και στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (Mayer και Marshall , 1993) . Έχει διαπιστωθεί ότι η 85-kDa PLA₂ των μακροφάγων είναι ευαίσθητη στην κατασταλτική επίδραση της δεξαμεθαζόνης (Gewert και Sundler , 1995) .

Η πρώτη ανίχνευση δραστηριότητας Φωσφολιπάσης A₂ στα μακροφάγα έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 , με σκοπό να διαπιστωθεί ο μηχανισμός παραγωγής προσταγλανδινών από τα κύτταρα αυτά . Διαπιστώθηκε ότι τα φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα διαθέτουν δύο διαφορετικές δραστηριότητες PLA₂ , από τις οποίες η μία είχε βέλτιστο pH 4,5 και δεν ήταν εξαρτημένη από το Ca²⁺ (δηλαδή χαρακτηρες λυσοσωματικού ενζύμου) ενώ η άλλη είχε βέλτιστο pH 8,5 και ήταν εξαρτημένη από το Ca²⁺ (δηλαδή χαρακτηρες κυτταροπλασματικού ενζύμου) (Wightman και συν., 1981) . Πολύ γρήγορα διαπιστώθηκε ότι το κυτταροπλασματικό ένζυμο ήταν υπεύθυνο για την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις κυτταρικές μεμβράνες και ότι η ενεργοποίηση του μακροφάγου οδηγούσε στην διέγερση αυτής της PLA₂ με την μεσολάβηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (Emilsson και Sundler , 1986) . Αυτή η δραστηριότητα Φωσφολιπάσης A₂ έχει ανιχνευθεί και σε κυτταρικές σειρές με χαρακτηρες μακροφάγων (π.χ. P388D₁, U937, RAW-264.7) και τα υπεύθυνα ένζυμα έχουν απομονωθεί , καθαριστεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά (Ulevitch και συν., 1988 , Leslie και συν., 1988 , Kramer και συν., 1991 , Leslie, 1991) . Έτσι απομονώθηκαν δύο κυτταροπλασματικές PLA₂ (χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους) από τις οποίες εκείνη με το υψηλό μοριακό βάρος (100 kDa) ενεργοποιείται όταν το μακροφάγο διεγερθεί (π.χ. από LPS , Diacylglycerol ή zymosan) , έχει βέλτιστο pH 8.0 , διασπά κατά εκλεκτικό τρόπο φωσφολιπίδια με αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση και τέλος είναι εξαρτημένη από το Ca²⁺ (Leslie και συν., 1988 , Leslie και Channon , 1990 , Leslie , 1990 , Leslie , 1991) . Επίσης , έχει

διαπιστωθεί ότι αυτή είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την παραγωγή των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος PGD₂, PGE₂, PGI₂ και TXA₂ και ότι διαθέτει ορισμένους ειδικούς αναστολείς (7,7-dimethyl-5,8-eicosadienoic acid, manoilide και manoalogue) που διαφέρουν από τους αναστολείς των άλλων ισομορφών της PLA₂ (Lister και συν., 1989).

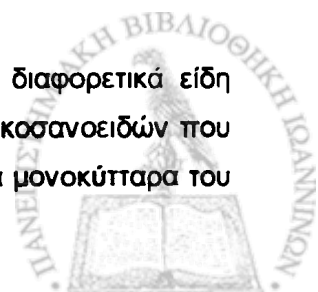
Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η Φωσφολιπάση A₂ δεν αποτελεί την μοναδική οδό για την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τις κυτταρικές μεμβράνες. Η διέγερση των περιτοναϊκών μακροφάγων με zymosan οδηγεί στην παραγωγή αραχιδονικού οξέος και με την συνδυασμένη δράση των ενζύμων Φωσφολιπάση C και Λιπάση των Διγλυκεριδίων (Moscat και συν., 1986).

Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα παράγουν συνεχώς μικρές ποσότητες από μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, αλλά μετά από διέγερση αυξάνει η ποσότητα και διαφοροποιείται ο τύπος των εικοσανοειδών που εκκρίνουν. Έτσι, τα φυσιολογικά μακροφάγα και μονοκύτταρα εκκρίνουν μικρές ποσότητες από PGD₂, PGE₁, PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXA₂, TXB₂, LTB₄, LTC₄ και LTD₄, αλλά μετά από διέγερσή τους με zymosan, A23187, LPS, PAF ή αλλεργιογόνα αυξάνει κατακόρυφα η παραγωγή των εικοσανοειδών αυτών (Weidemann και συν., 1978, Gemsa και συν., 1979, Kurland και Bockman, 1980, Scott και συν., 1980, Hartung, 1983, Pawlowski και συν., 1983, M'Rini-Puel και συν., 1993). Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάζεται και με μακροφάγα των κυτταρικών σειρών SK-2, WEHI-3, RAW-264 και J774 και με τα ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) τα οποία όλα αυξάνουν την βασική παραγωγή των PGE₂ και PGF_{2α} μετά από διέγερση με LPS, zymosan ή A23187 (Kurland και Bockman, 1978, Birmeilin και Decker, 1984). Εκτός από την διέγερση της PLA₂, ένας ακόμα πιθανός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει αυτή την αύξηση της παραγωγής εικοσανοειδών μετά από την ενεργοποίηση των μακροφάγων αφορά την επαγωγή της δραστηριότητας της COX-2 (Κυκλοοξυγενάσης-2). Έχει διαπιστωθεί (Lee και συν., 1992) ότι στα φυσιολογικά βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η δραστηριότητα Κυκλοοξυγενάσης οφείλεται στην COX-1, ενώ μετά την ενεργοποίησή τους με ενδοτοξίνη τα μακροφάγα εμφανίζουν και δραστηριότητα COX-2. Η έκφραση της COX-2 είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος. Επιπλέον μόνο η COX-2 είναι ευαίσθητη στην επίδραση της δεξαμεθαζόνης και των άλλων γλυκοκορτικοειδών.

Η επαγωγή της Κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα επιτυγχάνεται μέσω του Παράγοντα Μεταγραφής NFκB, ο οποίος επάγει και την Συνθετάση του Νιτρικού Οξειδίου (iNOS) και πολλών άλλων ενζύμων (Barnes και Karin, 1997). Η ταυτόχρονη επαγωγή των ενζύμων COX-2 και iNOS από τον παράγοντα NFκB είναι ωφέλιμη για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, γιατί ενώ το Νιτρικό Οξύ που παράγουν προκαλεί την Απόπτωσή τους, κάποιο από τα παράγωγα της COX-2 προστατεύει τα μακροφάγα από την Απόπτωση (Von Knechten και Brune, 1997). Ο παράγοντας NFκB ελέγχει την έκφραση διαφόρων ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση εικοσανοειδών, όπως την COX-2, την 5-Λιποξυγενάση και ορισμένες κυτταροπλασματικές Φωσφολιπάσες A₂ (PLA₂) (Barnes και Karin, 1997).

Το σύστημα των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων περιλαμβάνει πολλά και διαφορετικά είδη μακροφάγων. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ποσότητα και στο είδος των εικοσανοειδών που παράγονται ανάλογα με την προέλευση του μακροφάγου. Έτσι για παράδειγμα, τα μονοκύτταρα του



αίματος έχουν πολύ φτωχή παραγωγή εικοσανοειδών σε σχέση με τα περιτοναϊκά μακροφάγα ή τα μακροφάγα του μητρικού γάλακτος, ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν ασυνήθιστα υψηλή παραγωγή PGD₂ (Vicenzi και συν., 1984).

Για την αυξημένη παραγωγή των εικοσανοειδών είναι απαραίτητη όχι μόνο η απομάκρυνση μεγάλων ποσοτήτων αραχιδονικού οξέος από τις μεμβράνες με την δράση της PLA₂, αλλά και η αναστολή της δραστηριότητας της Ακυλοτρανσφεράσης των Λυσοφωσφατιδίων, η οποία εστεροποιεί πάλι το αραχιδονικό στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών. Η αναστολή αυτής της Ακυλοτρανσφεράσης είναι απαραίτητη για να υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα ελεύθερου αραχιδονικού στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και επιτυγχάνεται με ειδικούς αναστολείς αλλά και με το ιονοφόρο A23187 (Kroner και συν., 1981).

Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί από την ενεργοποίηση του μακροφάγου ως την αυξημένη παραγωγή εικοσανοειδών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Για την περίπτωση της ενεργοποίησης των μακροφάγων μετά από φαγοκυττάρωση *zymosan* ή φαγοκυττάρωση IgG-καλυμμένων σωματιδίων μέσω Fc-υποδοχέων, έχει προταθεί μια αλληλουχία γεγονότων που περιλαμβάνει την διέγερση μιας αντλίας Na⁺/H⁺, την διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC), την ταχύτατη σύνθεση κάποιων πρωτεϊνών και τέλος την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺, μετά από τα οποία ενεργοποιείται η PLA₂ και ξεκινά η παραγωγή εικοσανοειδών (Aderem και συν., 1986). Στην πρόταση αυτή συνηγορούν και τα αποτελέσματα μελετών με κύτταρα Kupffer, στα οποία διαπιστώθηκε η συμμετοχή της αντλίας Na⁺/H⁺ στην παραγωγή προσταγλανδινών μετά από φαγοκυττάρωση *zymosan* (Dieter και συν., 1987) καθώς και η εξάρτηση της παραγωγής εικοσανοειδών από την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺ μετά από φαγοκυττάρωση *zymosan* (Dieter και συν., 1988). Εκτός από το ασβέστιο, η διαδικασία παραγωγής μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος εξαρτάται και από την καλμοδουλίνη, όπως φαίνεται από πειράματα με τους αναστολείς της καλμοδουλίνης R-24571 και W-7 (Hartung, 1983, Birmelin και Decker, 1984). Τέλος, η συμμετοχή της διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) στην παραγωγή εικοσανοειδών μετά από φαγοκυττάρωση *zymosan* έχει διαπιστωθεί και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα μετά από μελέτες με έναν ειδικό αναστολέα της PKC, το μικροβιακό αλκαλοειδές σταυροσπορίνη (*staurosporine*) (Sprott και συν., 1990). Ωστόσο, σε φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν από διεγέρτες της PKC, διαπιστώθηκε ότι η σταυροσπορίνη μόνο σε πολύ μεγάλες δόσεις προκαλούσε αναστολή της παραγωγής προσταγλανδινών, ενώ σε μικρές δόσεις η ίδια η σταυροσπορίνη διέγειρε την παραγωγή τους (Watanabe και συν., 1990).

Όμως η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺ είναι απαραίτητο βήμα όχι μόνο για την παραγωγή εικοσανοειδών μετά από ενεργοποίηση με *zymosan* αλλά και μετά από ενεργοποίηση με LPS ή PAF, όπως διαπιστώθηκε σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς P388D1 (Asmis και συν., 1994).

Αν και η ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με *zymosan* ή άλλο διεγέρτη είναι απαραίτητη για την αύξηση της παραγωγής των προσταγλανδινών, λευκοτριενών και θρομβοξανών, αυτό αφορά μόνο κύτταρα που προηγουμένως ήταν μη-διεγερμένα (φυσιολογικά ή resident cells). Αντιθέτως, η προσθήκη *zymosan* σε φλεγμονώδη μακροφάγα (elicited ή inflammatory cells) που απομονώθηκαν μετά από μακροχρόνια παραμονή σε φλεγμονώδη εστία *in vivo*, έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα παραγωγής εικοσανοειδών (Bonney και συν., 1978, Humes και συν., 1980, Fels και συν., 1986). Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού, που λαβαίνει υπόψη και την

ομοιότητα των αναλογιών των παραγόμενων εικοσανοειδών TXA_2 , PGI_2 , PGE_2 και LTC_4 ανάμεσα στα φλεγμονώδη μακροφάγα και στα μονοκύτταρα είναι η εξής : τα φλεγμονώδη μακροφάγα δεν προέρχονται μόνο από την διέγερση των φυσιολογικών μακροφάγων της φλεγμονώδους εστίας , αλλά κατά το μεγαλύτερο μέρος είναι μονοκύτταρα που μεταναστεύουν από το αίμα στην περιοχή της φλεγμονής και για αυτό έχουν διαφορετική ικανότητα παραγωγής εικοσανοειδών από τα φυσιολογικά μακροφάγα (Tirp και συν., 1986) .

Τέλος , αξίζει να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιούνται in vivo από την ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος , ότι παρατηρήθηκε σχετική μείωση της παραγωγής θρομβοξανίων και αύξηση της παραγωγής λευκοτριενίων και HETE , που οφείλεται στην αναστολή των ενζύμων βιοσύνθεσης των θρομβοξανίων και στην ταυτόχρονη ενεργοποίηση των λιπο-οξυγενασών (Vincent και συν., 1990) .

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

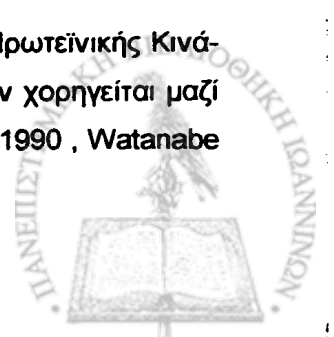
Η παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος από τα μακροφάγα είναι μια διαδικασία με πολλά βήματα , η οποία μπορεί να ανασταλεί ή να επιταχθεί από μία σειρά ουσίες ορμόνες ή άλλους βιολογικούς παράγοντες , καθώς και από συνθετικά σκευάσματα .

Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή εικοσανοειδών . Η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την παραγωγή της προσταγλανδίνης PGE_2 από ηπατικά (Kupffer) μακροφάγα που έχουν διεγερθεί in vitro με zymosan , PMA , A23187 , LPS ή PAF (Dieter και συν., 1986) . Η παραγωγή PGF_2 , PGE_2 , TXB_2 και LTB_4 από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα αναστέλλεται τόσο in vivo από την πρεδνιζόνη όσο και in vitro από την υδροκορτιζόνη (Sebalt και συν., 1990) . Είναι πολύ πιθανό ότι η επίδραση αυτή των γλυκοκορτικοειδών οφείλεται στην αναστολή της δραστηριότητας της PLA_2 των 85 kDa (Gewert και Sandler , 1995) .

Η ιντερφερόνη-β αναστέλλει την παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανών από περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν διεγερθεί με ενδοτοξίνη ή zymosan και αυτή η επίδραση της INF-β φαίνεται να ασκείται μέσω αύξησης του cAMP και αναστολής της δραστηριότητας της Φωσφολιπάσης A_2 (Boraschi και συν., 1984) .

Η ίδια η PGE_2 που παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ασκεί κατασταλτική επίδραση στα ίδια τα κύτταρα που την παράγουν . Αυτός ο μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback inhibition) οφείλεται στην ύπαρξη ειδικών EP-υποδοχέων για την PGE_2 στην επιφάνεια των μακροφάγων (Ormeier και συν., 1983) . Η σύνδεση της προσταγλανδίνης PGE_2 με τους υποδοχείς αυτούς προκαλεί την αύξηση του cAMP και την αναστολή της δραστηριότητας της PLA_2 , με αποτέλεσμα την διακοπή της παραγωγής εικοσανοειδών (Lim και συν., 1983) . Ενδεχομένως η ενεργοποίηση της κυτταροτοξικότητας των μακροφάγων κατά καρκινικών κυττάρων από την Ινδομεθακίνη να οφείλεται ακριβώς στην καταστολή της παραγωγής PGE_2 και την άρση του μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (Voth και συν., 1987) .

Η σταυροσπορίνη , η οποία αναφέρθηκε πιο πάνω , είναι αναστολέας της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Όταν χορηγείται μόνη της διεγείρει την παραγωγή εικοσανοειδών , ενώ όταν χορηγείται μαζί με διεγέρτες της PKC αναστέλλει την παραγωγή των εικοσανοειδών (Sporti και συν., 1990 , Watanabe και συν., 1990) .



ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα κατά την ενεργοποίησή τους παράγουν σχεδόν όλα τα είδη εικοσανοειδών , ανάμεσά τους και PGE₂ . Η ίδια η PGE₂ που παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα ασκεί αυτοκρινική και παρακρινική κατασταλτική επίδραση στα ίδια τα κύτταρα που την παράγουν . Αυτός ο μηχανισμός αυτοκαταστολής των μακροφάγων οφείλεται στην ύπαρξη ειδικών EP-υποδοχέων για την PGE₂ στην επιφάνεια των μακροφάγων , με Kd περίπου $3,2 \times 10^{-8}$ M (Ormeier και συν., 1983) . Η σύνδεση της προσταγλανδίνης PGE₂ με τους υποδοχείς αυτούς προκαλεί την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του cAMP (Remold-O'Donnell , 1974 , Remold-O'Donnell και Alpert , 1979) . Αυτό οδηγεί στην αναστολή της δραστηριότητας της PLA₂ και στην διακοπή της παραγωγής εικοσανοειδών (Lim και συν., 1983) αλλά και την καταστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Smith και συν., 1980 , Lim και συν., 1983) . Η PGE₂ σε χαμηλές δόσεις διεγείρει την παραγωγή TNF-α από περιτοναϊκά μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη , ενώ σε υψηλές δόσεις την καταστέλλει (Renz και συν., 1988) . Αντιθέτως , η PGE₂ σε όλες τις δόσεις διεγείρει την παραγωγή και έκκριση της Κολλαγενάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη (Wahl και συν., 1977) . Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι η αναστολή της Φωσφολιπάσης A₂ σε φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα δεν επηρεάζει την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻) (Schultz και συν., 1985) , ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η αναστολή της Φωσφολιπάσης A₂ σε ηπατικά μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη προκαλεί μείωση της παραγωγής O₂⁻ (Mayer και Spitzer, 1994) . Ωστόσο , ούτε η πλήρης αναστολή της παραγωγής PGE₂ ούτε η εξωγενής προσθήκη PGE₂ μεταβάλλουν την ικανότητα των περιτοναϊκών μακροφάγων να φονεύουν καρκινικά κύτταρα μετά από ενεργοποίηση με ενδοτοξίνη ή Ιντερφερόνη-γ (Utsugi και Fidler , 1991) .

Υπάρχει μία βιβλιογραφική αναφορά στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από Μεσαγγειακά κύτταρα μετά από φαγοκυττάρωση στην οποία φαίνεται ότι η διέγερση της παραγωγής Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου απαιτεί την διαμεσολάβηση της οδού των Λιποξυγενασών (Baud και συν., 1983) . Η αναστολή της δραστηριότητας Λιποξυγενασών προκαλούσε μείωση της παραγωγής H₂O₂ και O₂⁻ αλλά δεν επηρέαζε την ίδια την φαγοκυττάρωση .

Εκτός από την PGE₂ και η PGE₁ επηρεάζει την λειτουργία των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων , αφού αυξάνει την φαγοκυτταρική τους αντίδραση , αυξάνει την παραγωγή Κολλαγενάσης μετά από διέγερση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS , καταστέλλει την έκφραση των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια των φλεγμονωδών μακροφάγων και τέλος αυξάνει την παραγωγή cAMP στα μονοκύτταρα και στα P388D1 μακροφάγα (Loose και DiLuzio ,1973 , Wahl και συν.,1977 , Lavis και συν.,1980 , Kunkel και συν., 1984) .

Αν και η παραγωγή κολλαγενάσης από ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα επιτείνεται με την προσθήκη PGE₂ και αναστέλλεται με την προσθήκη ινδομεθακίνης (Wahl και συν., 1977) , το ίδιο δεν συμβαίνει για τις Ώξινες Υδρολάσες των μακροφάγων (β-Γλυκουρονιδάση και Ν-Ακετυλ-β-D-Γλυκοσαμινιδάση) . Η πλήρης καταστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών PGE₁ , PGE₂ και PGF_{1α} με ινδομεθακίνη δεν επηρεάζει καθόλου την παραγωγή των όξινων υδραλασών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Bonney και συν., 1978) .



Οι προσταγλανδίνες επηρεάζουν ποικιλοτρόπως και άλλες λειτουργίες των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Η PGE₁ καταστέλλει την έκφραση των Ια-αντιγόνων στην επιφάνεια των μακροφάγων ενώ αντίθετα η PGF_{2α} την επιτείνει (Kunkel και συν., 1984) . Η PGE₂ καταστέλλει την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 από ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα , ενώ οι λευκοτριένες δεν προκαλούν τέτοια επίδραση (Brandwein, 1986) . Τέλος , μακροφάγα του ΚΝΣ που έχουν προσβληθεί από τον ιό HIV παράγουν σημαντικές ποσότητες TNFα , IL-1β , λευκοτριενών , λιπoxινών και PAF, ενώ η αναστολή της παραγωγής των εικοσανοειδών με ειδικούς ενζυμικούς αναστολείς προκαλούσε ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής TNFα και IL-1β (Genis και συν., 1992) .

Εκτός από τις προσταγλανδίνες που ήδη αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλα εικοσανοειδή που επηρεάζουν την λειτουργία των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Έχει αποδειχθεί ότι η επώαση των ανθρώπινων μονοκυττάρων και των μονοκυττάρων της καρκινικής σειράς Mono-Mac-6 με 15-HPETE ή 15-HEETE ή αραχιδονικό οξύ προκαλεί μείωση της παραγωγής TNFα μετά από ενεργοποίηση με μιτογόνες ουσίες ή με μικροοργανισμούς . Επίσης η επώαση των προαναφερθέντων μονοκύτταρων φαγοκυττάρων με 15-HPETE προκαλεί καταστολή της παραγωγής TNFα μετά από διέγερση με LPS , το οποίο αποδίδεται στην ικανότητα του 15-HPETE να καταστέλλει την μετατόπιση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC-Translocation) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων (Ferrante και συν., 1997) .



Κεφάλαιο 8-10 . Νευροπεπτιδίο Υ .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Υ .

Το Νευροπεπτιδίο Υ (ΝΠΥ) είναι ένα πεπτιδίο με 36 αμινοξέα που παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων του με το Παγκρεατικό Πολυπεπτιδίο και το Πεπτιδίο ΥΥ . Η ανακάλυψη του ΝΠΥ έγινε το 1982 από τους Tatemoto και συνεργάτες , οι οποίοι απομόνωσαν το πεπτιδίο αυτό από τον εγκέφαλο χοίρων και μελέτησαν την πρωτοταγή δομή του . Η ονομασία του οφείλεται στο ότι το τελευταίο αμινοξύ της αλυσίδας του είναι μία τυροσίνη (που συμβολίζεται με Υ) . Μέσα σε λίγα χρόνια από την αρχική ανακάλυψη του πεπτιδίου , είχε ήδη εντοπιστεί το γονίδιο που το κωδικοποιεί στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 7 και είχε διαπιστωθεί ότι υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς για το πεπτιδίο αυτό .

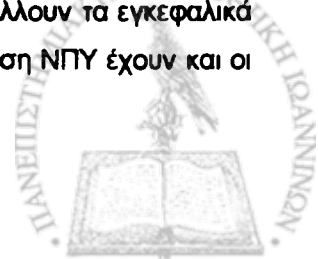
Το Νευροπεπτιδίο Υ παράγεται αρχικά με την μορφή ενός πρόδρομου μορίου με 97 αμινοξέα και Μ.Β. περίπου 10,8 kDa . Στην συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση σε δύο σημεία , με αποτέλεσμα να διασπάται σε τρία πεπτιδία από τα οποία το κεντρικό είναι το ΝΠΥ .

ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Υ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΑ .

Το Νευροπεπτιδίο Υ εντοπίζεται μέσα στα νευρωνικά στοιχεία πολλών οργάνων και ιστών . Έτσι , με ευαίσθητες ραδιοανοσολογικές τεχνικές (RIA) έχει εντοπιστεί τόσο στους νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος όσο και σε νευρώνες σε περιφερικά όργανα και στα επινεφρίδια .

Στον εγκέφαλο εντοπίζεται κυρίως στον φλοιό , στον παρακοιλιακό και στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου , αλλά και σε άλλες περιοχές του υποθαλάμου (περικοιλιακή , ραχιαία , πρόσθια , υπερχιασματική και προοπτική περιοχή) . Επίσης έχει ανιχνευτεί και στον παρακοιλιακό πυρήνα του θαλάμου , στον αμυγδαλοειδή πυρήνα , στην φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό του Sylvius και στην φαιά ουσία που χωρίζει την κεφαλή του κερκοφόρου πυρήνα από την πρόσθια διάτρητη ουσία (nucleus accumbens) , καθώς και αλλού (Allen και συν., 1983) . Οι νευράξονες των κυττάρων που περιέχουν ΝΠΥ διανύουν μεγάλες αποστάσεις μέσα στον εγκέφαλο , δημιουργώντας πολυάριθμες συνάψεις με κοντινούς και με απομακρυσμένους πυρήνες . Έτσι οι νευράξονες από τον τοξοειδή πυρήνα προβάλλουν στους υπόλοιπους υποθαλαμικούς πυρήνες , οι νευράξονες από τον ραχιαίο πυρήνα του υποθαλάμου συνάπτονται με τον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας και οι νευράξονες του αμυγδαλοειδούς πυρήνα προβάλλουν προς τον ραχιαίο πυρήνα του πνευμονογαστρικού και συνάπτονται με αυτόν . Οι χαρακτηριστικές θέσεις εντόπισης του ΝΠΥ στον εγκέφαλο συσχετίζονται με τις πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες στις οποίες το πεπτιδίο συμμετέχει .

Το Νευροπεπτιδίο Υ έχει επίσης ανιχνευθεί και στις λεπτές ίνες του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος καθώς επίσης και στα επινεφρίδια και στα συμπαθητικά γάγγλια (Gray και Morley , 1986 , Sandler και συν., 1986) . Πιο συγκεκριμένα , στον μυελό των επινεφριδίων το ΝΠΥ συναντάται μέσα στα αποθηκευτικά κυστίδια των χρωμιόφιλων κυττάρων που εκκρίνουν νοραδρεναλίνη , μαζί με τις Χρωμογρανίνες και τις Εγκεφαλίνες (Goodman-Gilman, 1996) . Στα συμπαθητικά γάγγλια έχει πολύ υψηλή συγκέντρωση , όπως επίσης και στις αυτόνομες νευρικές ίνες που περιβάλλουν τα εγκεφαλικά αγγεία και ειδικά τις αρτηρίες του εξαγώνου του Willis . Τέλος , υψηλή συγκέντρωση ΝΠΥ έχουν και οι συμπαθητικές νευρικές ίνες που απολήγουν στο μυοκάρδιο και στον σπλήνα .



Στον γαστρεντερικό σωλήνα έχει εντοπιστεί το ΝΠΥ στα νευρικά κύτταρα του Μυεντερικού πλέγματος του Auerbach και του Υποβλεννογονίου πλέγματος του Meissner (Sundler και συν., 1986). Αντίστοιχα, οι νευρώνες στους οποίους εντοπίζεται το πεπτιδίο προβάλλουν προς την κυκλωτήρ λεία μυϊκή στοιβάδα του σπλάχνου και προς τους λείους μύες της βλεννογόνιας μυϊκής στοιβάδας. Επίσης, έχει ανιχνευθεί το Νευροπεπτιδίο Υ και στα συμπαθητικά νεύρα του χοριοειδούς χιτώνα του οφθαλμού και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Τέλος, έχει διαπιστωθεί η παραγωγή και έκκριση του Νευροπεπτιδίου Υ από τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλαστικής στοιβάδας του ανθρώπινου πλακούντα καθώς επίσης και η ύπαρξη ειδικών υποδοχέων για το ΝΠΥ σε όλο τον πλακουντιακό ιστό (Petraglia και συν., 1989).

ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Υ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΑΣΣΙΚΩΝ ΝΕΥΡΟΜΕΤΑΒΙΒΑΣΤΩΝ.

Έχει διαπιστωθεί η συνύπαρξη του ΝΠΥ με άλλους νευρομεταβιβαστές, π.χ. με την νοραδρεναλίνη ή με το γ-αμινοβουτυρικό οξύ τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Η συνύπαρξη γ-αμινοβουτυρικού οξέος και ΝΠΥ έχει διαπιστωθεί σε νευρικά κύτταρα του φλοιού των πιθήκων και των αίλουρων. Αντιθέτως, η συνύπαρξη νοραδρεναλίνης και ΝΠΥ έχει διαπιστωθεί όχι μόνο σε περιοχές του ΚΝΣ όπως στον προμήκη μυελό, αλλά και σε συμπαθητικούς νευρώνες που καταλήγουν στην καρδιά και στα αγγεία, στον σπλήνα, στους ενδοκρινείς αδένες και στον σπερματικό πόρο, όχι όμως στον λιπώδη ιστό ή στους εξωκρινείς αδένες (Gray και Morley, 1986). Συγκεκριμένα αυτοί οι συμπαθητικοί νευρώνες περιέχουν δύο τύπους συναπτικών κυστιδίων, τα μικρά κυστίδια που έχουν διάμετρο 500 Å και τα μεγάλα κυστίδια με πυκνοχρωματικό πυρήνα και διάμετρο 1000 Å (dense-core granules). Το ΝΠΥ αποθηκεύεται μόνο στα μεγάλα κυστίδια, με αποτέλεσμα στον ίδιο νευρώνα να υπάρχουν δύο πληθυσμοί κυστιδίων, τα μικρά κυστίδια που περιέχουν μόνο νοραδρεναλίνη και τα μεγάλα κυστίδια που περιέχουν νοραδρεναλίνη και Νευροπεπτιδίο Υ. Έτσι είναι πιθανό ότι το ίδιο νεύρο έχει την δυνατότητα εκλεκτικής έκκρισης είτε μόνο της νοραδρεναλίνης ή και των δύο ουσιών ταυτόχρονα, αναλόγως με τον τύπο των συναπτικών κυστιδίων που θα εξωκυτώσει. Τα παραπάνω στοιχεία εξηγούν εν μέρει την αυξημένη έκκριση του Νευροπεπτιδίου Υ μετά από ισχυρή διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (Remow και συν., 1986), όπως και την αναστολή της έκκρισής του από τις νευρικές απολήξεις με την χρήση των α-αδρενεργικών ανταγωνιστών ή γουανεθιδίνης.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Υ.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ιππόκαμπος, φλοιός, παρεγκεφαλίδα, κ.α.) αλλά και σε άλλα όργανα έχουν ανιχνευτεί ειδικοί υποδοχείς για το Νευροπεπτιδίο Υ. Μέχρι πρόσφατα οι υποδοχείς αυτοί χωρίζονταν σε Υ₁- και Υ₂- υποδοχείς (Sheikhs και συν., 1989, Herzog και συν., 1992) αλλά σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν μέχρι έξη κατηγορίες υποδοχέων, που αριθμούνται από Υ₁- ως Υ₆- (Gehlert, 1994, Weinberg και συν., 1996). Οι υποδοχείς αυτοί είναι όλοι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες που συνήθως προκαλούν την καταστολή της Αδενυλικής Κυκλάσης και της παραγωγής cAMP. Επίσης μπορεί να επηρεάζουν και την συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ιονισμένου ασβεστίου και καλίου (Herzog και συν., 1992, Goodman-Gilman και συν., 1996).



ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Υ .

Το Νευροπεπτίδιο Υ έχει θεωρηθεί ότι διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους , τόσο στην ανταπόκριση του οργανισμού σε συνθήκες έντονης σωματικής ή ψυχολογικής καταπόνησης (stress) , όσο και στην ρύθμιση της συμπεριφοράς σίτισης και στην διαδικασία της μνήμης .

1. Το Νευροπεπτίδιο Υ προκαλεί ισχυρή και παρατεταμένη αγγειοσύσπαση των εγκεφαλικών , στεφανιαίων και σπλαχνικών αρτηριών και αυξάνει την αρτηριακή πίεση . Η αγγειοσυσπαστική δράση του ΝΠΥ είναι πιο ισχυρή στα μικρά αγγεία και υπάρχει συνεργεία με την νοραδρεναλίνη (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

2. Η έκκριση πολλών ορμονών επηρεάζεται από το ΝΠΥ . Έτσι , το πεπτίδιο αυτό αυξάνει την έκκριση της κορτικοστερόνης , της υδροκορτιζόνης και της Αντιδιουρητικής Ορμόνης (Goodman-Gilman και συν., 1996) ενώ αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης και της Αυξητικής Ορμόνης (McDonald και συν., 1985) . Επίσης ασκεί πολύπλοκη ρυθμιστική επίδραση στην έκκριση της Ωχρινοτρόπου Ορμόνης (LH) . Η χορήγηση ΝΠΥ σε ευνουχισμένους αρσενικούς επίμους προκαλεί την έντονη και παρατεταμένη μείωση των επιπέδων LH στο πλάσμα (Kerkorian και συν., 1985) . Σε ευνουχισμένους θηλυκούς επίμους η χορήγηση ΝΠΥ προκαλεί μειωμένη έκκριση LH , ενώ η in vitro επίδραση του πεπτιδίου σε υποφυσεκύτταρα προκαλεί αυξημένη έκκριση LH (McDonald και συν., 1985 , Sabatino και συν., 1989) . Οι επιδράσεις αυτές του Νευροπεπτιδίου Υ στην έκκριση LH οφείλονται και στην άμεση επίδρασή του στην υπόφυση αλλά και στην έμμεση επίδρασή του στα κύτταρα της Μέσης Εξοχής (Medial Eminence) του Φαιού Φύματος του Υποθαλάμου , που είναι υπεύθυνα για παραγωγή LHRH (McDonald και συν., 1985) .

Η άμεση επίδραση του ΝΠΥ στην παραγωγή γλυκοκορτικοειδών είναι ιδιαίτερα σημαντική , αφού συνάδει με τον κεντρικό ρόλο του πεπτιδίου στην αντίδραση του σώματος στο stress . Το Νευροπεπτίδιο Υ διεγείρει τον άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - επινεφριδίων και έτσι αυξάνει την παραγωγή CRH , ACTH και γλυκοκορτικοειδών (Haas και George , 1989 , Inoue και συν., 1989 , Tsagarakis και συν., 1989 , Inui και συν., 1990) . Η επίδραση αυτή του ΝΠΥ φαίνεται να ασκείται και στα κύτταρα της Μέσης Εξοχής του Φαιού Φύματος του Υποθαλάμου και στα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης , υπάρχει όμως μια διχογνωμία μεταξύ των ερευνητών , για το εάν η επίδραση του ΝΠΥ στην έκκριση των γλυκοκορτικοειδών εξαρτάται (Haas και George , 1989) ή όχι (Tsagarakis και συν., 1989) από τις κατεχολαμίνες . Ένα άλλο ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο είναι η ύπαρξη ειδικών υποδοχέων για τα γλυκοκορτικοειδή στην επιφάνεια των κυττάρων που παράγουν και εκκρίνουν το Νευροπεπτίδιο Υ (Hisano και συν., 1988 , Harfstrand και συν., 1989) . Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στους νευρώνες των πυρήνων του υποθαλάμου και του προμήκους που περιέχουν και ΝΠΥ μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε ένα μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης (feedback regulation) που ελέγχει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών κατά την διάρκεια σωματικού stress ή μια οδό μέσω της οποίας ασκούνται οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στο ΚΝΣ .

Τέλος , αν και οι συμπαθητικοί νευρώνες που απολήγουν στον θυρεοειδή αδένα περιέχουν ΝΠΥ , δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν το πεπτίδιο συμμετέχει στην φυσιολογική διαδικασία έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών .

3. Το Νευροπεπτίδιο Υ καταστέλλει την σεξουαλική συμπεριφορά στα πειραματόζωα και των δύο φύλων .



4. Η όρεξη και η συμπεριφορά σίτισης επίσης βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πεπτιδίου αυτού (Morley , 1988 . Καρύδης και Τόλης , 1997) . Το Νευροπεπτιδίο Υ αυξάνει το αίσθημα της πείνας και της δίψας μετά από την ενδοκοιλιακή έγχυση στον εγκέφαλο σε πειραματόζωα και προκαλεί αυξημένη πρόσληψη τροφής και νερού και ποικίλες διαταραχές στην συμπεριφορά τους . ενώ η ενδοφλέβια χορήγησή του δεν οδηγεί σε τέτοιες μεταβολές . Είναι πιθανό ότι η ορεξιογόνος δράση του πεπτιδίου ασκείται σε κάποιο κέντρο του υποθαλάμου και είναι ανεξάρτητη της νοραδρεναλίνης .

5. Το Νευροπεπτιδίο Υ επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μνήμης και πιθανώς στην παθογένεια της αμνησίας . Το ΝΠΥ ασκεί έντονο ρυθμιστικό ρόλο στην μνήμη , δρώντας κυρίως στην περιοχή του ιππόκαμπτου όπου υπάρχουν άφθονοι υποδοχείς για το πεπτιδίο αυτό . Η χορήγηση του πεπτιδίου σε πειραματόζωα στα οποία προηγουμένως προκλήθηκε τεχνητή αμνησία με ανισομυκίνη ή με σκοπολαμίνη είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά της μνήμης , ενώ υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες μπορεί το ίδιο το ΝΠΥ να προκαλέσει αμνησία (Flood και συν., 1987) . Τέλος , έχει διαπιστωθεί ότι οι νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού που περιέχουν το πεπτιδίο , συμμετέχουν στις παθολογοανατομικές αλλοιώσεις των ασθενών με νόσο του Alzheimer .

6. Το Νευροπεπτιδίο Υ συμμετέχει στην παθοφυσιολογία των τονικοκλωνικών επιληπτικών σπασμών και η χορήγησή του σε πειραματόζωα προκαλεί διαταραχές στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα . Ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που αναδεικνύουν αντιεπιληπτική δράση του ΝΠΥ , που ασκείται μέσω των Υ₅-υποδοχέων για το πεπτιδίο (Sperk και Herzog , 1997 , Woldbye και συν., 1997) .

7. Το Νευροπεπτιδίο Υ εκκρίνεται μαζί με τις κατεχολαμίνες κατά την διάρκεια της έντονης σωματικής άσκησης με αυξημένη διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου (Petow και συν., 1986) όπου πιθανώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της χρήσης των ενεργειακών υποστρωμάτων (Menendez και συν., 1990) .

8. Τέλος , υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την προστατευτική δράση του ΝΠΥ στον γαστρικό βλεννογόνο και στην αποτροπή της δημιουργίας των γαστρικών ελκών του Curling (stress-induced gastric ulcers) , αλλά με άγνωστο ακόμα μηχανισμό (Heilig και Murison , 1987) .

ΤΟ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ Υ ΚΑΙ ΤΟ ΑΝΟΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .

Μέχρι σήμερα δεν έχουν διαπιστωθεί αλληλεπιδράσεις του Νευροπεπτιδίου Υ με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος , ούτε έχουν ανιχνευτεί ειδικοί υποδοχείς για το ΝΠΥ στην επιφάνεια των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων .



Κεφάλαιο 8-11 . 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ (Καλσιτριόλη) .

8-11-1 . Γενικά στοιχεία για την 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ (Καλσιτριόλη) .

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 1,25-ΔΙΥΔΡΟΞΥ-ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D₃ .

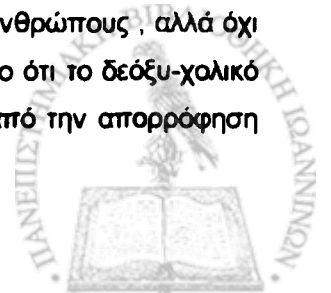
Η 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ (ή διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλη ή καλσιτριόλη) αποτελεί μία στεροειδική ορμόνη , με μηχανισμό δράσης και μεταβολική οδό παρόμοια με τις άλλες στεροειδικές ορμόνες . Η Βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) συνθέτεται κυρίως στο δέρμα , από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην 7-δεϋδρο-χοληστερόλη , σε αντίθεση με την Βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) που συνθέτεται από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο φυτικό στεροειδές εργοστερόλη . Η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε μία πλειάδα από ζωϊκές ή φυτικές στερόλες οδηγεί στον σχηματισμό διάφορων ουσιών με βιολογική δράση Βιταμίνης D₃ . Η φωτοχημική αυτή αντίδραση προκαλεί διάσπαση του δεσμού ανάμεσα στους άνθρακες C₉ και C₁₀ , που αποτελεί και την πιο ουσιαστική μεταβολή της στεροειδικής δομής κατά την διαδικασία της βιοσύνθεσης της χοληκαλσιφερόλης (DeLuca και Schpoees, 1983) .

Στον άνθρωπο και στα άλλα θηλαστικά, η κύρια πρόδρομος ουσία της Βιταμίνης D₃ είναι η 7-δεϋδρο-χοληστερόλη , η οποία συνθέτεται στο δέρμα . Αυτή η πρόδρομη ουσία μετατρέπεται με μια φωτολυτική αντίδραση υπό την επίδραση της ηλιακής (υπεριώδους) ακτινοβολίας σε Προβιταμίνη D₃ (6,7-cis-χοληκαλσιφερόλη) και στην συνέχεια η Προβιταμίνη μετατρέπεται αυτόματα σε Βιταμίνη D₃ .

Η Βιταμίνη D₃ είναι βιολογικά αδρανής ουσία και απαιτεί μια μεταβολική επεξεργασία για να ενεργοποιηθεί και να αποκτήσει δραστικότητα . Η μεταβολική αυτή επεξεργασία απαιτεί δύο αλληλοδιάδοχες υδροξυλιώσεις , στο ήπαρ και στον νεφρό αντίστοιχα , που επιτελούνται από ενζυμικά συστήματα που περιέχουν το κυτόχρωμα p450 και απαιτούν την παρουσία NADPH και μοριακού οξυγόνου για να δράσουν . Η πρώτη υδροξυλίωση γίνεται στην 25-θέση και επιτελείται από τα μικροσωμικά ένζυμα των ηπατοκυττάρων . Το προϊόν της αντίδρασης είναι η 25-υδροξυ-χοληκαλσιφερόλη που κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με μια ειδική σφαιρίνη , σε συγκέντρωση περίπου 30 ng/ml . Η δεύτερη υδροξυλίωση γίνεται στην 1α-θέση και επιτελείται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων και σε μικρότερο βαθμό σε κύτταρα του πλακούντα . Το προϊόν της αντίδρασης είναι η βιολογικά δραστική 1α,25-διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλη , που επίσης κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με μια ειδική σφαιρίνη , σε συγκέντρωση περίπου 30 pg/ml . Η αντίδραση αυτή υφίσταται έντονη ρύθμιση από την παραθορμόνη , τα επίπεδα της οποίας ρυθμίζονται από το ασβέστιο και τον φώσφορο του ορού , από την προλακτίνη και τα οιστρογόνα και τέλος από την ίδια την 1α,25-διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλη , η οποία επηρεάζει την έκκριση παραθορμόνης από τους παραθυρεοειδείς (Goodman Gilman και συν., 1985).

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D₃ .

Εκτός από την παραγόμενη στο δέρμα χοληκαλσιφερόλη , αυτή προσλαμβάνεται και από τις τροφές . Η απορρόφησή της από το λεπτό έντερο είναι ικανοποιητική σε υγιείς ανθρώπους , αλλά όχι σε ασθενείς με δυσλειτουργία του ήπατος ή των χολαγγείων . Αυτό οφείλεται στο ότι το δεόξυ-χολικό οξύ της χολής είναι απαραίτητο για την απορρόφηση της Βιταμίνης D₃ . Μετά από την απορρόφηση



της βιταμίνης από το έντερο, αυτή εισέρχεται στην λέμφο και στην συνέχεια στο αίμα. Εκεί συνδέεται με μια ειδική πρωτεΐνη (α-σφαιρίνη) που την μεταφέρει. Η Βιταμίνη D₃ έχει χρόνο ημιζωής στο πλάσμα 19 ως 25 ώρες αλλά μπορεί και να αποθηκευτεί στον λιπώδη ιστό για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέχρι που να ενεργοποιηθεί στο ήπαρ και στους νεφρούς. Αντιθέτως, η 25-υδροξυ-Βιταμίνη D₃ έχει χρόνο ημιζωής στο πλάσμα 19 ως 20 ημέρες.

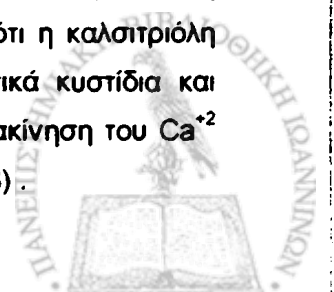
Η 1α,25-διϋδροξυ-Βιταμίνη D₃ υφίσταται ταχύτερη κάθαρση από το πλάσμα. Η κύρια οδός απέκκρισης είναι η χολή, όμως υπάρχει σημαντική εντεροηπατική κυκλοφορία του στεροειδούς αυτού. Εκτός από την ίδια την δραστική μορφή της βιταμίνης, αποβάλλονται στην χολή και οι βιολογικά αδρανείς μεταβολίτες της όπως π.χ. η 1α,24,25-τριϋδροξυ-Βιταμίνη D₃ και η 1α,25,26-τριϋδροξυ-Βιταμίνη D₃, που σχηματίζονται από την επίδραση διάφορων νεφρικών Υδροξυλασών. Επίσης, μια εναλλακτική βιοσυνθετική οδός που εμποδίζει τον σχηματισμό του δραστικού μεταβολίτη, είναι η 24-υδροξυλίωση της 25-υδροξυ-χοληκαλσιφερόλης που δίνει γένεση στην αδρανή 24,25-διϋδροξυ-χοληκαλσιφερόλη (Greenspan, 1991).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D₃ (ΚΑΛΣΙΤΡΙΟΛΗΣ).

- Η Βιταμίνη D₃ έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τον μηχανισμό με τον οποίο αυξάνει την εντερική απορρόφηση του Ca⁺² και συγκεκριμένα για το πως προκαλεί την ενεργητική μεταφορά του ιόντος από την ψυκτροειδή παρυφή προς την βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Διαπιστώθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός μοιάζει με τον μηχανισμό δράσης των στεροειδικών και των θυρεοειδικών ορμονών.

Η Βιταμίνη D₃ συνδέεται με ένα κυτταροπλασματικό υποδοχέα (VDR-υποδοχέας) ο οποίος ανήκει στην ίδια οικογένεια με τους υποδοχείς των ρετινοειδικών, στεροειδικών και των θυρεοειδικών ορμονών και παρουσιάζει ομοιότητες με το προϊόν του ογκογονιδίου *gag-erb-A*. Ο υποδοχέας αυτός έχει MW περίπου 50 kDa και στον άνθρωπο αποτελείται από 427 αμινοξέα. Όταν ο VDR-υποδοχέας συνδέεται με την Vit.D₃ φωσφορυλιώνεται και την μεταφέρει στον πυρήνα, όπου το σύμπλεγμα αυτό συνδέεται με ειδικές θέσεις του Προαγωγέα στο DNA των γονιδίων που επηρεάζονται από την Βιταμίνη D₃. Εκεί το σύμπλεγμα Vit.D₃-VDR συνδέεται με τον παράγοντα RXR (Retinoid X-Receptor), με την πρωτεΐνη SRC-1 και με άλλους παράγοντες με δραστηριότητα Υδροξυλάσης των Ιστονών (Jones και συν., 1998). Έτσι προκαλείται η μεταγραφή του mRNA της Αλκαλικής Φωσφατάσης, της Δεσμευτικής Πρωτεΐνης του Ασβεστίου (Calcium Binding Protein, CaBP ή Calbindin) και ορισμένων άλλων πρωτεϊνών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με την Calbindin. Όμως η Vit.D₃ καταστέλλει την έκφραση άλλων γονιδίων, όπως της Παραθορμόνης και της Ιντερλευκίνης-2.

Ωστόσο η μεταφορά του Ca⁺² μέσα από τα επιθήλια ξεκινά νωρίτερα από την σύνθεση των πρωτεϊνών αυτών που επηρεάζουν την μεταφορά του και δεν καταστέλλεται από αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης, π.χ. την κυκλοεξιμίδη, φαινόμενο που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι πιθανό η Βιταμίνη D₃ να δρα και μέσω άλλων μηχανισμών που δεν απαιτούν την de novo πρωτεϊνική σύνθεση. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι οι ενδοκυττωτικοί μηχανισμοί. Έχει προταθεί ότι η καλσιτριόλη προκαλεί την πρόσληψη του Ca⁺² μέσα από τον εντερικό αυλό με ενδοκυττωτικά κυστίδια και μεταφορά τους προς τα λυσοσώματα τα οποία αναλαμβάνουν την περαιτέρω μετακίνηση του Ca⁺² στην βασική επιφάνεια των επιθηλίων (Cancela και συν., 1988, Jones και συν., 1998).



ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D₃.

Η Βιταμίνη D₃ θεωρήθηκε παλαιότερα ένας απλός διατροφικός παράγοντας με παθητικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου. Όμως σήμερα υπάρχουν ευρήματα που επιτρέπουν την κατάταξη της στις ορμόνες και μάλιστα με ενεργό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού του ασβεστίου. Τα παρακάτω χαρακτηριστικά αποτελούν κριτήρια (Goodman-Gilman και συν., 1985, Hardman και συν., 1996) που συνηγορούν στην ταξινόμηση της 1α,25-διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλης στις ορμόνες:

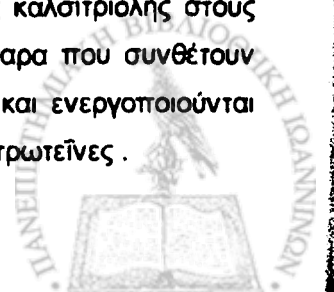
1. Η Βιταμίνη D₃ μπορεί να συντεθεί στο δέρμα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στην χοληστερόλη και υπό ιδανικές συνθήκες δεν απαιτείται η διαιτητική της πρόσληψη.
2. Η Βιταμίνη D₃ μεταφέρεται από τον τόπο παραγωγής σε άλλα απομακρυσμένα όργανα, όπου και υφίσταται ενεργοποίηση.
3. Η ενεργοποιημένη μορφή της ουσίας επηρεάζει τους ιστούς-στόχους σε όργανα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του ασβεστίου, προκαλώντας αύξηση του ασβεστίου στο πλάσμα.
4. Η Βιταμίνη D₃ δρα στους ιστούς-στόχους μέσω ειδικών υποδοχέων.
5. Ο μηχανισμός μετατροπής της ανενεργής βιταμίνης στην βιολογικά δραστικά της μορφή υφίσταται ρύθμιση από τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα, με μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback regulation).

Είναι σήμερα παραδεκτό ότι ο κύριος ρόλος της Βιταμίνης D₃ στον οργανισμό είναι η ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου στο αίμα, ώστε να διατηρούνται σε τιμές ικανοποιητικές για την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά και για την ομαλή λειτουργία των νευρομυϊκών συνάψεων.

Ωστόσο, η επίδραση της Βιταμίνης D₃ που έχει μελετηθεί καλύτερα από όλες είναι η διευκόλυνση της απορρόφησης ασβεστίου και φωσφόρου από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου διαθέτουν κυτταροπλασματικούς υποδοχείς για την 1α,25-διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ και τους χρησιμοποιούν για την μετάθεση (translocation) της βιταμίνης στον πυρήνα και την σύνδεσή της με την χρωματίνη, που έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφή και παραγωγή μιας πρωτεΐνης, της Πρωτεΐνης Δέσμευσης του Ασβεστίου (CaBP). Η πρωτεΐνη αυτή πιθανώς είναι ένας φορέας που διευκολύνει την ενεργητική μεταφορά του Ca²⁺ μέσα από τα εντερικά επιθήλια, αντίθετα από την ηλεκτροχημική κλίση. Είναι πιθανό επίσης η Βιταμίνη D₃ να δρα μέσω άλλων μηχανισμών που δεν απαιτούν πρωτεϊνοσύνθεση, όπως π.χ. με μηχανισμό ενδοκύτωσης.

Η 1α,25-διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ προκαλεί αυξημένη νεφρική κατακράτηση του ασβεστίου και του φωσφόρου μέσω αυξημένης επαναρρόφησής τους από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια.

Η Βιταμίνη D₃ σε μεγάλες δόσεις προκαλεί την κινητοποίηση ασβεστίου από τα οστά. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, έχει προταθεί όμως ότι μάλλον οφείλεται στην δράση της στους οστεοκλάστες. Οι οστεοκλάστες είναι αρχικά μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (μακροφάγα) που διαφοροποιούνται υπό την επίδραση της Βιταμίνης D₃ σε μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα με οστεολυτική δραστηριότητα (Bar-Shavit και συν., 1983). Πιθανώς η ίδια βιταμίνη να τους ενεργοποιεί για αυξημένη οστική απορρόφηση, αν και δεν έχουν ακόμα ανιχνευτεί υποδοχείς καλσιτριόλης στους οστεοκλάστες. Σε αντίθεση με τους οστεοκλάστες, οι οστεοβλάστες (τα κύτταρα που συνθέτουν οστέινη ουσία) διαθέτουν υποδοχείς για την 1α,25-διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλη και ενεργοποιούνται από αυτήν, παράγοντας Οστεοκαλσίνη (Osteocalcin), Ιντερλευκίνη-1 και άλλες πρωτεΐνες.



Υποδοχείς για την Βιταμίνη D₃ έχουν επίσης ανιχνευτεί σε κύτταρα του δέρματος, των οστών, των παραθυρεοειδών, του παγκρέατος, της υπόφυσης, του πλακούντα καθώς και άλλων ιστών. Είναι πιθανό ότι η ορμόνη αυτή επιδρά απευθείας στους ιστούς και ασκεί έτσι ιδιαίτερες βιολογικές επιδράσεις. Είναι σίγουρο ότι η καλσιτριόλη συμμετέχει στην διαφοροποίηση, την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό πολλών ειδών κυττάρων.

Η Βιταμίνη D₃ διαδραματίζει άμεσο ρόλο στην λειτουργία των σκελετικών μυών καθώς και του κεντρικού νευρικού συστήματος, εκτός της έμμεσης επίδρασης που έχει μέσω της ρύθμισης των επιπέδων ασβεστίου του αίματος (Boland, 1986, Luine και συν., 1987).

Η Βιταμίνη D₃ έχει υποδοχείς στον λεμφικό και στον αιμοποιητικό ιστό, με τους οποίους πιθανώς ρυθμίζει την ωρίμανση και διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών, καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά. Έχει σημαντικές επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως προκύπτει από την ύπαρξη υποδοχέων για την βιταμίνη αυτή στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων (Rigby, 1988). Συγκεκριμένα, η Βιταμίνη D₃ προκαλεί την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων και την αναστολή της παραγωγής Ιντερλευκίνης-2 και Ιντερφερόνης-γ από αυτά. Επίσης, προκαλεί την αναστολή του πολλαπλασιασμού των άωρων Τ-λεμφοκυττάρων (θυμοκυττάρων) του μυελού του Θύμου αδένου. Η 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνης D₃ επίσης προκαλεί την αναστολή της παραγωγής ανοσοσφαιρινών από τα Β-λεμφοκύτταρα, τόσο έμμεσα (καταστολή των Τ-λεμφοκυττάρων) όσο και άμεσα. Τέλος, η καλσιτριόλη προκαλεί και την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, την σύντηξη των μακροφάγων και τον σχηματισμό γιγαντοκυττάρων, την αυξημένη έκφραση των Fc-υποδοχέων στην επιφάνειά τους, την αυξημένη κυτταροτοξικότητά τους και την αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και TNF. Περισσότερα στοιχεία για την επίδραση της 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνης D₃ στα μονοκύτταρα θα αναφερθούν παρακάτω.

Τέλος είναι γνωστό ότι τα λεμφώματα και οι κοκκιωματώδεις παθήσεις όπως η σαρκοείδωση, χαρακτηρίζονται από την έκτοπη παραγωγή 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνης D₃ και την συνεπακόλουθη υπερασβεσταιμία που προκαλείται. Στην σαρκοείδωση η έκτοπη καλσιτριόλη παράγεται και από τα σαρκοειδικά κοκκιώματα (τα οποία περιέχουν επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα τύπου ξένου σώματος ή τύπου Langhans, που όλα προέρχονται από τα μακροφάγα) και από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Barbour και συν., 1981, Adams και συν., 1983). Η υπερασβεσταιμία των ασθενών με σαρκοείδωση είναι ανάλογη της δραστηριότητας της 1α-υδροξυλάσης που παρουσιάζουν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα του ασθενή (Adams και Gacad, 1985). Αντιθέτως, στα λεμφώματα η παραγωγή της 1α,25 -διυδροξυ- Βιταμίνης D₃ γίνεται μάλλον από τα Τ-λεμφοκύτταρα.

8-11-2 . Η 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ και τα μονοκύτταρα .

Η καλσιτριόλη έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης, ως προς την αλληλεπίδρασή της με τα μονοκύτταρα. Υπάρχουν πολυάριθμες in vitro μελέτες για τις αλληλεπιδράσεις αυτές καθώς και για τα ένζυμα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ρύθμισής τους.



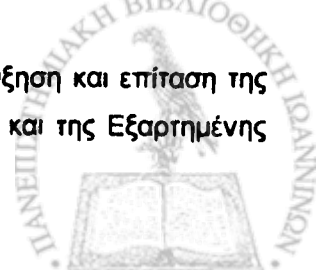
Τα μονοκύτταρα εκφράζουν συνεχώς τον VDR-υποδοχέα για την 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ (Rigby 1988) . Επίσης , τα μακροφάγα από φυσιολογικούς ανθρώπους και από ασθενείς με σαρκοειδωση (αλλά όχι με άλλες παθήσεις όπως Διάμεση Πνευμονική Ίνωση) μπορούν να προκαλέσουν την 1α-υδροξυλίωση και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση της Βιταμίνης D₃ (Adams και συν., 1983 , Reichel και συν., 1987) . Αυτή η δραστηριότητα 1α-Υδροξυλάσης που εμφανίζουν τα μακροφάγα των ασθενών με σαρκοειδωση δεν επηρεάζεται από την παραθορμόνη , την καλσιτριόλη ή το ασβέστιο του ορού , αλλά αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή και επιτείνεται από την Ιντερφερόνη-γ (Adams και Gacad , 1985) . Επίσης , δραστηριότητα 1α-Υδροξυλάσης μπορούν να εμφανίσουν και τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα από φυσιολογικούς ανθρώπους αν καλλιεργηθούν με ενδοτοξίνη ή με Ιντερφερόνη-γ (Koeffler και συν., 1985 , Rigby , 1988) . Η Ιντερφερόνη-γ μπορεί να προκαλέσει και την επαγωγή δραστηριότητας 24-Υδροξυλάσης στα μακροφάγα (Reichel και συν., 1987) , αλλά αυτό δεν πρέπει να έχει κάποια ιδιαίτερη κλινική σημασία αφού τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με σαρκοειδωση δεν παρουσιάζουν τέτοια ενζυμική δραστηριότητα . Αντιθέτως η επαγωγή της δραστηριότητας 1α-Υδροξυλάσης από τα μακροφάγα είναι σημαντική , γιατί μπορεί να προκληθεί όχι μόνο κατά την σαρκοειδωση , αλλά και από άλλες φλεγμονές και αντιδράσεις τύπου ξένου σώματος , π.χ. σε κοκκιώματα από εμφύτευση σιλικόνης (Kozeny και συν., 1984) .

Η 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ παράγεται από τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα και επηρεάζει άλλα μονοπύρνα φαγοκύτταρα (ή άλλους ιστούς και όργανα) που βρίσκονται στο εγγύς περιβάλλον ή σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος . Αυτό σημαίνει ότι η καλσιτριόλη μπορεί να παρουσιάζει ενδοκρινική , αυτοκρινική και παρακρινική δράση . Παραδείγματα τέτοιων επιδράσεων της 1α,25 -διυδροξυ-χοληκαλσιφερόλης είναι τα ακόλουθα :

Η Βιταμίνη D₃ προκαλεί την διαφοροποίηση των άωρων μονοκυττάρων (μονοβλαστών) της κυτταρικής σειράς U937 σε ώριμα μονοκύτταρα , όπως φαίνεται από την επαγωγή της έκφρασης των αντιγόνων επιφανείας AML-2-23 και MO2 και του Fc-υποδοχέα για την IgG-ανοσοσφαιρίνη και την παραγωγή λυσοζύμης (Rigby και συν., 1984 , Rouis και συν., 1985) . Η Βιταμίνη D₃ επίσης προκαλεί την ωρίμαση και διαφοροποίηση των ανθρώπινων φυσιολογικών μυελικών βλαστών αλλά και των λευχαιμικών βλαστών σε μονοκύτταρα και μακροφάγα (Koeffler και συν., 1984) . Τέλος , η ίδια Βιταμίνη D₃ που παράγεται από μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη-γ , αναστέλλει την παραγωγή Ιντερφερόνης από φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα , που φαίνεται να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός τοπικής αυτορρύθμισης της φλεγμονής (Reichel και συν., 1987) .

Η 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων και επιφέρει σημαντικές μορφολογικές αλλαγές , αυξάνοντας το μέγεθός τους και μειώνοντας τόσο την αναλογία πυρήνα / κυτταροπλάσματος όσο και την βασηοφιλία του κυτταροπλάσματος . Επιπλέον , η καλσιτριόλη προκαλεί την αυξημένη εμφάνιση ψευδοποδίων , την αυξημένη πτύχωση (ruffling) της κυτταρικής μεμβράνης και την αποπλάτυση των κυττάρων (Rigby και συν., 1984) . Επίσης η 1α,25-διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ προκαλεί την σύντηξη των μακροφάγων και την δημιουργία πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων (Abe και συν., 1984) . Η καλσιτριόλη προκαλεί και την μορφολογική διαφοροποίηση των προμυελοκυττάρων HL-60 σε ώριμα μακροφάγα (Reichel και συν., 1987) .

Στο λειτουργικό επίπεδο , η 1α,25 -διυδροξυ-Βιταμίνη προκαλεί την αύξηση και επίταση της έκφρασης Fc-υποδοχέων , της φαγοκυττάρωσης , της κατανάλωσης γλυκόζης και της Εξαρτημένης



από Αντισώματα Κυτταροτοξικότητας (ADCC) (Abe και συν., 1984, Rigby και συν., 1984). Επίσης, η καλσιτριόλη προκαλεί την επίταση της φαγοκυττάρωσης, καταστροφής και πέψης των μυκοβακτηριδίων από τα μονοκύτταρα, όπως επίσης και την εμφάνιση δραστηριότητας 1α-Υδροξυλάσης που έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παραγωγή καλσιτριόλης (Rook και συν., 1986). Σε κάποιες άλλες μελέτες αναφέρεται ότι προκαλεί την αυξημένη παραγωγή λυσοζύμης, Ανιόντος Υπεροξειδίου (O_2^-), Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) και TNF από τα μακροφάγα (Rouis και συν., 1985, Cohen και συν., 1986, Rook και συν., 1988). Ειδικά σε ότι αφορά την παραγωγή του H_2O_2 , η καλσιτριόλη προκαλεί την αυξημένη παραγωγή της τόσο στα μονοκύτταρα του αίματος όσο και στα ιστικά μακροφάγα μετά από επώαση διάρκειας 72 ωρών και η επίδραση αυτή είναι εξίσου ισχυρή με την ενεργοποίηση που προκαλεί η Ιντερφερόνη- γ σε υψηλές δόσεις (Cohen και συν., 1986). Η δράση αυτή φάνηκε να ασκείται μέσω ειδικών υποδοχέων για την καλσιτριόλη.

Εξάλλου, η 1 $\alpha,25$ -διυδροξύ-Βιταμίνη D_3 φαίνεται να ασκεί σημαντικό προστατευτικό ρόλο στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, αφού επάγει την σύνθεση Πρωτεϊνών Θερμικού Shock (Heat Shock Proteins) καθώς και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την προσκόλληση των μακροφάγων σε υποστρώματα κυτταροκαλλιέργειας και γενικά παραγόντων που διασφαλίζουν την φυσιολογική πρωτεϊνοσύνθεση και την κυτταρική επιβίωση (Polla και συν., 1986).

Μια σειρά μελετών για τον μηχανισμό με τον οποίο η 1 $\alpha,25$ -διυδροξύ-Βιταμίνη D_3 προκαλεί την ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων ξεκίνησε από μία εργασία (Rouis και συν., 1985), στην οποία παρατηρήθηκε ότι η βιταμίνη αυτή προκαλούσε στους άωρους μονοβλάστες U937 την έκφραση μιας ολόκληρης σειράς από δείκτες ωρίμασης και επιπλέον την αυξημένη σύνδεση της ινσουλίνης στον ειδικό υποδοχέα της. Όμως η ινσουλίνη είναι ένας γνωστός παράγοντας ωρίμασης και διαφοροποίησης των κυττάρων. Η δράση αυτή της η 1 $\alpha,25$ -διυδροξύ-χοληκαλσιφερόλης στους υποδοχείς ινσουλίνης θα μπορούσε να είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους προκαλεί την in vivo διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Στην συνέχεια μελετήθηκε από άλλον ερευνητή η επίδραση της Βιταμίνη D_3 στην επαγωγή της δραστηριότητας του ενζύμου Τρανσγλουταμινάση (Goldman, 1987). Η αύξηση της δραστηριότητας της Τρανσγλουταμινάσης παρατηρείται κατά την ωρίμανση και διαφοροποίηση των νεοπλασματικών μονοκυττάρων από την επίδραση της δεξαμεθαζόνης αλλά και κατά την φλεγμονώδη διέγερση των περιτοναϊκών μακροφάγων του μυός από θειογλυκολλικό ζυμό. Διαπιστώθηκε ότι η καλσιτριόλη προκαλούσε καταστολή της δραστηριότητας της Τρανσγλουταμινάσης στα μυελικής προέλευσης μακροφάγα των επίμυων ενώ δεν επηρέαζε καθόλου την δραστηριότητα στα μακροφάγα των μυών. Σε μακροφάγα από κυτταρικές σειρές ανθρώπων (ML3, HL-60, KG-1, U937) ή επίμυων (P388D1, J774.2) η καλσιτριόλη προκαλούσε μια ελάχιστη αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου και αυτό σε συνδυασμό με τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η 1 $\alpha,25$ -διυδροξύ-Βιταμίνη D_3 προκαλεί την ωρίμαση και διαφοροποίηση των μονοκυττάρων με διαφορετικό μηχανισμό από ότι τα γλυκοκορτικοειδή. Είναι πιθανό στον μηχανισμό αυτό να συμμετέχουν και διαδικασίες πρωτεϊνοσύνθεσης, αφού η καλσιτριόλη προκαλεί την σύντηξη (fusion) των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων μυών σε πολυκύτταρα γιγαντοκύτταρα μέσω της παραγωγής τριών ειδικών πρωτεϊνών με M.B. 98 kDa, 78 kDa και 50 kDa (Tanaka και συν., 1989). Ο μηχανισμός αυτός έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από τις πολυαμίνες σπερμίνη και σπερμιδίνη και ότι ενεργοποιείται και από την επίδραση της Ιντερλευκί-

νης-4 . Σε μία μεταγενέστερη μελέτη (Tanaka και συν., 1991) διαπιστώθηκε ότι όταν η Βιταμίνη D₃ προκαλούσε την σύντηξη των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επίμικτων σε πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα μέσω ενός μηχανισμού πρωτεϊνοσύνθεσης εξαρτημένου από τις πολυαμίνες , προκαλούσε ταυτόχρονα και την αύξηση της δραστηριότητας της Τρανσγλουταμινάσης . Επίσης , η αναστολή της σύνθεσης των δύο πολυαμινών σπερμίνης και σπερμιδίνης προκαλούσε και την αναστολή της δραστηριότητας της Τρανσγλουταμινάσης και την αναστολή της σύντηξης των μακροφάγων . Αν και η σύντηξη των μακροφάγων και η δημιουργία πολυπύρηννων γιγαντοκυττάρων αποτελεί μια «φυσιολογική» εξέλιξή τους, είναι πιθανό η διαδικασία ωρίμασης και διαφοροποίησης των άωρων μονοβλαστών σε μακροφάγα να μην διέπεται από τους ίδιους βιοχημικούς μηχανισμούς .



Κεφάλαιο 8-12 . Ιντερφερόνη-γ .

8-12-1 . Γενικά στοιχεία για τις Ιντερφερόνες .

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .

Οι Ιντερφερόνες ανακαλύφθηκαν το 1957 από τους Isaacs και Lindenmann . Αυτοί μελετούσαν το φαινόμενο της παρεμπόδισης της ανάπτυξης του ιού της γρίππης σε καλλιέργειες εμβρυϊκών κυττάρων νεοσσών από την παρουσία ενός παράγοντα , που προερχόταν από το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας εμβρυϊκών κυττάρων που ήδη είχαν μολυνθεί από αυτόν τον ιό . Επειδή το φαινόμενο αυτό ονομάζεται viral interference , η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη ονομάστηκε Ιντερφερόνη (Interferon) . Γρήγορα διαπιστώθηκε ότι η Ιντερφερόνη στην πραγματικότητα αποτελούσε μια οικογένεια από διάφορες πρωτεΐνες με ιδιόμορφα χαρακτηριστικά : ήταν ανθεκτικές στο όξινο pH , παράγονταν από διαφορετικά είδη κυττάρων και μάλιστα μόνο μετά από την επίδραση συγκεκριμένων διεγερτών , παρουσίαζαν μεγάλη ειδικότητα από είδος σε είδος (species-specific) και υψηλή βιολογική δραστηριότητα σε συγκεντρώσεις μέχρι και της τάξης του fmol (10^{-15} mol) . Για τις ιδιότητές τους αυτές και για τις πολλαπλές βιολογικές τους επιδράσεις απετέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας .

ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ .

Οι Ιντερφερόνες αποτελούν μια οικογένεια από πολλές διαφορετικές κυτταροκίνες (cytokines) που έχουν ισοστατικές , αντιυπερπλαστικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες . Επιπλέον , θεωρούνται χημικοί μεσολαβητές (chemical mediators) της φλεγμονώδους και της ανοσολογικής αντίδρασης .

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι Ιντερφερονών , ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων στα οποία πρωτοανιχνεύτηκε η παραγωγή τους . Έτσι , χωρίζουμε τις Ιντερφερόνες σε Ιντερφερόνη-α (INF-α) που ανιχνεύτηκε στα λευκοκύτταρα του αίματος , Ιντερφερόνη-β (INF-β) που ανιχνεύτηκε στους ινοβλάστες και σε Ιντερφερόνη-γ (INF-γ) που ανιχνεύτηκε στα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα . Αυτή η ταξινόμηση των Ιντερφερονών έχει διατηρηθεί μέχρι σήμερα , παρά το ότι με τον κλωνισμό των γονιδίων τους διαπιστώθηκε η ύπαρξη ορισμένων υποκατηγοριών που δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά με το σύστημα αυτό (Friedman , 1991) . Σύμφωνα με μία άλλη παλαιά ταξινόμηση , οι Ιντερφερόνες χωρίζονται σε δύο τύπους , ανάλογα με την αντοχή τους σε pH : 2,0 . Έτσι έχουμε την Ιντερφερόνη τύπου I (INF-α και INF-β) που είναι ανθεκτικές στα οξέα , και την Ιντερφερόνη τύπου II (INF-γ) που είναι ευαίσθητη στα οξέα (Sigal και Ron , 1994) .

Οι Ιντερφερόνες-α παράγονται από τα μακροφάγα , τα μονοκύτταρα , τους λεμφοβλάστες και τους ινοβλάστες , ως αντίδραση σε ιογενείς λοιμώξεις . Τα γονίδιά τους έχουν κλωνιστεί και έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μεγάλου αριθμού ανθρώπινων και ζωικών INF-α , που με βάση την δομή τους χωρίζονται σε δύο τάξεις (τάξεις I και II) . Οι INF-α της τάξης I έχουν μεγάλη διαφορά δομής από αυτές της τάξης II . Στον άνθρωπο υπάρχουν περισσότερα από 24 διαφορετικά γονίδια Ιντερφερονών-α , καθώς και μερικά ψευδογονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μεγάλη δομική ομολογία προς τις Ιντερφερόνες-α , αλλά δεν εκφράζονται ποτέ . Όλα αυτά τα γονίδια εντοπίζονται στην ίδια περιοχή στο χρωμόσωμα 9 , κανένα τους δεν περιέχει ιντρόνια (introns) και παρουσιάζουν ομολογία δομής πάνω από 90% (Oppenheim και Shevach , 1990) . Τέλος , οι INF-α παρουσιάζουν μερική βιοδραστι-

κότητα και σε άλλα είδη εκτός από εκείνα που τις παράγουν , π.χ. οι ανθρώπινες Ιντερφερόνες-α είναι δραστικές και στα βόεια και χοίρεια κύτταρα .

Οι Ιντερφερόνες-β παράγονται από τους ινοβλάστες , τα επιθηλιακά κύτταρα , τα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα . Οι INF-β χωρίζονται σε δύο ομάδες , τις β₁- και τις β₂- Ιντερφερόνες . Το γονίδιο της ανθρώπινης INF-β₁ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9 , στην ίδια περιοχή με τα γονίδια των INF-α και όπως αυτά , στερείται επίσης ιντρονίων . Παρουσιάζει απόλυτη ειδικότητα κατά είδος . Η Ιντερφερόνη-β₂ είναι αρκετά διαφορετική , τόσο στην δομή της όσο και στην λειτουργία της . Το γονίδιό της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και περιέχει τρία ιντρόνια . Σε αντίθεση με την INF-β₁ , παρουσιάζει ελάχιστη ισοστατική δράση αλλά ισχυρή επίδραση στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση . Επίσης θεωρείται ταυτόσημη με την Ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και τον Παράγοντα Διαφοροποίησης-2 των Β-λεμφοκυττάρων (BCDF-2 ή BSF-2) (Oppenheim και Shevach , 1990) .

Η Ιντερφερόνη-γ είναι μια λεμφοκίνη (lymphokine) διότι παράγεται από τα ενεργοποιημένα (με αντιγόνα ή μιτογόνα) Τ-λεμφοκύτταρα . Η INF-γ παράγεται επίσης από τα Κύτταρα Φυσικούς Φονείς (NK-cells , Natural Killer cells) . Ονομάζεται και Άνοση Ιντερφερόνη (Immune Interferon) . Η κύρια δράση της είναι ανοσορρυθμιστική και όχι ισοστατική . Το γονίδιο που κωδικοποιεί την INF-γ στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και περιέχει τρία ιντρόνια . Υπάρχει μόνο ένα γονίδιο για την INF-γ , το οποίο δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με τα γονίδια των INF-α και INF-β και το οποίο δεν έχει εντοπιστεί σε άλλο είδος σπονδυλωτών εκτός από τα θηλαστικά . Η ειδική δραστηριότητα της ανθρώπινης INF-γ είναι περίπου $1 - 25 \times 10^7$ units / mg πρωτεΐνης (Pestka και συν., 1987) .

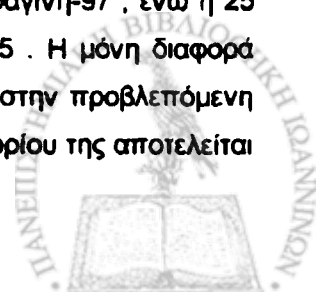
Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ .

Όλες οι Ιντερφερόνες είναι μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια , με MB από 17 ως 25 kDa .

Οι ανθρώπινες Ιντερφερόνες-α της τάξης I έχουν 165 - 166 αμινοξέα , ενώ της τάξης II έχουν 172 αμινοξέα . Όλες διαθέτουν μια σταθερή περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 115 και 151 , καθώς και μια μεταβλητή περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου τους . Επίσης υπάρχουν δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στα αμινοξέα 1 και 98 , 29 και 138 , αλλά μόνο ο 29-138 δεσμός είναι απαραίτητος για την διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των INF-α .

Η ανθρώπινη Ιντερφερόνη-β₁ είναι μια γλυκοπρωτεΐνη των 20 kDa , με 166 αμινοξέα και 20% περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες , ενώ η Ιντερφερόνη-β₂ είναι μια αρκετά διαφορετική πρωτεΐνη , με MB 21 kDa και με 184 αμινοξέα . Η INF-β₁ παρουσιάζει μια αρκετά σημαντική ομολογία αμινοξέων (περίπου 25%) με τις INF-α (Pestka και συν., 1987) .

Η ανθρώπινη Ιντερφερόνη-γ είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με 143 αμινοξέα , ευαίσθητη στο όξινο περιβάλλον και με ελάχιστη δομική ομοιότητα με τις άλλες Ιντερφερόνες . Αν και υπάρχει μόνο ένα γονίδιο INF-γ , σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE έχουν εντοπιστεί τρία διαφορετικά μόρια INF-γ με MB: 17, 20 και 25 kDa αντίστοιχα . Τα τρία διαφορετικά μοριακά βάρη οφείλονται στην διαφορετική αναλογία υδατανθράκων που έχουν οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές , ενώ το πρωτεϊνικό τμήμα τους είναι το ίδιο και στα τρία μόρια . Έτσι η 20 kDa INF-γ έχει γλυκοζυλιωθεί μόνο στην Ασπαραγίνη-97 , ενώ η 25 kDa INF-γ έχει γλυκοζυλιωθεί και στην Ασπαραγίνη-97 και στην Ασπαραγίνη-25 . Η μόνη διαφορά που έχει διαπιστωθεί ανάμεσα στην πραγματική πρωτοταγή δομή της INF-γ και στην προβλεπόμενη από την αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο DNA , είναι ότι το αμινοτελικό άκρο του μορίου της αποτελείται



από ένα μόριο πυρογλουταμικού οξέος αντί του αναμενόμενου τριπεπτιδίου Cys-Tyr-Cys . Ορισμένες παρατηρήσεις για ύπαρξη μορφών INF- γ με βραχύνσεις του καρβόξυ-τελικού άκρου του μορίου τους θα πρέπει να αποδοθούν σε πρωτεολυτική διάσπαση του πεπτιδίου μετά την έκκρισή του από τα κύτταρα . Μια περιοχή 45 αμινοξέων κοντά στο αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου της INF- γ φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την δράση της , αφού συνδέεται με τον υποδοχέα της (INF γ -R) και αναστέλλει την επαγωγή των HLA-αντιγόνων . Τέλος , υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι το φυσικό μόριο της INF- γ είναι διμερές ενώ η λειτουργική μορφή της είναι ένα τετραμερές . (Pestka και συν., 1987) .

Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΙΔΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Ιντερφερόνη- α , τύπος I	Πρωτεΐνη	Ινοβλάστες , λεμφοβλάστες , λευκοκύτταρα .
Ιντερφερόνη- α , τύπος II	Πρωτεΐνη	Ινοβλάστες , λεμφοβλάστες , λευκοκύτταρα .
Ιντερφερόνη- β 1	Γλυκοπρωτεΐνη	Ινοβλάστες , επιθηλιακά κύτταρα , λευκοκύτταρα .
Ιντερφερόνη- β 2	Πρωτεΐνη	Ινοβλάστες , επιθηλιακά κύτταρα , λευκοκύτταρα .
Ιντερφερόνη- γ	Γλυκοπρωτεΐνη	Ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα , NK-cells .

Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ .

Ένα από τα πρώτα χαρακτηριστικά που διαπιστώθηκαν στις Ιντερφερόνες είναι ότι δεν παράγονται συνεχώς αλλά μόνο μετά από την μόλυνση των κυττάρων με ιούς . Αργότερα διαπιστώθηκε ότι και άλλοι παράγοντες (φυσικοί ή συνθετικοί) εκτός από τους ιούς προκαλούσαν την παραγωγή τους , όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα .

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ .

1. Ζωικοί ιοί , ενεργοποιημένοι και απενεργοποιημένοι .
2. Άλλοι μικροοργανισμοί : βακτήρια , χλαμύδια , ρικέτσιες , πρωτόζωα (π.χ. *Toxoplasma*) και μύκητες .
3. Βακτηριακά παράγωγα (π.χ. LPS , MDP κ.α.) και προϊόντα εκχύλισης μυκήτων .
4. Πολυνουκλεοτιδία (π.χ. dsRNA ή poly-IC) και ανιονικά πολυμερή .
5. Μιτογόνα (Pokeweed Mitogen PWM , Concanavalin-A , κ.α.) .
6. Αντιγονικές ουσίες .
7. Κυτταροκίνες : Ιντερλευκίνη-1 (IL-1) , Ιντερλευκίνη-2 (IL-2) , Παράγοντας Νέκρωσης των Ογκών (TNF) .

Αν και οι Ιντερφερόνες περιγράφηκαν αρχικά σαν πρωτεΐνες των οποίων η παραγωγή επάγεται (δηλαδή ότι τα γονίδια που τις κωδικοποιούν εκφράζονται μόνο μετά από την επίδραση ενός ειδικού παράγοντα επαγωγής) , υπάρχουν ενδείξεις ότι υπό ορισμένες συνθήκες η παραγωγή τους μπορεί να επιτελείται συνεχώς . Έτσι , ενώ τα περιτοναϊκά μακροφάγα από υγιείς επίμυες είναι ανθεκτικά στην επιμόλυνση με ιούς , η *in vivo* χορήγηση αντισωμάτων κατά των INF- α και INF- β καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στους ίδιους ιούς (Proietto και συν., 1986) . Επίσης , πειραματόζωα ανθεκτικά στην επίδραση των ενδοτοξινών έχουν μακροφάγα ευαίσθητα στην μόλυνση από ιούς (Vogel και Fertsch , 1987) . Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ύπαρξη «φυσικής ανθεκτικότητας» σε ιούς μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην συνεχιζόμενη παραγωγή μικρών ποσοτήτων Ιντερφερονών λόγω της εισόδου των ενδοτοξινών της εντερικής χλωρίδας στην αιματική κυκλοφορία . Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και το ότι η χορήγηση αντισωμάτων κατά των Ιντερφερονών σε υγιή πειραματόζωα καταστέλλει την βασική δραστηριότητα της 2',5'-Ολιγοαδενυλικής Συνθετάσης , ενός ενζύμου που επάγεται από τις Ιντερφερόνες (Gresser και συν., 1985) .



Η επαγωγή της παραγωγής Ιντερφερονών μετά από ιογενείς λοιμώξεις μπορεί να είναι ένα τοπικό ιστικό φαινόμενο ή να είναι γενικευμένο και να οδηγήσει σε υψηλά επίπεδα Ιντερφερονών στο αίμα . Όμως , για να προκληθεί έκφραση των γονιδίων των INF από ένα προσβεβλημένο κύτταρο θα πρέπει να συμβεί και μεταγραφή και μετάφραση του γονιδιώματος του ιού (Taiga και συν., 1987).

Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων των Ιντερφερονών υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση και η ρυθμιστική περιοχή του γονιδιώματός τους έχει εντοπιστεί και κλωνιστεί . Στο ανθρώπινο γονίδιο της INF-β , η περιοχή -77 ως -19 πριν από το mRNA cap site είναι απαραίτητη και για την συνεχή και για την επαγόμενη σύνθεση της INF-β , ενώ η περιοχή από -210 ως -107 φαίνεται να καταστέλλει την συνεχή έκφρασή της . Παρομοίως , στο γονίδιο της INF-α η περιοχή -117 ως -74 πριν από το mRNA cap site ελέγχει την έκφραση της INF-α μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιούς .

Η επαγωγή της σύνθεσης Ιντερφερόνης-β₁ από ινοβλάστες μετά από έκθεση σε διπλές έλικες ριβονουκλεοτιδικού οξέος (dsRNA) όπως το πολυινοσινικό-πολυκυτιδυλικό οξύ (poly-IC) έχει γίνει το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης (Fujita και συν., 1985) . Διαπιστώθηκε ότι στην ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της INF-β₁ στους ινοβλάστες υπάρχει μία θέση επαυξητή (enhancer) , στην οποία συνδέεται μια πρωτεΐνη-καταστολέας (repressor) . Το poly-IC προκαλεί την αποσύνδεση της πρωτεΐνης-καταστολέα από την ρυθμιστική περιοχή και την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της INF-β₁ .

Ειδικά για την σύνθεση της Ιντερφερόνης-γ από τα Τ-λεμφοκύτταρα έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητη η ενεργοποίησή τους από την Ιντερλευκίνη-2 , το αραχιδονικό οξύ και τις λευκοτριένες . Οι ουσίες αυτές προκαλούν την αύξηση του cGMP και την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στα Τ-λεμφοκύτταρα , ενεργοποιώντας έτσι τους μηχανισμούς βιοσύνθεσης της INF-γ (Johnson και συν., 1986) .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ - ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ (ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ INF-γ) .

Η βιολογική δραστηριότητα των Ιντερφερονών οφείλεται στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων . Συνήθως οι Ιντερφερόνες ενεργοποιούν τα γονίδια αυτά , αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί και να καταστέλλουν την έκφραση τους (όπως π.χ. οι INF-α και INF-γ , που καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το προκολλαγόνο τύπου I και II) . Οι Ιντερφερόνες ενεργοποιούν ένα σημαντικό αριθμό διαφορετικών γονιδίων , ορισμένα από τα οποία περιέχουν μια κοινή αλληλουχία 30 ζευγών βάσεων , η οποία δρα σαν επαυξητής (enhancer) της έκφρασής τους .

Οι Ιντερφερόνες τύπου I (INF-α/β) και II (INF-γ) ενεργοποιούν διαφορετικά γονίδια . Για παράδειγμα , μόνο οι INF τύπου I επάγουν την έκφραση της P-1 Κινάσης και της Μx-Πρωτεΐνης , και μόνο η INF τύπου II επάγει την έκφραση των αντιγόνων MHC τάξεως II , του παράγοντα C2 του συμπληρώματος και της 67 kDa πρωτεΐνης-GBP . Ωστόσο , τα γονίδια αυτά εκφράζουν ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες που δρουν συνεργιστικά και συνδυαστικά , τόσο στους ισστατικούς όσο και στους αντι-υπερπλαστικούς μηχανισμούς . Επίσης , ορισμένα γονίδια (όπως π.χ. της 2',5'-Ολιγοαδενυλικής Συνθετάσης και των αντιγόνων MHC τάξεως I) ενεργοποιούνται και από τα τρία είδη Ιντερφερονών . Τέλος , είναι γνωστό ότι η INF-γ ενεργοποιεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των άλλων δύο Ιντερφερονών (INF -α και INF-β) (Hughes και Baron, 1987) .



Οι Ιντερφερόνες συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων για να προκαλέσουν την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης . Οι Ιντερφερόνες τύπου I (INF- α και INF- β_1) έχουν κοινό υποδοχέα (INF α/β -R) , το γονίδιο του οποίου εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 21 , ενώ η τύπου II (INF- γ) έχει διαφορετικό υποδοχέα (INF γ -R) , το γονίδιο του οποίου εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9 . Οι Ιντερφερόνες τύπου I έχουν μόλις λίγες εκατοντάδες υποδοχείς ανά κύτταρο , ενώ οι τύπου II έχουν μέχρι 10.000 υποδοχείς ανά κύτταρο .

Ο υποδοχέας της Ιντερφερόνης- γ (INF γ -R) εντοπίζεται σχεδόν σε όλα τα είδη των κυττάρων και έχει σταθερά Kd της τάξης του 10^{-9} ως 10^{-11} M . Παρά το ότι η INF- γ είναι ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Μακροφάγων (MAF, Macrophage Activating Factor) , τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα δεν έχουν ούτε διαφορετικό αριθμό υποδοχέων στην επιφάνειά τους , ούτε μεγαλύτερη ευαισθησία των υποδοχέων τους για το μόριο της INF- γ . Ωστόσο , ο INF γ -R των μονοκυττάρων του αίματος διαφέρει από τον αντίστοιχο υποδοχέα των ινοβλαστών και άλλων κυττάρων ως προς το Μοριακό Βάρος (τα μονοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς βαρύτερους κατά 30 - 50 kDa) και άλλα κριτήρια . Τα κύτταρα κάθε είδους θηλαστικού διαθέτουν υποδοχείς INF γ -R που αναγνωρίζουν και συνδέουν μόνο το μόριο που παράγεται από T-λεμφοκύτταρα του ίδιου είδους ή την αντίστοιχη ανασυνδυασμένη INF- γ . Ο INF γ -R υποδοχέας στα ανθρώπινα κύτταρα είναι μάλλον ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μία 53 kDa και μία 75 kDa υπομονάδα και το γονίδιό του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 (αν και απαιτούνται να εκφραστούν ακόμα δύο γονίδια , στα χρωμοσώματα 6 και 21 αντίστοιχα , για να δημιουργηθεί ένας πλήρως λειτουργικός INF γ -R υποδοχέας) . Ορισμένοι άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας έχει M.B. 90 - 95 kDa και ότι το γονίδιό του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 . Τέλος , δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των κατελιημένων υποδοχέων και στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων . Έτσι , η INF- γ θα προκαλέσει την επαγωγή γονιδίων ακόμα και όταν μόλις το 5% των υποδοχέων του κυττάρου-στόχου έχουν καταληφθεί από μόρια της Ιντερφερόνης (Pestka και συν., 1987 , Langer και Pestka , 1988) .

Η σύνδεση των υποδοχέων με τους υποκαταστάτες τους δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την ενεργοποίηση των κυττάρων , αλλά απαιτείται και η ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων συστημάτων Δεύτερων Μηνυτόρων , τα οποία επηρεάζουν τους μηχανισμούς ρύθμισης της πρωτεϊνοσύνθεσης . Παρά το ότι η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων μπορεί να ξεκινήσει μόλις μέσα σε 10' λεπτά , η ολοκληρωμένη κυτταρική απάντηση επέρχεται μέσα σε 12 ώρες και χωρίζεται σε δύο φάσεις : η πρώτη φάση επιτελείται μέσα σε 5-10 λεπτά και περιλαμβάνει την ταχεία έκφραση ορισμένων γονιδίων (primary genes ή Immediate-Early Genes, IEG) τα οποία κωδικοποιούν το mRNA των πρωτεϊνών της Πρωτογενούς Μακρομοριακής Απάντησης (primary macromolecular response) . Η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών ολοκληρώνεται μέσα σε 5 λεπτά ως 4 ώρες . Αυτές με την σειρά τους είτε θα επηρεάσουν άμεσα τα κύτταρα ή θα προκαλέσουν (μέσα σε 6 ώρες) την μεταγραφή του mRNA των πρωτεϊνών της Δευτερογενούς Μακρομοριακής Απάντησης (secondary macromolecular response) , οι οποίες θα είναι οι άμεσα υπεύθυνες για την κυτταρική αντίδραση (Langer και Pestka , 1988) .

Μετά την σύνδεση του μορίου μιας Ιντερφερόνης στον υποδοχέα της , δημιουργείται ένα σύμπλοκο . Αυτό το σύμπλοκο INF-υποδοχέα ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου η INF αποχωρίζεται από το σύμπλοκο και ο υποδοχέας είτε αποδομείται στα λυσοσώματα ή επιστρέφει στην επιφάνεια του κυττάρου . Η τύχη του μορίου της Ιντερφερόνης είναι αμφισβητούμενη



αφού κατά άλλους ερευνητές υφίσταται λυσοσωματική αποδόμηση ενώ κατά άλλους μεταφέρεται στον πυρήνα , συνδέεται με υποδοχείς της πυρηνικής μεμβράνης και εισέρχεται στο πυρηνόπλάσμα , όπου επηρεάζει άμεσα την γονιδιακή έκφραση (Langer και Pestka , 1988)

Το φαινόμενο της ενδοκυττάρωσης υποδοχέων έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη κυττάρων , τόσο μετά την ένωση των INF τύπου I με τον INF α/β -R όσο και μετά την ένωση της INF- γ με τον INF γ -R . Στην κυτταρική σειρά L-1210 , που προέρχεται από επίμυες , παρατηρείται ενδοκυττάρωση του συμπλόκου μέσα σε 5 -10 λεπτά από την σύνδεση της INF- γ με τον υποδοχέα της και η διεργασία φτάνει στον μέγιστο ρυθμό της μέσα σε 30 λεπτά . Στα κύτταρα αυτά οι υποδοχείς έχουν ένα χρόνο ημιζωής (T $\frac{1}{2}$) περίπου 8 ώρες . Το ίδιο συμβαίνει και στα κύτταρα της ανθρώπινης σειράς HeLa αλλά ο T $\frac{1}{2}$ φαίνεται να είναι μικρότερος (Pestka και συν., 1987) . Στα μακροφάγα των επίμυων η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων και η μεταφορά τους στα λυσοσώματα δεν οδηγεί στην καταστροφή τους , αλλά στην ανακύκλωσή τους και στην επιστροφή τους στην κυτταρική μεμβράνη . Αντιθέτως , στα μονοκύτταρα των επίμυων η ενδοκυττάρωση του συμπλόκου υποδοχέα - Ιντερφερόνης- γ οδηγεί στην λυσοσωματική αποδόμηση και καταστροφή του .

Τέλος , πρέπει να αναφερθεί ότι η μακροχρόνια έκθεση κυττάρων σε Ιντερφερόνη οδηγεί στην μείωση του αριθμού των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων (receptor down-regulation) . Η επίδραση αυτή είναι κοινή για όλα τα είδη Ιντερφερονών , αποτελεί αναστρέψιμη διεργασία και για να αποκατασταθεί απαιτεί την σύνθεση νέων υποδοχέων .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΗΝΥΤΩΡΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ .

Υπάρχουν πολύ λίγα στοιχεία για τους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων που ενεργοποιούνται μετά την σύνδεση των μορίων Ιντερφερόνης με τους υποδοχείς τους και για το πως αυτοί επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων του κυττάρου . Οι μηχανισμοί αυτοί ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων της Πρωτογενούς Μακρομοριακής Απάντησης (Primary Genes ή IEG ή Immediate-Early Genes) . Ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί αν ενεργοποιείται μόνο ένας μηχανισμός Δεύτερων Μηνυτόρων ή και περισσότεροι , αλλά φαίνεται ότι το αρχικό βήμα στην μεταγωγή του μηνύματος είναι η διέγερση μιας Κινάσης της Τυροσίνης που συνδέεται απευθείας με τον υποδοχέα της Ιντερφερόνης . Αυτή η Κινάση φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις STAT-πρωτεΐνες , που είναι απαραίτητες για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων (Pellegrini και Schindler, 1993 , Sadowski και συν., 1993).

Μετά από την σύνδεση των INF- α και INF- β με τον υποδοχέα INF α/β -R , το αρχικό βήμα αποτελεί η διέγερση της Κινάσης της Τυροσίνης Tyk-2 , που ανήκει στις JAK-Κινάσες (Janus Kinases) και φωσφορυλιώνει τους Παράγοντες Μεταγραφής p113 και p91 . Στην συνέχεια οι p113 και p91 μεταφέρονται στον πυρήνα και συνδέονται με την πρωτεΐνη p48 (ή αλλιώς ISGF-3 γ) και σχηματίζουν ένα τριμερές . Το τριμερές αυτό συνδέεται με το DNA ορισμένων γονιδίων που όλα διαθέτουν την ειδική περιοχή-προαγωγή που ονομάζεται ISRE (Interferon- α/β -Stimulated Response Element) . Η σύνδεση του τριμερούς στον ISRE-προαγωγή γίνεται μέσω της p48 (ISGF-3) και προκαλεί την έναρξη της έκφρασης του γονιδίου (Pellegrini και Schindler , 1993 , Horvath και Damell, 1997) . Φαίνεται ότι στην μεταγωγή του μηνύματος δεν συμμετέχουν τα συστήματα των φωσφατιδυλο-ινουσιτιδίων , του cGMP ή του ενδοκυττάρου Ca⁺² . Όμως σε κάποιο σημείο της πολύπλοκης αλληλουχίας των αντιδράσεων που



τελικά θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των γονιδίων , υπεισέρχεται το cAMP και μια Εξαρτημένη από το ATP Κινάση , ενδεχομένως με κάποιο ρυθμιστικό ρόλο (Langer και Pestka , 1988) .

Σε ότι αφορά την σύνδεση της INF- γ με τον INF γ -R , επίσης δεν είναι γνωστές πολλές λεπτομέρειες για τους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων που διεγείρονται . Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι μετά την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου υποδοχέα-INF- γ , η Ιντερφερόνη μεταφέρεται στην πυρηνική μεμβράνη όπου συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας , με τους οποίους θα εισαχθεί στο πυρηνόπλασμα και θα επιδράσει απευθείας στο γονιδίωμα του κυττάρου . Η υπόθεση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμα . Τα μόνα στοιχεία που είναι σίγουρα είναι ότι ο υποδοχέας INF γ -R είναι επίσης συνδεδεμένος με μια JAK Κινάση της Τυροσίνης , η οποία ενεργοποιείται κατά την ένωση της INF- γ με τον υποδοχέα . Η Κινάση φωσφορυλιώνει τον Παράγοντα Μεταγραφής p91 , ο οποίος είναι γνωστός ως **STAT-1a (Signal Transducer and Activator of Transcription)** ή ως STAT-91 . Η φωσφορυλίωση γίνεται στην θέση Tyr-701 και είναι απολύτως απαραίτητη για την ενεργοποίηση του p91 . Για την εκδήλωση μέγιστης δραστηριότητας από τον STAT-1a απαιτείται και η φωσφορυλίωσή του στην Σερίνη Ser-727 από τις MAP-Κινάσες . Τα μόρια του STAT-1a (p91) υφίστανται διμερισμό και τα διμερή μεταναστεύουν στον πυρήνα και συμμετέχουν στον σχηματισμό του Παράγοντα GAF , ο οποίος ενώνεται στο DNA του γονιδίου στην περιοχή GAS (Gamma Activation Site) του προαγωγέα . Η σύνδεση του παράγοντα GAF με τον προαγωγέα GAS προκαλεί έναρξη της μεταγραφής του mRNA του γονιδίου (Pellegriani και Schindler, 1993 , Shuai και συν., 1993 , Sadowski και συν., 1993 , Horvath και Damell, 1997) . Αυτή η αλληλουχία γεγονότων είναι κοινή για την επαγωγή της έκφρασης πολλών γονιδίων , αλλά φαίνεται πως δεν είναι η μόνη οδός Μεταγωγής Μηνύματος για την INF- γ . Στην κυτταρική σειρά U937 (ανθρώπινων μονοκυττάρων) κάποιοι ρόλοι διαδραματίζουν στην επαγωγή του μηνύματος (1) η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} και (2) η διέγερση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Η PKC φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο αφενός επειδή ενεργοποιείται ταχύτατα (σε λιγότερο από 10' λεπτά) και μετατοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (translocation) , αφετέρου επειδή η αναστολή της καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που επάγει η INF- γ (Fan και συν., 1985 , Langer και Pestka, 1988) . Η αναστολή της PKC στα κύτταρα U937 καταστέλλει την έκφραση του mRNA των HLA-DR αντιγόνων και του γονιδίου γ .1 . Εκτός από την PKC , μια άλλη οδός που διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο είναι αυτή του cAMP , αφού η διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης αναστέλλει την μεταγραφή του mRNA του γονιδίου γ .1 των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων (Fan και συν., 1985) .

Ακόμα δεν υπάρχουν μελέτες που να δείχνουν ότι οι Ιντερφερόνες μπορούν να δράσουν με άμεση διέγερση Παραγόντων Μεταγραφής όπως ο NF κ B (Barnes και Karin, 1997) .

ΑΜΥΝΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ .

Οι Ιντερφερόνες ασκούν προστατευτική δράση απέναντι στους ιούς και σε πολλά μικρόβια (π.χ. *Shigella*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Coxiella*, *Aspergillus* κ.α.) . Αυτή η δράση επιτυγχάνεται με την επαγωγή της έκφρασης ειδικών γονιδίων και την παραγωγή των πρωτεϊνών τους (Oppenheim και Shevach , 1990 , Baron και συν., 1992) . Εδώ θα αναφερθούν μερικά μόνο παραδείγματα .

Το dsRNA των ιών που προσβάλλουν ένα κύτταρο προκαλεί την παραγωγή Ιντερφερονών , οι οποίες ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων δύο 2',5'-Ολιγοαδενυλικών Συνθετασών χαμηλού

μοριακού βάρους . Αυτές οι δύο Συνθετάσες προκαλούν την παραγωγή 2',5'-Ολιγοαδενυλικών (2',5'-A) ολιγομερών , που συνδέονται σε μία Ενδοριβονουκλεάση (Rnase-L) και την ενεργοποιούν . Στην συνέχεια η Ενδοριβονουκλεάση Rnase-L καταστρέφει το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και υδρολύει το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και έτσι εμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση και διακόπτει την αναπαραγωγή του ιού στην φάση της Μετάφρασης του RNA .

Η προσβολή ενός κυττάρου από ιούς προκαλεί επίσης την έκφραση του γονιδίου μίας Κινάσης με MB 68 kDa (Protein Kinase P-1) , η οποία συνδέεται στα ριβοσώματα . Όταν αυτή η Κινάση P-1 έρχεται σε επαφή με το dsRNA του ιού και το ATP , αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται . Στην συνέχεια η Κινάση P-1 φωσφορυλιώνει και αδραντοποιεί τον Παράγοντα Έναρξης Πρωτεϊνοσύνθεσης eIF-2a (eukaryotic Initiation Factor-2a) και διακόπτει την σύνθεση πρωτεϊνών και την αναπαραγωγή του ιού στην φάση της Μετάφρασης του RNA . Ας σημειωθεί ότι στα τρωκτικά όλες οι Ιντερφερόνες θα προκαλέσουν την έκφραση της Κινάσης P-1 , ενώ στον άνθρωπο η INF-γ αποτελεί ασθενή επαγωγέα της P-1 και δεν οδηγεί στην φωσφορυλίωση του eIF-2a .

Ωστόσο οι Ιντερφερόνες προκαλούν την έκφραση πολλών ακόμα γονιδίων , που επίσης είναι υπεύθυνες για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης . Για παράδειγμα , οι Ιντερφερόνες ενεργοποιούν την Μx-Πρωτεΐνη , μια πρωτεΐνη των 75 kDa που αναστέλλει την σύνθεση του mRNA (ειδικά του ιού της γρίππης) , την Μεθυλάση , που αναστέλλει την μεθυλίωση του mRNA-cap , την Γλυκοσυλο-Τρανσφεράση , που αναστέλλει την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών , και τέλος μια Φωσφοδιεστεράση που καταστρέφει το tRNA των ιών και έτσι εμποδίζει την δημιουργία των πεπτιδικών αλυσίδων . Οι Ιντερφερόνες επίσης προκαλούν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα με μεταβολική επίδραση , όπως η 2,3-Διοξυγενάση της Ινδολαμίνης και η Οξειδάση της Ξανθίνης , ή και πρωτεΐνες με άγνωστους ακόμα ρόλους στην άμυνα του οργανισμού , όπως οι δύο γουανινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (GBP) των 67 και 56 kDa. Η INF-γ ειδικά ενεργοποιεί και άλλα γονίδια , που επίσης συσχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση και την ανοσολογική απόκριση , όπως τα γονίδια για τα αντιγόνα MHC τάξεως II και HLA-D τάξεως II , για τους παράγοντες του συμπληρώματος C2 και B (Complement Factor B) και τέλος για τον υποδοχέα του TNF (Παράγοντα Νέκρωσης των Ογκων) .

Οι Ιντερφερόνες διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία από μηχανισμούς με τους οποίους προκαλούν την αναστολή του αναδιπλασιασμού των ιών . Έτσι , στην περίπτωση του ραβδοϊού VSV (Vesicular Stomatitis Virus) , οι INF αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού με τέσσερις διαφορετικούς και ανεξάρτητους μηχανισμούς : μειώνεται η ικανότητα διείσδυσης (penetration) του ιού VSV στα κύτταρα-στόχους , αναστέλλεται η μεταγραφή του dsRNA του ιού και με ανεξάρτητο μηχανισμό αναστέλλεται και η μετάφραση του mRNA . Τέλος , παρεμποδίζεται και η συναρμολόγηση (assembly) του ιού , με αποτέλεσμα την δημιουργία ελαττωματικού ιού , χωρίς γλυκοπρωτεϊνικές δομές στο περίβλημά του .

Η αναστολή της ανάπτυξης του παρασίτου *Toxoplasma gondii* από την Ιντερφερόνη-γ είναι αποτέλεσμα της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου της 2,3-Διοξυγενάσης της Ινδολαμίνης , ενός ενζύμου που καταβολίζει την τρυπτοφάνη . Το *Toxoplasma* δεν μπορεί να αναπτυχθεί χωρίς την τρυπτοφάνη , η οποία είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό του . Ταυτόχρονα , οι INF-β και INF-γ προκαλούν ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων και αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (O_2^- , OH^\cdot , H_2O_2) και αζώτου (NO) , που είναι τοξικές για το *Toxoplasma* και την *Leishmania* . Οι ίδιες Ιντερφερόνες μπορούν να ενεργοποιήσουν και τα κύτταρα Φυσικούς Φονείς

(NK-cells , Natural Killer Cells) . Αυτό δείχνει ότι εκτός από την ενεργοποίηση γονιδίων , οι INF μπορούν να δράσουν και ενεργοποιώντας ολόκληρα κύτταρα με ανοσολογικές ιδιότητες .

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΕ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ .

Η ανοσολογική αντίδραση διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο τόσο στην πρόληψη των ιογενών λοιμώξεων όσο και στην ίαση και αποδρομή από τέτοιες λοιμώξεις . Όμως ο οργανισμός καταφέρνει να ιαθεί από τις ιώσεις ακόμα και κάτω από συνθήκες πλήρους ανοσοκαταστολής , χάρη σε άλλους μηχανισμούς όπως η παραγωγή Ιντερφερονών .

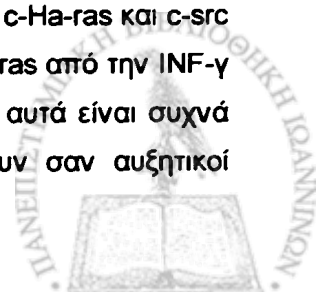
Ο μηχανισμός δράσης των Ιντερφερονών στις ιογενείς λοιμώξεις είναι αρκετά πολύπλοκος και περιλαμβάνει εκτός από την μεταβολή των ιδιοτήτων των κυττάρων-στόχων και την ενεργοποίηση των Κυττάρων Φυσικών Φονέων (NK-κύτταρα) , την διέγερση των Β-λεμφοκυττάρων για παραγωγή αντισωμάτων , την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων για φαγοκυττάρωση , την όξινση του pH του αίματος και την πυρετική αντίδραση . Όλες οι παραπάνω επιδράσεις των Ιντερφερονών εκμεταλλεύονται τους ανοσολογικούς μηχανισμούς του σώματος και προκαλούν την υποστροφή της ιογενούς λοίμωξης , υποβοηθώντας τον κύριο μηχανισμό προστασίας απέναντι στις ιώσεις , που είναι η επαγωγή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στα κύτταρα-στόχους .

ΟΙ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ .

Οι Ιντερφερόνες (και ιδιαίτερα η $INF-\beta_2$) αναστέλλουν την αύξηση των φυσιολογικών και των νεοπλασματικών κυττάρων , έχουν δηλαδή αντιυπερπλαστική (antiproliferative) δράση , αλλά επίσης ρυθμίζουν και την ταχύτητα του μιτωτικού κύκλου . Πιο συγκεκριμένα , κατά την διάρκεια της G_1 -μεταμιτωτικής φάσης οι Ιντερφερόνες αναστέλλουν τον σχηματισμό RNA και κάποιων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό DNA . Έτσι το κύτταρο ή θα συνεχίσει τον κύκλο του με αργό ρυθμό ή θα μεταπέσει στην φάση ηρεμίας G_0 . Ένας μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης είναι η αλληλεπίδραση με τα ογκογονίδια (oncogenes) και με τους αυξητικούς παράγοντες (growth factors) .

Οι Ιντερφερόνες αντιτίθενται στην μιτογόνο δράση διαφόρων αυξητικών παραγόντων , όπως για παράδειγμα οι PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) και EGF (Epidermal Growth Factor) . Ένα παράδειγμα αποτελεί ο ακόλουθος ρυθμιστικός μηχανισμός : ο PDGF προκαλεί την μιτωτική διαίρεση των ινοβλαστών του επίμυος αλλά ταυτόχρονα επάγει και την παραγωγή Ιντερφερονών , οι οποίες αναστέλλουν την μιτωτική δράση του PDGF (Zullo και συν., 1985) . Η δράση αυτή της Ιντερφερόνης ασκείται με την αναστολή της αύξησης του mRNA της ακτίνης , της Αποκαρβοξυλάσης της Ορνιθίνης , του c-myc και του c-fos . Ένα άλλο παράδειγμα αφορά τον Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (TNF) , ο οποίος προκαλεί την αύξηση των διπλοειδικών κυττάρων του ανθρώπου και ταυτόχρονα επάγει την παραγωγή της $INF-\beta_1$, η οποία καταστέλλει την αύξησή τους .

Οι Ιντερφερόνες επίσης επηρεάζουν την έκφραση των ογκογονιδίων . Παραδείγματα τέτοιων ρυθμιστικών επιδράσεων είναι η αναστολή της έκφρασης των ογκογονιδίων c-myc , c-Ha-ras και c-src από τις $INF-\alpha$ και $INF-\beta$ καθώς και η διέγερση της έκφρασης του c-myc και του v-Ki-ras από την $INF-\gamma$ σε κύτταρα HeLa και σε κύτταρα προσβεβλημένα από ρετροϊούς . Τα ογκογονίδια αυτά είναι συχνά υπεύθυνα για την κυτταρική αύξηση , γιατί κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν σαν αυξητικοί παράγοντες (Oppenheim και Shevach , 1990) .



ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος υφίστανται σημαντικές ρυθμιστικές επιδράσεις από τις Ιντερφερόνες , που αφορούν τόσο την κυτταρική όσο και την χυμική ανοσία .

Οι Ιντερφερόνες προκαλούν την αύξηση ή την μείωση της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών , ανάλογα με την δοσολογία και την χρονική στιγμή της χορήγησής τους . Έτσι , η χορήγηση των INF σε χαμηλές δόσεις μετά από την έκθεση στο αντιγόνο , οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων . Αν όμως οι INF χορηγηθούν σε υψηλές δόσεις πριν από την έκθεση στο αντιγόνο , προκαλούν μείωση της παραγωγής αντισωμάτων . Συγκεκριμένα , στα Β-λεμφοκύτταρα των επίμυων η INF- γ σε χαμηλές δόσεις επιτείνει την παραγωγή της IgG2a και αναστέλλει την παραγωγή των IgE και IgG1 , ενώ σε υψηλές δόσεις καταστέλλει την παραγωγή όλων των ανοσοσφαιρινών . Επίσης , η INF- β_2 αποτελεί τον BCDF-2 (Παράγοντα Διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων) , προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων .

Οι Ιντερφερόνες - α και - β αυξάνουν την απελευθέρωση ισταμίνης από τα βασεόφιλα λευκοκύτταρα μετά από έκθεση σε αντιγόνα . Αυτό σημαίνει ότι μετά από ιογενείς λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος , η απελευθέρωση Ιντερφερονών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ή την επιδείνωση του βρογχικού άσθματος .

Αρκετές από τις επιδράσεις των Ιντερφερονών στο ανοσοποιητικό σύστημα οφείλονται στην πρόκληση μεταβολών στους υποδοχείς και τα αντιγόνα της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων . Έτσι π.χ. οι INF- α και INF- β επιτείνουν την έκφραση των αντιγόνων MHC τύπου I στα σπληνικά λεμφοκύτταρα και στα θυμοκύτταρα . Η INF- γ είναι επίσης ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης των αντιγόνων MHC-I , Ia και Lyt στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων .

Η Ιντερφερόνη- γ που παράγεται από τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα είναι ο MAF (Macrophage Activating Factor) που ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα φέρνει σε λειτουργική κατάσταση υψηλής αντιμικροβιακής και αντινεοπλασματικής δραστηριότητας . Έτσι , η INF- γ επιτείνει την φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων , αυξάνει την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 , την κυτταροτοξικότητά τους αλλά και την έκφραση των Fc-υποδοχέων στην επιφάνειά τους . Επίσης η Ιντερφερόνη- γ αυξάνει την έκφραση των αντιγόνων MHC τάξεως II στην επιφάνεια όχι μόνο των μακροφάγων αλλά και όλων των αντιγονοπαρουσιαστικών (antigen-presenting) μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (π.χ. δενδριτικά κύτταρα) και έτσι επαυξάνει την παρουσίαση αντιγόνου προς τα T-λεμφοκύτταρα .

Οι Ιντερφερόνες καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων μετά από έκθεση σε μιτογόνα όπως η Φυτοαιμογλουτινίνη (PHA) και η Κοκκαναβαλίνη A (Con-A) , ενώ αντιθέτως αυξάνουν την παραγωγή κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (CTL) . Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν σε μηχανισμούς Εξαρτημένης από Αντισώματα Κυτταροτοξικότητας (ADCC) .

Η συμμετοχή όλων των Ιντερφερονών (INF- α , - β και - γ) στην ενεργοποίηση των Κυττάρων Φυσικών Φονέων (NK-cells) είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανοσολογική απόκριση . Η χορήγηση των INF , τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* , προκαλεί την ταχύτερη και πιο αποτελεσματική λύση των κυττάρων-στόχων και την ταχεία διαφοροποίηση των άωρων NK-κυττάρων σε ώριμα NK-κύτταρα και τέλος προάγει τον πολλαπλασιασμό των διαφοροποιημένων NK-κυττάρων .



Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή των Ιντερφερονών στην παθογένεια της αντίδρασης Shwartzmann, μιας θανατηφόρου φλεγμονώδους αντίδρασης με διάχυτες εστίες σπλαχνικής θρόμβωσης, που εμφανίζεται μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε ενδοτοξίνη από κάποια εστία φλεγμονής (Billiau, 1988). Φαίνεται πως η έκθεση στην ενδοτοξίνη προκαλεί αυξημένα επίπεδα INF- α και INF- β στο αίμα και αυξημένη παραγωγή INF- γ στην φλεγμονώδη εστία, αλλά ενώ οι Ιντερφερόνες τύπου I καταστέλλουν την ανοσολογική αντίδραση, η INF- γ αντιθέτως την επιτείνει. Η συνεργασία της INF- γ με άλλες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες οδηγεί σε σημαντική εστιακή βλάβη, ενώ οι άλλες δύο Ιντερφερόνες καταστέλλουν την συστηματική αντίδραση και αποκρύπτουν την σοβαρότητα της κατάστασης (Billiau, 1988).

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΩΝ.

Οι ιοστατικές, αντιυπερπλαστικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες των Ιντερφερονών είχαν ως αποτέλεσμα την χρησιμοποίησή τους για την θεραπεία νεοπλασιών και χρόνιων ιογενών λοιμώξεων.

Η Ιντερφερόνη- α έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην θεραπεία της χρόνιας Ηπατίτιδας που προκαλείται από τους ιούς HBV, HCV και HDV. Οι ασθενείς με Χρόνια Ηπατίτιδα Β ή C παρουσίαζαν σημαντική κλινική και παθολογοανατομική βελτίωση μετά από την θεραπεία, αλλά στην περίπτωση των ασθενών με Ηπατίτιδα Δ η κλινική βελτίωση ήταν παροδική. Επίσης η INF- α έχει χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία λοιμώξεων από Κυτταρομεγαλοϊό (CMV), Ιό του Απλού Έρπητα (HSV) και Ιό του Έρπητα Ζωστήρα (VZV). Στο AIDS (Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας) η Ιντερφερόνη- α χρησιμοποιείται με επιτυχία κατά του ιού HIV μόνο στα αρχικά στάδια της νόσου και σε συνδυασμό με Ζιδοβουδίνη, ενώ σε όψιμα στάδια προκαλεί έντονη μυελοτοξικότητα χωρίς σημαντικά κλινικά οφέλη.

Η Ιντερφερόνη- α έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία πολλών νεοπλασιών, με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παραδείγματα θεραπευτικών εφαρμογών της INF- α στον τομέα αυτό είναι η Λευχαιμία Τριχωτών Κυττάρων, η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία, τα Μη-Hodgkin Λεμφώματα και το Πολλαπλό Μυέλωμα, παθήσεις στις οποίες παρουσιάζεται κλινική βελτίωση σε ποσοστό πάνω από 50%. Όμως η INF- α έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλα νεοπλάσματα, όπως το σάρκωμα Kaposi, το κακόηθες μελάνωμα και τα επιθηλιακά καρκινώματα του νεφρού και της ουροδόχου κύστης, με μικρότερα ποσοστά επιτυχίας.

Η Ιντερφερόνη- γ έχει προταθεί να χρησιμοποιηθεί για την επικουρική ανοσοθεραπεία ορισμένων νεοπλασιών, όπως είναι το Κακόηθες Μελάνωμα και ο Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (Jaffe και Herbertman, 1988). Η INF- γ έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιεί in vivo τα μονοκύτταρα του αίματος από ασθενείς με προχωρημένες νεοπλασίες και τα καθιστά ικανά να παράγουν αυξημένες ποσότητες H_2O_2 , το οποίο έχει σαφή κυτταροτοξική δράση κατά νεοπλασματικών κυττάρων (Nathan και συν., 1985). Επίσης, η INF- γ ενεργοποιεί και τα Κύτταρα Φυσικούς Φονείς και συμβάλλει στην δημιουργία κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.

Μία άλλη κλινική χρήση της INF- γ είναι η χορήγησή της σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία (septic shock) από λοιμώξεις με Gram(-) μικρόβια. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ασθενείς με σηπτική κατάπληξία εμφανίζουν ανοσοκαταστολή που οφείλεται σε απενεργοποίηση των μονοκυττάρων τους και η οποία τους οδηγεί σε θάνατο από ευκαιριακές λοιμώξεις. Η in vivo χορήγηση INF- γ επαναφέρει την

ομαλή λειτουργία των μονοκυττάρων τους , αποκαθιστώντας την παραγωγή TNF- α και την έκφραση των αντιγόνων HLA-DR στην επιφάνειά τους (Docke και συν., 1997) .

Η κλινική χρήση των Ιντερφερονών περιορίζεται σε σοβαρές παθήσεις που δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με άλλα μέσα , λόγω των παρενεργειών τους : Σε χαμηλές παρεντερικές δόσεις INF προκαλείται το «Γριππώδες Σύνδρομο» , που χαρακτηρίζεται από πυρετό , ρίγη , ναυτία και εμέτους , κεφαλαλγία , διάρροια , αρθραλγίες και μυαλγίες . Σε υψηλές δόσεις προκαλείται καταστολή του μυελού των οστών με ακκοκιοκυτταραιμία και θρομβοπενία , νευροτοξικότητα με σύγχυση και υπνηλία , περιφερική νευροπάθεια , θυρεοειδοπάθεια και καρδιοτοξικότητα (Goodman-Gilman και συν., 1996) .

8-12-2 . Η Ιντερφερόνη- γ και τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα .

Η επίδραση της Ιντερφερόνης- γ στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα έχει μελετηθεί διεξοδικά και επισταμένα , λόγω των ισχυρών και πολύπλοκων μεταβολών που προκαλεί στην λειτουργική τους κατάσταση . Η εκτεταμένη έρευνα ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 , όταν διαπιστώθηκε ότι η INF- γ αποτελούσε τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Μακροφάγων (Macrophage Activating Factor) που ήταν υπεύθυνος για την αυξημένη αντιμικροβιακή και αντινεοπλασματική δραστηριότητα των μονοπύρρηνων φαγοκυττάρων . Μέχρι εκείνη την εποχή ήταν γνωστό ότι τα διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα παρήγαγαν μία ή περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες , που συλλήβδην ονομάζονταν «λεμφοκίνες» , που ήταν υπεύθυνες για την διέγερση των μικροβιοκτόνων και κυτταροτοξικών ιδιοτήτων των μακροφάγων . Το 1983 όμως ανακαλύφθηκε και αποδείχτηκε ότι η INF- γ ήταν η ουσία που προκαλούσε αυτήν την ενεργοποίηση (Nathan και συν., 1983) . Ανάμεσα στις πρώτες επιδράσεις που αποδόθηκαν στην INF- γ ήταν η αύξηση της παραγωγής H_2O_2 από τα μονοκύτταρα και η αυξημένη ικανότητά τους να καταστρέφουν το ενδοκυττάριο παράσιτο *Toxoplasma gondii* , καθώς και να προκαλούν μορφολογικές μεταβολές (αποπλάτυνση του κυτταροπλάσματος και στρογγυλοποίηση του πυρήνα) στα μονοκύτταρα (Nathan και συν., 1983) . Μετά την δημοσίευση αυτή ακολούθησε μια σημαντική αύξηση και εξάπλωση της έρευνας για τον ρόλο της INF- γ στην ενεργοποίηση των μακροφάγων , η οποία αφορούσε και την μελέτη των μηχανισμών δεύτερων μηνυτών που διέπουν την ενεργοποίηση και τις μεταβολές της βιοσυνθετικής , εκκριτικής και φαγοκυτταρικής δραστηριότητας που την συνοδεύουν .

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ Η INF- γ ΣΤΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Η INF- γ συνδέεται με τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα μέσω ειδικών INF- γ -R υποδοχέων (Gordon και συν., 1988) . Μετά την σύνδεση της INF- γ με τον υποδοχέα της , ακολουθεί η ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος των δύο μορίων (με ρυθμό 7000 συμπλεγμάτων ανά κύτταρο ανά ώρα) και η μεταφορά τους στο λυσοσωματικό δίκτυο (Celada και Schreiber, 1987) . Στην συνέχεια η Ιντερφερόνη υφίσταται αποδόμηση από τα λυσοσωματικά ένζυμα , ενώ οι υποδοχείς ανακυκλώνονται και επιστέφουν στην επιφάνεια του μακροφάγου . Η ενδοκυττάρωση της INF- γ είναι συνεχής , γιατί η κυτταρική επιφάνεια τροφοδοτείται συνεχώς με υποδοχείς από μια κυτταροπλασματική «αποθήκη» (receptor pool) μέχρι να επιστρέψουν στην επιφάνεια οι πρώτοι ανακυκλωμένοι υποδοχείς . Κατά τον πρώτο κύκλο ενδοκυττάρωσης μορίων INF- γ ενεργοποιούνται μηχανισμοί όπως της παραγωγής H_2O_2 , ενώ για την ενεργοποίηση του μηχανισμού μη-ειδικής καταστροφής νεοπλασματικών κυττάρων απαιτούνται πολλαπλοί

κύκλοι ενδοκυττάρωσης INF- γ / ανακύκλωσης υποδοχέων . Τέλος , η έκθεση περιτοναϊκών και μυελογενών μακροφάγων σε μεγάλες δόσεις INF- α , INF- β ή INF- γ για 24 ώρες δεν οδήγησε σε μείωση του αριθμού των INF- γ -R υποδοχέων στην επιφάνεια των μακροφάγων (Celada και Schreiber, 1987) .

Η σύνδεση της INF- γ στον υποδοχέα της ενεργοποιεί τον Παράγοντα Μεταγραφής STAT-1a μέσω των JAK-Κινάσων της Τυροσίνης και των MAP-Κινάσων . Ο παράγοντας STAT-1a διμερίζεται , ενώνεται με τον παράγοντα p48 και μεταναστεύει στον πυρήνα , όπου συνδέεται με την περιοχή GAS του DNA συγκεκριμένων γονιδίων και προκαλεί την μεταγραφή τους .

Μετά την σύνδεση της INF- γ στον υποδοχέα της ενεργοποιούνται πολλαπλοί μηχανισμοί μεταγωγής μηνύματος , ανάμεσα στους οποίους και αυτός της Πρωτεϊνικής Κινάσης C . Η ενεργοποίηση της PKC στα κύτταρα U937 και THP-1 είναι απαραίτητη για την έκφραση του γονιδίου γ .1 και των αντιγόνων HLA-DR μετά από επώαση με INF- γ . Οι ειδικοί αναστολείς της PKC H-7 και Σφιγγοσίνη αναστέλλουν τόσο την μετατόπιση (translocation) και ενεργοποίηση της PKC από την INF- γ , όσο και την μεταγραφή του mRNA των γ .1 και HLA-DR γονιδίων (Fan και συν., 1988) . Όπως αναφέρεται στην ίδια δημοσίευση , εκτός από την PKC και η ενεργοποίηση της Αδενυλικής Κυκλάσης αναστέλλει την έκφραση του γ .1 γονιδίου , προφανώς μέσω της αύξησης του cAMP και της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (cAMP-Dependent Protein Kinase) . Ωστόσο , μία άλλη μελέτη έδειξε ότι οι ειδικοί αναστολείς της Πρωτεϊνικής Κινάσης C H-7 και Ρετινάλη δεν εμποδίζουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων από την INF- γ για κυτταροτοξική δράση , ενώ καταστέλλουν την ενεργοποίησή τους από την INF- β (Radzioch και Varesio, 1988) .

Ο ρυθμιστικός ρόλος της αύξησης του cAMP και της ενεργοποίησης της PKA (Πρωτεϊνικής Κινάσης A) στην έκφραση γονιδίων μετά από επίδραση INF- γ έχει αποδειχτεί και σε άλλη μελέτη . Συγκεκριμένα , η επώαση περιτοναϊκών μακροφάγων με INF- γ προκαλεί έκφραση των Ια-αντιγόνων και μεταγραφή του mRNA των αντιγόνων MHC τάξεως II . Η χορήγηση PGE₂ προκαλεί αύξηση του cAMP και ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης A με ταυτόχρονη αναστολή της γονιδιακής έκφρασης (Figueiredo και συν., 1990) . Την ίδια επίδραση στην Πρωτεϊνική Κινάση A και στην έκφραση των αντιγόνων Ια (MHC-II) έχουν και το διβουτυρυλικό-cAMP και οι αναστολείς της Φωσφοδιεστεράσης . Ο πιθανότερος μηχανισμός με τον οποίο η PKA αναστέλλει την επαγωγή γονιδίων από την INF- γ είναι μέσω της αναστολής μιας αντλίας Na⁺/H⁺ που ενεργοποιείται από την Ιντερφερόνη .

Αν και η Πρωτεϊνική Κινάση C διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Μακροφάγων από την INF- γ , ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν είναι ακόμα κατάνοητος . Ωστόσο , έχει παρατηρηθεί ότι μετά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με INF- γ , τα κύτταρα αυτά είναι πιο ευαίσθητα στην διέγερση από παράγοντες που αυξάνουν την δραστηριότητα της PKC . Το φαινόμενο αυτό έχει εξηγηθεί εν μέρει και οφείλεται στην επίδραση της INF- γ στα κυτταρικά επιπέδα διακυλογλυκερόλης (DAG) , η οποία αποτελεί τον φυσικό ενεργοποιητή της PKC . Η INF- γ προκαλεί στα μακροφάγα όχι μόνο αύξηση των βασικών επιπέδων της DAG , αλλά και την ακόμα πιο αυξημένη παραγωγή DAG μετά από διέγερση με PAF ή PMA ή Ιονομυκίνη (Sebaldt και συν., 1990) . Η επίδραση αυτή της INF- γ στον μεταβολισμό της διακυλογλυκερόλης στα μακροφάγα δεν συνοδεύεται από μεταβολές στους άλλους δύο Δεύτερους Μηνύτορες που συσχετίζονται με την DAG , δηλαδή το κυτταροπλασματικό Ca⁺² και τα φωσφοινοσιτίδια (phosphatidylinositols) . Δεν πρέπει όμως να παραβλεφθεί η πιθανότητα ότι η διέγερση της PKC να συμμετέχει σε μερικές μόνο από τις εκδηλώσεις

της ενεργοποίησης των μακροφάγων . Αυτό προκύπτει από την παρατήρηση ότι η αναστολή της ΡΚΚ δεν εμποδίζει την ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας από τα μακροφάγα μετά από χορήγηση INF- γ (Radzioch και Varesio, 1988) .

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ INF- γ ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .

Ανάμεσα στις πρώτες επιδράσεις της INF- γ στα μακροφάγα που διαπιστώθηκαν , ήταν η αυξημένη ικανότητα των κυττάρων αυτών να παράγουν H_2O_2 (Nathan και συν., 1983 , Freund και Pick , 1985 , Murphy και συν., 1985 , Jungi και συν., 1987) . Αυτή η ικανότητα της INF- γ να αυξάνει την παραγωγή H_2O_2 αφορούσε και τα φυσιολογικά (resident) και τα φλεγμονώδη (elicited) μακροφάγα , τόσο κατά την in vitro όσο και κατά την in vivo χορήγησή της , και καθιστούσε τα κύτταρα ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην καταστροφή των μικροοργανισμών *Toxoplasma* και *Leishmania* (Freund και Pick, 1985 , Murphy και συν., 1985) . Η INF- γ επίσης αυξάνει την ικανότητα των ανθρώπινων μονοκυττάρων να παράγουν H_2O_2 , όταν χορηγηθεί ενδοφλεβίως σε ασθενείς με προχωρημένες νεοπλασίες (Nathan και συν., 1985) . Η ιδιότητα αυτή της INF- γ είναι σημαντική , διότι αναιρεί μερικώς την ανοσοκαταστολή που εμφανίζεται στους καρκινοπαθείς . Η INF- γ επίσης αναιρεί μερικώς την ανοσοκαταστολή που προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή στα μονοκύτταρα και προκαλεί έτσι την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων για παραγωγή H_2O_2 και O_2^- και για αυξημένη μικροβιοκτόνο δράση κατά των μικροβίων *Listeria* και *Salmonella* (Schaffner , 1985 , Schaffner και Rellstab , 1988) . Αυτό συμβαίνει γιατί οι μηχανισμοί με τους οποίους η INF- γ προκαλεί την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου δεν επηρεάζονται από τα γλυκοκορτικοειδή . Πρέπει να σημειωθεί ότι η INF- γ δεν είναι πάντοτε ικανή να προκαλέσει την παραγωγή H_2O_2 από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα . Έτσι υπάρχουν αναφορές ότι η επώαση ηπατικών μακροφάγων (κυττάρων Kupffer) από ποντίκια με INF- γ δεν προκαλεί παραγωγή H_2O_2 και δεν οδηγεί στην καταστροφή των μικροοργανισμών *Toxoplasma* και *Leishmania* (Lepay και συν., 1985) . Αυτή η έλλειψη οξειδωτικής αντίδρασης από τα κύτταρα Kupffer είναι παράδοξη , αφού τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην INF- γ με αυξημένη έκφραση των Ισ-αντιγόνων στην επιφάνειά τους και επειδή δεν έχει παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές που χρησιμοποίησαν ηπατικά μακροφάγα από άλλα είδη ζώων . Επίσης υπάρχουν αναφορές ότι με την πάροδο της ηλικίας τα μακροφάγα γίνονται λιγότερο ευαίσθητα στην επίδραση της Ιντερφερόνης- γ και δεν παράγουν O_2^- αλλά ούτε και TNF- α (Davila και συν., 1990) . Μετά όμως από την μεταμόσχευση ιστού υπόφυσης από νεαρά πειραματόζωα τα μακροφάγα των ηλικιωμένων ζώων γίνονταν πάλι ευαίσθητα στην επίδραση της INF γ και παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες O_2^- .

Η Ιντερφερόνη- γ προκαλεί επίσης την παραγωγή ενός άλλου δραστικού μορίου από τα περιτοναϊκά και τα σπληνικά μακροφάγα , του Νιτρικού Οξειδίου (Nitric Oxide , NO) . Το Νιτρικό Οξείδιο είναι ένας δραστικός μεταβολίτης του αζώτου με ισχυρή μικροβιοκτόνο και κυτταροτοξική δράση . Η INF- γ σε δόσεις από 1 ως 1000 U/ml προκαλεί εντυπωσιακή αύξηση της παραγωγής NO που διαρκεί μέχρι 96 ώρες (Stuehr και Marletta , 1987) .

Η INF γ συμμετέχει και στον μηχανισμό απενεργοποίησης των μακροφάγων μέσω Αδενοσίνης (Adenosine) . Συγκεκριμένα η επώαση των μακροφάγων με INF γ προκαλεί έκφραση A_{2B} -υποδοχέων Αδενοσίνης στην μεμβράνη τους . Οι υποδοχείς αυτοί είναι συνδεδεμένοι με την Αδενυλική Κυκλάση . Σε καταστάσεις υποξίας παράγεται Αδενοσίνη που αυξάνει το cAMP των ενεργοποιημένων με INF γ



μακροφάγων και οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης της iNOS και των αντιγόνων MHC-II , καθώς και της παραγωγής TNF α και IL-1 (Xaus και συν., 1999) .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από την Ιντερφερόνη προκαλεί αυξημένη έκφραση των Fc-υποδοχέων στην επιφάνειά τους (Jungli και συν.,1987) . Οι υποδοχείς αυτοί είναι υπεύθυνοι για την φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών που έχουν οψωνοποιηθεί με αντισώματα . Τα γλυκοκορτικοειδή επιτείνουν την έκφραση των Fc-υποδοχέων μετά από έκθεση σε INF- γ , καθώς και την φαγοκυττάρωση μέσω αυτών των υποδοχέων (Warren και Vogel ,1985) . Μία άλλη σημαντική επίδραση της INF- γ στα μακροφάγα είναι η επαγωγή της έκφρασης των αντιγόνων του Συμπλέγματος Μείζονος Ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC-II) , όπως είναι τα Ia-αντιγόνα (Immune-associated antigens) που συμμετέχουν στην παρουσίαση των φαγοκυτταρωμένων αντιγόνων στα Τ-λεμφοκύτταρα (Pariemik και συν.,1986 , Schneider και συν.,1987) . Φαίνεται ότι η INF- γ ελέγχει τον ρυθμό συσσώρευσης του mRNA για τα Ia-αντιγόνα , αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η Ιντερφερόνη- γ είναι ευαίσθητος στην καταστολή από Γλυκοκορτικοειδή (Warren και Vogel , 1985 , Koerner και συν., 1987, Fertsch και συν., 1987 , Fertsch-Ruggio και συν.,1988) . Η επαγωγή των Fc-υποδοχέων και των Ia-αντιγόνων από την INF- γ προσδίδει στα ενεργοποιημένα μακροφάγα σημαντική αντιμικροβιακή και αντινεοπλασματική λειτουργία . Η INF- γ επίσης καταστέλλει την έκφραση και δραστηριότητα των μεμβρανικών υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης στα μονοκύτταρα (mannosyl-fucosyl receptors) , οι οποίοι είναι δείκτες ηρεμίας του μονοπύρηνου φαγοκυττάρου και εξαφανίζονται μετά την ενεργοποίησή του (Mokoenka και Gordon , 1985) .

Η Ιντερφερόνη- γ προκαλεί την αυξημένη παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 από φυσιολογικά περιτοναϊκά μακροφάγα , ενώ αντιθέτως καταστέλλει την παραγωγή Ιντερλευκίνης-1 από φλεγμονώδη μακροφάγα που έχουν διεγερθεί in vitro με ενδοτοξίνη (Brandwein , 1986) . Η INF- γ επάγει και την έκφραση υποδοχέων Ιντερλευκίνης-2 στην επιφάνεια των ανθρώπινων μονοκυττάρων (Rambaldi και συν.,1987) . Επίσης , η INF- γ δεν προκαλεί την παραγωγή TNF- α όταν χορηγηθεί in vitro μόνη της σε φλεγμονώδη περιτοναϊκά μακροφάγα , ενώ αν χορηγηθεί σε συνδυασμό με Ιντερλευκίνη-2 (IL-2) προκαλεί σημαντική παραγωγή TNF- α από τα φλεγμονώδη μακροφάγα (Nagumi και συν.,1990) . Τέλος όταν η INF- γ χορηγηθεί in vivo προκαλεί την παραγωγή TNF- α και την έκφραση αντιγόνων HLA-DR στα μονοκύτταρα ασθενών με σηπτική καταπληξία , αναιρώντας την ανοσοκαταστολή τους (Docke και συν., 1997) .

Το τελικό αποτέλεσμα της επίδρασης της Ιντερφερόνης- γ στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα είναι η επίτευξη της «ενεργοποίησης» των κυττάρων αυτών . Με την ενεργοποίησή τους τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα γίνονται ιδιαίτερα ενεργά στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων . Αυτή η διαδικασία της ενεργοποίησης των μακροφάγων για κυτταροτοξική δράση καταστέλλεται από την ινδομεθακίνη , απαιτεί δύο αλληλοδιάδοχα βήματα διέγερσης και υψηλές δόσεις INF- γ , αλλά επιτυγχάνεται ακόμα και με μικρές δόσεις INF- γ αν ταυτοχρόνως χορηγηθεί και ένας δεύτερος διεγέρτης όπως τα Μουραμυλοδιπεπτιδία (MDP) ή η ενδοτοξίνη (Drysdale και Shin, 1981 , Meltzer, 1981 , Saiki και Fidler, 1985) .

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από την INF- γ συσχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων (D3 και C7) τα οποία επάγονται και κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων με ενδοτοξίνη , αλλά ο ρόλος τους είναι ακόμα άγνωστος (Hamilton και συν., 1989) .



Μια αξιοπερίεργη επίδραση της INF- γ στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι η επαγωγή της παραγωγής 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνης D₃ (καλσιτριόλης) από τα βρογχοκυψελιδικά και τα μυελογενή μακροφάγα (Koeffler και συν., 1985, Reichel και συν., 1987). Η επίδραση αυτή φαίνεται πως αποτελεί τμήμα ενός γενικότερου αυτορρυθμιστικού μηχανισμού, γιατί η παραγόμενη καλσιτριόλη προκαλεί την ωρίμανση και διαφοροποίηση των άωρων μονοκυττάρων σε ώριμα μακροφάγα αλλά και την καταστολή της παραγωγής INF- γ από τα T-λεμφοκύτταρα. Επίσης, η καλσιτριόλη δρα προσθετικά στην ικανότητα της Ιντερφερόνης- γ να αυξάνει την παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου από τα μονοκύτταρα και να προκαλεί την καταστροφή και πέψη των μυκοβακτηριδίων M.Tuberculosis (Rook και συν., 1986).

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ INF- α ΚΑΙ INF- β ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΡΗΝΑ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Εκτός από την INF- γ και οι άλλες Ιντερφερόνες ασκούν επιδράσεις στα μακροφάγα. Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι η INF- α καταστέλλει την έκφραση των μεμβρανικών υποδοχέων Μαννόζης-Φουκόζης στα μακροφάγα (Mokoena και Gordon, 1985), καταστέλλει την ωρίμανση των μονοκυττάρων και την δημιουργία των ειδικών κυτταρικών οργανιδίων για την προσκόλληση των μονοκυττάρων στον πυθμένα των τρυβλίων (actin/vinculin-containing adhesion plaques) και προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα αυτά (Honi και συν., 1985) και τέλος σε συνδυασμό με την ενδοτοξίνη διεγείρει την παραγωγή Ιντερλέυκίνης-1 από τα φλεγμονώδη μακροφάγα (Brandwein, 1986). Για την INF- β έχει δειχτεί ότι διεγείρει την κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την παραγωγή H₂O₂ και την αντιμικροβιακή τους δράση (Boraschi και συν., 1983), αυξάνει την παραγωγή του cAMP και καταστέλλει την παραγωγή των εικοσανοειδών στα περιτοναϊκά μακροφάγα (Boraschi και συν., 1984), και τέλος επάγει την έκφραση των γονιδίων D3, C7 και IP-10 και την παραγωγή TNF- α στα περιτοναϊκά μακροφάγα (Hamilton και συν., 1989, Nagumi και συν., 1990). Τόσο η INF- α όσο και η INF- β καταστέλλουν την έκφραση των Ia-αντιγόνων στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων μακροφάγων μέσω της καταστολής της μεταγραφής του mRNA τους (Fertsch και συν., 1987, Fertsch-Ruggio και συν., 1988).



Κεφάλαιο 9-1 . Σκοπός της ερευνητικής εργασίας .

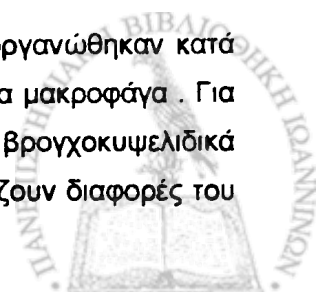
Η πρώτη περιγραφή των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων έγινε το 1884 από τον Metchnikoff . Από τότε και μέχρι την δεκαετία του 1970 επικρατούσε η αντίληψη ότι τα κύτταρα αυτά λειτουργούσαν κατά τρόπο αυτόνομο , φαγοκυτταρώνοντας μικροοργανισμούς και υπολείμματα των φλεγμονωδών αντιδράσεων και παρουσιάζοντας επεξεργασμένα αντιγόνα στα λεμφοκύτταρα . Ενδεχομένως αυτό να οφειλόταν στην παραδοσιακή αντιμετώπιση των μονοπύρηνων κυττάρων ως «κυττάρων της φλεγμονής» . Η φλεγμονή είχε περιγραφεί το 1793 από τον John Hunter σαν μια μη-ειδική αντίδραση του οργανισμού σε ένα βλαπτικό αίτιο και έτσι θεωρήθηκε φυσικό τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα να δρουν κατά τρόπο μη-ειδικό και αυτόνομο . Οι απόψεις των Lurie (1942) και Mackaness (1962) ότι τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα παρουσιάζουν ρύθμιση της λειτουργίας τους δεν αποτέλεσαν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας μέχρι την δεκαετία του 1980 .

Σήμερα είναι αποδεκτή η ύπαρξη ενός ενιαίου ρυθμιστικού συστήματος της ομοιοστασίας και αλλοστασίας , στον οποίο συμμετέχουν το Νευρικό , Ενδοκρινικό και Ανοσοποιητικό σύστημα . Από την πρώτη διατύπωση της θεωρίας του Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικού άξονα μελετήθηκε κυρίως η συμμετοχή των λεμφοκυττάρων σε αυτόν , επειδή παρουσίαζαν υποδοχείς για Νευροενδοκρινικούς παράγοντες στην κυτταρική τους μεμβράνη . Στα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα δεν δόθηκε μεγάλη σημασία αρχικά , ενώ αργότερα συμπεριλήφθηκαν στον ενιαίο αυτόν μηχανισμό σαν κύτταρα τα οποία επηρέαζαν την λειτουργία του Νευρικού και του Ενδοκρινικού συστήματος μέσω της έκκρισης κυτταροκινών , νευροπεπτιδίων και εκλυτικών παραγόντων (όπως π.χ. γ-Ενδορφίνη , TSH , ACTH , Σωματοστατίνη και Ιντερλευκίνη-1) . Μέσα από ορισμένες μελέτες προέκυψαν στοιχεία που αποτελούσαν έμμεσες ενδείξεις ότι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα ίσως αλληλεπιδρούσαν αμφίδρομα με τον Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικό άξονα και ότι πιθανώς μέσω αυτού ρύθμιζαν την λειτουργία τους .

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ανιχνευτούν Νευροενδοκρινικές επιδράσεις στην λειτουργία των μακροφάγων . Οι ρυθμιστικές αυτές επιδράσεις θα πρέπει να εξυπηρετούν ένα απώτερο σκοπό , όπως την κατεύθυνση της φλεγμονώδους ή ανοσολογικής αντίδρασης ή την προστασία της ομοιοστασίας του οργανισμού . Για να είναι δυνατή η κατανόηση του ρόλου που θα εξυπηρετούσε η Νευροενδοκρινική ρύθμιση , θα μελετηθούν οι επιδράσεις ορμονών που συμμετέχουν στην φλεγμονή και στο σωματικό stress . Επίσης , στα πλαίσια της μελέτης αυτής θα γίνει προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών μεταγωγής μηνύματος που διαμεσολαβούν τις επιδράσεις αυτές . Η επίτευξη αυτού του σκοπού θα βοηθήσει την επέκταση των γνώσεών μας για την παθοφυσιολογία της φλεγμονής και της ανοσίας .

Κεφάλαιο 9-2 . Οργάνωση πειραμάτων .

Τα πειράματα που εκτελέστηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής οργανώθηκαν κατά τρόπο ώστε να εξυπηρετηθεί η ανίχνευση των Νευροενδοκρινικών επιδράσεων στα μακροφάγα . Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε να μελετηθούν τρεις τύποι μακροφάγων (περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά και ηπατικά μακροφάγα) οι οποίοι είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν διαφορές του



φαινοτύπου τους που οφείλονται στο ιδιαίτερο ανατομικό περιβάλλον τους και στην διαφορετική λειτουργική σκοπιμότητα που εξυπηρετούν . Επίσης , επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των επιδράσεων τρεις διαφορετικές βιοχημικές παράμετροι (παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και Νιτρικού Οξειδίου , δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης) και μορφολογικές παρατηρήσεις , δηλαδή φαινόμενα που ελέγχονται από διαφορετικές Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος , ώστε να υπάρχει υψηλή πιθανότητα να εντοπιστεί κάποια μεταβολή . Για τον ίδιο λόγο επιλέχθηκε να χορηγηθούν πολλές πειραματικές ουσίες , οι οποίες να διαφέρουν στην χημική τους δομή και στον βιολογικό τους ρόλο .

Σε γενικές γραμμές η δομή των πειραμάτων ήταν η εξής :

1. Η απομόνωση των μακροφάγων γινόταν από υγιείς επίμυες στους σπυρίους δεν είχε χορηγηθεί καμία πειραματική ουσία in vivo . Τα κύτταρα από δύο ή τρεις επίμυες αθροίζονταν (cell pooling) και αφού πλένονταν με PBS εναιωρούνταν σε καλλιεργητικό υλικό . Μόνο στην περίπτωση των κυττάρων Kurfffer δεν αθροίζονταν μακροφάγα από περισσότερα του ενός πειραματόζωα . Μετά την εναιώρηση των μακροφάγων , ακολουθούσε ο διαμοιρασμός τους στα πολυτροβλία .
2. Σε κάθε θέση των πολυτροβλίων των 6 θέσεων μεταφερόταν ποσότητα εναιωρήματος που να περιέχει περίπου 4×10^6 μακροφάγα . Επειδή μόνο το 50 % των κυττάρων προσκολλώνται στον πυθμένα , η κάθε θέση του πολυτροβλίου θα έμενε με 2×10^6 μακροφάγα . Σε κάθε μια θέση των πολυτροβλίων των 24 θέσεων μεταφερόταν όγκος εναιωρήματος που να περιέχει περίπου 10^6 μακροφάγα , ώστε τελικά η κάθε θέση του πολυτροβλίου να έμενε με 5×10^5 μακροφάγα . Για την διασφάλιση της προσκόλλησης των μακροφάγων στα τροβλία γινόταν επώαση 4 ωρών στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών και μετά ακολουθούσε πλύσιμο των πολυτροβλίων με PBS .
3. Οι θέσεις των πολυτροβλίων χωρίζονταν σε ζευγάρια μαρτύρων-πειραματικών . Συνήθως δύο γειτονικές θέσεις αποτελούσαν ένα ζεύγος , γιατί έτσι διασφαλιζόταν ότι περιείχαν την ίδια ποσότητα μακροφάγων και ότι επιδρούσαν ακριβώς οι ίδιες συνθήκες πάνω τους . Στις θέσεις που αντιστοιχούσαν σε μάρτυρες προσθέτονταν καλλιεργητικό υλικό που περιείχε μόνο τον διεγέρτη και στις θέσεις που αντιστοιχούσαν σε πειραματικά προσθέτονταν καλλιεργητικό υλικό που περιείχε και τον διεγέρτη και την πειραματική ουσία . Οι επωάσεις είχαν ακριβώς την ίδια διάρκεια στους μάρτυρες και τα πειραματικά . Επίσης όλοι οι χειρισμοί που ακολουθούσαν ήταν όμοιοι για τους μάρτυρες και τα πειραματικά . Κατά τις φωτομετρήσεις κάθε ζεύγος δειγμάτων ελεγχόταν χωριστά .

Τα περισσότερα πειράματα που εκτελέστηκαν αφορούσαν την σύγκριση μεταξύ μακροφάγων που επωάστηκαν με LPS επί 14 ώρες και μακροφάγων που επωάστηκαν με LPS και κάποια πειραματική ουσία για 14 ώρες . Οι πειραματικές ουσίες που μελετήθηκαν ήταν ορμόνες του stress (Αδρεναλίνη , Νοτοπαμίνη , Δεξαμεθαζόνη , Ινσουλίνη , Γλυκαγόνη , Νευροπεπτιδιο Υ) ή ορμόνες της φλεγμονής (Σεροτονίνη , Ισταμίνη , PGE₂ , PGD₂) . Επίσης χρησιμοποιήθηκαν η Ιντερφερόνη-γ και η Βιταμίνη D₃ ως διεγέρτες των μακροφάγων σε ορισμένα πειράματα .

Η παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου μελετήθηκε μόνο στα περιτοναϊκά μακροφάγα ενώ η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και η δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης μελετήθηκαν και στους τρεις τύπους μακροφάγων .

Ορισμένες λεπτομέρειες σημαντικές για την κατανόηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων είναι οι ακόλουθες :



- Η μέτρηση μιας βιοχημικής παραμέτρου σε ένα τύπο μακροφάγων που έχει επωάσει με κάποιο διεγέρτη και μια πειραματική ουσία αποτελούσε ένα πείραμα . Το πείραμα αυτό επαναλαμβανόταν υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες δύο ή τρεις φορές . Το σύνολο των όμοιων πειραμάτων αποτελούσε μια πειραματική ομάδα . Σε κάθε ένα πείραμα μιας πειραματικής ομάδας δεν ήταν απαραίτητο να υπάρχει ο ίδιος αριθμός ζευγών μαρτύρων-πειραματικών . Ο αριθμός των ζευγών καθοριζόταν από τον αριθμό των μακροφάγων που απομονώθηκαν κάθε φορά , όπως αυτός υπολογιζόταν από την αριθμότητά τους σε πλακίδιο Neubauer με χρώση Trypan Blue .
- Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνταν σε κάθε ένα πείραμα ήταν αδέρφια μεταξύ τους (από την ίδια γέννα) . Συχνά χρησιμοποιήθηκαν μαζί αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα , αφού τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι τα μακροφάγα συμπεριφέρονταν με τον ίδιο τρόπο κατά την ενεργοποίησή τους με τους διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας , ανεξάρτητα από το φύλο του επίμοου από τον οποίο προέρχονταν . Επίσης , όλα τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνταν σε μια πειραματική ομάδα προέρχονταν από γονείς που ήταν αδέρφια μεταξύ τους (από την ίδια γέννα επίσης) .
- Επειδή έχει αναφερθεί ότι η μέθοδος εκχύλισης των λιποπολυσακχαριτών επηρεάζει τις ανοσοδιεγερτικές τους ιδιότητες (Pabst και Johnston, 1980) , το διάλυμα λιποπολυσακχαρίτη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν ισόποσο μείγμα από LPS του μικροβίου *E. coli* (ορότυπος O55:B5) που εκχυλίστηκε με βουτανόλη ή με φαινόλη (αντίστοιχα τα παρασκευάσματα L-2880 και L-4005 της εταιρείας Sigma) . Το διάλυμα αυτό χωρίστηκε σε μικρές μερίδες των 50 μl , που φυλάσσονταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf σε θερμοκρασία -15°C .
- Τα περισσότερα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τις βιοχημικές μετρήσεις παρασκευάζονταν υπό την μορφή πυκνών σταθερών διαλυμάτων (Stock solutions) , που χωρίζονταν σε μερίδες και φυλάσσονταν σφραγισμένα στους 4°C ή στ -15°C . Έτσι χρησιμοποιούνταν υλικά της ίδιας μερίδας για τα πειράματα της ίδιας ομάδας . Όταν ξεκινούσαν τα πειράματα μιας νέας πειραματικής ομάδας χρησιμοποιούνταν καινούργιες μερίδες από τα stock solutions για να παρασκευαστούν διαλύματα που θα χρησιμοποιούνταν μόνο στην συγκεκριμένη πειραματική ομάδα .
- Η Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αφορούσε το άθροισμα των αποτελεσμάτων από όλα τα πειράματα της ίδιας πειραματικής ομάδας . Η επεξεργασία γινόταν με το Student's unpaired t-test . Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μαρτύρων - πειραματικών θεωρήθηκαν εκείνες όπου ο δείκτης P είχε τιμή μικρότερη του 0.05 . Οι υπολογισμοί έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος Statworks σε υπολογιστή Macintosh SE και ορισμένοι από τους προσδιορισμούς του δείκτη P που βρίσκονταν πολύ κοντά στην τιμή 0.05 επιβεβαιώθηκαν με το πρόγραμμα Statview έκδοσης 4.5 .



Κεφάλαιο 10-1 . Υλικά και όργανα εργαστηρίου .

10-1-1 . Υλικά .

Τα κυριότερα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές απομόνωσης και καλλιέργειας των μακροφάγων και στις βιοχημικές και μορφολογικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής :

Acetic Acid (Glacial) . **Merck** , Cat. no. 1.00063 .

Adrenaline Hydrochloride Injection 1 mg/ml . **Demo** , Lot. 98008 .

Ammonium Molybdate Tetrahydrate . **Sigma** , Cat. no. A-7302 , Lot. 64-H-3431 .

Antibiotic-Antimycotic Solution . **Sigma** , Cat. no. A-9909 .

Calcitriol (1 α ,25-Dihydroxy-Cholecalciferol) . **Sigma** , Cat. no. D-1530 , Lot. No. 87-H-0237 .

Collagenase type IV . **Sigma** , Cat. no. C-5138 , Lot. 26-H-68171 .

Culture Plates (6-well) . **Corning** , Cat. no. 25810 .

Culture Plates (24-well) . **Corning** , Cat. no. 25820 .

Decadron (Dexamethasone 21-Phosphate) 4 mg/ml . **Merck & Co. Inc.** , Lot. 4532 .

Deoxyribonuclease type I , **Sigma** , Cat. no. D-4263 .

Dipotassium Phosphate (Anhydrous) . **Serva** , Cat. no. 26887 .

Disodium Phosphate (Dihydrate) . **Serva** , Cat. no. 30200 .

Dopamine Hydrochloride (3-Hydroxytyramine) . **Sigma** , Cat. no. H-8502 .

Ethylene-Diamine-Tetracetic Acid (Tetrasodium Salt) . **Sigma** , Cat. no. E-6511 .

Fetal Calf Serum . **Seromed** , Cat. no. S-0113 , Lot. 395-S , 251-L και 300-E .

Giemsa stain (Concentrated) . **Merck** , Cat. no. 9204 .

Glucagon . **Sigma** , Cat. no. G-9154 .

Glucose D(+) (Dextrose) . **Sigma** , Cat. no. G-7021 , Lot. 110-H-02455 .

L-Glutamine (200 mM) . **Seromed** , Cat. no. K-0282 , Lot. 340-L .

β -Glycerophosphate Dinatrium Pentahydrate . **Merck** , Cat. no. 4168.0050 , Lot. K-20072268 .

Hanks Balanced Salts . **Sigma** , Cat. no. H-6136 , Lot. 50-H-46271 .

HEPES Buffer (1 M solution) . **Flow Laboratories** , Cat. no. 16-884-46 , Lot. 0080472 .

Histamine . **Sigma** , Cat. no. H-7125 , Lot. 75-H-5038 .

Hydrochloric Acid (2.0 N) . **Sigma** , Cat. no. 251-2 .

Insulin . **Sigma** , Cat. no. I-6634 .

Interferon- γ (recombinant , rat) . **Gibco BRL** , Cat. no. 3283SB , Lot. 48 .

Leukocyte Acid Phosphatase Kit . **Sigma** , Cat. no. 387-A , Lot. 106-H-6205 .

Lipopolysaccharide (from E. coli O55:B5 , Phenol-extracted) . **Sigma** , Cat. no. L-2880 , Lot. 85-H-4092 .

Lipopolysaccharide (from E. coli O55:B5 , TCA-extracted) . **Sigma** , Cat. no. L-4005 , Lot. 62-H-4044 .

Malachite Green Oxalate . **Merck** , Cat. no. 1.01398.0025 , Lot. K-21769598 .

Methanol , Analytical Grade . **Merck** , Cat. no. 6009.2500 .

Monopotassium Phosphate (Anhydrous) . **Serva** , Cat. no. 26870 .

Monosodium Phosphate (Dihydrate) . **Serva** , Cat. no. 30186 .

Neuropeptide Y (Human , Rat) . **Peninsula Laboratories** , Cat. no. 7180 , Lot. 021658 .

N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamine Hydrochloride . **Sigma** , Cat. no. N-5889 , Lot. 96-H-0582 .

NML-Minisart Filters (0.22 μ M) . **Sartorius** .

PBS autoclaved solution (pH 7.2) . **Sigma** , Cat. no. P-5886



PBS tablets . **Sigma** , Cat. no. P-4417 , Lot. 84-H-8937 .
 Penicillin-Streptomycin Solution . **Sigma** , Cat. no. P-0781 , Lot. 104-H-2346 .
 Peroxidase type II (from Horseradish) . **Sigma** , Cat. no. P-8250 , Lot. 16-H-9522 .
 Phenol Red Sodium Salt . **Serva** , Cat. no. 32097 , Lot. 09080 .
 Phorbol-12-Myristate-13-Acetate . **Sigma** , Cat. no. P-8139 , Lot. 54-H-0094 και 113-H-1034 .
 Phosphoric Acid (85 %) . **Sigma** , Cat. no. P-6560 , Lot. 115-H-3453 .
 Prostaglandin D₂ . **Sigma** , Cat. no. P-5172 .
 Prostaglandin E₂ . **Sigma** , Cat. no. P-5640 .
 RPMI-1640 Medium (1 x) with 2.0 gr/Lt NaHCO₃ . **Seromed** , Cat. no. F-1215 , Lot. 408-L .
 RPMI-1640 Medium (1 x) with 20 mM HEPES . **Seromed** , Cat. no. F-1235 , Lot. 122-S και 158-L .
 RPMI-1640 Medium (1 x) with L-Glutamine and 2.0 gr/Lt NaHCO₃ . **Seromed** , Cat. no. F-1263 .
 Serotonin Hydrochloride (5'-Hydroxy-Tryptamine) . **Sigma** , Cat. no. H-9523 .
 Sodium Acetate Trihydrate . **Merck** , Cat. no. 6267.1000 .
 Sodium Bicarbonate Solution (7.5 %) . **Sigma** , Cat. no. S-8761 .
 Sodium Chloride . **Sigma** , Cat. no. S-5886 .
 Sodium Chloride (0.15 mol/Lt solution) . **Sigma** , Cat. no. 150-3 .
 Sodium Dodeceny Sulphate . **Sigma** , Cat. no. L-4390 .
 Sodium Hydroxide . **Ferak** , Cat. no. 01147 .
 Sodium Nitrate . **Sigma** , Cat. no. S-3421 , Lot. 36-H-3425 .
 Sulfanilamide . **Sigma** , Cat. no. S-9251 , Lot. 56-H-0644 .
 Sulfuric Acid (95.8 %) . **Sigma** , Cat. no. S-1526 .
 Theophylline . **Sigma** , Cat. no. T-1633 , Lot. 83-H-0205 .
 Triton X-100 (Laboratory Grade) . **Sigma** , Cat. no. X-100 .
 Trypan Blue . **Sigma** , Cat. no. T-6146 , Lot. 68-F-50346 .
 Tween 20 (zur Synthese) . **Merck** , Cat. no. 822184.0500 .
 Water for Injection (1000 ml bottle , Sterile , U.S.P.-XXII) . **Cooper** , Cat. no. 06 .

10-1-2 . Όργανα εργαστηρίου .

Οι κυτταροκαλλιέργειες εκτελέστηκαν σε έναν κλίβανο Διοξειδίου του Άνθρακα (Automatic CO₂ Water-Jacketed Incubator) τύπου Autoflow - U.S. της εταιρείας NuAire .

Οι φυγοκεντρήσεις των εναιωρημάτων των μακροφάγων γίνονταν σε μια απλή φυγόκεντρο τύπου MSE-Minor της εταιρείας MSE .

Για τις φωτομετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένα ψηφιακό φασματοφωτόμετρο τύπου U-1100 της εταιρείας Hitachi , που δεχόταν κυβέττες χαλαζία των 10 mm .

Για τις μορφολογικές παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Ortholux-II της εταιρείας Leitz , που ήταν εξοπλισμένο με φωτογραφική μηχανή και καταδυτικό φακό NPL Fluotar 100/1.32 DEL . Για τις έγχρωμες φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκε φιλμ Kodak Gold ISO 100/21° και για τις ασπρόμαυρες φωτογραφίες φιλμ Agfapan APX-100 .



Κεφάλαιο 10-2 . Βιοχημικές και Μορφολογικές Μέθοδοι .

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα παρουσιαστούν με αναλυτικό τρόπο όλες οι βιοχημικές και μορφολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της Διατριβής . Στοιχεία που διαφέρουν από τις αρχικές μεθόδους θα αναφέρονται κατά την περιγραφή και ανάπτυξη της τεχνικής . Οι περισσότερες διαφοροποιήσεις των αρχικών μεθόδων έγιναν ώστε να προσαρμοστούν αυτές οι τεχνικές στις συνθήκες του Εργαστηρίου μας .

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ : Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίμυες τύπου **Wistar** (Wistar rats) από το Εκτροφείο Πειραματοζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων . Οι επίμυες στεγάζονταν στα συνήθη κλουβιά που χρησιμοποιούνται στο Εκτροφείο , σε αριθμούς τέτοιους ώστε να μην υπάρχει συνωστισμός και εξαγρίωση των ζώων . Τρέφονταν με την συνήθη ξηρά ζωοτροφή του εμπορίου που χρησιμοποιείται από το Εκτροφείο και τους παρέχονταν τροφή και νερό συνεχώς (ad libitum) . Οι συνθήκες θερμοκρασίας και οι ώρες φωτός και σκότους ήταν οι συνήθεις του Εκτροφείου . Όλα τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υγιή . Πριν από κάθε πείραμα οι επίμυες βρίσκονταν υπό παρακολούθηση για διαπίστωση συμπτωμάτων κάποιων λοιμώδους νόσου και μετά από την εκτέλεση των πειραμάτων τα σπλάχνα των ζώων εξετάζονταν μακροσκοπικά για αντίστοιχα σημεία νόσου .

Η ηλικία των πειραματοζώων κατά την χρήση τους ήταν περίπου 3¹/₂ μηνών , όπου και αποκτούσαν βάρος σώματος από 170 ως 210 γραμμάρια και θεωρούνται «νεαρά ενήλικα» . Κατά την ηλικία αυτή οι επίμυες Wistar είχαν τις ιδανικές διαστάσεις για τους πειραματικούς χειρισμούς . Τα πειραματόζωα μεγάλων ηλικιών είναι δύσχρηστα για λεπτούς χειρισμούς και για επεμβάσεις , λόγω του όγκου τους και του λίπους που περιβάλλει τα όργανά τους . Επιπλέον είναι γνωστό ότι με την πάροδο της ηλικίας τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα δεν αντιδρούν εύκολα στην ενεργοποίηση και δεν παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου (Davila και συν.,1990 , Alvarez και συν.,1995) .

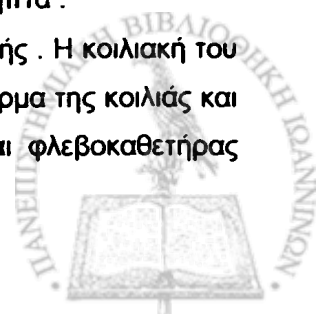
Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα επίμυες και των δύο φύλων , επειδή από τις πρόδρομες φάσεις της μελέτης (pilot experiments) δεν φάνηκε να υπάρχουν διαφορές αποτελεσμάτων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων . Έτσι για τις κυτταροκαλλιέργειες γινόταν άθροιση κυττάρων από πολλά πειραματόζωα και των δύο φύλων , που όμως για κάθε ξεχωριστό πείραμα ήταν όλα αδέρφια από την ίδια γέννα .

10-2-1. Απομόνωση Περιτοναϊκών , Βρογχοκυψελιδικών και Ηπατικών Μακροφάγων .

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

Η μέθοδος απομόνωσης των περιτοναϊκών μακροφάγων στηρίζεται σε μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο (Cohn και Benson, 1965a) και θα περιγραφεί στην συνέχεια . Όλα τα σκεύη και τα εργαλεία είναι αποστειρωμένα . Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα και κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες (cell culture grade) . Οι τεχνικές εκτελούνται άσηπτα .

- Ο κάθε επίμυς ναρκώνεται με διαιθυλικό αιθέρα και δένεται στην σανίδα ανατομής . Η κοιλιακή του χώρα ξεπλένεται με οινόπνευμα . Υπό άσηπτες συνθήκες παρασκευάζεται το δέρμα της κοιλιάς και αποκαλύπτεται το μυϊκό του τοίχωμα . Στην περιτοναϊκή κοιλότητα εισάγεται φλεβοκαθετήρας διαμέτρου 14G .

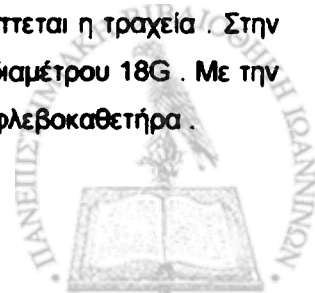


- Εισάγονται στην περιτοναϊκή του κοιλότητα 30 ml παγωμένου διαλύματος Phosphate Buffered Saline που περιέχει 0.1% EDTA (PBS-0.1% EDTA, pH 7.25) και 1000 μονάδες ηπαρίνης. Η κοιλιά του πειραματοζώου υφίσταται είκοσι μαλάξεις. Ακολουθεί η αναρρόφηση του εκπλύματος και η τοποθέτησή του σε σιλικοναρισμένο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης, μέσα σε παγόλουτρο.
- Αφού ολοκληρωθούν οι περιτοναϊκές εκπλύσεις σε όλα τα πειραματοζώα τοποθετούνται οι σωλήνες που περιέχουν εκπλύματα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση (200g x 10' min, 4°C). Το υπερκείμενο υγρό σε κάθε σωλήνα αφαιρείται με πιπέττα και παραμένουν μόνο τα κύτταρα στον πυθμένα του. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 ml ψυχθέντος διαλύματος PBS χωρίς EDTA και με ήπιες αναρροφήσεις τα μακροφάγα επανεναιωρούνται σε αυτό. Όλα τα εναιωρήματα μεταφέρονται σε έναν σιλικοναρισμένο φυγοκεντρικό σωλήνα.
- Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρούνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (200g x 10' min, 4°C). Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS. Με ήπιες αναρροφήσεις με μια πιπέττα τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (200g x 5' min, 4°C).
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS. Τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα και αφαιρείται δείγμα 50 μl για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα. Ταυτόχρονα γίνεται νέα φυγοκέντρηση (200g x 5' min, 4°C).
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα. Τα κύτταρα εναιωρούνται σε διάλυμα RPMI-1640 (ενισχυμένο με 10% FCS) σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων στο εναιώρημα να είναι 10⁶/ml. Τα κύτταρα μεταφέρονται αμέσως σε πολυτρυβλία και επωάζονται σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 95% αέρας-5%CO₂) για ένα διάστημα τουλάχιστον 4 ωρών.
- Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό κάθε τρυβλίου αφαιρείται με πιπέττα και στην συνέχεια ο πυθμένας του τρυβλίου ξεπλένεται προσεχτικά τρεις φορές με διάλυμα PBS στους 37°C και το τρυβλίο γεμίζει με καλλιεργητικό υλικό και επιστρέφει στον επωαστικό κλίβανο. Επειδή μόνο τα μακροφάγα προσκολλώνται στον πυθμένα του τρυβλίου, ο κυτταρικός πληθυσμός που έχει παραμείνει στον πυθμένα του τρυβλίου είναι σχεδόν καθαρός πληθυσμός μακροφάγων.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ

Για την απομόνωση βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων από επίμυες Wistar υπάρχουν διάφορες μέθοδοι. Εμείς χρησιμοποιήσαμε μια απλούστευση προϋπαρχόντων μεθόδων (Cohn και Wiener, 1963a, McCarron και συν., 1984). Όλα τα απαραίτητα σκεύη και τα εργαλεία είναι αποστειρωμένα. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα και κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες (cell culture grade). Οι τεχνικές εκτελούνται άσηπτα και ταχύτατα.

- Ο κάθε επίμυς ναρκώνεται με διαιθυλικό αιθέρα και δένεται στην σανίδα ανατομής. Η τραχηλική του χώρα και ο θώρακας ξεπλένονται με οινόπνευμα. Υπό άσηπτες συνθήκες παρασκευάζεται το δέρμα του τραχήλου, ο θυρεοειδής και οι προτραχειακοί μύες και αποκαλύπτεται η τραχεία. Στην συνέχεια η τραχεία παρασκευάζεται και σ' αυτήν εισάγεται φλεβοκαθετήρας διαμέτρου 18G. Με την βοήθεια ράμματος 2.0 γίνεται σχετικά σφικτή περιδεση της τραχείας και του φλεβοκαθετήρα.



- Εισάγονται στην τραχεία 5 ml παγωμένου διαλύματος Phosphate Buffered Saline που περιέχει 0.1% EDTA (PBS-0.1% EDTA, pH 7.25) και 1000 μονάδες ηπαρίνης. Ο θώρακας του επίμους υφίσταται δέκα μαλάξεις. Ακολουθεί η αναρρόφηση του εκπλύματος και η τοποθέτησή του σε σιλικοναρισμένο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης, μέσα σε παγόλουτρο. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία αυτή άλλες τρεις φορές, κάθε φορά με 5 ml PBS-0.1% EDTA, δηλαδή συνολικά με 20 ml PBS-0.1% EDTA διαλύματος για κάθε πειραματόζωο.
- Αφού ολοκληρωθούν οι βρογχικές εκπλύσεις σε όλα τα πειραματόζωα τοποθετούνται οι σωλήνες που περιέχουν εκπλύματα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση (200g x 10' min, 4°C). Το υπερκείμενο υγρό σε κάθε σωλήνα αφαιρείται με πιπέττα και παραμένουν μόνο τα κύτταρα στον πυθμένα του. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 ml παγωμένου διαλύματος PBS χωρίς EDTA και με ήπιες αναρροφήσεις τα μακροφάγα επανεναιωρούνται σε αυτό. Όλα τα εναιωρήματα μεταφέρονται σε έναν σιλικοναρισμένο φυγοκεντρικό σωλήνα.
- Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρώνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (200g x 10' min, 4°C). Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS. Με ήπιες αναρροφήσεις με μια πιπέττα τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (200g x 5' min, 4°C).
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS. Τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα και αφαιρείται δείγμα 50 μl για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα. Ταυτόχρονα γίνεται νέα φυγοκέντρηση (200g x 5' min, 4°C).
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα. Τα κύτταρα εναιωρούνται σε διάλυμα RPMI-1640 (ενισχυμένο με 10% FCS) σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων στο εναιώρημα να είναι 10^6 /ml. Τα κύτταρα μεταφέρονται αμέσως σε πολυτρυβλία και επωάζονται σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 95% αέρα-5% CO₂) για ένα διάστημα τουλάχιστον 4 ωρών.

Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό κάθε τρυβλίου αφαιρείται με πιπέττα και στην συνέχεια ο πυθμένας του τρυβλίου ξεπλένεται προσεχτικά τρεις φορές με διάλυμα PBS στους 37°C και το τρυβλίο γεμίζει με καλλιεργητικό υλικό και επιστρέφει στον επωαστικό κλίβανο. Επειδή μόνο τα μακροφάγα προσκολλώνται στον πυθμένα του τρυβλίου, ο κυτταρικός πληθυσμός που έχει παραμένει στον πυθμένα του τρυβλίου είναι σχεδόν καθαρός πληθυσμός μακροφάγων.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ (ΚΥΤΤΑΡΩΝ KUPFFER).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση κυττάρων Kupffer από τους επίμους στηρίζεται σε μία άλλη μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρύτατα (Lentz και DiLuzio, 1979). Όλα τα υάλινα σκεύη είναι αποστρωμένα με σιλικόνη. Όλα τα απαραίτητα σκεύη και τα χειρουργικά εργαλεία είναι αποστειρωμένα. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα και κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες (cell culture grade). Όλες οι τεχνικές εκτελούνται άσηπτα και ταχύτατα. Για την απομόνωση κυττάρων Kupffer χρησιμοποιήθηκε μόνο ένας επίμους (αρσενικός ή θηλυκός) σε κάθε πείραμα, αλλά κάθε πείραμα γινόταν σε τρεις επαναλήψεις.

- Ο κάθε επίμους ναρκώνεται με διαιθυλικό αιθέρα και δένεται στην σανίδα ανατομής. Χορηγούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 1000 μονάδες ηπαρίνης. Μετά από πέντε λεπτά συνεχίζει η διαδικασία

απομόνωσης . Η κοιλιακή χώρα και ο θώρακας του επίμους ξεπλένονται με οινόπνευμα . Υπό άσηπτες συνθήκες παρασκευάζεται το δέρμα του θώρακα και της κοιλιάς . Διανοίγεται ο θώρακας και παρασκευάζεται η καρδιά και η κάτω κοίλη φλέβα . Η κάτω κοίλη καθετηριάζεται δια μέσου του δεξιού καρδιακού κόλπου με καθετήρα 20G και με την βοήθεια ράμματος 4.0 γίνεται σχετικά σφικτή περίδεση της φλέβας και του φλεβοκαθετήρα .

- Διανοίγεται ταχύτατα το κοιλιακό τοίχωμα και παρασκευάζεται το ήπαρ του πειραματοζώου . Είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί άλος ο περιβάλλον συνδετικός ιστός (σύνδεσμοι και στοιχεία του διαφράγματος) και επίσης να φανεί ο ηπατοδωδεκαδακτυλικός σύνδεσμος , ώστε να απολινωθεί προσωρινά η πυλαία φλέβα με μια αγγειολαβίδα .
- Από τον καθετήρα εισάγονται αργά στην φλέβα 10 ml του παγωμένου διαλύματος GKN . Το ήπαρ του επίμους υφίσταται λίγες μαλάξεις . Ακολουθεί η διατομή της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας του πειραματοζώου και η αργή έγχυση άλλων 15 ml παγωμένου διαλύματος GKN μέσα στον φλεβοκαθετήρα . Με την διαδικασία αυτή απομακρύνεται το αίμα από τα κολποειδή του ήπατος .
- Το ήπαρ αφαιρείται ζυγίζεται και τεμαχίζεται σε καθαρή υάλινη επιφάνεια . Τα μικρά τεμάχια του ήπατος τοποθετούνται σε σιλικοναρισμένο γυάλινο ποτήρι ζέσεως των 150 ml το οποίο περιέχει 100 ml παγωμένου διαλύματος GKN-Κολλαγενάσης . Το διάλυμα αυτό περιέχει 1250 units ενζύμου Κολλαγενάση IV ανά 100 ml , καθώς και έναν αποστειρωμένο μαγνήτη ανάδευσης . Το ποτήρι ζέσεως σκεπάζεται με parafilm και τοποθετείται μέσα σε παγόλουτρο , το οποίο τοποθετείται πάνω σε ένα μαγνητικό αναδευτήρα .
- Το εναιώρημα του ηπατικού ιστού αναδεύεται μέσα στο παγόλουτρο για 2 ώρες . Στην συνέχεια το εναιώρημα φιλτράρεται μέσα από 4 στρώματα αποστειρωμένης γάζας και συλλέγεται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης . Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (450g x 10' min , 4°C) .
- Το υπερκείμενο υγρό σε κάθε σωλήνα αφαιρείται με πιπέττα και παραμένουν μόνο τα κύτταρα στον πυθμένα του . Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 ml παγωμένου διαλύματος PBS-γλυκόζης και τα κύτταρα επανεναιωρούνται σε αυτό . Όλα τα εναιωρήματα συγκεντρώνονται μέσα σε δύο σιλικοναρισμένους φυγοκεντρικούς σωλήνες . Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (450g x 10' min , 4°C) .
- Το υπερκείμενο υγρό σε κάθε σωλήνα αφαιρείται με πιπέττα και παραμένουν μόνο τα κύτταρα στον πυθμένα του . Σε αυτά θα προστεθούν από 10 ml διαλύματος PBS-γλυκόζης-DNase . Αυτό το διάλυμα περιέχει 600 units DNase τύπου I . Τα 20 ml του διαλύματος μεταφέρονται σε μικρή φιάλη Erlenmeyer που έχει επικάλυψη σιλικόνης . Η φιάλη τοποθετείται σε θερμό υδατόλουτρο (37°C) . Ακολουθεί επώαση δέκα λεπτών υπό συνεχή ανάδευση μέσα στο υδατόλουτρο .
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε δύο σωλήνες φυγοκέντρωσης . Στην συνέχεια γίνεται μια φυγοκέντρωση (200g x 5' min) . Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 1 ml υποτονικού διαλύματος 0,45% NaCl (για την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων) . Με ήπιες αναρροφήσεις με μια πιπέττα τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα . Μετά από 20" δευτερόλεπτα το εναιώρημα αραιώνεται με 9 ml διαλύματος PBS-γλυκόζης . Ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (280g x 2' min , 4°C) .



- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS . Με ήπιες αναρροφήσεις με μια πιπέττα τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα . Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (200g x 5'min , 4°C) .
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα και αντικαθίσταται από 10 ml διαλύματος PBS . Τα κύτταρα εναιωρούνται στο διάλυμα και αφαιρείται δείγμα 50 μl για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων στο εναιώρημα . Ταυτοχρόνως γίνεται νέα φυγοκέντρηση (200g x 5'min , 4°C) .
- Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται με πιπέττα . Τα κύτταρα εναιωρούνται σε διάλυμα RPMI-1640 (ενισχυμένο με 10% FCS) σε θερμοκρασία δωματίου . Ο όγκος του διαλύματος ρυθμίζεται ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων στο εναιώρημα να είναι 10^6 /ml . Τα κύτταρα μεταφέρονται αμέσως σε πολυτρυβλία και επωάζονται σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 95% αέρας-5%CO₂) για ένα διάστημα τουλάχιστον 12 ωρών .

Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό κάθε τρυβλίου αφαιρείται με πιπέττα και στην συνέχεια ο πυθμένας του τρυβλίου ξεπλένεται προσεχτικά τρεις φορές με διάλυμα PBS στους 37°C και το τρυβλίο γεμίζει με καλλιεργητικό υλικό και επιστρέφει στον επωαστικό κλίβανο . Επειδή μόνο τα μακροφάγα προσκολλώνται στον πυθμένα του τρυβλίου , ο κυτταρικός πληθυσμός που έχει παραμένει στον πυθμένα του τρυβλίου είναι σχεδόν καθαρός πληθυσμός κυττάρων Kirpffer .

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ .

- **PBS-0.1 % EDTA** : Παρασκευάζεται με την ανασύσταση μιας ταμπλέτας PBS (Sigma , Cat. no. P-4417) σε 200 ml δις-απεσταγμένου ύδατος και την προσθήκη 200 mg EDTA . Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο .
- **PBS χωρίς EDTA** : Χρησιμοποιείται το έτοιμο διάλυμα PBS (Sigma , Cat. no. P-5886) .
- **GKN** : Σε 890 ml διαλύματος 0.9 % NaCl προστίθενται 4 ml διαλύματος 35 % Δεξτρόζης και 4 ml διαλύματος 10 % Χλωριούχου καλίου . Συμπληρώνεται το διάλυμα με 102 ml Water for Injection , γίνεται συνεχής ήπια ανάδευση και ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος με διήθηση από φίλτρο NML-Minisart 0.22 μM . Το διάλυμα φυλάσσεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια .
- **GKN-Κολλαγενάση** : Προστίθενται 0.5 ml διαλύματος 2500 u/ml Κολλαγενάσης τύπου IV σε 100 ml διαλύματος GKN (υπό άσηπτες συνθήκες) και γίνεται ισχυρή ανάδευση .
- **PBS-GLC-DNase I** : Σε 200 ml PBS με pH 7.2 προστίθενται 6 ml διαλύματος 35 % Δεξτρόζης . Σε 50 ml του παραπάνω διαλύματος προστίθενται 0.5 ml διαλύματος 1200 u/ml Δεοξυριβονουκλέασης τύπου I και ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex .

10-2-2. Κυτταροκαλλιέργειες .

Για τις καλλιέργειες των μακροφάγων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμασμένες μέθοδοι που έχουν περιγραφεί σε εγχειρίδια σχετικά με την κυτταροκαλλιέργεια (Jakoby και Pastan, 1979 , Davis, 1994 , Freshney, 1994) , προσαρμοσμένες στις συνθήκες του Εργαστηρίου μας .

Τα μακροφάγα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά πολυτρυβλία των 6 ή των 24 θέσεων . Οι πυθμένες των τρυβλίων ήταν επεξεργασμένοι για καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων (culture-treated plastic) . Το καλλιεργητικό υλικό ήταν το RPMI-1640 , ενισχυμένο με 10% FCS και 20 mM HEPES . Το RPMI-1640 έχει βέλτιστη απόδοση όταν περιέχει 0.3 g/Lt L-Γλουταμίνη και 24 mM NaHCO₃ . Ορισμένες συσκευασίες RPMI-1640 δεν περιέχουν αυτά τα στοιχεία (επειδή υπάρχει τάση σταδιακής αποσύνθεσής τους και για την αποφυγή επιμόλυνσης πριν την χρήση του υλικού) και πρέπει να γίνεται η

προσθήκη τους πριν την χρήση τους στις κυτταροκαλλιέργειες . Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο συνδυασμός Πενικιλίνης G (100.000 $\mu\text{g/L}$) , Στρεπτομικίνης (100 mg/L) και Αμφοτερικίνης B (5.6 mg/L) . Το pH του υλικού κυμαινόταν πάντα μεταξύ 7.20 - 7.45 . Το FCS ήταν πάντοτε ελεγμένο για επιμόλυνση από Μυκόπλασμα και υπόκειντο σε επώαση μέσα σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά , για την αδρανοποίηση του Συμπληρώματος . Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες και στα βιοχημικά ή μορφολογικά πειράματα παρασκευάζονταν με Water for Injection της φαρμακευτικής εταιρείας Cooper , ώστε να διασφαλίζεται η υψηλή καθαρότητα του ύδατος .

Οι υπόλοιπες παράμετροι της κυτταροκαλλιέργειας ήταν οι συνήθειες για τα μακροφάγα , δηλαδή θερμοκρασία 37 °C , ατμόσφαιρα με αναλογία 5% CO_2 - 95% αέρα και σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 95 % . Όλα τα υαλικά ή πλαστικά που έρχονταν σε επαφή με τα καλλιεργητικά υλικά ή τα τρυβλία ήταν αποστειρωμένα σε αυτόκαυστο . Η ίδια η αίθουσα κυτταροκαλλιεργειών αποστειρωνόταν κάθε νύχτα από ειδικές λυχνίες υπεριώδους ακτινοβολίας .

Η επιλογή της καλλιέργειας των μακροφάγων σε μονοστοιβάδες έγινε επειδή υπάρχει στην βιβλιογραφία μία αναφορά ότι τα μακροφάγα που καλλιεργούνται σε εναιώρημα παρουσιάζουν πολύ μικρή οξειδωτική δραστηριότητα και παραγωγή H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot -}$ σε σύγκριση με τα ίδια κύτταρα επικολλημένα σε μονοστοιβάδα στον πυθμένα υάλινων τρυβλίων (Cohen και συν.,1981) . Η χρήση τρυβλίων από πλαστικό με επικάλυψη κολλαγόνου είναι η συνηθέστερη μέθοδος καλλιέργειας των μακροφάγων σε μονοστοιβάδες και δίνει πολύ καλά αποτελέσματα , χωρίς να σημαίνει ότι το πλαστικό μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως την άμεση επαφή με άλλα κύτταρα (Schumann και συν.,1989) .

Πριν από την έναρξη των επωάσεων με πειραματικές ουσίες το εναιώρημα μακροφάγων που είχε τοποθετηθεί στις θέσεις των πολυτρυβλίων επωαζόταν στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών επί 4 ώρες για να προσκολληθούν τα μακροφάγα στον πυθμένα των τρυβλίων . Ανά μία ώρα γινόταν ήπια ανάδευση του πολυτρυβλίου , επειδή τα μακροφάγα έχουν την τάση να συσσωρεύονται στην περιφέρεια του πυθμένα , ενώ το κέντρο του τρυβλίου μένει με πολύ αραιό κυτταρικό πληθυσμό .

Μετά από κάθε στάδιο επώασης των περιτοναϊκών μακροφάγων γινόταν προσεχτική πλύση των τρυβλίων τουλάχιστον τρεις φορές με διάλυμα PBS στους 37 °C , για δύο λόγους : Για να μειωθεί ο αριθμός των κυττάρων που δεν ήταν μακροφάγα και είχαν προσκολληθεί χαλαρά στον πυθμένα του τρυβλίου και για να απομακρυνθούν ουσίες που προσθέτονταν στο προηγούμενο στάδιο επώασης και των οποίων η παρουσία στο επόμενο στάδιο δεν ήταν επιθυμητή . Ιδιαίτερη προσοχή δινόταν να μην υπάρχουν ερυθρά αιμοσφαίρια προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου , για δύο λόγους : αφενός περιέχουν μεγάλες ποσότητες καλίου που θα αλλοίωναν τα πειραματικά αποτελέσματα , αν υπήρχε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αφετέρου περιέχουν αιμοσφαιρίνη , η οποία δεσμεύει και εξουδετερώνει το Νιτρικό Οξείδιο και τους Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου (Kim και συν.,1996) .

Ο χρόνος έκθεσης των μακροφάγων σε LPS για να ενεργοποιηθούν ήταν συνήθως 14 ώρες . Ο χρόνος αυτός κρίθηκε ικανοποιητικός για την ολοκλήρωση των βιολογικών φαινομένων της ενεργοποίησης , όπως η σύνθεση νέων πρωτεϊνών και η μετατόπιση (translocation) ενζύμων ή άλλων παραγόντων από ένα κυτταρικό διαμέρισμα σε άλλο . Έχει διαπιστωθεί ότι αρκεί επαφή λίγων λεπτών (5' ως 10' συνήθως) με τα μόρια του LPS για να ξεκινήσουν οι Μηχανισμοί Μεταγωγής Μηνύματος που θα προκαλέσουν αργότερα την ενεργοποίηση ολόκληρου του κυττάρου (Gallay και συν.,1993) .



10-2-3. Βιοχημικές Μέθοδοι .

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ .

Η μέθοδος μέτρησης του H_2O_2 που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην οξειδωση του Ερυθρού της Φαινόλης από την Υπεροξειδάση , που απαιτεί την παρουσία H_2O_2 για να ολοκληρωθεί .

- Τα μακροφάγα που καλλιεργούνται σε πολυτρυβλία 6 θέσεων , ξεπλένονται τρεις φορές με PBS στους $37\text{ }^\circ\text{C}$. Στην συνέχεια επώζονται για 40' λεπτά με καλλιεργητικό υλικό το οποίο περιέχει 0.1 $\mu\text{g/ml}$ PMA , με σκοπό την διέγερση της PKC .
- Τα τρυβλία ξεπλένονται τρεις φορές με PBS στους $37\text{ }^\circ\text{C}$. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml διαλύματος Ερυθρού της Φαινόλης σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου και επώαση για άλλα 45' λεπτά .
- Το διάλυμα Ερυθρού της Φαινόλης αφαιρείται από κάθε θέση του πολυτρυβλίου και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 20 μl NaOH (1N) . Ακολουθεί ανάδευση για 5'' δευτερόλεπτα σε συσκευή vortex . Η αντίδραση διακόπτεται με την ανάμειξη του διαλύματος του Ερυθρού Φαινόλης με το NaOH . Ακολουθεί επώαση 10' λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου .
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυβέτες φωτομέτρου . Η οξειδωση του Ερυθρού της Φαινόλης θα προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά στα 610 nm .

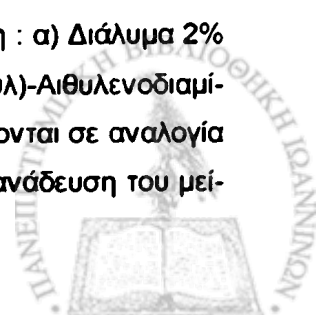
Διάλυμα Ερυθρού της Φαινόλης : Το διάλυμα αποτελείται από Ρυθμιστικό Διάλυμα 10 mM Οξίνου Φωσφορικού Καλίου (pH 7.0) που περιέχει 140 mM NaCl , 5.5 mM Δεξτρόζης , 0.1 gr/Lt Δινατριούχου άλατος Ερυθρού της Φαινόλης και 8.5 $\mu\text{g/ml}$ Υπεροξειδάση τύπου II . Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια ημέρα που θα χρησιμοποιηθεί και τα δύο τελευταία συστατικά προστίθενται λίγο πριν την χρήση του .

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ .

Η μέθοδος προσδιορισμού της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στηρίζεται σε προϋπάρχουσα μέθοδο μέτρησης δύο μεταβολιτών του , της Νιτρικής και της Νιτρώδους ρίζας (Green και συν., 1982) . Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα , αλλά υπάρχουν και κάποιες παραλλαγές της (Stuehr και Marletta, 1985 , Marletta και συν., 1988 , Vodonotz και συν., 1994 , Thomas και συν., 1994 , McCarthy και συν., 1995) .

- Τα μακροφάγα καλλιεργούνται σε πολυτρυβλία 24 θέσεων , με 1 ml καλλιεργητικού υλικού που περιέχει τις αντίστοιχες πειραματικές ουσίες . Όταν συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης το καλλιεργητικό υλικό αφαιρείται από κάθε θέση του πολυτρυβλίου και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που είναι κενός .
- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 ml αντιδραστήριου Greiss . Ακολουθεί ανάδευση για 10'' δευτερόλεπτα σε συσκευή vortex . Ακολουθεί επώαση 10' λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου .
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυβέτες φωτομέτρου . Η παραγωγή των μεταβολιτών του Νιτρικού Οξειδίου θα προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά στα 550 nm .

Αντιδραστήριο Greiss : Το αντιδραστήριο Greiss αποτελείται από δύο μέρη : α) Διάλυμα 2% Σουλφαναμιδης σε 5% Φωσφορικό Οξύ και β) Υδατικό διάλυμα 0.2% N-(1-Ναφθυλ)-Αιθυλενοδιαμίνης . Τα δύο αυτά διαλύματα φυλάσσονται σε σκοτεινόχρωμες φιάλες και αναμειγνύονται σε αναλογία ένα προς ένα , λίγο πριν την χρήση του αντιδραστήριου Greiss . Απαιτείται ισχυρή ανάδευση του μείγματος πριν χρησιμοποιηθεί .



ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε προϋπάρχουσες μεθόδους (Appelmans και συν., 1955, Wattiaux και DeDune, 1956, Hubscher και West, 1965) αλλά έχει υποστεί ορισμένες σαφείς τροποποιήσεις και βελτιώσεις στο Εργαστήριό μας. Οι αρχικές μέθοδοι στηρίζονταν στον προσδιορισμό του ανόργανου φωσφόρου με την μέθοδο των Fiske και SubbaRow, ενώ στην παρούσα μέθοδο χρησιμοποιείται η μέθοδος του Πράσινου του Μαλαχίτη (Baykon και συν., 1988, Geladopoulos και συν., 1991).

- Τα μακροφάγα καλλιεργούνται σε πολυτρυβλία 24 θέσεων. Μετά το τέλος της επώασης με τις πειραματικές ουσίες το καλλιεργητικό υλικό γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού και πλύσιμο των μονοστοιβάδων τρεις φορές με 0.9% NaCl στους 37 °C. (Δεν χρησιμοποιήθηκε PBS επειδή τα φωσφορικά μπορεί να επηρέαζαν τις μετρήσεις). Σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου προστέθηκαν 250 μl παγωμένο Διάλυμα Λύσης. Τα πολυτρυβλία μεταφέρθηκαν κλειστά σε παγόλουτρο και εκεί επωάστηκαν για 30' λεπτά.
- Σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου προστέθηκαν 750 μl Οξικού Ρυθμιστικού Διαλύματος στους 37 °C. Ακολούθησε ήπια κυκλοτερής ανάδευση των πολυτρυβλίων για 5" δευτερόλεπτα. Τα πολυτρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C για 5' λεπτά.
- Το περιεχόμενο κάθε θέσης του πολυτρυβλίου αναρροφάται 2 φορές με αυτόματη πιπέττα Gilson. Στην συνέχεια μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 1 ml Διαλύματος Αντίδρασης. Ο σωλήνας αναδεύεται σε συσκευή vortex για 5" δευτερόλεπτα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο που είναι ρυθμισμένο στους 37 °C.
- Ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο για 1 ώρα. Οι σωλήνες υπόκεινται σε ισχυρή ανάδευση με το χέρι κάθε 15' λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 91 μl Υπερχλωρικού Οξέος (72%) σε κάθε σωλήνα και την μεταφορά του στο παγόλουτρο. Οι σωλήνες επωάζονται στον πάγο για 10' λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωλήνων στα 720g για 3' λεπτά. Από κάθε σωλήνα αφαιρούνται 1.6 ml του υπερκείμενου υγρού και μεταφέρονται σε καινούργιο σωλήνα που περιέχει 400 μl Διαλύματος Πράσινου του Μαλαχίτη. Το μείγμα αναδεύεται ισχυρά με το χέρι.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται για 10' λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε κυβέττες φωτομέτρου και ο ανόργανος φώσφορος προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 630 nm.

Οξικό Ρυθμιστικό Διάλυμα : Διαλύματα 0.07 M Οξικού Οξέος και 0.07 M Οξικού Νατρίου αναμειγνύονται σταδιακά στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να δώσουν pH = 5.0.

Διάλυμα Λύσης : Σε θερμοκρασία δωματίου αραιώνονται 4 ml υδατικού διαλύματος 0.7% Triton X-100 με 10 ml Οξικού Ρυθμιστικού Διαλύματος. Το μείγμα αναδεύεται για 10' λεπτά με ήπιες κινήσεις και ψύχεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

Διάλυμα Αντίδρασης : Σε 20 ml Οξικού Ρυθμιστικού Διαλύματος προσθέτονται 8 ml διαλύματος 0.07 M β-Γλυκεροφωσφορικού Νατρίου και 70 mg EDTA. Προσθέτονται σταδιακά μικρές ποσότητες HCl (2N) μέχρι το pH να φτάσει το 5.4 στους 37 °C.

Διάλυμα Πράσινου του Μαλαχίτη : Σε 60 ml H₂SO₄ (1.84 gr/Lt) προσθέτονται σταδιακά 300 ml δις-απεσταγμένου ύδατος, μέσα σε παγόλουτρο. Στην συνέχεια διαλύονται σε αυτό 0.44 gr Οξαλι-

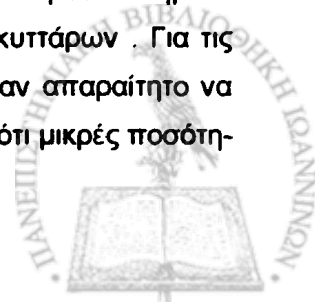
κού άλατος Πράσινου του Μαλαχίτη . Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται για 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου . Την ημέρα της χρήσης , σε 10 ml του παραπάνω διαλύματος προσθέτονται 2.5 ml υδατικού διαλύματος 15.2% Μολυβδαινικού Αμμωνίου και 0.2 ml υδατικού διαλύματος 11% Tween 20 . Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με το χέρι για 10' λεπτά .

10-2-4. Μορφολογικές Μέθοδοι .

ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Για τα πειράματα μορφολογικών παρατηρήσεων στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα , είτε αυτά αφορούσαν την κυτταρολογική χρώση Giemsa ή την ιστοχημική χρώση Ώξινης Φωσφατάσης , η κυτταροκαλλιέργεια των Μονοπύρηνων Φαγοκυττάρων γίνηκε με διαφορετική μεθοδολογία από ότι στα πειράματα με τις βιοχημικές μετρήσεις . Συγκεκριμένα , τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα καλλιεργήθηκαν απευθείας πάνω σε γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου . Αυτό έγινε δυνατόν με την χρήση τεμαχίων κρυστάλλου διαστάσεων 5×5 εκατοστά και πάχους 1 εκατοστού . Κάθε τεμάχιο κρυστάλλου έφερε δύο σπές διαμέτρου 8'' χιλιοστών στο κέντρο του , με απόσταση 2 εκατοστών μεταξύ τους . Οι κυλινδρικές διατομές των σπών στο κρύσταλλο έλαβαν επικάλυψη υγρής σιλικόνης (από εξάχνωση διχλωροδιμεθυλο-σιλανίου) . Τα τοιχώματα των δύο κυλίνδρων που δημιουργούνται μέσα στο κρύσταλλο αποτελούσαν τα τοιχώματα δύο τρυβλίων και ο κοινός πυθμένας τους ήταν ένα γυάλινο πλακίδια μικροσκοπίου . Η συγκράτηση του πλακιδίου στο κρύσταλλο και η στεγανοποίηση του πυθμένα των δύο τρυβλίων γινόταν με βερνίκι νυχιών , το οποίο τοποθετείτο στην περιφέρεια του πλακιδίου (στις «ραφές» με το κρύσταλλο) . Τα πλακίδια μικροσκοπίας και τα τεμάχια του κρυστάλλου καθαρίζονταν προσεκτικά πριν την χρήση τους και αποστειρώνονταν σε πυραντήριο στους 200°C . Μετά την ένωση του πλακιδίου και του κρυστάλλου με το βερνίκι νυχιών , το εσωτερικό των τρυβλίων πλενόταν καλά με δις-απεσταγμένο νερό και ακολουθούσε αποστείρωση σε αυτόκαυστο .

Για την καλλιέργεια των μακροφάγων επάνω στα πλακίδια μικροσκοπίας ακολουθείτο η εξής διαδικασία : το σύμπλεγμα κρυστάλλου-πλακιδίου τοποθετείτο επάνω σε καθαρό τρυβλίο Petri ή σε οποιαδήποτε άλλη καθαρή επιφάνεια και μέσα σε κάθε μια από τις κυλινδρικές σπές τοποθετούνταν 500 μl εναιωρήματος μακροφάγων . Το σύμπλεγμα μεταφερόταν στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών και ακολουθούσε επώαση 4 ωρών για να προσκολληθούν τα μακροφάγα στο πλακίδιο . Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείτο το εναιώρημα με πιπέττα Gilson και το εσωτερικό των τρυβλίων πλενόταν με PBS στους 37°C . Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνταν 500 μl καλλιεργητικού υλικού που περιείχε τις πειραματικές ουσίες οι οποίες προβλέπονταν για το πείραμα και ακολουθούσε η καλλιέργεια των κυττάρων για το προβλεπόμενο χρονικό διάστημα . Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείτο το καλλιεργητικό υλικό από το κάθε τρυβλίο . Το πλακίδιο αποκολλείτο από το κρύσταλλο με την βοήθεια μιας λεπίδας νυστεριού . Ακολουθούσε το πλύσιμο της επιφάνειας του πλακιδίου στην οποία ήταν προσκολλημένα τα μακροφάγα με 0.9% NaCl στους 37°C και στην συνέχεια η μονιμοποίηση των κυττάρων . Για τις διαδικασίες μονιμοποίησης με οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη , ακετόνη κ.λ.π.) ήταν απαραίτητο να γίνονται με διαδοχική εμβάπτιση σε πολλά δοχεία με τον διαλύτη . Αυτό εξασφάλιζε ότι μικρές ποσότητες



τες από το βερνίκι νυχιών που είχαν παραμείνει στην περιφέρεια του πλακιδίου δεν θα επικάλυπταν τα μακροφάγα (αφού το βερνίκι νυχιών διαλύεται στους οργανικούς διαλύτες).

ΧΡΗΣΗ GIEMSA

- Τα πλακίδια στεγνώνουν στον αέρα μέσα σε ξηραντήρα (dessicator) , στους 4°C .
- Τα πλακίδια μονιμοποιούνται με απόλυτη Μεθανόλη (4°C) για 10 ' λεπτά . Ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα Sorensen .
- Τα πλακίδια τοποθετούνται σε δοχείο Corlin που περιέχει αραιωμένη χρώση Giemsa . Ακολουθεί επώαση 35' λεπτών στο σκότος .
- Τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα Sorensen για 15'' δευτερόλεπτα . Ακολουθεί δυνατό τίναγμα για να απομακρυνθεί το υγρό και αφήνονται να στεγνώσουν .
- Σε κάθε πλακίδιο τοποθετείται μία σταγόνα Entellan και λεπτή καλυπτρίδα .

Διάλυμα Sorensen : Σε θερμοκρασία δωματίου αναμειγνύονται 495 ml διαλύματος 0.066 M KH_2PO_4 και 505 ml διαλύματος 0.066 M Na_2HPO_4 . Υπό συνεχή ανάδευση προσθέτονται στάγδην μικρές ποσότητες από το αντίστοιχο συστατικό ώστε να ρυθμιστεί το pH στην τιμή 7.25 .

Διάλυμα Giemsa : Υπό συνεχή ανάδευση , 20 ml πυκνού διαλύματος Giemsa αραιώνονται με 230 ml διαλύματος Sorensen . Το αραιωμένο διάλυμα διηθείται αμέσως και το διήθημα συλλέγεται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη . Το διάλυμα αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 12 ωρών .

ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ

- Τα πλακίδια μικροσκοπίας μονιμοποιούνται με εμβάπτιση σε διάλυμα Φορμόλης-Ακετόνης για 30'' δευτερόλεπτα . Ακολουθεί πλύσιμο των πλακιδίων με απιονισμένο ύδωρ στους 37°C .
- Τα πλακίδια μεταφέρονται χωρίς να στεγνώσουν σε δοχείο Corlin , το οποίο περιέχει το Διάλυμα Αντίδρασης και είναι τοποθετημένο μέσα σε υδατόλουτρο (37°C) . Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα με ανάδευση του δοχείου κάθε 10' λεπτά . Το δοχείο Corlin μένει καλυμμένο με αλουμινόχαρτο γιατί το Διάλυμα Αντίδρασης είναι ευαίσθητο στο φως .
- Τα πλακίδια ξεπλένονται με απιονισμένο ύδωρ στους 37°C και μεταφέρονται σε άλλο δοχείο Corlin που περιέχει Αιματοξυλίνη Gill no.3 . Ακολουθεί επώαση 2' λεπτών .
- Τα πλακίδια εμβαπτίζονται για 3' λεπτά σε δοχεία Corlin που περιέχουν νερό βρύσης το οποίου το pH είναι ελαφρά αλκαλικό . Ακολουθεί προσεκτικό στέγνωμα στον αέρα .
- Τα πλακίδια φυλάσσονται χωρίς καλυπτρίδα μέχρι την ημέρα που θα παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο . Λίγες ώρες πριν την παρατήρησή τους τοποθετείται μία σταγόνα Entellan και καλυπτρίδα .

Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την τεχνική αυτή περιέχονται στο Leukocyte Acid Phosphatase Kit υπ' αριθμόν 387-A της εταιρείας Sigma . Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται παρασκευάζονται λίγο πριν την εφαρμογή της μεθόδου , ως εξής :

Διάλυμα Φορμόλης-Ακετόνης : 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος Κιτρικών αραιώνονται με 65 ml απόλυτης Ακετόνης . Προσθέτονται 8 ml διαλύματος 37% Φορμαλδεϋδης και ακολουθεί ανάδευση .

Διάλυμα Αντίδρασης : 0.5 ml διαλύματος Fast Gamet GBC αναμειγνύονται σε δοκιμαστικό σωλήνα με 0.5 ml διαλύματος 0.1 mol/Lt Νιτρικού Νατρίου . Ο σωλήνας πωματίζεται και ακολουθεί

ήπια ανάδευση δια αναστροφής επί 30" δευτερόλεπτα . Το μείγμα αυτό επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 2' λεπτά και στην συνέχεια μεταφέρεται σε δοχείο ζέσεως που περιέχει 45 ml απιονισμένο ύδωρ στους 37°C . Υπό συνεχή ήπια ανάδευση προσθέτονται 0.5 ml διαλύματος Naphthol AS-BI και 2 ml οξικού ρυθμιστικού διαλύματος με pH 7.2 . Το μείγμα διατηρείται προφυλαγμένο από το φως .

Διάλυμα Naphthol AS-BI : Το διάλυμα αυτό περιέχεται έτοιμο στο Kit της Sigma .

Οξικό ρυθμιστικό διάλυμα : Το διάλυμα αυτό περιέχεται έτοιμο στο Kit της Sigma .

Διάλυμα Αιματοζυλίνης Gill no.3 : Το διάλυμα αυτό περιέχεται έτοιμο στο Kit της Sigma .



ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**(Συμπεριλαμβάνεται προεισαγωγική ανάλυση των αποτελεσμάτων των
επιμέρους πειραμάτων)**



Πειραματική ομάδα : # 1 .

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου σε καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν επί δύο ώρες με ενδοτοξίνη (LPS) .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) .

Διεύρτης : 2 $\mu g/ml$ LPS , για δύο ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός του διεγέρτη .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί δύο ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί δύο ώρες με ενδοτοξίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 18

Σκοπός του πειράματος : Να επιβεβαιωθεί ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με ενδοτοξίνη , ακόμα και για μικρό χρονικό διάστημα , προκαλεί αύξηση της παραγωγής H_2O_2 . Επίσης να αποδειχθεί ότι η μέθοδος την οποία χρησιμοποιούμε λειτουργεί υπό τις συνθήκες του εργαστηρίου μας .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή απόκλιση) : 8.894 ± 0.387

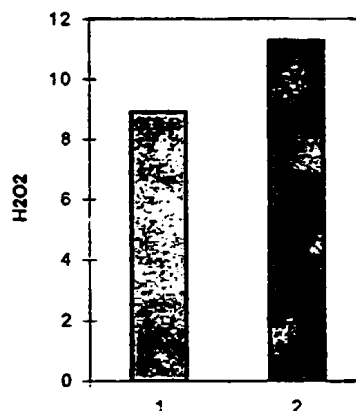
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή απόκλιση) : 11.281 ± 0.533

Μεταβολή (%) : Αύξηση 26.83 %

t-statistic : - 15.359

Βαθμοί Ελευθερίας : 34

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η χορήγηση ενδοτοξίνης στα περιτοναϊκά μακροφάγα προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου κατά 26.83 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 8.894 μM H_2O_2 ενώ η μέση τιμή των πειραματικών 11.281 . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη $P < 0.001$, συνεπώς ήταν στατιστικώς σημαντική . Από το πείραμα αυτό φάνηκε ότι η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του H_2O_2 λειτουργεί ικανοποιητικά . Όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο «Υλικά - Μέθοδοι» , η διάταξη που έχει χρησιμοποιηθεί είναι μια παραλλαγή της μεθόδου μέτρησης του H_2O_2 σε κυτταροκαλλιέργειες που ανέπτυξαν οι Pick και Keisari . Επίσης αποδείχτηκε με τα αποτελέσματά μας ότι ο χρόνος επώασης των δύο ωρών για την ενεργοποίηση των μακροφάγων με ενδοτοξίνη είναι αρκετός για να έχουμε αποτελέσματα . Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι τα μακροφάγα ενεργοποιούνται από τον LPS ακόμα και μετά από επαφή λίγων λεπτών , αλλά χρειάζεται στη συνέχεια ένα χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση των μηχανισμών της ενεργοποίησης (Gallay και συν., 1993) .

Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 1 συμβαδίζουν με ανακοινώσεις στην διεθνή βιβλιογραφία από παρόμοια πειράματα (Pabst και Johnston, 1980) .



Πειραματική ομάδα : # 2

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου σε καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που επώαστηκαν με Ιντερφερόνη-γ επί πέντε ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : 250 units/ml Ιντερφερόνης-γ (INF-γ) , για 5 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός της Ιντερφερόνης-γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που καλλιεργήθηκαν επί πέντε ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που καλλιεργήθηκαν επί πέντε ώρες με Ιντερφερόνη-γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 8

Σκοπός του πειράματος : Να επιβεβαιωθεί ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί πέντε ώρες με Ιντερφερόνη-γ προκαλεί αύξηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Επίσης να αποδειχθεί ότι η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στο Εργαστήριό μας λειτουργεί ικανοποιητικά .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 2.700 ± 0.220

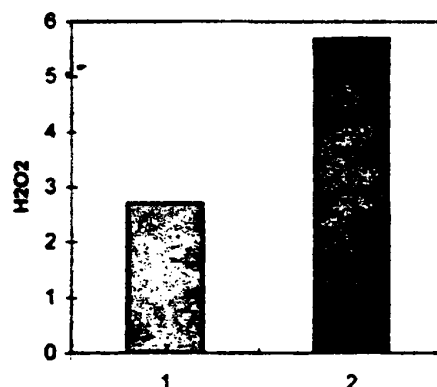
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.688 ± 0.348

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 110.66 %

t-statistic : - 20.505

Βαθμοί Ελευθερίας : 14

P value : $P < 0.0001$

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 5 ώρες με Ιντερφερόνη-γ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν $2.700 \mu M H_2O_2$ ενώ των πειραματικών ήταν 5.688 και η αύξηση ήταν της τάξης του 110.66 % και ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.0001 . Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων δείχνουν αφενός ότι η μέθοδος μέτρησης του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου που χρησιμοποιήθηκε λειτουργεί ικανοποιητικά και αφετέρου ότι η επώαση των κυττάρων με 250 units/ml Ιντερφερόνης-γ για πέντε ώρες είναι αρκετός χρόνος για να σημειωθεί μια δραματική αύξηση (κατά 110.66 %) της παραγωγής H_2O_2 .

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες δημοσιεύσεις στην διεθνή βιβλιογραφία , στις οποίες διαπιστώνεται ότι η Ιντερφερόνη-γ προκαλεί αυξημένη παραγωγή H_2O_2 από πολλούς διαφορετικούς τύπους μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε μια μεγάλη ποικιλία συγκεντρώσεων Ιντερφερόνης-γ και χρονικών διαστημάτων επώασης (Murray και συν., 1985 , Nathan και συν., 1985 , Schaffner και Reistab, 1988) .



Πειραματική ομάδα : # 3

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ιντερφερόνη-γ .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διεύρτης : Ιντερφερόνη-γ (INF-γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός από την Ιντερφερόνη-γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ιντερφερόνη-γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Ιντερφερόνη-γ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι στο προηγούμενο πείραμα θα προκαλούσε αύξηση της ικανότητάς τους να παράγουν H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 6.350 ± 0.639

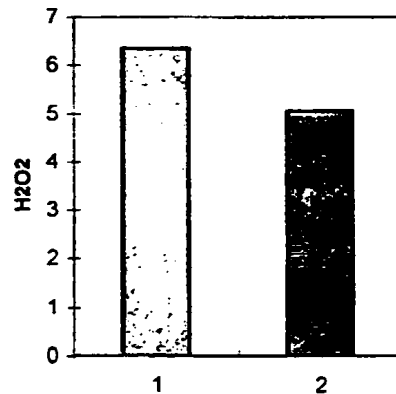
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.042 ± 0.774

Μεταβολή (%) : Μείωση 20.59 % .

t-statistic : 4.516

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η παράταση του χρόνου επώασης των περιτοναϊκών μακροφάγων με Ιντερφερόνη-γ στις 14 ώρες όχι μόνο δεν οδηγούσε σε αύξηση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 , αλλά αντιθέτως οδήγησε σε μείωση κατά 20.59 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 6.350 μM H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 5.042 μM . Ο δείκτης P ήταν $< 0.001\%$ και συνεπώς αυτή η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική . Αν και είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς αυτοπεριορισμού της ενεργοποίησής τους (π.χ. μέσω της αυτοκρινικής επίδρασης των PGE_2 και IL-10) στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ανακοινώσεις που να αναφέρουν την μείωση της ικανότητας παραγωγής του H_2O_2 μετά από την παρατεταμένη επώαση με Ιντερφερόνη-γ . Είναι πιθανό ότι η έντονη και παρατεταμένη ενεργοποίηση των μακροφάγων οδηγεί σε παραγωγή PGE_2 , IL-10 , TGF- β ή άλλων ουσιών με αυτορρυθμιστική δράση , οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μειωμένη ικανότητα παραγωγής του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .



Πειραματική ομάδα : # 4

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 4 ώρες με ενδοτοξίνη (LPS) και Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διευέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 4 ώρες με 2 $\mu g/ml$ LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 4 ώρες με 2 $\mu g/ml$ LPS + 10^{-4} M αδρεναλίνης .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση με αδρεναλίνη επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 από τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 11.060 ± 0.477

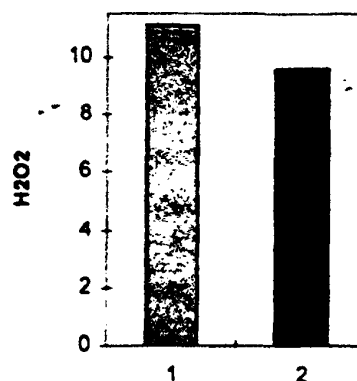
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 9.593 ± 0.552

Μεταβολή (%) : Μείωση 13.26 % .

t-statistic : 7.789

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση αδρεναλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με ενδοτοξίνη προκαλούσε μείωση της ικανότητας των κυττάρων να εκκρίνουν Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Συγκεκριμένα η επώαση των μακροφάγων με 10^{-4} M αδρεναλίνης κατά την διάρκεια της τετράωρης ενεργοποίησης με LPS προκαλούσε μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 13.26 % . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 11.060 μM H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών 9.593 . Επειδή η τιμή P ήταν $< 0.001\%$, κατά συνέπεια η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική . Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με την γενικότερη βιβλιογραφία για τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα . Είναι αποδεκτό ότι τα μακροφάγα διαθέτουν $\beta 2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους (Koopman και συν., 1973 , Remold O'Donnell, 1974 , Nowell και συν., 1977 , Ikegami , 1977 , Remold O'Donnell και Alpert , 1979 , Abrass και συν., 1985) , οι οποίοι δρουν μέσω Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξησης του cAMP (Hunt και συν., 1984 , Kammer, 1988) . Ταυτόχρονα διαθέτουν και $\alpha 2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς που καταστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση και μειώνουν το cAMP (Verghese και Snyderman, 1983) και μέσω αυτών ασκείται ένας μηχανισμός αυτορρύθμισης με την παραγωγή νοραδρεναλίνης από τα μακροφάγα (Spengler και συν., 1994) . Οι $\beta 2$ -υποδοχείς είναι επικρατούν λειτουργικά και είναι υπεύθυνοι για την αύξηση του cAMP και την καταστολή της λειτουργίας των μακροφάγων . Πιθανώς μέσω αυτής της οδού επιτυγχάνεται την μείωση της παραγωγής του H_2O_2 . Άλλοι ερευνητές υποστήριξαν ότι οι κατεχολαμίνες επηρεάζουν άμεσα την γονιδιακή έκφραση , μέσω του παράγοντα NFkB (Muroi και Suzuki, 1993) .

Πειραματική ομάδα : # 5

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη , αδρεναλίνη και θεοφυλλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M και Θεοφυλλίνη 10^{-3} M , για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 4 ώρες με ενδοτοξίνη και αδρεναλίνη .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν 4 ώρες με ενδοτοξίνη , αδρεναλίνη και θεοφυλλίνη για 4 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη θεοφυλλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με ενδοτοξίνη και αδρεναλίνη θα προκαλούσε περαιτέρω μείωση της παραγωγής του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **6.105 \pm 0.555**

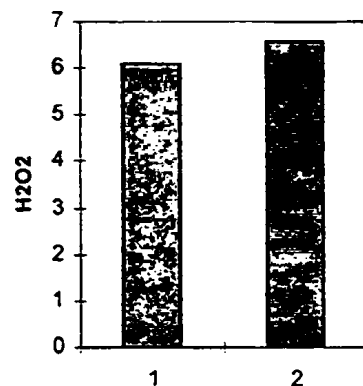
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **6.580 \pm 0.852**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 7.58 % (τάση αύξησης) .

t-statistic : - 2.088

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P < 0.044

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η μέση τιμή των μαρτύρων είναι 6.105 μM H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών είναι 6.580 . Η τιμή P είναι < 0.05 άρα η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική αν και σχετικά μικρού μεγέθους . Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δεν είναι τα αναμενόμενα . Δείχνουν ότι η προσθήκη θεοφυλλίνης στα μακροφάγα προκαλεί κάποια περαιτέρω αύξηση στην παραγωγή του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και όχι την μείωση που αναμενόταν . Αυτή η αύξηση της παραγωγής του H_2O_2 δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί , επειδή παραδοσιακά ο μηχανισμός δράσης της θεοφυλλίνης έχει αποδοθεί στην ανατολή των Φωσφοδιεστερασών που καταστρέφουν το cAMP . Όμως είναι γνωστό ότι η θεοφυλλίνη επιδρά έμμεσα ή άμεσα και σε άλλους μηχανισμούς , όπως στα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{+2} και στους υποδοχείς Αδενosίνης (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996 , 9^η έκδοση) και πιθανώς η επίδραση η οποία διαπιστώθηκε στα δικά μας πειράματα να διαμεσολαβείται από έναν τέτοιο μηχανισμό . Μέχρι σήμερα όμως η διεθνής βιβλιογραφία για τα μακροφάγα δέχεται ότι η θεοφυλλίνη επιδρά στις Φωσφοδιεστεράσες τους και προκαλεί αύξηση του cAMP και επίταση της δράσης της β -αδρενεργικής οδού (Lim και συν.,1981 , Okonogi και συν.,1991 , Dent και συν.,1994) .



Πειραματική ομάδα : # 6

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη , αδρεναλίνη και θεοφυλλίνη για τέσσερις ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M και Θεοφυλλίνη 10^{-3} M , για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και θεοφυλλίνη , για 4 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη , θεοφυλλίνη και αδρεναλίνη για 4 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί βαθύτερα ο τρόπος δράσης της Θεοφυλλίνης , σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος (πειραματική ομάδα # 5) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.400 ± 0.424

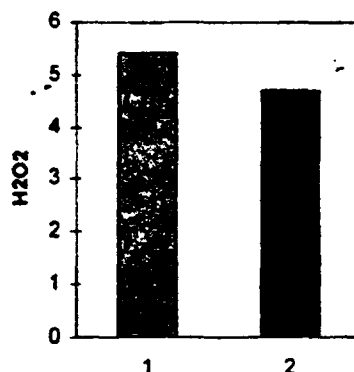
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.696 ± 0.733

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 13.03 %

t-statistic : 2.880

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.01$ ($P = 0.009$)

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη αδρεναλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS και Θεοφυλλίνη προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση της παραγωγής H_2O_2 από ότι η προσθήκη Θεοφυλλίνης σε κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με LPS και αδρεναλίνη (βλέπε # 5) . Από αυτό το αποτέλεσμα μπορούμε να υποθέσουμε ότι τον κυριότερο ρόλο διαδραματίζει η αδρεναλίνη (διεγέρτης της Αδενυλικής Κυκλάσης) και όχι η θεοφυλλίνη (αναστολέας της Φωσφοδιεστεράσης) στην καταστολή της παραγωγής H_2O_2 . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 5.400 μM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 4.696 μM H_2O_2 . Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P ήταν $P < 0.01$. Ο ρόλος των Φωσφοδιεστερασών στην ρύθμιση των επιπέδων του cAMP στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και η επίδραση της Θεοφυλλίνης στην αναστολή του ενζύμου αυτού είναι καλά τεκμηριωμένα (Lim και συν., 1981 , Okonogi και συν., 1991 , Dent και συν., 1994) . Όμως ο κύριος ρόλος στην καταστολή της παραγωγής των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου αποδίδεται στην διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και στην αυξημένη παραγωγή του cAMP (Weidemann και συν., 1978 , Smith και συν., 1980 , Lim και συν., 1983) .



Πειραματική ομάδα : # 7

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και ντοπαμίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Υπεροξειδίο του Υδρογόνου .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη 2.5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με ενδοτοξίνη για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και ντοπαμίνη για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 23

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η χορήγηση ντοπαμίνης σε καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με ενδοτοξίνη για 14 ώρες θα προκαλούσε μεταβολές στην παραγωγή του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.485 ± 0.692

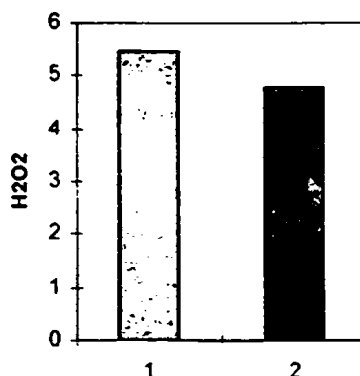
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.796 ± 0.794

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 12.56 % .

t-statistic : 3.136

Βαθμοί Ελευθερίας : 44

P value : $P < 0.005$ ($P = 0.003$) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η χορήγηση 2.5×10^{-5} M ντοπαμίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται από 2 μg/ml LPS για 14 ώρες προκάλεσε την μείωση της παραγωγής του H₂O₂ κατά 12.56 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 5.485 μM H₂O₂ ενώ η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 4.796 μM . Η διαφορά των τιμών ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.005$. Η ντοπαμίνη προκαλεί την μείωση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου , όπως ακριβώς προκαλούσε στην πειραματική ομάδα # 6 και η άλλη κατεχολαμίνη που χρησιμοποιήθηκε , δηλαδή η αδρεναλίνη . Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι πιθανώς η ντοπαμίνη δρα στα περιτοναϊκά μακροφάγα μέσω της αύξησης του cAMP , δηλαδή όπως ακριβώς και η αδρεναλίνη . Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον , αφού δεν υπάρχουν δημοσιεύσεις που να αφορούν τις επιδράσεις της ντοπαμίνης στην παραγωγή H₂O₂ από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Από μελέτες που αφορούν την επίδραση της ντοπαμίνης στα ενεργοποιημένα με INF- γ μακροφάγα προκύπτουν αποτελέσματα αντιφατικά (Koff και Dunegan, 1986 , Sternberg και συν.,1986 , Sternberg και συν.,1987) . Το μοναδικό άρθρο που αφορούσε ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα (Hasko και συν.,1996) αναφέρει ότι έχει παρατηρηθεί επίδραση της ντοπαμίνης και των ειδικών ντοπαμινεργικών αγωνιστών στα μακροφάγα μέσω των D2- και D1-υποδοχέων . Οι D2-υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για την καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και TNF α , ενώ οι D1-υποδοχείς επηρεάζουν μόνο την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .

Πειραματική ομάδα : # 8

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και ινσουλίνη για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu g/ml$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu g/ml$ LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu g/ml$ LPS + 25 $\mu g/ml$ ινσουλίνης

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 26

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η χορήγηση ινσουλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία ενεργοποιούνται με ενδοτοξίνη για 14 ώρες θα προκαλέσει μεταβολή στην ικανότητα παραγωγής H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.692 ± 0.390

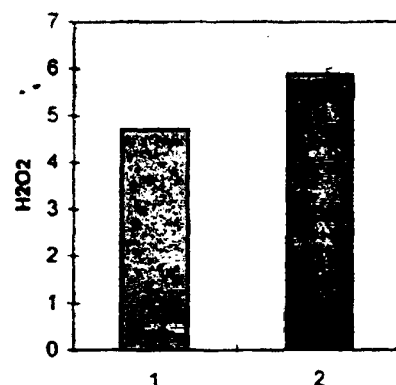
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.877 ± 0.849

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 25.25 %

t-statistic : - 6.465

Βαθμοί Ελευθερίας : 50

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η χορήγηση 25 $\mu g/ml$ ινσουλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται από 2 $\mu g/ml$ ενδοτοξίνη προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής H_2O_2 . Συγκεκριμένα η ινσουλίνη προκάλεσε αύξηση κατά 25.25 % της ικανότητας παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 4.692 μM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 5.877 . Η διαφορά τους ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.001$. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η ινσουλίνη ασκεί ισχυρή ευοδωτική επίδραση επί της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Η επίδραση αυτή της ινσουλίνης έχει μεγάλο ενδιαφέρον , γιατί δεν υπάρχουν άλλες ανακοινώσεις που να δείχνουν παρόμοια αποτελέσματα . Αντιθέτως , στην διεθνή βιβλιογραφία διαπιστώνουμε ότι η ουσία αυτή ασκεί κατασταλτικές επιδράσεις στα μακροφάγα , όπως π.χ. καταστολή της έκφρασης Fc-υποδοχέων , καταστολή της φαγοκυττάρωσης μέσω Fc-υποδοχέων , καταστολή της Εξαρτημένης από Αντίσωμα Κυτταροτοξικότητας (ADCC) και τέλος καταστολή της παραγωγής TNF α και της ενδοκυττάριας καταστροφής Μυκοβακτηριδίων (Rhodes, 1975 , Muschel και συν., 1977 , Bar και συν., 1977 , Bermudez και συν., 1990) . Επειδή όμως η ινσουλίνη δρα μέσω της οδού των Κινασών της Tyrosίνης και έτσι ενεργοποιεί πολλούς μηχανισμούς μέσα στο κύτταρο , μια τέτοια ευοδωτική επίδραση δεν θα πρέπει να εντυπωσιάζει . Επίσης , η ινσουλίνη ανταγωνίζεται την δράση των Αδρενεργικών αγωνιστών , πιθανώς μέσω της ικανότητάς της να ενεργοποιεί την Φωσφοδιεστεράση και να κατεβάζει τα επίπεδα του cAMP . Δεν είναι ακριβώς γνωστό πως επιτυγχάνεται αυτή η δράση .



Πειραματική ομάδα : # 9

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και γλυκαγόνη για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$ για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνη για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 27

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη 10^{-7} M Γλυκαγόνης για 14 ώρες σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιούνται με ενδοτοξίνη θα προκαλούσε μεταβολή στην ικανότητα παραγωγής του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.381 ± 0.520

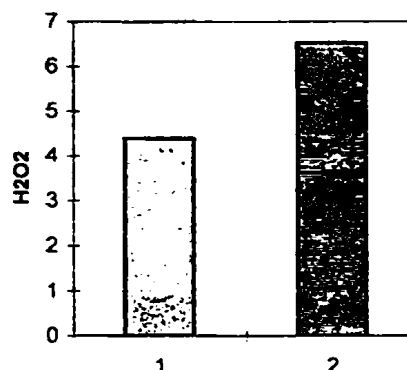
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 6.533 ± 0.534

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 49.12 %

t-statistic : - 14.995

Βαθμοί Ελευθερίας : 52

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η προσθήκη Γλυκαγόνης στις καλλιέργειες των περιτοναϊκών μακροφάγων προκάλεσε μεγάλη αύξηση της παραγωγής H_2O_2 . Συγκεκριμένα η Γλυκαγόνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 κατά 49.12 % , με μέση τιμή μαρτύρων 4.381 μM και μέση τιμή πειραματικών 6.533 μM . Η αύξηση της παραγωγής H_2O_2 ήταν στατιστικά σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.001 . Φαίνεται ότι η Γλυκαγόνη ασκεί ισχυρή ευοδωτική επίδραση στην παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Αυτό δεν ήταν αναμενόμενο αποτέλεσμα με βάση προγενέστερες παρατηρήσεις . Αν και έχουν ανιχνευθεί ειδικοί υποδοχείς για Γλυκαγόνη στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Blecher και Goldstein, 1977 , Bhathena, 1981 , Gordon και συν., 1988) οι ελάχιστες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν διαλεύκαναν ούτε σε ποια οδό μεταγωγής μηνύματος συνδέονται αυτοί οι υποδοχείς , ούτε έδειξαν ότι η γλυκαγόνη προκαλεί βιολογικές επιδράσεις στα μακροφάγα και στα μονοκύτταρα (Smith και συν., 1980 , Bermudez και συν., 1990) . Είναι βέβαιο ότι η γλυκαγόνη δεν προκαλεί αύξηση του cAMP στα μακροφάγα , όπως προκαλεί σε άλλα κύτταρα (Smith και συν., 1980) . Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά των δικών μας πειραμάτων , διότι αν η Γλυκαγόνη προκαλούσε αύξηση του cAMP θα αναμενόταν να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής H_2O_2 , πράγμα όμως που δεν συμβαίνει . Ο μηχανισμός με τον οποίο η Γλυκαγόνη προκαλεί την αύξηση της παραγωγής H_2O_2 δεν είναι δυνατόν να με τα πειράματα της παρούσας διατριβής και θα αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής εργασίας .



Πειραματική ομάδα : # 10

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) 1.25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS και Νευροπεπτίδιο Υ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 13

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη Νευροπεπτιδίου Υ σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάζονταν επί 14 ώρες με ενδοτοξίνη θα προκαλούσε μεταβολές στην παραγωγή H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.858 ± 0.229

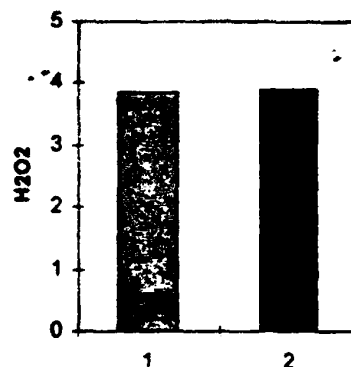
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.892 ± 0.327

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.88 % (πρακτικά δεν υπάρχει) .

t-statistic : - 0.313

Βαθμοί Ελευθερίας : 24

P value : $P = 0.757$. Η μεταβολή που καταγράφεται είναι στατιστικώς μη-σημαντική .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η προσθήκη του Νευροπεπτιδίου Υ (NPY) στα περιτοναϊκά μακροφάγα δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Η καταγραφείσα μεταβολή είναι μόλις 0.88 % και επειδή ο δείκτης P έχει τιμή $P = 0.757$ (δηλαδή είναι στατιστικά μη-σημαντική διαφορά) θεωρείται ότι το NPY δεν προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 . Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για το NPY , ούτε ότι αυτή η ουσία προκαλεί βιολογικές επιδράσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος .

Πειραματική ομάδα : # 11

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα μετά από χορήγηση υψηλής δόσης δεξαμεθαζόνης (10^{-4} M) και ενδοτοξίνης για 12 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 10^{-4} M , για 12 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Δεξαμεθαζόνη για 12 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 5

Σκοπός του πειράματος : Να επιβεβαιωθεί η γνωστή από την βιβλιογραφία παρατήρηση ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων Δεξαμεθαζόνης σε καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων για σχετικά μικρά διαστήματα προκαλεί καταστολή της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου , στα πλαίσια της γενικής κατασταλτικής επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στο ανοσοποιητικό σύστημα .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 7.000 ± 0.332

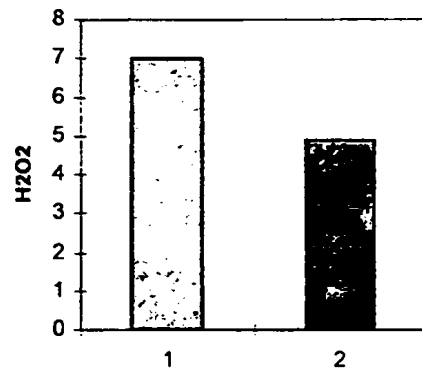
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.870 ± 0.148

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 30.42 %

t-statistic : 13.109

Βαθμοί Ελευθερίας : 8

P value : $P < 0.0001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η χορήγηση υψηλών ποσοτήτων δεξαμεθαζόνης προκαλεί μία σημαντική μείωση της παραγωγής H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Συγκεκριμένα , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 7.000 μM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 4.870 μM . Η διαφορά των μέσων τιμών ήταν της τάξης του 30.42 % και οι σταθερές αποκλίσεις ήταν πολύ μικρές . Για τον λόγο αυτό ο δείκτης P ήταν πολύ μικρός ($P < 0.0001$) και η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική , παρά τον σχετικά μικρό αριθμό παρατηρήσεων . Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σύμφωνα με την γνωστή γενικότερη κατασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών . Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανασταλτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα δεν έχει γίνει αποδεκτή από όλους . Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι παρουσιάζεται αναστολή της παραγωγής H_2O_2 και O_2^{-1} μετά από επώαση με γλυκοκορτικοειδή (Schultz και συν., 1985 , Maridonneau-Parini και συν., 1989) ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή δεν επηρεάζουν την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Dieter και συν., 1986 , Schaffner και Rellstab, 1988) .



Πειραματική ομάδα : # 12

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα μετά από χορήγηση χαμηλής δόσης (5×10^{-6} M) δεξαμεθαζόνης .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2)

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-6} M , για 12 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με LPS επί 12 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με LPS και χαμηλή δόση δεξαμεθαζόνης (5×10^{-6} M) επί 12 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 7 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 35

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η χορήγηση χαμηλής δόσης δεξαμεθαζόνης σε μακροφάγα που ενεργοποιούνται επί 12 ώρες με ενδοτοξίνη θα προκαλέσει την αναμενόμενη καταστολή της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **3.834 \pm 0.847**

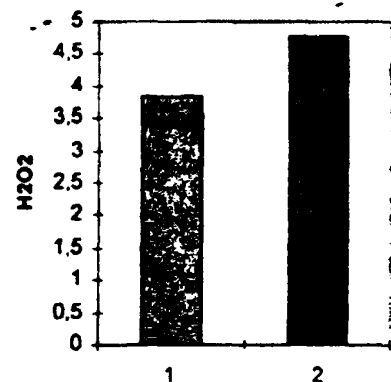
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **4.744 \pm 1.730**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 23.73 % .

t-statistic : - 2.795

Βαθμοί Ελευθερίας : 68

P value : $P < 0.01$ ($P = 0.007$) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Σε 7 από τα 7 πειράματα που έγιναν για να διαπιστωθούν οι επιδράσεις των χαμηλών δόσεων (5×10^{-6} M) δεξαμεθαζόνης στην παραγωγή H_2O_2 από τα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα , υπήρξε αύξηση της παραγωγής του . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 3.834 μM H_2O_2 ενώ των πειραματικών ήταν 4.744 μM H_2O_2 , δηλαδή υπήρξε μια αύξηση της τάξης του 23.73 % . Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική με δείκτη $P < 0.01$. Η ευοδωτική επίδραση των χαμηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης στην παραγωγή H_2O_2 ήταν ένα αποτέλεσμα μη-αναμενόμενο , λόγω της γενικότερης κατασταλακτικής επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος . Η διεγερτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στα μακροφάγα είχε ήδη διαπιστωθεί και ερμηνευτεί από την ομάδα των Broug-Holub και Kraal σε μία δημοσίευση του 1996 , αλλά αφορούσε διαφορετικά είδη μακροφάγων (βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα) και διαφορετικές παραμέτρους (παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και Ιντερλευκίνης-1 β) . Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα μελέτες που να έχουν δείξει επίταση της παραγωγής H_2O_2 από τα γλυκοκορτικοειδή . Πρέπει να υποθέσουμε ότι η χαμηλή δόση της Δεξαμεθαζόνης προκαλούσε την εκλεκτική σύνδεση του συμπλέγματος της ορμόνης και του κυτταροπλασματικού υποδοχέα , σε θέσεις του προαγωγέα που επιτείνουν την έκφραση γονιδίων (positive glucocorticoid-responsive elements) .



Πειραματική ομάδα : # 13

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και σεροτονίνη για 4 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη 2×10^{-5} M , για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 4 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 4 ώρες με LPS + σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των ενεργοποιημένων με ενδοτοξίνη περιτοναϊκών μακροφάγων με 2×10^{-5} M σεροτονίνη θα επηρέαζε την παραγωγή H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.017 ± 0.216

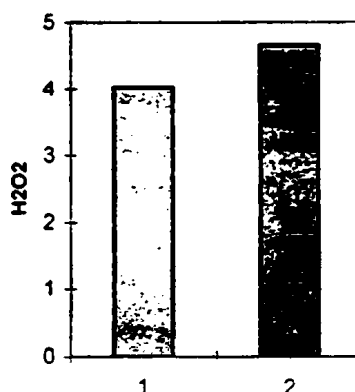
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.657 ± 0.157

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 15.93 % .

t-statistic : - 9.285

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η χορήγηση σεροτονίνης (2×10^{-5} M) στα περιτοναϊκά μακροφάγα προκάλεσε επίταση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Συγκεκριμένα η σεροτονίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 κατά 15.93 % , αφού η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν $4.017 \mu\text{M}$ και των πειραματικών ήταν $4.657 \mu\text{M}$. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική με τιμή $P < 0.001$. Αν και σε κάποια παρόμοια εργασία έχει ανακοινωθεί ότι η σεροτονίνη συνδέεται με τους υποδοχείς των μουραμυλ-διπεπτιδίων (MDP) και οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή Ανιόντος Υπεροξειδίου (Silverman και συν., 1985) , ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία για την επίδραση της σεροτονίνης στην παραγωγή H_2O_2 από μακροφάγα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη . Στα ενεργοποιημένα με Ιντερφερόνη- γ μακροφάγα υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς τις επιδράσεις της σεροτονίνης σε διάφορες άλλες παραμέτρους (Koff και Dunegan, 1986 , Sternberg και συν., 1986 , Sternberg και συν., 1987) .



Πειραματική ομάδα : # 14

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και ισταμίνη για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 1 μM ($10^{-6} M$) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS επί 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS + 1 μM Ισταμίνης επί 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 5 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 25

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η χορήγηση ισταμίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία ενεργοποιούνται από ενδοτοξίνη θα προκαλέσει μεταβολή στην ικανότητα παραγωγής H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.916 ± 0.724

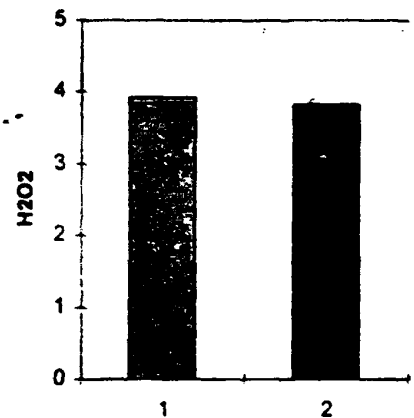
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.832 ± 0.770

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 2.14 %

t-statistic : 0.397

Βαθμοί Ελευθερίας : 48

P value : $P = 0.693$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά)

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η χορήγηση Ισταμίνης στα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα προκάλεσε μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά 2.14 % . Αυτή η διαφορά είναι αρκετά μικρή και επιπλέον στατιστικώς μη-σημαντική ($P = 0.693$) . Για τον λόγο αυτό θεωρούμε ότι η Ισταμίνη πρακτικά δεν επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με τα όσα μας είναι γνωστά από την βιβλιογραφία . Τα μακροφάγα διαθέτουν H1- και H2-ισταμινικούς υποδοχείς (Diaz και συν., 1979 , Οσί, 1982) που επιδρούν τόσο σε ενεργοποιημένα μακροφάγα (Sternberg και συν., 1987) όσο και σε μη-ενεργοποιημένα κύτταρα (Cluzel και συν., 1990) . Οι H2-υποδοχείς δρουν μέσω της διέγερσης της Γουανυλικής Κυκλάσης και της αύξησης του cGMP και του ενδοκυττάριου Ca^{+2} (Ohno και συν., 1991) , ενώ οι H1-υποδοχείς δρουν μέσω της διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης και της αύξησης του cAMP (Mirossay και συν., 1994) . Όμως μόνο τα άωρα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και οι αντίστοιχες κυτταρικές σειρές διαθέτουν H2-υποδοχείς , ενώ όταν τα κύτταρα αυτά ωριμάσουν σε μακροφάγα χάνουν τους H2-υποδοχείς τους . Έτσι στα άωρα κύτταρα U-937 και THP-1 η ισταμίνη καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 μέσω των H2-υποδοχέων και της αύξησης του cAMP . Αν τα κύτταρα αυτά ωριμάσουν προς μακροφάγα χάνουν τους H2-υποδοχείς του και η ισταμίνη παύει να οδηγεί στην αύξηση του cAMP και την καταστολή της παραγωγής H_2O_2 (Gespatch και συν., 1985 , Mirossay και συν., 1994) . Επίσης , τα μονοκύτταρα του αίματος (που θεωρούνται «άωρα» κύτταρα) εκφράζουν H2-υποδοχείς και έτσι η ισταμίνη προκαλεί σε αυτά καταστολή της παραγωγής H_2O_2 (Hellstrand και συν., 1994) .

Πειραματική ομάδα : # 15

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και προσταγλανδίνη PGE₂ για 4 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) 10⁻⁵ M , για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 μg/ml LPS για 4 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 μg/ml LPS + 10⁻⁵ M PGE₂ για 4 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2

Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 12

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί η επίδραση της Προσταγλανδίνης PGE₂ στην παραγωγή H₂O₂ από τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα . Επειδή η προσταγλανδίνη αυτή αναφέρεται ότι ασκεί τις επιδράσεις της μέσω της αύξησης του cAMP , δηλαδή δρα όπως η αδρεναλίνη . Αναμένεται ότι θα προκληθούν τα ίδια αποτελέσματα όπως και με την αδρεναλίνη , δηλαδή μείωση της παραγωγής H₂O₂ .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **14.387 ± 1.049**

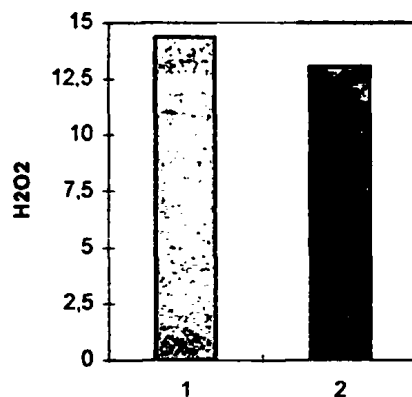
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **13.063 ± 1.260**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 9.20 %

t-statistic : 2.800

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.01

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των ενεργοποιημένων με ενδοτοξίνη περιτοναϊκών μακροφάγων με PGE₂ επί 4 ώρες προκαλεί την μείωση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου κατά 9.20 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 14.387 μM H₂O₂ και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 13.063 μM H₂O₂ . Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.01 . Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η PGE₂ προκαλεί την αναμενόμενη μείωση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την PGE₂ (Ormeier και συν., 1983) και ότι η σύνδεση της PGE₂ με αυτούς προκαλεί την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του cAMP (Remold O'Donnell , 1974 , Remold O'Donnell και Alpert, 1979) με τελικό αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής των O₂⁻¹ και H₂O₂ (Smith και συν., 1980 , Lim και συν., 1983) . Δεν είναι γνωστό με ποιόν ακριβώς μηχανισμό η αύξηση του cAMP προκαλεί την καταστολή της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Επίσης δεν είναι γνωστό αν η παρατηρούμενη αναστολή της PLA₂ σχετίζεται με την διακοπή της παραγωγής O₂⁻¹ (Mayer και Spitzer , 1994) .



Πειραματική ομάδα : # 16

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν με 10^{-5} M PGE₂ κατά την φάση διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC) δια του PMA (Phorbol Myristate Acetate) .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) 10^{-5} M , που χορηγήθηκε μετά την 4ωρη ενεργοποίηση των κυττάρων με LPS , κατά την διάρκεια της επώασης των 40' λεπτών για διέγερση της PKC δια του PMA .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 4 ώρες με ενδοτοξίνη .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 4 ώρες με ενδοτοξίνη και στην συνέχεια για άλλα 40' λεπτά με PGE₂ (δηλαδή κατά την φάση διέγερσης της PKC δια του PMA) .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επίδραση της PGE₂ στην παραγωγή του H₂O₂ από τα μακροφάγα που διαπιστώθηκε στην πειραματική ομάδα # 15 (μείωση της παραγωγής κατά 9.20 %) μπορεί να επιτευχθεί με χορήγηση της προσταγλανδίνης κατά την φάση διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C με τον εστέρα της φορβόλης PMA . Αν συμβαίνει αυτό θα σημαίνει ότι η επίδραση της PGE₂ ασκείται μέσω καταστολής της δράσης της PKC . Κατά συνέπεια η δράση της PGE₂ (που οφείλεται σε αύξηση του cAMP λόγω διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης) θα είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης της αύξησης του cAMP επάνω στην PKC .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 3.875 ± 0.820

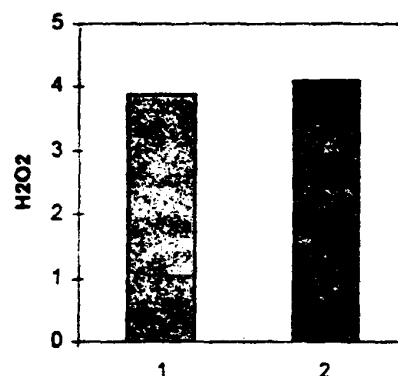
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 4.115 ± 0.955

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 6.19 % .

t-statistic : - 0.853

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P = 0.399 (Στατιστικώς μη-σημαντική διαφορά) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η χορήγηση της PGE₂ κατά την φάση της διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C προκάλεσε μια μικρή τάση αύξησης της παραγωγής H₂O₂ (6.19 %) η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή 0.399 . Έτσι η PGE₂ φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την παραγωγή H₂O₂ όταν χορηγείται κατά την φάση διέγερσης της PKC . Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αύξηση της cAMP δεν επηρεάζει την λειτουργία της Πρωτεϊνικής Κινάσης C , αλλά κάποιο άλλο στάδιο της διαδικασίας παραγωγής H₂O₂ . Μια πιθανή εξήγηση για τα παραπάνω είναι ότι η αύξηση του cAMP και η διέγερση της PKA αναστέλλουν την PKC εμποδίζοντας την μετατόπισή της (translocation) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι δεν ασκούν κατασταλτική επίδραση εάν η PKC έχει ήδη μετατοπιστεί στην κυτταρική μεμβράνη .

Πειραματική ομάδα : # 17

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα στα οποία χορηγήθηκε PGE₂ τόσο κατά την διάρκεια της επώασης των 4 ωρών με LPS όσο και κατά την διάρκεια της επώασης των 40' λεπτών για διέγερση της PKC δια του PMA (Phorbol Myristate Acetate).

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) .

Διεγέρτης : LPS 2 μg/ml , για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10⁻⁵ M , αρχικά για 4 ώρες (μαζί με τον LPS) και στην συνέχεια για άλλα 40' λεπτά (μαζί με το PMA) .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν για 4 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν για 4 ώρες με LPS και PGE₂ και στην συνέχεια για άλλα 40' λεπτά με PMA και PGE₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με PGE₂ τόσο κατά την φάση ενεργοποίησης όσο και κατά την φάση διέγερσης της PKC θα προκαλέσει μεταβολή στην παραγωγή H₂O₂ σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 15 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 8.970 ± 0.509

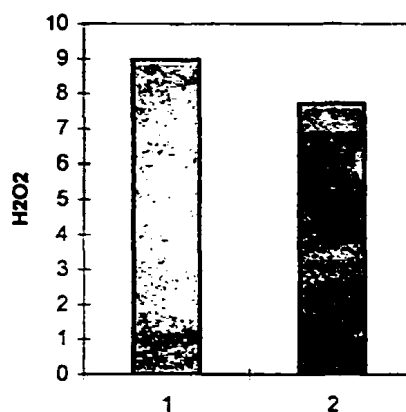
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 7.707 ± 0.627

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 14.08 %

t-statistic : 6.056

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : P < 0.001 .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η χορήγηση της PGE₂ κατά τις φάσεις ενεργοποίησης του περιτοναϊκού μακροφάγου και διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C προκαλεί μείωση της παραγωγής H₂O₂ κατά 14.08 % . Αυτή η μείωση είναι κάπως μεγαλύτερη από εκείνη που προκάλεσε η χορήγηση PGE₂ κατά την φάση της επώασης με LPS (στην ομάδα # 15 , με μείωση κατά 9.20 %) . Στην τρέχουσα πειραματική ομάδα ο μέσος όρος των μαρτύρων ήταν 8.970 μM H₂O₂ και ο μέσος όρος των πειραματικών ήταν 7.707 μM H₂O₂ . Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική με δείκτη P < 0.001 . Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η παράταση της παρουσίας της PGE₂ και στην φάση διέγερσης της PKC προκαλεί περαιτέρω ελάττωση της παραγωγής H₂O₂ , προφανώς λόγω της επίδρασης σε κάποιο από τα βήματα στην αλυσίδα των αντιδράσεων μεταγωγής μηνύματος που προηγούνται της διέγερσης της PKC . Είναι πιθανό ότι η παράταση της παρουσίας της PGE₂ οδηγεί στην διατήρηση υψηλών επιπέδων cAMP , με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η έστω και καθυστερημένη μετατόπιση (translocation) της PKC στην κυτταρική μεμβράνη .



Πειραματική ομάδα : # 18

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων
 → τα οποία επωάστηκαν με ενδοτοξίνη και προσταγλανδίνη PGD₂ για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGD₂ 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η PGD₂ προκαλεί μεταβολές στην παραγωγή H₂O₂ από τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα . Από την βιβλιογραφία δεν έχει διαπιστωθεί ότι τα μακροφάγα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την PGD₂ .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **4.075 ± 0.454**

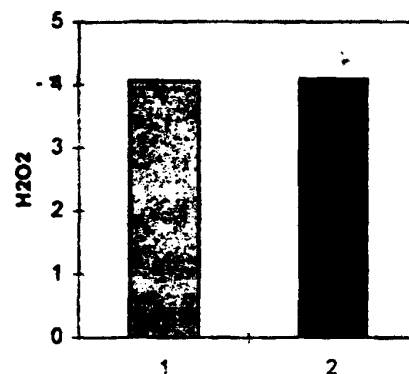
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **4.100 ± 0.849**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.61 % (μικρή τάση αύξησης) .

t-statistic : - 0.116

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P = 0.908



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η μεταβολή ανάμεσα στις μέσες τιμές των μαρτύρων και των πειραματικών (μεταβολή μόλις 0.61 %) ήταν αμεληταία ενώ η τιμή του δείκτη P ήταν πολύ μεγάλη (P = 0.908) . Αυτά δείχνουν ότι δεν προκαλείται καμία μεταβολή στην ικανότητα παραγωγής H₂O₂ από τα περιτοναϊκά μακροφάγα με την επίδραση της PGD₂ . Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την βιβλιογραφία . Επιπλέον αποδεικνύεται έμμεσα ότι οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν με την χορήγηση της PGE₂ στις πειραματικές ομάδες # 15 , # 16 και # 17 αποτελούν ειδικές επιδράσεις για την συγκεκριμένη προσταγλανδίνη .

Πειραματική ομάδα : # 19

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF- γ) 250 units/ml , για 6 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με 250 u/ml INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με 250 u/ml INF γ + 10^{-4} M αδρεναλίνης

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 14

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί αν η αδρεναλίνη ασκεί την ίδια κατασταλτική επίδραση επί της παραγωγής H_2O_2 στα ενεργοποιημένα με INF γ περιτοναϊκά μακροφάγα όπως ασκεί και στα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα (βλέπε πειραματική ομάδα # 4) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **7.021 \pm 0.684**

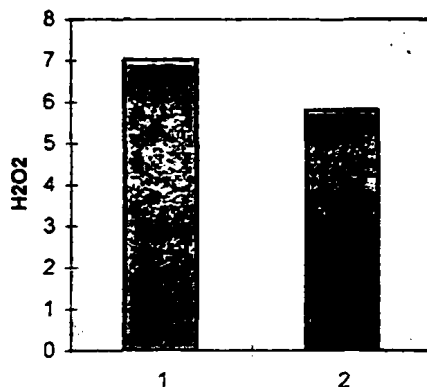
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **5.814 \pm 1.383**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 17.19 %

t-statistic : 2.926

Βαθμοί Ελευθερίας : 26

P value : P < 0.01 (P = 0.007) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των ενεργοποιημένων με Ιντερφερόνη- γ περιτοναϊκών μακροφάγων με αδρεναλίνη προκαλεί την μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 17.19 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 7.021 μ M H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 5.814 μ M H_2O_2 . Αυτή η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική με δείκτη P < 0.01 . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αδρεναλίνη καταστέλλει την παραγωγή του H_2O_2 . Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενη μελέτη , όπου η αδρεναλίνη προκαλούσε καταστολή της παραγωγής TNF α από μακροφάγα ενεργοποιημένα με INF γ ή με LPS (Bermudez και συν., 1990) . Σε μια παλαιότερη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η νοραδρεναλίνη σε υψηλές δόσεις προκαλούσε την καταστολή της κυτταροτοξικότητας των ενεργοποιημένων με INF γ μακροφάγων , ενώ σε χαμηλές δόσεις προκαλούσε την αύξηση της κυτταροτοξικότητας (Koff και Dunegan, 1985) . Αυτό το αποτέλεσμα μάλλον οφείλεται σε δράση μέσω $\alpha 2$ -υποδοχέων σε χαμηλές δόσεις και μέσω $\beta 2$ -υποδοχέων σε υψηλές δόσεις . Επίσης διαπιστώθηκε ότι και η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη αυξάνουν το cAMP των φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων και μειώνουν την ικανότητα των κυττάρων αυτών να ενεργοποιούνται από την INF γ και να καταστρέφουν κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς (Koff και Dunegan, 1986) .



Πειραματική ομάδα : # 20

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν αρχικά με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με Ιντερφερόνη- γ και Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διεύρτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , αρχικά για 6 ώρες και στην συνέχεια για άλλες 8 ώρες (συνολικά επί 14 ώρες) .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M για 6 ώρες . Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M για 8 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ επί 6 ώρες και στην συνέχεια επί άλλες 8 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη επί 6 ώρες και στην συνέχεια επί άλλες 8 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η κατασταλτική επίδραση της αδρεναλίνης στην παραγωγή H_2O_2 είναι ικανή να εμποδίσει την διέγερση της παραγωγής H_2O_2 που προκαλεί η χορήγηση χαμηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) επί μικρό χρονικό διάστημα (8 ώρες) . - -

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.358 ± 0.249

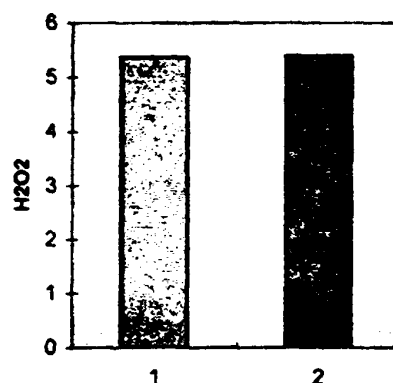
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.387 ± 0.282

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.54 %

t-statistic : - 0.267

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.791 (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η μέση τιμή των μαρτύρων και η μέση τιμή των πειραματικών παρουσίαζαν μόλις 0.54 % διαφορά . Αυτή η μεταβολή ήταν πρακτικά ασήμαντη . Ο δείκτης P έχει πολύ υψηλή τιμή (P = 0.791) . Από το αποτέλεσμα αυτό διαπιστώνουμε ότι η αδρεναλίνη δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 στα κύτταρα που επωάστηκαν αρχικά με Ιντερφερόνη- γ και στην συνέχεια με χαμηλή δόση δεξαμεθαζόνης για 8 ώρες . Όμως η παρούσα μελέτη δεν είναι δυνατόν να εξηγήσει ικανοποιητικά το αποτέλεσμα αυτό . Η δεξαμεθαζόνη πιθανώς επιτείνει την παραγωγή H_2O_2 μέσω της επαγωγής γονιδίων . Αυτό θα επιτυγχάνεται με σύνδεση σε θέσεις του προαγωγέα τύπου "Θετικού GRE" (positive glucocorticoid-responsive elements) . Δεν γνωρίζουμε αν στα μακροφάγα η Αδρεναλίνη επιδρά στην έκφραση γονιδίων και μέσω ποιου μηχανισμού . Η αδρεναλίνη έχει αναφερθεί από τους Muroi και Suzuki ότι επηρεάζει την έκφραση γονιδίων μέσω του παράγοντα NF κ B .



Πειραματική ομάδα : # 21

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 για 6 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Διενέργης : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (1,25-Vit.D3) 2.5×10^{-7} M , για 6 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός από την 1,25-Vit.D3 .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με 2.5×10^{-7} M 1,25-Vit.D3

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 8

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η 1,25-Vit.D3 είναι ικανή να διεγείρει την παραγωγή H_2O_2 όταν χορηγηθεί σε μη-διεγερμένα περιτοναϊκά μακροφάγα .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.037 ± 0.121

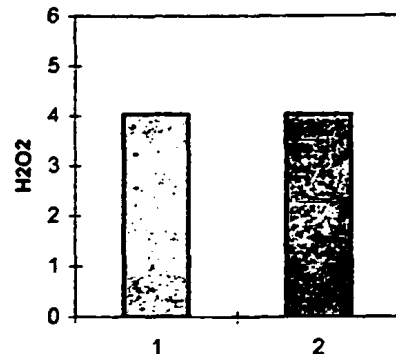
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.043 ± 0.129

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.14 %

t-statistic : - 0.0995

Βαθμοί Ελευθερίας : 14

P value : P = 0.922

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των φυσιολογικών (μη-ενεργοποιημένων) περιτοναϊκών μακροφάγων με 1,25-Vit.D3 για διάστημα 6 ωρών δεν προκάλεσε κάποια αξιόλογη μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των πειραματικών ήταν μόλις 0.14 % μεγαλύτερη από την μέση τιμή των μαρτύρων . Η ασήμαντη αυτή διαφορά σε συνδυασμό με την μεγάλη τιμή του δείκτη P (P = 0.922) δείχνουν ότι η 1,25-Vit.D3 δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 . Ωστόσο στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές στην δυνατότητα ενεργοποίησης των μακροφάγων από την 1,25-Vit.D3 καθώς και στην διεγερτική επίδραση στην παραγωγή H_2O_2 (Rigby και συν., 1984 , Rouis και συν., 1985 , Rook και συν., 1986 , Cohen και συν., 1986 , Reichel και συν., 1987 , Rook και συν., 1988) . Όμως για την επίτευξη των παραπάνω αποτελεσμάτων χρειάστηκαν πολύ μεγάλα διαστήματα επώασης με την 1,25-Vit.D3 . Κάτω από αυτές τις συνθήκες η 1,25-Vit.D3 συνδέεται με τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα VDR και στην συνέχεια το σύμπλεγμα αυτό μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου και συνδέεται με το DNA , προκαλώντας την μεταγραφή του mRNA ορισμένων γονιδίων (Cancela και συν., 1988) .



Πειραματική ομάδα : # 22

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D3 επί 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διεγέρτης : 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D3 (1,25-Vit.D3) 2.5×10^{-7} M , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χορηγήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός από την 1,25-Vit.D3 .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2.5×10^{-7} M 1,25-Vit.D3 .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 17

Σκοπός του πειράματος : Στην προηγούμενη πειραματική ομάδα (# 21) διαπιστώθηκε ότι τα μακροφάγα δεν ανταποκρίνονται σε επώαση 6 ωρών με 1,25-Vit.D3 . Σκοπός της πειραματικής ομάδας # 22 είναι να διερευνηθεί αν η παράταση του χρόνου επώασης των φυσιολογικών (μη-διεγερμένων) μακροφάγων με 1,25-Vit.D3 σε 14 ώρες θα προκαλέσει μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.264 ± 0.251

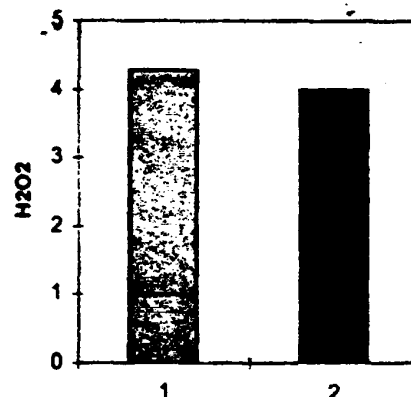
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.976 ± 0.226

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 6.75 % .

t-statistic : 3.514

Βαθμοί Ελευθερίας : 32

P value : $P < 0.001$.

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η in vitro επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 1,25-Vit.D3 επί 14 ώρες προκάλεσε μια μικρή μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 6.75 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν $4.264 \mu M H_2O_2$ και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν $3.976 \mu M H_2O_2$. Αυτή η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.001 . Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η 1,25-Vit.D3 επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα που δεν έχουν ενεργοποιηθεί , αλλά απαιτείται ένα μεγάλο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί αυτή η επίδραση . (Cohen και συν., 1986 , Rook και συν., 1986) .

Πειραματική ομάδα : # 23

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με ενδοτοξίνη και 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (1,25-Vit.D3) $2,5 \times 10^{-7} M$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 1,25-Vit.D3 .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 17

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η 1,25-Vit.D3 προκαλεί μεταβολές στην παραγωγή H_2O_2 στα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 6.097 ± 0.468

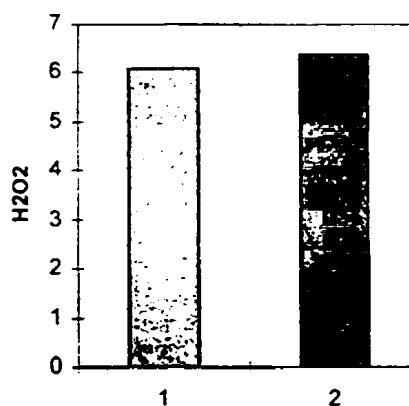
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 6.394 ± 0.504

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 4.87 % .

t-statistic : - 1.777

Βαθμοί Ελευθερίας : 32

P value : P = 0.085 (Στατιστικώς Μη-σημαντικό αποτέλεσμα) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η χορήγηση της 1,25-Vit.D3 στα ενεργοποιημένα από ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 από τα κύτταρα αυτά . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 6.097 μM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 6.394 μM . Η διαφορά των τιμών ήταν της τάξης του 4.87 % , αλλά ο δείκτης P είχε τιμή 0.085 . Η αύξηση των τιμών δεν διαπιστώθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική . Στην πειραματική ομάδα # 22 αποδείχτηκε ότι η 1,25-Vit.D3 προκαλεί αυξημένη παραγωγή H_2O_2 . Ένας πιθανός λόγος που η ταυτόχρονη επώαση με LPS και 1,25-Vit.D3 δεν προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της παραγωγής H_2O_2 σε σύγκριση με την επώαση μόνο με LPS είναι ότι η καλσιτριόλη συνδέεται με τον VDR-υποδοχέα και προκαλεί την μεταγραφή mRNA . Η ενδοτοξίνη επίσης επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μακροφάγων και με την παραγωγή H_2O_2 (Introna και συν., 1986 , Largen και Tannenbaum, 1986 , Aderem, 1988 , Hamilton, 1989 , Tannenbaum και Hamilton, 1989) . Είναι λοιπόν πιθανό ότι ο LPS και η 1,25-Vit.D3 προκαλούν την επαγωγή των ίδιων γονιδίων και ότι για αυτό η ταυτόχρονη χορήγηση και των δύο ουσιών δεν προκαλεί εντονότερο αποτέλεσμα .



Πειραματική ομάδα : # 24

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν με ενδοτοξίνη για 2 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 2 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με καλλιεργητικό υλικό για 2 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS για 2 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 5 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 19

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu g/ml$ ενδοτοξίνη για 2 ώρες προκαλεί αύξηση της παραγωγής H_2O_2 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.158 ± 0.119

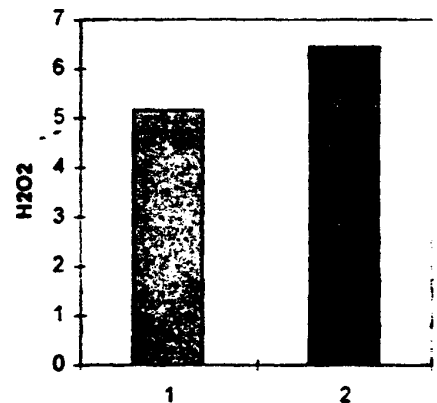
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 6.429 ± 0.283

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 24.64 %

t-statistic : - 18.013

Βαθμοί Ελευθερίας : 36

P value : $P < 0.0001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με ενδοτοξίνη , ακόμα και για χρονικό διάστημα 2 ωρών , προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , της τάξης του 24.64 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 5.158 μM H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 6.429 μM H_2O_2 . Ο δείκτης P ήταν πολύ μικρός ($P < 0.0001$) και η αύξηση της παραγωγής H_2O_2 στατιστικώς σημαντική . Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των επίμυων ανταποκρίνονται στην ενδοτοξίνη με αυξημένη παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Στην διεθνή βιβλιογραφία όμως οι διάφορες μελέτες δεν έδωσαν πάντα θετικά αποτελέσματα (Wizeman και Laskin, 1994) . Ενδεχομένως αυτό οφείλεται στην διαφορετική μέθοδο απομόνωσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων και στην in vitro χορήγηση του LPS που εφαρμόστηκαν στο Εργαστήριό μας . Έτσι η αξιολόγηση των επιδράσεων της ενδοτοξίνης έγινε χωρίς την συνύπαρξη κυτταροκινών ή άλλων ουσιών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν περαιτέρω μεταβολές στην ικανότητα παραγωγής H_2O_2 .

Πειραματική ομάδα : # 25

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν με Ιντερφερόνη- γ για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 μ /ml INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 11

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ για 14 ώρες θα προκαλούσε αύξηση ή μείωση της παραγωγής H_2O_2 . Αναμένεται ότι η επώαση των 14 ωρών θα προκαλούσε μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 , όπως συνέβη και με τα περιτοναϊκά μακροφάγα της πειραματικής ομάδας # 3 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.700 ± 0.385

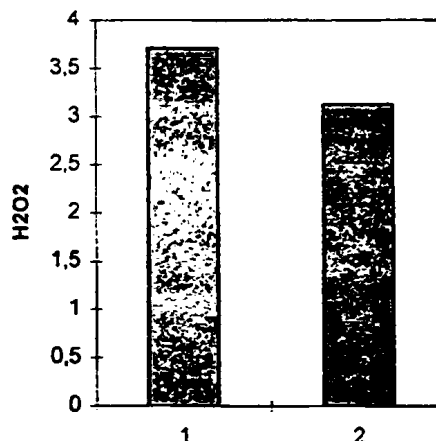
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 3.132 ± 0.364

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 15.35 %

t-statistic : 3.560

Βαθμοί Ελευθερίας : 20

P value : $P < 0.005$ ($P = 0.002$) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ για 14 ώρες προκάλεσε την μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά 15.35 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν $3.700 \mu M H_2O_2$ και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν $3.132 \mu M H_2O_2$. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.005$. Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η παρατεταμένη επώαση των μακροφάγων με INF γ ενεργοποιεί μηχανισμούς καταστολής της ενεργοποίησης και έτσι οδηγεί στην μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 .



Πειραματική ομάδα : # 26

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη επί 6 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 6 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 14

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση με 10^{-4} M Αδρεναλίνη για 6 ώρες καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 και σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με 250 u/ml Ιντερφερόνη- γ .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.464 ± 0.313

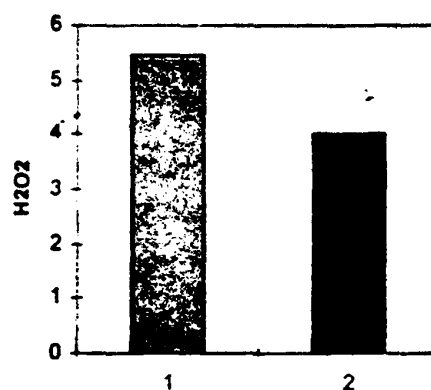
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 4.025 ± 0.464

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 26.33 % .

t-statistic : 9.605

Βαθμοί Ελευθερίας : 26

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 u/ml INF γ οδήγησε στην μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 26.33 % . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 5.464 μ M H_2O_2 και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 4.025 μ M . Η διαφορά τους ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η αδρεναλίνη καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 και στα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την παρατήρηση ότι η χορήγηση της νοραδρεναλίνης σε δόσεις μεγαλύτερες από 10^{-7} M (δόση στην οποία η νοραδρεναλίνη συνδέεται με β 2-αδρενεργικούς υποδοχείς και δρα όπως η αδρεναλίνη) προκαλεί καταστολή της ικανότητας των μακροφάγων να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα , ενώ σε δόσεις μικρότερες από 10^{-8} M (όπου η νοραδρεναλίνη συνδέεται με α 2-υποδοχείς και δρα αντίθετα με την αδρεναλίνη) ευοδώνει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (Koff και Dupegan, 1985) . Επίσης η ικανότητα της αδρεναλίνης να καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 από ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα εξηγεί το γιατί η αδρεναλίνη εμποδίζει την INF γ να διεγείρει τα περιτοναϊκά μακροφάγα για καταστροφή των προσβεβλημένων από τους ιούς HSV-1 και HSV-2 (Koff και Dupegan, 1986) . Αυτές οι κατασταλτικές επιδράσεις της αδρεναλίνης επεκτείνονται και στα μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με TNFa (Bermudez και συν., 1990) .



Πειραματική ομάδα : # 27

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από ενεργοποιημένα με INF γ βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν αρχικά με Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂) .

Διεύρτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , αρχικά για 6 ώρες και στην συνέχεια για άλλες 8 ώρες (14 ώρες συνολικά) .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10⁻⁴ M , για 6 ώρες , Δεξαμεθαζόνη 1 μ M (10⁻⁶ M) , για 8 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 6 ώρες με INF γ και στην συνέχεια επί άλλες 8 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη και στην συνέχεια επί άλλες 8 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν η κατασταλτική επίδραση της Αδρεναλίνης στην παραγωγή H₂O₂ θα μειώσει την παραγωγή H₂O₂ από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα στα οποία χορηγήθηκαν χαμηλές δόσεις Δεξαμεθαζόνης (10⁻⁶ M) για μικρό χρονικό διάστημα (8 ώρες) . Στην πειραματική ομάδα # 20 έχει ήδη διαπιστωθεί ότι η αδρεναλίνη δεν έχει αυτή την επίδραση στα περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν με δεξαμεθαζόνη .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.283 \pm 0.167

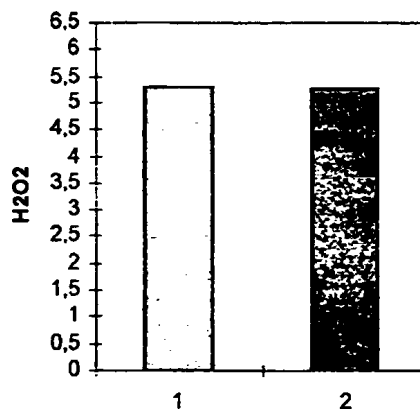
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 5.275 \pm 0.167

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 0.15 %

t-statistic : 0.122

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.904

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη για 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ και Δεξαμεθαζόνη δεν προκάλεσε μεταβολή στην παραγωγή H₂O₂ . Διαπιστώθηκε ότι η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 5.283 μ M και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 5.275 μ M , δηλαδή υπήρξε μια ελάχιστη μείωση της παραγωγής H₂O₂ που ήταν της τάξης του 0.15 % . Αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P = 0.904) . Άρα η αδρεναλίνη δεν επηρέασε την παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν με INF γ και χαμηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης . Το αποτέλεσμα αυτό αντιτίθεται με την θεωρία ότι η αδρεναλίνη δρα άμεσα στην έκφραση γονιδίων , μέσω ενεργοποίησης του Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B (Muroi και Suzuki , 1994) .



Πειραματική ομάδα : # 28

Θέμα : Προκαταρκτικά πειράματα μέτρησης της παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από Ηπατικά μακροφάγα (Κύτταρα Kupffer) .

Τύπος κυττάρων : Κύτταρα Kupffer (ηπατικά μακροφάγα) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H_2O_2) .

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν τα κύτταρα Kupffer μπορούν να διεγερθούν για παραγωγή H_2O_2 . Για τον σκοπό αυτό εκτελέστηκαν πέντε σειρές προκαταρκτικών πειραμάτων , χρησιμοποιώντας την ενδοτοξίνη και άλλες πειραματικές ουσίες . Τα πειράματα που έγιναν για την ανίχνευση παραγωγής H_2O_2 από τα κύτταρα Kupffer θα παρουσιαστούν στην συνέχεια .

1η ΣΕΙΡΑ .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη ουσία εκτός από την ενδοτοξίνη .

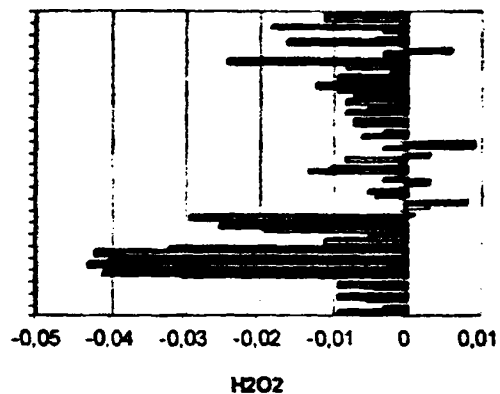
Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν με καλλιεργητικό υλικό επί 12 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν με LPS επί 12 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 5· **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Αποτελέσματα :

Από την γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων διαπιστώνουμε ότι στην πλειονότητα των φωτομετρικών μετρήσεων οι τιμές του H_2O_2 ήταν αρνητικές , δηλαδή μικρότερες του φωτομετρικού τυφλού . Οι τιμές είχαν μεγάλη διακύμανση , που ήταν παρόμοια για τους μάρτυρες και τα πειραματικά . Οι μέσες τιμές των μαρτύρων και των πειραματικών ήταν - 0.016 μM και -0.017 μM H_2O_2 αντίστοιχα . Η διαφορά αυτή είναι αμελητέα . Τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν ένδειξη ότι τα ηπατικά μακροφάγα δεν παρήγαγαν H_2O_2 μετά από την διέγερσή τους με την ενδοτοξίνη .



2η ΣΕΙΡΑ .

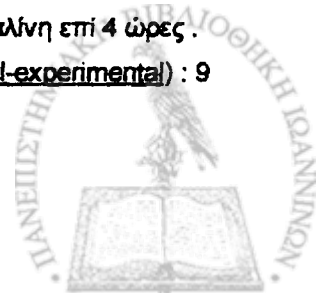
Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu g/ml$, για 4 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη $10^{-4} M$, για 4 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν με LPS επί 4 ώρες .

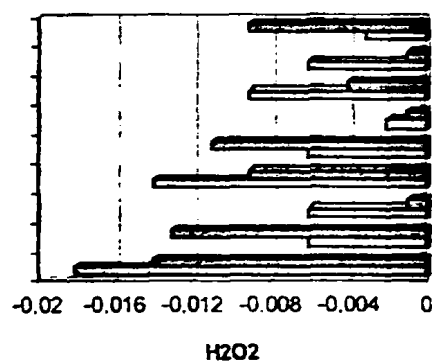
Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν με LPS + Αδρεναλίνη επί 4 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 9



Αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με ενδοτοξίνη και με αδρεναλίνη επί 4 ώρες δεν κατέδειξε την παρουσία παραγωγής H_2O_2 . Όλες οι φωτομετρικές μετρήσεις του H_2O_2 έδωσαν αρνητικές τιμές. Δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των πειραματικών. Οι μέσες τιμές που μας έδωσαν οι φωτομετρήσεις ήταν -0.007 και για τους μάρτυρες και τα πειραματικά. Υπάρχει μια υπόθεση ότι λόγω της θέσης τους στο ήπαρ τα κύτταρα Kupffer είναι σε κατάσταση μόνιμης "διέγερσης" και δεν παράγουν H_2O_2 λόγω της αυτοκρινικής κατασταλτικής επίδρασης της PGE_2 . Αυτός ο μηχανισμός είναι πιθανώς η εξήγηση για την έλλειψη ανίχνευσης παραγωγής Υπεροξειδίου του Υδρογόνου. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι τα κύτταρα Kupffer παράγουν μικρές ποσότητες H_2O_2 οι οποίες είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της φωτομετρικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

**3η ΣΕΙΡΑ .**

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) $2 \mu g/ml$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη $2 \times 10^{-5} M$, για 12 ώρες .

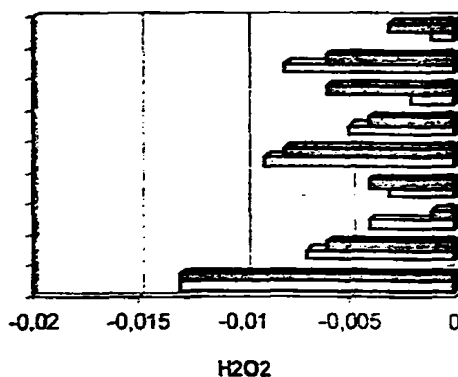
Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS επί 12 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS + Σεροτονίνη επί 12 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 9

Αποτελέσματα :

Όπως φαίνεται στο διπλανό σχήμα που αποτελεί την γραφική παράσταση της παραγωγής H_2O_2 , τα κύτταρα Kupffer δεν ανταποκρίθηκαν στην επώαση με ενδοτοξίνη και σεροτονίνη και δεν αύξησαν την παραγωγή του H_2O_2 σε μετρήσιμα επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, όλες οι μετρήσεις έδειξαν αρνητικές τιμές. Η μέση τιμή μαρτύρων και πειραματικών ήταν $-0.006 \mu M$. Δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των πειραματικών. Η επιλογή της Σεροτονίνης έγινε επειδή η ουσία αυτή προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 στα περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS. Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω ότι τα κύτταρα Kupffer ή δεν ενεργοποιούνται καθόλου για παραγωγή H_2O_2 ή ότι παράγουν ελάχιστες ποσότητες που δεν ανιχνεύονται από την παρούσα μέθοδο.



4η ΣΕΙΡΑ .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 1 μM (10^{-6} M) , για 14 ώρες .

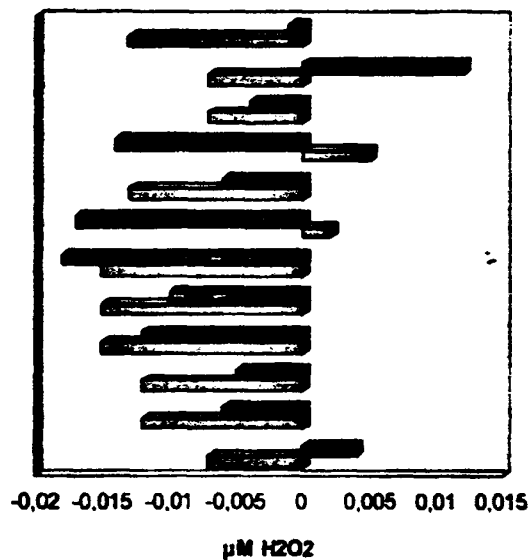
Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 12

Αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS και Ισταμίνη δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 . Σχεδόν όλες οι μετρήσεις που έγιναν έδωσαν αρνητικές τιμές και αποδεικνύουν ότι δεν υπήρξε καμία ανιχνεύσιμη έκκριση H_2O_2 από τα κύτταρα Kupffer . Δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ μαρτύρων και πειραματικών . Η επιλογή της Ισταμίνης έγινε επειδή έχει τεκμηριωθεί η ύπαρξη Ισταμινεργι-κών υποδοχέων διαφόρων τύπων στα μακροφάγα . Οι υποδοχείς αυτοί είναι γνωστό ότι επηρεάζουν πολλές οδούς Δεύτερων Μηνυτών .



5η ΣΕΙΡΑ .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5 x 10^{-6} M , για 12 ώρες .

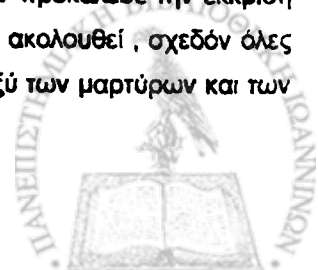
Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 12 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 12 ώρες με LPS + χαμηλή δοσολογία Δεξαμεθαζόνης (5 x 10^{-6} M) .

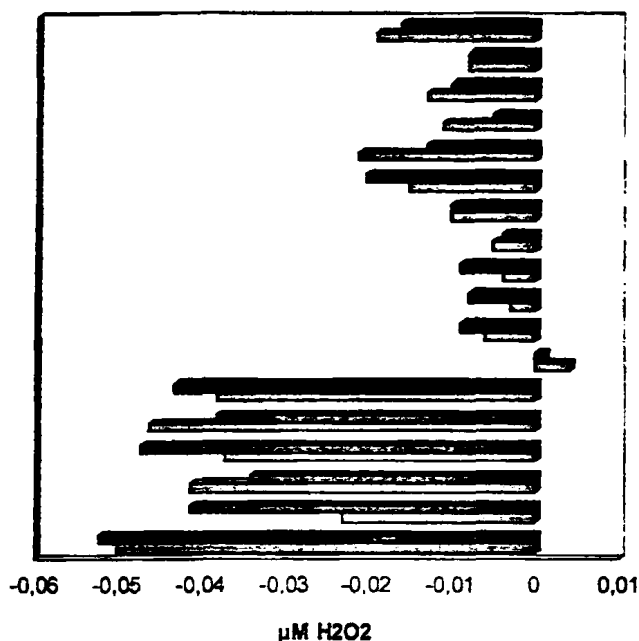
Αριθμός πειραμάτων : 3 Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 24

Αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS και χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης (ένας συνδυασμός ο οποίος προκαλούσε στα περιτοναϊκά μακροφάγα μεγάλη αύξηση της παραγωγής H_2O_2) δεν προκάλεσε την έκκριση ανιχνεύσιμων ποσοτήτων H_2O_2 . Όπως φαίνεται και στην γραφική παράσταση που ακολουθεί , σχεδόν όλες οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν αρνητικές και δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των



πειραματικών . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν $-0.016 \mu\text{M}$ και των πειραματικών ήταν $-0.018 \mu\text{M}$. Έτσι επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει μετρήσιμη παραγωγή H_2O_2 από τα κύτταρα Kupffer .



Στην διπλανή γραφική παράσταση , που είναι η απεικόνιση των αποτελεσμάτων της 5^{ης} σειράς πειραμάτων , φαίνεται ότι εκτός από μία μοναδική περίπτωση , όλες οι τιμές H_2O_2 ήταν πάλι αρνητικές και χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ μαρτύρων και πειραματικών .

Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων μας με τα κύτταρα Kupffer υποδεικνύουν ότι ίσως δεν υπάρχει παρουσία παραγωγής H_2O_2 κάτω από τις δικές μας πειραματικές συνθήκες . Ούτε και η χορήγηση ουσιών όπως η Ενδοτοξίνη , η Αδρεναλίνη , η Σεροτονίνη , η Ισταμίνη και η Δεξαμεθαζόνη φάνηκε να επιφέρει κάποιο αποτέλεσμα σχετικό με την παραγωγή H_2O_2 . Τα παραπάνω μπορούν να εξηγηθούν με το ότι τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ βρίσκονται σε κατάσταση «μόνιμης διέγερσης» και δεν παράγουν H_2O_2 λόγω κάποιας αυτοκρινικής επίδρασης ή ότι παράγουν μικρές ποσότητες που δεν μπορούν να ανιχνευτούν κάτω από τις δικές μας πειραματικές και μεθοδολογικές συνθήκες .

Πειραματική ομάδα : # 29

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με ενδοτοξίνη (LPS) επί 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί η επίδραση στην παραγωγή NO της επώασης των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS (ενδοτοξίνη) για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.036 \pm 0.004**

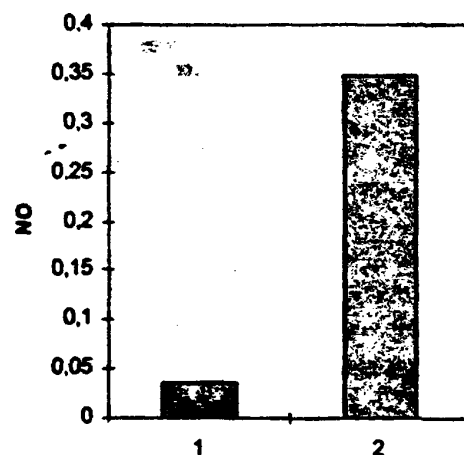
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.347 \pm 0.025**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 863.88 % .

t-statistic : -58.786

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : **P < 0.0001**



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η ενδοτοξίνη , όταν χορηγήθηκε στα περιτοναϊκά μακροφάγα επί 14 ώρες , προκάλεσε την πολύ μεγάλη αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.036 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.347 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 863.88 % . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη **P < 0.0001** , ήταν δηλαδή στατιστικώς πολύ σημαντική διαφορά .

Πειραματική ομάδα : # 30

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν με 250 μ /ml Ιντερφερόνης- γ για 5 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 5 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 5 ώρες με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 5 ώρες με 250 μ /ml INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 8

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ για 5 ώρες θα προκαλέσει κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.017 ± 0.004

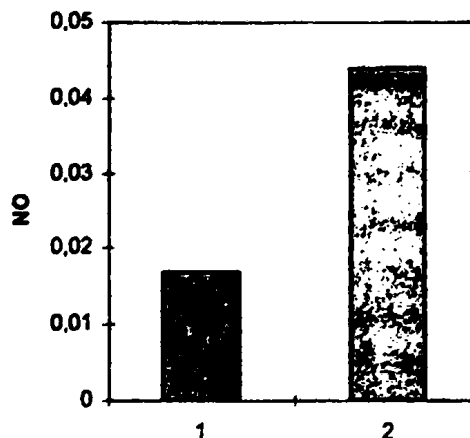
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.044 ± 0.007

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 158.82 % .

t-statistic : -9.425

Βαθμοί Ελευθερίας : 14

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 μ /ml INF γ προκάλεσε μεγάλη αύξηση της παραγωγής NO (κατά 158.82 %). Αναλυτικά, η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.017 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.044 mM. Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική με δείκτη $P < 0.001$. Η αύξηση της παραγωγής NO είναι αναμενόμενη (Stuehr και Marletta, 1987) και αποδεικνύει ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων και για την μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου ήταν αποτελεσματική. Στην αντίθετη περίπτωση δεν θα είχε παρατηρηθεί μεταβολή στην παραγωγή NO.

Πειραματική ομάδα : # 31

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν με 250 u/ml

↳ Ιντερφερόνης- γ για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 u/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 u/ml INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 46

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 u/ml INF γ για 14 ώρες θα οδηγούσε σε ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή NO ή εάν θα υπήρχε μείωση της παραγωγής NO (όπως συνέβη με το H₂O₂ στην πειραματική ομάδα # 3) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.010 \pm 0.004

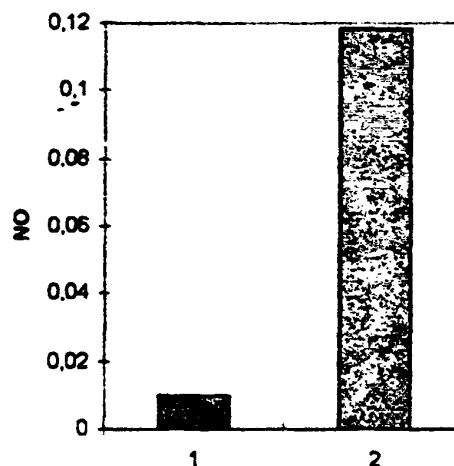
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.118 \pm 0.026

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 1080 % .

t-statistic : -27.661

Βαθμοί Ελευθερίας : 90

P value : P < 0.0001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ προκάλεσε ιδιαίτερα σημαντική αύξηση της παραγωγής NO από τα κύτταρα αυτά . Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.010 mM και των πειραματικών ήταν 0.118 mM , δηλαδή υπήρξε αύξηση της τάξης του 1080 % με δείκτη P < 0.0001 . Η μεταβολή αυτή είναι σύμφωνη με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών σε παρόμοια πειράματα (Stuehr και Marletta, 1987 , Marletta και συν., 1988) . Πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση της INF γ στην παραγωγή NO είναι διαφορετική από την επίδρασή της στην παραγωγή H₂O₂ στον ίδιο τύπο κυττάρων κατά τον ίδιο χρόνο επώασης (14 ώρες) , αφού στο Υπεροξειδίου του Υδρογόνου υπήρξε σημαντική μείωση της παραγωγής του μετά από επώαση 14 ωρών , ενώ με το Νιτρικό Οξείδιο παρατηρείται μεγάλη αύξηση . Η διαφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στους διαφορετικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την παραγωγή τους . Συγκεκριμένα για την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου φαίνεται ότι τον κυριότερο ρόλο διαδραματίζουν οι Κινάσες Τυροσίνης που διεγείρουν τον παράγοντα NF κ B , ο οποίος με την σειρά του προκαλεί την μεταγραφή του γονιδίου iNOS που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή NO (Wu και Thiemeermann, 1996 , Barnes και Karin, 1997) , ενώ η PKC που είναι το κυρίως υπεύθυνο ένζυμο για την παραγωγή του H₂O₂ έχει μια σχετικά μικρή συμβολή στην παραγωγή του NO (Li και συν., 1996 , Jun και συν., 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 32

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη και Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διέγερτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν η επώαση των ενεργοποιημένων με LPS περιτοναϊκών μακροφάγων με αδρεναλίνη επί 14 ώρες θα προκαλούσε μεταβολές στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.947 \pm 0.027**

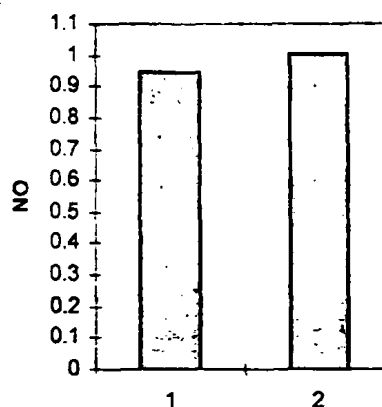
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **1.003 \pm 0.019**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 5.91 % .

t-statistic : -7.729

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 14 ώρες προκάλεσε μικρή αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.947 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 1.003 mM , δηλαδή υπήρξε μια αύξηση της τάξης του 5.91 % . Αυτή η αύξηση ήταν μεν μικρή αλλά επειδή οι Σταθερές Απόκλισεις ήταν επίσης μικρές και ο δείκτης P < 0.001 , η μεταβολή αυτή ήταν στατιστικά σημαντική . Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι ο συνδυασμός LPS + Αδρεναλίνης οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής NO . Η αδρεναλίνη συνήθως έχει κατασταλτικό ρόλο στα μακροφάγα , όπως δείχνουν προηγούμενα πειράματά μας . Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη (Mullet και συν., 1997) η οποία συσχετίζει την αύξηση του cAMP και την παραγωγή NO , μικρές αυξήσεις του cAMP προκαλούν επίταση της παραγωγής NO από ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα ANA-1 , ενώ οι μεγάλες αυξήσεις του cAMP καταστέλλουν την δραστηριότητα της iNOS . Δεν υπάρχουν εξηγήσεις για τον μηχανισμό που διέπει αυτά τα φαινόμενα , επειδή ακριβώς υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για αυτά . Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση ότι η μικρή αύξηση του cAMP φαίνεται να διεγείρει την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της iNOS , ενώ η μεγάλη αύξηση του cAMP φαίνεται ότι αναστέλλει την δραστηριότητα της iNOS , πιθανώς επειδή η PKA φωσφορυλιώνει και καταστέλλει την PKC , που με την σειρά της παύει να ενεργοποιεί τα μόρια της iNOS .



Πειραματική ομάδα : # 33

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με g/ml Ενδοτοξίνη και $2.5 \times 10^{-5} M$ Ντοπαμίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) $2 \mu g/ml$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη $2.5 \times 10^{-5} M$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 5 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 46

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη θα προκαλέσει κάποια μεταβολή στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.685 ± 0.111

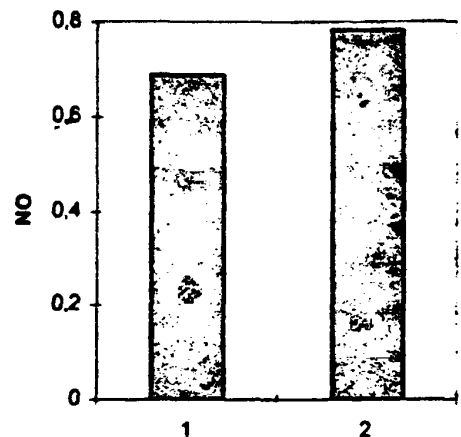
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.782 ± 0.112

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 14.16 % .

t-statistic : - 4.202

Βαθμοί Ελευθερίας : 90

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη προκαλούσε αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.685 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.782 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 14.16 % . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη $P < 0.001$ και συνεπώς ήταν στατιστικώς σημαντική . Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ντοπαμίνη προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής NO στα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα . Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με εκείνα της πειραματικής ομάδας # 32 , αφού η κατεχολαμίνη ντοπαμίνη έχει προκαλέσει αύξηση της παραγωγής NO , όπως και η αδρεναλίνη . Επίσης υπάρχει σημαντική παραλληλία με τα αποτελέσματα από μια άλλη μελέτη για την επίδραση της ντοπαμίνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Hasko και συν., 1996) , όπου προτάθηκε ότι στα ενεργοποιημένα μακροφάγα η διέγερση D1-υποδοχέων (που προκαλεί αύξηση του cAMP) συνδυάζεται με αύξηση της παραγωγής NO .



Πειραματική ομάδα : # 34

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 35

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη θα προκαλέσει κάποια μεταβολή στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.432 ± 0.027

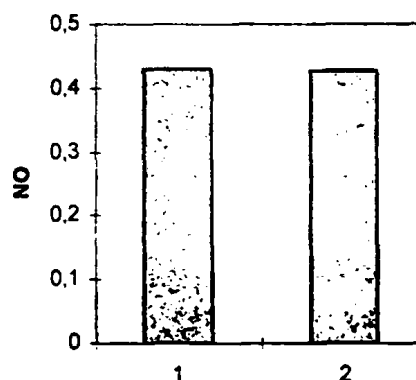
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.428 ± 0.038

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 0.92 %

t-statistic : 0.452

Βαθμοί Ελευθερίας : 68

P value : P = 0.653

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ινσουλίνη για 14 ώρες προκάλεσε ελάχιστη μείωση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.432 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.428 mM . Η διαφορά μεταξύ τους ήταν της τάξης του 0.92 % , δηλαδή ελάχιστη . Εκτός από την πάρα πολύ μικρή διαφορά , ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.653 , δηλαδή η διαφορά ήταν στατιστικά μη-σημαντική . Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ινσουλίνη δεν προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι το αναμενόμενο , αφού είναι γνωστές οι ισχυρές επιδράσεις που έχει η ινσουλίνη σε δραστηριότητες όπως η φαγοκυττάρωση , η ADCC και η παραγωγή TNF α (Muschel και συν., 1977 , Bag και συν., 1977 , Bermudez και συν., 1990) . Η ύπαρξη επιδράσεων στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου θα ήταν αναμενόμενη και για έναν ακόμα λόγο , την κοινή οδό μεταγωγής μηνύματος : Η Ινσουλίνη δρα μέσω των Κινασών της Tyrosίνης και επίσης η επαγωγή της έκφρασης της iNOS γίνεται μέσω των Κινασών της Tyrosίνης .



Πειραματική ομάδα : # 35

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από Περιτοναϊκά Μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ενδοτοξίνης + 10^{-7} M Γλυκαγόνης .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 5 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 43

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνη επί 14 ώρες προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.478 ± 0.028

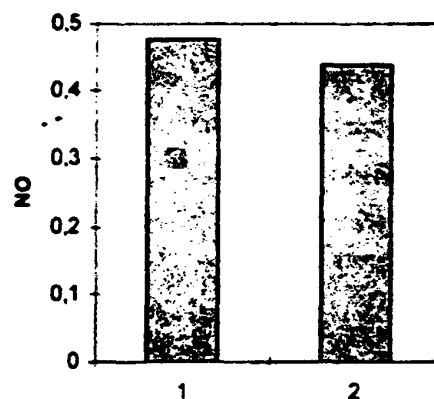
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.438 ± 0.041

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 8.36 % .

t-statistic : 5.314

Βαθμοί Ελευθερίας : 84

P value : $P < 0.001$.

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη προκάλεσε μικρή μείωση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα υπήρξε μια μείωση της τάξης του 8.36 % . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.478 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.438 mM . Η διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν μικρή , αλλά ο δείκτης P είχε τιμή < 0.001 . Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η επώαση με LPS + Γλυκαγόνη προκαλεί μείωση της παραγωγής NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Η γλυκαγόνη δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα να παρουσιάζει επιδράσεις στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα . Η γλυκαγόνη προκάλεσε επίσης την αυξημένη παραγωγή H_2O_2 στην πειραματική ομάδα # 9 . Αν και έχουν ανιχνευθεί ειδικοί υποδοχείς για την Γλυκαγόνη στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα , οι ελάχιστες μελέτες που έχουν γίνει δεν διευκρίνισαν σε ποια οδό μεταγωγής μηνύματος συνδέονται αυτοί οι υποδοχείς , ούτε έδειξαν να προκαλεί η γλυκαγόνη βιολογικές επιδράσεις στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα (Smith και συν., 1980 , Bernudez και συν., 1990) . Αν η χορήγηση Γλυκαγόνης προκαλεί διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης των μακροφάγων θα πρέπει να σημειώνεται μια πολύ μεγάλη αύξηση των επιπέδων cAMP ώστε να οδηγή στην καταστολή της παραγωγής NO , αλλά αυτό θα σήμαινε ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής H_2O_2 στην ομάδα # 9 . Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η Γλυκαγόνη δρα στα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα μέσω άλλης Οδού Μεταγωγής Μηνυμάτων .



Πειραματική ομάδα : # 36

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 µg/ml LPS + 1.25 µg/ml Νευροπεπτιδίου Υ .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 µg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτιδίο Υ (NPY) 1.25 µg/ml , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS + NPY για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 4 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 33

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων για 14 ώρες με LPS + NPY θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή του NO . Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη υποδοχέων για το Νευροπεπτιδίο Υ στην επιφάνεια των μακροφάγων .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.424 ± 0.089

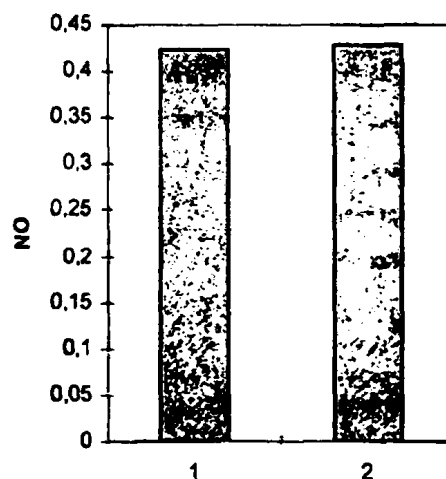
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.429 ± 0.086

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 1.17 % .

t-statistic : - 0.252

Βαθμοί Ελευθερίας : 64

P value : P = 0.802 (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + NPY προκάλεσε πολύ μικρή αύξηση της παραγωγής NO , η οποία ήταν της τάξης του 1.17 % . Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.424 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.429 mM . Εκτός από την πολύ μικρή διαφορά τους , ο δείκτης P είχε πολύ μεγάλη τιμή (P = 0.802) και για τους λόγους αυτούς η μεταβολή της παραγωγής NO θεωρείται ανύπαρκτη . Έτσι προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + NPY δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην παραγωγή NO , το οποίο ήταν και αναμενόμενο από την βιβλιογραφία .

Πειραματική ομάδα : # 37

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από Περιτοναϊκά Μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη και χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης (5×10^{-6} M) .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργειας : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-6} M (Χαμηλή Δοσολογία) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης (5×10^{-6} M) θα έχει επίδραση στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.468 \pm 0.031**

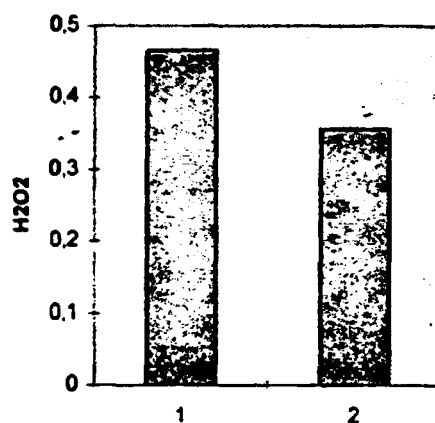
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.358 \pm 0.023**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 23.50 % .

t-statistic : 14.071

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση με LPS + χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης προκαλεί μια σημαντική μείωση της παραγωγής NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.468 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.358 mM . Η μείωση της παραγωγής NO ήταν της τάξης του 23.50 % και ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Έτσι φαίνεται από τα παραπάνω ότι η επώαση με LPS + χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης προκαλεί καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , δηλαδή την ανάποδη επίδραση από αυτή που είχε στην παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (όπως παρατηρήθηκε στην πειραματική ομάδα # 12) . Είναι πιθανό ότι το αποτέλεσμα που διαπιστώθηκε οφειλόταν στον μεγάλο χρόνο επώασης των 14 ωρών , αφού υπάρχουν δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν ότι η επώαση με χαμηλές δόσεις Δεξαμεθαζόνης για μικρό χρονικό διάστημα προκαλεί την αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , μέσω της εκλεκτικής επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που διαθέτουν «Positive Glucocorticoid Responsive Elements» στον προαγωγέα τους (Broug-Holub και Kraal , 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 38

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 22

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί αν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων για 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη έχει επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.354 ± 0.043

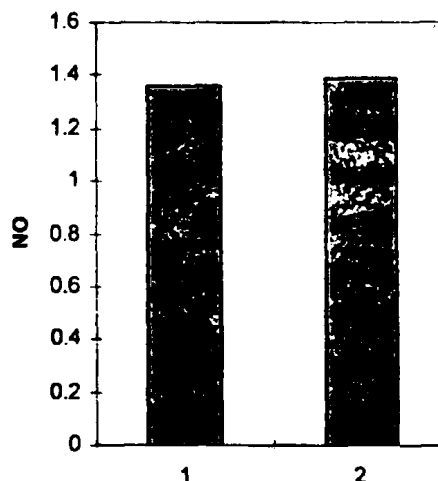
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.385 ± 0.034

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 2.28 %

t-statistic : -2.707

Βαθμοί Ελευθερίας : 42

P value : $P < 0.01$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων για 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη προκάλεσε μικρή αύξηση της παραγωγής NO . Η αύξηση της παραγωγής ήταν μόλις 2.28 % αλλά η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.01 . Συγκεκριμένα οι μέσες τιμές των μαρτύρων και πειραματικών ήταν αντίστοιχα 1.354 mM και 1.385 mM . Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η επώαση με LPS + Σεροτονίνη οδηγεί σε μικρή αύξηση της παραγωγής NO . Δεν υπάρχουν ανάλογα πειράματα στην διεθνή βιβλιογραφία , με μελέτη Νιτρικού Οξειδίου μετά από επώαση με LPS + Σεροτονίνη . Ορισμένες από τις δημοσιεύσεις δείχνουν είτε αδράνεια ή μια τάση της Σεροτονίνης να καταστείλει τις λειτουργίες των ενεργοποιημένων με INF- γ μακροφάγων (Koff και Dunegan, 1986 , Sternberg και συν., 1986) ενώ μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η σεροτονίνη επηρέαζε την φαγοκυττάρωση σωματιδίων latex ανάλογα με τον βαθμό ενεργοποίησης των μακροφάγων : με χαμηλές δόσεις INF γ η σεροτονίνη δρούσε ευοδωτικά , ενώ με υψηλές δόσεις INF γ δρούσε κατασταλτικά (Sternberg και συν., 1987) . Όμως η δόση 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες είναι υψηλή και θα αναμέναμε καταστολή της παραγωγής NO , αν λειτουργούσαν και εδώ οι ίδιοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί . Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η σύνδεση της σεροτονίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα με 5-HT $_{2c}$ υποδοχείς προκαλεί την διέγερση της PLC και την παραγωγή NO μέσω Ca^{+2} και DAG , δηλαδή μέσω ουσιών που συμμετέχουν στην άμεση διέγερση της iNOS από την PKC .



Πειραματική ομάδα : # 39

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεύρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 2×10^{-6} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 23

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί αν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη (2×10^{-6} M) προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.132 ± 0.044

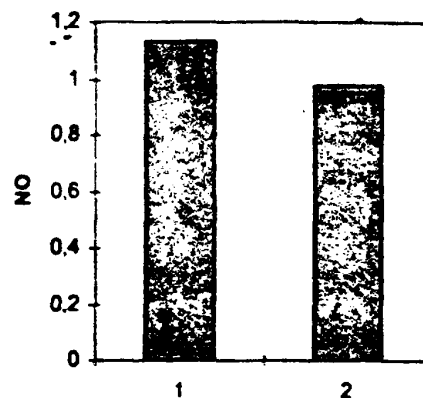
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.978 ± 0.037

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 13.60 % .

t-statistic : 12.950

Βαθμοί Ελευθερίας : 44

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη προκάλεσε την μείωση της παραγωγής NO κατά 13.60 % . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 1.132 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.978 mM . Η διαφορά τους ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι ο συνδυασμός LPS + Ισταμίνη προκαλεί σημαντική καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Το εύρημα αυτό δεν είναι δυνατό να ελεγχθεί με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης . Η σύνδεση της Ισταμίνης με H1-υποδοχείς θα οδηγούσε σε διέγερση της PLC , αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} και DAG , διέγερση της PKC και συνεπώς φωσφορύλιωση και ενεργοποίηση της iNOS . Η μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στην περίπτωση αυτή θα μπορούσε να έχει επιτευχθεί μέσω H2-υποδοχέων , όμως μετά την ωρίμαση του μονοκυττάρου σε μακροφάγο παύει να φέρει λειτουργικούς H2-υποδοχείς (Gespaich και συν., 1985 , Mirossay και συν., 1994) . Εξάλλου παρατηρήθηκε στις προηγούμενες πειραματικές ομάδες (# 32 , # 33) ότι ουσίες που προκαλούσαν αύξηση του cAMP οδηγούσαν σε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και όχι σε μείωση .



Πειραματική ομάδα : # 40

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη και Προσταγλανδίνη PGE₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGE₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + PGE₂ θα προκαλέσει κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Ο συνήθης ρόλος της PGE₂ είναι κατασταλτικός και οφείλεται στην διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του cAMP . Όμως στις πειραματικές ομάδες # 32 και # 33 διαπιστώθηκε ότι οι κατεχολαμίνες Αδρεναλίνη και Ντοπαμίνη , οι οποίες επίσης προκαλούν διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξηση του cAMP , προκάλεσαν μια σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.386 ± 0.030**

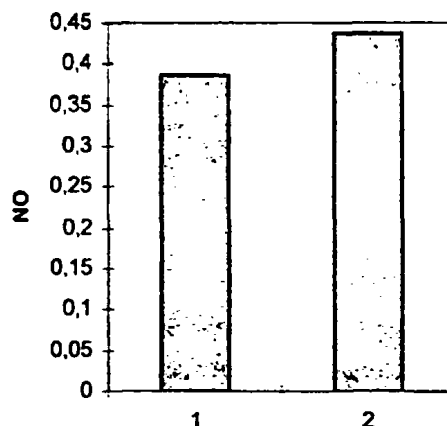
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.438 ± 0.035**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 13.47 %

t-statistic : -4.967

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P < 0.001 . (Στατιστικώς σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων για 14 ώρες με LPS + PGE₂ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.386 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.438 mM , δηλαδή η αύξηση ήταν της τάξης του 13.47 % . Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική με δείκτη P < 0.001 . Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + PGE₂ προκαλεί την αύξηση της παραγωγής NO μέσω της αύξησης του κυτταρικού cAMP . Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραματικών ομάδων (# 32 , # 33) η επίδραση αυτή φαίνεται να είναι κοινή για όλες τις ουσίες που προκαλούν αύξηση του cAMP . Υπάρχουν και αντίθετες απόψεις στην διεθνή βιβλιογραφία (Radassi και συν., 1993 , Mullet και συν., 1997) που διαπιστώνουν ότι η μικρή ή μέτρια αύξηση του cAMP επάγει την iNOS και έτσι προκαλεί την αυξημένη παραγωγή NO , ενώ η υπέρμετρη αύξηση του cAMP οδηγεί στην καταστολή της λειτουργίας της iNOS και στην μείωση της παραγωγής NO .



Πειραματική ομάδα : # 41

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με ενδοτοξίνη και PGD₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGD₂ 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + PGD₂ θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.454 ± 0.046

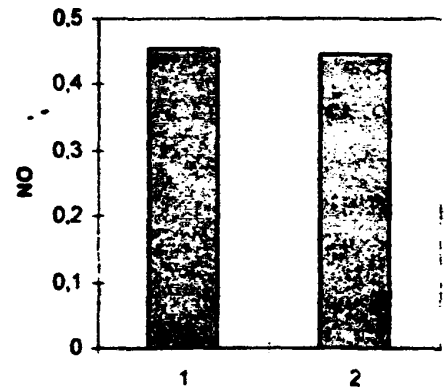
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.447 ± 0.041

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 1.54 % .

t-statistic : 0.540

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.592 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + PGD₂ προκάλεσε μια πολύ μικρή μείωση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα οι μέσες τιμές των μαρτύρων και πειραματικών ήταν αντίστοιχα 0.454 mM και 0.447 mM , δηλαδή η μεταβολή ήταν της τάξης του 1.54 % . Εκτός από το πολύ μικρό μέγεθος της μεταβολής και ο δείκτης P είχε μεγάλη τιμή (P = 0.592) , στοιχεία τα οποία συνηγορούν στην μη-ύπαρξη πραγματικής μεταβολής στην παραγωγή NO . Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η PGD₂ δεν προκαλεί καμία απολύτως μεταβολή στην παραγωγή NO , αποτέλεσμα που ήταν και αναμενόμενο .

Πειραματική ομάδα : # 42

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί αν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 μ ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης θα προκαλούσε μεταβολή στην παραγωγή του NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.663 ± 0.027

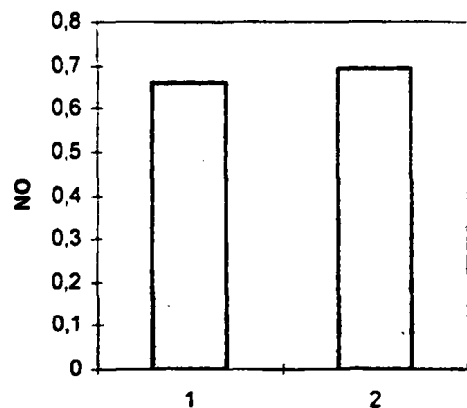
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.694 ± 0.017

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 4.67 %

t-statistic : -4.612

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη προκάλεσε μια μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.663 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.694 mM , κατά συνέπεια η αύξηση ήταν της τάξης του 4.67 % . Η μικρή αυτή αύξηση ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Από αυτά τα στοιχεία είναι εμφανές ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO , η οποία πιθανώς οφείλεται στην αύξηση του κυτταροπλασματικού cAMP . Σε προηγούμενα πειράματα (πειραματική ομάδα # 32) διαπιστώθηκε ότι η επώαση με ενδοτοξίνη και αδρεναλίνη προκαλεί την αύξηση της παραγωγής NO και σε άλλα πειράματα έγινε αντιληπτό ότι γενικά οι ουσίες που αυξάνουν το Κυκλικό AMP προκαλούν αύξηση της παραγωγής NO (πειραματικές ομάδες # 33 και # 40) . Αυτά τα στοιχεία έρχονται σε αντίθεση με αποτελέσματα άλλων ερευνητών (Koff και Dunegan, 1985 , Koff και Dunegan, 1986 , Bermudez και συν., 1990) που έδειξαν ότι η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη , στις δόσεις όπου προκαλούν την αύξηση του κυτταροπλασματικού cAMP μειώνουν την ικανότητα των ενεργοποιημένων μακροφάγων να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή μυκοβακτηρίδια . Φαίνεται λοιπόν ότι οι μηχανισμοί που καταστέλλονται από την αύξηση του cAMP (δηλαδή η παραγωγή O_2^{-1} , H_2O_2 και οι άλλοι Οξειδωτικοί Μηχανισμοί) είναι πιο σημαντικοί για την κυτταροτοξική δραστηριότητα των μακροφάγων από ότι η παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .



Πειραματική ομάδα : # 43

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 6 ώρες με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF- γ) 250 μ /ml , για 6 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 6 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 14

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 μ /ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης επί 6 ώρες , έχει κάποια επίδραση στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.324 \pm 0.024**

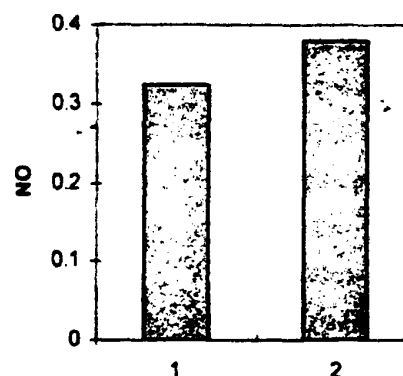
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.379 \pm 0.014**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 16.97 % .

t-statistic : - 7.334

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.324 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.379 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 16.97 % . Η μεταβολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Τα αποτελέσματα αυτά ευρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που μας έδωσαν προηγούμενες πειραματικές ομάδες , όπου επίσης διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με ουσίες που αυξάνουν το cAMP προκαλεί αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Όμως τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 42 και # 43 έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 19 , όπου διαπιστώθηκε ότι η επώαση των μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη προκαλούσε την καταστολή της παραγωγής H₂O₂ . Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την ασυμφωνία είναι ότι η παραγωγή H₂O₂ και NO ελέγχονται από διαφορετικές οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων , με αποτέλεσμα η αδρεναλίνη να προκαλεί διαφορετικές επιδράσεις . Μια τέτοια δράση θα μπορούσε να ασκηθεί από την Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση (PKA) , η οποία καταστέλλει την δραστηριότητα της PKC μέσω αναστολής των Διαύλων Ca⁺² , ενώ μπορεί επίσης να αυξήσει την έκφραση της iNOS ή να επιτείνει την δραστηριότητα της iNOS φωσφορυλιώνοντάς την στις ειδικές θέσεις Σερίνης που διαθέτει .



Πειραματική ομάδα : # 44

Θέμα : Μέτρηση παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν αρχικά με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με Ιντερφερόνη- γ και Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 μ l/ml , αρχικά για 6 ώρες και στην συνέχεια για άλλες 8 ώρες (δηλαδή συνολικά για 14 ώρες) .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες , Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M , για 8 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν αρχικά με INF γ επί 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη επί άλλες 8 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη επί 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη επί 8 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν η επώαση επί 6 ώρες των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη προκαλεί κάποια μεταβολή στην ικανότητα των κυττάρων να παράγουν NO μετά από μια δεύτερη επώαση με INF γ + Δεξαμεθαζόνη . Εξαιτίας της γενικότερης ευοδωτικής επίδρασης της αδρεναλίνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (την οποία διαπιστώσαμε στις πειραματικές ομάδες # 32 , # 42 και # 43) είναι πιθανό ότι στην ομάδα των πειραματικών θα διαπιστωθεί κάποια αύξηση στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.748 ± 0.145

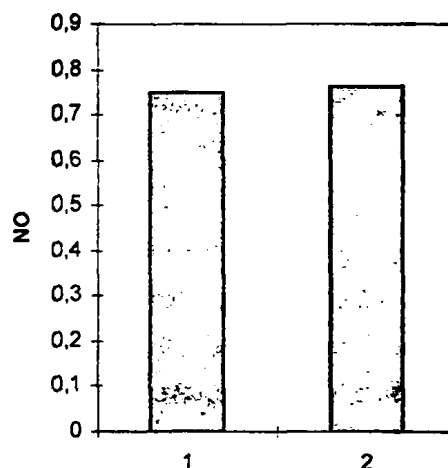
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.763 ± 0.112

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 2.01 %

t-statistic : -0.2950

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.771 (Στατιστικά Μη-σημαντική διαφορά) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει σημαντικά την κατασταλτική επίδραση της Δεξαμεθαζόνης επί της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Οι ομάδες μαρτύρων και πειραματικών παρουσίασαν μια μεταβολή της τάξης του 2.01 % , η οποία δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική (P = 0.771) . Αναλυτικά , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.748 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.763 mM . Τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι η αρχική επώαση των κυττάρων της ομάδας των μαρτύρων με INF γ + Αδρεναλίνη δεν επηρέασε καθόλου την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .



Πειραματική ομάδα : # 45

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα μετά από επώαση 14 ωρών με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διευέρτης : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (Vit.D3) 2.5×10^{-7} M , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την Vit.D3 .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με καλλιεργητικό υγρό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Vit.D3 .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2.5×10^{-7} M Vit.D3 θα προκαλούσε μεταβολή στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου . Στην πειραματική ομάδα # 22 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με Vit.D3 προκαλούσε καταστολή της παραγωγής H_2O_2 και είναι πιθανό ότι μπορεί να υπάρχει επίδραση και στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.612 ± 0.037

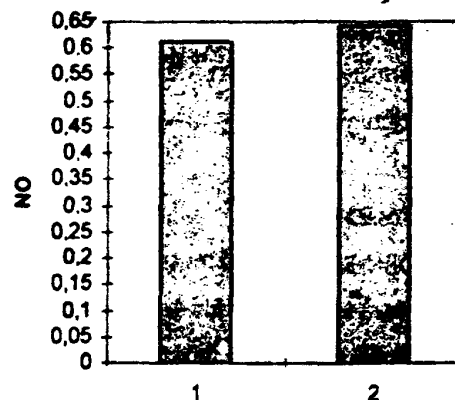
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.641 ± 0.035

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 4.73 % .

t-statistic : -2.211

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : $P < 0.05$ (συγκεκριμένα $P = 0.035$) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2.5×10^{-7} M Vit.D3 προκάλεσε μια μικρή αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , η οποία όμως ήταν Στατιστικώς Σημαντική . Αναλυτικά η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.612 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.641 mM NO , δηλαδή παρατηρήθηκε μία αύξηση της τάξης του 4.73 % . Αυτή η μεταβολή ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.05$. Είναι πολύ πιθανό ότι εάν παρατεινόταν το διάστημα επώασης των μακροφάγων με την Vit.D3 μπορεί να παρουσιαζόταν ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Η Vit.D3 συνδέεται με έναν ειδικό κυτταροπλασματικό υποδοχέα και μεταφέρεται στον πυρήνα , όπου προκαλεί απευθείας την έκφραση ορισμένων γονιδίων . Ενδεχομένως και το γονίδιο της iNOS να αποτελεί έναν από τους στόχους της Vit.D3 .

Πειραματική ομάδα : # 46

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με ενδοτοξίνη και 1,25-Διϋδρόξυ Βιταμίνη D3 .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (Vit.D3) 2.5×10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS επί 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS + Vit.D3 επί 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με $2\mu\text{g/ml}$ LPS + 2.5×10^{-7} M Vit.D3 για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή NO . Στην πειραματική ομάδα # 23 είχε διαπιστωθεί ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με ενδοτοξίνη + Vit.D3 για 14 ώρες δεν προκαλούσε κάποια επίδραση στην παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου . Είναι πιθανό ότι δεν θα παρατηρηθεί κάποια επίδραση ούτε στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.536 ± 0.018

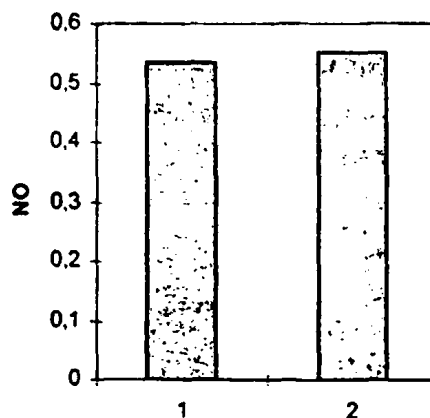
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.554 ± 0.035

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 3.35 % .

t-statistic : -2.151

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : $P < 0.05$ ($P = 0.037$) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Vit.D3 προκάλεσε μια μικρή αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η αύξηση της παραγωγής του NO ήταν της τάξης του 3.35 % , η οποία όμως ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.05$. Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.536 mM και των πειραματικών ήταν 0.554 mM . Αυτή η πολύ μικρή αύξηση δείχνει ότι η Vit.D3 έχει ευοδωτική επίδραση στην παραγωγή NO . Είναι πιθανό ότι η επίδραση αυτή οφείλεται στην άμεση επίδραση της Vit.D3 στην έκφραση γονιδίων .



Πειραματική ομάδα : # 47

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (ενδοτοξίνη) επί 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεύρτις : 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (ενδοτοξίνη) , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS για 14 ώρες θα προκαλούσε την αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , όπως ακριβώς προκάλεσε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα (βλέπε πειραματική ομάδα # 29) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.062 ± 0.008

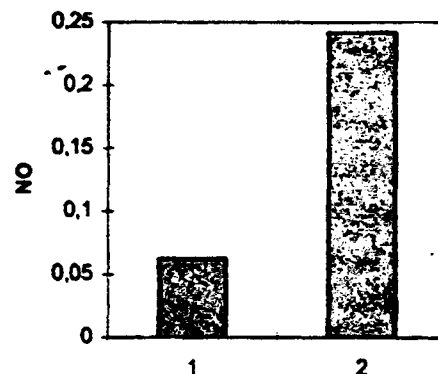
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.242 ± 0.014

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 290.32 % .

t-statistic : -61.735

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : $P < 0.0001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS για 14 ώρες προκάλεσε μια εντυπωσιακή αύξηση της παραγωγής NO . Συγκεκριμένα , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.062 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.242 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 290.32 % . Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.0001$. Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS προκαλεί αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Αυτά τα αποτελέσματα είναι εν μέρει αναμενόμενα , αφού και άλλοι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι τα μακροφάγα αυτά είναι ικανά να παράγουν Νιτρικό Οξείδιο μετά από έκθεση σε παράγοντες όπως ο αμιάντος και οι πολύ χαμηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών (Thomas και συν., 1994 , Broug-Holub και Kraal, 1996) .

Πειραματική ομάδα : # 48

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 units/ml Ιντερφερόνης- γ .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 μ /ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 33

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων για 14 ώρες με 250 μ /ml INF γ θα προκαλούσε την αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , όπως προκάλεσε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα (βλέπε πειραματική ομάδα # 31) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.090 ± 0.010

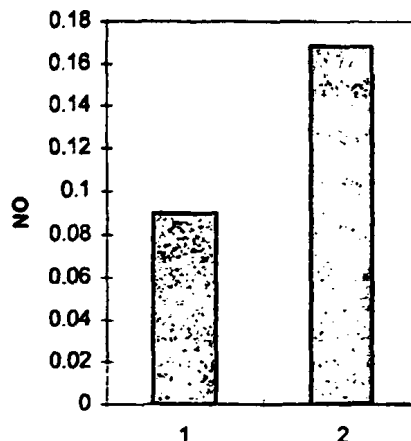
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.169 ± 0.011

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 87.77 % .

t-statistic : -29.136

Βαθμοί Ελευθερίας : 64

P value : $P < 0.0001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 μ /ml INF γ για διάστημα 14 ωρών προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO κατά 87.77 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.090 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.169 mM . Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.0001$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η INF γ προκαλεί έντονη αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με την γενικότερη διαπίστωση ότι η INF- γ προκαλεί την παραγωγή NO σε πολλά άλλα είδη μονοκύτταρων φαγοκυττάρων (Stuehr και Marletta, 1987 , Iyengar και συν., 1987 , Marletta και συν., 1988) .



Πειραματική ομάδα : # 49

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ Ενδοτοξίνη + 10^{-4} M Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια θα ήταν η επίδραση της επώασσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.425 ± 0.016

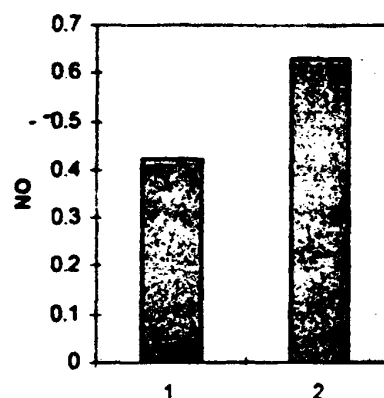
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.630 ± 0.018

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 48.23 % .

t-statistic : -29.932

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε αύξηση κατά 48.23 % , αφού η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.425 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.630 mM . Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι η αδρεναλίνη προκαλεί αύξηση της παραγωγής NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , δηλαδή έχει την ίδια επίδραση που έχει και στα περιτοναϊκά μακροφάγα (βλέπε πειραματική ομάδα # 32) . Όμως είναι εμφανές ότι η επίδραση στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι πολύ ισχυρότερη από ότι στα περιτοναϊκά κύτταρα (αύξηση κατά 48.23 % και 5.91 % αντίστοιχα) . Στην βιβλιογραφία η αδρεναλίνη έχει συσχετιστεί με την καταστολή των αντιμικροβιακών και κυτταροτοξικών ιδιοτήτων των μακροφάγων (Koff και Dunegan, 1985 , Koff και Dunegan, 1986 , Bermudez και συν., 1990) . Από τα προηγούμενα πειράματά μας φαίνεται ότι η αύξηση του cAMP που προκαλεί η Αδρεναλίνη καταστέλλει τους οξειδωτικούς μηχανισμούς παραγωγής O_2^{-1} και H_2O_2 , που έχουν μεγάλη βαρύτητα για την κυτταροτοξική και αντιμικροβιακή δραστηριότητα των μακροφάγων .



Πειραματική ομάδα : # 50

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ Ενδοτοξίνη (LPS) και 2.5×10^{-5} M Ντοπαμίνη .

Τύπος κυτάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεύρτις : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη 2.5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου προκαλεί η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2.5×10^{-5} M Ντοπαμίνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.426 ± 0.014

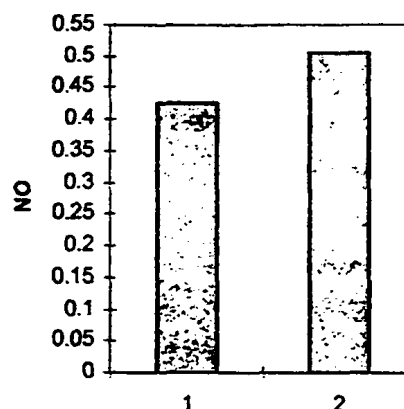
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.505 ± 0.018

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 18.54 % .

t-statistic : -12.183

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2.5×10^{-5} M Ντοπαμίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO κατά 18.54 % . Συγκεκριμένα , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.426 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.505 mM . Η μεταβολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική με δείκτη $P < 0.001$. Από τα παραπάνω είναι αντιληπτό ότι η ντοπαμίνη επιτείνει την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου στα ενεργοποιημένα με LPS βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Την ίδια ακριβώς επίδραση είχε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα , όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 33 .



Πειραματική ομάδα : # 51

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με Ενδοτοξίνη + Ινσουλίνη για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί αν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης προκαλεί κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.062 \pm 0.007**

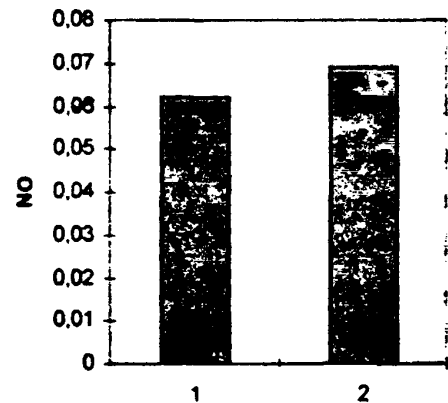
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.069 \pm 0.009**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.29 %

t-statistic : -1.941

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.065 (Στατιστικώς Μη-σημαντική μεταβολή) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης για 14 ώρες δεν προκαλεί Στατιστικώς Σημαντική αύξησης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.062 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.069 mM . Η αύξηση αυτή είναι της τάξης του 11.29 % , όμως λόγω των μεγάλων σταθερών αποκλίσεων (\pm 0.007 και \pm 0.009 αντίστοιχα) η διαφορά ήταν Στατιστικώς Μη-σημαντική (P = 0.065) , δηλαδή δεν υπήρχε κάποια πραγματική αύξηση της παραγωγής NO . Στην πειραματική ομάδα # 34 διαπιστώθηκε πως η Ινσουλίνη δεν επηρέασε την παραγωγή NO ούτε στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Αν και στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές ανακοινώσεις για την επίδραση της Ινσουλίνης σε διάφορες λειτουργίες των μακροφάγων , δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν τις επιδράσεις της Ινσουλίνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου ή άλλων Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου ή Οξυγόνου .

Πειραματική ομάδα : # 52

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν με Ενδοτοξίνη και Γλυκαγόνη για 14 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης για 14 ώρες προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.063 ± 0.005

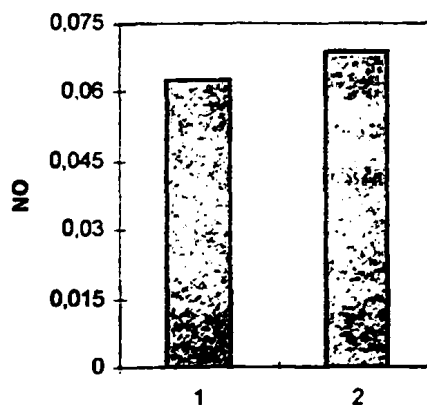
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.069 ± 0.008

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 9.52 % .

t-statistic : - 2.095

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.05$ (πιο συγκεκριμένα $P = 0.048$)

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης για 14 ώρες προκαλούσε μια μικρή αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Η αύξηση αυτή ήταν της τάξης του 9.52 % αλλά ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.05 (και πιο συγκεκριμένα $P = 0.048$) . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.063 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.069 mM . Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η Γλυκαγόνη προκαλεί επίταση της παραγωγής NO , ενώ αντιθέτως η Γλυκαγόνη προκάλεσε μείωση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα (όπως φάνηκε στην πειραματική ομάδα # 35) . Λόγω των ελάχιστων δημοσιεύσεων για επιδράσεις της Γλυκαγόνης στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα και τους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων που την διέπουν στα κύτταρα αυτά , δεν είναι δυνατό να δοθεί κάποια εξήγηση για τις διαφορετικές επιδράσεις στους δύο τύπους κυττάρων .

Πειραματική ομάδα : # 53

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Νευροπεπτίδιο Υ .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) 1.25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + NPY .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1.25 $\mu\text{g/ml}$ NPY για 14 ώρες θα προκαλούσε μεταβολή στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.046 \pm 0.011**

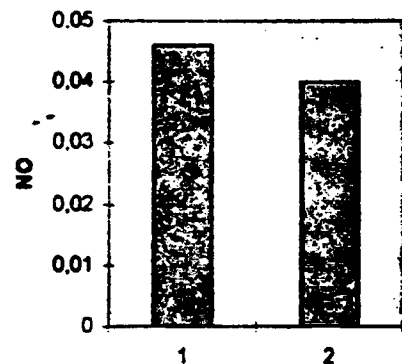
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.040 \pm 0.007**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 13.04 % .

t-statistic : 1.742

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.095 (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά)



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + NPY για 14 ώρες δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μεταβολή της παραγωγής NO . Ο δείκτης P είχε τιμή 0.095 . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.046 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.040 mM . Η μεταβολή ήταν της τάξης του 13.04 % , αλλά λόγω των μεγάλων σταθερών αποκλίσεων δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μια πραγματική ελάττωση της παραγωγής NO . Στην πειραματική ομάδα # 36 διαπιστώθηκε ότι το NPY δεν προκαλούσε μεταβολές στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου ούτε στα περιτοναϊκά μακροφάγα .



Πειραματική ομάδα : # 54

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα μετά από επώαση 14 ωρών με Ενδοτοξίνη και Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (5×10^{-5} M)

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-5} M (Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 5×10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα προκαλούσε στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η επώαση με Ενδοτοξίνη + Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.045 ± 0.011

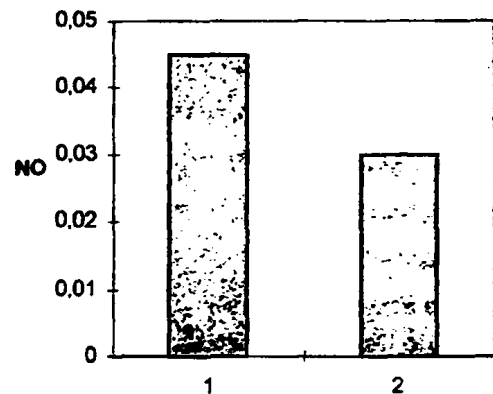
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.030 ± 0.005

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 33.33 % .

t-statistic : 4.154

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$.

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης για 14 ώρες προκάλεσε την μείωση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου κατά 33.33 % . Αυτή η μείωση ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Αναλυτικά , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.045 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.030 mM . Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η επώαση με LPS + 5×10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης προκαλεί μείωση της παραγωγής NO . Το αποτέλεσμα αυτό θεωρείται αναμενόμενο με βάση παρόμοιες βιβλιογραφικές αναφορές (Broug-Holub και Kraal, 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 55

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 44 ώρες με Ενδοτοξίνη + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη , Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS και Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου έχει η επώαση επί 14 ώρες των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) Δεξαμεθαζόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.056 ± 0.008

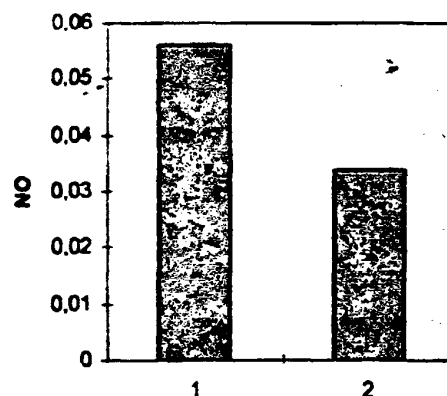
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.034 ± 0.005

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 39.28 % .

t-statistic : 10.232

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα , η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.056 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.034 mM , δηλαδή σημειώθηκε μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 39.28 % , με δείκτη $P < 0.001$. Η συμπεριφορά της παραγωγής NO είναι διαφορετική από εκείνη της παραγωγής H_2O_2 . Έτσι τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 11 και # 12 έδειξαν ότι οι χαμηλές δόσεις Δεξαμεθαζόνης προκαλούν αυξημένη παραγωγή H_2O_2 . Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντιφατικές απόψεις για τις επιδράσεις της Δεξαμεθαζόνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (Broug-Holub και Kraal , 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 56

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν με 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη 5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Σεροτονίνη για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.203 ± 0.010

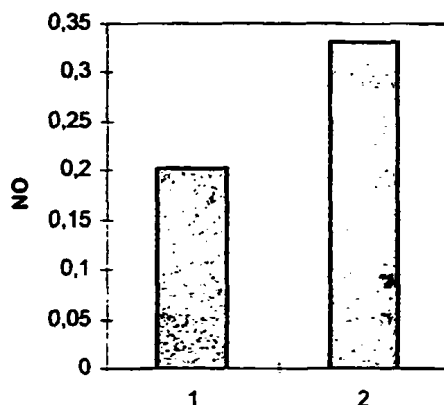
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.332 ± 0.023

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 63.54 % .

t-statistic : -17.600

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες προκαλούσε μια σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου ήταν της τάξης του 63.54 % , αφού η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.203 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.332 mM . Αυτή η μεταβολή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Στην πειραματική ομάδα # 38 διαπιστώθηκε ότι η Σεροτονίνη προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα όπως και στην πειραματική ομάδα # 13 διαπιστώθηκε ότι προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής H_2O_2 στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Δεν υπάρχουν δημοσιεύσεις για την επίδραση αυτής της βιοδραστικής αμίνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου ή άλλων Ελεύθερων Ριζών από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .



Πειραματική ομάδα : # 57

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 2×10^{-6} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2×10^{-6} M Ισταμίνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.203 ± 0.010

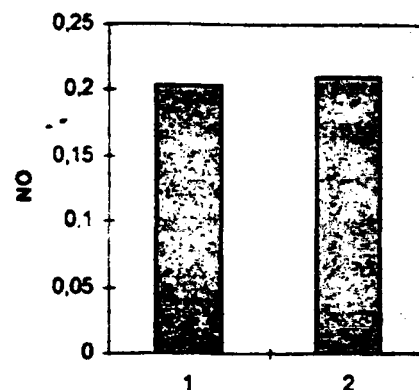
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.210 ± 0.010

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 3.44 % .

t-statistic : -1.841

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.079 (Στατιστικώς Μη-σημαντική μεταβολή)



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 57 έδειξαν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Ισταμίνη για 14 ώρες δεν προκάλεσαν κάποια πραγματική μεταβολή στην παραγωγή NO . Αυτό προκύπτει από το μικρό μέγεθος της μεταβολής που παρατηρήθηκε (μόλις 3.44 %) σε συνδυασμό με τον μεγάλο δείκτη P (συγκεκριμένα P = 0.079) . Οι μέσες τιμές των μαρτύρων και πειραματικών ήταν 0.203 mM και 0.210 mM αντίστοιχα . Στην πειραματική ομάδα # 39 η Ισταμίνη προκάλεσε μια σημαντική μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν επωαστεί με ενδοτοξίνη + Ισταμίνη για 14 ώρες . Από την διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται ότι η Ισταμίνη επιδρά στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και προκαλεί μια μεγάλη ποικιλία φαινομένων σε αυτά (Cluzel και συν.,1990 , Vignola και συν.,1994) .



Πειραματική ομάδα : # 58

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Προσταγλανδίνη PGD₂.

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη D₂ (PGD₂) 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS + PGD₂ για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 μg/ml LPS + 10⁻⁵ M PGD₂ .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.056 ± 0.006**

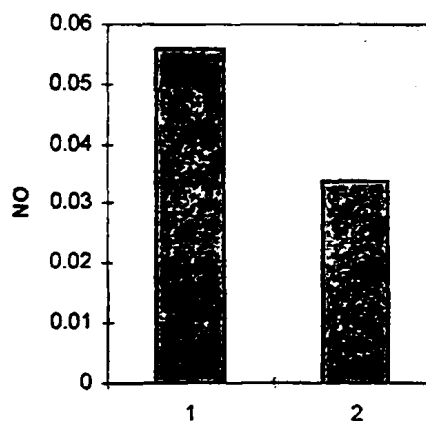
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.034 ± 0.005**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 39.28 % .

t-statistic : 10.487

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 58 ήταν τελείως μη-αναμενόμενα . Η επώαση για 14 ώρες των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ προκάλεσε σημαντική μείωση της παραγωγής NO . Πιο συγκεκριμένα , η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ προκάλεσε την μείωση της παραγωγής NO κατά 39.28 % , με δείκτη P < 0.001 . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.056 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.034 mM . Στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν έγινε δυνατό να καταδειχθεί σε προηγούμενα παρόμοια πειράματα με περιτοναϊκά μακροφάγα (πειραματικές ομάδες # 18 και # 41) . Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν ανευρέθησαν μελέτες όπου να αναφέρεται η ανταπόκριση των μακροφάγων στην PGD₂ , ούτε έχουν περιγραφεί ειδικοί υποδοχείς για την ουσία αυτή .



Πειραματική ομάδα : # 59

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2.5×10^{-7} M 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνης D₃ (Vit.D₃) .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : 1,25-Διυδροξυ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) 2.5×10^{-7} M , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την Vit.D₃ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Vit.D₃ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με Vit.D₃ θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή NO .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.053 ± 0.005

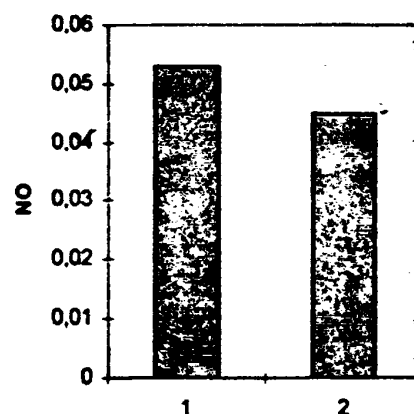
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.045 ± 0.006

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 15.09 %

t-statistic : 3.446

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : $P < 0.005$ ($P = 0.002$) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με Vit.D₃ για 14 ώρες προκάλεσε μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.053 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.045 mM , δηλαδή παρουσιάστηκε μια μείωση της τάξης του 15.09 % . Αυτή η μεταβολή ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή < 0.005 . Η μείωση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου που παρατηρήθηκε σε αυτό το πείραμα δεν παρατηρήθηκε σε προηγούμενο παρόμοιο πείραμα με περιτονικά μακροφάγα (# 45) , ούτε υπάρχουν στην βιβλιογραφία ανάλογες παρατηρήσεις .

Πειραματική ομάδα : # 60

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃.

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) $2,5 \times 10^{-7}$ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Vit.D₃ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 μg/ml LPS + $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.265 ± 0.025

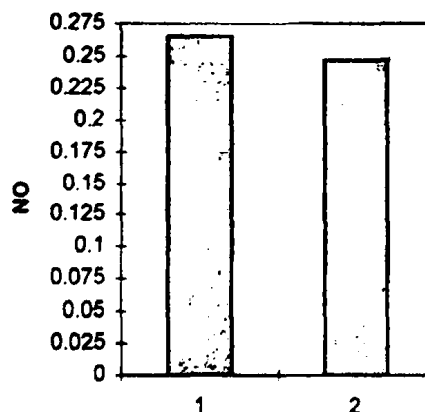
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.246 ± 0.020

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 7.17 %

t-statistic : 2.881

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : $P < 0.01$ (Συγκεκριμένα $P = 0.006$) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Vit.D₃ προκάλεσε την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 7.17 % . Παρά το σχετικά μικρό μέγεθος της μεταβολής αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.01$. Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.265 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.246 mM . Από τα στοιχεία αυτά είναι αντιληπτό ότι η επώαση με LPS + Vit.D₃ οδηγεί στην μείωση της παραγωγής NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, ενώ στην πειραματική ομάδα # 46 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με LPS και Vit.D₃ για το ίδιο χρονικό διάστημα προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για άλλες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της Vit.D₃ στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .



Πειραματική ομάδα : # 61

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 250 μ /ml Ιντερφερόνη- γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα θα προκαλούσε η επώασή τους με 250 μ /ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνη για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.498 \pm 0.051

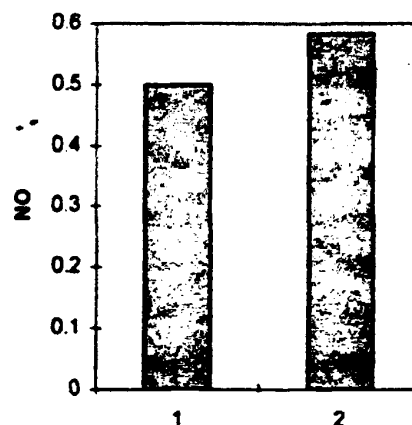
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.585 \pm 0.032

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 17.47 % .

t-statistic : -6.975

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη επί 14 ώρες οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής NO κατά 17.47 % και η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.498 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.585 mM . Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη προκαλεί αύξηση της παραγωγής NO , δηλαδή ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα που προκλήθηκε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στο ότι οι μικρές και μέτριες αυξήσεις του cAMP επάγουν την παραγωγή του NO . Αυτό καταδεικνύεται και από προηγούμενα πειράματα . Οι μεγάλες αυξήσεις του cAMP καταστέλλουν την δραστηριότητα της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου (Radassi και συν., 1993 , Mullet και συν., 1997) .



Πειραματική ομάδα : # 62

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με 250 μ /ml Ιντερφερόνη- γ + Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) Δεξαμεθαζόνης για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη , Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με INF γ για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποιά επίδραση θα προκαλούσε στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η επώαση με 250 μ /ml INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.234 \pm 0.014**

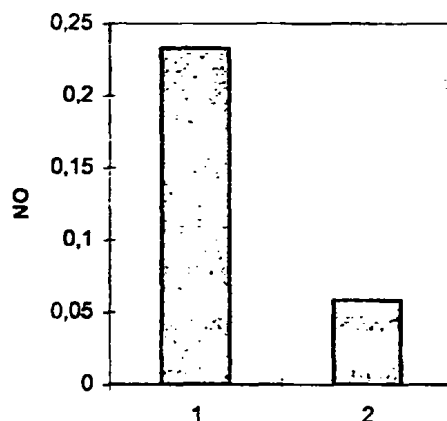
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.059 \pm 0.007**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 74.78 % .

t-statistic : 39.257

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P < 0.0001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης για 14 ώρες προκαλούσε σημαντική μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.234 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.059 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 74.78 % . Η μεταβολή αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική , με δείκτη P < 0.0001 . Επίσης στις πειραματικές ομάδες # 37 και # 55 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με Χαμηλές Δόσεις Δεξαμεθαζόνης προκαλούσε την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS . Η συμπεριφορά της παραγωγής NO είναι διαφορετική από την συμπεριφορά της παραγωγής H₂O₂ (πειραματικές ομάδες # 11 και # 12) . Οι απόψεις της βιβλιογραφίας για τον έλεγχο της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από την Δεξαμεθαζόνη είναι αντιφατικές (Broug-Holub και Kraal , 1996).



Πειραματική ομάδα : # 63

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) για 14 ώρες . Σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν λάβει κανένα διεγέρτη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 μ /ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη , Χαμηλή Δόση (10^{-6} M) για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με καλλιεργητικό υλικό για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Για να εκτιμηθεί καλύτερα ο βαθμός της μείωσης της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου από την επώαση με INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης που παρατηρήθηκε στην πειραματική ομάδα # 62 , συγκρίθηκε η παραγωγή του NO με εκείνη από κύτταρα σε βασική κατάσταση (basal state) , που δεν έχουν λάβει δηλαδή καμία διέγερση .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.110 \pm 0.006**

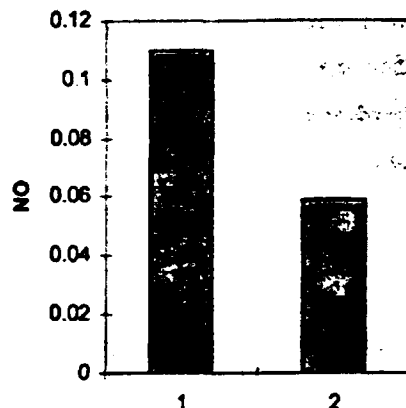
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.059 \pm 0.006**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 46.36 % .

t-statistic : 20.675

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P < 0.001 .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων για 14 ώρες με 250 μ /ml INF γ + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 46.36 % σε σύγκριση με βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που δεν είχαν λάβει καμία διέγερση , δηλαδή με φαγοκύτταρα σε πλήρη ηρεμία . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.110 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.059 mM , ενώ η μεταβολή που παρατηρήθηκε είχε δείκτη P < 0.001 , δηλαδή ήταν Στατιστικώς Σημαντική . Από το γεγονός ότι διαπιστώθηκε παραγωγή NO κατά 46.36 % μικρότερη από εκείνη των κυττάρων που δεν ήταν διεγερμένα είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό το μέγεθος της κατασταλτικής επίδρασης που ασκεί η δεξαμεθαζόνη . Αυτό το αποτέλεσμα δεν συμφωνεί με τα ευρήματα μιας άλλης ερευνητικής ομάδας (Broug-Holub και Kraal, 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 64

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με 250 units/ml Ιντερφερόνης- γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 u/ml , για 6 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 14

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση έχει στην παραγωγή NO η βραχύχρονη επώαση (για 6 ώρες) των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 units/ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.178 \pm 0.008**

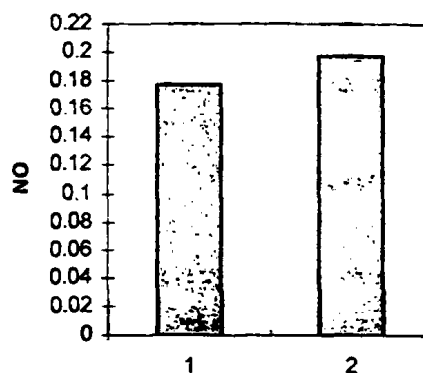
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.198 \pm 0.008**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.23 % .

t-statistic : -6.225

Βαθμοί Ελευθερίας : 26

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 u/ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης προκαλούσε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 11.23 % . Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.178 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.198 mM , ενώ η μεταβολή αυτή είχε δείκτη P < 0.001 , δηλαδή ήταν στατιστικώς σημαντική . Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των πειραματικών ομάδων # 43 και # 49 , όπου διαπιστώθηκε ότι η αδρεναλίνη επιτείνει την παραγωγή NO από περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν επωαστεί για 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη και την παραγωγή NO από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που είχαν επωαστεί με LPS + Αδρεναλίνη για 14 ώρες . Έτσι επιβεβαιώνεται η άποψη ότι η οδός του cAMP επιτείνει την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Η εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων αφορά την επίδραση του cAMP στην δραστηριότητα της iNOS (Radassi και συν., 1993 , Mullet και συν., 1997) .



Πειραματική ομάδα : # 65

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη για 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για άλλες 8 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , αρχικά για 6 ώρες και στην συνέχεια για άλλες 8 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 6 ώρες , Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M , για 8 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ για 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για άλλες 8 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη για 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για άλλες 8 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 12**

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη για 6 ώρες και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για άλλες 8 ώρες θα επηρεάσει την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.503 \pm 0.052**

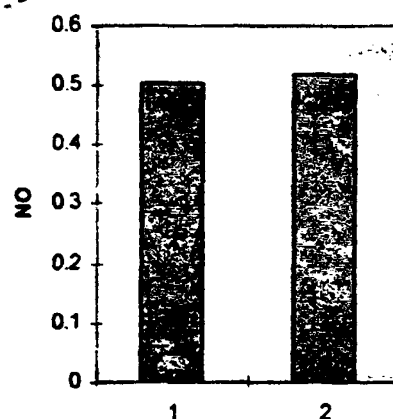
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.517 \pm 0.057**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 2.78 % .

t-statistic : - 0.653

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.520 (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων αρχικά με 250 μ /ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 6 ώρες και στην συνέχεια με 250 μ /ml INF γ + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης για άλλες 8 ώρες δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.503 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.517 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της τάξης του 2.78 % , αλλά ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.520 , δηλαδή η διαφορά ήταν Στατιστικώς Μη-σημαντική . Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των πειραματικών ομάδων # 20 και # 27 , τα οποία δείχνουν ότι η αρχική επώαση των κυττάρων με αδρεναλίνη δεν επηρεάζει τις μεταβολές που θα προκαλέσει στην παραγωγή Δραστικών μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου η επώαση με Δεξαμεθαζόνη .

Πειραματική ομάδα : # 66

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 21

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες θα προκαλούσε την αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.023 ± 0.004

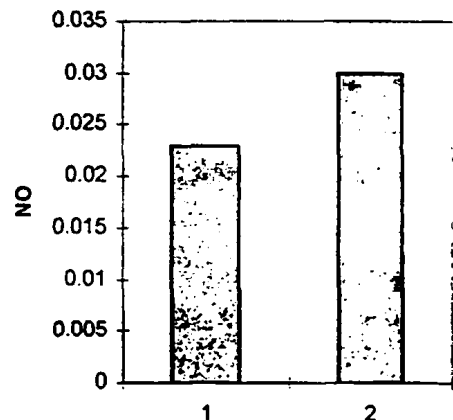
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.030 ± 0.004

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 30.43 % .

t-statistic : -5.827

Βαθμοί Ελευθερίας : 40

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS για 14 ώρες προκαλούσε την αύξηση της παραγωγής NO κατά 30.43 % . Αυτή η αύξηση ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.023 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.030 mM . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer με ενδοτοξίνη προκαλεί την αυξημένη παραγωγή NO . Η ικανότητα των κυττάρων Kupffer να παράγουν Νιτρικό Οξείδιο υπό την επίδραση πολλών διεγερτών έχει ήδη αναφερθεί και θεωρείται πιθανό ότι συμβάλλει όχι μόνο σε αμυντικούς μηχανισμούς αλλά και στην τοπική ρύθμιση της αιματικής κυκλοφορίας στο ήπαρ (Decker, 1990) .



Πειραματική ομάδα : # 67

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 units/ml INF γ .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer).

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO).

Διενέργεια : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 μ /ml, για 14 ώρες.

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό.

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 30

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 250 μ /ml INF γ θα προκαλούσε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.064 ± 0.016

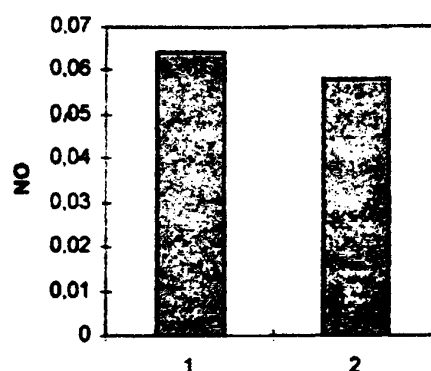
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.058 ± 0.012

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 9.37 %.

t-statistic : 1.858

Βαθμοί Ελευθερίας : 58

P value : $P = 0.068$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική Διαφορά).



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 250 μ /ml INF γ για 14 ώρες δεν προκάλεσε μεταβολή στην παραγωγή του NO. Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.064 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.058 mM. Η μείωση αυτή ήταν της τάξης του 9.37%, αλλά ήταν Στατιστικώς Μη-σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P = 0.068$. Επειδή η INF γ δεν φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή NO από τα κύτταρα Kupffer δεν έγιναν άλλα πειράματα μέτρησης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου μετά από ενεργοποίηση με Ιντερφερόνη- γ .

Πειραματική ομάδα : # 68

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επί 14 ώρες επωάστηκαν με LPS + Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer)

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 36

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Αδρεναλίνη για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.042 \pm 0.007**

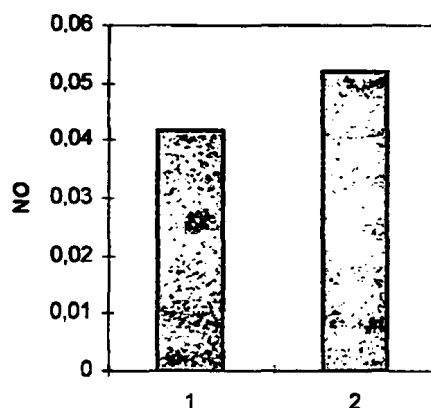
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.052 \pm 0.009**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 23.80 % .

t-statistic : -5.376

Βαθμοί Ελευθερίας : 70

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS + Αδρεναλίνη για 14 ώρες παρουσίασαν μια αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου της τάξης του 23.80 % . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.042 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.052 mM . Ο δείκτης P είχε τιμή P < 0.001 . Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα Kupffer που επωάζονται με LPS + Αδρεναλίνη παρουσιάζουν μια αύξηση της παραγωγής NO , όπως ακριβώς και τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS + Αδρεναλίνη για 14 ώρες στις πειραματικές ομάδες # 32 και # 49 .



Πειραματική ομάδα : # 69

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Ντοπαμίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer)

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Ντοπαμίνη για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.029 ± 0.004

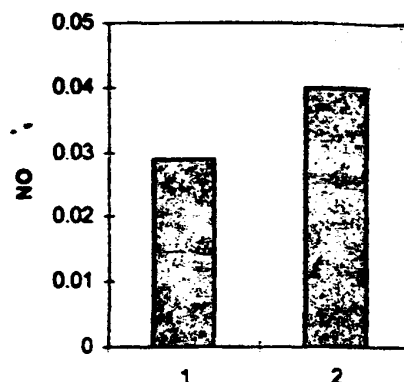
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.040 ± 0.008

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 37.93 % .

t-statistic : -7.606

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη προκαλεί μια σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.029 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.040 mM , δηλαδή η αύξηση ήταν της τάξης του 37.93 % . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη $P < 0.001$, δηλαδή ήταν Στατιστικώς Σημαντική . Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με Ενδοτοξίνη + Ντοπαμίνη προκαλεί αύξηση της παραγωγής NO , όπως ακριβώς προκαλείται και στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (βλέπε πειραματικές ομάδες # 33 και # 50) .

Πειραματική ομάδα : # 70

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Τύπος κυτάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση θα είχε στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer η επώαση επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.028 \pm 0.003**

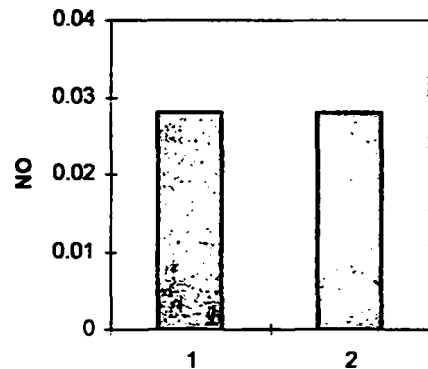
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.028 \pm 0.004**

Μεταβολή (%) : Δεν υπήρξε καμία απολύτως μεταβολή .

t-statistic : -0.845

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : P = 0.401

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ για 14 ώρες δεν προκάλεσε απολύτως καμία μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα αυτά . Ο μεγάλος δείκτης P (P = 0.401) δεν αφήνει αμφιβολία ότι αυτή η έλλειψη μεταβολής δεν είναι τυχαία αλλά Στατιστικώς Σημαντική . Στις πειραματικές ομάδες # 34 και # 51 διαπιστώθηκε ότι η Ινσουλίνη δεν επηρέασε την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου ούτε στα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , όπως ακριβώς δεν τα επηρέασε και στα κύτταρα Kupffer . Φαίνεται ότι παρά την ικανότητα της Ινσουλίνης να ενεργοποιεί πολλαπλούς βιοχημικούς μηχανισμούς των κυττάρων μέσω των Κινασών της Τυροσίνης (Goodman & Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) και να προκαλεί πολλά φαινόμενα στα μακροφάγα (Rhodes, 1975 , Muschel και συν., 1977 , Bar και συν., 1977) δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου .



Πειραματική ομάδα : # 71

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Γλυκαγόνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση θα είχε στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer η επώαση 14 ωρών με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνη .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.030 \pm 0.006**

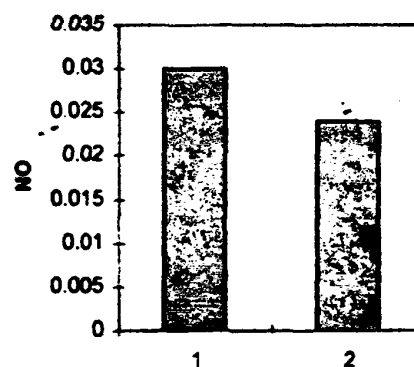
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.024 \pm 0.005**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 20 % .

t-statistic : 4.127

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : P < 0.001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνη προκάλεσε την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 20 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή P < 0.001 . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.030 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.024 mM . Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η Γλυκαγόνη προκάλεσε μείωση της παραγωγής NO στα κύτταρα Kupffer , όπως ακριβώς προκάλεσε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα (πειραματική ομάδα # 35) , ενώ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (πειραματική ομάδα # 52) . Η Γλυκαγόνη προκαλεί διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξηση των επιπέδων του cAMP . Η αύξηση του cAMP μπορεί να εξηγήσει τα αυξημένα παραγωγή NO στην πειραματική ομάδα # 52 αλλά όχι το αποτέλεσμα του παρόντος πειράματος .

Πειραματική ομάδα : # 72

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Νευροπεπτίδιο Υ .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) 1,25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + NPY .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1,25 $\mu\text{g/ml}$ NPY θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.115 ± 0.061

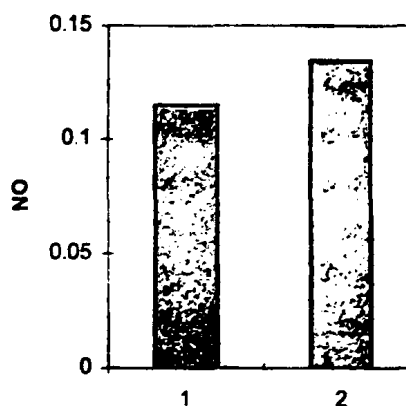
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.134 ± 0.068

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 16.52 % .

t-statistic : -1.136

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : $P = 0.260$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1,25 $\mu\text{g/ml}$ NPY για 14 ώρες δεν προκαλεί μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.115 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.134 mM , δηλαδή υπάρχει μια αύξηση της τάξης του 16.52 % , που όμως δεν είναι Στατιστικώς Σημαντική ($P = 0.260$) λόγω των μεγάλων Σταθερών Αποκλίσεων (± 0.061 και ± 0.068 , αντίστοιχα για μάρτυρες και πειραματικά) . Το αποτέλεσμα αυτό που προέκυψε από μετρήσεις σε κύτταρα Kupffer είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 36 και # 53 , όπου διαπιστώθηκε ότι το NPY δεν επηρεάζει την παραγωγή NO από τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .



Πειραματική ομάδα : # 73

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν για 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-6} M (Χαμηλή Δόση) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-6} M Δεξαμεθαζόνη (Χαμηλή Δόση) θα προκαλούσε μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.050 ± 0.011

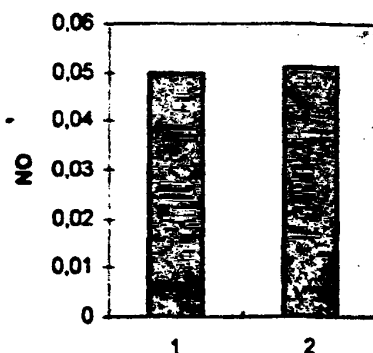
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.051 ± 0.010

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 2 % .

t-statistic : -0.300

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : $P = 0.765$ (Στατιστικά Μη-σημαντική Διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης δεν προκάλεσε μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Αν και παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 2 % μεταξύ των μέσων τιμών μαρτύρων και πειραματικών , αυτή ήταν ελάχιστη σε σχέση με τις μεγάλες Σταθερές Αποκλίσεις (± 0.011 και ± 0.010 αντίστοιχα) . Επίσης ο δείκτης P είχε πολύ μεγάλη τιμή ($P = 0.765$) . Τα κύτταρα Kupffer φαίνεται ότι ανταποκρίνονται διαφορετικά στην χαμηλή δόση δεξαμεθαζόνης από ότι τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (οι πειραματικές ομάδες # 37 και # 55 έδειξαν μια μεγάλη μείωση της παραγωγής NO και στους δύο κυτταρικούς τύπους) .

Πειραματική ομάδα : # 74

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ενδοτοξίνη + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 30

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Σεροτονίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.042 ± 0.008

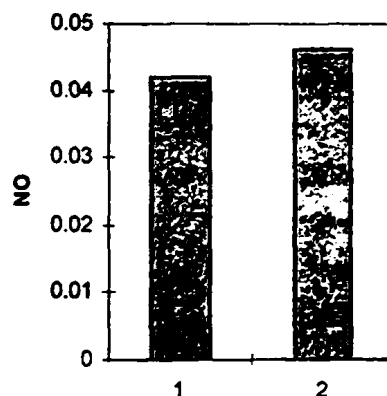
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.046 ± 0.009

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 9.52 % .

t-statistic : -1.817

Βαθμοί Ελευθερίας : 58

P value : $P = 0.074$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική μεταβολή) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Σεροτονίνη δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.042 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.046 mM . Αυτή η αύξηση ήταν της τάξης του 9.52 % , αλλά δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική λόγω των μεγάλων Σταθερών Αποκλίσεων ($P = 0.074$) . Έτσι τα κύτταρα Kupffer δεν έγινε δυνατόν να ανταποκριθούν στην Σεροτονίνη με αύξηση της παραγωγής NO , όπως ανταποκρίθηκαν τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (πειραματικές ομάδες # 38 και # 56) .



Πειραματική ομάδα : # 75

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 µg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 2×10^{-6} M (2 µM) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) : 22**

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα προκαλούσε στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 µg/ml LPS + 2 µM Ισταμίνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.027 ± 0.005**

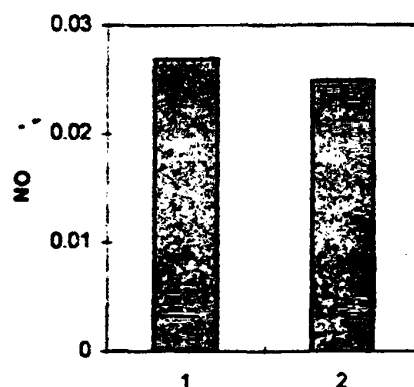
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.025 ± 0.003**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 7.4 %

t-statistic : 1.768

Βαθμοί Ελευθερίας : 42

P value : P = 0.084 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 µg/ml LPS + 2 µM Ισταμίνης δεν προκάλεσε μεταβολή στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.027 mM και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.025 mM , δηλαδή υπήρξε μια μείωση της τάξης του 7.4 % . Η μεταβολή αυτή είναι σχετικά μικρή και λόγω των μεγάλων Σταθερών Αποκλίσεων θα πρέπει να αγνοηθεί ως τυχαία , αφού ο δείκτης P έχει τιμή P = 0.084 . Η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Ισταμίνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην παραγωγή NO και στην πειραματική ομάδα # 57 είχε διαπιστωθεί ότι η Ισταμίνη επίσης δεν προκαλούσε καμία μεταβολή στην παραγωγή NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Στην πειραματική ομάδα # 39 είχε διαπιστωθεί ότι η Ισταμίνη προκαλούσε μείωση της παραγωγής NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Δεν είναι γνωστό για ποιο λόγο δεν παρατηρείται απόκριση στην Ισταμίνη από τα βρογχοκυψελιδικά και τα ηπατικά μακροφάγα , ενώ υπάρχει μόνο στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Ενδεχομένως τα ηπατικά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα να μην εκφράζουν ικανοποιητικά τους H2-υποδοχείς (βλέπε σχετικό θέμα που αναπτύσσεται στους Gespach και συν., 1985 , Mirossay και συν., 1994) .



Πειραματική ομάδα : # 76

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS + PGE₂ για 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν με LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με LPS + PGE₂ για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου θα προκαλούσε η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 μg/ml LPS + 10⁻⁵ M PGE₂ για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.027 ± 0.004**

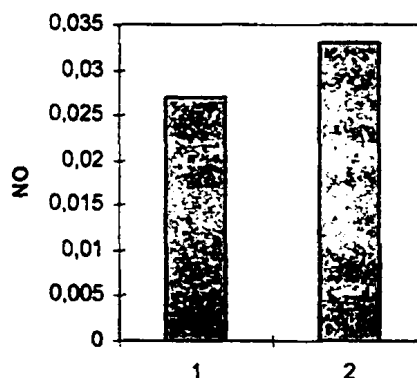
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : **0.033 ± 0.007**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 22.22 % .

t-statistic : -3.700

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P = 0.001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με LPS + PGE₂ οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.027 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.033 mM , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 22.22 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή 0.001 . Η αύξηση της παραγωγής του NO από τα κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με PGE₂ συμφωνεί με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν και στην πειραματική ομάδα # 40 , όπου τα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν επωαστεί με PGE₂ παρουσίασαν την ίδια αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 32 , # 49 και # 68 , συνηγορούν στην άποψη ότι η διέγερση της οδού του cAMP σχετίζεται με την επίταση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .



Πειραματική ομάδα : # 77

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν για 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer).

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO).

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 μg/ml, για 14 ώρες.

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη D₂ (PGD₂) 10⁻⁵ M, για 14 ώρες.

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS.

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου θα είχε η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 μg/ml LPS + 10⁻⁵ M PGD₂ για 14 ώρες.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.052 ± 0.012

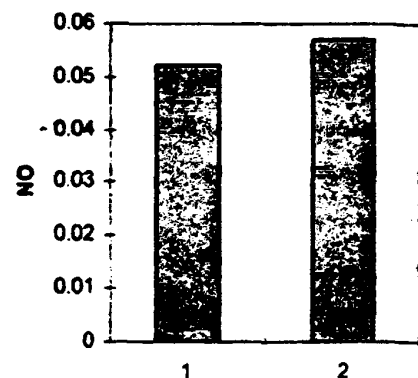
Μέση τιμή experimentals (± Σταθερή Απόκλιση) : 0.057 ± 0.010

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 9.61 %.

t-statistic : -1.585

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.120 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Διαφορά).

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + PGD₂ δεν προκάλεσε μεταβολή στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου. Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.052 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.057 mM, δηλαδή σημειώθηκε μεταβολή της τάξης του 9.61%. Όμως αυτή η μεταβολή είναι πολύ μικρή σε σύγκριση με τις μεγάλες Σταθερές Απόκλίσεις που παρατηρήθηκαν (± 0.012 και ± 0.010 mM αντίστοιχα) και πρέπει να θεωρηθεί τυχαία. Εξάλλου ο δείκτης P είχε τιμή 0.120. Το ίδιο αποτέλεσμα με τα κύτταρα Kupffer έδωσαν και τα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν επωαστεί με PGD₂ (βλέπε πειραματική ομάδα # 41). Ανταπόκριση στην PGD₂ έγινε δυνατόν να επιτευχθεί με τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα στην πειραματική ομάδα # 58, όπου παρατηρήθηκε καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου. Δεν έχουν περιγραφεί ειδικοί υποδοχείς για την PGD₂ στα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα.

Πειραματική ομάδα : # 78

Θέμα : Μέτρηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου (NO) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (Vit.D3) $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Vit.D3 .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση θα προκαλούσε στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ Vit.D3 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.155 ± 0.030

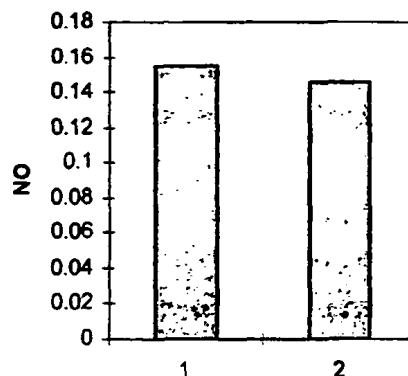
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.146 ± 0.035

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 5.8 % .

t-statistic : 0.988

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : $P = 0.328$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με LPS + Vit.D3 δεν προκάλεσε μεταβολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Η μέση τιμή των μαρτύρων ήταν 0.155 mM NO και η μέση τιμή των πειραματικών ήταν 0.146 mM NO , ενώ οι Σταθερές Αποκλίσεις ήταν ± 0.030 και ± 0.035 αντίστοιχα . Ο δείκτης P είχε τιμή 0.328 . Τα κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS + Vit.D3 παρουσίασαν διαφορετική αντίδραση από τα περιτοναϊκά μακροφάγα (πειραματική ομάδα # 46) τα οποία ανταποκρίθηκαν με αύξηση της παραγωγής NO . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (πειραματική ομάδα # 60) ανταποκρίθηκαν με μείωση της παραγωγής NO . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να βοηθούν στην ερμηνεία αυτής της διαφοροποίησης των αντιδράσεων στην Vit.D3 .



Πειραματική ομάδα : # 79

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Τύπος κυτάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , μετρούμενη σε $\mu\text{g/ml PO}_3^{-4}$ ανά ώρα .

Διευέριτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες μόνο με το καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 11

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Ουσιαστικά αυτό το πείραμα αποτελεί μία δοκιμή για να ελεγχθεί εάν η μέθοδος μέτρησης που χρησιμοποιούμε λειτουργεί και δίνει αποτελέσματα . Θα αξιολογηθεί σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του πειράματος # 80 , που είναι το ίδιο πείραμα αλλά μετά από επώαση 12 ωρών με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS , δηλαδή η συγκέντρωση του διεγέρτη διαφέρει κατά 10 φορές .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.083 \pm 0.005**

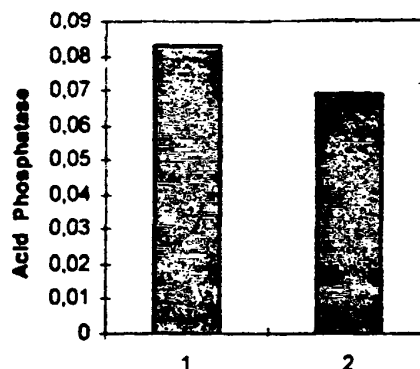
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.069 \pm 0.007**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 16.86 % .

t-statistic : 5.794

Βαθμοί Ελευθερίας : 20

P value : P < 0.001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκαλούσε την μείωση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης κατά 16.86 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Η μέση τιμή δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες ήταν 0.083 $\mu\text{g/ml PO}_3^{-4}$ /ώρα και για τα πειραματικά 0.069 $\mu\text{g/ml}$. Αυτή η μείωση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης σημαίνει ότι τα μακροφάγα ανταποκρίνονται στην ενδοτοξίνη όχι μόνο με την παραγωγή νέων ποσοτήτων του ενζύμου αλλά και με την έκκριση του ενζύμου προς τον μεσοκυττάριο χώρο . Η μέθοδος μέτρησης που χρησιμοποιούμε λειτουργεί ικανοποιητικά . Από την διεθνή βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η επώαση των μακροφάγων με LPS προκαλεί αυξημένη παραγωγή νέων ποσοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης αλλά μεγάλο ποσοστό αυτού του ενζύμου εξέρχεται και παρουσιάζεται στην κυκλοφορία του αίματος , δηλαδή εξωκυττώνεται (Cohn και Benson, 1965 , Saito και Suter, 1965 , Morland και Kaplan, 1977 , Cooper και συν., 1984) .



Πειραματική ομάδα : # 80

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (μετρούμενη σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 0.2 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με καλλιεργητικό υλικό για 12 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν με LPS για 12 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες . Η ποσότητα του LPS είναι το 1/10 σε σχέση με την πειραματική ομάδα # 79 . Το πείραμα αυτό έχει επίσης σκοπό την αξιολόγηση της μεθόδου μέτρησης της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.073 \pm 0.002**

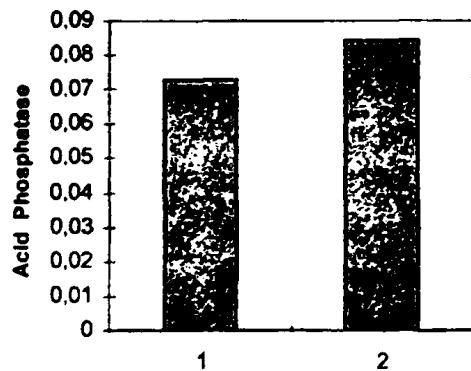
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.084 \pm 0.005**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 15.06 % .

t-statistic : -6.823

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P < 0.001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκάλεσε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Συγκεκριμένα υπήρξε αύξηση της τάξης του 15.06 % . Αντιθέτως στο πείραμα # 79 υπήρξε μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης λόγω εξωκύτωσης του ενζύμου . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες ήταν 0.073 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα και η μέση τιμή για τα πειραματικά ήταν 0.084 $\mu\text{g/ml}$ ανά ώρα . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη P < 0.001 . Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντιληπτό ότι η μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης λειτουργεί ικανοποιητικά .



Πειραματική ομάδα : # 81

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργειας : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 34

Σκοπός του πειράματος : Το πείραμα αυτό , όπως και το # 79 , αποτελεί δοκιμή για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ακολουθούμενης μεθοδολογίας . Επίσης θα διαπιστωθεί ποια επίδραση έχει στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες , που θα αποτελέσουν και τις παραμέτρους που θα ακολουθηθούν στα επόμενα πειράματα .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.867 \pm 0.130**

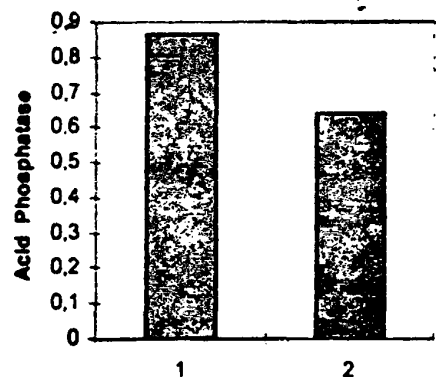
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.641 \pm 0.128**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 26.06 % .

t-statistic : 7.221

Βαθμοί Ελευθερίας : 66

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες προκαλεί την μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων κατά 26.06 % . Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.867 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και η μέση τιμή δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης για τα πειραματικά ήταν 0.641 $\mu\text{g/ml}$. Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι η επώαση των μακροφάγων με LPS για 14 ώρες προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η επώαση των μακροφάγων με LPS προκαλεί παραγωγή Ώξινης Φωσφατάσης (Cohn και Benson, 1965 , Saito και Suter, 1965 , Morland και Kaplan, 1977 , Coorger και συν., 1984) αλλά μεγάλο ποσοστό αυτού του ενζύμου εξέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος , επειδή υφίσταται εξωκυττάρωση .

Σημείωση : Από την πειραματική ομάδα # 81 και πέρα χρησιμοποιείται η ακριβώς η μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης που περιγράφεται στο κεφάλαιο 10-3 (Υλικά - Μέθοδοι) , ενώ στις πειραματικές ομάδες # 79 και # 80 χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή της μεθόδου με λιγότερο ομογενοποιημένα μακροφάγων .



Πειραματική ομάδα : # 82

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 units/ml INF γ .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 28

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ για 14 ώρες . Επίσης , το πείραμα αυτό αποτελεί δοκιμή για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.733 \pm 0.081**

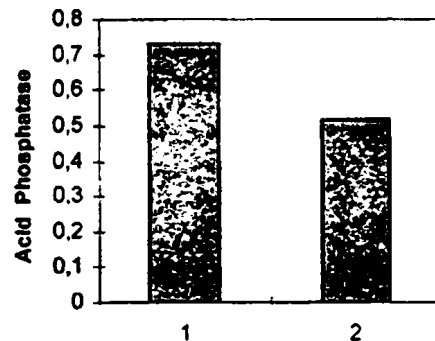
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.517 \pm 0.094**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 29.46 % .

t-statistic : 9.225

Βαθμοί Ελευθερίας : 54

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ για 14 ώρες προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης κατά 29.46 % . Η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.733 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τα πειραματικά ήταν 0.517 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ για 14 ώρες προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές δημοσιεύσεις για τις επιδράσεις της επώασης με Ιντερφερόνης- γ στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν ότι η ακολουθούμενη μεθοδολογία μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα .



Πειραματική ομάδα : # 83

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 28

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.928 ± 0.120

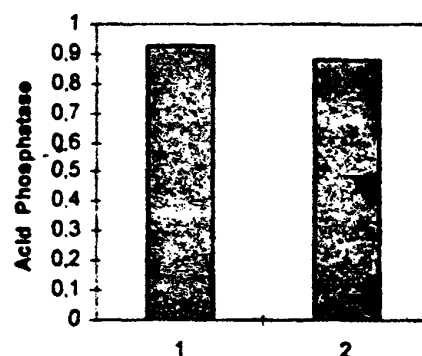
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.876 ± 0.127

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 5.6 % .

t-statistic : 1.579

Βαθμοί Ελευθερίας : 54

P value : P = 0.120 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 14 ώρες δεν προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.928 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και η μέση τιμή για τα πειραματικά ήταν 0.876 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Αυτή η μείωση ήταν της τάξης του 5.6 % αλλά δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή 0.120 . Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να συσχετίζουν την β -Αδρενεργική οδό (Αδενυλική Κυκλάση - cAMP - PKA) με την δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .



Πειραματική ομάδα : # 84

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Τύπος κυτάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη $2,5 \times 10^{-5}$ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 34

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων για 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.866 ± 0.136

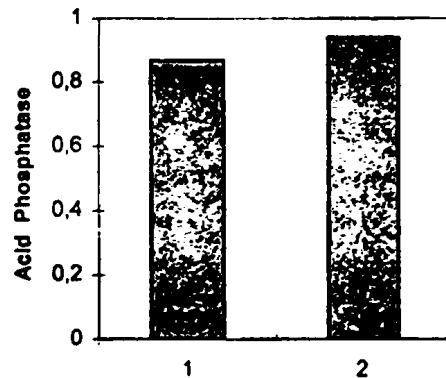
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.938 ± 0.148

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 8.31 % .

t-statistic : -2.070

Βαθμοί Ελευθερίας : 66

P value : $P < 0.05$ (Συγκεκριμένα $P = 0.042$) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνης για 14 ώρες προκάλεσαν την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 8.31 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.05$. Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες ήταν 0.866 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά 0.938 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα . Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ντοπαμίνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Στην προηγούμενη πειραματική ομάδα (# 83) δεν είχε γίνει δυνατό να διαπιστωθεί αν η Αδρεναλίνη προκαλεί κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα του ενζύμου .



Πειραματική ομάδα : # 85

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ινσουλίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.432 ± 0.027

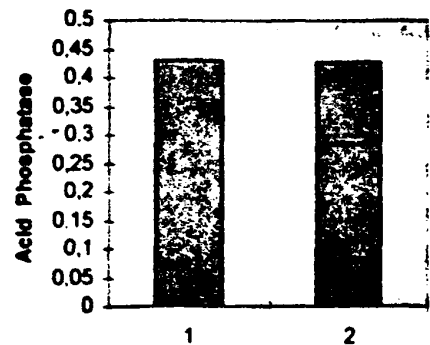
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.428 ± 0.038

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 0.92 %

t-statistic : 0.452

Βαθμοί Ελευθερίας : 68

P value : $P = 0.653$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ινσουλίνης δεν προκάλεσε ουσιαστικά καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των δραστηριοτήτων ήταν 0.432 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.428 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η μεταβολή ήταν μόλις 0.92 % και ο δείκτης P είχε τιμή $P = 0.653$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ινσουλίνη δεν προκαλεί μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα της Φωσφατάσης . Ας σημειωθεί ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ινσουλίνη προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής H_2O_2 (πειραματική ομάδα # 8) και καμία επίδραση στην παραγωγή NO (πειραματική ομάδα # 34) .

Πειραματική ομάδα : # 86

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 22

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.799 ± 0.219

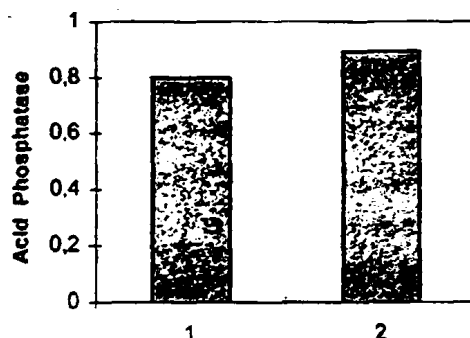
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.893 ± 0.251

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.76 % .

t-statistic : -1.322

Βαθμοί Ελευθερίας : 42

P value : P = 0.193

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης για 14 ώρες δεν προκαλούσε μεταβολή της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης . Οι Σταθερές Αποκλίσεις που παρουσιάστηκαν κατά τις μετρήσεις ήταν μεγάλες . Η μέση τιμή δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης ήταν για τους μάρτυρες 0.799 ± 0.219 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα ενώ για τα πειραματικά 0.893 ± 0.251 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Ο δείκτης P είχε τιμή 0.193 . Τα αποτελέσματα αυτά σημαίνουν ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Γλυκαγόνη δεν προκαλεί μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , αν και η Γλυκαγόνη επηρεάζει τις κυτταροπλασματικές δραστηριότητες πάρα πολλών ενζύμων (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) .



Πειραματική ομάδα : # 87

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Νευροπεπτίδιο Υ .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + NPY .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 26

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NPY θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.433 \pm 0.109**

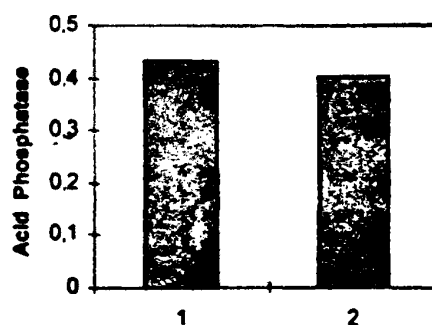
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.401 \pm 0.127**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 7.39 % .

t-statistic : 0.965

Βαθμοί Ελευθερίας : 50

P value : P = 0.339 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NPY δεν προκαλούσε μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Συγκεκριμένα οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων ήταν 0.433 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ για τους μάρτυρες και 0.401 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ για τα πειραματικά . Η μείωση της δραστηριότητας κατά 7.39 % που σημειώθηκε ήταν πολύ μικρή σε σύγκριση με τις πολύ μεγάλες Σταθερές Αποκλίσεις και για αυτό δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική (P = 0.339) . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + NPY δεν προκαλεί κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης .

Πειραματική ομάδα : # 88

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυτάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διεύρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-6} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.576 ± 0.077

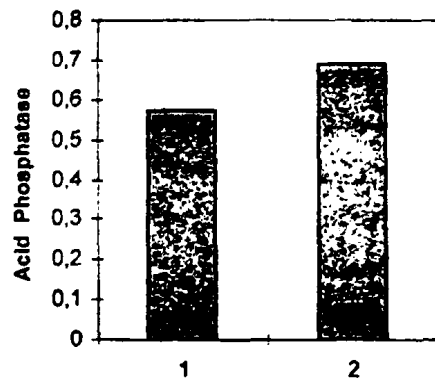
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.691 ± 0.090

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 19.96 % .

t-statistic : -4.718

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης επί 14 ώρες προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης κατά 19.96 % . Η αύξηση αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Συγκεκριμένα η μέση τιμή των δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.576 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , ενώ η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τα πειραματικά ήταν 0.691 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντιληπτό ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Δεξαμεθαζόνη προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε από τα πειράματα της παρούσας εργασίας αν η αύξηση οφείλεται σε αναστολή της εξωκυττάρωσης του ενζύμου ή σε αυξημένη σύνθεσή του . Η διεθνής βιβλιογραφία δεν αναφέρει ανάλογα αποτελέσματα , ενώ ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών έχει θεωρηθεί γενικά κατασταλτικός σε ότι αφορά την Ώξινη Φωσφατάση (Rinehart και συν., 1982) .



Πειραματική ομάδα : # 89

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη 5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 22

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα προκαλούσε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.623 ± 0.109

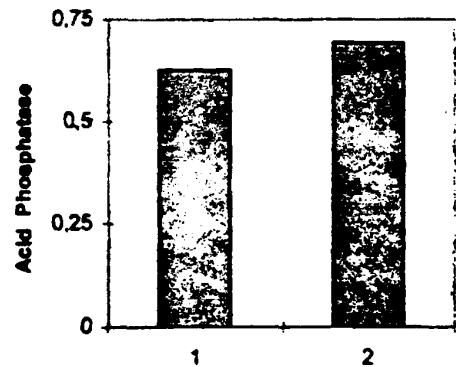
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.694 ± 0.071

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.39 % .

t-statistic : -2.545

Βαθμοί Ελευθερίας : 42

P value : $P < 0.05$ (Συγκεκριμένα $P = 0.015$) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης επί 14 ώρες προκαλούσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 11.39 % . Αυτή η μεταβολή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P = 0.015$. Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.623 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.694 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Σεροτονίνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Τα αποτελέσματα της επώασης των περιτοναϊκών μακροφάγων με Ενδοτοξίνη + Σεροτονίνη έχουν αποδειχθεί διεγερτικά στην παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου (πειραματικές ομάδες # 13 και # 38) .

Πειραματική ομάδα : # 90

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (2 μM) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 27

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα προκαλούσε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.834 ± 0.136

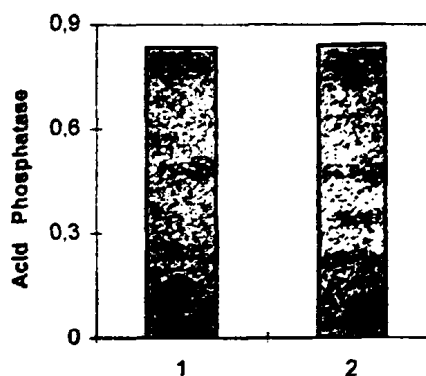
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.841 ± 0.163

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.83 % .

t-statistic : -0.156

Βαθμοί Ελευθερίας : 52

P value : $P = 0.877$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης δεν προκάλεσε μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων της Οξίνης Φωσφατάσης ήταν 0.834 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.841 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η διαφορά που σημειώθηκε ήταν της τάξης του 0.83 % και με δείκτη P ιδιαίτερα υψηλό (0.877) , δηλαδή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική . Η διαπίστωση ότι η επώαση των περιτοναϊκών κυττάρων επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη δεν προκαλεί μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης έρχεται σε αντίθεση με ορισμένα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας . Έχει διαπιστωθεί από άλλους ότι η Ισταμίνη από μόνη της είναι ικανή να διεγείρει την παραγωγή λυσοσωματικών ενζύμων από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Cluzel και συν., 1990) .



Πειραματική ομάδα : # 91

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGE₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.991 \pm 0.078**

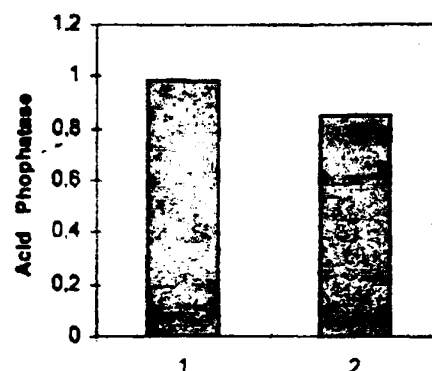
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.854 \pm 0.088**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 13.82 % .

t-statistic : 3.911

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 13.82 % . Οι μέσες τιμές των ενζυμικών δραστηριοτήτων ήταν 0.991 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.854 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + PGE₂ προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης , που μπορεί να οφείλεται είτε 1) σε μειωμένη σύνθεση του ενζύμου ή 2) σε αυξημένη εξωκύττωσή του ή τέλος 3) σε συνδυασμό των δύο παραπάνω . Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής ομάδας ενδέχεται να μπορούν να ερμηνευτούν με βάση της οδό Μεταγωγής Μηνύματος του cAMP , χωρίς όμως επί του παρόντος να υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για αυτό . Όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία και από μελέτες του Εργαστηρίου μας , σε πολλά κύτταρα το cAMP αναστέλλει τις λειτουργίες που σχετίζονται με την φαγοκυττάρωση .

Πειραματική ομάδα : # 92

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10^{-5} M , για 12 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με LPS + PGE₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 10

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποιά επίδραση στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ για 12 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.087 \pm 0.003**

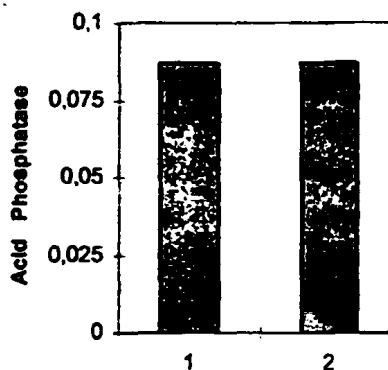
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.087 \pm 0.004**

Μεταβολή (%) : Δεν υπήρξε καμία μεταβολή .

t-statistic : 0.371

Βαθμοί Ελευθερίας : 18

P value : P = 0.715 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 12 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Η μείωση του χρόνου επώασης με LPS + PGE₂ από 14 σε 12 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση των ανιχνευόμενων δραστηριοτήτων της Ώξινης Φωσφατάσης στα ίδια επίπεδα για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά (0.087 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) , ενώ στην προηγούμενη πειραματική ομάδα (# 91) είχε παρατηρηθεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου .



Πειραματική ομάδα : # 93

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml}$ PO₄³⁻ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10^{-5} M , για 14 ώρες

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGE₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα προκαλούσε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.163 \pm 0.011**

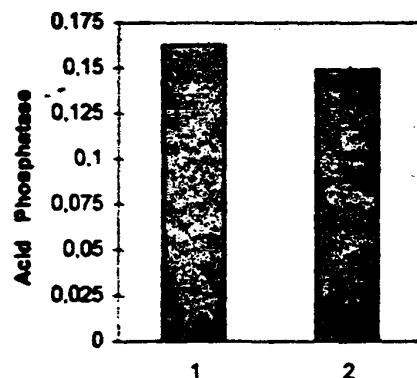
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.149 \pm 0.022**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 8.58 %

t-statistic : 2.403

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : P < 0.05 (συγκεκριμένα P = 0.021)



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Από τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ για 14 ώρες προκαλούσε μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 8.58 % . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων ήταν 0.163 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PO₄³⁻ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.149 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PO₄³⁻ ανά ώρα για τα πειραματικά . Ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.021 , δηλαδή η διαφορά της τάξης του 8,58 % ήταν στατιστικώς σημαντική . Είναι εμφανές ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + PGE₂ για 14 ώρες προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης , το οποίο και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 91 .



Πειραματική ομάδα : # 94

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGD₂ 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10⁻⁵ M PGD₂.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.408 \pm 0.112

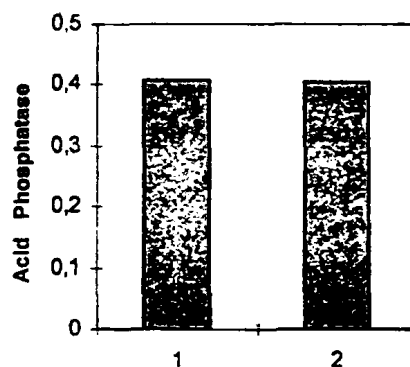
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.404 \pm 0.126

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 0.98 % (ελάχιστη τάση μείωσης) .

t-statistic : 0.119

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.906 (Στατιστικώς Μη-σημαντική μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + PGD₂ για 14 ώρες ουσιαστικά δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης , αφού οι μέσες τιμές δραστηριοτήτων που μετρήθηκαν ήταν 0.408 \pm 0.112 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ και 0.404 \pm 0.126 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά αντίστοιχα . Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι η επώαση με LPS + PGD₂ δεν επηρεάζει την δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων .



Πειραματική ομάδα : # 95

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃.

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέριτης : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) $2,5 \times 10^{-7}$ M , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την Vit.D₃ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιερρητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Vit.D₃ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.623 ± 0.079

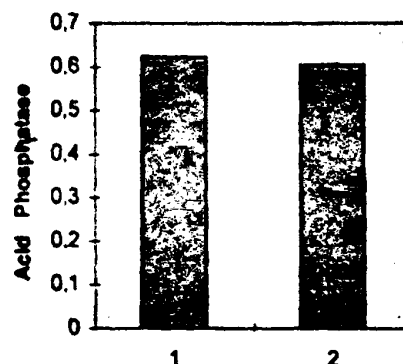
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.606 ± 0.073

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 2.72 % .

t-statistic : 0.6276

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : P = 0.535 (Στατιστικώς Μη-σημαντική μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ για 14 ώρες δεν προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Ο δείκτης P είχε τιμή 0.535 . Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων της Οξίνης Φωσφατάσης ήταν 0.623 ± 0.079 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.606 ± 0.073 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{-3}$ για τα πειραματικά . Από τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύεται ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Vit.D₃ δεν προκαλεί κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Ωστόσο η Vit.D₃ προκαλεί γενικά την ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και την επίταση και ενεργοποίηση πολλών ιδιοτήτων τους (Rigby και συν., 1984 , Rouis και συν., 1985 , Cohen και συν., 1986 , Rook και συν., 1988) .

Πειραματική ομάδα : # 96

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε περιτοναϊκά μακροφάγα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 (Vit.D3) $2,5 \times 10^{-7}$ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Vit.D3 .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (στην πειραματική ομάδα # 95 διαπιστώθηκε ότι η Vit.D3 από μόνη της δεν επηρεάζει την δραστηριότητα του ενζύμου στα μακροφάγα) .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.724 \pm 0.036**

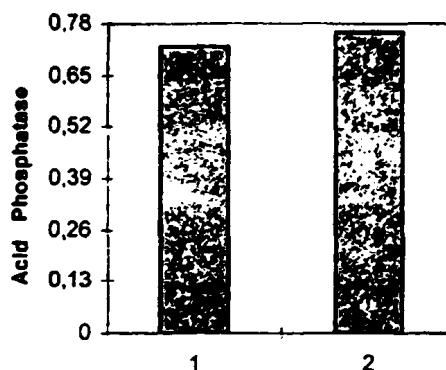
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.758 \pm 0.040**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 4.69 % .

t-statistic : -3.052

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P < 0.005 (συγκεκριμένα P = 0.004) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης ήταν 0.724 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.758 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ για τα πειραματικά , δηλαδή η αύξηση ήταν της τάξης του 4.69 % . Παρά το μικρό μέγεθος της μεταβολής αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή P < 0.005 . Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Vit.D3 προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες μόνο με Vit.D3 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης (βλέπε πειραματική ομάδα # 95) . Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δημοσιεύσεις που να αναφέρουν ανάλογο πείραμα .



Πειραματική ομάδα : # 97

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ + Αδρεναλίνη επί 14 ώρες .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INF + 10^{-4} M Αδρεναλίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.925 \pm 0.079**

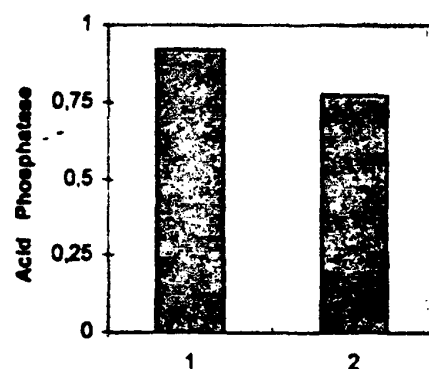
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.774 \pm 0.077**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 16.32 %

t-statistic : 6.657

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης επί 14 ώρες προκαλούσε την μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 16.32 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων Οξίνης Φωσφατάσης ήταν 0.925 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.774 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ για τα πειραματικά . Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται σε δράση μέσω της αύξησης του cAMP . Οι ενδείξεις που έχουμε όμως είναι λίγες και δεν υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία σαφείς απόψεις πάνω σε αυτό το θέμα .



Πειραματική ομάδα : # 98

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Τύπος κυττάρων : Περιτοναϊκά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα)

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.826 \pm 0.142**

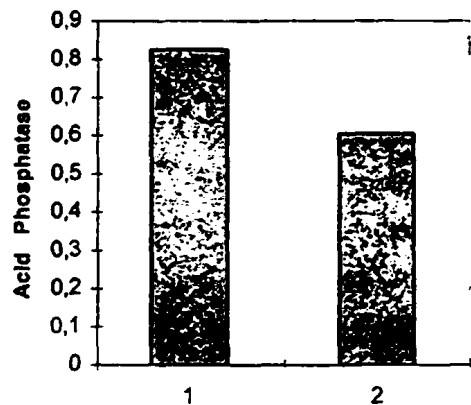
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.605 \pm 0.117**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 26.75 % .

t-statistic : 6.75

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : P < 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκάλεσε την μείωση της δραστηριότητας της Οξινής Φωσφατάσης κατά 26.75 % . Η μείωση αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P < 0.001 . Η μέση τιμή δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.826 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.605 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα . Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS για 14 ώρες προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης , όπως παρατηρήθηκε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα των πειραματικών ομάδων # 79 και # 81 .



Πειραματική ομάδα : # 99

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με Ιντερφερόνη-γ .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη-γ (INFγ) 250 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INFγ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INFγ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 28

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INFγ για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.769 ± 0.111

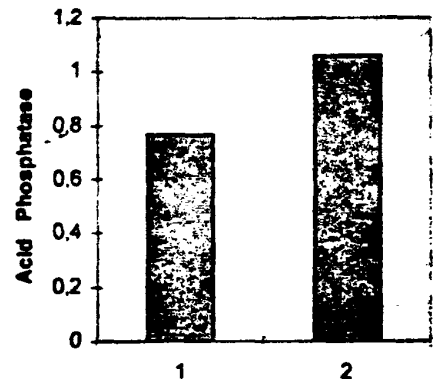
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.059 ± 0.091

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 37.71 % .

t-statistic : -10.627

Βαθμοί Ελευθερίας : 54

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INFγ επί 14 ώρες προκάλεσε μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Συγκεκριμένα η μέση τιμή των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν 0.769 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 1.059 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση κατά 37.71 % . Αυτή η μεταβολή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση με Ιντερφερόνη-γ προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Το αποτέλεσμα αυτό είναι αντίθετο από εκείνο της πειραματικής ομάδας # 98 , όπου η διέγερση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με ενδοτοξίνη προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου . Μια πιθανή ερμηνεία αυτής της διαφοράς είναι ότι η INFγ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής του ενζύμου χωρίς ταυτοχρόνως να αυξήσει και την εξωκύττωσή του , με αποτέλεσμα την συνεχή συσσώρευση του ενζύμου στα λυσοσώματα .

Πειραματική ομάδα : # 100

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνη για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.258 ± 0.126

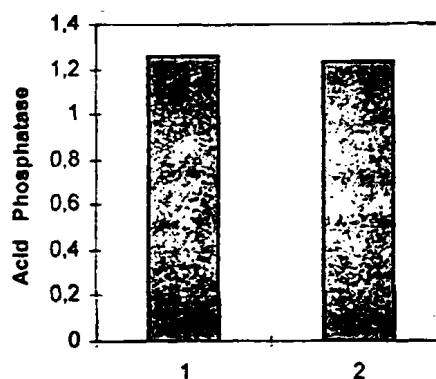
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.232 ± 0.202

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 2.06 % .

t-statistic : 0.368

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.716 (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 14 ώρες δεν προκάλεσε μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 1.258 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 1.232 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και παρατηρήθηκε μείωση κατά 2.06 % στις δραστηριότητες Ώξινης Φωσφατάσης . Όμως αυτή η μείωση δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή 0.716 . Δηλαδή στο πείραμα αυτό , όπως και στην πειραματική ομάδα # 83 , δεν έγινε δυνατό να ληφθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά με την επίδραση της Αδρεναλίνης .



Πειραματική ομάδα : # 101

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη $2,5 \times 10^{-5}$ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ξενίων control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνης επί 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.258 ± 0.127

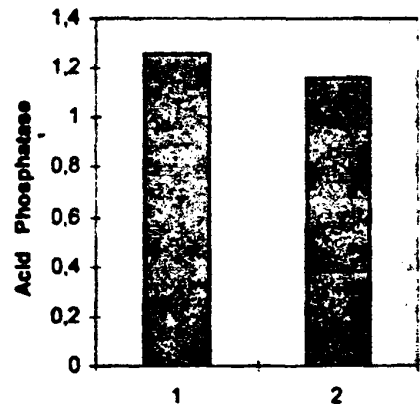
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.163 ± 0.118

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 7.55 %

t-statistic : 1.896

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.071$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνης δεν προκάλεσε μεταβολή της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν 1.258 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 1.163 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης του 7.55 % , αλλά ο δείκτης P είχε τιμή $P = 0.071$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Ντοπαμίνη για 14 ώρες δεν προκάλεσε μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .



Πειραματική ομάδα : # 102

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα)

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης επί 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.447 ± 0.022

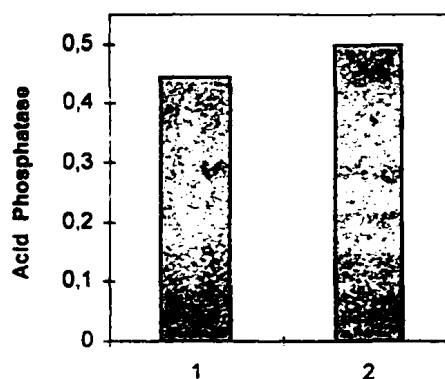
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.499 ± 0.043

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.63 % .

t-statistic : -3.727

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P = 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης προκαλούσε αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 11.63 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P = 0.001$. Συγκεκριμένα η μέση δραστηριότητα των μαρτύρων ήταν $0.447 \pm 0.022 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , ενώ για τα πειραματικά ήταν $0.499 \pm 0.043 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Ινσουλίνη για 14 ώρες (πειραματική ομάδα # 85) δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα . Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής ομάδας είναι δυνατόν να ερμηνεύονται από την επίδραση της Ινσουλίνης στα επίπεδα του cAMP .



Πειραματική ομάδα : # 103

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.448 ± 0.022

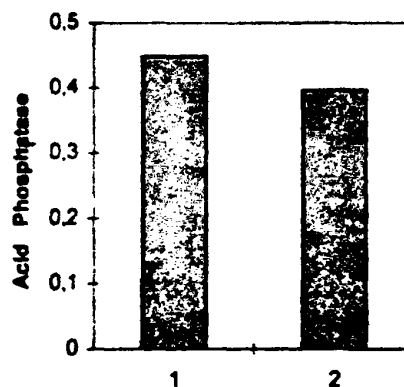
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.396 ± 0.035

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 11.60 % .

t-statistic : 4.362

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης για 14 ώρες οδήγησε στην μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Αναλυτικά η μέση τιμή ενζυματικής δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.448 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.396 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 11.60 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Γλυκαγόνη για 14 προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης , ενώ αντιθέτως στην πειραματική ομάδα # 86 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Γλυκαγόνη δεν προκαλούσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Η Γλυκαγόνη είχε προκαλέσει και την αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα της ομάδας # 52 .

Πειραματική ομάδα : # 104

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Νευροπεπτιδίο Υ .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διεγέρτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτιδίο Υ (NPY) 1.25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + NPY .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (Ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1.25 $\mu\text{g/ml}$ NPY .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.307 \pm 0.041**

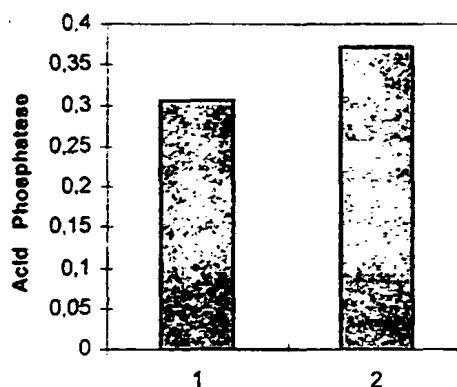
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.373 \pm 0.045**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 21.49 % .

t-statistic : -3.831

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.001 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1.25 $\mu\text{g/ml}$ NPY για 14 ώρες προκάλεσε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Συγκεκριμένα οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν αντίστοιχα για τους μάρτυρες 0.307 \pm 0.041 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ και για τα πειραματικά 0.373 \pm 0.045 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 21.49 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P = 0.001 . Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + NPY για 14 ώρες προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Στην πειραματική ομάδα # 87 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με NPY δεν προκαλεί μεταβολές της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Επίσης στην πειραματική ομάδα # 53 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με NPY δεν προκαλεί μεταβολές στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Δεν υπάρχουν αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία για επιδράσεις του Νευροπεπτιδίου Υ στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα ή σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος . Συνεπώς , η ανίχνευση της επίδρασης του Νευροπεπτιδίου Υ στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων είναι μη-αναμενόμενη και πολύ ενδιαφέρουσα .



Πειραματική ομάδα : # 105

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 5×10^{-5} M (Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Υψηλή Δόση (5×10^{-5} M) Δεξαμεθαζόνης .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Υψηλή Δόση (5×10^{-5} M) Δεξαμεθαζόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.307 ± 0.041

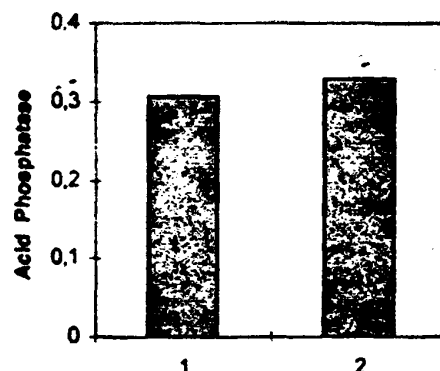
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.329 ± 0.048

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 7.16 % .

t-statistic : -1.213

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.238 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Διαφορά) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης (Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης) για 14 ώρες δεν οδήγησε σε μεταβολή της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Αναλυτικά η μέση τιμή της ενζυματικής δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.307 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.329 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση κατά 7.16 % . Η μεταβολή αυτή δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή 0.238 . Κατά συνέπεια η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (5×10^{-5} M) για 14 ώρες δεν προκαλεί μεταβολή της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης .

Πειραματική ομάδα : # 106

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M (Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης (Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης) .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.581 ± 0.055

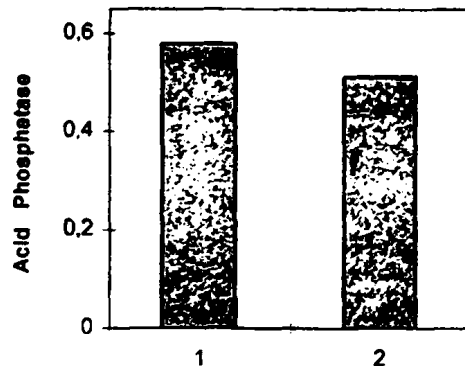
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.509 ± 0.033

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 12.39 % .

t-statistic : 3.873

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P = 0.001$.

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης (Χαμηλή Δόση) για 14 ώρες οδήγησε στην μείωση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης . Αναλυτικά η μέση τιμή ενζυματικής δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.581 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.509 $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 12.39 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P = 0.001$. Τα αποτελέσματα αυτά μας αποδεικνύουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) για 14 ώρες προκαλεί μια σημαντική μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Στην βιβλιογραφία τα γλυκοκορτικοειδή έχουν συσχετιστεί με την μείωση της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου (Rinehart και συν., 1982) .

Πειραματική ομάδα : # 107

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη 5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.225 ± 0.042

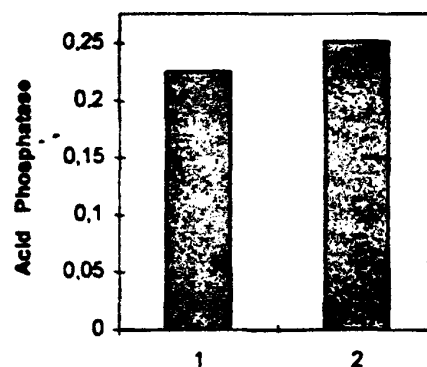
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.251 ± 0.087

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.55 % .

t-statistic : -0.936

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.359



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Αναλυτικά η μέση τιμή ενζυματικής δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.225 ± 0.042 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.251 ± 0.087 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της τάξης του 11.55 % , που όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική αφού ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.359 . Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Σεροτονίνη δεν προκαλεί κάποια μεταβολή της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Αντιθέτως στην πειραματική ομάδα # 89 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με Σεροτονίνη επί 14 ώρες προκαλούσε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στα περιτοναϊκά μακροφάγα .

Πειραματική ομάδα : # 108

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 2×10^{-6} M (2 μM) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.225 ± 0.042

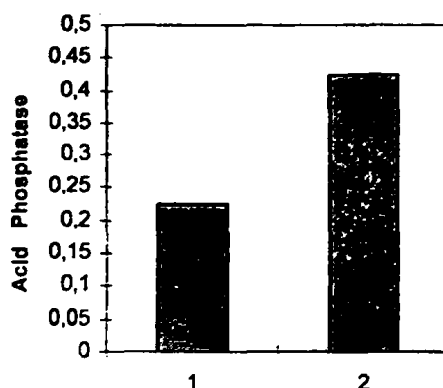
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.423 ± 0.093

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 88 %

t-statistic : -6.783

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης για 14 ώρες οδήγησε στην αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 88 % . Η μέση τιμή ενζυματικής δραστηριότητας για τους μάρτυρες ήταν 0.225 ± 0.042 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν 0.423 ± 0.093 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 88 % που φυσικά ήταν Στατιστικώς Σημαντική ($P < 0.001$) . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Ισταμίνη για 14 ώρες προκαλεί σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Το αποτέλεσμα αυτό έχει μεγάλο ενδιαφέρον επειδή η μόνη άλλη μελέτη για την επίδραση της Ισταμίνης στα λυσοσωματικά ένζυμα των μακροφάγων αφορούσε μη-ενεργοποιημένα μακροφάγα (Cluzel και συν.,1990) , ενώ στην πειραματική ομάδα # 90 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Ισταμίνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Η διαφορά αυτή στην απόκριση των δύο τύπων μακροφάγων στην Ισταμίνη μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη ποσότητα Ισταμινεργικών υποδοχέων στην επιφάνεια των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων (Diaz και συν.,1979) .



Πειραματική ομάδα : # 109

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGD₂ 10⁻⁵ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10⁻⁵ M PGD₂ για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.583 \pm 0.055

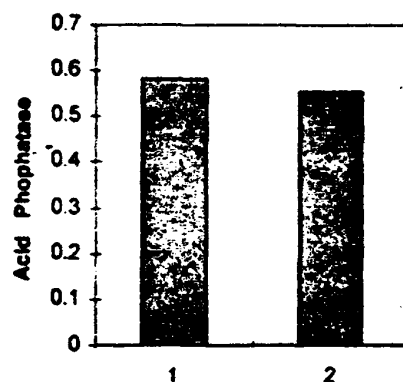
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.555 \pm 0.075

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 4.8 % (μικρή τάση μείωσης) .

t-statistic : 1.019

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : P = 0.319 .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ για 14 ώρες δεν προκαλεί καμιά μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων της Οξίνης Φωσφατάσης ήταν 0.583 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.555 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ για τα πειραματικά , δηλαδή υπάρχει μια τάση μείωσης κατά 4.8 % . Η μεταβολή αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P έχει τιμή P = 0.319 . Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ δεν προκαλεί κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα του ενζύμου , ενώ στην πειραματική ομάδα # 58 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ οδηγούσε σε σημαντική μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Δεν υπάρχουν ανακοινώσεις στην διεθνή βιβλιογραφία που να αναφέρουν ανίχνευση υποδοχέων για την PGD₂ στην επιφάνεια των μακροφάγων .

Πειραματική ομάδα : # 110

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃ .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) $2,5 \times 10^{-7}$ M , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την Vit.D₃ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με Vit.D₃ .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 15

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ θα προκαλέσει κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.850 \pm 0.066**

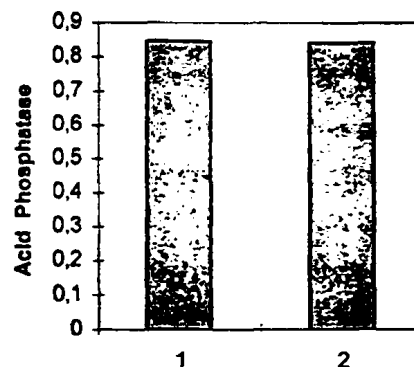
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.839 \pm 0.073**

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 1.29 % .

t-statistic : 0.438

Βαθμοί Ελευθερίας : 28

P value : P = 0.665 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ επί 14 ώρες δεν προκαλούσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων της Ώξινης Φωσφατάσης ήταν 0.850 και 0.839 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά αντίστοιχα . Η μείωση που εμφανίστηκε ήταν της τάξης του 1.29 % και δεν ήταν στατιστικώς σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.665 . Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η Vit.D₃ δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , όπως ακριβώς δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στα περιτοναϊκά μακροφάγα της πειραματικής ομάδας # 95 .

Πειραματική ομάδα : # 111

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D₃.

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) 2.5×10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Vit.D₃ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2.5×10^{-7} M Vit.D₃ θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.565 ± 0.037

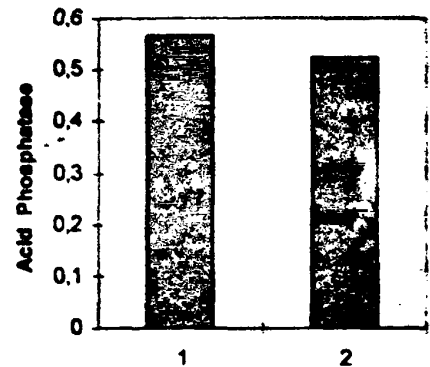
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.524 ± 0.042

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 7.25 % .

t-statistic : 3.554

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Vit.D₃ προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης κατά 7.25 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική με δείκτη P = 0.001 . Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν 0.565 ± 0.037 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα , ενώ για τα πειραματικά ήταν 0.524 ± 0.042 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Vit.D₃ οδήγησε στην μείωση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης , ενώ αντιθέτως στην πειραματική ομάδα # 96 η επώαση των περιτοναϊκών κυττάρων με LPS + Vit.D₃ οδήγησε στην αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου . Δεν υπάρχουν δεδομένα στην διεθνή βιβλιογραφία που να επιτρέπουν την ερμηνεία αυτής της διαφοράς αποκρίσεων στα δύο είδη μακροφάγων .

Πειραματική ομάδα : # 112

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα)

Διεγέρτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης θα προκαλούσε μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξινής Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.844 ± 0.125

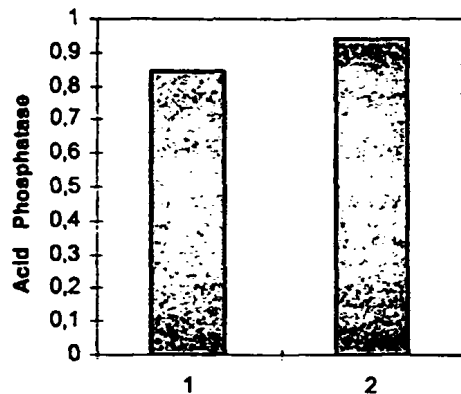
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.943 ± 0.152

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 11.72 % .

t-statistic : -2.443

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.018

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης επί 14 ώρες προκαλούσε αύξηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης . Πιο συγκεκριμένα η μέση τιμή των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν $0.844 \pm 0.125 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και $0.943 \pm 0.152 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης του 11.72 % και ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.018 , δηλαδή η μεταβολή ήταν Στατιστικώς Σημαντική . Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης . Στην πειραματική ομάδα # 97 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ + Αδρεναλίνη οδήγησε στην μείωση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης . Δεν υπάρχουν στοιχεία στην διεθνή βιβλιογραφία που να εξηγούν τον πιθανό μηχανισμό αυτής της διαφορετικής αντίδρασης των δύο τύπων μακροφάγων .

Πειραματική ομάδα : # 113

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διευέριτης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INF γ + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.027 ± 0.089

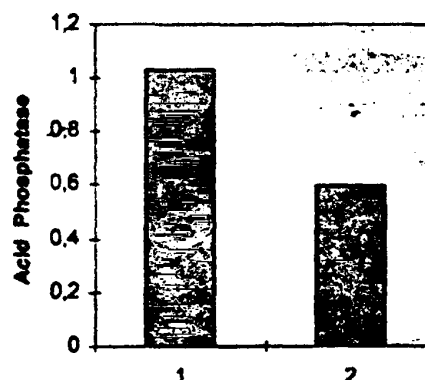
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.600 ± 0.109

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 41.57 % .

t-statistic : 10.539

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INF γ + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε την μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 41.57 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Η μέση τιμή δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν $1.027 \pm 0.089 \mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και για τα πειραματικά ήταν $0.600 \pm 0.109 \mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνεται ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με Ιντερφερόνη- γ και Δεξαμεθαζόνη για 14 ώρες προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης .

Πειραματική ομάδα : # 114

Θέμα : Μέτρηση δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη . Σύγκριση με μακροφάγα που δεν έλαβαν καμία διέγερση (basal-state macrophages) .

Τύπος κυττάρων : Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη- γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με INF γ + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 12

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ο βαθμός της κατασταλτικής επίδρασης που ασκεί η Δεξαμεθαζόνη στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.841 ± 0.113

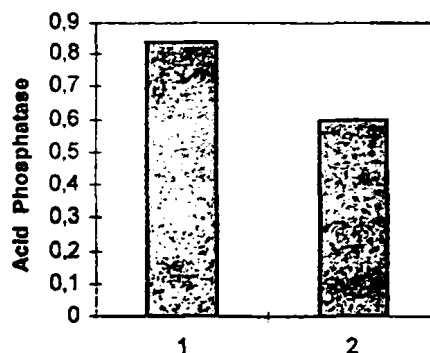
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.598 ± 0.127

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 28.89 % .

t-statistic : 4.935

Βαθμοί Ελευθερίας : 22

P value : $P < 0.001$.

**Αναλυτικά αποτελέσματα :**

Διαπιστώθηκε ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία είχαν επωαστεί επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ + 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης παρουσίαζαν δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης κατά 28.89 % χαμηλότερη από εκείνη που παρουσίαζαν κύτταρα τα οποία δεν είχαν λάβει καμία απολύτως διέγερση . Οι μέσες τιμές ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν 0.841 ± 0.113 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.598 ± 0.127 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η διαφορά των δύο ομάδων ήταν 28.89 % και ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για 14 ώρες προκαλεί πολύ έντονη μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , οδηγώντας την σε επίπεδο χαμηλότερο και από εκείνο που έχουν τα μακροφάγα σε κατάσταση ηρεμίας .



Πειραματική ομάδα : # 115

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες .

Τύπος κυτάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$, για 12 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 12 ώρες με LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 20

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποια επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 12 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.147 ± 0.007

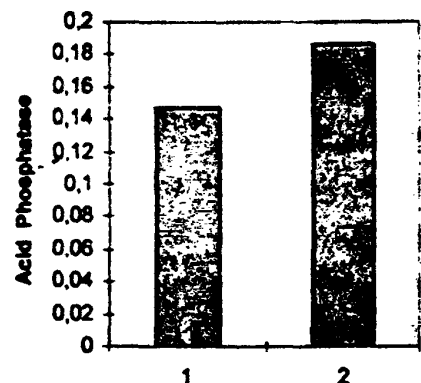
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.187 ± 0.008

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 27.21 % .

t-statistic : -17.040

Βαθμοί Ελευθερίας : 38

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 12 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 27.21 % . Η μέση τιμή των ενζυματικών δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες ήταν $0.147 \pm 0.007 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ και για τα πειραματικά ήταν $0.187 \pm 0.008 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$. Από αυτά τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 12 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκαλούσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Επίσης στην πειραματική ομάδα # 80 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με χαμηλή δόση ενδοτοξίνης προκαλεί την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας , ενώ σε άλλα πειράματα (# 79 και # 98) διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών και των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με μεγαλύτερες δόσεις LPS προκαλεί την μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας (πιθανώς λόγω εξωκύττωσης των λυσοσωματικών ενζύμων) .



Πειραματική ομάδα : # 116

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Τύπος κυτάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 1 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 10

Σκοπός του πειράματος : Το πείραμα αυτό αποτελεί συμπλήρωμα του # 115 , ώστε να διαπιστωθεί αν με την παράταση της επώασης των κυττάρων Kupffer με χαμηλή δόση LPS θα προκληθεί μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.122 ± 0.008

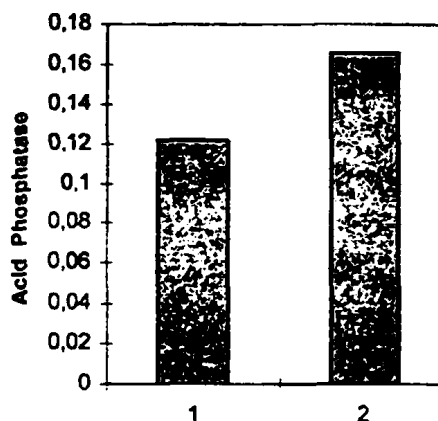
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.166 ± 0.008

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 36.06 % .

t-statistic : -12.050

Βαθμοί Ελευθερίας : 18

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 36.06 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P < 0.001$. Αναλυτικά οι μέσες τιμές δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες και τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα $0.122 \pm 0.008 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και $0.166 \pm 0.008 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Τα αποτελέσματα αυτά (μαζί με εκείνα της ομάδας # 115) δείχνουν ότι η παράταση της επώασης των κυττάρων Kupffer με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS κατά 2 ώρες προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης από 127.21 % του μάρτυρα σε 136.06 % του μάρτυρα .



Πειραματική ομάδα : # 117

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξινή Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από τον LPS .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 34

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS επί 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξινής Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.547 ± 0.107

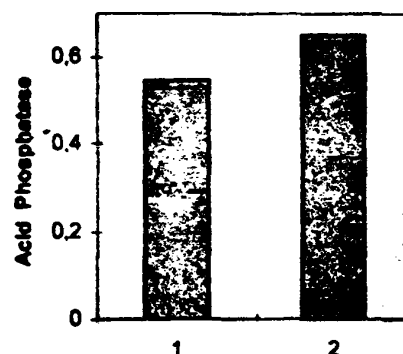
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.651 ± 0.063

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 19.01 % .

t-statistic : -4.870

Βαθμοί Ελευθερίας : 66

P value : $P < 0.001$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης κατά 19.01 % . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.001$. Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα $0.547 \pm 0.107 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και $0.651 \pm 0.063 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Από τα στοιχεία αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS οδηγεί στην σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης .

Πειραματική ομάδα : # 118

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης σε κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με 250 units/ml Ιντερφερόνης-γ .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξινής Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ιντερφερόνη-γ (INF γ) 250 units/ml , για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια άλλη πειραματική ουσία εκτός από την INF γ .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με INF γ .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 30

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ προκαλεί κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξινής Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.286 ± 0.056

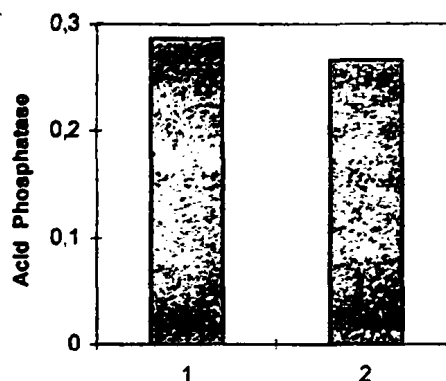
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.266 ± 0.061

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 6.99 % .

t-statistic : 1.268

Βαθμοί Ελευθερίας : 58

P value : P = 0.210 (Στατιστικά Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ δεν προκαλούσε ουσιαστικά κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξινής Φωσφατάσης . Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν $0.286 \pm 0.056 \mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα και $0.266 \pm 0.061 \mu\text{g/ml PO}_4^{-3}$ ανά ώρα , για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά αντίστοιχα . Η μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν μια μείωση της τάξης του 6.99 % , αλλά λόγω των μεγάλων Σταθερών Αποκλίσεων δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική (P = 0.210) . Από τα στοιχεία αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με INF γ δεν προκαλεί μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξινής Φωσφατάσης , όπως ακριβώς στην πειραματική ομάδα # 67 διαπιστώθηκε ότι η Ιντερφερόνη-γ δεν οδηγούσε σε μεταβολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer .



Πειραματική ομάδα : # 119

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Αδρεναλίνη 10^{-4} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Αδρεναλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 14 ώρες .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.182 ± 0.038

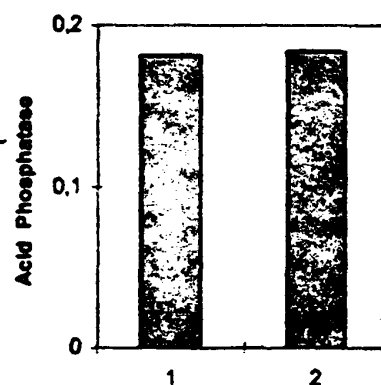
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.184 ± 0.039

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 1.09 % .

t-statistic : -0.209

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : P = 0.835 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνη για 14 ώρες δεν προκάλεσε μεταβολή της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Ο δείκτης P είχε τιμή 0.835 . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων Οξίνης Φωσφατάσης ήταν 0.182 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.184 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Από αυτά τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης , όπως ακριβώς στις πειραματικές ομάδες # 83 και # 100 η επώαση των περιτοναϊκών και βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Αδρεναλίνη δεν επηρέασε την ενζυματική δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης των κυττάρων αυτών . Είναι πιθανό η οδός του cAMP να μην επιδρά στους μηχανισμούς που ελέγχουν την παραγωγή ή την έκκριση (εξωκύτωση) της Οξίνης Φωσφατάσης .

Πειραματική ομάδα : # 120

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ντοπαμίνη $2,5 \times 10^{-5}$ M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ντοπαμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνη θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.234 ± 0.029

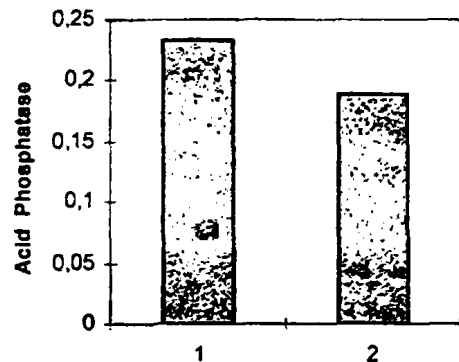
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.189 ± 0.039

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 19.23 % .

t-statistic : 5.937

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : $P < 0.001$.



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-5}$ M Ντοπαμίνης επί 14 ώρες προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 19.23 % . Η μείωση αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική και ο δείκτης P είχε τιμή $P < 0.001$. Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης ήταν 0.234 ± 0.029 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.189 ± 0.039 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνεται ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Ντοπαμίνη προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Αντιθέτως στις πειραματικές ομάδες # 84 και # 101 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με LPS + Ντοπαμίνη προκάλεσε την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας στα περιτοναϊκά μακροφάγα και καμία μεταβολή στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Δεν είναι γνωστή η αιτία για την οποία οι τρεις τύποι μακροφάγων αποκρίνονται διαφορετικά στην επώαση με LPS + Ντοπαμίνη , ούτε το γιατί η Αδρεναλίνη και η Ντοπαμίνη δεν ασκούν τις ίδιες επιδράσεις στα κύτταρα αυτά .

Πειραματική ομάδα : # 121

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης σε κύτταρα Kupffer τα οποία επώσθησαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

14

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer)

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ινσουλίνη 25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώσθησαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώσθησαν επί 14 ώρες με LPS + Ινσουλίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ξενών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διερευνηθεί ποια επίδραση στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης θα είχε η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνη .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.255 ± 0.053

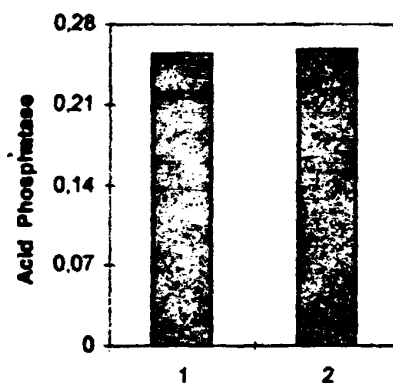
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.257 ± 0.060

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 0.78 %

t-statistic : -0.178

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : $P = 0.859$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Η μέση τιμή των δραστηριοτήτων ήταν 0.255 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 0.257 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και τα πειραματικά αντίστοιχα , δηλαδή παρουσιάστηκε αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας κατά 0.78 % . Η μεταβολή αυτή δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή $P = 0.859$. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Ινσουλίνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Το ίδιο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε και με τα περιτοναϊκά μακροφάγα στην πειραματική ομάδα # 85 , ενώ αντιθέτως στην πειραματική ομάδα # 102 τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασαν αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητάς τους .



Πειραματική ομάδα : # 122

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης σε κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Γλυκαγόνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Γλυκαγόνη 10^{-7} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν με LPS + Γλυκαγόνη για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 40

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποιά επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.238 ± 0.038

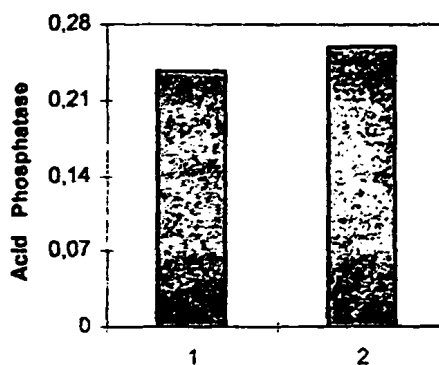
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.259 ± 0.039

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 8.82 % .

t-statistic : -2.513

Βαθμοί Ελευθερίας : 78

P value : P = 0.014



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-7} M Γλυκαγόνης επί 14 ώρες προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 8.82 % . Πιο συγκεκριμένα οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν 0.238 ± 0.038 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.259 ± 0.039 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Η μεταβολή αυτή ήταν Στατιστικώς Σημαντική , αφού ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.014 . Από τα αποτελέσματα αυτά είναι φανερό ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Γλυκαγόνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Γλυκαγόνη δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα (πειραματική ομάδα # 86) ενώ η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Γλυκαγόνη προκάλεσε την σημαντική μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης (πειραματική ομάδα # 103) .



Πειραματική ομάδα : # 123

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Νευροπεπτιδίο Υ .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Νευροπεπτιδίο Υ (NPY) 1.25 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + NPY .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποιά επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1.25 $\mu\text{g/ml}$ NPY .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.285 ± 0.075

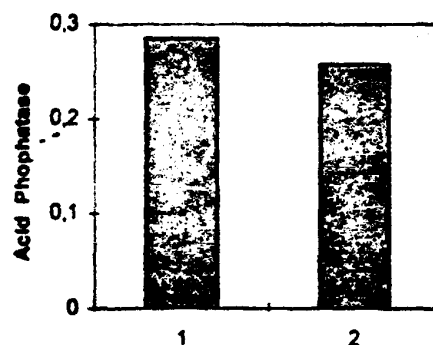
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.258 ± 0.090

Μεταβολή (%) : Μείωση κατά 9.47 % .

t-statistic : 1.301

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : P = 0.198 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 1.25 $\mu\text{g/ml}$ NPY οδήγωσε σε μια τάση μείωσης της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης , η οποία όμως δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική (P = 0.198) . Αναλυτικά , οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν 0.285 ± 0.075 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και 0.258 ± 0.090 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά , δηλαδή υπάρχει μείωση της τάξης του 9.47 % που υπερκαλύπτεται όμως από τις μεγάλες Σταθερές Αποκλίσεις . Από αυτά τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + NPY δεν προκαλεί μεταβολή στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα επίσης δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή της ενζυματικής τους δραστηριότητας μετά από επώαση με LPS + NPY (πειραματική ομάδα # 87) , ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασαν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης μετά από επώαση με LPS + NPY (πειραματική ομάδα # 104) .



Πειραματική ομάδα : # 124

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Δεξαμεθαζόνη $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Δεξαμεθαζόνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί ποιά επίδραση θα είχε στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ Δεξαμεθαζόνης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.506 ± 0.136

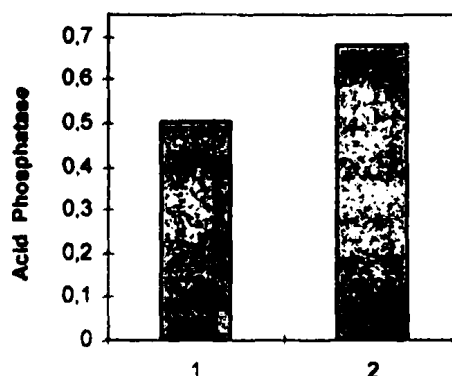
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.681 ± 0.198

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 34,58 % .

t-statistic : -3.582

Βαθμοί Ελευθερίας : 42

P value : P = 0.001



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 34,58 % . Η μεταβολή αυτή είχε δείκτη P = 0.001 και συνεπώς ήταν Στατιστικώς Σημαντική . Η μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων ήταν $0.506 \pm 0.136 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τους μάρτυρες και $0.681 \pm 0.198 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα για τα πειραματικά . Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Δεξαμεθαζόνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης , είτε λόγω αναστολής της εξωκύτωσης του ενζύμου ή λόγω αύξησης της σύνθεσής του . Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά από την επώαση με την Δεξαμεθαζόνη έρχεται σε αντίθεση με τις δημοσιεύσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας (Rinehart και συν., 1982) .



Πειραματική ομάδα : # 125

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS . .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 16

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Σεροτονίνης για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.160 ± 0.006

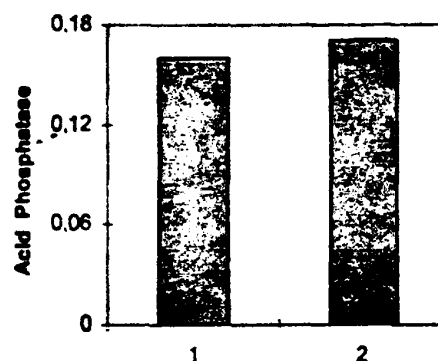
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.170 ± 0.010

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 6.25 % .

t-statistic : -3.470

Βαθμοί Ελευθερίας : 30

P value : $P = 0.002$



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Σεροτονίνης προκαλούσε την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 6.25 % . Η μεταβολή αυτή που παρατηρήθηκε ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη $P = 0.002$. Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων Οξίνης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα $0.160 \pm 0.006 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και $0.170 \pm 0.010 \mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Από τα στοιχεία αυτά διαπιστώνουμε ότι η επώαση των ηπατικών φαγοκυττάρων με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης . Στην επόμενη πειραματική ομάδα (# 126) θα επαναληφθούν τα ίδια πειράματα με διπλάσια συγκέντρωση της ενδοτοξίνης (2 $\mu\text{g/ml}$) .

Πειραματική ομάδα : # 126

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα)

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Σεροτονίνη 5×10^{-5} M , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη για 14 ώρες .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 31

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες θα προκαλέσει την ίδια αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης η οποία παρατηρήθηκε και στην πειραματική ομάδα # 125 , όπου χρησιμοποιήθηκε μικρότερη δόση ενδοτοξίνης . Να σημειωθεί ότι στα δύο πειράματα της ομάδας # 126 χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από μια διαφορετική παρτίδα (lot) σε σχέση με τα πειράματα της ομάδας # 125 .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.155 ± 0.160

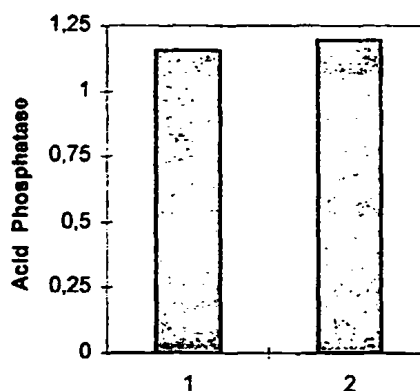
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 1.197 ± 0.180

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 3.63 % .

t-statistic : -0.968

Βαθμοί Ελευθερίας : 60

P value : P = 0.337 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης δεν προκαλούσε την ίδια αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης με την πειραματική ομάδα # 125 . Η μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν μια τάση αύξησης κατά 3.63 % , που δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική , με δείκτη P = 0.337 . Οι μέσες τιμές των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 1.155 ± 0.160 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 1.197 ± 0.180 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Οι δραστηριότητες στην πειραματική ομάδα # 126 είναι αρκετά μεγαλύτερες , αλλά αυτό οφείλεται μάλλον στις διαφορετικές παρτίδες ορισμένων αντιδραστηρίων . Από τα στοιχεία αυτά διαπιστώνουμε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη δεν προκαλεί κάποια αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ αντιθέτως η επώαση των κυττάρων Kupffer με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS + Σεροτονίνη προκαλούσε αύξηση κατά 6.25 % . Ο μηχανισμός αυτής της διαφορετικής αντίδρασης δεν είναι ακριβώς κατανοητός αλλά είναι πιθανό ότι σχετίζεται με μια παλαιότερη παρατήρηση για την Σεροτονίνη , δηλαδή ότι επιτείνει την φαγοκυττάρωση σε μακροφάγα που έχουν υποστεί ασθενή διέγερση με χαμηλή δόση INF γ ενώ παράλληλα καταστέλλει την φαγοκυττάρωση σε μακροφάγα που έχουν υποστεί ισχυρή διέγερση με υψηλές δόσεις INF γ (Sternberg και συν., 1987) .

Πειραματική ομάδα : # 127

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) .

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα) .

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, για 14 ώρες .

Πειραματική ουσία : Ισταμίνη 2×10^{-6} M (2 μM) , για 14 ώρες .

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS .

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Ισταμίνη .

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 32

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης .

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.611 ± 0.127

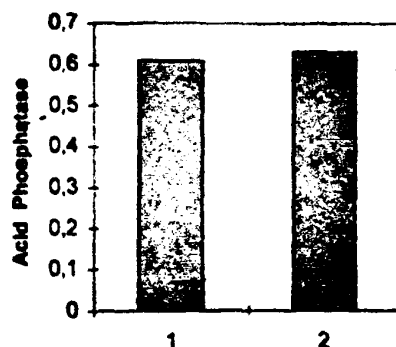
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.628 ± 0.127

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 2.78 % .

t-statistic : -0.520

Βαθμοί Ελευθερίας : 62

P value : $P = 0.605$ (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή) .



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 2 μM Ισταμίνης για 14 ώρες προκαλούσε μια μικρή τάση αύξησης της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 0.611 ± 0.127 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 0.628 ± 0.127 $\mu\text{g}/\text{ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα . Παρατηρήθηκε δηλαδή μια μικρή τάση αύξησης που ήταν της τάξης του 2.78 % που όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική και ο δείκτης P είχε τιμή $P = 0.605$. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Ισταμίνη δεν προκαλεί κάποια μεταβολή της Οξίνης Φωσφατάσης , όπως επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα περιτοναϊκά μακροφάγα της πειραματικής ομάδας # 90 , ενώ αντίθετως στην πειραματική ομάδα # 108 παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων .

Πειραματική ομάδα : # 128

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επωάστηκαν με επί 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Τύπος κυτάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer).

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα).

Διενέριτης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες.

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGD₂ 10^{-5} M, για 14 ώρες.

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS.

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επωάστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGD₂.

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 21

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGD₂ για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.438 ± 0.106

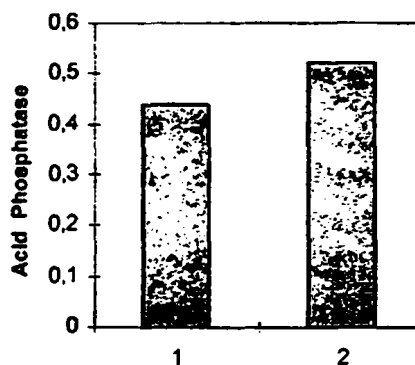
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.522 ± 0.115

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 19.17 %.

t-statistic : -2.438

Βαθμοί Ελευθερίας : 40

P value : P = 0.019



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGD₂ για 14 ώρες προκαλούσε μια αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης. Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 0.438 ± 0.106 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 0.522 ± 0.115 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα. Παρατηρήθηκε δηλαδή μια αύξησης της τάξης του 19.17 %, η οποία ήταν Στατιστικώς Σημαντική και ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.019. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + PGD₂ προκαλούσε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης, ενώ δεν είχε προκαλέσει κάποια τέτοια μεταβολή στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα των πειραματικών ομάδων # 94 και # 109. Αντιθέτως η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + PGD₂ προκάλεσε την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου (# 58) χωρίς να επηρεάσει την παράμετρο αυτή στα άλλα είδη μακροφάγων.

44
27



Πειραματική ομάδα : # 129

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGE₂.

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer).

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα)

Διενέργεια : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες.

Πειραματική ουσία : Προσταγλανδίνη PGE₂ 10^{-5} M, για 14 ώρες.

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS.

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + PGE₂.

Αριθμός πειραμάτων : 3 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 28

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.205 \pm 0.070**

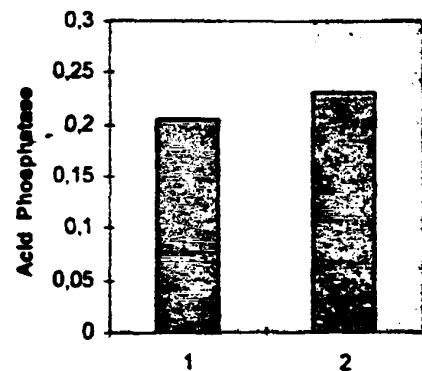
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : **0.231 \pm 0.102**

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 12.68 %.

t-statistic : -1.115

Βαθμοί Ελευθερίας : 54

P value : P = 0.270 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή).



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M PGE₂ για 14 ώρες προκάλεσε τάση αύξησης της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης, η οποία όμως ήταν Στατιστικώς Μη-σημαντική (P = 0.270). Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 0.205 \pm 0.070 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 0.231 \pm 0.102 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα. Παρατηρήθηκε δηλαδή τάση αύξησης της τάξης του 12.68 % που δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + PGE₂ δεν προκαλούσε κάποια μεταβολή της Οξίνης Φωσφατάσης, αποτέλεσμα αναμενόμενο αφού ούτε η αδρεναλίνη που επίσης δρα μέσω της αύξησης του cAMP προκάλεσε μεταβολή της ενζυματικής δραστηριότητας στα ηπατικά μακροφάγα (πειραματική ομάδα # 119).

Πειραματική ομάδα : # 130

Θέμα : Μέτρηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από κύτταρα Kupffer τα οποία επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + 1,25-Διυδροξύ-Βιταμίνη D₃.

Τύπος κυττάρων : Ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer).

Παράμετρος που μετρήθηκε : Δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης (σε $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα)

Διενέργης : Ενδοτοξίνη (LPS) 2 $\mu\text{g/ml}$, για 14 ώρες.

Πειραματική ουσία : 1,25-Διυδροξύ-Βιταμίνη D₃ (Vit.D₃) $2,5 \times 10^{-7}$ M, για 14 ώρες.

Μάρτυρες (Controls) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS.

Πειραματικά (Experimentals) : Κύτταρα που επώαστηκαν επί 14 ώρες με LPS + Vit.D₃.

Αριθμός πειραμάτων : 2 **Συνολικός αριθμός παρατηρήσεων (ζευγών control-experimental) :** 24

Σκοπός του πειράματος : Να διαπιστωθεί εάν η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ για 14 ώρες θα προκαλούσε κάποια μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης.

Αποτελέσματα :

Μέση τιμή controls (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.307 ± 0.089

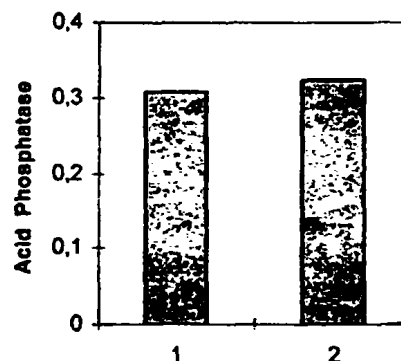
Μέση τιμή experimentals (\pm Σταθερή Απόκλιση) : 0.322 ± 0.083

Μεταβολή (%) : Αύξηση κατά 4.88 %.

t-statistic : -0.593

Βαθμοί Ελευθερίας : 46

P value : P = 0.556 (Στατιστικώς Μη-σημαντική Μεταβολή).



Αναλυτικά αποτελέσματα :

Η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D₃ για 14 ώρες προκαλούσε μια μικρή τάση αύξησης της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης. Οι μέσες τιμές των ενζυματικών δραστηριοτήτων για τους μάρτυρες και για τα πειραματικά ήταν αντίστοιχα 0.307 ± 0.089 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα και 0.322 ± 0.083 $\mu\text{g/ml PO}_4^{3-}$ ανά ώρα. Παρατηρήθηκε δηλαδή αύξηση της τάξης του 4.88 % που όμως δεν ήταν Στατιστικώς Σημαντική και ο δείκτης P είχε τιμή P = 0.556. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS + Vit.D₃ δεν προκαλούσε κάποια μεταβολή της Ώξινης Φωσφατάσης. Αντιθέτως, στις πειραματικές ομάδες # 96 και # 111 διαπιστώθηκε ότι η επώαση με LPS + Vit.D₃ προκαλούσε αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά μακροφάγα και μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα.

ΠΕΡΙ ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΗΣ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ

Η επιστήμη της μαθηματικής και της φυσικής επιστήμης είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανάλυση των φαινομένων της φύσης και της κοινωνίας. Η μαθηματική είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων, ενώ η φυσική επιστήμη ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων της φύσης. Η μαθηματική και η φυσική επιστήμη είναι στενά συνδεδεμένες και η ανάπτυξη της μιας επιστήμης οδηγεί στην ανάπτυξη της άλλης.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μαθηματική και η φυσική επιστήμη είναι στενά συνδεδεμένες και η ανάπτυξη της μιας επιστήμης οδηγεί στην ανάπτυξη της άλλης. Η μαθηματική είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων, ενώ η φυσική επιστήμη ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων της φύσης. Η μαθηματική και η φυσική επιστήμη είναι στενά συνδεδεμένες και η ανάπτυξη της μιας επιστήμης οδηγεί στην ανάπτυξη της άλλης.

Η επιστήμη της μαθηματικής και της φυσικής επιστήμης είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανάλυση των φαινομένων της φύσης και της κοινωνίας. Η μαθηματική είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων, ενώ η φυσική επιστήμη ασχολείται με την ανάλυση των ποσοτικών φαινομένων της φύσης.



ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .

Γενικά στοιχεία .

Στις επόμενες σελίδες θα αναπτυχθούν τα αποτελέσματα των μορφολογικών πειραμάτων που έγιναν με περιτοναϊκά και με βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Οι εικόνες που παρουσιάζονται μέσα στα κείμενα που ακολουθούν έχουν προέλθει από έγχρωμες ή ασπρόμαυρες φωτογραφίες μεγέθους 13 x 18 εκατοστών οι οποίες σαρώθηκαν σε έναν σαρωτή (scanner) τύπου Primax 9600 Profi , με την βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας MGI Photosuite SE . Επεξεργασία εικόνας δεν έγινε στις περισσότερες εικόνες , ενώ σε ελάχιστες έγινε μόνο διόρθωση της φωτεινότητας κατά 5 % . Σε ορισμένες εικόνες έχει γίνει μικρού βαθμού μεγέθυνση (περίπου κατά 15 %) για να διευκολυνθεί η παρατήρηση λεπτομερειών του πυρήνα ή του κυτταροπλάσματος . Οι μεγεθύνσεις αυτές έχουν γίνει με τεχνική zoom ώστε να είναι συμμετρική η αύξηση σε όλους τους άξονες και να μην παραμορφωθεί το σχήμα των απεικονιζόμενων κυττάρων .

Η ρύθμιση των παραμέτρων σάρωσης ήταν :

1. Για τις έγχρωμες εικόνες : Χρωματική Απόδοση *Truecolor* , Ανάλυση x 125 .
2. Για τις ασπρόμαυρες εικόνες : Χρωματική Απόδοση *Grayscale* , Ανάλυση x 180 .

Η εκτύπωση των εικόνων έγινε μέσω της μετατροπής τους σε bitmaps και εισαγωγής τους στο κείμενο του Microsoft Word 7.0 . Η εκτύπωση έγινε με την βοήθεια ενός εκτυπωτή τύπου Lexmark 2050 Color Ink Jet Printer , ρυθμισμένο σε παραμέτρους Χρωματικής Απόδοσης «Natural Color» και Ποιότητας Εκτύπωσης «Presentation» .

Τα υπόλοιπα ειδικά στοιχεία για τον σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραμάτων και για την μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων αναφέρονται στο κεφάλαιο 10 («Υλικά - Μέθοδοι») . Απλά θα σημειωθεί εδώ ότι κάθε ένα από τα πειράματα που αναφέρονται στις επόμενες σελίδες έχει εκτελεστεί εις διπλούν και σε δύο χωριστές καλλιέργειες κάθε φορά . Οι παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα που αναφέρονται προκύπτουν από την μελέτη όλου του πειραματικού υλικού . Οι φωτογραφίες όμως που παρουσιάζονται έχουν ληφθεί από αντιπροσωπευτικά οπτικά πεδία σε πλακίδια μικροσκόπησης .

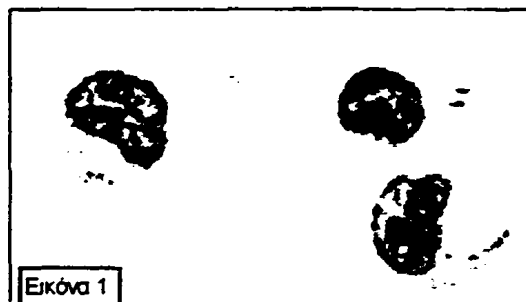
Το υλικό που θα παρουσιαστεί περιλαμβάνει επτά πειράματα μορφολογικής εκτίμησης με την εφαρμογή χρώσης Giemsa καθώς και δύο πειράματα ιστοχημικής ανίχνευσης Οξίνης Φωσφατάσης . Επειδή τα δύο ιστοχημικά πειράματα της Οξίνης Φωσφατάσης δεν απέδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα θα παρουσιαστούν μαζί , χωρίς να παρουσιαστούν εικόνες . Επίσης υπήρχε και μία 8^η πειραματική ομάδα μορφολογικής εκτίμησης με χρώση Giemsa , η οποία αφορούσε στην εκτίμηση της επίδρασης των τριών αμινών Σεροτονίνη , Ισταμίνη και Ντοπαμίνη στις καλλιέργειες περιτοναϊκών μακροφάγων που επώαστηκαν με LPS για 14 ώρες . Επειδή η ομάδα αυτή δεν έδωσε πρακτικώς κανένα αποτέλεσμα έχει παραληφθεί τελείως η παρουσίαση εικόνων από αυτήν .



ΠΕΙΡΑΜΑ # 1 . ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

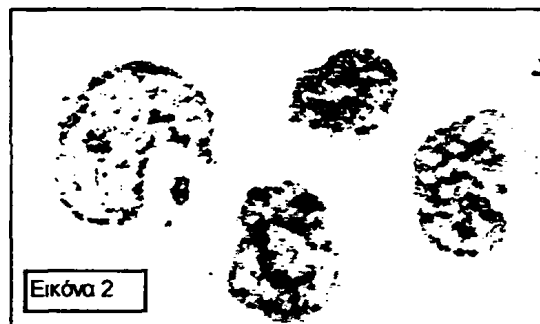
Στο πείραμα # 1 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από φυσιολογικούς επίμυες Wistar , τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες . Στην πρώτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 4 ώρες χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας . Στην δεύτερη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 4 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS . Στην τρίτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 4 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης . Στην τέταρτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 4 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνη + 10^{-5} M Θεοφυλλίνη .

Στην εικόνα 1 (πρώτη ομάδα) απεικονίζονται χαρακτηριστικά περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν επωαστεί μόνο με καλλιεργητικό υλικό , χωρίς κάποια προσθήκη διεγέρτη ή πειραματικής ουσίας . Ο πυρήνας τους έχει το χαρακτηριστικό νεφροειδές σχήμα , ομαλό περίγραμμα και είναι καλά αφορισμένος . Τα μακροφάγα διαθέτουν άφθονο κυτταρόπλασμα που περιβάλλει τον πυρήνα τους .



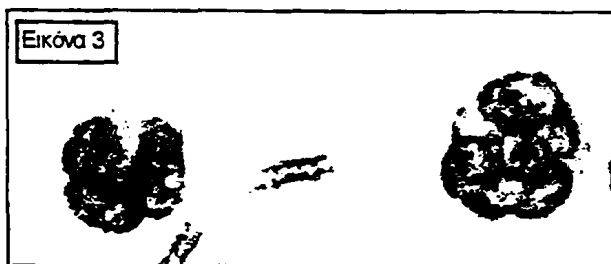
Εικόνα 1

Στην εικόνα 2 (δεύτερη ομάδα) απεικονίζονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 4 ώρες με LPS και ήδη παρουσιάζουν χαρακτηριστικές μεταβολές . Το μέγεθός τους παρουσιάζει μικρή αύξηση . Ο πυρήνας τους παρουσιάζει μεγάλη αύξηση . Λόγω της μεγάλης αύξησης του μεγέθους του πυρήνα διακρίνεται λιγότερο κυτταρόπλασμα γύρω του . Επίσης ο πυρήνας είναι αραιοχρωματικός και φαίνεται σαν να παρουσιάζει μετατόπιση της χρωματίνης του στην περιφέρεια . Ορισμένες φορές η περιφέρεια του πυρήνα γίνεται πιο ανώμαλη .

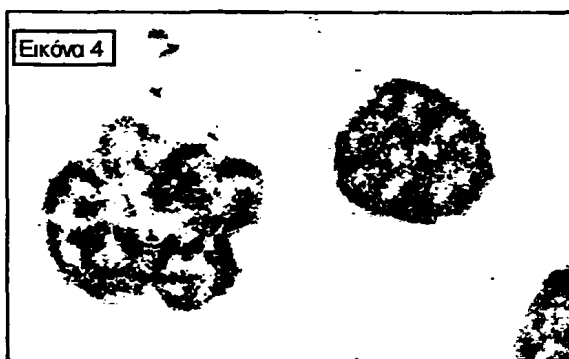


Εικόνα 2

Στις εικόνες 3 και 4 (τρίτη ομάδα) απεικονίζονται περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν επί 4 ώρες με LPS και Αδρεναλίνη . Στις εικόνες αυτές είναι ευκρινώς ορατό ότι αυξάνεται η λόβωση του πυρήνα τους και γενικά η πολυπλοκότητα του σχήματός του .



Εικόνα 3



Εικόνα 4

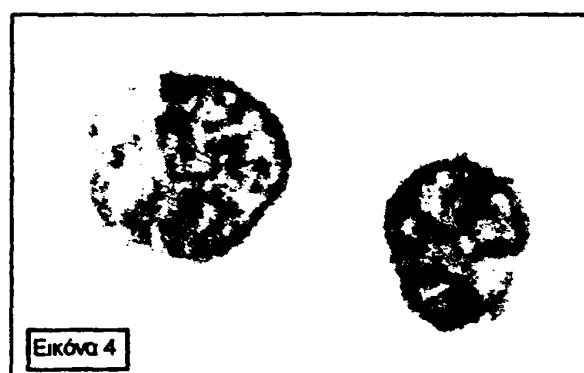
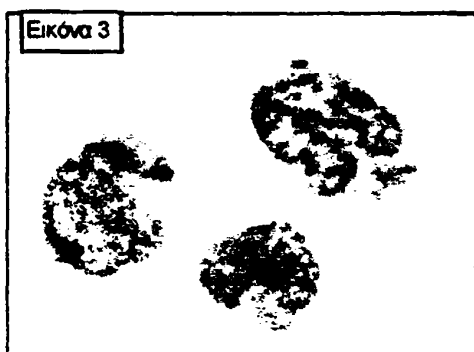
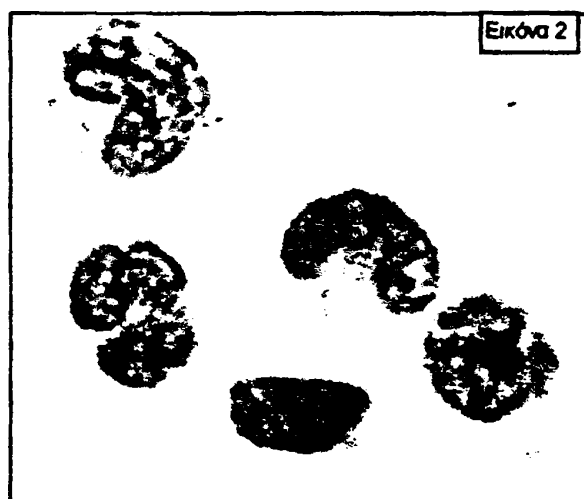
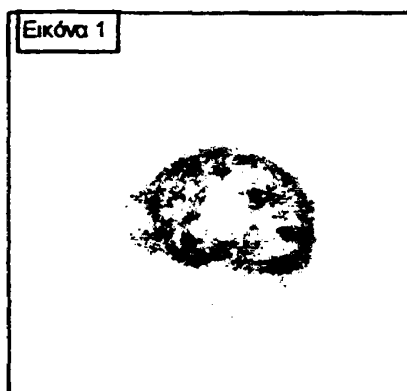
Μια τάση για μικρή ελάττωση του μεγέθους των κυττάρων που έλαβαν LPS και Αδρεναλίνη δεν έγινε δυνατό να καταδειχθεί με αναμφισβήτητο τρόπο . Οι μεταβολές που προκάλεσε η Αδρεναλίνη στην μορφολογία του πυρήνα των κυττάρων παρουσίασαν πολύ ελαφρά επίταση με την προσθήκη της Θεοφυλλίνης στο καλλιεργητικό υλικό . Δεν θα παρατεθούν εδώ εικόνες από την τέταρτη ομάδα .

ΠΕΙΡΑΜΑ # 2 . ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Στο πείραμα # 2 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από φυσιολογικούς επίμυες Wistar , τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες . Στην πρώτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό , χωρίς την προσθήκη κάποιου διεγέρτη ή μιας πειραματικής ουσίας . Στην δεύτερη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS . Στην τρίτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης . Στην τέταρτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης + 10^{-5} M Θεοφυλλίνης .

Στις εικόνες 1 , 2 , 3 και 4 (πρώτη ομάδα) απεικονίζονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν μόνο με καλλιεργητικό υλικό , χωρίς την προσθήκη διεγέρτη ή πειραματικής ουσίας . Το μέγεθός τους είναι μικρό και το σχήμα τους στρογγυλό . Είναι χαρακτηριστικός ο μικρός τους πυρήνας με το νεφροειδές σχήμα και το άφθονο κυτταρόπλασμα γύρω από αυτόν .

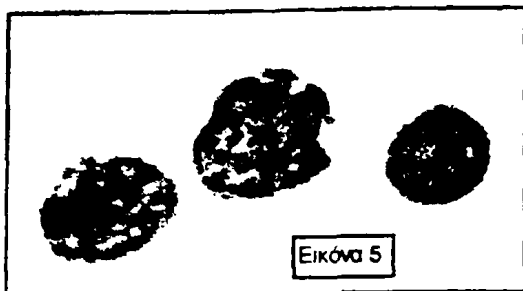
Στις εικόνες 5 , 6 , 7 και 8 (δεύτερη ομάδα) απεικονίζονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα που



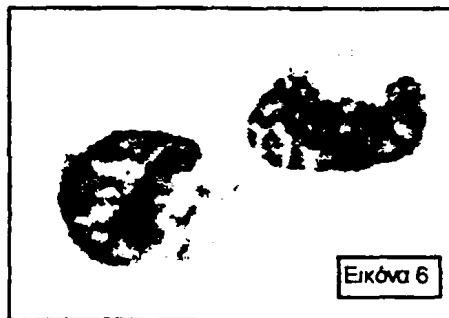
επωάστηκαν με LPS . Είναι ορατό στις εικόνες αυτές ότι τα μακροφάγα έχουν μεγαλύτερο λόγο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα , από ότι τα κύτταρα

των εικόνων 1 ως 4 . Αυτό προκαλεί την μείωση του κυτταροπλάσματος που διακρίνεται γύρω από τον πυρήνα . Επίσης γίνεται αντιληπτό ότι ο πυρήνας αποκτά κάπως ανώμαλο σχήμα . Υπάρχει επίσης αύξηση του μεγέθους του κυττάρου . Τα ευρήματα στα περιτοναϊκά μακροφάγα του Πειράματος # 2 είναι πιο χαρακτηριστικά από ότι τα αντίστοιχα στο Πείραμα # 1 και απαντώνται σε μεγαλύτερη αναλογία κυττάρων . Αυτό προφανώς οφείλεται στην μεγαλύτερη χρονική διάρκεια επώασης με την ενδοτοξίνη (14 ώρες έναντι 4 ωρών) .

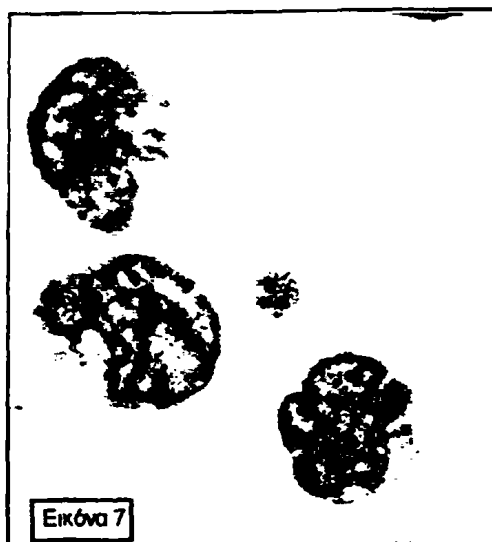




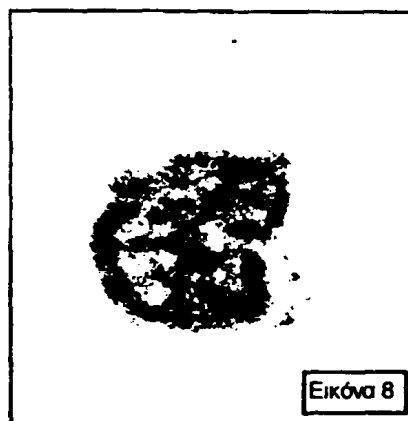
Εικόνα 5



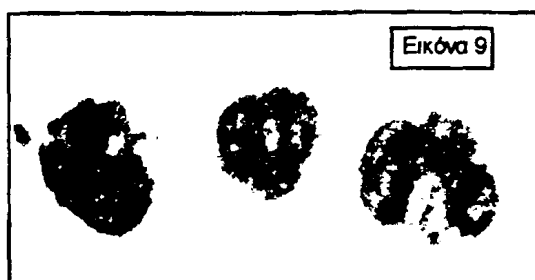
Εικόνα 6



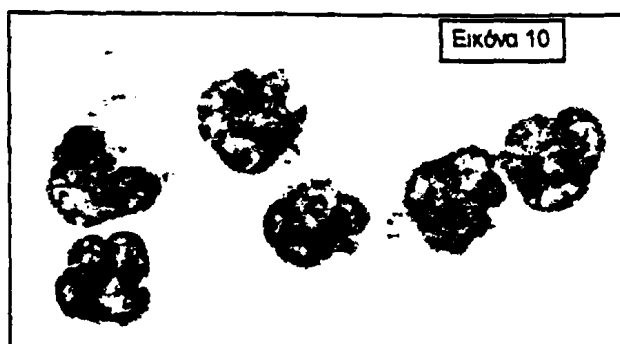
Εικόνα 7



Εικόνα 8



Εικόνα 9

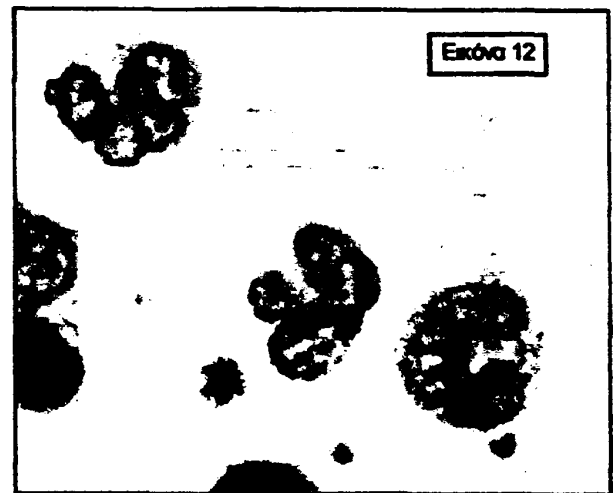
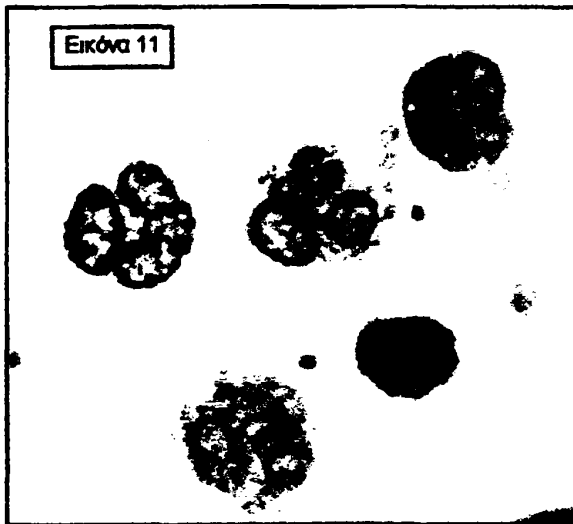


Εικόνα 10

Στις εικόνες 9 και 10 (τρίτη ομάδα) απεικονίζονται περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS και Αδρεναλίνη . Όπως και στο Πείραμα # 1 είναι εμφανές ότι ο πυρήνας παρουσιάζει μια αυξημένη λόβωση και πολυπλοκότητα . Μια τάση για μικρή ελάττωση του μεγέθους των κυττάρων που έλαβαν Αδρεναλίνη δεν έγινε δυνατόν να καταδειχθεί με αναμφισβήτητο τρόπο . Αυτό που γίνεται αντιληπτό είναι ότι διακρίνεται το κυτταρόπλασμα ευκολότερα , το οποίο οφείλεται στην λόβωση του πυρήνα .

Στις εικόνες 11 και 12^η (τέταρτη ομάδα) που ακολουθούν απεικονίζονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS + Αδρεναλίνη + Θεοφυλλίνη . Εκτός από μία πολύ ήπια αύξηση της λόβωσης του πυρήνα , δεν ήταν αντιληπτή κάποια άλλη μεταβολή της μορφολογίας των μακροφάγων , σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με Ενδοτοξίνη + Αδρεναλίνη . Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη της Θεοφυλλίνης συνεισφέρει ελάχιστα σε μορφολογικές μεταβολές .

Επίσης, σε πειράματα που έγιναν στο Εργαστήριό μας διαπιστώσαμε ότι η Θεοφυλλίνη από μόνη της δεν προκαλεί καμία μορφολογική μεταβολή στα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα.



Από το σύνολο των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων που μελέτησαμε συνάγεται ότι η ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS προκαλεί ευδιάκριτες μορφολογικές μεταβολές και κυρίως αύξηση του μεγέθους του πυρήνα και του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Η προσθήκη και της Αδρεναλίνης τροποποιεί σαφώς την μορφολογία του μακροφάγου και προκαλεί την λόβωση του πυρήνα. Η προσθήκη και της Θεοφυλλίνης δεν προκαλεί αξιόλογες επιπρόσθετες μεταβολές.

ΠΕΙΡΑΜΑ #3 . ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

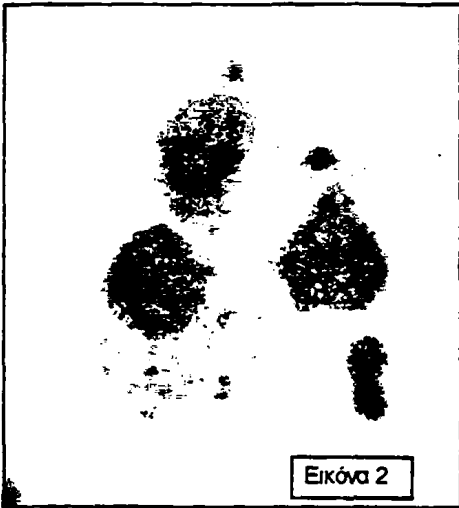
Στο πείραμα # 3 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από φυσιολογικούς επίμυες τύπου Wistar . Τα κύτταρα αυτά χωρίστηκαν σε πέντε (5) ομάδες . Στην πρώτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν με 250 μ /ml INF γ για 24 ώρες , ενώ στην δεύτερη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν με 250 μ /ml INF γ + 10⁻⁵ M PGE₂ . Στην τρίτη ομάδα τα κύτταρα επωάστηκαν με 250 μ /ml INF γ + 10⁻⁴ M Αδρεναλίνης για 24 ώρες . Στην τέταρτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν με 250 μ /ml INF γ + 10⁻⁵ M Δεξαμεθαζόνης για 24 ώρες . Τέλος στην πέμπτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν με INF γ + 25 μ g/ml Ινσουλίνης για 24 ώρες .



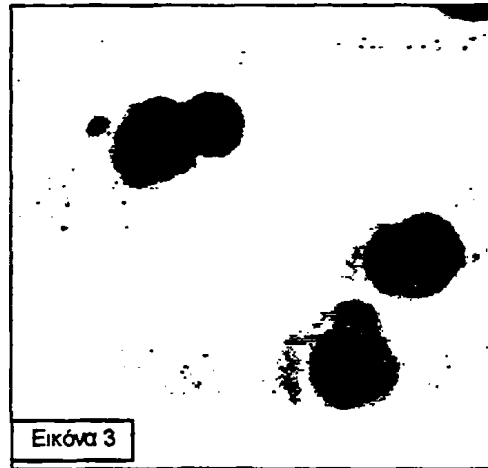
Εικόνα 1

Στις εικόνες 1 , 2 και 3 (πρώτη ομάδα) απεικονίζονται τα μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ . Έχουν την χαρακτηριστική μορφολογία ενεργοποιημένων μακροφάγων , δηλαδή σχετικά μεγάλο μέγεθος , ευμεγέθη στρογγυλό πυρήνα και άφθονο κοκκιώδες κυτταρόπλασμα .

Η χορήγηση της PGE₂ μαζί με την INF γ για 24 ώρες (δεύτερη ομάδα) δεν προκάλεσε καμία επιπρόσθετη μορφολογική μεταβολή στα μακροφάγα .

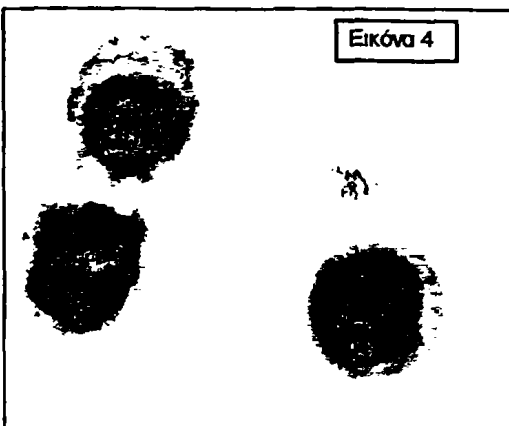


Εικόνα 2

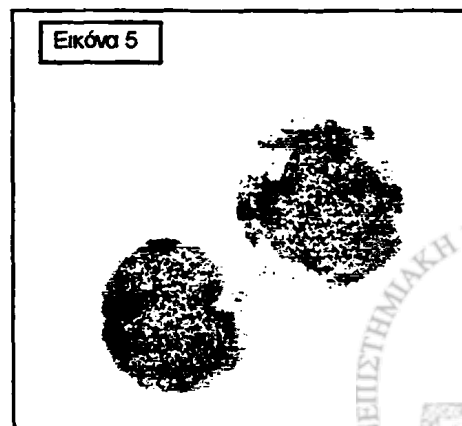


Εικόνα 3

Στις εικόνες 4 , 5 , 6 και 7 (τρίτη ομάδα) απεικονίζονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ και Αδρεναλίνη . Τα κύτταρα αυτά έχουν πυρήνα με εμφανέστερη εντομή και περισσότερο νεφροειδές σχήμα , χωρίς όμως να φτάνει μέχρι την εμφάνιση λόβωσης , όπως στην περίπτωση χορήγησης Αδρεναλίνης μαζί με LPS (πειράματα # 1 και # 2) . Το μέγεθος των κυττάρων δεν παρουσιάζει μεταβολή υπό την επίδραση της Αδρεναλίνης .

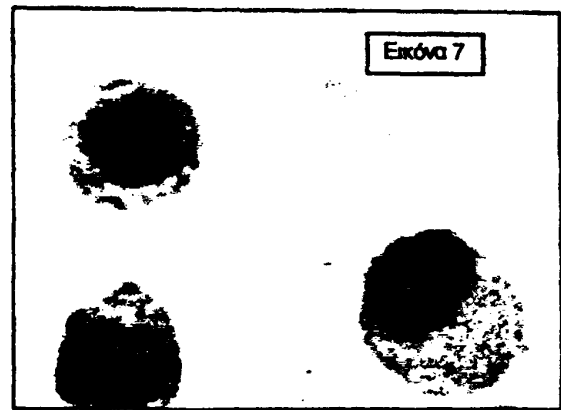
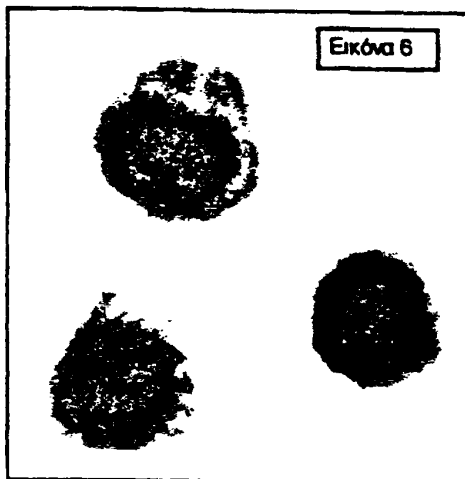


Εικόνα 4

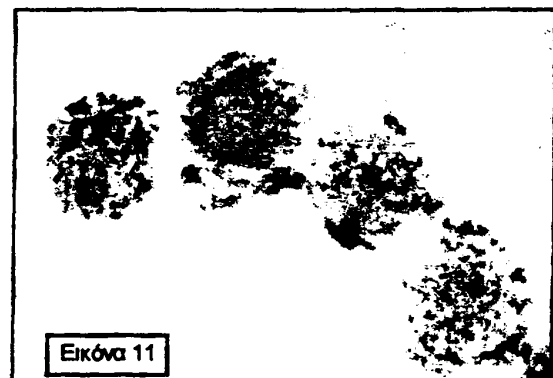
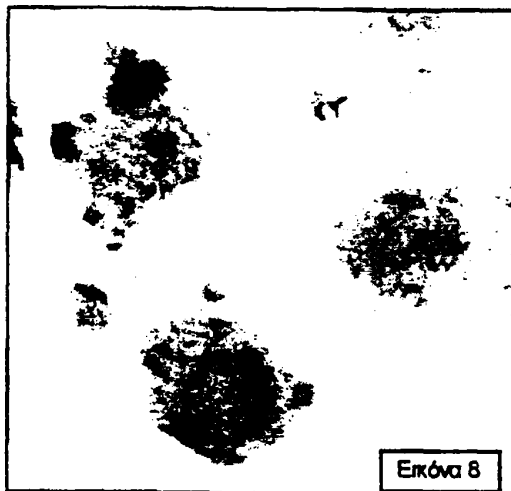


Εικόνα 5



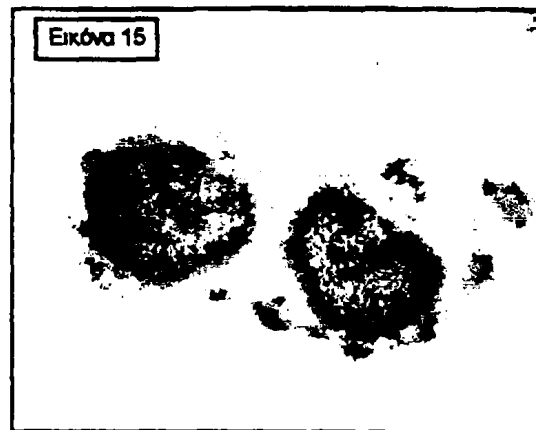
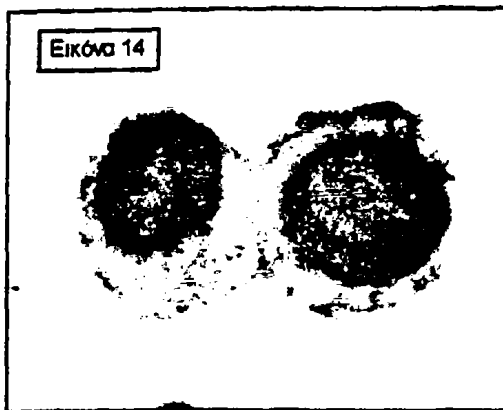
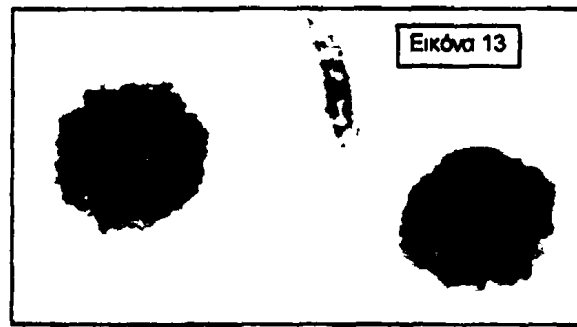
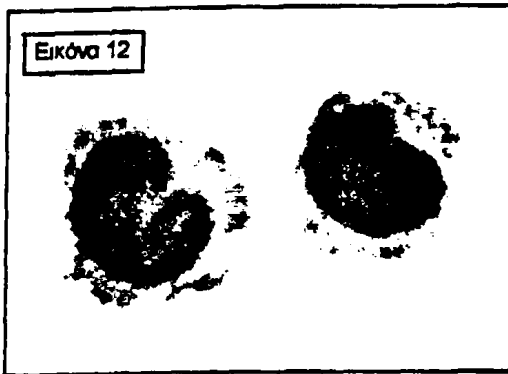


Στις εικόνες 8 , 9 , 10 και 11 (τέταρτη ομάδα) απεικονίζονται περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ και Δεξαμεθαζόνη . Τα κύτταρα αυτά έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη μορφολογία . Το μέγεθός τους είναι πολύ μεγάλο και το σχήμα τους στρογγυλό . Ο πυρήνας τους είναι ευμεγέθης και αραιοχρωματικός . Και το κυτταρόπλασμά τους είναι επίσης πολύ αραιοχρωματικό . Υπάρχει αύξηση του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα .



Οι εικόνες 12 , 13 , 14 και 15 (πέμπτη ομάδα) απεικονίζουν περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ + Ινσουλίνη . Τα μακροφάγα αυτά επίσης έχουν ιδιαίτερη μορφολογία . Το μέγεθος των κυττάρων δεν είναι πολύ μεγάλο αλλά υπάρχει αύξηση του μεγέθους του πυρήνα . Το κυτταρόπλασμα είναι αραιοχρωματικό , ιδιαίτερα γύρω από την εντομή του πυρήνα . Ο πυρήνας είναι αρκετά πυκνοχρωματικός και στρογγυλός με εντομή ή νεφροειδής . Η θέση του είναι συχνά έκκεντρη . Σημείωση : οι εικόνες 12 - 15 έχουν μεγεθυνθεί .



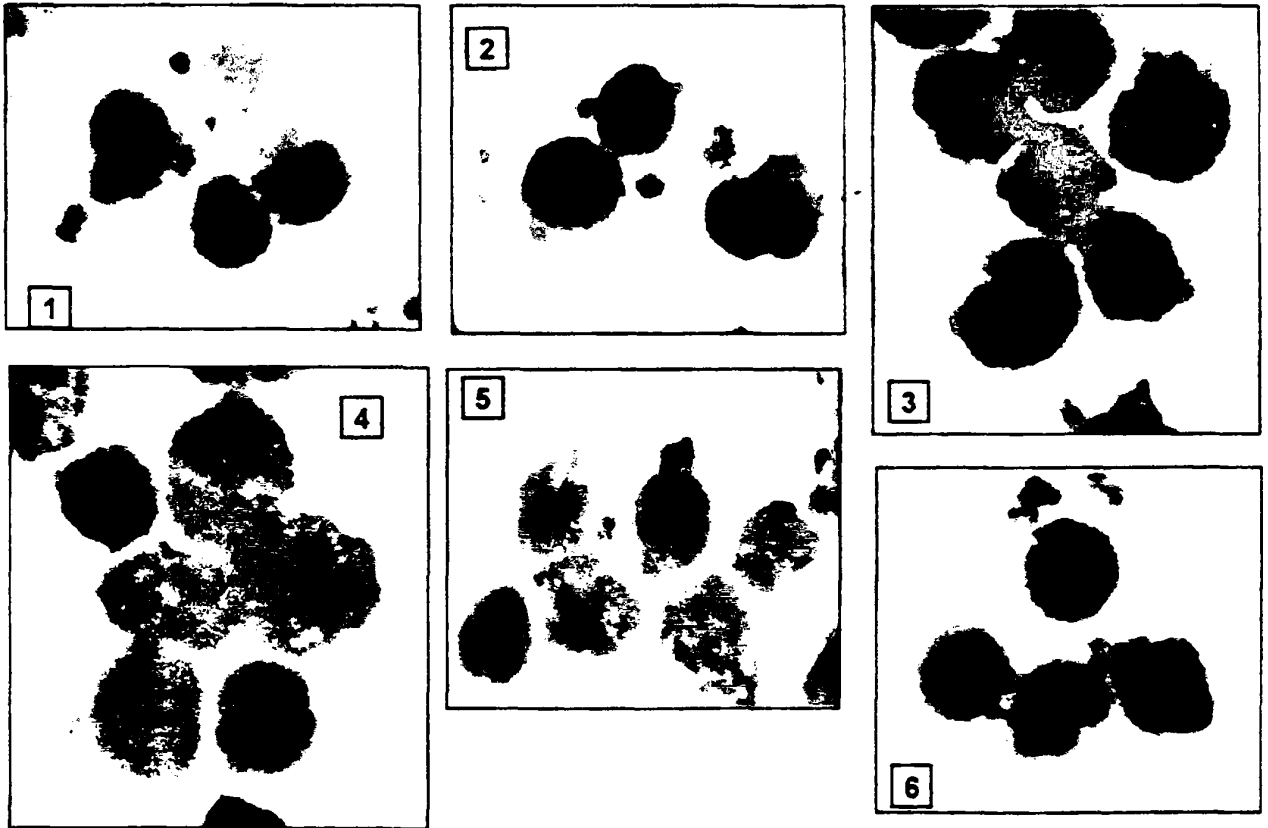


Από το σύνολο των μικροσκοπιακών παρασκευασμάτων που μελετήθηκαν συνάγεται ότι η ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Ιντερφερόνη- γ προκαλεί ευδιάκριτες μορφολογικές μεταβολές που μοιάζουν σε ορισμένα σημεία με μεταβολές που παρατηρήθηκαν κατά την ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS (πειράματα # 1 και # 2) . Η προσθήκη PGE₂ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα , ενώ η προσθήκη της Αδρεναλίνης προκάλεσε μικρές μόνο τροποποιήσεις της μορφολογίας των μακροφάγων . Αντίθετα , η προσθήκη της Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε σημαντικές μεταβολές , όπως αύξηση του μεγέθους του πυρήνα και του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα . Η προσθήκη Ινσουλίνης επίσης προκάλεσε χαρακτηριστικές μεταβολές , όπως την αύξηση του πυρήνα αλλά και του κυτταροπλάσματος , που έχει υφή κοκκιώδη .

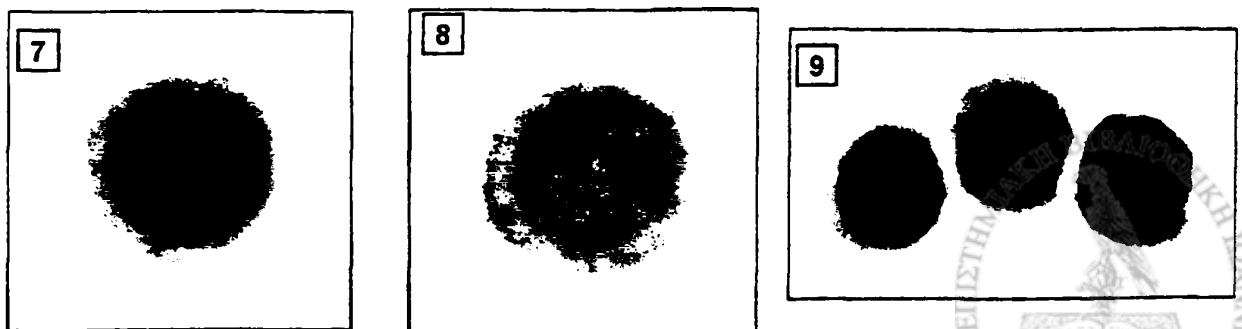
ΠΕΙΡΑΜΑ # 4 . ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

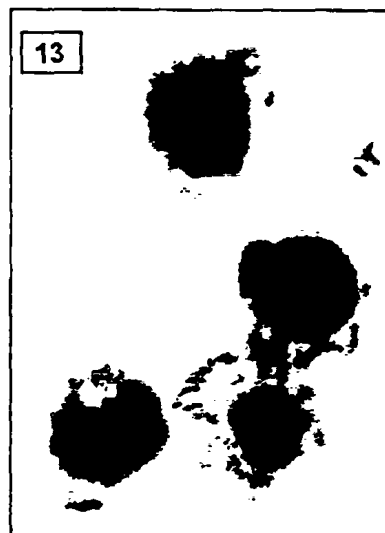
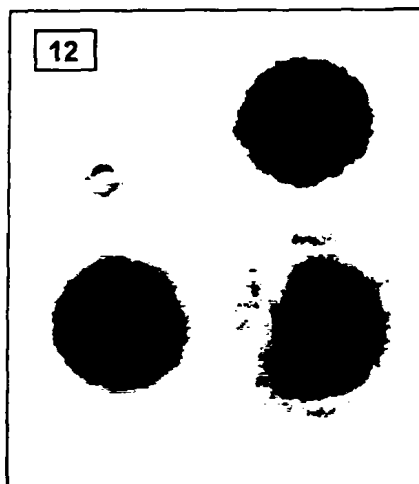
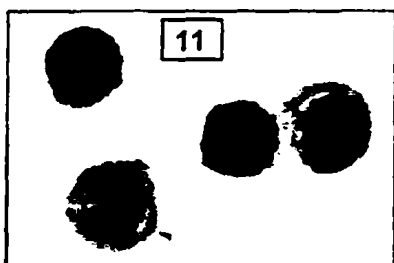
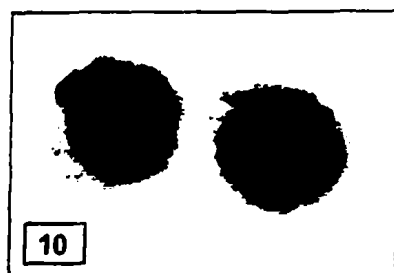
Στο πείραμα # 4 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από φυσιολογικούς επίμυες Wistar , τα οποία χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες . Στην πρώτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 24 ώρες με 250 μ /ml INF γ . Στην δεύτερη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν επί 24 ώρες με 250 μ /ml INF γ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης ενώ στην τρίτη ομάδα επωάστηκαν επί 24 ώρες με 250 μ /ml INF γ + 10^{-5} M PGE $_2$. Στην τέταρτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 24 ώρες με 250 μ /ml INF γ + 10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης και στην πέμπτη ομάδα επωάστηκαν επί 24 ώρες με 250 μ /ml INF γ + 25 μ g/ml Ινσουλίνης . Όλες οι ομάδες έδωσαν μορφολογικά αποτελέσματα εκτός από την τρίτη ομάδα (INF γ + PGE $_2$ για 24 ώρες) όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ μαρτύρων και πειραματικών .

Στις εικόνες 1, 2, 3, 4, 5 και 6 απεικονίζονται περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF- γ (πρώτη ομάδα) . Τα κύτταρα αυτά έχουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενεργοποιημένων μακροφάγων . Είναι μεγάλα και αποπλατυσμένα κύτταρα . Ο πυρήνας τους είναι ευμεγέθης , στρογγυλός και σπάνια νεφροειδής . Το κυτταρόπλασμα δίνει την εκτύπωση της έντονης κοκκίωσης .



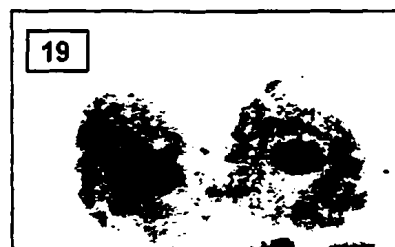
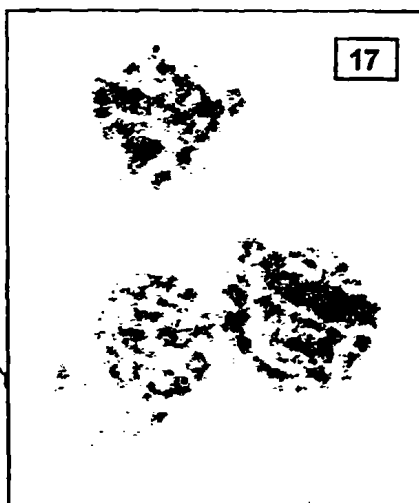
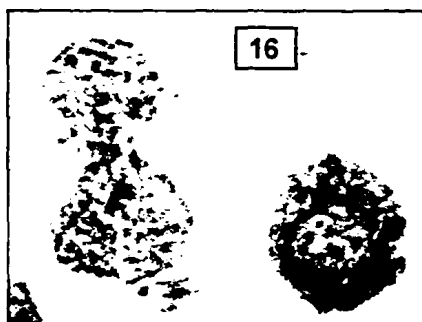
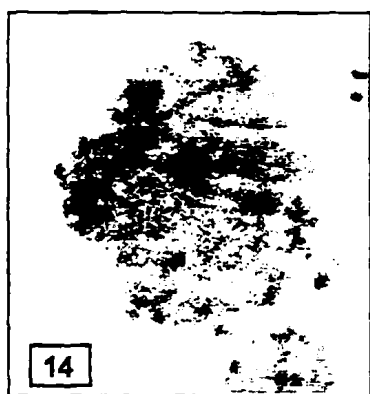
Στις εικόνες 7, 8, 9, 10, 11, 12 και 13 (δεύτερη ομάδα) απεικονίζονται περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ και Αδρεναλίνη . Το μέγεθος των κυττάρων εμφανίζει ελάχιστη τάση μείωσης . Ο λόγος πυρήνα προς κυτταρόπλασμα αυξάνεται . Η αύξηση της λόβωσης του πυρήνα η οποία παρατηρήθηκε σε προηγούμενα πειράματα εδώ δεν είναι ορατή .





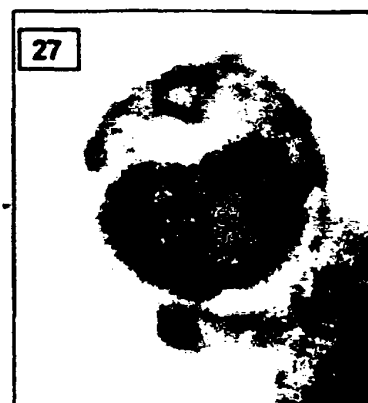
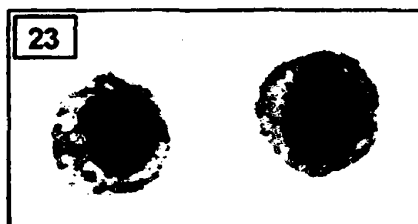
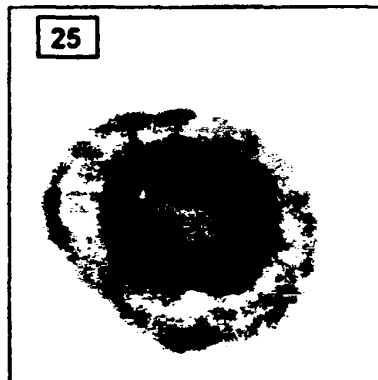
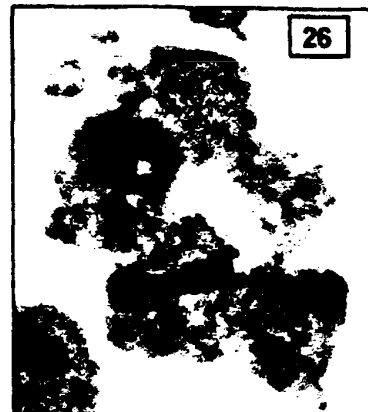
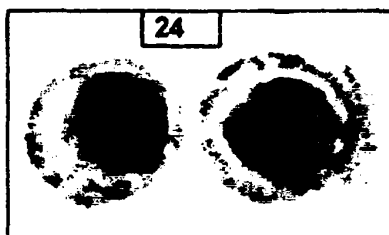
Η τρίτη ομάδα περιτοναϊκών μακροφάγων περιλάμβανε κύτταρα που επώαστηκαν με $INF\gamma + PGE_2$. Τα κύτταρα αυτά δεν εμφάνισαν καμία απολύτως μορφολογική μεταβολή σε σχέση με τους μάρτυρες (δηλαδή τα μακροφάγα της πρώτης ομάδας που επώαστηκαν μόνο με Ιντερφερόνη- γ). Για τον λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται εικόνες από αυτά τα κύτταρα.

Οι εικόνες 14, 15, 16, 17, 18, 19 και 20 (τέταρτη ομάδα) απεικονίζουν τα μακροφάγα που επώαστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Δεξαμεθαζόνη. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους τους και αραιοχρωματικό κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες τους είναι μεγάλοι, στρογγυλοί και αραιοχρωματικοί. Υπάρχει αύξηση του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα.



Στις εικόνες 21, 22, 23, 24, 25, 26 και 27 οι οποίες ακολουθούν (πέμπτη ομάδα) απεικονίζονται τα μακροφάγα που επώαστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Ινσουλίνη για 24 ώρες. Αυτά τα περιτοναϊκά μακροφάγα εμφανίζουν αύξηση του μεγέθους τους και αύξηση του κυτταροπλάσματος που περιβάλλει

τον πυρήνα . Τα περισσότερα από τα κύτταρα αυτά έχουν πυρήνα ευμεγέθη , στρογγυλό και πολύ ευδιάκριτο . Αυτή η μορφολογία είναι χαρακτηριστική .

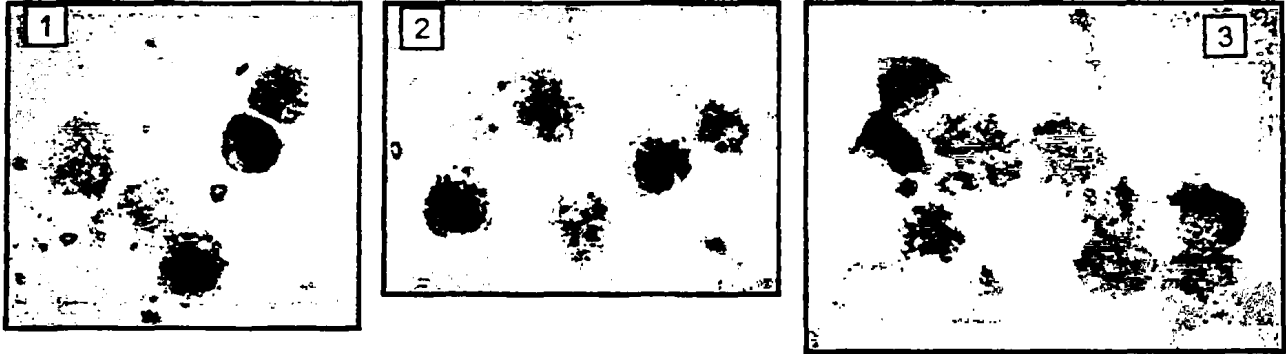


Από την μελέτη των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων γίνεται αντιληπτό ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν για 24 ώρες με Ιντερφερόνη- γ και κάποια άλλη πειραματική ουσία ανέπτυξαν ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά . Ορισμένα χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν και στο πείραμα # 3 . Η μόνη πειραματική ομάδα που δεν έδωσε κάποια μεταβολή της μορφολογίας της σε σχέση με τα κύτταρα που έλαβαν μόνο την Ιντερφερόνη- γ , ήταν τα κύτταρα που επωάστηκαν με $INF\gamma$ και PGE_2 .

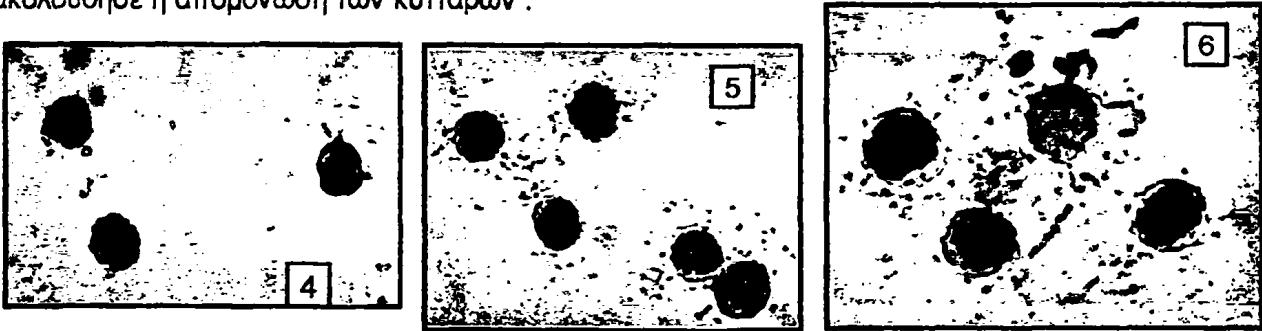
ΠΕΙΡΑΜΑ # 5 . ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ - IN VIVO ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ .

Στο πείραμα # 5 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα από τέσσερις επίμυες Wistar , οι οποίοι ανήκαν σε δύο ομάδες . Η πρώτη ομάδα (μάρτυρες) έλαβε τέσσερις υποδόριες ενέσεις 0.9% NaCl (μία ένεση ανά 2 ώρες) , ενώ η δεύτερη ομάδα (πειραματικά) έλαβε τέσσερις υποδόριες ενέσεις 0.05 mg Αδρεναλίνης (in vivo χορήγηση Αδρεναλίνης) , μία ένεση ανά 2 ώρες . Η απομόνωση των μακροφάγων έγινε 2 ώρες μετά την τελευταία ένεση .

Οι εικόνες 1, 2 και 3 απεικονίζουν περιτοναϊκά μακροφάγα από επίμυες που έλαβαν μόνο τον φυσιολογικό ορό (μάρτυρες) .



Οι εικόνες 4, 5 και 6 απεικονίζουν τα περιτοναϊκά μακροφάγα από επίμυες που έλαβαν 4 υποδόριες ενέσεις 0.05 mg Αδρεναλίνης και στην συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των κυττάρων .

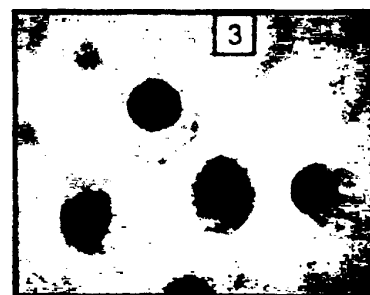
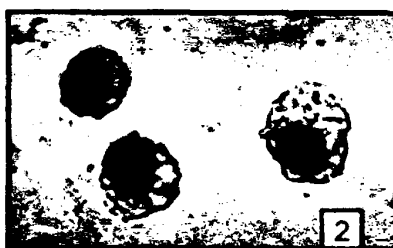
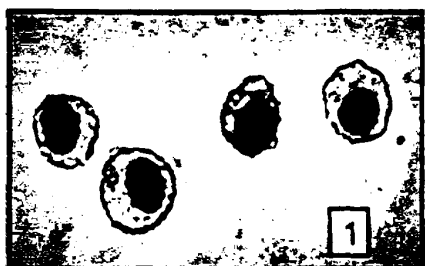


Από την μελέτη των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων μικροσκοπίας γίνεται αντιληπτό ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα των επίμυων που έλαβαν Αδρεναλίνη φαίνονταν να διαθέτουν λιγότερο κυτταρόπλασμα , που φαινόταν πυκνότερο με την χρώση Giemsa . Επίσης δημιουργείται η εντύπωση ότι οι πυρήνες των κυττάρων από επίμυες που έλαβαν αδρεναλίνη είναι πολύ πυκνοχρωματικοί . Και εδώ διαπιστώθηκε η τάση για μείωση του μεγέθους των μακροφάγων που παρατηρήθηκε και στα πειράματα in vitro χορήγησης LPS και Αδρεναλίνης (# 1 και # 2) .

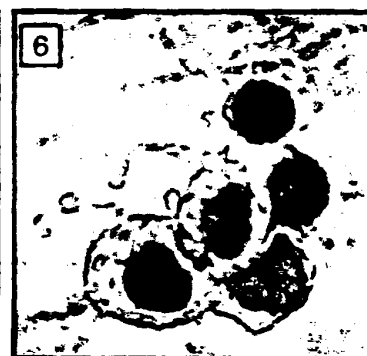
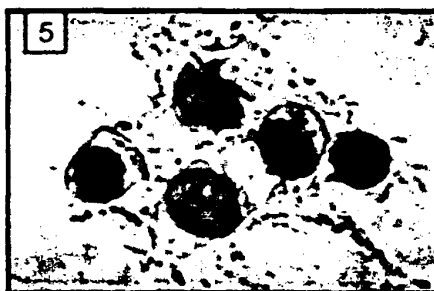
ΠΕΙΡΑΜΑ # 6 . ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ - ΙΝ VΙΝΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗΣ

Στο πείραμα # 6 χρησιμοποιήθηκαν βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα από τέσσερις επίμυες Wistar, οι οποίοι ανήκαν σε 2 ομάδες. Οι επίμυες της πρώτης ομάδας (2 μάρτυρες) έλαβαν τέσσερις υποδόριες ενέσεις 0.9% NaCl (μία ένεση ανά δύο ώρες). Οι επίμυες της δεύτερης ομάδας έλαβαν τέσσερις υποδόριες ενέσεις 0.05 mg Αδρεναλίνης (in vivo χορήγηση Αδρεναλίνης, μία ένεση ανά 2 ώρες). Η απομόνωση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων έγινε σε κάθε πειραματόζωο 2 ώρες μετά την τελευταία ένεση.

Οι εικόνες 1, 2 και 3 απεικονίζουν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που προέρχονται από τους επίμυες που έλαβαν ενέσεις 0.9% NaCl (μάρτυρες).



Στις εικόνες 4, 5 και 6 απεικονίζονται τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που προέρχονται από τους επίμυες που έλαβαν τις τέσσερις ενέσεις 0.05 mg Αδρεναλίνης (πειραματικά). Διαπιστώνεται ότι δεν παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από τα κύτταρα που δεν έλαβαν Αδρεναλίνη.



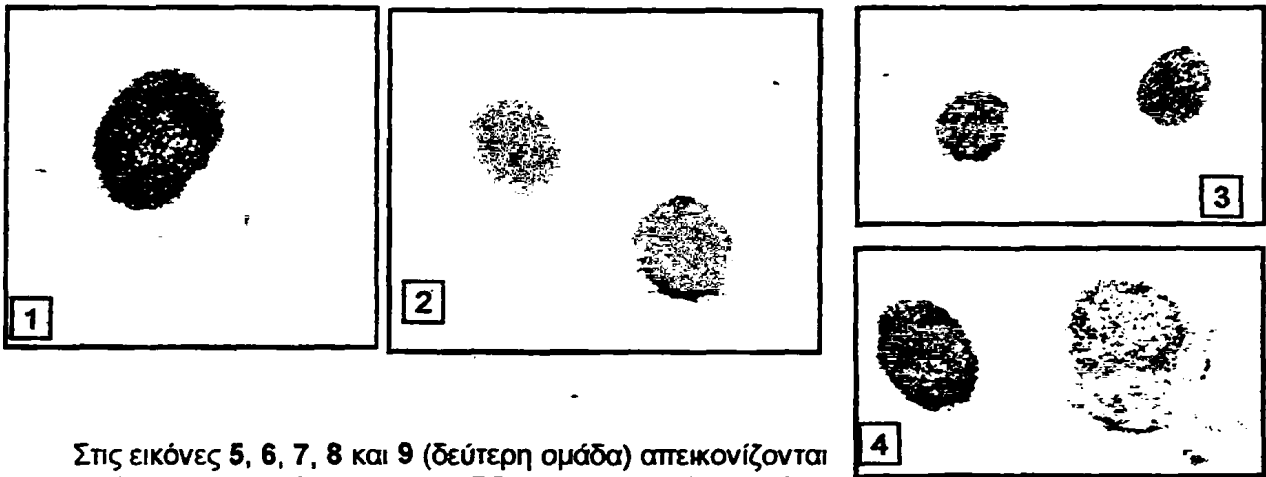
Σημείωση : Η εικόνα 6 έχει υποστεί μικρού βαθμού μεγέθυνση.

Η έλλειψη μορφολογικών μεταβολών στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα μετά από την in vivo χορήγηση Αδρεναλίνης έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα του πειράματος # 5, όπου τα περιτοναϊκά μακροφάγα εμφάνισαν μικρή μεταβολή του μεγέθους τους και του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Αυτό ενδεχομένως μπορεί να ερμηνευτεί στα πλαίσια του διαφορετικού φαινοτύπου των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων, ο οποίος αναπτύσσεται λόγω της ιδιαίτερης ανατομικής εντόπισής τους.

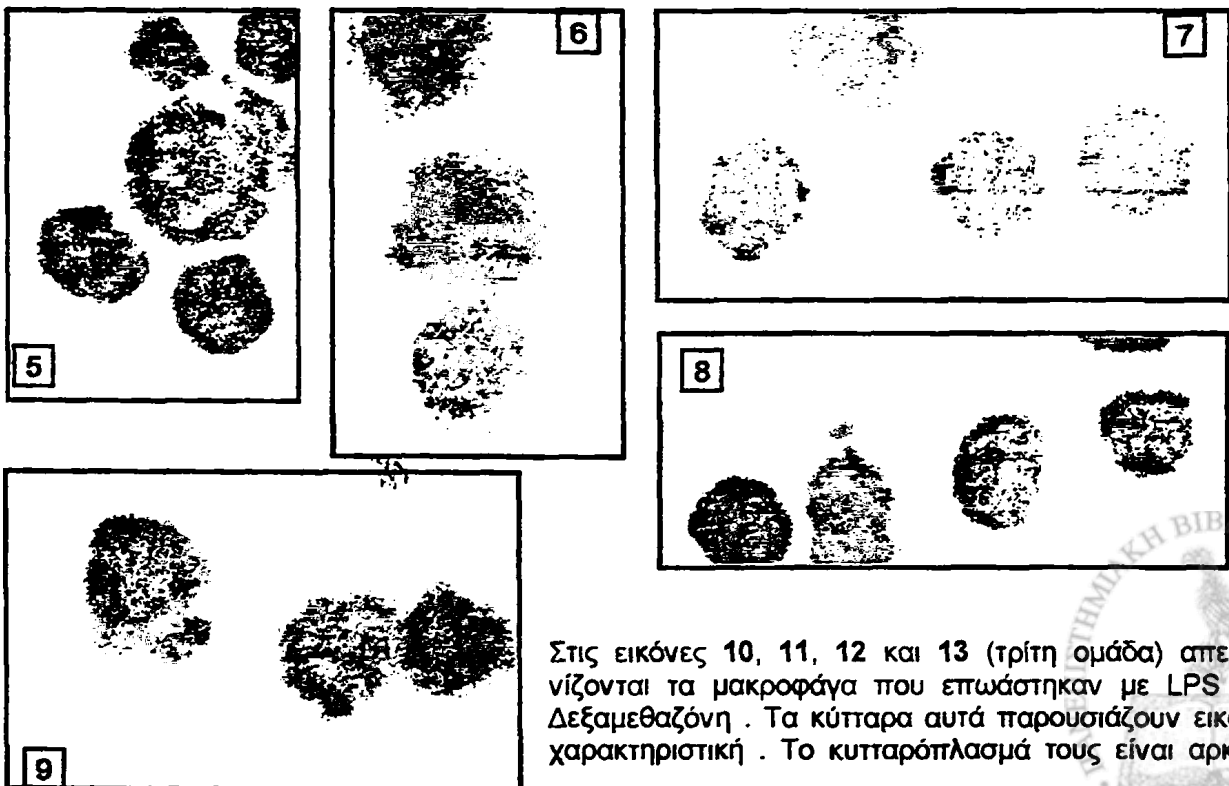
ΠΕΙΡΑΜΑ # 7 . ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ .

Στο πείραμα # 7 χρησιμοποιήθηκαν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα από φυσιολογικούς επίμους Wistar , τα οποία χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες . Στην πρώτη ομάδα τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επωάστηκαν επί 16 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS . Στην δεύτερη ομάδα τα κύτταρα επωάστηκαν επί 16 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνης . Στην τρίτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης . Στην τέταρτη ομάδα τα κύτταρα επωάστηκαν επί 16 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g/ml}$ Ινσουλίνης . Στην πέμπτη ομάδα τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επωάστηκαν επί 16 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 2×10^{-7} M 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνης D_3 (Vit. D_3) .

Στις εικόνες 1, 2, 3 και 4 (πρώτη ομάδα) απεικονίζονται τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS . Τα κύτταρα αυτά έχουν άφθανο φυσαλιδώδες ή κοκκιώδες κυτταρόπλασμα , πυρήνες ευμεγέθεις , πικνοχρωματικούς και με σχήμα συνήθως ωσειδές με εντομή . Ο λόγος του πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα είναι περίπου 1 προς 1 .

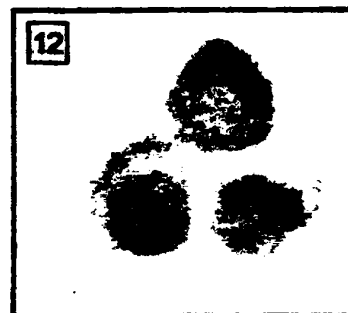


Στις εικόνες 5, 6, 7, 8 και 9 (δεύτερη ομάδα) απεικονίζονται τα μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS και Αδρεναλίνη . Είναι εύκολα ορατές οι μορφολογικές μεταβολές που έχουν συμβεί . Τα κύτταρα είναι μικρότερα και με λιγότερο κυτταρόπλασμα . Οι πυρήνες είναι επίσης μικροί αλλά πιο αραιοχρωματικοί .

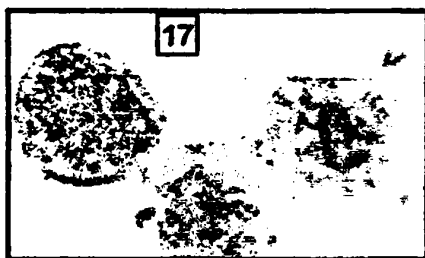
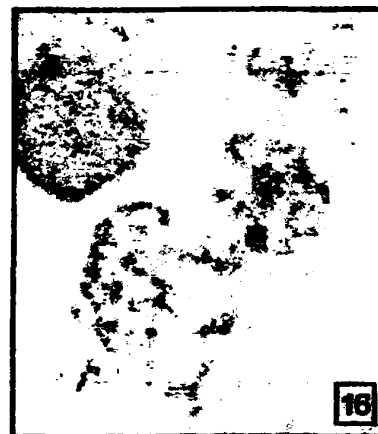
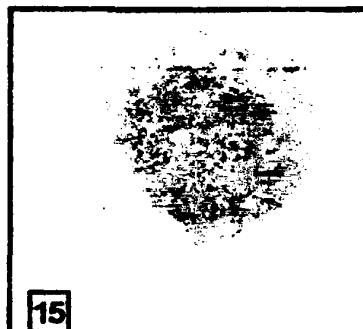
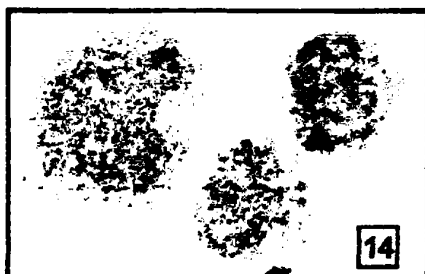


Στις εικόνες 10, 11, 12 και 13 (τρίτη ομάδα) απεικονίζονται τα μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS και Δεξαμεθαζόνη . Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν εικόνα χαρακτηριστική . Το κυτταρόπλασμά τους είναι αρκετό

και σχετικά κυανό με την χρώση Giemsa . Οι πυρήνες των μακροφάγων είναι μικροί , στρογγυλοί και σχετικά αραιοχρωματικοί . Δεν παρουσιάζεται η αύξηση του λόγου πυρήνα προς κυτταρόπλασμα η οποία παρατηρήθηκε στα περιτοναϊκά μακροφάγα .



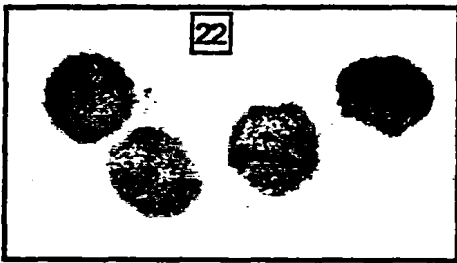
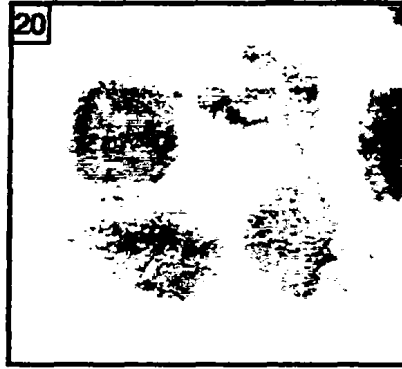
Στις εικόνες 14, 15, 16, 17 και 18 απεικονίζονται βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επώαστηκαν με LPS και Ινσουλίνη . Είναι φανερό ότι τα κύτταρα αυτά είναι τεράστια , με ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους του κυτταροπλάσματος τους και του πυρήνα τους . Ο πυρήνας συχνά είναι πολύ αραιοχρωματικός . Το κυτταρόπλασμα αρκετά κοκκώδες .



Σημείωση : οι εικόνες 14, 15, 16 και 18 έχουν για να γίνουν ορισμένες λεπτομέρειες καλύτερα

υποστεί μικρού βαθμού μεγέθυνση , ορατές .

Στις εικόνες 19, 20, 21, 22, 23 και 24 απεικονίζονται βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν επί 16 ώρες με LPS + Vit.D₃ . Τα κύτταρα αυτά είναι σχετικά μικρά σε διάμετρο . Έχουν λίγο κυτταρόπλασμα που χρωματίζεται ερυθρό ή ρόδινο με την χρώση Giemsa . Οι πυρήνες τους είναι μάλλον μικρού μεγέθους .



Από την μελέτη των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων προκύπτει ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα δεν ανταποκρίνονται πάντοτε στην επώαση με διάφορες πειραματικές ουσίες με τον ίδιο τρόπο που ανταποκρίνονται τα περιτοναϊκά μακροφάγα, όπως περιγράφεται σε προηγούμενα πειράματα. Έτσι, ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS, Αδρεναλίνη και Ινσουλίνη παρουσίασαν παραπλήσιες μορφολογικές μεταβολές με τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με τον ίδιο τρόπο, τα φαγοκύτταρα που επωάστηκαν με Δεξαμεθαζόνη έδειξαν διαφορετική συμπεριφορά.

ΠΕΙΡΑΜΑ # 8 . ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ .

Στο πείραμα # 8 χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα , τα οποία χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες : Στην πρώτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες μόνο με καλλιεργητικό υλικό , χωρίς την προσθήκη πειραματικών ουσιών . Στην δεύτερη ομάδα τα περιτοναϊκά κύτταρα επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS . Στην τρίτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 10^{-4} M Αδρεναλίνη . Στην τέταρτη ομάδα τα μακροφάγα επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ινσουλίνη . Στην πέμπτη ομάδα τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωάστηκαν επί 6 ώρες με 250 u/ml INF γ . Το πείραμα # 8 εκτελέστηκε δύο φορές , δηλαδή επαναλήφθηκε ακριβώς το ίδιο πείραμα σε διαφορετική ημερομηνία .

Σε καμία από τις πέντε πειραματικές ομάδες δεν ανιχνεύθηκε με βεβαιότητα η δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης . Το ίδιο ίσχυσε και για την επανάληψη του πειράματος . Οι μέθοδοι ιστοχημικής ανίχνευσης της Οξίνης Φωσφατάσης είναι πολύ ευαίσθητες και το αποτέλεσμά τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες , όπως π.χ. από μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας των διαλυμάτων ή του pH ή από άλλα αίτια (Janckila και συν., 1978) . Είναι ενδεχόμενο ότι κατά την διαδικασία μονιμοποίησης που ακολουθήθηκε στα πειράματά μας η ακετόνη μετέφερε μικρή ποσότητα βερνικιού νυχιών από τις άκρες του πλακιδίου και τις εναπόθεσε στην περιοχή όπου υπήρχαν τα μακροφάγα , με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ιστοχημική αντίδραση ή να γίνεται πολύ ασθενής , έτσι ώστε να μην μπορεί να εντοπιστεί με βεβαιότητα .



Κεφάλαιο 12 . ΣΥΖΗΤΗΣΗ .

Η διαπίστωση της ύπαρξης αλληλεπιδράσεων μεταξύ Ενδοκρινικού , Νευρικού και Ανοσοποιητικού συστήματος (Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικός άξονας) έγινε η αφορμή για εκτεταμένη μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης της λειτουργίας των Λεμφοκυττάρων , των NK-κυττάρων (Natural Killer cells) και άλλων κυττάρων εμπλεκόμενων σε αμυντικούς μηχανισμούς , σε μια προσπάθεια εξήγησης των διαταραχών της άμυνας του σώματος που συνοδεύουν ορισμένες παθήσεις ενδοκρινολογικής ή ψυχιατρικής φύσης , καθώς και των αντιδράσεων του Stress σωματικής ή ψυχολογικής εντόπισης . Η λειτουργία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων από την άποψη της πιθανής Νευρο-ενδοκρινική ρύθμισης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς . Τα κύτταρα αυτά θεωρούνταν απλά οι «ρακοσυλλέκτες» των ιστών (scavenger cells) , τα οποία φαγοκυττάρωναν οψωνοποιημένους μικροοργανισμούς και καθάριζαν τις φλεγμονώδεις εστίες κατά τρόπο μη-ειδικό , μη-ρυθμιζόμενο και μη-κατευθυνόμενο . Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε σε μια προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν συμμετέχουν και τα μακροφάγα στον Νευρο-ενδοκρino-ανοσολογικό άξονα . Επειδή ο σχεδιασμός των πειραμάτων έγινε έτσι ώστε κατά κύριο λόγο να διευκολυνθεί η ανίχνευση των Νευρο-ενδοκρινικών επιδράσεων και δευτερευόντως για να μελετηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν τις επιδράσεις αυτές , θα απαιτηθεί εκτεταμένη ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων ώστε να εξαχθούν οποιαδήποτε συμπεράσματα . Ο πραγματικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να πιστοποιηθεί ότι πραγματικά υπάρχουν στα μακροφάγα Νευρο-ενδοκρινικές επιδράσεις , που δεν είναι τυχαίες αλλά αποσκοπούν στο να εξυπηρετήσουν την ρύθμιση της λειτουργίας των μακροφάγων .

Στην μελέτη αυτή προέκυψαν πολλά αποτελέσματα τα οποία είναι αδύνατο να αναλυθούν και να ερμηνευτούν χωρίς τον διαχωρισμό τους σε ομάδες και την συγκριτική μελέτη τους . Για τα βιοχημικά πειράματα θα ακολουθήσει η συζήτηση των αποτελεσμάτων μέσα τις ακόλουθες ομαδοποιήσεις :

α. Ανάλυση των αποτελεσμάτων που έδωσαν όλες οι πειραματικές ουσίες σε ένα τύπο κυττάρων ως προς μία βιοχημική παράμετρο .

β. Ανάλυση των αποτελεσμάτων που μας έδωσε η κάθε πειραματική ουσία και στους τρεις τύπους κυττάρων για όλες τις βιοχημικές παραμέτρους .

γ. Ομαδοποίηση των πειραματικών ουσιών που έδωσαν ευοδωτικές ή κατασταλτικές επιδράσεις στον ίδιο τύπο κυττάρων και ως προς την ίδια παράμετρο .

δ. Ομαδοποίηση των πειραματικών ουσιών που δρουν μέσω της ίδιας Οδού Δεύτερων Μηνυτόρων .

Για τις μορφολογικές παρατηρήσεις που έγιναν θα υπάρξει συζήτηση χωριστή από τα αποτελέσματα των βιοχημικών πειραμάτων και χωρίς ομαδοποιήσεις . Για την συζήτηση των μορφολογικών παρατηρήσεων θα ληφθούν κυρίως υπόψη ο κυτταρικός τύπος , η πειραματική ουσία και η διάρκεια της επώασης .



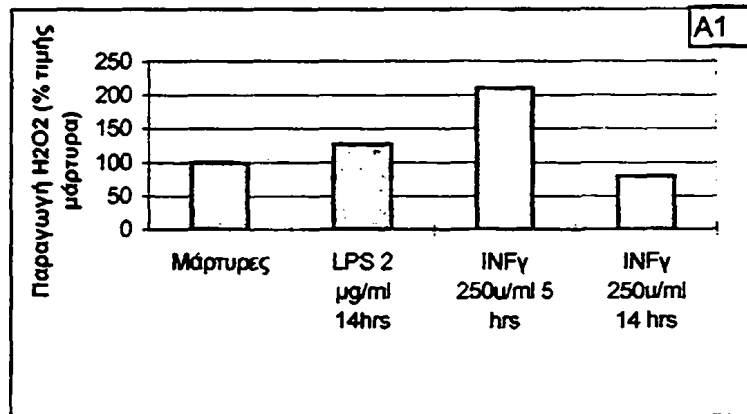
ΑΝΑΛΥΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟ .

Η *in vitro* επώαση των μακροφάγων με διάφορους διεγέρτες και πειραματικές ουσίες είχε ως αποτέλεσμα την αποκομιδή πολλών αποτελεσμάτων από τους βιοχημικούς προσδιορισμούς . Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα αυτά ομαδοποιημένα ως προς την ίδια παράμετρο . Τα στοιχεία που θα παρουσιαστούν θα αναφέρονται κάθε φορά στην επίδραση των διαφόρων πειραματικών ουσιών σε μία παράμετρο η οποία προσδιορίστηκε σε ένα τύπο μακροφάγου .

Συνολικά Αποτελέσματα Πειραμάτων Μέτρησης Υπεροξειδίου του Υδρογόνου .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 2 ώρες και η επώασή τους με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ για 5 ώρες οδήγησαν στην αύξηση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 , όπως φαίνεται στον πίνακα A1 . Αντιθέτως η επώαση

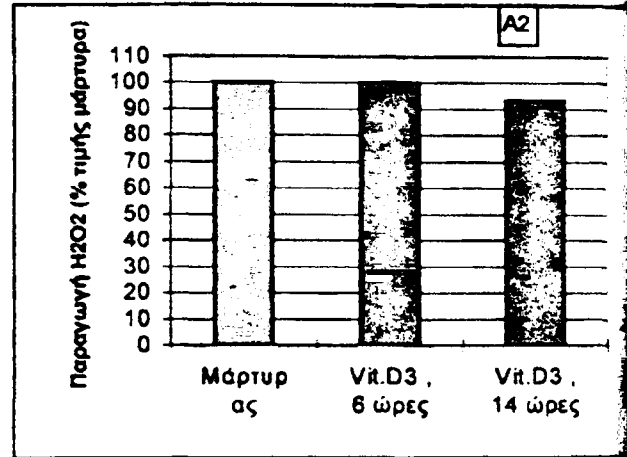
των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ οδήγησε στην μείωση της ικανότητας παραγωγής του H_2O_2 . Η αύξηση της παραγωγής H_2O_2 μετά από επώαση με LPS ή INF γ είναι αναμενόμενη και υπάρχει βιβλιογραφική τεκμηρίωση . Η μειωμένη ικανότητα παραγωγής του H_2O_2 μετά από επώαση 14



ωρών με Ιντερφερόνη- γ δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στην βιβλιογραφία . Θα μπορούσε να παρομοιαστεί με «εξάντληση» των μακροφάγων μετά από παρατεταμένη ισχυρή διέγερση . Αυτό το αποτέλεσμα προέρχεται από την πειραματική ομάδα # 3 . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα παρουσίασαν μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 20.59 % της τιμής του μάρτυρα και ο δείκτης P έχει τιμή < 0.001 . Πιθανώς τα ενεργοποιημένα μακροφάγα διαθέτουν μηχανισμούς αυτοελέγχου και αυτοπεριορισμού , που δεν επιτρέπουν την υπερβολική παραγωγή βλαπτικών Ελεύθερων Ριζών . Τέτοιοι μηχανισμοί συνήθως χρησιμοποιούν την αυτοκρινική επίδραση ουσιών όπως η PGE_2 , η IL-10 , η TGF- β , η Αδενοσίνη και η Νοραδρεναλίνη (Lim και συν., 1983 , Espinoza-Delgado και συν., 1994 , Spengler και συν., 1994 , Xaus και συν., 1999) αλλά πιο συχνά αφορούν την ενεργοποίηση με LPS . Αντιθέτως η Ιντερφερόνη- γ έχει χρησιμοποιηθεί για να επαναφέρει κατασταλμένα μακροφάγα στην κατάσταση ενεργοποίησης (Docke και συν., 1997) . Εξάλλου δεν είχαν παρατηρηθεί τέτοια φαινόμενα καταστολής της παραγωγής H_2O_2 σε άλλες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν υψηλές δόσεις INF γ για διαστήματα μέχρι και 3 ημέρες (Nathan και συν., 1983 , Murray και συν., 1985) . Το ίδιο αποτέλεσμα προκάλεσε και η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ για 14 ώρες , μια μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά 15.35 % (πειραματική ομάδα # 25) . Δεν είναι εφικτό να δοθεί σαφής εξήγηση στο φαινόμενο αυτό , αλλά θα πρέπει να αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό των μακροφάγων κατά της συνεχούς παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου .

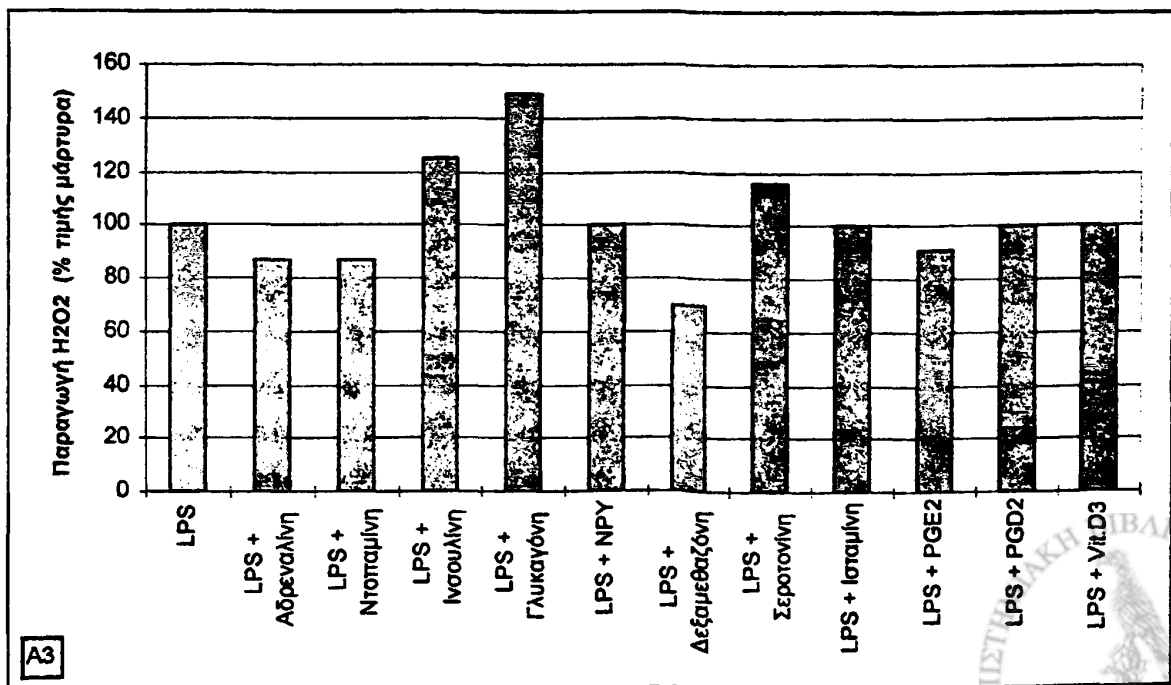


Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2.5×10^7 M 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D₃ επί 14 ώρες οδήγησε σε μείωση της ικανότητας παραγωγής H₂O₂ κατά 6.75 % , ενώ η επώαση με την ίδια συγκέντρωση 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D₃ για 6 ώρες δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην ικανότητα παραγωγής H₂O₂ . Το αποτέλεσμα αυτό ταιριάζει με όσα γνωρίζουμε για τον αργό μηχανισμό δράσης της Vit.D₃ (Goodman & Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 9th ed., 1996) αλλά δεν ήταν αναμενόμενο , αφού γενικά η Vit.D₃ θεωρείται ότι ασκεί διεγερτική δράση στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα (Rigby και συν.,1984 , Rigby, 1988) και μάλιστα υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες για την ικανότητα της Vit.D₃ να αυξάνει την παραγωγή του H₂O₂



(Cohen και συν.,1986 , Rook και συν.,1986) . Είναι πιθανό ότι η αντίθεση αυτή οφείλεται στο ότι αυτές οι δύο μελέτες αφορούν άωρα μονοκύτταρα και όχι ώριμα περιτοναϊκά μακροφάγα όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας . Ωστόσο στην μελέτη των Rook και συνεργατών διαπιστώθηκε ότι η Vit.D₃ δρα προσθετικά με την INF- γ στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων για την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και την λύση φαγοκυτταρωμένων μυκοβακτηριδίων . Η λογικότερη ερμηνεία για το αποτέλεσμά μας είναι ότι τα ήδη διαφοροποιημένα και ώριμα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάζονται με Vit.D₃ ενεργοποιούν μηχανισμούς αρνητικής αυτορρύθμισης για να αποφεύγουν την υπερβολική διέγερσή τους .

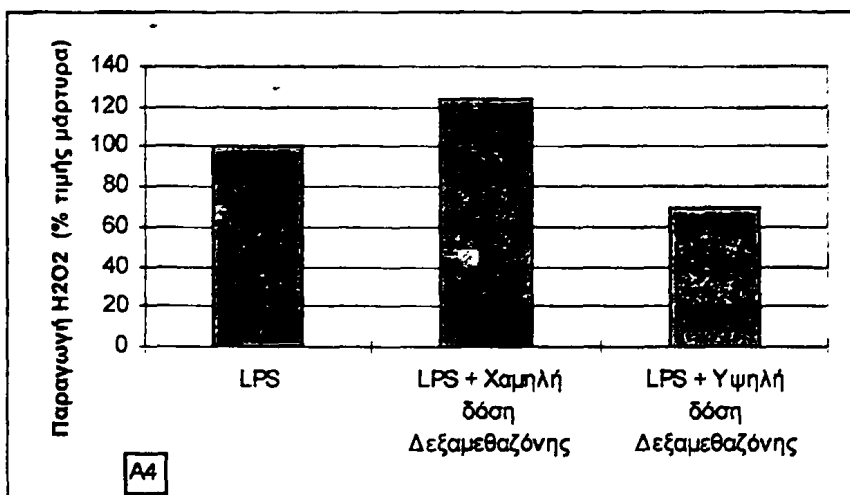
Στον πίνακα A3 που ακολουθεί θα παρουσιαστούν οι επιδράσεις στην παραγωγή H₂O₂ από ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα όλων των πειραματικών ουσιών που χορηγήθηκαν . Οι ουσίες αυτές χωρίζονται σε Ορμόνες του Stress , Αυτακοειδή και στην Βιταμίνη D₃ που δεν ανήκει σε καμία από τις δύο αυτές κατηγορίες . Οι Ορμόνες του Stress απεικονίζονται με ιώδες χρώμα και τα Αυτακοειδή με γαλάζιο χρώμα .



Από τον πίνακα A3 διαπιστώνουμε ότι οι περισσότερες πειραματικές ουσίες επηρεάζουν την παραγωγή του H_2O_2 . Μόνο τέσσερις ουσίες δεν προκάλεσαν μεταβολές στην Οξειδωτική Έκρηξη των περιτοναϊκών μακροφάγων και συγκεκριμένα το Νευροπεπτιδίο Y, η Ισταμίνη, η Προσταγλανδίνη D2 και η 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D3. Φαινομενικά δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των τεσσάρων αυτών ουσιών: είναι τελείως διαφορετικά μόρια, με διαφορετικό φυσιολογικό ρόλο και διαφορετικούς μηχανισμούς λειτουργίας. Επίσης δεν υπάρχει κάποια εμφανής λογική στις επιδράσεις των άλλων πειραματικών ουσιών στην παραγωγή του H_2O_2 . Η Αδρεναλίνη, η Ντοπαμίνη, η Δεξαμεθαζόνη και η PGE_2 προκάλεσαν μείωση της ικανότητας παραγωγής του, ενώ η Ινσουλίνη, η Γλυκαγόνη και η Σεροτονίνη προκάλεσαν αύξηση της ικανότητας παραγωγής του. Είναι δύσκολο να ομαδοποιηθούν τα αποτελέσματα αφού ούτε όλες οι Ορμόνες του Stress προκάλεσαν το ίδιο αποτέλεσμα, ούτε όλα τα Αυτακοειδή. Παράγοντες που σίγουρα εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες σαν συνέπεια εκτεταμένου τραυματισμού (Κατεχολαμίνες, Γλυκοκορτικοειδή, Γλυκαγόνη και Σεροτονίνη) οδηγούν σε αντίθετα αποτελέσματα. Ορμόνες με διαφορετικές φυσιολογικές επιδράσεις και με αντίθετους ομοιοστατικούς ρόλους, όπως η Γλυκαγόνη και η Ινσουλίνη, προκαλούν την ίδια ακριβώς επίδραση στην παραγωγή H_2O_2 από τα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα. Από τις παρατηρήσεις αυτές είναι εμφανές ότι η φύση της πειραματικής ουσίας και ο γενικότερος ρόλος της στην φυσιολογία του οργανισμού δεν σχετίζονται με την επίδρασή της στην ικανότητα παραγωγής H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα.

Ένα πολύ εντυπωσιακό αποτέλεσμα προέκυψε από την επώαση των ενεργοποιημένων με ενδοτοξίνη μακροφάγων με Δεξαμεθαζόνη σε χαμηλή και σε υψηλή δοσολογία (αντίστοιχα 5×10^{-6} M και 10^{-4} M). Μετά από επώαση

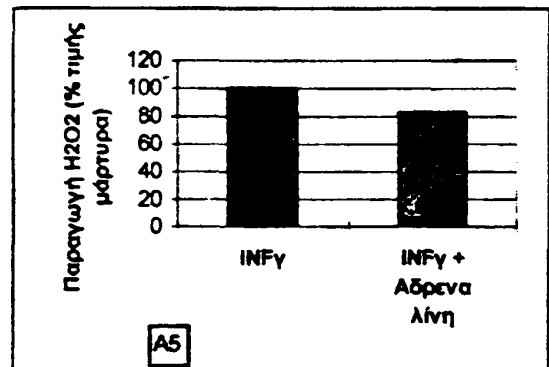
με $LPS + 5 \times 10^{-6}$ M Δεξαμεθαζόνης, τα περιτοναϊκά μακροφάγα αύξησαν την ικανότητά τους για παραγωγή H_2O_2 (δηλαδή έκαναν το αντίθετο από ότι με Αδρεναλίνη), ενώ μετά από επώαση με $LPS + 10^{-4}$ M Δεξαμεθαζόνης για 12 ώρες μειώθηκε η παραγωγή H_2O_2 . Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρόμοιες αναφο-



ρές, εκτός από μια μελέτη για την αύξηση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με χαμηλές δόσεις Δεξαμεθαζόνης για μικρό χρονικό διάστημα (Broug-Holub και Kraal, 1996). Η πιθανότερη εξήγηση αυτού του φαινομένου βρίσκεται στον μηχανισμό της δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Τα μόρια αυτά συνδέονται με έναν κυτταροπλασματικό υποδοχέα και το σύμπλοκο που δημιουργείται μεταφέρεται στον πυρήνα. Εκεί συνδέεται με μια ειδική μικρή αλληλουχία νουκλεοπιδίων στο ρυθμιστικό τμήμα του γονιδίου που θα επηρεαστεί. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται GRE (Glucocorticoid Responsive Elements) και μπορεί να προάγει ή να καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση (Θετικά GRE - Αρνητικά GRE). Εκτός από την σύνδεση με τις αλληλουχίες GRE, τα σύμπλοκα γλυκοκορτικοειδούς-υποδοχέα μπορούν να μειώσουν την γονιδιακή έκφραση συνδεόμενα με τους Παράγοντες Μεταγραφής AP-1 (Activating Protein 1) και εμποδίζοντάς

τους να συνδεθούν με τις ρυθμιστικές θέσεις των γονιδίων (Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Edition, 1996). Είναι πιθανό τα γλυκοκορτικοειδή σε πολύ χαμηλές δόσεις να συνδέονται εκλεκτικά με θετικά GRE και έτσι προάγεται η έκφραση γονιδίων σχετίζονται με την παραγωγή H_2O_2 . Όταν τα γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται σε υψηλότερες δόσεις υπάρχει σύνδεση και με τα Αρνητικά GRE, που είναι ισχυρότερα. Έτσι επικρατεί η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Με το μηχανισμό αυτό οι Βρουγ-Χολιου και Κραλ εξήγησαν το αντίστοιχο φαινόμενο που παρατήρησαν στα δικά τους κύτταρα. Όμως εκτός από το παράδοξο της διέγερσης της παραγωγής H_2O_2 από την Δεξαμεθαζόνη, και η μείωση της παραγωγής του από τις υψηλές δόσεις του γλυκοκορτικοειδούς είναι πολύ ενδιαφέρουσα, αφού δεν υπάρχει ομοφωνία για αυτές τις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου από τα μακροφάγα (Schultz και συν., 1985, Maridonneau-Parini και συν., 1988) ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι τα μακροφάγα δεν επηρεάζονται καθόλου από τις ουσίες αυτές (Dieter και συν., 1986, Schaffner και Rellstab, 1988).

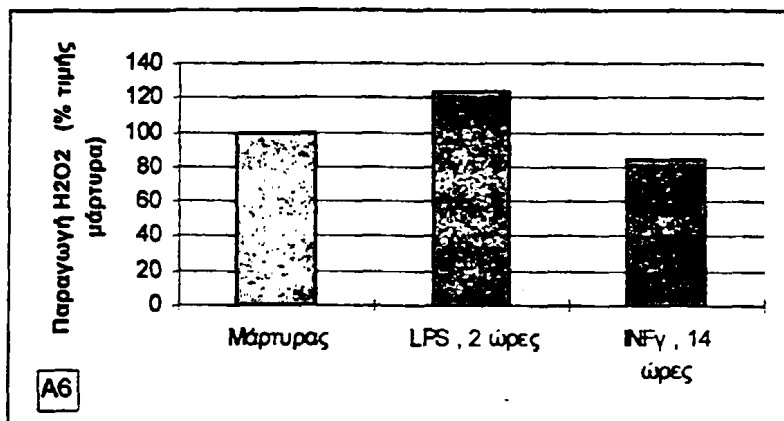
Η παραγωγή του H_2O_2 σε περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη- γ μελετήθηκε σε δύο πειράματα: Στο πρώτο πείραμα (πίνακας Α5) χορηγήθηκαν ταυτόχρονα $INF\gamma$ και Αδρεναλίνη για 6 ώρες, με αποτέλεσμα η παραγωγή του H_2O_2 να μειωθεί κατά 17.19%. Στο δεύτερο πείραμα έγινε αρχικά επώαση μακροφάγων με $INF\gamma$ + Αδρεναλίνη και στην συνέχεια ακολούθησε επώαση με $INF\gamma$ + Δεξαμεθαζόνη. Η παραγωγή του H_2O_2 από τα κύτταρα αυτά συγκρίθηκε με εκείνη από κύτταρα που επώαστηκαν αρχικά με $INF\gamma$ και στην συνέχεια με $INF\gamma$ + Δεξαμεθαζόνη. Αναμενόταν να υπάρχει κάποια διαφορά στις τιμές, επειδή η Αδρεναλίνη θα ασκούσε κατασταλτική δράση ενώ η Δεξαμεθαζόνη (η οποία χορηγήθηκε σε χαμηλή δόσολογία και για 8 μόλις ώρες) θα δρούσε ευοδωτικά στην παραγωγή H_2O_2 . Δεν υπήρξε κάποιο τέτοιο αποτέλεσμα, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους: α) η δράση της Αδρεναλίνης να έχει περιορισμένη διάρκεια ή β) η ευοδωτική επίδραση της Δεξαμεθαζόνης καλύπτει την κατασταλτική δράση της Αδρεναλίνης.



Δεν μπορεί να δοθεί βέβαιη εξήγηση στα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 22 και # 23. Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων μονάχα με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 για 14 ώρες προκαλεί μόνο μια μικρή μείωση της παραγωγής H_2O_2 στα φυσιολογικά μακροφάγα, αλλά κατά την επώαση των ενεργοποιημένων με LPS μακροφάγων με 1,25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D3 για 14 ώρες δεν παρατηρείται καμία απολύτως μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 . Η έλλειψη κάποιας επίδρασης στην δεύτερη περίπτωση είναι πιθανό να οφείλεται σε επίδραση της Vit.D3 επάνω στα γονίδια εκείνα που επάγει η ενδοτοξίνη κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων (Intropa και συν., 1986, Largen και Tannenbaum, 1986, Aderem, 1988, Hamilton, 1989, Tannenbaum και Hamilton, 1989).

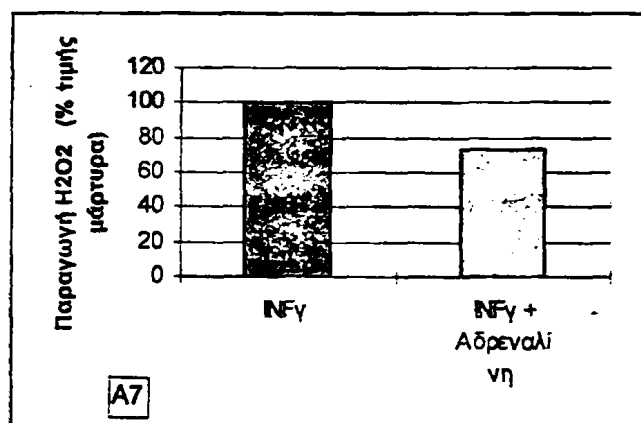
Η επώαση βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 2 ώρες (πειραματική ομάδα # 24) και με 250 units/ml $INF\gamma$ για 14 ώρες (πειραματική ομάδα # 25) έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με τα αντίστοιχα πειράματα των περιτοναϊκών μακροφάγων. Ενώ η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 2 ώρες οδήγησε στην αύξηση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά

24.64 % , αντίθετα η επώασή τους με 250 units/ml INF γ για 14 ώρες προκάλεσε μείωση της παραγωγής H $_2$ O $_2$ κατά 15.35 % . Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στον πίνακα A6 . Στην πειραματική ομάδα # 28 έγινε επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων για 6



ώρες με 250 μ /ml INF γ + 10 $^{-4}$ M Αδρεναλίνης για 6 ώρες . Το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος φαίνεται στον πίνακα A7 . Η παραγωγή του H $_2$ O $_2$ μειώθηκε , προφανώς λόγω της επίδρασης της Αδρεναλίνης μέσω του cAMP .

Η επανάληψη του ίδιου πειράματος με εκείνο της ομάδας # 20 έγινε και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Αυτά τα κύτταρα επωάστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη και στην συνέχεια



με INF γ + Δεξαμεθαζόνη και η ικανότητα της παραγωγής H $_2$ O $_2$ συγκρίθηκε με εκείνη από μακροφάγα που επωάστηκαν αρχικά με INF γ και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη . Διαπιστώθηκε ότι η Αδρεναλίνη δεν επηρέασε καθόλου την παραγωγή του H $_2$ O $_2$ από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

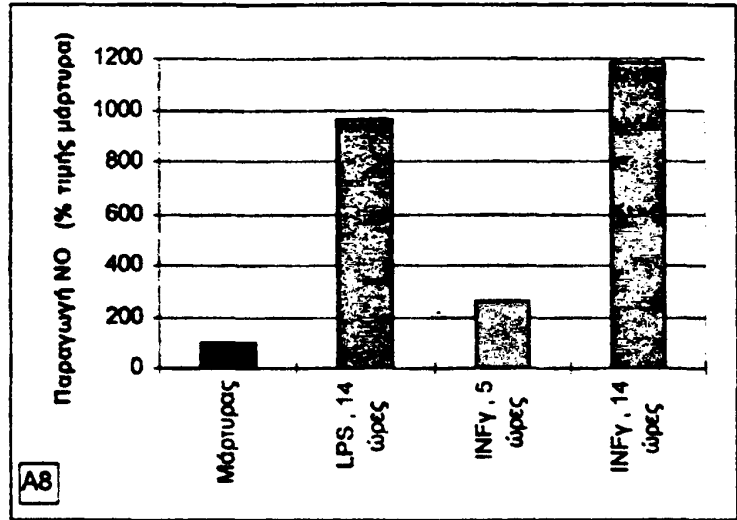
Από τα στοιχεία τα οποία δόθηκαν παραπάνω για τις επιδράσεις των πειραματικών

ουσιών στην παραγωγή του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου από τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα περί των μηχανισμών που διέπουν αυτά τα φαινόμενα . Πολλά από τα αποτελέσματα αυτά είναι δυσερμήνευτα . Φαίνεται όμως ότι υπάρχουν κάποιοι «προστατευτικοί μηχανισμοί» που αποτρέπουν την υπερπαραγωγή των δυνητικά βλαπτικών Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Επίσης φαίνεται να υπάρχει μια δυνατότητα «λεπτής ρύθμισης» της παραγωγής του H $_2$ O $_2$. Ορισμένες από τις ορμόνες και τα αυτακοειδή που μελετήθηκαν πρέπει να αποτελούν φορείς αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών . Τέλος , ορισμένα από τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν συνηγορούν στην άποψη ότι υπάρχει ένας αυτορρυθμιστικός μηχανισμός που σταματά την παραγωγή του H $_2$ O $_2$ μετά από επώαση 14 ωρών με Ιντερφερόνη- γ . Είναι πιθανό ο μηχανισμός αυτός να δρα μέσω της παραγωγής και της αυτοκρινικής επίδρασης ουσιών όπως η PGE $_2$, η IL-10 και η Νοραδρεναλίνη (Lim και συν., 1983 , Spengler και συν., 1994) .

Συνολικά αποτελέσματα των πειραμάτων μέτρησης παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .

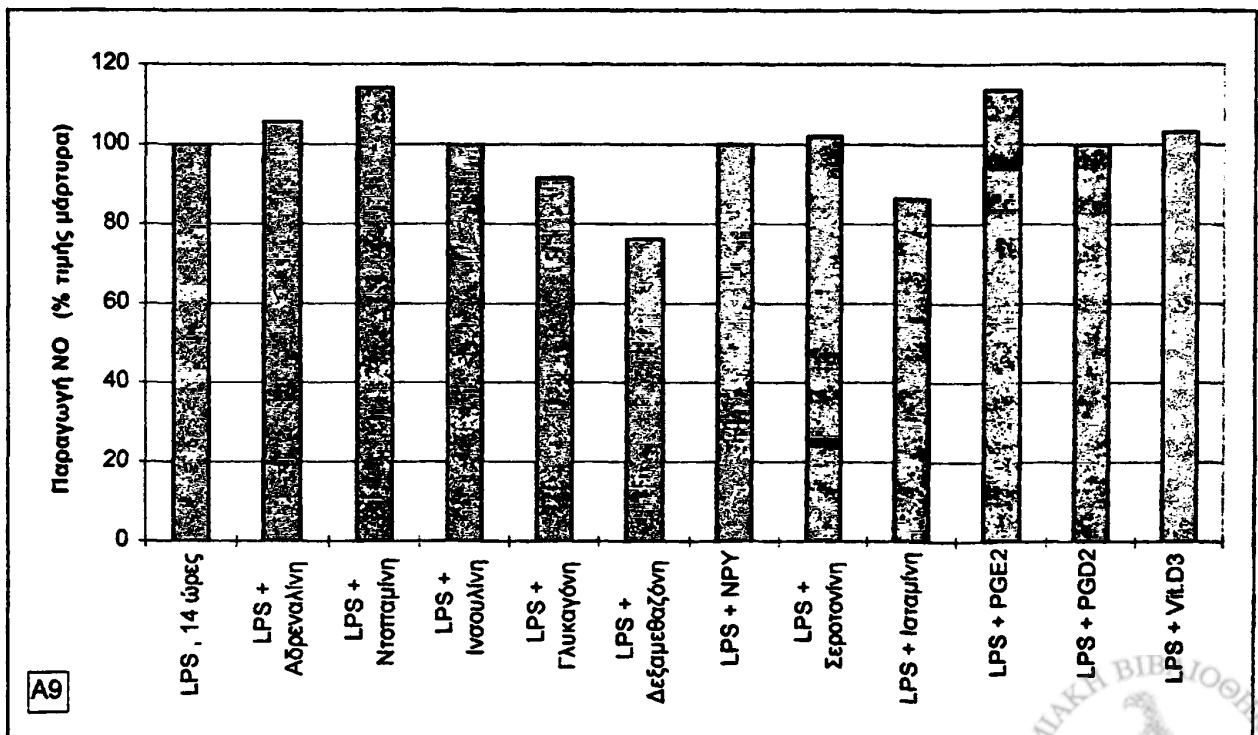
Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 μg/ml LPS προκάλεσε αύξηση

της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 863.88 % . Η επώαση των μακροφάγων αυτών με 250 μ/ml INFγ επί 14 ώρες οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής NO κατά 1080 % , ενώ η επώαση με 250 μ/ml INFγ επί 5 ώρες προκάλεσε αύξηση κατά 158.82 % . Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στον πίνακα A8 και ήταν τα αναμενόμενα , αφού υπάρχουν πολλές ανακοινώσεις στην βιβλιογραφία οι οποίες περιγράφουν την επίταση της



παραγωγής NO μετά από ενεργοποίηση των μακροφάγων με διάφορους διεγέρτες . Πρέπει όμως να παρατηρηθεί ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 μ/ml INFγ επί 14 ώρες προκάλεσε την συνεχιζόμενη αύξηση του ρυθμού παραγωγής NO , ενώ η ικανότητα παραγωγής του H₂O₂ μετά από την ίδια επώαση (250 μ/ml INFγ , επί 14 ώρες) παρουσίαζε σημαντική μείωση . Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μία πρώτη ένδειξη ότι το Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και το Νιτρικό Οξείδιο διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης .

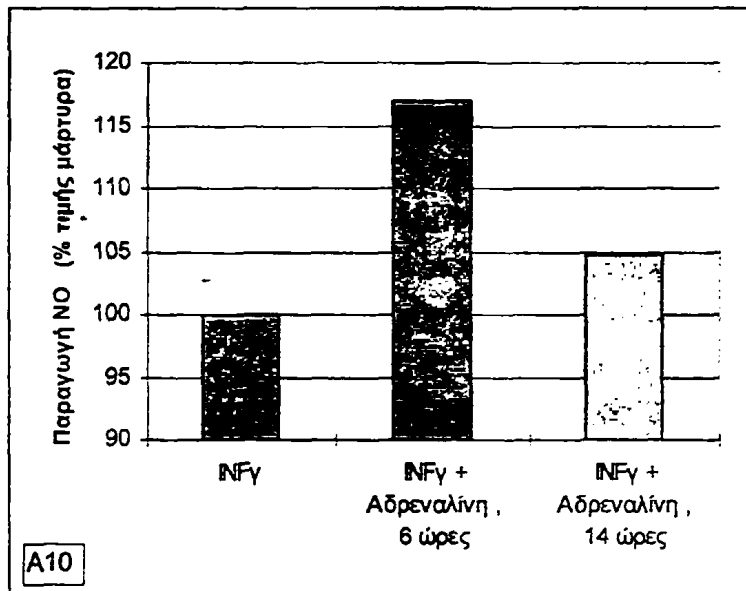
Στον πίνακα A9 που ακολουθεί απεικονίζονται οι επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με LPS για 14 ώρες , δηλαδή τις πειραματικές ομάδες # 32 ως # 41 , καθώς και την ομάδα # 46 .



Στον πίνακα A9 οι Ορμόνες του Stress απεικονίζονται με κώδες ενώ τα Αυτακοιδή με κυανό χρώμα . Η Βιταμίνη D3 δεν ανήκει σε καμία από τις δύο κατηγορίες και για αυτό παρουσιάζεται τελευταία .

Από τα αποτελέσματα του πίνακα A9 διαπιστώνουμε ότι ούτε όλες οι Ορμόνες του Stress ούτε όλα τα Αυτακοειδή έχουν την ίδια επίδραση στην παραγωγή NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Από τις ουσίες που μελετήθηκαν οι περισσότερες προκάλεσαν κάποια επίδραση εκτός από την Ινσουλίνη , το Νευροπεπτιδίο Υ και την Προσταγλανδίνη PGD₂ . Οι παρατηρούμενες επιδράσεις δεν έχουν σχέση με την φύση της πειραματικής ουσίας (δηλαδή αν είναι πολυπεπτιδίο , αμίνη ή λιπίδιο) . Επίσης δεν υπάρχει συσχέτιση της επίδρασης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου με το αν μια ουσία αυξάνεται σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις ή όχι (π.χ. δύο τυπικοί χυμικοί διαβιβαστές της φλεγμονής , η Ισταμίνη και η Σεροτονίνη , είχαν αντίθετες επιδράσεις) . Η προσταγλανδίνη PGE₂ , ενώ θεωρείται ότι καταστέλλει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος , στην συγκεκριμένη περίπτωση προκάλεσε αύξηση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου . Η Δεξαμεθαζόνη προκάλεσε μείωση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου , ενώ υπάρχουν δημοσιεύσεις για το αντίθετο αποτέλεσμα σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Η Ινσουλίνη , ενώ υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις σχετικά με τις επιδράσεις της στα μακροφάγα , δεν προκάλεσε καμία επίδραση στην παραγωγή NO . Αντιθέτως η Γλυκαγόνη μείωσε την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου . Οι κατεχολαμίνες Αδρεναλίνη και Ντοπαμίνη προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , αν και συνήθως ο ρόλος τους είναι κατασταλτικός .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 μ g/ml INF γ προκάλεσε τεράστια αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Στον πίνακα A10 έχουν απεικονιστεί οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης στα κύτταρα αυτά . Όταν στα μακροφάγα τα οποία επωάζονταν με Ιντερφερόνη- γ χορηγήθηκε και Αδρεναλίνη για 6 ώρες , η παραγωγή NO αυξήθηκε δραματικά , ενώ αντιθέτως η επώαση με Ιντερφερόνη και Αδρεναλίνη για 14 ώρες οδήγησε στην πολύ μικρότερη μεταβολή στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .



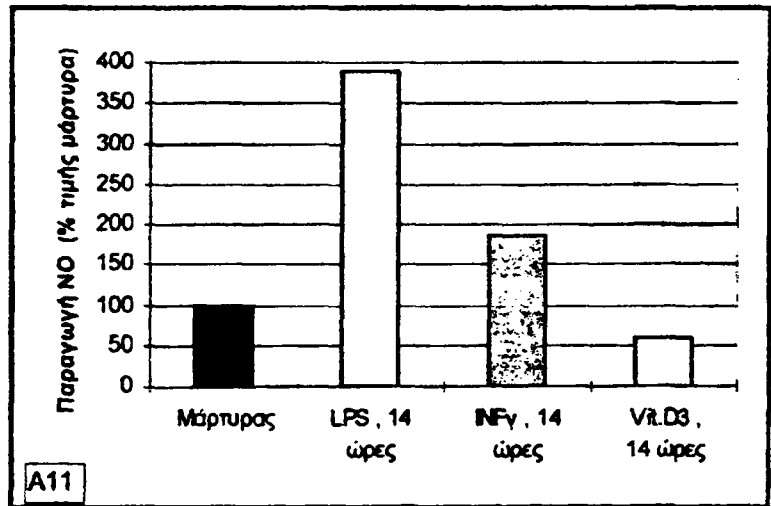
Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με τρεις τρόπους : α. Μετά από 14 ώρες η επίδραση της Αδρεναλίνης φθίνει , β. Μετά από 14 ώρες η Αδρεναλίνη δρα με σταθερό τρόπο ενώ στους μάρτυρες η Ιντερφερόνη- γ προκαλεί αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου εκθετικά και όχι γραμμικά , με αποτέλεσμα να μειώνονται οι διαφορές μαρτύρων - πειραματικών , γ. Η υπερβολική αύξηση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου από τον συνδυασμό Ιντερφερόνης και Αδρεναλίνης ενεργοποιεί κάποιον μηχανισμό αυτοπεριορισμού της παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Αζώτου .

Δύο ακόμα αποτελέσματα δεν έχουν αναφερθεί σχετικά με τις επιδράσεις στην παραγωγή NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Στην πειραματική ομάδα # 44 τα κύτταρα επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ + Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη για 8 ώρες . Η παραγωγή του NO συγκρίθηκε με εκείνη από κύτταρα που επωάστηκαν επί 6 ώρες με INF γ και στην συνέχεια με INF γ +

Δεξαμεθαζόνη για άλλες 8 ώρες . Η αρχική επώαση με Αδρεναλίνη δεν προκάλεσε καμία αύξηση στην παραγωγή NO , είτε επειδή η κατασταλτική επίδραση της Δεξαμεθαζόνης υπερτερεί ή επειδή η δράση της Αδρεναλίνης είναι βραχύχρονη . Η πρώτη εξήγηση είναι πιο πιθανή , αφού η Αδρεναλίνη λογικά προκαλεί επαγωγή της iNOS και ακόμα και μια βραχύχρονη επίδραση θα ήταν εμφανής . Είναι όμως δυνατό η Αδρεναλίνη να δρα και με άλλους τρόπους , όπως π.χ. αυξάνοντας την δραστηριότητα της ήδη υπάρχουσας iNOS μέσω φωσφορυλίωσης από την PKA . Επίσης πρέπει εδώ να αναφερθούν τα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 45 , όπου διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες μόνο με Vit.D3 προκάλεσε μικρή αλλά σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έλαβαν καμία διέγερση (κατά 4.73 %) . Η επώαση μόνο με Vit.D3 προκαλεί αύξηση κατά 4.73 % σε σύγκριση με μακροφάγα που δεν έλαβαν καμία άλλη διέγερση , ενώ η επώαση με INF γ + Vit.D3 προκαλεί την αύξηση της παραγωγής NO κατά 3.35 % σε σύγκριση με μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με INF γ (για τα οποία είναι γνωστό ότι παράγουν κατά 1000 % περισσότερο NO από μακροφάγα που δεν έλαβαν άλλη διέγερση) . Είναι αντικείμενο απορίας αυτή η σταθερή διαφορά μεταξύ μαρτύρων και πειραματικών , ανεξάρτητα από την ποσότητα του NO που παράγουν οι μάρτυρες .

Στον πίνακα A11 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι επιδράσεις του LPS , της INF γ και της Vit.D3 στην παραγωγή NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Διαπιστώνουμε ότι η επώαση με

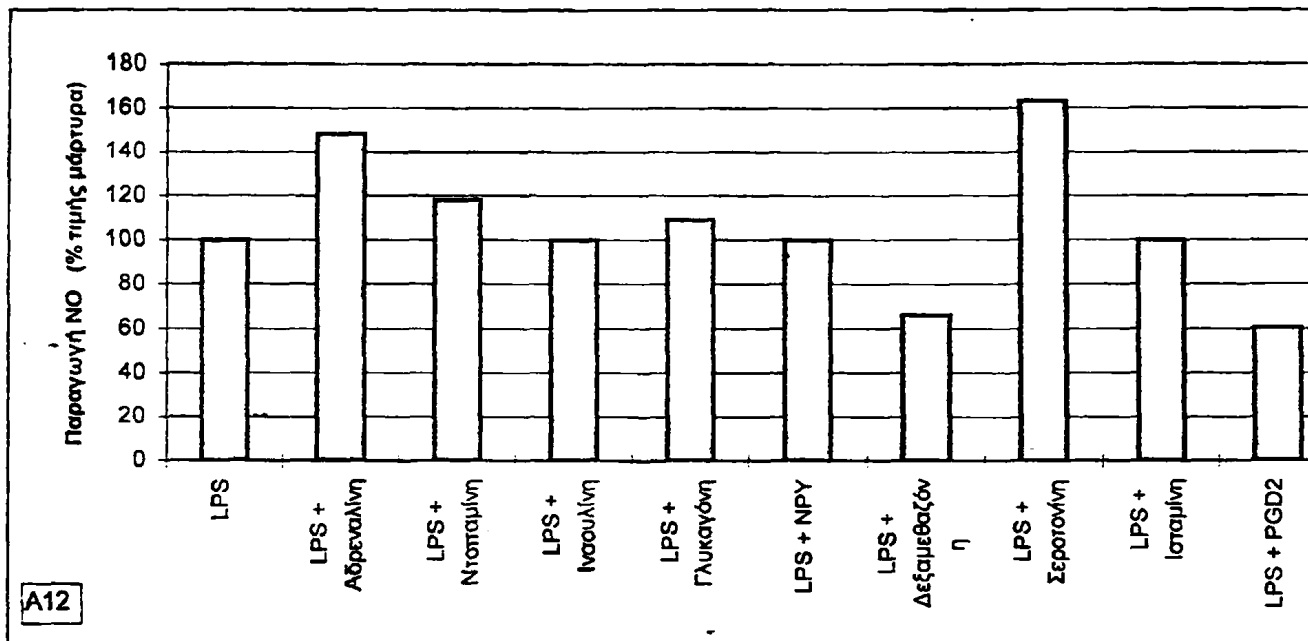
LPS και INF γ προκαλούν αύξηση της παραγωγής του NO , ενώ αντιθέτως η Vit.D3 προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής του NO . Η αύξηση στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από επώαση 14 ωρών με LPS είναι της τάξης του 290,32 % , ενώ μετά από επώαση 14 ωρών με INF γ είναι μόλις 87.77 % . Αντιθέτως η επώαση για 14 ώρες με Vit.D3 οδηγεί σε μείωση της έκκρισης NO κατά 15.09 % , το οποίο έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα



των περιτοναϊκών μακροφάγων (στην πειραματική ομάδα # 45 η Vit.D3 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 4.37 %) . Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να ήταν ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι ήδη «διεγερμένα» αφού έρχονται σε επαφή με σκόνες , σωματίδια και μικροοργανισμούς από τον ατμοσφαιρικό αέρα , ενώ τα προστατευμένα περιτοναϊκά μακροφάγα υπό κανονικές συνθήκες δεν είναι διεγερμένα . Έτσι η Vit.D3 ενεργοποιεί τα περιτοναϊκά κύτταρα και αυξάνει την παραγωγή NO , ενώ στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα προκαλεί μείωση της παραγωγής NO σε μια προσπάθεια περιορισμού της υπερβολικής παραγωγής Δραστικών Ριζών Αζώτου . Η εξήγηση αυτή θα μπορούσε να βοηθήσει και στην ερμηνεία του άλλου παραδόξου φαινομένου , ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα αποκρίνονται εντονότερα στον LPS παρά στην INF γ , ενώ στα περιτοναϊκά μακροφάγα παρατηρούμε την ανάποδη επίδραση . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα δεν έρχονται σε επαφή με την ενδοτοξίνη υπό κανονικές συνθήκες ,

ενώ τα περιτοναϊκά κύτταρα που έρχονται περιοδικά σε επαφή με απειροελάχιστες ποσότητες LPS από την φυσιολογική εντερική χλωρίδα πιθανώς να αναπτύσσουν κάποιου βαθμού «εξοικείωση» και συνεπώς άμβλυνση των αντιδράσεων στις ενδοτοξίνες . Έτσι φαίνεται σαν να αντιδρούν περισσότερο στην INF- γ .

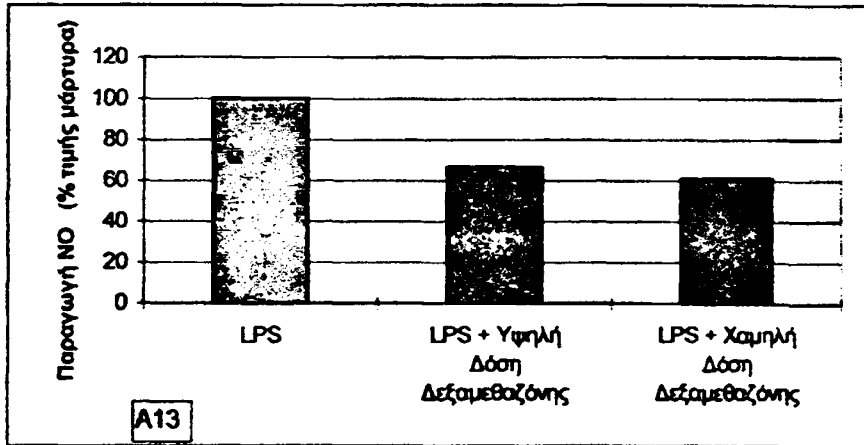
Στον πίνακα A12 απεικονίζονται οι επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στην παραγωγή NO από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επωάστηκαν με LPS για 14 ώρες . Οι επιδράσεις των Ορμονών του Stress παρουσιάζονται με χρώμα κίωδες ενώ οι επιδράσεις των Αυτακοειδών με κυανό . Η Vit.D3 παρουσιάζεται τελευταία .



Στον πίνακα A12 διαπιστώθηκε ότι ούτε όλες οι ορμόνες του Stress ασκούν την ίδια επίδραση στα ενεργοποιημένα με LPS βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , ούτε όλα τα Αυτακοειδή . Από τις Ορμόνες του Stress οι Κατεχολαμίνες και η Γλυκαγόνη προκαλούν αυξημένη παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου , η Ινσουλίνη και το NPY δεν προκαλούν καμία επίδραση , ενώ η Δεξαμεθαζόνη μειώνει την παραγωγή του NO . Από τα Αυτακοειδή η Σεροτονίνη αυξάνει την παραγωγή NO , η Ισταμίνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή και η Προσταγλανδίνη PGD₂ οδηγεί σε μείωση κατά 7.17 % . Το τελευταίο αυτό αποτέλεσμα είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον , γιατί δεν παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο με τα περιτοναϊκά κύτταρα , ούτε υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για επιδράσεις της PGD₂ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ή άλλα μακροφάγα . Αντιθέτως η Vit.D3 προκάλεσε το αναμενόμενο αποτέλεσμα , δηλαδή μια μικρή μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Πολλές ουσίες προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής του NO , το οποίο δεν συμβαδίζει με την θεωρία ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι «διεγερμένα» από την επαφή τους με τους ρύπους και τα μικρόβια του αέρα και για τον λόγο αυτό ενεργοποιούν πιο εύκολα μηχανισμούς καταστολής της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου .

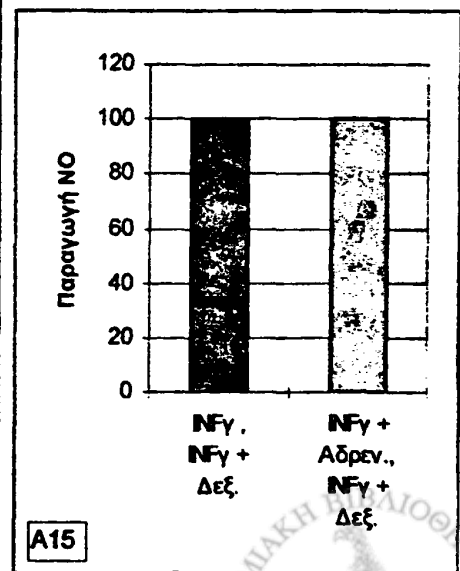
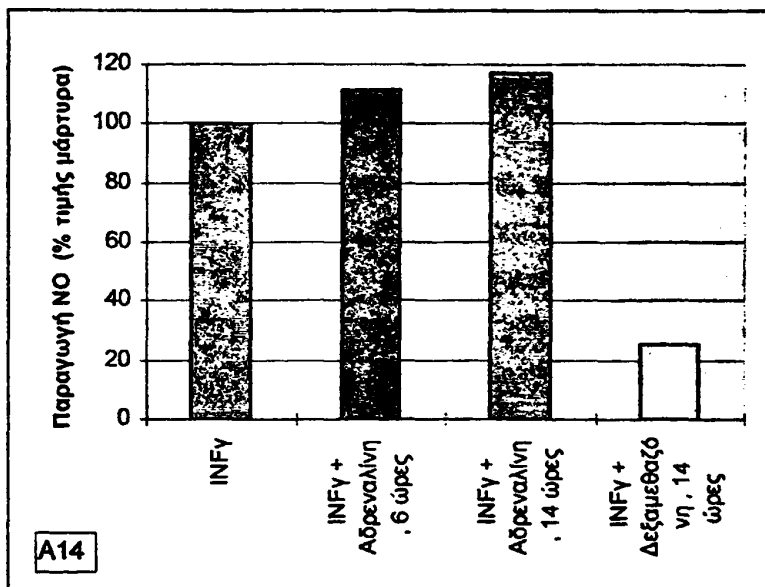
Στον πίνακα A13 που ακολουθεί φαίνεται ότι η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS + Δεξαμεθαζόνη προκαλεί μείωση στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου , ανεξάρτητα από την δόση της Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M ή 5×10^{-5} M) . Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την μελέτη των Broug-Holub και Kraal , στην οποία φαίνεται ότι η βραχεία επώαση των

ενεργοποιημένων με LPS βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου. Εδώ συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή η χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης έχει προκαλέσει ακόμα μεγαλύτερη καταστολή της παραγωγής NO από την Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης. Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμα κατανοητός.



Στην συνέχεια θα ακολουθήσουν λίγα αποτελέσματα από πειράματα όπου τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν επωαστεί με INF γ και διάφορες άλλες ουσίες.

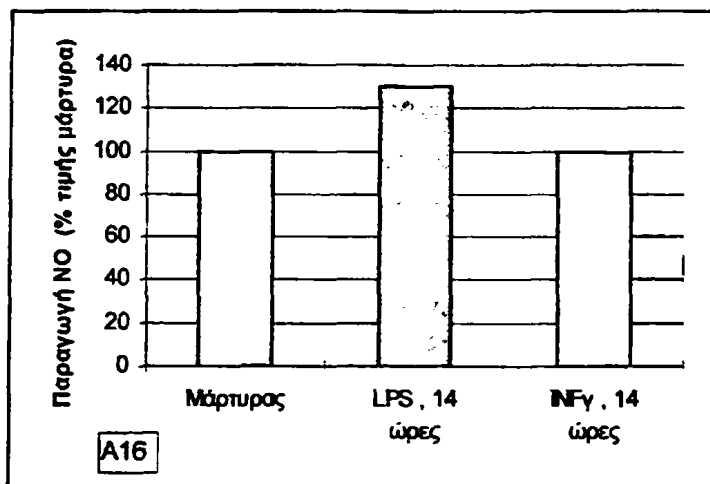
Όταν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επώαστηκαν με Ιντερφερόνη- γ και Αδρεναλίνη για 6 ώρες η παραγωγή NO αυξήθηκε κατά 11.23%, ενώ μετά από 14 ώρες υπήρξε αύξηση κατά 17.47%. Όταν τα μακροφάγα επώαστηκαν για 14 ώρες με INF γ και Δεξαμεθαζόνη παρουσιάστηκε μείωση της παραγωγής NO κατά 74.78%. Σύμφωνα με την πειραματική ομάδα # 63 η παραγωγή NO μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που έχουν τα μακροφάγα που δεν έλαβαν κανένα διεγέρτη. Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με εκείνα που παρουσιάζουν βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επώαστηκαν με LPS και την πειραματική ουσία. Τέλος, κύτταρα που επώαστηκαν αρχικά με INF γ + Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη παράγουν τις ίδιες ποσότητες NO με εκείνα τα οποία επώαστηκαν αρχικά με INF γ και στην συνέχεια με INF γ + Δεξαμεθαζόνη. Αυτό υποδηλώνει ότι η Αδρεναλίνη ασκεί πολύ βραχύχρονα αποτελέσματα ή ότι οι επιδράσεις της είναι πολύ ασθενείς σε σύγκριση με την ισχυρή κατασταλτική επίδραση της Δεξαμεθαζόνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στους πίνακες A14 και A15 που ακολουθούν.



Από τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί ένα συμπέρασμα για τους μηχανισμούς που καθορίζουν τις επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στα βρογχοκυψελιδικά μακρο-

φάγα , αν και ορισμένοι δείχνουν ότι έχουν ως σκοπό τον περιορισμό της υπέρμετρης παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου (δηλαδή αποτρέπουν την ιστική βλάβη από την υπερβολική έκκριση NO) .

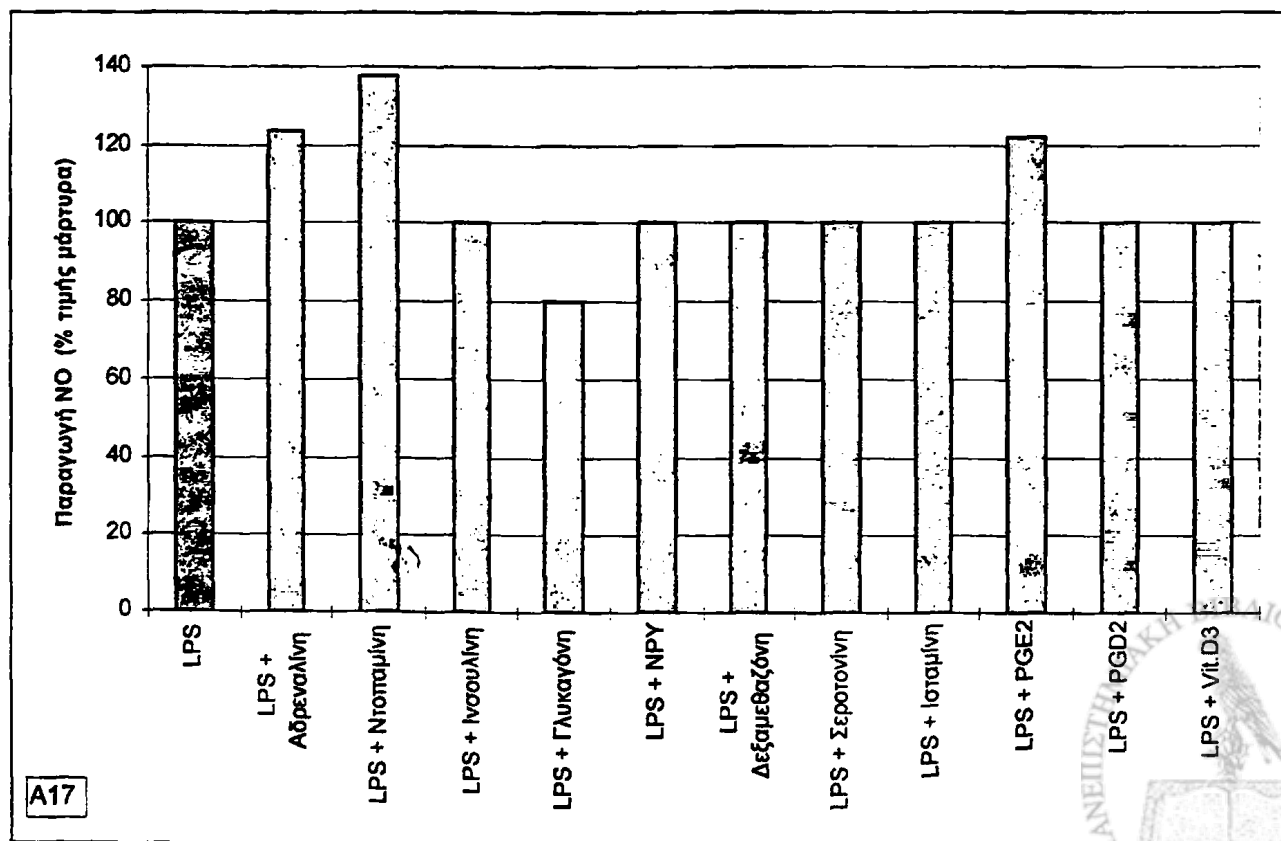
Στην συνέχεια θα δοθούν τα αποτελέσματα από πειράματα μέτρησης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από κύτταρα Kupffer . Στον πίνακα A16 απεικονίζονται οι επιδράσεις από την επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με LPS ή με INF γ . Διαπιστώνουμε ότι η επώαση με Ενδοτοξίνη ασκεί



μια έντονη διεγερτική δράση (αύξηση της παραγωγής NO κατά 30.43 %) , ενώ η INF γ δεν προκαλεί καμία επίδραση στην παραγωγή NO . Όμως , η επώαση των κυττάρων Kupffer με INF γ δεν προκαλεί ούτε την παραγωγή H $_2$ O $_2$. Είναι πιθανό τα ηπατικά μακροφάγα να μην έχουν την δυνατότητα απόκρισης στην INF γ . Ένα σημαντικό στοιχείο είναι ότι τα κύτταρα Kupffer ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στην Ενδοτοξίνη , το οποίο μειώνει πολύ

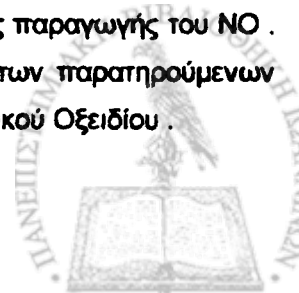
την πιθανότητα να υπάρχει ένας αυτορρυθμιστικός μηχανισμός που να μην επιτρέπει την υπερβολική παραγωγή NO . Τα κύτταρα Kupffer έρχονται σε συνεχή επαφή με τον LPS και θα αναμενόταν μια «ανοχή» και αμβλυμμένη αντίδραση στα μόρια της Ενδοτοξίνης αν υπήρχε τέτοιος μηχανισμός .

Στον πίνακα A17 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer . Τα αποτελέσματα που προέρχονται από τις Ορμόνες του Stress απεικονίζονται με πράσινο χρώμα ενώ τα αποτελέσματα των Αυτακοειδών με κυανό χρώμα . Τελευταία απεικονίζεται η Vit.D3 , που δεν ανήκει στις προηγούμενες δύο κατηγορίες .



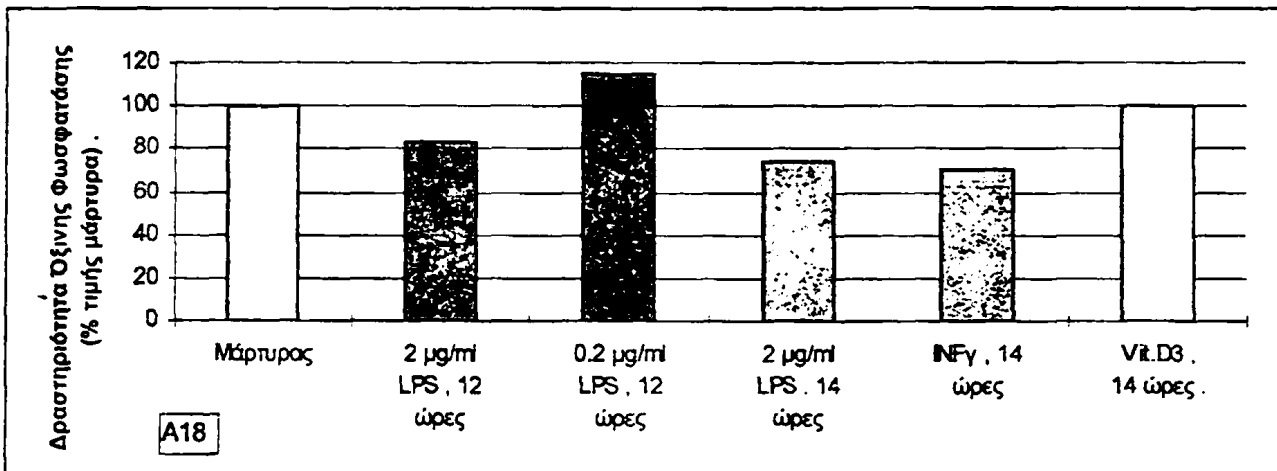
Είναι εμφανές ότι οι περισσότερες από τις πειραματικές ουσίες δεν προκάλεσαν μεταβολές στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Από τις ορμόνες του Stress , οι κατεχολαμίνες Αδρεναλίνη και Ντοπαμίνη προκάλεσαν πολύ έντονες αυξήσεις στην παραγωγή του NO και η Γλυκαγόνη προκάλεσε μείωση της παραγωγής του . Οι άλλες τρεις ορμόνες Ινσουλίνη , Δεξαμεθαζόνη και NPY δεν φάνηκε να προκαλούν καμία μεταβολή στην παραγωγή του NO . Από τα Αυτακοειδή μόνο η PGE₂ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO , ενώ η Σεροτονίνη , η Ισταμίνη και η PGD₂ δεν είχαν καμία επίδραση . Η Vit.D3 επίσης δεν προκάλεσε μεταβολές στην παραγωγή του NO από τα κύτταρα Kupffer . Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι ελάχιστες από τις πειραματικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ρυθμιστικές επιδράσεις στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer και ότι συνήθως η επίδραση αυτή ήταν ευοδωτική για την παραγωγή του NO . Από τα παραπάνω θα μπορούσε να υποθέσει κάποιος ότι η πρωταρχική μέριμνα του οργανισμού είναι να αυξήσει την παραγωγή NO ώστε να είναι μέγιστη η αντιμικροβιακή άμυνα του ήπατος . Όμως αυτό αντικρούεται στην έλλειψη παραγωγής H₂O₂ από τα κύτταρα Kupffer . Η παραγωγή του NO θα μπορούσε να έχει αγγειορυθμιστικό ρόλο , αφού το Νιτρικό Οξείδιο είναι αγγειοδιασταλτικός παράγοντας (Endothelial-Derived Relaxing Factor) . Από την άλλη είναι πιθανό τα κύτταρα Kupffer απλώς να μην αναγνωρίζουν ή να μην αποκρίνονται στις ουσίες που εμείς χορηγήσαμε , αλλά για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση πρέπει να διαπιστωθεί ότι και στα πειράματα μέτρησης της δραστηριότητας Οξίνης Λυσοσωματικής Φωσφατάσης δεν υπάρχει απόκριση στις ίδιες ουσίες . Τέλος είναι πιθανό από τις παραπάνω εξηγήσεις να ισχύουν όλες ταυτοχρόνως .

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ των τριών τύπων μακροφάγων διαπιστώνουμε κάποια ανομοιογένεια τόσο στην διέγερσή τους για παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου όσο και στην απόκρισή τους στις Ορμόνες του Stress και τα Αυτακοειδή . Τα περιτοναϊκά μακροφάγα παράγουν περισσότερο NO όταν διεγερθούν με INF γ παρά με LPS , τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παράγουν περισσότερο NO μετά από επώαση με LPS παρά με INF γ και τέλος τα κύτταρα Kupffer δεν αποκρίνονται καθόλου στην INF γ . Επίσης , όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωαστούν μόνο με Vit.D3 αυξάνουν την παραγωγή NO , ενώ όταν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επωαστούν μόνο με Vit.D3 παρατηρείται μία ελαφρά μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Οι φαινοτυπικές αυτές διαφορές μεταξύ των τριών ειδών μακροφάγων δεν μπορούν να εξηγηθούν εύκολα : Αν υποθέσουμε ότι λόγω ανατομικής εντόπισης τα περιτοναϊκά κύτταρα έχουν αναπτύξει «εξοικείωση» με τον LPS και για αυτό δεν αντιδρούν σε αυτόν με έντονη παραγωγή NO , τότε τα κύτταρα Kupffer δεν θα έπρεπε να αντιδρούν καθόλου στον LPS αλλά μόνο στην INF γ . Η άλλη πιθανή εξήγηση , δηλαδή ότι τα μακροφάγα που είναι σε μια μόνιμη κατάσταση «διέγερσης» έχουν αυτορρυθμιστικούς μηχανισμούς επίσης δεν πρέπει να ισχύει , αφού τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τα κύτταρα Kupffer συμπεριφέρονται τελείως διαφορετικά . Εκτός από τις προαναφερθείσες διαφορές , διαπιστώθηκαν και διαφορές στον τρόπο απόκρισης στις ουσίες που χορηγήθηκαν . Όμως τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα φαίνεται να υπακούνε σε μηχανισμούς λεπτής ρύθμισης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Αντιθέτως , τα κύτταρα Kupffer που όφειλαν να έχουν την αυστηρότερη ρύθμιση (λόγω εντόπισης στο ευαίσθητο ηπατικό παρέγχυμα) επιδέχονται ελάχιστες ρυθμιστικές επιδράσεις , με κύριο σκοπό την αύξηση της παραγωγής του NO . Τελικά η μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν επιτρέπει την ερμηνεία των παρατηρούμενων επιδράσεων στα πλαίσια ενός μηχανισμού αυτορρύθμισης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .



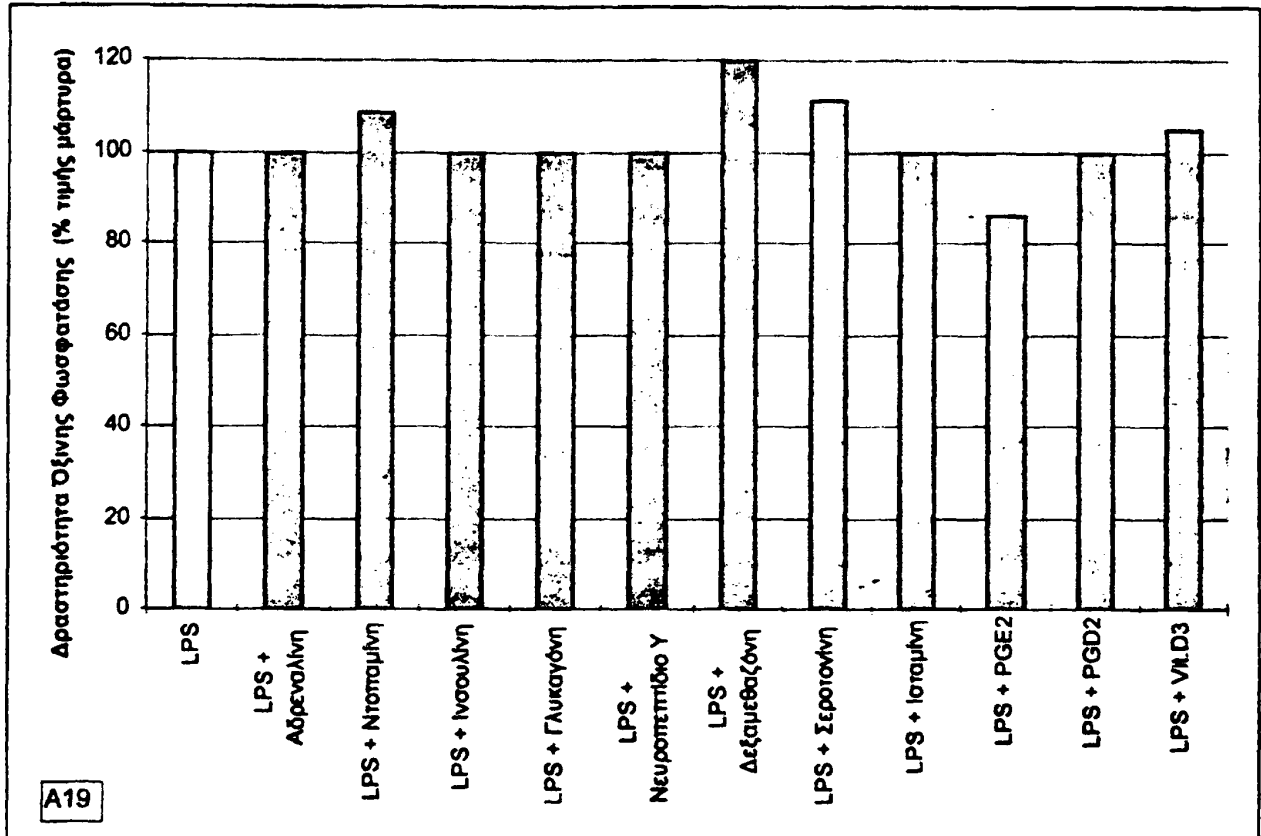
Συνολικά αποτελέσματα των πειραμάτων μέτρησης της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 12 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 16.86 % , ενώ η επώαση των κυττάρων αυτών επί 12 ώρες με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 15.06 % . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκάλεσε την μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 26.06 % και η επώασή τους επί 14 ώρες με 250 u/ml INF γ οδήγησε σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 29.46 % . Τέλος η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 14 ώρες με Vit.D3 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών απεικονίζονται στον πίνακα A18 .



Η παρατηρούμενη μείωση των δραστηριοτήτων Ώξινης Φωσφατάσης θα πρέπει να αποδοθεί στην έκκριση του ενζύμου , δηλαδή στην εξωκύττωσή του . Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι τα μακροφάγα που επωάζονται in vitro με LPS παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης (Morland και Kaplan, 1977 , Cooper και συν., 1984) αλλά ταυτοχρόνως έχουν την ικανότητα έκκρισης μεγάλων ποσοτήτων του ενζύμου (Schnyder και Baggiolini, 1978) έτσι ώστε να παρατηρείται μεγαλύτερη δραστηριότητα της Υδρολάσης στον μεσοκυττάριο χώρο παρά μέσα στο ίδιο το κύτταρο . Στην περίπτωση της επώασης των κυττάρων με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες αυξήθηκε η δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης , που σημαίνει ότι αυξήθηκε η σύνθεση του ενζύμου αλλά δεν υπήρξε αύξηση του ρυθμού εξωκύττωσής του σε σημείο που να επισκιάζεται ο ρυθμός εξωκύττωσής του . Έτσι συσσωρεύεται το ένζυμο στα λυσοσώματα . Στην περίπτωση της Ιντερφερόνης- γ ο ρυθμός εξωκύτωσης πρέπει να υπερβαίνει τον ρυθμό σύνθεσης του ενζύμου . Η ενζυματική δραστηριότητα την οποία μετρά αυτή η μέθοδος αυτή πρέπει να γίνεται αντιληπτή σαν την ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή νέων μορίων ενζύμου και την έκκρισή τους στον μεσοκυττάριο χώρο . Δεν είναι γνωστό εάν η εξωκύτωση των Ώξινων Υδρολασών έχει σταθερό ρυθμό ή αν εξαρτάται από την κατάσταση ενεργοποίησης του μακροφάγου , αλλά είναι πιθανότερο ότι ο ρυθμός εξωκύτωσης μεταβάλλεται ανάλογα με τον βαθμό διέγερσης των μακροφάγων . Έτσι , η έλλειψη κάποιας μεταβολής στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης μετά από την επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Vit.D3 θα μπορούσε να μην σημαίνει ότι η πειραματική ουσία δεν επηρεάζει τα κύτταρα , αλλά ότι η αύξηση της έκκρισης του ενζύμου ήταν ακριβώς ίση με την αύξηση της παραγωγής του . Βέβαια η πιθανότητα να συμβαίνει αυτό είναι πολύ μικρή .

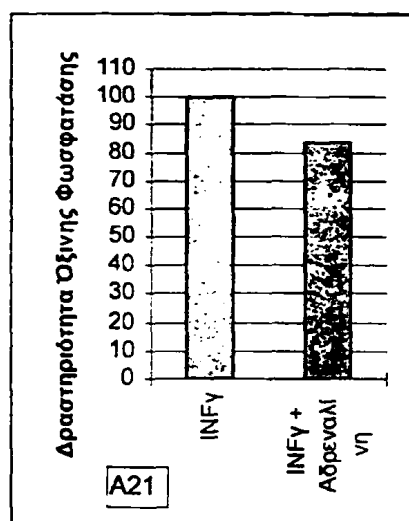
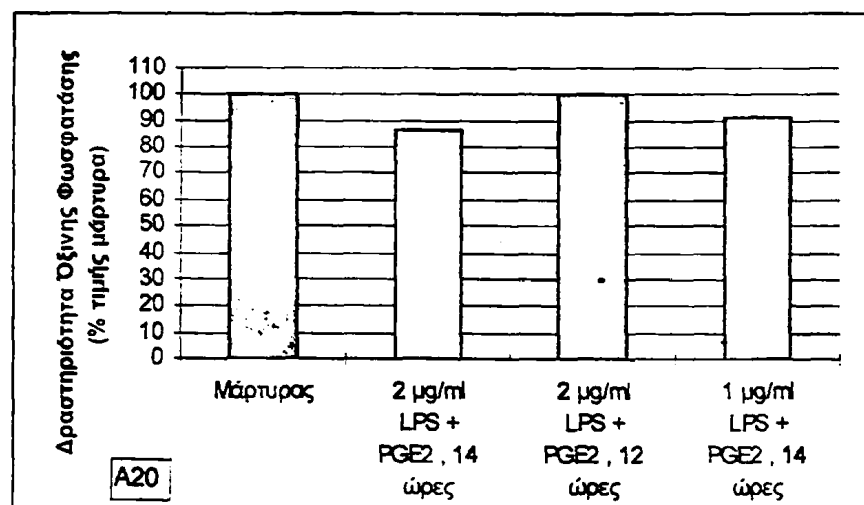
Στον πίνακα A19 που ακολουθεί απεικονίζονται οι επιδράσεις της επίωσης των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS και τις πειραματικές ουσίες στην Δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Οι επιδράσεις των ορμονών του Stress απεικονίζονται με πράσινο χρώμα και με κίτρινο απεικονίζονται οι επιδράσεις των Αυτακοειδών .



Στον πίνακα αυτόν είναι εμφανές ότι οι περισσότερες πειραματικές ουσίες δεν επηρέασαν την δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης , ενώ από εκείνες που προκάλεσαν κάποια μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα μόνο η PGE₂ οδήγησε σε μείωσή της . Η Νικοταμίνη , η Δεξαμεθαζόνη και η Σεροτονίνη προκάλεσαν μεγάλη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας και η Βιταμίνη D3 προκάλεσε λίγο μικρότερη . Πολλά από τα αποτελέσματα αυτά είναι δυσερμήνευτα : συνήθως η Αδρεναλίνη και η Νικοταμίνη προκαλούν όμοιες επιδράσεις αλλά στην συγκεκριμένη περίπτωση αυτό δεν συμβαίνει . Η Δεξαμεθαζόνη έχει συσχετιστεί με την «καταστολή» των λυσοσωματικών ενζύμων . Η μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης που προκαλεί (της τάξης του 19.96 %) φανερώνει ότι αυτό δεν οφείλεται στην μειωμένη σύνθεση του ενζύμου αλλά μάλλον στην παρεμπόδιση της εξωκύτωσης του . Ίσως αυτό το φαινόμενο να είναι που σε παλαιότερα συγγράμματα και μελέτες περιγραφόταν ως «σταθεροποίηση των λυσοσωματικών μεμβρανών» . Όμως φαίνεται ότι η Δεξαμεθαζόνη θα μπορούσε να προκαλεί και αύξηση του ρυθμού σύνθεσης της Οξίνης Φωσφατάσης . Ένα άλλο αποτέλεσμα που δύσκολα ερμηνεύεται είναι εκείνο της PGE₂ . Παραδοσιακά ο ρόλος της PGE₂ είναι αντιφλεγμονώδης και ανοσοκατασταλτικός , όπως της Δεξαμεθαζόνης . Όμως εδώ διαπιστώθηκε ότι αυτές οι δύο ουσίες είχαν αντίθετα αποτελέσματα . Η PGE₂ προκαλεί μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης κατά 13.82 % , που σημαίνει ότι είτε προκαλεί αύξηση της έκκρισης ή μείωση της σύνθεσης του ενζύμου . Δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για να συμπεράνουμε με ποιόν μηχανισμό ακριβώς η PGE₂ επιδρά στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η οδός Δεύτερων Μηνυτόρων που ενεργοποιείται να δρα στο ίδιο το ένζυμο . Τέλος είναι ενδιαφέρον

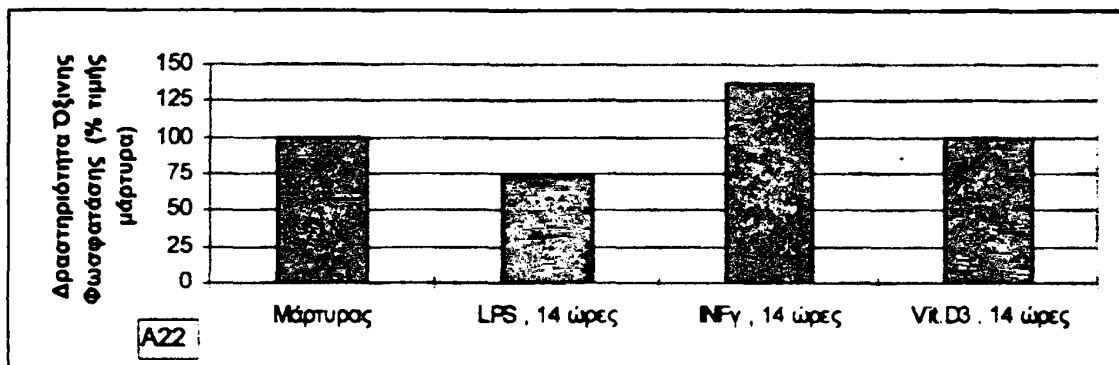
ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Vit.D3 + LPS προκαλεί μικρή αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης, ενώ η Vit.D3 από μόνη της δεν ασκεί καμία επίδραση στην ενζυματική δραστηριότητα.

Στον πίνακα A20 απεικονίζονται οι επιδράσεις της επώασης με PGE₂ στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων. Όταν τα μακροφάγα ενεργοποιούνται επί 14 ώρες με 2 µg/ml LPS, τότε η PGE₂ μειώνει την ενζυματική δραστηριότητα κατά 13.82%. Όταν η επώαση με LPS + PGE₂ διαρκεί 12 ώρες δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην δραστηριότητα του ενζύμου. Όταν η δοσολογία της ενδοτοξίνης είναι 1 µg/ml για 14 ώρες, τότε η PGE₂ μειώνει την ενζυματική δραστηριότητα κατά 8.58%. Ο συνδυασμός των παραπάνω στοιχείων δείχνει ότι μάλλον η PGE₂ αυξάνει με την έκκριση του ενζύμου, παρά μειώνει την σύνθεσή του. Η μείωση της διάρκειας επώασης κατά 2 ώρες δεν θα μπορούσε να αυξήσει την σύνθεση του ενζύμου, άρα φαίνεται ότι δεν προφταίνει το μακροφάγο να εξωκυτταρώσει την Φωσφατάση. Η μείωση της συγκέντρωσης του LPS σε 1 µg/ml μειώνει την σύνθεση του ενζύμου, αλλά η εξωκύπτωσή του είναι σταθερά υψηλή λόγω της PGE₂, με αποτέλεσμα να μειωθεί η διαφορά μεταξύ μαρτύρων και πειραματικών.



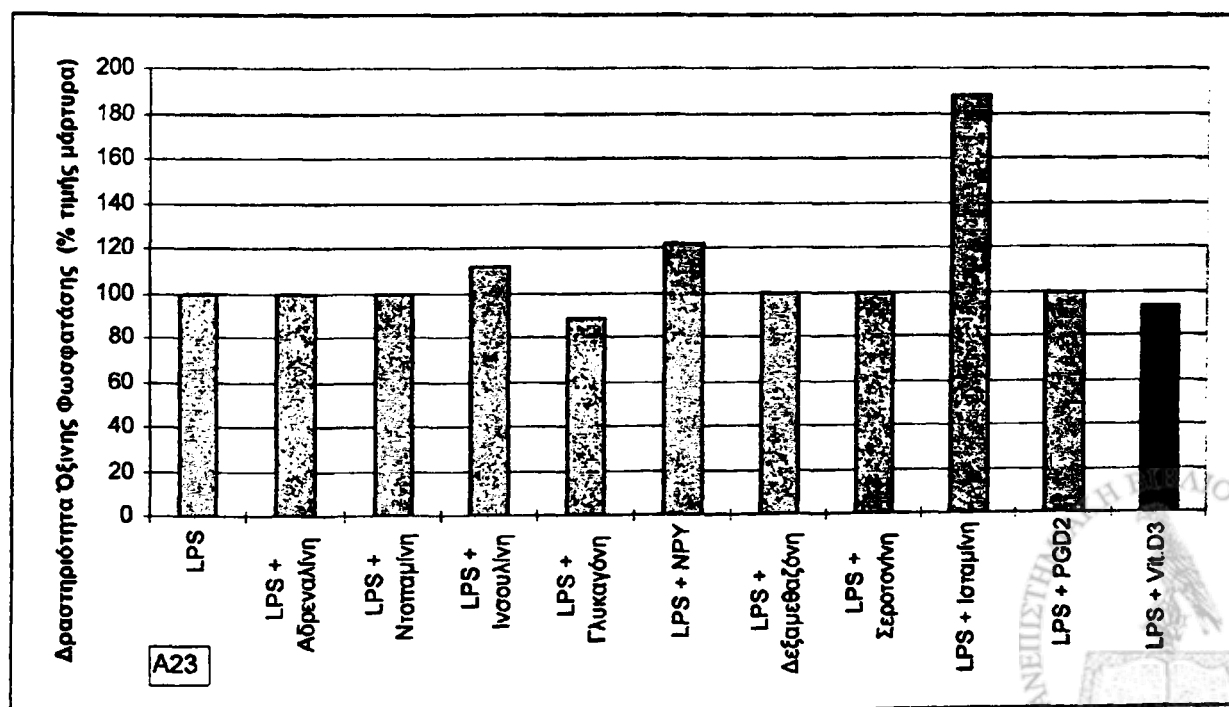
Στον πίνακα A21 έχει παρουσιαστεί ένα άλλο αξιοπρόσεκτο αποτέλεσμα που προέκυψε από τα περιτοναϊκά μακροφάγα. Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS + Αδρεναλίνη δεν προκάλεσε μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Όμως, η επώαση των κυττάρων αυτών με INF γ + Αδρεναλίνη προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης. Αυτό σημαίνει ότι η Αδρεναλίνη είτε επιτείνει την εξωκύπτωση του ενζύμου σε αυτά τα μακροφάγα ή μειώνει την παραγωγή του. Όμως δεν είναι κατανοητό γιατί δεν προκαλούνται οι ίδιες επιδράσεις και στα ενεργοποιημένα με Ενδοτοξίνη περιτοναϊκά μακροφάγα. Θα ήταν πολύ λογικό να υποθέσουμε ότι επειδή η INF γ προκαλεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω διαφορετικής οδού Μεταγωγής Μηνύματος από τον LPS, η Αδρεναλίνη επιδρά σε αυτή την οδό και καταστέλλοντας την ίδια την ενεργοποίηση μειώνει την σύνθεση του ενζύμου. Όμως στις πειραματικές ομάδες # 42 και # 43 διαπιστώθηκε ότι η Αδρεναλίνη αυξάνει την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα ενεργοποιημένα με INF γ περιτοναϊκά μακροφάγα, δηλαδή δεν υπάρχει κατασταλτική επίδραση της ουσίας αυτής. Με βάση τα στοιχεία που διαθέτουμε δεν υπάρχει κάποια ικανοποιητική εξήγηση για αυτή την διαφορά των επιδράσεων της Αδρεναλίνης, ανάλογα με το είδος του ενεργοποιητή των μακροφάγων.

Στον πίνακα A22 απεικονίζονται οι επιδράσεις του LPS , της INF γ και της Vit.D3 στην Οξίνη Φωσφατάση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων . Διαπιστώνουμε ότι ενώ η επώασή τους με LPS προκαλεί μείωση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης κατά 26.75 % , η επώαση με INF γ αυξάνει την ενζυματική δραστηριότητα κατά 37.71 % και η Vit.D3 δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων .



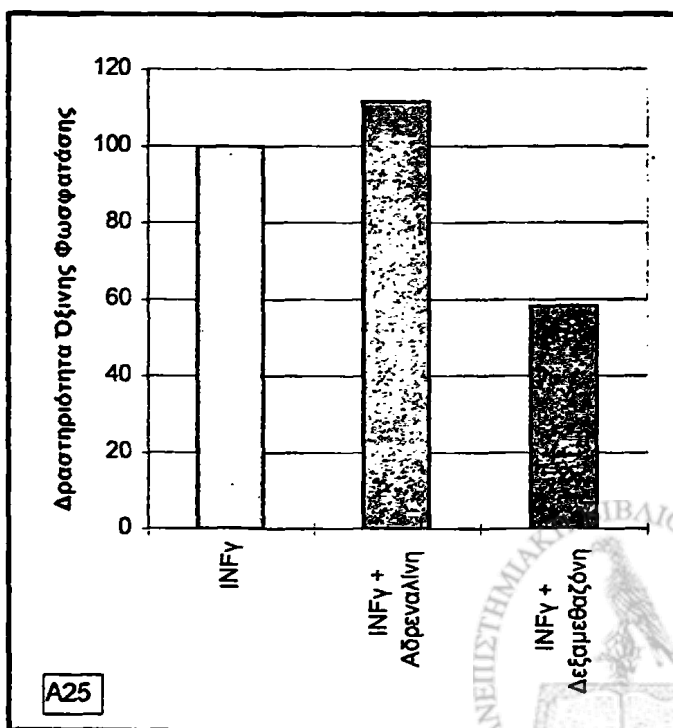
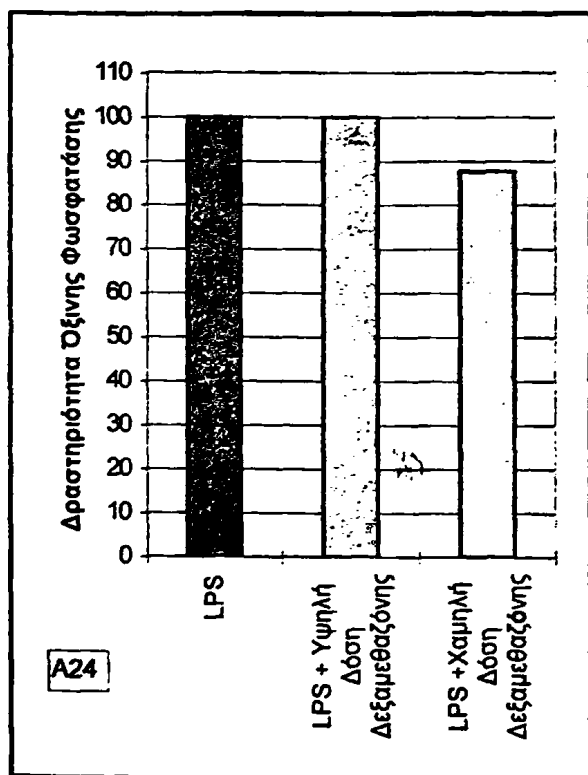
Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εμφανώς αποκρίνονται διαφορετικά στην ενεργοποίηση με LPS και με INF γ , αλλά ο μηχανισμός αυτής της διαφοράς δεν είναι διευκρινισμένος πλήρως . Ενώ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εμφανίζουν μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης μετά από επώαση με LPS , αντιθέτως αυξάνουν την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης μετά από την επώαση με INF γ . Αυτό μάλλον σημαίνει ότι η INF γ προκαλεί αυξημένη σύνθεση του ενζύμου χωρίς αύξηση της εξωκύττωσής του . Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως εξής : όταν τα μακροφάγα έρχονται σε επαφή με LPS εκκρίνουν Οξίνες Υδρολάσες για να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς που τα περιβάλλουν , ενώ όταν έρχονται σε επαφή με INF γ αυξάνουν την παραγωγή των ενζύμων και τα συσσωρεύουν σε λυσοσώματα για να καταστρέψουν ότι φαγοκυτταρωθεί . Η έλλειψη κάποιας επίδρασης από την Vit.D3 είναι δύσκολο να εξηγηθεί , αφού τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν υποδοχείς για την ουσία αυτή και είναι γνωστό ότι η Vit.D3 προκαλεί αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Rook και συν., 1986 , Rigby, 1988) .

Στον πίνακα A23 απεικονίζονται οι επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων τα οποία ενεργοποιούνται με LPS .



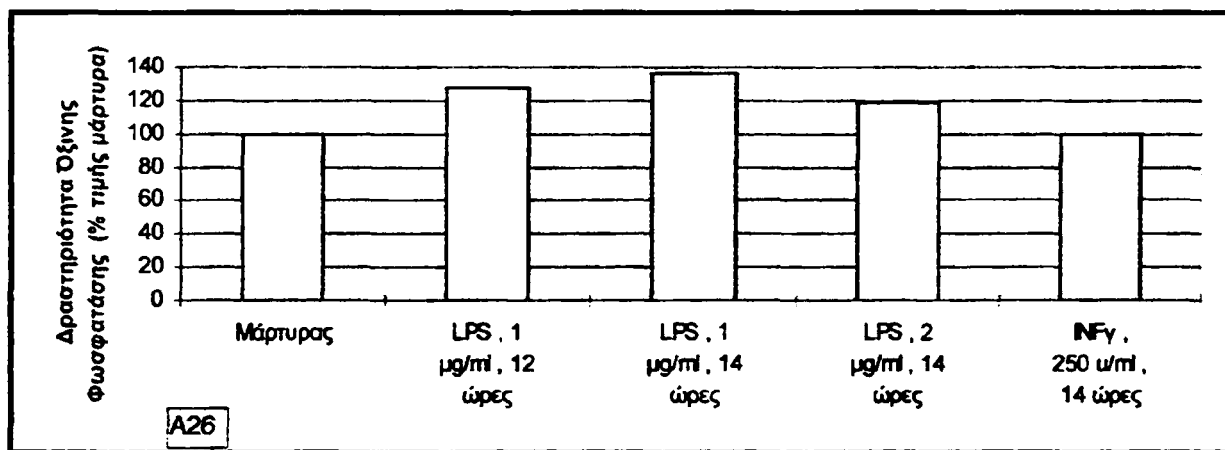
Τα αποτελέσματα από την χορήγηση ορμονών του Stress παρουσιάζονται με ιώδες χρώμα , ενώ τα αποτελέσματα από τα Αυτακοειδή με κυανό χρώμα και η επίδραση της Vit.D3 παρουσιάζεται τελευταία . Είναι φανερό ότι οι ορμόνες του stress άσκησαν πολλές και διαφορετικές επιδράσεις στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης : η Αδρεναλίνη , η Ντοπαμίνη και η Δεξαμεθαζόνη (σε υψηλές δόσεις) δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή , η Ινσουλίνη και το Νευροπεπτιδίο Υ αυξάνουν την ενζυμική δραστηριότητα της Φωσφατάσης και η Γλυκαγόνη μειώνει την δραστηριότητα του ενζύμου . Αντιθέτως μεταξύ των αυτακοειδών μόνο η Ισταμίνη προκάλεσε κάποια μεταβολή . Η Vit.D3 προκάλεσε μικρή μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας , το οποίο θυμίζει την επίδρασή της στους οστεοκλάστες . Από τα αποτελέσματα αυτά ορισμένα είναι αρκετά περίεργα : οι πιο χαρακτηριστικές από τις ορμόνες του stress (δηλαδή οι Κατεχολαμίνες και η Δεξαμεθαζόνη) δεν ασκούν καμία επίδραση στα μακροφάγα ενώ αντίθετα το Νευροπεπτιδίο Υ προκαλεί αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας κατά 21.49 % , παρά το ότι δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με επιδράσεις του NPY σε κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων ή σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος . Επίσης τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είναι πιθανότερο να έρχονται σε επαφή με Αδρεναλίνη από τις ελεύθερες νευρικές απολήξεις του τραχειοβρογχικού δέντρου και του πνευμονικού παρεγχύματος , παρά με την Ινσουλίνη ή την Γλυκαγόνη . Ωστόσο δέχονται ρυθμιστικές επιδράσεις από τις ορμόνες αυτές και όχι από τις κατεχολαμίνες . Η Ισταμίνη προκάλεσε αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας κατά 88 % , που δείχνει αυξημένη σύνθεση Ώξινης Φωσφατάσης και ελαχιστοποίηση της έκκρισης του ενζύμου , ενώ θα αναμενόταν αντιθέτως η μεγιστοποίηση της εξωκύττωσης από τον διαμεσολαβητή των αναφυλακτικών και αλλεργικών αντιδράσεων υπερευαισθησίας .

Στον πίνακα A24 απεικονίζονται οι επιδράσεις της Δεξαμεθαζόνης στα επωαζόμενα με LPS βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Όταν τα μακροφάγα αυτά επωαστούν με 5×10^{-5} M Δεξαμεθαζόνης (Υψηλή Δόση) δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ αν επωαστούν με 10^{-6} M Δεξαμεθαζόνης (Χαμηλή Δόση) παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 12.39 % (δηλαδή αυξημένη έκκριση ή μειωμένη σύνθεση της Φωσφατάσης) .



Στον πίνακα A25 απεικονίζονται οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης και της Δεξαμεθαζόνης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με 250 $\mu\text{g/ml}$ INF γ . Από τα παραπάνω στοιχεία είναι εμφανές ότι η Αδρεναλίνη αυξάνει την ενζυματική δραστηριότητα κατά 11.72 % ενώ η Δεξαμεθαζόνη μειώνει την δραστηριότητα κατά 41.57 %. Η επίδραση του γλυκοκορτικοειδούς είναι όμοια με εκείνη που ασκείται στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS, ενώ αντιθέτως η επίδραση της Αδρεναλίνης είναι διαφορετική αφού στα μακροφάγα που επωάζονται με LPS δεν προκαλεί καμία μεταβολή της ενζυματικής δραστηριότητας. Από τα στοιχεία των πινάκων A24 και A25 θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν την σύνθεση των Ώξινων Υδρολασών, σε μια προσπάθεια διαφύλαξης του ευαίσθητου πνευμονικού παρεγχύματος. Δεν υπάρχει όμως τότε καμία ομοιότητα με τον ρόλο των γλυκοκορτικοειδών στα περιτοναϊκά μακροφάγα, όπου προκαλούν την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης. Επιπλέον δύσκολα θα ερμηνευτεί η επίδραση της Αδρεναλίνης, αφού δεν επηρεάζει την ενζυματική δραστηριότητα στα ενεργοποιημένα με ενδοτοξίνη μακροφάγα (που έχουν ήδη μειωμένη δραστηριότητα σε σχέση με τους μάρτυρες) αλλά αυξάνουν την ενζυματική δραστηριότητα στα ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα (τα οποία έχουν ήδη αυξημένη δραστηριότητα). Η πιο λογική εξήγηση θα ήταν ότι η Αδρεναλίνη αναστέλλει την εξωκύτωση και έτσι εξασφαλίζει την ελάχιστη δυνατή απώλεια Ώξινης Φωσφατάσης στον μεσοκυττάριο χώρο, ώστε να την χρησιμοποιούν τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα για την λύση φαγοκυτταρωμένων μικροβίων και σωματιδίων. Ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή.

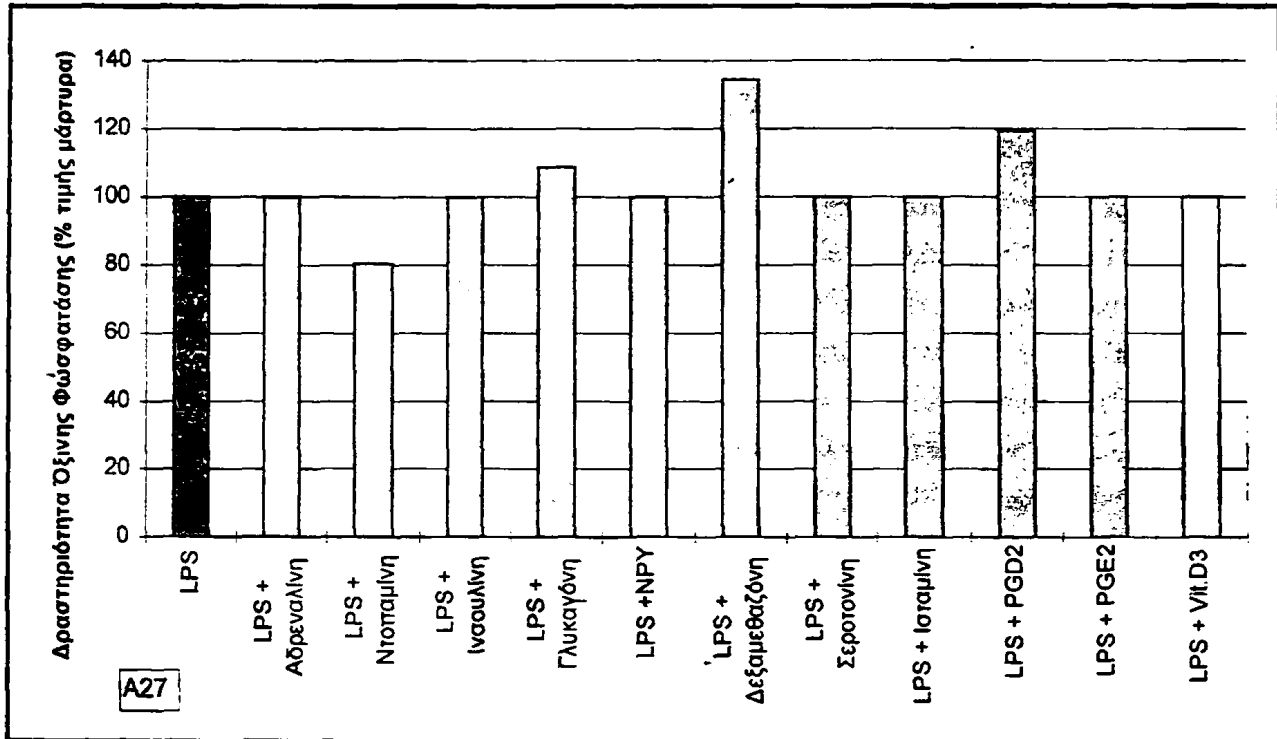
Στον πίνακα A26 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι επιδράσεις του LPS και της INF γ στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των ηπατικών μακροφάγων (κυττάρων Kupffer).



Διαπιστώνουμε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 27.21 %. Όταν η επώαση των κυττάρων Kupffer με LPS παρατάθηκε κατά 2 ώρες (δηλαδή από 12 σε 14 ώρες), η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου έφτασε στο 36.06 %. Όταν τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες, η αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας ήταν μόλις 19.01 %. Η πιθανότερη εξήγηση είναι για αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι η επώαση με χαμηλή δόση ενδοτοξίνης αυξάνει την παραγωγή του ενζύμου, αλλά χωρίς την έκκρισή του στον μεσοκυττάριο χώρο. Έτσι η παράταση της επώασης επιτρέπει την συσσώρευση περισσότερου ενζύμου στα λυσοσώματα. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του LPS τα κύτταρα Kupffer φαίνεται ότι είτε εκκρίνουν περισσότερο ένζυμο ή μειώνουν την παραγωγή του. Με την χορήγηση INF γ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης, το

οποίο είναι σύμφωνο με την έλλειψη αντίδρασης στην Ιντερφερόνη- γ και ως προς την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου . Δεν είναι γνωστό για ποιόν λόγο τα κύτταρα Kupffer που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά δεν αποκρίνονται στην επώαση με INF γ .

Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν επιδράσεις διαφόρων πειραματικών ουσιών στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των κυττάρων Kupffer που επωάστηκαν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS . Στον πίνακα A27 οι επιδράσεις των ορμονών του Stress απεικονίζονται με ιώδες και οι επιδράσεις των Αυτακοειδών με κυανό χρώμα . Η Vit.D3 απεικονίζεται τελευταία .



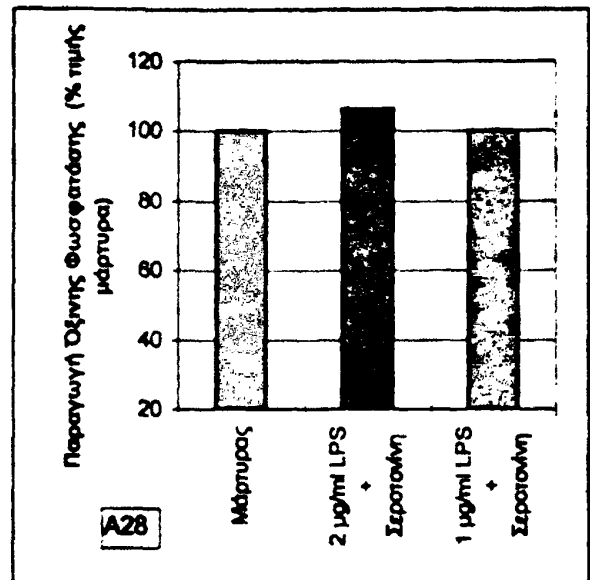
Είναι φανερό ότι οι περισσότερες από τις πειραματικές ουσίες δεν έχουν καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Από τις ορμόνες του Stress μόνο η Ντοπαμίνη προκαλεί την μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας των κυττάρων Kupffer , ενώ η Γλυκαγόνη και η Δεξαμεθαζόνη προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου . Από τα τέσσερα Αυτακοειδή που χορηγήθηκαν μόνο η PGD₂ προκαλεί μεταβολή στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης και πιο συγκεκριμένα αύξηση κατά 19.17 % . Τα αποτελέσματα αυτά είναι δύσκολο να εξηγηθούν . Ειδικά το αποτέλεσμα της PGD₂ είναι απρόσμενο , αφού αυτή η προσταγλανδίνη υποτίθεται ότι δεν αναγνωρίζεται από τα μακροφάγα και επιπλέον τα κύτταρα Kupffer δεν αποκρίθηκαν στην PGD₂ στα πειράματα μέτρησης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Από τα αποτελέσματα των ορμονών του Stress προκαλεί μεγάλη εντύπωση η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 34.58 % από την δράση της Δεξαμεθαζόνης . Η σημαντική αυτή αύξηση πρέπει να οφείλεται σε συνδυασμό αυξημένης σύνθεσης του ενζύμου και μειωμένης εξωκύττωσής του , με απώτερο στόχο την διαφύλαξη του ηπατικού παρεγχύματος από την βλαπτική επίδραση των εκκρινόμενων Ώξινων Υδρολασών , χωρίς όμως να μειωθεί η ικανότητα της λυσοσωματικής αποδόμησης των φαγοκυτταρωμένων σωματιδίων από τα ηπατικά μακροφάγα . Δεν αποκλείεται ο ρόλος της Γλυκαγόνης να είναι παρόμοιος με αυτόν των γλυκοκορτικοειδών , δηλαδή η μείωση της έκκρισης της Ώξινης Φωσφατάσης . Η Ντοπαμίνη ασκεί την αντίθετη επίδραση . Για την Αδρεναλίνη δεν υπάρχουν στοιχεία ότι επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα των κυττάρων Kupffer ,

αν και το ήπαρ διαθέτει πλούσια Αδρενεργική νεύρωση και θα ήταν πολύ φυσικό οι κατεχολαμίνες να ασκούν τον ουσιαστικό ρυθμιστικό ρόλο και όχι ορμόνες όπως η Γλυκαγόνη ή τα γλυκοκορτικοειδή .

Στον πίνακα A28 υπάρχει μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση . Αν τα κύτταρα Kupffer επωαστούν επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης δεν θα παρατηρηθεί σημαντική μεταβολή στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Όταν όμως τα κύτταρα Kupffer επωαστούν με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + 5×10^{-5} M Σεροτονίνης για 14 ώρες , τότε θα παρατηρηθεί αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης κατά 6.25 % . Δεν είναι ακόμα κατανοητό για ποιόν λόγο τα κύτταρα Kupffer έχουν δύο διαφορετικές αντιδράσεις στην Σεροτονίνη ανάλογα με την συγκέντρωση του LPS , αλλά δεν πρέπει να οφείλεται σε μηχανισμό αυτορρύθμισης

της έκκρισης των λυσοσωματικών ενζύμων , αφού τα κύτταρα Kupffer που επωάζονται με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS δεν παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση των λυσοσωματικών ενζύμων τους ακόμα και χωρίς την επίδραση της Σεροτονίνης .

Από τα αποτελέσματα της χορήγησης διαφόρων πειραματικών ουσιών στα κύτταρα Kupffer δεν έγινε δυνατόν να ανιχνευθεί ένας γενικότερος μηχανισμός ρύθμισης της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης , όπως έγινε δυνατόν σε άλλες περιπτώσεις . Αυτό οφείλεται αναμφίβολα στο γεγονός ότι η δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης επηρεάζεται και από τον βαθμό παραγωγής του ενζύμου στα κύτταρα και από την έκταση της εξωκύτωσης του ενζύμου στο περιβάλλοντα κολλιτοειδικό χώρο . Είναι σίγουρο ότι στα κύτταρα Kupffer ασκούνται νευροενδοκρινικές επιδράσεις , αλλά δεν είναι εμφανής ο γενικότερος μηχανισμός στον οποίο υπακούν οι επιδράσεις αυτές. Η Γλυκαγόνη , η Δεξαμεθαζόνη και η PGD_2 (οι τρεις ουσίες που αυξάνονται σε καταστάσεις έντονης καταπόνησης από τραύμα ή φλεγμονή) φαίνεται ότι αυξάνουν την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης μέσα στο λυσοσωματικό δίκτυο των κυττάρων Kupffer , ενώ η Ντοπαμίνη μειώνει αυτή την ενζυματική δραστηριότητα . Όμως και η Ντοπαμίνη είναι ουσία που συμμετέχει στις ίδιες παθοφυσιολογικές καταστάσεις με την Γλυκαγόνη , την Δεξαμεθαζόνη και την PGD_2 . Η ύπαρξη ή όχι ενός «προστατευτικού μηχανισμού» που να αποτρέπει την καταστροφή του ευαίσθητου ηπατικού παρεγχύματος από την εξωκύτωση Ώξινων Υδρολασών , χωρίς να μειώνει την ικανότητα της λυσοσωματικής πέψης και αποδόμησης των φαγοκυτταρωμένων σωματιδίων , δεν μπορεί ούτε να επιβεβαιωθεί αλλά ούτε και να αποκλειστεί . Η ύπαρξη όμως μηχανισμού «λεπτής ρύθμισης» της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης στα κύτταρα Kupffer μάλλον δεν πρέπει να ισχύει , αφού οι περισσότερες επιδράσεις έχουν την ίδια κατεύθυνση , δηλαδή προκαλούν την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας .



Συζήτηση των συνολικών αποτελεσμάτων , μελετημένα ως προς τις βιοχημικές παραμέτρους .

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των βιοχημικών πειραμάτων ως προς την παράμετρο που μετρήθηκε συνέβαλλε μερικώς στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τα αποτελέσματα αυτά και την σκοπιμότητα την οποία εξυπηρετούν σε κάθε περίπτωση .

Ξεκινώντας από τις μετρήσεις της παραγωγής H_2O_2 διαπιστώθηκε ότι τα περιτοναϊκά κύτταρα ανταποκρίνονται στον LPS και στην βραχεία επώαση με INF γ με αύξηση της παραγωγής του H_2O_2 , αποτελέσματα που αναμένονταν (Pabst και Johnston , 1980 , Cooper και συν., 1984) . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ επί 14 ώρες προκάλούσε την μείωση της ικανότητας παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Την μειωμένη ικανότητα παραγωγής H_2O_2 μετά από επώαση 14 ωρών με INF γ την παρατηρούμε και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένας μηχανισμός προστασίας του οργανισμού από την υπερβολική παραγωγή H_2O_2 . Στην υπόθεση αυτή συνηγορούν και τα αποτελέσματα των επιδράσεων των πειραματικών ουσιών : ορισμένες από αυτές τις ουσίες ασκούν κατασταλτικές επιδράσεις και άλλες ευοδώνουν την παραγωγή του H_2O_2 , με τελικό αποτέλεσμα την αυστηρή ρύθμιση της ικανότητας παραγωγής Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου . Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η επίδραση της Δεξαμεθαζόνης , αφού σε χαμηλές δόσεις (συμβατές με μικρού βαθμού Stress) αυξάνει την παραγωγή H_2O_2 , ενώ σε υψηλές δόσεις (συμβατές με μεγάλου βαθμού Stress) καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 . Έτσι , αν πράγματι η παραγωγή του H_2O_2 βρίσκεται υπό αυστηρό νευροενδοκρινικό έλεγχο , η Δεξαμεθαζόνη θα μπορούσε να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο με το να κατευθύνει την λειτουργία των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων : στην αρχή της λοίμωξης ή της νεοπλασίας υψηλή παραγωγή H_2O_2 , για να υπάρχει αποτελεσματική αμυντική λειτουργία , ενώ εάν υπάρχει παράταση της λοίμωξης ή αδυναμία αντιμετώπισης του νεοπλασματος ακολουθεί μείωση της παραγωγής H_2O_2 , ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των ζωτικών οργάνων και ιστών . Τέλος , η επίδραση της Αδρεναλίνης είναι πάντα κατασταλτική , τόσο για τα περιτοναϊκά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS ή INF γ , όσο και για τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με INF γ . Από αυτά τα στοιχεία φαίνεται ότι η παραγωγή H_2O_2 υπόκειται σε αυστηρή νευροενδοκρινική ρύθμιση αλλά και σε μηχανισμό αυτορρύθμισης , με τελικό σκοπό την αποφυγή της υπέρμετρης παραγωγής αυτού του Δραστικού Μεταβολίτη Οξυγόνου .

Τα αποτελέσματα του Νιτρικού Οξειδίου και της Ώξινης Φωσφατάσης οδηγούν σε διαφορετικά συμπεράσματα , όπως θα διαπιστωθεί στην συνέχεια .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS για 14 ώρες προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής NO . Η επώαση των κυττάρων αυτών με INF γ επί 5 ώρες προκάλεσε επίσης αύξηση της παραγωγής NO , ενώ η επώαση με INF γ επί 14 ώρες οδήγησε σε παραγωγή NO πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της επώασης των 5 ωρών αλλά και από εκείνη που προκάλεσε ο LPS στον ίδιο χρόνο . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στην περίπτωση της έκκρισης Νιτρικού Οξειδίου από τα περιτοναϊκά μακροφάγα δεν ισχύει ο μηχανισμός αυτοκαταστολής που ισχύει για την έκκριση του H_2O_2 .

Όταν μελετήθηκαν οι επιδράσεις των διαφόρων πειραματικών ουσιών στην έκκριση NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάζονται με LPS , προέκυψαν ορισμένα αποτελέσματα τα οποία δεν αναμένονταν . Υπήρχαν επιδράσεις και προς τις δύο κατευθύνσεις (αύξηση και μείωση) που θα ήταν δυνατό να εξυπηρετούν έναν ρυθμιστικό μηχανισμό ελέγχου της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου ,

όμως ορισμένες από αυτές τις επιδράσεις ήταν αντίθετες από τις αναμενόμενες : οι δύο κατεχολαμίνες και η PGE_2 που συνήθως έχουν κατασταλτικό ρόλο εδώ προκαλούσαν αύξηση της παραγωγής NO , ενώ η Γλυκαγόνη που προκαλούσε έντονη αύξηση της παραγωγής H_2O_2 εδώ οδηγούσε στην μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Τα στοιχεία αυτά δεν συμφωνούν με την υπόθεση της ρύθμισης της λειτουργίας των μακροφάγων . Επίσης , ενώ η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ επί 14 ώρες δεν προκαλούσε μείωση της παραγωγής NO σε σύγκριση με την επώαση των 5 ωρών , όταν τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με INF γ + Αδρεναλίνη για 14 ώρες παρήγαγαν αναλογικά λιγότερο NO σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με INF γ + Αδρεναλίνη για 6 ώρες . Δεν είναι γνωστό εάν αυτή η επίδραση οφείλεται σε μηχανισμό περιορισμού της υπέρμετρης παραγωγής NO ή σε άλλη αιτία , αλλά θα ήταν αυθαίρετο να αποδοθεί σε αυτορυθμιστικό μηχανισμό χωρίς άλλα στοιχεία .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζουν διαφορετικές αντιδράσεις στους ίδιους διεγέρτες και στις ίδιες πειραματικές ουσίες με τα περιτοναϊκά μακροφάγα . Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ προκαλεί μικρότερη παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από ότι η επώαση με LPS , ενώ στα περιτοναϊκά κύτταρα συνέβαινε το αντίθετο . Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να ήταν ότι ο οργανισμός έχει μεγάλη ανάγκη από παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου όταν εισβάλλουν μικροοργανισμοί στον βρογχοκυψελιδικό χώρο , άρα είναι αναγκαία η έντονη αντίδραση των μακροφάγων αυτών στην παρουσία του LPS με μεγάλη έκκριση NO . Αντίθετα η Ιντερφερόνη- γ ενεργοποιεί τα μακροφάγα όταν ήδη έχουν κινητοποιηθεί και τα Τ-λεμφοκύτταρα , άρα η παραγωγή NO δεν χρειάζεται να είναι πολύ μεγάλη . Η μελέτη των επιδράσεων των πειραματικών ουσιών έδειξε ότι οι περισσότερες από αυτές αυξάνουν την παραγωγή NO στα κύτταρα που επωάζονται με LPS . Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα περιτοναϊκά μακροφάγα , εδώ η Γλυκαγόνη αυξάνει την παραγωγή NO και η PGD_2 την μειώνει . Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι δεν υπάρχει μηχανισμός ελέγχου και ρύθμισης της παραγωγής NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , αλλά οι περισσότερες νευροενδοκρινικές επιδράσεις προσπαθούν να αυξήσουν την παραγωγή του . Η ίδια προσπάθεια για μεγαλύτερη παραγωγή NO παρατηρείται και σε κύτταρα που επωάζονται με INF γ + Αδρεναλίνη , όπου η παράταση της επώασης δεν προκαλεί την μείωση της έκκρισης NO αλλά αντίθετως προκαλεί μεγαλύτερη έκκριση .

Στα κύτταρα Kupffer διαπιστώνουμε ότι ενώ αντιδρούν στην επώαση με LPS αυξάνοντας την έκκριση NO , δεν αντιδρούν καθόλου στην επώαση με INF γ . Τα κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS και μια πειραματική ουσία παρουσίαζαν καταστολή της παραγωγής NO μόνο με την Γλυκαγόνη . Οι κατεχολαμίνες και η PGE_2 προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής NO , ενώ εντύπωση προκαλεί η έλλειψη ανταπόκρισης στην Δεξαμεθαζόνη . Οι περισσότερες πειραματικές ουσίες δεν είχαν καμία επίδραση στην παραγωγή NO . Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι στην περίπτωση των ηπατικών μακροφάγων πρέπει να αποκλειστεί η θεωρία ύπαρξης ενός ρυθμιστικού μηχανισμού για τον έλεγχο της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου .

Τα παραπάνω στοιχεία από τα πειράματα μέτρησης του Νιτρικού Οξειδίου δείχνουν ότι η θεωρία ύπαρξης ενός μηχανισμού ελέγχου και ρύθμισης της λειτουργίας των μακροφάγων ίσως δεν αφορά την δραστηριότητα της iNOS .

Στα πειράματα προσδιορισμού της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης διαπιστώθηκε ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα αντιδρούν στην επώαση με LPS ή INF γ μειώνοντας την δραστηριότητα του

ενζύμου που μετράται στο ομογενοποίηση . Η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας είναι αποτέλεσμα της εξωκύτωσης του ενζύμου , άρα η δραστηριότητα που προσδιορίζεται στο κυτταρόπλασμα είναι το αποτέλεσμα της δυναμικής ισορροπίας ανάμεσα στην μεταβολή του ρυθμού σύνθεσης του ενζύμου και στην μεταβολή του ρυθμού έκκρισής του (Schnyder και Baggiolini, 1978) . Όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επώαστηκαν με μικρή ποσότητα LPS (0.2 $\mu\text{g/ml}$ αντί για 2 $\mu\text{g/ml}$) η δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης αυξήθηκε , μάλλον επειδή αυξήθηκε ο ρυθμός σύνθεσης του ενζύμου χωρίς να αυξηθεί ο ρυθμός εξωκύτωσης του . Στην διεθνή βιβλιογραφία επιβεβαιώνεται ότι η δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των μακροφάγων αυξάνει μετά από επώαση με χαμηλές δόσεις LPS (Cooper και συν., 1984) . Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο οργανισμός «επιλέγει» πότε θα αποβάλλει το ένζυμο στον μεσοκυττάριο χώρο , δηλαδή όταν αντιλαμβάνεται μεγάλη συγκέντρωση LPS , που θα ήταν ενδεικτικό υψηλού μικροβιακού φορτίου στην περιτοναϊκή κοιλότητα . Αντιθέτως , όταν η συγκέντρωση του LPS είναι μικρή αυξάνει η σύνθεση του ενζύμου χωρίς να εξωκυτώνεται , αφού το μικρό μικροβιακό φορτίο θα αντιμετωπιστεί εύκολα με την φαγοκυττάρωσή του . Όταν μελετήθηκαν οι επιδράσεις των διαφόρων πειραματικών ουσιών στην δραστηριότητα του ενζύμου διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες από αυτές δεν είχαν καμία επίδραση ή προκαλούσαν αύξηση της δραστηριότητας . Μόνο η PGE_2 προκάλούσε κάποια μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας . Επίσης , όταν μελετήθηκε η ιδιότητα της PGE_2 να μειώνει την δραστηριότητα της Φωσφατάσης με άλλη συγκέντρωση LPS ή με διαφορετικό χρόνο επώασης , παρατηρήθηκε ότι κατά την επώαση με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες (αντί για 14 ώρες) η PGE_2 δεν ασκεί καμία επίδραση στην ενζυματική δραστηριότητα , ενώ αντιθέτως όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωαστούν με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες η PGE_2 προκαλεί μια μικρή μείωση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης . Αυτά τα αποτελέσματα είναι μερικώς συμβατά με την ύπαρξη ρυθμιστικού μηχανισμού ο οποίος ασκεί έλεγχο της λειτουργίας των μακροφάγων , αλλά η έλλειψη επιδράσεων από τις υπόλοιπες ορμόνες (κυρίως από την Αδρεναλίνη) και τα αυτακοειδή , καθώς και η αντίθετη δράση μεταξύ της Δεξαμεθαζόνης και της PGE_2 (δύο ουσίες που θεωρούνται εξ' ορισμού «κατασταλτικές» στην λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος) δημιουργούνται τα ερωτήματα αν υπάρχει πράγματι ο μηχανισμός αυτός και αν έχει κάποια βιολογική σημασία .

Στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η $\text{INF}\gamma$ προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης , σε αντίθεση με τα περιτοναϊκά μακροφάγα όπου προκαλούσε μείωσή της . Η επώαση με LPS προκαλεί την μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας και στα δύο είδη κυττάρων . Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε έναν προστατευτικό μηχανισμό : τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εκκρίνουν την Ώξινη Υδρολάση μόνο όταν διεγερθούν από LPS , που σημαίνει ύπαρξη μικροβίων στον βρογχοκυψελιδικό χώρο , ενώ όταν διεγερθούν από $\text{INF}\gamma$ αυξάνουν την παραγωγή της Ώξινης Φωσφατάσης αλλά την συγκεντρώνουν στα λυσοσώματά τους , ώστε να την χρησιμοποιήσουν στην αποδόμηση των φαγοκυτταρωμένων σωματιδίων . Με τον τρόπο αυτό αναλαμβάνουν την άμυνα του βρογχοκυψελιδικού χώρου τα Τ-λεμφοκύτταρα που παράγουν την Ιντερφερόνη- γ και τα μακροφάγα δεν προκαλούν εκτεταμένη ιστική βλάβη με τις Ώξινες Υδρολάσες τους . Αυτή η υπόθεση είναι λογική και επιβεβαιώνεται από το ότι η επώαση με LPS και Ισταμίνη προκαλεί την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας : η έκκριση Ώξινης Φωσφατάσης θα ήταν ανεπιθύμητη σε κάθε αλλεργική αντίδραση του βρογχικού δέντρου . Όμως η παραπάνω υπόθεση αντικρούεται από τα υπόλοιπα ευρήματα των πειραμάτων στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Οι σημαντικότερες από τις «κατασταλτικές» ορμόνες

του Stress, δηλαδή οι κατεχολαμίνες και τα γλυκοκορτικοειδή, δεν έχουν καμία επίδραση στην Όξινη Φωσφατάση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων. Αντιθέτως το Νευροπεπτιδίο Υ, που σχετίζεται με ειδικές μορφές του stress (όπως π.χ. το αίσθημα της πείνας) καθώς και με αγγειοκινητικά φαινόμενα στο ΚΝΣ και αλλού και με τον έλεγχο της έκκρισης ορισμένων ορμονών, προκάλεσε μια αύξηση της δραστηριότητας της Όξινης Φωσφατάσης που δεν έχει εμφανή ρόλο στην οικονομία του οργανισμού. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών γίνεται πιο δυσχερής εάν συνδυαστεί με την διαπίστωση επιδράσεων από τα γλυκοκορτικοειδή μόνο όταν χορηγηθούν σε χαμηλές δόσεις μαζί με LPS, όπου προκαλούν την μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας (δηλαδή επιτείνουν την δράση του LPS αντί να την καταστέλλουν). Αυτή η λεπτομέρεια δεν ταιριάζει απόλυτα με την υπόθεση που αναφέρθηκε στην αρχή της παραγράφου, ότι δηλαδή υπάρχει μηχανισμός που προστατεύει το ευαίσθητο πνευμονικό παρέγχυμα από την έκκριση των Όξινων Υδρολασών. Επίσης δεν ταιριάζει με την υπόθεση αυτή η παρατήρηση ότι τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που έχουν επωαστεί με INFγ και Αδρεναλίνη αυξάνουν την δραστηριότητα της Φωσφατάσης, ενώ τα μακροφάγα που επωάζονται με INFγ και Δεξαμεθαζόνη μειώνουν την ενζυματική δραστηριότητα. Η παρουσία της Δεξαμεθαζόνης θα υποδήλωνε βαρύτερη ή πιο παρατεταμένη καταπόνηση από ότι η παρουσία της Αδρεναλίνης και συνεπώς θα δικαιολογούσε την μείωση της έκκρισης Όξινης Φωσφατάσης για να αποφευχθεί η ιστική καταστροφή.

Η μελέτη της ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer με LPS ή INFγ οδήγησε σε ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Τα κύτταρα Kupffer δεν παρουσιάζουν μεταβολές της δραστηριότητας Όξινης Φωσφατάσης μετά από επώαση με INFγ, ενώ ο LPS προκαλεί την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας. Αν η αύξηση της δραστηριότητας της Όξινης Φωσφατάσης εξηγηθεί σαν μηχανισμός συσσώρευσης του ενζύμου στα λυσοσώματα για την αποδόμηση και πέψη των σωματιδίων που θα φαγοκυτταρωθούν, χωρίς την απώλειά του προς τον ευαίσθητο ηπατικό ιστό, θα αναμενόταν ότι οι περισσότερες από τις πειραματικές ουσίες που χορηγήθηκαν μαζί με τον LPS να προκαλούν την ίδια επίδραση. Τα αποτελέσματα των αντίστοιχων πειραμάτων έδειξαν ότι οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες δεν είχαν καμία επίδραση, αλλά δύο πολύ σημαντικές ορμόνες του stress (η Γλυκαγόνη και η Δεξαμεθαζόνη) καθώς και η PGD₂ (που παράγεται στο ήπαρ) επιτείνουν την επίδραση του LPS. Μόνο η Ντοπαμίνη είχε την αντίθετη επίδραση. Η Αδρεναλίνη και η PGE₂, αν και αποτελούν δύο παράγοντες με σημαντική ενδογενή κατασταλτική δράση στην φλεγμονή, δεν προκαλούν μεταβολές στην ενζυματική δραστηριότητα των κυττάρων Kupffer. Στην περίπτωση των ηπατικών μακροφάγων φαίνεται ότι δεν υπάρχει μηχανισμός «λεπτής ρύθμισης» της ενζυματικής δραστηριότητας, αλλά μόνο κατασταλτικές επιδράσεις από ορισμένες ουσίες. Η ύπαρξη αυτών των κατασταλτικών επιδράσεων είναι απαραίτητη για την προστασία του ήπατος, αφού έχει αποδειχθεί ότι σε πολλές φλεγμονώδεις παθήσεις τα κύτταρα Kupffer είναι υπεύθυνα για την ιστική καταστροφή που προκαλείται, μέσω της παραγωγής και έκκρισης των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου και Αζώτου, Όξινων Υδρολασών και Ουδέτερων Πρωτεασών (Wipwood και Arthur, 1993).

Παρατηρούνται κάποιες διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα των δικών μας πειραμάτων και εκείνα που προέρχονται από παραπλήσιες μελέτες στην διεθνή βιβλιογραφία. Αυτές οι διαφορές οφείλονται σε διαφορές της διάρκειας επώασης των κυττάρων με ενδοτοξίνη. Τα δικά μας πειράματα αφορούν βραχείες επωάσεις με LPS (διάρκειας 14 ωρών), ενώ τα πειράματα που αναφέρονται στην

βιβλιογραφία αφορούν μεγαλύτερους χρόνους επώασης , όπως 27 ώρες με 0.05 $\mu\text{g/ml}$ LPS ή 72 ώρες με 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Morland και Kaplan, 1977 , Cooper και συν., 1984) .

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω στοιχεία γίνεται αντιληπτό ότι ακόμα δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ένας ενιαίος μηχανισμός που να ερμηνεύει όλες τις επιδράσεις που παρατηρήθηκαν και στους τρεις τύπους μακροφάγων και για τις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν . Είναι φανερό ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι επιδράσεις εξυπηρετούν την «λεπτή ρύθμιση» των παραμέτρων (δηλαδή την αύξηση ή μείωση της συγκεκριμένης παραμέτρου ανάλογα με τις τοπικές ανάγκες) ενώ σε κάποιες άλλες περιπτώσεις εξυπηρετούν τον περιορισμό της υπέρμετρης αύξησης κάποιας παραμέτρου , που πιθανώς να είχε βλαπτικές συνέπειες . Τέλος , ορισμένες επιδράσεις δεν φαίνεται να εξυπηρετούν καμία συγκεκριμένη λογική ή σκοπιμότητα . Δηλαδή πίσω από όλες αυτές τις επιμέρους επιδράσεις δεν διακρίνεται κάποια γενική κατευθυντήρια «γραμμή» . Εντύπωση προκαλεί ότι ανάλογα με το είδος των μακροφάγων ορισμένες από τις ορμόνες , όπως π.χ. η Ντοπαμίνη και η Δεξαμεθαζόνη , άλλοτε αυξάνουν και άλλοτε μειώνουν την ενζυματική δραστηριότητα . Επίσης προκαλεί εντύπωση το ότι ορισμένες ουσίες που δεν θα έπρεπε να ασκούν καθόλου επιδράσεις , προκαλούν σημαντικές μεταβολές σε ορισμένες από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν . Δύο τέτοια τυπικά παραδείγματα αποτελούν η PGD_2 και το Νευροπεπτίδιο Υ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Τέλος δεν είναι κατανοητό γιατί σε ορισμένες περιπτώσεις δεν φαίνεται να ασκεί καμία επίδραση η Αδρεναλίνη , που ίσως είναι η πιο σημαντική από τις ουσίες που μελετήθηκαν .

Από τα παραπάνω είναι εύκολο να συμπεράνουμε ότι ο νευροενδοκρινικός έλεγχος της λειτουργίας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων δεν φαίνεται να εξυπηρετεί γενικότερους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και για αυτό θα πρέπει να μελετηθούν οι ειδικοί μηχανισμοί που ελέγχουν τις επιμέρους λειτουργίες των κυττάρων αυτών .



ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΑΘΕ ΜΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΤΡΕΙΣ ΤΥΠΟΥΣ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΔΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟ .

Στον πίνακα A29 αναφέρονται τα αποτελέσματα της επώασης περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS στην παραγωγή H_2O_2 και NO και στην δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης ενώ στην συνέχεια αναφέρονται οι επιδράσεις της επώασης περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ στις ίδιες αυτές παραμέτρους (H_2O_2 , NO και Οξίνη Φωσφατάση) .

Πίνακας A29 . Επιδράσεις του LPS και της INF γ στα περιτοναϊκά μακροφάγα

2 μ g/ml LPS , 2 ώρες	Αύξηση παραγωγής H_2O_2 κατά 23.83 %
2 μ g/ml LPS , 14 ώρες	Αύξηση παραγωγής NO κατά 863.88 %
2 μ g/ml LPS , 14 ώρες	Μείωση δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 26.06 %
250 u/ml INF γ , 5 ώρες	Αύξηση παραγωγής H_2O_2 κατά 110.66 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Μείωση παραγωγής H_2O_2 κατά 20.59 %
250 u/ml INF γ , 5 ώρες	Αύξηση παραγωγής NO κατά 158.82 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Αύξηση παραγωγής NO κατά 1080 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 29.46 %

Οι επιδράσεις αυτές θεωρούνται ότι χαρακτηρίζουν την ενεργοποίηση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Παρατηρούμε ότι ενώ η INF γ προκαλεί αρχικά (στις 5 ώρες επώασης) την αύξηση της ικανότητας παραγωγής του H_2O_2 , στις 14 ώρες επώασης η ικανότητα παραγωγής H_2O_2 μειώνεται . Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη ενός ενδογενούς προστατευτικού μηχανισμού που εμποδίζει την υπερπαραγωγή του βλαπτικού Δραστικού Μεταβολίτη Οξυγόνου . Αντιθέτως , η παραγωγή του NO ήταν αυξανόμενη μετά από επώαση 5 ή 14 ωρών με LPS ή INF γ . Η αύξηση της παραγωγής NO στα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι αναμενόμενη (Nathan και Hibbs, 1991) . Ωστόσο υπάρχουν αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία για απενεργοποίηση της iNOS μετά από επώαση 48-72 ωρών με τον συνδυασμό LPS και INF γ (Vodonotz και συν., 1994) .

Στον πίνακα A30 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και INF γ στην παραγωγή των H_2O_2 και NO και στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης . Ο LPS προκαλεί αύξηση της παραγωγής H_2O_2 και NO και μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης . Η INF γ προκαλεί μείωση της παραγωγής H_2O_2 μετά από επώαση 14 ωρών και αύξηση της παραγωγής NO και της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης των μακροφάγων αυτών .

Πίνακας A30 . Επιδράσεις του LPS και της INF γ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα

2 μ g/ml LPS , 2 ώρες	Αύξηση παραγωγής H_2O_2 κατά 24.64 %
2 μ g/ml LPS , 14 ώρες	Αύξηση παραγωγής NO κατά 290.32 %
2 μ g/ml LPS , 14 ώρες	Μείωση δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 26,75 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Μείωση παραγωγής H_2O_2 κατά 15.35 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Αύξηση παραγωγής NO κατά 87.77 %
250 u/ml INF γ , 14 ώρες	Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 37.71 %

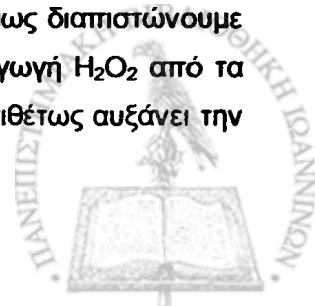
Η αυξημένη παραγωγή O_2^{-1} και H_2O_2 από βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα μετά από έκθεση σε LPS έχει τεκμηριωθεί τόσο in vitro όσο και in vivo (Wizemann και Laskin, 1994 , Lohmann-Matthes και συν., 1994) . Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μετά από επώαση με INF γ τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παράγουν μεγάλες ποσότητες Νιτρικού Οξειδίου . Το γεγονός αυτό έχει συσχετιστεί με την παθογένεια της Διάμεσης Ίνωσης του Πνεύμονα μετά από έκθεση σε αμιάντο (Thomas και συν., 1994) .

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ επί 14 ώρες προκάλεσε παρόμοια μείωση της ικανότητας παραγωγής H₂O₂ με εκείνη που προκάλεσε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα , που σημαίνει ότι πιθανώς πρόκειται για τον ίδιο μηχανισμό : η παραγωγή του Δραστικού Μεταβολίτη σταματά πριν προκληθεί σημαντική ιστική βλάβη . Δημιουργείται όμως η απορία γιατί να μην ισχύει το ίδιο και για το Νιτρικό Οξειδίο . Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι απλώς απαιτείται περισσότερος χρόνος για να εμφανιστεί η ίδια επίδραση , αφού σε μια δημοσιευμένη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η επώαση των φλεγμονωδών περιτοναϊκών μακροφάγων με συνδυασμό LPS και INF γ προκαλεί απενεργοποίηση της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξειδίου σε 48 με 72 ώρες (Vodonotz και συν., 1994) . Μια άλλη εξήγηση είναι ότι εάν η παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου υπερβεί κάποια όρια θα οδηγήσει στον Αποπρωτικό θάνατο του μακροφάγου , μια διαδικασία που αναστέλλεται από την Κυκλοοξυγενάση-2 (Albina και συν., 1993 , Von Klöthen και Brune, 1997) .

Στα κύτταρα Kupffer ούτε ο LPS ούτε η INF γ προκαλούν παραγωγή H₂O₂ . Γενικά η INF γ δεν φάνηκε να προκαλεί οποιαδήποτε επίδραση στα ηπατικά μακροφάγα (σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 67 και # 118) , ενώ ο LPS προκάλεσε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και της δραστηριότητας Οξινής Φωσφατάσης . Η επίδραση αυτή του LPS στα μακροφάγα του ήπατος είναι μερικώς προστατευτική , αφού δεν επιτρέπει την εξωκύτωση των Οξινων Υδρολασών . Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα κύτταρα Kupffer απελευθερώνουν ελάχιστες ποσότητες Οξινων Υδρολασών (Dieter και συν., 1988 , Winwood και Arthur, 1993) . Όμως και η έκκριση του Νιτρικού Οξειδίου έχει επίσης συσχετιστεί με την δημιουργία βλαβών στο ηπατικό παρέγχυμα , αλλά ταυτόχρονα είναι απαραίτητη για την αμυντική λειτουργία των κυττάρων Kupffer και δεν θα μπορούσε να περιοριστεί χωρίς να δημιουργήσει προβλήματα . (Winwood και Arthur, 1993) .

Η έλλειψη παραγωγής H₂O₂ από τα κύτταρα Kupffer φαίνεται καθαρά στα αποτελέσματα της πειραματικής ομάδας # 28 . Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αντικρουόμενες απόψεις για την ικανότητα των κυττάρων Kupffer να παράγουν Δραστικούς Μεταβολίτες Οξυγόνου . Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα κύτταρα Kupffer δεν παράγουν καθόλου H₂O₂ (Leray και συν., 1985, Ding και Nathan, 1988) ενώ άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι με πολύ ευαίσθητες φθοριομετρικές μεθόδους ανιχνεύεται παραγωγή H₂O₂ από τα κύτταρα αυτά (Matsuo και συν., 1985). Υπάρχουν επίσης πολλές δημοσιεύσεις που αναφέρουν την παραγωγή O₂⁻¹ από τα κύτταρα Kupffer και την μελέτη των μηχανισμών ελέγχου της παραγωγής του (Bhatnagar και συν., 1981 , Matsuo και συν., 1985 , Mayer και Spitzer, 1994) . Τελικά φαίνεται ότι τα κύτταρα Kupffer διαθέτουν το ένζυμο NADPH-Οξειδάση και για αυτό όταν διεγερθούν παρουσιάζουν Οξειδωτική Έκρηξη (Respiratory Burst) της οποίας το κύριο προϊόν είναι το Ανιόν Υπεροξειδίου (O₂⁻¹) . Επειδή όμως τα κύτταρα Kupffer στερούνται του ενζύμου Μυελοϋπεροξειδάση παράγουν πάρα πολύ μικρές ποσότητες H₂O₂ (Decker, 1990) .

Στον πίνακα A31 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης (σε συγκέντρωση 10⁻⁴ M) στα περιτοναϊκά μακροφάγα ή που ενεργοποιήθηκαν με LPS ή με INF γ . Η Αδρεναλίνη θεωρείται ότι έχει κατασταλτική επίδραση στην φλεγμονή και στην ανοσολογική αντίδραση . Όμως διαπιστώνουμε από τα παρακάτω αποτελέσματα ότι η ορμόνη αυτή καταστέλλει μόνο την παραγωγή H₂O₂ από τα περιτοναϊκά μακροφάγα , ανεξάρτητα από τον διεγέρτη τους (LPS ή INF γ) ενώ αντιθέτως αυξάνει την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου .



Πίνακας A31 . Επιδράσεις της Αδρεναλίνης σε περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία επωάζονται με LPSή με INF γ .

2 μ g/ml LPS + Αδρεναλίνη , 4 ώρες
 2 μ g/ml LPS + Αδρεναλίνη , 14 ώρες
 2 μ g/ml LPS + Αδρεναλίνη , 14 ώρες

Μείωση παραγωγής H₂O₂ κατά 13.26 %
 Αύξηση παραγωγής NO κατά 5.91 %
 Καμία μεταβολή της δραστηριότητας Φωσφατάσης .

250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 6 ώρες
 250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 6 ώρες
 250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 14 ώρες

Μείωση παραγωγής H₂O₂ κατά 17.19 %
 Αύξηση παραγωγής NO κατά 16.97 %
 Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 16.32 %

Στα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάζονται με LPS η Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει καθόλου την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ στα κύτταρα που επωάζονται με INF γ η Αδρεναλίνη μειώνει περαιτέρω την δραστηριότητα του ενζύμου , δηλαδή επιτείνει την επίδραση της INF γ και αυξάνει την έκκριση της Ώξινης Υδρολάσης . Οι παραπάνω επιδράσεις της Αδρεναλίνης δείχνουν ότι διαδραματίζει ρυθμιστικούς ρόλους . Δεν μπορούν να χαρακτηριστούν κατασταλτικές οι επιδράσεις τις οποίες ασκεί η Αδρεναλίνη στα περιτοναϊκά μακροφάγα .

Στον πίνακα A32 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που έχουν επωαστεί με LPS ή με INF γ . Είναι φανερό ότι και στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα η Αδρεναλίνη ασκεί έντονες ρυθμιστικές επιδράσεις , οι οποίες μάλιστα είναι «προστατευτικές» στην περίπτωση του H₂O₂ και της Ώξινης Φωσφατάσης . Αντίθετα , η παραγωγή NO αυξάνει με την επίδραση της Αδρεναλίνης .

Πίνακας A32 . Επιδράσεις της Αδρεναλίνης σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάζονταιμε LPS ή με INF γ .

2 μ g/ml LPS + Αδρεναλίνη , 14 ώρες
 2 μ g/ml LPS + Αδρεναλίνη , 14 ώρες

Αύξηση παραγωγής NO κατά 48.23 %
 Καμία μεταβολή της δραστηριότητας Φωσφατάσης .

250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 6 ώρες
 250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 6 ώρες
 250 μ l/ml INF γ + Αδρεναλίνη , 14 ώρες

Μείωση παραγωγής H₂O₂ κατά 26.33 %
 Αύξηση παραγωγής NO κατά 11.23 %
 Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 11.72 %

Τα κύτταρα Kupffer που επωάζονται με LPS και Αδρεναλίνη παρουσιάζουν επίσης αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου κατά 23.80 % , ενώ δεν μεταβάλλεται καθόλου η δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Τα αποτελέσματα των κυττάρων Kupffer μοιάζουν με εκείνα των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων . Μέσα από αυτά φαίνεται ότι η έλλειψη επίδρασης της Αδρεναλίνης στην δραστηριότητα της Φωσφατάσης οφείλεται συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση από τον LPS , ενώ η αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου είναι σταθερό φαινόμενο . Έτσι επιβεβαιώνεται η άποψη της ύπαρξης ρυθμιστικών επιδράσεων , αλλά όχι συνολική για όλη την δραστηριότητα του κυττάρου . Η Αδρεναλίνη φαίνεται ότι παρεμβαίνει ειδικά σε κάποιον μηχανισμό σήμανσης . Όμως δεν καταστέλλει όλες τις λειτουργίες των μακροφάγων και φαίνεται να δεν εξυπηρετεί τον σκοπό της προστασίας των ιστών που της είχε αποδοθεί .

Τα αποτελέσματα της δεύτερης κατεχολαμίνης που περιλήφθηκε στην μελέτη , δηλαδή της Ντοπαμίνης , παρουσιάζονται στον πίνακα A33 ο οποίος ακολουθεί . Οι επιδράσεις της Ντοπαμίνης στην παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου ήταν ομοιόμορφες και στα τρία είδη μακροφάγων , δηλαδή προκαλούσαν την αύξησή του . Αντιθέτως στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης υπήρξαν τρεις διαφορετικές επιδράσεις στα τρία είδη μακροφάγων . Η Ντοπαμίνη είναι βέβαιο ότι προκαλεί

ρυθμιστικές επιδράσεις στην λειτουργία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων , χωρίς να είναι σίγουρο ότι ασκούν κάποιο «προστατευτικό» ρόλο .

Πίνακας A33 . Επιδράσεις της Ντοπαμίνης σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα

τα οποία επωάζονται με LPS .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

Μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 12.56 %

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 14.16 %

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 8.31 %

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 18.54 %

Καμία μεταβολή στις δραστηριότητα της Φωσφατάσης

ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ντοπαμίνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 37.93 %

Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 19.23 %

Στον πίνακα A34 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων χορήγησης Ινσουλίνης στα περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά και ηπατικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS .

Πίνακας A34 . Επιδράσεις της Ινσουλίνης σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα

(κύτταρα Kupffer) τα οποία επωάζονται με 2 µg/ml LPS για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής H_2O_2 κατά 25.25 %

Καμία μεταβολή στην παραγωγής NO .

Καμία μεταβολή στις δραστηριότητα της Φωσφατάσης

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

Καμία μεταβολή στην παραγωγής NO .

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 11.63 %

ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

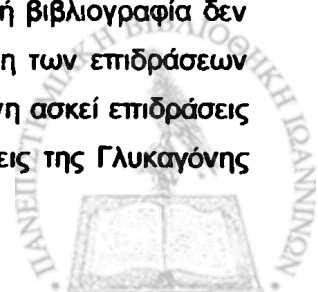
2 µg/ml LPS + Ινσουλίνη , 14 ώρες

Καμία μεταβολή στην παραγωγής NO .

Καμία μεταβολή στις δραστηριότητα της Φωσφατάσης

Η σχετική έλλειψη επιδράσεων από την Ινσουλίνη καθιστά μάλλον απίθανο να συμμετέχει σε μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας των μακροφάγων . Επίσης δεν είναι γνωστό αν οι ελάχιστες επιδράσεις τις οποίες προκαλεί οφείλονται στην μείωση του cAMP ή σε επιδράσεις μέσω άλλων μηχανισμών . Στην βιβλιογραφία υπάρχει μία μελέτη που δείχνει ότι η έλλειψη Ινσουλίνης σε πειραματόζωα με γενετική προδιάθεση για Σακχαρώδη Διαβήτη προκαλεί μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων τους . Η παρατήρηση αυτή έχει σχετιστεί με την αυξημένη ευπάθεια των διαβητικών σε λοιμώξεις του αναπνευστικού . Θα μπορούσε επίσης να έχει κάποια σχέση με την ανεύρεση επιδράσεων της Ινσουλίνης στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης μόνο στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (Sima και συν., 1988) .

Αντίθετα με την Ινσουλίνη , η Γλυκαγόνη φαίνεται να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των τριών βιοχημικών παραμέτρων που μελετήθηκαν . Η ορμόνη αυτή προκάλεσε μεταβολές σε όλες τις παραμέτρους και σε όλα τα είδη μακροφάγων . Ωστόσο , στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρά ελάχιστες μελέτες για τον ρόλο της ορμόνης αυτής στην ρύθμιση των επιδράσεων στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα . Μόνο σε μία μελέτη διαπιστώθηκε ότι η Γλυκαγόνη ασκεί επιδράσεις στα μακροφάγα . Τα αποτελέσματα των δικών μας πειραμάτων για τις επιδράσεις της Γλυκαγόνης στους τρεις τύπους κυττάρων παραθέτονται στον πίνακα A35 .



Πίνακας A35 . Επιδράσεις της Γλυκαγόνης σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα

(κύτταρα Kupffer) τα οποία επωάζονται με 2 µg/ml LPS για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής H₂O₂ κατά 49.12 %

Μείωση της παραγωγής NO κατά 8.36 %.

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 11.76 %

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 9.52 %.

Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 11.60 %

ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

2 µg/ml LPS + Γλυκαγόνη , 14 ώρες

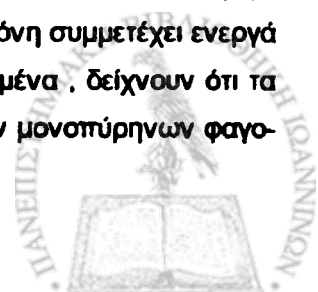
Μείωση της παραγωγής NO κατά 20 % .

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 8.82 %

Η Γλυκαγόνη προκάλεσε τις αντίθετες επιδράσεις στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα από ό τι στα περιτοναϊκά και τα ηπατικά κύτταρα . Η κατανομή αυτή δεν επιτρέπει να αποδοθούν οι διαφορές των αποτελεσμάτων με βεβαιότητα στον διαφορετικό φαινότυπο , αφού τα βρογχοκυψελιδικά όπως και τα ηπατικά μακροφάγα είναι «διεγερμένα» λόγω της επαφής τους αντίστοιχα με μικροοργανισμούς του ατμοσφαιρικού αέρα και ενδοτοξίνες της εντεροηπατικής (πυλαίας) κυκλοφορίας . Επίσης είναι δύσκολο να αποδοθούν σε μηχανισμό προστασίας των ιστών , αφού το πνευμονικό παρέγχυμα είναι εξίσου ευαίσθητο με το ηπατικό παρέγχυμα , αλλά η επίδραση της Γλυκαγόνης μοιάζει να επιτείνει την έκλυση βλαπτικών παραγόντων . Η μόνο πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να ήταν ότι το Νιτρικό Οξείδιο δεν είναι τόσο βλαπτικό για τα κυψελιδικά διαφράγματα (είτε γιατί διαχέεται στον αέρα των βρόγχων ή για άλλο λόγο) , ενώ η παρατηρούμενη μείωση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα δεν οφείλεται σε αύξηση της εξωκύτωσης του ενζύμου αλλά σε μείωση της σύνθεσής του . Εάν ισχύουν αυτές οι υποθέσεις , τότε είναι πιθανό η Γλυκαγόνη να συμμετέχει σε έναν μηχανισμό ο οποίος να εξασφαλίζει την μέγιστη αμυντική λειτουργία των μακροφάγων χωρίς να επιτρέπει την απελευθέρωση ουσιών που θα μπορούσαν να βλάψουν τους παρακείμενους ιστούς . Η επίδραση αυτή θα ήταν ευεργετική , αφού η ορμόνη αυτή εκκρίνεται σε καταστάσεις όπου υπάρχουν αυξημένες ανάγκες σε γλυκόζη , όπως για παράδειγμα σε σωματικό stress από τραύμα ή λοίμωξη .

Σε αντίθεση με την Γλυκαγόνη , το Νευροπεπτιδίο Υ (NPY) δεν φαίνεται να συμμετέχει σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς . Το Νευροπεπτιδίο Υ δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στις παραμέτρους που μετρήθηκαν , εκτός από την αύξηση κατά 21.49 % της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων (πειραματική ομάδα # 104) . Κατά συνέπεια η ουσία αυτή δεν είναι δυνατό να διαδραματίζει κάποιον σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λειτουργίας των μακροφάγων .

Τα γλυκοκορτικοειδή ενδεχομένως αποτελούν τις σημαντικότερες ορμόνες του Stress , λόγω των επιδράσεών τους στα περισσότερα συστήματα , αλλά κυρίως λόγω του αντιφλεγμονώδους - ανοσοκατασταλτικού χαρακτήρα τους . Ως αντιπρόσωπος των γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιήθηκε ένα ισχυρό συνθετικό ανάλογο , η Δεξαμεθαζόνη . Στον πίνακα A36 παρουσιάζονται οι επιδράσεις της Δεξαμεθαζόνης και στους τρεις τύπους των μακροφάγων , όταν η ορμόνη αυτή χορηγείται μαζί με LPS ή με INFγ . Τα στοιχεία που απεικονίζονται αποδεικνύουν ότι η Δεξαμεθαζόνη συμμετέχει ενεργά στους μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας των μακροφάγων . Πιο συγκεκριμένα , δείχνουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν κυρίως κατασταλτικές επιδράσεις στις λειτουργίες των μονοκύτταρων φαγο-



κυττάρων . Επίσης δείχνουν ότι προκαλούν την λεπτή ρύθμιση ορισμένων δραστηριοτήτων μέσω της άσκησης διαφοροποιούμενων ανάλογα με τις συνθήκες επιδράσεων .

Πίνακας A36 . Επιδράσεις της Δεξαμεθαζόνης (σε υψηλή ή χαμηλή δόση) σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) που επωάζονται με LPS ή με INF γ για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Υ.Δ.) , 12 ώρες	Μείωση της παραγωγής H $_2$ O $_2$ κατά 30.42 %
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 12 ώρες	Αύξηση της παραγωγής H $_2$ O $_2$ κατά 23.73 %
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της παραγωγής NO κατά 23.50 %.
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 19.96 %

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Υ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της παραγωγής NO κατά 33.33 %.
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της παραγωγής NO κατά 39.28 %
250 μ l/ml INF γ + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της παραγωγής NO κατά 74.78 %.
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Υ.Δ.) , 14 ώρες	Καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Φωσφατάσης .
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 12.39 %
250 μ l/ml INF γ + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 41.57 %.

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΡΦΕΡ

2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Καμία μεταβολή στην παραγωγή του NO .
2 μ g/ml LPS + Δεξαμεθαζόνη (Χ.Δ.) , 14 ώρες	Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 34.58 % .

Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα διαφοροποιούμενων ανάλογα με τις συνθήκες επιδράσεων εμφανίζονται στην παραγωγή H $_2$ O $_2$ από τα περιτοναϊκά μακροφάγα και στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS και Χαμηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής H $_2$ O $_2$, ενώ η επώαση με LPS και Υψηλή Δόση Δεξαμεθαζόνης οδηγεί σε μείωση της παραγωγής H $_2$ O $_2$. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι σε μια σύντομη ή ελαφρά λοίμωξη τα γλυκοκορτικοειδή ευοδώνουν την παραγωγή H $_2$ O $_2$, ενώ όσο η λοίμωξη παρατείνεται ή γίνεται σοβαρότερη η αυξανόμενη έκκριση γλυκοκορτικοειδών θα οδηγήσει σε μείωση της παραγωγής H $_2$ O $_2$ και σε αποφυγή της ιστικής βλάβης . Αντίστοιχα , η επώαση με LPS και χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης μειώνει την δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ενώ η επώαση με LPS και υψηλή δόση του γλυκοκορτικοειδούς δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα . Αυτό σημαίνει ότι όταν η σοβαρότητα μιας κατάστασης αυξάνει και ο κίνδυνος για τον οργανισμό γίνεται μεγαλύτερος , τα γλυκοκορτικοειδή σταματούν να επηρεάζουν την λειτουργία των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων .

Ενώ η Δεξαμεθαζόνη ασκεί ρυθμιστικές επιδράσεις με καθορισμένη σκοπιμότητα στην λειτουργία των μακροφάγων , ουσίες όπως η Σεροτονίνη επίσης επηρεάζουν τις δραστηριότητες των κυττάρων αυτών αλλά χωρίς να είναι εμφανής ο σκοπός τον οποίο εξυπηρετούν . Οι επιδράσεις της επώασης των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με LPS και Σεροτονίνη φαίνονται στον πίνακα A37 . Τα αποτελέσματα των επιδράσεων της Σεροτονίνης είναι δύσκολα στην ερμηνεία . Το βέβαιο συμπέρασμα είναι ότι το Αυτακοειδές αυτό ασκεί εκλεκτικά επιδράσεις και ότι συμμετέχει στους μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Στα περιτοναϊκά κύτταρα η Σεροτονίνη αυξάνει την παραγωγή H $_2$ O $_2$ και NO και την κυτταροπλασματική δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , άρα διεγείρει τις αμυντικές λειτουργίες των κυττάρων αυτών . Στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η επώαση με Σεροτονίνη αυξάνει την παραγωγή NO κατά 63.54 % , χωρίς να επηρεάζει την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Η επώαση των κυττάρων Kupffer επί 14 ώρες με 2 μ g/ml LPS και Σεροτονίνη δεν επηρεάζει ούτε την παραγωγή NO αλλά ούτε την δραστηριότητα της Ώξινης

Φωσφατάσης . Όταν όμως τα κύτταρα Kupffer επωαστούν με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS και Σεροτονίνη εμφανίζεται αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης κατά 15.93 % . Αυτό σημαίνει ότι οι επιδράσεις του Αυτακοειδούς αυτού , οι οποίες είναι κυρίως ανοσοδιεγερτικές , ασκούνται όταν ο βαθμός διέγερσης των μακροφάγων είναι μικρός . Όταν κάποια από τις παραμέτρους λειτουργεί σε ικανοποιητικό βαθμό η Σεροτονίνη μάλλον δεν έχει καμία επίδραση .

Πίνακας A37 . Επιδράσεις της Σεροτονίνης σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) τα οποία επωάζονται με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 4 ώρες

Αύξηση της παραγωγής H_2O_2 κατά 15.93 %

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 2.28 %.

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 11.39 %

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 63.54 %.

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΠΦΕΡ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή NO

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Σεροτονίνη , 14 ώρες

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 6.25 %

Παρόμοια αποτελέσματα με τα προαναφερθέντα διαπίστωσαν και ορισμένοι άλλοι ερευνητές σε μακροφάγα που επωάστηκαν με $\text{INF}\gamma$ και Σεροτονίνη , δηλαδή την επίταση της φαγοκυττάρωσης σε χαμηλές δόσεις $\text{INF}\gamma$ και την καταστολή της φαγοκυττάρωσης στις υψηλές δόσεις $\text{INF}\gamma$ (Stenberg και συν., 1987) . Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας αποδεικνύουν ότι η Σεροτονίνη συμμετέχει σε πολλούς μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων , ενώ διαθέτει χαρακτήρα κυρίως ανοσοενισχυτικό .

Στον πίνακα A38 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επώασης των μακροφάγων με LPS και Ισταμίνη ως προς την παραγωγή H_2O_2 και NO και την δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Οι επιδράσεις που προκαλεί η Ισταμίνη είναι σαφώς λιγότερες από εκείνες της Σεροτονίνης .

Πίνακας A38 . Επιδράσεις της Ισταμίνης σε περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) τα οποία επωάζονται με 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 4 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή H_2O_2

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Μείωση της παραγωγής NO κατά 13.60 %.

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή NO

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 88 %

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΠΦΕΡ

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή NO

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS + Ισταμίνη , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

Η Ισταμίνη δεν προκάλεσε μεταβολές στις παραμέτρους που μελετήθηκαν , εκτός από την μείωση της παραγωγής Νιτρικού Ώξειδίου στα περιτοναϊκά μακροφάγα και την θεαματική αύξηση κατά 88 % της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Συγκεκριμένα στα κύτταρα Kupffer η Ισταμίνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή , ενώ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα (όπου αναμενόταν να ασκεί τις περισσότερες επιδράσεις) δεν επηρεάζει την παραγωγή του Νιτρικού

Οξειδίου . Αφού ασκεί τόσες λίγες επιδράσεις , είναι μάλλον απίθανο η Ισταμίνη να συμμετέχει στους μηχανισμούς ελέγχου της λειτουργίας των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων .

Σε αντίθεση με την Ισταμίνη , ένα άλλο Αυτακοειδές φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των φλεγμονωδών αντιδράσεων . Για την Προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2) διαπιστώθηκε ότι ασκεί πολλαπλές επιδράσεις , όπως φαίνεται στον πίνακα A39 που ακολουθεί .

Πίνακας A39 . Επιδράσεις της PGE_2 σε περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα , τα οποία επωάζονται με 2 $\mu g/ml$ LPS για 14 ώρες (Δεν έγιναν πειράματα με PGE_2 στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα) .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 4 ώρες	Μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 9.20 %
2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 14 ώρες	Αύξηση της παραγωγής NO κατά 13.47 %
2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 12 ώρες	Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης
2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 14 ώρες	Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 13.82 %
1 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 14 ώρες	Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 8.58 %

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΥΠΦΕΡ

2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 14 ώρες	Αύξηση της παραγωγής NO κατά 22.22 %
2 $\mu g/ml$ LPS + PGE_2 , 14 ώρες	Καμία επίδραση στην δραστηριότητα Φωσφατάσης

Είναι χαρακτηριστικό ότι η PGE_2 δεν έχει πάντα τον κατασταλτικό ρόλο που της έχει αποδοθεί στην βιβλιογραφία . Η παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου αυξάνεται κατά 13.47 % στα περιτοναϊκά και κατά 22.22 % στα ηπατικά μακροφάγα , ενώ η μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων οφείλεται στην έκκριση του ενζύμου και όχι στην αναστολή της σύνθεσής του . Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η PGE_2 ασκεί ρυθμιστικές επιδράσεις στις λειτουργίες των μακροφάγων , που είναι πολύ σημαντικές αφού η PGE_2 παράγεται από τα ίδια τα μακροφάγα κατά την ενεργοποίησή τους . Έτσι η ουσία αυτή συμμετέχει σε αυτορυθμιστικούς μηχανισμούς . Είναι πιθανό ότι η αύξηση της παραγωγής NO από την PGE_2 να έχει ως σκοπό την αναπλήρωση του κενού των αντιμικροβιακών μηχανισμών που αφήνει η καταστολή της παραγωγής H_2O_2 από την PGE_2 . Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι να καταστέλλεται η παραγωγή του H_2O_2 ώστε να μην αντιδρά με το Νιτρικό Οξείδιο και σχηματίζεται το τοξικό για τα ίδια τα μακροφάγα Υπεροξειονιτρικό Ανιόν .

Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μια δημοσίευση που αναφέρει ότι η PGE_2 και το cAMP σε χαμηλές δόσεις προκαλούν καταστολή της παραγωγής NO από τα περιτοναϊκά μακροφάγα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS (Raddassi και συν.,1993) . Το αποτέλεσμα αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα , γιατί έχει διαπιστωθεί ότι οι επιδράσεις της PGE_2 ή του cAMP στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα μακροφάγα εξαρτώνται από την δόση της PGE_2 ή του cAMP. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι κατά την επώαση μακροφάγων που έχουν ενεργοποιηθεί με INF γ με χαμηλές δόσεις PGE_2 ή cAMP προκαλείται αύξηση της παραγωγής NO , ενώ όταν τα ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα επωαστούν με υψηλές δόσεις cAMP ή PGE_2 (όπως έγινε στα δικά μας πειράματα) θα προκληθεί καταστολή της παραγωγής NO (Mullet και συν.,1997) .

Μια άλλη Προσταγλανδίνη που παράγεται από τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα είναι η PGD_2 , η οποία όμως δεν έχει τις ίδιες επιδράσεις με την PGE_2 . Η PGD_2 δεν επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα , την παραγωγή NO από τα περιτοναϊκά ή τα ηπατικά μακροφάγα και την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης από τα περιτοναϊκά ή τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Αντιθέτως η PGD_2 προκαλεί την αύξηση της παραγωγής NO από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS και την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης από τα μακροφάγα του ήπατος . Η PGD_2 φαίνεται λοιπόν ότι δεν μπορεί να συμμετέχει σε μηχανισμούς ρύθμισης , αφού

ασκεί ελάχιστες επιδράσεις στα μακροφάγα . Τα δύο αποτελέσματα που προκαλούνται δεν οδηγούν σε συγκεκριμένο συμπέρασμα , αλλά η PGD_2 μάλλον επανδύει την λειτουργία των ήδη ισχυρότερων μηχανισμών του κάθε μακροφάγου (δηλαδή της παραγωγής NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και την δραστηριότητα της λυσοσωματικής Οξίνης Φωσφατάσης στα κύτταρα Kupffer) .

Η 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D3 (Vit.D3 ή Καλσιτριόλη) δεν ανήκει ούτε στις Ορμόνες του Stress ούτε στα Αυτακοειδή , αλλά έχει συσχετιστεί με την διαφοροποίηση και ωρίμαση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Για τους λόγους αυτούς μελετήθηκαν οι επιδράσεις της Vit.D3 στις παραμέτρους της ενεργοποίησης των μακροφάγων , όπως φαίνεται στον πίνακα A40 .

Πίνακας A40 . Οι επιδράσεις της Vit.D3 στα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , τα οποία επωάζονται μόνο με Vit.D3 για 6 ή 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 6 ώρες

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 14 ώρες

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 14 ώρες

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή H_2O_2

Μείωση της παραγωγής H_2O_2 κατά 6.75 %

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 4.73 %

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Φωσφατάσης

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 14 ώρες

$2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 , 14 ώρες

Μείωση της παραγωγής NO κατά 15.09 %

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Φωσφατάσης

Διαπιστώνουμε ότι η επώαση των μακροφάγων με Vit.D3 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης , παρά το ότι η ουσία αυτή έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την αύξηση της παραγωγής και έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων από τους οστεοκλάστες . Επίσης παρά τα ευρήματα άλλων ερευνητών στα άωρα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα (Cohen και συν., 1986 , Rook και συν., 1986) η χορήγηση Vit.D3 σε ώριμα και διαφοροποιημένα μακροφάγα δεν προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 . Στον πίνακα A41 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επώασης των μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu g/ml$ LPS και $2,5 \times 10^{-7}$ M Vit.D3 στις τρεις παραμέτρους που μελετήθηκαν .

Πίνακας A41 . Οι επιδράσεις της Vit.D3 στα περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά ή ηπατικά μακροφάγα (κύτταρα Kupffer) τα οποία επωάζονται με 2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 για 14 ώρες .

ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή H_2O_2

Αύξηση της παραγωγής NO κατά 3.35 %

Αύξηση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 4.69 %

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

Μείωση της παραγωγής NO κατά 7.17 %

Μείωση της δραστηριότητας Φωσφατάσης κατά 7.25 %

ΚΥΤΤΑΡΑ KUPFFER

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

2 $\mu g/ml$ LPS + Vit.D3 , 14 ώρες

Καμία επίδραση στην παραγωγή NO

Καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Φωσφατάσης

Είναι φανερό ότι τα αποτελέσματα της επώασης των μακροφάγων με τον συνδυασμό LPS και Vit.D3 διαφέρουν από εκείνα της επώασης με Vit.D3 . Όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωαστούν με την Vit.D3 επί 14 ώρες μειώνεται η ικανότητα παραγωγής H_2O_2 κατά 6.75 % , ενώ τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS και Vit.D3 δεν εμφανίζουν καμία μεταβολή της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 . Η επώαση των περιτοναϊκών και βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με Vit.D3 προκαλεί ακριβώς τις ίδιες επιδράσεις στην παραγωγή NO με τον συνδυασμό LPS και Vit.D3 . Αντιθέτως , ενώ η επώαση των κυττάρων αυτών μόνο με Vit.D3 δεν προκάλεσε καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Οξίνης

Φωσφατάσης, η χορήγηση LPS και Vit.D3 προκαλεί αντίστοιχα αύξηση και μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας. Τα κύτταρα Kupffer που εκθέτονται σε ενδοτοξίνη δεν επηρεάζονται καθόλου από την Vit.D3. Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι γενικά τα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα επιτείνουν τις δραστηριότητές τους υπό την επίδραση της Vit.D3 (εκτός από την έκκριση H_2O_2), τα ενεργοποιημένα με LPS βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα καταστέλλουν τις δραστηριότητές τους υπό την επίδραση της Vit.D3 και τέλος τα κύτταρα Kupffer δεν επηρεάζονται καθόλου. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την ποικιλία των ενδοκρινικών επιδράσεων που δέχονται τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα. Τα αποτελέσματα που λάβαμε χορηγώντας Vit.D3 στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα επίμυων Wistar δεν συμφωνούν με τα ευρήματα μιας άλλης ερευνητικής ομάδας (Abe και συν., 1984) σε βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα άλλων πειραματόζων (dd.-mice) μετά από επωάσεις με Vit.D3 για 24 - 72 ώρες. Στα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι η Vit.D3 προκαλεί την αύξηση της κατανάλωσης Γλυκόζης, την αύξηση της έκφρασης Fc-υποδοχέων και την αύξηση της κυτταροτοξικής δράση κατά των νεοπλασματικών κυττάρων L-929 και B16, δηλαδή δρα περίπου όπως ο LPS. Αυτό σημαίνει ότι ο LPS και η Vit.D3 προκαλούν την έκφραση πολλών κοινών γονιδίων. Όμως ο LPS δεν προκαλεί την σύντηξη (fusion) των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων σε Γιγαντοκύτταρα, δηλαδή υπάρχουν κάποια γονίδια που εκφράζονται μόνο υπό την επίδραση της Vit.D3, όπως υπάρχουν πολλά γονίδια τα οποία εκφράζονται μόνο υπό την επίδραση του LPS. Αν και η 1,25-Διϋδροξυ-Βιταμίνη D3 δεν είναι ορμόνη του stress ή αυτακοειδής, είναι γνωστό ότι στις κοκκιωματώδεις φλεγμονές τα μακροφάγα του κοκκιώματος παράγουν Vit.D3, ενώ και τα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παράγουν την ορμόνη αυτή (Adams και συν., 1983, Kozeny και συν., 1984, Koeffler και συν., 1985). Αυτό σημαίνει ότι σε διάφορες φλεγμονές με έντονη συμμετοχή των μονοπύρνων φαγοκυττάρων, η Vit.D3 η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά θα επηρεάζει την λειτουργία των μονοκυττάρων και μακροφάγων που θα συρρέουν στην φλεγμονώδη εστία.

Όταν μελετούμε τις επιδράσεις του LPS ή της INF γ στο H_2O_2 πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι επιδράσεις αυτού του Δραστικού Μεταβολίτη Οξυγόνου, ορισμένες από τις οποίες μοιάζουν με επιδράσεις του Νιτρικού Οξειδίου. Το μόριο του H_2O_2 έχει άμεση αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση. Επίσης έχει την ιδιότητα να διαχέεται στον μεσοκυττάριο χώρο προς τα παρακείμενα κύτταρα (π.χ. Τ-λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα) και να προκαλεί ενεργοποίησή τους μέσω άμεσης διέγερσης του Παράγοντα Μεταγραφής NF κ B (Schreck και συν., 1991). Το Νιτρικό Οξείδιο μπορεί να διεγείρει την παραγωγή cGMP αλλά δεν προκαλεί την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Ένα άλλο πολύ σημαντικό στοιχείο είναι ότι το H_2O_2 που παράγεται στα μακροφάγα διαχέεται στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου και προκαλεί βλάβες στις λυσοσωματικές του μεμβράνες, με αποτέλεσμα: 1) δημιουργία υπεροξειδίων των μεμβρανικών λιπιδίων, που είναι επίσης τοξικά και 2) ρήξη των λυσοσωμάτων και απελευθέρωση των Όξινων Υδρολασών στο κυτταρόπλασμα (Brunk και Cadenas, 1988). Επίσης το H_2O_2 αντιδρά με το παραγόμενο NO και δημιουργούν την Υπεροξεονιτρική Ρίζα, που είναι ιδιαίτερα τοξική. Τέλος το H_2O_2 προκαλεί τον Αποπτωτικό θάνατο των μονοπύρνων φαγοκυττάρων. Όμως η Απόπτωση των μακροφάγων υπό την επίδραση του H_2O_2 είναι ένας ακόμα αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων αυτών, που χρησιμοποιείται για την μαζική καταστροφή ενδοκυττάρων παρασίτων όπως π.χ. τα μυκοβακτηρίδια (Laochumroonvorapong και συν., 1996).



Σε μια προσπάθεια σύνοψης των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν ομαδοποιημένα ως προς την πειραματική ουσία που χρησιμοποιήθηκε, θα διατυπωθούν ορισμένες παρατηρήσεις:

1. Οι πειραματικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προκαλούσαν αποτελέσματα που άλλοτε ανταποκρίνονται και άλλοτε δεν ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένο «μοντέλο» λειτουργίας. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στα εξής ενδεχόμενα: α. οι παρατηρούμενες επιδράσεις να ταιριάζουν σε μοντέλο «αυτοπεριορισμού» της υπερβολικής ενεργοποίησης ή της υπέρμετρης παραγωγής αντιμικροβιακών και κυτταροτοξικών ουσιών που θα κατέστρεφαν τους υγιείς ιστούς και τα όργανα, β. οι επιδράσεις που παρατηρούνται να ταιριάζουν σε μοντέλο «λεπτής ρύθμισης» των λειτουργιών του μακροφάγου, δηλαδή της επίτευξης συγκεκριμένων επιπέδων παραγωγής αντιμικροβιακών και κυτταροτοξικών ουσιών μέσα από μικρές αλληλοαναιρούμενες ή αλληλοσυμπληρούμενες επιδράσεις πολλών ορμονών και αυτακοειδών. Αυτό το μοντέλο εξασφαλίζει την μέγιστη αμυντική λειτουργία με την ελάχιστη ιστική καταστροφή, χωρίς την σπατάλη των ενεργειακών και βιοχημικών αποθεμάτων των μακροφάγων, ενώ επιτρέπει την προσαρμογή της λειτουργίας τους ανάλογα με τις ανάγκες της στιγμής. Όμως τα μακροφάγα δεν φάνηκαν να ανταποκρίνονται στις πειραματικές ουσίες σύμφωνα με κανένα από τα δύο παραπάνω ομοιοστατικά μοντέλα.

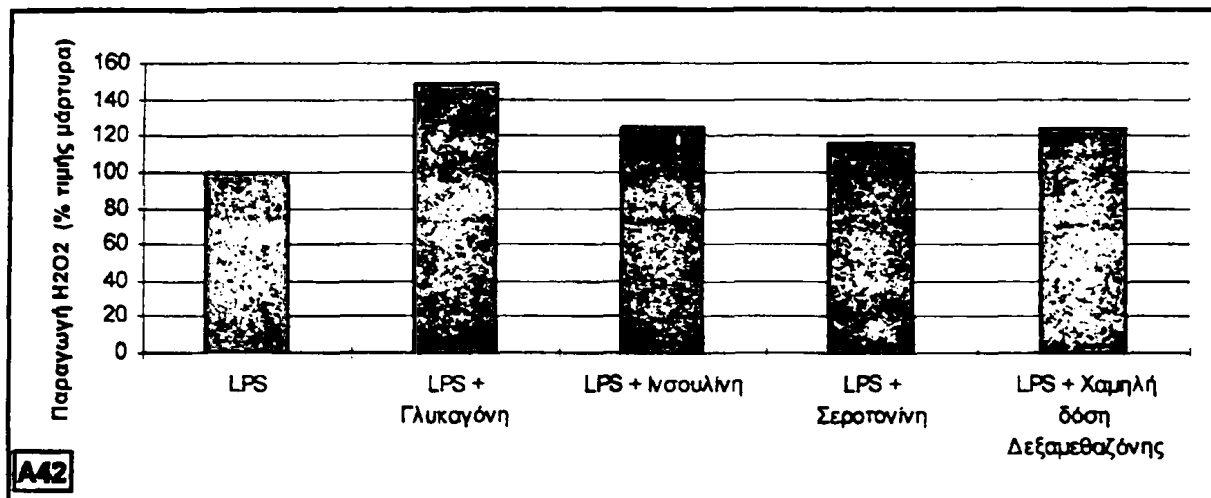
2. Συχνά η ίδια πειραματική ουσία προκαλούσε διαφορετικές επιδράσεις σε δύο διαφορετικούς τύπους μακροφάγων. Για παράδειγμα η Γλυκαγόνη μειώνει την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα ενώ αντιθέτως την αυξάνει στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιούνται με LPS, ενώ αντιθέτως την επηρεάζει στα ενεργοποιημένα με INF γ μακροφάγα. Συγκεκριμένα, στα περιτοναϊκά μακροφάγα η δραστηριότητα της Φωσφατάσης μειώνεται, ενώ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η δραστηριότητα αυξάνεται. Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι οι επιδράσεις των πειραματικών ουσιών γίνονται σε στοιχεία του φαινοτύπου των μακροφάγων που διαφοροποιούνται ανάλογα με την ανατομική εντόπιση και με την λειτουργική κατάσταση του κυττάρου. Για αυτούς τους λόγους είναι απαραίτητο η ανάλυση των αποτελεσμάτων της χορήγησης των πειραματικών ουσιών στα μακροφάγα να μην γίνεται μόνο με βάση τις αναμενόμενες επιδράσεις στην λειτουργία του ανοσοποιητικού, αλλά λαβαίνοντας υπόψη κυρίως τους Μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνύματος των κυττάρων αυτών. Δηλαδή θα πρέπει να απομονώσουμε τους επιμέρους βιοχημικούς μηχανισμούς που αφορούν τις μεταβολές των εκκρινόμενων ουσιών (H_2O_2 , NO, Ώξινης Φωσφατάσης) και να εστιάσουμε την προσοχή μας στους ειδικούς μηχανισμούς ελέγχου της κυτταρικής λειτουργίας.

Συμπερασματικά, τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η εξήγηση των αποτελεσμάτων επάνω στα μακροφάγα των ουσιών που χορηγήθηκαν (ορμονών ή αυτακοειδών) πρέπει να αναζητηθεί κυρίως στην επίδραση της ουσίας στην συγκεκριμένη λειτουργική κατάσταση του μακροφάγου, η οποία εξαρτάται από: 1. την ανατομική εντόπιση και προέλευση του κυττάρου, 2. το επίπεδο ενεργοποίησής του, 3. τις επιδράσεις τροποποιητικών παραγόντων της λειτουργικής του κατάστασης, και άλλα λοιπά.



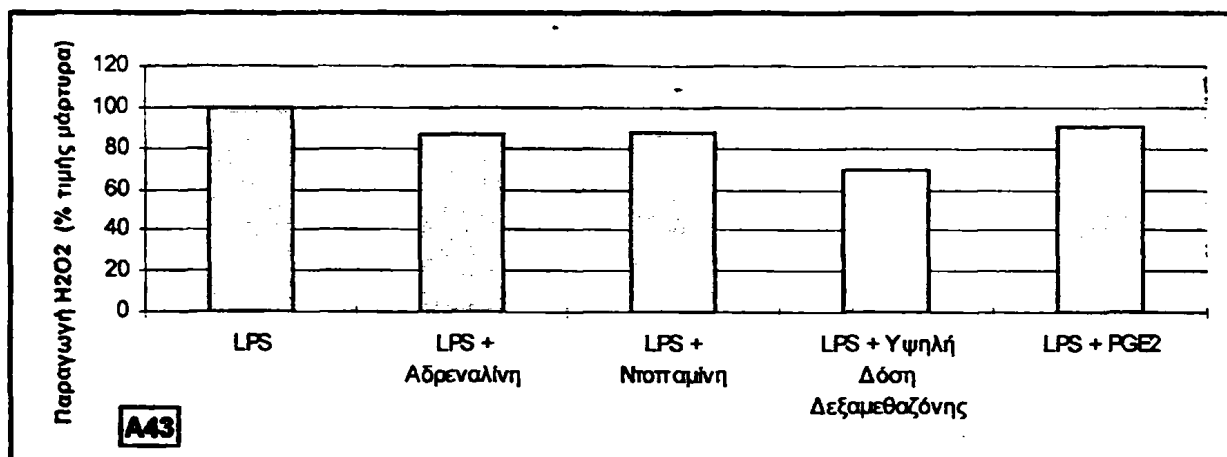
ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (ΑΥΞΗΣΗ Ή ΜΕΙΩΣΗ) ΣΕ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟ .

Στον πίνακα **A42** απεικονίζονται όλες οι ουσίες που προκάλεσαν την αύξηση της παραγωγής H_2O_2 στα περιτοναϊκά μακροφάγα τα οποία επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS .



Διαπιστώνουμε ότι οι τέσσερις αυτές ουσίες είναι τελείως διαφορετικές μεταξύ τους , τόσο από πλευράς δομής όσο και από πλευράς φυσιολογικών επιδράσεων .

Στον πίνακα **A43** απεικονίζονται οι ουσίες που προκάλεσαν την μείωση της παραγωγής H_2O_2 στα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS .

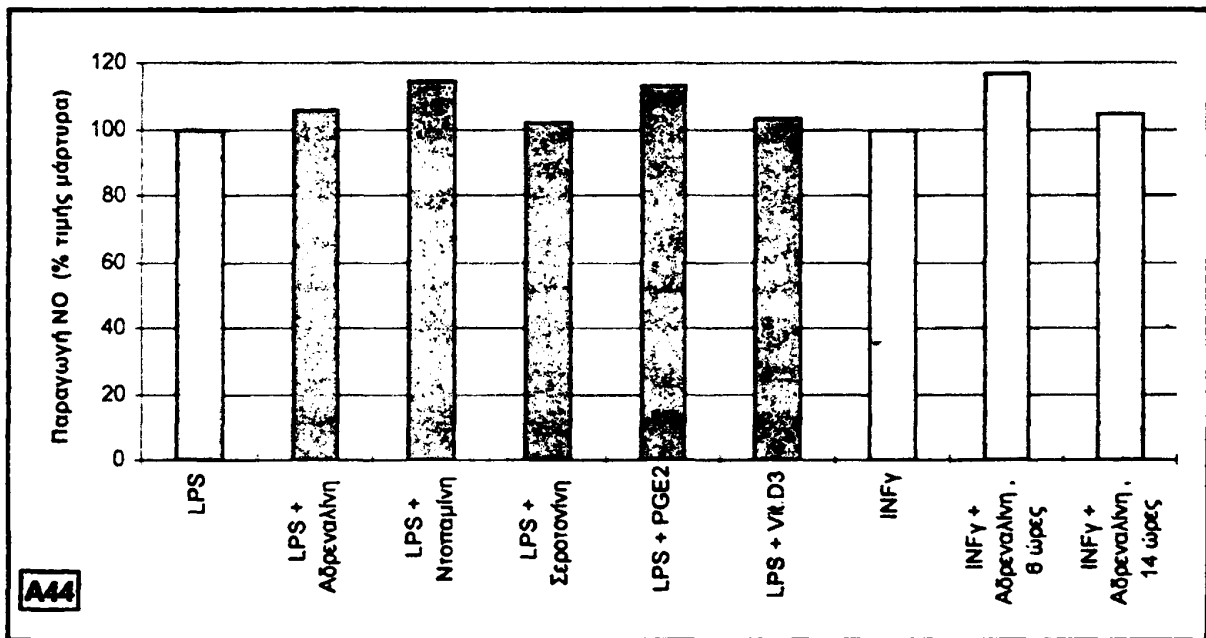


Αν παρατηρήσουμε τις ουσίες αυτές θα διαπιστώσουμε ότι οι δύο είναι Κατεχολαμίνες και μία ακόμα είναι η PGE₂ , δηλαδή υπάρχουν τρεις ουσίες που δρουν μέσω της αύξησης του cAMP . Αυτό σημαίνει ότι η διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και η αύξηση του cAMP σχετίζονται με την μείωση της ικανότητας παραγωγής του H_2O_2 . Από τις ουσίες του πίνακα **A42** που προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , μόνο στην Γλυκαγόνη έχει αποδοθεί η αύξηση του cAMP ως μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την λειτουργία της , αλλά έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δράσει και μέσω διέγερσης της PLC και αύξησης του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} . Από τις άλλες τρεις ουσίες , καμία δεν οδηγεί άμεσα στην αύξηση του cAMP , αφού η Ινσουλίνη δρα μέσω Κινασών της Τυροσίνης και μειώνει το cAMP , τα Γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω κυτταροπλασματικών υποδοχέων και η Σεροτονίνη έχει συσχετιστεί είτε με την καταστολή της Αδενυλικής Κυκλάσης και την μείωση του cAMP ή με την διέγερση της PLC και την

αύξηση του Ca^{2+} . Τα στοιχεία αυτά μας οδηγούν στην αναζήτηση άλλων ομοιοτήτων μεταξύ ουσιών που προκάλεσαν την ίδια επίδραση και των Οδών Μεταγωγής Μηνύματος τις οποίες χρησιμοποιούν.

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη για 6 ώρες οδήγησε στην μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά 17.19%. Επίσης η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη προκάλεσε την μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 κατά 26.33%. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση της αύξησης του cAMP στην παραγωγή του H_2O_2 ήταν η ίδια, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των μακροφάγων με LPS ή INF γ .

Στον πίνακα A44 απεικονίζονται οι ουσίες που προκάλεσαν την αύξηση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν επωαστεί με 2 μ g/ml LPS.



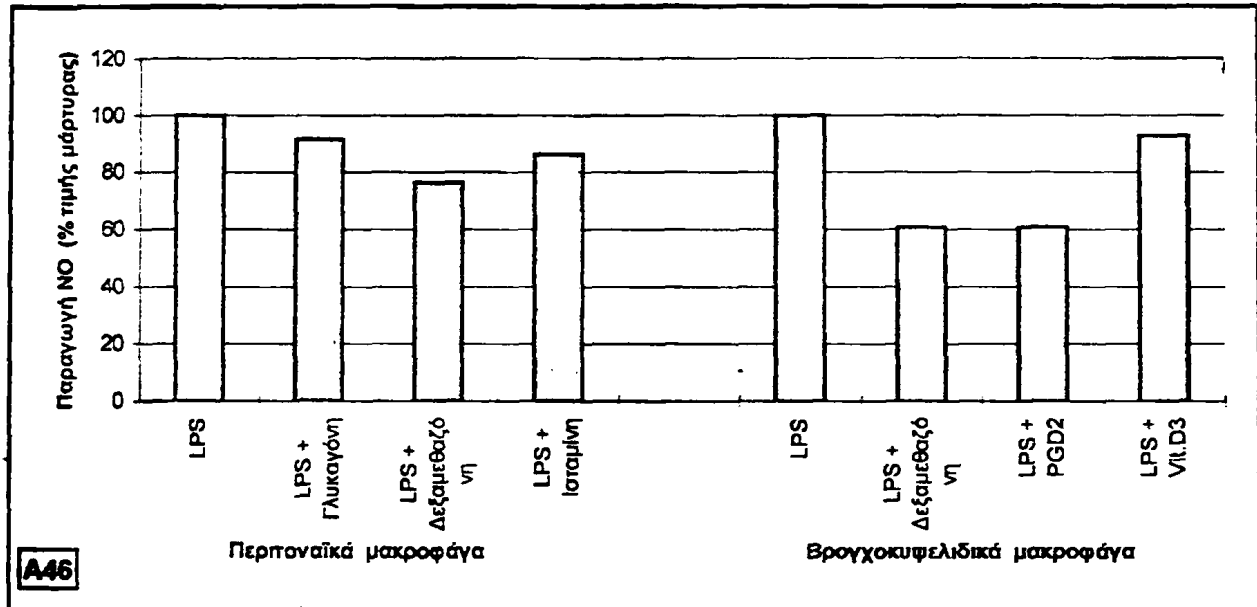
Διαπιστώθηκε ότι οι κατεχολαμίνες (Αδρεναλίνη και Ντοπαμίνη) και η PGE₂, δηλαδή οι ουσίες που δρουν μέσω της αύξησης του cAMP, οδηγούν στην αύξηση της παραγωγής NO. Όμως στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγούν και η Σεροτονίνη (που σχετίζεται με την μείωση του cAMP και την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+}) και η Vit.D3 (που δρα μέσω κυτταροπλασματικών υποδοχέων σαν αυτούς των γλυκοκορτικοειδών). Η Αδρεναλίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO και στα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν ενεργοποιηθεί με INF γ . Αν εξετάσουμε όμως ποιες από τις πειραματικές ουσίες προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS, θα διαπιστώσουμε ότι αυτές ήταν η Αδρεναλίνη, η Ντοπαμίνη, η Γλυκαγόνη και η Σεροτονίνη. Δηλαδή στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα η Vit.D3 δεν προκαλεί αύξηση της παραγωγής NO αλλά αντίθετως την μείωση της παραγωγής της, ενώ η Γλυκαγόνη (που συνήθως προκαλεί την αύξηση του cAMP) αυξάνει την παραγωγή NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα. Η Γλυκαγόνη όμως προκάλεσε την μείωση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα. Έτσι η Vit.D3 και η Γλυκαγόνη ασκούν ακριβώς τις αντίθετες επιδράσεις στα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα.

Πίνακας A45. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΑΓΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ VIT.D3 ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ

Παραμασκή Ουσία	Περιτοναϊκά μακροφάγα	Βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα
Γλυκαγόνη	Μείωση της παραγωγής NO	Αύξηση της παραγωγής NO
Βιταμίνη D3	Αύξηση της παραγωγής NO	Μείωση της παραγωγής NO

Στον πίνακα A45 φαίνεται καθαρά η διαφορά των επιδράσεων των δύο ουσιών ανάλογα με τον τύπο του μακροφάγου στο οποίο θα χορηγηθούν . Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να ερμηνευτεί μόνο εάν οι υποδοχείς των ορμονών αυτών ήταν συζευγμένοι με διαφορετικά συστήματα Δεύτερων Μηνυτόρων στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Στον πίνακα A46 που ακολουθεί απεικονίζονται όλες οι ουσίες που προκάλεσαν μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .



Είναι φανερό ότι εκτός από την Δεξαμεθαζόνη , οι άλλες ουσίες που προκαλούσαν την καταστολή της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου είναι διαφορετικές για τα περιτοναϊκά και τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα αλλά με ένα ιδιαίτερο γνώρισμα : οι δυο από αυτές (Γλυκαγόνη και Vit.D3) ασκούν τις επιδράσεις που φαίνονται στον πίνακα A45 , ενώ η Ισταμίνη και η PGD₂ δεν προκαλούν καμία απολύτως επίδραση στα αντίθετα είδη μακροφάγων . Δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί για ποιόν λόγο η Ισταμίνη προκαλεί την μείωση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα ενώ δεν προκαλεί καμία τέτοια μεταβολή στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα , ούτε γιατί συμβαίνει το αντίστροφο στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα με την PGD₂ . Η εξήγηση πρέπει να εντοπίζεται στον μηχανισμό δράσης των ουσιών αυτών .

Στον πίνακα A44 φαίνεται καθαρά ότι η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου . Το ίδιο συμβαίνει μετά την επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη . Επίσης , η επώαση των κυττάρων αυτών με INF γ και Δεξαμεθαζόνη οδηγεί σε πολύ μεγάλη μείωση της παραγωγής NO , όπως ακριβώς στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS και Δεξαμεθαζόνη .

Στον πίνακα A47 που ακολουθεί αναφέρονται ποιες πειραματικές ουσίες προκάλεσαν αύξηση και ποιες προκάλεσαν μείωση της παραγωγής NO από κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με LPS .

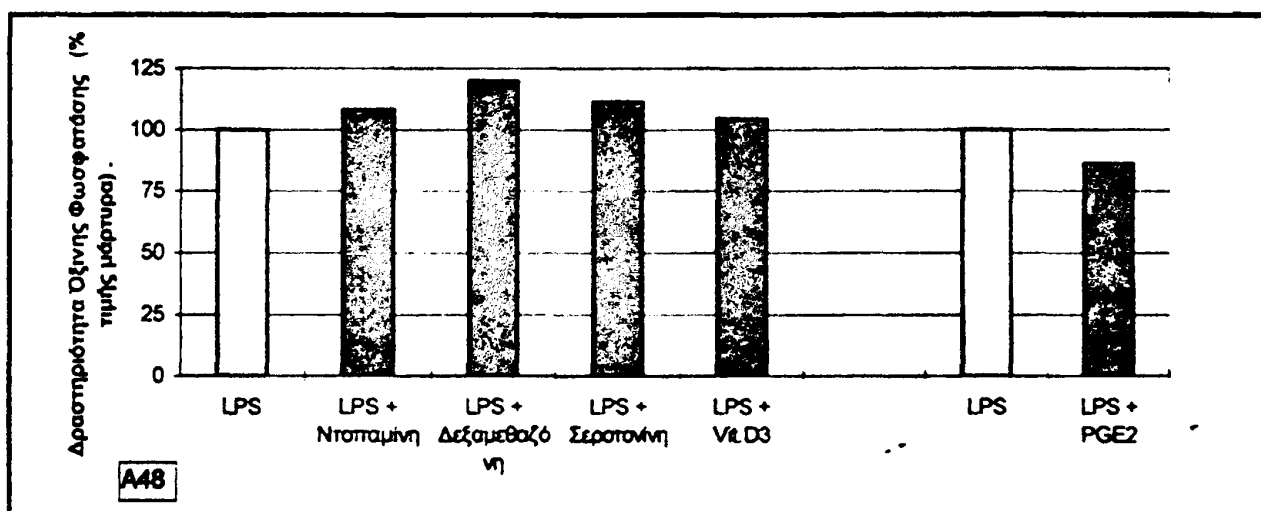
Πίνακας A47 . Επιδράσεις των πειραματικών ουσιών στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα κύτταρα Kupffer .

1. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ NO : Αδρεναλίνη , Ντοπαμίνη , PGE₂ .
2. ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ NO : Γλυκαγόνη .
3. ΚΑΜΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΣΤΟ NO : Ινσουλίνη , NPY , Δεξαμεθαζόνη , Σεροτονίνη , Ισταμίνη , PGD₂ , Vit.D3 .

Οι τρεις ουσίες που είναι γνωστό ότι προκαλούν αύξηση του cAMP προκαλούν και αύξηση της παραγωγής NO . Η Γλυκαγόνη αντιθέτως προκαλεί την μείωση της παραγωγής NO . Δεν είναι γνωστό

γιατί η Γλυκαγόνη δεν προκαλεί επίσης αύξηση της παραγωγής NO, εκτός εάν υποθέσουμε ότι στα κύτταρα Kirpffer η ορμόνη αυτή συνδέεται σε υποδοχέα ο οποίος δεν διεγείρει την Αδενυλική Κυκλάση και δεν προκαλεί την αύξηση του cAMP. Ένα άλλο εντυπωσιακό αποτέλεσμα που έδωσαν τα κύτταρα Kirpffer είναι ότι η Δεξαμεθαζόνη δεν προκαλεί καμία επίδραση στην παραγωγή NO, για το οποίο προς το παρόν επίσης δεν υπάρχει καμία εξήγηση.

Στον πίνακα A48 που ακολουθεί απεικονίζονται οι ουσίες που προκάλεσαν την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάζονται με LPS.

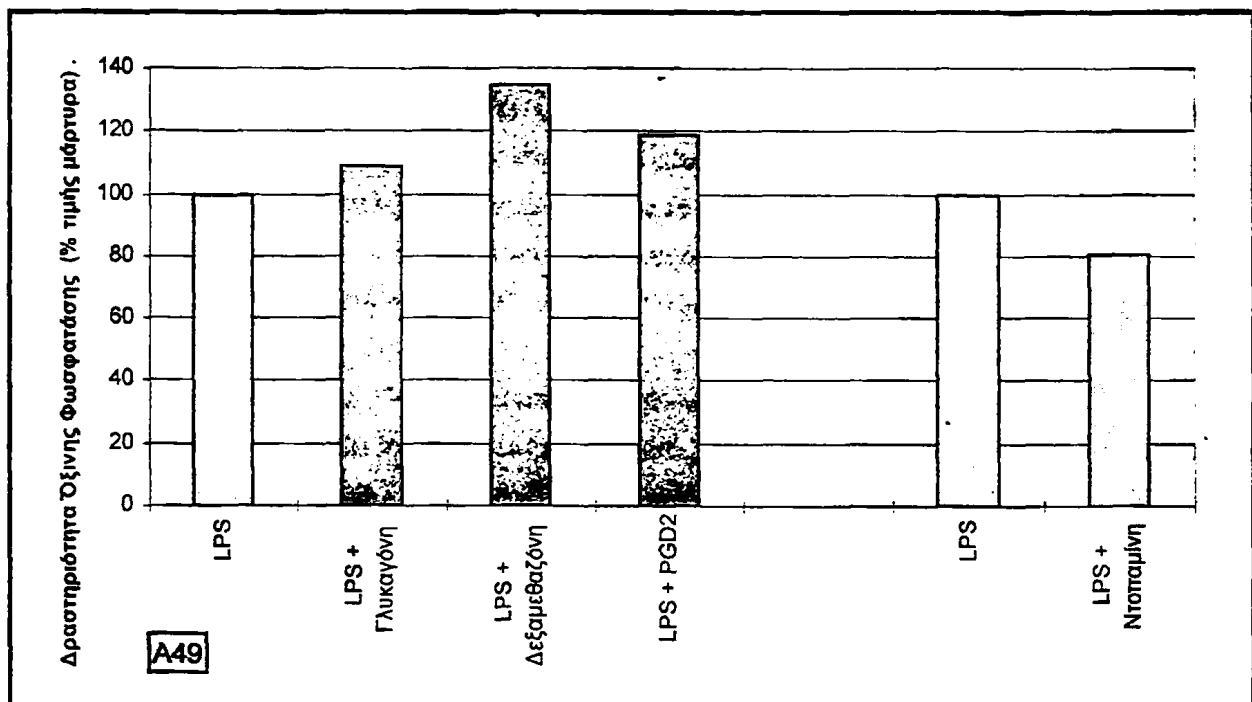


Τα περιτοναϊκά μακροφάγα παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης υπό την επίδραση της PGE₂ (που δρα μέσω αύξησης του cAMP), ενώ παρουσιάζουν αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας υπό την επίδραση τεσσάρων διαφορετικών ουσιών. Από αυτές η Vit.D3 και η Δεξαμεθαζόνη δρουν μέσω κυτταροπλασματικών υποδοχέων στην γονιδιακή έκφραση, ενώ οι άλλες δύο ουσίες έχουν πολλές οδούς δράσης. Η Σεροτονίνη συνήθως σχετίζεται με την μείωση του cAMP ή με την διέγερση της PLC και την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, ενώ η Ντοπαμίνη συνήθως σχετίζεται με την αύξηση του cAMP, την διέγερση της PLC και την αύξηση του Ca²⁺, αλλά οι D2-υποδοχείς της Ντοπαμίνης προκαλούν μείωση του cAMP. Έτσι είναι εξίσου πιθανό αυτές οι δύο Αμίνες να δρουν μέσω της μείωσης του cAMP ή μέσω της διέγερσης της PLC και της αύξησης του Ca²⁺. Αν η επίδρασή τους οφειλόταν στην μείωση του cAMP, θα εξηγούσε και την αντίθεση με την επίδραση της PGE₂, που μειώνει την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης.

Στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με LPS, την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης προκάλεσαν η Ινσουλίνη, το Νευροπεπτίδιο Υ και η Ισταμίνη, ενώ μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου προκάλεσαν η Γλυκαγόνη, η Δεξαμεθαζόνη (μόνο σε χαμηλές δόσεις) και η Vit.D3. Υπάρχει σημαντική διαφορά από τα αποτελέσματα που έδωσαν τα περιτοναϊκά κύτταρα που επωάστηκαν με LPS, αφού σε εκείνη την περίπτωση την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας προκάλεσαν η Ντοπαμίνη, η Δεξαμεθαζόνη, η Σεροτονίνη και η Vit.D3. Δεν γνωρίζουμε ακριβώς για ποιόν λόγο τα δύο είδη μακροφάγων να επηρεάζονται από διαφορετικές ουσίες, αλλά υποθέτουμε ότι το μικροπεριβάλλον των κυττάρων αυτών καθορίζει το είδος των υποδοχέων που εκφράζουν επάνω στην κυτταρική τους μεμβράνη ή την ευαισθησία των υποδοχέων αυτών. Παρατηρούμε όμως ότι υπάρχει μια αντιστοιχία στους μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων που χρησιμοποιούν οι ουσίες που επηρεάζουν τα δύο είδη μακροφάγων: οι D1-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς δρουν είτε μέσω διέγερσης της Αδενυλικής Κυκλάσης και αύξησης του cAMP ή μέσω διέγερσης της PLC και αύξησης του Ca²⁺. Οι D2-

ντοπαμινεργικοί υποδοχείς δρουν καταστέλλοντας την Αδενυλική Κυκλάση και μειώνοντας το cAMP ή επηρεάζουν με άλλον τρόπο τα κυτταρικά επίπεδα Ca^{+2} και K^{+1} . Για το Νευροπεπτιδίο Υ υπάρχουν υποδοχείς $Y_1 - Y_6$ που είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες και συνήθως καταστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση και μειώνουν το cAMP ή επηρεάζουν αλλιώς την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{+2} και K^{+1} . Άρα οι D2-υποδοχείς μπορούν να ασκήσουν τις ίδιες επιδράσεις με τους Υ-υποδοχείς του Νευροπεπτιδίου. Η σύνδεση της Σεροτονίνης με 5HT1A-υποδοχείς μπορεί να προκαλέσει τις ίδιες επιδράσεις με την Ντοπαμίνη και το Νευροπεπτιδίο Υ, αφού οι 5HT1A-υποδοχείς καταστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση μειώνοντας το cAMP και επηρεάζουν τους διαύλους Ca^{+2} και K^{+1} , όπως οι D2-υποδοχείς και οι Υ-υποδοχείς. Όμως η σύνδεση της Σεροτονίνης με 5HT2-υποδοχείς θα προκαλέσει την ίδια επίδραση με την σύνδεση της Ντοπαμίνης σε D1-υποδοχείς, μέσω της διέγερσης της PLC και της PKC και της αύξησης του κυτταροπλασματικού ιονισμένου Ca^{+2} . Η σύνδεση της Ισταμίνης στους H1-Ισταμινεργικούς υποδοχείς προκαλεί την διέγερση της PLC και την αύξηση του κυτταρικού Ca^{+2} . Η σύνδεση της Ισταμίνης στους H2-Ισταμινεργικούς υποδοχείς προκαλεί την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του cAMP. Τέλος, είναι γνωστό ότι τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν άμεσα την μεταβολή στο ρυθμό έκφρασης ορισμένων γονιδίων, αλλά στα ίδια αποτελέσματα οδηγεί και η χορήγηση Ινσουλίνης μέσω των Κινασών της Τυροσίνης και των MAP-Κινασών. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί σε δύο είδη μακροφάγων με την χορήγηση διαφορετικών ουσιών.

Στον πίνακα A49 που ακολουθεί απεικονίζονται οι επιδράσεις διαφόρων ουσιών στην Ώξινη Φωσφατάση των κυττάρων Kirpffer που επωάζονται με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες.



Παρατηρούμε ότι στα κύτταρα Kirpffer η αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης οφείλεται στην επίδραση της Γλυκαγόνης και της Δεξαμεθαζόνης, δηλαδή ουσιών που μείωσαν την ενζυματική δραστηριότητα στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα. Η Δεξαμεθαζόνη αύξησε την δραστηριότητα της Φωσφατάσης και στα περιτοναϊκά μακροφάγα, αλλά οι υπόλοιπες ουσίες που επέδρασαν στους δύο τύπους μακροφάγων ήταν διαφορετικές. Όμως και πάλι υπάρχουν ορισμένες αντιστοιχίες ανάμεσα στις ουσίες που επηρεάζουν τα δύο είδη κυττάρων και τους Δεύτερους Μηνύτορες που συμμετέχουν στην

διαμεσολάβηση των επιδράσεών τους . Συγκεκριμένα η Γλυκαγόνη δρα μέσω της αύξησης του cAMP (όπως δρα η Ντοπαμίνη μέσω D1-υποδοχέων) ή μέσω της διέγερσης της PLC και της αύξησης του Ca^{+2} (όπως δρα η Σεροτονίνη μέσω των 5HT2-υποδοχέων) . Έτσι στα δύο είδη μακροφάγων θα επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα στην ίδια παράμετρο αλλά ως επίδραση διαφορετικών ουσιών .

Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα τρία είδη μακροφάγων που μελετήθηκαν , ανάλογα με την ανατομική προέλευση ή την λειτουργική κατάστασή τους , ανταποκρίνονται σε επιδράσεις διαφορετικών ουσιών . Αυτές οι ουσίες μπορεί τελικά να προκαλούν την ίδια επίδραση εάν χρησιμοποιούν κοινές οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων . Επίσης φαίνεται ότι ανάλογα με την ανατομική προέλευση του μακροφάγου και την λειτουργική του κατάσταση η ανταπόκριση στην Ορμόνη ή το Αυτακοειδές γίνεται μέσω διαφορετικού τύπου του ίδιου υποδοχέα (receptor subclass) , ο οποίος είναι συνδεδεμένος με συγκεκριμένη οδό Δεύτερου Μηνύτορα . Για παράδειγμα στα τρία είδη μακροφάγων άλλοτε παρατηρούνται επιδράσεις της Ισταμίνης μέσω H1-Ισταμινεργικών υποδοχέων και άλλοτε μέσω H2-υποδοχέων , άλλοτε παρατηρούνται επιδράσεις της Ντοπαμίνης μέσω D1-υποδοχέων και άλλοτε μέσω D2-υποδοχέων . Επίσης πρέπει να υποθέσουμε τα εξής : 1. Ότι κάθε ένας από τους υποδοχείς των μακροφάγων μπορεί να δουλεύει με περισσότερους από έναν μηχανισμούς ταυτόχρονα . Έτσι είναι δυνατό οι $\beta 2$ -αδρενεργικοί υποδοχείς να προκαλούν συγχρόνως την διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης με αύξηση του cAMP και την διέγερση της Φωσφολιπάσης C με αύξηση του Ca^{+2} . Όμως ακόμα δεν γνωρίζουμε στα μακροφάγα ούτε ποιος μηχανισμός είναι ποσοπικά ο πιο ισχυρός , ούτε ποιος μηχανισμός ενεργοποιείται πρώτος . Επίσης δεν γνωρίζουμε τις ποσότητες του δεύτερου αγγελιαφόρου που παράγονται με την δοσολογία των πειραματικών ουσιών την οποία χορηγήσαμε . Έτσι μια δόση 10^{-6} M Αδρεναλίνης μπορεί να προκαλεί μέτρια αύξηση του cAMP και μικρή αύξηση του Ca^{+2} , οδηγώντας σε ένα αποτέλεσμα λόγω επίδρασης μόνο του cAMP, ενώ μια δόση 10^{-4} M Αδρεναλίνης να προκαλεί μεγάλη αύξηση τόσο του cAMP όσο και του Ca^{+2} , οδηγώντας σε διαφορετικό αποτέλεσμα λόγω της επίδρασης του Ca^{+2} . 2. Ότι από ορισμένες δόσεις και πάνω η ίδια πειραματική ουσία μπορεί να πληρώνει τους υποδοχείς ενός τύπου και η περίσσεια να συνδέεται είτε με διαφορετικούς τύπους του ίδιου υποδοχέα (receptor subtypes) ή με διαφορετικούς υποδοχείς για τους οποίους έχει μικρή συγγένεια , με αποτέλεσμα την πρόκληση βιολογικών επιδράσεων και μέσα από αυτούς με διαφορετική οδό Δεύτερων Αγγελιαφόρων .

Στην συνέχεια θα αναφερθούν ορισμένες λεπτομέρειες από πειράματα που έχουν σημασία για την κατανόηση των Μηχανισμών Μεταγωγής Μηνύματος οι οποίοι ελέγχουν την παραγωγή και έκκριση H_2O_2 , NO και Ώξινης Φωσφατάσης .

Οι πειραματικές ομάδες # 2 και # 3 αφορούν μετρήσεις της παραγωγής H_2O_2 μετά από την διέγερση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 250 μ g/ml INF γ επί 5 και 14 ώρες αντίστοιχα . Φαίνεται ότι η INF γ προκαλεί αρχικά σημαντική αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , αλλά στην συνέχεια ακολουθεί η μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 . Η δράση της INF γ στα μακροφάγα ασκείται αρχικά μέσω της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων μέσα σε 5 - 10' λεπτά (Primary Genes ή Immediate Early Genes - IEG) τα οποία κωδικοποιούν το mRNA των πρωτεϊνών της πρωτογενούς μακρομοριακής απάντησης (primary macromolecular response) , ενώ στην συνέχεια μέσα σε 6 - 12 ώρες θα εκφραστούν και άλλα γονίδια (Secondary Genes) , τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες της δευτερογενούς μακρομοριακής απάντησης (secondary macromolecular response) που είναι άμεσα υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του μακροφάγου (Langer και Pestka, 1988) . Αυτή η αλληλουχία γεγονότων επιτυγχάνεται μέσα από δύο

οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων : 1. Ο $\text{INF}\gamma\text{R}$ υποδοχέας της $\text{INF}\gamma$ έχει δραστηριότητα Κινάσης της Τυροσίνης και φωσφορυλιώνει τον Παράγοντα Μεταγραφής p91 , που συμμετέχει στην δημιουργία του Παράγοντα GAF , ο οποίος προκαλεί την μεταγραφή του mRNA πολλών γονιδίων , 2. Με κάποιο άγνωστο ακόμα μηχανισμό η $\text{INF}\gamma$ προκαλεί την αύξηση του κυτταρικού Ca^{+2} και την διέγερση της PKC , οδηγώντας επίσης στην έκφραση ορισμένων γονιδίων . Η αύξηση του cAMP καταστέλλει αυτές τις επιδράσεις της PKC και του Ca^{+2} (Fan και συν., 1985 , Pellegrini και Schindler , 1993 , Sadowski και συν., 1993 , Shuai και συν., 1993) . Είναι πιθανό ότι η μείωση της ικανότητας παραγωγής H_2O_2 που παρατηρείται στις 14 ώρες επώασης οφείλεται στην καταστολή της δράσης της PKC από την αύξηση του cAMP . Η αύξηση του cAMP στα ενεργοποιημένα με $\text{INF}\gamma$ μακροφάγα οφείλεται στην παραγωγή PGE_2 και Νοραδρεναλίνης , ουσίες δηλαδή που επιδρούν αυτοκρινικά στα μακροφάγα .

Οι πειραματικές ομάδες # 30 και # 31 αφορούν τα πειράματα μέτρησης της παραγωγής NO σε περιτοναϊκά μακροφάγα μετά από επώαση 5 και 14 ωρών αντίστοιχα με 250 $\mu\text{g/ml}$ $\text{INF}\gamma$. Σε αντίθεση με την παραγωγή H_2O_2 , η παραγωγή NO δεν μειώνεται στις 14 ώρες αλλά συνεχίζεται με ρυθμό αυξανόμενο . Αυτό σημαίνει ότι η αύξηση του cAMP που δημιουργείται από την αυτοκρινική επίδραση της PGE_2 και της Νοραδρεναλίνης , δεν επηρεάζει την έκφραση και την λειτουργία της iNOS .

Ενώ στα ευρήματα των πειραματικών ομάδων # 2 και # 3 η διαφορά της επίδρασης της $\text{INF}\gamma$ στις 5 και στις 14 ώρες μάλλον οφείλεται στην ύπαρξη ενός αυτοπεριοριστικού μηχανισμού ο οποίος διαμεσολαβείται από το cAMP , στις πειραματικές ομάδες # 21 και # 22 παρουσιάζονται τα ευρήματα από την επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με Vit.D3 για 6 και 14 ώρες , που εξηγούνται μέσα από διαφορετικό μηχανισμό . Η Vit.D3 συνδέεται με κυτταροπλασματικό υποδοχέα και το σύμπλεγμα αυτό μεταναστεύει στον πυρήνα και προκαλεί την μεταγραφή του mRNA πολλών γονιδίων . Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθούν αυτές οι διεργασίες είναι μεγάλος και για αυτό η έλλειψη κάποιας επίδρασης στις 6 ώρες πρέπει να οφείλεται στην μη-ολοκλήρωση της έκφρασης των γονιδίων , ενώ η μείωση της παραγωγής H_2O_2 στις 14 ώρες ίσως οφείλεται στο είδος των γονιδίων που εκφράζονται : η Vit.D3 έχει συσχετιστεί με την ωρίμαση και διαφοροποίηση των άωρων ή αρχέγονων μορφών των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και όχι με την ενεργοποίηση των ώριμων μορφών τους .

Η διάρκεια της επώασης και η δοσολογία των ορμονών πρέπει να λαμβάνονται πάντα υπόψη στην μελέτη των ενδοκρινικών επιδράσεων στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα , αφού έχει διαπιστωθεί για τα γλυκοκορτικοειδή ότι προκαλούν διαφορετικά αποτελέσματα όταν χορηγηθούν σε μικρές δόσεις και για σύντομο χρονικό διάστημα παρά όταν χορηγηθούν σε μεγάλες δόσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα (Broug-Holub και Kraal, 1996) . Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στον μηχανισμό δράσης αυτών των ορμονών . Τα γλυκοκορτικοειδή συνδέονται με ειδικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και έτσι δημιουργείται ένα σύμπλεγμα που μεταναστεύει στον πυρήνα και συνδέεται απευθείας με το DNA των γονιδίων που επηρεάζονται . Η θέση σύνδεσης αυτού του συμπλέγματος είναι η ρυθμιστική περιοχή πριν από το καθεαυτό γονίδιο και ονομάζεται GRE (Glucocorticoid Responsive Elements) . Υπάρχουν Θετικά GRE που προάγουν την έκφραση των γονιδίων καθώς και Αρνητικά GRE που καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων . Το σύμπλεγμα Γλυκοκορτικοειδούς-Υποδοχέα πιθανώς έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα Θετικά GRE , με τα οποία συνδέεται αμέσως . Αλλά με την πάροδο του χρόνου ή όταν κορεστούν τα Θετικά GRE θα συνδεθούν συμπλέγματα Ορμόνης-Υποδοχέα στα Αρνητικά GRE , που έχουν πολύ ισχυρότερη επίδραση στην γονιδιακή έκφραση . Στις πειραματικές ομάδες # 12 και # 13 φαίνεται ακριβώς αυτό το φαινόμενο : η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 12 ώρες με LPS

και χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης προκαλεί αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , ενώ η επώαση με LPS και υψηλή δόση Δεξαμεθαζόνης προκαλεί την καταστολή της παραγωγής H_2O_2 . Όμως στις ομάδες # 54 και # 55 δεν παρατηρήθηκε το αντίστοιχο φαινόμενο με την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα, το οποίο σημαίνει ότι ο μηχανισμός αυτός δεν έχει εφαρμογή σε όλες τις βιοχημικές διεργασίες ή σε όλα τα είδη μακροφάγων. Στις πειραματικές ομάδες # 105 και # 106 παρατηρήθηκε ένα παρόμοιο φαινόμενο, δηλαδή η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και υψηλή δόση Δεξαμεθαζόνης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης, ενώ η επώασή τους με LPS και χαμηλή δόση Δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι η χρονική διάρκεια της επώασης με τα Γλυκοκορτικοειδή και η συγκέντρωση των Γλυκοκορτικοειδών στο καλλιεργητικό υλικό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην προσπάθεια εξήγησης των επιδράσεων στις Οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων.

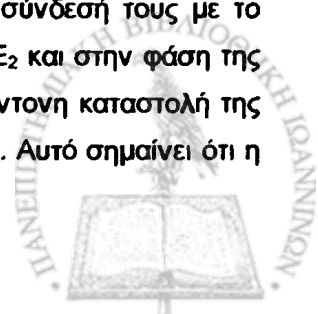
Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για την σημασία του χρόνου επώασης και της συγκέντρωσης των διεγερτών και των πειραματικών ουσιών που χορηγούνται στα μακροφάγα, γίνονται ακόμα πιο σπουδαία στην περίπτωση της μελέτης της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης. Αυτό οφείλεται στο ότι η δραστηριότητα που μετράται στο ομογενοποίημα των κυττάρων επηρεάζεται και από τον ρυθμό παραγωγής της Οξίνης Φωσφατάσης με πρωτεϊνσύνθεση, αλλά και από τον ρυθμό έκκρισης του ενζύμου στο μεσοκυττάριο χώρο με εξωκύτωση. Ένα παράδειγμα αυτής της ρύθμισης σε δύο σημεία δίνεται με τα αποτελέσματα των πειραματικών ομάδων # 79, # 80 και # 81, τα οποία αφορούν την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων. Η επώαση των κυττάρων με 0.2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκαλεί την αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας, η επώασή τους με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκαλεί μικρή μείωση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης, ενώ τέλος η επώαση των μακροφάγων με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες προκαλεί μεγάλη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Μια πιθανή εξήγηση αυτών των τριών αποτελεσμάτων είναι ότι η επώαση με την μικρή δόση LPS προκαλεί αυξημένη σύνθεση του ενζύμου, ενώ η επώαση με μεγάλη δόση LPS προκαλεί αύξηση τόσο του ρυθμού παραγωγής όσο και του ρυθμού έκκρισης της Φωσφατάσης και οδηγεί στην μείωση της ποσότητας του ενζύμου μέσα στα λυσοσώματα. Τέλος, η αύξηση του χρόνου επώασης με την ενδοτοξίνη κατά 2 ώρες μειώνει ακόμα περισσότερο την ποσότητα της Φωσφατάσης μέσα στα μακροφάγα, αφού το ένζυμο εκκρίνεται με πολύ ταχύτερο ρυθμό από ότι παράγεται. Τα αποτελέσματα από τα κύτταρα Kupffer καταγράφονται στις πειραματικές ομάδες # 115, # 116 και # 117, που αφορούν την μέτρηση δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης μετά από επώαση με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες, 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες και 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες. Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των κυττάρων Kupffer με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 14 ώρες προκαλούσε μικρή αύξηση της δραστηριότητας της Οξίνης Φωσφατάσης, η επώαση των ίδιων κυττάρων με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS για 12 ώρες προκαλούσε λίγο μεγαλύτερη αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ η επώαση των κυττάρων Kupffer για 14 ώρες με 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκαλούσε την μεγαλύτερη αύξηση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να ερμηνευτούν ως εξής: όταν τα ηπατικά μακροφάγα επωάζονται με μεγάλη δόση LPS για 14 ώρες, έχουν αυξημένη παραγωγή του ενζύμου αλλά και ταχεία έκκρισή του, που οδηγεί σε χαμηλή ποσότητα Φωσφατάσης μέσα στα λυσοσώματα. Η επώαση των κυττάρων αυτών με μικρή δόση ενδοτοξίνης οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του ενζύμου αλλά μικρότερη έκκριση, που σημαίνει ότι περισσότερο ένζυμο παραμένει στα λυσοσώματα. Η παράταση της καλλιέργειας των κυττάρων Kupffer



με Kurpffer με 1 μg/ml LPS κατά 2 ώρες αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητα ακόμα περισσότερο, αφού η παραγωγή του ενζύμου συνεχίζεται αλλά δεν υπάρχει σημαντική έκκρισή του.

Στην πειραματική ομάδα # 4 διαπιστώνεται ότι η επίδραση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS και Αδρεναλίνη για 4 ώρες καταστέλλει την ικανότητα παραγωγής H_2O_2 . Η επίδραση αυτή της Αδρεναλίνης είναι πιθανό να διαμεσολαβείται από β2-αδρενεργικούς υποδοχείς και να οφείλεται στην διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης και την αύξηση του cAMP (Hunt και συν., 1984, Kammer, 1988). Όμως δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η επίδραση αυτή να διαμεσολαβείται από άλλους αδρενεργικούς υποδοχείς του μακροφάγου και να οφείλεται σε ενεργοποίηση άλλου μηχανισμού. Για να διαλευκανθεί το σημείο αυτό εκτελέστηκαν τα πειράματα των ομάδων # 5 και # 6. Επειδή για τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα έχει αποδειχθεί ότι η Θεοφυλλίνη αναστέλλει τις Φωσφοδιεστεράσες που διασπούν το cAMP (Lim και συν., 1981, Okonogi και συν., 1991, Dent και συν., 1994) θεωρήθηκε ότι η προσθήκη της Θεοφυλλίνης στα μακροφάγα θα έπρεπε να επιτείνει τα αποτελέσματα της Αδρεναλίνης και να μειώνει περαιτέρω την παραγωγή H_2O_2 . Δεν επιβεβαιώθηκε κάτι τέτοιο. Δεν είναι γνωστή η εξήγηση της επίδρασης της Θεοφυλλίνης. Ενδεχομένως οφείλεται είτε στην ταυτόχρονη δράση της Αδρεναλίνης και με άλλο Δεύτερο Μηνύτορα εκτός από το cAMP ή στην παράλληλη επίδραση της Θεοφυλλίνης στο cAMP και στο κυτταροπλασματικό Ca^{+2} . Η Θεοφυλλίνη θα μπορούσε να δράσει και στους υποδοχείς της Αδενοσίνης ή να επηρεάζει έμμεσα και άλλες οδούς (Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1996). Ωστόσο, για τα ανθρώπινα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα αποδείχτηκε ότι η Θεοφυλλίνη καταστέλλει την παραγωγή H_2O_2 μέσω αναστολής των Φωσφοδιεστερασών, αύξησης του cAMP και διέγερσης της PKA (Dent και συν., 1994). Όμως τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη εκείνη προέρχονταν από υγιείς εθελοντές και δεν έλαβαν κανένα διεγέρτη in vitro, που σημαίνει ότι μπορεί να συμπεριφέρονται διαφορετικά από τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα δικά μας πειράματα.

Στις πειραματικές ομάδες # 15, # 16 και # 17 απεικονίζονται οι επιδράσεις της PGE_2 στην ικανότητα παραγωγής H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα. Η PGE_2 δρα στα περιτοναϊκά κύτταρα προκαλώντας αύξηση του cAMP (Remold O'Donnell, 1974, Remold O'Donnell και Alpert, 1979). Δεν είναι γνωστό όμως το cAMP σε ποια ακριβώς βιοχημική διεργασία επιδρά, δηλαδή αν καταστέλλει την σύνθεση της NADPH-Οξειδάσης, την διέγερση της PKC ή εμποδίζει την PKC να φωσφορυλιώσει το Κυτόχρωμα b-245 της NADPH-Οξειδάσης. Για να προσδιορίσουμε κάπως καλύτερα σε ποιο στάδιο της πολύπλοκης αλληλουχίας των αντιδράσεων επιδρά το cAMP, στην ομάδα # 15 χορηγήθηκε η PGE_2 πριν την προσθήκη του PMA (που διεγείρει την PKC), στην ομάδα # 16 χορηγήθηκε η PGE_2 μαζί με το PMA, ενώ στην ομάδα # 17 χορηγήθηκε και στις δύο αυτές φάσεις. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαφαίνεται ότι το cAMP δεν εμποδίζει την λειτουργία της NADPH-Οξειδάσης, ούτε φαίνεται να καταστέλλει την φωσφορυλίωση της NADPH-Οξειδάσης από την PKC. Φαίνεται λοιπόν ότι το cAMP είτε εμποδίζει την μετατόπιση (translocation) της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στην κυτταρική μεμβράνη ή εμποδίζει την σύνθεση της NADPH-Οξειδάσης (π.χ. μπορεί να εμποδίζει την μετατόπιση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών p47 και p67 στην κυτταρική μεμβράνη και την σύνδεσή τους με το Κυτόχρωμα b558 ή άλλα επιμέρους στοιχεία της Οξειδάσης). Η χορήγηση της PGE_2 και στην φάση της επίδρασης με LPS και στην φάση της διέγερσης της PKC με PMA προκάλεσε πιο έντονη καταστολή της παραγωγής H_2O_2 σε σύγκριση με την χορήγηση της PGE_2 μόνο στην πρώτη φάση. Αυτό σημαίνει ότι η



παράταση της αύξησης του cAMP και στην φάση της διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C θα παρατείνει την καταστολή της NADPH-Οξειδάσης .

Στις ομάδες # 91 , # 92 και # 93 μελετήθηκε στα περιτοναϊκά μακροφάγα η επίδραση της PGE₂ στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης μετά από επώαση 14 ωρών με 2 μg/ml LPS ή 14 ωρών με 1 μg/ml LPS , καθώς και μετά από επώαση 12 ωρών με 2 μg/ml LPS . Η συγκέντρωση της PGE₂ ήταν σταθερή στα 10⁻⁵ M . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 2 μg/ml LPS + PGE₂ για 14 ώρες προκάλεσε μεγάλη μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας , ενώ η επώαση με 1 μg/ml LPS + PGE₂ για 14 ώρες προκάλεσε μικρότερη μείωση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης . Η επώαση αυτών των μακροφάγων με 2 μg/ml LPS + PGE₂ για 12 ώρες δεν προκάλεσε καμία μεταβολή , που σημαίνει ότι η μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε στις άλλες δύο ομάδες συμβαίνει σχετικά απότομα κατά την διάρκεια των επόμενων δύο ωρών . Φαίνεται ότι η προκαλούμενη αύξηση του cAMP οδηγεί σε κάποια στιγμή στην εξωκύτωση του ενζύμου . Η μεγαλύτερη δόση LPS οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου , που σημαίνει ότι η επίδραση της PGE₂ είναι επίσης μεγαλύτερη . Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις για την παρατήρηση αυτή : είτε στα κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με LPS η PGE₂ προκαλεί μεγαλύτερη παραγωγή cAMP ή εναλλακτικά το cAMP που δημιουργείται υπό την επίδραση της PGE₂ είναι σταθερό , αλλά επιδρά σε κάποιο στοιχείο που αυξάνει κατά την ενεργοποίηση των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Στις πειραματικές ομάδες # 125 και # 126 μελετήθηκε η επίδραση της επώασης των κυττάρων Kupffer με 5 × 10⁻⁵ M Σεροτονίνης και LPS στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Όταν τα μακροφάγα επώαστηκαν με 2 μg/ml LPS δεν παρατηρήθηκε Στατιστικώς Σημαντική μεταβολή στην ενζυματική δραστηριότητα , ενώ η επώαση των κυττάρων Kupffer με 1 μg/ml LPS προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου . Μια πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου είναι ότι η χαμηλή δόση LPS προκαλεί μικρές μεταβολές στους Δεύτερους Μηνύτορες , συγκριτικά με τις οποίες οι επιδράσεις της Σεροτονίνης είναι σημαντικές . Η μεγάλη δόση LPS προκαλεί έντονες μεταβολές στους Δεύτερους Μηνύτορες , τις οποίες δεν επαυξάνουν οι επιδράσεις της Σεροτονίνης . Ένα παράδειγμα θα ήταν η επίδραση των ουσιών αυτών στο κυτταροπλασματικό Ca⁺² των κυττάρων Kupffer . Μια χαμηλή δόση LPS θα οδηγούσε σε μικρή αύξηση του Ca⁺² , ενώ η Σεροτονίνη θα προκαλούσε επιπλέον αύξηση του Ca⁺² μέσω 5-HT₂ υποδοχέων . Μια υψηλή δόση LPS θα οδηγούσε σε μεγάλη αύξηση του Ca⁺² , ενώ η περαιτέρω αύξηση του Ca⁺² από την Σεροτονίνη θα ήταν αμελητέα . Όμως στις πειραματικές ομάδες # 116 και # 117 διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερη δραστηριότητα Φωσφατάσης επιτυγχάνεται με την μικρή συγκέντρωση LPS παρά με την μεγάλη συγκέντρωση και έτσι θα αναμενόταν η Σεροτονίνη να οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας όταν χορηγείται μαζί με 2 μg/ml LPS . Είναι λοιπόν πιθανό η Σεροτονίνη να επιδρά στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των μακροφάγων και μέσω των 5-HT_{1A} υποδοχέων . Η σύνδεση της Σεροτονίνης με τους υποδοχείς αυτούς δρα μέσω άλλης οδού Μεταγωγής Μηνύματος και συγκεκριμένα προκαλεί μείωση του cAMP . Ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί αν η μείωση του cAMP επηρεάζει με κάποιον τρόπο την δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης στα κύτταρα Kupffer .

Στις πειραματικές ομάδες # 20 , # 27 , # 44 και # 65 μελετήθηκε η επίδραση της Αδρεναλίνης στην διέγερση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων με Ιντερφερόνη-γ και Δεξαμεθαζόνη . Αυτή η σειρά των πειραμάτων έγινε για δύο σκοπούς : α) Επειδή σε μια έντονη λοίμωξη , έγκαιρα ή τραυματισμό , όπου τα μονοπύρηνια φαγοκύτταρα θα συμμετάσχουν στους μηχανισμούς άμυνας και επούλωσης της ιστικής βλάβης , οι κατεχολαμίνες εκκρίνονται στην κυκλοφορία αμέσως ενώ τα γλυκοκορτικοειδή

αργούν . Έτσι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα έχουν εκτεθεί στις κατεχολαμίνες για αρκετό διάστημα πριν αρχίσει η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών επάνω τους , το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την αντίδραση των κυττάρων αυτών στα γλυκοκορτικοειδή . β) Επειδή υπάρχει μια δημοσίευση στην διεθνή βιβλιογραφία που δείχνει ότι η Αδρεναλίνη είναι ικανή να προκαλέσει την έκφραση ορισμένων γονιδίων μέσω του Παράγοντα Μεταγραφής NFκΒ , δηλαδή δρα περίπου όπως τα γλυκοκορτικοειδή που επηρεάζουν απευθείας την έκφραση των γονιδίων (Mugoi και Suzuki, 1993) . Έτσι εκτελέστηκαν μια σειρά πειραμάτων όπου οι μάρτυρες επωάστηκαν αρχικά με INFγ επί 6 ώρες και στην συνέχεια με INFγ και Δεξαμεθαζόνη επί άλλες 8 ώρες , ενώ τα πειραματικά επωάστηκαν αρχικά επί 6 ώρες με INFγ και Αδρεναλίνη και στην συνέχεια με INFγ και Δεξαμεθαζόνη . Διαπιστώθηκε ότι αυτή η αρχική προσθήκη Αδρεναλίνης μαζί την INFγ δεν επηρέασε τα αποτελέσματα καμίας από τις πειραματικές ομάδες : ούτε την παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά ή τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , ούτε την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα περιτοναϊκά ή τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Η έλλειψη μιας επίδρασης από την αδρεναλίνη μπορεί να ερμηνευτεί με δύο τρόπους : 1. Η δράση της Αδρεναλίνης είναι σχετικά σύντομη . Μόλις αντικατασταθεί το καλλιεργητικό υλικό που περιέχει την Αδρεναλίνη με εκείνο που περιέχει INFγ και Δεξαμεθαζόνη , αρχίζει να φθίνει η επίδραση της Αδρεναλίνης . 2. Η όποια επίδραση έχει η Αδρεναλίνη στην γονιδιακή έκφραση είναι πολύ ασθενής σε σύγκριση με τις ισχυρές επιδράσεις που ασκεί η Δεξαμεθαζόνη . Έτσι , παρά την ύπαρξη κάποιας επίδρασης από την Αδρεναλίνη , η Δεξαμεθαζόνη είναι που καθορίζει τον ρυθμό παραγωγής της H_2O_2 και του NO .

Στις πειραματικές ομάδες # 2 και # 3 διαπιστώθηκε ότι η επώαση των περιτοναϊκών κυττάρων με 250 μ l/ml INFγ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης για 5 ώρες προκαλούσε αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , ενώ στις 14 ώρες επώασης προκαλεί την μείωση της παραγωγής H_2O_2 . Στις πειραματικές ομάδες # 42 και # 43 παρατηρείται ένα παρόμοιο φαινόμενο με την παραγωγή του NO . Μετά από 6 ώρες επώασης με 250 μ l/ml INFγ + 10^{-4} M Αδρεναλίνης διαπιστώνεται μεγάλη αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου ενώ μετά από επώαση 14 ωρών η αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου είναι αρκετά μικρότερη , δηλαδή σχεδόν τα 2/3 της αύξησης που παρατηρείται στις 6 ώρες . Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν εν μέρει την υπόθεση ότι οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης είναι βραχύχρονες . Δεν έχει διευκρινιστεί αν υπάρχει συγκεκριμένη σκοπιμότητα για την οποίο οι επιδράσεις αυτές έχουν μικρή διάρκεια .

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν έντονη αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση . Ειδικά η επίδραση της Δεξαμεθαζόνης είναι πολύ ισχυρή . Οι πειραματικές ομάδες # 62 και # 63 απεικονίζουν την ισχύ της δράσης της Δεξαμεθαζόνης : όταν τα περιτοναϊκά μακροφάγα επωαστούν επί 14 ώρες με LPS και χαμηλή δόση του γλυκοκορτικοειδούς μειώνεται σε τέτοιο επίπεδο η παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου , που γίνεται μικρότερη από τα επίπεδα παραγωγής των μακροφάγων που δεν έχουν λάβει καμία ενεργοποίηση (μακροφάγα βασικής κατάστασης , basal state macrophages) .

Ένα ακόμα στοιχείο στο οποίο πρέπει να δοθεί έμφαση είναι η επίδραση της Δεξαμεθαζόνης στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων . Στις πειραματικές ομάδες # 105 και # 106 παρατηρούμε ότι μόνο οι χαμηλές δόσεις Δεξαμεθαζόνης (10^{-6} M) επηρεάζουν την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων που επωάζονται με LPS , προκαλώντας μικρού βαθμού μείωσή της . Όμως στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα τα οποία επωάζονται με INFγ και Δεξαμεθαζόνη , προκαλείται πολύ εντονότερη μείωση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης . Όπως και στην περίπτωση των πειραμάτων μέτρησης του Νιτρικού Οξειδίου , η χορήγηση της Δεξαμεθαζόνης μαζί με INFγ μειώνει την ενζυματική δραστηριότητα σε επίπεδα πιο

χαμηλά από εκείνα των μακροφάγων που δεν έχουν λάβει καμία διέγερση, δηλαδή των μακροφάγων μακροφάγα βασικής κατάστασης (basal state macrophages). Δεν είναι ακόμα γνωστός ο λόγος για τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ισχυρότερες επιδράσεις στα μακροφάγα που ενεργοποιούνται με Ιντερφερόνη- γ παρά σε εκείνα που ενεργοποιούνται με ενδοτοξίνη. Μια υπόθεση είναι ότι η INF γ προκαλεί την έκφραση ορισμένων διαφορετικών γονιδίων από εκείνα που προκαλεί ο LPS. Επίσης μπορεί να προκαλούν την έκφραση των ίδιων γονιδίων αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Φαίνεται ότι κάποια από αυτά τα γονίδια που εκφράζονται μόνο από την INF γ ή σε μεγαλύτερο βαθμό από την INF γ , καταστέλλονται με μεγάλη ευκολία από τα γλυκοκορτικοειδή.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΜΕΛΕΤΗΜΕΝΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΜΥΝΗΤΩΡΩΝ ΠΟΥ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΝ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ .

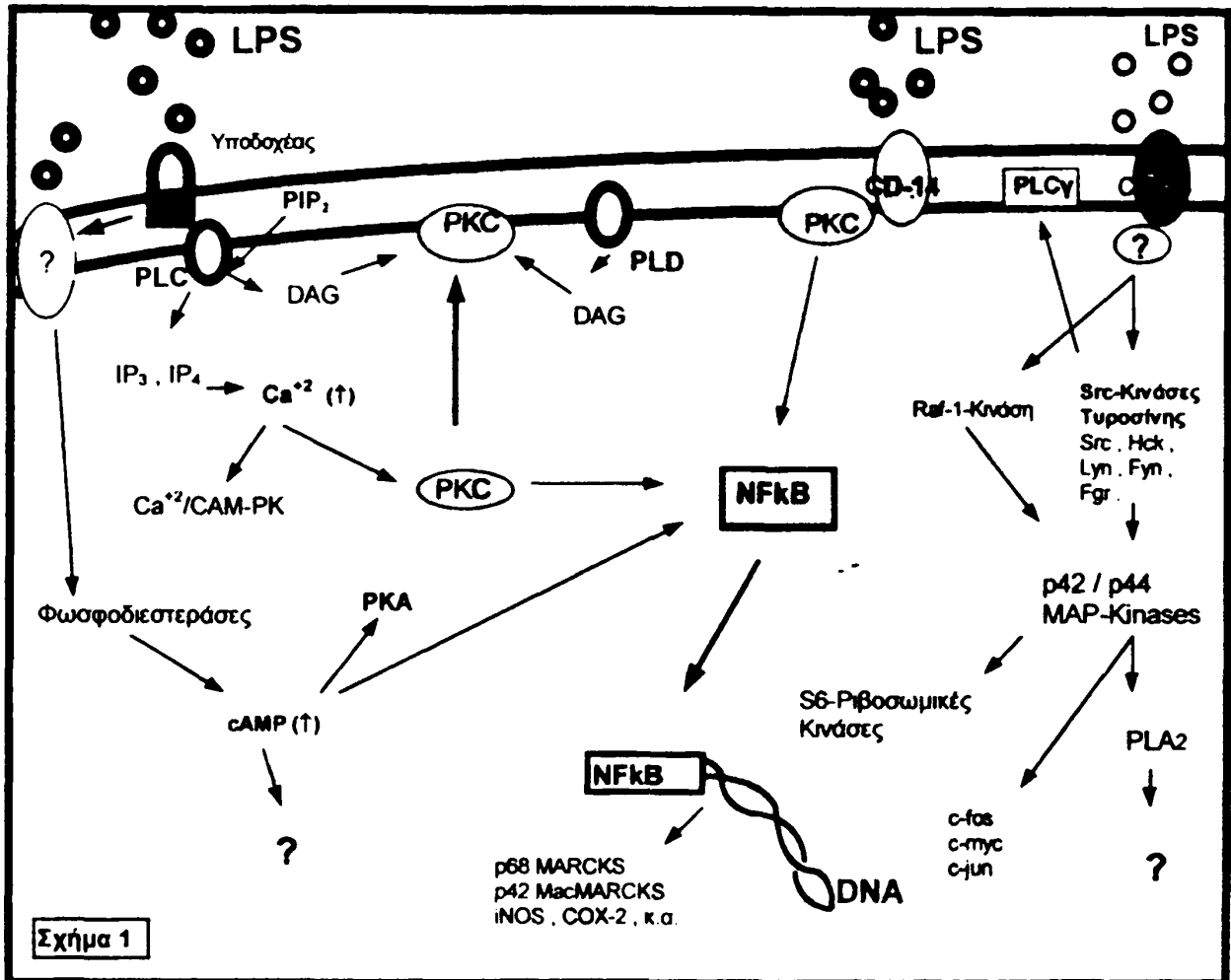
Από τα όσα έχουν ήδη αναφερθεί στην ανάλυση των αποτελεσμάτων , φαίνεται ότι δεν έχουν ευρεθεί εξηγήσεις που να έχουν εφαρμογή σε όλα τα ευρήματα . Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία όμως που υποδεικνύουν ότι εξηγήσεις των αποτελεσμάτων μπορούν να δοθούν μέσα από την συσχέτιση των ευρημάτων με τις οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων που επηρεάζουν οι πειραματικές ουσίες .

Στο Κεφάλαιο 7 φάνηκε ότι οι μηχανισμοί Δεύτερων Μηνυτόρων οι οποίοι διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου , Νιτρικού Οξειδίου και την δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης είναι πολλαπλοί και πολύπλοκοι . Υπάρχουν βέβαια ορισμένοι Κεντρικοί Μηχανισμοί Μεταγωγής Μηνύματος που αφορούν την ενεργοποίηση ολόκληρου του μονοκύτταρου φαγοκυττάρου και οι οποίοι μάλιστα είναι κοινός και για άλλα είδη λευκοκυττάρων . Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η οδός της Φωσφολιπάσης C (PLC) , που υπάρχει στα περισσότερα είδη λευκοκυττάρων . Η συγκεκριμένη οδός ελέγχει την απόκριση των ουδετερόφιλων φαγοκυττάρων στις χημειοτακτικές ουσίες , αλλά και πολλά άλλα φαινόμενα στα διάφορα είδη λευκοκυττάρων (Zembala και Asherson, 1989) . Έχει αποδειχθεί ότι οι ίδιοι μηχανισμοί ισχύουν και για τα μακροφάγα .

1. Η σύνδεση μιας χημειοτακτικής ουσίας σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί την διέγερση της PLC και την υδρόλυση της PIP_2 . Από την αντίδραση αυτή παράγονται κυρίως τρεις ουσίες , η IP_3 , η IP_4 και η DAG .
2. Οι ινοσιτόλες IP_3 και IP_4 προκαλούν την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} με εισροή από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες και από τον μεσοκυττάριο χώρο αντίστοιχα . Η αύξηση του Ca^{+2} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες είναι ταχεία και προσωρινή . Η είσοδος του ιόντος από τον μεσοκυττάριο χώρο γίνεται μέσα από έναν διάυλο Ca^{+2} και είναι βραδεία αλλά με παρατεταμένη διάρκεια .
3. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} έχει τρεις κύριες επιδράσεις :
 - α. Ενεργοποιεί την Εξαρτημένη από Ca^{+2} και Καλμοδουλίνη Πρωτεϊνική Κινάση τύπου II (δηλαδή την Ca/CAM-PK τύπου II ή CAM-PK τύπου II) που στην συνέχεια φωσφορυλιώνει Κινάσες ή άλλα ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες .
 - β. Ενεργοποιεί την Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση (PKA) . Η PKA αναστέλλει την δραστηριότητα της PLC και την λειτουργία του διαύλου Ca^{+2} .
 - γ. Ενεργοποιεί την PLD για παραγωγή DAG από την μεμβρανική Φωσφατιδυλ-Χολίνη .
 - δ. Η παρατεταμένη αύξηση του Ca^{+2} θα προκαλέσει την μετατόπιση (translocation) της PKC από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη . Εκεί η PKC μπορεί να διεγερθεί ευκολότερα .
4. Η DAG που παράγεται αρχικά από την δράση της PLC και στην συνέχεια από την δράση της PLD προκαλεί την διέγερση της PKC που βρίσκεται συνδεδεμένη με την κυτταρική μεμβράνη . Η PKC φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα και προκαλεί μεγάλη ποικιλία βιολογικών αντιδράσεων .

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχουν πολλαπλοί και διαπλεκόμενοι μηχανισμοί Δεύτερων Μηνυτόρων , που ενεργοποιούν και ρυθμίζουν την λειτουργία των λευκοκυττάρων . Ειδικά στα μακροφάγα παρατηρείται συμμετοχή πολλών Οδών Μεταγωγής Μηνύματος ταυτόχρονα αλλά και μεγάλου βαθμού αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων Οδών . Σε μια προσπάθεια χαρτογράφησης όλων των μηχανισμών Μεταγωγής Μηνύματος που ρυθμίζουν την έκφραση των Ια-αντιγόνων και την παραγωγή TNF α , διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν τουλάχιστον τέσσερις παράλληλοι Οδοί που οδηγούσαν

στην έκφραση των γονιδίων Ia και TNF α και που όλες ασκούν ρυθμιστικές επιδράσεις μεταξύ τους (Lewis και McGee, 1992). Στο σχήμα 1 που ακολουθεί απεικονίζονται οι κυριότερες οδοί Μεταγωγής Μηνύματος που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων από LPS. (Τροποποιημένο από τους Hauschildt και Kleine, 1995).



Στο σχήμα αυτό, πρέπει να δοθούν ορισμένες διευκρινήσεις. Η Ενδοτοξίνη (LPS) συνδέεται με τον ειδικό υποδοχέα CD-14 αλλά και με άλλους υποδοχείς (Wright και συν., 1990, Hampton και συν., 1991, Netea και συν., 1998). Επίσης ο υποδοχέας CD-14 δεν ενεργοποιεί πάντα τις ίδιες οδούς Δεύτερων Μηνυτόρων, όπως έχει παρατηρηθεί από τις διαφορετικές αντιδράσεις όταν συνδέει LPS ή τις γλυκοπρωτεΐνες αποπτωτικών κυττάρων (Devitt και συν., 1998). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ότι ενεργοποιούνται ταυτόχρονα πολλοί παράλληλοι Οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων, από τις οποίες η κυριότερη είναι η οδός της Φωσφολιπάσης C. Η δραστηριότητα της PLC οδηγεί στην δημιουργία των φωσφοϊνοσιτιδίων IP₃ και IP₄, τα οποία προκαλούν την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ που θα οδηγήσει στην μετατόπιση (translocation) της PKC από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη. Εκεί η Διακυλογλυκερόλη (DAG) θα ενεργοποιήσει την PKC, που στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η PKC φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MAP-Κινάσες p40 και p42, τις πρωτεΐνες MARCKS (p68) και MacMARCKS (p42) και ορισμένες Κινάσες της Τυροσίνης. Όμως η πιο σημαντική πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνεται είναι ο Αναστολέας IκB του Παράγοντα Μεταγραφής NFκB. Η φωσφορυλίωση του IκB προκαλεί την διάστασή του από

τον NFκB, ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα και προκαλεί την μεταγραφή του mRNA πολλών γονιδίων (μεταξύ των οποίων και της iNOS). Έχει προταθεί ότι και η PKA (Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση) φωσφορυλιώνει τους Αναστολείς IκB. Έτσι η PKA μπορεί να υποβοηθήσει την έκφραση των γονιδίων που μεταγράφονται από τον NFκB.

Δεν είναι γνωστή ποια Οδός Δεύτερου Μηνύτορα προκαλεί την μεταγραφή του mRNA των MAP-Κινασών. Γνωρίζουμε όμως ότι τόσο η PKC όσο και διάφορες Src-Κινάσες της Τυροσίνης ή και η Raf-1-Κινάση μπορούν να προκαλέσουν την φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή τους.

Η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου γίνεται από την iNOS. Όταν το σύμπλεγμα IκB-NFκB υποστεί φωσφορυλίωση και διάσπαση, ο παράγοντας NFκB μεταναστεύει στον πυρήνα και συνδέεται με το DNA, προκαλώντας την έκφραση του γονιδίου της iNOS. Αντιθέτως η παραγωγή Υπεροξειδίου του Υδρογόνου ελέγχεται από επιπλέον μηχανισμούς. Οι πρωτεΐνες p47PHOX και p67PHOX υφίστανται φωσφορυλίωση από μια Κινάση και μετατοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου ενώνονται με το κυτόχρωμα b558 και μια GTP-πρωτεΐνη για να σχηματιστεί η NADPH-Οξειδάση. Η επίδραση της PKC είναι απαραίτητη, είτε για την φωσφορυλίωση των υπομονάδων p47 και p67 είτε μετά την σύνδεση των επιμέρους τμημάτων της NADPH-Οξειδάσης.

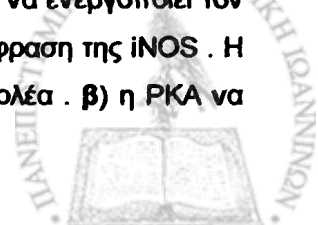
Για την iNOS έχει διαπιστωθεί επίσης ότι αν φωσφορυλιωθεί από Κινάσες της Τυροσίνης μετά την μετάφραση (post-translational modification), αυξάνεται η δραστηριότητά της (Pan και συν., 1996).

Για τους ειδικούς μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτόρων που ελέγχουν την παραγωγή (σύνθεση) και έκκριση (εξωκύτωση) της Οξίνης Φωσφατάσης υπάρχουν ορισμένα κενά.

Αν υποθέσουμε ότι στα μακροφάγα των πειραμάτων μας έχουν ενεργοποιηθεί όλες οι Οδοί Μεταγωγής Μηνύματος, είναι πιθανό οι διάφορες πειραματικές ουσίες να δρουν σε παραπάνω από ένα σημεία των Οδών. Στην συνέχεια θα γίνει προσπάθεια εντόπισης των σημείων αυτών.

Η Αδρεναλίνη, η Ντοπαμίνη και η PGE₂ είναι τρεις ουσίες που προκαλούν αύξηση του cAMP και διέγερση της PKA. Όλες προκάλεσαν την μείωση της παραγωγής H₂O₂ στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS. Αντίστροφα, η Ινσουλίνη είναι ουσία που προκαλεί ελάττωση του cAMP και διαπιστώθηκε ότι προκαλεί αύξηση της παραγωγής H₂O₂ στα περιτοναϊκά μακροφάγα. Δεν είναι γνωστό με ποιόν ακριβώς μηχανισμό επιτυγχάνεται αυτό το αποτέλεσμα, αλλά είναι πιθανό ότι η PKA επιδρά στον υποδοχέα της IP₃ (Taylor και Marshall, 1992) και αναστέλλει την έκλυση του Ca²⁺, η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Scully και συν., 1986, Truett και συν., 1988). Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι η PKA αναστέλλει την αντλία Na⁺/H⁺, η οποία διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον LPS (Aderem και συν., 1986, Lewis και McGee 1992). Όμως δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η PKA να αναστέλλει την δημιουργία της DAG ή να επιδρά απευθείας στην PKC, αν και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τέτοιες επιδράσεις.

Η Αδρεναλίνη, η Ντοπαμίνη και η PGE₂ προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής NO και στους τρεις τύπους μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με LPS. Φαίνεται λοιπόν ότι η αύξηση του cAMP και η διέγερση της PKA επάγουν την δραστηριότητα της iNOS. Δεν είναι γνωστό ποιος μηχανισμός διαμεσολαβεί αυτή την επίδραση, αλλά υπάρχουν δύο πιθανές εκδοχές: α) η PKA να ενεργοποιεί τον παράγοντα NFκB (Muroi και Suzuki, 1993) που με την σειρά του προκαλεί την έκφραση της iNOS. Η επίδραση αυτή της PKA μπορεί να οφείλεται στην φωσφορυλίωση του IκB-αναστολέα. β) η PKA να



φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB, ο οποίος συνδέεται σε περιοχή CRE του γονιδίου της iNOS και προκαλεί την έκφρασή του. Ας σημειωθεί ότι υπάρχει μια μελέτη σε μακροφάγα ενεργοποιημένα με INF γ , όπου παρατηρείται αύξηση της παραγωγής NO υπό την επίδραση χαμηλών δόσεων cAMP (Mullet και συν., 1997).

Είναι πιθανό ότι οι αντίθετες επιδράσεις του cAMP στην παραγωγή H₂O₂ και NO να εξυπηρετούν τον ίδιο σκοπό. Η αύξηση του cAMP προκαλεί την μείωση της παραγωγής H₂O₂ και την αύξηση της παραγωγής NO. Όμως στα ουδετερόφιλα φαγοκύτταρα το NO αναστέλλει την δράση της NADPH-οξειδάσης και μειώνει την παραγωγή H₂O₂ (Clancy και συν., 1992). Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα είναι πιθανό να χρησιμοποιούν το H₂O₂ και το NO για να ρυθμίζουν την Απόπτωση. Το H₂O₂ προκαλεί την απόπτωση των μονοκυττάρων (Lao-chumtsoonvorarong και συν., 1996) όπως ακριβώς και το NO (Albina και συν., 1993). Όμως το NO επίσης δρα ανασταλτικά στην απόπτωση, Νιτροζυλιώνοντας την Κοσπάση (Mannick και συν., 1999). Η διαφορετική επίδραση του cAMP στις δύο αυτές ρίζες μπορεί να ρυθμίζει την έναρξη της Απόπτωσης.

Τα αποτελέσματα της Ώξινης Φωσφατάσης δεν ήταν ομοιόμορφα για τις ουσίες που αυξάνουν το cAMP. Η Αδρεναλίνη δεν διαπιστώθηκε να προκαλεί μεταβολές στην Δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών, βρογχοκυψελιδικών και ηπατικών μακροφάγων που επωάστηκαν με LPS. Η χορήγηση Ντοπαμίνης οδήγησε σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας στα περιτοναϊκά μακροφάγα και μείωσή της στα κύτταρα Kupffer, ενώ δεν επηρέασε καθόλου τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με LPS. Τέλος η χορήγηση PGE₂ μαζί με τον LPS οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών μακροφάγων και δεν προκάλεσε μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας στα κύτταρα Kupffer. Από τα παραπάνω στοιχεία δεν είναι εμφανείς οι Οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων που ενέχονται στην ρύθμιση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης. Για παράδειγμα οι τρεις πειραματικές ουσίες προκάλεσαν στα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά μακροφάγα τις ίδιες επιδράσεις στην παραγωγή H₂O₂ και NO, άρα θα πρέπει να δρουν μέσα από τον ίδιο Δεύτερο Μηνύτορα. Όμως οι ίδιες αυτές πειραματικές ουσίες προκάλεσαν στα περιτοναϊκά μακροφάγα τρεις διαφορετικές επιδράσεις στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης, που αντιτίθεται στην άποψη ότι δρουν με τον ίδιο Δεύτερο Μηνύτορα. Στο εργαστήριό μας είναι σε εξέλιξη πειράματα για την διαλεύκανση της Οδού Δεύτερου Μηνύτορα που διαμεσολαβεί την ρύθμιση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα.

Η Γλυκαγόνη επίσης θεωρείται ουσία που δρα κυρίως μέσω της αύξησης του cAMP. Όμως στα αντίστοιχα πειράματα η Γλυκαγόνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής H₂O₂ αντί για την μείωση που αναμενόταν. Είναι πιθανό ότι η Γλυκαγόνη δρα στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα μέσω διέγερσης της PLC, δημιουργώντας έτσι Ca²⁺ και DAG που ενεργοποιούν την PKC. Η δράση της γλυκαγόνης μέσω PLC έχει περιγραφεί μόνο στα ηπατοκύτταρα (Murphy και συν., 1987).

Η Γλυκαγόνη δεν προκάλεσε ομοιόμορφα αποτελέσματα στην παραγωγή NO και στην Ώξινη Φωσφατάση. Συγκεκριμένα προκάλεσε μειωμένη παραγωγή NO και αυξημένη δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα, ενώ προκάλεσε αυξημένη παραγωγή NO και μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα. Η αύξηση του Ca²⁺ προκαλεί την αποκοκκίωση των λυσοσωμάτων στα ουδετερόφιλα πολυμορφοκύτταρα και θα έπρεπε να μειώνει την δραστηριότητα της Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα, ενώ η διέγερση της PKC

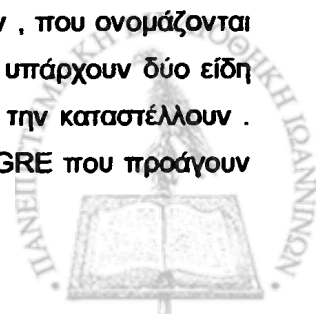


προκαλεί την έκφραση της iNOS μέσω του παράγοντα NFκB και θα έπρεπε να αυξήσει την παραγωγή NO στα μακροφάγα αυτά . Οι επιδράσεις της Γλυκαγόνης στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα ταιριάζουν σε αυτό ακριβώς το μοντέλο και υποθέτουμε ότι διαθέτουν διαφορετικό είδος υποδοχέα Γλυκαγόνης σε σύγκριση με τα περιτοναϊκά και ηπατικά κύτταρα . Επίσης είναι πιθανό η γλυκαγόνη να προκαλεί μέσω της PLC πολύ έντονη διέγερση των περιτοναϊκών και ηπατικών μακροφάγων που να οδηγεί στην έκφραση των αυτοκρινικών μηχανισμών καταστολής της λειτουργίας τους , π.χ. μέσω της παραγωγής PGE₂ , Νοραδρεναλίνης , IL-10 ή Αδενοσίνης .

Η Ινσουλίνη προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής H₂O₂ στα περιτοναϊκά μακροφάγα και σε συνδυασμό με τα αντίθετα προς αυτήν αποτελέσματα που προκάλεσαν η Αδρεναλίνη , η Ντοπαμίνη και η PGE₂ υποδεικνύεται ότι η ορμόνη αυτή συμμετέχει στην ρύθμιση της παραγωγής H₂O₂ μέσω της ελάττωσης των επιπέδων του cAMP . Η Ινσουλίνη επίσης προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Η διαμεσολάβηση των δραστηριοτήτων της Ινσουλίνης από το cAMP έχει ήδη υποστηριχθεί από παλαιότερα (Muschel και συν., 1977) . Η έλλειψη επιδράσεων από την Ινσουλίνη ως προς την παραγωγή NO και Ώξινης Φωσφατάσης είναι δύσκολο να εξηγηθεί . Ο υποδοχέας της Ινσουλίνης αποτελεί μια Μεμβρανική Κινάση της Τυροσίνης η οποία ενεργοποιεί την Raf-1-Κινάση , τις MAP-Κινάσες , την PLCγ και την PKC . Η διέγερση της PKC συμβαδίζει με την αύξηση της παραγωγής H₂O₂ στα περιτοναϊκά μακροφάγα , όμως δεν συμβαδίζει με την έλλειψη επίδρασης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Επίσης , αν η PKC φωσφορυλιώνει τις β-υπομονάδες του υποδοχέα της Ινσουλίνης θα αναστέλλει την δράση του (Goodman and Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) . Όμως η PKC ενεργοποιεί και τον παράγοντα NFκB και θα έπρεπε να προκαλεί αυξημένη έκφραση της iNOS και αυξημένη παραγωγή NO . Επίσης τα πειράματά μας δεν προσφέρουν κάποια ικανοποιητική εξήγηση για την αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Υποθέτουμε ότι τα κύτταρα αυτά έχουν διαφορετικό φαινότυπο από τα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα , με αποτέλεσμα η Ινσουλίνη να προκαλεί την αύξηση της σύνθεσης του ενζύμου μόνο σε αυτά τα κύτταρα .

Το Νευροπεπτιδίο Υ επίσης προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης μόνο στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Ο μηχανισμός δράσης του Νευροπεπτιδίου Υ θεωρείται ότι είναι η μείωση του cAMP μέσω των Gi-πρωτεϊνών που αναστέλλουν την Αδενυλική Κυκλάση , αλλά επίσης επηρεάζουν την συγκέντρωση Ca⁺² και K⁺¹ (Herzog και συν., 1992 , Goodman and Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) . Από τα λίγα δεδομένα που διαθέτουμε δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η αυξημένη δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων οφείλεται σε αυτούς τους μηχανισμούς . Για τα περιτοναϊκά και τα ηπατικά μακροφάγα είναι πιθανό να μην εκφράζουν καθόλου υποδοχείς για το Νευροπεπτιδίο Υ .

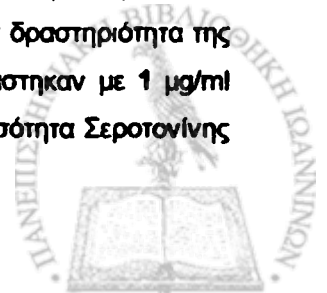
Οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών εξηγούνται ικανοποιητικά από τον μηχανισμό δράσης τους . Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω των ειδικών κυτταροπλασματικών υποδοχέων τους, που τους επιτρέπουν να επηρεάζουν άμεσα την έκφραση πολλών γονιδίων . Το σύμπλεγμα του υποδοχέα με το γλυκοκορτικοειδές συνδέεται σε ειδικές περιοχές του προαγωγέα των γονιδίων , που ονομάζονται Glucocorticoid-Responsive Elements (GRE) . Στον ίδιο προαγωγέα μπορούν να υπάρχουν δύο είδη θέσεων GRE , εκείνες που προάγουν την έκφραση του γονιδίου και εκείνες που την καταστέλλουν . Το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για τις θέσεις GRE που προάγουν



την έκφραση του γονιδίου και αρχικά καταλαμβάνουν αυτές . Με την αύξηση της δόσολογίας ή με την παράταση του χρόνου επώασης καταλαμβάνονται και οι θέσεις GRE που καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων , οι οποίες έχουν ισχυρότερη δράση από τις προηγούμενες (Goodman and Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) . Έτσι οι υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών προκαλούν την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ενώ οι χαμηλές δόσεις επιτείνουν την γονιδιακή έκφραση . Αυτό παρατηρήθηκε με την παραγωγή H_2O_2 στα περιτοναϊκά μακροφάγα και με την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , αλλά όχι με την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου από τα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά κύτταρα . Δεν είναι γνωστό για ποιόν λόγο η παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου από τα μακροφάγα αναστέλλεται και από τις υψηλές και από τις χαμηλές δόσεις της Δεξαμεθαζόνης , αλλά υπάρχει η εξής πιθανότητα : η «χαμηλή δόση» της Δεξαμεθαζόνης (10^{-4} M) η οποία χρησιμοποιήθηκε να ήταν σχετικά υψηλή , αφού σε μια παρόμοια μελέτη διαπιστώθηκε αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου σε δόσεις μικρότερες από 10^{-7} M (Broug-Holub και Kraal, 1996) . Από την προαναφερθείσα μελέτη των Broug-Holub και Kraal πρέπει να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ο προαγωγέας του γονιδίου της iNOS να μην διαθέτει περιοχή GRE που να επιτρέπει την αύξηση της έκφρασης της iNOS . Πρέπει εξάλλου να ληφθεί υπόψη ότι η έκφραση της iNOS επάγεται από τον παράγοντα NFκB , την λειτουργία του οποίου αναστέλλουν τα γλυκοκορτικοειδή με δύο τρόπους : α) ανταγωνίζονται τον NFκB για τις θέσεις σύνδεσης στο DNA , β) επάγουν την σύνθεση του αναστολέα IκB (Stemberg, 1997) . Αυτός ο διπλός μηχανισμός επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στον NFκB ίσως να αποτελεί την εξήγηση γιατί η Δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την παραγωγή NO και σε χαμηλές και σε υψηλές δόσολογίες χορήγησης .

Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει ομοφωνία για το αν τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την παραγωγή O_2^{-1} και H_2O_2 . Ορισμένοι ερευνητές (Schultz και συν., 1985 , Maridonneau-Parini και συν., 1989) αναφέρουν αναστολή της παραγωγής των Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates) , ενώ άλλοι (Dieter και συν., 1988, Schaffner και Rellstab , 1988) αμφισβητούν τέτοια επίδραση . Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά κύτταρα δείχνουν καθαρά ότι η Δεξαμεθαζόνη επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 και μάλιστα ότι αυτό απαιτεί την ρύθμιση της έκφραση κάποιου γονιδίου .

Η επώαση των μακροφάγων με LPS και Σεροτονίνη επίσης έδωσε πολλά αποτελέσματα . Η Σεροτονίνη ασκεί επιδράσεις κυρίως με τις εξής δύο Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος : α) Οι 5-HT1 υποδοχείς συνδέονται μέσω Gi-πρωτεϊνών στην Αδενυλική Κυκλάση και μειώνουν την παραγωγή του cAMP . Επίσης οι 5-HT1 υποδοχείς επηρεάζουν τους διαύλους K^+ και Ca^{+2} β) Οι 5-HT2 υποδοχείς διεγείρουν άμεσα την PLC και προκαλούν παραγωγή DAG και Ca^{+2} . Οι 5-HT3 και 5-HT4 υποδοχείς δρουν μέσω άλλων Οδών . Από τα πειράματά μας δεν υπήρξε καμία ένδειξη ότι η Σεροτονίνη δρούσε μέσω Αδενυλικής Κυκλάσης . Η Σεροτονίνη προκάλεσε στα περιτοναϊκά μακροφάγα την αύξηση της παραγωγής H_2O_2 , NO και Οξίνης Φωσφατάσης . Η επίδραση αυτή μοιάζει να προκαλείται από την διέγερση της PLC και υπάρχει ήδη μια δημοσίευση που αναφέρει την ύπαρξη επιδράσεων στα περιτοναϊκά μακροφάγα μέσω υποδοχέων 5-HT2 (Stemberg και συν., 1986) . Στα κύτταρα Kupffer που επωάστηκαν με 2 $\mu g/ml$ LPS για 14 ώρες δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης από την Σεροτονίνη , αλλά όταν τα κύτταρα Kupffer επωάστηκαν με 1 $\mu g/ml$ LPS παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης με την ίδια ποσότητα Σεροτονίνης

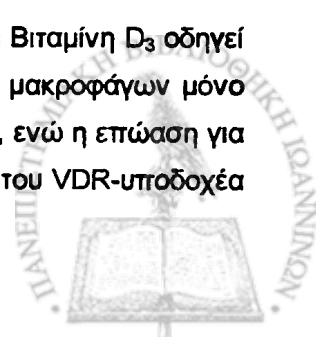


και τον ίδιο χρόνο επώασης . Μια πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου είναι η εξής : η Σεροτονίνη προκαλεί την αύξηση της παραγωγής του ενζύμου όπως και ο LPS , αλλά η επίδρασή της στα κύτταρα Kurpffer είναι ασθενής σε σύγκριση με την επίδραση του LPS . Ίσως οι δύο ουσίες να χρησιμοποιούν την ίδια Οδό Μεταγωγής Μηνύματος . Όταν χορηγείται μικρή δόση LPS είναι εμφανής η επίδραση της Σεροτονίνης , ενώ όταν χορηγείται μεγάλη δόση LPS η επίδραση της Σεροτονίνης γίνεται αμελητέα . Η ασθενής επίδραση της Σεροτονίνης στα κύτταρα Kurpffer πιθανώς εξηγεί την έλλειψη επίδρασης στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου . Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάστηκαν με Σεροτονίνη και LPS παρουσίασαν πολύ μεγάλη αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου αλλά καμία επίδραση στην δραστηριότητα της Ώξινης Φωσφατάσης . Είναι πιθανό ότι η επίδραση του συνδυασμού LPS και Σεροτονίνης ήταν πολύ ισχυρή στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και τελικά προκάλεσε την έκκριση της Ώξινης Φωσφατάσης στον μεσοκυττάριο χώρο (η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2} οδηγεί στην αποκοκκίωση των λυσοσωμάτων) .

Η χορήγηση Ισταμίνης στα ενεργοποιημένα με LPS μακροφάγα προκάλεσε λίγες επιδράσεις . Συγκεκριμένα προκάλεσε μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου στα περιτοναϊκά μακροφάγα και αύξηση της δραστηριότητας της Ώξινης Φωσφατάσης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Τα κύτταρα Kurpffer μάλλον δεν διαθέτουν υποδοχείς για την Ισταμίνη . Δεν γνωρίζουμε μέσω ποιου μηχανισμού ασκεί τις επιδράσεις της η Ισταμίνη , αλλά δεν φαίνεται να τις ασκεί μέσω της διέγερσης της PLC (H1-υποδοχείς) ή μέσω της αύξησης του cAMP (H2-υποδοχείς) . Είναι πιθανό όμως οι H1-υποδοχείς των μακροφάγων να είναι συνδεδεμένοι με την Γουανυλική Κυκλάση , οδηγώντας έτσι στην αύξηση του cGMP . Έχει ήδη αποδειχθεί σε κυτταρικές σειρές μακροφάγων ότι διαθέτουν H1-υποδοχείς οι οποίοι προκαλούν αύξηση του cGMP και παροδική αύξηση του κυτταρικού Ca^{+2} (Ohno και συν.,1991) . Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όμως για τον τρόπο επίδρασης του cGMP στα μακροφάγα στις παραμέτρους που μελετούμε (Schmidt και συν.,1993) . Αν πράγματι συμβαίνει αύξηση του cGMP στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα υπό την επίδραση της Ισταμίνης , τότε ενδεχομένως η Ισταμίνη ασκεί τις επιδράσεις της είτε μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την Εξαρτημένη από το cGMP Πρωτεϊνική Κινάση ή μέσω της αναστολής της λειτουργίας των διαύλων Ca^{+2} .

Η Προσταγλανδίνη PGD_2 προκάλεσε δύο μόνο επιδράσεις , την αύξηση της παραγωγής NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα και την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα κύτταρα Kurpffer . Η έλλειψη επιδράσεων στα περιτοναϊκά μακροφάγα οφείλεται στην έλλειψη ειδικών υποδοχέων για την PGD_2 . Η αύξηση της παραγωγής του Νιτρικού Οξειδίου στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα διαμεσολαβείται από τις Gs-πρωτεΐνες στις οποίες συνδέονται οι υποδοχείς της PGD_2 και οι οποίες προκαλούν διέγερση της Αδενυλικής Κυκλάσης , αύξηση του cAMP και διέγερση της PKA . (Goodman and Gilman's , The Pharmacological Basis of Therapeutics , 1996) . Η Εξαρτημένη από το cAMP Πρωτεϊνική Κινάση πιθανώς ενεργοποιεί τον παράγοντα NFκB και επάγει την έκφραση της iNOS . Η PGD_2 επίσης προκάλεσε την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης στα μακροφάγα του ήπατος , αλλά μέσω αδιευκρίνητου ακόμα μηχανισμού .

Εκτελέστηκαν ορισμένα πειράματα στην προσπάθεια να διαπιστωθεί αν η Βιταμίνη D_3 οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων . Η επώαση περιτοναϊκών μακροφάγων μόνο με Βιταμίνη D_3 για 6 ώρες δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στην παραγωγή H_2O_2 , ενώ η επώαση για 14 ώρες προκάλεσε μείωση της παραγωγής H_2O_2 . Επειδή ο μηχανισμός δράσης του VDR-υποδοχέα



της Vit.D3 σχετίζεται με την άμεση ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (Jones και συν., 1998) είναι αναμενόμενο να υπάρχει κάποια καθυστέρηση μέχρι την εμφάνιση των βιολογικών αποτελεσμάτων . Όμως οι μάρτυρες ήταν μακροφάγα που δεν έλαβαν καμία ενεργοποίηση και παρήγαγαν H_2O_2 μετά από την επίδραση του PMA στην PKC που ήδη υπήρχε στην κυτταρική τους μεμβράνη . Άρα η Vit.D3 προκάλεσε μειωμένη σύνθεση κάποιου συστατικού της NADPH-Οξειδάσης ή μειωμένη μετανάστευση (translocation) της PKC στην κυτταρική μεμβράνη . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων μόνο με Vit.D3 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO , ενώ η επώαση των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων προκάλεσε μείωση της παραγωγής του NO . Εδώ είναι εμφανές ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα έχουν διαφορετικό φαινότυπο από τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα , τα οποία είναι μονίμως σε κατάσταση «διέγερσης» . Η Vit.D3 προκάλεσε αυξημένη έκφραση της iNOS στα περιτοναϊκά κύτταρα , ενώ στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που παρουσιάζουν υψηλή βασική παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου είτε η έκφραση της iNOS μειώνεται ή αναστέλλεται κάποιος άλλος παράγοντας που είναι απαραίτητος για την δράση της . Τέλος η επώαση με Vit.D3 δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης ούτε στα περιτοναϊκά ούτε στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα .

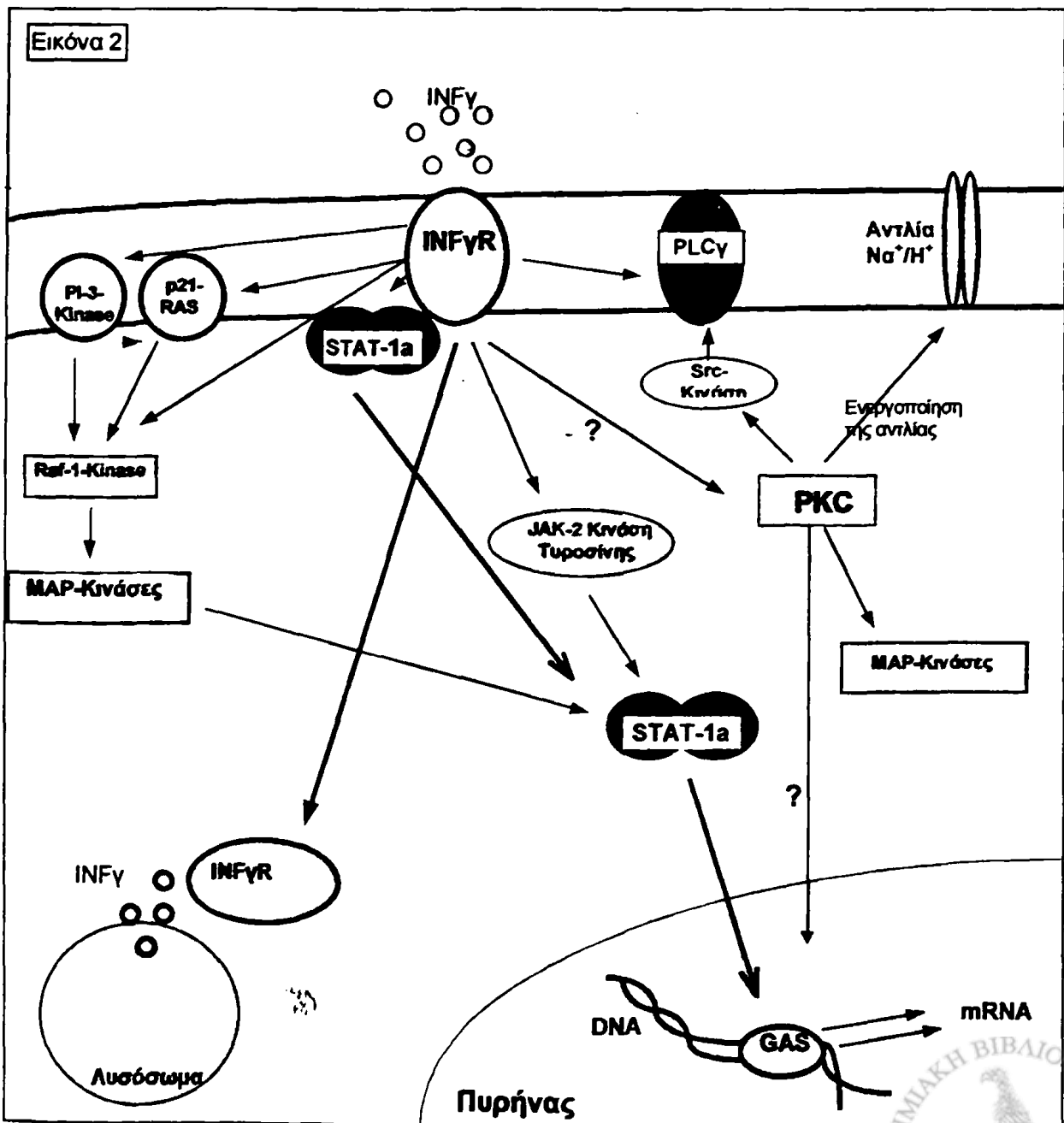
Όταν η Vit.D3 χορηγήθηκε μαζί με LPS ορισμένα από τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά . Η παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά μακροφάγα δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την Vit.D3 , ενώ η παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου και Οξίνης Φωσφατάσης αυξήθηκαν , που δείχνει αυξημένη γονιδιακή έκφραση . Η έλλειψη επίδρασης της Vit.D3 στην παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά κύτταρα μπορεί να οφείλεται στο ότι η συνδυασμένη επίδραση του LPS και της Vit.D3 οδηγούν σε κάποιον μηχανισμό αυτοπεριορισμού της παραγωγής H_2O_2 . Τα κύτταρα Kupffer δεν παρουσιάζουν επιδράσεις από την Vit.D3 , είτε επειδή δεν διαθέτουν υποδοχείς για την ουσία αυτή ή για κάποιον άλλο λόγο . Όμως τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα εμφάνισαν μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και της Οξίνης Φωσφατάσης , αλλά με αδιευκρίνιστο ακόμα μηχανισμό .

Οι μηχανισμοί Δεύτερων Μηνυτόρων που ελέγχουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων υπό την επίδραση της INF γ είναι επίσης πολλαπλοί και πολύπλοκοι . Ωστόσο υπάρχει μόνο ένα είδος υποδοχέα που συνδέει την INF γ (INF γ R) και όλες οι Οδοί Μεταγωγής Μηνύματος ξεκινούν από αυτόν τον υποδοχέα . Παρά το γεγονός αυτό , οι Οδοί Δεύτερων Μηνυτόρων που ενεργοποιούνται από την INF γ παραμένουν πολλές και η πολύπλοκη οργάνωσή τους απεικονίζεται στο σχήμα 2 .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ επί 5 ώρες προκαλεί αυξημένη παραγωγή H_2O_2 , αλλά μετά από επώαση 14 ωρών η παραγωγή του H_2O_2 μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα του μάρτυρα . Η αναστολή αυτή είναι πολύ ισχυρή και δεν μπορεί να οφείλεται μόνο σε αύξηση του cAMP και αναστολή της εισόδου Ca^{2+} λόγω των αυτοκρινικών επιδράσεων της PGE $_2$, της Νοραδρεναλίνης και της Αδενοσίνης . Η έντονη αυτή καταστολή της παραγωγής H_2O_2 οφείλεται μάλλον σε άλλους αυτορρυθμιστικούς μηχανισμούς , που καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την NADPH-Οξειδάση . Τέτοιοι μηχανισμοί έχουν περιγραφεί για άλλα γονίδια (Tannebaum και Hamilton, 1989) . Παρόμοιο αποτέλεσμα προκαλεί και η επώαση βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με INF γ επί 14 ώρες . Παρατηρείται μείωση της παραγωγής H_2O_2 σε επίπεδα χαμηλότερα από τα επίπεδα του μάρτυρα . Ένας σημαντικός λόγος για τον οποίο η επώαση των μακροφάγων προκαλεί την έκφραση αυτορρυθμιστικών μηχανισμών είναι ότι οι δόσεις της INF γ είναι μεγάλες : 250 units/ml στα πειράματά μας , όταν στην διεθνή βιβλιογραφία συνήθως χρησιμοποιούνται 0.1 - 10 units/ml INF γ .



Η INF γ προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου από τα περιτοναϊκά και μια μικρότερη αύξηση στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα . Η μικρότερη αύξηση της παραγωγής NO οφείλεται στον φαινότυπο των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων : η μόνιμη κατάσταση διέγερσής τους θα τα έκανε να παράγουν συνεχώς μεγάλες ποσότητες NO και για να αποφευχθεί αυτό υπάρχει κάποιος «περιορισμός» στην έκφραση του γονιδίου της iNOS ή στην ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού . Είναι πιθανό ότι σε αυτά τα κύτταρα δεν επιτελείται η φωσφορυλίωση της iNOS από Κινάσες Τυροσίνης , η οποία σε άλλα είδη μακροφάγων αυξάνει την δραστηριότητα του ενζύμου (Rap και συν.,1996) . Ίσως τα αποτελέσματα της INF γ στην δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης να εξηγούνται με έναν παρόμοιο μηχανισμό . Η INF γ μειώνει την δραστηριότητα της Φωσφατάσης στα περιτοναϊκά μακροφάγα και την αυξάνει στα βρογχοκυψελιδικά : η διαφορά αυτή πιθανώς οφείλεται στην μειωμένη εξωκύτωση του ενζύμου στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα .



Η Αδρεναλίνη, η Ντοπαμίνη και η PGE₂ είναι τρεις ουσίες που προκαλούν αύξηση του cAMP και διέγερση της PKA. Όλες προκάλεσαν την μείωση της παραγωγής H₂O₂ στα περιτοναϊκά και στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που είχαν ενεργοποιηθεί με INFγ. Δεν είναι γνωστό με ποιόν ακριβώς μηχανισμό επιτυγχάνεται αυτό το αποτέλεσμα, αλλά είναι πιθανό ότι η PKA επιδρά στον υποδοχέα της IP₃ (Taylor και Marshall, 1992) και αναστέλλει την έκλυση Ca²⁺, η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή των Δραστικών Μεταβολιτών Οξυγόνου (Scully και συν., 1986, Truett και συν., 1988). Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι η PKA αναστέλλει την αντλία Na⁺/H⁺, η οποία διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον INFγ (Figueroa και συν., 1990, Lewis και McGee, 1992). Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η PKA μπορεί να αναστέλλει την δημιουργία της DAG ή να επιδρά στην ίδια την PKC, αν και δεν υπάρχει βιβλιογραφική τεκμηρίωση για φωσφορυλίωση της PKC από την PKA.

Η Αδρεναλίνη προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που ενεργοποιήθηκαν με INFγ. Η αύξηση του cAMP και η διέγερση της PKA επάγουν την δραστηριότητα της iNOS αλλά δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός που διαμεσολαβεί αυτή την επίδραση. Μια μελέτη σε μακροφάγα ενεργοποιημένα με INFγ αναφέρει την αύξηση της παραγωγής NO υπό την επίδραση χαμηλών δόσεων cAMP και μείωση της παραγωγής NO υπό την επίδραση υψηλών δόσεων cAMP (Mullet και συν., 1997). Ο μηχανισμός αυτής της διαφορετικής επίδρασης του cAMP ανάλογα με την δοσολογία του δεν είναι γνωστός, θυμίζει όμως τις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση γονιδίων μέσω των παραγόντων GRE. Αν η INFγ ενεργοποιεί τον παράγοντα NFκB που με την σειρά του προκαλεί την έκφραση της iNOS, τότε θα πρέπει και η PKA να ενεργοποιεί τον NFκB. Όμως είναι πιθανότερο η INFγ να προκαλεί την έκφραση της iNOS μέσω του παράγοντα STAT-1a, ο οποίος δρα απευθείας σε μια θέση GAS του γονιδιώματος. Τότε η επίδραση της PKA θα πρέπει να ασκείται στο σύστημα αυτό, είτε επιδρώντας απευθείας στον παράγοντα STAT-1a (φωσφορυλίωση σε θέση Σερίνης αντί των MAP-Κινασών) ή ενεργοποιώντας κάποια Src-Κινάση Τυροσίνης η οποία θα ενεργοποιήσει την PLCγ και έμμεσα τον STAT-1a. Επίσης η PKA μπορεί να φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB, ο οποίος να συνδέεται σε περιοχή CRE του γονιδίου της iNOS και επιτείνει την έκφρασή του. Θα απαιτηθούν ορισμένα διευκρινιστικά πειράματα για να προσδιοριστεί ακριβώς μέσω ποιου μηχανισμού επιτυγχάνεται η επίδραση του cAMP στην παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου.

Στην δραστηριότητα της Οξίνης Φωσφατάσης η Αδρεναλίνη προκάλεσε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στα περιτοναϊκά μακροφάγα και αύξηση της δραστηριότητας στα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα. Δηλαδή η Αδρεναλίνη προκάλεσε επίταση της επίδρασης που είχε η INFγ από μόνη της στα μακροφάγα αυτά, αυξάνοντας τα επίπεδα ενεργοποίησής τους. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν είναι γνωστός αλλά πρέπει να είναι κάποιος από τους προαναφερθέντες στην περίπτωση της αύξησης της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου. Η Αδρεναλίνη ενεργοποιεί μέσω cAMP την PKA και στην συνέχεια η PKA επιτείνει την γονιδιακή έκφραση, είτε επιδρώντας άμεσα στον παράγοντα STAT-1a ή ενεργοποιώντας κάποια Src-Κινάση Τυροσίνης που θα ενεργοποιήσει την PLCγ και έμμεσα τον STAT-1a. Επίσης η PKA μπορεί να φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB, ο οποίος να συνδέεται σε περιοχή CRE διαφόρων γονιδίων που επάγονται και από την INFγ. (Αναλυτικά για την ικανότητα του cAMP να επιδρά στην γονιδιακή έκφραση στους Schmid και συν., 1993, Della Fazio και συν., 1997).



Τα ενεργοποιημένα με INF γ βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν μεγάλη μείωση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου και Ώξινης Φωσφατάσης υπό την επίδραση Δεξαμεθαζόνης σε χαμηλή δόση . Η Δεξαμεθαζόνη προκαλεί τις ίδιες ακριβώς επιδράσεις στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα είτε ενεργοποιηθούν με INF γ ή με LPS , ασκώντας την δράση της μάλλον στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα λυσοσωματικά ένζυμα .



ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΩΝ .

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα , τα οποία υφίστανται μεταβολές κατά την φλεγμονώδη διέγερση ή την ενεργοποίησή τους (Williams και Mayhew, 1973 , Mayhew και Williams, 1974 , Morland και Kaplan, 1977 , Cooper και συν.,1984) . Δεν είναι γνωστές οι οδοί Μεταγωγής Μηνύματος και οι ειδικοί βιοχημικοί μηχανισμοί που ελέγχουν αυτές τις μεταβολές της μορφολογίας των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Γνωρίζουμε αποσπασματικά μόνο μερικά από τα φαινόμενα που διαμεσολαβούν τις μορφολογικές μεταβολές της ενεργοποίησης .

- Η επώαση των μονοκυττάρων της κυτταρικής σειράς U937 με Βιταμίνη D3 προκαλεί την αυξημένη γονιδιακή έκφραση , μέσω του ειδικού κυτταροπλασματικού υποδοχέα της Βιταμίνης . Η αυξημένη γονιδιακή έκφραση οδηγεί στην μείωση του μεγέθους του πυρήνα , την μείωση της αναλογίας του πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα , την πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης και την δημιουργία των ψευδοποδίων (Rigby και συν.,1984) .
- Από τις μορφολογικές μεταβολές ορισμένες οφείλονται στον πολυμερισμό των μικρονηματίων της ακτίνης , όπως έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ο LPS (Shinji και συν.,1991) .
- Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον LPS προκαλεί μέσω της PKC την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών MARCKS και MacMARCKS , οι οποίες είναι υπεύθυνες για ορισμένες από τις μείζονες δομικές αλλαγές του κυτταροσκελετού που συνοδεύουν την ενεργοποίηση (Rosen και συν.,1989 , Aderem, 1992 , Li και Aderem, 1992) . Η πρωτεΐνη MARCKS είναι υπεύθυνη για την δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ των νηματίων Ακτίνης κοντά στην κυτταρική μεμβράνη (Actin crosslinking) . Η φωσφορυλίωσή της από την PKC και η σύνδεσή της με Ca^{+2} και με Καλμοδουλίνη εμποδίζουν την πρωτεΐνη MARCKS να προκαλέσει τον πολυμερισμό των νηματίων Ακτίνης , με επιπτώσεις στην χημειοταξία και την έκκριση (Aderem, 1992) .
- Η πρωτεΐνη Προφιλίνη (Profilin, MB: 12-15 kDa) προάγει τον πολυμερισμό της Ακτίνης και ταυτόχρονα παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για την PIP_2 . Όταν είναι συνδεδεμένη με την PIP_2 δεν προκαλεί πολυμερισμό της Ακτίνης . Η ενεργοποίηση της PLC οδηγεί στην διάσπαση της PIP_2 και την απελευθέρωση της Προφιλίνης , που μπορεί να επιδράσει στην Ακτίνη (Aderem,1992) .
- Στα μακροφάγα υπάρχουν δύο Οδοί Μεταγωγής Μηνύματος που προκαλούν φαγοκύτωση . Οι δύο αυτές οδοί ξεκινούν από διαφορετικά είδη υποδοχέων . Η μία οδός είναι ανεξάρτητη του Ca^{+2} και της PKC , ενώ η άλλη οδός είναι εξαρτημένη από το Ca^{+2} (Hishikawa και συν.,1991) .
- Η φωσφορυλίωση της αλυσίδας MLC_{20} της Μυοσίνης-II από την Κινάση των Ελαφρών Αλύσεων Μυοσίνης (Myosin Light-Chain Kinase) , ένζυμο εξαρτημένο από το Ca^{+2} και την Καλμοδουλίνη , αναστέλλει την χημειοταξία στα μακροφάγα (Wilson και συν., 1991) .
- Η διέγερση της PKC από τον PMA προκαλεί την αύξηση της πτύχωσης (ruffling) της μεμβράνης . Η διέγερση της 3-Κινάσης της Φωσφατιδυλ-Ινοσιτόλης προκαλεί την σύγκλιση των φαγοσωμάτων και των μακροπνοκυττωπικών κυστιδίων σε ενδοκυτταρικά οργανίδια (Araki και συν.,1996) .
- Η αποπλάτυνση των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων διαμεσολαβείται από τις MAP-Κινάσες ERK-1 , ERK-2 και p38 . Αυτές οι MAP-Κινάσες ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση μέσω του παράγοντα



Eik-1 , ο οποίος αφού φωσφορυλιωθεί συνδέεται στις θέσεις SRE (Serum Response Elements) του προαγωγέα ορισμένων γονιδίων (Ogura και Kitamura , 1998) .

2. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Οι επιδράσεις της χορήγησης LPS στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με LPS προκάλεσε μικρή αύξηση του κυτταροπλάσματος , λίγο μεγαλύτερη αύξηση του πυρήνα και έτσι παρατηρείται αύξηση του λόγου του πυρήνα προς το κυτταροπλάσμα (Nπ/Vκ) . Η ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος με αναλογικά μικρότερη αύξηση του κυτταροπλάσματος προκαλεί την μείωση του κυτταροπλάσματος που είναι ορατό γύρω από τον πυρήνα . Αν και οι μεταβολές αυτές είναι ορατές από τις 4 ώρες επώασης , είναι ιδιαίτερα εμφανείς στις 14 ώρες επώασης . Η αύξηση του συνολικού μεγέθους του κυττάρου είναι χαρακτηριστικό εύρημα της ενεργοποίησής του και οφείλεται εν μέρει στην αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης και εν μέρει στην αποπλάτυνση του μακροφάγου . Η αύξηση της πρωτεϊνοσυνθετικής δραστηριότητας του μακροφάγου είναι υπεύθυνη για την μετατόπιση όλης της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα , με αποτέλεσμα να δίνει εικόνα λεπτού δακτυλίου χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα .

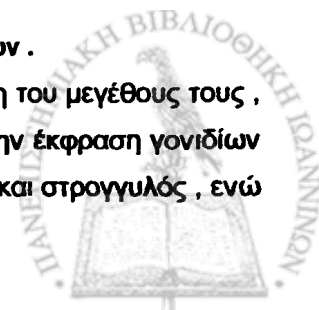
Οι επιδράσεις της ταυτόχρονης χορήγησης LPS και Αδρεναλίνης στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Η Αδρεναλίνη προκαλεί αυξημένη λόβωση του πυρήνα , με αποτέλεσμα το περίγραμμα του πυρήνα (που αντιπροσωπεύει το συνολικό σχήμα του) να γίνεται πιο πολύπλοκο . Το μέγεθος του πυρήνα δεν αλλάζει . Όμως παρατηρείται μικρή μείωση του συνολικού μεγέθους του κυττάρου . Οι μεταβολές που προκαλούνται από την Αδρεναλίνη είναι ήδη ορατές στις 4 ώρες επώασης αλλά γίνονται πιο εμφανείς στις 14 ώρες επώασης . Αν και υπάρχει μια μικρή μείωση του μεγέθους του κυττάρου , η αύξηση της λόβωσης του πυρήνα δημιουργεί περισσότερες περιοχές στις οποίες το κυτταροπλάσμα είναι ορατό . Οι μεταβολές αυτές πρέπει να οφείλονται στην αύξηση του cAMP και την ενεργοποίηση της PKA . Η προσθήκη Θεοφυλλίνης στις κυτταροκαλλιέργειες , η οποία αναστέλλει την Φωσφοδιεστεράση που υδρολύει το cAMP , οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της λόβωσης του πυρήνα . Η Θεοφυλλίνη από μόνη της προκαλεί μικρή αύξηση του cAMP και δεν ενεργοποιεί ικανοποιητικά την PKA . Έτσι η ουσία αυτή απλώς επιτείνει την επίδραση της Αδρεναλίνης . Από μόνη της η Θεοφυλλίνη δεν προκαλεί ορατές επιδράσεις στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Οι μεταβολές της μορφολογίας που προκαλεί η Αδρεναλίνη πρέπει να οφείλονται στην κατασταλτική επίδραση της PKA στην έκφραση ορισμένων γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον LPS . Όμως δεν αποκλείεται και η ευοδωτική επίδραση της Αδρεναλίνης στην έκφραση άλλων γονιδίων , τα οποία θα διαθέτουν περιοχές CRE (cAMP-Responsive Elements) στον προαγωγέα τους .

Οι επιδράσεις της χορήγησης INF γ στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων επί 24 ώρες με INF γ προκαλεί αύξηση του μεγέθους τους , η οποία οφείλεται εν μέρει στην αποπλάτυνση του σχήματός τους και εν μέρει στην έκφραση γονιδίων και την πρωτεϊνοσύνθεση . Ο πυρήνας των μακροφάγων αυτών είναι ευμεγέθης και στρογγυλός , ενώ



γύρω του διακρίνεται άφθονο κυτταρόπλασμα . Η μορφολογία των ενεργοποιημένων με INF γ μακροφάγων είναι ελαφρώς διαφορετική από εκείνη των ενεργοποιημένων με LPS μακροφάγων , αν και τα περισσότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ίδια . Οι μικρές διαφορές πιθανώς οφείλονται στο ότι υπάρχουν ορισμένα γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται μόνο κατά την ενεργοποίηση με LPS ή με INF γ (Hamilton και Tannenbaum, 1986 , Panuska και συν., 1988 , Fan και συν., 1988 , Aderem και συν., 1988, Aderem, 1988 , Hamilton και συν., 1989 , Li και Aderem, 1992) .

Οι επιδράσεις της χορήγησης INF γ και ουσιών που αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Όταν στα περιτοναϊκά μακροφάγα χορηγηθούν ταυτόχρονα INF γ και PGE $_2$ για 24 ώρες δεν υπάρχει καμία ορατή μεταβολή στην μορφολογία τους . Αντιθέτως , η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με INF γ και Αδρεναλίνη για 24 ώρες προκαλεί την αύξηση του ορατού κυτταροπλάσματος γύρω από τον πυρήνα και την επανεμφάνιση εντομής στον πυρήνα ή ακόμα και εμφάνιση πυρήνων με σχήμα νεφροειδές . Δηλαδή η οδός του cAMP προκαλεί αύξηση της πολυπλοκότητας του πυρήνα , όπως προκάλεσε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα που είχαν ενεργοποιηθεί με ενδοτοξίνη . Η μεταβολές της μορφολογίας του πυρήνα αντιπροσωπεύουν την επίδραση της αύξησης του cAMP και της διέγερσης της Πρωτεϊνικής Κινάσης A (PKA) στην γονιδιακή έκφραση .

Οι επιδράσεις της χορήγησης INF γ και Δεξαμεθαζόνης στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων
Η επώαση των μακροφάγων με συνδυασμό INF γ και Δεξαμεθαζόνης για 24 ώρες προκάλεσε αύξηση του μεγέθους τους και στρογγυλοποίηση του σχήματός τους . Το κυτταρόπλασμα των μακροφάγων γίνεται σχετικά αραιοχρωματικό . Ο πυρήνας τους επίσης παρουσιάζει αύξηση του μεγέθους του , ενώ διατηρεί το στρογγυλό σχήμα των ενεργοποιημένων με INF γ κυττάρων και γίνεται περισσότερο αραιοχρωματικός .

Οι επιδράσεις της επώασης με INF γ και Ινσουλίνη στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Η επώαση των μακροφάγων με INF γ και Ινσουλίνη για 24 ώρες προκαλεί μικρή μείωση του μεγέθους του κυττάρου . Το μέγεθος του πυρήνα είναι αναλογικά μεγάλο . Ο πυρήνας είναι πυκνοχρωματικός και με σχήμα στρογγυλό με εντομή ή νεφροειδές . Το κυτταρόπλασμα των περιτοναϊκών μακροφάγων έχει αραιοχρωματική εμφάνιση . Οι επιδράσεις της Ινσουλίνης στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων είναι πιθανό να διαμεσολαβούνται εν μέρει από την επίδρασή της στην 3'-Κινάση της Φωσφατιδυλινοσιτόλης (Araki και συν., 1996) .

Οι επιδράσεις της in vivo χορήγησης Αδρεναλίνης στην μορφολογία των περιτοναϊκών μακροφάγων .

Η υποδόρια χορήγηση τεσσάρων δόσεων Αδρεναλίνης στα πειραματόζωα προκάλεσε ορισμένες μορφολογικές μεταβολές στα περιτοναϊκά μακροφάγα . Συγκεκριμένα τα μακροφάγα που προέρχονται από τα πειραματόζωα που έλαβαν την Αδρεναλίνη παρουσίαζαν μείωση του μεγέθους του κυττάρου με αποτέλεσμα να φαίνεται λιγότερο το κυτταρόπλασμά τους . Επίσης οι πυρήνες των φαγοκυττάρων εμφανίζονται πιο πυκνοχρωματικοί . Η μείωση του μεγέθους του κυττάρου φαίνεται να είναι σταθερό αποτέλεσμα των ουσιών που αυξάνουν το cAMP .



3. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Οι επιδράσεις της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS για 16 ώρες στην μορφολογία τους .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS παρουσιάζουν άφθονο και φυσαλιδώδες κυτταρόπλασμα και ευμεγέθης πυκνοχρωματικός πυρήνας . Η μορφολογία τους παρουσιάζει απλώς μια επίταση των χαρακτηριστικών που έχουν υπό κανονικές συνθήκες .

Οι επιδράσεις της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και Αδρεναλίνη για 16 ώρες στην μορφολογία τους .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS και Αδρεναλίνη είναι μικρότερα από εκείνα που επωάζονται μόνο με LPS . Η μείωση του μεγέθους των κυττάρων είναι καθολική αφού τα κύτταρα παρουσιάζουν και λιγότερο κυτταρόπλασμα και μικρότερους πυρήνες . Η μείωση του μεγέθους των πυρήνων είναι μικρή . Το κυτταρόπλασμα είναι λιγοστό και μόλις φαίνεται γύρω από τον πυρήνα . Οι πυρήνες των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων που επωάστηκαν με LPS και Αδρεναλίνη μοιάζουν πιο αραιοχρωματικοί από εκείνους των μακροφάγων που επωάστηκαν μόνο με LPS .

Οι επιδράσεις της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και Δεξαμεθαζόνη για 16 ώρες στην μορφολογία τους .

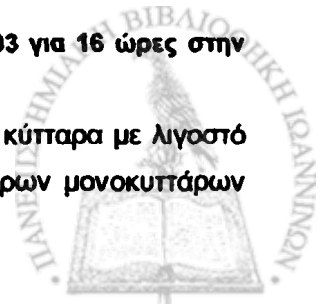
Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS και Δεξαμεθαζόνη παρουσιάζουν μικρούς και στρογγυλούς αραιοχρωματικούς πυρήνες που περιβάλλονται από άφθονο κυανό κυτταρόπλασμα . Η αύξηση του μεγέθους του κυττάρου παρατηρήθηκε και στα περιτοναϊκά μακροφάγα , αλλά όχι και η μείωση του μεγέθους του πυρήνα . Από τα πειράματα που εκτελέστηκαν και την μέχρι σήμερα γνωστή βιβλιογραφία δεν είναι δυνατόν να διευκρινιστεί αν η διαφορά της επίδρασης στον πυρήνα οφείλεται στο διαφορετικό είδος μακροφάγου ή στο διαφορετικό ενεργοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε πείραμα .

Οι επιδράσεις της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και Ινσουλίνη για 16 ώρες στην μορφολογία τους .

Η επώαση των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 16 ώρες με LPS και Ινσουλίνη προκαλεί μεγάλη αύξηση του μεγέθους των κυττάρων . Η αύξηση του μεγέθους των μακροφάγων είναι συνολική , αφού παρουσιάζουν αύξηση του κυτταροπλάσματός τους και του μεγέθους του πυρήνα τους . Η εικόνα που δίνει το κυτταρόπλάσμα τους είναι πυκνή και κοκκιώδης ενώ ο ευμεγέθης πυρήνας τους είναι αρκετά αραιοχρωματικός . Ευμεγέθεις πυρήνες παρατηρήθηκαν και στα περιτοναϊκά μακροφάγα που επωάστηκαν με INF γ και Ινσουλίνη .

Οι επιδράσεις της επώασης των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων με LPS και Vit.D3 για 16 ώρες στην μορφολογία τους .

Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα που επωάζονται με LPS και Vit.D3 είναι μικρά κύτταρα με λιγοστό ρόδινο κυτταρόπλασμα και μικρούς αραιοχρωματικούς πυρήνες . Η επώαση άωρων μονοκυττάρων



μόνο με Vit.D3 έχει αναφερθεί ότι μειώνει την βασεοφιλία του κυτταροπλάσματός τους και μειώνει το μέγεθος του πυρήνα , ενώ ταυτόχρονα προκαλεί πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης και αύξηση του κυτταροπλάσματος στα πλαίσια της ωρίμασης του κυτάρου (Rigby και συν.,1984) . Τα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν ήδη μεγάλο μέγεθος και έντονη πτύχωση της μεμβράνης τους , χωρίς την προσθήκη της Vit.D3 .

Οι επιδράσεις της In vitro χορήγησης Αδρεναλίνης στην μορφολογία των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων .

Η υποδόρια χορήγηση τεσσάρων δόσεων Αδρεναλίνης στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα δεν προκάλεσε καμία ορατή μεταβολή στην μορφολογία τους .



Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ ΜΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ .

Σκοπός της εκπόνησης αυτής της μελέτης ήταν η αναζήτηση της ύπαρξης ρυθμιστικών επιδράσεων από το Νευροενδοκρινικό σύστημα στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα . Τα αποτελέσματα των βιοχημικών μετρήσεων και των μορφολογικών παρατηρήσεων αποδεικνύουν ότι πραγματικά παρατηρούνται ρυθμιστικές επιδράσεις των ορμονών του stress και των ορμονών της φλεγμονής (αυτακοειδών) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη στις λειτουργίες των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων . Έτσι οι βιοχημικές και μορφολογικές παρατηρήσεις της μελέτης αυτής και τα συμπεράσματα που προκύπτουν αποτελούν συνεισφορά στην Ιατρική και την Βιολογία . Οι κυριότεροι λόγοι για τους οποίους αυτή η μελέτη μπορεί να συνεισφέρει στις επιστήμες αυτές παραθέτονται στην συνέχεια :

- Μέχρι σήμερα πολλοί πιστεύουν ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα δεν παρουσιάζουν ρύθμιση της λειτουργίας τους , αλλά ότι δρουν κατά τρόπο ουσιαστικά αυτόνομο . Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται κάποια στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα υφίστανται ρύθμιση των λειτουργιών τους .
- Μέχρι σήμερα οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι μόνο τα λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ-κύτταρα υφίστανται νευροενδοκρινικές επιδράσεις . Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στοιχεία που καταδεικνύουν ότι ορισμένες ορμόνες και αυτακοειδή επηρεάζουν την λειτουργία των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων .
- Συζητούνται τα αποτελέσματα με βάση τις φαινοτυπικές διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των τριών τύπων μακροφάγων που μελετήθηκαν . Τα συμπεράσματα θα μπορούσαν να βοηθήσουν την κατανόηση των μηχανισμών άμυνας των διαφόρων οργάνων . Επίσης θα μπορούσαν να βοηθήσουν την εξήγηση των διαφορών στην παθοφυσιολογία των φλεγμονωδών αντιδράσεων ανάλογα με την ανατομική εντόπιση .
- Τα συμπεράσματα θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην κατανόηση της ευπάθειας των ατόμων που βρίσκονται σε καταστάσεις stress στα λοιμώδη νοσήματα ή τις νεοπλασίες .
- Δημιουργούνται δυνατότητες για την συνέχιση αυτής της μελέτης με τον προσδιορισμό των πιθανότερων οδών Μεταγωγής Μηνύματος που διαμεσολαβούν αυτές τις νευροενδοκρινικές επιδράσεις στα μακροφάγα .
- Παρέχονται στοιχεία που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη φαρμάκων που θα αύξαναν την αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δραστηριότητα των μακροφάγων ή θα τροποποιούσαν την εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης σε όφελος του οργανισμού .

Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή πάρα πολλών ουσιών στους μηχανισμούς της νευροενδοκρινικής ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης . Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ουσίες όπως οι Γοναδοτροπίνες , οι Ενδορφίνες , τα Γλυκοκορτικοειδή , η Προλακτίνη , η Κορτικοτροπίνη , το Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτιδίο και η Ουσία P (Substance P) . Όμως όλες αυτές οι επιδράσεις που αναφέρονται στις αντίστοιχες μελέτες αφορούν τα Τ-λεμφοκύτταρα , τα Β-λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ-κύτταρα . Για τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα είχε θεωρηθεί ότι συμμετέχουν στους μηχανισμούς της νευροενδοκρινικής ρύθμισης μόνο με την παραγωγή κυτταροκινών όπως η IL-1 , ο TNFα και η INFα . Έτσι σε πολυάριθμες καταστάσεις όπου η σωματική ή ψυχολογική καταπόνηση οδηγούσε σε μείωση της ικανότητας του σώματος για ανάπτυξη ανοσολογικής αντίδρασης και για ιστική επούλωση (π.χ. σε συγγενείς ασθενών με χρόνιες παθήσεις , σε άτομα με αντιδραστική κατάθλιψη , σε νεοσύλλεκτους με κακή ψυχολογία , σε αγχώδη άτομα κ.τ.λ.) ο ρόλος των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων θεωρήθηκε ότι έχει δευτερεύουσα σημασία (Goetzl και Speedharan, 1992 , Reichlin, 1993 , Lotan και Schwartz, 1994 , Husband, 1995 , Sternberg, 1997 , Glaser και Kiecolt-Glaser, 1998) .



Σήμερα όμως υπάρχουν αρκετές ενδείξεις οι οποίες μας υποδεικνύουν ότι η λειτουργία των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων υφίσταται επιδράσεις από το νευροενδοκρινικό σύστημα . Ένα παράδειγμα αποτελεί η μειωμένη ικανότητα παρουσίασης αντιγόνων που έχουν τα σπληνικά μακροφάγα μετά από κλειστές κακώσεις με μεγάλη αιμορραγία (McCartee και συν.,1998) . Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν αρχικά μεγάλη μείωση μερικών ανοσολογικών τους ιδιοτήτων , αλλά ενώ μετά από επτά ημέρες παράγουν φυσιολογικές ποσότητες TNF α , IL-6 , H $_2$ O $_2$ και NO δεν επανέρχεται στο φυσιολογικό η ικανότητα της παρουσίασης αντιγόνων . Κατά ανάλογο τρόπο, στις 24 ώρες και στις επτά μέρες μετά από επέμβαση σπληνεκτομής , τα περιτοναϊκά μακροφάγα που συλλέγονται με περιτοναϊκή έκπλυση παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής NO και φαγοκυττάρωσης μικροοργανισμών , ενώ αντίθετα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες TNF α (McCarthy και συν.,1995) . Επίσης οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στην ανοσολογική απόκριση θα μπορούσαν να εξηγηθούν και στην βάση ότι η Προγεστερόνη επηρεάζει την έκφραση της iNOS και την παραγωγή του Νιτρικού Οξειδίου στα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα (Miller και συν.,1996) . Οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν ότι το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων πρέπει να διερευνηθεί για την ανάμειξή του στα ολοκληρωμένα συστήματα ομοιοστασίας και αλλοστασίας που προστατεύουν τον οργανισμό , τμήμα των οποίων αποτελεί και ο Νευρο-Ενδοκρίνο-Ανοσολογικός άξονας . Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν ακόμα πολλές που να περιλαμβάνουν τα μακροφάγα στους παραπάνω λεπτούς μηχανισμούς . Επίσης υπάρχει έλλειψη στοιχείων για τους βιοχημικούς μηχανισμούς οι οποίοι διαμεσολαβούν την απόκριση των κυττάρων αυτών στις νευροενδοκρινικές επιδράσεις .



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων και την ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων αυτών , προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα που αποτελούν τις απαντήσεις στην αρχική ερευνητική υπόθεση :

1. Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα πράγματι υφίστανται νευροενδοκρινικό έλεγχο . Οι διάφορες ορμόνες του Stress και της φλεγμονής ασκούν ρύθμιση της λειτουργίας των φαγοκυττάρων , αλλά όλες οι ουσίες δεν έχουν την ίδια επίδραση , ούτε δρουν στις ίδιες παραμέτρους .
2. Τα τρία είδη μακροφάγων που μελετήθηκαν (περιτοναϊκά, βρογχοκυψελιδικά και ηπατικά) διαθέτουν διαφορετικούς φαινοτύπους και για αυτό αντιδρούν διαφορετικά στους διεγέρτες και στις πειραματικές ουσίες που τους χορηγούνται . Ιδιαίτερα τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα έχουν πολύ διαφορετικούς φαινοτύπους , το οποίο πρέπει να οφείλεται στην άμεση επαφή τους με τον ατμοσφαιρικό αέρα και έτσι αντιδρούν αρκετά διαφορετικά από τα περιτοναϊκά ή τα ηπατικά μακροφάγα .
3. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων από την Ενδοτοξίνη είναι διαφορετική από την ενεργοποίησή τους από την Ιντερφερόνη-γ . Αυτό οφείλεται σε διαφορετικές Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος οι οποίες διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση από κάθε διεγέρτη και σε διαφορετικά γονίδια που εκφράζονται . Η διαφορά αυτή μεταξύ του βιολογικού υποστρώματος της ενεργοποίησης από τους δύο διεγέρτες είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη έλλειψη επιδράσεων από ορισμένες πειραματικές ουσίες , ανάλογα με τον διεγέρτη που χρησιμοποιείται .
4. Ο ρόλος μιας ορμόνης στον μεταβολισμό ή την ομοίωση δεν μπορεί να συσχετιστεί με τις επιδράσεις της στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα . Επίσης ο ρόλος ενός αυτακοειδούς στην πήξη του αίματος , στην μεταβολή της αρτηριακής πίεσης ή στην τοπική μικροκυκλοφορία επίσης δεν μπορεί να συσχετιστεί με την επίδρασή του στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα .
5. Οι τρεις παράμετροι που μετρήθηκαν (H_2O_2 , NO και Ώξινη Φωσφατάση) υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ότι διαθέτουν χωριστούς μηχανισμούς ρύθμισης , που δεν υπακούνε στους ίδιους κανόνες ούτε εξυπηρετούν την ίδια λογική . Είναι προφανής λοιπόν η ύπαρξη επιμέρους νευροενδοκρινικών επιδράσεων σε κάθε μία από τις τρεις παραμέτρους . Δεν υπάρχει επομένως ενιαία νευροενδοκρινική ρύθμιση της (γενικότερης) λειτουργίας των μακροφάγων αλλά νευροενδοκρινική ρύθμιση των (επιμέρους) λειτουργιών των μακροφάγων .
6. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την λειτουργία των μονοκύτταρων φαγοκυττάρων πολλές φορές είναι συνυφασμένοι με τους ειδικούς μηχανισμούς Μεταγωγής Μηνύματος (Μηχανισμούς Δεύτερων Μηνυτών) που ελέγχουν την παραγωγή της κάθε μίας βιοχημικής παραμέτρου . Σε γενικές γραμμές , οι ουσίες που αυξάνουν την λειτουργία της Οδού της Φωσφολιπάσης C - κυτταροπλασματικού Ca^{*2} - Πρωτεϊνικής Κινάσης C ή που ενεργοποιούν τον παράγοντα NFκB επιτείνουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων . Οι ουσίες που αυξάνουν το cAMP προκαλούν μειωμένη παραγωγή H_2O_2 και αυξημένη παραγωγή NO . Επίσης υπάρχουν ουσίες που επιδρούν ευοδωτικά ή κατασταλτικά στην γονιδιακή έκφραση .
7. Αποτελέσματα που έχουν ιδιαίτερη σημασία ή που διαφέρουν από όσα έχουν ήδη παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές είναι τα εξής :



- Η ενεργοποίηση των περιτοναϊκών και των βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS προκαλεί την μείωση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης των κυττάρων αυτών , πιθανώς λόγω της εξωκύτωσης του ενζύμου στον μεσοκυττάριο χώρο .
- Η ενεργοποίηση των περιτοναϊκών και βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 250 units/ml INF γ μειώνει την ικανότητα παραγωγής H_2O_2 υπό την επίδραση Μυρισπικού Εστέρα Φορβόλης , ενώ στις 5 ώρες επώασης η ικανότητα αυτή είναι σημαντικά αυξημένη .
- Η Αδρεναλίνη δεν επηρεάζει την δραστηριότητα Οξίνης Φωσφατάσης στα ενεργοποιημένα με LPS περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα , ενώ αντίθετα την επηρεάζει στα ενεργοποιημένα με INF γ κύτταρα .
- Η Αδρεναλίνη προκαλεί χαρακτηριστικές μορφολογικές μεταβολές στα ενεργοποιημένα μακροφάγα , συγκεκριμένα μείωση του μεγέθους του κυττάρου και αύξηση της πολυπλοκότητας του πυρήνα του .
- Με την Ινσουλίνη διαπιστώθηκαν ελάχιστες επιδράσεις στα μονοπύρνα φαγοκύτταρα , ενώ με την Γλυκαγόνη παρατηρήθηκαν πολλές και ισχυρές επιδράσεις .
- Η Ινσουλίνη προκαλεί αύξηση του μεγέθους του πυρήνα των ενεργοποιημένων μακροφάγων .
- Οι επιδράσεις της Γλυκαγόνης δεν φαίνεται να διαμεσολαβούνται στα μακροφάγα από την οδό του cAMP , όπως συμβαίνει σε άλλα κύτταρα .
- Τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν διαφορετικές επιδράσεις ανάλογα με την δοσολογία τους .
- Τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν αύξηση του μεγέθους των μακροφάγων , λόγω αύξησης του κυτταροπλάσματός τους .
- Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ανταποκρίνονται στην χορήγηση Νευροπεπτιδίου Υ με την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης .
- Τα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ανταποκρίνονται στην χορήγηση PGD $_2$ με αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Οξειδίου , ενώ τα κύτταρα Kupffer ανταποκρίνονται στην χορήγηση PGD $_2$ με την αύξηση της δραστηριότητας Οξίνης Φωσφατάσης .

Γενικότερα , στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα μονοπύρνα φαγοκύτταρα υπόκεινται σε Νευροενδοκρινική ρύθμιση των επιμέρους λειτουργιών τους . Για την διερεύνηση αυτών των ρυθμιστικών επιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν μόνο τρεις από τους πολλούς αμυντικούς μηχανισμούς των μακροφάγων . Από την μελέτη μας και από την διεθνή βιβλιογραφία υποδεικνύεται ότι υπό την έλεγχο των νευροενδοκρινικών επιδράσεων , το σύνολο των επιμέρους λειτουργικών ιδιοτήτων των μακροφάγων (χημειοταξία , φαγοκυττάρωση , επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων , παραγωγή Κυτταροκινών , Αυξητικών Παραγόντων και Εικοσανοειδών , έκκριση Ελευθέρων Ριζών και Ενζύμων κ.λ.π.) μεταβάλλονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προσαρμόζεται η λειτουργία των μονοπύρνων φαγοκυττάρων στις άμεσες και μακροχρόνιες ανάγκες του οργανισμού .



ΠΕΡΙΛΗΨΗ .

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στην υπόθεση ότι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα υπόκεινται σε Νευροενδοκρινική ρύθμιση της λειτουργίας τους . Η υπόθεση αυτή βασίστηκε σε δύο παρατηρήσεις :

1) Στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων υπάρχουν υποδοχείς για ορμόνες και για αυτακοειδή και 2) Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα που υποδεικνύουν ότι ουσίες που δεν ήταν Κυτταροκίνες ή Αυξητικοί Παράγοντες προκαλούσαν επιδράσεις στην λειτουργία των μακροφάγων . Αν η αρχική αυτή υπόθεση αποδεικνυόταν ορθή , θα βοηθούσε στην εξήγηση ορισμένων φαινομένων , όπως το γιατί ορισμένες ενδοκρινικές ή ψυχολογικές διαταραχές επηρεάζουν την εξέλιξη των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αντιδράσεων .

Για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή εκτελέστηκαν μια σειρά από βιοχημικά και μορφολογικά πειράματα . Με την βοήθεια μεθόδων έκπλυσης ή ενζυματικής πέψης απομονώθηκαν περιτοναϊκά , βρογχοκυψελιδικά και ηπατικά μακροφάγα από επίμους Wistar ηλικίας περίπου 3 μηνών . Τα κύτταρα αυτά τοποθετήθηκαν σε βραχύχρονες πρωτογενείς καλλιέργειες και επώαστηκαν με έναν ενεργοποιητή (Ενδοτοξίνη ή Ιντερφερόνη-γ) και έναν τροποποιητή . Οι τροποποιητές είτε ήταν ορμόνες του Stress (Αδρεναλίνη, Ντοπαμίνη, Γλυκαγόνη, Ινσουλίνη, Νευροπεπτιδιο Υ, Δεξαμεθαζόνη) ή ήταν ορμόνες της φλεγμονής (αυτακοειδή : Σεροτονίνη, Ισταμίνη, PGD_2 , PGE_2) . Η 1.25-Διϋδρόξυ-Βιταμίνη D_3 χρησιμοποιήθηκε σε άλλα πειράματα σαν ενεργοποιητής και σε άλλα σαν τροποποιητής . Με το τέλος των επώασεων προσδιοριζόταν μια συγκεκριμένη βιοχημική παράμετρος (όπως η παραγωγή H_2O_2 ή NO και η δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης) ή τα μακροφάγα υπόκειντο σε χρώση Giemsa και μορφολογική παρατήρηση . Τα αποτελέσματα των βιοχημικών πειραμάτων επεξεργάζονταν με το t-test του Student .

Τα σημαντικότερα ευρήματα σχετικά με την ενεργοποίηση των μακροφάγων ήταν τα εξής :

- Η παραγωγή H_2O_2 από τα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα παρουσίασε μείωση μετά από 14 ώρες επώασης με 250 units/ml Ιντερφερόνης-γ .
- Παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης των περιτοναϊκών και βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων μετά από επώαση 14 ωρών με 2 $\mu g/ml$ LPS . Η μείωση της μετρούμενης ενζυματικής δραστηριότητας οφείλεται πιθανώς στην εξωκύτωση του προς τον μεσοκυττάριο χώρο . Η επώαση των περιτοναϊκών μακροφάγων με 0.2 $\mu g/ml$ LPS για 14 ώρες προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας της Φωσφατάσης , πιθανώς λόγω αύξησης του ρυθμού παραγωγής της .
- Η επώαση των περιτοναϊκών και βρογχοκυψελιδικών μακροφάγων επί 14 ώρες με 2.5×10^{-7} M της Βιταμίνης D_3 δεν επηρέασε την δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης , ενώ προκάλεσε αύξηση της παραγωγής NO στα περιτοναϊκά μακροφάγα και μείωση της παραγωγής NO στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα που αφορούν την τροποποίηση των λειτουργιών των μακροφάγων που ενεργοποιήθηκαν με LPS ή INFγ ήταν τα εξής :

- Η Αδρεναλίνη , η Ντοπαμίνη και η PGE_2 είναι τρεις παράγοντες που προκαλούν την αύξηση του cAMP . Αποδείχτηκε ότι μειώνουν την παραγωγή H_2O_2 , ενώ ταυτόχρονα επιτείνουν την παραγωγή Νιτρικού Οξειδίου .



- Η Ινσουλίνη , μια ορμόνη που προκαλεί την ελάττωση του cAMP , οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής H_2O_2 .
- Οι επιδράσεις της Αδρεναλίνης στην παραγωγή H_2O_2 και NO από περιτοναϊκά μακροφάγα ήταν παρόμοιες για τα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με LPS και για εκείνα που ενεργοποιήθηκαν με Ιντερφερόνη- γ . Σε ότι αφορά την μορφολογία , η Αδρεναλίνη αυξάνει την πολυπλοκότητα του πυρήνα , προκαλώντας την λόβωσή του . Επίσης μειώνει το μέγεθος του κυττάρου .
- Η Γλυκαγόνη προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις στα περιτοναϊκά και ηπατικά μακροφάγα , δηλαδή την μείωση της παραγωγής NO και την αύξηση της δραστηριότητα Ώξινης Φωσφατάσης . Όμως η Γλυκαγόνη ασκεί τις αντίθετες επιδράσεις στα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .
- Η Δεξαμεθαζόνη επηρεάζει την παραγωγή H_2O_2 ευοδωτικά ή ανασταλτικά ανάλογα με την δοσολογία της αλλά προκαλεί σταθερά την αναστολή της παραγωγής Νιτρικού Ώξειδίου . Η Δεξαμεθαζόνη προκαλεί την αύξηση του κυτταροπλάσματος στα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά και βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα .
- Η Σεροτονίνη ασκεί γενικά ευοδωτική επίδραση στις λειτουργίες των ενεργοποιημένων μακροφάγων . Η Ισταμίνη ασκεί ελάχιστες επιδράσεις στα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα .
- Τα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα ανταποκρίνονται στο Νευροπεπτιδίο Y με την αύξηση της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Επίσης ανταποκρίνονται στην PGD₂ με αύξηση της παραγωγής Νιτρικού Ώξειδίου .
- Όταν η Βιταμίνη D3 χορηγείται στα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα προκαλεί αύξηση της παραγωγής NO και της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Όταν χορηγείται στα ενεργοποιημένα βρογχοκυψελιδικά μακροφάγα προκαλεί μείωση της παραγωγής Νιτρικού Ώξειδίου και της δραστηριότητας Ώξινης Φωσφατάσης . Στα κύτταρα Kupffer δεν διαπιστώθηκε να προκαλεί μεταβολές κάποιας παραμέτρου .

Οι προαναφερθείσες επιδράσεις μπορούν να εξηγηθούν εν μέρει αν συσχετιστούν με τις Οδούς Μεταγωγής Μηνύματος τις οποίες οι τροποποιητές μπορούν να επηρεάσουν . Έτσι , οι ουσίες που διεγείρουν την οδό της Φωσφολιπάσης C - κυτταροπλασματικού Ca^{+2} προκαλούν την επίταση των δραστηριοτήτων των μακροφάγων . Οι ουσίες που αυξάνουν το cAMP μειώνουν την παραγωγή H_2O_2 και αυξάνουν την παραγωγή NO . Αυτές οι αντίθετες επιδράσεις του cAMP στην παραγωγή του H_2O_2 και του NO είναι πιθανό να εξυπηρετούν τον ίδιο σκοπό , αφού το NO μειώνει την παραγωγή H_2O_2 μέσω αναστολής της NADPH-Ώξειδάσης . Εξάλλου από την διεθνή βιβλιογραφία είναι πιθανό αυτές οι αντίθετες επιδράσεις να ελέγχουν την έναρξη των Αποπτωτικών φαινομένων .

Επίσης ορισμένες από αυτές τις επιδράσεις είναι πιθανό να αποτελούν τμήματα γενικότερων αυτοπεριοριστικών μηχανισμών του σώματος , οι οποίοι να εμποδίζουν την ανάπτυξη ιστικής βλάβης κατά την διάρκεια έντονων φλεγμονωδών αντιδράσεων ή να κατευθύνουν τις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις κατά τρόπο ωφελιμότερο για τον οργανισμό .

Η παρούσα διδακτορική διατριβή καταλήγει σε ορισμένα συμπεράσματα που θα μπορούσαν :

(1) να χρησιμεύσουν στην διεκρίνιση του ρόλου των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στον Νευρο-Ενδοκρino-Ανοσολογικό άξονα και

(2) να συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών Δευτέρων Μηνυτόρων που διαμεσολαβούν την ρύθμιση της λειτουργίας των ενεργοποιημένων μακροφάγων .



THE REGULATION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTE ACTIVATION . BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF NEUROENDOCRINE FACTORS ON MONONUCLEAR PHAGOCYTES ACTIVATED WITH ENDOTOXIN OR INTERFERON-GAMMA .

DIMITRIOS JOHN KONDOMERKOS , M.D.

SUMMARY .

The working hypothesis of the present thesis is that Mononuclear Phagocytes are subject to Neuroendocrine modulation . This allegation is based on reports that receptors for hormones and autacoids exist on the cell membrane of macrophages and also that certain substances that were not cytokines affected macrophage functions through yet undefined biochemical pathways . If the working hypothesis was proven correct it would contribute in understanding the reasons that cause endocrine and psychological imbalances to affect the inflammatory and immune responses .

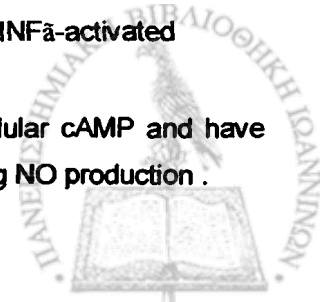
To test this working hypothesis , a series of biochemical and morphological experiments were undertaken . Peritoneal , bronchoalveolar and hepatic macrophages from 3-month old Wistar rats were obtained by lavage or by enzymatic degradation methods . Short-term primary cell cultures were established and the macrophages were incubated with an activator (Endotoxin or Interferon- γ) and a modulator . The modulators were either Stress hormones (Adrenaline, Dopamine, Glucagon, Insulin, Neuropeptide Y, Dexamethasone) or Autacoids (Serotonin, Histamine, PGD₂, PGE₂) . 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ was applied both as an activator and a modulator . After the incubations were completed , a specific function was assayed (production of Hydrogen Peroxide or Nitric Oxide , cellular activity of Acid Phosphatase) or the cells were stained with Giemsa and morphological observations were carried out . The results that derived from biochemical methods were evaluated by Student's t-test .

The most interesting findings concerning macrophage activation were as follows :

- H₂O₂ production by peritoneal and bronchoalveolar macrophages decreased after a 14 hour period of incubation with 250 units/ml of Interferon- α .
- The activity of Acid Phosphatase in peritoneal and bronchoalveolar macrophages decreases from control values after a 14 hour incubation with 2 ig/ml of LPS , presumably due to exocytosis of the enzyme into the extracellular milieu . Incubation of peritoneal macrophages with 0.2 ig/ml of LPS for 14 hours causes an increase of enzyme activity , possibly due to a high production rate .
- A 14 hour incubation of peritoneal or bronchoalveolar macrophages with 2.5×10^{-7} M of Vitamin D₃ does not affect the activity of Acid Phosphatase , while causing an increase of NO production in peritoneal macrophages and a decrease of NO production in bronchoalveolar macrophages .

The most interesting findings concerning the modulation of LPS-activated or INF α -activated macrophage functions were as follows :

- Adrenaline , Dopamine and PGE₂ are three agents that cause elevation of cellular cAMP and have proven to cause an decrease in H₂O₂ production while simultaneously augmenting NO production .



- Insulin , a hormone that decreases cellular cAMP levels , caused an increase in H_2O_2 production .
- The effects of Adrenaline on H_2O_2 and NO production by peritoneal macrophages were similar for cells activated both by LPS or by Interferon- γ . Also Adrenaline caused increased complexity of the nucleus such as nuclear lobulation and a decrease in cell size .
- Glucagon causes similar effects on peritoneal and hepatic macrophages (decreased NO production and increased Acid Phosphatase activity) but has the opposite effects on bronchoalveolar cells .
- Dexamethasone affects H_2O_2 production by activated macrophages in a biphasic dose-dependent manner , but steadily inhibits Nitric Oxide production . Dexamethasone also causes an increase of macrophage cytoplasm .
- Serotonin generally has a potentiating effect of activated macrophage functions . Histamine has very few effects on macrophage functions at all .
- Bronchoalveolar macrophages respond to Neuropeptide Y by increased Acid Phosphatase activity , and to PGD_2 by increased Nitric Oxide production .
- As a modulator of macrophage activation , Vitamin D3 causes an increase in NO production and Acid Phosphatase activity in peritoneal macrophages , a decrease of NO production and Acid Phosphatase activity in bronchoalveolar macrophages , yet has no effect on Kupffer cells .

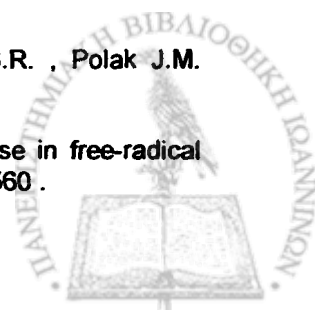
The above mentioned effects on macrophage functions can be partially explained by relating them to the Second Messenger pathways that the modulators affect . Hormones and Autacoids that are capable of activating the Phospholipase C - Ca^{+2} - Protein Kinase C second messenger pathway seem to augment macrophage activation . There is strong evidence that Cyclic AMP controls H_2O_2 and NO production . Elevation of cAMP levels produce a decrease in H_2O_2 production and an increase in NO production . The opposite directions of the above changes in H_2O_2 and NO production are difficult to explain . It may be that both radicals serve the same biochemical process . Thus , elevations in cAMP levels decrease H_2O_2 production and increase NO production , which in turn directly inhibits membrane NADPH-oxidase and further decreases H_2O_2 . Another possibility is that the decrease in H_2O_2 production leads to inhibition of phagocytic activity and the increase in NO production leads to apoptotic death of macrophages and elimination of phagocytosis .

Also many of these effects seem to be parts of inhibitory circuits that prevent tissue damage by intense inflammatory reactions or to serve guiding the immune reaction in a more beneficial manner for the host (Neuro-Endocrine Immune Modulation) .

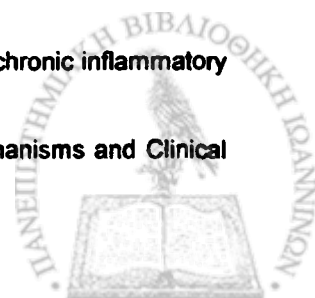


BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ :

- 1) Abe E. , Shiina Y. , Miyaura C. , Tanaka H. , Hayashi T. , Kanegasaki S. , Saito M. , Nishii Y. , DeLuca H. , Suda T. Activation and fusion induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and their relation in alveolar macrophages . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) , 81 : 7112 - 7116 .
- 2) Abrass C.K. , O'Connor S.W. , Scarpace P.J. , Abrass I.B. Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage . *J. Immunol.* (1985) , 135 : 1338 - 1341 .
- 3) Adams D.O. The granulomatous inflammatory response . *Am. J. Pathol.* (1976) , 84 : 165 - 191 .
- 4) Adams D.O. , Hamilton T.A. The cell biology of macrophage activation . *Ann. Rev. Immunol.* (1976) , 2 : 283 - 318 .
- 5) Adams D.O. Molecular interactions in macrophage activation . *Immunol. Today* (1989) , 10 : 33 - 35 .
- 6) Adams J.S. , Sharma O.P. , Gacad M.A. , Singer F.R. Metabolism of 25-Hydroxyvitamin D₃ by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis . *J. Clin. Invest.* (1983) , 72 : 1856 - 1860 .
- 7) Adams J.S. , Gacad M.A. Characterization of 1 α -Hydroxylation of Vitamin D₃ sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis . *J. Exp. Med.* (1985) , 161 : 755 - 765 .
- 8) Adams L.B. , Hibbs J.B. Jr. , Taintor R.R. , Krahenbuhl J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii* . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2725 - 2729 .
- 9) Aderem A.A. , Scott W.A. , Cohn Z.A. Evidence for sequential signals in the induction of the arachidonic acid cascade in macrophages . *J. Exp. Med.* (1986) , 163 : 139 - 154 .
- 10) Aderem A.A. , Cohen D.S. , Wright S.D. , Cohn Z.A. Bacterial lipopolysaccharides prime macrophages for enhanced release of arachidonic acid metabolites . *J. Exp. Med.* (1986) , 164 : 165 - 179 .
- 11) Aderem A.A. Protein myristoylation as intermediate step during signal transduction in macrophages : its role in arachidonic acid metabolism and in responses to interferon - γ . *J. Cell Sci.* (1988), Suppl.9 , 151 - 167 .
- 12) Aderem A.A. , Albert K.A. , Keum M.M. , Wang J.K.T. , Greengard P. , Cohn Z.A. Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for Protein Kinase C . *Nature* (1988) , 332 : 362 - 364 .
- 13) Aderem A.A. Signal transduction and the actin cytoskeleton : the roles of MARCKS and Profilin . *TIBS* (1992) , 17 : 439 - 443 .
- 14) Aggarwal B.B. , Mehta K. Determination and regulation of Nitric Oxide production from macrophages by lipopolysaccharides , cytokines and retinoids . *Meth. Enzymol.* (1996) , 269 : 166 - 171 .
- 15) Albert D.H. , Snyder F. Biosynthesis of 1-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho-choline (Platelet Activating Factor) from 1- Alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phospho-choline by rat alveolar macrophages . *J. Biol. Chem.* (1983) , 258 : 97 - 102 .
- 16) Albina J.E. , Cui S. , Mateo R.B. , Reichner J.S. Nitric Oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages . *J. Immunol.* (1993) , 150 : 5080 - 5085 .
- 17) Allen Y.S. , Adrian T.E. , Allen J.M. , Tatemoto K. , Crow T.J. , Bloom S.R. , Polak J.M. Neuropeptide Y distribution in the rat brain . *Science* (1983) , 221 : 877 - 879 .
- 18) Alvarez E. , Conde M. , Machado A. , Sobrino F. , Santa Maria C. Decrease in free-radical production with age in rat peritoneal macrophages . *Biochem. J.* (1995) , 312 : 555 - 560 .

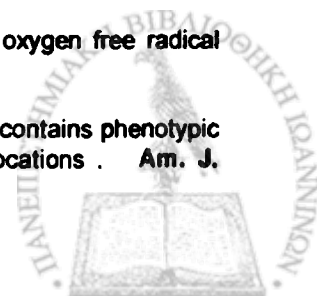


- 19) Anderson C.L. , Looney R.J. , Culp D.J. , Ryan D.H. , Fleit H.B. , Utell M.J. , Frampton M.W. , Manganiello P.D. , Guyre P.M. Alveolar and peritoneal macrophages bear three distinct classes of Fc receptors for IgG . *J. Immunol.* (1990) , 145 : 196 - 201 .
- 20) Antonov A.S. , Munn D.H. , Kolodgie F.D. , Virmani R. , Gerrity R.G. Aortic endothelial cells regulate proliferation of human monocytes in vitro via a mechanism synergistic with Macrophage Colony Stimulating Factor . *J. Clin. Invest.* (1997) , 99 : 2867 - 2876 .
- 21) Appelmans F. , Wattiaux R. , DeDuve C. Tissue fractionation studies : 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in the rat liver . *Biochem. J.* (1955) , 59 : 438 - 445 .
- 22) Arai K. , Lee F. , Miyajima A. , Miyatake S. , Arai N. , Yokota T. Cytokines : Coordinators of immune and inflammatory responses . *Annu. Rev. Biochem.* (1990) , 59 : 783 - 836 .
- 23) Araki N. , Johnson M.T. , Swanson J.A. A role for Phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages . *J. Cell Biol.* (1996) , 135 : 1249 - 1260 .
- 24) Aratake Y. , Tamura K. , Kotani T. , Ohtaki S. Application of the Avidin-Biotin-complex method for the light microscopic analysis of lymphocyte subsets with monoclonal antibodies on air-dried smears . *Acta Cytologica* (1988) , 32 : 117 - 122 .
- 25) Aronson N.N. Effects of glucagon and insulin on liver lysosomes . *Life Sciences* (1980) , 27 : 95 - 104 .
- 26) Asaoka Y. , Nakamura S. , Yoshida K. , Nishizuka Y. Protein kinase C , calcium and phospholipid degradation . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 414 - 417 .
- 27) Asmis R. , Randriamampita C. , Tsien R.Y. , Dennis E.A. Intracellular Ca²⁺ , inositol 1,4,5-triphosphate and additional signalling by platelet-activating factor of prostaglandin E₂ formation in P388D₁ macrophage-like cells . *Biochem. J.* (1994) , 298 : 543 - 551 .
- 28) Austyn J.M. , Wood K.J. , editors . Chapter 10.4 : Macrophages . *In* : Principles of Cellular and Molecular Immunology . Oxford University Press (1993) Oxford , New York , Toronto .
- 29) Baek H.S. , Yoon J.W. Direct involvement of macrophages in destruction of β -cells leading to development of diabetes in virus-infected mice . *Diabetes* (1991) , 40 : 1586 - 1597 .
- 30) Baeuerle P.A. , Baltimore D. I κ B : A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor . *Science* (1988) , 242 : 540 - 546 .
- 31) Baldwin G.C. , Fleischmann J. , Chung Y. , Koyanagi Y. , Chen I.S.Y. , Golde D.W. Human Immunodeficiency Virus causes mononuclear phagocyte dysfunction . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1990) , 87 : 3933 - 3937 .
- 32) Bar R.S. , Gordens P. , Roth J. , Kahn C.R. , de Meyts P. Fluctuations in the affinity and concentration of Insulin receptors on circulating monocytes of obese patients . *J. Clin. Invest.* (1976) , 58 : 1123 - 1135 .
- 33) Bar R.S. , Kahn C.R. , Koren H.S. Insulin inhibition of antibody-dependent cytotoxicity and insulin receptors in macrophages . *Nature* (1977) , 265 : 632 - 634 .
- 34) Barbour G.L. , Coburn J.W. , Slatopolsky E. , Norman A.W. , Horst R.L. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis : Evidence for extrarenal generation of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ . *N. Engl. J. Med.* (1981) , 305 : 440 - 443 .
- 35) Barnard E.A. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 368 - 374 .
- 36) Barnes P.J. , Karin M. Nuclear Factor - κ B . A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases . *N. Engl. J. Med.* (1997) , 336 : 1066 - 1071 .
- 37) Barnes P.J. , Rodger I.W. , Thomson N.C. , editors . Asthma : Basic Mechanisms and Clinical Management , 3rd edition . Academic Press , (1998) . San Diego .

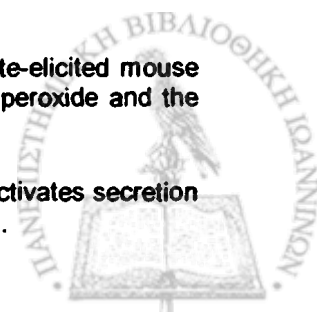


- 38) Bath P.M.W. , Mayston S.A. , Martin J.F. Endothelin and PDGF do not stimulate peripheral blood monocyte chemotaxis , adhesion to endothelium and superoxide production . **Exp. Cell Res.** (1990) , 187 : 339 - 342 .
- 39) Baud L. , Hagege J. , Sraer J. , Rondeau E. , Perez J. , Ardaillou R. Reactive Oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis is associated with stimulation of Lipoxigenase activity . **J. Exp. Med.** (1983) , 158 : 1836 - 1852 .
- 40) Baumgartner J.D. , Heumann D. , Gerain J. , Weinbreck P. , Grau G.E. , Glauser M.P. Association between the protective effect of anti-lipoplysaccharide (LPS) antibodies and suppression of LPS-induced Tumor Necrosis Factor - α and Interleukin 6 . **J. Exp. Med.** (1990) , 171 : 889 - 896 .
- 41) Baykov A.A. , Evtushenko O.A. , Avaeva S.M. A Malachite Green procedure for orthophosphate determination and its use in Alkaline Phosphatase-based Enzyme Immunoassay . **Analytical Biochem.** (1988) , 171 : 266 - 270 .
- 42) Bayne E.K. , Rupp E.A. , Limjuco G. , Chin J. , Schmidt J.A. Immunocytochemical detection of Interleukin-1 within stimulated human monocytes . **J. Exp. Med.** (1986) , 163 : 1267 - 1280 .
- 43) Bell R.M. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers . **Cell** (1986) , 45 : 631 - 632 .
- 44) Berliner J.A. , Heinecke J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis . **Free Radic. Biol. Med.** (1996) , 20 : 707 - 727 .
- 45) Bermudez L.E. , Wu M. , Young L.S. Effect of stress-related hormones on macrophage receptors and response to Tumor Necrosis Factor . **Lymphokine Res.** (1990) , 9 : 137 - 145 .
- 46) Bernardini R. , Kamilaris T.C. , Calogero A.E. , Johnson E.O. , Gomez M.T. , Gold P.W. , Chrousos G.P. Interactions between Tumor Necrosis Factor- α , hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone and Adrenocorticotropin secretion in the rat . **Endocrinology** (1990) , 126 : 2876 - 2881 .
- 47) Bernstein M.S. , Tong-Starksen S.E. , Locksley R.M. Activation of human monocyte-derived macrophages with lipopolysaccharide decreases Human Immunodeficiency Virus replication in vitro at the level of gene expression . **J. Clin. Invest.** (1991) , 88 : 540 - 545 .
- 48) Beretta A. , Grassi F. , Pelagi M. , Clivio A. , Parravicini C. , Giovanazzo G. , Andronico F. , Lopalco L. , Verani P. , Butto S. , Titti F. , Rossi G.B. , Viale G. , Ginelli E. , Siccardi A.G. HIV-env glycoprotein shares a cross-reacting epitope with a surface protein present on activated human monocytes and involved in antigen presentation . **Eur. J. Immunol.** (1987) , 17 : 1793 - 1798 .
- 49) Bernton E.W. , Beach J.E. , Holaday J.W. , Smallridge R.C. , Fein H.G. Release of multiple hormones by a direct action of Interleukin-1 on pituitary cells . **Science** (1987) , 238 : 519 - 521 .
- 50) Berridge M.J. The molecular basis of communication within the cell . **Sci. American** (1985) , 253 : 142 - 152 .
- 51) Berridge M.J. , Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signalling . **Nature** (1989) , 341 : 197 - 205 .
- 52) Besedovsky H. , Del Rey A. , Sorkin E. , Dinarello C.A. Immunoregulatory feedback between Interleukin-1 and glucocorticoid hormones . **Science** (1986) 233 : 652 - 654 .
- 53) Beutler B. , Cerami A. Tumor necrosis , cachexia shock and inflammation : a common mediator . **Ann. Rev. Biochem.** (1988) , 57 : 505 - 518 .
- 54) Bhatena S.J. , Louie J. , Schechter G.P. , Redman R.S. , Wahl L. , Recant L. Identification of Human Mononuclear Leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon . **Diabetes** (1981) , 30 : 127 - 131 .
- 55) Bhatnagar R. , Schirmer R. , Ernst M. , Decker K. Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in vitro . **Eur. J. Biochem.** (1981) , 119 : 171 - 175 .
- 56) Billiau A. Gamma-interferon : the match that lights the fire ? **Immunol. Today** (1988) , 9 : 37 - 40 .

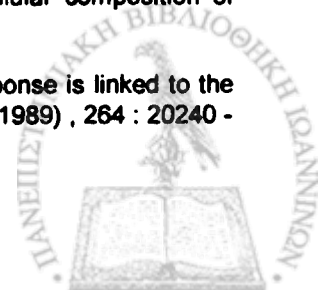
- 57) Birmelin M. , Decker K. Ca^{2+} flux as an initial event in phagocytosis by rat Kupffer cells . *Eur. J. Biochem.* (1983) , 131 : 539 - 543 .
- 58) Birmelin M. , Decker K. Synthesis of prostanoids and cyclic nucleotides by phagocytosing rat Kupffer cells . *Eur. J. Biochem.* (1984) , 142 : 219 - 225 .
- 59) Blackwell G.J. , Carnuccio R. , DiRosa M. , Flower R.J. , Parente L. , Persico P. Macro cortin : a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids . *Nature* (1980) , 287 : 147 - 149 .
- 60) Bloom B.R. , Diamond B. , Muschel R. , Rosen N. , Schneck J. , Damiani G. , Rosen O. , Scharff M. Genetic approaches to the mechanism of macrophage functions . *Fed. Proc.* (1978) , 37 : 2765 - 2771
- 61) Bloom W. , Fawcett D.W. , editors . *A Textbook of Histology* , tenth edition . W.B. Saunders (1975) . Philadelphia , London , Toronto .
- 62) Bobik A. , Campbell J.H. Vascular derived growth factors : cell biology , pathophysiology and pharmacology . *Pharmacol. Rev.* (1993) , 45 : 1 - 42 .
- 63) Bodel P.T. , Nichols B.A. , Bainton D.F. Differences in peroxidase localization of rabbit peritoneal macrophages after surface adherence . *Am. J. Pathol.* (1978) , 91 : 107 - 118 .
- 64) Bonney R.J. , Wightman P.D. , Davies P. , Sadowski S.J. , Kuehl F.A. , Humes J.L. Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages . *Biochem. J.* (1978) , 176 : 433 - 442 .
- 65) Boraschi D. , Ghezzi P. , Pasqualetto E. , Salmona M. , Nencioni L. , Soldateschi D. , Villa L. , Tagliabue A. Interferon decreases production of hydrogen peroxide by macrophages : correlation with reduction of suppressive capacity and of anti-microbial activity . *Immunology* (1983) , 50 : 359 - 368 .
- 66) Boraschi D. , Censini S. , Bartalini M. , Scapigliati G. , Barbarulli G. , Vicenzi E. , Donati M.B. , Tagliabue A. Interferon inhibits prostaglandin biosynthesis in macrophages : effects on arachidonic acid metabolism . *J. Immunol.* (1984) , 132 : 1987 - 1992 .
- 67) Bosch H. Van Den . Intracellular Phospholipases A . *Biochim. Biophys. Acta* (1980) , 604 : 191 - 246 .
- 68) Bourne H.R. , Lichtenstein L.M. , Melmon K.L. , Henney C.S. , Weinstein Y. , Shearer G.M. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP . *Science* (1974) , 184 : 19 - 28 .
- 69) Brandwein S.R. Regulation of interleukin 1 production by mouse peritoneal macrophages . *J. Biol. Chem.* (1986) , 261 : 8624 - 8632 .
- 70) Brederoo P. , Daems W.Th. Cell coat , worm-like structures and labyrinths in guinea pig resident and exudate peritoneal macrophages , as demonstrated by an abbreviated fixation procedure for electron microscopy . *Z. Zellforsch.* (1972) , 126 : 135 - 156 .
- 71) Broxmeyer H.E. , Sherry B. , Lu L. , Cooper S. , Carow C. , Wolpe S.D. , Cerami A. Myelopoietic enhancing effects of murine Macrophage Inflammatory Proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells . *J. Exp. Med.* (1989) , 170 : 1583 - 1594 .
- 72) Broug - Holub E. , Kraal G. Dose- and time-dependent activation of rat alveolar macrophages by glucocorticoids . *Clin. Exp. Immunol.* (1996) , 104 : 332 - 336 .
- 73) Bruijnzeel - Koomen C.A.F.M. , Hoefsmit E.C.M. , editors . *Immunopharmacology of Macrophages and other Antigen - Presenting Cells* . Academic Press (1994) . London , San Diego , New York , Boston , Sydney , Tokyo , Toronto .
- 74) Brunk U. , Cadenas E. The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology . *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* (1988) , 96 : 3 - 13 .
- 75) Buckley P.J. , Smith M.R. , Braverman M.F. , Dickinson S.A. Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations . *Am. J. Pathol.* (1987) , 128 : 505 - 520 .



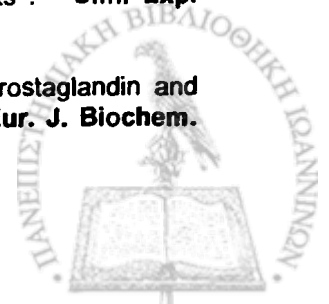
- 76) Burt A.D. , Le Bail B. , Balabaud C. , Bioulac-Sage P. Morphologic investigation of sinusoidal cells . *Semin. Liver Dis.* (1993) , 13 : 21 - 38 .
- 77) Butcher R.W. Role of cyclic AMP in hormone actions . *N. Engl. J. Med.* (1968) , 279 : 1378 - 1384 .
- 78) Cadena D.L. , Gill G.L. Receptor tyrosine kinases . *FASEB J.* (1992) , 6 : 2332 - 2337 .
- 79) Cantley C.L. , Auger K.R. , Carpenter C. , Duckworth B. , Graziani A. , Kapeller R. , Soltoff S. Oncogenes and signal transduction . *Cell* (1991) , 64 : 281 - 302 .
- 80) Carpenter G. Receptor tyrosine kinase substrates : src homology domains and signal transduction . *FASEB J.* (1992) , 6 : 3283 - 3289 .
- 81) Carr K. , Carr I. How cells settle on glass : a study by light and scanning electron microscopy of some properties of normal and stimulated macrophages . *Z. Zellforsch.* (1970) , 105 : 234 - 241 .
- 82) Catterall J.R. , Sharma S.D. , Remington J.S. Oxygen-independent killing by alveolar macrophages . *J. Exp. Med.* (1986) , 163 : 1113 - 1131 .
- 83) Celada A. , Schreiber R.D. Internalization and degradation of receptor-bound interferon - γ by murine macrophages . *J. Immunol.* (1987) , 139 : 147 - 153 .
- 84) Cerami A. , Beutler B. The role of cachectin/T.N.F. in endotoxic shock and cachexia . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 28 - 31 .
- 85) Chao W. , Liu H. , Hanahan D.J. , Olson M.S. Protein tyrosine phosphorylation and regulation of the receptor for platelet-activating factor in rat Kupffer cells . *Biochem. J.* (1992) , 288 : 777 - 784 .
- 86) Chen C.C. , Wang J.K. , Lin S.B. Antisense Oligonucleotides targeting Protein Kinase C - α , - β 1 or - δ but not - η inhibit Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Synthase expression in RAW 264.7 macrophages : Involvement of a Nuclear Factor κ B - dependent mechanism . *J. Immunol.* (1998) , 161 : 6206 - 6214 .
- 87) Chrousos G.P. , Gold P.W. The concept of stress and stress system disorders . *J.A.M.A.* (1992) , 267 : 1244 - 1252 .
- 88) Chrousos G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation . *N. Engl. J. Med.* (1995) , 332 : 1351 - 1362 .
- 89) Clancy R.M. , Leszczynska-Piziak J. , Abramson S.B. Nitric Oxide , an Endothelial Cell Relaxation Factor , inhibits Neutrophil Superoxide production via a Direct Action on the NADPH Oxidase . *J. Clin. Invest.* (1992) , 90 : 1116 - 1121 .
- 90) Claudio E. , Segade F. , Wrobel K. , Ramos S. , Lazo P.S. Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1995) , 13 : 547 - 554 .
- 91) Cline M.J. , Lehrer R.I. , Territo M.C. , Golde D.W. Monocytes and macrophages : functions and diseases . *An. Intern. Med.* (1978) , 88 : 78 - 88 .
- 92) Cluzel M. , Liu M.C. , Goldman D.W. , Undem B.J. , Lichtenstein M. Histamine acting on a type 1 (H1) receptor increases β -glucuronidase release from human lung macrophages . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1990) , 3 : 603 - 609 .
- 93) Cohen M.S. , Ryan J.L. , Root R.K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages : the relationship between oxygen , superoxide and hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation . *J. Immunol.* (1981) , 127 : 1007 - 1011 .
- 94) Cohen M.S. , Mesler D.E. , Snipes R.G. , Gray T.K. 1,25-dihydroxyvitamin D3 activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes . *J. Immunol.* (1986) , 136 : 1049 - 1053 .



- 95) Cohen P. Signal integration at the level of protein kinases , protein phosphatases and their substrates . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 408 - 413 .
- 96) Cohn Z.A. , Wiener E. The particulate hydrolases of macrophages : I. Comparative enzymology , isolation and properties . *J. Exp. Med.* (1963) , 118 : 991 - 1008 .
- 97) Cohn Z.A. , Wiener E. The particulate hydrolases of macrophages : II . Biochemical and morphological response to particle ingestion . *J. Exp. Med.* (1963) , 118 : 1009 -1019 .
- 98) Cohn Z.A. , Benson B. The differentiation of mononuclear phagocytes : Morphology , cytochemistry and biochemistry . *J. Exp. Med.* (1965a) , 121 : 153 - 169 .
- 99) Cohn Z.A. , Benson B. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes : III. The reversibility of granule and hydrolytic enzyme formation and the turnover of granule constituents . *J. Exp. Med.* (1965b) , 122 : 455 - 466 .
- 100) Cohn Z.A. , Hirsch J.G. , Fedorko M.E. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes : IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture . *J. Exp. Med.* (1966) , 123 : 747 - 756 .
- 101) Cohn Z.A. , Fedorko M.E. , Hirsch J.G. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes : V. The formation of macrophage lysosomes . *J. Exp. Med.* (1966) , 123 : 757 - 766 .
- 102) Cohn Z.A. The activation of mononuclear phagocytes : Fact , fancy and future . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 813 - 816 .
- 103) Conrad G.W. , Rink T.J. Platelet activating factor raises intracellular calcium ion concentration in macrophages . *J. Cell Biol.* (1986) , 103 : 439 - 450 .
- 104) Cooper P.H. , Mayer P. , Baggiolini M. Stimulation of phagocytosis in bone marrow - derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide : correlation with biochemical and functional parameters . *J. Immunol.* (1984) , 133 : 913 - 922 .
- 105) Cope W. , Dilly S.A. Kupffer cell numbers during human development . *Clin. Exp. Immunol.* (1990) , 81 : 485 - 488 .
- 106) Cosentino F. , Katusic Z.S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries . *Circulation* (1995) , 91 : 139 - 144 .
- 107) Cotran R.S. , Kumar V. , Robbins S.L. , editors . *Robbins Pathologic Basis of Disease* , fourth edition . W.B. Saunders (1989) . International Editions . Philadelphia , London , Toronto , Montreal , Sydney , Tokyo .
- 108) Crocker P.R. , Gordon S. Isolation and characterization of Resident Stromal Macrophages and haematopoietic cell clusters from mouse bone marrow . *J. Exp. Med.* (1985) , 162 : 993 - 1014 .
- 109) Crocker P.R. , Morris L. , Gordon S. Novel cell surface adhesion receptors involved in interactions between stromal macrophages and haematopoietic cells . *J. Cell Sci.* (1988) , Suppl. 9 , 185 - 206 .
- 110) Crofton R.W. , Diesselhoff -den Dulk M.M.C. , Furth R. Van. The origin , kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal , steady state . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 1 - 17 .
- 111) Daems W.Th. , Brederoo P. Electron microscopical studies on the structure , phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig . *Z. Zellforsch.* (1973) , 144 : 247 - 297 .
- 112) Daems W.Th. , Koerten H.K. The effects of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudates in the mouse . *Cell Tiss. Res.* (1978) , 190 : 47 - 60 .
- 113) Daniel-Issakani S. , Spiegel A.M. , Strulovici B. Lipopolysaccharide response is linked to the GTP Binding Protein , Gi2 , in the Promonocytic cell line U-937 . *J. Biol. Chem.* (1989) , 264 : 20240 - 20247 .



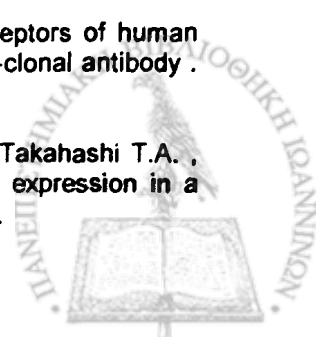
- 114) Darnell J. , Lodish H. , Baltimore D. , editors . *Molecular Cell Biology* , second edition . Scientific American Books , W.H. Freeman and Co. (1990) . New York .
- 115) Davies P. , Bailey P.J. , Goldenberg M.M. , Ford - Hutchinson A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation . *Ann. Rev. Immunol.* (1984) , 2 : 335 - 357 .
- 116) Davila D.R. , Edwards C.K. , Arkins S. , Simon J. , Kelley K.W. Interferon- γ -induced priming for secretion of superoxide anion and tumor necrosis factor- α declines in macrophages from aged rats . *FASEB. J.* (1990) , 4 : 2906 - 2911 .
- 117) Davis J.D. The Mitogen-activated Protein Kinase signal transduction pathway . *J. Biol. Chem.* (1993) , 268 : 14553 - 14556 .
- 118) Davis J.M. , editor . *Basic Cell Culture : A Practical Approach* . I.R.L. Press at Oxford University Press (1994) . Oxford , New York , Tokyo .
- 119) Dawson A.P. Regulation of intracellular Ca^{2+} . *Essays Biochem.* (1990) , 25 : 1 - 37 .
- 120) Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells) . *Eur. J. Biochem.* (1990) , 192 : 245 - 261 .
- 121) Delgado M. , Munoz-Elias E.J. , Kan Y. , Gozes I. , Fridkin M. , Brennehan D.E. , Gomariz R.P. , Ganea D. Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide inhibit Tumor Necrosis Factor α transcriptional activation by regulating Nuclear Factor κ B and cAMP Response Element-binding Protein/c-Jun . *J. Biol. Chem.* (1998) , 273 : 31427 - 31436 .
- 122) Delgado M. , Munoz-Elias E.J. , Gomariz R.P. , Ganea D. Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages : In Vitro and In Vivo studies . *J. Immunol.* (1999) , 162 : 1707 - 1716 .
- 123) Delovitch T.L. , Semple J.W. , Phillips M.L. Influence of antigen processing on immune responsiveness . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 216 - 218 .
- 124) Denlinger L.C. , Garis K.A. , Sommer J.A. , Guadarrama A.G. , Proctor R.A. , Bertics P.J. Nuclear Translocation of NF κ B in Lipopolysaccharide-treated macrophages fails to correspond to Endotoxicity : Evidence suggesting a requirement for a Gamma Interferon-like signal . *Infect. Immun.* (1998) , 66 : 1638 - 1647 .
- 125) Dent G. , Gienbycz M.A. , Rabe K.F. , Wolf B. , Barnes P.J. , Magnussen H. Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 10 : 565 - 572 .
- 126) Deodhar S.D. , Barna B.P. Macrophage activation : potential for cancer therapy . *Cleve. Clin. Q.* (1986) , 53 : 223 - 234 .
- 127) Devitt A. , Moffatt O.D. , Raykundalia C. , Capra J.D. , Simmons D.L. , Gregory C.D. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells . *Nature* (1998) , 392 : 505 - 509 .
- 128) De Vries H.E. , Ronken E. , Reinders J.H. , Buchner B. , Van Berkel T.J.C. , Kuiper J. Acute effects of oxidized low density lipoprotein on metabolic responses in macrophages . *FASEB J.* (1998) , 12 : 111 - 118 .
- 129) Dhib - Jalbut S. , McFarlin D.E. Macrophages , microglia and other antigen-presenting cells in neurological disorders . *Progr. Neuroendocrinimmunol.* (1989) , 2 : 86 - 95 .
- 130) Diaz P. , Jones D.G. , Kay A.B. Histamine receptors on guinea pig alveolar macrophages : chemical specificity and the effects of H1- and H2- receptor agonists and antagonists . *Clin. Exp. Immunol.* (1979) , 35 : 462 - 469 .
- 131) Dieter P. , Schulze - Specking A. , Decker K. Differential inhibition of prostaglandin and superoxide production by dexamethasone in primary cultures of rat Kupffer cells . *Eur. J. Biochem.* (1986) , 159 : 451 - 457 .



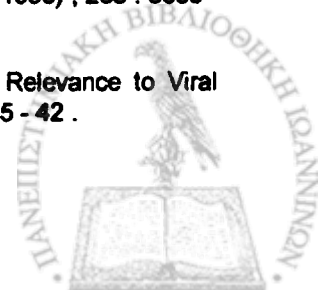
- 132) Dieter P. , Schulze - Specking A. , Karck U. , Decker K. Prostaglandin release but not superoxide production by rat Kupffer cells stimulated in vitro depends on Na^+ / H^+ exchange . *Eur. J. Biochem.* (1987) , 170 : 201 - 206 .
- 133) Dieter P. , Schulze - Specking A. , Decker K. Ca^{2+} requirement of prostanoid but not of superoxide production by rat Kupffer cells . *Eur. J. Biochem.* (1988) , 177 : 61 - 67 .
- 134) DiGregorio K.A. , Cilento E.V. , Lantz R.C. Measurement of superoxide release from single pulmonary alveolar macrophages . *Am. J. Physiol.* (1987) , 252 : C677 - C683 .
- 135) Ding A. , Nathan C. Analysis of the nonfunctional respiratory burst in murine Kupffer cells . *J. Exp. Med.* (1988) , 167 : 1154- 1170 .
- 136) Dingle J.T. , Fell H.B. , editors . *Lysosomes in Biology and Pathology* . North Holland Publishing Co. (1969) , Amsterdam , London .
- 137) Dobson E.L. , Kelly L.S. The combined stimulation of the reticuloendothelial system by estradiol and endotoxin . *J. Reticuloendothel Soc.* (1973) , 13 : 61 - 69 .
- 138) Docke W.D. , Randow F. , Syrbe U. , Krausch D. , Asadullah K. , Reinke P. , Volk H.D. , Kox W. Monocyte deactivation in septic patients : Restoration by $\text{INF-}\gamma$ treatment . *Nature-Medicine* (1997) , 3 : 678 - 681 .
- 139) Dong Z. , Qi X. , Fidler I.J. Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is necessary for activation of murine macrophages by natural and synthetic bacterial products . *J. Exp. Med.* (1993) , 177 : 1071 - 1077 .
- 140) Drapier J.C. , Hibbs J.B.Jr. Aconitases : a class of metalloproteins highly sensitive to Nitric Oxide synthesis . *Meth. Enzymol.* (1996) , 269 : 26 - 34 .
- 141) Drysdale B.E. , Shin H.S. Activation of macrophages for tumor cell cytotoxicity : identification of indomethacin sensitive and insensitive pathways . *J. Immunol.* (1981) , 127 : 760 - 765 .
- 142) Dumont J.E. , Jauniaux J.C. , Roger P.P. The cyclic AMP - mediated stimulation of cell proliferation . *T.I.B.S.* (1989) , 14 : 67 - 71 .
- 143) Edelman A.M. , Blumenthal D.K. , Krebs E.G. Protein serine / threonine kinases . *Ann. Rev. Biochem.* (1987) , 56 : 567 - 613 .
- 144) Emilsson A. , Sundler R. Evidence for a catalytic role of phospholipase A in phorbol diester- and zymosan- induced mobilization of arachidonic acid in mouse peritoneal macrophages . *Biochim. Biophys. Acta* (1986) , 876 : 533 - 542 .
- 145) English B.K. , Ihle J.N. , Myracle A. , Yi T. Hck tyrosine kinase activity modulates Tumor Necrosis Factor production by murine macrophages . *J. Exp. Med.* (1993) , 178 : 1017 - 1022 .
- 146) Epps D.E. Van , Saland L. β - Endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis . *J. Immunol.* (1984) , 132: 3046 - 3053 .
- 147) Errasfa M. , Bachelet M. , Russo-Marie F. Inhibition of phospholipase A2 activity of guinea-pig alveolar macrophages by lipocortin-like proteins purified from mice lung . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1988) , 153 : 1267 - 1270 .
- 148) Espinoza-Delado I. , Bosco M.C. , Musso T. , Mood K. , Ruscetti F.W. , Longo D.L. , Varesio L. Inhibitory cytokine circuits involving Transforming Growth Factor- β , Interferon- γ and Interleukin-2 in human monocyte activation . *Blood* (1994) , 83 : 3332 - 3338 .
- 149) Evered D. , Nugent J. , O'Connor M. , editors . *Biochemistry of Macrophages* . Ciba Foundation Symposium , volume 118 , Pitman editions (1986) , London .
- 150) Fan X.D. , Goldberg M. , Bloom B.R. Interferon- γ induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) , 85 : 5122 - 5125 .



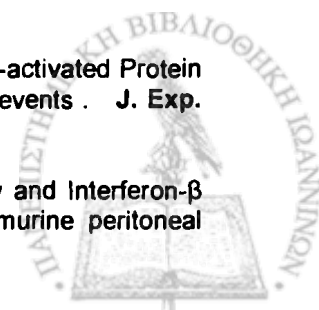
- 151) Fantl W.J. , Johnson D.E. , Williams L.T. Signaling by receptor tyrosine kinases . *Annu. Rev. Biochem.* (1993) , 62 : 453 - 481 .
- 152) Fantone J.C. , Ward P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions . *Am. J. Pathol.* (1982) , 107 : 397 - 418 .
- 153) Fecho K. , Maslonek K.A. , Coussons-Read M.E. , Dykstra L.A. , Lysle D.T. Macrophage-derived nitric oxide is involved in the depressed Concanavalin A responsiveness of splenic lymphocytes from rats administered morphine in vivo . *J. Immunol.* (1994) , 152 : 5845 - 5852 .
- 154) Fels A.O.S. , Pawlowski N.A. , Abraham E.L. , Cohn Z.A. Compartmentalized regulation of macrophage arachidonic acid metabolism . *J. Exp. Med.* (1986) , 163 : 752 - 757 .
- 155) Ferrante J.V. , Huang Z.H. , Nandoskar M. , Hii C.S.T. , Robinson B.S. , Rathjen D.A. , Poulos A. , Morris C.P. , Ferrante A. Altered responses of Human macrophages to Lipopolysaccharide by Hydroperoxy-eicosatetraenoic Acid , Hydroxy-eicosatetraenoic Acid and Arachidonic Acid . *J. Clin Invest.* (1997) , 99 : 1445 - 1452 .
- 156) Fertsch D. , Schoenberg D.R. , Germain R.N. , Tou J.Y.L. , Vogel S.N. Induction of macrophage Ia-antigen expression by rINF- γ and down-regulation by INF- α/β and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA . *J. Immunol.* (1987) , 139 : 244 - 249 .
- 157) Fertsch-Ruggio D. , Schoenberg D.R. , Vogel S.N. Induction of macrophage Ia-antigen expression by rINF- γ and down-regulation by INF- α/β and dexamethasone are regulated transcriptionally . *J. Immunol.* (1988) , 141 : 1582 - 1589 .
- 158) Fidler I.J. Macrophages and metastasis - A biological approach to cancer therapy . *Cancer Res.* (1985) , 45 : 4714 - 4726 .
- 159) Figueiredo F. , Uhing R.J. , Okonogi K. , Gettys T.W. , Johnson S.P. , Adams D.O. , Prpic V. Activation of the cAMP cascade inhibits an early event involved in murine macrophage Ia expression . *J. Biol. Chem.* (1990) , 265 : 12317 - 12323 .
- 160) Finkel T. Oxygen radicals and signaling . *Current Opinion Cell Biol.* (1998) , 10 : 248 - 253
- 161) Fitzgerald L. Exercise and the Immune system . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 337 - 339 .
- 162) Flood J.F. , Hernandez E.N. , Morley J.E. Modulation of memory processing by Neuropeptide Y . *Brain Res.* (1987) , 421 : 280 - 290 .
- 163) Fogelman A.M. , Van Lenten B.J. , Warden C. , Haberland M.E. , Edwards P.A. Macrophage Lipoprotein Receptors . *J. Cell Sci.* (1988) , Suppl. 9 , 135 - 149 .
- 164) Forman H.J. , Dorio R.J. , Skelton D.C. Hydroperoxide-induced damage to alveolar macrophage function and membrane integrity : Alterations in intracellular-free Ca^{2+} and membrane potential . *Archives Biochem. Biophys.* (1987) , 259 : 457 - 465 .
- 165) Forster O. , Landy M. , editors . Heterogeneity of Mononuclear Phagocytes . Academic Press (1981). London , New York , Toronto , Sydney , San Francisco .
- 166) Freshney R.I. , editor . Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique . Third Edition . Wiley - Liss (1994) . New York , Chichester , Brisbane , Toronto , Singapore .
- 167) Freund M. , Pick E. The mechanism of action of lymphokines : VIII. Lymphokine-enhanced spontaneous hydrogen peroxide production by macrophages . *Immunol.* (1985) , 54 : 35 - 45
- 168) Frey J. , Engelhardt W. Characterization and structural analysis of Fc γ -receptors of human monocytes , a monoblast cell line (U937) and a myeloblast cell line (HL-60) by a mono-clonal antibody . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 583 - 591 .
- 169) Fujihara M. , Ikebuchi K. , Maekawa T.L. , Wakamoto S. , Ogiso C. , Ito T. , Takahashi T.A. , Suzuki T. , Sekiguchi S. Lipopolysaccharide-induced desensitization of junB gene expression in a mouse macrophage-like cell line , P388D1 . *J. Immunol.* (1998) , 161 : 3659 - 3665 .



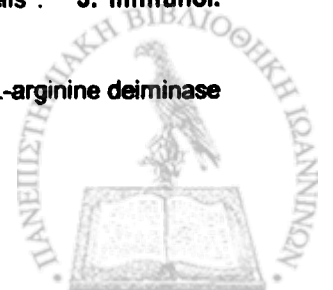
- 170) Furth R. Van , Hirsch J.G. , Fedorko M.E. Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes , monocytes and macrophages . *J. Exp. Med.* (1970) , 132 : 794 - 812 .
- 171) Furth R. Van , Raeburn J.A. , Zwet T.L. Van. Characteristics of human mononuclear phagocytes . *Blood* (1979) , 54 : 485 - 500 .
- 172) Gallay P. , Jongeneel C.V. , Barras C. , Burnier M. , Baumgartner J.D. , Glauser M.P. , Heumann D. Short time exposure to Lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes . *J. Immunol.* (1993) , 150 : 5086 - 5093 .
- 173) Gallin J.I. , Sandler J.A. , Clyman R.I. , Manganiello V.C. , Vaughan M. Agents that increase cyclic AMP inhibit accumulation of cGMP and depress human monocyte locomotion . *J. Immunol.* (1978) , 120 : 492 - 496 .
- 174) Ganong W.F. , editor . *Review of Medical Physiology* . Fourteenth Edition . Appleton and Lange (1989) . Norwalk , San Mateo .
- 175) Gautam S. , James K. , Deodhar S.D. Macrophage -mediated tumoricidal activity generated by human C-reactive protein (C.R.P.) encapsulated in liposomes is complement - dependent . *Cleve. Clin. Q.* (1986) , 53 : 235 - 239 .
- 176) Geisel J. , Cook J.A. , Coffee K.A. , Wise W.C. , Halushka P.V. Endotoxin-induced arachidonic acid metabolism requires de novo protein synthesis and protein kinase C activation . *Biochim. Biophys. Acta* (1991) , 1085 : 15 - 20 .
- 177) Geisow M.J. , D'Arcy - Hart P. , Young M.R. Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages : studies by fluorescence microscopy . *J. Cell Biol.* (1981) , 89 : 645 - 652 .
- 178) Geladopoulos T.P. , Sotiroudis T.G. , Evangelopoulos A.E. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity . *Anal. Biochem.* (1991) , 192 : 112 - 116 .
- 179) Gemsa D. , Seitz M. , Kramer W. , Grimm W. , Till G. , Resch K. Ionophore A23187 raises cyclic AMP levels in macrophages by stimulating prostaglandin E formation . *Exp. Cell Res.* (1979) , 118 : 55 - 62 .
- 180) Genis P. , Jett M. , Bernton E.W. , Boyle T. , Gelbard H.A. , Dzenko K. , Keane R.W. , Resnick L. , Mizrachi Y. , Volsky D.J. , Epstein L.G. , Gendelman H.E. Cytokines and arachidonic acid metabolites produced during Human Immunodeficiency Virus (H.I.V.)-infected macrophage - astroglia interactions : Implications for the neuropathogenesis of H.I.V. disease . *J. Exp. Med.* (1992) , 176 : 1703 - 1718 .
- 181) Germain N. , Bertin B. , Legendre A. , Martin B. , Lagente V. , Payne A. , Boichot E. Selective Phosphodiesterase inhibitors modulate the activity of alveolar macrophages from sensitized guinea-pigs . *Eur. Respir. J.* (1998) , 12 : 1334 - 1339 .
- 182) Gespach C. , Cost H. , Abita J.P. Histamine H2 receptor activity during the differentiation of the human monocytic-like cell line U-937 . Comparison with prostaglandins and isoproterenol . *F.E.B.S. Letters* (1985) , 184 : 207 - 213 .
- 183) Gewert K. , Sundler R. Dexamethasone down-regulates the 85 kDa phospholipase A₂ in mouse macrophages and suppresses its activation . *Biochem. J.* (1995) , 307 : 499 - 504 .
- 184) Gianetto R. , DeDuve C. Tissue fractionation studies : 4. Comparative study of the binding of Acid Phosphatase , β -Glucuronidase and Cathepsin by rat liver particles . *Biochem. J.* (1955) , 59 : 433 - 438 .
- 185) Glaser K.B. , Asmis R. , Dennis E.A. Bacterial lipopolysaccharide priming of P338D1 macrophage-like cells for enhanced arachidonic acid metabolism . *J. Biol. Chem.* (1990) , 265 : 8658 - 8664 .
- 186) Glaser R. , Kiecolt-Glaser J.K. Stress-associated Immune Modulation : Relevance to Viral Infections and Chronic Fatigue Syndrome . *Am. J. Med.* (1998) , 105 Suppl. 3A : 35 - 42 .



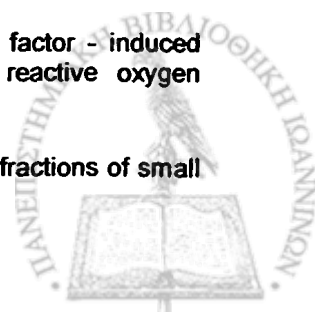
- 187) Goenka S. , Das T. , Sa G. , Ray P.K. Protein A induces NO production : involvement of Tyrosine Kinase , Phospholipase C and Protein Kinase C . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1998) , 250 : 425 - 429 .
- 188) Goetzl E.J. , Sreedharan S.P. Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems . **FASEB. J.** (1992) , 6 : 2646 - 2652 .
- 189) Goldman R. Modulation of Transglutaminase activity in mononuclear phagocytes and macrophage-like tumor cell lines by differentiation agents . **Exp. Cell Res.** (1987) , 168 : 31 - 43 .
- 190) Goldner R.D. , Adams D.O. The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo . III. The effect of particulate foreign substances . **Am. J. Pathol.** (1977) , 89 : 335 - 350 .
- 191) Gomez F. , Ruiz P. , Schreiber A.D. Impaired function of macrophage Fc γ receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis . **N. Engl. J. Med.** (1994) , 331 : 1122 - 1128 .
- 192) Goodman-Gilman A. , Goodman L.S. , Rall T.W. , Murad F., editors . Goodman and Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics , seventh edition . Macmillan Publishers (1985). New York .
- 193) Gordon S. , Perry V.H. , Rabinowitz S. , Chung L.P. , Rosen H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system . **J. Cell Sci.** (1988) , Suppl. 9 , 1 - 26 .
- 194) Granger D.L. , Taintor R.R. , Boockvar K.S. , Hibbs J.B.Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using Nitrate Reductase and Griess reaction . **Meth. Enzymol.** (1996) , 268 : 142 - 151 .
- 195) Gray T.S. , Morley J.E. Neuropeptide Y : Anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system . **Life Sci.** (1986) , 38 : 389 - 401 .
- 196) Green D.R. , Faist E. Trauma and the immune response . **Immunol. Today** (1988) , 9 : 253 - 255 .
- 197) Green L.C. , Wagner D.A. , Glogowski J. , Skipper P.L. , Wishnok J.S. , Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate , nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids . **Anal. Biochem.** (1982) , 126 : 131 - 138
- 198) Greengard P. Phosphorylated proteins as physiological effectors . **Science** (1978) , 199 : 146 - 152 .
- 199) Greenspan F.S. , editor . Basic and Clinical Endocrinology . Third Edition . Appleton and Lange (1991) . Norwalk , San Mateo .
- 200) Griffin F.M. , Griffin J.A. , Leider J.E. , Silverstein S.C. Studies on the mechanism of phagocytosis : I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane . **J. Exp. Med.** (1975) , 142 : 1263 - 1282 .
- 201) Guicheux J. , Heymann D. , Gouin F. , Pilet P. , Faivre A. , Daculsi G. Growth Hormone stimulates multinucleated cell formation in long-term bone marrow cultures . **Eur. J. Cell Biol.** (1998) , 75 : 59 - 65 .
- 202) Haas D.A. , George S.R. Neuropeptide Y - induced effects on hypothalamic corticotropin-releasing factor content and release are dependent on noradrenergic/adrenergic neurotransmission . **Brain Res.** (1989) , 498 : 333 - 338 .
- 203) Haeffner A. , Thieblemont N. , Deas O. , Marelli O. , Charpentier B. , Senik A. , Wright S.D. , Haeffner-Cavaillon N. , Hirsch F. Inhibitory effect of Growth Hormone on TNF- α secretion and Nuclear Factor- κ B translocation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes . **J. Immunol.** (1997) , 158 : 1310 - 1314 .
- 204) Hambleton J. , McMahon M. , DeFranco A.L. Activation of Raf-1 and Mitogen-activated Protein Kinase in murine macrophages partially mimics Lipopolysaccharide-induced Signaling events . **J. Exp. Med.** (1995) , 182 : 147 - 154 .
- 205) Hamilton T.A. , Bredon N. , Ohmori Y. , Tannenbaum C.S. Interferon- γ and Interferon- β independently stimulate the expression of lipopolysaccharide - inducible genes in murine peritoneal macrophages . **J. Immunol.** (1989) , 142 : 2325 - 2331 .



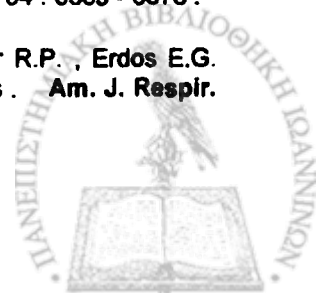
- 206) Hampton R.Y. , Golenbock D.T. , Penman M. , Krieger M. , Raetz C.R.H. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors . *Nature* (1991) , 352 : 342 - 344 .
- 207) Han H. , Iwanaga T. , Uchiyama Y. , Fujita T. Aggregation of macrophages in the tips of intestinal villi in guinea pigs : their possible role in the phagocytosis of effete epithelial cells . *Cell Tissue Res.* (1993) , 271 : 407 - 416 .
- 208) Harnett M.M. , Klaus G.G.B. G-protein regulation of receptor signaling . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 315 - 320 .
- 209) Hardman J.G. , Limbird L.E. , Molinoff P.B. , Ruddon R.W. , Goodman-Gilman A. , editors . Goodman and Gilman's : The Pharmacological Basis of Therapeutics , Ninth Edition . McGraw-Hill (1996) . International Edition .
- 210) Harfstrand A. , Cintra A. , Fuxe K. , Aronsson M. , Wikstrom A.C. , Okret S. , Gustafsson J.A. , Agnati L.F. Regional differences in glucocorticoid receptor immunoreactivity among Neuropeptide Y immunoreactive neurons of the rat brain . *Acta Physiol. Scand.* (1989) , 135 : 3 - 9 .
- 211) Harpe J. De la , Nathan C.F. A semi-automated microassay for H₂O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages . *J. Immunol. Meth.* (1985) , 78 : 323 - 336 .
- 212) Harper J.F. Stimulus-Secretion coupling : second messenger-regulated exocytosis . *Adv. Second Messenger and Phosphoprotein Res.* (1988) , 22 : 193 - 298 .
- 213) Hartung H.P. Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (platelet activating factor) mediates heightened metabolic activity in macrophages . *F.E.B.S. Letters* (1983) , 160 : 209 - 212 .
- 214) Hasko G. , Szabo C. , Merkel K. , Bencsics A. , Zingarelli B. , Kvetan V. , Vizi E.S. Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor - alpha and nitric oxide production by dopamine receptor agonists and antagonists in mice . *Immunol. Lett.* (1996) , 49 : 143 - 147 .
- 215) Hauschildt S. , Kleine B. Bacterial stimulators of macrophages . *International Rev. Cytol.* (1995) , 161 : 263 - 331 .
- 216) Hayashi H. , Kudo I. , Inoue K. , Nomura H. , Nojima S. Macrophage activation by PAF incorporated into dipalmitoylphosphatidylcholine-cholesterol liposomes . *J. Biochem.* (1985) , 97 : 1255 - 1258 .
- 217) Heller R.A. , Kronke M. Tumor Necrosis Factor receptor - mediated signaling pathways . *J. Cell Biol.* (1994) , 126 : 5 - 9 .
- 218) Hellstrand K. , Asea A. , Dahlgren C. , Hermodsson S. Histaminergic regulation of NK-cells : Role of monocyte-derived Reactive Oxygen Metabolites . *J. Immunol.* (1994) , 153 : 4940 - 4947 .
- 219) Helper J.R. , Gilman A.G. G proteins . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 383 - 387 .
- 220) Hercend T. , Schmidt R.E. Characteristics and uses of natural killer cells . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 291 - 293 .
- 221) Herzog H. , Hort Y.J. , Ball H.J. , Hayes G. , Shine J. , Selbie L.A. Cloned human Neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) , 89 : 5794 - 5798 .
- 222) Hibbs J.B.Jr. , Vavrin Z. , Taintor R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells . *J. Immunol.* (1987) , 138 : 550 - 565 .
- 223) Hibbs J.B.Jr. , Taintor R.R. , Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity : Role for L-arginine deiminase and imino-nitrogen oxidation to nitrite . *Science* (1987) , 235 : 473 - 476 .



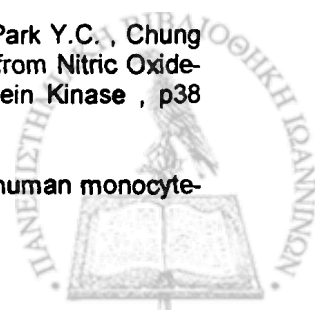
- 224) Hibbs J.B.Jr. , Taintor R.R. , Vavrin Z . , Rachlin E.M. Nitric oxide : a cytotoxic activated macrophage effector molecule . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1988) , 157 : 87 - 94 .
- 225) Hidaka H. , Kobayashi R. Pharmacology of protein kinase inhibitors . **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** (1992) , 32 : 377 - 397 .
- 226) Hill J.R. , Corbett J.A. , Kwon G. , Marshall C.A. , McDaniel M.L. Nitric oxide regulates Interleukin-1 bioactivity released from murine macrophages . **J. Biol. Chem.** (1996) , 271 : 22672 - 22678 .
- 227) Hirata F. , Schiffmann E. , Krishnamoorthy V. , Salomon D. , Axelrod J. A phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (1980) , 77 : 2533 - 2536 .
- 228) Hirsch J.G. , Fedorko M.E. Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and postfixation in uranyl acetate . **J. Cell Biol.** (1968) , 38 : 615 - 627 .
- 229) Hisano S. , Kagotani Y. , Tsuruo Y. , Daikoku S. , Chihara K. , Whitnall M.H. Localization of glucocorticoid receptor in Neuropeptide Y-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus . **Neuroscience Lett.** (1988) , 95 : 13 - 18 .
- 230) Hishikawa T. , Cheung J.Y. , Yelamarty R.V. , Knutson D.W. Calcium transients during Fc-receptor mediated and nonspecific phagocytosis by murine peritoneal macrophages . **J. Cell Biol.** (1991) , 115 : 59 - 66 .
- 231) Hobbs A.J. , Ignarro L.J. Nitric Oxide - Cyclic GMP signal transduction system . **Meth. Enzymol.** (1996) , 269 : 134 - 148 .
- 232) Hocking W.G. , Golde D.W. The pulmonary alveolar macrophage . **N. Engl. J. Med.** (1979) , 301 : 580 - 587 .
- 233) Hocking W.G. , Golde D.W. The pulmonary alveolar macrophage . **N. Engl. J. Med.** (1979) , 301 : 639 - 645 .
- 234) Hoffstein S.T. , Gennaro D.E. , Meunier P.C. Cytochemical demonstration of constitutive H₂O₂ production by macrophages in synovial tissue from rats with adjuvant arthritis . **Am. J. Pathol.** (1988) , 130 : 120 - 125 .
- 235) Hogg N. , Takacs L. , Palmer D.G. , Selvendran Y. , Allen C. The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes : comparison with expression of class II molecules . **Eur. J. Immunol.** (1986) , 16 : 240 - 248 .
- 236) Holvoet P. , Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis . **FASEB J.** (1994) , 8 : 1279 - 1284 .
- 237) Horvath C.M. , Darnell J.E. The state of the STATs : recent developments in the study of signal transduction to the nucleus . **Current Opinion Cell Biol.** (1997) , 9 : 233 - 239 .
- 238) Hovi T. , Veli-Pekka L. , Virtanen I. Interferon affects the formation of adhesion plaques in human monocyte cultures . **Exp. Cell Res.** (1985) , 159 : 305 - 312 .
- 239) Hsueh W. , Kuhn C. , Needleman P. Relationship of prostaglandin secretion by rabbit alveolar macrophages to phagocytosis and lysosomal enzyme release . **Biochem. J.** (1979) , 184 : 345 - 354 .
- 240) Huang S.J. , Monk P.N. , Downes C.P. , Whetton A.D. Platelet-activating factor - induced hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stimulates the production of reactive oxygen intermediates in macrophages . **Biochem. J.** (1988) , 249 : 839 - 845 .
- 241) Hubscher G. , West G. Specific assays of some phosphatases in subcellular fractions of small intestinal mucosa . **Nature** (1965) , 205 : 799 - 800 .



- 242) Hume D.A. , Robinson A.P. , Macpherson G.G. , Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80 . *J. Exp. Med.* (1983) , 158 : 1522 - 1536 .
- 243) Humes J.L. , Burger S. , Galavage M. , Kuehl F.A. , Wightman P.D. , Dahlgreen M.E. , Davies P. , Bonney R.J. The diminished production of arachidonic acid oxygenation products by elicited mouse peritoneal macrophages : possible mechanisms . *J. Immunol.* (1980) , 124 : 2110 - 2116 .
- 244) Hunt N.H. , Lim L.K. , Eichner R.D. , Buffinton G.D. , Weidemann M.J. Activation of cyclic AMP - dependent protein kinase in macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) , 119 : 1082 - 1088 .
- 245) Hunter T. A thousand and one protein kinases . *Cell* (1987) , 50 : 823 - 829 .
- 246) Hursh D.M. , Hsueh W. , Kartha R.K. PAF metabolism in resident and activated alveolar macrophages : Role of protein kinase C. *Cell. Immunol.* (1990) , 130 : 429 - 436 .
- 247) Husband A.J. The immune system and integrated homeostasis . *Immunol. Cell Biol.* (1995) , 73 : 377 - 382 .
- 248) Hutson J.C. Testicular macrophages . *International Rev. Cytol.* (1994) , 149 : 99 - 143 .
- 249) Ignarro L.J. Stimulation of phagocytic release of neutral protease from human neutrophils by cholinergic amines and cyclic 3',5'-Guanosine Monophosphate . *J. Immunol.* (1974) , 112 : 210 - 214 .
- 250) Ihm S.H. , Yoon J.W. Macrophages essential for development of β -cell-specific cytotoxic effectors and insulinitis in NOD mice . *Diabetes* (1990) , 39 : 1273 - 1278 .
- 251) Ikegami K. Modulation of adenosine 3',5'-monophosphate contents of rat peritoneal macrophages mediated by β_2 -adrenergic receptors . *Biochem. Pharmacol.* (1977) , 26 : 1813 - 1816 .
- 252) Introna M. , Hamilton T.A. , Kaufman R.E. , Adams D.O. , Bast R.C.Jr. Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters the expression of c-fos and c-myc oncogenes . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 2711 - 2715 .
- 253) Inui A. , Inoue T. , Nakajima M. , Okita M. , Sakatani N. , Okimura Y. , Chihara K. , Baba S. Brain Neuropeptide Y in the control of adrenocorticotrophic hormone secretion in the dog . *Brain Res.* (1990) , 510 : 211 - 215 .
- 254) Irimura T. , North S.M. , Nicolson G.L. Glycoprotein profiles of macrophages at different stages of activation as revealed by lectin binding after electrophoretic separation . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 73 - 78 .
- 255) Irvine R.F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells ? *Biochem. J.* (1982) , 204 : 3 - 16 .
- 256) Isakov N. Cell activation and signal initiation . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 251 - 252 .
- 257) Ishihara T. , Akizuki S. , Yokota T. , Takahashi M. , Uchino F. , Matsumoto N. Foamy cells associated with platelet phagocytosis . *Am. J. Pathol.* (1984) , 114 : 104 - 111 .
- 258) Iuvone T. , D'Aquisto F. , Camuccio R. , DiRosa M. Nitric oxide inhibits LPS-induced Tumor Necrosis Factor synthesis in vivo and in vitro . *Life Sci.* (1996) , 59 : PL207 - 211 .
- 259) Iyengar R. , Stuehr D.J. , Marletta M.A. Macrophage synthesis of nitrite , nitrate , and N-nitrosamines : Precursors and role of the respiratory burst . *Biochemistry* (1987) , 84 : 6369 - 6373 .
- 260) Jackman H.L. , Tan F. , Schraufnagel D. , Dragovic T. , Dezso B. , Becker R.P. , Erdos E.G. Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1995) , 13 : 196 - 204 .



- 261) Jaffe H.S. , Herberman R.B. Rationale for recombinant human interferon-gamma adjuvant immunotherapy for cancer . *J. Natl. Cancer Inst.* (1988) , 80 : 616 - 618 .
- 262) Jakoby W.B. , Pastan I.H. , editors . *Cell Culture . Meth. in Enzymol.* , vol. 58 . Academic Press (1979) . New York , San Francisco , London .
- 263) Jan L.Y. , Jan Y.N. Receptor-regulated Ion Channels . *Current Opinion Cell Biol.* (1997) 9 : 155 - 160 .
- 264) Janckila A.J. , Li C.Y. , Lam K.W. , Yam L.T. The cytochemistry of Tartrate-resistant Acid Phosphatase : technical considerations . *Am. J. Clin. Pathol.* (1978) , 70 : 45 - 55 .
- 265) Janeway Jr. C.A. How the immune system recognizes invaders . *Sci. American* (1993) , 269 : 41 - 47 .
- 266) Janusz M.J. , Austen K.F. , Czop J.K. Isolation of soluble yeast β -glucans that inhibit human monocyte phagocytosis mediated by β -glucan receptors . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 3270 - 3276 .
- 267) Jiang C. , Ting A.T. , Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines . *Nature* (1998) , 391 : 82 - 86 .
- 268) Johnson E.O. , Moutsopoulos H.M. Neuroimmunological axis and rheumatic disease . *Eur. J. Clin. Invest.* (1992) , 22 : 2 - 5 (Suppl.) .
- 269) Johnson E.O. , Kamilaris T.C. , Chrousos G.P. , Gold P.W. Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis . *Neurosci. Biobehav. Rev.* (1992) , 16 : 115 - 130
- 270) Johnson H.M. , Russel J.K. , Torres B.A. Second messenger role of arachidonic acid and its metabolites in Interferon- γ production . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 3053 - 3056 .
- 271) Johnston R.B.Jr. Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages . *Fed. Proc.* (1978) , 37 : 2759 - 2764 .
- 272) Johnston R.B.Jr. , Godzik C.A. , Cohn Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 115 - 127
- 273) Johnston R.B.Jr. Monocytes and macrophages . *N. Engl. J. Med.* (1988) , 318 : 747 - 752 .
- 274) Jones G. , Strugnell S.A. , DeLuca H.F. Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D . *Physiol. Rev.* (1998) , 78 : 1193 - 1231 .
- 275) Jones N.L. , Jerome W.G. , Lewis J.C. Pigeon monocyte / macrophage lysosomes during β VLDL uptake . Induction of Acid Phosphatase Activity . A model for complex arterial lysosomes . *Am. J. Pathol.* (1991) , 139 : 383 - 392 .
- 276) Jong J.P. de , Voerman J.S.A. , Sluijs-Gelling A.J. Van der , Wilemsen R. , Ploemacher R.E. A monoclonal antibody against murine macrophages . I. Ontogeny , distribution and enzyme histochemical characterization of ER-HR3 positive cells . *Cell Tissue Res.* (1994) , 275 : 567 - 576 .
- 277) Jong J.P. de , Leenen P.J.M. , Voerman J.S.A. , Sluijs-Gelling A.J. Van der , Ploemacher R.E. A monoclonal antibody against murine macrophages . II. Biochemical and functional aspects of the ER-HR3 antigen . *Cell Tissue Res.* (1994) , 275 : 577 - 585 .
- 278) Jun C.D. , Yoon H.J. , Park Y.C. , Lee S.Y. , Kang S.S. , Kim H.M. , Chung H.T. Synergistic cooperation between thapsigargin and phorbol ester for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages . *Free Rad. Biol. Med.* (1996) , 20 : 769 - 776 .
- 279) Jun C.D. , Oh C.D. , Kwak H.J. , Pae H.O. , Yoo J.C. , Choi B.M. , Chun J.S. , Park Y.C. , Chung H.T. Overexpression of Protein Kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from Nitric Oxide-Induced apoptosis : Involvement of c-jun N-Terminal Kinase / Stress-Activated Protein Kinase , p38 Kinase and CPP-32 Protease pathways . *J. Immunol.* (1999) , 162 : 3395 - 3401 .
- 280) Jungi T.W. , Lerch P.G. , Brcic M. The effect of recombinant Interferon- γ on human monocyte-derived macrophages . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 735 - 738 .



- 281) Kaczmarek L. , Kaminska B. Molecular biology of Cell Activation . *Exp. Cell Res.* (1989) , 183 : 24 - 35 .
- 282) Kammer G.M. The adenylate cyclase - cAMP - protein kinase A pathway and regulation of the immune response . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 222 - 229 .
- 283) Kaplan G. , Unkeless J.C. , Cohn Z.A. Insertion and turnover of macrophage plasma membrane proteins . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1979) , 76 : 3824 - 3828 .
- 284) Karnovsky M.L. , Lazdins J.K. Biochemical criteria for activated macrophages . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 809 - 812 .
- 285) Καρύδης Ι. , Τόλης Γ. Το Νευροπεπτίδιο Υ ως ρυθμιστής της συμπεριφοράς σίτησης . *Ιατρική* (1997) , 71 : 225 - 231 .
- 286) Kaul N. , Forman H.J. Activation of NFκB by the respiratory burst of macrophages . *Free Rad. Biol. Med.* (1996) , 21 : 401 - 405 .
- 287) Keizer G.D. , Velde A.A.T. , Schwarting R. , Figdor C.G. , de Vries J.E. Role of p150,95 in adhesion , migration , chemotaxis and phagocytosis of human monocytes . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 1317 - 1322 .
- 288) Kelley J.L. , Rozek M.M. , Suenram C.A. , Schwartz C.J. Activation of human peripheral blood monocytes by lipoproteins . *Am. J. Pathol.* (1988) , 130 : 223 - 231 .
- 289) Kerkerian L. , Guy J. , Lefevre G. , Pelletier G. Effects of Neuropeptide Y (NPY) on the release of anterior pituitary hormones in the rat . *Peptides* (1985) , 6 : 1201 - 1204 .
- 290) Keshav S. , Chung P. , Milon G. , Gordon S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization . *J. Exp. Med.* (1991) , 174 : 1049 - 1058 .
- 291) Kiechle F.L. , Malinski T. Nitric oxide : Biochemistry , pathophysiology and detection . *Am. J. Clin. Pathol.* (1993) , 100 : 567 - 575 .
- 292) Kielian M.C. , Cohn Z.A. Modulation of phagosome - lysosome fusion in mouse macrophages . *J. Exp. Med.* (1981) , 153 : 1015 - 1020 .
- 293) Kim Y.M. , Hong S.J. , Billiar T.R. , Simmons R.L. Counterprotective effect of erythrocytes in experimental bacterial peritonitis is due to scavenging of nitric oxide and reactive oxygen intermediates . *Infect. Immun.* (1996) , 64 : 3074 - 3080 .
- 294) Kimura Y. , Hirata M. , Hamachi T. , Koga T. Possible physiological role of guanosine triphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate in Ca²⁺ release in macrophages stimulated with chemotactic peptide . *Biochem. J.* (1988) , 249 : 531 - 536 .
- 295) Kinscherf R. , Daigner H.P. , Usinger C. , Pill J. , Wagner M. , Kamencic H. , Hou D. , Chen M. , Schmiedt M. , Schrader M. , Kovacs G. , Kato K. , Metz J. Induction of mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in macrophages by oxidized LDL : its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits . *FASEB J.* (1997) , 11 : 1317 - 1328 .
- 296) Kitchens R.L. , Ulevitch R.J. , Munford R.S. Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14 - mediated pathway . *J. Exp. Med.* (1992) , 176 : 485 - 494 .
- 297) Kiyotaki C. , Bloom B.R. Activation of murine macrophage cell lines . Possible involvement of protein kinases in stimulation of superoxide production . *J. Immunol.* (1984) , 133 : 923 - 931 .
- 298) Klemper M.S. An Adenosine Triphosphate-dependent Calcium Uptake pump in human neutrophil lysosomes . *J. Clin. Invest.* (1985) 76 : 303 - 310 .
- 299) Knapp P.E. , Swanson J.A. Plasticity of the tubular lysosomal compartment in macrophages . *J. Cell Sci.* (1990) , 95 : 433 - 439 .

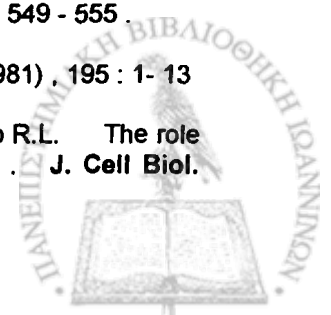


- 300) Knethen A. Von , Brune B. Cyclooxygenase-2 : an essential regulator of NO-mediated apoptosis **FASEB. J.** (1997) , 11 : 887-895 .
- 301) Koeffler H.P. , Amatruda T. , Ikekawa N. , Kobayashi Y. , DeLuca H.F. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and its fluorinated analogues . **Cancer Res.** (1984) , 44 : 5624 - 5628 .
- 302) Koeffler H.P. , Reichel H. , Bishop J.E. , Norman A.W. Interferon- γ stimulates production of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ by normal human macrophages . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1985) , 127 : 596 - 603 .
- 303) Koerner T.J. , Hamilton T.A. , Adams D.O. Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide : Evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA . **J. Immunol.** (1987) , 139 : 239 - 243 .
- 304) Koff W.C. , Dunegan M.A. Modulation of macrophage - mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones . **J. Immunol.** (1985) , 135 : 350 - 354 .
- 305) Koff W.C. , Dunegan M.A. Neuroendocrine hormones suppress macrophage - mediated lysis of Herpes Simplex Virus - infected cells . **J. Immunol.** (1986) , 136 : 705 - 709 .
- 306) Konur A. , Krause S.W. , Rehli M. , Kreutz M. , Andreesen R. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide . **J. Immunol.** (1996) , 157 : 2109 - 2115 .
- 307) Koopman W.J. , Gillis M.H. , David J.R. Prevention of MIF activity by agents known to increase cellular Cyclic AMP . **J. Immunol.** (1973) , 110 : 1609 - 1614 .
- 308) Kornfeld S. , Mellman I. The biogenesis of lysosomes . **Annu. Rev. Cell Biol.** (1989) , 5 : 483 - 525 .
- 309) Kosaka H. , Wishnok J.S. , Miwa M. , Leaf C.D. , Tannenbaum S.R. Nitrosation by stimulated macrophages . Inhibitors , enhancers and substrates . **Carcinogenesis** (1989) , 10 : 563 - 566 .
- 310) Kotoulas O.B. , Phillips M.J. , Maintas D. Electron microscopic aspects of autophagocytosis in hydrocortisone-treated newborn rat hepatocytes . **Hippocrates** (1977) , 2 : 133 - 139 .
- 311) Kotoulas O.B. An electron microscopic and biochemical study of the effects of Insulin on newborn rat hepatocytes . **Path. Res. Pract.** (1981) , 172 : 138 - 147 .
- 312) Kotoulas O.B. An electron microscopic and biochemical study of the effects of glucagon on newborn rat hepatocytes . **Bull. Assoc. Anat.** (1984) , 68 : 189 - 197 .
- 313) Kozeny G.A. , Barbato A.L. , Bansal V.K. , Vertuno L.L. , Hano J.E. Hypercalcemia associated with silicone-induced granulomas . **N. Engl. J. Med.** (1984) , 311 : 1103 - 1105 .
- 314) Kramer R.M. , Roberts E.F. , Manetta J. , Putnam J.E. The Ca²⁺ - sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100 - kDa protein in human monoblast U937 cells . **J. Biol. Chem.** (1991) , 266 : 5268 - 5272 .
- 315) Kroemer G. , Brezinschek H.P. , Faessler R. , Schauenstein K. , Wick G. Physiology and pathology of an immunoendocrine feedback loop . **Immunol. Today** (1988) , 9 : 163 - 165 .
- 316) Kroncke K.D. , Rodriguez M.L. , Kolb H. , Kolb-Bachofen V. Cytotoxicity of activated rat macrophages against syngeneic islet cells is arginine-dependent , correlates with citrulline and nitrite concentrations and is identical to lysis by the nitric oxide donor nitroprusside . **Diabetologia** (1993) , 36 : 17 - 24 .
- 317) Kroner E.E. , Peskar B.A. , Fiscer H. , Ferber E. Control of arachidonic acid accumulation in bone marrow - derived macrophages by acyltransferases . **J. Biol. Chem.** (1981) , 256 : 3690 - 3697 .
- 318) Kunkel S.L. , Chensue S.W. , Plewa M. , Higashi G.I. Macrophage function in the Schistosoma mansoni egg - induced pulmonary granuloma . **Am. J. Clin. Pathol.** (1984) , 114 : 240 - 249 .
- 319) Kunkel S.L. The importance of arachidonate metabolism by immune and non-immune cells **Lab. Invest.** (1988) , 58 : 119 - 121 .

- 320) Kurland J.I. , Bockman R. Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 952 - 957 .
- 321) Kurose I. , Saito H. , Miura S. , Ebinuma H. , Higuchi H. , Watanabe N. , Zeki S. , Nakamura T. , Takaishi M. , Ishii H. CD18/ICAM-1-dependent oxidative NF- κ B activation leading to nitric oxide production in rat Kupffer cells cocultured with syngeneic Hepatoma cells . *J. Clin. Invest.* (1997) , 99 : 867 - 878 .
- 322) Langer J.A. , Pestka S. Interferon receptors . *Immunol. Today* (1988) , 9 : 393 - 400 .
- 323) Laochumroonvorapong P. , Paul S. , Elkon K.B. , Kaplan G. Hydrogen peroxide induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium* - M. Intracellulare within cultured human monocytes . *Infect. Immun.* (1996) , 64 : 452 - 459 .
- 324) Lappin D. , Whaley K. Adrenergic receptors on monocytes modulate complement component synthesis . *Clin. Exp. Immunol.* (1982) , 47 : 606 - 612 .
- 325) Lergen M.T. , Tannenbaum C.S. LPS regulation of specific protein synthesis in murine peritoneal macrophages . *J. Immunol.* (1986) , 136 : 988 - 993 .
- 326) Lerner A.C. , David M. , Feldman G.M. , Igarashi K.I. , Hackett R.H. , Webb D.S.A. , Sweitzer S.M. , Petricoin E.F. , Finbloom D.S. Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines . *Science* (1993) , 261 : 1730 - 1733 .
- 327) Lerner J. Insulin and the stimulation of glycogen synthesis . *Adv. Enzymol.* (1990) , 63 : 173 - 231 .
- 328) Larrick J.W. , Fischer D.G. , Anderson S.J. , Koren H.S. Characterization of a human macrophage - like cell line stimulated in vitro : A model of macrophage functions . *J. Immunol.* (1980) , 125 : 6 - 12 .
- 329) Laskin D.L. , Sirak A.A. , Pilaro A.M. , Laskin J.D. Functional and biochemical properties of rat Kupffer cells and peritoneal macrophages . *J. Leukocyte Biol.* (1988) , 44 : 71 - 78 .
- 330) Laskin D.L. , Soltys R.A. , Berg R.A. , Riley D.J. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 10 : 58 - 64 .
- 331) Lavis V.R. , Strada S.J. , Ross C.P. , Hersh E.M. , Thompson W.J. Comparison of the responses of freshly isolated and cultured human monocytes and P388D1 cells to agents affecting cyclic AMP metabolism . *J. Lab. Clin. Med.* (1980) , 96 : 551 - 561 .
- 332) Lawson C.A. , Yan S.D. , Yan S.F. , Liao H. , Zhou Y.S. , Sobel J. , Kiesel W. , Stern D.M. , Pinsky D.J. Monocytes and Tissue Factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation . *J. Clin Invest.* (1997) , 99 : 1729 - 1738 .
- 333) Lee S.H. , Soyoola E. , Chanmugam P. , Hart S. , Sun W. , Zhong H. , Liou S. , Simmons D. , Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide . *J. Biol. Chem.* (1992) , 267 : 25934 - 25938 .
- 334) Lee S.W. , Tsou A.P. , Chan H. , Thomas J. , Petrie K. , Eugui E.M. , Allison A.C. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the Interleukin -1 β gene and decrease the stability of Interleukin -1 β mRNA . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) , 85 : 1204 - 1208 .
- 335) Leiter E.H. Murine macrophages and pancreatic β -cells : chemotactic properties of Insulin and β -cytostatic action of Interleukin-1 . *J. Exp. Med.* (1987) , 165 : 1174 - 1179 .
- 336) Lemaire I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages . *J. Immunol.* (1988) , 140 : 2983 - 2988 .
- 337) Lenardo M.J. , Baltimore D. NF- κ B : A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control . *Cell* (1989) , 58 : 227 - 229 .

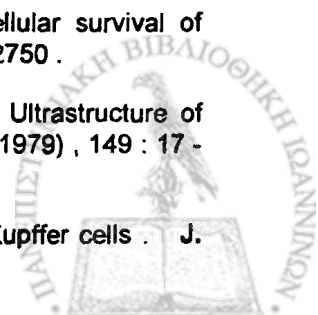


- 338) Lenten B.J. Van , Fogelman A.M. , Seager J. , Ribí E. , Haberland M.E. , Edwards P.A. Bacterial endotoxin selectively prevents the expression of scavenger-receptor activity on human monocyte-macrophages . *J. Immunol.* (1985) , 134 : 3718 - 3721 .
- 339) Lepay D.A. , Nathan C.F. , Steinman R.M. , Murray H.W. , Cohn Z.A. Murine Kupffer cells : Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates . *J. Exp. Med.* (1985) , 161 : 1079 - 1096 .
- 340) Lepay D.A. , Steinman R.M. , Nathan C.F. , Murray H.W. , Cohn Z.A. Liver macrophages in murine Listeriosis : Cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates . *J. Exp. Med.* (1985) , 161 : 1503 - 1512 .
- 341) Leslie C.C. , Voelker D.R. , Channon J.Y. , Wall M.M. , Zelarney P.T. Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from a macrophage cell line RAW 264.7 . *Biochim. Biophys. Acta* (1988) , 963 : 476 - 492 .
- 342) Leslie C.C. , Channon J.Y. Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity . *Biochim. Biophys. Acta* (1990) , 1045 : 261 - 270 .
- 343) Leslie C.C. Macrophage phospholipase A2 specific for sn-2-arachidonic acid . *Meth. Enzymol.* (1990) , 187 : 216 - 225 .
- 344) Leslie C.C. Kinetic properties of a high molecular mass arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 that exhibits lysophospholipase activity . *J. Biol. Chem.* (1991) , 266 : 11366 - 11371
- 345) Levitzki A. From epinephrine to cyclic AMP . *Science* (1988) , 241 : 800 - 806 .
- 346) Levitzki A. Tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction . *FASEB J.* (1992) , 6 : 3275 - 3282 .
- 347) Lewis C.E. , McGee J. O'D. , editors . The Macrophage . I.R.L. Press at Oxford University Press (1992) . Oxford , New York , Tokyo .
- 348) Li H.T. , Zhao B.L. , Hou J.W. , Xin W.J. Two-peak kinetic curve of the chemiluminescence in phorbol-induced macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) , 223 : 311 - 314 .
- 349) Li J. , Aderem A. MacMARCKS , a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates . *Cell* (1992) , 70 : 791 - 801 .
- 350) Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes . *Circulation* (1995) , 91 : 2844 - 2850 .
- 351) Liew F.Y. , Millott S. , Parkinson C. , Palmer R.M.J. , Moncada S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 4794 - 4797 .
- 352) Lim L.K. , Hunt N.H. , Evans T. , Weidemann M.J. Rapid changes in the activities of the enzymes of cyclic AMP metabolism after addition of A23187 to macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1981) , 103 : 745 - 750 .
- 353) Lim L.K. , Hunt N.H. , Eichner R.D. , Weidemann M.J. Cyclic AMP and the regulation of prostaglandin production by macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) , 114 : 248 - 254 .
- 354) Lim L.K. , Hunt N.H. , Weidemann M.J. Reactive oxygen production , arachidonate metabolism and cyclic AMP in macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) , 114 : 549 - 555 .
- 355) Limbird L.E. Activation and attenuation of adenylate cyclase . *Biochem. J.* (1981) , 195 : 1- 13
- 356) Lin T.H. , Yurochko A. , Kornberg L. , Morris J. , Walker J.J. , Haskill S. , Juliano R.L. The role of protein tyrosine phosphorylation in Integrin-mediated gene induction in monocytes . *J. Cell Biol.* (1994) , 126 : 1585 - 1593 .



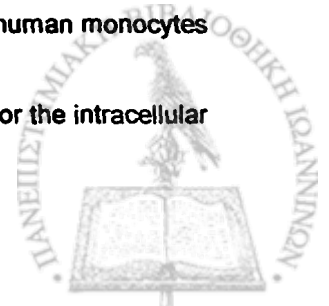
- 357) Lin W.W. , Chen B.C. Distinct PKC isoforms mediate the activation of cPLA₂ and Adenyl Cyclase by Phorbol Ester in RAW 264.7 macrophages . *Br. J. Pharmacol.* (1998) 125 : 1601 - 1609 .
- 358) Lincoln T.M. , Cornwell T.L. , Komalavilas P. , Boerth N. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase in Nitric Oxide Signaling . *Meth. Enzymol.* (1996) , 269 : 149 - 166 .
- 359) Link E.M. , Riley P.A. Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/ xanthine oxidase system . *Biochem. J.* (1988) , 249 : 391 - 399 .
- 360) Liscovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 393 - 399 .
- 361) Lister M.D. , Glaser K.B. , Ulevitch R.J. , Dennis E.A. Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A2 in vitro and prostaglandin E2 production in vivo of the macrophage - like P388D1 cell . *J. Biol. Chem.* (1989) , 264 : 8520 - 8528 .
- 362) Liu H. , Chao W. , Olson M.S. Regulation of the surface expression of the Platelet Activating Factor Receptor in IC-21 peritoneal macrophages . *J. Biol. Chem.* (1992) , 267 : 20811 - 20819 .
- 363) Lohmann - Matthes M.L. , Steinmuller C. , Franke - Ullmann G. Pulmonary macrophages . *Eur. Respir. J.* (1994) , 7 : 1678 - 1689 .
- 364) Lolait S.J. , Clements J.A. , Markwick A.J. , Cheng C. , McNally M. , Smith A.I. , Funder J.W. Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and post-translational processing of beta-endorphin in spleen macrophages . *J. Clin. Invest.* (1986) , 77 : 1776 - 1779 .
- 365) Loose L.D. , DiLuzio N.R. Effect of prostaglandin E1 on cellular and humoral immune responses . *J. Reticuloendothel. Soc.* (1973) , 13 : 70 - 77 .
- 366) Lopes-Virella M.F. , Klein R.L. , Lyons T.J. , Stevenson H.C. , Witztum J.L. Glycosylation of Low-Density Lipoprotein enhances Cholesteryl Ester synthesis in human monocyte-derived macrophages . *Diabetes* (1988) , 37 : 550 - 557 .
- 367) Lotan M. , Schwartz M. Cross talk between the Immune System and the Nervous System in response to injury . Implication for regeneration . *FASEB J.* (1994) , 8 : 1026 - 1033 .
- 368) Lowry O.H. , Rosenbrough N.J. , Lewis -Farr A. , Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J. Biol. Chem.* (1951) , 193 : 265 - 275 .
- 369) Luetig B. , Steinmuller C. , Gifford G.E. , Wagner H. , Lohmann - Matthes M.L. Macrophage activation by the polysaccharide Arabinogalactan isolated from the plant cell cultures of *Echinacea purpurea* . *J. Natl. Cancer Inst.* (1989) , 81 : 669 - 675 .
- 370) Lumpkin M.D. The regulation of ACTH secretion by IL-1 . *Science* (1987) , 238 : 452 - 454 .
- 371) Lundy S.R. , Dowling R.L. , Stevens T.M. , Kerr J.S. , Mackin W.M. , Gans K.R. Kinetics of phospholipase A2 , arachidonic acid and eicosanoid appearance in mouse zymosan peritonitis . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2671 - 2677 .
- 372) Lunec J. Free radicals : their involvement in disease processes . *Ann. Clin. Biochem.* (1990) , 27 : 173 - 182 .
- 373) MacDermot J. , Fuller R.W. Chapter 6. , Macrophages , *in* : Barnes P.J. , Rodger I.W. , Thomson N.C. , editors . *Asthma : Basic mechanisms and clinical management* . Academic Press , 1989 . London , San Diego , New York , Boston , Sydney , Tokyo , Toronto . pp.97 - 113 .
- 374) Maher J.J. , Friedman S.L. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver . *Semin. Liver Dis.* (1993) , 13 : 13 - 20 .
- 375) Maintas D.B. , Kotoulas O.B. , Kotoulas A.O. A quantitative description of the insulin-induced ultrastructural changes in newborn rat hepatocytes . *Histol. Histopathol.* (1993) , 8 : 235 - 242 .
- 376) Mannick J.B. , Hausladen A. , Liu L. , Hess D.T. , Zeng M. , Miao Q.X. , Kane L.S. , Gow A.J. , Stamler J.S. Fas-induced Caspase denitrosylation . *Science* (1999) 284 : 651 - 654 .

- 377) Manthey C.L. , Qureshi N. , Stutz P.L. , Vogel S.N. Lipopolysaccharide antagonists block Taxol-induced signaling in murine macrophages . *J. Exp. Med.* (1993) , 178 : 695 - 702 .
- 378) Maridonneau-Parini I. , Errasfa M. , Russo-Marie F. Inhibition of O₂⁻ generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin-1 in alveolar macrophages . *J. Clin. Invest.* (1989) , 83 : 1936 - 1940 .
- 379) Marletta M.A. , Yoon P.S. , Iyengar R. , Leaf C.D. , Wishnok J.S. Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate : Nitric oxide is an intermediate . *Biochemistry* (1988) , 27 : 8706 - 8711 .
- 380) Mathison J.C. , Schreiber R.D. , LaForest A.C. , Ulevitch R.J. Suppression of ACTH-induced steroidogenesis by supernatants from LPS-treated peritoneal exudate macrophages . *J. Immunol.* (1983) , 130 : 2757 - 2762 .
- 381) Matsuo S. , Nakagawara A. , Ikeda K. , Mitsuyama M. , Nomoto K. Enhanced release of reactive oxygen intermediates by immunologically activated rat Kupffer cells . *Clin. Exp. Immunol.* (1985) , 59 : 203 - 209 .
- 382) Matthys K.E. , Van Hove C.E. , Jorens P.G. , Rosseneu M. , Marescau B. , Herman A.G. , Bult H. Dual effects of oxidized low-density lipoprotein on immune-stimulated nitric oxide and prostaglandin release in macrophages . *Eur. J. Pharmacol.* (1996) , 298 : 97 - 103 .
- 383) Mael J. , Buchmuller-Rouiller Y. Effect of lipopolysaccharide on intracellular killing of *Leishmania enriettii* and correlation with macrophage oxidative metabolism . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 203 - 208 .
- 384) May W.S. , Sahyoun N. , Wolf M. , Cuatrecasas P. Role of intracellular calcium mobilization in the regulation of Protein Kinase C - mediated membrane processes . *Nature* (1985) , 317 : 549 - 551 .
- 385) Mayer A.M.S. , Spitzer J.A. Modulation of superoxide generation in In Vivo lipopolysaccharide-primed Kupffer cells by staurosporine , okadaic acid , manoolide , arachidonic acid , genistein and sodium orthovanadate . *J. Pharmacol. Exp. Therap.* (1994) , 268 : 238 - 247 .
- 386) Mayer R.J. , Marshall L.A. New insights on mammalian phospholipase A₂(s) : comparison of arachidonoyl-selective and nonselective enzymes . *FASEB J.* (1993) , 7 : 339 - 348 .
- 387) Mayhew T.M. , Williams M.A. A quantitative morphological analysis of macrophage stimulation : 1. A study of subcellular compartments and of the cell surface . *Z. Zellforsch* (1974) , 147 : 567 - 588 .
- 388) Mayhew T.M. , Williams M.A. A quantitative morphological analysis of macrophage stimulation : 2. Changes in granule number , size and size distributions . *Z. Zellforsch* (1974) , 150 : 529 - 543 .
- 389) McCarron R.M. , Goroff D.K. , Luhr J.E. , Murphy M.A. , Herscovitz H.B. Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages . *Meth. Enzymol.* (1984) , 108 : 274 - 284 .
- 390) McCarter M.D. , Mack V.E. , Daly J.M. , Naama H.A. , Calvano S.E. Trauma-induced alterations in macrophage function . *Surgery* (1998) , 123 : 96 - 101 .
- 391) McCarthy J.E. , Redmond P.H. , Duggan S.M. , Watson R.W.G. , Condon C.M. , O'Donnell J.R. , Bouchier-Hayes D.J. Characterization of the defects in murine peritoneal macrophage function in the early post-splenectomy period . *J. Immunol.* (1995) , 155 : 387 - 396 .
- 392) McDonald J.K. , Lumpkin M.D. , Samson W.K. , McCann S.M. Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1985) , 82 : 561 - 564 .
- 393) McNeely T.B. , Turco S.J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2745 - 2750 .
- 394) Meer J.W.M. Van Der , Beelen R.H.J. , Fluitsma D.M. , Furth R. Van Ultrastructure of mononuclear phagocytes developing in liquid bone marrow cultures . *J. Exp. Med.* (1979) , 149 : 17 - 26 .
- 395) Melly M.A. , Duke L.J. , Koenig M.G. Studies on isolated cultured rabbit Kupffer cells . *J. Reticuloendothel. Soc.* (1972) , 12 : 1 - 15 .



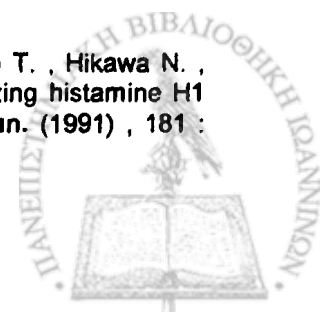
- 396) Meltzer M.S. Macrophage activation for tumor cytotoxicity : characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation . *J. Immunol.* (1981) , 127 : 179 - 183 .
- 397) Menendez J.A. , McGregor I.S. , Healey P.A. , Atrens D.M. , Leibowitz S.F. Metabolic effects of Neuropeptide Y injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus . *Brain Res.* (1990) , 516 : 8 - 14 .
- 398) Meng F. , Lowell C.A. Lipopolysaccharide (LPS)- induced Macrophage Activation and signal transduction in the absence of Src-Family kinases Hck , Fgr and Lyn . *J. Exp. Med.* (1997) , 185 : 1661 - 1670 .
- 399) Meyer M. , Schreck R. , Baeuerle P.A. H_2O_2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor . *EMBO J.* (1993) , 12 : 2005 - 2015 .
- 400) Michell R.H. Inositol lipids in cellular signalling mechanisms . *TIBS* (1992) , 17 : 274 - 276 .
- 401) Michl J. , Ohlbaum D.J. , Silverstein S.C. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages . *J. Exp. Med.* (1976) , 144 : 1465 - 1483 .
- 402) Mikkelsen H.B. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines . *Histol. Histopathol.* (1995) , 10 : 719 - 736 .
- 403) Miller L. , Alley E.W. , Murphy W.J. , Russell S.W. , Hunt J.S. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages . *J. Leukocyte Biol.* (1996) , 59 : 442 - 450 .
- 404) Miller L.J. , Schwarting R. , Springer T.A. Regulated expression of the Mac-1 , LFA-1 , p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 2891 - 2900 .
- 405) Mirossay L. , Chastre E. , Callebort J. , Launay J.M. , Housset B. , Zimber A. , Abita J.P. , Gespach C. Histamine H2 receptors and histidine decarboxylase in normal and leukemic human monocytes and macrophages . *Am. J. Physiol.* (1994) , 267 : R602 - R611 .
- 406) Misra U.K. , Gawdi G. , Pizzo S.V. Cyclosporin A inhibits Inositol 1,4,5-Triphosphate binding to its receptors and release of calcium from intracellular stores in peritoneal macrophages . *J. Immunol.* (1998) , 161 : 6122 - 6127 .
- 407) Misra U.K. , Pizzo S.V. Upregulation of macrophage plasma membrane and nuclear Phospholipase D activity on ligation of the α 2-Macroglobulin Signaling Receptor : Involvement of Heterotrimeric and Monomeric G-proteins . *Arch. Biochem. Biophys.* (1999) , 363 : 68 - 80 .
- 408) Mohamed-Ali H. , DeSouza P. , Shakibaei M. , Hecker-Kja A. , Kolkenbrock H. , Merker H.J. Synovial and peritoneal macrophages in organoid culture . *Histol. Histopathol.* (1995) , 10 : 393 - 403
- 409) Mohri M. , Spriggs D.R. , Kufe D. Effects of lipopolysaccharide on phospholipase A2 activity and Tumor Necrosis Factor expression in HL-60 cells . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2678 - 2682 .
- 410) Mokoena T.R. , Gordon S. Human macrophage activation : Modulation of mannosyl-fucosyl receptor activity in vitro by lymphokines , gamma and alpha interferons and dexamethasone . *J. Clin. Invest.* (1985) , 75 : 624 - 631 .
- 411) Mokoena T.R. and Gordon S. Chapter 2 : Macrophages and Inflammatory Responses , pp. 29 - 42 . In : Peters T.J. , editor . *Subcellular Pathology of Systemic Disease* . Chapman and Hall (1987) . London .
- 412) Monick M.M. , Carter A.B. , Gudmundsson G. , Mallampalli R. , Powers L.S. , Hunninghake G.W. A Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C regulates activation of p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinases in Lipopolysaccharide-stimulated human alveolar macrophages . *J. Immunol.* (1999) , 162 : 3005 - 3012 .
- 413) Morland B. , Kaplan G. Macrophage activation in vivo and in vitro . *Exp. Cell Res.* (1977) , 108 : 279 - 288 .

- 414) Morrey K.M. , McLachlan J.A. , Serkin C.D. , Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone Melatonin . *J. Immunol.* (1994) , 153 : 2671 - 2680 .
- 415) Morrison D.K. , Cutler R.E. The complexity of Raf-1 regulation . *Current Opinion in Cell Biol.* (1997) , 9 : 174 - 179 .
- 416) Moscat J. , Herrero C. , Garcia-Barreno P. , Municio A.M. Phospholipase C - diglyceride lipase is a major pathway for arachidonic acid release in macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986) , 141 : 367 - 373 .
- 417) Mosier D.E. Separation of macrophages on plastic and glass surfaces . *Meth. Enzymol.* (1984) , 108 : 294 - 297 .
- 418) Motta P. A scanning electron microscopic study of the rat liver sinusoid : Endothelial and Kupffer cells . *Cell Tiss. Res.* (1975) , 164 : 371 - 385 .
- 419) M'Rini-Puel C. , Thardin J.F. , Forgue M.F. , Cambon C. , Seguelas M.H. , Pipy B. Arachidonic acid metabolism of rat peritoneal macrophages after passive sensitization and allergen challenge . *Biochim. Biophys. Acta* (1993) , 1167 : 165 - 174 .
- 420) Mullet D. , Fertel R.H. , Kniss D. , Cox G.W. An increase in intracellular Cyclic AMP modulates nitric oxide production in INF- γ -treated macrophages . *J. Immunol.* (1997) , 158 : 897 - 904 .
- 421) Munn D.H. , Beall A.C. , Song D. , Wrenn R.W. , Throckmorton D.C. Activation-induced Apoptosis in human macrophages : Developmental regulation of a novel cell death pathway by Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interferon- γ . *J. Exp. Med.* (1995) , 181 : 127 - 136 .
- 422) Munro J.M. , Cotran R.S. The pathogenesis of atherosclerosis : Atherogenesis and inflammation . *Lab. Invest.* (1988) , 58 : 249 - 261 .
- 423) Muroi M. , Suzuki T. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF κ B proteins of a mouse macrophage-like cell line , J774 . *Cellular Signalling* (1993) , 5 : 289 - 298 .
- 424) Murphy G.J. , Hruby V.J. , Trivedi D. , Wakelam M.J.O. , Houslay M.D. The rapid desensitization of Glucagon-stimulated Adenylate Cyclase is a cyclic AMP-independent process that can be mimicked by hormones which stimulate Inositol phospholipid metabolism . *Biochem. J.* (1987) , 243 : 39 - 46 .
- 425) Murray H.W. , Spitalny G.L. , Nathan C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon- γ . *J. Immunol.* (1985) , 134 : 1619 - 1622 .
- 426) Muschel R.J. , Rosen N. , Rosen O.M. , Bloom B.R. Modulation of Fc-mediated phagocytosis by cyclic AMP and Insulin in a macrophage-like cell line . *J. Immunol.* (1977) , 119 : 1813 - 1820 .
- 427) Musso T. , Varesio L. , Zhang X. , Rowe T.K. , Ferrara P. , Ortaldo J.R. , O'Shea J.J. , McVicar D.W. IL-3 and IL-4 induce Lsk , a Csk-like Tyrosine Kinase in human monocytes . *J. Exp. Med.* (1994) , 180 : 2383 - 2388 .
- 428) Najjar V.A. , Fridkin M. , editors . Antineoplastic , immunogenic and other effects of the tetrapeptide Tuftsin : a natural macrophage activator . *Annals of the New York Academy of Sciences* , volume 419 . New York , 1983 .
- 429) Nahum A. , Sznajder J.I. Chapter 58 : Role of Free Radicals in critical illness . In : Hall J.B. , Schmidt G.A. , Wood L.D.H. , editors . *Principles of Critical Care* , p.679 - 692 , McGraw-Hill Inc. (1992) , New York , St.Louis, San Francisco .
- 430) Nakagawara A. , Nathan C.F. , Cohn Z.A. Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro . *J. Clin. Invest.* (1981) , 68 : 1243 - 1252 .
- 431) Nakamura S.I. , Nishizuka Y. Lipid mediators and protein kinase C activation for the intracellular signaling network . *J. Biochem.* (1994) , 115 : 1029 - 1034 .

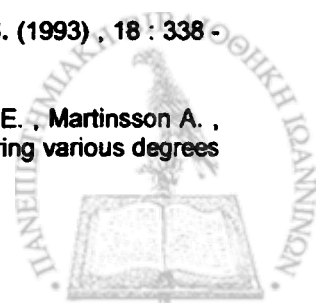


- 432) Narumi S. , Finke J.H. , Hamilton T.A. Interferon- γ and Interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages . *J. Biol. Chem.* (1990) , 265 : 7036 - 7041 .
- 433) Narumi S. , Hamilton T.A. Dexamethasone selectively regulates LPS - inducible gene expression in murine peritoneal macrophages . *Immunopharmacology* (1990) , 19 : 93 - 101 .
- 434) Nathan C.F. , Asofsky R. , Terry W.D. Characterization of the non-phagocytic adherent cell from the peritoneal cavity of normal and BCG-treated mice . *J. Immunol.* (1977) , 118 : 1612 - 1621 .
- 435) Nathan C.F. , Root R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages : Dependence on sequential activation and triggering . *J. Exp. Med.* (1977) , 146 : 1648 - 1662 .
- 436) Nathan C.F. , Brukner L.H. , Silverstein S.C. , Cohn Z.A. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes : 1. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide . *J. Exp. Med.* (1979a) , 149 : 84 - 99 .
- 437) Nathan C.F. , Silverstein S.C. , Brukner L.H. , Cohn Z.A. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes : 2. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity . *J. Exp. Med.* (1979b) , 149 : 100 - 113 .
- 438) Nathan C.F. , Brukner L.H. , Kaplan G. , Unkeless J. , Cohn Z.A. Role of activated macrophages in antibody-dependent lysis of tumor cells . *J. Exp. Med.* (1980) , 152 : 183 - 197 .
- 439) Nathan C.F. , Cohn Z.A. Role of oxygen-dependent mechanisms in antibody-induced lysis of tumor cells by activated macrophages . *J. Exp. Med.* (1980) , 152 : 198 - 208 .
- 440) Nathan C.F. Secretion of oxygen intermediates : Role in effector functions of activated macrophages . *Federation Proc.* (1982) , 41 : 2206 - 2211 .
- 441) Nathan C.F. , Murray H.W. , Wiebe M.E. , Rubin B.Y. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative activity and antimicrobial activity . *J. Exp. Med.* (1983) , 158 : 670 - 689 .
- 442) Nathan C.F. , Horwitz C.R. , De La Harpe J. , Vadhan-Raj S. , Sherwin S.A. , Oettgen H.F. , Krown S.E. Administration of recombinant interferon- γ to cancer patients enhances monocyte secretion of hydrogen peroxide . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1985) , 82 : 8686 - 8690 .
- 443) Nathan C.F. , Hibbs J.B.Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity . *Current Opin. Immunol.* (1991) , 3 : 65 - 70 .
- 444) Nelson D.S. Macrophages : progress and problems . *Clin. Exp. Immunol.* (1981) , 45 : 225 - 233 .
- 445) Nelken N.A. , Coughlin S.R. , Gordon D. , Wilcox J.N. Monocyte Chemoattractant Protein-1 in human atheromatous plaques . *J. Clin. Invest.* (1991) , 88 : 1121 - 1127 .
- 446) Nestel F.P. , Price K.S. , Seemayer T.A. , Lapp W.S. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of Tumor Necrosis Factor- α during Graft-Versus-Host disease . *J. Exp. Med.* (1992) , 175 : 405 - 413 .
- 447) Netea M.G. , Kullberg B.J. , Van Der Meer J.W.M. Lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor and interleukin-1 is differentially regulated at the receptor level : the role of CD14-dependent and CD14-independent pathways . *Immunology* (1998) , 94 : 340 - 344 .
- 448) Newton A.C. Regulation of Protein Kinase C . *Current Opinion Cell Biol.* (1997) 9 : 161 - 167
- 449) Nicholson S. , Bonecini-Almeida M.G. , Lapa e Silva J.R. , Nathan C. , Xie Q.W. , Mumford R. , Weidner J.R. , Calacay J. , Geng J. , Boechat N. , Linhares C. , Rom W. , Ho J.L. Inducible Nitric Oxide Synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis . *J. Exp. Med.* (1996) , 183 : 2293 - 2302 .
- 450) Nicod L.P. Role of antigen-presenting cells in lung immunity . *Eur. Respir. Rev.* (1996) , 6 : 142 - 150 .

- 451) Nicola N.A. Hemopoietic cell growth factors and their receptors . *Annu. Rev. Biochem.* (1989) , 58 : 45 - 77 .
- 452) Nilsson M. , Nilsson K. , Forsbeck K. Increased endocytosis and formation of multivesicular bodies in Phorbol Ester-stimulated human monoblastic U-937 cells . *Exp. Cell Res.* (1989) , 181 : 551 - 565 .
- 453) Nishizuka Y. Turnover of Inositol Phospholipids and signal transduction . *Science* (1984) , 225 : 1365 - 1370 .
- 454) Nishizuka Y. Studies and perspectives of Protein Kinase C . *Science* (1986) , 233 : 305 - 312 .
- 455) Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation . *Nature* (1988) , 334 : 661 - 665 .
- 456) Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C . *Science* (1992) , 258 : 607 - 614 .
- 457) North R.J. The concept of the activated macrophage . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 806 - 809 .
- 458) Northoff H. , Andus T. , Tran-Thi T.A. , Bauer J. , Decker K. , Kubanek B. , Heinrich P.C. The inflammation mediators Interleukin-1 and Hepatocyte-Stimulating factor are differently regulated in human monocytes . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 707 - 711 .
- 459) Norton J.M. , Munck A. In vitro actions of glucocorticoids on murine macrophages : Effects on glucose transport and metabolism , growth in culture and protein synthesis . *J. Immunol.* (1980) , 125 : 259 - 266 .
- 460) Nossal G.J.V. Life , death and the immune system . *Sci. American* (1993) , 269 : 21 - 30 .
- 461) Novogrodsky A. , Vanichkin A. , Patya M. , Gazit A. , Oshero N. , Levitzki A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors . *Science* (1994) , 264 : 1319 - 1322 .
- 462) Nowell G.H. , Cruse J.M. , Sprunt D.H. Detection of β -adrenergic receptors on mouse peritoneal macrophages by binding to insolubilized hormone preparation . *Fed. Proc.* (1977) , 36 (3) : abstract no.5259 .
- 463) Nussler A.K. , Beger H.G. , Liu Z.Z. , Billiar T.R. Nitric oxide , hepatocytes , and inflammation . *Research Immunol.* (1995) , 146 : 671 - 677 .
- 464) O'Brien R.M. , Granner D.K. Regulation of gene expression by insulin . *Biochem. J.* (1991) , 278 : 609 - 619 .
- 465) Ogmundsdottir H.M. , Weir D.M. Mechanisms of macrophage activation . *Clin. Exp. Immunol.* (1980) , 40 : 223 - 234 .
- 466) Ogura M , Kitamura M. Oxidant Stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated Kinases and p38 Mitogen Activated Protein Kinase . *J. Immunol.* (1998) 161 : 3569 - 3574 .
- 467) Oh Y.K. , Swanson J.A. Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes . *J. Cell Biol.* (1996) , 132 : 585 - 593 .
- 468) Ohlsson B.G. , Englund M.C.O. , Karlsson A.L.K. , Knutsen E. , Erixon C. , Skribeck H. , Liu Y. , Bondjers G. , Wiklund O. Oxidized Low Density Lipoprotein inhibits Lipopolysaccharide-induced binding of Nuclear Factor- κ B to DNA and the subsequent expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin- 1β in macrophages . *J. Clin Invest.* (1996) , 98 : 78 - 89 .
- 469) Ohno S. , Shirai A. , Ueda A. , Igarashi T. , Ishigatsubo Y. , Tani K. , Okubo T. , Hikawa N. , Kawakami T. , Takenaka T. Increase in intracellular calcium induced by stimulating histamine H1 receptors in macrophage-like P388D1 cells . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1991) , 181 : 1156 - 1163 .

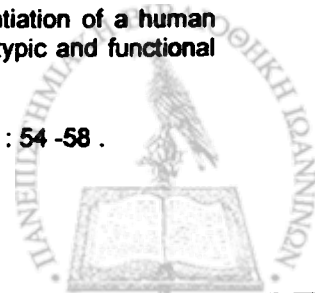


- 470) Okonogi K. , Gettys T.W. , Uhing R.J. , Tarry W.C. , Adams D.O. , Prpic V. Inhibition of Prostaglandin E2 - stimulated cAMP accumulation by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages . *J. Biol. Chem.* (1991) , 266 : 10305 - 10312 .
- 471) Oliver A.M. Macrophage heterogeneity in human fetal tissue . *Fetal macrophages. Clin. Exp. Immunol.* (1990) , 80 : 454 - 459 .
- 472) Oliver M. , Cook , Desanctis J. , Hel Z. , Wojciechowski W. , Reiner N.E. , Skamene E. , Radzioch D. Phenotypic difference between Bcg^r and Bcg^s macrophages is related to differences in Protein Kinase C - dependent signaling . *Eur. J. Biochem.* (1998) , 251 : 734 - 743 .
- 473) Ooi Y.M. Histamine suppresses in vitro synthesis of precursor (Pro-C5) of the fifth complement component (C5) by mouse peritoneal macrophages . *J. Immunol.* (1982) , 129 : 200 - 205 .
- 474) Opmeer F.A. , Adolfs M.J.P. , Bonta I.L. Direct evidence for the presence of selective binding sites for (³H) prostaglandin E2 on rat peritoneal macrophages . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) , 114 : 155 - 161 .
- 475) Oppenheim J.J. , Shevach E.M. , editors . *Immunophysiology : The Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation* . Oxford University Press (1990) . Oxford , New York , Toronto .
- 476) Ozaki T. , Yasuoka S. , Nakayama T. , Tsubura E. Glucocorticoid receptors in human alveolar macrophages and peripheral blood cells . *Clin. Exp. Immunol.* (1982) , 47 : 505 - 511 .
- 477) Pabst M.J. , Johnston R.B. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl-dipeptide or lipopolysaccharide . *J. Exp. Med.* (1980) , 151 : 101 - 114 .
- 478) Page R.C. , Davies P. , Allison A.C. Participation of mononuclear phagocytes in chronic inflammatory diseases . *J. Reticuloendothel. Soc.* (1974) , 15 : 413 - 439 .
- 479) Pan J. , Burgher K.L. , Szczepanic A.M. , Ringheim G.E. Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase : Implications for potential post-translational regulation . *Biochem. J.* (1996) , 314 : 889 - 894 .
- 480) Panuska J.R. , Fukui K. , Parker C.W. Secreted proteins of human monocytes . *Biochem. J.* (1988) , 249 : 501 - 511 .
- 481) Papadimitriou J.M. , Ashman R.B. Macrophages : current views on their differentiation , structure and function . *Ultrastruct. Pathol.* (1989) , 13 : 343 - 372 .
- 482) Papiernik M. , Dombret H. , Stefanos S. , Wietzerbin J. Control of Ia-antigen expression on phagocytic cells of the thymic reticulum by Interferon-gamma and prostaglandins . *Eur. J. Immunol.* (1986) , 16 : 296 - 300 .
- 483) Parrillo J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock . *N. Engl. J. Med.* (1993) , 328 : 1471 - 1476 .
- 484) Paul W.E. Infectious diseases and the immune system . *Sci. American* (1993) , 269 : 57 - 63 .
- 485) Pawlowski N.A. , Kaplan G. , Hamill A.L. , Cohn Z.A. , Scott W.A. Arachidonic acid metabolism by human monocytes . *J. Exp. Med.* (1983) , 158 : 393 - 412 .
- 486) Pazin M.J. , Williams L.T. Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 374 - 378 .
- 487) Pelech S.L. , Sanghera J.S. Mitogen-activated protein kinases : versatile transducers for cell signaling . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 233 - 238 .
- 488) Pellegrini S. , Schindler C. Early events in signaling by interferons . *T.I.B.S.* (1993) , 18 : 338 - 342 .
- 489) Pernow J. , Lundberg J.M. , Kaijser L. , Hjemdahl P. , Theodorsson-Norheim E. , Martinsson A. , Pernow B. Plasma Neuropeptide Y - like immunoreactivity and catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man . *Clin. Physiol.* (1986) , 6 : 561 - 578 .

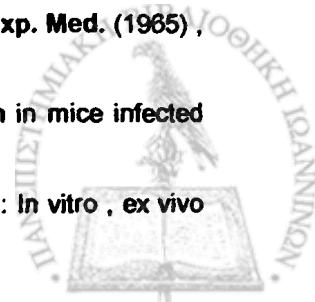


- 490) Perry V.H. , Gordon S. Macrophages and the nervous system . *International Rev. Cytol.* (1991) , 125 : 203 - 244 .
- 491) Pestka S. , Langer J.A. , Zoon K.C. , Samuel C.E. Interferons and their actions . *Annu. Rev. Biochem.* (1987) , 56 : 727 - 777 .
- 492) Petraglia F. , Calza L. , Giardino L. , Sutton S. , Marrama P. , Rivier J. , Genazzani A.R. , Vale W. Identification of immunoreactive Neuropeptide Y in human placenta : localization , secretion and binding sites . *Endocrinol.* (1989) , 124 : 2016 - 2022 .
- 493) Pick E. , Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture . *J. Immunol. Meth.* (1980) , 38 : 161 - 170 .
- 494) Pick E. , Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader . *J. Immunol. Meth.* (1981) , 46 : 211 - 226 .
- 495) Piomelli D. Arachidonic acid in cell signaling . *Current Opin. Cell Biol.* (1993) , 5 : 274 - 280 .
- 496) Polla B.S. , Healy A.M. , Amento E.P. , Krane S.M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ maintains adherence of human monocytes and protects them from thermal injury . *J. Clin. Invest.* (1986) , 77 : 1332 - 1339 .
- 497) Pollaud-Cherion C. , Vandaele J. , Quartulli F. , Seguelas M.H. , Decerprit J. , Pipy B. Involvement of Calcium and Arachidonate metabolism in Acetylated Low Density Lipoprotein - stimulated Tumor Necrosis Factor- α production by rat peritoneal macrophages . *Eur. J. Biochem.* (1998) , 253 : 345 - 353 .
- 498) Powis G. Signaling targets for anticancer drug development . *T.I.P.S.* (1991) , 12 : 188 - 194 .
- 499) Prpic V. , Uhing R.J. , Weiel J.E. , Jakoi L. , Gawdi G. , Herman B. , Adams D.O. Biochemical and functional responses stimulated by Platelet Activating Factor in murine peritoneal macrophages . *J. Cell Biol.* (1988) , 107 : 363 - 372 .
- 500) Pulverer B.J. , Kyriakis J.M. , Avruch J. , Nikolakaki E. , Woodgett J.R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP-kinases . *Nature* (1991) , 353 : 670 - 674 .
- 501) Rabinovitch M. The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages . *Exp. Cell Res.* (1967) , 46 : 19 - 28 .
- 502) Rabinowitz S. , Horstmann H. , Gordon S. , Griffiths G. Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages . *J. Cell Biol.* (1992) , 116 : 95 - 112 .
- 503) Raddassi K. , Petit J.F. , Lemaire G. LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides . *Cell. Immunol.* (1993) , 149 : 50 - 64 .
- 504) Radzioch D. , Varesio L. Protein Kinase C inhibitors block the activation of macrophages by INF- β but not by INF- γ . *J. Immunol.* (1988) , 140 : 1259 - 1263 .
- 505) Radzun H.J. , Parwaresch M.R. , Muller-Hermelink H.K. Polymorphism of acid hydrolases in human epithelioid cells indicates cellular origin and defined differentiation stages . *Path. Res. Pract.* (1982) , 175 : 50 - 61 .
- 506) Raetz C.R.H. Biochemistry of endotoxins . *Annu. Rev. Biochem.* (1990) , 59 : 129 - 170 .
- 507) Rajagopalan S. , Meng X.P. , Ramasamy S. , Harrison D.G. , Gallis Z.S. Reactive Oxygen Species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix Metalloproteinases in vitro . *J. Clin. Invest.* (1996) , 98 : 2572 - 2579 .
- 508) Rambaldi A. , Young D.C. , Hermann F. , Cannistra S.A. , Griffin J.D. Interferon- γ induces expression of the Interleukin-2 receptor gene in human monocytes . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 153 - 156 .

- 509) Randriamampita C. , Trautman A. Arachidonic acid activates Ca^{2+} extrusion in macrophages . *J. Biol. Chem.* (1990) , 265 : 18059 - 18062 .
- 510) Rasmunssen H. The cycling of calcium as an intracellular messenger . *Sci. Amer.* (1989) , 261 : 44 - 51 .
- 511) Rawadi G. , Garcia J. , Lemercier B. , Roman-Roman S. Signal transduction pathways involved in the activation of NF- κ B , AP-1 and c-fos by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in macrophages . *J. Immunol.* (1999) 162 : 2193 - 2203 .
- 512) Reichel H. , Koeffler H.P. , Norman A.W. Synthesis in vitro of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ by Interferon- γ stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages . *J. Biol. Chem.* (1987) , 262 : 10931 - 10937 .
- 513) Reichel H. , Koeffler H.P. , Norman A.W. The role of the Vitamin D endocrine system in health and disease . *N. Engl. J. Med.* (1989) , 320 : 980 - 991 .
- 514) Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions . *N. Engl. J. Med.* (1993) , 329 : 1246 - 1253 .
- 515) Reiner R.G. , Tanner A.R. , Keyhani A.H. , Wright R. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury . *Clin. Exp. Immunol.* (1981) , 43 : 376 - 380 .
- 516) Remold-O'Donnell E. Stimulation and desensitization of macrophage Adenylate Cyclase by prostaglandins and catecholamines . *J. Biol. Chem.* (1974) , 249 : 3615 - 3621 .
- 517) Remold-O'Donnell E. , Alpert H.R. Alteration of hormone-stimulated cyclic AMP synthesis in guinea pig peritoneal macrophages . *Cell. Immunol.* (1979) , 45 : 221 - 229 .
- 518) Renz H. , Gong J.H. , Schmidt A. , Nain M. , Gerns D. Release of Tumor Necrosis Factor - α from macrophages : Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides . *J. Immunol.* (1988) , 141 : 2388 - 2393 .
- 519) Rhee H.J. Van der , Burgh-de-Winter C.P.M. Van der , Daems W.Th. The differentiation of monocytes into macrophages , epithelioid cells and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas : 1. Fine structure . *Cell Tissue Res.* (1979a) , 197 : 355 - 378 .
- 520) Rhee H.J. Van der , Burgh-de-Winter C.P.M. Van der , Daems W.Th. The differentiation of monocytes into macrophages , epithelioid cells and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas : 2. Peroxidatic activity . *Cell Tissue Res.* (1979b) , 197 : 379 - 396 .
- 521) Rhee H.J. Van der , Burgh-de-Winter C.P.M. Van der , Tijssen J.G.P. , Daems W.Th. Comparative study on peroxidatic activity in inflammatory cells on cutaneous and peritoneal implants . *Cell Tissue Res.* (1979c) , 197 : 397 - 412 .
- 522) Rhodes J. Modulation of macrophage Fc-receptor expression in vitro by insulin and cyclic nucleotides . *Nature* (1975) , 257 : 597 - 599 .
- 523) Ricote M. , Li A.C. , Willson T.M. , Kelly C.J. , Glass C.K. The Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation . *Nature* (1998) , 391 : 79 - 82 .
- 524) Rietschel E.T. , Brade H. Bacterial endotoxins . *Sci. Amer.* (1992) , 267 : 26 - 33 .
- 525) Rietschel E.T. , Kirikae T. , Schade F.U. , Mamat U. , Schmidt G. , Loppnow H. , Ulmer A.J. , Zahringer U. , Seydel U. , DiPadova F. , Schreier M. , Brade H. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function . *FASEB J.* (1994) , 8 : 217 - 225 .
- 526) Rigby W.F.C. , Shen L. , Ball E.D. , Guyre P.M. , Fanger M.W. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) : a morphologic , phenotypic and functional analysis . *Blood* (1984) , 64 : 1110 - 1115 .
- 527) Rigby W.F.C. The immunobiology of vitamin D. *Immunol. Today* (1988) , 9 : 54 -58 .

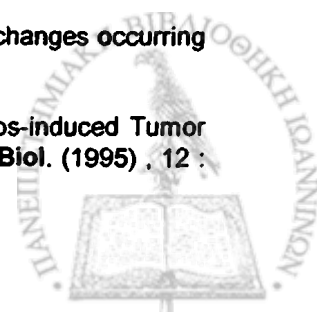


- 528) Rinehart J.J. , Wuest D. , Ackerman G.A. Corticosteroid alteration of human monocyte to macrophage differentiation . *J. Immunol.* (1982) , 129 : 1436 - 1430 .
- 529) Robinson M.J. , Cobb M.H. Mitogen-Activated Protein Kinase pathways . *Current Opinion Cell Biol.* (1997) , 9 : 180 - 186 .
- 530) Roholl P.J.M. , Kleyne J. , Prins M.E.F. , Hooijkaas H. , Vroom M.Th. , Van Unnik J.A.M. Immunologic marker analysis of normal and malignant histiocytes . *Am. J. Clin. Pathol.* (1988) , 89 : 187 - 194 .
- 531) Roith D. Le. Insulin-like growth factors . *N. Engl. J. Med.* (1997) , 336 : 633 - 640 .
- 532) Roitt I.M. Essential Immunology , sixth edition . Blackwell Scientific Publications (1988) . Oxford , London , Edinburgh , Boston , Palo Alto , Melbourne .
- 533) Rose C.E. , Juliano C.A. , Tracey D.E. , Yoshimura T. , Fu S.M. Role of Interleukin-1 in endotoxin-induced lung injury in the rat . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 10 : 214 - 221 .
- 534) Rosen A. , Nairn A.C. , Greengard P. , Cohn Z.A. , Aderem A. Bacterial Lipopolysaccharide regulates the phosphorylation of the 68K Protein Kinase C substrate in macrophages . *J. Biol. Chem.* (1989) , 264 : 9118 - 9121 .
- 535) Rosen G.M. , Pou S. , Ramos C.L. , Cohen M.S. , Britigan B.E. Free radicals and phagocytic cells . *FASEB J.* (1995) , 9 : 200 - 209 .
- 536) Ross R. , Wight T.N. , Strandness E. , Thiele B. Human atherosclerosis : Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery . *Am. J. Pathol.* (1984) , 114 : 79 - 93 .
- 537) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : A perspective for the 1990's . *Nature* (1993) , 362 : 801 - 809 .
- 538) Ross R. Atherosclerosis : A defense mechanism gone awry . *Am. J. Pathol.* (1993) , 143 : 987 - 1002 .
- 539) Rouis M. , Thomopoulos P. , Louache F. , Testa U. , Hervy C. , Titeux M. Differentiation of U-937 Human monocyte-like cell line by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 or by retinoic acid . *Exp. Cell Res.* (1985) , 157 : 539 - 543 .
- 540) Ruco L.P. , Meltzer M.S. Macrophage activation for tumor cytotoxicity : Development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 2035 - 2042 .
- 541) Saada A. , Reichert F. , Rotshenker S. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells . *J. Cell Biol.* (1996) , 133 : 159 - 167 .
- 542) Sabatino F.D. , Collins P. , McDonald J.K. Neuropeptide Y stimulation of Lutenizing Hormone secretion from the Median Eminence in vitro by estrogen-dependent and extracellular Ca²⁺-independent mechanisms . *Endocrinol.* (1989) , 124 : 2089 - 2098 .
- 543) Sadowski H.B. , Shuai K. , Darnell J.E.Jr. , Gilman M.Z. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factors and cytokine receptors . *Science* (1993) , 261 : 1739 - 1744 .
- 544) Saiki I. , Fidler I.J. Synergistic activation by recombinant mouse interferon- γ and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in mouse macrophages . *J. Immunol.* (1985) , 135 : 684 - 688 .
- 545) Saito K. , Suter E. Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG . *J. Exp. Med.* (1965) , 121 : 727 - 738 .
- 546) Saito K. , Suter E. Lysosomal acid hydrolases and hyperactivity to endotoxin in mice infected with BCG . *J. Exp. Med.* (1965) , 121 : 739 - 749 .
- 547) Salvemini D. , Masferrer J.L. Interactions of Nitric Oxide with Cyclooxygenase : In vitro , ex vivo and in vivo studies . *Meth. Enzymol.* (1996) , 269 : 12 - 25 .



- 548) Samuelsson B. , Goldyne M. , Granstrom E. , Hamberg M. , Hammarstrom S. , Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes . *Ann. Rev. Biochem.* (1978) , 47 : 997 - 1029 .
- 549) Sapolsky R. , Rivier C. , Yamamoto G. , Plotsky P. , Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor . *Science* (1987) , 238 : 522 - 524 .
- 550) Schackert G. , Simmons R.D. , Buzbee T.M. , Hume D.A. , Fidler I.J. Macrophage infiltration into experimental brain metastases : Occurrence through an intact blood-brain barrier . *J. Natl. Cancer Inst.* (1988) , 80 : 1027 - 1034 .
- 551) Schaffner A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma-interferon . *J. Clin. Invest.* (1985) , 76 : 1755 - 1764 .
- 552) Schaffer C.J. , Nanney L.B. Cell biology of wound healing . *International Rev. Cytol.* (1996) , 169 : 151 - 181 .
- 553) Schaffner A. , Rellstab P. γ -Interferon restores Listericidal activity and concurrently enhances release of reactive oxygen metabolites in dexamethasone-treated human monocytes . *J. Clin. Invest.* (1988) , 82 : 913 - 919 .
- 554) Schillace R.V. , Scott J.D. Organization of Kinase , Phosphatases and Receptor Signaling Complexes . *J. Clin. Invest.* (1999) 103 : 761 - 765 .
- 555) Schlesinger L.S. , Bellinger-Kawahara C.G. , Payne N.R. , Horwitz M.A. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3 . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2771 - 2780 .
- 556) Schmidt H.H.H.M. , Lohmann S.M. , Walter U. The Nitric Oxide and cGMP signal transduction system : Regulation and mechanism of action . *Biochim. Biophys. Acta* (1993) , 1178 : 153 - 175 .
- 557) Schneider F.J. , Opel B. , Ballhausen W. , Henkes W. , Steinlein P. , Reske K. Synthesis and expression of MHC-Class II molecules in the absence of attached invariant chains by recombinant Interferon- γ -activated bone marrow-derived macrophages . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 1235 - 1242 .
- 558) Schnyder J. , Baggiolini M. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and non-stimulated macrophages . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 435 - 450 .
- 559) Schreck R. , Rieber P. , Baeuerle P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1 . *E.M.B.O. J.* (1991) , 10 : 2247 - 2258 .
- 560) Schuber F. Influence of Polyamines on membrane functions . *Biochem. J.* (1989) , 260 : 1 - 10 .
- 561) Schulman H. , Lou L.L. Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase . Domain structure and regulation . *TIBS* (1989) , 14 : 62 - 66 .
- 562) Schultz R.M. , Nanda S.K.W. , Altom M.G. Effects of various inhibitors of arachidonic acid oxygenation on macrophage superoxide release and tumoricidal activity . *J. Immunol.* (1985) , 135 : 2040 - 2044 .
- 563) Schulz S. , Yuen P.S.T. , Garbers D.L. The expanding family of Guanylyl Cyclases . *TIPS* (1991) , 12 : 116 - 120 .
- 564) Schumann R.R. , Leong S.R. , Flagg G.W. , Gray P.W. , Wright S.D. , Mathison J.C. , Tobias P.S. , Ulevitch R.J. Structure and function of Lipopolysaccharide Binding Protein . *Science* (1990) , 249 : 1429 - 1431 .
- 565) Schumann R.R. , Van der Bosch J. , Ruller S. , Ernst M. , Schlaak M. Monocyte long-term cultivation on microvascular endothelial cell monolayers : Morphologic and phenotypic characterization and comparison with monocytes cultured on tissue culture plastic . *Blood* (1989) , 73 : 818 - 826 .

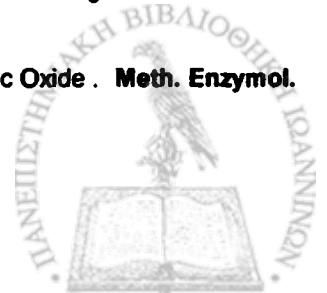
- 566) Schwartz R.H. , Bianco A.R. , Handwerger B.S. , Kahn C.R. Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes : Implications for studies of Insulin-resistant states in man . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (1975) , 72 : 474 - 478 .
- 567) Scott W.A. , Zrike J.M. , Hamill A.L. , Kempe J. , Cohn Z.A. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages . **J. Exp. Med.** (1980) , 152 : 324 - 335 .
- 568) Scully S.P. , Segel G.B. , Lichtman M.A. Relationship of superoxide production to cytoplasmic free calcium in human monocytes . **J. Clin. Invest.** (1986) , 77 : 1349 - 1356 .
- 569) Sebaldt R.J. , Prpic V. , Hollenbach P.W. , Adams D.O. , Uhing R.J. INF- γ potentiates the accumulation of diacylglycerol in murine macrophages . **J. Immunol.** (1990) , 145 : 684 - 689 .
- 570) Sebaldt R.J. , Sheller J.R. , Oates J.A. , Jackson-Roberts L. , Fitzgerald G.A. Inhibition of eicosanoid biosynthesis by glucocorticoids in humans . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (1990) , 87 : 6974 - 6978 .
- 571) Sen R. , Baltimore D. Inducibility of k-Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF-kB by a posttranslational mechanism . **Cell** (1986) , 47 : 921 - 928 .
- 572) Shakhov A.N. , Collart M.A. , Vassalli P. , Nedospasov S.A. , Jongeneel C.V. kB- type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the Tumor Necrosis Factor - α gene in primary macrophages . **J. Exp. Med.** (1990) , 171 : 35 - 47 .
- 573) Sheiks S. , Hakanson R. , Schwartz T. Y1 and Y2 receptors for Neuropeptide Y . **FEBS Lett.** (1989) , 245 : 209 - 214 .
- 574) Sherry B. , Cerami A. Cachectin / Tumor Necrosis Factor exerts endocrine , paracrine , and autocrine control of inflammatory responses . **J. Cell Biol.** (1988) , 107 : 1269 - 1277 .
- 575) Shimada S. , Katz S.I. The skin as an immunologic organ . **Arch. Pathol. Lab. Med.** (1988) , 112 : 231 - 234 .
- 576) Shimokado K. , Raines E.W. , Madtes D.K. , Barrett T.B. , Benditt E.P. , Ross R. A significant part of Macrophage-Derived Growth Factor consists of at least two forms of P.D.G.F. **Cell** (1985) , 43 : 277 - 286 .
- 577) Shinji H. , Kaiho S. , Nakano T. , Yoshida T. Reorganization of microfilaments in macrophages after LPS stimulation . **Exp. Cell Res.** (1991) , 193 : 127 - 133 .
- 578) Shiratori Y. , Tananka M. , Kawase T. , Shiina S. , Komatsu Y. , Omata M. Quantification of sinusoidal cell function in vivo . **Semin. Liver Dis.** (1993) , 13 : 39 - 49 .
- 579) Sigal E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism . **Am. J. Physiol.** (1991) , 260 : L13 - L28 .
- 580) Sigal L.H. , Ron Y. , editors . 1994 . Immunology and Inflammation : Basic Mechanisms and Clinical Consequences . *Singapore , Mc Graw - Hill International Editions* .
- 581) Silverman D.H.S. , Wu H. , Karnovsky M.L. Muramyl peptides and serotonin interact at specific binding sites on macrophages and enhance superoxide release . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1985) , 131 : 1160 - 1167 .
- 582) Sima A.A.F. , O'Neill S.J. , Naimark D. , Yagihashi S. , Klass D. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats . **Diabetes** (1988) , 37 : 544 - 549 .
- 583) Simionescu M. , Simionescu N. Proatherosclerotic events : pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration . **FASEB J.** (1993) , 7 : 1359 - 1366 .
- 584) Simeonova P.P. , Luster M.I. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced Tumor Necrosis Factor - α response from alveolar macrophages . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** (1995) , 12 : 676 - 683 .



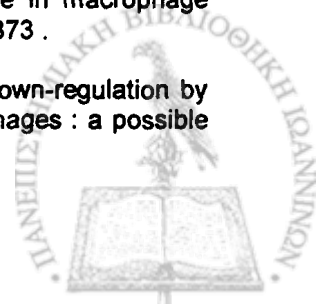
- 585) Simpson S.Q. , Singh R. , Bice D.E. Heat-killed Pneumococci and Pneumococcal capsular polysaccharides stimulate Tumor Necrosis Factor - α production by murine macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 10 : 284 - 289 .
- 586) Smedsrod B. , Pertoft H. , Eggertsen G. , Sundstrom C. Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll and selective substrate adherence. *Cell Tissue Res.* (1985) , 241 : 639 - 649 .
- 587) Smith R.L. , Hunt N.H. , Merritt J.E. , Evans T. , Weidemann M.J. Cyclic nucleotide metabolism and reactive oxygen production by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1980) , 96 : 1079 - 1087 .
- 588) Snipes R.G. , Lam K.W. , Dodd R.C. , Gray T.K. , Cohen M.S. Acid Phosphatase activity in mononuclear phagocytes and in the U937 cell line : Monocyte-derived macrophages express tartrate-resistant acid phosphatase. *Blood* (1986) , 67 : 729 - 734 .
- 589) Snyder S.H. , Brett D.S. Biological roles of Nitric Oxide. *Sci. American* (1992) , 266 : 28 - 35 .
- 590) Soderberg-Naucer C. , Fish K.N. , Nelson J.A. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α specifically induce formation of Cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J. Clin. Invest.* (1997) , 100 : 3154 - 3163 .
- 591) Sorokin S.P. , Hoyt R.F. , McNelly N.A. Nonimmune-mediated phagocytosis by «premedullary» lung macrophages : Effects of Concanavalin A , Tuftsin and Macrophage-Inhibitory Peptide. *Anatomical Rec.* (1989) , 223 : 55 - 61 .
- 592) Sorokin S.P. , Hoyt R.F. Macrophage development : 1. Rationale for using Griffonia simplicifolia Isolectin B4 as a marker for the line. *Anatomical Rec.* (1992) , 232 : 520 - 526 .
- 593) Sorokin S.P. , Hoyt R.F. , Blunt D.G. , McNelly N.A. Macrophage development : 2. Early ontogeny of macrophage populations in brain , liver , and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anatomical Rec.* (1992) , 232 : 527 - 550 .
- 594) Sorokin S.P. , Blunt D.G. , McNelly N.A. , Hoyt R.F. Macrophage development : 3. Transformation of pulmonary macrophages from precursors in fetal lungs and their later maturation in organ culture. *Anatomical Rec.* (1992) , 232 : 551 - 571 .
- 595) Sorokin S.P. , McNelly N.A. , Hoyt R.F. Macrophage development : 4. Effects of blood factors on macrophages from prenatal rat lung cultures. *Anatomical Rec.* (1992) , 233 : 415 - 428 .
- 596) Sozzani S. , Ghezzi S. , Iannolo G. , Luini W. , Borsatti A. , Polentarutti N. , Sica A. , Locati M. , Mackay C. , Wells T.N.C. , Biswas P. , Vicenzi E. , Poli G. , Mantovani A. Interleukin-10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.* (1998) , 187 : 439 - 444 .
- 597) Spencer S.C. , Fabre J.W. Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of the heart. *J. Exp. Med.* (1990) , 171 : 1841 - 1851 .
- 598) Spengler R.N. , Chensue S.W. , Giacherio D.A. , Blenk N. , Kunkel S.L. Endogenous Norepinephrine regulates Tumor Necrosis Factor- α production from macrophages in vitro. *J. Immunol.* (1994) , 152 : 3024 - 3031 .
- 599) Sperk G. , Herzog H. Anticonvulsant action of Neuropeptide Y. *Nature-Medicine* (1997) , 3 : 728 - 729 .
- 600) Sporn P.H.S. , Marshall T.M. , Peters-Golden M. Differential dependence on protein kinase C of arachidonic acid metabolism stimulated by hydrogen peroxide and by zymosan in the alveolar macrophage. *Biochim. Biophys. Acta* (1990) , 1047 : 187 - 191 .
- 601) Stacey K.J. , Sweet M.J. , Hume D.A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* (1996) , 157 : 2116 - 2122 .
- 602) Stamler J.S. , Singel D.J. , Loscalzo J. Biochemistry of Nitric Oxide and its Redox-Activated forms. *Science* (1992) , 258 : 1898 - 1902 .

- 603) Stenson W.F. , Parker C.W. Prostaglandins , macrophages and immunity . *J. Immunol.* (1980) , 125 : 1 - 4 .
- 604) Sternberg E.M. , Trial J. , Parker C.W. Effect of serotonin on murine macrophages : Suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 276 - 282 .
- 605) Sternberg E.M. , Wender H.J. , Leung M.K. , Parker C.W. Effect of serotonin (5-HT) and other monoamines on murine macrophages : Modulation of Interferon- γ induced phagocytosis . *J. Immunol.* (1987) , 138 : 4360 - 4365 .
- 606) Sternberg E.M. Cytokines and the brain : Neural-immune interactions in health and disease . *J. Clin. Invest.* (1997) , 100 : 2641 - 2647 .
- 607) Stevens A. , Lowe J.S. , editors . *Histology* . Gower Medical Publishing (1992) . London .
- 607) Steveson H.C. , Dekaban G.A. , Miller P.J. , Benyajati C. , Pearson M.L. Analysis of human blood monocyte activation at the level of gene expression : Expression of Alpha-Interferon Genes during activation of human monocytes by Poly IC/LC and Muramyl Dipeptide . *J. Exp. Med.* (1985) , 161 : 503 - 513 .
- 609) Stuehr D.J. , Marletta M.A. Mammalian nitrate biosynthesis : Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) , 82 : 7738 - 7742 .
- 610) Stuehr D.J. , Marletta M.A. Induction of nitrite / nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection , lymphokines or Interferon- γ . *J. Immunol.* (1987) , 139 : 518 - 525 .
- 611) Sundler F. , Hakanson R. , Ekblad E. , Uddman R. , Wahlestedt C. Neuropeptide Y in the Peripheral Adrenergic and Enteric Nervous System . *International. Rev. Cytol.* (1986) , 102 : 243 - 269 .
- 612) Surleff S.V. , Papadimitriou J.M. The mononuclear phagocytes of the rat adrenal . *Am. J. Pathol.* (1981) , 104 : 258 - 271 .
- 613) Sutton J.S. , Weiss L. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages , epithelioid cells and multinucleated giant cells . *J. Cell Biol.* (1966) , 28 : 303 - 332 .
- 614) Sutton L.N. , Mason D.Y. , Redman C.W.G. Isolation and characterization of human fetal macrophages from placenta . *Clin. Exp. Immunol.* (1989) , 78 : 437 - 443 .
- 615) Suzuki K. , Sakata N. , Kitani A. , Hara M. , Hirose T. , Hirose W. , Norioka K. , Harigai M. , Kawagoe M. , Nakamura H. Characterization of human monocytic cell line U937 , in taking up acetylated low-density lipoprotein and cholesteryl ester accumulation . A flow cytometric and HPLC study *Biochim. Biophys. Acta* (1990) , 1042 : 210 - 216 .
- 616) Suzuki T. Signal transduction mechanisms through Fc γ receptors on the mouse macrophage surface . *FASEB. J.* (1991) , 5 : 187 - 193 .
- 617) Swanson J. , Bushnell A. , Silverstein S.C. Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) , 84 : 1921 - 1925 .
- 618) Syvalahti E. Endocrine and immune adaptation to stress . *Annals Clin. Res.* (1987) , 19 : 70 - 77 .
- 619) Tabas I. , Myers J.N. , Innerarity T.L. , Xu X.X. , Arnold K. , Boyles J. , Maxfield F.R. The influence of particle size and multiple Apoprotein E - receptor interactions on the endocytic targeting of β -VLDL in mouse peritoneal macrophages . *J. Cell Biol.* (1991) , 115 : 1547 - 1560 .
- 620) Takema M. , Inaba K. , Uno K. , Kakahara K.I. , Tawara K. , Muramatsu S. Effect of L-arginine on the retention of macrophage tumoricidal activity . *J. Immunol.* (1991) , 146 : 1928 - 1933 .

- 621) Tanaka H. , Shinki T. , Hayashi T. , Jin C.H. , Miyaura C. , Abe E. , Suda T. Spermidine-dependent proteins are involved in the fusion of mouse alveolar macrophages induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and Interleukin-4 . *Exp. Cell Res.* (1989) , 180 : 72 - 83 .
- 622) Tanaka H. , Shinki T. , Takito J. , Jin C.H. , Suda T. Transglutaminase is involved in the fusion of mouse alveolar macrophages induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 . *Exp. Cell Res.* (1991) , 192 : 165 - 172 .
- 623) Tang W.J. , Gilman A.G. Adenytyl Cyclases . *Cell* (1992) , 70 : 869 - 872 .
- 624) Tanikawa K. , Sata M. Endotoxin and Kupffer cells in liver disease . *Advances Exper. Med. Biol.* (1990) , 256 : 481 - 495 .
- 625) Tannenbaum C.S. , Hamilton T.A. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP . *J. Immunol.* (1989) , 142 : 1274 - 1280 .
- 626) Tatemoto K. , Carlquist M. , Mutt V. Neuropeptide Y : A novel brain peptide with structural similarities to Peptide YY and Pacreatic Polypeptide . *Nature* (1982) , 246 : 659 - 660 .
- 627) Tapper H. , Sundler R. Glucan receptor and zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages . *Biochem J.* (1995) , 306 : 829 - 835 .
- 628) Tarsi-Tsuk D. , Levy R. Stimulation of the respiratory burst in peripheral blood monocytes by lipoteichoic acid . *J. Immunol.* (1990) , 144 : 2665 - 2670 .
- 629) Taylor C.W. , Marshall I.C.B. Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors : a complex relationship . *T.I.B.S.* (1992) , 17 : 403 - 407 .
- 630) Taylor S.S. cAMP-dependent protein kinase : model for an enzyme family . *J. Biol. Chem.* (1989) , 264 : 8443 - 8446 .
- 631) Taylor S.S. , Buechler J.A. , Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase : framework for a diverse family of regulatory enzymes . *Annu. Rev. Biochem.* (1990) , 59 : 971 - 1005 .
- 632) Taylor S.S. , Knighton D.R. , Zheng J. , Sowadski J.M. , Gibbs C.S. , Zoller M.J. A template for the protein kinase family . *T.I.B.S.* (1993) , 18 : 84 - 89 .
- 633) Thiemermann C. , Vane J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo . *Eur. J. Pharmacol.* (1990) , 182 : 591 - 595 .
- 634) Thomas G. , Ramwell P.W. Vasodilatory properties of mono-L-arginine containing compounds . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1988) , 154 : 332 - 338 .
- 635) Thomas G. , Ando T. , Verma K. , Kagan E. Asbestos fibers and Interferon- γ up-regulate nitric oxide production in rat alveolar macrophages . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 11 : 707 - 715 .
- 636) Ting A.T. , Karnitz L.M. , Schoon R.A. , Abraham R.T. , Leibson P.J. Fc γ receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both phospholipase C (PLC)- γ 1 and (PLC)- γ 2 in Natural Killer Cells . *J. Exp. Med.* (1992) , 176 : 1751 - 1755 .
- 637) Toker A. The synthesis and cellular roles of Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate . *Current Opin. Cell Biol.* (1998) , 10 : 254 - 261 .
- 638) Tol E.A.F. Van , Verspaget H.W. , Lamers C.B.H.W. Neuropeptide regulation of Cell-Mediated Cytotoxicity against human tumor cells . *Neuropeptides* (1990) , 16 : 25 - 32 .
- 639) Tonks N.K. , Charbonneau H. Protein tyrosine dephosphorylation and signal transduction . *T.I.B.S.* (1989) , 14 : 497 - 500 .
- 640) Torres J. , Wilson M.T. Interaction of Cytochrome-c Oxidase with Nitric Oxide . *Meth. Enzymol.* (1996) , 269 : 3 - 11 .

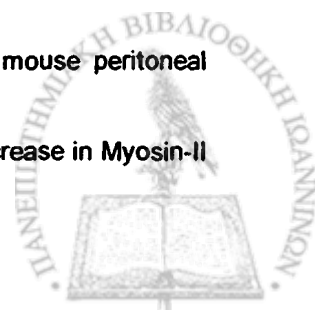


- 641) Tripp C.S. , Unanue E.R. , Needleman P. Monocyte migration explains the changes in macrophage arachidonate metabolism during the immune response . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) , 83 : 9655 - 9659 .
- 642) Truett A.P. , Verghese M.W. , Dillon S.B. , Snyderman R. Calcium Influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) , 85 : 1549 - 1553 .
- 643) Tsagarakis S. , Rees L.H. , Besser G.M. , Grossman A. Neuropeptide Y stimulates CRF-41 release from rat hypothalami in vitro . *Brain Res.* (1989) , 502 : 167 - 170 .
- 644) Tsimoyannis E.C. , Tsimoyannis J.C. , Sarros C.J. , Lekkas F.T. , Kosmas J. , Kotoulas O.B. Peritoneal adhesions after experimental intestinal ischaemia/reperfusion . *Hellenic Journal of Gastroenterology* (1990) , 3 : 17 - 22 .
- 645) Tsujitani S. , Furukawa T. , Tamada R. , Okamura T. , Yasumoto K. , Sugimachi K. Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma . *Cancer* (1987) , 59 : 501 - 505 .
- 646) Tsukamoto Y. , Kuwabara K. , Hirota S. , Ikeda J. , Stern D. , Yanagi H. , Matsumoto M. , Ogawa S. , Kitamura Y. 150-kDa Oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified Low Density Lipoprotein . *J. Clin. Invest.* (1996) , 98 : 1930 - 1941 .
- 647) Tsunawaki S. , Nathan C.F. Macrophage deactivation : Altered kinetic properties of Superoxide-producing enzyme after exposure to tumor-cell conditioned medium . *J. Exp. Med.* (1986) , 164 : 1319 - 1331 .
- 648) Tsutsumi M. , Takada A. , Takase S. , Ooshima A. Connective tissue components in cultured parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver . *Lab. Invest.* (1988) , 58 : 88 - 92 .
- 649) Ulevitch R.J. , Watanabe Y. , Sano M. , Lister M.D. , Deems R.A. , Dennis E.A. Solubilization , purification and characterization of a membrane-bound phospholipase A2 from the P388D1 macrophage-like cell line . *J. Biol. Chem.* (1988) , 263 : 3079 - 3085 .
- 650) Unanue E.R. Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity *N. Engl. J. Med.* (1980) , 303 : 977 - 985 .
- 651) Unanue E.R. Antigen-presenting function of the macrophage . *Ann. Rev. Immunol.* (1984) , 2 : 395 - 428 .
- 652) Unanue E.R. , Allen P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells . *Science* (1987) , 236 : 551 - 557 .
- 653) Urban M.B. , Schreck R. , Baeuerle P.A. NF- κ B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit . *EMBO J.* (1991) , 10 : 1817 - 1825 .
- 654) Urdiales-Viedma M. , De Haro-Munoz T. , Martos-Padilla S. , Abad-Ortega J.M. , Varela-Duran J. , Granda-Paez R. Jacalin another marker for histiocytes in paraffin-embedded tissues . *Histol. Histopathol.* (1995) , 10 : 597 - 602 .
- 655) Utsugi T. , Fidler I.J. Prostaglandin E2 does not inhibit tumoricidal activity of mouse macrophages against adherent tumor cells . *J. Immunol.* (1991) , 146 : 2066 - 2071 .
- 656) Vallance P. , Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide . *Br. Med. J.* (1994) , 309 : 453 - 457 .
- 657) Verghese M.W. , Snyderman R. Hormonal activation of adenylate cyclase in macrophage membranes is regulated by guanine nucleotides . *J. Immunol.* (1983) , 130 : 869 - 873 .
- 658) Vial D. , Arbibe L. , Havet N. , Dumarey C. , Vargaftig B.B. , Touqui L. Down-regulation by prostaglandins of Type-II Phospholipase A2 expression in guinea-pig alveolar macrophages : a possible involvement of cAMP . *Biochem. J.* (1998) , 330 : 89 - 94 .

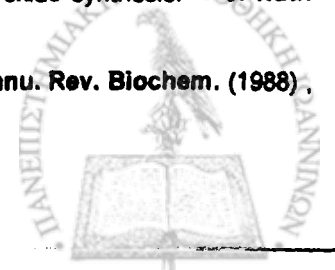


- 659) Vicenzi E. , Biondi A. , Bordignon C. , Rambaldi A. , Benedetta-Donati M. , Mantovani A. Human mononuclear phagocytes from different anatomical sites differ in their capacity to metabolize arachidonic acid . *Clin. Exp. Immunol.* (1984) , 57 : 385 - 392 .
- 660) Vieweg R. , Leslie R.G.Q. Soluble immune complex triggering of a respiratory burst in macrophages : the role of complex aggregation at the phagocyte surface . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 149 - 151 .
- 661) Vignola A.M. , Chanez P. , Paul-Lacoste P. , Paul-Eugene N. , Godard P. , Bousquet J. Phenotypic and functional modulation of normal human alveolar macrophages by histamine . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 11 : 456 - 463 .
- 662) Vincent J.E. , Vermeer M.A. , Kort W.J. , Zijlstra F.J. The formation of thromboxane B₂ , leukotriene B₄ and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by alveolar macrophages after activation during tumor growth in the rat . *Biochim. Biophys. Acta* (1990) , 1042 : 255 - 258 .
- 663) Vlassara H. , Brownlee M. , Cerami A. Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors . *J. Exp. Med.* (1986) , 164 : 1301 - 1309 .
- 664) Vodovotz Y. , Kwoon N.S. , Pospischil M. , Manning J. , Paik J. , Nathan C.F. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with INF- γ and bacterial lipopolysaccharide . *J. Immunol.* (1994) , 152 : 4110 - 4118 .
- 665) Voth R. , Storch E. , Huller K. , Kirchner H. Activation of cytotoxic activity in cultures of bone marrow-derived macrophages by indomethacin . *Eur. J. Immunol.* (1987) , 17 : 145 - 148 .
- 666) Wahl L.M. , Olsen C.E. , Sandberg A.L. , Mergenhagen S.E. Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1977) , 74 : 4955 - 4958 .
- 667) Wahl S.M. , Wahl L.M. , McCarthy J.B. , Chedid L. , Mergenhagen S.E. Macrophage activation by mycobacterial water-soluble compounds and synthetic muramyl dipeptide . *J. Immunol.* (1979) , 122 : 2226 - 2231 .
- 668) Wake K. , Decker K. , Kim A. , Knook D.L. , McCuskey R.S. , Bouwens L. , Wisse E. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver . *International Rev. Cytol.* (1989) , 118 : 173 - 229 .
- 669) Wal A.C. Van der , Das P.K. , Tigges A.J. , Becker A.E. Macrophage differentiation in atherosclerosis . An in situ immunohistochemical analysis in humans . *Am. J. Pathol.* (1992) , 141 : 161 - 168 .
- 670) Waldman S.A. , Murad F. Cyclic GMP synthesis and function . *Pharmacol. Rev.* (1987) , 39 : 163 - 196 .
- 671) Walker F. , Nicola N.A. , Metcalf D. , Burgess A.W. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors . *Cell* (1985) , 43 : 269 - 276 .
- 672) Walton K.M. , Dixon J.E. Protein tyrosine phosphatases . *Annu. Rev. Biochem.* (1993) , 62 : 101 - 120 .
- 673) Wang B.S. , Lumanglas A.L. , Ruzala - Mallon V.M. , Durr F.E. Induction of tumor -inhibitory macrophages with a synthetic immunomodulator , 3,6-bis(2-piperidinoethoxyacridine) trihydrochloride (CL 246,738) . *J. Immunol.* (1985) , 135 : 679 - 683 .
- 674) Warren M.K. , Vogel S.N. Opposing effects of glucocorticoids on Interferon- γ -induced murine macrophage Fc receptor and Ia antigen expression . *J. Immunol.* (1985) , 134 : 2462 - 2469 .
- 675) Warwick-Davies J. , Lowrie D.B. , Cole P.J. Growth Hormone is a human macrophage-activating factor . *J. Immunol.* (1995) , 154 : 1909 - 1918 .
- 676) Watanabe M. , Tamura T. , Ohashi M. , Hirasawa N. , Ozeki T. , Tsurufuji S. , Fujiki H. , Ohuchi K. Dual effects of staurosporine on arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages . *Biochim. Biophys. Acta* (1990) , 1047 : 141 - 147 .
- 677) Wattiaux R. , De Duve C. Tissue fractionation studies : Release of bound hydrolases by means of Triton X-100 . *Biochem. J.* (1956) , 63 : 606 - 608 .

- 678) Wigzell H. The Immune system as a therapeutic agent . *Sci. American* (1993) , 269 : 95 - 101 .
- 679) Weidemann M.J. , Peskar B.A. , Wrogemann K. , Rietschel E.Th. , Staudinger H. , Fischer H. Prostaglandin and thromboxane synthesis in a pure macrophage population and the inhibition by E - type prostaglandins of chemiluminescence . *FEBS Letters* (1978) , 89 : 136 - 140 .
- 680) Weinberg D.H. , Sirinathsinghji D.L.S. , Tan C.P. , Shiao L.L. , Morin N. , Rigby M.R. , Heavens R.H. , Rapoport D.R. , Bayne M.L. , Cascieri M.A. , Strader C.D. , Linemeyer D.L. , MacNeil D.J. Cloning and expression of a novel Neuropeptide Y receptor . *J. Biol. Chem.* (1996) , 271 : 16435 - 16438 .
- 681) Weinberg J.B. , Chapman H.A. , Hibbs J.B. Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 72 - 80 .
- 682) Weinberg J.B. , Athens J.W. Chapter 10 : The Mononuclear Phagocyte System , in : Lee G.R. , Bithell T.C. , Foerster J. , Athens J.W. , Lukens J.N. , editors . *Wintrobe's Clinical Hematology* , 9th edition . *Lea & Febiger* , 1993 . *Philadelphia , London* .
- 683) Weinstein I.B. Protein kinase , phospholipid and control of growth . *Nature* (1983) , 302 : 750 - 750 .
- 684) Weinstein S.L. , Gold M.R. , DeFranco A.L. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) , 88 : 4148 - 4152 .
- 685) Weinstein S.L. , Sanghera J.S. , Lemke K. , DeFranco A.L. , Pelech S.L. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in macrophages . *J. Biol. Chem.* (1992) , 267 : 14955 - 14962 .
- 686) Werb Z. , Foley R. , Munck A. Interactions of glucocorticoids with macrophages : Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 1684 - 1694 .
- 687) Werb Z. Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture : Specific inhibition of elastase , collagenase and plasminogen activator secretion and effects on other metabolic functions . *J. Exp. Med.* (1978) , 147 : 1695 - 1712 .
- 688) Werb Z. , Foley R. , Munck A. Glucocorticoid receptors and glucocorticoid-sensitive secretion of neutral proteinases in a macrophage line . *J. Immunol.* (1978) , 121 : 115 - 121 .
- 689) Weyrich A.S. , Elstad M.R. , McEver R.P. , McIntyre T.M. , Moore K.L. , Morrissey J.H. , Prescott S.M. , Zimmerman G.A. Activated platelets signal Chemokine synthesis by human monocytes . *J. Clin. Invest.* (1996) , 97 : 1525 - 1534 .
- 690) Wightman P.D. , Humes J.L. , Davies P. , Bonney R.J. Identification and characterization of two phospholipase A2 activities in resident mouse peritoneal macrophages . *Biochem. J.* (1981) , 195 : 427 - 433 .
- 691) Wightman P.D. , Dahlgren M.E. , Hall J.C. , Davies P. , Bonney R.J. Identification and characterization of a phospholipase C activity in resident mouse peritoneal macrophages . *Biochem. J.* (1981) , 197 : 523 - 526 .
- 692) Wightman P.D. , Raetz C.R.H. The activation of Protein Kinase C by biologically active lipid moieties of lipopolysaccharide . *J. Biol. Chem.* (1984) , 259 : 10048 - 10052 .
- 693) Williams C.A. , Chase M.W. , editors . *Methods in Immunology and Immunochemistry* , vol.5 *Academic Press* (1976) . *New York , San Francisco , London* .
- 694) Williams M.A. , Mayhew T.M. Quantitative microscopical studies of the mouse peritoneal macrophage following stimulation in vitro . *Z. Zellforsch.* (1973) , 140 : 187 - 203 .
- 695) Wilson A.K. , Gorgas G. , Claypool W.D. , de Lanerolle P. An increase or a decrease in Myosin-II phosphorylation inhibits macrophage motility . *J. Cell Biol.* (1991) , 114 : 277 - 283 .



- 696) Wilson J.D. , Braumwald E. , Isselbacher K.J. , Petersdorf R.G. , Martin J.B. , Fauci A.S. , Root R.K. , Editors . *Harrison's Principles of Internal Medicine* , twelfth edition . McGraw-Hill , Inc. (1991) International Edition .
- 697) Wing E.J. , Magee D.M. , Pearson A.C. , Waheed A. , Shadduck R.K. Peritoneal macrophages exposed to purified Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) suppress mitogen- and antigen-stimulated lymphocyte proliferation . *J. Immunol.* (1986) , 137 : 2768 - 2773 .
- 698) Winwood P.J. , Arthur M.J.P. Kupffer cells : Their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease . *Semin. Liver Dis.* (1993) , 13 : 50 - 59 .
- 699) Wishnok J.S. , Glogowski J.A. , Tannenbaum S.R. Quantitation of nitrate , nitrite and nitrosating agents . *Meth. Enzymol.* (1996) , 268 : 130 - 141 .
- 700) Wizemann T.M. , Laskin D.L. Enhanced phagocytosis , chemotaxis and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 11 : 358 - 365 .
- 701) Woldbye D.P.D. , Larsen P.J. , Mikkelsen J.D. , Klomp K. , Madsen T.M. , Bolwig T.G. Powerful inhibition of kainic acid seizures by Neuropeptide Y via Y5-like receptors . *Nature-Medicine* (1997) , 3 : 761 - 764 .
- 702) Wolf M. , LeVine H. , May W.S. , Cuatrecasas P. , Sahyoun N. A model for intracellular translocation of Protein Kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters . *Nature* (1985a) , 317 : 546 - 549 .
- 703) Wolf M. , Cuatrecasas P. , Sahyoun N. Interaction of Protein Kinase C with Membranes is regulated by Ca^{2+} , phorbol esters and ATP . *J. Biol. Chem.* (1985b) , 260 : 15718 - 15722 .
- 704) Wolff S.M. Monoclonal antibodies and the treatment of gram-negative bacteremia and shock . *N. Engl. J. Med.* (1991) , 324 : 486 - 487 .
- 705) Woodgett J.R. , editor . *Protein Kinases* . I.R.L. Press at Oxford University Press (1994) Oxford , New York , Tokyo .
- 706) Wright S.D. , Rao P.E. , Voorhis Van W.C. , Craigmyle L.S. , Iida K. , Talle M.A. , Westberg E.F. , Goldstein G. , Silverstein S.C. Identification of the C3bi-receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) , 80 : 5699 - 5703 .
- 707) Wright S.D. , Ramos R.A. , Tobias P.S. , Ulevitch R.J. , Mathison J.C. CD14 , a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein . *Science* (1990) , 249 : 1431 - 1433 .
- 708) Wu C.C. , Thiernemann C. Biological control and inhibition of induction of Nitric Oxide Synthase *Meth. Enzymol.* (1996) , 268 : 408 - 420 .
- 709) Xaus J. , Mirabet M. , Lloberas J. , Soler C. , Lluís C. , Franco R. , Celada A. $INF\gamma$ up-regulates the A_{2B} Adenosine Receptor expression in macrophages : A mechanism of macrophage deactivation . *J. Immunol.* (1999) , 162 : 3607 - 3614 .
- 710) Xing Z. , Jordana M. , Kirpalani H. , Driscoll K.E. , Schall T.J. , Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo : Endotoxin induces Tumor Necrosis Factor- α , Macrophage Inflammatory Protein-2 , Interleukin- β and Interleukin-6 , but not RANTES or Transforming Growth Factor- β 1 mRNA expression in acute lung inflammation . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1994) , 10 : 148 - 153 .
- 711) Yam L.T. , Li C.Y. , Crosby W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes . *Am. J. Clin. Path.* (1971) , 55 : 283 - 290 .
- 712) Yang X. , Galeano N.F. , Szabolcs M. , Sciacca R.R. , Cannon P.J. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake , apoptosis , viability and nitric oxide synthesis . *J. Nutr.* (1996) , 126 : 1072 - 1076 (Suppl.) .
- 713) Yarden Y. , Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases . *Annu. Rev. Biochem.* (1988) , 57 : 443 - 478 .



714) Yeung Y.G. , Jubinsky P.T. , Sengupta A. , Yeung D.C.Y. , Stanley E.R. Purification of the colony-stimulating factor-1 receptor and demonstration of its tyrosine kinase activity . Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) , 84 : 1268 - 1271 .

715) Young D.A. , Lowe L.D. , Clark S.C. Comparison of the effects of IL-3 , granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture . J. Immunol. (1990) , 145 : 6-7 - 615 .

716) Young M.R. , Hart P.D'Arcy Movements and other distinguishing features of small vesicles identified by darkfield microscopy in living macrophages . Exp. Cell Res. (1986) , 164 : 199 - 210 .

717) Yu B. , Hailman E. , Wright S.D. Lipopolysaccharide Binding Protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids . J. Clin. Invest. (1997) , 99 : 315 - 324 .

718) Zembala M. , Asherson G.L. , editors . Human Monocytes . Academic Press (1989) . London , San Diego , New York , Berkley , Boston , Sydney , Tokyo , Toronto .

719) Ziegler H.K. , Orlin C.A. , Cluff C.W. Differential requirements for the processing and presentation of soluble and particulate bacterial antigens by macrophages . Eur. J. Immunol. (1987) , 17 : 1287 - 1296 .

720) Zimmerli S. , Majeed M. , Gustavsson M , Stendahl O. , Sanan D.A. , Ernst J.D. Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages . J. Cell Biol. (1996) , 132 : 49 - 61 .

