

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

**ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ**  
**A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ**  
**ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΑΡΚΑΜΠΟΥΝΑΣ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**



Ημερομηνία αίτησης του κ. **Καρκαμπούνα Αθανασίου**: 10-03-04

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.:

551<sup>A</sup>/19-03-04

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

**Επιβλέπουσα:**

**Μαρία-Ελένη Λέκκα**, Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων

**Μέλη:**

**Μαρία Λαϊτσιώτου-Σακαρέλλου**, Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων

**Μάμαντος Προδρομίδης**, Επικ. Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-03-04

**Θέμα:** «Φθορισμομετρική Μέθοδος Προσδιορισμού Ενεργότητας Φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> με χρήση Ακίνητοποιημένων Υποστρωμάτων».

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.:**

832<sup>A</sup>/02-12-11

1. **Μαρία-Ελένη Λέκκα**, Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων

2. **Μαρία Λαϊτσιώτου-Σακαρέλλου**, Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων

3. **Μάμαντος Προδρομίδης**, Επικ. Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων

4. **Γεώργιος Νάκος**, Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων

5. **Τριαντάφυλλος Αλμπάνης**, Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων

6. **Ευγενία Πάνου**, Αναπλ. Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων

7. **Βασίλειος Σακκάς**, Λέκτορας, Παν/μιο Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 22-12-11**



*Αφιερώνεται στον Μάριο-Αλέξανδρο  
και στην Εύη*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την άμεση επίβλεψη της Καθηγήτριας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κυρίας Μαρίας-Ελένης Λέκκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Λέκκα, χωρίς την αμέριστη βοήθεια της οποίας δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Την ευχαριστώ για τη συνεχή και άμεση επίβλεψη σε όλη τη διάρκεια αυτής, για την επιμονή, τη συμπαράσταση και το πραγματικό ενδιαφέρον της. Την ευχαριστώ επίσης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω σε ερευνητικό θέμα, με την καθοδήγηση της οποίας μπορεί να οδηγήσει στην απονομή Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Διευθυντή της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Νάκο για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια του. Τον ευχαριστώ επίσης για την διάθεση των βιολογικών δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μάμαντο Προδρομίδα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την σημαντική βοήθειά του για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, ιδίως κατά το στάδιο που αφορούσε την ακινητοποίηση των υποστρωμάτων. Τον ευχαριστώ επίσης για την ευγενική παραχώρηση του πολυμερούς PVA-SbQ.

Ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαρία Δαϊτσιώτου-Σακαρέλλου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την Δρ. Γεωργία Κυριακάκου για την πολύτιμη βοήθεια της στη σύνταξη της έκθεσης για χορήγηση Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά για την συνεισφορά τους τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής και πιο συγκεκριμένα τον Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Τριαντάφυλλο

Αλμπάνη, την Αν. Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας κ. Ευγενία Πάνου και τον Λέκτορα του Τμήματος Χημείας κ. Βασίλειο Σακκά.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας (Ε.Λ.Κ.Ε.) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη στήριξη και οικονομική ενίσχυση της αίτησης για χορήγηση Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Δέσποινα Πανταζή για την ουσιαστική της συμπαράσταση για την εκπόνηση της παρούσης εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Δρ. Ειρήνη Κητσιούλη για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ζωή Καρέτσου για τη λήψη των εικόνων των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για το εποικοδομητικό κλίμα του εργαστηρίου τους Δρ. Γεωργία Αντωνίου, Δρ. Ελίζα Μαγκατζίνου, Μιχάλη Καραγιαννόπουλο, Ελένη Γκότζου, Στάθη Βασδέκη και Ανδριάννα Γιακουμή.

Ένα ξεχωριστό όμως ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου, και ιδιαίτερα στη σύζυγό μου Εύη, για την ουσιαστική της συμπαράσταση.

Ιωάννινα, Νοέμβριος 2011

Θανάσης Καρκαμπούνας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                                   |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>                                                                   | I    |
| <b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>                                                                | III  |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ</b>                                                                     | IX   |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>                                                                   | XI   |
| <b>SUMMARY</b>                                                                    | XIII |
| <b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b>                                                                 | XV   |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>                                                                   | 1    |
| <b>1) ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ <math>A_2</math></b>                                           | 1    |
| 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ                                                                    | 1    |
| 1.2 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$                                                            | 1    |
| 1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ $A_2$ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΟΥΣ       | 3    |
| 1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ $A_2$ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΟΥΣ ΡΟΛΟ | 4    |
| 1.4.1 ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$                                             | 4    |
| 1.4.2 ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$                                              | 9    |
| 1.4.3 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ $Ca^{2+}$ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$           | 14   |
| 1.4.4 ΡΑΦ-ΑΚΕΤΥΛΥΔΡΟΛΑΣΕΣ                                                         | 18   |
| 1.4.5 ΛΥΣΟΣΩΜΙΚΗ ΟΜΑΔΑ XV ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ $A_2$                                      | 27   |
| 1.5 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ                               | 30   |
| 1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΩΝ $PLA_2$                                          | 35   |
| 1.7 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ $A_2$ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ.              | 38   |
| 1.8 ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ $PLA_2$ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΑΜΥΝΑ ΕΝΑΝΤΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΙΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ  | 41   |
| 1.9 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΟΦΑΣΗΣ                                                        | 43   |
| 1.10 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ $A_2$                                            | 47   |
| 1.11 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ $PLA_2$                                    | 53   |
| 1.11.1 ΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ                                                      | 55   |
| 1.11.2 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ                                                   | 57   |
| <b>2) ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ</b>                                                     | 62   |
| <b>A. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ</b>                                                          | 62   |



|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ                                                                                                  | 62 |
| 2.A.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ                                                                        | 62 |
| 2.A.3 ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ                                                                              | 65 |
| 2.A.4 ΣΒΕΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (QUENCHING)                                                                                 | 65 |
| 2.A.5 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ                                                                           | 66 |
| <b>Β. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ</b>                                                                        | 68 |
| 2.B.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ                                                                                                  | 68 |
| 2.B.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ                                                                            | 69 |
| 2.B.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ                                                                            | 70 |
| 2.B.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC                                                                                        | 71 |
| <b>Γ. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ</b>                                                                                 | 75 |
| 2.Γ.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ                                                                                                  | 75 |
| 2.Γ.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYMΩΝ                                                                             | 76 |
| 2.Γ.3 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ PLA <sub>2</sub>                                                                            | 78 |
| <b>3) ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ</b>                                                                                | 79 |
| 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ                                                                                                    | 79 |
| 3.2 ΛΗΨΗ ΤΟΥ BAL                                                                                                  | 79 |
| 3.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (LUNG SURFACTANT)                                                 | 79 |
| 3.4 ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ BAL ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΛΟΓΟΥΣ                                                                        | 80 |
| <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>                                                                                          | 83 |
| <b>1. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ C<sub>12</sub>-NBD-PC, C<sub>6</sub>-NBD-PC</b>                                               | 83 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                                                      | 83 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                                         | 83 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                | 85 |
| <b>ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ</b>                                                                                     | 85 |
| <b>1.2 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC</b>   | 85 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                                                      | 85 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                                         | 85 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                | 85 |
| <b>1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ</b>                                                     | 86 |
| 1.3.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ C <sub>12</sub> - ΚΑΙ C <sub>6</sub> -NBD-PC | 86 |

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 86 |
| 1.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ                                                                                                                             | 87 |
| Α. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΩΝ $\text{Ca}^{2+}$                                                                                                                                             | 87 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                                                                                                       | 87 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 87 |
| Β. ΕΠΙΔΡΑΣΗ $\text{pH}$                                                                                                                                                         | 87 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                                                                                                                    | 87 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                                                                                                       | 88 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 88 |
| Γ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ                                                                                                                                                        | 89 |
| ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                                                                                                                                        | 89 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 89 |
| <b>1.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΚΡΟΦΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ <math>\text{C}_{12}</math>- ΚΑΙ <math>\text{C}_6</math>-NBD-PC ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ</b>                                                 | 89 |
| Α.ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ                                                                                                                                                                | 89 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 89 |
| Β.ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ                                                                                                                                              | 90 |
| 1.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ $\text{C}_{12}$ -NBD-FA                                                                                                                      | 91 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 91 |
| 1.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ BSA                                                                                                                                                              | 91 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 91 |
| <b>2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ <math>\text{PLA}_2</math></b>                                                                                                                   | 92 |
| <b>2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ <math>\text{PLA}_2</math></b>                                                                                                                          | 92 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 92 |
| <b>2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΟΥ Ή ΒΑΛ</b>                                                                                                                                                  | 92 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                                                                                                                    | 92 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                                                                                                       | 93 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 93 |
| <b>2.3 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ <math>\text{PLA}_2</math> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ <math>\text{C}_{12}</math>-NBD-PC</b>                                                 | 94 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                                              | 94 |
| <b>2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ <math>\text{PLA}_2</math> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ <math>\text{C}_{12}</math>-NBD-PC</b> | 95 |

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| A. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ                                                                  | 95  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 95  |
| B. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ                            | 95  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 95  |
| Γ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ PLA <sub>2</sub>                                               | 95  |
| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ                                                                             | 95  |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                 | 96  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 96  |
| <b>3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ</b>                                                   | 96  |
| <b>3.1 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub> ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ</b> | 96  |
| ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ                                                                              | 96  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 97  |
| ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ                                                     | 97  |
| <b>3.2 HPLC-ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub></b>                | 97  |
| ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ                                                                              | 97  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 97  |
| <b>3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY</b>                              | 98  |
| ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ                                                                              | 98  |
| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ                                                                             | 98  |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                 | 98  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 98  |
| <b>3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>                                           | 98  |
| <b>4. ΠΗΓΕΣ PLA<sub>2</sub></b>                                                           | 100 |
| <b>4.1 BAL</b>                                                                            | 100 |
| A. ΛΗΨΗ ΤΟΥ BAL                                                                           | 100 |
| B. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ BAL                                                                     | 100 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                              | 100 |
| ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ                                                                                 | 100 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 100 |
| Γ. ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ BAL                                                      | 101 |
| ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ                                                              | 101 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                        | 101 |

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>4.2 ΟΡΟΣ</b>                                                                                                                                       | 101 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ                                                                                                                                    | 101 |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>                                                                                                                                   | 103 |
| <b>1. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ</b>                                                                                                                  | 103 |
| <b>1.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ</b>                                                                                                     | 103 |
| 1.1.1 ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ                                                                                                                  | 104 |
| <b>1.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ</b>                                                                                         | 106 |
| 1.2.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ C <sub>12</sub> - ΚΑΙ C <sub>6</sub> -NBD-PC                                     | 107 |
| 1.2.2 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ                                                                                                        | 108 |
| 1.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C <sub>12</sub> - ΚΑΙ C <sub>6</sub> -NBD-PC                    | 108 |
| A. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΩΝ Ca <sup>2+</sup>                                                                                                                   | 108 |
| B. ΕΠΙΔΡΑΣΗ pH                                                                                                                                        | 109 |
| Γ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ                                                                                                                              | 110 |
| <b>1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ</b>                   | 112 |
| 1.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ C <sub>12</sub> -NBD-FA                                                                                            | 116 |
| 1.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ BSA                                                                                                                                    | 119 |
| <b>2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PLA<sub>2</sub></b>                                                                                                     | 122 |
| <b>2.1 ΠΡΟΤΥΠΗ PLA<sub>2</sub></b>                                                                                                                    | 122 |
| <b>2.2 ΟΡΟΣ Ή BAL</b>                                                                                                                                 | 124 |
| <b>2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ</b>                                                                                                                 | 129 |
| <b>2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC</b> | 130 |
| A. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ                                                                                                                              | 130 |
| B. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ                                                                                        | 131 |
| Γ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ PLA <sub>2</sub>                                                                                                           | 132 |
| <b>3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ</b>                                                                                                                     | 132 |
| <b>4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ</b>                                                                                                           | 133 |
| <b>5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ</b>                                                                                                                       | 135 |
| <b>6. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC</b>                                                                                           | 136 |
| <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>                                                                                                                          | 139 |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>                                                                                                                                   | 147 |



## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ακινητοποίηση λιπιδικών υποστρωμάτων, που περιέχουν φθορίζουσα ομάδα στο μόριό τους, σε κατάλληλο αδρανές υλικό. Η ακινητοποίηση έγινε με στόχο την χρησιμοποίηση των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων για την ανάπτυξη και αξιολόγηση φθορισμομετρικής μεθόδου προσδιορισμού ενεργότητας Φωσφολιπάσης  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) βιολογικών δειγμάτων.

Επιπλέον, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή της μεθόδου σε φασματοφθορισμόμετρο εφοδιασμένο με πλάκα ELISA, έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση σημαντικού αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα. Απώτερος σκοπός ήταν η ανάπτυξη kit για τον προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub> βιολογικών δειγμάτων. Τέλος, προς αυτή την κατεύθυνση η παρούσα εργασία έχει αποσταλεί στον Οργανισμό Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας για την χορήγηση Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Φωσφολιπάσες  $PLA_2$  (PLA<sub>2</sub>s) είναι ένζυμα που καταλύουν τον καταβολισμό των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και λύσο-φωσφολιπίδια. Θεωρούνται δείκτες φλεγμονής και για το λόγο αυτό παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον. Προς την κατεύθυνση αυτή, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και αξιολόγηση φθορισμομετρικής μεθόδου προσδιορισμού ενεργότητας  $PLA_2$  βιολογικών δειγμάτων.

Για το σκοπό αυτό ακινητοποιήθηκαν με παγίδευση σε πήγμα πολυμερούς τα φθορίζοντα υποστρώματα της  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC. Εν συνεχεία, λήφθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων σε κατάλληλο φασματοφθορισμόμετρο, εφοδιασμένο με πλάκα ELISA. Εξετάσθηκαν διάφοροι παράμετροι, οι οποίοι δύναται να επηρεάσουν το φθορισμό της ακινητοποιημένης  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC, όπως θερμοκρασία, pH, ιόντα  $Ca^{2+}$ .

Μελετήθηκε η συμπεριφορά των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα και εξετάσθηκε εάν εκροφούνται στην υδατική φάση, τόσο φθορισμομετρικά, όσο και με τη βοήθεια διάταξης υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Εξετάσθηκε ακόμη η παρουσία πηγής πρωτεΐνης στο φθορισμό των ακινητοποιημένων  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC.

Βρέθηκε πως όταν πηγή  $PLA_2$  δράσει στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της  $C_{12}$ -NBD-PC απελευθερώνεται στην υδατική φάση  $C_{12}$ -NBD-FA, ενώ δεν λαμβάνει χώρα εκρόφηση του ακινητοποιημένου υποστρώματος. Στις συνθήκες ανάλυσης ο φθορισμός του προϊόντος αντίδρασης της  $PLA_2$  είναι διακριτός από τον φθορισμό του ακινητοποιημένου υποστρώματος. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε: 1) φθορισμομετρικά, 2) με τη βοήθεια διάταξης HPLC και 3) με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Έτσι, η  $PLA_2$  προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά από την κλίση της καμπύλης αύξησης της έντασης του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη προσθήκη εσωτερικού προτύπου διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA στο μείγμα της αντίδρασης.

Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH, των ιόντων  $Ca^{2+}$ , της παρουσίας ειδικών αναστολέων της  $PLA_2$  στον φθορισμομετρικό προσδιορισμό



αυτής. Η μέθοδος συγκρίθηκε στατιστικά με φθορισμομετρική και με HPLC-φθορισμομετρική μέθοδο της βιβλιογραφίας.

Συμπερασματικά, η παρούσα μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλό όριο ανίχνευσης (1 pmol FA), ικανοποιητική επαναληψιμότητα ( $\%RSD \leq 6\%$ ), αναπαραγωγιμότητα ( $\%RSD \leq 9\%$ ), μπορεί να εφαρμοσθεί σε διάφορες πειραματικές συνθήκες και παρουσιάζει σημαντική στατιστική συσχέτιση με τις μεθόδους με τις οποίες συγκρίθηκε. Επιπλέον, εισάγει τη χρήση του ακινητοποιημένου υποστρώματος.

## SUMMARY

Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) are a family of highly regulated enzymes that catalyze the hydrolysis of the *sn*-2 ester bond of phospholipids, liberating free fatty acids and lyso-phospholipids. They are considered to be inflammation markers and their determination could give important information. In this framework, the purpose of the present study was the development and evaluation of a fluorimetric assay for the determination of PLA<sub>2</sub> activity in biological samples.

For this purpose C<sub>12</sub>- and C<sub>6</sub>-NBD-PC substrates were immobilized by entrapment in a polymer matrix. Excitation and emission spectra were recorded in a proper spectrofluorimeter, equipped with an ELISA plate. The fluorescence of the immobilized substrates was tested under various experimental conditions such as temperature, pH values, or Ca<sup>2+</sup> concentrations.

Furthermore, the behaviour of the immobilized substrates in proper buffer solutions was evaluated. It was also tested if they are desorbed in the aqueous phase with fluorescence and HPLC techniques.

It was found that when PLA<sub>2</sub> from biological samples acts on the immobilized substrate of C<sub>12</sub>-NBD-PC, C<sub>12</sub>-NBD-FA is yielding in the aqueous phase. Moreover, under these conditions, no desorption of the immobilized substrate took place. The fluorescence of the PLA<sub>2</sub> reaction product is distinct from the fluorescence of the immobilized substrate. This result was confirmed: 1) fluorometrically, 2) in an HPLC unit and 3) with Thin Layer Chromatography (TLC). PLA<sub>2</sub> activity was determined fluorometrically from the slope of the fluorescence enhancement in response to reaction time. Internal standard solution of C<sub>12</sub>-NBD-FA was also added in the reaction mixture.

The method was evaluated under high protein concentrations, various incubation temperatures, pH values, Ca<sup>2+</sup> concentrations and in the presence of PLA<sub>2</sub> inhibitors. Furthermore, the present assay was validated by a fluorimetric and an HPLC-fluorimetric method.

Conclusively, the present assay is characterized by low limit detection (1pmol FA), is repeatable (%RSD ≤ 6%), reproducible (%RSD ≤ 9%) and could be applied in various experimental conditions. Additionally, has significant statistical correlation

and good agreement with the methods which was evaluated. Finally, it introduces the use of immobilized substrates.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

|                                                             |                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADP                                                         | : Διφωσφορική Αδενοσίνη                                                                               |
| Asp                                                         | : Ασπαρτικό                                                                                           |
| ATP                                                         | : Τριφωσφορική Αδενοσίνη                                                                              |
| BAL (Broncoalveolar Lavage)                                 | : Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα                                                                            |
| BSA (Bovine Serum Albumin)                                  | : Αλβουμίνη ορού βοός                                                                                 |
| C <sub>6</sub> -NBD-FA                                      | : 6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoic acid                                          |
| C <sub>6</sub> -NBD-PC                                      | : 1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine    |
| C <sub>12</sub> -NBD-FA                                     | : 12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid                                       |
| C <sub>12</sub> -NBD-PC                                     | : 1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine |
| CMC (Critical Micellar Concentration)                       | : Κρίσιμη Μικυλλιακή Συγκέντρωση                                                                      |
| cPLA <sub>2</sub> (cytosolic Phospholipase A <sub>2</sub> ) | : Κυτοσολική Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>                                                               |
| EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic acid)                   | : Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ                                                                    |
| Gly                                                         | : Γλυκίνη                                                                                             |
| HDL (High Density Lipoproteins)                             | : Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνες                                                                     |
| His                                                         | : Ιστιδίνη                                                                                            |
| HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)                  | : Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης                                                                    |
| HSA (Human Serum Albumin)                                   | : Αλβουμίνη Ανθρώπινου Ορού                                                                           |
| iPLA <sub>2</sub>                                           | : Φωσφολιπάση A <sub>2</sub> , ανεξάρτητη της παρουσίας ιόντων Ca <sup>2+</sup>                       |
| LDL (Low Density Lipoproteins)                              | : Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνες                                                                    |
| LY 311727                                                   | : (3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-                                                                   |

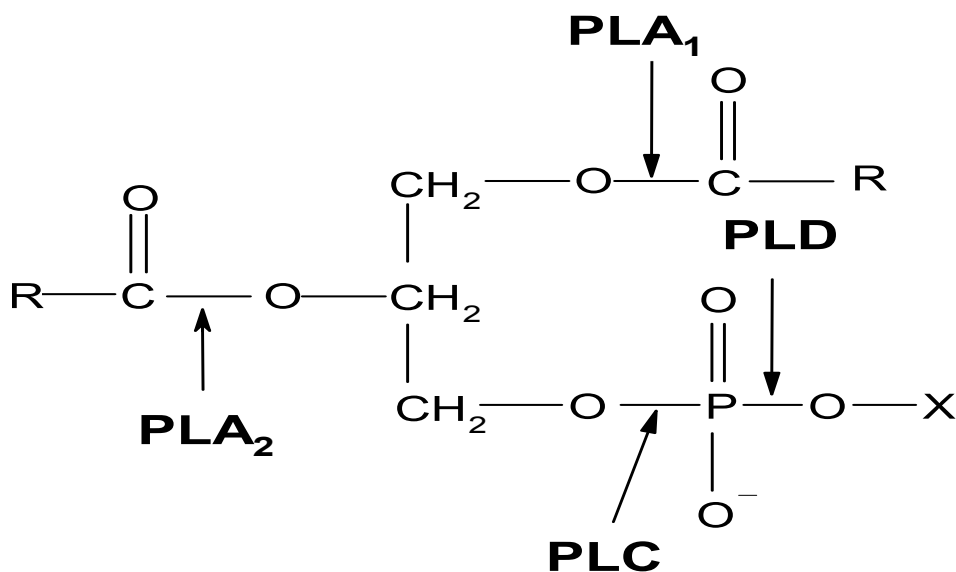
|                                                             |                                                                                |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|                                                             | indoyl-5-oxy) propane phosphonic acid                                          |
| Λυσο-PA                                                     | : Λυσο-Φωσφατιδικό Οξύ                                                         |
| Λυσο-PC                                                     | : Λυσο-Φωσφατιδυλοχολίνη                                                       |
| Λυσο-PLA <sub>1</sub>                                       | : Λυσο-Φωσφολιπάση A <sub>1</sub>                                              |
| Λυσο-PLA <sub>2</sub>                                       | : Λυσο-Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>                                              |
| Λυσο-PS                                                     | : Λυσο-Φωσφατιδυλοσερίνη                                                       |
| ML 3176                                                     | : 1-[2-(4-carboxymethylphenoxy)ethyl]-<br>3-dodecanoylindole-2-carboxylic acid |
| PAF (Platelet Activating Factor)                            | : Παράγοντας Ενεργοποίησης<br>Αιμοπεταλίων                                     |
| PAF-AcH (Platelet Activating Factor-<br>Acetylhydrolase)    | : Ακετυλδωρολάση του Παράγοντα<br>Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων                   |
| PA                                                          | : Φωσφατιδικό Οξύ                                                              |
| PC                                                          | : Φωσφατιδυλοχολίνη                                                            |
| PE                                                          | : Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη                                                      |
| PG                                                          | : Φωσφατιδυλογλυκερόλη                                                         |
| PI                                                          | : Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη                                                         |
| PLA <sub>1</sub>                                            | : Φωσφολιπάση A <sub>1</sub>                                                   |
| PLA <sub>2</sub>                                            | : Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>                                                   |
| PLC                                                         | : Φωσφολιπάση C                                                                |
| PLD                                                         | : Φωσφολιπάση D                                                                |
| PS                                                          | : Φωσφατιδυλοσερίνη                                                            |
| Ser                                                         | : Σερίνη                                                                       |
| Sph                                                         | : Σφιγγομυελίνη                                                                |
| sPLA <sub>2</sub> (secretory Phospholipase A <sub>2</sub> ) | : Εκκρινόμενη Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>                                       |
| TLC (Thin Layer Chromatography)                             | : Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδος                                                |
| V <sub>max</sub>                                            | : Μέγιστη Ταχύτητα Αντίδρασης                                                  |

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub>

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Οι φωσφολιπάσες (PLases) είναι διάφορα είδη ενζύμων που καταλύουν τον καταβολισμό των φωσφολιπιδίων. Ανάλογα με τον εστερικό δεσμό που υδρολύουν διακρίνονται σε τέσσερις γενικές κατηγορίες. Με βάση αυτή τη χαρακτηριστική ιδιότητα τους, διακρίνονται στις φωσφολιπάσες A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), C (PLC) και D (PLD), (Σχήμα 1). Επίσης, υπάρχουν ένζυμα που έχουν ταυτόχρονη δράση PLA<sub>1</sub> και PLA<sub>2</sub>. Τα ένζυμα αυτά αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως φωσφολιπάση B (PLB).

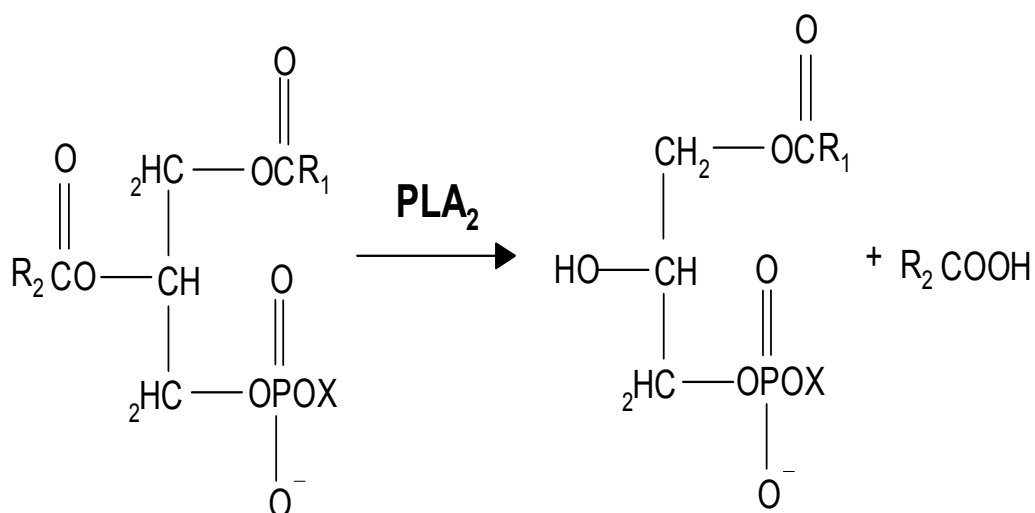


ΣΧΗΜΑ 1. Ταξινόμηση φωσφολιπασών με βάση τον εστερικό δεσμό που υδρολύουν.

Οι μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια, όσο αναφορά τη δομή και την δράση αυτών των ενζύμων είναι εκτεταμένες. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε σχεδόν αποκλειστικά με τις PLA<sub>2</sub>.

### 1.2 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub>

Οι φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> (E.C. 3.1.1.4.) είναι μία μεγάλη οικογένεια αποτελούμενη από διάφορα ένζυμα που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού των φωσφολιπιδίων στην *sn*-2 θέση, απελευθερώνοντας με αυτό τον τρόπο ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια [1] (Σχήμα 2).



ΣΧΗΜΑ 2. Χημική εξίσωση της αντίδρασης που καταλύουν τα ένζυμα της οικογένειας των PLA<sub>2</sub>. Το αντιδρών φωσφολιπίδιο υδρολύεται στην *sn*-2 θέση απελευθερώνοντας λυσοφωσφολιπίδιο και ελεύθερο λιπαρό οξύ.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται από τη δράση των PLA<sub>2</sub>s, όπως το αραχιδονικό και το ελαϊκό οξύ είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι μπορούν να δράσουν ως αποθήκες ενέργειας για τα κύτταρα. Επιπλέον, το αραχιδονικό οξύ μπορεί να δράσει ως δεύτερος αγγελιοφόρος [2] και ως πρόδρομος ένωση των εικοσανοειδών, που είναι εν δυνάμει μεσολαβητές της φλεγμονής και της μεταγωγής σήματος [3].

Τα λυσοφωσφολιπίδια, τα υπόλοιπα προϊόντα της δράσης των PLA<sub>2</sub>s, είναι σημαντικά στην κυτταρική σηματοδότηση, στην ανάπτυξη των φωσφολιπιδίων στην διαταραχή της μεμβράνης καθώς επίσης και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες [4,5].

Από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα και τις αρχές του 20<sup>ου</sup> ήταν γνωστό πως οι PLA<sub>2</sub> αποτελούν ουσιώδες συστατικό του δηλητηρίου των φιδιών. Επίσης απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στο πάγκρεας θηλαστικών, στον ανθρώπινο εγκέφαλο και την

καρδιά, σε διάφορα ανθρώπινα βιολογικά υγρά και αλλού. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τα ένζυμα αυτά αυξάνεται συνεχώς και εστιάζεται σε διάφορους τομείς.

### 1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ $A_2$ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΟΥΣ

Η κατάταξη των φωσφολιπασών μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: α) με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους και β) με βάση τον βιολογικό τους ρόλο.

Η σημαντικότερη και συστηματικότερη προσπάθεια ταξινόμησης των  $PLA_2$ s έγινε με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Με βάση το κριτήριο αυτό κατατάσσονται σε 15 ομάδες, οι οποίες σημαίνονται με έναν λατινικό αριθμό, ενώ επειδή υπάρχουν υποομάδες σε κάθε ομάδα, αυτές σημαίνονται με ένα λατινικό γράμμα [6,7,8,9].

Τα κριτήρια για την κατάταξη σε κάποια από τις ομάδες και υποομάδες μεταβάλλονται, διότι καινούργια ένζυμα απομονώνονται και χαρακτηρίζονται συνεχώς. Μόλις το 2000, για παράδειγμα, απομονώθηκε η ομάδα XIV  $PLA_2$  [9]. Έχει δημιουργηθεί λοιπόν η ανάγκη ώστε τα κριτήρια αυτά να κωδικοποιηθούν, έτσι ώστε να είναι εφαρμόσιμα και στο μέλλον, όταν και αν απομονωθούν και άλλες  $PLA_2$ . Έχουν γίνει αποδεκτά τέσσερα θεμελιώδη κριτήρια [6].

Το πρώτο και ταυτόχρονα θεμελιώδες κριτήριο προκειμένου ένα ένζυμο να τοποθετηθεί σε μία από τις ομάδες  $PLA_2$ , είναι να καταλύει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στη θέση *sn*-2 ενός φωσφολιπιδικού υποστρώματος. Υπάρχουν πολλά φυσικώς απαντούντα υποστρώματα, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, οξειδωμένα φωσφολιπίδια με μικρού μήκους λιπαρές αλυσίδες καθώς επίσης και φωσφολιπίδια με μεγάλο μήκος λιπαρών αλυσίδων των οποίων η *sn*-2 άκυλο αλυσίδα περιέχει από δύο έως είκοσι άτομα άνθρακα ή και ακόμη περισσότερα. Ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ενζύμων αυτών έχει δράση  $PLA_2$ , κάποια μέλη της δύναται να έχουν ταυτόχρονα και άλλες δράσεις όπως  $PLA_1$ , λύσο-φωσφολιπάσης  $A_1/A_2$ , ακυλ-τρανσφεράσης ή και τρανσακυλάσης.

Άλλο ουσιώδες κριτήριο, προκειμένου ένα ένζυμο να τοποθετηθεί σε κάποια από τις ομάδες  $PLA_2$ , είναι ολόκληρη η αλληλουχία των αμινοξέων του να είναι γνωστή.

Επίσης, η κάθε ομάδα  $PLA_2$  πρέπει να περιέχει όλα εκείνα τα ένζυμα που περιέχουν άμεσα αναγνωρίσιμη αλληλουχία ομολόγων. Αν περισσότερα από ένα



ομόλογα γονίδια  $PLA_2$  υπάρχουν σε ένα είδος, τότε το κάθε ένα από αυτά θα πρέπει να τοποθετηθεί σε υποομάδα της ίδιας ομάδας. Παράδειγμα αποτελούν οι υποομάδες IVA, IVB και IVC της ομάδας IV  $PLA_2$ . Όμως, ομόλογα γονίδια που ανήκουν σε διαφορετικά είδη πρέπει να τοποθετούνται στην ίδια υποομάδα, οποτεδήποτε αυτό είναι δυνατό, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην ομάδα IVA από ψάρι-ζέβρα (zebrafish) και από άνθρωπο. Από την άλλη, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα δύσκολα να καταταγούν ομόλογα ένζυμα σε υπάρχουσες υποομάδες.

Τέλος, σύμφωνα με το τέταρτο κριτήριο ταξινόμησης τα ενεργά παραλλάγματα που οφείλονται σε διαφορετικές θέσεις ματίσματος (splice variants) του ιδίου γονιδίου  $PLA_2$ , μπορεί να είναι ξεχωριστές πρωτεΐνες, θα ανήκουν όμως στην ίδια υποομάδα. Προκειμένου να διακριθούν μεταξύ τους, θα παίρνουν, μετά το όνομα της υποομάδας και έναν αραβικό αριθμό. Παράδειγμα αποτελεί η ομάδα VIA  $PLA_2$ , η οποία επειδή έχει δύο ενεργά παραλλάγματα χωρίζεται στις υποομάδες VIA-1 και VIA-2  $PLA_2$  [10].

Τα τέσσερα παραπάνω κριτήρια μπορεί να είναι γενικά, να περιέχουν εξαιρέσεις και να αφήνουν κάποιες αμφιβολίες, ωστόσο συμβάλλουν σημαντικά σε μελλοντικές ταξινομήσεις γονιδίων  $PLA_2$ .

## 1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ $A_2$ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΟΥΣ ΡΟΛΟ

Με βάση τις βιολογικές τους ιδιότητες οι διάφορες  $PLA_2$ s κατατάσσονται σε τέσσερις γενικές κατηγορίες:

- Εκκρινόμενες (secretory) φωσφολιπάσες  $A_2$  (s $PLA_2$ ),
- Κυτοσολικές (cytosolic) φωσφολιπάσες  $A_2$  (c $PLA_2$ ),
- Ενδοκυττάριας φωσφολιπάσες  $A_2$ , ανεξάρτητες της παρουσίας ιόντων ασβεστίου (i $PLA_2$ ),
- PAF-ακετυλνυδρολάσες (PAF-acetylhydrolase-PAF-AH).

Ουσιαστικά η παρούσα ταξινόμηση στηρίζεται σε αυτή της προηγούμενης παραγράφου (1.3), με τη διαφορά ότι οι δεκαπέντε ομάδες χωρίζονται σε τέσσερις, λαμβάνοντας υπόψη το βιολογικό τους ρόλο.

### 1.4.1 ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ $PLA_2$

Οι sPLA<sub>2</sub> ήταν ο πρώτος τύπος ενζύμων PLA<sub>2</sub> που ανακαλύφθηκαν. Απαντούν σε φυτά [11], έντομα [12], μαλάκια [13], ερπετά [14] και θηλαστικά [15].

Είναι ένζυμα χαμηλής μοριακής μάζας (13-15 kDa), το ενεργό τους κέντρο περιλαμβάνει ιστιδίνη, ενώ απαιτούν την παρουσία mM ιόντων Ca<sup>2+</sup> για την επίτευξη της καταλυτικής τους δράσης. Περιέχουν από έξι σταθερούς και έναν με δύο μεταβλητούς δισουλφιδικούς δεσμούς [16]. Οι διάφορες ομάδες και υποομάδες sPLA<sub>2</sub> παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2.

*ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub> των ομάδων II, II και III [16].*

| Ομάδα | Πηγή                                  | Μοριακή<br>μάζα<br>(kDa) | Δισουλφιδικοί<br>δεσμοί |
|-------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| IA    | Κόμπρα                                | 13-15                    | 7                       |
| IB    | Άνθρωπος/πάγκρεας<br>χοίρου           | 13-15                    | 7                       |
| IIA   | Κροταλία/Ανθρώπινο<br>αρθρικό υγρό    | 13-15                    | 7                       |
| IIB   | Οχιά                                  | 13-15                    | 6                       |
| IIC   | Αρουραίος/όρχεις ποντικού             | 15                       | 8                       |
| IID   | Άνθρωπος/πάγκρεας,<br>σπλήνα ποντικού | 14-15                    | 7                       |
| IIIE  | Άνθρωπος/εγκέφαλος<br>ποντικού        | 14-15                    | 7                       |
| IIIF  | Άνθρωπος/όρχεις ποντικού              | 16-17                    | 6                       |
| III   | Άνθρωπος/ποντικός/σαύρα<br>/μέλισσα   | 15-18                    | 8                       |
|       | Άνθρωπος/ποντικός                     | 55                       |                         |

Οι μηχανισμοί κατάλυσης των sPLA<sub>2</sub>s περιλαμβάνουν: 1) διαμορφωτικές αλλαγές του ενζύμου ή 2) αλλαγές στον προσανατολισμό, τη διαμόρφωση και την ενυδάτωση του υποστρώματος που διευκολύνουν την κατάλυση. Ανεξαρτήτως της προέλευσης και του ρόλου των sPLA<sub>2</sub>s η δομή τους είναι παρόμοια. Αποτελούνται από τρία

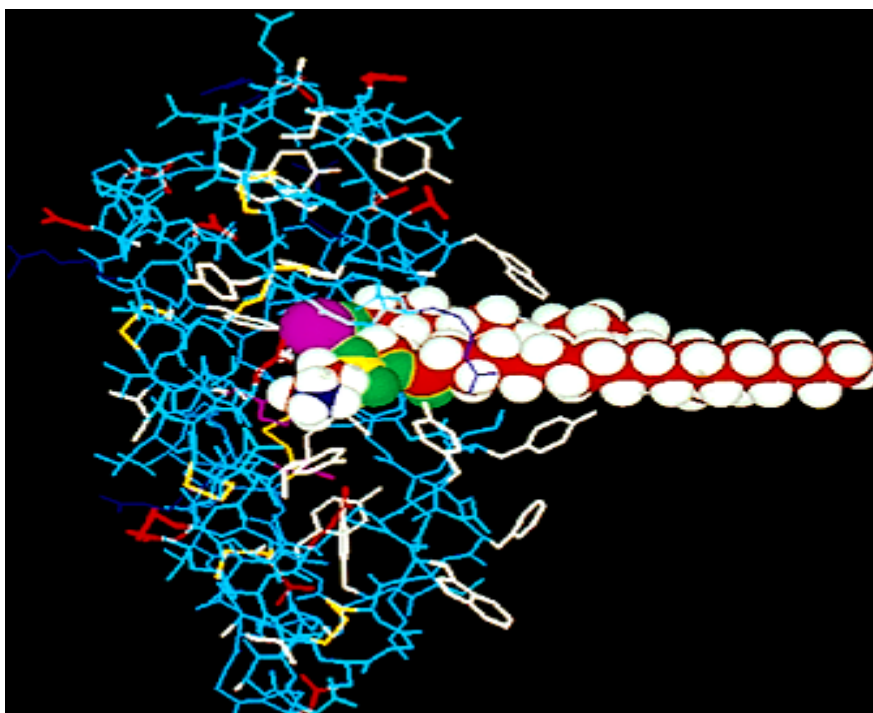
κύρια και δύο δευτερεύοντα τμήματα α-έλικας, ένα διπλά τυλιγμένο και αντιπαράλληλο τμήμα β-πτυχωτού φύλλου, μία κύρια περιοχή δέσμευσης των  $\text{Ca}^{2+}$  (σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει και δεύτερη περιοχή δέσμευσης) και τους δισουλφιδικούς δεσμούς [17].

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Εκκρινόμενες  $\text{PLA}_2$  των ομάδων V, IX, X, XI, XII, XIII και XIV [16].

| Ομάδα | Πηγή                       | Μοριακή<br>μάζα<br>(kDa) | Δισουλφιδικοί<br>δεσμοί |
|-------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| V     | Άνθρωπος/ποντικός          | 14                       | 6                       |
| IX    | Σαλιγκάρι                  | 14                       | 6                       |
| X     | Άνθρωπος                   | 14                       | 8                       |
| XIA   | Βλαστοί πράσινου<br>ρυζιού | 12.4                     | 6                       |
| XIB   | Βλαστοί πράσινου<br>ρυζιού | 12.9                     | 6                       |
| XII   | Άνθρωπος/ποντικός          | 19                       | 7                       |
| XIII  | Parvovirus                 | <10                      | 0                       |
| XIV   | Βακτήρια                   | 13-19                    | 2                       |

Οι  $\text{sPLA}_2\text{s}$  των ομάδων I, II, V και X ακολουθούν πρακτικά έναν κοινό μηχανισμό για τη επίτευξη της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων στη θέση *sn*-2. Η υδρόλυση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση και τον κατάλληλο προσανατολισμό ενός μορίου  $\text{H}_2\text{O}$ , το οποίο συνδέεται με δεσμό υδρογόνου στο ενεργό κέντρο της ιστιδίνης [18]. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από το pH, το οποίο πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή 7 με 9 [19]. Πρόσφατες εργασίες, στις οποίες το φωσφολιπιδικό υπόστρωμα περιείχε φωσφατιδυλοχολίνη (PC) στη θέση *sn*-2, έδειξαν ότι η υδρόλυση του φωσφολιπιδίου είναι ανάλογη με την ευκολία πρόσβασης του  $\text{H}_2\text{O}$  στο ενεργό κέντρο [20,21]. Η ενεργοποίηση του μορίου  $\text{H}_2\text{O}$  επιτυγχάνεται τόσο από την παρουσία ιστιδίνης (His) όσο και ασπαρτικού οξέος, με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Επιπρόσθετα, στη γειτονική περιοχή της καταλυτικής His βρίσκεται ένα κατάλοιπο ασπαρτικού (Asp), έτσι ώστε να σχηματίζεται η καταλυτική δυάδα His/Asp. Το

ασπαρτικό αυτό συνδέεται στην ίδια περιοχή στην οποία συνδέονται και τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , η παρουσία των οποίων σταθεροποιεί την αρνητικά φορτισμένη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης την οποία καταλύει η  $\text{PLA}_2$ . Αυτή είναι και η αιτία που η συντριπτική πλειοψηφία των  $\text{sPLA}_2\text{s}$  απαιτούν mM ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  για την επίτευξη της καταλυτικής τους δράσης [22].

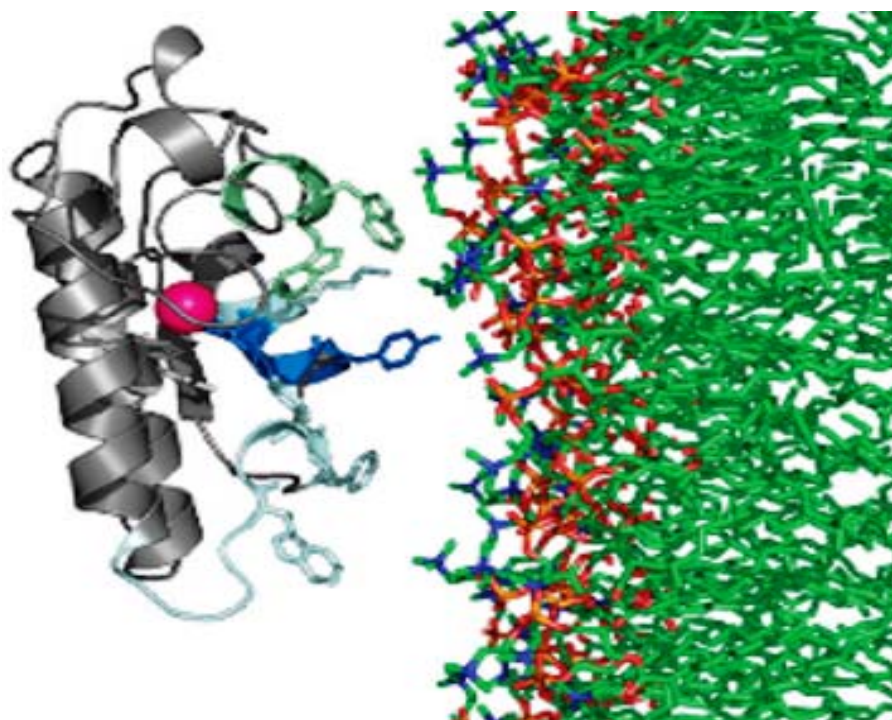


ΣΧΗΜΑ 3. Κρυσταλλική δομή της ομάδας IA  $\text{PLA}_2$  από δηλητήριο κόμπρας N. Naja naja. Το φωσφολιπιδικό υπόστρωμα απεικονίζεται με την ενεργοποιημένη του μορφή [9].

Ακόμη, οι  $\text{sPLA}_2\text{s}$  των ομάδων I, II, V και X έχουν αλληλουχίες σήματος οι οποίες διαχωρίζονται κατά τη διαδικασία της έκκρισης από την ώριμη, ενεργή πρωτεΐνη. Εξαιρεση αποτελεί η υποομάδα IB, η οποία εκκρίνεται με ένα πεπτίδιο, το οποίο με τη σειρά του πρέπει να διαχωριστεί με θρυψίνη προκειμένου να παραχθεί η ώριμη, ενεργή πρωτεΐνη.

Οι  $\text{sPLA}_2\text{s}$  δεν δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στην υδρόλυση συγκεκριμένων φωσφολιπιδικών υποστρωμάτων. Ουσιαστικά, παρουσιάζουν παρόμοια ενεργότητα στην υδρόλυση φωσφολιπιδίων με διαφορετικό μήκος λιπαρής αλυσίδας στην *sn*-2

θέση. Ωστόσο, δείχνουν διαφορετική προτίμηση ως προς το φορτίο του λιπιδικού υποστρώματος.



*ΣΧΗΜΑ 4. Μοντέλο πρόσδεσης της ομάδας IA PLA<sub>2</sub> από δηλητήριο κόμπρας N. Naja Naja στην επιφάνεια του φωσφολιπιδίου [9].*

Εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>s που περιέχουν θρυπτοφάνη στην επιφάνεια δέσμευσης με το λιπίδιο επιδεικνύουν μέγιστη ενεργότητα σε ουδέτερα λιπίδια, ενώ sPLA<sub>2</sub>s που περιέχουν υπερβολικό αριθμό βασικών καταλοίπων στην επιφάνεια δέσμευσης με το λιπίδιο παρουσιάζουν μέγιστη ενεργότητα σε αρνητικά φορτισμένα λιπίδια [23,24]. Ακόμη, τα περισσότερα μέλη της ομάδας II δρουν σε ανιονικά φωσφολιπίδια όπως φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και φωσφατιδυλοσερίνη (PS), ακόμη όμως και σε ουδέτερα όπως η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) [25]. Οι sPLA<sub>2</sub>s των ομάδων V και X υδρολύουν τόσο ανιονικά φωσφολιπίδια [26,27] όσο και τη PC αποτελεσματικά. Κάποια μέλη της ομάδας II είναι ιδιαίτερα κατιονικά και δεσμεύονται ισχυρά σε ανιονικά ηπαρανοειδή, όπως η ηπαρίνη και η θειϊκή ηπαράνη. Το σύμπλεγμα των βασικών αμινοξέων πλησίον του C- τελικού άκρου είναι απαραίτητο για την δέσμευση αυτή, ενώ άλλα βασικά κατάλοιπα διαχέονται σε ολόκληρα τα μόρια και παίζουν έναν υποστηρικτικό ρόλο [28].

### 1.4.2 ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΕΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub>

Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> είναι μεγάλες κυτοσολικές πρωτεΐνες με διάφορες μοριακές μάζες, οι οποίες ποικίλουν από 61 έως 114 kDa, και κύριο χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι σταθεροποιούν μία καταλυτική σερίνη. Στον πίνακα 3 συνοψίζονται οι cPLA<sub>2</sub>s της ομάδας IV.

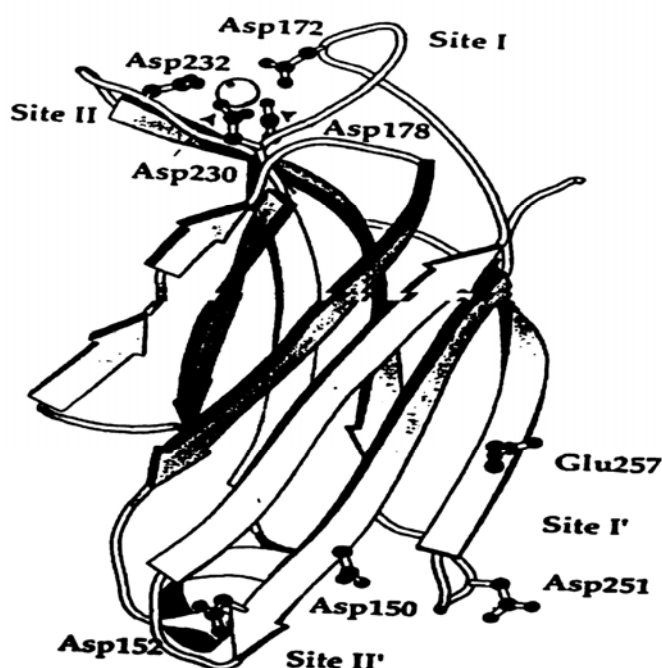
Μέχρι το 1986 οι μόνες γνωστές PLA<sub>2</sub> ήταν αυτές που χαρακτηρίζονται από χαμηλή μοριακή μάζα και κάνουν χρήση μιας καταλυτικής ιστιδίνης (εκκρινόμενες). Το 1986 αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε μία διαφορετική PLA<sub>2</sub>, η οποία βρέθηκε σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα κύτταρα [29] και αιμοπετάλια [30]. Το 1991 βρέθηκε η ακριβής αλληλουχία αυτής της κυτοσολικής PLA<sub>2</sub>, η οποία σήμερα είναι γνωστή ως IVA PLA<sub>2</sub> και είναι η πρώτη PLA<sub>2</sub>, η οποία αξιοποιεί μία καταλυτική σερίνη [31].

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Κυτοσολικές PLA<sub>2</sub> της ομάδας IV [16].

| Ομάδα | Πηγή                  | Μοριακή<br>μάζα<br>(kDa) | Χαρακτηριστικά | Άλλη<br>ονομασία    |
|-------|-----------------------|--------------------------|----------------|---------------------|
| IVA   | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 85                       | C2 περιοχή     | cPLA <sub>2</sub> a |
| IVB   | Άνθρωπος              | 114                      | C2 περιοχή     | cPLA <sub>2</sub> β |
| IVC   | Άνθρωπος              | 61                       | ακυλιωμένη     | cPLA <sub>2</sub> γ |
| IVD   | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 92-93                    | C2 περιοχή     | cPLA <sub>2</sub> δ |
| IVE   | Ποντικός              | 100                      | C2 περιοχή     | cPLA <sub>2</sub> ε |
| IVF   | Ποντικός              | 96                       | C2 περιοχή     | cPLA <sub>2</sub> ζ |

Η ομάδα IV PLA<sub>2</sub> είναι μία πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 85 kDa. Αποτελείται από δύο πεδία, ένα C2 και ένα πεδίο α/β υδρολάσης [32,33]. Έρευνες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει πως ο μηχανισμός υδρόλυσης εκμεταλλεύεται μία νέα καταλυτική δυάδα αποτελούμενη από Ser-228 και Asp-549 [34]. Η ομάδα αυτή δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση στην υδρόλυση φωσφολιπιδίων που περιέχουν

αραχιδονικό οξύ στην *sn*-2 θέση [35,36]. Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε εικοσανοειδή όπως λευκοτριένια και προσταγλανδίνες, που είναι εν δυνάμει μεσολαβητές φλεγμονωδών και σηματοδοτικών μονοπατιών. Πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια έχουν επιβεβαιώσει τον κεντρικό ρόλο της IVA PLA<sub>2</sub> ομάδας στην απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος [37]. Επιπλέον, άλλες έρευνες σε σιτευτικά κύτταρα από ποντίκια έχουν αποδείξει τον κεντρικό ρόλο της ομάδας αυτής σε όλα τα στάδια της απελευθέρωσης εικοσανοειδών.

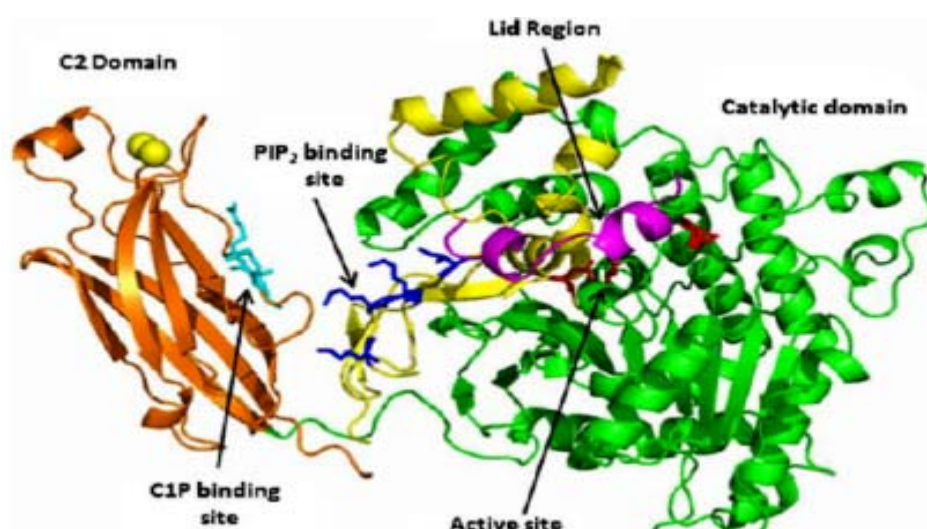


ΣΧΗΜΑ 5. Σχηματική απεικόνιση της γεωμετρίας της C2 περιοχής. Στην εικόνα απεικονίζεται τόσο η κύρια, όσο και μία δευτερεύουσα περιοχή δέσμευσης των Ca<sup>2+</sup>. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την μεμβρανική σύνδεση της cPLA<sub>2</sub> [17].

Η ομάδα IVA PLA<sub>2</sub> εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup>. Σε αντίθεση όμως με τις εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>, η παρουσία των ιόντων Ca<sup>2+</sup> δεν είναι απαραίτητη για την επίτευξη καταλυτικής δράσης, αλλά για την μεταφορά του ενζύμου σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες [38,39,40].

Η C2 περιοχή της IVA PLA<sub>2</sub> αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα μέλη μιας μεγάλης οικογένειας C2 περιοχών (σχήμα 5) [41]. Περιέχει τις απαραίτητες ιδιότητες για την δέσμευση δύο ιόντων Ca<sup>2+</sup> και μεμβρανών φωσφολιπιδίων [42,43]. Είναι

πιθανό πως in vivo η C2 περιοχή είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της IVA PLA<sub>2</sub> από το κυτοσόλιο στην περιοχή της περιτυρηνικής μεμβράνης, έπειτα από ανταπόκριση σε ερεθίσματα που αυξάνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> [44,45]. Ένας ενδιαφέρον μηχανισμός, ο οποίος αναφέρεται στον εντοπισμό της περιτυρηνικής περιοχής περιλαμβάνει μία εξαρτώμενη από την παρουσία Ca<sup>2+</sup> αλληλεπίδραση της C2 περιοχής με βιμεντίνη (vimentin), μία κυτοσκελετική πρωτεΐνη, η οποία επίσης εντοπίζεται στην περιτυρηνική περιοχή. Η C2 περιοχή της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub> εμφανίζει εξειδίκευση για μεμβράνες που περιέχουν κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη [46].



ΣΧΗΜΑ 6. Κρυσταλλική δομή της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub>. Απεικονίζονται στο σχήμα η C2 περιοχή με τις δύο περιοχές δέσμευσης ιόντων Ca<sup>2+</sup>, η ενεργός περιοχή του ενζύμου, καθώς και η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος της PIP<sub>2</sub> και της C1P [9].

Εκτός του ρυθμιστικού ρόλου του ασβεστίου μέσω της C2 περιοχής, η IVA PLA<sub>2</sub> ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση της Ser-505 in vitro [47]. In vivo, η φωσφορυλίωση της Ser-505 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της IVA PLA<sub>2</sub> σε απάντηση της ενεργοποίησης του κυττάρου [48]. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές πως η φωσφορυλίωση της Ser-505 επηρεάζει την ενεργοποίηση της IVA PLA<sub>2</sub>. Πάντως, η φωσφορυλίωση της Ser-505 έχει βρεθεί πως προκαλεί μία πολύ μικρή αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου [49]. Άλλες φωσφορυλιώσεις έχουν αναφερθεί στη Ser437, στη Ser454, στη Ser515 και Ser727 [50,51,52] Επιπλέον, ένα μεγάλο ποσοστό της IVA PLA<sub>2</sub> (50% ή και ακόμη μεγαλύτερο) μπορεί να είναι



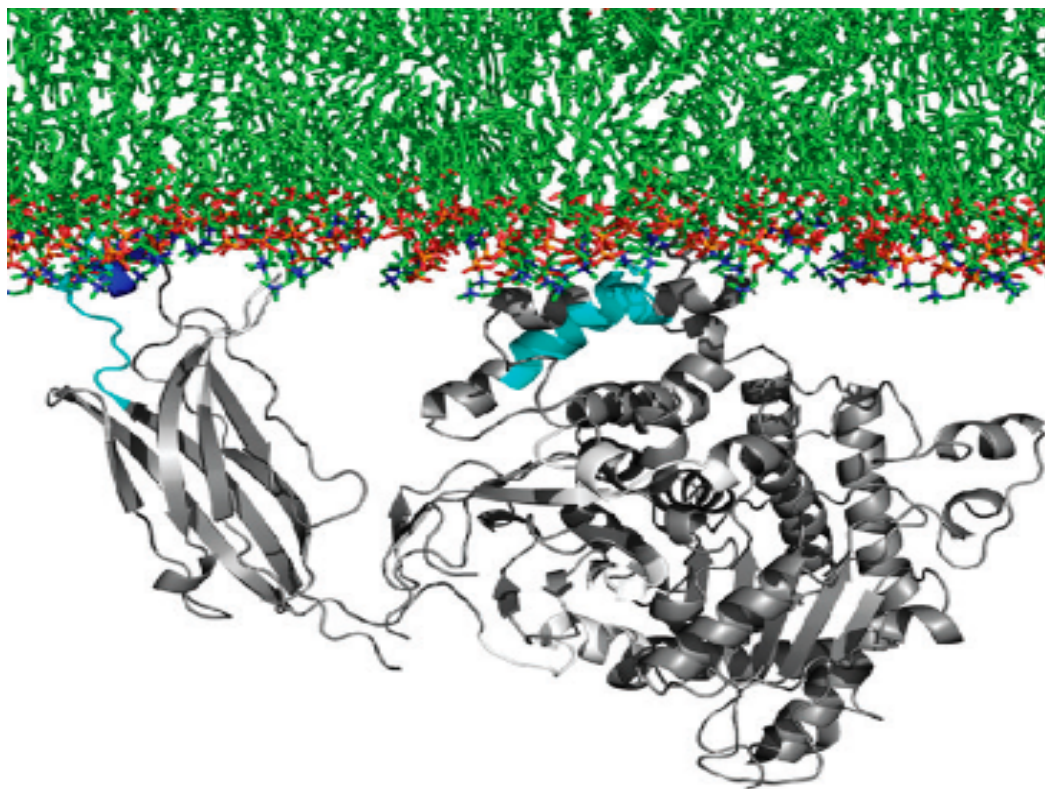
φωσφορυλιωμένο κάτω από ορισμένες συνθήκες, γεγονός που δείχνει το ρόλο της φωσφορυλίωσης για την κυτταρική ενεργοποίηση της ομάδας αυτής.

Τελευταίες μελέτες δείχνουν πως η ομάδα IVA PLA<sub>2</sub> παρουσιάζει υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για το υπόστρωμα της 4,5-διφωσφορικήφωσφατιδυλινοσιτόλης (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-PIP<sub>2</sub>) [53]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της PIP<sub>2</sub> με τη διεπιφάνεια οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου [54]. Ακόμη, η IVA PLA<sub>2</sub> δύναται να ενεργοποιηθεί προκειμένου να απελευθερώσει αραχιδονικό οξύ χωρίς να αυξηθεί ταυτόχρονα η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Η ενεργοποίηση αυτή λαμβάνει χώρα με ακόλουθη αύξηση των επιπέδων της PIP<sub>2</sub>. Επιπλέον, στα ενεργοποιημένα κύτταρα αναστολή της σύνθεσης της PIP<sub>2</sub> συσχετίζεται με μείωση ως προς την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Τέλος, κάθε αύξηση των επιπέδων της PIP<sub>2</sub> στα κύτταρα με απευθείας προσθήκη ή διέγερση της σύνθεσής της, είναι επαρκής προκειμένου να ενεργοποιήσει την IVA PLA<sub>2</sub> [55,56]. Η περιοχή πρόσδεσης της PIP<sub>2</sub> βρέθηκε έπειτα από πειράματα μεταλλαξιγένεσης και εντοπίζεται σε τέσσερις λυσίνες στις θέσεις 485, 541, 543 και 544 [57].

Πρόσφατα βρέθηκε πως η ceramide 1-phosphate (C1P, κεραμίδιο 1 φωσφορική) είναι ένας ακόμη ενεργοποιητής της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub> [58]. Η C1P προσδένεται στο ένζυμο σε συγκεκριμένο τμήμα της C2 περιοχής, το οποίο αποτελείται από τις Arg57, Lys58 και Arg59 [59]. Μελέτες έχουν δείξει επίσης, πως ο μηχανισμός ενεργοποίησης της C1P εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> [60]. Στο σχήμα 6 απεικονίζεται η κρυσταλλική δομή της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub>.

Διάφορες άλλες PLA<sub>2</sub> έχουν τοποθετηθεί στην IV ομάδα με βάση ομοιότητες στην αλληλουχία τους (πίνακας 3). Η ομάδα IVB PLA<sub>2</sub> είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1012 αμινοξέα, η οποία παρουσιάζει περίπου 30% ομοιότητα με την ομάδα IVA PLA<sub>2</sub> [61]. Το mRNA εκφράζεται παντού, ωστόσο σε πολύ υψηλότερα επίπεδα βρίσκεται στο πάγκρεας, στο συκώτι, στην καρδιά και στον εγκέφαλο. Έχει μοριακή μάζα περίπου 114 kDa και ένα μοναδικό 242-κατάλοιπο στο άμινο-τελικό άκρο. Εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> με όμοιο τρόπο με την ομάδα IVA PLA<sub>2</sub>, ενώ περιλαμβάνει επίσης μία C2 περιοχή [62]. Ακόμη, έχει υψηλή ομολογία με την ομάδα IVA PLA<sub>2</sub> κοντά στα καταλυτικά κατάλοιπα της Ser-228 και Asp-549, ωστόσο δεν έχει καμία από τις τέσσερις σερίνες οι οποίες φωσφορυλιώνονται στην ομάδα αυτή. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός πως σε λύματα κυττάρων που

περιέχουν IVB PLA<sub>2</sub> σε σημαντικές ποσότητες, φαίνεται πως το ένζυμο έχει μεγαλύτερη δράση PLA<sub>1</sub> και λυσοPLA<sub>2</sub> παρά PLA<sub>2</sub>. Ωστόσο, προκειμένου να βγούν ασφαλή συμπεράσματα σε αυτή την κατεύθυνση πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες.



ΣΧΗΜΑ 7. Μοντέλο πρόσδεσης της ομάδας IVa PLA<sub>2</sub> στην επιφάνεια του φωσφολιπιδίου [9].

Η ομάδα IVC PLA<sub>2</sub> είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 541 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 61 kDa. Έχει ελαφρώς λιγότερη από 30% ομολογία με την ομάδα IVa PLA<sub>2</sub> [63]. Το mRNA εκφράζεται περισσότερο στην καρδιά και τους σκελετικούς μύες. Ακριβώς λόγω του μικρότερου μεγέθους της, η ομάδα IVC PLA<sub>2</sub> δεν περιέχει την C2 περιοχή, ενώ δεν παρουσιάζει καμία εξάρτηση από την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> [64]. Έχει επίσης δειχθεί πως η εν λόγω ομάδα παρουσιάζει πολύ μικρότερη εξειδίκευση στην υδρόλυση υποστρωμάτων που περιέχουν αραχιδονικό οξύ στη θέση *sn*-2, σε σχέση με την ομάδα IVa PLA<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, η εξειδίκευση της πρώτης στην υδρόλυση τέτοιων υποστρωμάτων είναι περίπου 7 φορές μικρότερη σε σχέση με τη δεύτερη. Ακόμη, η ομάδα IVC PLA<sub>2</sub> μπορεί να υδρολύει και τις δύο

ακυλο αλυσίδες υποστρωμάτων φωσφατιδυλοχολίνης (PC) παρουσιάζοντας με τον τρόπο αυτό ξεκάθαρη δράση PLA<sub>2</sub>, πιθανότατα δράση PLA<sub>1</sub> και ενδεχομένως δράση λυσοPLA<sub>1</sub> και λυσοPLA<sub>2</sub>.

Οι ομάδες IVD, IVE και IVF PLA<sub>2</sub>, παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση στην υδρόλυση υποστρωμάτων που περιέχουν διαφορετικά λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα IVD PLA<sub>2</sub> εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση στην υδρόλυση υποστρωμάτων που περιέχουν λινολενικό οξύ στη sn-2 θέση [65], ενώ οι ομάδες IVE και IVF υδρολύουν τόσο αραχιδονικό, όσο και λινολενικό οξύ [66].

### ***1.4.3 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ Ca<sup>2+</sup> ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub>***

Η πρώτη χαρακτηρισμένη και κλωνοποιημένη PLA<sub>2</sub> η οποία βρέθηκε να είναι εντελώς ανεξάρτητη της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup>, και η οποία συχνά αναφέρεται ως i(independent)PLA<sub>2</sub>, κατατάσσεται σήμερα στην ομάδα VIA-1 PLA<sub>2</sub>. Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί διάφορες άλλες PLA<sub>2</sub>s, οι οποίες είναι ανεξάρτητες της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup>, και οι οποίες κατατάσσονται στις ομάδες VI έως VIII. Ειδικά για τις ομάδες VII και VIII θα γίνει λεπτομερής αναφορά σε επόμενη παράγραφο της παρούσας εργασίας. Επίσης θα πρέπει να υπενθυμίσουμε, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, πως η ομάδα IVC PLA<sub>2</sub>, μολονότι κατατάσσεται στις κυτοσολικές PLA<sub>2</sub>, δεν απαιτεί την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> ούτε για την επίτευξη της καταλυτικής της δράσης, ούτε για την μετατόπισή της σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Οι ιδιότητες των ανεξάρτητων της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup> PLA<sub>2</sub>, οι οποίες απαντούν σε θηλαστικά, συνοψίζονται στον πίνακα 4.

Οι iPLA<sub>2</sub>s, όπως άλλωστε και οι cPLA<sub>2</sub>s, χρησιμοποιούν μια σερίνη για την επίτευξη της κατάλυσης. Το γονίδιο της ομάδας VIA PLA<sub>2</sub> που απαντά στον άνθρωπο έχει διάφορα παραλλάγματα που οφείλονται σε διαφορετικές θέσεις ματίσματος, τα οποία απεικονίζονται σχηματικά στο σχήμα 8. Τουλάχιστον δύο καταλυτικά ενεργές μορφές του ενζύμου έχουν αναγνωρισθεί και πιο συγκεκριμένα οι ομάδες VIA-1 (επίσης γνωστή και ως iPLA<sub>2</sub>-A) και VIA-2 (επίσης γνωστή και ως iPLA<sub>2</sub>-B) [67].

Η ομάδα VIA-1 PLA<sub>2</sub> απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε αρχικά από μακροφάγα P388D<sub>1</sub> [68]. Αποτελείται από 750 αμινοξέα και έχει σχετική μοριακή μάζα 85 kDa [69]. Περιέχει οκτώ επαναλήψεις αγκυρίνης (ankyrin repeats). Επίσης, περιέχει μία συγκαταβατική ακολουθία λιπάσης (Gly-X-Ser<sup>465</sup>-X-Gly), η οποία δεν περιέχει την ενεργό σερίνη, όπως έχει αποδειχθεί με πειράματα μεταλλαξιγένεσης [70].

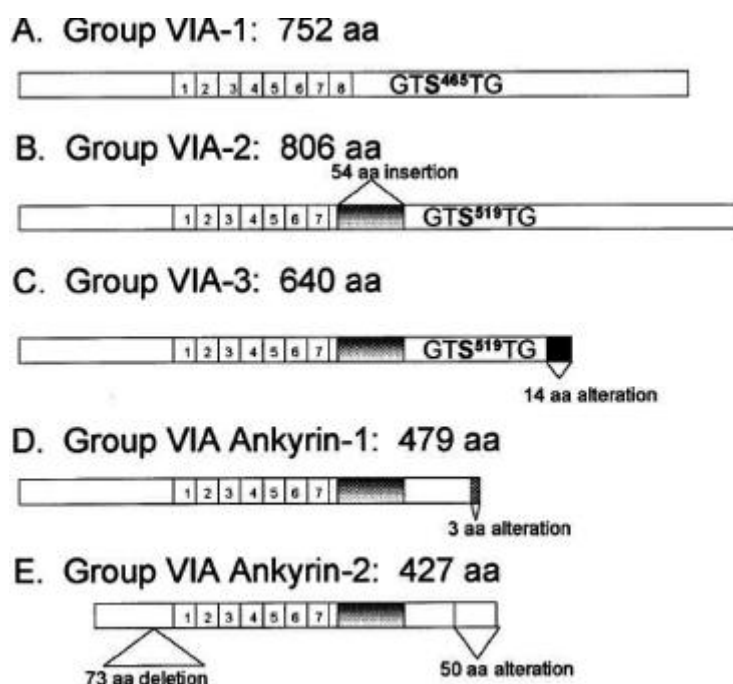
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ιδιότητες των ανεξάρτητων της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup> PLA<sub>2</sub>, οι οποίες απαντούν σε θηλαστικά [71].

| Ομάδα           | Εναλλακτικά<br>Ονόματα | Mw (kDa)               | Ιδιότητες Δομής                                                          |
|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| VIA             | iPLA <sub>2</sub>      | 85-88                  | 7-8 επαναλήψεις<br>αντικυρίνης                                           |
| VII και<br>VIII | PAF-AcHs               | Πολλαπλές<br>ισομορφές | Ετερογενής                                                               |
| IVC             | iPLA <sub>2</sub> -γ   | 61                     | 30% ομοιότητα με<br>την cPLA <sub>2</sub> -α                             |
| VIB             | iPLA <sub>2</sub> -γ   | 88                     | Εντοπισμός της<br>αλληλουχίας του<br>C-τελικού άκρου<br>στα μικροσωμάτια |

Η ομάδα VIA-2 PLA<sub>2</sub> έχει σχετική μοριακή μάζα 88 kDa με ταυτόσημη πρωτογενή ακολουθία με την ομάδα VIA-1 PLA<sub>2</sub>. Εξαίρεση αποτελεί το γεγονός ότι οι οκτώ επαναλήψεις αγκυρίνης διακόπτονται από ένα επιπλέον κομμάτι 54 αμινοξέων. Επίσης, στο γονίδιο της iPLA<sub>2</sub> που ανιχνεύεται στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη τρεις ομάδες. Πιο συγκεκριμένα η ομάδα VIA-3 (αναφέρεται επίσης στη βιβλιογραφία και ως iPLA<sub>2</sub>-2), η ομάδα VIA-Αγκυρίνη-1 (επίσης γνωστή ως Αγκυρίνη-iPLA<sub>2</sub>-1) και η ομάδα VIA-Αγκυρίνη-2 (επίσης γνωστή και ως Αγκυρίνη-iPLA<sub>2</sub>, βλέπε και σχήμα 8). Ωστόσο στο μέλλον είναι πολύ πιθανό να αναγνωρισθούν και άλλες ομάδες.

Η ομάδα VIB PLA<sub>2</sub> έχει μελετηθεί σε πολύ μικρότερη έκταση και δεν είναι ακριβής ο τρόπος δράσης της [72]. Πιστεύεται πως συμμετέχει στην απελευθέρωση

αραχιδονικού οξέος [73]. Οι Jenkins και συνεργάτες βρήκαν πως οι ομάδες VIA και VIB PLA<sub>2</sub> παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία σε σχέση με τα εναντιομερή της βρωμο-ένολο-λακτόνης (BEL), ενός ειδικού αναστολέα των διαφόρων ενζύμων της ομάδας VI PLA<sub>2</sub> [74]. Πιο συγκεκριμένα, το S-εναντιομερές εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση στην αναστολή της ομάδας VIA PLA<sub>2</sub>, ενώ το R-εναντιομερές μεγαλύτερη εξειδίκευση στην αναστολή της ομάδας VIB PLA<sub>2</sub>. Η ενδιαφέρουσα αυτή δράση του αναστολέα ίσως βοηθήσει έτσι ώστε να κατανοηθούν στο άμεσο μέλλον οι διαφορετικές κυτταρικές δράσεις των ομάδων αυτών PLA<sub>2</sub>.



**ΣΧΗΜΑ 8.** Σχηματική απεικόνιση των ισομορφών της ανθρώπινης iPLA<sub>2</sub>. (A) Ομάδα VIA-1, (B) Ομάδα VIA-2, (C) Ομάδα VIA-3, (D) Ομάδα VIA αγκυρίνη-1, (E) Ομάδα VIA αγκυρίνη-2. Οι αριθμοί 1 έως 7 ή 1 έως 8 δείχνουν τον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης, δείχνεται η καταλυτική σερίνη, ενώ aa σημαίνει αμινοξέα [71].

Προσφάτως έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις νέες iPLA<sub>2</sub>, οι οποίες σήμερα είναι γνωστές ως ομάδες VIC, VID, VIE και VIF PLA<sub>2</sub> [75,76]. Ωστόσο λίγα πράγματα είναι γνωστά όσο αναφορά τον τρόπο δράσης τους. Στον πίνακα 5 συνοψίζονται οι iPLA<sub>2</sub> της ομάδας VI.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ομάδες VIA-1 και VIA-2 PLA<sub>2</sub> περιέχουν έναν αριθμό επαναλήψεων αγκυρίνης. Οι επαναλήψεις αγκυρίνης είναι κοινά μοτίβα,

τα οποία είναι παρόντα σε περισσότερες από 400 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων μεταγραφής, τοξινών, αναστολέων και πρωτεϊνών [77]. Πιστεύεται ότι οι επαναλήψεις αυτές είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ των μονομερών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Ανεξάρτητες της παρουσίας ιόντων  $Ca^{2+}$  φωσφολιπάσες  $A_2$  (iPLA<sub>2</sub>) της ομάδας VI [16].

| Ομάδα | Πηγή                  | Mw<br>(kDa) | Εναλλακτικά<br>Ονόματα |
|-------|-----------------------|-------------|------------------------|
| VIA-1 | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 84-85       | iPLA <sub>2</sub>      |
| VIA-2 | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 88-90       | iPLA <sub>2</sub> β    |
| VIB   | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 88-91       | iPLA <sub>2</sub> γ    |
| VIC   | Άνθρωπος/<br>ποντικός | 146         | iPLA <sub>2</sub> δ    |
| VID   | Άνθρωπος              | 53          | iPLA <sub>2</sub> ε    |
| VIE   | Άνθρωπος              | 57          | iPLA <sub>2</sub> ζ    |
| VIF   | Άνθρωπος              | 28          | iPLA <sub>2</sub> η    |

Η ομάδα VIA PLA<sub>2</sub> συμμετέχει σε διάφορες διαδικασίες και πιο συγκεκριμένα στην ανάπλαση φωσφολιπιδίων, στην απελευθέρωση αραχιδινικού οξέος με αποτέλεσμα το σχηματισμό εικοσανοειδών [78,79], στην έκφραση πρωτεϊνών [80], στην έκκριση [81,82,83], στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [84,85] και στην απόπτωση [86,87,88]. Επίσης, η ομάδα VIA PLA<sub>2</sub> ενδεχομένως να σχετίζεται με την εκκαθάριση των αποπτωτικών κυττάρων από μακροφάγα [89].

Το 1997 οι Kim και συνεργάτες απομόνωσαν από πνεύμονα αρουραίου μία πρωτεΐνη, σχετικής μοριακής μάζας 25 kDa, η οποία εμφανίζει όξινη δράση PLA<sub>2</sub>, ανεξάρτητης της παρουσίας ιόντων  $Ca^{2+}$  [90]. Το ένζυμο αυτό εμφανίζει ασθενή δράση PLA<sub>2</sub>, ανεξάρτητης της παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  μεταξύ pH 3 και 6 και μάλιστα εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα σε τιμή pH=4. Ωστόσο, αργότερα βρέθηκε πως η

πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει ταυτόχρονα δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η οποία μάλιστα είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής της PLA<sub>2</sub> [91,92]. Σήμερα το ένζυμο αυτό (E.C. 1.11.1.7) είναι γνωστό ως όξινη iPLA<sub>2</sub> (aiPLA<sub>2</sub>) ή υπεροξυρεδοξίνη-6 (Peroxiredoxin-6, PRDX6). Είναι ένα πολυλειτουργικό ένζυμο, λυσοσωμιακής προέλευσης, με διπλή δράση, iPLA<sub>2</sub> και PRDX6 (ανεξαρτήτως σεληνίου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-6). Έχει βέλτιστη τιμή pH=4, που το διαφοροποιεί από τις άλλες iPLA<sub>2</sub>. Το ενεργό κέντρο περιλαμβάνει μία Ser32 για την επίτευξη ενεργότητας iPLA<sub>2</sub> και μία Cys47 για την επίτευξη ενεργότητας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η ενεργότητα της aiPLA<sub>2</sub> ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση της Thr177 [93].

Η aiPLA<sub>2</sub> έχει τη μοναδική ιδιότητα να δρα σαν υπεροξειδάση της γλουταθειόνης όταν εντοπίζεται στο κυτοπλάσμα και ως PLA<sub>2</sub>, ανεξάρτητη της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup> όταν εντοπίζεται στο λυσόσωμα [94]. Πιο πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ο εντοπισμός του ενζύμου σε όξινα κυστίδια εξαρτάται από ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από δέκα αμινοξέα που βρίσκεται μεταξύ των θέσεων 31-40 της πρωτεΐνης. Υπάρχει μία ισορροπία της υπεροξυρεδοξίνης-6 που εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και τη λυσοσωμιακή μεμβράνη.

#### **1.4.4 PAF-AKETYLALDEHYDES**

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) (1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) είναι ένα γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) με τη διαφορά ότι στη θέση 1 έχει αιθερικό αντί εστερικό δεσμό και στη θέση *sn*-2 έχει ακετυλομάδα (βλέπε και σχήμα 9). Η ακριβής χημική του δομή βρέθηκε το 1979 [95].

Είναι ένα φωσφολιπίδιο-διαβιβαστής και παράγεται στα κύτταρα είτε μέσω της πορείας ανάπλασης (remodeling pathway) [96], είτε μέσω της *de novo* σύνθεσης [97]. Είναι ένας από τους πλέον ισχυρούς λιπιδικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. Από την ανακάλυψή του, στα μέσα της δεκαετίας του 1960, ως μεσολαβητής της αναφυλαξίας σε κουνέλια [98,99], έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων.

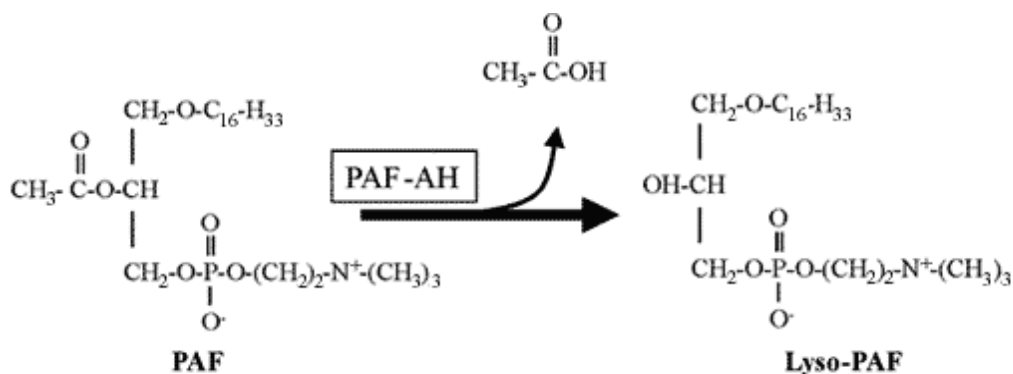
Συγκεντρώσεις του PAF έχουν βρεθεί τόσο ενδοκυττάρια, όσο και εξωκυττάρια και κάθε μία σχετίζεται με διαφορετική φυσιολογική λειτουργία [100]. Στην

$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\
 | \\
 \text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\
 \parallel \quad | \\
 \text{O} \quad \text{O}^- \\
 | \\
 \text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{CH}_3
 \end{array}$$

19



γνωστές PLA<sub>2</sub> των ομάδων VII και VIII, οι οποίες παρουσιάζουν ενεργότητα PAF-AH.



ΣΧΗΜΑ 10. Καταλυτική δράση της PAF-AH στον PAF [117].

Τρείς ακετυλδωρολάσες έχουν μελετηθεί λεπτομερώς, τόσο σε επίπεδο cDNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα VIIA PLA<sub>2</sub> ή PAF-AH του πλάσματος (pPAF-AH) ή όπως αναφέρεται πλέον τα τελευταία χρόνια στη βιβλιογραφία Lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>, την οποία υιοθετούμε και στην παρούσα εργασία) ή PLA<sub>2</sub>G7, η ενδοκυττάρια ισομορφή II (PAF-AH II) ή VIIB PLA<sub>2</sub> και η ετεροτριμερής μορφή του εγκεφάλου PAF-AH Ib (VIII PLA<sub>2</sub>, βλέπε και πίνακα 6).

Η Lp-PLA<sub>2</sub>, όπως και όλες οι ακετυλδωρολάσες της προηγούμενης παραγράφου, δρα μέσω μιας καταλυτικής σερίνης, ενώ δεν απαιτεί την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> για την επίτευξη της καταλυτικής της δραστηριότητας. Είναι μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, με σχετική μοριακή μάζα 45 kDa, αποτελούμενη από 441 αμινοξέα.

Η ακριβής της μορφή δεν είναι ακόμη γνωστή λεπτομερώς, ωστόσο σημαντικά στοιχεία έχουν προκύψει έπειτα από σύγκρισή της με άλλες πρωτεΐνες. Η πρωτογενής της αλληλουχία παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με ουδέτερες λιπάσες και εστεράσες, σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας των PLA<sub>2</sub> [118,119]. Παρουσιάζει ομοιότητες στην αλληλουχία με την *Streptomyces exfolatus* λιπάση [120]. Έχει διαμόρφωση α/β υδρολάσης και αποτελείται κατά κύριο λόγο από ένα τμήμα παράλληλου β-φύλλου, το οποίο περιέχει έλικες. Η καταλυτική τριάδα συνίσταται από Ser273, Asp296 και His351 [121]. Πιο συγκεκριμένα, η Ser273 εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο μιας α-έλικας. Τα άλλα δύο κατάλοιπα της

καταλυτικής τριάδας προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ενεργοποιηθεί η πυρηνόφιλη Ser273 για την κατάλυση.

Η Lp-PLA<sub>2</sub>, όπως έχει ήδη αναφερθεί, υδρολύει τον PAF [122]. Επίσης, υδρολύει οξειδωμένα προϊόντα της PC ή PE, που περιέχουν στην sn-2 θέση μέχρι και εννέα μεθυλομάδες, ασχέτως της φύσης ή του μήκους της αλυσίδας στην sn-1 θέση [123,124,125] (βλέπε και σχήμα 11).

Η PC που περιέχει αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση βρίσκεται σε αφθονία στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) και οξείδωση αυτής έχει ως συνέπεια την σημαντική αύξηση της παραγωγής οξειδωμένων προϊόντων με μικρού μήκους λιπαρές αλυσίδες στην sn-2 θέση. Κάποια από τα μόρια αυτά (γνωστά και ως PAF-like επειδή ομοιάζουν δομικά με τον PAF) επίσης αποικοδομούνται από την Lp-PLA<sub>2</sub>. Ακόμη, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως εστεροποιημένα φωσφολιπίδια που περιέχουν ισοπροσάνια στην sn-2 θέση υδρολύονται από την Lp-PLA<sub>2</sub>, τόσο in vitro, όσο και in vivo. Μάλιστα, στο πλάσμα η Lp-PLA<sub>2</sub> είναι η μοναδική PLA<sub>2</sub>, η οποία μπορεί να πετύχει την κατάλυση αυτής της αντίδρασης [126]. Επιπρόσθετα, η Lp-PLA<sub>2</sub> μπορεί να υδρολύσει και οξειδωμένα φωσφολιπίδια που περιέχουν αλυσίδες με περισσότερα από εννέα άτομα άνθρακα. Αυτό συμβαίνει διότι τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, τα οποία παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στην sn-2 θέση τους, περιέχουν αλδεϋδική, καρβοξυλική ή υδροξυλομάδα στο τελικό άκρο της ακυλομάδας τους [127]. Ακόμη, ορισμένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια υποβάλλονται σε θρυμματισμό στις υπεροξειδωμένες άκυλο αλυσίδες τους. Αυτά τα φωσφολιπίδια υδρολύονται αποτελεσματικότερα από την Lp-PLA<sub>2</sub>, σε σχέση με αυτά που δεν έχουν υποστεί θρυμματισμό στις υπεροξειδωμένες άκυλο αλυσίδες τους [128]. Η υδρολυτική δράση της Lp-PLA<sub>2</sub> στα οξειδωμένα φωσφολιπίδια έχει αποτέλεσμα τον σχηματισμό οξειδωμένων λιπαρών οξέων και λυσο-PC.

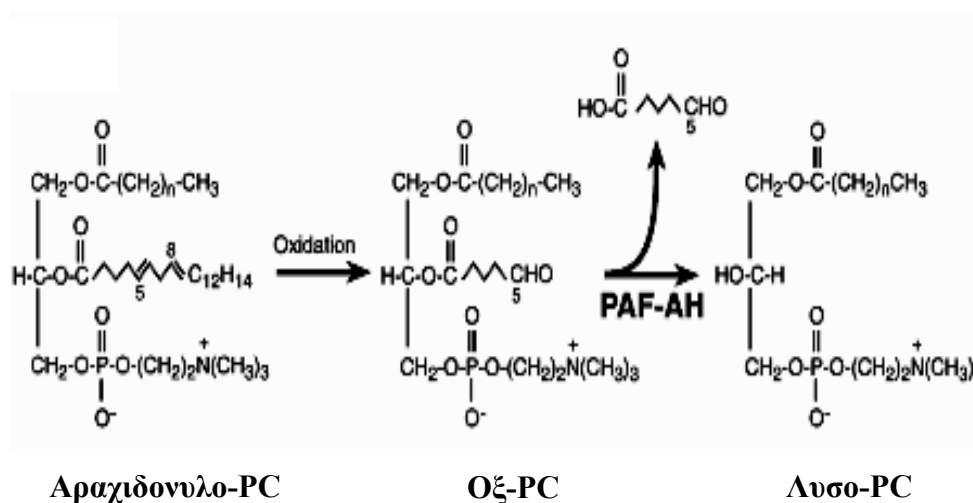
Η ανθρώπινη Lp-PLA<sub>2</sub> παράγεται και εκκρίνεται από αιμοποιητικά κύτταρα όπως μονοκύτταρα/μακροφάγα, σιτευτικά κύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια [129,130]. Ακόμη, καθώς τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα επάγουν την έκφραση του mRNA της Lp-PLA<sub>2</sub>, και εκκρίνονται έτσι σημαντικές ποσότητες αυτής [131].

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Ομάδες VII και VIII φωσφολιπάσης  $A_2$  που εμφανίζουν ενεργότητα ακετυλνδρολάσης (PAF-AH) [16].

| Ομάδα | Πηγή                                         | Μοριακ<br>ή Μάζα<br>(kDa) | Χαρακτηριστικά                                                                                                                          | Εναλλακτική<br>Ονομασία                    |
|-------|----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| VIIA  | Άνθρωπος,<br>ποντικός,<br>χοίρος,<br>βοοειδή | 45                        | Εκκρινόμενη,<br>$\alpha/\beta$ υδρολάση                                                                                                 | Lp-PLA <sub>2</sub><br>PAF-AH<br>πλάσματος |
| VIIIB | Άνθρωπος,<br>βοοειδή                         | 40                        | Ενδοκυττάρια,<br>$\alpha/\beta$ υδρολάση                                                                                                | PAF-AH II                                  |
| VIIIA | Άνθρωπος                                     | 26                        | Ενδοκυττάρια,<br>τριάδα Ser/His/Asp,<br>ομοδιμερές ή<br>ετεροδιμερές με την<br>VIIIB συνδεόμενη<br>ρυθμιστικά με $\beta$ -<br>υπομονάδα | PAF-AH Ib<br>( $\alpha 1$ υπομονάδα)       |
| VIIIB | Άνθρωπος                                     | 26                        | Ενδοκυττάρια,<br>τριάδα Ser/His/Asp,<br>ομοδιμερές ή<br>ετεροδιμερές με την<br>VIIIA συνδεόμενη<br>ρυθμιστικά με $\beta$ -<br>υπομονάδα | PAF-AH Ib<br>( $\alpha 2$ υπομονάδα)       |

Η έκκριση της Lp-PLA<sub>2</sub> ρυθμίζεται από διάφορα εξωγενή ερεθίσματα όπως υποστρώματα σαν τον PAF καθώς επίσης και από μία ποικιλία κυτοκινών και στεροειδών ορμονών. Η ικανότητα προ- και αντί-φλεγμονωδών ουσιών να μεταβάλλουν της έκφραση της Lp-PLA<sub>2</sub> φαίνεται πως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κυτταρική διαμόρφωση [132,133]. Επί παραδείγματι, προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένου του λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide,

LPS), της ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6, IL-6) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor, TNF-α) μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την σύνθεση και έκκριση της Lp-PLA<sub>2</sub> από διάφορα κύτταρα [134].



ΣΧΗΜΑ 11. Οξείδωση της αραχιδονυλο-PC σε οξειδωμένη PC και εν συνεχεία αποικοδόμηση αυτής σε λυσο-PC έπειτα από την καταλυτική δράση της Lp-PLA<sub>2</sub> [135].

Η PAF-AH του πλάσματος κυκλοφορεί σε ενεργό μορφή συνδεδεμένη με λιποπρωτεΐνες [136], για το λόγο αυτό άλλωστε τα τελευταία χρόνια στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει να αναφέρεται ως Lp-PLA<sub>2</sub> [137]. Πιο συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο πλάσμα η Lp-PLA<sub>2</sub> κυκλοφορεί συνδεδεμένη με τις χαμηλής και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Low και High Density Lipoprotein, LDL και HDL αντίστοιχα). 70 με 80% της συνολικής δραστηριότητας του ενζύμου βρίσκεται με τη μορφή συμπλέγματος με τις LDL, ενώ 20 με 30% απαντά συνδεδεμένο με τις HDL [138,139]. Η κατανομή αυτή επιβεβαιώθηκε πειραματικά με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης και υπερφυγοκέντρωσης [140]. Σήμερα έχει καθιερωθεί πως συγκεκριμένες υποομάδες της LDL και HDL είναι οι κύριοι μεταφορείς της Lp-PLA<sub>2</sub> σε νορμολιπιδαιμικά άτομα (άτομα με φυσιολογικό λιπιδαιμικό προφίλ) [141]. Ωστόσο είναι σημαντικό να επισημάνουμε πως τα περισσότερα σωματίδια LDL δεν περιέχουν Lp-PLA<sub>2</sub> [142]. Μάλιστα η μοριακή αναλογία μεταξύ Lp-PLA<sub>2</sub> και απολιποπρωτεΐνης-B100 (apo-B100, η κύρια πρωτεΐνη της LDL) κυμαίνεται μεταξύ 1:100 και 1:10,000). Ακόμη και τα πιο πλούσια κλάσματα της LDL περιέχουν μόλις 1% Lp-PLA<sub>2</sub> [143]. Έχει δειχθεί επίσης ότι η

Lp-PLA<sub>2</sub> μπορεί να μετατοπίζεται μεταξύ των λιποπρωτεϊνών, η δε κατανομή της μέσα σε αυτές ενδεχομένως να σχετίζεται με παθοφυσιολογικές δράσεις του ενζύμου στους ανθρώπους [144,145]. Τέλος, έχει αναφερθεί πως η Lp-PLA<sub>2</sub>, εκτός από τις LDL και HDL, στο πλάσμα μπορεί να συνδέεται και άλλες λιποπρωτεΐνες όπως τις ενδιάμεσης και πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Intermediate και Very Low Density Lipoprotein, IDL και VLDL αντίστοιχα) καθώς επίσης και με τη λιποπρωτεΐνη-α (Lipoprotein-a, Lp(a)).



ΣΧΗΜΑ 12. Υποθετικό τριδιάστατο μοντέλο της Lp-PLA<sub>2</sub> και της PAF-AH(II) βασισμένο στην γεωμετρία της λιπάσης *S. exfoliatus* [116].

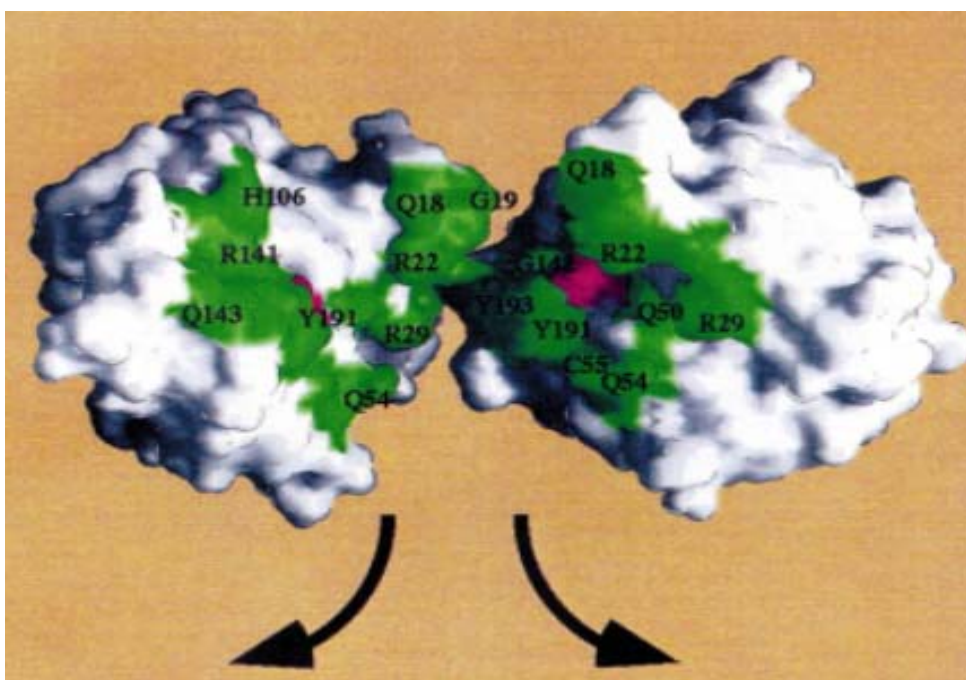
Ο κύριος βιολογικός ρόλος της Lp-PLA<sub>2</sub> φαίνεται να είναι η αδρανοποίηση του PAF και των πολικών φωσφολιπιδίων. Η υδρολυτική δράση της Lp-PLA<sub>2</sub> έναντι οξειδωμένων φωσφολιπιδίων έχει συγκεντρώσει τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον διότι μπορεί εν δυνάμει να έχει ευεργετική δράση αναστέλλοντας την πρόοδο της αθηρογένεσης [146,147]. Ωστόσο η άποψη αυτή έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες, στις οποίες έχει προταθεί πως το ένζυμο είναι μάλλον ένας θετικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίων παθήσεων και πως ο

προσδιορισμός των επιπέδων του στο πλάσμα ενδεχομένως να συμβάλλει στην πρόβλεψη του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων [148,149].

Η ομάδα VIIIB PLA<sub>2</sub> απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε αρχικά από ήπαρ βοός [150] και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως PAF-AH (II). Είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο που παρουσιάζει 43% ομοιότητα στην αλληλουχία με την ομάδα VIIA PLA<sub>2</sub>, συμπεριλαμβανομένης της συγκαταβατικής αλληλουχίας λιπάσης Gly-X-Ser-X-Gly. Είναι ένα μονομερές με σχετική μοριακή μάζα 45 kDa, αποτελούμενο από 392 αμινοξέα [151]. Υδρολύει την ακυλοομάδα στην *sn*-2 θέση φωσφολιπιδίων που περιέχουν δύο ή και περισσότερα άτομα άνθρακα. Πάντως δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη εάν υδρολύει μόνο μονομερή.

Η PAF-AH (II) εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς. Είναι μέλος της οικογένειας των α/β υδρολασών. Έχει βρεθεί πως η PAF-AH (II) παρουσία οξειδωτικών μετατοπίζεται από το κυτοσόλιο στις μεμβράνες, ενώ παρουσία αντιοξειδωτικών μετατοπίζεται από τις μεμβράνες προς το κυτοσόλιο. Επίσης, σε πειράματα που έχουν γίνει σε κύτταρα από κινέζικο hamster, τα οποία χαρακτηρίζονταν από υπερέκκριση του ενζύμου και υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό stress παρατηρήθηκε μία προστασία των κυττάρων αυτών έναντι της απόπτωσης. Για το λόγο αυτό πιστεύεται πως η PAF-AH (II) ενδεχομένως να έχει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού stress [152]. Στο σχήμα 12 απεικονίζεται ένα υποθετικό τριδιάστατο μοντέλο της Lp-PLA<sub>2</sub> και της PAF-AH (II) το οποίο βασίζεται στη γεωμετρία της λιπάσης *S. exfoliatus*. Στο άνω μέρος του σχήματος απεικονίζεται η περιοχή που εισέρχεται στο υπόστρωμα.

Η ομάδα VIII PLA<sub>2</sub>, επίσης γνωστή ως PAF-AH (Ib) αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και μία ρυθμιστική υπομονάδα. Οι καταλυτικές υπομονάδες VIIIA και VIIIB, επίσης γνωστές ως α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> αντίστοιχα, μπορούν να σχηματίζουν ενεργά ομο- και ετεροδιμερή και έχουν σχετική μοριακή μάζα 26 kDa η κάθε μία. Το ένζυμο της PAF-AcH(Ib) του βοδιού μπορεί εύκολα να διαχωριστεί στο καταλυτικό α<sub>1</sub>/α<sub>2</sub> ετεροδιμερές και στην β-υπομονάδα. Όλη η καταλυτική ενεργότητα βρίσκεται στο ετεροδιμερές και μάλιστα, όπως έχουν δείξει πειράματα με ραδιενεργούς αναστολείς, η α<sub>1</sub> υπομονάδα είναι πιο ενεργή από την α<sub>2</sub>-υπομονάδα [153]. Από την άλλη, όταν οι α-υπομονάδες εκφράζονται διαφορετικά στο *Escherichia coli*, η πρωτεΐνη σχηματίζει πάντα σταθερά ομοδιμερή, καθένα από τα οποία έχουν ίδια καταλυτική ενεργότητα [154].



ΣΧΗΜΑ 13. Σχηματική απεικόνιση της δομής της  $\alpha 1$  υπομονάδας της PAF-AH Ib [116].

Η  $\alpha 1$ -υπομονάδα είναι το μόνο λιπολυτικό ένζυμο που έχει τεταρτοταγή διαμόρφωση, η οποία να θυμίζει μικρές GTPases. Περιέχει μία κλασσική καταλυτική τριάδα αποτελούμενη από τα αμινοξέα Ser-47, His-195 και Asp-192. Η επιφάνεια του μονομερούς περιέχει έναν αριθμό πολικών και φορτισμένων αμινοξέων, τα οποία προσδίδουν μεγάλη σταθερότητα στο διμερές. Οι δύο ενεργές περιοχές εντοπίζονται πολύ κοντά μεταξύ των δύο μονομερών, έτσι ώστε μόνο η μία ενεργή περιοχή να μπαίνει στο υπόστρωμα σε κάποια συγκεκριμένη στιγμή. Ο διμερισμός είναι πιθανότατα απαραίτητος για την έκφραση της καταλυτικής ενεργότητας, πιθανότατα λόγω του γεγονότος ότι έτσι σταθεροποιείται η θηλιά που περιέχει την καταλυτική ασπαρτική ομάδα. Στο σχήμα 13 απεικονίζεται μία τριδιάστατη απεικόνιση της  $\alpha 1$  υπομονάδας της PAF-AH Ib.

Η εξειδίκευση της οικογένειας VIII PLA<sub>2</sub> ως προς την υδρόλυση υποστρωμάτων φαίνεται πως εξαρτάται από τη σύνθεση των καταλυτικών διμερών. Πιο συγκεκριμένα, το ομοδιμερές  $\alpha 2/\alpha 2$  δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση στην υδρόλυση του PAF καθώς και του υποστρώματος 1-O-αλκυλ-2-ακετυλ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοιθανολαμίνη, ενώ το ομοδιμερές  $\alpha 1/\alpha 1$  και το ετεροδιμερές  $\alpha 1/\alpha 2$  παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην υδρόλυση του 1-O-αλκυλ-2-ακετυλ-*sn*-

γλυκερο-3-φωσφατιδικού οξέος. Επίσης, η επίδραση της β-υπομονάδας στην ενζυματική δράση του ενζύμου εξαρτάται από τη σύνθεση των καταλυτικών διμερών. Η ενζυματική δράση του ομοδιμερούς α2/α2 αυξάνεται από την β-υπομονάδα, του ετεροδιμερούς α1/α2 μειώνεται, ενώ η β-υπομονάδα επηρεάζει ελάχιστα το ομοδιμερές α1/α1[155].

Ο εγκέφαλος περιέχει υψηλά επίπεδα ενεργότητας PAF-AH, η οποία αποδίδεται κυρίως, όχι όμως αποκλειστικά, στην οικογένεια VIII PLA<sub>2</sub>. Υπάρχουν ενδείξεις πως η ομάδα αυτή ενδεχομένως να παίζει ένα ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Πιστεύεται πως η ανάπτυξη του εγκεφάλου ίσως επηρεάζεται από τα ομο- και ετεροδιμερή και από τη β-υπομονάδα [156,157].

#### ***1.4.5 ΛΥΣΟΣΩΜΙΚΗ-ΟΜΑΔΑ XV ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A<sub>2</sub>***

Σε αντίθεση με τις κυτοσολικές και εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>s, μικρός αριθμός αναφορών έχουν δημοσιευθεί που να αφορούν λυσοσωμιακά ένζυμα με δράση PLA<sub>2</sub>. Το 1997 απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε η aiPLA<sub>2</sub>, η οποία εντοπίζεται στο λυσόσωμα, και η οποία έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο που περιγράφονται οι ανεξάρτητες της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup> PLA<sub>2</sub>.

Το 1996 ένα νέο ένζυμο αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία, το οποίο και ονομάστηκε συνθάση του 1-O-ακυλ-κεραμιδίου (1-O-acyl-ceramide synthase, ACS). Η καταλυτική του δράση αναφέρεται στην τρανσακυλίωση της N-ακετυλο σφιγγοσίνης στην υδροξυλομάδα της 1-θέσης. Το προϊόν της αντίδρασης είναι η 1-O-ακυλ-N-ακετυλοσφιγγοσίνη (1-O-acyl-N-acetylsphingosine). Από πειράματα με ραδιοσημασμένες ομάδες και κατά το στάδιο καθαρισμού του ενζύμου από το λυσόσωμα των MDCK κυττάρων προέκυψαν πληροφορίες για επιπλέον δράση αυτού. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε πως το ένζυμο σε όξινες συνθήκες εμφανίζει ταυτόχρονη δράση τρανσακυλάσης και φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> [158]. Η ακυλομάδα δηλαδή στη θέση sn-2 του φωσφολιπιδίου μπορεί να μεταφερθεί στην υδροξυλομάδα της C1 θέσης (δράση τρανσακυλάσης) καθώς επίσης και στην υδροξυλομάδα ενός μορίου νερού (δράση PLA<sub>2</sub>, βλέπε και σχήμα 14). Η δράση του ενζύμου δεν απαιτεί την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup>, ενώ παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα και για τις δύο δράσεις του σε pH=4.5. Το ένζυμο αυτό εν συνεχεία κλωνοποιήθηκε και βρέθηκε η ακριβής αλληλουχία του [159,160]. Σήμερα είναι γνωστό πως εμφανίζει κατά κύριο



λόγο δράση PLA<sub>2</sub>, ουσιαστικά δε η ACS είναι μία λυσοσωμική PLA<sub>2</sub>, ανεξάρτητη της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup>, ενώ η δράση της ως τρανσακυλάση αποδίδεται στο μηχανισμό αντίδρασης της PLA<sub>2</sub>. Το ένζυμο αυτό αναφέρεται πλέον ως λυσισωμιακή PLA<sub>2</sub> (LPPLA<sub>2</sub>) και κατατάσσεται στην ομάδα XV PLA<sub>2</sub>.

Η LPPLA<sub>2</sub> έχει σχετική μοριακή μάζα 45 kDa. Ανήκει στην υπεροικογένεια των α/β υδρολασών [161] και περιέχει στο ενεργό της κέντρο την καταλυτική τριάδα Ser/His/Asp.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Λυσισωμική XV ομάδα PLA<sub>2</sub>

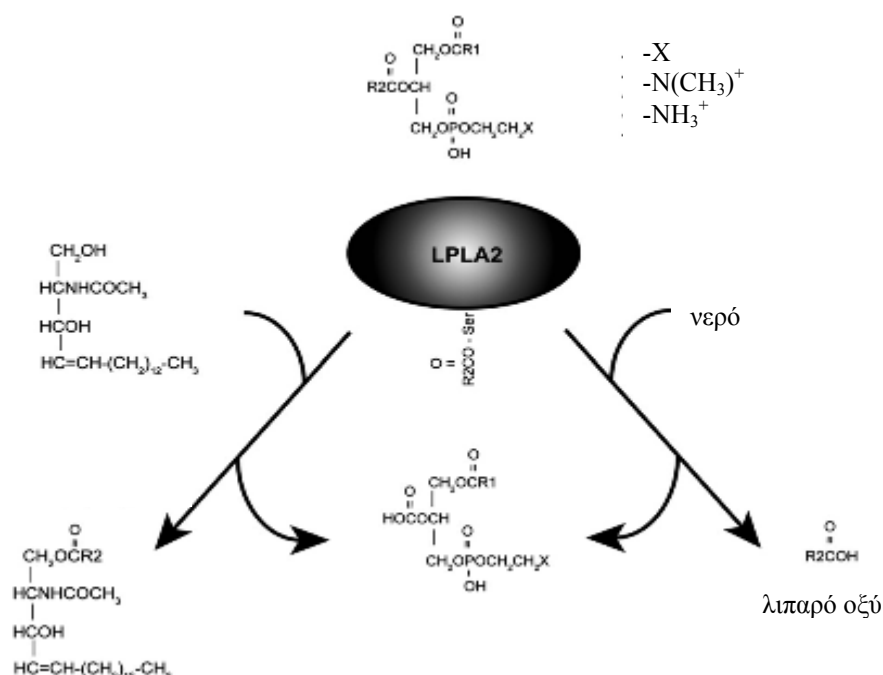
| Ομάδα | Πηγή                            | Σχετική<br>Μοριακή μάζα<br>(kDa) | Χαρακτηριστικά                           | Εναλλακτικά<br>ονόματα                                          |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| XV    | Άνθρωπος<br>ποντικός<br>βοοειδή | 45                               | Τριάδα<br>Ser/His/Asp,<br>γλυκοζυλιωμένη | ACS,<br>λυσισωμιακή<br>PLA <sub>2</sub> ,<br>LPPLA <sub>2</sub> |

Το ένζυμο εμφανίζει υψηλή ομολογία με την πρωτεΐνη της ακυλοτρανσφεράσης λεκιθίνης-χοληστερόλης-λυσοφωσφολιπάσης (lecithin-cholesterol acyltransferase-like lysophospholipase, LLPL) [162]. Ωστόσο, τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες, κυριότερες από τις οποίες είναι η σχετική μοριακή μάζα, το βέλτιστο pH δράσης, η θέση τους στο κύτταρο και η εξειδίκευση υποστρώματος. Επίσης η LPPLA<sub>2</sub> έχει κατά 49% ίδια αλληλουχία αμινοξέων με την ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης-χοληστερόλης, (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT). Η LCAT και η LPPLA<sub>2</sub> κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο [163].

Σύμφωνα με έναν προτεινόμενο μηχανισμό για την εξήγηση της κατάλυσης, το ένζυμο διασπά τον ακυλ-εστερικό δεσμό των γλυκεροφωσfolιπιδίων, σχηματίζοντας το ενδιάμεσο της ακυλ-LPPLA<sub>2</sub>, με τη βοήθεια ενός καταλυτικού καταλοίπου σερίνης. Προσβολή του ενδιαμέσου αυτού από ένα μόριο νερού έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό η LPPLA<sub>2</sub> πιθανώς να δρα όπως μία χαρακτηριστική σερινοπρωτεάση σαν τη θρυψίνη

ή την ελαστάση [164]. Όπως είναι γνωστό για τα ένζυμα αυτά, κατά τη διάρκεια της κατάλυσης λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη προσβολή του υδροξυλικού οξυγόνου της καταλυτικής σερίνης στον καρβονυλικό δεσμό που πρόκειται να διασπαστεί.

Η LPPLA<sub>2</sub> αναγνωρίζει υποστρώματα δικορεσμένης PC. Επίσης δείχνει προτίμηση στην υδρόλυση ακυλομάδων τόσο στην 1, όσο και στην 2 θέση της PC και της PE. Ακόμη αναγνωρίζει και τα υποστρώματα της PG και της PS. Για την υδρόλυση των υποστρωμάτων συχνά απαιτούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ανιονικά λιπίδια στο λυσίσωμα.



ΣΧΗΜΑ 14. Λυσισωμική PLA<sub>2</sub> ομάδας XV: Σχηματική απεικόνιση της διττής καταλυτικής δράσης τρανσακυλάσης και φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>. Το ένζυμο αναγνωρίζει τα υποστρώματα της PC και PE. Επίσης στο σχήμα απεικονίζεται και το ενδιάμεσο της ακυλο-PLA<sub>2</sub> [165].

Η LPPLA<sub>2</sub> έχει ανιχνευθεί σε μία ποικιλία τύπων κυττάρων και ιστών συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της καρδιάς, των νεφρών, της σπλήνας και του πνεύμονα. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι ανιχνεύθηκε ενεργότητα του ενζύμου σε κυψελιδικά μακροφάγα ποντικού, τα οποία απομονώθηκαν από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, η οποία ήταν πενήντα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του συνολικού πνεύμονα. Επίσης, η ενεργότητα της

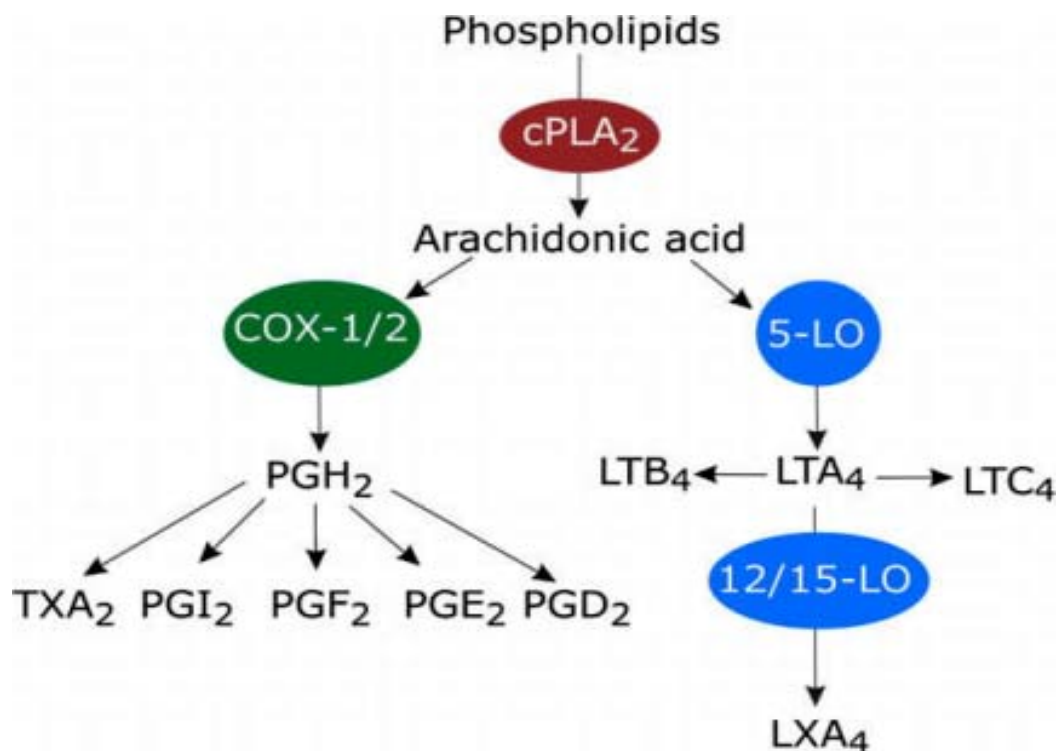
LPPLA<sub>2</sub> στα κυψελιδικά αυτά μακροφάγα ήταν πενήντα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την ενεργότητα που ανιχνεύθηκε στα περιτοναϊκά μακροφάγα ή στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η LPPLA<sub>2</sub> ίσως παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων από τα κυψελιδικά μακροφάγα [166,167].

## 1.5 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub> ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΙΚΟΣΑΝΟΕΙΔΩΝ

Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος αποτελεί εκτεταμένο αντικείμενο μελέτης για της επιστήμες της βιοχημείας, της φαρμακολογίας και της φυσιολογίας για περισσότερα από τριάντα χρόνια. Οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος έχουν έναν μεγάλο και ποικίλο αριθμό φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών ρόλων, ωστόσο οι ακριβείς λεπτομέρειες που αφορούν τον σχηματισμό του αραχιδονικού οξέος βρίσκονται υπό συνεχή έρευνα [168].

Όπως κατά κανόνα ισχύει για όλα τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος είναι χαμηλά μέσα στα κύτταρα. Το αραχιδονικό οξύ βρίσκεται στην *sn*-2 θέση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων και μπορεί να απελευθερωθεί με την καταλυτική δράση διαφορετικών λιπασών [169]. Θεωρητικά το αραχιδονικό οξύ μπορεί να απελευθερωθεί μέσω ενός αριθμού διαφορετικών μονοπατιών. Αυτά περιλαμβάνουν την καταλυτική δράση της PLC, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό διακυλογλυκερόλης (DAG), η οποία στη συνέχεια διασπάται από την λιπάση της διακυλογλυκερόλης απελευθερώνοντας αραχιδονικό οξύ [170,171,172]. Επίσης, η δράση της PLD έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA), το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μεταβολιστεί, με τη δράση της φωσφουδρολάσης του φωσφατιδικού οξέος, σε διακυλογλυκερόλη [173].

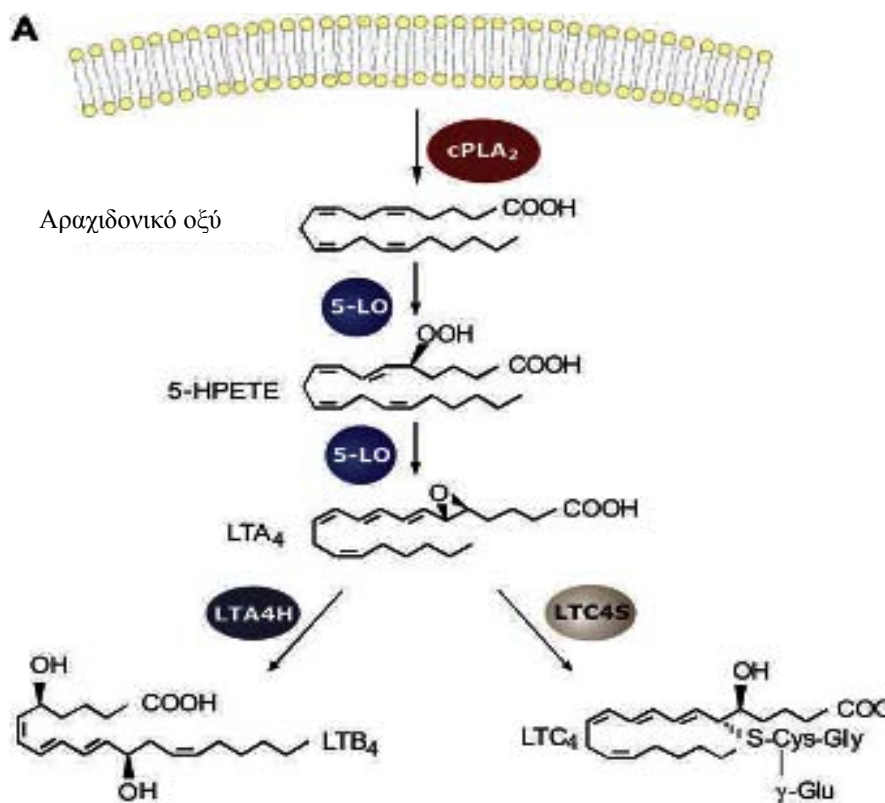
Πάντως, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται κυρίως από μεμβρανικά φωσφολιπίδια έπειτα από τη δράση της PLA<sub>2</sub> σε απόκριση διαφόρων κυτταρικών ερεθισμάτων και μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε μία ποικιλία βίο-ενεργών μορίων, τα οποία είναι γνωστά με την ονομασία εικοσανοειδή (επειδή περιέχουν είκοσι άτομα άνθρακα στο μόριό τους) [174].



ΣΧΗΜΑ 15. Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, έπειτα από την καταλυτική δράση της *cPLA<sub>2</sub>*, μέσω των μεταβολικών πορειών κυκλοξυγονάσης και λιποξυγονάσης (*COX* και *LOX*), αντίστοιχα [175].

Το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ δύναται να μεταβολιστεί μέσω της πορείας της κυκλοξυγονάσης (*COX*), που περιλαμβάνει τις *COX-1* και *COX-2*, καθώς επίσης και συνθάσες τερματισμού προκειμένου να συνθέσει τις προσταγλανδίνες (*PG*) και τα θρομβοξάνια (*TX*). Οι προσταγλανδίνες και τα θρομβοξάνια δρουν μέσω υποδοχέων *G*-πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, το αραχιδονικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί μέσω του μονοπατιού της λιποξυγονάσης (*LOX*) με τη δράση των ενζύμων της 5-λιποξυγονάσης (*5-LO*), 12/15-λιποξυγονάσης, της υδρολάσης των λευκοτριενίων (*LT*) και της συνθάσης των λευκοτριενίων (*LTC<sub>4</sub>S*), προκειμένου να σχηματίσει τις διάφορες κλάσεις των λευκοτριενίων και των λιποξινών [176,177,178] (βλέπε και σχήμα 15 για το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος).

Επειδή τα εικοσανοειδή είναι μεσολαβητές της οξείας φλεγμονής, του πυρετού και ασθενειών όπως θρόμβωση, καρκίνος, αθηροσκλήρωση, άσθμα ή ρινίτιδα, διάφορα φάρμακα έχουν αναπτυχθεί που διαταράσσουν την βιοσύνθεσή τους. Τα πιο διαδεδομένα από αυτά είναι τα *Thromblyl*, *Cycotec*, *Celebrex* και *Xalatan*.



ΣΧΗΜΑ 16. Η πορεία μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μέσω λιποξυγονάσης [175].

Σύμφωνα με την πορεία της λιποξυγονάσης, το ένζυμο της 5-LO καταλύει την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος σχηματίζοντας το ενδιάμεσο του 5-υδροπεροξυ αραχιδονικού οξέος (arachidonic acid 5-hydroperoxide, 5-HPETE) και εν συνεχεία τα λευκοτριένια A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Η υδρολάση των A<sub>4</sub> λευκοτριενίων (LTA<sub>4</sub>H) καταλύει την μετατροπή των λευκοτριενίων A<sub>4</sub> σε λευκοτριένια B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), δρώντας ως αμινοπεπτιδάση [179]. Επίσης, η συνθάση των λευκοτριενίων (LTC<sub>4</sub>S) καταλύει την μετατροπή των λευκοτριενίων A<sub>4</sub> σε λευκοτριένια C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) (βλέπε και σχήμα 16). Η cPLA<sub>2</sub>, η 5-LO καθώς επίσης και η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη της 5-λιποξυγονάσης (5-lipoxygenase activating protein, FLAP) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το οποίο εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη [180].

Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό πως κυρίως η κυτοσολική ομάδα IV PLA<sub>2</sub> παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή των προσταγλανδινών και των λευκοτριενίων, δείχνοντας ιδιαίτερη προτίμηση στην υδρόλυση φωσφολιπιδίων που περιέχουν αραχιδονικό οξύ στην *sn*-2 θέση [181,182,183].

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις πως εκτός από τις κυτοσολικές PLA<sub>2</sub> και οι εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub> παίζουν έναν ουσιώδη ρόλο στην παραγωγή των εικοσανοειδών. Απαιτείται ακόμη όμως σημαντική δουλειά, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο οι sPLA<sub>2</sub>s δύνανται να επηρεάσουν τον σχηματισμό εικοσανοειδών [184].

Υπάρχει πάντως σημαντικός όγκος δεδομένων που υποδεικνύει ότι η ανθρώπινη sPLA<sub>2</sub> IIA ομάδα συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στο αρθρικό υγρό ασθενών που πάσχουν από αρθρίτιδα και ειδικότερα ρευματοειδή αρθρίτιδα [185,186], καθώς επίσης και στον ορό σηπτικών ασθενών [187]. Το ίδιο παρατηρείται και σε πειραματόζωα στα οποία έχει χορηγηθεί λιποπολυσακχαρίτης (LPS).

Τα στοιχεία που έχουν ανακοινωθεί μέχρι σήμερα για τη συμμετοχή της sPLA<sub>2</sub> στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος είναι αρκετά περιορισμένα. Η προσθήκη ανασυνδυασμένης sPLA<sub>2</sub> IIA από άνθρωπο σε κύτταρα θηλαστικών *in vitro*, όπως αυτά που απομονώνονται από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, οδηγεί στην παραγωγή εικοσανοειδών [188]. Οι Murakami και συνεργάτες έδειξαν πως η υπερέκφραση της sPLA<sub>2</sub> IIA ομάδας σε HEK293 κύτταρα ποντικού έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και τον σχηματισμό προσταγλανδινών E<sub>2</sub>. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από τους Mounier και συνεργάτες, ωστόσο η ικανότητα του αναστολέα LY311727 (ειδικός αναστολέας της sPLA<sub>2</sub> IIA, για τον οποίο γίνεται λεπτομερής αναφορά σε επόμενη παράγραφο) να αναστείλει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος δεν επιβεβαιώθηκε [189].

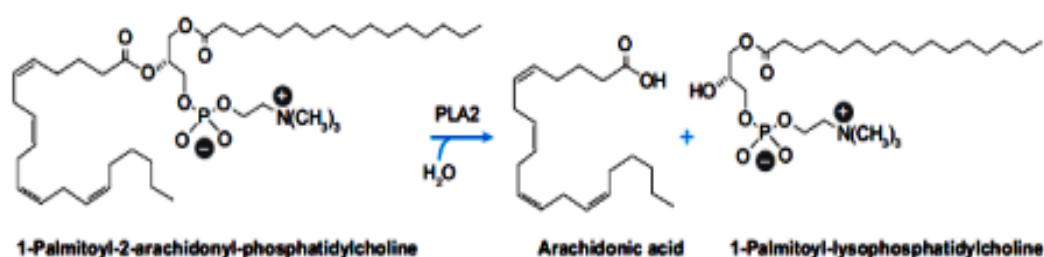
Στην ίδια εργασία οι Mounier και συνεργάτες έδειξαν ότι η sPLA<sub>2</sub> IIA ομάδα από άνθρωπο επάγει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος στα HEK293 κύτταρα με τρόπο όμως, ο οποίος σχετίζεται και με την κυτοσολική IVA ομάδα PLA<sub>2</sub>. Οι Cho και συνεργάτες έδειξαν ότι εξωγενής προσθήκη ανθρώπινης sPLA<sub>2</sub> V ομάδας σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα οδηγεί στη σύνθεση εικοσανοειδών, η οποία εξαρτάται και από την cPLA<sub>2</sub> IVA ομάδα [190]. Πάντως προσθήκη της ίδιας ομάδας εκκρινόμενης PLA<sub>2</sub> σε ηωσινόφιλα επάγει μεν τη σύνθεση λευκοτριενίων, με τρόπο όμως που είναι ανεξάρτητος της κυτοσολικής IVA ομάδας PLA<sub>2</sub> [191]. Ακόμη, στα RGM1 κύτταρα αρουραίου (κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου) η sPLA<sub>2</sub> IIA ομάδα συνεργάζεται με την cPLA<sub>2</sub> IVA προκειμένου να απελευθερωθεί αραχιδονικό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται στη συνέχεια σε προσταγλανδίνες E<sub>2</sub> [192,193].

Η αλληλοσυσχέτιση μεταξύ cPLA<sub>2</sub> και sPLA<sub>2</sub> δεν έχει επίσης διευκρινιστεί. Έχει προταθεί ότι η cPLA<sub>2</sub> παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο, καθώς η ενεργοποίηση της ακολουθείται από ενεργοποίηση της sPLA<sub>2</sub>, γεγονός που αυξάνει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων και την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος [194]. Ο μηχανισμός αυτός έχει προταθεί για διάφορους τύπους κυττάρων [195,196], όμως άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι sPLA<sub>2</sub> ενεργοποιούνται ανεξάρτητα και στη συνέχεια ενεργοποιούνται οι ενδοκυττάριας cPLA<sub>2</sub> [197]. Ο τελευταίος μηχανισμός είναι συμβατός με έρευνες οι οποίες κάνουν χρήση οστεοβλαστών ποντικού και ανθρώπινων ουδετερόφιλων κυττάρων [198].

Όλες οι παραπάνω μελέτες αναφέρονται σε εξωγενή προσθήκη ή σε βίαιη υπερέκφραση της sPLA<sub>2</sub>. Λίγες εργασίες υποστηρίζουν πως η ενδογενής sPLA<sub>2</sub> IIa (η οποία είναι και εκείνη η ομάδα εκκρινόμενης PLA<sub>2</sub>, η οποία έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό) δύναται να αυξήσει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος. Σε αυτή την κατεύθυνση, οι Kudo και συνεργάτες προτείνουν ότι στα 3Y1 ινοβλαστικά κύτταρα ποντικού λαμβάνει χώρα συνεργασία μεταξύ της sPLA<sub>2</sub> IIa και της ενδοκυττάριας, ανεξάρτητης της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup>, VIB ομάδας για την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος [199]. Σε P388D1 κύτταρα ποντικού η ενδογενής μείωση της sPLA<sub>2</sub> V ομάδας έχει ως αποτέλεσμα και τη μείωση της σύνθεσης των εικοσανοειδών [200]. Διαταραχή του γονιδίου που κωδικοποιεί αυτή την ομάδα PLA<sub>2</sub> οδηγεί σε περίπου 50% μείωση της σύνθεσης των εικοσανοειδών σε μακροφάγα ποντικού [201]. Μελέτες με χρήση ποντικών έδειξαν πως η εκκρινόμενη ομάδα X PLA<sub>2</sub> εκφράζεται τόσο στο επιθήλιο, όσο και στα κυψελιδικά μακροφάγα. Μείωση της έκκρισης αυτής έχει ως συνέπεια και μία σημαντική μείωση σε μία σειρά φλεγμονωδών παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης εικοσανοειδών [202]. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με την cPLA<sub>2</sub> IVa ομάδα, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία τόσο των κυτοσολικών, όσο και των εκκρινόμενων PLA<sub>2</sub> στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

Σε συστήματα όπου μία ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων μίας κυτοσολικής και μίας εκκρινόμενης PLA<sub>2</sub> οδηγεί σε μείωση της απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος και παραγωγής εικοσανοειδών, είναι ιδιαίτερα δύσκολο να προσδιοριστεί το κλάσμα του οξέος που απελευθερώθηκε χάρη στη δράση της μίας ή της άλλης PLA<sub>2</sub>. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δύο τύποι PLA<sub>2</sub> έχουν την ενζυμική ικανότητα να υδρολύουν μεμβρανικά φωσφολιπίδια καθώς επίσης και στο γεγονός ότι το

αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται δεν παραμένει στη μεμβράνη στην οποία παράχθηκε [203].



ΣΧΗΜΑ 17. Η καταλυτική δράση της PLA<sub>2</sub> στο υπόστρωμα της 1-παλμιτοϋλο-2-αραχιδονυλο-φωσφατιδυλοχολίνης έχει ως συνέπεια το σχηματισμό 1-παλμιτοϋλο-λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος, το οποίο είναι πρόδρομος ένωση των εικοσανοειδών [184].

## 1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ PLA<sub>2</sub>

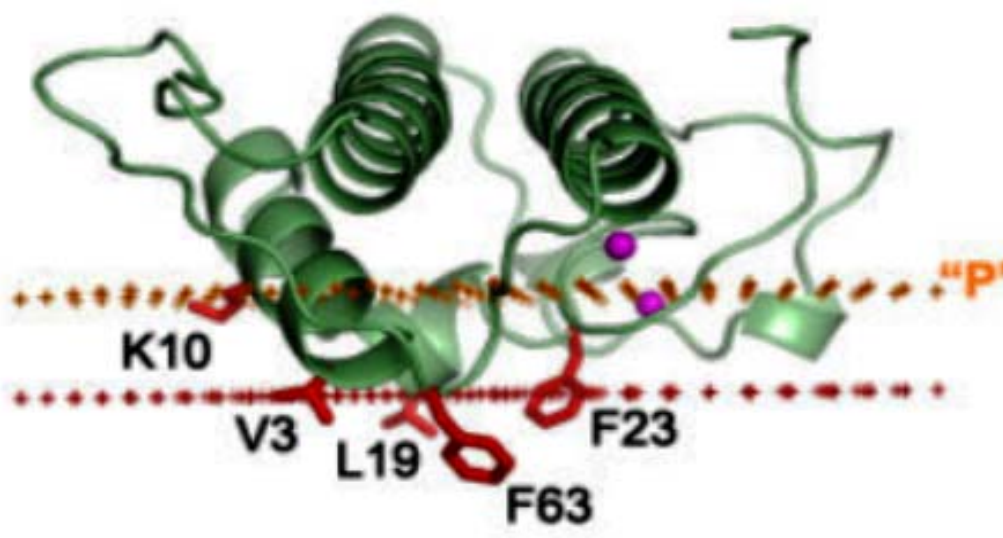
Μία ποικιλία διαφορετικών βιολογικών λειτουργιών έχουν αποδοθεί στις sPLA<sub>2</sub>, ωστόσο ισχυρές αποδείξεις για την in vivo δράση τους δεν υπάρχουν σε πολλές περιπτώσεις. Οι περισσότερες από τις λειτουργίες αυτές αποδίδονται στις πρώτες εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub> που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν και πιο συγκεκριμένα στις ομάδες IB και IIA. Οι λειτουργίες αυτές συσχετίζονται με διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, καθώς επίσης και με μία πληθώρα φλεγμονωδών ασθενειών όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, κολίτιδα, νόσος του Crohn, παγκρεατίτιδα, ψωρίαση και άλλες. Εξαιτίας της συνεχούς ανακάλυψης νέων ομάδων sPLA<sub>2</sub>, η αφθονία συγκεκριμένων βιολογικών τους ρόλων πρέπει να αξιολογηθεί.

In vitro στις ομάδες IB και IIA sPLA<sub>2</sub> αποδίδεται ένας ουσιώδης ρόλος στον πολλαπλασιασμό [204,205], στην απόπτωση [206,207] και στην απομάκρυνση κατεστραμμένων κυττάρων [208], καρκινικών και μη [209,210] Σύμφωνα με τους Dong και συνεργάτες η sPLA<sub>2</sub> ίσως παίζει έναν ρόλο στον καρκίνο του προστάτη [211]. Τόσο η ομάδα IIA, όσο και άλλες ομάδες εκκρινόμενων PLA<sub>2</sub> εκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνων [212,213], ενώ οι ομάδες X και III ενδεχομένως συμμετέχουν στην ογκογένεση [214,215]. Ωστόσο, παρά τον μεγάλο αριθμό



δημοσιεύσεων οι μηχανιστικοί ρόλοι των sPLA<sub>2</sub> στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καρκίνο είτε είναι άγνωστοι, είτε είναι ποικίλοι, είτε είναι ακόμη και αμφιλεγόμενοι.

Οι sPLA<sub>2</sub> είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν και στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του δέρματος. Αρκετές ομάδες sPLA<sub>2</sub> εκφράζονται σε διάφορες στιβάδες του δέρματος ανθρώπου και ποντικού. Έχει προταθεί πως η sPLA<sub>2</sub> παίζει έναν ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας των λιπιδίων, καθώς επίσης και στη φωτοπροστασία [216,217]. Γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια, τα οποία χαρακτηρίζονταν από υπερέκφραση sPLA<sub>2</sub> IIΑ ή III ανέπτυξαν υπεκεράτωση (γενετική πάθηση η οποία εκδηλώνεται με την εμφάνιση τραχέων εξογκωμάτων στο δέρμα), υπερπλασία και εμφάνισαν μία αυξημένη ευαισθησία σε χημική καρκινογένεση [218,219]. Επίσης η ομάδα sPLA<sub>2</sub> III ενδεχομένως να έχει κάποιο ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα [220].



ΣΧΗΜΑ 18. Απεικόνιση εκκρινόμενης IIΑ PLA<sub>2</sub> από άνθρωπο [221].

Αρκετές sPLA<sub>2</sub> από θηλαστικά και δηλητήρια έχουν εν δυνάμει αντιπηκτικές ιδιότητες in vitro [222]. Εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub> που είναι ισχυρά κατιονικές σε φυσιολογικές τιμές pH, όπως το ένζυμο της sPLA<sub>2</sub> IIΑ, από άνθρωπο, αναστέλλουν το σχηματισμό του συμπλέγματος της προθρομβινάσης με απευθείας σύνδεση στον παράγοντα X. Το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο από την λιπολυτική ενζυμική δραστηριότητα των sPLA<sub>2</sub>. Επίσης, σε όξινες συνθήκες sPLA<sub>2</sub>, παρόμοιες με την

ομάδα X από άνθρωπο, αναστέλλουν την πήξη. Πάντως δεν έχειδειχτεί κατά πόσο αυτή τους η αντιπηκτική δράση έχει μία σημαντική επίδραση σε καρδιαγγειακές παθήσεις *in vivo* [223].

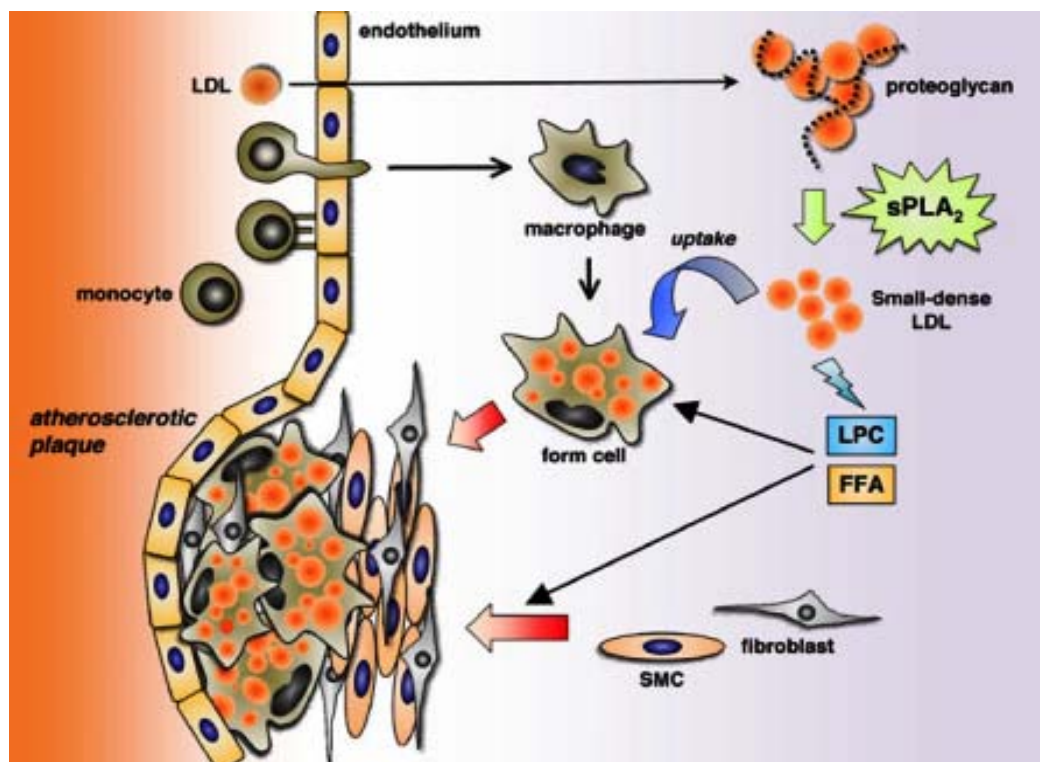
Κάποιες sPLA<sub>2</sub> ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [224]. Οι ομάδες IIF, V και XIIA sPLA<sub>2</sub> εκφράζονται ισχυρά και επιλεκτικά στην εμβρυογένεση ποντικών [225]. Επίσης αρκετές sPLA<sub>2</sub> εκφράζονται σε σκελετικούς μυς, στο συκώτι, την καρδιά, τους νεφρούς, τη σπλήνα, ακόμη και στον αμφιβληστροειδή [226].

Συσσωρευμένα στοιχεία δείχνουν ότι τουλάχιστον τέσσερα μέλη της υπέρ-οικογένειας των εκκρινόμενων PLA<sub>2</sub>, και πιο συγκεκριμένα οι ομάδες IIA, III, V και X sPLA<sub>2</sub>, είναι πολύ πιθανό να έχουν πολλαπλές προ-αθηρογενετικές ιδιότητες στο αγγειακό τοίχωμα [227,228,229,230]. Αυτές οι sPLA<sub>2</sub> μπορούν να δράσουν: 1) παράγοντας προ-φλεγμονώδεις λιπιδικούς μεσολαβητές όπως προσταγλανδίνες, θρομβοξάνια λευκοτριένια και λυσο-φωσφολιπίδια, 2) υδρολύοντας σωμάτια LDL και μετατρέποντάς τα σε ακόμη πιο αθηρογενετικά σωμάτια και 3) παράγοντας πολλαπλές φλεγμονώδεις διαδικασίες σε διάφορα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος.

Αρχικά δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση ερευνητικά στην ομάδα sPLA<sub>2</sub> IIA από άνθρωπο για τον εν δυνάμει ρόλο της στην αθηροσκλήρωση [231]. Ειδικότερα η ομάδα αυτή sPLA<sub>2</sub> εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε αθηρωματικές ανθρώπινες αρτηρίες και αυξημένη συγκέντρωσή της στο πλάσμα συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίων επεισοδίων σε ασθενείς [232,233]. Δείχνει αυξημένη ικανότητα να υδρολύει την οξειδωμένη LDL Η ανθρώπινη sPLA<sub>2</sub> IIA μπορεί να είναι ένας παράγοντας που επιδρά στην εκκίνηση, την εξέλιξη ή/και την θραύση της πλούσιας σε λιπιδικό περιεχόμενο αθηρωματικής πλάκας, επηρεάζοντας τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ή ενεργώντας τοπικά στην αθηρωματική πλάκα [234,235]

Από τις δέκα διαφορετικές ομάδες sPLA<sub>2</sub> που απαντούν στα θηλαστικά, οι ομάδες V και X υδρολύουν τις LDL και HDL τουλάχιστον είκοσι φορές πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την ομάδα IIA [236,237,238]. Και οι δύο αυτές ομάδες απαντούν σε αθηρωματικές βλάβες τόσο στον άνθρωπο, όσο και στον ποντικό. Η δε παρουσία τους στις αθηρωματικές βλάβες και κυρίως η ικανότητάς τους να υδρολύουν σωμάτια LDL τις καθιστούν ενδιαφέροντες προ-αθηρογενετικούς παράγοντες για τους ερευνητές. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Bastrom και συνεργάτες η ομάδα V sPLA<sub>2</sub>

είναι ένας εν δυνάμει παράγοντας για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης *in vivo*, τουλάχιστον για διάφορα είδη ποντικών [239]. Στο σχήμα 19 απεικονίζεται ένα προτεινόμενο μοντέλο για τον ρόλο της sPLA<sub>2</sub> στην ανάπτυξη αρτηριοσκλήρωσης.



ΣΧΗΜΑ 19. Προτεινόμενος ρόλος της sPLA<sub>2</sub> στην ανάπτυξη αθηρωμάτωσης. Στο αρτηριακό τοίχωμα πολλές εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub> είναι παρούσες στα μακροφάγα και στα κύτταρα του λείου μυ, καθώς και στην εξωκυττάρια περιοχή. Οι LDL δεσμεύονται στις πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας περιοχής και υδρολύονται από τις sPLA<sub>2</sub> (IIA, III, V και X ομάδες) μετατρέποντάς τες σε μικρές-πυκνές LDL (τύπος της LDL που θεωρείται παράγοντας ανάπτυξης καρδιαγγειακών ασθενειών). Με τον τρόπο αυτό το αγγειακό τοίχωμα πυκνώνει και αρχίζει η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Επίσης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (FFA και LPC αντίστοιχα), που απελευθερώνονται από την δράση των sPLA<sub>2</sub>, δύναται να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα και τα κύτταρα του λείου μυ, προωθώντας με τον τρόπο αυτό την απόθεση κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες [240].

## 1.7 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A<sub>2</sub> ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ

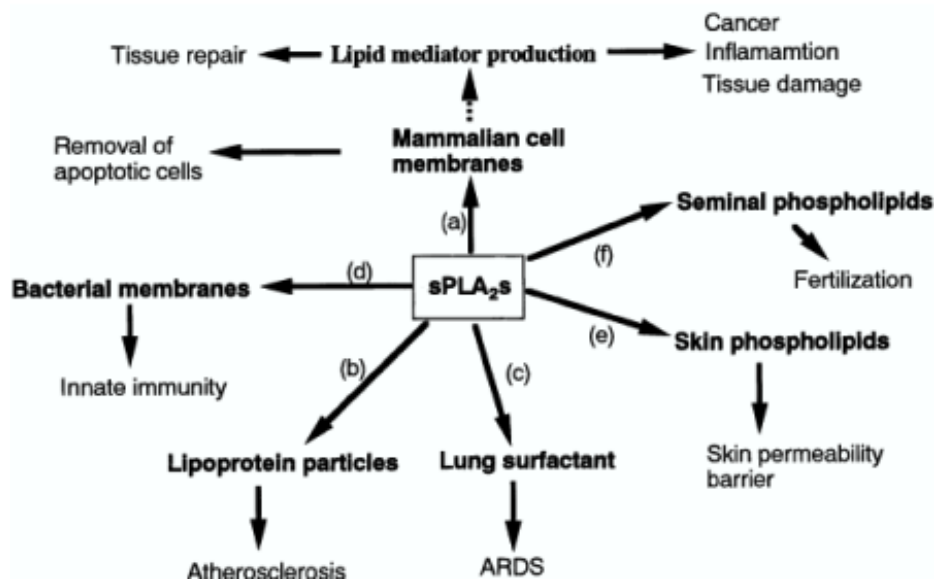
Η οξεία πνευμονική βλάβη (Acute Lung Injury, ALI) είναι ένας γενικός όρος, ο οποίος αναφέρεται σε οξείες καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από υποξυγοναιμία, αυξημένη διαπερατότητα της κυψελιδοτριχοειδικής μεμβράνης και συνοδεύεται από ένα σύνολο κλινικών και ακτινολογικών διαταραχών. Η σοβαρής μορφή της ALI είναι γνωστή ως σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) μία ασθένεια που απειλεί τη ζωή και χαρακτηρίζεται από μεγάλη θνησιμότητα. Είναι ένα παθολογικό αποτέλεσμα που προκαλείται από διάχυτη πνευμονική βλάβη, επηρεάζοντας το πνευμονικό παρέγχυμα, τα αγγεία και τους αεραγωγούς. Το ARDS περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1967 [241]. Χαρακτηρίζεται ως πρώιμο (early) (< 2 ημέρες από την εκδήλωσή του), ενδιάμεσο (intermediate) (2-7 ημέρες από την εκδήλωσή του) και όψιμο (late) (> 7 ημερών από την εκδήλωσή του). Οι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS δύναται να είναι άμεσοι (εισπνοή τοξικών ουσιών, πνευμονική λοίμωξη) ή έμμεσοι (σήψη, λιπώδης εμβολή κ.α.) [242,243].

Διάφορες PLA<sub>2</sub>s συμμετέχουν στην παθογένεση της φλεγμονής του ARDS είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω σύνθεσης βιολογικά ενεργών μορίων [244,245]. Επίσης άλλες PLA<sub>2</sub>s δύναται να έχουν και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (για τον οποίο υπάρχει λεπτομερής αναφορά σε επόμενη παράγραφο της παρούσας εργασίας) υδρολύεται από τις διάφορες PLA<sub>2</sub>s, οι οποίες παράγονται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Τα παραγόμενα από την καταλυτική δράση των ενζύμων λυσο-φωσφολιπίδια και εικοσανοειδή έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια του ARDS [246,247,248,249,250].

Η ομάδα IB PLA<sub>2</sub> ανιχνεύθηκε στον ορό ασθενών που έπασχαν από ARDS, όχι όμως και στον ορό υγιών ανθρώπων (control). Δύναται να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης [251]. Επίσης, το ένζυμο αυτό έχει ενοχοποιηθεί για επιπλοκές στην οξεία παγκρεατίτιδα [252], έναν αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του ARDS.

Η ομάδα sPLA<sub>2</sub> ΠΑ παίζει έναν ουσιώδη ρόλο στο ARDS κυρίως αποικοδομώντας τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων (για τον οποίο θα αναφερθούμε σε επόμενη παράγραφο της εργασίας) [253,254]. Σε ασθενείς που πάσχουν από ARDS βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα sPLA<sub>2</sub> ΠΑ στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού

εκπλύματος, καθώς επίσης και στο πλάσμα [255]. Χημική αναστολή του ενζύμου σε μοντέλα ζώων έδειξε προστασία έναντι της ALI [256].



ΣΧΗΜΑ 20. Λειτουργίες  $sPLA_2$ . Οι  $sPLA_2$ : α) με τη δράση τους οι σε κύτταρα θηλαστικών προκαλούν την έναρξη ή αύξηση της σύνθεσης λιπιδικών διαμεσολαβητών, β) υδρολύουν λιπίδια ή οξειδωμένα λιπίδια, δράση που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αρτηριοσκλήρωσης, γ) με τη δράση τους στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων δύναται να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση σοβαρών αναπνευστικών δυσλειτουργιών, όπως το ARDS, δ) αποικοδομούν τα φωσφολιπίδια στις βακτηριακές μεμβράνες, συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στην φυσική ανοσία, ε) συμμετέχουν στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του δέρματος και στ) ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο στην γονιμότητα ρυθμίζοντας την σπερματογένεση [257].

Μελέτες σε γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια πρότειναν ότι η ομάδα V  $sPLA_2$  [258], πιθανότατα και άλλες ομάδες εκκρινόμενων  $PLA_2$  [259,260,261] συμβάλλουν στη δυσλειτουργία του πνεύμονα εξαιτίας της υδρόλυσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων. Η ικανότητα των  $PLA_2$  να επάγουν την εξωκύττωση και την παραγωγή κυτοκινών και χυμοκινών από κυψελιδικά μακροφάγα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα δεν απαιτεί λιπολυτική ενζυματική δράση, αλλά πρέπει να συσχετίζεται με δέσμευση των  $PLA_2$  σε συγκεκριμένα σημεία της μεμβράνης. Οι

διάφορες ομάδες PLA<sub>2</sub> που συσχετίζονται με το ARDS έχουν ανακεφαλαιωθεί πρόσφατα από τους Λέκκα και συνεργάτες [262].

## 1.8 ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ PLA<sub>2</sub> ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΑΜΥΝΑ ΕΝΑΝΤΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΙΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Ενδεχομένως η πιο μελετημένη βιολογική λειτουργία της ομάδας IIA sPLA<sub>2</sub> είναι ο ρόλος της στη φυσική ανοσία ως ένας εν δυνάμει αντιμικροβιακός παράγοντας [263]. Η αντιβακτηριακή δράση της ομάδας αυτή ανακοινώθηκε αρχικά από τους Elsbach και συνεργάτες [264,265], οι οποίοι έδειξαν ότι η ομάδα IIA είναι παρούσα στον ορό κουνελιού και εμφανίζει ισχυρή δράση έναντι του Gram-αρνητικού *Escherichia coli* (E.coli), σε συνέργια με βακτηριοκτόνες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται και διαταράσσουν το υμένιο λιποπολυσακχαρίτη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό στην sPLA<sub>2</sub> IIA την πρόσβαση στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα.

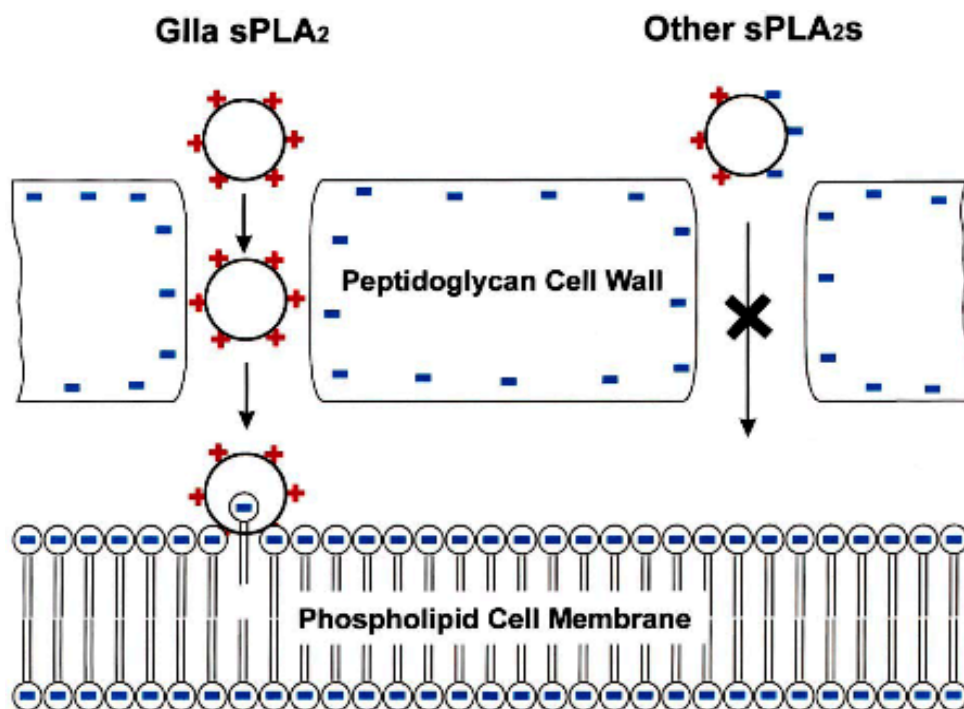
Στη συνέχεια διαπιστώθηκε πως η ομάδα sPLA<sub>2</sub> IIA εμφανίζει μία εν δυνάμει αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών Gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pilori*, *Bacillus anthracis* και *Listeria monocytogenes* [266,267,268,269,270].

Υψηλές συγκεντρώσεις sPLA<sub>2</sub> IIA έχουν βρεθεί σε δάκρυα, κύτταρα σπέρματος, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα καθώς και στον ορό ασθενών που έπασχαν από βακτηριακές μολύνσεις, γεγονός που δείχνει ότι το ένζυμο είναι παρών σε στρατηγικά σημεία για να συνεισφέρει στην αντιβακτηριακή άμυνα [271,272].

Η βακτηριοκτόνος δράση της ομάδας sPLA<sub>2</sub> IIA απαιτεί σε πρώτο στάδιο ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ισχυρά βασικού ενζύμου και του λιποτεichoϊκού οξέος των Gram-θετικών βακτηρίων (βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων, lipoteichoic acid, LTA), προκειμένου στη συνέχεια να αναπτύξει την υδρολυτική του δράση έναντι των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων [273].

Εξωκυττάρια υγρά που περιέχουν την sPLA<sub>2</sub> IIA δύναται εύκολα να προσβάλλουν διαφόρους τύπους Gram-θετικών βακτηρίων in vitro. Επιπλέον, εξωγενής προσθήκη της sPLA<sub>2</sub> IIA σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα, που δεν εκφράζουν το ένζυμο, έχει ως

αποτέλεσμα την εμφάνιση βακτηριοκτόνου δράσης έναντι του *S. aureus* [274]. In vivo, γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια, που χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση ανθρώπινης sPLA<sub>2</sub> IIA, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε μόλυνση από *S. Aureus*, *E. Coli* και *B. Anthracis* [275].



ΣΧΗΜΑ 21. Μοντέλο διείσδυσης στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων της ομάδας sPLA<sub>2</sub> IIA. Το θετικό φορτίο του ενζύμου του δίνει τη δυνατότητα να μετακινηθεί μέσα από το αρνητικά φορτισμένο κυτταρικό τοίχωμα με τη βοήθεια ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Αντίστροφα, ένζυμα που χαρακτηρίζονται από μικρότερες κατιονικές ιδιότητες έχουν πιθανότητα μικρότερη συγγένεια προς το κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις να μην εμφανίζουν υδρολυτική δράση έναντι των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων [276].

Διάφορες άλλες εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>s εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηριακών στελεχών in vitro [277], ωστόσο ο ρόλος τους in vivo δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί. Η κατάταξη των διαφόρων sPLA<sub>2</sub>s ως προς την ικανότητά τους να σκοτώνουν Gram-θετικά βακτήρια in vitro είναι: IIA> X> V> XII> IIE> IB, IIF [278]. Ποικίλες sPLA<sub>2</sub>s εκφράζονται σε ποντίκια και στον άνθρωπο, οι οποίες δύναται να έχουν αντιβακτηριακή δράση [279]. Επίσης, πολλές sPLA<sub>2</sub>s από



δηλητήρια φιδιών παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση έναντι τόσο Gram-θετικών, όσο και Gram-αρνητικών βακτηρίων [280,281,282].

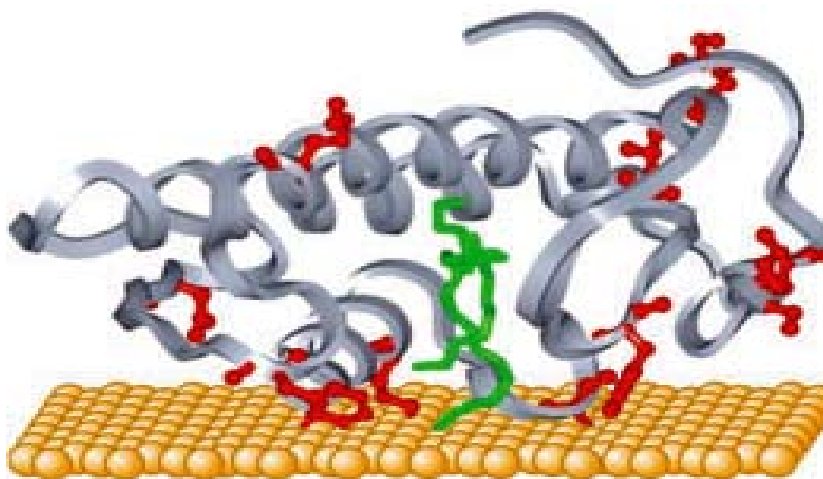
Οι sPLA<sub>2</sub>s που απαντούν σε θηλαστικά συμμετέχουν επίσης στη συστηματική άμυνα έναντι ιών και παρασίτων. Ορισμένες sPLA<sub>2</sub>s από δηλητήρια μέλισσας, φιδιού και εντόμου και η ομάδα X sPLA<sub>2</sub> από άνθρωπο, όχι όμως και οι ομάδες IB και IIA, πιστεύεται ότι μπορούν να αναστείλουν τη μόλυνση από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας [283,284,285]. Οι ομάδες V και X sPLA<sub>2</sub> δρουν αποτρεπτικά στην μόλυνση από αδενοϊό σε κύτταρα θηλαστικών [286]. Ακόμη, οι sPLA<sub>2</sub>s από δηλητήρια και θηλαστικά μπορούν να εμποδίσουν την μόλυνση των ερυθροκυττάρων από *Plasmodium falciparum* (το παράσιτο της ελονοσίας) [287]. Κατά πόσο οι άλλες ομάδες sPLA<sub>2</sub>s είναι αποτελεσματικές έναντι αυτών των παθογόνων και έχουν τέτοια αντική και αντιπαρασιτική δράση δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

Ωστόσο, ορισμένα παθογόνα βακτήρια, όπως η Gram-αρνητική *Pseudomonas aeruginosa*, η ομάδα A. *Streptococcus* και ορισμένοι παρβοϊοί έχουν γονίδια που κωδικοποιούν ειδικές sPLA<sub>2</sub>, οι οποίες συμμετέχουν στην μόλυνση ως λοιμογόνιοι παράγοντες, αυξάνοντας έτσι τη σοβαρότητα της συσχετιζόμενης ασθένειας [288]. Ακόμη, είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενώ ενδοτοξίνες, όπως η E. coli επάγουν την έκφραση της ομάδας sPLA<sub>2</sub> IIA, άλλοι παράγοντες, όπως η θανατηφόρα τοξίνη B. anthracis, μπορούν να μειώσουν την έκφραση αυτής. Με τον τρόπο αυτό βοηθούν το βακτήριο να αποφύγει την βακτηριοκτόνο δράση του ενζύμου [201,289].

## 1.9 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΟΦΑΣΗΣ

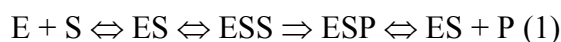
Οι περισσότερες φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα σε αντίθεση με τα υποστρώματα που υδρολύουν, τα οποία είναι λιποδιαλυτά. Αυτό έχει ως συνέπεια να δρουν, για την επίτευξη της κατάλυσης, στη μεσόφαση (interface), τη φυσική διαχωριστική δηλαδή επιφάνεια που σχηματίζεται μεταξύ αυτών και των υποστρωμάτων (βλέπε και σχήμα 22) [290,291,292,293].





ΣΧΗΜΑ 22. Απεικόνιση της δέσμευσης της ομάδας sPLA<sub>2</sub> ΙΙΑ στη μεσόφαση, τη φυσική διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του υδατοδιαλυτού ενζύμου και του λιποδιαλυτού υποστρώματος. Η επιφάνεια πρόσδεσης των sPLA<sub>2</sub> στη μεσόφαση είναι διακριτή από το ενεργό τους κέντρο [184].

Για την περιγραφή του φαινομένου της κατάλυσης στη μεσόφαση οι Dennis και συνεργάτες πρότειναν το ακόλουθο μοντέλο, που περιγράφεται μαθηματικά από την εξίσωση 1 [294]



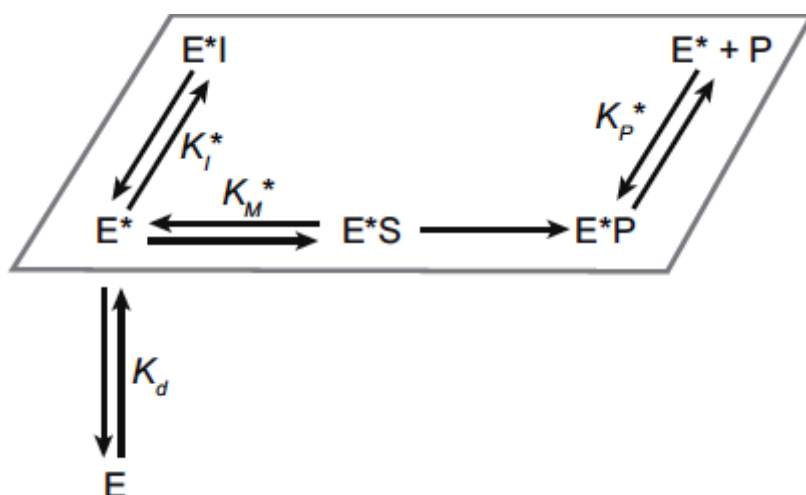
Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, το υδατοδιαλυτό ένζυμο (E) αρχικά συνδέεται με το φωσfolιπιδικό υπόστρωμα (S) προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλοκο ES. Η δέσμευση αυτή λαμβάνει χώρα στη μεσόφαση. Στη συνέχεια το ένζυμο συνδέεται, με το ενεργό του κέντρο, με δεύτερο μόριο υποστρώματος προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλοκο Michaelis ESS.

Οι Verger και συνεργάτες πρότειναν ένα πιο γενικό μοντέλο για την περιγραφή της κατάλυσης στη μεσόφαση, το οποίο περιγράφεται μαθηματικά από την εξίσωση 2 [295,296].

$E \rightleftharpoons E^* + S \rightleftharpoons E^*S \Rightarrow E^*P \rightleftharpoons E^* + P \quad (2)$ , όπου E\*S είναι το σύμπλοκο ενεργοποιημένου ενζύμου-υποστρώματος στη μεσόφαση, E\*P το σύμπλοκο ενεργοποιημένου ενζύμου-προϊόντος στη μεσόφαση και P το προϊόν (βλέπε και σχήμα 23).

Με βάση το μοντέλο αυτό, το ένζυμο (E) συνδέεται σε πρώτο στάδιο στη μεσόφαση από μόνο του, χωρίς να συνδεθεί με μόρια υποστρώματος. Αυτό έχει σα

συνέπεια την ενεργοποίηση του ενζύμου ( $E^*$ ). Στη συνέχεια σχηματίζονται στην περιοχή της μεσόφασης αρχικά το σύμπλοκο ενεργοποιημένου ενζύμου-υποστρώματος ( $E^*S$ ) και ακολούθως το σύμπλοκο ενεργοποιημένου ενζύμου-προϊόντος ( $E^*P$ ), προκειμένου να απελευθερωθεί τελικώς το προϊόν ( $P$ ). Η δέσμευση του ενζύμου στη μεσόφαση είναι τοπολογικά διακριτή από το ενεργό του κέντρο (βλέπε και σχήμα 22). Επίσης, η δέσμευση του ενζύμου στη μεσόφαση και η δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι κινητικά διακριτά φαινόμενα [297,298]. Τόσο το μοντέλο των Dennis και συνεργατών, όσο και αυτό των Verger και συνεργατών, περιγράφουν με ικανοποιητικό τρόπο την σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα στη μεσόφαση, ενώ οι εξισώσεις 1 και 2 είναι μαθηματικά ισοδύναμες.



ΣΧΗΜΑ 23. Μηχανισμός δράσης  $PLA_2$  στη μεσόφαση. Τα βήματα που λαμβάνουν χώρα στη μεσόφαση βρίσκονται μέσα στο παραλληλόγραμμο.  $K_d$ ,  $K_M^*$ ,  $K_P^*$  και  $K_I^*$  (για έναν ανταγωνιστικό αναστολέα) είναι οι σταθερές διάστασης στη μεσόφαση για το ενεργοποιημένο ένζυμο ( $E^*$ ), το υπόστρωμα ( $S$ ), προϊόν ( $P$ ) και τον αναστολέα ( $I$ ) αντίστοιχα.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα των διαφόρων φωσφολιπασών  $A_2$  είναι πολύ μεγαλύτερη όταν δρουν πάνω σε υποστρώματα τα οποία είναι οργανωμένα σε συσσωματώματα (για παράδειγμα μικκύλια), σε σχέση με τα ίδια υποστρώματα όταν αυτά εμφανίζονται στο διάλυμα σαν μονομερή. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως ενεργοποίηση μεσόφασης (interface activation) [299,300,301,302,303].

Για την ερμηνεία του φαινομένου της ενεργοποίησης μεσόφασης έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί διάφορες ερμηνείες. Οι δύο επικρατούσες υποθέσεις είναι του μοντέλου υποστρώματος (substrate model) και του μοντέλου ενζύμου (enzyme model) [304].

Το μοντέλο υποστρώματος αναφέρεται στη συμμετοχή των φυσικών μορφών αυτού για την επίτευξη της κατάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο αυτό αποδίδει την αύξηση της ενεργότητας στον κατάλληλο προσανατολισμό του λιπιδίου, στη διαμόρφωσή του, καθώς επίσης και στην ενυδάτωση των πολικών του ομάδων. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ενίσχυσαν την ορθότητα του μοντέλου αυτού [305,306,307].

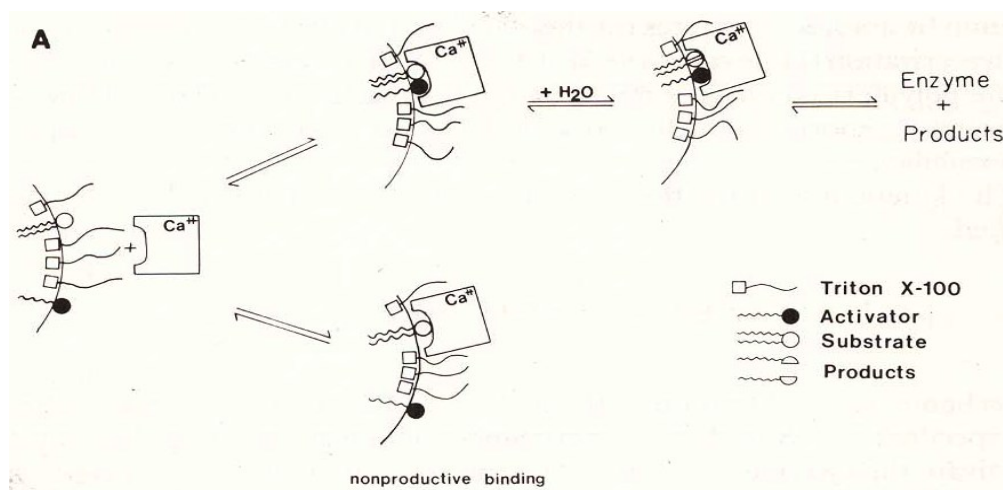
Σύμφωνα με το μοντέλο ενζύμου, το τελευταίο υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες οφείλονται στη σύνδεσή του με το υπόστρωμα και οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση του ενεργού κέντρου και την ενίσχυση της κατάλυσης. Μελέτες που έχουν γίνει με χρήση τεχνικών NMR [308,309], φθορισμομετρίας [310] και κρυσταλλογραφίας [311] ενισχύουν την ορθότητα του μοντέλου αυτού, επιβεβαιώνοντας τις διαμορφωτικές αλλαγές που υφίσταται το ένζυμο [312,313]. Πάντως είναι πολύ πιθανό πως και τα δύο μοντέλα πρέπει να δρουν ταυτόχρονα, διότι το ένα δεν αποκλείει, ούτε αναιρεί το άλλο.

Οι Min και συνεργάτες υποστηρίζουν ότι η Lp-PLA<sub>2</sub> (PAF-AH του πλάσματος) πρέπει να προσεγγίζει το υπόστρωμα από την υδατική φάση [314,315,316]. Αν όντως συμβαίνει αυτό, τότε η Lp-PLA<sub>2</sub>, σε αντίθεση με την μεγάλη πλειοψηφία των φωσφολιπασών A<sub>2</sub>, δεν δρα στη μεσόφαση.

Οι μηχανισμοί δράσης των PLA<sub>2</sub>s από δηλητήριο κόμπρας N. naja naja έχουν μελετηθεί σε εκτενή βαθμό. Στις περισσότερες μελέτες που αφορούν ανάλυση της κινητικής του ενζύμου, τα φωσφολιπιδικά υποστρώματα είναι διαλυμένα σε κατάλληλο απορρυπαντικό, έτσι ώστε να σχηματίζονται μικτά μικκύλια. Το απορρυπαντικό που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως είναι το Triton X-100 [317]. Για την επίτευξη μέγιστης ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου απαιτείται τόσο ένας κατάλληλος ενεργοποιητής, όσο και η κατάλυση να λαμβάνει χώρα στη μεσόφαση [318]. Η κατάλυση περιγράφεται σύμφωνα με το μοντέλο της εξίσωσης 3

$E + A \rightleftharpoons EA + S \rightleftharpoons EAS \Rightarrow EAS + P$  (3), όπου E είναι το ένζυμο, A ο ενεργοποιητής, S το υπόστρωμα και P το προϊόν.

Ο Waite αναφέρεται σε τέσσερα πιθανά μοντέλα για το μηχανισμό δράσης της PLA<sub>2</sub> από δηλητήριο της κόμπρας *N. naja naja*. Το μοντέλο A (βλέπε και σχήμα 24) προβλέπει ότι ο κατάλληλος ενεργοποιητής αυξάνει την συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα, όχι όμως και την  $V_{\max}$  της αντίδρασης. Το μοντέλο B προτείνει ότι ο ενεργοποιητής επιδρά στην απελευθέρωση του προϊόντος και αυξάνει την  $V_{\max}$  της αντίδρασης. Σύμφωνα με το μοντέλο C, ο ενεργοποιητής, συνδεδεμένος σε μία διακριτή θέση, προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου. Με βάση το μοντέλο D, απαιτείται σχηματισμός ενός διμερούς. Το μόριο του ενεργοποιητή συνδέεται με το ένα μονομερές του ενζύμου, ενώ το υπόστρωμα συνδέεται με το δεύτερο. Πάντως δεν δύναται να βγει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για το αν κάποιο από τα τέσσερα αυτά μοντέλα είναι ορθά. Είναι πιο πιθανό πως το μοντέλο C ή ένας συνδυασμός ανάμεσα στα C και D ανταποκρίνεται περισσότερο στην πραγματικότητα.



ΣΧΗΜΑ 24. Μοντέλο A για τη δράση της PLA<sub>2</sub> από δηλητήριο κόμπρας *N. naja naja* [319].

## 1.10 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΩΝ A<sub>2</sub>

Η καταλυτική δράση των PLA<sub>2</sub>s έχει, μεταξύ των άλλων, ως συνέπεια την παραγωγή ενώσεων, οι οποίες επάγουν τη φλεγμονή, όπως ο PAF και τα εικοσανοειδή. Η απευθείας αναστολή είτε της καταλυτικής δράσης της PLA<sub>2</sub>, είτε των παραγώγων των προϊόντων υδρόλυσής της θα μπορούσε να είναι ένα βήμα προς

τη θεραπεία τέτοιων φλεγμονωδών καταστάσεων. Η αναστολή όμως της σύνθεσης τέτοιων ενώσεων, όπως των εικοσανοειδών [320,321], έχει αρκετά μειονεκτήματα [322,323]. Για το λόγο αυτό η φαρμακευτική βιομηχανία έχει πεισθεί για το σχεδιασμό προϊόντων που θα έχουν δράση αντί-PLA<sub>2</sub> [324,325].

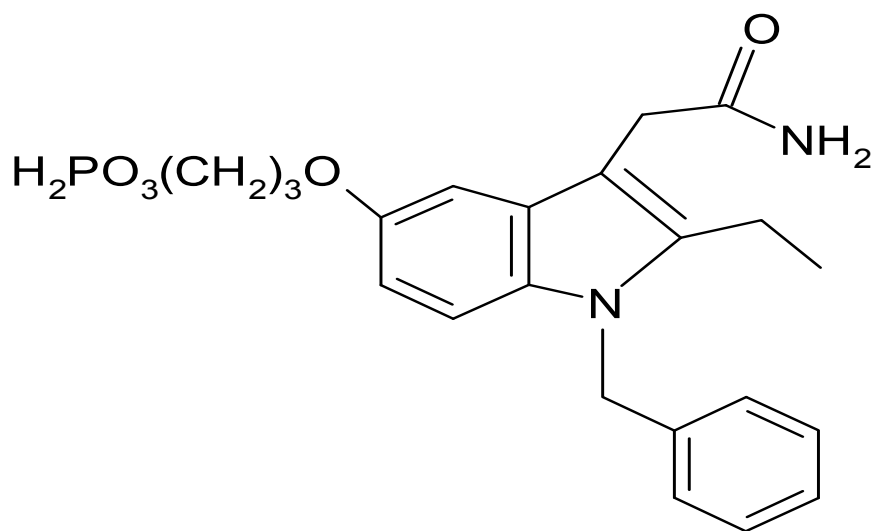
Ο έλεγχος, για παράδειγμα, της παραγωγής του αραχιδονικού οξέος με αναστολή της δράσης της PLA<sub>2</sub> φαίνεται να έχει αρκετά πλεονεκτήματα για τη θεραπεία παθολογικών καταστάσεων που οφείλονται στη σύνθεση ενώσεων που είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος και επάγουν τη φλεγμονή [326]. Επιπρόσθετα, η αναστολή της PLA<sub>2</sub> θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης πολλών προ-φλεγμονωδών λυσοφωσφολιπιδίων. Για το λόγο αυτό οι αναστολείς της PLA<sub>2</sub> έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων ως ένα πιθανό θεραπευτικό μέσο ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την καταστροφή των ιστών [327,328].

Ωστόσο, ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αναστολέων της PLA<sub>2</sub> είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν διάφορες ομάδες PLA<sub>2</sub>, οι οποίες συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και στην παραγωγή του αραχιδονικού οξέος. Για το λόγο αυτό πρέπει αρχικά να διευκρινιστεί πια συγκεκριμένη ομάδα PLA<sub>2</sub> παίζει τον πρωτεύοντα ρόλο στη δημιουργία ενός συγκεκριμένου προϊόντος, το οποίο επάγει τη φλεγμονή.

Επιπρόσθετα, η χρήση χημικών αναστολέων των διαφόρων ομάδων PLA<sub>2</sub> είναι πολύ χρήσιμη στους ερευνητές διότι με αυτό τον τρόπο μπορούν να κατανοήσουν την ακριβή δράση των ενζύμων αυτών στις διάφορες κυτταρικές διαδικασίες καθώς επίσης και να αναγνωρίσουν ομάδες και υποομάδες PLA<sub>2</sub> στα διάφορα βιολογικά δείγματα. Δυστυχώς όμως δεν υπάρχουν ειδικοί αναστολείς για όλες τις ομάδες PLA<sub>2</sub>. Οι αναστολείς της καταλυτικής δράσης των διαφόρων ομάδων PLA<sub>2</sub> μπορεί να είναι πρωτεϊνικά ή μη πρωτεϊνικά μόρια, ενώ η δράση τους μπορεί να είναι τόσο αντιστρεπτή, όσο και μη αντιστρεπτή. Συνήθως δεσμεύονται απευθείας στο ένζυμο.

Σημαντικός όγκος αναφορών υπάρχει στην βιβλιογραφία που να αφορά τις ιδιότητες των αναστολέων έναντι των sPLA<sub>2</sub>s. Τυπικά μόρια που αναφέρονται ως ‘κλασσικοί’ αναστολείς των sPLA<sub>2</sub>s περιλαμβάνουν φάρμακα έναντι της ελονοσίας (π.χ. mepracrine), αμινογλυκοσίδες, αλκοόλες και πολυαμίνες. Ωστόσο, τα μόρια αυτά ουσιαστικά δρουν αμβλύνοντας τις αλληλεπιδράσεις των ενζύμων με τα

υποστρώματα ή ακόμη και με τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , δεν εμφανίζουν δηλαδή καμία εξειδίκευση. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση τους [329,330].

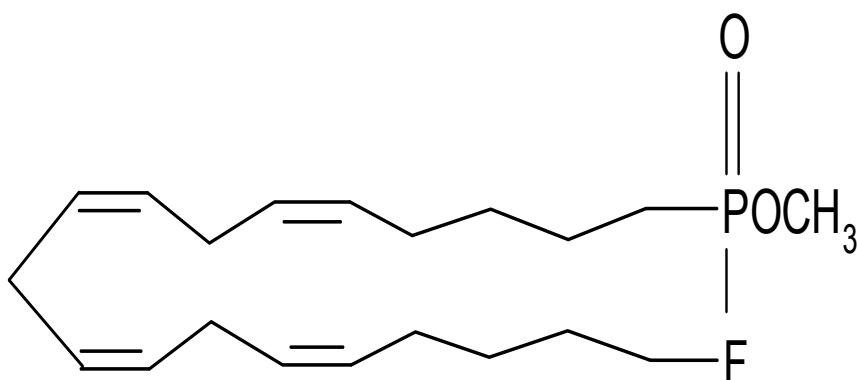


ΣΧΗΜΑ 25. Αναστολέας LY 311727 (3-(3-ακεταμιδ-1-βενζυλ-2-αιθυλινδοϋλ-5-οξύ) προπανο-σουλφονικό οξύ).

Το p-βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο (pBPB) είναι ένας μη ειδικός αναστολέας των εκκρινόμενων  $\text{PLA}_2\text{s}$  [331,332]. Δεσμεύεται απευθείας με την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  στο ενεργό κέντρο ακυρώνει τη δράση του αναστολέα επειδή προστατεύουν την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου από αλκυλίωση [333]. Αναστέλλει μη αντιστρεπτά τις  $\text{sPLA}_2\text{s}$ , όχι όμως τις  $\text{cPLA}_2\text{s}$  και  $\text{iPLA}_2\text{s}$  in vitro. Σε κυτταρικά συστήματα αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για τη δράση του. Η χλωροκουίνη, η μεπακρίνη και άλλα κατιονικά αμφίφυλα αντιδραστήρια είναι επίσης μη ειδικοί αναστολείς των  $\text{sPLA}_2\text{s}$  [334]. Ακόμη, μια σειρά άλλων αντιδραστηρίων όπως βιταμίνη E και ρετινοειδή αναστέλλουν τη δράση των  $\text{sPLA}_2\text{s}$ , χωρίς όμως να είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους. Το μονοαλίδιο (monoalide) είναι ένας μη ειδικός αναστολέας των  $\text{sPLA}_2\text{s}$  ο οποίος συνδέεται με το ένζυμο με ένα κατάλοιπο λυσίνης ή ιστιδίνης [335,336]. Η δράση του μοιάζει με το pBPB.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πιο ειδικοί αναστολείς έναντι των  $\text{sPLA}_2\text{s}$ , οι οποίοι είναι παράγωγα του ινδολίου [337,338,339]. Θεωρούνται πως είναι οι πλέον ισχυροί αναστολείς έναντι των  $\text{sPLA}_2\text{s}$  από θηλαστικά [340]. Για το λόγο αυτό είναι

ιδιαίτερα χρήσιμοι για in vitro μελέτες, αλλά και για μελέτες σε περιπτώσεις που οι PLA<sub>2</sub>s βρίσκονται έξω από το κύτταρο. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνεται το 3-(3-ακεταμιδ-1-βενζυλ-2-αιθυλινδοϋλ-5-οξύ) προπανο-σουλφονικό οξύ (LY 311727), του οποίου η γεωμετρία έχει βρεθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Αναστέλλει ειδικά την ομάδα sPLA<sub>2</sub> IIA (βλέπε και σχήμα 25) [341,342].

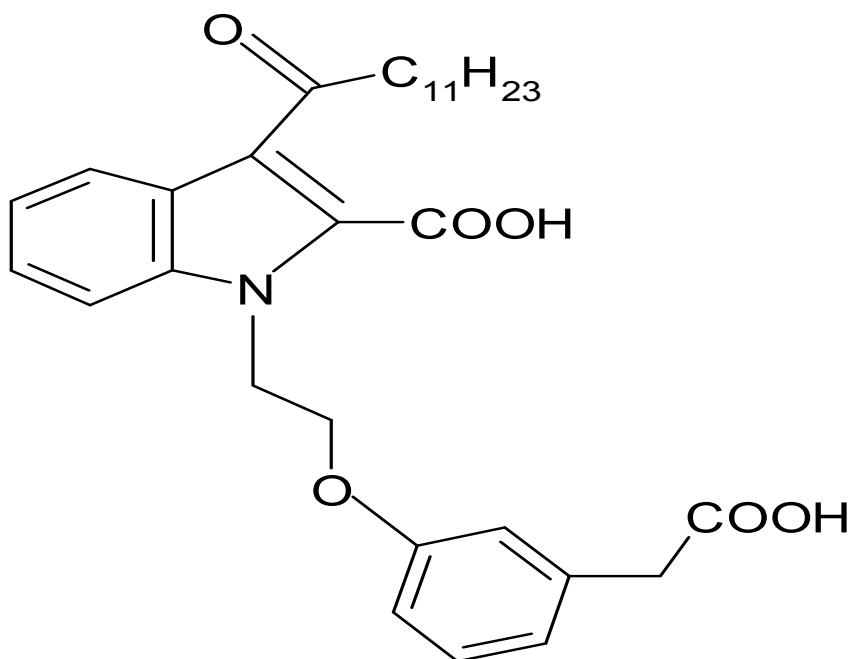


ΣΧΗΜΑ 26. Αναστολέας MAFP (μεθυλο-αραχιδονυλο-φθοροφωσφονικό).

Η αραχιδονυλο-τριφθορο-μεθυλοκετόνη (AACOCF<sub>3</sub> ή AATFMK ή ATFK) [343], και το μεθυλο-αραχιδονυλο-φθοροφωσφονικό (MAFP, βλέπε και σχήμα 26) [344] αναστέλλουν τη δράση των cPLA<sub>2</sub>s. Η δομή τους είναι παρόμοια με αυτή του αραχιδονικού οξέος. Σε ολόκληρα κυτταρικά συστήματα προτιμάται ο MAFP έναντι του AATFMK διότι ο δεύτερος δρα αντιστρεπτά και απαιτεί πολύ χρόνο για να δράσει [345]. Ο MAFP αναστέλλει μη αναστρέψιμα και την ομάδα VI PLA<sub>2</sub> καθώς επίσης και την ενεργότητα PAF-AH [346]. Η AATFMK αναστέλλει επίσης την ομάδα VI PLA<sub>2</sub> και την κυκλοξυγονάση [347].

Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί παράγωγα του ινδολίου ως αναστολείς των cPLA<sub>2</sub>s. Το πιο διαδεδομένο παράγωγο είναι το 1-[2-(4-καρβοξυ-μεθυλ-φαινοξυ)αιθυλ]-3-δωδεκανουλινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ (ML 3176, βλέπε και σχήμα 27) [348,349]. Ακόμη, πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει πως παράγωγα της πυρρολιδίνης (pyrrolidine), όπως η pyrrhophenone, αναστέλλουν ειδικά την ομάδα IVA PLA<sub>2</sub>. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση έναντι της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub> σε σχέση με τις ομάδες VIA, IB, IIA, V και X PLA<sub>2</sub> ή της παγκρεατικής λιπάσης [350,351]. Η pyrrhophenone, ως εν δυνάμει αναστολέας της cPLA<sub>2</sub> έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε μελέτες που αφορούν την απελευθέρωση αραχιδονικού

οξέος σε κυτταρικά συστήματα [352,353]. Η πυρρολιδίνη-1 (pyrrolidine-1) είναι ένας ακόμη εν δυνάμει αναστολέας της ομάδας IVA PLA<sub>2</sub> [354].



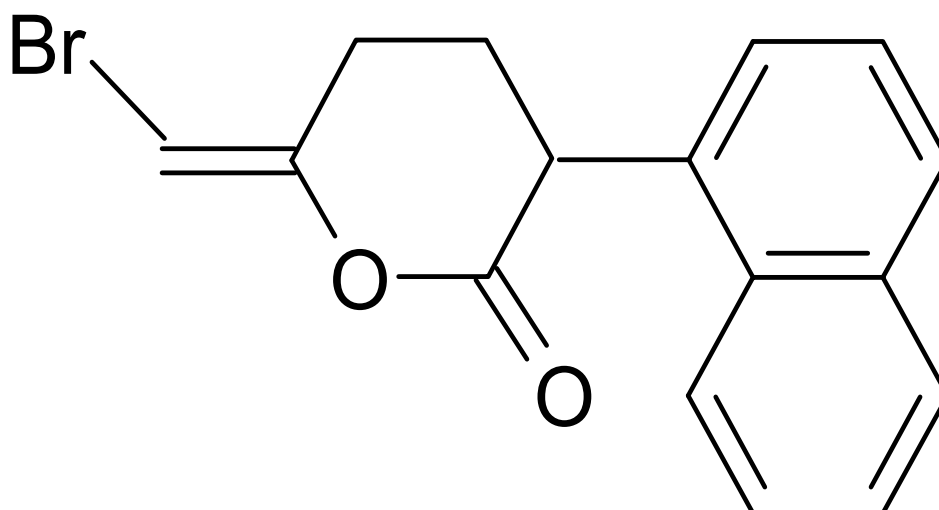
ΣΧΗΜΑ 27. Αναστολέας ML 3176 1-[2-(4-καρβοξυ-μεθυλ-φαινοξυ)αιθυλ]-3-δωδεκανουλινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ).

Η βρωμο-ενολο-λακτόνη (BEL, βλέπε και σχήμα 28) είναι ένας ειδικός αναστολέας των iPLA<sub>2</sub>s [355,356], η οποία δεν αναστέλλει τις sPLA<sub>2</sub>s και cPLA<sub>2</sub>s. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αναστολείς των cPLA<sub>2</sub>s, AATFMK και MAFP, αναστέλλουν και τη δράση των iPLA<sub>2</sub>s. Για το λόγο αυτό αν σε κάποια πηγή PLA<sub>2</sub> παρατηρείται αναστολή από τους AATFMK και MAFP χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονα αναστολή από τον BEL, αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη της παρουσίας cPLA<sub>2</sub>. Η aiPLA<sub>2</sub> δεν εμφανίζει ευαισθησία έναντι των αναστολέων AATFMK και pBPB. Αναστέλλεται από τον ειδικό αναστολέα MJ33 [357,358], ένα φωσφολιπιδικό ανάλογο. Ακόμη η ενεργότητα της aiPLA<sub>2</sub> αναστέλλεται από την πρωτεΐνη A του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με την PRDX6 [359].

Το διϊσοπροπυλο-φθοροφωσφορικό οξύ (DFP) αναστέλλει τη δράση της Lp-PLA<sub>2</sub>, τροποποιώντας μία σερίνη της β-υπομονάδας, γεγονός που πιστοποιεί ότι το ενεργό κέντρο του ενζύμου περιέχει μία ενεργή σερίνη. Επίσης, το 4-[2-



αμινοαιθυλ]βενζυλο-σουλφονυλο φθορίδιο (pefablock), αναστέλλει την καταλυτική δράση της Lp-PLA<sub>2</sub>. Ένα παράγωγο της αζεδιτινόνης και πιο συγκεκριμένα η SB-222657 είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της Lp-PLA<sub>2</sub> [360,361].



ΣΧΗΜΑ 28. Αναστολέας BEL (βρωμο-ενολο-λακτόνη).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Κυριότεροι χημικοί αναστολείς ομάδων PLA<sub>2</sub>.

| Είδος ενζύμου      | Αναστολέας | Παραπομπές |
|--------------------|------------|------------|
| sPLA <sub>2</sub>  | pBPB,      | 331, 332   |
|                    | LY 311727  | 341, 342   |
| cPLA <sub>2</sub>  | AATFMK,    | 343        |
|                    | MAFP,      | 344        |
|                    | ML 3176    | 348, 349   |
| iPLA <sub>2</sub>  | BEL        | 355, 356   |
| aiPLA <sub>2</sub> | MJ33       | 357        |
| PAF-AH             | DFP,       | 322        |

Πλην των χημικών αναστολέων, έχουν βρεθεί και φυσικοί αναστολείς, οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση ομάδων PLA<sub>2</sub>. Μία τέτοια οικογένεια φυσικών αναστολέων, που αναστέλλουν συνήθως αντιστρεπτά αλλά και μη ειδικά κάποιες ομάδες

εκκρινόμενης και κυτοσολικής PLA<sub>2</sub> είναι οι αννεξίνες. Οι αννεξίνες έχουν ρυθμιστικές λειτουργίες σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως στη σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης και στην απόπτωση. Έχει βρεθεί ότι η cPLA<sub>2</sub> που βρίσκεται στη σπλήνα χοίρου αναστέλλεται από την αννεξίνη-1 (ANX-I) [362]. Οι κυριότεροι χημικοί αναστολείς των διαφόρων ομάδων PLA<sub>2</sub> συνοψίζονται στον πίνακα 8.

### 1.11 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub>

Για την επιλογή μίας κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub> πρέπει κανείς να έχει υπόψη τρεις θεμελιώδεις παραμέτρους. Αρχικά θα πρέπει, μέσα από μία πληθώρα φωσφολιπιδικών υποστρωμάτων, που είτε είναι διαθέσιμα στο εμπόριο είτε μπορούν να παρασκευαστούν στο εργαστήριο, να επιλέξει το κατάλληλο υπόστρωμα. Επίσης, επειδή τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν διάφορες συσσωρευμένες μορφές στο νερό, πρέπει να επιλεγεί η κατάλληλη φυσική μορφή του υποστρώματος. Τέλος, θα πρέπει να βρεθεί μία μέθοδος ανίχνευσης, η οποία θα είναι συμβατή τόσο με το υπόστρωμα, όσο και με τη φυσική του μορφή.

Από τα εμπορικά διαθέσιμα φωσφολιπιδικά υποστρώματα η PC και η PE είναι εσωτερικά δίπολα (zwitterions) σε ουδέτερο pH, ενώ το PA, η PS, η PG και η PI είναι ανιονικά. Η PC σχηματίζει εύκολα μεικτά μικκύλια και κυστίδια, ενώ η PE διαλύεται σχετικά δύσκολα. Επίσης, η παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> μειώνει τη διαλυτότητα ανιονικών φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια πρέπει να φυλάσσονται και να χειρίζονται με ιδιαίτερη προσοχή διότι μπορούν πολύ εύκολα να οξειδωθούν, κυρίως αυτά που περιέχουν πολλούς πολλαπλούς δεσμούς, όπως το αραχιδονικό οξύ για παράδειγμα. Ακόμη, η PE και η PS είναι πιο ασταθείς σε σχέση με την PC. Για το λόγο αυτό και πρέπει να φυλάσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε σκοτάδι, καθώς επίσης και σε διαλύτες όπως το τολουόλιο ή η αιθανόλη. Από την άλλη, μπορεί τα φωσφολιπίδια που περιέχουν κορεσμένες λιπαρές αλυσίδες να είναι πιο σταθερά, όμως είναι λιγότερο διαλυτά.

Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνει κανείς υπόψη είναι ότι κατά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων μπορεί να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα δράσεις περισσότερων του ενός ενζύμων. Επί παραδείγματι, η απελευθέρωση ράδιο-σημασμένων λιπαρών οξέων από τη θέση *sn*-2 ενός φωσφολιπιδίου μπορεί να

οφείλεται όχι μόνο σε δράση  $PLA_2$  αλλά και  $PLA_1$  ή λυσο-φωσφολιπάσης ή ακόμη και σε δράσης PLC και μιας λιπάσης.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού  $PLA_2$  παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα. Το σημαντικότερο όμως μειονέκτημά τους πηγάζει από το γεγονός ότι τα υποστρώματα είναι αδιάλυτα στο νερό. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού τα φωσφολιπίδια υπάρχουν σε πολλές διαφορετικές συσσωρευμένες μορφές (aggregates) στα υδατικά διαλύματα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ταχύτητα υδρόλυσης εξαρτάται όχι μόνο από τη φύση του υποστρώματος, αλλά και από τη φυσικοχημική του κατάσταση. Οι  $PLA_2$ s υδρολύουν συσσωρευμένα υποστρώματα πολύ ταχύτερα σε σχέση με τα ίδια υποστρώματα, όταν αυτά απαντούν στο διάλυμα με τη μορφή μονομερών. Κατά κανόνα οι ταχύτητες υδρόλυσης μονομερών υποστρωμάτων είναι πολύ χαμηλές. Για το λόγο αυτό τα υποστρώματα βρίσκονται συνήθως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της κρίσιμης μικυλιακής τους συγκέντρωσης (CMC) [363,364,365]. Η CMC ενός φωσφολιπιδίου μειώνεται όσο αυξάνει το μήκος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος [366]. Τα φωσφολιπίδια που έχουν μεγάλο μήκος λιπαρές αλυσίδες δεν σχηματίζουν εύκολα μικκύλια, ωστόσο μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε μικτά μικκύλια με απορρυπαντικά [367,368,369].

Η επιλογή μιας μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος. Κάποιες μέθοδοι, για παράδειγμα, μπορούν να εφαρμοστούν αποκλειστικά για καθαρισμένα ένζυμα. Άλλες μέθοδοι είναι συνεχείς και παρέχουν τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης, ενώ άλλες όχι. Επίσης, κάποιες μέθοδοι επιδέχονται εύκολα την αυτοματοποίηση, ενώ άλλες δεν μπορούν να αυτοματοποιηθούν. Ωστόσο, το πιο σημαντικό κριτήριο για την επιλογή μιας συγκεκριμένης μεθόδου είναι η ευαισθησία που απαιτείται. Η ευαισθησία εξαρτάται από την ποσότητα του ενζύμου στο προς μελέτη υλικό και από την ειδική του ενεργότητα.

Η ευαισθησία μιας μεθόδου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, σημαντικότερος από τους οποίους είναι το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου. Το όριο ανίχνευσης καθορίζεται από τις φυσικές ιδιότητες της μεθόδου. Οι όροι ευαισθησία και όριο ανίχνευσης είναι διαφορετικοί και δεν πρέπει να συγχέονται. Το όριο ανίχνευσης είναι στατιστικό μέγεθος και δείχνει την ποσότητα ενός φυσικού μεγέθους (π.χ. ενεργότητα), η οποία δίνει ανάγνωση σε ένα όργανο μέτρησης τριπλάσια της τυπικής απόκλισης. Η έννοια του ορίου ανίχνευσης είναι

συμβατική και πρακτικά είναι η μικρότερη ενεργότητα την οποία ο αναλυτής μπορεί να ελπίζει ότι θα ανιχνεύσει με δεδομένο βαθμό αξιοπιστίας [370,371]. Στον πίνακα 9 συνοψίζονται οι κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού PLA<sub>2</sub>.

*ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub> [372].*

| Μέθοδος              | Όριο<br>Ανίχνευσης | Συνεχής<br>Παρακολούθηση | Φυσικό<br>Υπόστρωμα |
|----------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|
| Ογκομετρικές         | 20nmol             | +                        | +                   |
| Πεχαμετρικές         | 100pmol            | +                        | +                   |
| Ραδιομετρικές        | 1fmol-1pmol        | -                        | -                   |
| NMR                  | 1μmol              | -                        | +/-                 |
| Μέθοδος Μονοστιβάδας | -                  | +                        | +                   |
| Πολαρογραφικές       | 40nmol             | +                        | +                   |
| Φασματοφωτομετρικές  | 200pmol-<br>25nmol | +/-                      | +/-                 |
| Φθορισμομετρικές     | 1pmol              | +/-                      | -                   |
| ESR                  | 1nmol              | +                        | -                   |
| Χρωματογραφικές      | 1pmol              | +                        | -                   |

Όταν συγκρίνουμε διαφορετικές μεθόδους, θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι το όριο ανίχνευσης από μόνο του δεν αντανακλά απαραίτητα την ευαισθησία μιας μεθόδου για ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Ειδικότερα, στις διάφορες φθορισμομετρικές μεθόδους, μπορεί μία μέθοδος να έχει πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης χωρίς όμως να έχει υψηλή ευαισθησία εξαιτίας της δράσης του υποστρώματος. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε κυρίως με τις φθορισμομετρικές, τις ραδιομετρικές και τις HPLC-φθορισμομετρικές μεθόδους ανίχνευσης και προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub>.

### **1.11.1 ΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Οι ραδιομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> είναι οι πλέον διαδεδομένες. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα και ιδιαίτερα

χαμηλό όριο ανίχνευσης (το όριο ανίχνευσης ορισμένων ραδιομετρικών μεθόδων είναι περίπου 1 fmol). Απαιτούν τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων, σημασμένων με ραδιενεργά ισότοπα, όπως  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  και  $^{32}\text{P}$ . Τα περισσότερα ραδιενεργά υποστρώματα είναι εμπορικά διαθέσιμα, ωστόσο είναι κατά κανόνα ιδιαίτερα ακριβά.

Η ευαισθησία των ραδιομετρικών μεθόδων εξαρτάται από την ειδική ενεργότητα του ενζύμου έναντι των σημασμένων υποστρωμάτων. Τυπικές ειδικές ενεργότητες για εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα είναι 50-100 Ci/mmol για το  $^3\text{H}$  και 50-100 mCi/mmol για τον  $^{14}\text{C}$ , που αντιστοιχούν σε όρια ανίχνευσης της τάξης του 1 fmol και 1 pmol αντίστοιχα. Τα σημασμένα με  $^{32}\text{P}$  ραδιενεργά φωσφολιπιδικά υποστρώματα γενικώς δεν είναι εμπορικώς διαθέσιμα.

Κατά τις ραδιομετρικές μεθόδους γίνεται μέτρηση ενός εκ των προϊόντων της υδρολυτικής αντίδρασης της  $\text{PLA}_2$ . Στις περισσότερες όμως εκ των περιπτώσεων οι μέθοδοι είναι ασυνεχείς και απαιτούν κατά κανόνα διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης από τα αντιδρώντα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, εκχύλιση ή φυγοκέντρηση. Το κύριο όμως μειονέκτημά τους, πέραν του αυξημένου κόστους και χρόνου της ανάλυσης, είναι η χρήση επικίνδυνων και επιβλαβών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον χημικών ουσιών. Το γεγονός αυτό, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην ανάπτυξη άλλων περισσότερο φιλικών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον μεθόδων.

Μία διαδεδομένη ραδιομετρική μέθοδος προσδιορισμού είναι αυτή που στηρίζεται στην εκχύλιση Dole [373]. Τα λιπίδια εκχυλίζονται με 2-προπανόλη, επτάνιο και θεϊκό οξύ. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα εκχυλίζονται από τη φάση του επτανίου, ενώ η πλειοψηφία των φωσφολιπιδίων και λυσο-φωσφολιπιδίων παραμένει στην υδατική φάση. Ένα κλάσμα από τη φάση του επτανίου μεταφέρεται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών, προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα του ενζύμου. Έστω και ένα μικρό κλάσμα των φωσφολιπιδίων και λυσοφωσφολιπιδίων δύναται να εκχυλιστεί στη φάση του επτανίου και συνεπώς να αλληλεπιδράσει με το κλάσμα των λιπαρών οξέων. Για το λόγο αυτό στο μείγμα εκχύλισης προστίθεται πυριτικό οξύ, προκειμένου να απομακρυνθεί από τη φάση του επτανίου το κλάσμα των φωσφολιπιδίων και λυσοφωσφολιπιδίων. Η εν λόγω μέθοδος μπορεί να μην απαιτεί μεγάλο χρόνο ανάλυσης, ωστόσο χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι τυχόν

εναπομείναι ποσότητα του υποστρώματος ή των λυσοφωσφολιπιδίων στη φάση του επτανίου μετρείται και δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί από αυτή των λιπαρών οξέων. Επίσης, τυχόν ποσότητα λιπαρών οξέων που δεν εκχυλίστηκε από την υδατική φάση δεν μπορεί να ανιχνευθεί.

Μία επίσης διαδεδομένη ραδιομετρική μέθοδος είναι αυτή κατά την οποία γίνεται χρήση του *E. coli*. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μεμβράνες *E. coli* που περιέχουν ραδιοσημασμένα φωσφολιπίδια επωάζονται μαζί με την πηγή του ενζύμου. Στο τέλος της ανάλυσης το μείγμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε φυγόκεντρο προκειμένου να απομακρυνθούν οι μεμβράνες από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια ένα κλάσμα του υπερκειμένου μεταφέρεται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών, προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα του ενζύμου. Η παρούσα μέθοδος λιγότερο χρόνο ανάλυσης από τη μέθοδο Dole, ωστόσο η φωσφολιπιδική σύσταση ρυθμίζεται από το *E. Coli* και δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί. Ένα ακόμη μειονέκτημά της είναι ότι η ποσότητα του λιπιδικού υποστρώματος είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Οι Dennis και συνεργάτες ανίχνευαν ραδιομετρικά ενεργότητες PLA<sub>2</sub> των ομάδων II, IV, V και VI από θηλαστικά [374].

### **1.11.2 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Οι φθορισμομετρικές μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub> είναι πρακτικά εφάμιλλες σε σχέση με τις ραδιομετρικές ως προς την ευαισθησία και μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες PLA<sub>2</sub> που υπάρχουν ενδοκυττάρια. Για το σκοπό αυτό έχουν παρασκευασθεί διάφορα φωσφολιπιδικά υποστρώματα, τα οποία περιέχουν στο μόριο τους μία φθορίζουσα ομάδα. Επίσης έχουν αναπτυχθεί και διάφορα λιπαρά οξέα, που περιέχουν την ίδια φθορίζουσα ομάδα με αυτή των αντίστοιχων υποστρωμάτων. Πολλά από αυτά τα φθορίζοντα υποστρώματα και τα αντίστοιχα φθορίζοντα λιπαρά οξέα διατίθενται στο εμπόριο, ενώ άλλα πρέπει να παρασκευαστούν εργαστηριακά. Τα υποστρώματα αυτά, συνεπώς και τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα, περιέχουν συνήθως στη θέση *sn*-2 μία φθορίζουσα ομάδα, για το λόγο αυτό και είναι ειδικά για τη μελέτη της υδρολυτικής δράσης της PLA<sub>2</sub>.

Οι περισσότερες φθορισμομετρικές μέθοδοι είναι ασυνεχείς και απαιτούν, όπως και οι ραδιομετρικές, διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης από τα αντιδρώντα

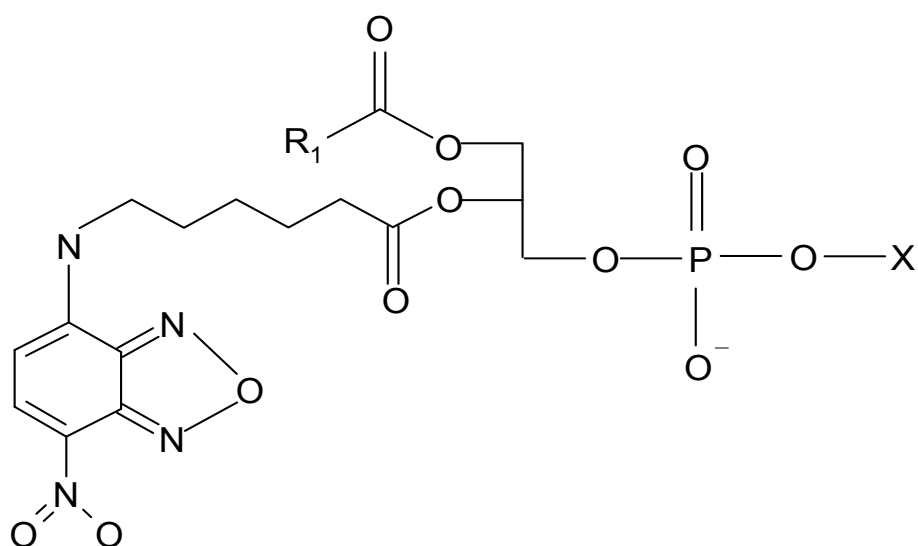
με κάποια χρωματογραφική μέθοδο. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και συνεχείς φθορισμομετρικές μέθοδοι. Σε αυτές τις συνεχείς μεθόδους ο φθορισμός του υποστρώματος πρέπει να είναι διακριτός από τον φθορισμό του προϊόντος. Αυτό ενδεχομένως να απαιτεί τη χρήση διαφορετικών φάσεων. Οι συνθήκες για να επιτευχθεί αυτό ποικίλουν για τα διαφορετικά υποστρώματα. Σε ορισμένες δε περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθεί η προσθήκη ή η απομάκρυνση αλβουμίνης ή και άλλων πρωτεϊνών που είναι φορείς λιπιδίων, προκειμένου τα φθορίζοντα λιπαρά οξέα να μεταφερθούν από τα κυστίδια στο διάλυμα της αντίδρασης. Επίσης, η προσθήκη αναστολέων ή πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει την κατανομή των προϊόντων.

Διάφορα φθορίζοντα υποστρώματα έχουν αναπτυχθεί, τα οποία περιέχουν το πυρένιο ως φθορίζουσα ομάδα στο μόριο τους [375]. Πολλά από τα υποστρώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση ενεργότητας τόσο  $PLA_2$ , όσο και  $PLA_1$ . Οι Radvanyi και συνεργάτες ανέπτυξαν μια συνεχή φθορισμομετρική μέθοδο προσδιορισμού ενεργότητας της φωσφολιπάσης  $A_2$  παρουσία αλβουμίνης ορρού. Χρησιμοποίησαν ως υποστρώματα φωσφολιπίδια που περιείχαν στη θέση *sn*-2 τη φθορίζουσα ομάδα του 10-πυρενυλοδεκανοϊκού οξέος [376]. Οι Thuren και συνεργάτες ανέπτυξαν φθορισμομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό  $PLA_2$  από δείγματα ορρού χρησιμοποιώντας φθορίζον υπόστρωμα που περιείχε στη θέση *sn*-2 ανάλογο του πυρενίου [377]. Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε την υδrolυτική δράση της  $PLA_2$  σε διαφορετικά φθορίζοντα υποστρώματα [378]. Πολλά από τα υποστρώματα αυτά δεν είναι διαθέσιμα στο εμπόριο και πρέπει να παρασκευασθούν εργαστηριακά. Το ίδιο ισχύει και για τα αντίστοιχα φθορίζοντα λιπαρά οξέα

Σε διαφορετικές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί υποστρώματα που περιέχουν το φθορίζον υπόστρωμα της dansyl-PC [379]. Σε μία ιδιαίτερα ευαίσθητη (1 pmol/min) φθορισμομετρική μέθοδο προσδιορισμού ενεργότητας  $PLA_2$  γίνεται χρήση υποστρώματος που περιέχει το βινυλοναφθαλένιο ως φθορίζουσα ομάδα [380]. Η μέθοδος είναι ασυνεχής και απαιτεί διαχωρισμό των προϊόντων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Ο αιθερικός δεσμός στη θέση *sn*-1-του φωσφολιπιδίου κάνει το υπόστρωμα ανθεκτικό σε δράσεις  $PLA_1$  και λυσοφωσφολιπάσης. Ο διαχωρισμός των προϊόντων μπορεί να γίνει και με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας [381].

Μία άλλη σειρά υποστρωμάτων που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιεί στη θέση *sn*-2 την NBD (7-νιτρο-βενζο-2-οξα-1,3-διαζολ-4-υλ) φθορίζουσα ομάδα. Οι Wittenauer

και συνεργάτες προσδιόρισαν παγκρεατική φωσφολιπάση  $A_2$  από δείγματα χοίρου χρησιμοποιώντας την  $C_6$ -NBD-PC (βλέπε και σχήμα 29) ως φθορίζων υπόστρωμα [382]. Η χρήση της NBD-PC ως κατάλληλου υποστρώματος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της ενεργότητας της  $PLA_2$  ενισχύεται και από άλλες ερευνητικές προσπάθειες [383,384].

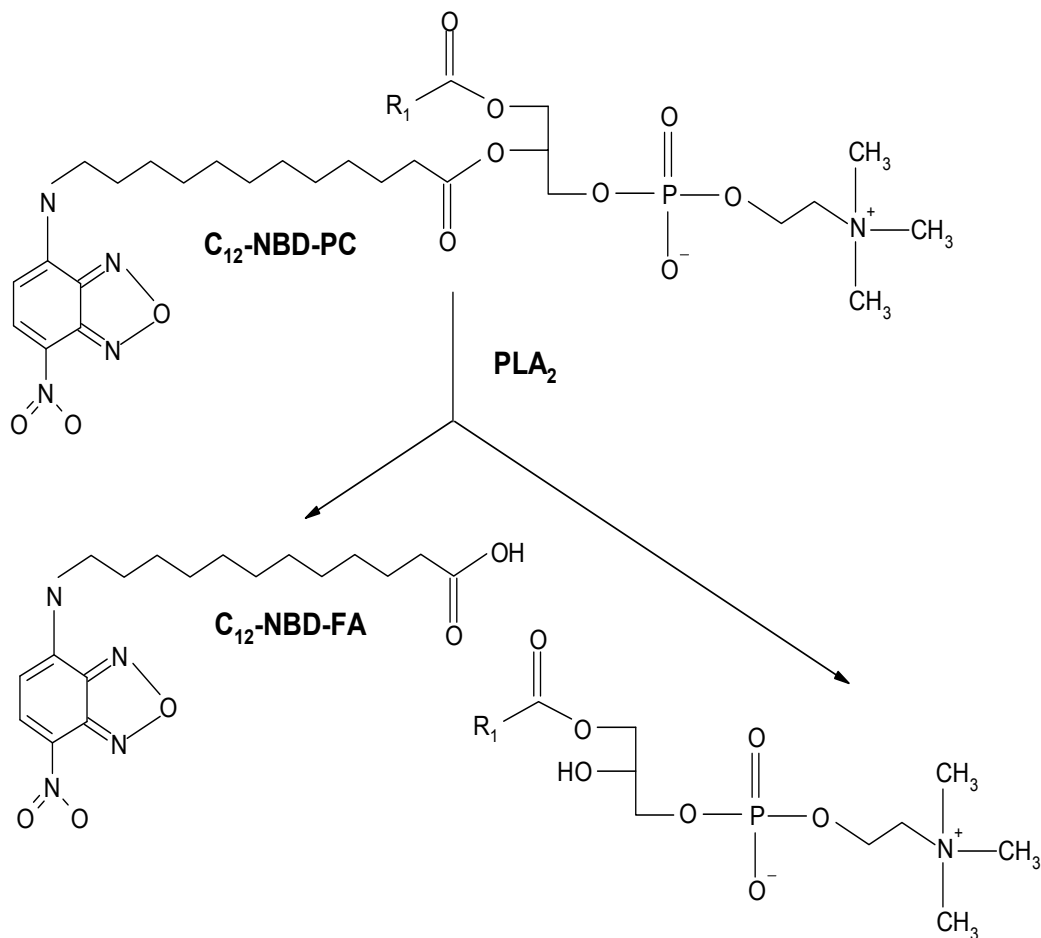


ΣΧΗΜΑ 29.  $C_6$ -NBD-PC.

Οι Λέκκα και συνεργάτες ασχολήθηκαν με τη χρήση των  $C_{12}$ -NBD-PC και  $C_6$ -NBD-PC ως πιθανών υποστρωμάτων για το προσδιορισμό ενεργοτήτων  $PLA_2$  και PAF-AH σε βιολογικά υγρά. Βρήκαν ότι η  $C_{12}$ -NBD-PC παρουσία  $Ca^{2+}$  υδρολύεται μόνο από την  $PLA_2$ , ενώ η  $C_6$ -NBD-PC απουσία  $Ca^{2+}$  υδρολύεται μόνο από την PAF-AH. Με βάση αυτή την ιδιότητα έγινε δυνατός ο ταυτόχρονος φθορισμομετρικός προσδιορισμός των ενεργοτήτων της  $PLA_2$  και της PAF-AH σε βιολογικά δείγματα. Ακόμη, βρέθηκε πως στις συνθήκες ανάλυσης, ο φθορισμός των μονομερών προϊόντων (NBD-FAs) είναι έως 100 φορές μεγαλύτερος του φθορισμού των αντιδρώντων (NBD-PCs), τα οποία βρίσκονται σε μικκυλιακή κατάσταση με συνέπεια την εμφάνιση της σβέσης του φθορισμού, και έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός ενεργότητας των δύο ενζύμων. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, γραμμική για ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων, συνεχής, επαναλήψιμη και δεν απαιτεί το διαχωρισμό των προϊόντων με χρωματογραφική μέθοδο [385]. Η παρουσία των πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά δείγματα αποτελεί ένα μειονέκτημά της και πιο



συγκεκριμένα είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε δείγματα ορού ή πλάσματος [386].



**ΣΧΗΜΑ 30.** Η υδρολυτική δράση της PLA<sub>2</sub> στην C<sub>12</sub>-NBD-PC έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του C<sub>12</sub>-NBD-FA και της λυσο-PC..

Για την άρση των περιορισμών της εν λόγω μεθόδου αναπτύχθηκε μία HPLC-φθορισμομετρική μέθοδος. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα που χαρακτηρίζονταν από υψηλές συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης, σε διάφορες πειραματικές συνθήκες, καθώς επίσης και παρουσία ειδικών αναστολέων PLA<sub>2</sub>. Αξιολογήθηκε στατιστικά τόσο με την φθορισμομετρική μέθοδο, όσο και με ραδιομετρική μέθοδο. Η HPLC-φθορισμομετρική μέθοδος χαρακτηρίστηκε από ακρίβεια, γραμμικότητα και επαναληψιμότητα και εφαρμόστηκε ικανοποιητικά στα δείγματα που δεν μπορούσε να εφαρμοσθεί η φθορισμομετρική μέθοδος [387]. Στο

σχήμα 30 φαίνεται η υδρολυτική δράση της  $PLA_2$  στο υπόστρωμα της  $C_{12}$ -NBD-PC που έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της λυσο μορφής του υποστρώματος και του αντίστοιχου λιπαρού οξέος ( $C_{12}$ -NBD-FA). Παρόμοια είναι και η δράση της PAF-AH στο υπόστρωμα της  $C_6$ -NBD-PC, όπου απελευθερώνεται αντίστοιχα η λυσο μορφή του υποστρώματος και το αντίστοιχο λιπαρό οξύ ( $C_6$ -NBD-FA).

Οι Hendrickson και συνεργάτες ανέπτυξαν φθορισμομετρική μέθοδο με HPLC για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της φωσφολιπάσης  $A_2$ , χρησιμοποιώντας ως φθορίζον υπόστρωμα της dansyl-PC [388]. Όταν η  $PLA_2$  δρα στο υπόστρωμα αυτό απελευθερώνεται η λυσο-dansyl-PC. Με στήλη ανάστροφης φάσης και με σύστημα έκλουσης εξανίου-ισοπροπανόλης-νερού (6:8:1.6, v/v/v) προσδιόρισαν τις κορυφές της δανσυλο-PC και λυσο-δανσυλο-PC. Η μέθοδος είναι ευαίσθητη και συνεχής, ωστόσο μειονεκτεί καθώς ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου γίνεται έμμεσα.

## **2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

### **A. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ**

#### **2.A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ**

Όταν ένα μόριο φωτοδιεγείρεται απορροφώντας ένα φωτόνιο προσλαμβάνει ενέργεια. Η ενέργεια αυτή δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο αλλά δύναται να αποβληθεί και με την εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια (luminescence). Η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός (fluorescence), αν η εκπομπή γίνεται σε χρονικό διάστημα  $10^{-9}$  έως  $10^{-6}$  sec μετά τη διέγερση και ως φωσφορισμός (phosphorescence), όταν μεσολαβεί χρονική καθυστέρηση  $10^{-4}$  έως  $10^1$  sec μέχρι την εκπομπή. Ένας τρίτος τύπος φωταύγειας είναι η χημειοφωταύγεια, η οποία βασίζεται στην εκπομπή διεγερμένου σωματιδίου, το οποίο παράγεται κατά τη διάρκεια μίας χημικής αντίδρασης.

Η υπεύθυνη για το φθορισμό ηλεκτρονική ενεργειακή μετάπτωση δεν χαρακτηρίζεται από μεταβολή του ηλεκτρονικού spin. Για το λόγο αυτό και ο φθορισμός είναι τόσο σύντομο χρονικά φαινόμενο. Από την άλλη, η εκπομπή φωσφορισμού συνοδεύεται από μεταβολή του ηλεκτρονικού spin.

Το φαινόμενο της φωταύγειας των μορίων είναι πολύπλοκο. Περιλαμβάνει ταυτόχρονα ηλεκτρονικές, δονητικές και περιστροφικές μεταπτώσεις, γεγονός που δείχνει ότι ο συνολικός αριθμός των διεγέρσεων είναι πολύ μεγάλος.

#### **2.A.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ**

Το φαινόμενο του φθορισμού είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο. Τόσο η μοριακή δομή, όσο και το χημικό περιβάλλον καθορίζουν αν θα φθορίζει μία ουσία ή όχι. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το φαινόμενο του φθορισμού συνοψίζονται παρακάτω.

**Κβαντική απόδοση** (quantum yield) φθορισμού. Η κβαντική απόδοση ουσιαστικά είναι ο λόγος των μορίων που φθορίζουν προς τον συνολικό αριθμό των διεγερμένων μορίων. Σε μόρια που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα φθορισμού, η

κβαντική απόδοση πλησιάζει τη μονάδα. Δηλαδή η μεγάλη πλειοψηφία των διεγερμένων μορίων φθορίζει. Ένα τέτοιο μόριο είναι η φλουορεσκεΐνη. Αντίθετα, για τις ουσίες που φθορίζουν ελάχιστα ή καθόλου η τιμή της κβαντικής απόδοσης τείνει στο μηδέν.

Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα μόριο έχει ως αποτέλεσμα ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις του τύπου  $\eta-\pi^*$  ή  $\pi-\pi^*$ , όπου οι συμβολισμοί  $\eta$ ,  $\pi$  και  $\pi^*$  αντιστοιχούν σε μη δεσμικά, δεσμικά και αντιδεσμικά τροχιακά αντίστοιχα. Οι ηλεκτρονιακές αυτές μεταπτώσεις έχουν ως αποτέλεσμα τη μετάβαση του μορίου από τη θεμελιώδη σε διεγερμένες καταστάσεις. Η κβαντική απόδοση είναι μεγαλύτερη στις μεταπτώσεις  $\pi-\pi^*$ . Ο φθορισμός εμφανίζεται συχνότερα όταν λαμβάνουν χώρα τέτοιες μεταπτώσεις, επειδή αυτές συνοδεύονται από μικρότερη χρονική διάρκεια (είναι της τάξης του  $10^{-9}$  έως  $10^{-7}$  sec, ενώ για τις μεταπτώσεις  $\eta-\pi^*$  είναι της τάξης του  $10^{-7}$  έως  $10^{-6}$  sec) [389].

**Δομή των μορίων.** Θεμελιώδης προϋπόθεση για την εμφάνιση του φθορισμού είναι η ύπαρξη τέτοιας δομής στο μόριο, ώστε αυτό να μπορεί να απορροφά ακτινοβολία στο υπεριώδες ή στο ορατό. Σωματίδια που παρουσιάζουν το φαινόμενο του φθορισμού ή του φωσφορισμού περιέχουν στο μόριο τους ομάδα δότη ηλεκτρονίων (αμίνες, αλκοόλες, ετεροάτομα που περιέχουν ζεύγος ηλεκτρονίων σθένους μη δεσμικών ή  $\pi$  ηλεκτρονίων) ή σύστημα διπλών δεσμών (αρωματικοί δακτύλιοι ή συζυγή διένια). Οι περισσότεροι μη υποκατεστημένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες φθορίζουν σε διαλύματα, ενώ η κβαντική απόδοση αυξάνεται κατά κανόνα με αύξηση του αριθμού των δακτυλίων. Οι απλές ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως η πυριδίνη και το φουράνιο δεν φθορίζουν. Επίσης, ομάδες δότες ηλεκτρονίων όπως η  $-\text{OH}$  και η  $-\text{NH}_2$  αυξάνουν τον φθορισμό, ενώ ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων, όπως η  $-\text{COOH}$  τον ελαττώνουν. Κατά την αρωματική υποκατάσταση με αλογόνα, παρατηρείται ελάττωση του φθορισμού με αύξηση της σχετικής μοριακής μάζας του αλογόνου.

**Διαλύτης.** Ο χρησιμοποιούμενος για την ανάλυση διαλύτης ή σύστημα διαλυτών δεν πρέπει να απορροφά την ακτινοβολία διέγερσης ή φθορισμού. Επίσης, ο φθορισμός αυξάνεται με αύξηση της πολικότητας και του ιξώδους του διαλύτη. Ακόμη ο φθορισμός μειώνεται σε διαλύτες που περιέχουν βαρέα άτομα στο μόριο τους.

**pH.** Το pH επηρεάζει σημαντικά τον φθορισμό. Ανάλογα με την τιμή του μπορεί μη δεσμικά ηλεκτρόνια να προσλαμβάνουν πρωτόνια. Με το τρόπο αυτό ελαττώνεται η ικανότητα φθορισμού της ουσίας. Υπάρχουν ουσίες που φθορίζουν σε αλκαλικό pH, ενώ σε όξινο χάνουν αυτή τους την ιδιότητα.

**Παρουσία ξένων μορίων.** Όταν κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιας ουσίας υπάρχουν ξένα μόρια, τα οποία μπορεί να αντιδρούν με την υπό μελέτη ουσία ή να φθορίζουν τα ίδια ή να απορροφούν μέρος της ακτινοβολίας διέγερσης ή φθορισμού τότε η ένταση του φθορισμού αλλοιώνεται σημαντικά.

**Θερμοκρασία.** Αύξηση της θερμοκρασίας κατά κανόνα συνεπάγεται μείωση της έντασης του φθορισμού. Αυτό συμβαίνει διότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει και την τυχαία κίνηση των μορίων συνεπώς και την πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ τους. Με το τρόπο αυτό τα φθορίζοντα μόρια χάνουν μέρος της ενέργειας τους. Η επίδραση της θερμοκρασίας κατά το φθορισμομετρικό προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, διότι πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου. Μπορεί δηλαδή αυξάνοντας τη θερμοκρασία να έχουμε μείωση της έντασης του φθορισμού, όμως μπορεί ταυτόχρονα να αυξάνεται η ολική ενζυμική ενεργότητα, λόγω της βελτιστοποίησης της καταλυτικής δράσης του ενζύμου.

**Δομική ακαμψία.** Έχει βρεθεί ότι ο φθορισμός ευνοείται στη περίπτωση μορίων που χαρακτηρίζονται από άκαμπτη δομή.

**Διαλυμένο οξυγόνο.** Η παρουσία διαλυμένου οξυγόνου μειώνει την ένταση φθορισμού ενός διαλύματος.

#### **Συγκέντρωση.**

Σε αραιά διαλύματα η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού (F) δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$F = k\Phi P_0 \epsilon b c = k' c, \quad (1)$$

όπου  $\Phi$  είναι ο συντελεστής κβαντικής απόδοσης,  $P_0$  είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,  $\epsilon$  είναι η μοριακή απορροφητικότητα,  $b$  είναι το πάχος της κυψελίδας,  $c$  είναι η συγκέντρωση της ουσίας και  $k'$  είναι σταθερά που εξαρτάται από το όργανο μέτρησης. Με βάση τη σχέση (1) η γραφική παράσταση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας θα είναι ευθεία γραμμή μέχρι μια μέγιστη συγκέντρωση  $c_{\max} = 0.05/\epsilon b$ . Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της  $c_{\max}$  η καμπύλη αναφοράς καθίσταται μη γραμμική.

Για το λόγο αυτό και οι αναλύσεις των διαφόρων ουσιών θα πρέπει να γίνονται σε συγκεντρώσεις μικρότερες της  $c_{\max}$  [390].

### **2.A.3 ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ**

Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μίας ουσίας λαμβάνονται δύο είδη φασμάτων, και πιο συγκεκριμένα τα φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής. Κατά κανόνα ο φθορισμός εμφανίζεται σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από αυτά της διέγερσης.

Η γραφική παράσταση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού σε συνάρτηση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης (για σταθερό μήκος κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού) αποτελεί το φάσμα διέγερσης. Η γραφική παράσταση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού σε συνάρτηση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού (για σταθερό μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης) αποτελεί το φάσμα εκπομπής.

Η καταγραφή των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής αποτελεί πρωταρχική και θεμελιώδη διαδικασία κατά τη φθορισμομετρική μελέτη των διαφόρων ουσιών. Με το τρόπο αυτό βρίσκονται τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα. Τα φάσματα αυτά λαμβάνονται με τη βοήθεια φασματοφθορισμομέτρου που περιέχει δύο μονοχρωμάτορες, έναν για την ακτινοβολία διέγερσης και το δεύτερο για την ακτινοβολία φθορισμού.

### **2.A.4 ΣΒΕΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (QUENCHING)**

Όταν παρατηρείται μείωση στην ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού, η οποία και δεν είναι αναμενόμενη, αυτή αποδίδεται με το γενικό όρο σβέση ή απόσβεση φθορισμού (quenching). Αυτό έχει σα συνέπεια να εμφανίζονται αποκλίσεις από τη σχέση (7) και η πρότυπη καμπύλη να μην είναι γραμμική.

Η σβέση του φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες. Μεταξύ αυτών είναι η αποδιέγερση των διεγερμένων μορίων της φθορίζουσας ουσίας. Ακόμη, μια πολύ συνηθισμένη αιτία εμφάνισης της σβέσης είναι η απορρόφηση της ακτινοβολίας διέγερσης από την ίδια τη φθορίζουσα ουσία, η οποία-σπανιότερα όμως- μπορεί να απορροφά ακόμη και την ακτινοβολία φθορισμού. Το τελευταίο φαινόμενο είναι γνωστό ως φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (inner filter effect). Επίσης, αν η

ακτινοβολία διέγερσης είναι πλούσια σε ενέργεια μπορεί η φθορίζουσα ουσία να φωτοδιασπάται, με συνέπεια την εμφάνιση του φαινομένου της σβέσης του φθορισμού. Για να μειωθεί η πιθανότητα φωτοδιάσπασης οι μετρήσεις πρέπει να γίνονται όσο το δυνατόν συντομότερα [415].

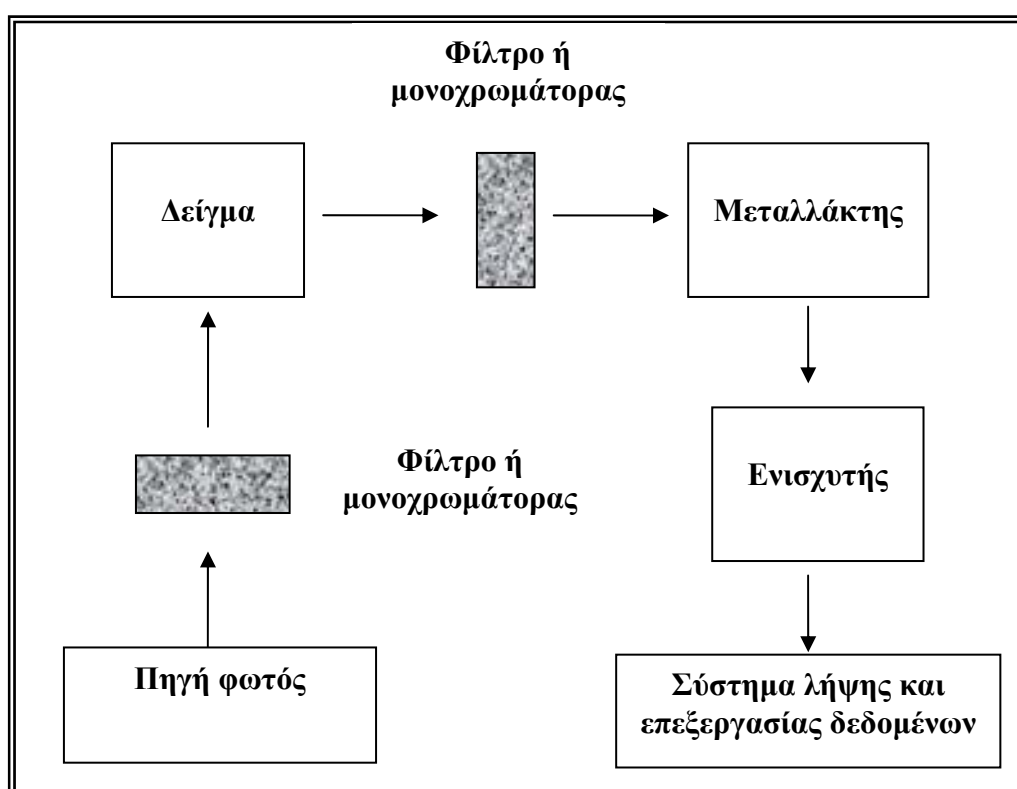
Για τη μείωση, όχι όμως και την εξάλειψη, των σφαλμάτων που εισάγονται κατά την φθορισμομετρική ανάλυση μίγματος ουσιών, συνίσταται, αντί της κατασκευής πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η προσθήκη εσωτερικού προτύπου. Συνίσταται δηλαδή η προσθήκη στο μείγμα της αντίδρασης ποσότητας της προσδιοριζόμενης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό δύναται να αυξηθεί η ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης μεθόδου. Βεβαίως, η ποσότητα και η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου θα πρέπει να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή στο άγνωστο διάλυμα.

## **2.4.5 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ**

Για τη μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού χρησιμοποιούνται δύο τύποι οργάνων, τα φθορισμόμετρα και τα φασματοφθορισμόμετρα. Τα πρώτα διαθέτουν φίλτρα για την επιλογή των μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής, ενώ τα δεύτερα διαθέτουν έναν ή δύο μονοχρωμάτορες.

Σήμερα, όλα τα όργανα μέτρησης φθορισμού διαθέτουν οπτικά συστήματα διπλής δέσμης, έτσι ώστε να περιορίζονται οι διακυμάνσεις της έντασης της πηγής. Ακολούθως περιγράφεται συνοπτικά η αρχή λειτουργίας ενός φθορισμομέτρου ή φασματοφθορισμομέτρου. Η προερχόμενη από τη πηγή ακτινοβολία διέρχεται αρχικά από ένα φίλτρο διέγερσης ή έναν μονοχρωμάτορα. Το φίλτρο αυτό ή ο μονοχρωμάτορας επιτρέπει τη διόδο μόνο εκείνου του μέρους της ακτινοβολίας, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση των μορίων του δείγματος της φθορίζουσας ουσίας. Το υπόλοιπο μέρος της ακτινοβολίας, που είναι και το συντριπτικά μεγαλύτερο, διέρχεται από τη κυψελίδα του δείγματος χωρίς όμως να απορροφηθεί από αυτό. Με τον τρόπο αυτό δηλαδή ουσιαστικά αποκλείεται η διέλευση της ακτινοβολίας εκπομπής φθορισμού. Στη συνέχεια εκπέμπεται από το δείγμα η ακτινοβολία φθορισμού προς όλες τις κατευθύνσεις. Συνήθως όμως αυτή μετρείται υπό γωνία 90 μοιρών ως προς την ακτινοβολία διέγερσης. Αυτό γίνεται για να διακριθεί επαρκώς η ακτινοβολία διέγερσης από την ακτινοβολία φθορισμού, αλλά

και για να περιοριστεί σημαντικά η σκέδαση. Η ακτινοβολία φθορισμού είναι ασθενέστερη της ακτινοβολίας διέγερσης και για αυτό οι μετρήσεις γίνονται υπό γωνία. Ακολούθως, η ακτινοβολία φθορισμού διέρχεται από το φίλτρο εκπομπής ή δεύτερο μονοχρωμάτορα και προσπίπτει σε κατάλληλο μεταλλάκτη, που συνήθως είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής. Με τον τρόπο αυτό το σήμα εξόδου του ανιχνευτή ενισχύεται και καταγράφεται σε κατάλληλο όργανο μέτρησης. Για να βελτιωθεί ο λόγος σήματος/θόρυβο οι μεταλλάκτες μπορούν να δρουν ως απεριθμητές φωτονίων.



***ΣΧΗΜΑ 31.** Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων ενός φθορισμομέτρου ή ενός φασματοφθορισμομέτρου.*

Ορισμένα φθορισμόμετρα και φασματοφθορισμόμετρα έχουν τη δυνατότητα μηδενισμού του βασικού φθορισμού (auto zero), ενώ άλλα διαθέτουν ένα αναλογικό κύκλωμα διαίρεσης. Επιπλέον, τα σύγχρονα φασματοφθορισμόμετρα είναι εφοδιασμένα με δύο μονοχρωμάτορες, έτσι ώστε να είναι δυνατή η λήψη τόσο του φάσματος διέγερσης, όσο και του φάσματος εκπομπής.

Για τη μέτρηση του φθορισμού χρησιμοποιούνται κυψελίδες κατασκευασμένες από ύαλο ή χαλαζία. Σε ορισμένα όργανα υπάρχει η δυνατότητα τοποθέτησης



διαμερίσματος κυψελίδων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η φθορισμομετρική ανάλυση περισσότερων του ενός δειγμάτων, μειώνοντας το χρόνο ανάλυσης με τον τρόπο αυτό. Σημαντική όμως καινοτομία είναι η δυνατότητα τοποθέτησης πλάκας. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα και υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, ενώ παράλληλα μειώνεται σημαντικά ο συνολικός όγκος των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων και δειγμάτων. Η δυνατότητα αυτή μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμα στα κλινικά χημικά εργαστήρια, έτσι ώστε μέσα σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα να αναλυθεί ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δειγμάτων. Στο σχήμα 31 απεικονίζονται τα βασικά τμήματα ενός φθορισμομέτρου ή φασματοφθορισμομέτρου.

## **B. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ**

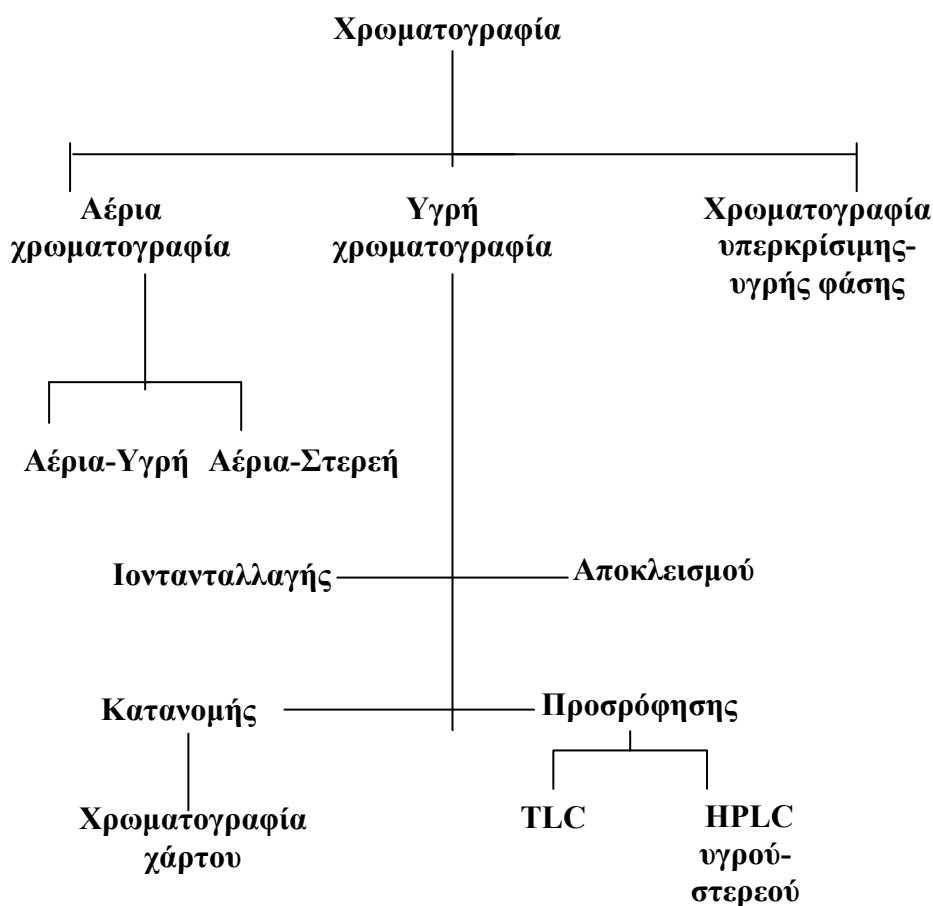
### **2.B.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ**

Οι χρωματογραφικές τεχνικές αποτελούν ίσως τις πιο διαδεδομένες μεθόδους διαχωρισμού και προσδιορισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες στα συστατικά τους. Υπάρχουν περιπτώσεις δειγμάτων που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλο τρόπο, πλην των μεθόδων χρωματογραφίας. Το όνομα οφείλεται στο Ρώσο επιστήμονα M. Tswett, ο οποίος πέτυχε το διαχωρισμό φυσικών χρωστικών. Συνδυάζουν την απλότητα, την ακρίβεια, την ευαισθησία, την μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, την επαναληψιμότητα, την δυνατότητα ανάλυσης μικρών δειγμάτων αλλά και ένα ευρύ φάσμα πολλαπλών εφαρμογών. Οι ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, της στατικής φάσης (stationary phase) και της κινητής (mobile phase), κατά μήκος της στατικής φάσης. Οι ουσίες που είναι διαλυμένες στην κινητή φάση εξαναγκάζονται σε κίνηση κατά μήκος της στατικής φάσης, με ταχύτητα ανάλογη με τη σχετική τους συγγένεια προς τις ουσίες που αποτελούν τη στατική φάση. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται με μικρότερη ταχύτητα, σε σχέση με τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα, τα οποία με τη σειρά τους κινούνται ταχύτερα. Το αποτέλεσμα αυτών των διαφορών είναι ο διαχωρισμός των συστατικών και εν συνεχεία ο ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός τους.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ουσιών (αναλυτική HPLC), στην ανάλυση ιχνών και σε παρασκευαστικούς σκοπούς (παρασκευαστική HPLC) για την απομόνωση και των καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων ουσιών.

## **2.B.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης, τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης, το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά το διαχωρισμό ακόμα και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος.



ΣΧΗΜΑ 32. Κυριότερες χρωματογραφικές τεχνικές [391].

Αναλυτικότερα, με βάση τη φύση της κινητής φάσης έχουμε την υγρή (liquid chromatography-LC) την αέρια χρωματογραφία (gas chromatography- GC), και την χρωματογραφία υπεγκρίσιμου ρευστού (supercritical-fluid chromatography). Οι δύο πρώτες τάξεις υποδιαιρούνται περαιτέρω ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης. Με βάση τη μορφή της στατικής φάσης οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία στήλης και σε επίπεδη χρωματογραφία (planar chromatography). Στη πρώτη, η στατική φάση συγκρατείται σε μία στενή στήλη ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στήλη με τη βοήθεια πίεσης. Στην επίπεδη χρωματογραφία, η στατική φάση είναι είτε μια λωρίδα χάρτου είτε μια στιβάδα στερεού στερεωμένη σε μια υάλινη συνήθως πλάκα, ενώ η κινητή φάση κινείται μέσω της στατικής με τριχοειδή φαινόμενα ή με τη βοήθεια της βαρύτητας. Ανάλογα με το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά το διαχωρισμό οι τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, ιονανταλλαγής, κατανομής, μοριακού αποκλεισμού και συγγένειας. Στο σχήμα 32 συνοψίζονται, με τη μορφή διαγράμματος, οι κυριότερες χρωματογραφικές τεχνικές. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε αποκλειστικά με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (High Pressure ή Performance Liquid Chromatography, HPLC).

### **2.B.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ**

Η είναι ίσως η πιο διαδεδομένη από τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού μείγματος ουσιών. Είναι μία μέθοδος διαχωρισμού ή/και ποσοτικού προσδιορισμού μίγματος ουσιών με διαδοχικές προσροφήσεις-εκροφήσεις ή κατανομές μεταξύ μιας υγρής κινητής φάσης και μιας στερεής ή υγρής στατικής φάσης με τη βοήθεια πίεσης μεγαλύτερης της ατμοσφαιρικής. Ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης η HPLC διακρίνεται σε HPLLC (χρωματογραφία υγρού / υγρού, κατανομής) και HPLSC (χρωματογραφία υγρού / στερεού, προσρόφησης).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης χρησιμοποιήθηκε αρχικά τη δεκαετία του 1960 και από την επόμενη δεκαετία άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως. Παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων χρωματογραφικών τεχνικών όπως ο σύντομος χρόνος ανάλυσης, η ικανότητα ανάλυσης μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ουσιών, η υψηλή ευαισθησία, η ακρίβεια, το χαμηλό όριο ανίχνευσης, η δυνατότητα

ανάλυσης ουσιών που συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον της βιομηχανίας και της έρευνας, η δυνατότητα αυτοματοποίησης της, αλλά και διάφορα άλλα.

#### **2.B.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC**

Στην HPLC χρησιμοποιούνται αντλίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν πιέσεις ακόμη και μερικών εκατοντάδων ατμοσφαιρών. Αυτό έχει σα συνέπεια να απαιτείται πολύπλοκος εξοπλισμός, σε σχέση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, ο οποίος αυξάνει σημαντικά το κόστος ανάλυσης. Ωστόσο το μειονέκτημα αυτό αντισταθμίζεται από την πληθώρα των πλεονεκτημάτων της. Τα βασικά τμήματα μιας HPLC αποτελούνται από τα δοχεία κινητής φάσης, την αντλία, τη μονάδα εισαγωγής του δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και έναν κατάλληλο ολοκληρωτή για τη λήψη και επεξεργασία του σήματος. Στο σχήμα 33 απεικονίζονται τα βασικά τμήματα μιας HPLC, για τα οποία θα αναφερθούμε πολύ συνοπτικά παρακάτω.

**Δοχεία κινητής φάσης-Διαλύτες.** Μία σύγχρονη μονάδα HPLC αποτελείται από ένα ή περισσότερα δοχεία που περιέχουν την κινητή φάση. Τα δοχεία αυτά είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή ανοξείδωτο ατσάλι, η δε χωρητικότητά τους είναι τουλάχιστον 500 mL. Συνδέονται με τη στήλη με ειδικούς πλαστικούς σωλήνες, οι οποίοι είναι εφοδιασμένοι με κατάλληλο φίλτρα, έτσι ώστε να εμποδίζεται η μεταφορά σωματιδίων και αδιάλυτων αερίων προς την αντλία, που θα είχε ως συνέπεια πιθανές βλάβες στην αντλία, στη μονάδα εισαγωγής του δείγματος, ακόμη και έμφραξη της στήλης.

Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών πρέπει να απαερωθούν πριν την ανάλυση για την απομάκρυνση του περιεχόμενου αέρα και την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην ομαλή ροή της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη και στην απόδοση του ανιχνευτή. Οι απαερωτές που χρησιμοποιούνται μπορεί να αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης ή από διάταξη που θερμαίνει και αναδεύει ταυτόχρονα τους διαλύτες [392]. Ο απλούστερος τρόπος όμως απαέρωσης περιλαμβάνει την διαβίβαση στο σύστημα των διαλυτών μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου, συνήθως He, χαμηλής διαλυτότητας, υπό πίεση (ο τρόπος αυτός απαέρωσης απεικονίζεται στο σχήμα 33). Το αέριο αυτό

πρέπει να μην αντιδρά με τα συστατικά της κινητής φάσης και να είναι αδιάλυτο σε αυτή.

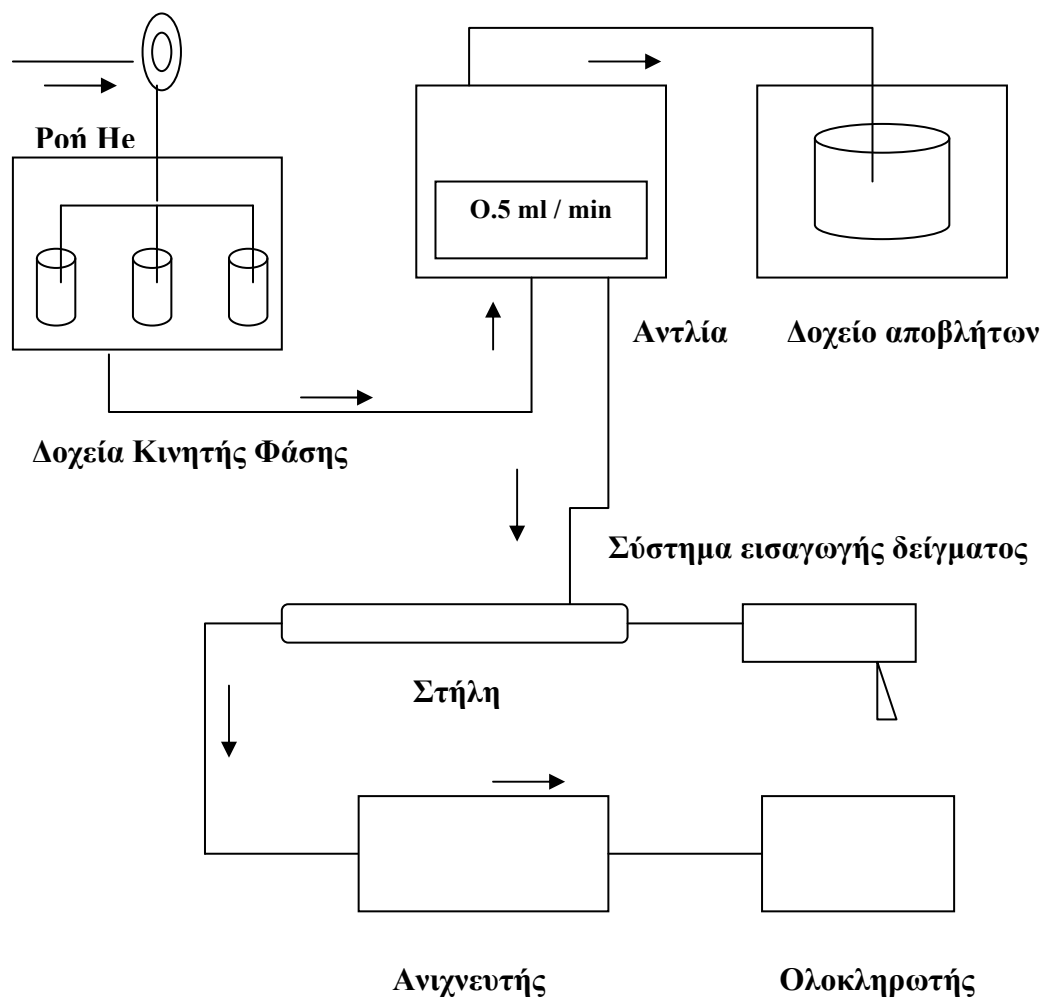
Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και πρέπει πριν τη χρήση τους να έχουν διαλυθεί από μικροπορώδες φίλτρο (millipore filter), υπό κενό. Η επιλογή του συστήματος των διαλυτών εξαρτάται από την πολικότητά και την εκλεκτικότητά τους. η πολικότητα των διαλυτών θα πρέπει να διαφέρει από αυτή της κινητής φάσης, έτσι ώστε ο διαχωρισμός να είναι ικανοποιητικός.

Όταν για την ανάλυση χρησιμοποιείται διαλύτης ή σύστημα διαλυτών σταθερής σύστασης σε όλη τη διάρκεια αυτής, τότε ο διαχωρισμός ονομάζεται ισοκρατική έκλουση (isocratic elution). Όταν χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα συστήματα διαλυτών, τα οποία διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα, τότε ο διαχωρισμός ονομάζεται βαθμωτή έκλουση (gradient elution). Η χρησιμοποίηση βαθμωτής έκλουσης αυξάνει σημαντικά την απόδοση του διαχωρισμού και για το λόγο αυτό προτιμάται σε αρκετές περιπτώσεις. Ο λόγος των διαλυτών που χρησιμοποιούνται άλλοτε με προγραμματισμένο τρόπο και άλλοτε με μια σειρά διαφορετικών κάθε φορά βημάτων. Η βαθμωτή έκλουση δύναται επίσης να μειώσει σημαντικά και τον απαιτούμενο χρόνο για το διαχωρισμό. Οι σύγχρονες συσκευές HPLC είναι εφοδιασμένες με κατάλληλες βαλβίδες, οι οποίες επιτρέπουν τη ροή διαλύτη από δύο ή και περισσότερα δοχεία διαλυτών σε αναλογίες που μπορούν να μεταβάλλονται συνεχώς.

**Αντλία (pump).** Η αντλία έχει σα σκοπό να τροφοδοτεί τη στήλη με το σύστημα των διαλυτών έκλουσης, υπό αυστηρά καθορισμένη ροή. Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται στην HPLC θα πρέπει να αντέχουν πιέσεις έως και 600 psi. Οι ταχύτητες ροής που εφαρμόζονται κυμαίνονται μεταξύ 0.1 και 10 mL/min, ενώ η επαναληψιμότητα της ροής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0.5 %. Περιλαμβάνουν τμήματα που είναι ανθεκτικά στη διάβρωση, ενώ επίσης θα πρέπει να είναι ανθεκτικές έναντι μεγάλου εύρους οργανικών και ανόργανων διαλυτών [393].

Υπάρχουν τρεις τύποι αντλίας και πιο συγκεκριμένα οι παλινδρομικές ή περιστροφικές αντλίες (reciprocating pumps), οι αντλίες σύριγγας και οι αντλίες σταθερής πίεσης. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος τύπος αντλίας είναι η περιστροφική, η σχηματική παράσταση της οποίας απεικονίζεται στο σχήμα 34. Χαρακτηρίζονται από μικρούς εσωτερικούς όγκους, μπορούν να αναπτύξουν πίεση

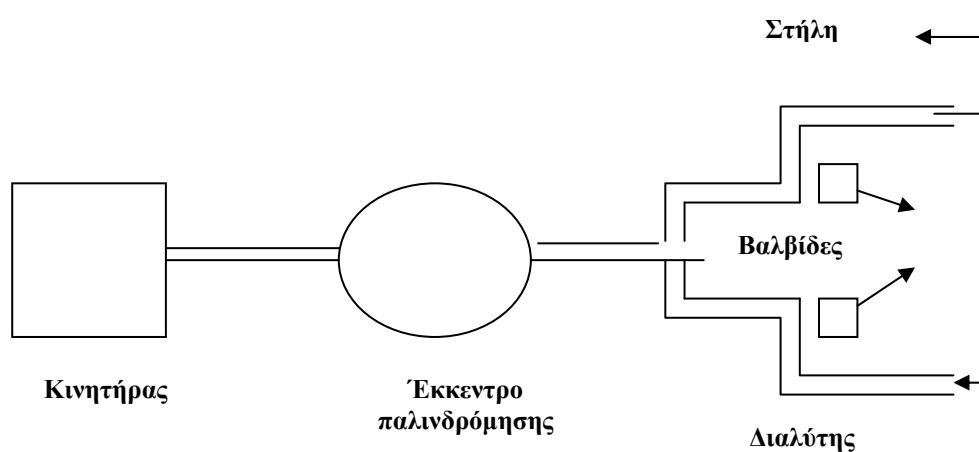
εξόδου μέχρι και 10,000 psi, έχουν σταθερές ταχύτητες ροής και μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν για βαθμωτή έκλουση [394].



ΣΧΗΜΑ 33. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων μιας διάταξης HPLC.

**Σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Αποτελεί το σημείο όπου εισάγεται το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα. Οι σύγχρονες διατάξεις HPLC περιέχουν κατάλληλες βαλβίδες, οι οποίες έχουν την δυνατότητα εισαγωγής από 5 έως και 500  $\mu$ l δείγματος. Η βαλβίδα έχει δύο θέσεις, τη θέση πληρώσεως (load) και τη θέση εισαγωγής του δείγματος (inject). Υπάρχει η δυνατότητα περιστροφικής κίνησης της βαλβίδας μεταξύ των δύο αυτών θέσεων.

Για την εισαγωγή του δείγματος, η βαλβίδα περιστρέφεται στη θέση πλήρωσης και με το τρόπο αυτό σταματά προς στιγμή η ροή του διαλύτη προς τη στήλη. Το δείγμα εγχύεται με τη βοήθεια κατάλληλης σύριγγας και ακολούθως παγιδεύεται στη θηλιά (loop) του δείγματος. Η βαλβίδα περιστρέφεται στη θέση εισαγωγής και αποκαθίσταται η ροή του διαλύτη προς τη στήλη, ο οποίος διέρχεται από τη θηλιά του δείγματος παρασύροντας το τελευταίο προς τη στήλη. Κατά την έγχυση του δείγματος δεν πρέπει να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος.



*ΣΧΗΜΑ 34. Σχηματική αναπαράσταση της παλινδρομικής αντλίας. Ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα κινούμενο μηχανικό έμβολο.*

**Στήλες.** Κατά κανόνα οι στήλες της HPLC είναι σωλήνες μικρής διαμέτρου κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα. Το μήκος τους είναι, κατά κανόνα, από 10 έως 30 cm., η εσωτερική διάμετρος κυμαίνεται από 4 έως 10 mm, ενώ το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης είναι 5 με 10  $\mu\text{m}$ . Το υλικό πλήρωσης της στήλης μπορεί να είναι πορώδες με βάση το πυριτικό οξύ, μη πορώδες ή σκληρό πήγμα με βάση το πολυστυρόλιο. Τέτοιου είδους στήλες περιέχουν 40,000 έως 60,000 πλάκες/m. Στο εμπόριο υπάρχει η δυνατότητα αγοράς και στηλών με μικρότερες διαστάσεις, οι οποίες περιέχουν μέχρι και 100,000 πλάκες/m. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εξοικονόμηση στην κατανάλωση διαλυτών.

Για την παράταση ζωής της στήλης χρησιμοποιείται, μεταξύ της βαλβίδας εισαγωγής του δείγματος και της στήλης, μία προστατευτική στήλη (guard column) ή

προ-στήλη (pre-column). Η τελευταία έχει μήκος 5 με 10 cm και είναι κατασκευασμένη με το ίδιο υλικό με το οποίο είναι κατασκευασμένη και η κυρίως στήλη. Ο ρόλος της είναι να συγκρατεί ουσίες, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά στη στατική φάση της στήλης και μειώνουν με τον τρόπο αυτό τόσο την απόδοση της στήλης, όσο και την διάρκεια ζωής της.

**Ανιχνευτές.** Ο ανιχνευτής μίας HPLC ουσιαστικά ελέγχει το προϊόν του διαχωρισμού ανά πάσα στιγμή. Θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική ευαισθησία, σταθερότητα, γραμμική απόκριση για ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων, αξιοπιστία και αναπαραγωγικότητα.

Ανάλογα με τη φύση των προς ανάλυση ουσιών και την επιθυμητή ευαισθησία ο ανιχνευτής μπορεί να είναι φωτόμετρο UV-ορατού, διόδου λυχνίας (diode array detector), φθορισμομετρικός, ηλεκτροχημικός και άλλοι.

Η HPLC υγρού/υγρού μπορεί να είναι είτε κανονικής (normal) είτε ανάστροφης (reversed) φάσης. Στην κανονική φάση το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι πιο πολικό από το διαλύτη έκλουσης, ενώ στην ανάστροφη φάση το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι λιγότερο πολικό από το διαλύτη έκλουσης. Στην ανάστροφη φάση η στήλη αποτελείται από πολυμερή διοξειδίου του πυριτίου (silica) πάνω στα οποία είναι προσδεμένες αλειφατικές αλυσίδες 4, 8 και 18 ατόμων άνθρακα (C4, C8 και C18 αντίστοιχα). Οι στήλες αυτές είναι κατάλληλες για μόρια μεσαίας πολικότητας. Όσο πιο υδρόφοβη είναι η σταθερή φάση (μεγάλη ανθρακική αλυσίδα) τόσο πιο ισχυρά συγκρατούνται οι λιπόφιλες ουσίες.

Με HPLC κανονικής φάσης, για παράδειγμα, μπορούμε να διαχωρίσουμε τάξεις φωσφολιπιδίων, ενώ με HPLC ανάστροφης φάσης μπορούμε να διαχωρίσουμε τα μοριακά είδη της κάθε τάξης. Ενδεικτικά για διαχωρισμούς φωσφολιπιδίων με τεχνικές είτε κανονικής, είτε ανάστροφης φάσης αναφέρουμε τις ακόλουθες εργασίες [395,396,397,398].

## Γ. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

### **2.Γ.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ**

Η ακινητοποίηση βιομορίων αναφέρεται στη δέσμευση (παγίδευση) αυτών σε αδρανή αδιάλυτα υλικά με τρόπο ώστε τα βιομόρια να διατηρούν τις ιδιότητές τους



για μεγάλο χρονικό διάστημα και να υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα ακινητοποίησης ολόκληρων κυττάρων. Η ακινητοποίηση βιομορίων βρίσκει σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία, στην αναλυτική χημεία, στη βιοχημεία κ.α. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της είναι η ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

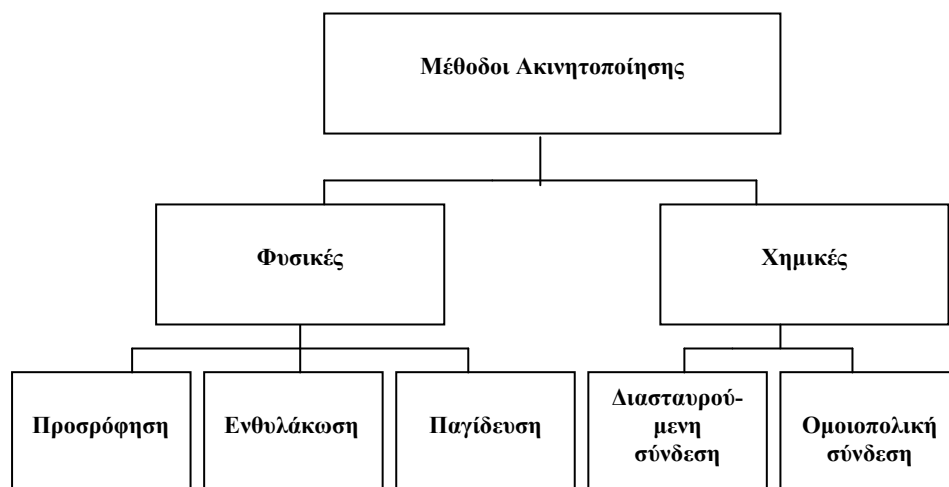
Κύρια πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων βιομορίων είναι η αύξηση της ανθεκτικότητάς τους κατά τη μεταβολή διαφόρων φυσικοχημικών παραγόντων, όπως pH ή θερμοκρασία, η μείωση του κόστους ανάλυσης, λόγω επαναχρησιμοποίησης τους και η αύξηση του χρόνου αποθήκευσής τους.

## **2.Γ.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ**

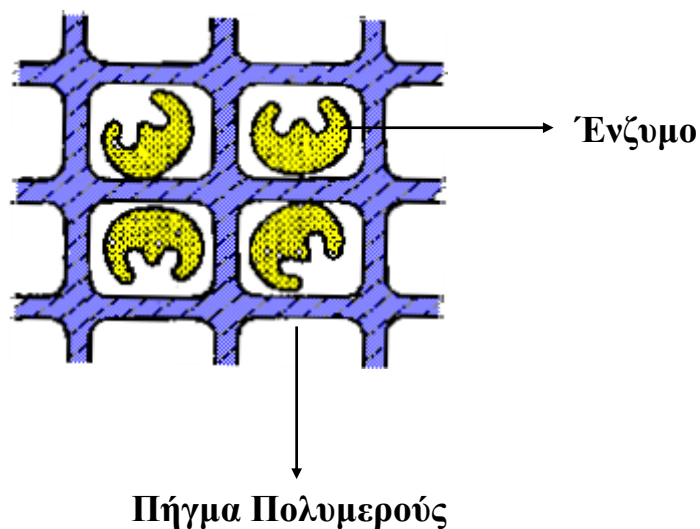
Οι τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων διακρίνονται σε φυσικές, χημικές και συνδυασμούς αυτών. Οι συνηθέστερες φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης είναι η προσρόφηση σε κατάλληλο μη υδατοδιαλυτό μέσο, η ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά και η παγίδευση σε πήγμα πολυμερούς. Οι πιο διαδεδομένες χημικές μέθοδοι είναι η διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) και η ομοιοπολική σύνδεση σε κατάλληλο ενεργοποιημένο φορέα (βλέπε και σχήμα 35) [399].

Η παραπάνω ταξινόμηση των μεθόδων ακινητοποίησης είναι γενική και πολύ συχνά χρησιμοποιούνται συνδυασμοί ή και διάφορες παραλλαγές αυτών, ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο γίνεται η ακινητοποίηση. Η λεπτομερής καταγραφή των μεθόδων αυτών ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας εργασίας και για το λόγο αυτό θα περιοριστούμε σε μία σύντομη επισκόπηση της μεθόδου ακινητοποίησης με παγίδευση. Η τελευταία είναι μία συνηθισμένη φυσική μέθοδος ακινητοποίησης, η οποία βασίζεται στην παγίδευση (entrapment) των ενζύμων σε μία μήτρα πολυμερούς. Για το σκοπό αυτό το βιομόριο μεταφέρεται σε διάλυμα μονομερούς και εν συνεχεία παγιδεύεται στο τρισδιάστατο πλέγμα που δημιουργείται με το φωτοπολυμερισμό του τελευταίου (βλέπε και σχήμα 36). Η παγίδευση πραγματοποιείται με τρόπο ώστε το ένζυμο να συγκρατείται στο πλέγμα, ενώ ταυτόχρονα να είναι δυνατή η διείσδυση του υποστρώματος. Θεωρητικά τα παγιδευμένα ένζυμα δεν είναι προσκολλημένα στο πολυμερές, η δε ελεύθερη διάχυσή τους είναι περιορισμένη. Τα συνηθέστερα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι

το αλγινικό ασβέστιο, το πολυακρυλαμίδιο, η πολυβινυλοαλκοόλη, το κολλαγόνο, η πολυανιλίνη [400] κ.α.



ΣΧΗΜΑ 35. Κυριότερες μέθοδοι ακίνητοποίησης.



ΣΧΗΜΑ 36. Σχηματική απεικόνιση ακίνητοποίησης ενζύμου σε πήγμα πολυμερούς.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης σε πήγμα πολυμερούς είναι το σχετικά χαμηλό της κόστος και κυρίως ότι περιλαμβάνει ήπιες μεθόδους ακίνητοποίησης. Με τον τρόπο αυτό τα ακίνητοποιημένα ένζυμα επηρεάζονται ελάχιστα και δεν σχηματίζουν χημικούς δεσμούς με το αδιάλυτο υλικό. Από την

άλλη όμως μπορούν να εκρέουν στην υδατική φάση. Η εκρόφηση στην υδατική φάση μπορεί να περιοριστεί με αύξηση του χρόνου που απαιτείται για τον φωτοπολυμερισμό του μονομερούς ή με συνδυασμό της παρούσης μεθόδου με κάποιο στάδιο χημικής ακινητοποίησης.

### **2.Γ.3 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ PLA<sub>2</sub>**

Στη βιβλιογραφία έχουν δημοσιευθεί διάφορες εργασίες που αφορούν την ακινητοποίηση PLA<sub>2</sub> και τη χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου για βιομηχανικούς και βιοιατρικούς σκοπούς [401,402]. Επίσης, ακινητοποιημένη PLA<sub>2</sub> έχει χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία της ενεργοποίησης μεσόφασης, καθώς επίσης και για το ρόλο της παρουσίας ιόντων Ca<sup>2+</sup> για την επίτευξη της κατάλυσης [403]. Κυρίως έχουν αναπτυχθεί χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης μέσω αμινομάδων λυσίνης και καρβοξυλομάδων ασπαρτικού. Ωστόσο, στις μεθόδους αυτές παρατηρείται σημαντική απώλεια ενζυμικής ενεργότητας και για το λόγο αυτό η χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου εμφανίζει διάφορους περιορισμούς. Για τον περιορισμό της απώλειας ενεργότητας έχει προταθεί η ακυλίωση του ενζύμου, πριν την ακινητοποίησή του [404].

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως ενώ οι εργασίες που αφορούν την ακινητοποίηση του ενζύμου είναι αρκετές στη βιβλιογραφία, δύσκολα μπορεί κανείς να αναζητήσει εργασίες που να αφορούν την ακινητοποίηση του υποστρώματος στο δραστικά καταλυτικά PLA<sub>2</sub>, που είναι και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

### **3. ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ**

#### **3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ**

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (Bronchoalveolar Lavage Fluid, BAL) είναι ένα βιολογικό υγρό που λαμβάνεται από την περιοχή των πνευμόνων, ύστερα από έκπλυση των τελευταίων με φυσιολογικό ορό. Χρησιμοποιείται στην ιατρική ως μέσο διάγνωσης, όπως για παράδειγμα μικροβιακών λοιμώξεων. Περιέχει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια που βρίσκονται στις κυψελίδες των πνευμόνων καθώς επίσης και τα κύτταρα που βρίσκονται στην κυψελιδική περιοχή. Ακόμη περιέχει τον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων

#### **3.2 ΛΗΨΗ ΤΟΥ BAL**

Για τη λήψη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος χρησιμοποιείται κατάλληλο βρογχοσκόπιο. Η βρογχοσκόπηση γίνεται συνήθως στο μεσαίο λοβό του δεξιού πνεύμονα. Αρχικά εισάγεται η άκρη του βρογχοσκοπίου και ακολούθως εγχύεται φυσιολογικός ορός σε ποσότητες που ποικίλουν. Ο φυσιολογικός ορός συνήθως θερμαίνεται για μικρό χρονικό διάστημα στους 37°C. Για μεγάλο όγκου έκπλυση εγχύονται 200-300 ml φυσιολογικού ορού, ενώ για μικρού όγκου έκπλυση 100 ml. Συνήθως προτιμούνται μεγάλου όγκου εκπλύσεις διότι με το τρόπο αυτό ανακτούνται μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης και μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων [405]. Ακολούθως, με αναρρόφηση γίνεται παραλαβή του εκπλύματος και συλλογή του σε πλαστικούς σωλήνες [406]. Το έκπλυμα φυλάσσεται στους -20 °C ή -80 °C όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

#### **3.3 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (LUNG SURFACTANT)**

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (lung surfactant) είναι ένα μείγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών και καλύπτει το εσωτερικό των πνευμόνων [407]. Έχει την ικανότητα να μειώνει την επιφανειακή τάση των κυψελίδων. Με το τρόπο αυτό

αποφεύγεται το κλείσιμο των κυψελίδων, ιδίως κατά την εκπνοή, και έτσι διατηρείται η σταθερότητα του πνεύμονα [408].

Το συντριπτικά μεγαλύτερο μέρος του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων αποτελείται από λιπίδια, σε ποσοστό περίπου 90% κατά βάρος. Από αυτά το μεγαλύτερο μέρος είναι φωσφολιπίδια (80-90%) και το υπόλοιπο είναι ουδέτερα λιπίδια με τη χοληστερόλη να υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό [409]. Η PC αποτελεί περίπου το 70 με 80 % των φωσφολιπιδίων. Το μεγαλύτερο ποσοστό της PC περιέχει στις θέσεις-1 και -2 παλμιτικό οξύ (DPPC). Επίσης σε ποσοστό περίπου 10% υπάρχει PG. Ακόμη, σε πολύ μικρά ποσοστά υπάρχουν PI, PS, PE και Sph. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων περιέχει σε ποσοστό περίπου 10 % πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες (surfactant proteins-SP), και είναι οι SP-A, SP-B, SP-C και SP-D [410].

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.

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

### 3.4 ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ BAL ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση και τη λειτουργία των πνευμόνων. Βιοχημική ανάλυση των συστατικών του και μελέτη των διαφόρων κυτταρικών του πληθυσμών βοηθάει σημαντικά την κατανόηση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στον πνεύμονα [411]. Επίσης, συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών πολλών πνευμονικών

παθήσεων. Στις σύγχρονες μονάδες εντατικής θεραπείας των νοσοκομείων η λήψη του BAL γίνεται σε καθημερινή βάση. Πλεονεκτεί σε σχέση με τα διάφορα δείγματα αίματος, διότι η συλλογή του γίνεται από την περιοχή της βλάβης και έτσι συμβάλει σημαντικά στη διάγνωση και κατανόηση αυτής. Σε αρκετές ασθένειες τα ευρήματα που βρίσκονται έπειτα από ανάλυση του BAL είναι τόσο ευδιάκριτα και χαρακτηριστικά που ενισχύουν σημαντικά μια συγκεκριμένη κλινική διάγνωση. Για το λόγο αυτό είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο [412].



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC

### Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές

- C<sub>6</sub>-NBD-PC, (1- palmitoyl-2-[6-[(7- nitrobenz-2- oxa –1,3- diazol-4- yl) amino] hexanoyl]- sn- glycer-3- phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810130, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, P-3412, Sigma).
- C<sub>6</sub>-NBD-FA, (6-[(7- nitrobenz-2- oxa –1,3- diazol-4- yl) amino] hexanoic acid; σε στερεή κατάσταση, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, N-5013, Sigma).
- C<sub>12</sub>-NBD-PC, (1- palmitoyl-2-[12-[(7- nitrobenz-2- oxa –1,3- diazol-4- yl) amino] dodecanoyl]- sn- glycer-3- phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810131, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA)).
- C<sub>12</sub>-NBD-FA, (12-[(7- nitrobenz-2- oxa –1,3- diazol-4- yl) amino] dodecanoic acid; σε στερεή κατάσταση, 790440, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA)).
- Tris-HCl ([Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride], C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, M.B. :157.6, Sigma).
- EDTA (ethylenediamino-tetraacetic acid; C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, M.B. : 372.2, Sigma).
- Πολυμερές PVA-SbQ (photocrosslinkable polyvinyl acetate with styrypyridinium residues, Toyo Gosei Kogyo, Chiba Japan).
- CaCl<sub>2</sub> (M.B. : 110.99, Sigma).
- Αιθανόλη (M.B. : 46.0, Labscan).

### Διαλύματα

- Διάλυμα 0.5 mM C<sub>6</sub>-NBD-PC σε αιθανόλη: Ποσότητα ίση με 1 mg διαλύεται ποσοτικά σε 2.586 mL αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C.
- Διάλυμα 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC σε αιθανόλη: Ποσότητα ίση με 1 mg διαλύεται ποσοτικά σε 2.336 mL αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους –20 °C.



- Πυκνό διάλυμα 1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη: Ποσότητα ίση με 2 mg C<sub>6</sub>-NBD-FA διαλύεται ποσοτικά σε 6.796 mL αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Πυκνό διάλυμα 1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη: Ποσότητα ίση με 1 mg C<sub>12</sub>-NBD-FA διαλύεται ποσοτικά σε 2.642 mL αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα 0.1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA: 100 μL του πυκνού διαλύματος 1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα 0.1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA: 100 μL του πυκνού διαλύματος 1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα 0.01 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA: 100 μL του διαλύματος 0.1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA: 100 μL του διαλύματος 0.1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Διάλυμα 10% EDTA pH 7.4: Ζυγίζονται 10.00 g EDTA και προστίθενται περίπου 80 mL νερού. Το εναιώρημα θέτεται σε μαγνητική ανάδευση και το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Όταν το διάλυμα γίνει αλκαλικό διαλύεται το EDTA στο νερό. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται με νερό στα 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα 0.5 M CaCl<sub>2</sub> pH 7.4: Ζυγίζονται 2.7747 g CaCl<sub>2</sub> και διαλύονται σε περίπου 40 mL νερού, υπό μαγνητική ανάδευση. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 50 mL με νερό. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4: Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε περίπου 80 mL νερού και προστίθενται 3.7 mL διαλύματος 10% EDTA pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4: Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε 80 mL νερού και προστίθενται 400 μL διαλύματος 0.5 M

CaCl<sub>2</sub> pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C

### **Πειραματική πορεία**

Σε υάλινα μπουκάλια μεταφέρεται ποσότητα 1 g PVA-SbQ προστίθενται 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4), ακολουθεί ανάδευση μέχρι σχηματισμού διαλύματος του πολυμερούς. Στη συνέχεια μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα αυτό σε υάλινο σωλήνα και προστίθενται 30 μL διαλύματος 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC ή 30 μL 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA (0.5 mM C<sub>6</sub>-NBD-PC ή 30 μL 0.01 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA), προκειμένου να σχηματιστεί το μείγμα ακινητοποίησης. Κάνουμε επίσταξη 20 μL σε πλάκα από teflon και η πλάκα μεταφέρεται σε θάλαμο UV 365 nm επί μία ώρα, προκειμένου να παγιδευτεί το φθορίζον υπόστρωμα στο τρισδιάστατο πλέγμα του πολυμερούς [413]. Ακολουθεί έκπλυση των κηλίδων του ακινητοποιημένου υποστρώματος της C<sub>12</sub>-NBD-PC με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4, για την τυχόν απομάκρυνση ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος που δεν ακινητοποιήθηκε. Η πλάκα διατηρείται στους 4 °C.

## **ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ**

### **1.2. ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC**

#### **Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές**

- Φάσματοφθορισμόμετρο Perkin Elmer LS-55 εφοδιασμένο με λάμπα ξένου (Waltham, Massachusetts, USA).
- Αλβουμίνη ορού βοός, (BSA, Bovine Serum Albumin, 100 g, A-9647, Sigma).

#### **Διαλύματα**

- Διάλυμα 2.5 mg/mL BSA: Διαλύονται 0.05 g BSA σε 20 mL νερού. Το διάλυμα διατηρείται ίδιες -20 °C.

### **Πειραματική πορεία**

Για τη λήψη των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής κάθε ακινητοποιημένης ουσίας προστίθεται σε πλάκα ELISA 96 θέσεων ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4 για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC και 10

mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4 για την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC) και οι ακόλουθες ποσότητες, τέτοιες ώστε ο συνολικός όγκος σε κάθε θέση ίδιες πλάκας να είναι 250  $\mu$ L:

- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(ή C<sub>6</sub>-) NBD-PC.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 2  $\mu$ L διαλύματος 2.5 mg/mL BSA.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 4  $\mu$ L διαλύματος 2.5 mg/mL BSA.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 8  $\mu$ L διαλύματος 2.5 mg/mL BSA.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 16  $\mu$ L διαλύματος 2.5 mg/mL BSA.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 10  $\mu$ L BAL.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 20  $\mu$ L BAL.
- Μία μεμβράνη ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-(C<sub>6</sub>-) NBD-PC και 10  $\mu$ L ορού.

Οι αρχικές συγκεντρώσεις των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων είναι 65.2  $\mu$ M. Για τη λήψη των φασμάτων διέγερσης, η εκπομπή ρυθμίζεται στα 535 nm και τα δείγματα διεγείρονται με σάρωση στην περιοχή 300-700 nm. Για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής η διέγερση ρυθμίζεται στα 475 nm και τα δείγματα διεγείρονται με σάρωση της περιοχής 350-800 nm. Η σάρωση των περιοχών γίνεται με ταχύτητα 60 nm/min.

### 1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

#### 1.3.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC

##### **Πειραματική πορεία**

Αναμιγνύουμε 230.0, 215.0, 207.5, 200.0, 185.0, 170.0, 155.0, 140.0, 125.0, 110.0 και 95.0  $\mu$ L διαλύματος πολυμερούς (όπως αυτό παρασκευάζεται με βάση το πρωτόκολλο της σελίδας 85) με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC ή 0.5 mM C<sub>6</sub>-NBD-PC, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 230  $\mu$ L. Ακολουθεί η

πορεία ακινητοποίησης, με βάση το πρωτόκολλο της σελίδας 85. Μεταφέρουμε σε θέσεις της πλάκας ELISA 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4), προσθέτουμε τη μεμβράνη της ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  ( $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$ ) διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων και καταγράφουμε την ένταση του φθορισμού στο φασματοφθορισμόμετρο με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 475 και 535 nm αντίστοιχα. Στη συνέχεια, για αρχική συγκέντρωση 65.2  $\mu\text{M}$  και των δύο ακινητοποιημένων υποστρωμάτων καταγράφουμε, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, την ένταση φθορισμού 10 διαφορετικών μεμβρανών.

### 1.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

#### *A. Επίδραση ιόντων $\text{Ca}^{2+}$*

##### **Διαλύματα**

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4: 0.1576 g Tris-HCl διαλύονται σε 100 mL νερού και το pH ρυθμίζεται στη τιμή 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στους 4  $^{\circ}\text{C}$ .

##### **Πειραματική πορεία**

Σε πλάκα ELISA μεταφέρεται ποσότητα 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 ή 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 ή 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4 και προστίθεται μία μεμβράνη, αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$ , ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  ή  $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$  (εις τριπλούν για την κάθε μεμβράνη). Καταγράφεται η ένταση φθορισμού της κάθε θέσης με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 475 και 535 nm αντίστοιχα.

#### *B. Επίδραση pH*

##### **Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές**

- $\text{CH}_3\text{COONa}$  (M.B. :82.03, Sigma).
- Tris-base, ((Tris [hydroxymethyl]aminomethane),  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , M.B. : 121.1, Merck).
- Οξικό οξύ (Acetic acid glacial,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , M.B. : 60.053, Carlo Erba reagent ).

### Διαλύματα

- Διάλυμα 0.1 M Tris-base, pH 8.5: Ζυγίζονται 1.211 g Tris-base και διαλύονται σε 80 mL νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 8.5 και ο τελικός όγκος στα 100 mL με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.
- Διάλυμα 0.2 M CH<sub>3</sub>COONa: Ζυγίζονται 1.64 g CH<sub>3</sub>COONa και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH: 1.15 ml παγόμορφου CH<sub>3</sub>COOH αραιώνονται στα 100 mL με νερό. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικών, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 5.0: Αναμιγνύονται τα διαλύματα 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH και 0.2 M CH<sub>3</sub>COONa σε αναλογία 1.48/3.52 αντίστοιχα. Από το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρονται 50 mL και προστίθενται 400 μL διαλύματος 0.5 M CaCl<sub>2</sub>. Το τελευταίο διάλυμα υποβάλλεται σε μαγνητική ανάδευση και το pH ρυθμίζεται στο 5.0. Ο τελικός όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL με νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικών, 10 mM EDTA, pH 5.0: Αναμιγνύονται τα διαλύματα 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH και 0.2 M CH<sub>3</sub>COONa σε αναλογία 1.48/3.52 αντίστοιχα. Από το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρονται 50 mL και προστίθενται 3.7 mL 10% EDTA. Το τελευταίο διάλυμα υποβάλλεται σε μαγνητική ανάδευση και το pH ρυθμίζεται στο 5.0. Ο τελικός όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL με νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-base, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 8.5: Σε ποτήρι ζέσης μεταφέρονται 10 mL διαλύματος 0.1 M Tris-base και προστίθενται 400 μL διαλύματος 0.5 M CaCl<sub>2</sub>. Το διάλυμα αραιώνεται με νερό και το pH ρυθμίζεται στο 8.5. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 mL με νερό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-base, 10 mM EDTA, pH 8.5: Σε ποτήρι ζέσης μεταφέρονται 10 mL διαλύματος 0.1 M Tris-base και προστίθενται 3.7 mL διαλύματος 10% EDTA. Το διάλυμα αραιώνεται με νερό και το pH ρυθμίζεται στο 8.5. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 mL με νερό. Το διάλυμα διατηρείται στους -4 °C.

### Πειραματική πορεία

Σε πλάκα ELISA μεταφέρονται 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM οξικών, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 5.0 και προστίθεται μεμβράνη, αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$ , ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  ή  $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$  (η διαδικασία αυτή γίνεται εις τριπλούν). Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η ένταση φθορισμού σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 475 και 535 nm αντίστοιχα. Η ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα: 1) 50 mM οξικών, 10 mM EDTA, pH 5.0, 2) 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4, 3) 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4, 4) 10 mM Tris-base, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 8.5 και 5) 10 mM Tris-base, 10 mM EDTA, pH 8.5.

### *Γ. Επίδραση θερμοκρασίας*

#### **Συσκευές**

- Θερμαινόμενος επωαστήρας titramax 1000, Heidolph.

#### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται ποσότητα 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 ή 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4 και προστίθεται μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$  ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  ή  $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$  αντίστοιχα (εις τριπλούν). Η πλάκα μεταφέρεται σε θερμαινόμενο επωαστήρα στους 20 °C επί 10 min και εν συνεχεία μετρείται η ένταση φθορισμού στο φασματοφθορισμόμετρο σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 475 και 535 nm αντίστοιχα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τις θερμοκρασίες των 25, 28, 32 και 37 °C.

## **1.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ $\text{C}_{12}\text{-}$ ΚΑΙ $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ**

### **1.4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### ***A. Φθορισμομετρία***

#### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται ποσότητα 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 ή 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4 και προστίθεται μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$  ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC ή  $\text{C}_6$ -NBD-PC αντίστοιχα. Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου για χρονική διάρκεια περίπου 4 ωρών. Ως χρόνο μηδέν λαμβάνεται η χρονική στιγμή της προσθήκης του ακινητοποιημένου υποστρώματος. Παράλληλα από θέσεις της πλάκας αφαιρείται η μεμβράνη του υποστρώματος, σε διάφορες χρονικές στιγμές, και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού που παρατηρείται πριν και αμέσως μετά την αφαίρεση της μεμβράνης.

### ***B. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης***

#### **Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές**

- Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης Shimatzu LC-10 AD, εφοδιασμένος με φθορισμομετρικό ανιχνευτή Shimatzu RF- 10AXL και ανιχνευτή διόδου λυχνίας (diode array detector) Shimatzu SPD-M10A.
- Στήλη ανάστροφης φάσης Supercosil LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ , Supelco).
- Υάλινη συσκευή διήθησης διαλυτών υπό κενό (Sartorius, Germany).
- Φίλτρα διήθησης 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Bedford, USA).
- Μεθανόλη (HPLC grade, M.B. : 32.04 Riedel de Haen).
- Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας χρωματογραφημάτων (DAPA software V 1.4x).

#### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρονται 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4) και προστίθεται μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$  ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC ( $\text{C}_6$ -NBD-PC). Σε διάφορες χρονικές στιγμές από την προσθήκη της μεμβράνης γίνεται ένεση 20  $\mu\text{L}$  από την υδατική φάση στον υγρό χρωματογράφο. Χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $\text{CH}_3\text{OH}$ -  $\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v) (( $\text{CH}_3\text{OH}$ -  $\text{H}_2\text{O}$ -  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (60:40:0.2, v/v/v)). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

#### 1.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΙΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ C<sub>12</sub>-NBD-FA

##### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται ποσότητα 248  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4, μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu$ M ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC και 2  $\mu$ L διαλύματος 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA. Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου για χρονική διάρκεια περίπου 4 ωρών. Ως χρόνο μηδέν λαμβάνεται η χρονική στιγμή της προσθήκης του διαλύματος λιπαρού οξέος. Επίσης, από θέσεις της πλάκας αφαιρείται η μεμβράνη του υποστρώματος, σε διάφορες χρονικές στιγμές, και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού που παρατηρείται πριν και αμέσως μετά την αφαίρεση της μεμβράνης.

Ακόμη, από θέσεις της πλάκας σε διάφορες χρονικές στιγμές γίνεται ένεση 20  $\mu$ L από την υδατική φάση στον υγρό χρωματογράφο. Χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης CH<sub>3</sub>OH- H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, τόσο του φασματοφθορισμομέτρου, όσο και του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

#### 1.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ BSA

##### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4), μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu$ M ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC (C<sub>6</sub>-NBD-PC) και 0, 2, 4, 8 και 16  $\mu$ L διαλύματος 2.5 mg/mL BSA αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση είναι 250  $\mu$ L. Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού συναρτήσει του χρόνου. Ως χρόνο μηδέν λαμβάνεται η χρονική στιγμή της προσθήκης του διαλύματος της BSA. Παράλληλα σε αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές αφαιρείται η μεμβράνη του υποστρώματος και καταγράφεται η τιμή της έντασης του φθορισμού.



Ακόμη, από θέσεις της πλάκας σε διάφορες χρονικές στιγμές γίνεται ένεση 20  $\mu\text{L}$  από την υδατική φάση στον υγρό χρωματογράφο. Για την ακινητοποιημένη  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v), ενώ για την ακινητοποιημένη  $\text{C}_6$ -NBD-PC το σύστημα  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}$  (60:40:0.2, v/v/v). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, τόσο του φασματοφθορισμομέτρου, όσο και του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

## 2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ $\text{PLA}_2$

### 2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ $\text{PLA}_2$

#### Πειραματική πορεία

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4, μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2  $\mu\text{M}$  ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC και 0, 5.0, 7.5 και 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος 100  $\mu\text{g/mL}$  πρότυπης  $\text{PLA}_2$  αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση είναι 250  $\mu\text{L}$ . Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού συναρτήσει του χρόνου. Ως χρόνο μηδέν λαμβάνεται η χρονική στιγμή της προσθήκης της πρότυπης  $\text{PLA}_2$ .

Ακόμη, από θέσεις της πλάκας σε διάφορες χρονικές στιγμές γίνεται ένεση 20  $\mu\text{L}$  από την υδατική φάση στον υγρό χρωματογράφο. Χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, τόσο του φασματοφθορισμομέτρου, όσο και του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

### 2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΟΥ Ή BAL

#### Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές

- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Sorvall RC-5B, Dupont Canada).
- Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, 20 x 20 cm, Merck.
- Θάλαμος χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm.

- Υδροχλώριο (HCl, M.B. 36.5, Labscan).
- Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>, M.B. 119.38, Labscan).

#### **Διαλύματα**

- Διάλυμα 2N HCl: 10 mL πυκνού διαλύματος HCl αραιώνονται με σε 50 mL νερού. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

#### **Πειραματική πορεία**

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4), μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2 μM ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC (C<sub>12</sub>-NBD-PC) και μέγιστη ποσότητα βιολογικού δείγματος 25 μL. Ο τελικός όγκος σε κάθε θέση είναι 250 μL. Η πλάκα μεταφέρεται στο φασματοφθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού συναρτήσει του χρόνου. Ως χρόνο μηδέν λαμβάνεται η χρονική στιγμή της προσθήκης του δείγματος. Ακόμη, από θέσεις της πλάκας σε διάφορες χρονικές στιγμές γίνεται ένεση 20 μL από την υδατική φάση στον υγρό χρωματογράφο. Χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης CH<sub>3</sub>OH- H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) (CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>COOH (60:40:0.2, v/v/v)). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, τόσο του φασματοφθορισμομέτρου, όσο και του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

Επίσης, σε θέσεις της πλάκας ELISA προστίθενται, σε διάφορες χρονικές στιγμές από την προσθήκη του βιολογικού δείγματος, 12.5 μL 2 N HCl και ακολουθεί εκχύλιση των λιπιδίων με βάση τη μέθοδο Bligh-Dyer [414]. Σε 0.9 όγκους του υπερκειμένου προστίθενται 2 όγκοι μείγματος μεθανόλης-χλωροφορμίου (1:1, v/v), έτσι ώστε η τελική αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-υπερκειμένου να είναι 1:1:0.9, v/v/v. Το μείγμα αναδεύεται και εν συνεχεία φυγοκεντρείται στα 500 x g, για 10 min. Παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση (κατώτερη). Στην υδατομεθανολική φάση προστίθεται επιπλέον 1 όγκος χλωροφορμίου και επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία. Ενώνονται οι χλωροφορμικές φάσεις. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου και επαναδιάλυση σε περίπου 80 μL χλωροφορμίου. Τα δείγματα, μαζί με πρότυπα διαλύματα 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC και 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA, τοποθετούνται σε πλάκα TLC και η πλάκα αναπτύσσεται σε κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει μείγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (65:35:7, v/v/v). Αποξύνονται οι περιοχές των δειγμάτων που έχουν ίδιο R<sub>f</sub> με το

πρότυπο διάλυμα C<sub>12</sub>-NBD-FA, επαναδιαλύονται, φυγοκεντρώνονται στα 500 x g και στη συνέχεια μετρείται η ένταση φθορισμού τους.

## 2.3 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PLA<sub>2</sub> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC

### Πειραματική πορεία

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4, μεμβράνη αρχικής συγκέντρωσης 65.2 μM ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC (τυφλό δείγμα) και κατάλληλη ποσότητα βιολογικού δείγματος (ορού ή BAL) ή κατάλληλη ποσότητα πρότυπης 100 μg/mL PLA<sub>2</sub> (θετικό control) ή κατάλληλη ποσότητα βρασμένου δείγματος (αρνητικό control). Ο μέγιστος όγκος των δειγμάτων είναι 25 μL, ενώ ο συνολικός όγκος σε κάθε θέση της πλάκας είναι 250 μL. Καταγράφουμε την τιμή της έντασης του φθορισμού ανά 15 περίπου λεπτά για χρονική διάρκεια περίπου 4 h. Ως χρόνο μηδέν για μεν το τυφλό λαμβάνεται η χρονική στιγμή προσθήκης της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC, για δε τα δείγματα, θετικά και αρνητικά control, η χρονική στιγμή της προσθήκης αυτών. Μετά το πέρας των 4 h προσθέτουμε 2 μL προτύπου διαλύματος 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA (εσωτερικό πρότυπο) και καταγράφεται η αύξηση της έντασης του φθορισμού που οφείλεται στην προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Η διαδικασία προσθήκης εσωτερικού προτύπου επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές. Η πλάκα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης είναι τοποθετημένη σε θερμαινόμενο επωαστήριο στους 37 °C.

### Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο για το τυφλό και τα δείγματα και προσδιορίζεται η κλίση της καμπύλης για το χρονικό διάστημα 0 έως 4 h. Η ενεργότητα PLA<sub>2</sub> των δειγμάτων σε nmol FA/h/mL δείγματος υπολογίζεται από τη σχέση:

$$A = \frac{1200 \times (\lambda_1 - \lambda_2)}{\Delta F \times V}$$

όπου:

|                                     |                                                                            |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>A,</b>                           | Ενεργότητα PLA <sub>2</sub> (nmol FA·mL <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ) |
| <b>λ<sub>1</sub>, λ<sub>2</sub></b> | Κλίση της καμπύλης του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα                 |
| <b>ΔF,</b>                          | Μέσος όρος αύξησης έντασης φθορισμού λόγω προσθήκης εσωτερικού προτύπου    |
| <b>V,</b>                           | Όγκος δείγματος (σε μL)                                                    |

## 2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ PLA<sub>2</sub> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC

### *A. Επίδραση θερμοκρασίας*

#### **Πειραματική πορεία**

Ακολουθείται η πειραματική πορεία που περιγράφεται στις σελίδες 93 και 94 με τη διαφορά ότι η πλάκα είναι τοποθετημένη σε θερμαινόμενο επωαστήριο στους 20, 25, 28, 32 ή 37 °C.

### *B. Επίδραση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης βιολογικών δειγμάτων*

#### **Πειραματική πορεία**

Προσδιορίζεται η ενεργότητα PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL, με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις σελίδες 93 και 94, χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες δείγματος (διαφορετική δηλαδή ποσότητας ολικής πρωτεΐνης στη θέση της πλάκας ELISA).

### *Γ. Επίδραση αναστολέων της PLA<sub>2</sub>*

#### **Αντιδραστήρια**

- Αναστολέας της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> ML 3176 (1-[2-(4-καρβοξυμεθυλφenoξυ) αιθυλ]-3- δωδεκανοϊνδουλ-2- καρβοξυλικό οξύ, M.B.: 521, Merckle, Germany).

- Αναστολέας της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> LY 311727 ([3-(3-ακεταμιδο-1-βενζυλ-2-αυθυλ-ινδουλ-5-οξύ) προπανοφωσφονικό οξύ], M.B. :430, Merckle Germany)

#### **Διαλύματα**

- Διάλυμα 23 mM LY 311727 σε αιθανόλη: Ζυγίζονται 0.010 g LY 311727 και διαλύονται σε 1000  $\mu$ L αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα 2.3 mM LY 311727 σε αιθανόλη: 100  $\mu$ L του διαλύματος 23 mM LY 311727 αραιώνονται με αιθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1000  $\mu$ L. Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα 23 mM ML 3176 σε αιθανόλη: Ζυγίζονται 0.010 g ML 3176 και διαλύονται σε 1000  $\mu$ L αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Διάλυμα 2.3 mM ML 3176 σε αιθανόλη: 100  $\mu$ L του διαλύματος 23 mM ML 3176 αραιώνονται με αιθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1000  $\mu$ L. Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$

#### **Πειραματική πορεία**

Προσδιορίζουμε την ενεργότητα PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL, με βάση το πρωτόκολλο των σελίδων 93 και 94, σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις: 1) Απουσία διαλύματος αναστολέα, 2) Παρουσία διαλύματος του αναστολέα ML 3176 και 3) Παρουσία διαλύματος του αναστολέα LY 311727. Η συγκέντρωση του κάθε αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης είναι 20  $\mu$ M. Αρχικά ο αναστολέας επωάζεται με το δείγμα BAL για 15 min στους  $37^{\circ}\text{C}$ , πριν την έναρξη της αντίδρασης.

### **3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

#### **3.1 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub> ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ**

##### **Αρχή μεθόδου**

Για το φθορισμομετρικό προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub> σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η C<sub>12</sub>-NBD-PC. Η C<sub>12</sub>-NBD-PC όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα και διεγερθεί στα 475 nm φθορίζει ελάχιστα στα 535 nm. Υδρόλυση αυτής από την PLA<sub>2</sub> έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του C<sub>12</sub>-NBD-FA, το

οποίο σε υδατικό διάλυμα φθορίζει τουλάχιστον 50 φορές περισσότερο από το υπόστρωμα χωρίς καμία μετατόπιση του μεγίστου μήκος κύματος εκπομπής [385].

### **Πειραματική πορεία**

Σε πλάκα ELISA προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 και 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0.5 mM  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC. Στη συνέχεια προστίθενται από 10 έως 25  $\mu\text{L}$  δείγματος BAL, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος σε κάθε θέση να είναι 250  $\mu\text{L}$ . Η προσθήκη του δείγματος αποτελεί την έναρξη της αντίδρασης. Ακολουθεί καταγραφή της μεταβολής της έντασης του φθορισμού του διαλύματος σε συνάρτηση με το χρόνο για χρονικό διάστημα περίπου 4 h. Μετά το πέρας αυτών προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης 2  $\mu\text{L}$  προτύπου διαλύματος 0.01 mM  $\text{C}_{12}$ -NBD-FA. Η προσθήκη ίδιας ποσότητας προτύπου επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά.

### **Υπολογισμός και έκφραση αποτελεσμάτων**

Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας μεταβολής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου, που παρατηρείται από 30 min περίπου μέχρι 4 h μετά την προσθήκη της πηγής του ενζύμου. Βάση του εσωτερικού προτύπου ο φθορισμός μετατρέπεται σε nmol προϊόντος της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol FA/h/ml BAL ή ως nmol FA/h/ mg πρωτεΐνης του BAL.

## **3.2 HPLC-ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ $\text{PLA}_2$**

### **Αρχή μεθόδου**

Για τον προσδιορισμό ενεργότητας  $\text{PLA}_2$  χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC. Η υδρόλυση της τελευταίας από την  $\text{PLA}_2$  έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του  $\text{C}_{12}$ -NBD-FA. Η αντίδραση αυτή παρακολουθείται χρονικά σε διάταξη HPLC, εφοδιασμένη με κατάλληλο φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Από την ταυτοποίηση, τον ποσοτικό προσδιορισμό των κορυφών που λαμβάνονται και από τη συνεχή αύξηση του εμβαδού της κορυφής του  $\text{C}_{12}$ -NBD-FA, σε συνάρτηση με το χρόνο, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου [387].

### **Πειραματική πορεία**

Χρησιμοποιείται το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στα 0.5 mL/min. Τα μήκη κύματος

διέγερσης και εκπομπής του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 και 535 nm αντίστοιχα.

Σε θέσεις της πλάκας ELISA μεταφέρουμε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4. Προσθέτουμε 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0.5 mM  $\text{C}_{12}$ -NBD-PC και 10 με 25  $\mu\text{L}$  δείγματος BAL. Ο συνολικός όγκος σε κάθε θέση είναι 250  $\mu\text{L}$ . Η πλάκα μεταφέρεται σε θερμαινόμενο επωαστήρα στους 37 °C. Η στιγμή που προσθέτουμε το δείγμα αποτελεί τη χρονική έναρξη της αντίδρασης. Κάνουμε 3-4 ενέσεις από το μείγμα της αντίδρασης στο χρωματογράφο σε αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές. Παρακολουθούμε τη συνεχή αύξηση της κορυφής που αντιστοιχεί στο  $\text{C}_{12}$ -NBD-FA. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με χρήση προτύπου διαλύματος 0.1 και 0.01 mM  $\text{C}_{12}$ -NBD-FA.

### 3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY [415]

#### Αρχή μεθόδου

Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται αρχικά με τα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Folin & phenol (φωσφο-μολυβδαινικό-φωσφο-βολφραμικό αντιδραστήριο) το οποίο ανάγεται από τα σύμπλοκο πρωτεΐνης- $\text{Cu}^{2+}$ , με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανού χρώματος που απορροφά έντονα στα 720 nm.

#### Αντιδραστήρια

- NaOH (M.B.: 40, Merck).
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (M.B.: 105.99, Fluka).
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (M.B.: 249.68, Fluka).
- Κιτρικό νάτριο ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , M.B.: 294.10, Merck)
- Αντιδραστήριο φαινόλης: Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma).

#### Διαλύματα

- Διάλυμα 1N NaOH: 4 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL. Το διάλυμα αφήνεται να κρυσώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Διάλυμα 0.5 N NaOH: 2 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL. Το διάλυμα αφήνεται να κρυσώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Διάλυμα 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα 1 % κιτρικού νατρίου: 1.139 g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Διάλυμα 0.5%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  σε 1 % κιτρικό νάτριο: 0.5 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  διαλύονται σε 100 mL διαλύματος 1 % κιτρικού νατρίου. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- Μίγμα διαλυμάτων 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 0.5 %  $\text{CuSO}_4$  σε αναλογία 50:1: Σε 50 mL διαλύματος 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  προστίθεται 1 mL διαλύματος 0.5%  $\text{CuSO}_4$ . Το μίγμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- Πρότυπο διάλυμα BSA 200  $\mu\text{g/mL}$  σε 0.5 N NaOH: 100 mg BSA διαλύονται σε 500 mL 0.5 N NaOH. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για λίγες ώρες μέχρι να διαλυθεί η BSA. Το διάλυμα μοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες και διατηρείται στους -20 °C.
- Αντιδραστήριο φαινόλης: Ορισμένος όγκος αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu αναμιγνύεται με ίσο όγκο  $\text{H}_2\text{O}$ . Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

### **Πειραματική πορεία**

#### *Προετοιμασία δειγμάτων*

Κατάλληλη ποσότητα δείγματος BAL (από λίγα  $\mu\text{L}$  έως 500  $\mu\text{L}$ ) μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα. Στο σωλήνα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 1 N NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται στα 1000  $\mu\text{L}$  με διάλυμα 0.5 N NaOH. Το μείγμα αναδεύεται και αφήνεται για περίπου 120 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την υδρόλυση των πρωτεϊνών.

#### *Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων*

Σε κάθε πλαστικό σωλήνα προστίθενται 5 mL μίγματος 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 0.5%  $\text{CuSO}_4$  (50:1, v/v). Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια προστίθεται 500  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου φαινόλης και αμέσως ακολουθεί ανάδευση. Σχηματίζεται κυανού χρώμα και μετά από 30 min δείγματα και πρότυπα φωτομετρούνται έναντι του τυφλού στα 720 nm, σε υάλινη κυψελίδα.

### **3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**



Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά προγράμματα Statistika v. 7.0 και GraphPad v.5.0. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές και κάθε δείγμα μετρήθηκε εις τριπλούν. Οι τιμές των μετρήσεων αναφέρονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η σύγκριση μεταξύ ομάδων έγινε με Students t-test με  $P < 0.05$ .

## 4. ΠΗΓΕΣ PLA<sub>2</sub>

### 4.1 BAL

#### A. Λήψη του BAL

Με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου με οπτικές ίνες εγχύονται έξι δείγματα των 20 mL αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Το πρώτο κλάσμα υγρού που ανακτάται αποτελεί το βρογχικό έκκριμα, ενώ το υπόλοιπο υγρό αποτελεί το BAL. Το BAL συλλέγεται απευθείας σε πλαστικούς σωλήνες εμβαπτισμένους σε παγόλουτρο.

#### B. Κατεργασία του BAL

#### Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές

- Αποστειρωμένα φίλτρα (cell strainers, 75 $\mu$ m Nylon, 352350, Becton Dickinson, USA).
- RPMI 1640 medium (F-1275, Biochrom AG).
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (M.B. : 137.99, Merck).
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O (M.B. : 335.99, Merck).
- NaCl (M.B. : 58.44, Riedel and Haen).

#### Διαλύματα

- Διάλυμα 6.6 mM PBS, pH 7.4: Ζυγίζονται 0.13 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O και 6.5 g NaCl. Διαλύονται σε 1000 mL H<sub>2</sub>O και το pH ρυθμίζεται στο 7.4. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

#### Πειραματική πορεία

Το BAL διηθείται σε αποστειρωμένα φίλτρα για την απομάκρυνση της βλέννας και ακολούθως φυγοκεντρείται στα 500 x g, για 10 min, στους 4 °C σε ψυχόμενη

φυγόκεντρο. Με το τρόπο αυτό διαχωρίζεται το υγρό BAL από τα κύτταρα. Το υπερκείμενο μοιράζεται σε erpedorf και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , ενώ τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 1 ml RPMI ή PBS και φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Γ. Διαφορικές φυγοκετρήσεις του BAL*

#### **Υλικά-Αντιδραστήρια-Συσκευές**

- Υπερφυγόκεντρος Beckman L5-65B, με κεφαλή SW41
- Συσκευή υπερήχων probe.
- Φυσιολογικός ορός (Sterile sodium chloride 0.9 %, Cooper Hellas).

#### **Πειραματική πορεία**

Το υγρό BAL φυγοκεντρείται στα 30,000 x g, στους  $4^{\circ}\text{C}$ , για 60 min σε υπερφυγόκεντρο. Το ίζημα παραλαμβάνεται ποσοτικά με φυσιολογικό ορό και κατεργάζεται σε συσκευή υπερήχων για 30 sec. Η υπερήχηση του ιζήματος γίνεται 3 φορές με παύση 30 sec μεταξύ της κάθε μίας. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο υποβάλλεται σε νέα υπερφυγοκέντρωση στα 100,000 x g, για 60 min, στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το νέο ίζημα επεξεργάζεται όπως το προηγούμενο, ενώ το νέο υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **4.2 ΟΡΟΣ**

#### **Πειραματική πορεία**

Το δείγμα αίματος αμέσως μετά τη λήψη του φυγοκεντρείται ως έχει στα 500 x g επί 10 min και ακολούθως συλλέγεται το υπερκείμενο (ορός). Ο ορός διαχωρίζεται σε erpedorf και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες φθορίζουσες ουσίες του εμπορίου: C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>6</sub>-NBD-PC, οι οποίες και ακινητοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο της σελίδας 84 σε αδρανές υλικό. Στη σειρά αυτή πειραμάτων, αρχικά εκτελέστηκαν πειράματα αναφοράς, για τη διερεύνηση:

- των συνθηκών ακινητοποίησης,
- της σταθερότητας των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων και
- της επίδρασης χημικών και φυσικοχημικών παραμέτρων του διαλύματος αντίδρασης στην ένταση του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης.

Ακολουθήθηκε το διάγραμμα ροής του επόμενου σχήματος:

**1 g PVA-SbQ + 5 mL 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7.4**



**200 μL άνω διαλύματος + 30 μL 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC**



**Επίσταξη 20 μL**



**UV 365 nm επί 1 h, έκπλυση**



**Αποθήκευση στους 4 °C**

ΣΧΗΜΑ 37. Διάγραμμα ροής ακινητοποίησης C<sub>12</sub>-NBD-PC.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

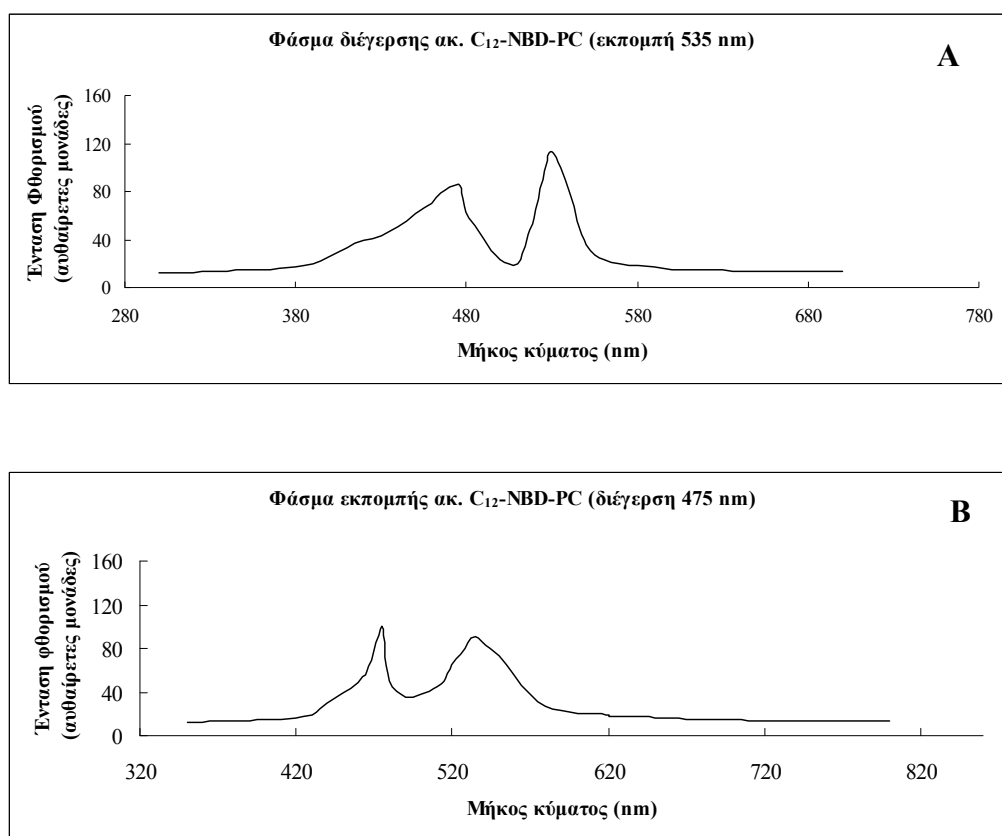
### 1.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

### 1.1 1 ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ

Για κάθε μία από τις ακινητοποιημένες ουσίες λήφθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής σε κατάλληλο φασματοφθορισμόμετρο. Ελέγχθηκαν τυχόν διαφορές των φασμάτων από τις αντίστοιχες ουσίες σε διάλυμα. Τέλος, διερευνήθηκε η τυχόν επίδραση BSA, και πρωτεϊνών ορού ή BAL στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των παραπάνω ουσιών.

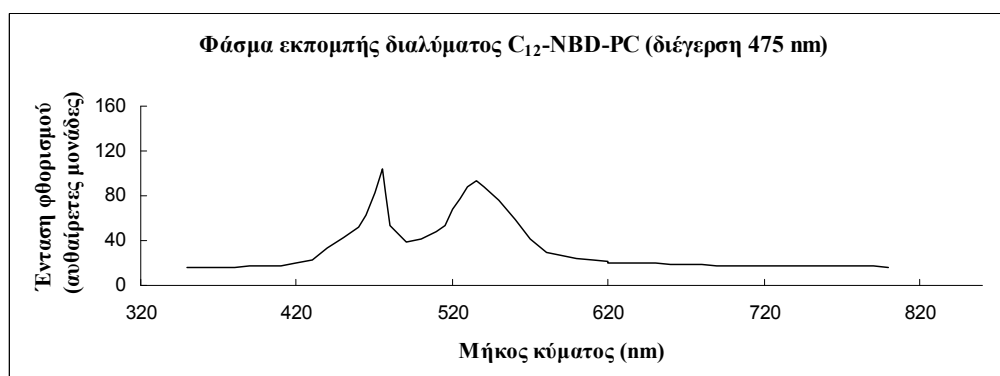
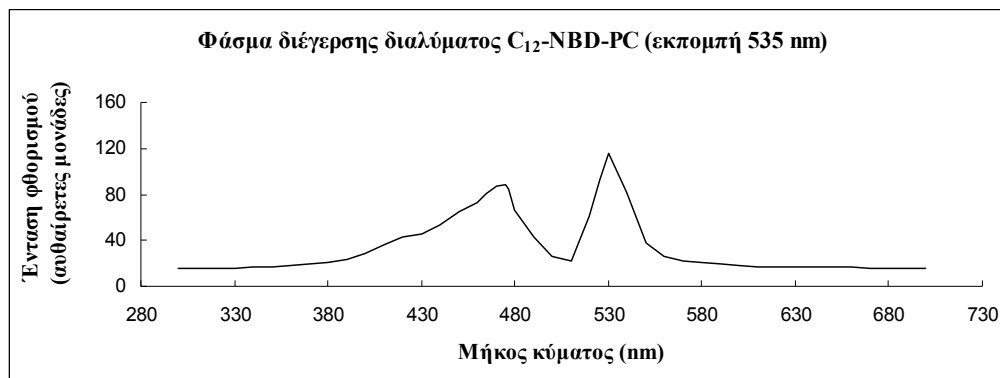
Το μήκος κύματος διέγερσης, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη εκπομπή φθορισμού των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων βρέθηκε στα  $475 \pm 2$  nm. Επίσης, η μέγιστη ένταση φθορισμού βρέθηκε στο μήκος κύματος των  $535 \pm 2$  nm. Τα ίδια μήκη κύματος προσδιορίστηκαν και για τις αντίστοιχες ουσίες σε διάλυμα

**Παρατηρούμε επομένως πως τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων δεν διαφέρουν από αυτά των αντίστοιχων ουσιών σε διάλυμα. (βλέπε και σχήματα 38 και 39).**



ΣΧΗΜΑ 38. Φάσματα διέγερσης (A) και εκπομπής (B) ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC. Για τη λήψη των φασμάτων μεταφέρονται 250  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM

*Tris-HCl*, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 και η μεμβράνη του ακινητοποιημένου υποστρώματος. Τα μήκη κύματος όπου παρατηρείται η μέγιστη ακτινοβολία διέγερσης και φθορισμού είναι 475 και 535 nm αντίστοιχα.



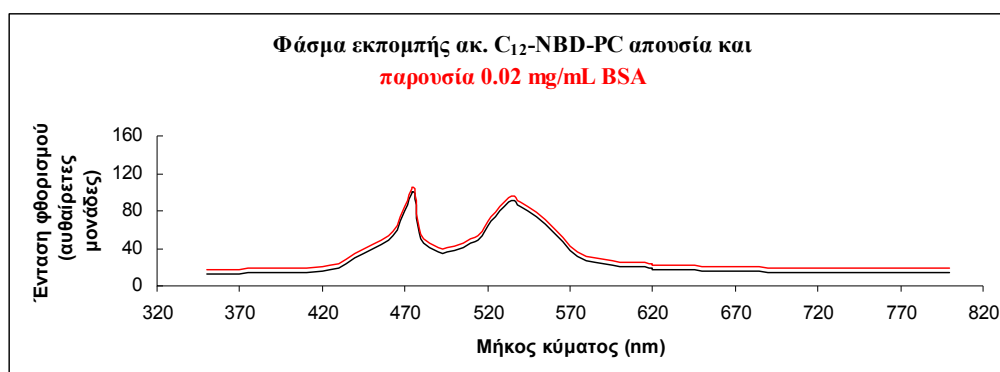
**ΣΧΗΜΑ 39.** Φάσματα διέγερσης (A) και εκπομπής (B) διαλύματος  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ . Για τη λήψη των φασμάτων μεταφέρονται 248.0  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM *Tris-HCl*, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 και 2.0  $\mu\text{L}$  0.5 mM  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ . Τα μήκη κύματος όπου παρατηρείται η μέγιστη ακτινοβολία διέγερσης και φθορισμού είναι 475 και 535 nm αντίστοιχα.

Ακόμη, εξετάσθηκε η επίδραση πηγής πρωτεΐνης στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των ακινητοποιημένων ουσιών. Οι πρωτεΐνες είναι παρούσες σε ποικίλες συγκεντρώσεις στα διάφορα βιολογικά δείγματα και για το λόγο αυτό έπρεπε να προσδιοριστεί εάν η παρουσία τους επηρεάζει τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής. Παρουσία πηγής πρωτεΐνης (BSA, BAL ή ορού) παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού, όμως τα μήκη κύματος όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη ακτινοβολία διέγερσης και φθορισμού δεν μεταβλήθηκαν και δεν

παρατηρήθηκε καμία μετατόπιση αυτών. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της έντασης του φθορισμού που παρατηρήθηκε για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC ήταν στατιστικά μη σημαντική (P>0.05) για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις και πηγές πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν. Για την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC παρουσία 0.04, 0.08 και 0.16 mg/mL BSA παρατηρήθηκε αύξηση στην ένταση φθορισμού στατιστικώς σημαντική (P=0.0095, P=0.0030 και P=0.0010 αντίστοιχα) σε σχέση με την παρουσία 0.02 mg/mL ή την απουσία πρωτεΐνης (βλέπε και σχήμα 40)

**Παρατηρήθηκε συνεπώς πως τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων δε μεταβάλλονται παρουσία πηγής πρωτεΐνης.**

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν στο φασματοφθορισμόμετρο αλλά και στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή της διάταξης HPLC (στα πειράματα όπου αυτή απαιτήθηκε) τα μήκη κύματος 475 και 535 nm για τη διέγερση και την εκπομπή αντίστοιχα.



ΣΧΗΜΑ 40. Αντιπροσωπευτικό φάσμα εκπομπής ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC απουσία και παρουσία 0.02 mg/mL BSA. Παρουσία και απουσία πηγής πρωτεΐνης το βέλτιστο μήκος κύματος εκπομπής είναι 535 nm.

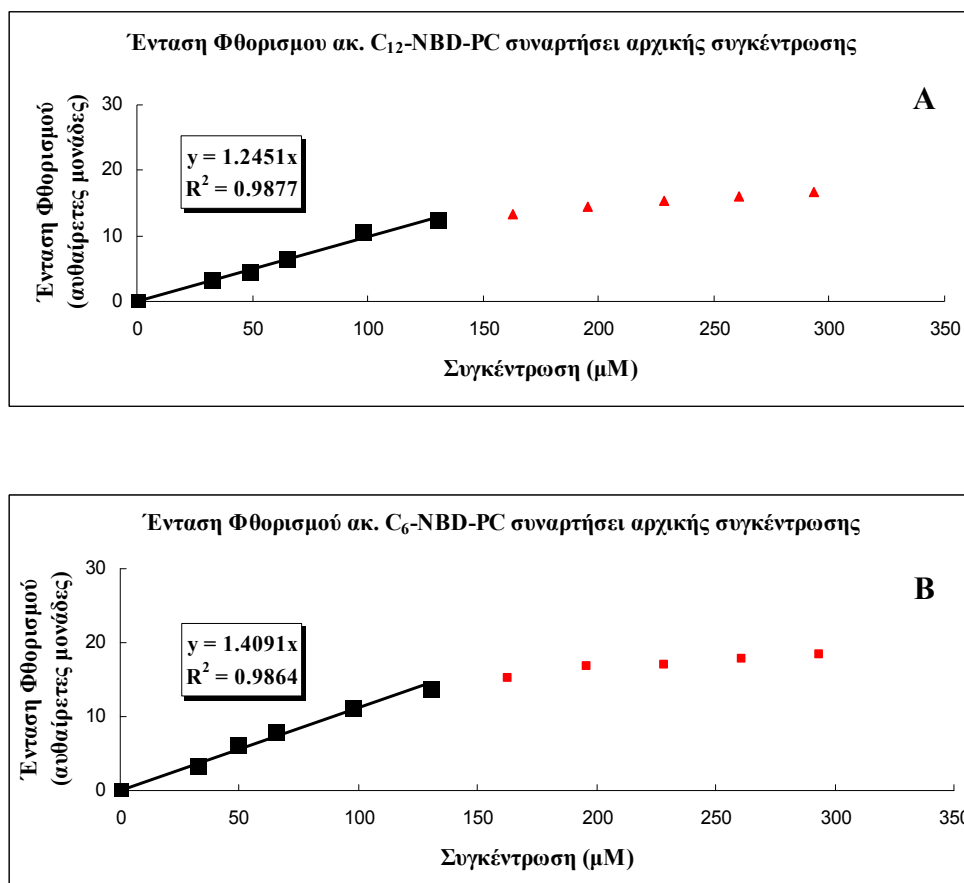
## 1.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Στη σειρά αυτή των πειραμάτων εξετάσθηκαν διάφοροι παράμετροι, οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν την σταθερότητα των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων.

### 1.2.1 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC

Μελετήθηκε η μεταβολή της έντασης φθορισμού των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων συναρτήσει διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ έντασης φθορισμού και αρχικής συγκέντρωσης μέχρι τη συγκέντρωση των 130  $\mu\text{M}$ . Στη συνέχεια, και για τα δύο ακινητοποιημένα υποστρώματα, η γραφική παράσταση μεταξύ έντασης φθορισμού και αρχικής συγκέντρωσης καμπυλώνει και αίρεται η γραμμικότητα (βλέπε και σχήμα 41).

Παρατηρούμε επομένως πως η μέγιστη αρχική συγκέντρωση διαλυμάτων των υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση της C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC είναι 130  $\mu\text{M}$ .



ΣΧΗΜΑ 41. Αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση μεταξύ έντασης φθορισμού ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC (Α) και C<sub>6</sub>-NBD-PC (Β) και αρχικής συγκέντρωσης



διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους.

### 1.2.2 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Προκειμένου να αξιολογήσουμε την διαδικασία ακινητοποίησης της  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο ακινητοποίησης της σελίδας 84 και καταγράψαμε την τιμή της έντασης φθορισμού 10 διαφορετικών μεμβρανών εις τριπλούν σε μία ημέρα καθώς επίσης και σε τρεις διαδοχικές ημέρες. Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu\text{M}$ . Στον ακόλουθο **πίνακα 11** συνοψίζεται η πιστότητα της διαδικασίας ακινητοποίησης για τα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την % RSD των μετρήσεων.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11** Πιστότητα διαδικασίας ακινητοποίησης  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC.

| <b>Πιστότητα</b> |                   |            |            |
|------------------|-------------------|------------|------------|
| $C_{12}$ -NBD-PC | Επαναληψιμότητα   | $\leq 3\%$ | $\leq 4\%$ |
| $C_6$ -NBD-PC    | Αναπαραγωγιμότητα | $\leq 4\%$ | $\leq 5\%$ |

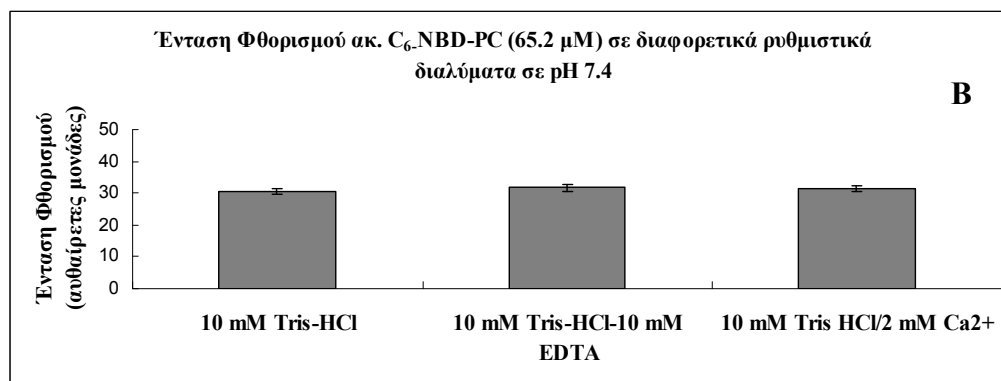
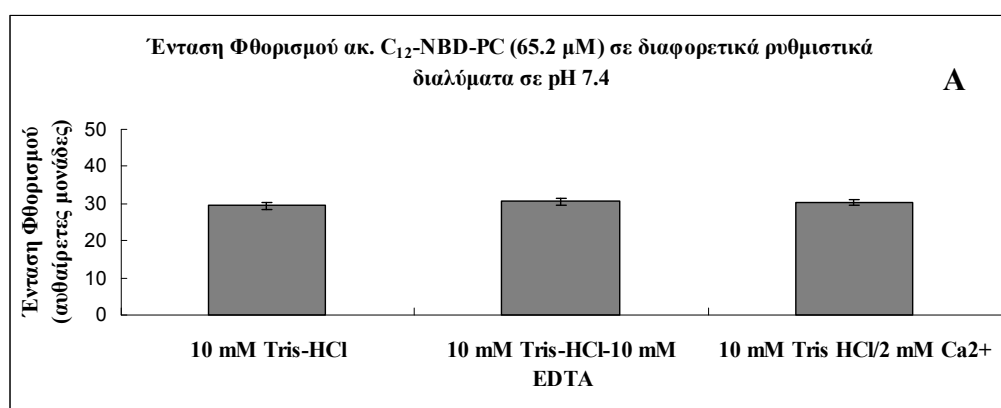
**Από τα δεδομένα του πίνακα προκύπτει πως η διαδικασία ακινητοποίησης χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα.**

### 1.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ $C_{12}$ - ΚΑΙ $C_6$ -NBD-PC

*A. Επίδραση ιόντων  $Ca^{2+}$*

Καταγράφηκε η ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC σε τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα παρουσία και απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu$ M. Παρατηρούμε πως η τιμή της έντασης φθορισμού και των δύο ακινητοποιημένων υποστρωμάτων δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά στα τρία αυτά ρυθμιστικά διαλύματα ( $P > 0.05$  σε όλες τις περιπτώσεις, βλέπε και **σχήμα 42 Α και Β**).

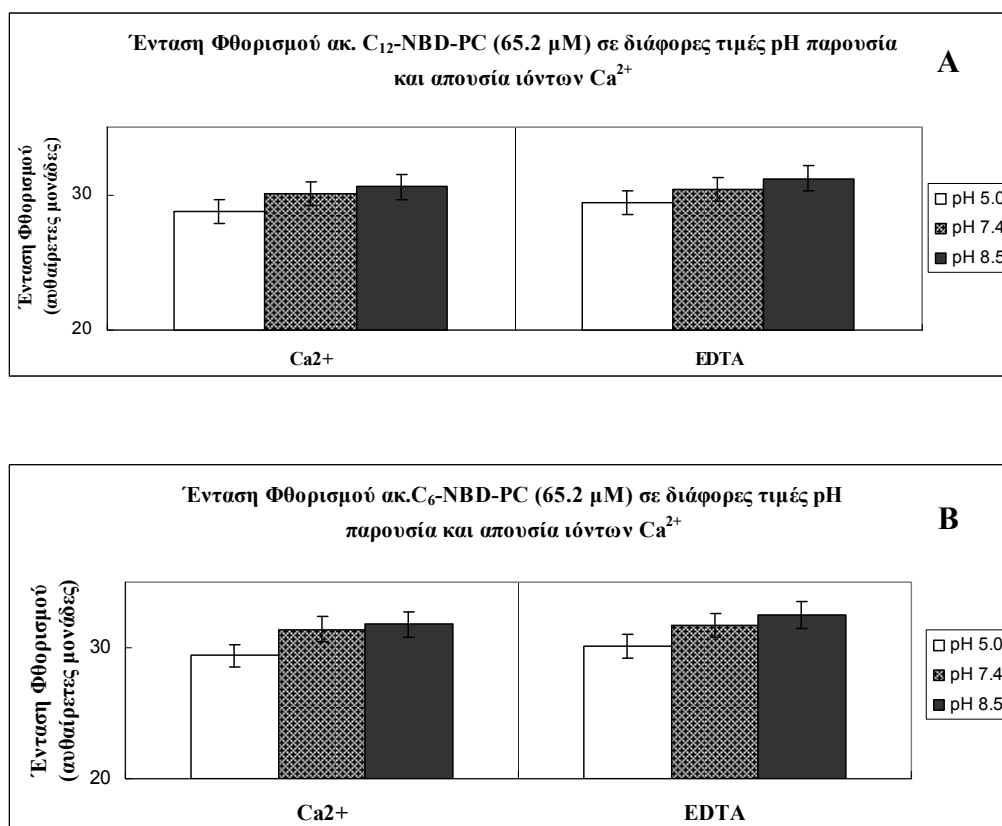
**Συνεπώς, η παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  δεν επηρεάζει το φθορισμό των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων.**



**ΣΧΗΜΑ 42.** Ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (A) και  $C_6$ -NBD-PC (B) σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα παρουσία και απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu$ M.

*B Επίδραση pH*

Καταγράφηκε η ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC σε διαφορετικές τιμές pH, παρουσία και απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά της τιμής της έντασης φθορισμού των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στις διαφορετικές τιμές pH, τόσο παρουσία, όσο και απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  (βλέπε και **σχήμα 43 Α και Β**).

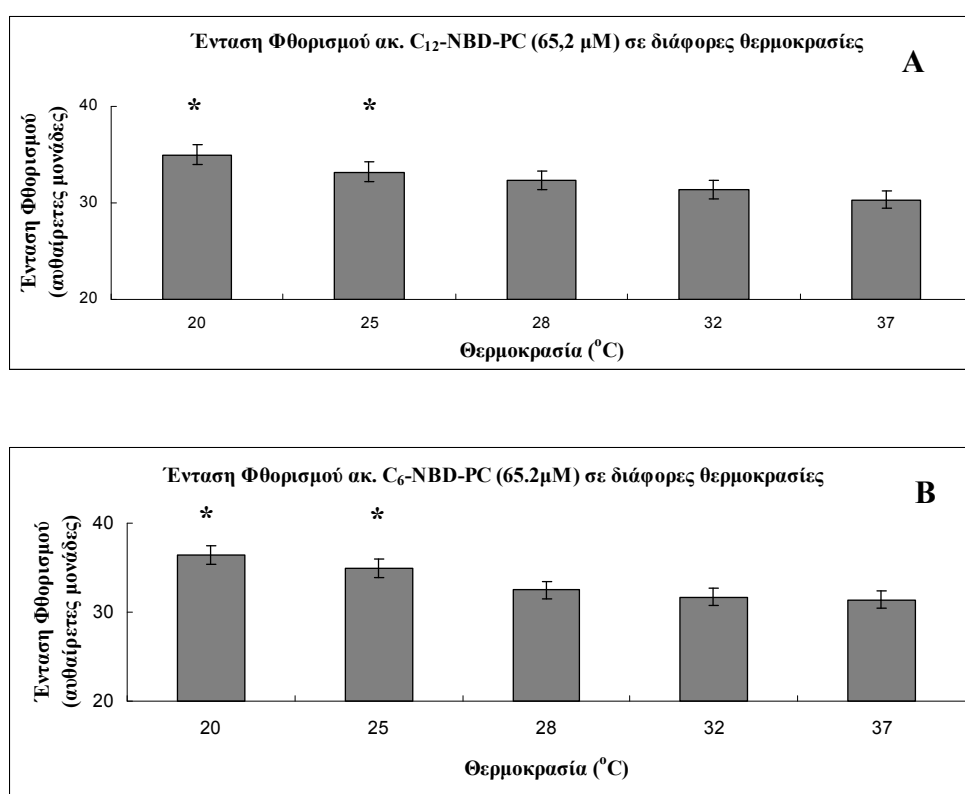


**ΣΧΗΜΑ 43.** Ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (Α) και  $C_6$ -NBD-PC σε διαφορετικές τιμές pH, παρουσία και απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu$ M.

### Γ. Επίδραση θερμοκρασίας

Καταγράφηκε η ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC σε διάφορες θερμοκρασίες. Παρατηρήθηκε μείωση της έντασης φθορισμού, και για τα δύο ακινητοποιημένα υποστρώματα, αυξανόμενης της θερμοκρασίας από τους 20 έως τους 37  $^{\circ}$ C. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η ένταση φθορισμού για την

ακίνητοποιημένη  $C_{12}$ -NBD-PC που μετράται στους 20 και στους 25 °C, παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P=0.0017$  και  $P=0.0081$  αντίστοιχα) σε σχέση με την ένταση φθορισμού που μετράται στους 37 °C. Αντίθετα, η ένταση φθορισμού που μετράται στους 28 και στους 32 °C δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ένταση φθορισμού που μετράται στους 37 °C. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα για την ακίνητοποιημένη  $C_6$ -NBD-PC. Πιο συγκεκριμένα η ένταση φθορισμού που μετράται στους 20 και στους 25 °C παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P=0.0005$  και  $P=0.0019$ ), ενώ αυτή που μετράται στους 28 και 32 °C δεν παρουσιάζει, σε σχέση με την ένταση φθορισμού που μετράται στους 37 °C (βλέπε και **σχήμα 44 Α και Β**). Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους, ήταν σε όλες τις μετρήσεις 65.2  $\mu$ M.



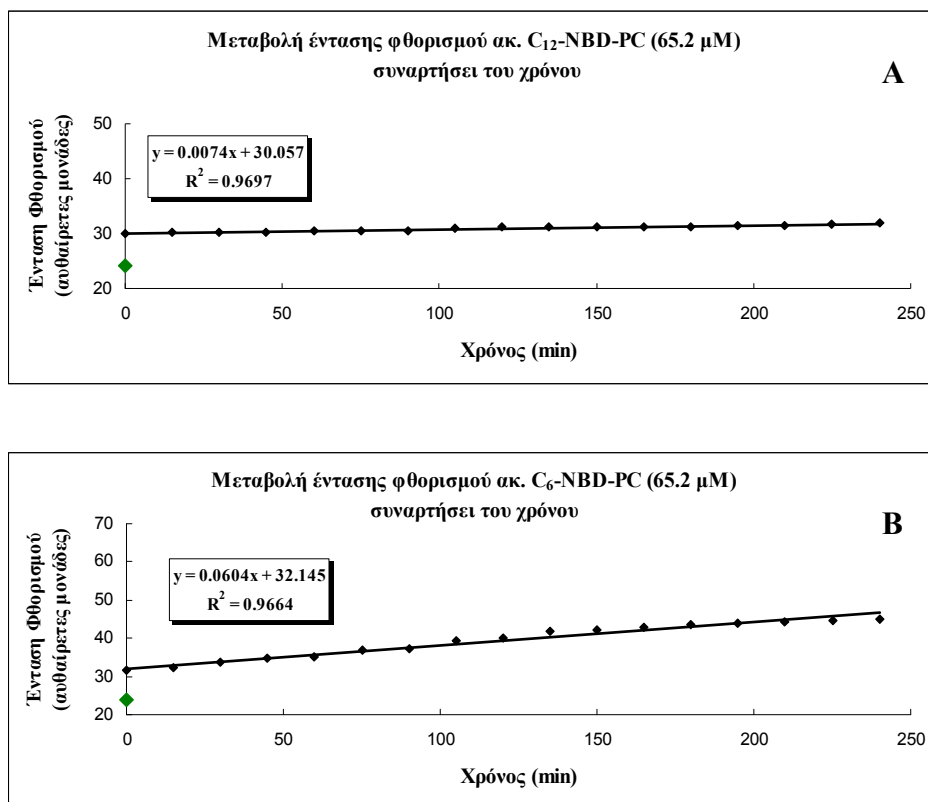
**ΣΧΗΜΑ 44.** Ένταση φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (Α) και  $C_6$ -NBD-PC (Β). σε διάφορες θερμοκρασίες. Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu$ M. (\* στατιστικώς σημαντική διαφορά).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τον φθορισμό των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων.

### 1.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

#### α) Μεταβολή φθορισμού ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στο μίγμα της αντίδρασης

Μελετήθηκε η μεταβολή της έντασης φθορισμού της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC στο μίγμα αντίδρασης σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρήθηκε αύξηση της κλίσης της καμπύλης της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο και για τα δύο υποστρώματα (βλέπε και σχήμα 45).



ΣΧΗΜΑ 45. Αντιπροσωπευτική μεταβολή έντασης φθορισμού ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC (A) και C<sub>6</sub>-NBD-PC (B) συναρτήσει του χρόνου. Το σημείο με πράσινο

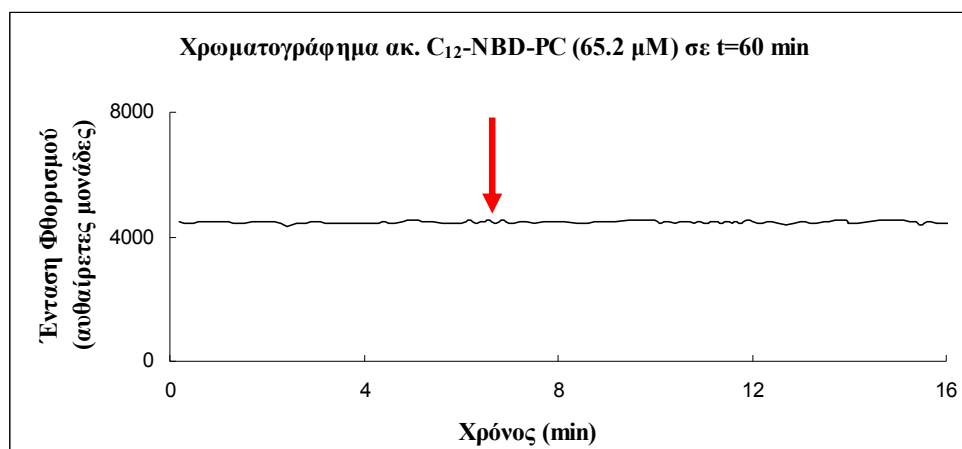
χρώμα απεικονίζει το βασικό φθορισμό (χωρίς το ακινητοποιημένο υπόστρωμα). Η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή τους ήταν 65.2  $\mu\text{M}$ .

Η αύξηση της έντασης φθορισμού των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων συναρτήσει του χρόνου μπορεί να οφείλεται είτε σε τυχόν εκρόφηση αυτών στην υδατική φάση, είτε σε υδρόλυση του ακινητοποιημένου υποστρώματος, είτε ακόμη και σε μερική εξάτμιση της υδατικής φάσης στην πορεία της αντίδρασης.

Για το λόγο αυτό ακολούθησε χρωματογραφική ανάλυση των υπερκειμένων του μίγματος αντίδρασης με HPLC, εφοδιασμένης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή, καθώς επίσης και περεταίρω φθορισμομετρική ανάλυση του μίγματος αντίδρασης.

#### β) Ανάλυση υπερκειμένων μίγματος αντίδρασης με HPLC

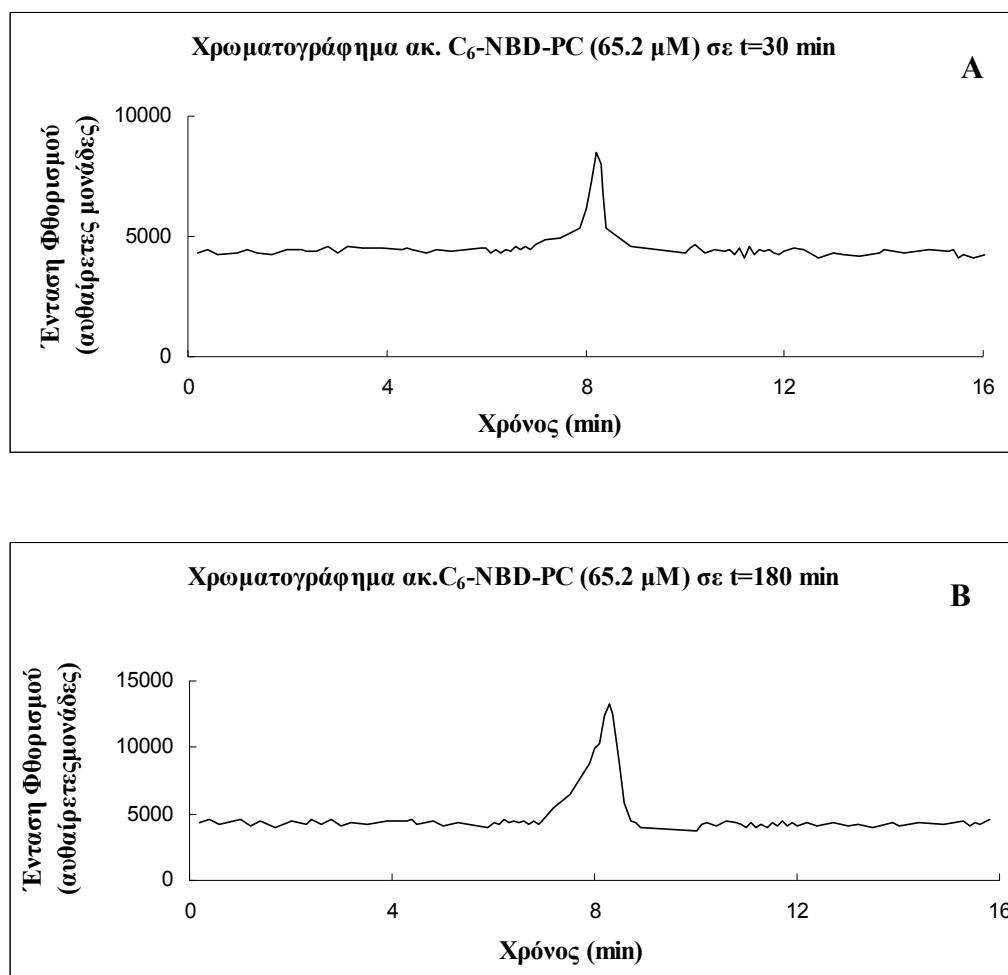
Για την ανάλυση των υπερκειμένων που περιείχαν την ακινητοποιημένη  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  χρησιμοποιήθηκε το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Δεν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του αντίστοιχου διαλύματος του υποστρώματος. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε για όλες τις αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές (μεταξύ 0 και 4 h) που έγινε ένεση στην HPLC (βλέπε και **σχήμα 46**).



ΣΧΗΜΑ 46. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που λαμβάνεται έπειτα από 60 min από την προσθήκη ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$  σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Δεν ανιχνεύεται κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, η οποία θα αντιστοιχούσε στην  $C_{12}$ -NBD-PC.

Για την ανάλυση των υπερκειμένων που περιείχαν την ακινητοποιημένη  $C_6$ -NBD-PC χρησιμοποιήθηκε το ισοκρατικό σύστημα έκλουσης  $CH_3OH-H_2O-CH_3COOH$  (60:40:0.2, v/v/v). Ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 8.0 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του αντίστοιχου διαλύματος του υποστρώματος. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του εμβαδού, που αντιστοιχεί στην κορυφή με χρόνο κατακράτησης 8.0 min, με αύξηση του χρόνου παραμονής της μεμβράνης του ακινητοποιημένου υποστρώματος στο μίγμα αντίδρασης (βλέπε και σχήμα 47).



ΣΧΗΜΑ 47. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που λαμβάνεται έπειτα από 30 (A) και 180 min (B) από την προσθήκη ακινητοποιημένης  $C_6$ -NBD-PC σε κατάλληλο

*ρυθμιστικό διάλυμα. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 8.0 min αντιστοιχεί στην C<sub>6</sub>-NBD-PC.*

**Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνουμε πως η ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC δεν εκροφάται στην υδατική φάση, σε αντίθεση με την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC, η οποία εκροφάται μερικώς. Επίσης, τα ακινητοποιημένα υποστρώματα δεν υδρολύονται στο μίγμα αντίδρασης.**

**γ) Μεταβολή έντασης φθορισμού έπειτα από αφαίρεση της μεμβράνης των υποστρωμάτων**

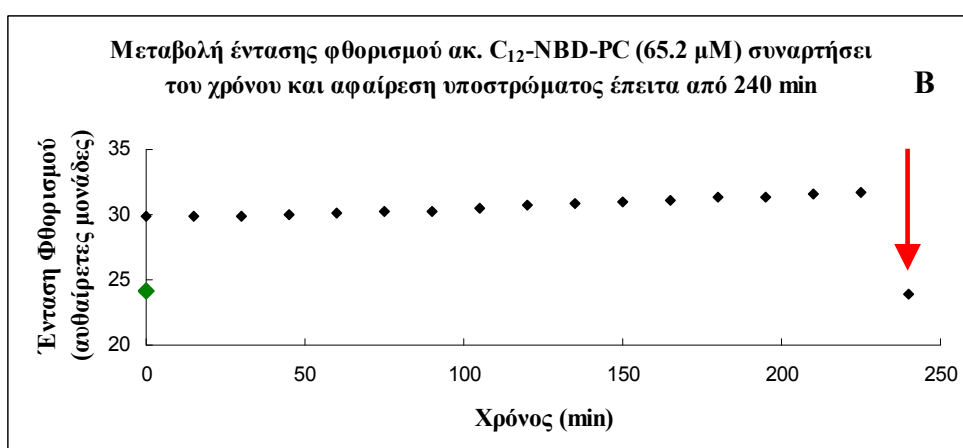
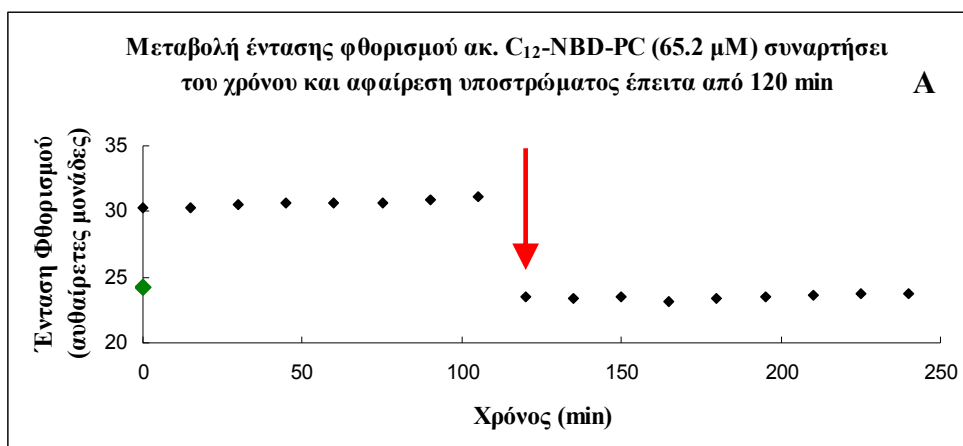
Καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης φθορισμού έπειτα από αφαίρεση της μεμβράνης των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων σε αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές μετά την προσθήκη τους στο μίγμα αντίδρασης.

Για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC παρατηρήθηκε ότι η τιμή της έντασης φθορισμού έπειτα από την αφαίρεσή της από το μίγμα αντίδρασης πρακτικά επανήλθε σε αυτή του βασικού φθορισμού (στη τιμή δηλαδή της έντασης φθορισμού που είχε καταγραφεί πριν την προσθήκη της στο μίγμα αντίδρασης). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε για όλες τις αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές που έγινε αφαίρεση της μεμβράνης (βλέπε και **σχήμα 48**).

Για την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC παρατηρήθηκε ότι η τιμή της έντασης φθορισμού έπειτα από την αφαίρεσή της από το μίγμα της αντίδρασης δεν επανήλθε σε αυτή του βασικού φθορισμού, αλλά σε μεγαλύτερη. Επιπλέον, με αύξηση του χρόνου παραμονής της μεμβράνης στο μίγμα αντίδρασης αυξήθηκε και η απόκλιση από την τιμή του βασικού φθορισμού. Αφαίρεση της μεμβράνης έπειτα από 4 h από την προσθήκη της έδειξε απόκλιση κατά  $32 \pm 4\%$  από την τιμή του βασικού φθορισμού.

**Τα αποτελέσματα της φθορισμομετρικής ανάλυσης συμπίπτουν με αυτά της HPLC και επιβεβαιώνουν ότι η ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC δεν εκροφάται στην υδατική φάση, σε αντίθεση με την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC, η οποία εκροφάται μερικώς.**





ΣΧΗΜΑ 48. Μεταβολή έντασης φθορισμού έπειτα από την αφαίρεση της μεμβράνης της C<sub>12</sub>-NBD-PC μετά από 120 (A) και 240 (B) min από την προσθήκη της στο μίγμα αντίδρασης. Το σημείο με πράσινο χρώμα απεικονίζει το βασικό φθορισμό.

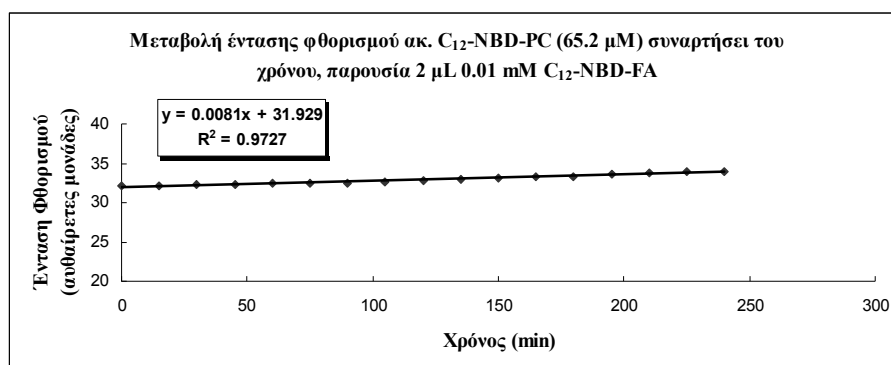
### 1.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ C<sub>12</sub>-NBD-FA

Στη σειρά αυτή πειραμάτων διερευνήθηκε η επίδραση προτύπου διαλύματος C<sub>12</sub>-NBD-FA στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC σε μίγμα αντίδρασης.

#### α) Μεταβολή φθορισμού ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στο μίγμα της αντίδρασης παρουσία προτύπου διαλύματος C<sub>12</sub>-NBD-FA

Παρουσία προτύπου διαλύματος C<sub>12</sub>-NBD-FA παρατηρήθηκε αύξηση της κλίσης της καμπύλης της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο (βλέπε και σχήμα 49).

Η κλίση της καμπύλης δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την κλίση της καμπύλης απουσία προτύπου διαλύματος ( $P > 0.05$ ). Η αρχική συγκέντρωση του αντίστοιχου διαλύματος του υποστρώματος στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή του, ήταν σε όλες τις μετρήσεις 65.2  $\mu\text{M}$ .

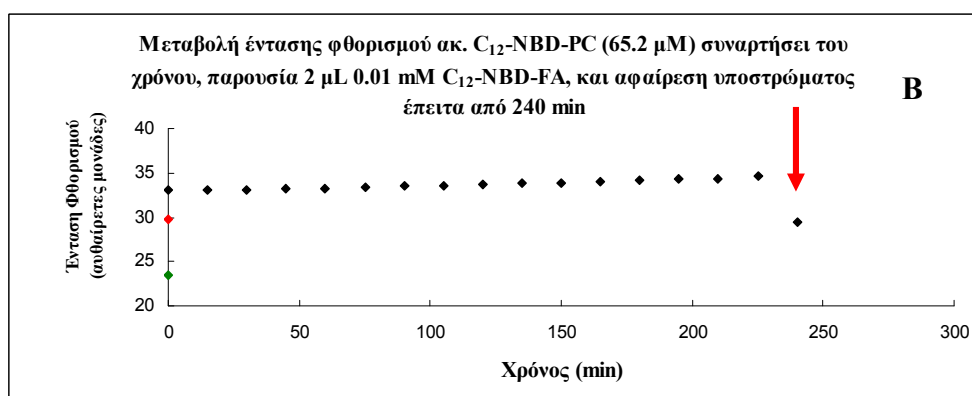
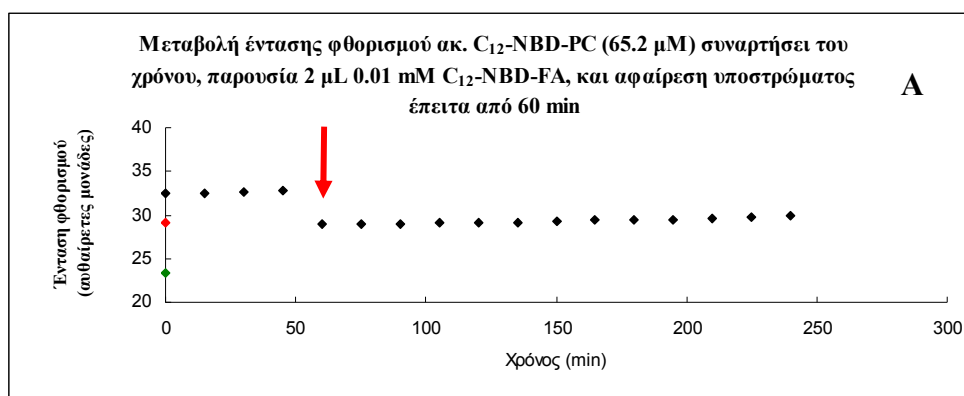


ΣΧΗΜΑ 49. Μεταβολή έντασης φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC παρουσία διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA, συναρτήσει του χρόνου. Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος του υποστρώματος στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή του ήταν 65.2  $\mu\text{M}$ .

Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα του ακινητοποιημένου υποστρώματος παρουσία προτύπου διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA, καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης φθορισμού του μίγματος αντίδρασης έπειτα από αφαίρεση της μεμβράνης αυτού. Επίσης, προκειμένου να ελεγχθεί τυχόν εκρόφιση του υποστρώματος στην υδατική φάση παρουσία του αντίστοιχου λιπαρού οξέος έγινε χρωματογραφική ανάλυση των υπερκειμένων με HPLC.

**β) Μεταβολή φθορισμού μίγματος αντίδρασης παρουσία προτύπου διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA, έπειτα από αφαίρεση της μεμβράνης του ακινητοποιημένου υποστρώματος.**

Παρατηρήθηκε ότι η ένταση φθορισμού που καταγράφηκε μετά την αφαίρεση της μεμβράνης του ακινητοποιημένου υποστρώματος, για όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάστηκαν, συμπίπτει πρακτικά με την ένταση του βασικού φθορισμού και του φθορισμού του προτύπου διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA (βλέπε και **σχήμα 50**).



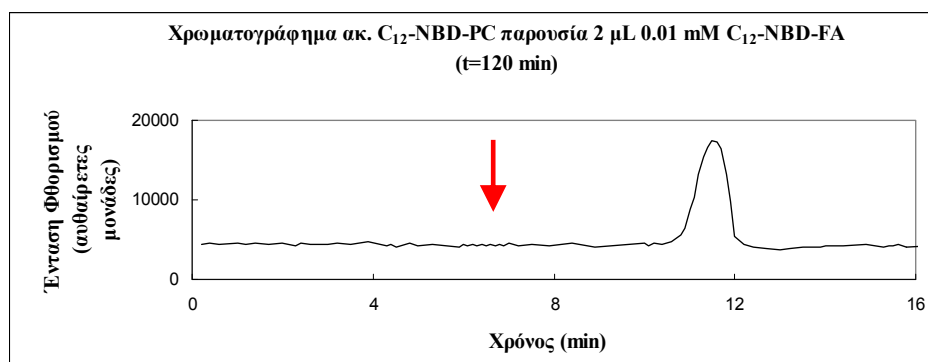
ΣΧΗΜΑ 50. Μεταβολή έντασης φθορισμού μίγματος αντίδρασης παρουσία διαλύματος 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA, έπειτα από αφαίρεση της μεμβράνης του υποστρώματος μετά από 60 (A) και 240 min (B) από την προσθήκη της. Το σημείο με πράσινο χρώμα απεικονίζει το βασικό φθορισμό, ενώ το σημείο με κόκκινο χρώμα απεικονίζει το βασικό φθορισμό και το φθορισμό του προτύπου διαλύματος.

Συμπεραίνουμε επομένως ότι η ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα στο μίγμα αντίδρασης παρουσία προτύπου διαλύματος C<sub>12</sub>-NBD-FA.

### γ) Ανάλυση υπερκειμένου μίγματος αντίδρασης παρουσία προτύπου διαλύματος C<sub>12</sub>-NBD-FA με HPLC

Με τη βοήθεια διάταξης HPLC ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 11.5 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του προτύπου διαλύματος 0.01 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA που χρησιμοποιήθηκε. Ακόμη, δεν ανιχνεύθηκε καμία κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης της C<sub>12</sub>-

NBD-PC, Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε για όλες τις διαφορετικές χρονικές στιγμές που έγινε ένεση στην HPLC (βλέπε και σχήμα 51).



***ΣΧΗΜΑ 51.** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που λαμβάνεται έπειτα από 120 min προσθήκης της μεμβράνης της ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC στο μίγμα αντίδρασης. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 11.5 min αντιστοιχεί στο  $C_{12}$ -NBD-FA, ενώ δεν ανιχνεύεται καμία κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που θα αντιστοιχούσε στην  $C_{12}$ -NBD-PC.*

**Τα αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τη φθορισμομετρική ανάλυση. Συμπεραίνουμε επομένως πως η ακινητοποιημένη  $C_{12}$ -NBD-PC δεν εκροφάται στην υδατική φάση παρουσία προτύπου διαλύματος  $C_{12}$ -NBD-FA.**

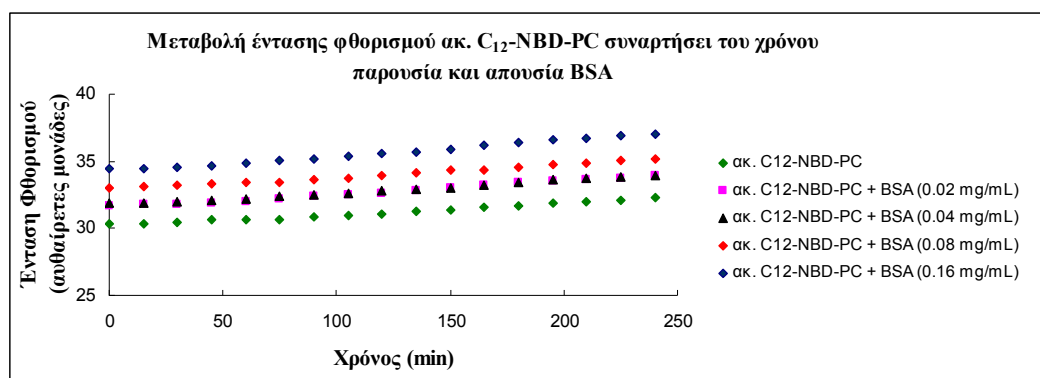
### 1.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ BSA

Στη σειρά αυτή πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης BSA στο φθορισμό των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων της  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC και ελέγχθηκε τυχόν εκρόφησή τους στην υδατική φάση.

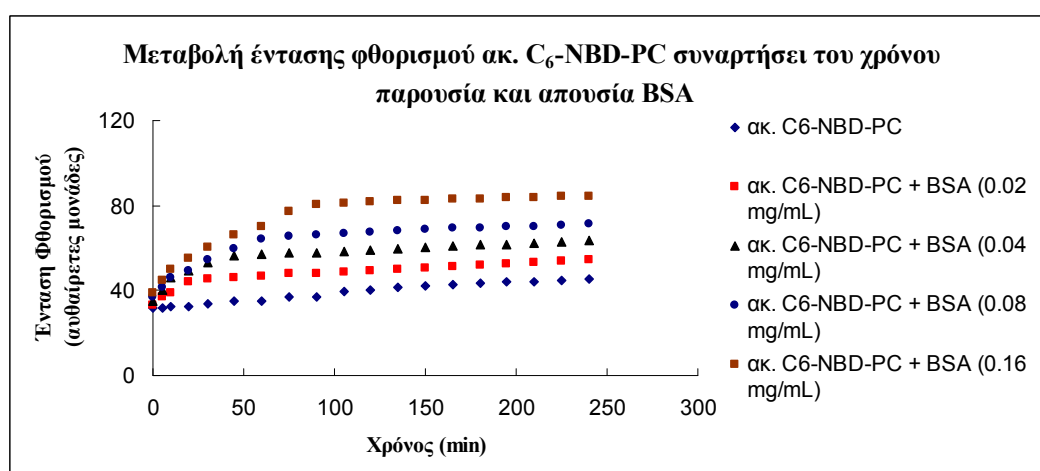
#### **α) Μεταβολή φθορισμού ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στο μίγμα της αντίδρασης**

Για την ακινητοποιημένη  $C_{12}$ -NBD-PC παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού συναρτήσει του χρόνου (βλέπε και **σχήμα 52**). Ωστόσο, οι κλίσεις των καμπυλών που καταγράφηκαν, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης BSA, δεν

παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την κλίση του τυφλού δείγματος (απουσία BSA).



**ΣΧΗΜΑ 52.** Μεταβολή έντασης φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης BSA, συναρτήσει του χρόνου. Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος του αντίστοιχου υποστρώματος στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή του ήταν  $65.2 \mu M$ .



**ΣΧΗΜΑ 53.** Μεταβολή έντασης φθορισμού ακινητοποιημένης  $C_6$ -NBD-PC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BSA, συναρτήσει του χρόνου. Η αρχική συγκέντρωση του αντίστοιχου υποστρώματος στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή του ήταν  $65.2 \mu M$ .

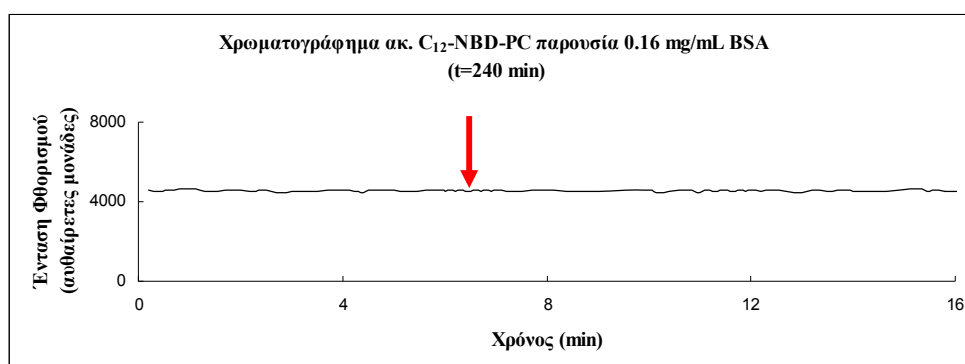
Για την ακινητοποιημένη  $C_6$ -NBD-PC παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έντασης φθορισμού μετά την προσθήκη της BSA. Μετά από ορισμένο χρονικό

διάστημα η κλίση της καμπύλης άρχισε να μικραίνει. Με αύξηση της συγκέντρωσης της BSA αυξήθηκε και ο χρόνος μέχρι να παρατηρηθεί η μείωση της κλίσης της καμπύλης (βλέπε και σχήμα 53).

Προκειμένου να διερευνηθεί περεταίρω ο ρόλος της BSA στο φθορισμό των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων έγινε χρωματογραφική ανάλυση των υπερκειμένων της αντίδρασης με HPLC.

## β) Ανάλυση υπερκειμένων μίγματος αντίδρασης με HPLC

Για την ανάλυση των υπερκειμένων που περιείχαν την ακινητοποιημένη  $C_{12}$ -NBD-PC χρησιμοποιήθηκε το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλουσης  $CH_3OH-H_2O$  (80:20, v/v). Δεν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης της  $C_{12}$ -NBD-PC. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε για όλες τις αντιπροσωπευτικές χρονικές στιγμές (μεταξύ 0 και 4 h) και για όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις BSA που χρησιμοποιήθηκαν (βλέπε και σχήμα 54).



ΣΧΗΜΑ 54 Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που λαμβάνεται έπειτα από 240 min από την προσθήκη 16  $\mu$ L προτύπου διαλύματος 2.5 mg/mL BSA στο μίγμα αντίδρασης που περιέχει την ακινητοποιημένη  $C_{12}$ -NBD-PC. Δεν ανιχνεύεται καμία κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που .

Για την ανάλυση των υπερκειμένων που περιείχαν την ακινητοποιημένη  $C_6$ -NBD-PC χρησιμοποιήθηκε το ισοκρατικό σύστημα έκλουσης  $CH_3OH-H_2O-CH_3COOH$  (60:40:0.2, v/v/v). Ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 8.0 min, που

αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης της C<sub>6</sub>-NBD-PC. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του εμβαδού, που αντιστοιχεί στην κορυφή με χρόνο κατακράτησης 8.0 min, με αύξηση του χρόνου παραμονής της μεμβράνης του ακινητοποιημένου υποστρώματος στο μίγμα αντίδρασης.

Συμπεραίνουμε επομένως πως η ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC δεν εκροφάται στο υπερκείμενο του μίγματος αντίδρασης παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης BSA, ενώ η ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC εκροφάται μερικώς στην υδατική φάση παρουσία BSA.

## **2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PLA<sub>2</sub>**

Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε κατά πόσο η PLA<sub>2</sub> από διαφορετικές πηγές μπορεί να προσδιορισθεί με ακινητοποιημένα υποστρώματα. Ο έλεγχος της μεθόδου έγινε με μελέτη της μεταβολής της έντασης του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης, καθώς και μετά από ανάλυση αυτού με HPLC

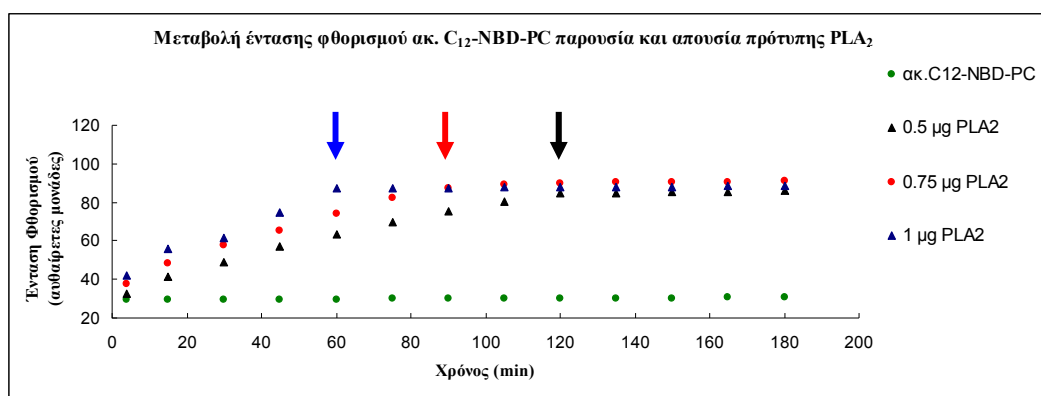
### **2.1 ΠΡΟΤΥΠΗ PLA<sub>2</sub>**

#### **α) Μεταβολή φθορισμού ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στο μίγμα της αντίδρασης**

Παρατηρήθηκε πως η παρουσία του πρότυπου ενζύμου αυξάνει την κλίση της καμπύλης της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Πιο συγκεκριμένα η καμπύλη αυξάνει γραμμικά σε συνάρτηση με το χρόνο και εν συνεχεία παρατηρείται η εμφάνιση plateau. Αύξηση της συγκέντρωσης της PLA<sub>2</sub> αυξάνει γραμμικά την κλίση της γραμμικής περιοχής και ταυτόχρονα μειώνει γραμμικά τον χρόνο εμφάνισης του plateau. Επιπρόσθετα, όλες οι καμπύλες καταλήγουν πρακτικά στην ίδια τιμή έντασης φθορισμού πριν την εμφάνιση του plateau (βλέπε και **σχήμα 55**). Αναλυτικότερα, η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης που αντιστοιχεί στην παρουσία 0.5 μg PLA<sub>2</sub> (μαύρα σημεία του **σχήματος 55**) είναι  $0.3075 \pm 5\%$ , με  $R^2=0.985$ . Η κλίση που αντιστοιχεί στην παρουσία 0.75 μg PLA<sub>2</sub> (κόκκινα σημεία του **σχήματος 55**) είναι  $0.4659 \pm 5\%$ ,  $R^2=0.993$ , ενώ η κλίση που αντιστοιχεί στην παρουσία 1 μg PLA<sub>2</sub> (μπλε σημεία του **σχήματος 55**) είναι  $0.5876 \pm 5\%$ , με

$R^2=0.981$ . Τέλος, η κλίση της καμπύλης που αντιστοιχεί στην παρουσία 0  $\mu\text{g}$  PLA<sub>2</sub> (τυφλό δείγμα, πράσινα σημεία του **σχήματος 55**) είναι  $0.0065 \pm 3\%$ , με  $R^2=0.934$ .

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί κατά πόσο η γραμμική αύξηση του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης οφείλεται στην υδρολυτική δράση της PLA<sub>2</sub>, ακολούθησε ανάλυση με HPLC.



**ΣΧΗΜΑ 55.** Μεταβολή έντασης φθορισμού μίγματος αντίδρασης απουσία (καμπύλη με πράσινα σημεία) και παρουσία 0.5, 0.75 και 1.0  $\mu\text{g}$  BSA (καμπύλη με μαύρα, κόκκινα και μπλε σημεία αντίστοιχα). Το ιδίου χρώματος βέλος δείχνει την χρονική στιγμή εμφάνισης του plateau σε κάθε καμπύλη. Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της C<sub>12</sub>-NBD-PC στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή της ήταν 65.2  $\mu\text{M}$ .

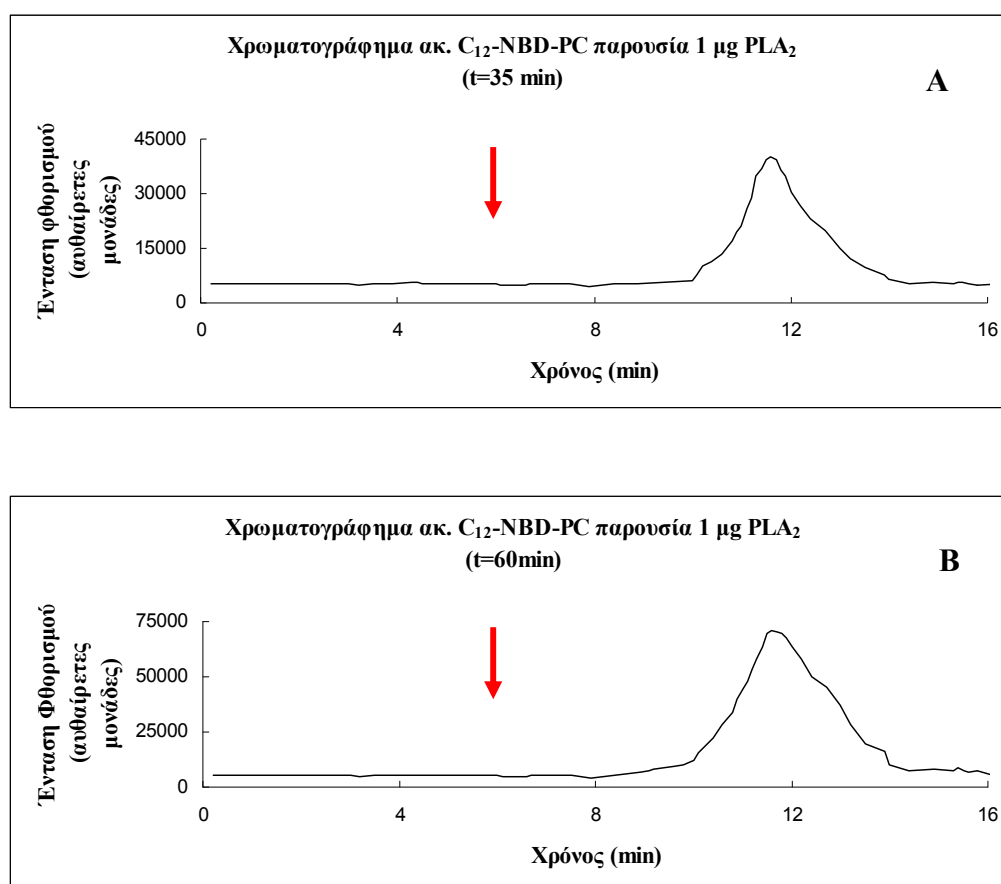
## β) Ανάλυση υπερκειμένων μίγματος αντίδρασης με HPLC

Από τα χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 11.5 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του C<sub>12</sub>-NBD-FA, του προϊόντος δηλαδή υδρόλυσης της πρότυπης PLA<sub>2</sub> στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της C<sub>12</sub>-NBD-PC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση ανάμεσα στο εμβαδό της κορυφής αυτής και στο χρόνο παραμονής της μεμβράνης της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC στο μίγμα αντίδρασης. Ακόμη, για το χρονικό διάστημα που παρακολούθηθηκε κινητικά η αντίδραση (μεταξύ 0 και 4 h), δεν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που θα αντιστοιχούσε στο χρόνο κατακράτησης της C<sub>12</sub>-NBD-PC (βλέπε και **σχήμα 56**).



Συμπερασματικά, με τη βοήθεια της HPLC προκύπτει ότι η αύξηση της έντασης του φθορισμού οφείλεται σε υδρολυτική δράση του πρότυπου ενζύμου στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της  $C_{12}$ -NBD-PC.

Επίσης, επιβεβαιώνεται ότι το ακινητοποιημένο υπόστρωμα δεν εκροφάται στην υδατική φάση παρουσία πρότυπης πηγής ενζύμου.

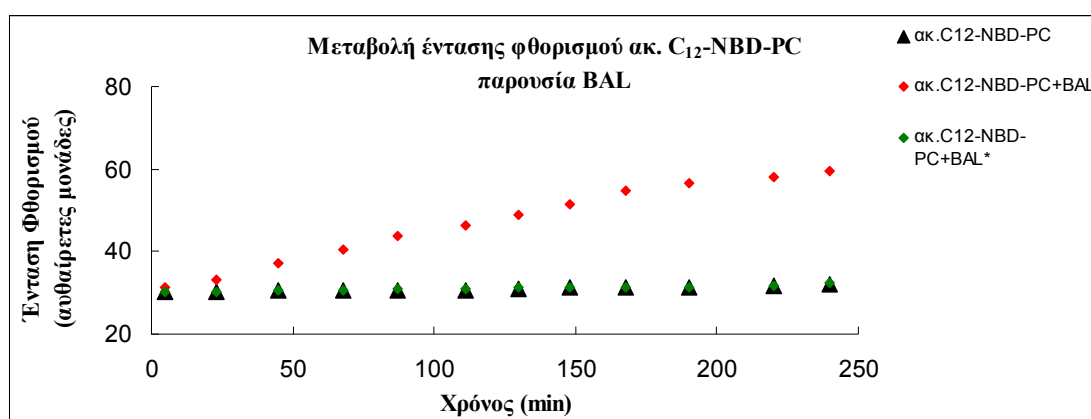


ΣΧΗΜΑ 56. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται μετά από 35 (A) και 60 min (B) από την προσθήκη προτύπου διαλύματος 100  $\mu$ g/mL  $PLA_2$  στο μίγμα αντίδρασης. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 11.5 min αντιστοιχεί στο  $C_{12}$ -NBD-FA, ενώ δεν ανιχνεύεται κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που αντιστοιχεί στην  $C_{12}$ -NBD-PC.

## 2.2 ΟΡΟΣ Ή BAL

α) Μεταβολή φθορισμού ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στο μίγμα της αντίδρασης

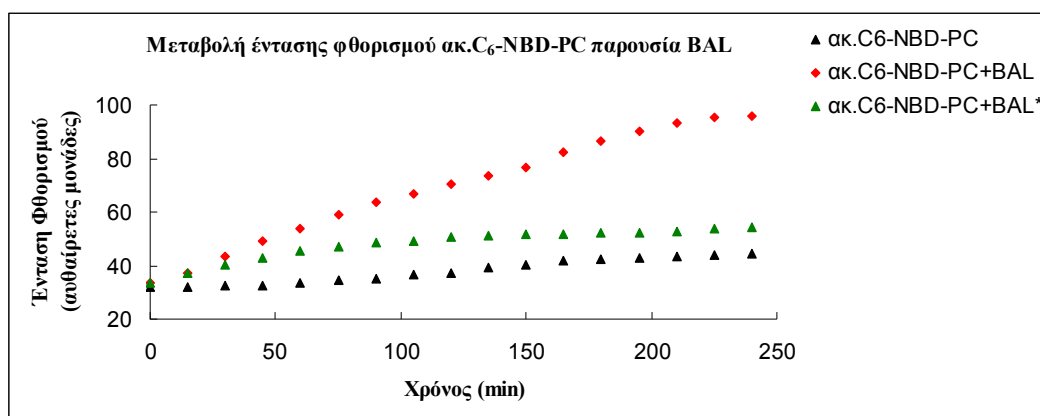
Στο ακόλουθο **σχήμα 57** απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού του μίγματος αντίδρασης που καταγράφηκε απουσία δείγματος BAL (τυφλού δείγματος), παρουσία δείγματος BAL και παρουσία του ιδίου δείγματος, το οποίο προηγουμένως είχε υποστεί βρασμό (αρνητικό control) για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC. Οι κλίσεις των καμπυλών είναι  $0.0067 \pm 3 \%$ , με  $R^2=0.967$  (μαύρα σημεία του σχήματος 57),  $0.1265 \pm 6 \%$ , με  $R^2=0.982$  (κόκκινα σημεία του σχήματος 57) και  $0.0077 \pm 6 \%$ , με  $R^2=0.963$  (πράσινα σημεία του σχήματος 57), αντίστοιχα.



**ΣΧΗΜΑ 57.** Μεταβολή έντασης φθορισμού μίγματος αντίδρασης απουσία δείγματος BAL (καμπύλη με μαύρα σημεία), παρουσία δείγματος BAL (καμπύλη με κόκκινα σημεία) και παρουσία ιδίου βρασμένου δείγματος BAL\* (καμπύλη με πράσινα σημεία). Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της C<sub>12</sub>-NBD-PC στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή της ήταν 65.2  $\mu$ M.

Στο ακόλουθο **σχήμα 58** απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού που καταγράφηκε απουσία δείγματος BAL (τυφλού δείγματος), παρουσία δείγματος BAL και παρουσία του ιδίου δείγματος, το οποίο προηγουμένως είχε υποστεί βρασμό (αρνητικό control) για την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC. Οι κλίσεις των καμπυλών είναι  $0.0609 \pm 4\%$ , με  $R^2=0.977$  (μαύρα σημεία του σχήματος 58),  $0.2690 \pm 8 \%$ , με  $R^2=0.988$  (κόκκινα σημεία του σχήματος 58) και  $0.0744 \pm 8\%$ , με  $R^2=0.848$  (πράσινα σημεία του σχήματος 58), αντίστοιχα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί κατά πόσο η γραμμική αύξηση του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης οφείλεται στην υδρολυτική δράση της PLA<sub>2</sub>, ακολούθησε ανάλυση με HPLC και TLC.

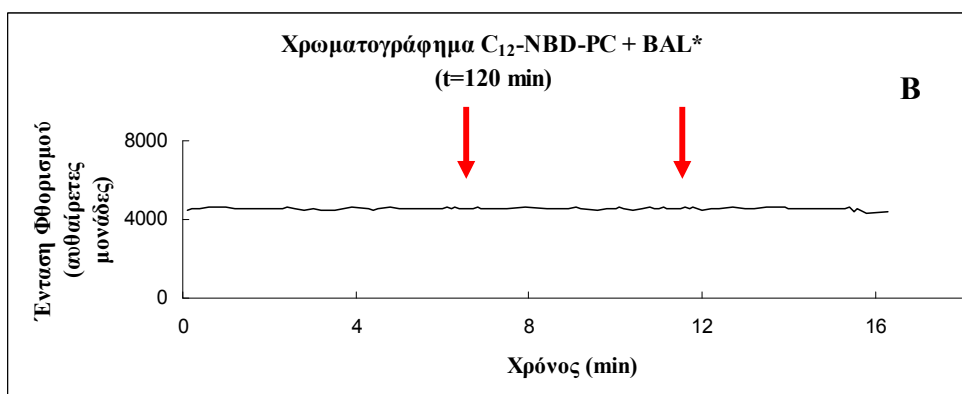
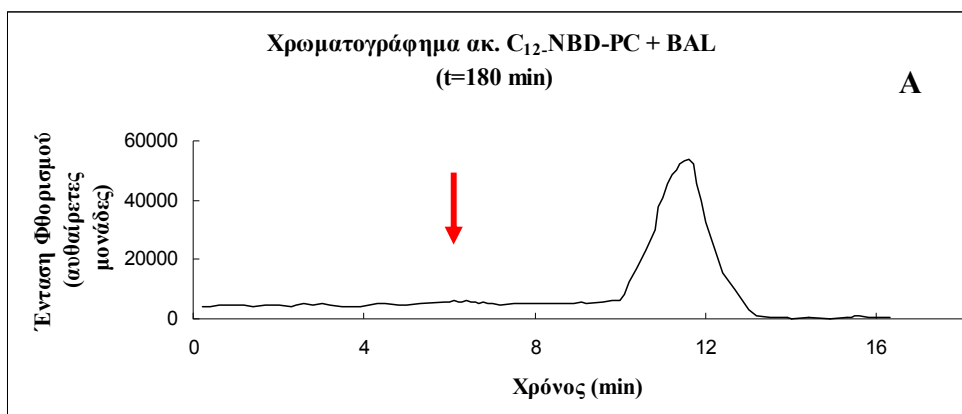


ΣΧΗΜΑ 58. Μεταβολή έντασης φθορισμού μίγματος αντίδρασης απουσία δείγματος BAL (καμπύλη με μαύρα σημεία), παρουσία δείγματος BAL (καμπύλη με κόκκινα σημεία) και παρουσία ιδίου βρασμένου δείγματος BAL\* (καμπύλη με πράσινα σημεία). Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της C<sub>6</sub>-NBD-PC στο αδρανές υλικό πριν την ακινητοποίησή της ήταν 65.2 μM.

## β) Ανάλυση υπερκειμένων μίγματος αντίδρασης με HPLC

Από τα χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 11.5 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του C<sub>12</sub>-NBD-FA, του προϊόντος δηλαδή υδρόλυσης της PLA<sub>2</sub> του δείγματος BAL στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της C<sub>12</sub>-NBD-PC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση ανάμεσα στο εμβαδό της κορυφής αυτής και στο χρόνο παραμονής της μεμβράνης της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC στο μίγμα αντίδρασης. Ακόμη, για το χρονικό διάστημα που παρακολούθηθηκε κινητικά η αντίδραση (μεταξύ 0 και 4 h), δεν ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που θα αντιστοιχούσε στο χρόνο κατακράτησης της C<sub>12</sub>-NBD-PC. Επίσης, για το βρασμένο δείγμα BAL δεν ανιχνεύθηκε καμία κορυφή, τόσο σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, όσο και σε χρόνο κατακράτησης 11.5 min (βλέπε και **σχήμα 59**).

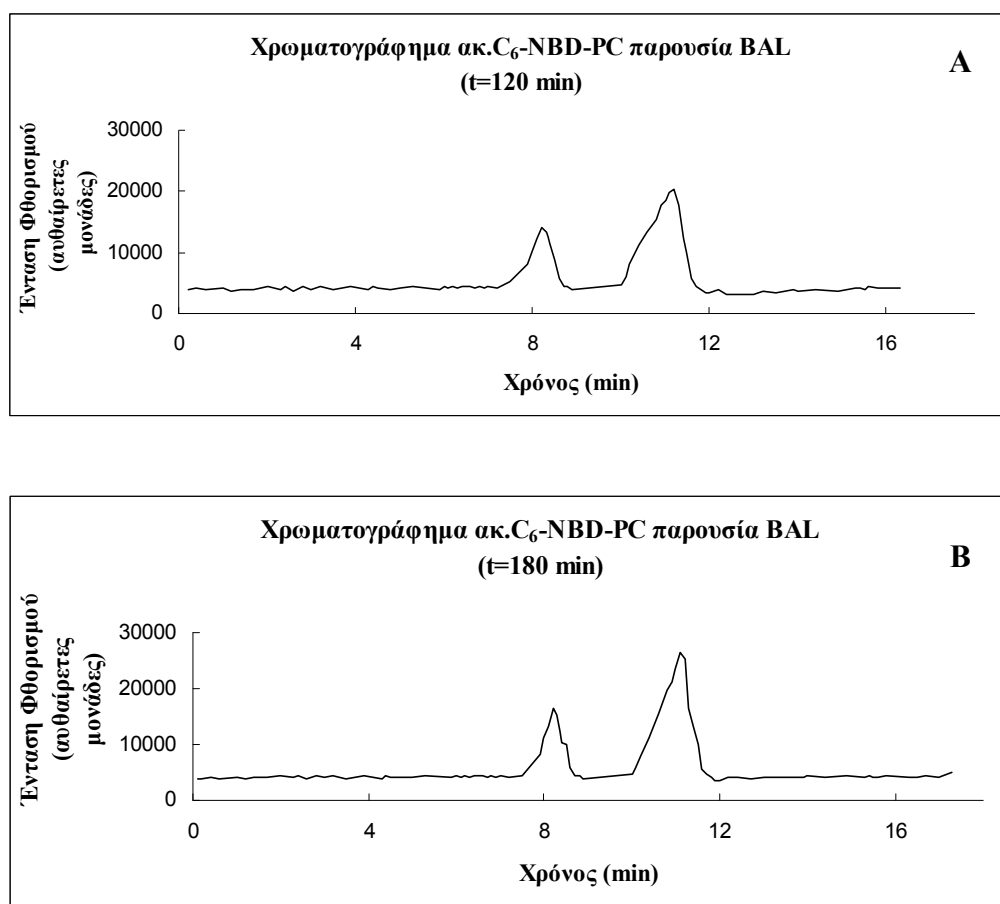
**Συμπερασματικά, με τη βοήθεια της HPLC προκύπτει ότι η αύξηση της έντασης του φθορισμού οφείλεται σε υδρολυτική δράση της PLA<sub>2</sub> του δείγματος BAL στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της C<sub>12</sub>-NBD-PC.**



**ΣΧΗΜΑ 59.** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται μετά από 180 min (A) από την προσθήκη δείγματος BAL και 180 min έπειτα από τη προσθήκη του ιδίου βρασμένου δείγματος BAL\* στο μίγμα αντίδρασης που περιέχει την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 11.5 min αντιστοιχεί στο C<sub>12</sub>-NBD-FA, ενώ δεν ανιχνεύεται καμία κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 6.6 min, που αντιστοιχεί στην C<sub>12</sub>-NBD-PC.

Από τα χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν για το ίδιο δείγμα BAL, ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 11.2 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης του C<sub>6</sub>-NBD-FA. Παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση ανάμεσα στο εμβαδό της κορυφής αυτής και στο χρόνο παραμονής της μεμβράνης της ακινητοποιημένης C<sub>6</sub>-NBD-PC στη θέση της πλάκας. Επίσης, για το χρονικό διάστημα που παρακολούθηθηκε κινητικά η αντίδραση (μεταξύ 0 και 4 h), ανιχνεύθηκε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 8.0 min, που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης της C<sub>6</sub>-NBD-PC. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του εμβαδού της κορυφής που αντιστοιχεί σε χρόνο κατακράτησης 8.0 min σε συνάρτηση με το χρόνο

παραμονής της ακινητοποιημένης C<sub>6</sub>-NBD-PC στο μίγμα της αντίδρασης (βλέπε και σχήμα 60).

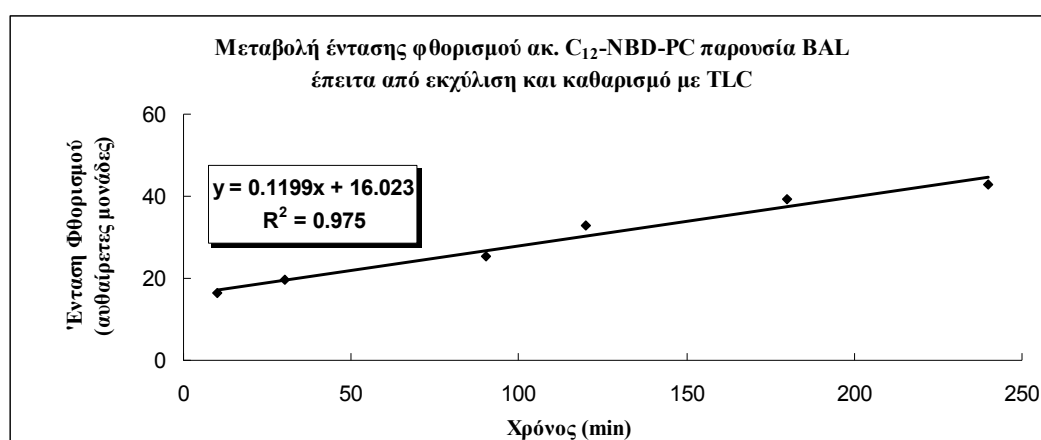


ΣΧΗΜΑ 60. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται μετά από 120 (Α) και 180 min (Β) από την προσθήκη δείγματος BAL στο μίγμα αντίδρασης που περιέχει την ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 11.2 min αντιστοιχεί στο C<sub>6</sub>-NBD-FA, ενώ η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 8.0 min αντιστοιχεί στην C<sub>6</sub>-NBD-PC.

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η αύξηση της έντασης φθορισμού οφείλεται στη δράση της PLA<sub>2</sub> του BAL στην ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC, αλλά και στο υπόστρωμα που έχει εκροφηθεί στην υδατική φάση.

γ) Ανάλυση υπερκειμένων μίγματος αντίδρασης με TLC

Το υπερκείμενο του μίγματος αντίδρασης που περιείχε την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC παρουσία δείγματος BAL εκχυλίστηκε κατά Bligh-Dyer και καθαρίστηκε με TLC σε διάφορες χρονικές στιγμές. Απομονώθηκε εν συνεχεία η κορυφή που αντιστοιχούσε στο R<sub>f</sub> του C<sub>12</sub>-NBD-FA, του προϊόντος δηλαδή που απελευθερώνεται από τη δράση της PLA<sub>2</sub> του BAL στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα της C<sub>12</sub>-NBD-PC και μετρήθηκε ο φθορισμός του. Στο ακόλουθο **σχήμα 61** απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρούμε πως η κλίση της καμπύλης είναι  $0.1199 \pm 8\%$  με  $R^2=0.975$ , πρακτικά ίδια με την κλίση που είχε προσδιοριστεί φθορισμομετρικά πριν τον καθαρισμό του.



*ΣΧΗΜΑ 61. Μεταβολή έντασης φθορισμού μίγματος αντίδρασης παρουσία δείγματος BAL, έπειτα από τον καθαρισμό του με TLC.*

Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει πως η αύξηση της έντασης του φθορισμού που παρατηρήθηκε φθορισμομετρικά οφείλεται σε υδρολυτική δράση της PLA<sub>2</sub> του δείγματος BAL στην ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC.

## 2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε φθορισμομετρική μέθοδος ανίχνευσης και προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub> με χρήση ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC. Στον ακόλουθο πίνακα 12 συνοψίζεται η πιστότητα αυτής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την % RSD των μετρήσεων.

*ΠΙΝΑΚΑΣ 12 Πιστότητα φθορισμομετρικής μεθόδου προσδιορισμού PLA<sub>2</sub> με χρήση ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC.*

|           |                   |      |
|-----------|-------------------|------|
| Πιστότητα | Επαναληψιμότητα   | ≤ 6% |
|           | Αναπαραγωγιμότητα | ≤ 9% |

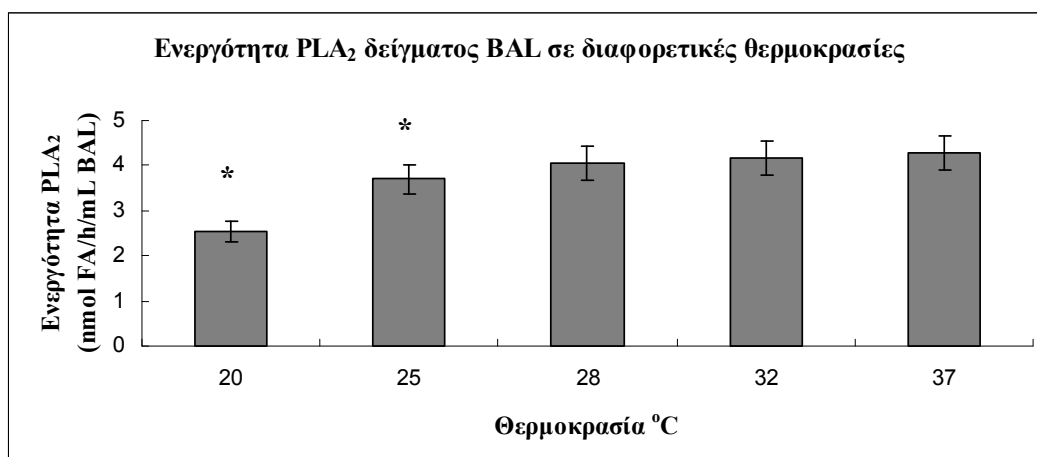
Παρατηρούμε πως η μέθοδος προσδιορισμού ενεργότητας PLA<sub>2</sub> βιολογικών δειγμάτων χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα.

## 2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ C<sub>12</sub>-NBD-PC

Στη σειρά αυτή πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων χημικών και φυσικοχημικών παραμέτρων στο προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub> με χρήση ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC.

### *A. Επίδραση θερμοκρασίας*

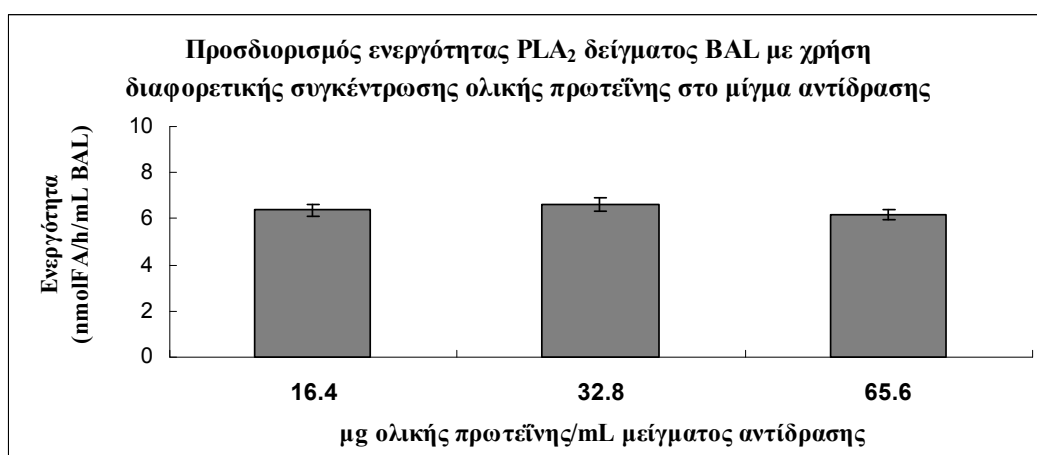
Προσδιορίστηκε η ενεργότητα δείγματος BAL σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 έως τους 37 °C παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής της ενεργότητας του δείγματος. Μάλιστα, η ενεργότητα που προσδιορίζεται στους 28, τους 32 και τους 37 °C παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική μεταβολή ( $P < 0.001$ ) σε σχέση με την ενεργότητα που προσδιορίζεται στους 20 και τους 25 °C (βλέπε και **σχήμα 62**). Επιπλέον, η μέγιστη ενεργότητα προσδιορίστηκε στους 37 °C. **Για το λόγο αυτό και η θερμοκρασία των 37 °C επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub>.**



ΣΧΗΜΑ 62. Προσδιορισμός ενεργότητας PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL στους 20, 25, 28, 32 και 37 °C. Το σύμβολο \* δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

#### *B. Επίδραση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης βιολογικών δειγμάτων*

Προσδιορίστηκε η ενεργότητα PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL χρησιμοποιώντας διαφορετικούς όγκους δείγματος, έτσι ώστε η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης του δείγματος να διαφέρει σημαντικά στο μίγμα αντίδρασης.



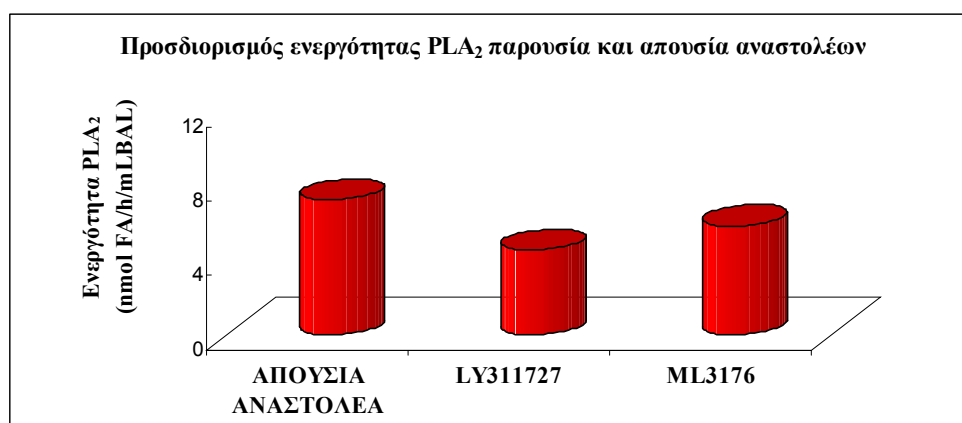
ΣΧΗΜΑ 63. Επίδραση ολικής πρωτεΐνης BAL στο προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub>.

Συνεπώς, με βάση την παρούσα μέθοδο μπορεί να προσδιοριστεί ενεργότητα PLA<sub>2</sub> βιολογικών δειγμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ολικής πρωτεΐνης.



### Γ. Επίδραση αναστολέων της PLA<sub>2</sub>

Προσδιορίστηκε η ενεργότητα PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL απουσία αναστολέα, παρουσία του αναστολέα LY 311727 και παρουσία του αναστολέα ML 3176. **Βρέθηκε ότι με τον αναστολέα LY 311727 έχουμε  $39 \pm 2\%$  αναστολή της δράσης της PLA<sub>2</sub>, ενώ με τον αναστολέα ML έχουμε  $19 \pm 2\%$  αναστολή της δράσης της PLA<sub>2</sub> (βλέπε και σχήμα 64).**



ΣΧΗΜΑ 64. Προσδιορισμός ενεργότητας PLA<sub>2</sub> δείγματος BAL απουσία αναστολέα και παρουσία αναστολέων LY 311727 και ML 3176.

## 3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στην παρούσα εργασία ακινητοποιήθηκαν τα υποστρώματα της C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για το φθορισμομετρικό προσδιορισμό PLA<sub>2</sub> βιολογικών δειγμάτων.

Παρατηρήθηκε πως η ακινητοποιημένη C<sub>6</sub>-NBD-PC εμφανίζει σταθερότητα παρουσία και απουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup>, σε διαφορετικές τιμές pH, ενώ η διαδικασία ακινητοποίησής της χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγικότητα.

Ωστόσο παρατηρήθηκε η μερική εκρόφησή της στην υδατική φάση παρουσία διαφόρων παραμέτρων. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub> είναι απαραίτητη η παρουσία και ο ακριβής έλεγχος του τυφλού δείγματος.

#### 4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

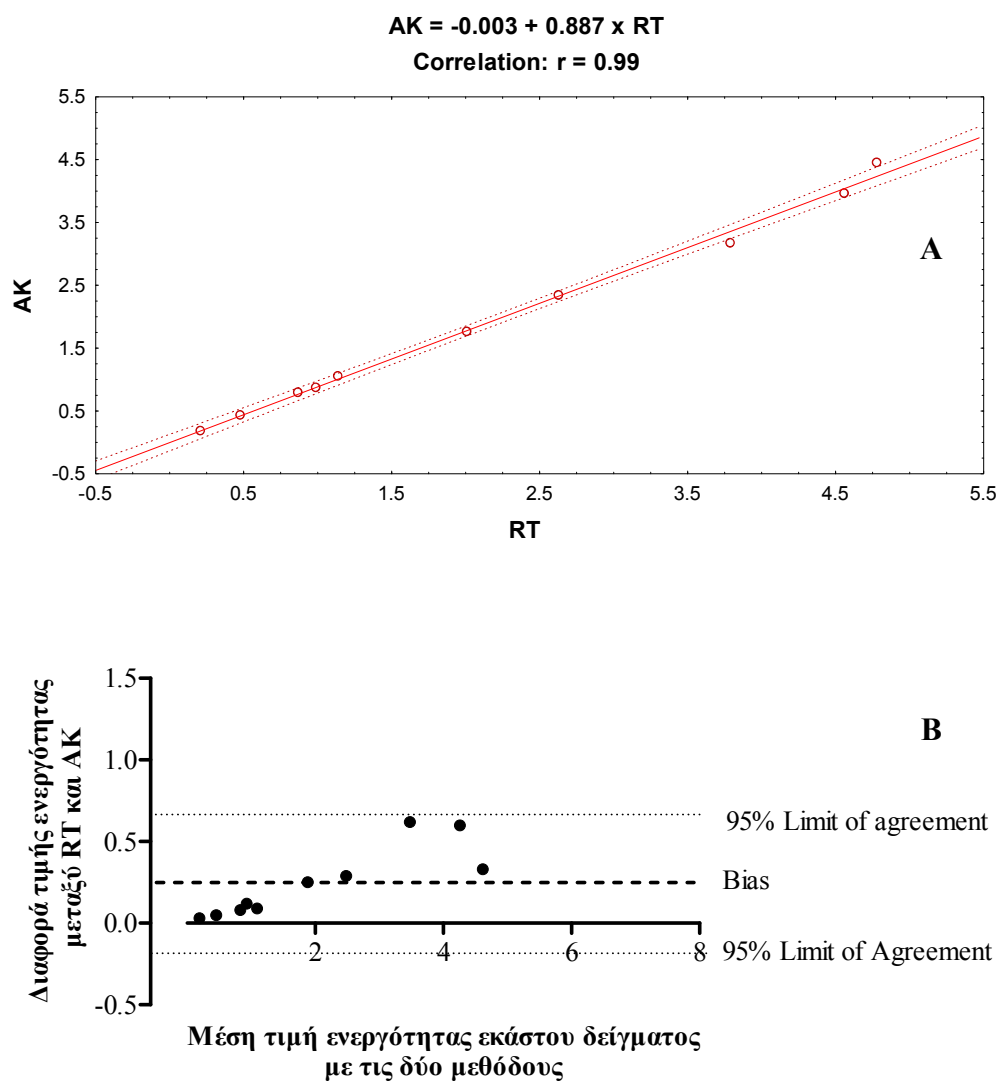
Στον ακόλουθο πίνακα 12 απεικονίζεται η ενεργότητα  $PLA_2$  δειγμάτων BAL, όπως αυτή προσδιορίστηκε με την παρούσα φθορισμομετρική μέθοδο (AK), με φθορισμομετρική μέθοδο σε πραγματικό χρόνο (RT) καθώς επίσης και με HPLC-φθορισμομετρική μέθοδο (HPLC). Σε ανεξάρτητη στήλη απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων BAL, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα statistika (version 15.0) και Graph Pad (version 5.0).

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 Προσδιορισμός ενεργότητας  $PLA_2$  δειγμάτων BAL με τρεις φθορισμομετρικές μεθόδους.

| BAL<br>(α/α) | Φθορισμομετρική<br>μέθοδος με χρήση<br>ακ. $C_{12}$ -NBD-PC<br>(nmol FA·h <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup><br>BAL) | Φθορισμομετρική<br>μέθοδος σε<br>πραγματικό χρόνο<br>(nmolFA·h <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup><br>BAL) | HPLC-<br>φθορισμομετρική<br>μέθοδος<br>(nmolFA·h <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup><br>BAL) | Ολική<br>Πρωτεΐνη<br>(μg/mL<br>BAL) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1            | 4.45 ± 0.37                                                                                                       | 4.78 ± 0.55                                                                                            | 4.69 ± 0.59                                                                              | 818.1                               |
| 2            | 3.17 ± 0.25                                                                                                       | 3.79 ± 0.45                                                                                            | 3.76 ± 0.49                                                                              | 789.7                               |
| 3            | 3.96 ± 0.30                                                                                                       | 4.56 ± 0.5                                                                                             | 4.32 ± 0.51                                                                              | 611.2                               |
| 4            | 2.34 ± 0.20                                                                                                       | 2.63 ± 0.30                                                                                            | 2.45 ± 0.32                                                                              | 140.5                               |
| 5            | 1.76 ± 0.11                                                                                                       | 2.01 ± 0.25                                                                                            | 2.11 ± 0.25                                                                              | 267.4                               |
| 6            | 0.18 ± 0.02                                                                                                       | 0.21 ± 0.05                                                                                            | 0.23 ± 0.03                                                                              | 526.5                               |
| 7            | 0.79 ± 0.07                                                                                                       | 0.87 ± 0.10                                                                                            | 0.82 ± 0.11                                                                              | 739.4                               |
| 8            | 0.87 ± 0.07                                                                                                       | 0.99 ± 0.11                                                                                            | 1.02 ± 0.12                                                                              | 508.3                               |
| 9            | 1.05 ± 0.08                                                                                                       | 1.14 ± 0.14                                                                                            | 1.23 ± 0.15                                                                              | 239.6                               |
| 10           | 0.43 ± 0.04                                                                                                       | 0.48 ± 0.07                                                                                            | 0.53 ± 0.07                                                                              | 687.3                               |

*A. Συσχέτιση μεταξύ φθορισμομετρικής μεθόδου με χρήση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (AK) και φθορισμομετρικής μεθόδου σε πραγματικό χρόνο (RT)*

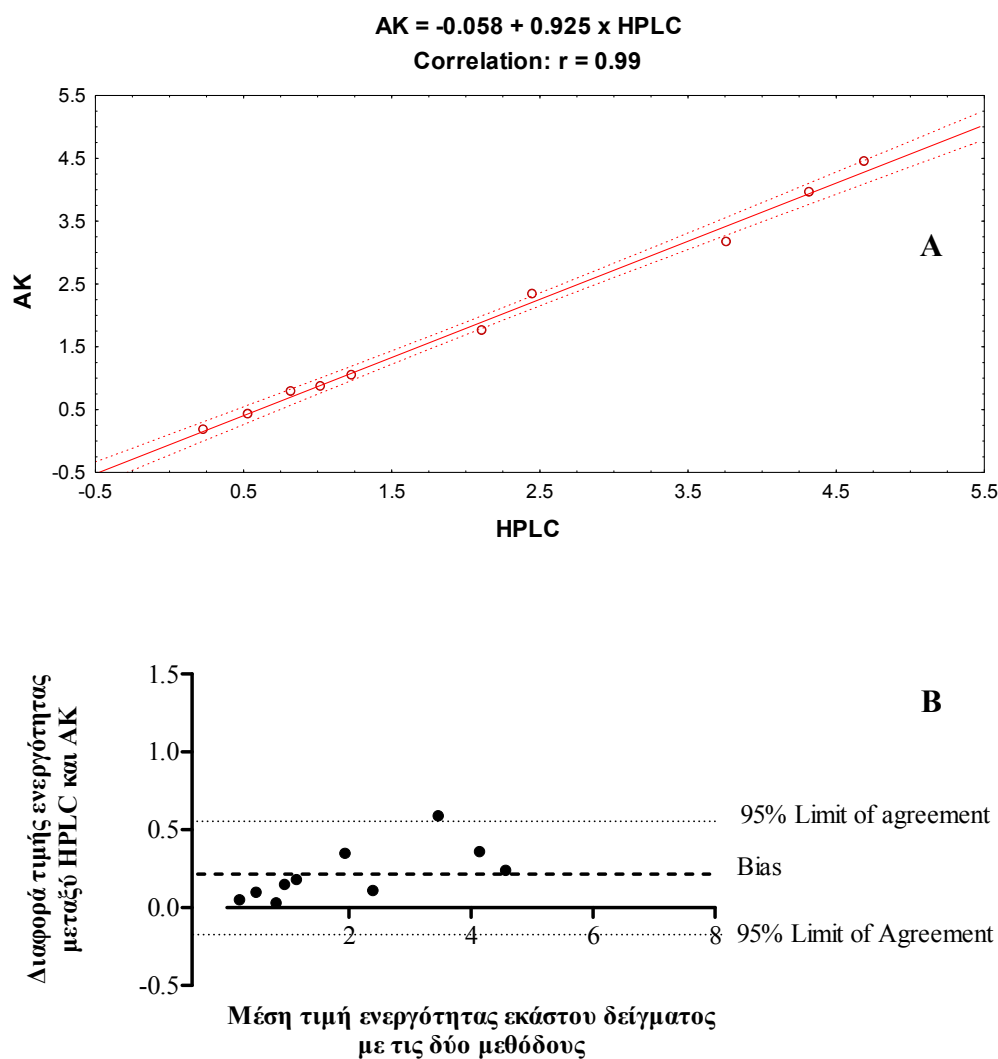
Στο ακόλουθο **σχήμα 65A** απεικονίζεται γραφικά η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι  $r=0.99$  με  $P<0.0001$ . Η σχέση που συνδέει τις δύο μεθόδους είναι  $AK = -0.003 + 0.887 \times RT$ . Στο **σχήμα 65B** απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων, με βάση την ανάλυση Bland-Altman. Με βάση αυτή, η mean difference μεταξύ των δύο μεθόδων είναι  $0.25 \pm 0.22$ .



ΣΧΗΜΑ 65. Συσχέτιση μεταξύ AK και RT. Ανάλυση κατά Pearson (A) και ανάλυση κατά Bland-Altman (B).

B. Συσχέτιση μεταξύ φθορισμομετρικής μεθόδου με χρήση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (AK) και HPLC-φθορισμομετρικής μεθόδου

Στο ακόλουθο **σχήμα 66Α** απεικονίζεται γραφικά η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι  $r=0.99$  με  $P<0.0001$ . Η σχέση που συνδέει τις δύο μεθόδους είναι  $AK = -0.058 + 0.925 \times HPLC$ . Στο **σχήμα 66Β** απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων, με βάση την ανάλυση Bland-Altman. Με βάση αυτή, η mean difference μεταξύ των δύο μεθόδων είναι  $0.22 \pm 0.17$ .



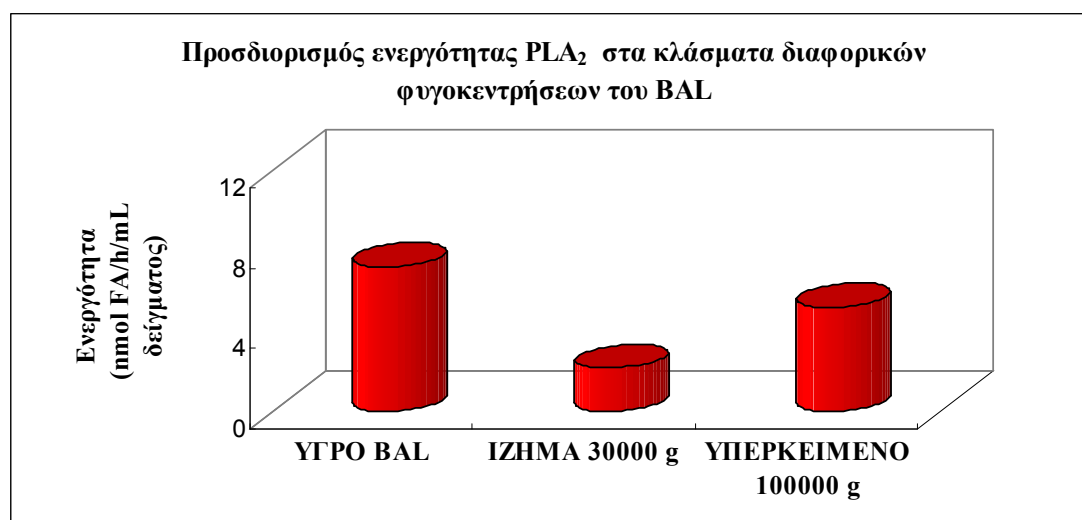
ΣΧΗΜΑ 66. Συσχέτιση μεταξύ AK και RT. Ανάλυση κατά Pearson (A) και ανάλυση κατά Bland-Altman (B).

Παρατηρούμε πως η παρούσα μέθοδος παρουσιάζει σημαντική στατιστική συσχέτιση με τις μεθόδους με τις οποίες αξιολογήθηκε.

## 5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ενεργότητας  $PLA_2$  στο υγρό δείγμα BAL, στο ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης των 30,000 x g και στο υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης των 100,000 x g με χρήση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC (βλέπε και σχήμα 67).

**Παρατηρούμε πως η παρούσα μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί σε διαφορετικές βιολογικές πηγές  $PLA_2$ .**

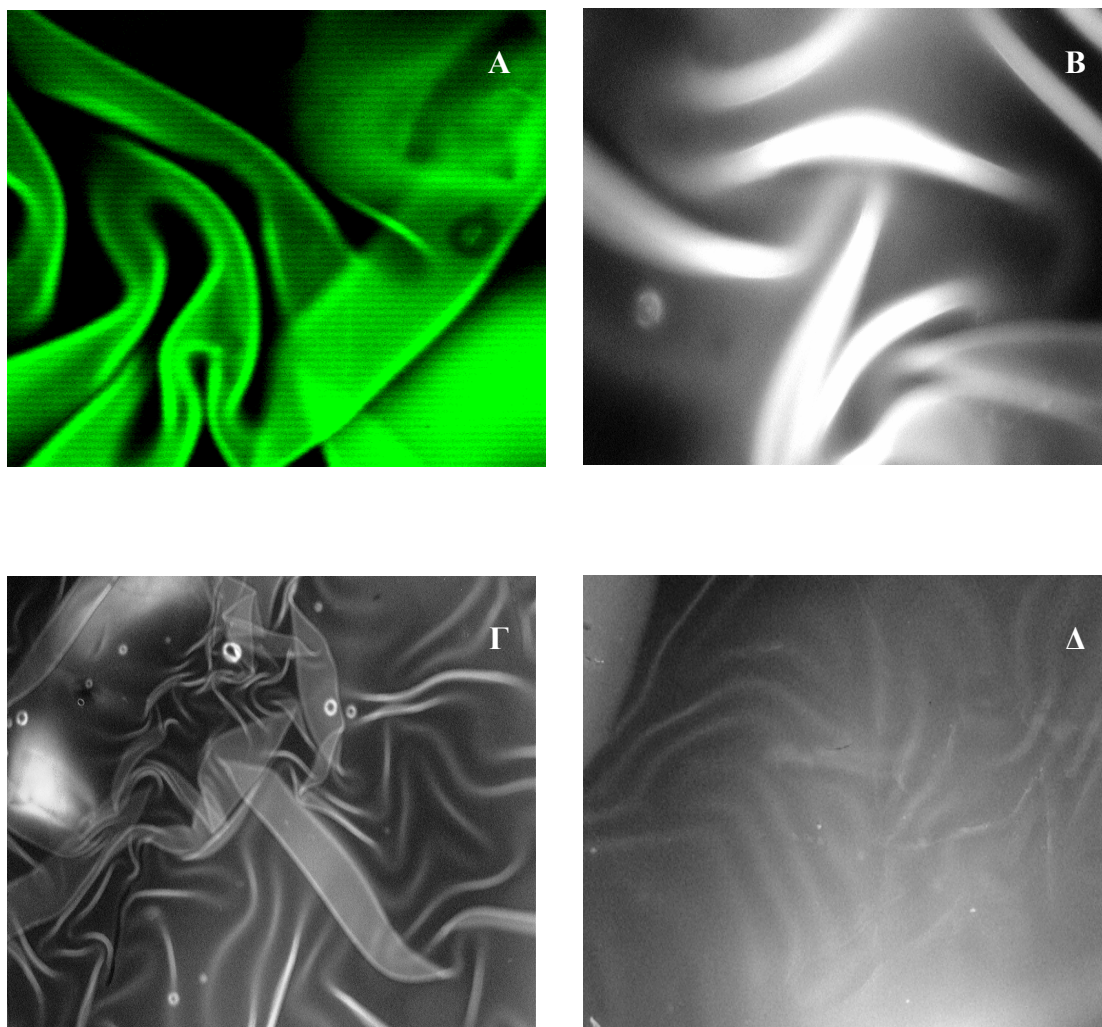


*ΣΧΗΜΑ 67. Προσδιορισμός ενεργότητας  $PLA_2$  με χρήση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC στο υγρό δείγμα BAL, στο ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης των 30,000 g και στο υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης των 100,000 g.*

## **6. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ $C_{12}$ -NBD-PC**

Στο ακόλουθο σχήμα 68 απεικονίζεται το ακινητοποιημένο υπόστρωμα της  $C_{12}$ -NBD-PC με χρήση μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης (Α) και με χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου ανοσοφθορισμού (Β,Γ,Δ). Οι εικόνες Β και Γ είναι πριν, ενώ η εικόνα Δ είναι μετά την επίδραση βιολογικής πηγής  $PLA_2$  στο ακινητοποιημένο υπόστρωμα.

Όπως προκύπτει από τις διάφορες εικόνες το υπόστρωμα φέρει πτυχώσεις, ο δε φθορισμός είναι διάχυτος. Επίσης παρατηρείται μείωση του φθορισμού μετά την επίδραση βιολογικής πηγής  $PLA_2$ .



ΣΧΗΜΑ 68. Απεικόνιση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC σε μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης LEICA TCS SP (Α μεγέθυνση X40) και σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού LEICA DM IRBE πριν (Β μεγέθυνση X5, Γ μεγέθυνση X2.5) και μετά (Δ μεγέθυνση X2.5) τη δράση βιολογικής πηγής  $PLA_2$ .



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε φθορισμομετρική μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό ολικής ενεργότητας ομάδων PLA<sub>2</sub>, με προτίμηση σε μεγάλες και μικρές λιπαρές αλυσίδες στη θέση *sn*-2 των φωσφολιπιδίων, σε πρότυπα διαλύματα και σε βιολογικά δείγματα με χρήση ακινητοποιημένου λιπιδικού υποστρώματος μιας χρήσης. Για το σκοπό αυτό έγινε ακινητοποίηση των υποστρωμάτων της C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC σε κατάλληλο αδρανές υλικό.

Αρχικά, έγιναν πειράματα αναφοράς για τον έλεγχο της διαδικασίας ακινητοποίησης. Για το σκοπό αυτό:

- Προσδιορίστηκαν τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων παρουσία διαφόρων παραγόντων
- Εξετάσθηκε η τυχόν εκρόφηση των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στην υδατική φάση παρουσία διαφόρων παραγόντων, τόσο φθορισμομετρικά, όσο και χρωματογραφικά (με τη βοήθεια διάταξης HPLC).
- Εξετάσθηκαν παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν το φθορισμό των υποστρωμάτων, όπως pH ή θερμοκρασία.

Στη συνέχεια, έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα PLA<sub>2</sub> και σε βιολογικά δείγματα ορού ή BAL:

- Μελετήθηκαν φυσικοχημικές παράμετροι που μπορεί να επηρεάζουν τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό PLA<sub>2</sub> με χρήση ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC, όπως θερμοκρασία ή παρουσία ειδικών αναστολέων του ενζύμου.
- Έγινε στατιστική αποτίμηση της μεθόδου σε σύγκριση με φθορισμομετρική μέθοδο σε πραγματικό χρόνο και με HPLC φθορισμομετρική μέθοδο.
- Προσδιορίστηκαν οι περιορισμοί της μεθόδου.

### 1. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ C<sub>12</sub>- ΚΑΙ C<sub>6</sub>-NBD-PC

Στη βιβλιογραφία μπορεί κανείς να βρει σημαντικό αριθμό δημοσιεύσεων που να αφορούν την ακινητοποίηση ενζύμων και γενικότερα βιομορίων για αναλυτικούς, βιοχημικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς. Ωστόσο, πολύ μικρό αριθμό πληροφοριών μπορεί κανείς να συγκεντρώσει σχετικά με την ακινητοποίηση λιπιδικών



υποστρωμάτων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη καταλυτικής δράσης ενζύμων, που είναι και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

Για την ακινητοποίηση των υποστρωμάτων της C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της σελίδας 84 [413]. Ως αδρανές υλικό για την ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκε η PVA-SbQ. Η υδροφιλικότητα του πολυμερούς, οι ήπιες συνθήκες ακινητοποίησης και η διαδικασία φωτοπολυμερισμού που ακολουθείται είναι ορισμένα από τα πλεονεκτήματά του [416]. Ακόμη, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ακινητοποίησης είναι μια ήπια φυσική μέθοδος, με συνέπεια το υπόστρωμα να επηρεάζεται ελάχιστα.

Η μέθοδος ακινητοποίησης χαρακτηρίζεται από ικανοποιητικά αναλυτικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα η επαναληψιμότητα της διαδικασίας ακινητοποίησης, εκφρασμένης ως %RSD, για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC ήταν  $\leq 3\%$  και  $\leq 4\%$  αντίστοιχα. Η αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας ακινητοποίησης ήταν  $\leq 4\%$  και  $\leq 5\%$  αντίστοιχα.

### *1.1 Φάσματα διέγερσης και εκπομπής*

Προσδιορίστηκαν τα βέλτιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC, παρουσία και απουσία διαφόρων πηγών πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες υπάρχουν σε διάφορες συγκεντρώσεις στα βιολογικά δείγματα και για το λόγο αυτό έπρεπε να εξεταστεί εάν η παρουσία τους μεταβάλλει τα βέλτιστα μήκη κύματος.

Βρέθηκε πως το βέλτιστο μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης και για τα δύο ακινητοποιημένα υποστρώματα ήταν  $475 \pm 2$  nm. Επίσης βρέθηκε πως η ακτινοβολία φθορισμού εμφανίζει μέγιστο σε μήκος κύματος  $535 \pm 2$  nm. Η παρουσία πηγής πρωτεΐνης (BSA, BAL ή ορού) δεν επηρέασε τα παραπάνω μήκη κύματος. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν περιοχές αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής.

Τα βέλτιστα αυτά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ταυτίζονται με τα βέλτιστα μήκη κύματος των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση των βέλτιστων μηκών κύματος σε καμία περίπτωση [385].

### *1.2 Κινητική κορεσμού της μεμβράνης σε ακινητοποιημένα υποστρώματα C<sub>12</sub>- KAI C<sub>6</sub>-NBD-PC*

Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έντασης φθορισμού των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων και της αρχικής συγκέντρωσης των διαλυμάτων των αντίστοιχων υποστρωμάτων στο αδρανές υλικό, πριν την ακινητοποίησή τους μέχρι τη συγκέντρωση των 130  $\mu\text{M}$ . Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αίρεται η γραμμική αυτή σχέση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μέχρι τη συγκέντρωση αυτή, έχει ακινητοποιηθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα των υποστρωμάτων. Επίσης, είναι πιθανό λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων να μην μπορεί να ακινητοποιηθεί επιπλέον ποσότητα και για το λόγο αυτό να παρατηρούνται αποκλίσεις από τη γραμμικότητα.

### *1.3 Επίδραση χημικών και φυσικοχημικών παραμέτρων στο φθορισμό των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων*

Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  παίζουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη της καταλυτικής δράσης των περισσότερων ομάδων  $\text{PLA}_2$ . Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας, υπάρχουν ομάδες  $\text{PLA}_2$ , οι οποίες απαιτούν την παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  (της τάξης μερικών mM) για την επίτευξη της καταλυτικής τους δράσης, ομάδες  $\text{PLA}_2$ , οι οποίες απαιτούν την παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  (της τάξης μερικών  $\mu\text{M}$ ) για την ενδοκυττάρια μεταφορά τους και άλλες ομάδες  $\text{PLA}_2$ , οι οποίες είναι ανεξάρτητες της παρουσίας ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Για το λόγο αυτό έπρεπε να εξετασθεί εάν η παρουσία ή η απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  επηρεάζει το φθορισμό της ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ - και  $\text{C}_6$ -NBD-PC. Βρέθηκε πως η ένταση φθορισμού τόσο της ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ -, όσο και της ακινητοποιημένης  $\text{C}_6$ -NBD-PC παρουσία ή απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  είναι πρακτικώς η ίδια. Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι θα μπορούσαν τα ακινητοποιημένα υποστρώματα να χρησιμοποιηθούν και για τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων ισομορφών  $\text{PLA}_2$ .

Βρέθηκε επίσης ότι η ένταση φθορισμού της ακινητοποιημένης  $\text{C}_{12}$ - και  $\text{C}_6$ -NBD-PC μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 στους 37 °C. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν βιβλιογραφικά αναμενόμενο [417]. Μάλιστα, η τιμή της έντασης φθορισμού, και για τα δύο ακινητοποιημένα υποστρώματα, που μετρήθηκε στους 32

και 37 °C παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή της έντασης φθορισμού που μετρήθηκε στους 20, 25 και 28 °C ( $P < 0.001$ , σε όλες τις περιπτώσεις). Ωστόσο, βιβλιογραφικά είναι επίσης γνωστό ότι η PLA<sub>2</sub> παρουσιάζει βέλτιστη τιμή δράσης τους 37 °C, για το λόγο αυτό και το φαινόμενο έπρεπε να μελετηθεί περεταίρω.

Ο φθορισμός των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων σε όξινο pH ήταν μειωμένος σε σχέση με τον αντίστοιχο φθορισμό σε αλκαλικές τιμές pH. Η διαφορά ωστόσο ήταν στατιστικώς μη σημαντική. Ο φθορισμός σε όξινο pH παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι τα ακινητοποιημένα υποστρώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και για την ανίχνευση ομάδων PLA<sub>2</sub>, οι οποίες παρουσιάζουν βέλτιστη δράση σε όξινο pH, όπως η aiPLA<sub>2</sub> για παράδειγμα.

#### *1.4 Έλεγχος εκρόφησης ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στην υδατική φάση*

Συχνά κατά την ακινητοποίηση μορίων παρατηρείται εκρόφηση αυτών. Ακόμη και στις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης το φαινόμενο αυτό δύναται να λάβει χώρα. Για το λόγο αυτό και ο έλεγχος της τυχόν εκρόφησης των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων στην υδατική φάση ήταν κεφαλαιώδους σημασίας. Ο έλεγχος έγινε τόσο φθορισμομετρικά, όσο και χρωματογραφικά, με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης HPLC.

Για την ακινητοποιημένη C<sub>12</sub>-NBD-PC βρέθηκε πως το υπόστρωμα δεν εκροφάται στην υδατική φάση, ούτε και αυτοϋδρολύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε παρουσία διαφόρων παραγόντων. Επίσης παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον η σταθερότητα της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>-NBD-PC στο μίγμα αντίδρασης.

Η συμπεριφορά της ακινητοποιημένης C<sub>6</sub>-NBD-PC ήταν διαφορετική. Βρέθηκε ότι το υπόστρωμα εκροφάται μερικώς στην υδατική φάση. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε παρουσία διαφόρων παραγόντων.

Η C<sub>6</sub>-NBD-PC είναι λιγότερο υδρόφοβο μόριο σε σχέση με την C<sub>12</sub>-NBD-PC και αυτό εξηγεί πιθανότατα τη διαφορετική τους συμπεριφορά. Ενδεχομένως μελλοντικά να πρέπει να δοκιμαστεί ένας περισσότερο υδρόφοβος φορέας για την ακινητοποίηση της πρώτης, έτσι ώστε να περιοριστεί το φαινόμενο της εκρόφησης.

## 2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLA<sub>2</sub>

Μελετήθηκε η συμπεριφορά των ακινητοποιημένων υποστρωμάτων σε μίγματα αντίδρασης παρουσία βιολογικής πηγής PLA<sub>2</sub> (πρότυπη παγκρεατική PLA<sub>2</sub>, δείγματα ορού ή BAL). Διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο διασπά τα ακινητοποιημένα υποστρώματα (NBD-PCs) απελευθερώνοντας στην υδατική φάση τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα (NBD-FAs).

Η καταλυτική δράση της PLA<sub>2</sub> στα ακινητοποιημένα υποστρώματα εξακριβώθηκε φθορισμομετρικά, με τη βοήθεια διάταξης HPLC και με TLC.

Η ενεργότητα PLA<sub>2</sub> προσδιορίστηκε από την αύξηση της καμπύλης μεταβολής της έντασης φθορισμού του μίγματος αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου. Τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση εσωτερικού προτύπου.

### *2.1 Επίδραση χημικών και φυσικοχημικών παραμέτρων*

Όπως αναφέρθηκε στη σελίδα 138, παρατηρήθηκε μείωση της έντασης φθορισμού της ακινητοποιημένης C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 στους 37 °C. Από την άλλη, κατά τον προσδιορισμό ενεργότητας δειγμάτων BAL με χρήση ακινητοποιημένων υποστρωμάτων, διαπιστώθηκε αύξηση της ενεργότητας με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 στους 37 °C, όπως αναμένονταν με βάση τη βιβλιογραφία. Μάλιστα, η ενεργότητα που προσδιορίστηκε στους 28, στους 32 και στους 37 °C παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P < 0.001$ ), σε σχέση με αυτή που προσδιορίστηκε στους 20 και 25 °C. Για το λόγο αυτό και επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 37 °C για τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο ειδικοί αναστολείς της PLA<sub>2</sub> και πιο συγκεκριμένα ο ML 3176, που είναι ειδικός αναστολέας της cPLA<sub>2</sub>, και ο LY 311727, που είναι ειδικός αναστολέας της ομάδας sPLA<sub>2</sub> IIa και V. Παρουσία του αναστολέα ML 3176 παρατηρήθηκε  $19 \pm 2$  % αναστολή της δράσης του ενζύμου. Παρουσία του αναστολέα LY 311727 παρατηρήθηκε  $37 \pm 2$  % αναστολή της δράσης της PLA<sub>2</sub>. Με τη βοήθεια επομένως ειδικών αναστολέων, αλλά και συνθηκών αντίδρασης (pH, παρουσία ή απουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup>), η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση και προσδιορισμό ενεργότητας διαφόρων ισομορφών PLA<sub>2</sub>, που υπάρχουν στα διάφορα βιολογικά δείγματα [417].

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση ευρείας περιοχής διαφορετικής συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης κατά τον προσδιορισμό ενεργότητας  $PLA_2$  με χρήση ακινητοποιημένης  $C_{12}$ -NBD-PC. Διαπιστώθηκε ότι ανεξάρτητα της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης των βιολογικών δειγμάτων, η μέθοδος δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Συνεπώς, μπορεί να εφαρμοσθεί σε βιολογικά δείγματα που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης, (όπως για παράδειγμα δείγματα ορού) αίροντας με τον τρόπο αυτό τους περιορισμούς της προηγούμενης φθορισμομετρικής μεθόδου που είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας [385].

### 3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό ενεργότητας  $PLA_2$  χαρακτηρίζεται από χαμηλό όριο ανίχνευσης (1 pmol FA), το οποίο είναι εφάμιλλο με άλλες φθορισμομετρικές μεθόδους [377,380,381,382,383,385]. Όσο αναφορά την πιστότητα της μεθόδου, χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα (%RSD  $\leq$  6%) και αναπαραγωγιμότητα (%RSD  $\leq$  9%).

Επιπλέον, η παρούσα μέθοδος παρουσιάζει σημαντική στατιστική συσχέτιση, τόσο με τη φθορισμομετρική μέθοδο, όσο και με την HPLC-φθορισμομετρική μέθοδο που αξιολογήθηκε. Είναι συνεχής και δεν απαιτεί το διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης από το υπόστρωμα [379]. Επιπλέον, ο φθορισμός των προϊόντων είναι διακριτός από αυτών του υποστρώματος.

Ο προσδιορισμός ενεργότητας  $PLA_2$  στα κλάσματα διαφορετικών φυγοκεντρήσεων του BAL, σε διάφορες πειραματικές συνθήκες (pH, παρουσία ή απουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ , παρουσία ή απουσία ειδικών αναστολέων της  $PLA_2$ ) δείχνει πως η μέθοδος έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και μπορεί πιθανότατα να χρησιμοποιηθεί και για την διάκριση ισομορφών της οικογένειας των  $PLA_2$ s.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των υποστρωμάτων της  $C_{12}$ - και  $C_6$ -NBD-PC είναι ότι κατά την αποθήκευσή τους, ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες, διασπώνται και δύναται να λάβουν χώρα αντιδράσεις ισομερείωσης [418]. Κατά τη δράση  $PLA_2$  στα υποστρώματα αυτά, μπορεί, στις συνθήκες αυτές, εκτός από NBD-FA, να απελευθερωθεί και ακυλ-NBD-λυσωφωσφατιδυλοχολίνη. Αντίθετα, οι

ακινητοποιημένες C<sub>12</sub>- και C<sub>6</sub>-NBD-PC δεν διασπώνται κατά την αποθήκευσή τους και μπορεί να χρησιμοποιηθούν και μετά από αρκετό χρονικό διάστημα από την παρασκευή τους.

Κατά τη χρησιμοποίηση ωστόσο της C<sub>6</sub>-NBD-PC, επειδή αυτή εκροφάται στην υδατική φάση, είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση τυφλών δειγμάτων, προκειμένου να ελέγχεται ο βαθμός εκρόφησής της στο υπερκείμενο του μίγματος αντίδρασης.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλό κόστος, συγκρινόμενη τουλάχιστον με ραδιομετρικές μεθόδους. Ακόμη, σε σύγκριση με αυτές, περιέχει φιλικότερα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον χημικά, διότι αποφεύγεται η χρήση επιβλαβών ραδιενεργών υποστρωμάτων.

Επίσης, με την εφαρμογή της σε πλάκα ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα, μειώνοντας σημαντικά το χρόνο, αλλά και το κόστος ανάλυσης.

Επόμενος στόχος μας είναι η αυτοματοποίηση της μεθόδου, με στόχο την ανάπτυξη ενός kit για τον προσδιορισμό ενεργότητας PLA<sub>2</sub> βιολογικών δειγμάτων, με χρήση ακινητοποιημένων υποστρωμάτων. Για το σκοπό αυτό και η παρούσα εργασία έχει υποβληθεί προς έγκριση πατέντας στον Οργανισμό Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας (Ο.Β.Ι.).



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 
- [1] J.E. Burke and E.A. Dennis. Phospholipase A<sub>2</sub> Biochemistry, Cardiovasc. Drugs Ther.: 2009; 23: 49-59
- [2] M.A Gijon and CC Leslie. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation, J. Leukoc. Biology: 1999; 65: 330-336.
- [3] P. Devvillier, N. Baccard and C. Advenier. Leukotriens, leukotriene receptor, antagonists and leukotriene synthesis and inhibition in asthma: an update, Pharmacol. Res.: 1999; 40: 15-29
- [4] J. Balsinde, M.A. Balboa and E.A. Dennis. Antisense- inhibition of group VI Ca<sup>2+</sup> independent phospholipase A<sub>2</sub> blocks phospholipid fatty acid remodeling in mutine P388D1 macrophage, J. Biol Chem.: 1997; 272: 29317-29321
- [5] R. Rivera and J. Chun. Biological effects of lysophospholipids, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.: 2008; 160: 25-46
- [6] D.A. Six and E.A. Dennis. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub>: classification and characterization, Biochim. Biophys. Acta: 2000; 1488: 1-19
- [7] E.A. Dennis. The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes, Trends Biochem. Sci.: 1997; 22: 1-2
- [8] J. Balsinde, MV Winstead and EA Dennis. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization, FEBS Letters: 2002; 531: 2-6
- [9] J.E. Burke and E.A. Dennis. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism and signaling, J.Lipid Res.: 2009; 50: 237-242
- [10] Z. Ma, X. Wang, W. Nowatzke, S. Ramanadham and J. Turk. Express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipases A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA<sub>2</sub> gene on chromosome 22q13.1, J. Biol. Chem.: 1999; 274: 9607-9616
- [11] H.Y. Lee, S.C. Bahn, J.S. Shin, I. Hwang, K. Back, J.H. Doelling and S. Beungtae Ryu. Multiple forms of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in plants, Prog. Lipid Res.: 2005; 44: 52-67



- 
- [12] Y. Ryu, Y. oh, J. Yoon, W. Cho and K. Baek. Molecular characterization of a gene encoding the *Drosophila melanogaster* phospholipase A<sub>2</sub>, *Biochim. Biophys. Acta*: 2003; 1628: 206-210
- [13] J. M. McIntosh, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, D.J. Dooley, S.J. Stoehr, A.B. Giordani, S.R. Naisbitt, B.M. Olivera and M. Conodipine. A novel phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the marine snail *conus magus*, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 3518-3526
- [14] R. Manjunatha Kini. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes, *Toxicon*: 2003; 42: 827-840
- [15] E. Valentin and G. Lambeau. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their receptors and binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*: 2000; 1488: 59-70
- [16] R.H. Schaloske and E.A. Dennis. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system, *B.B.A.*: 2006; 1761: 1246-1259
- [17] M.F. Roberts. Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface, *The FASEB Journal*: 1996; 10: 1159-1152
- [18] E.A. Dennis. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 1994; 269: 13057-13060
- [19] D.L. Scott, S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.h. Gelb and P.B. Sigler. Interfacial catalysis: the mechanism of PLA<sub>2</sub>, *Science*: 1990; 250: 1541-1546
- [20] L. Linderoth, T.L. Andresen, K. Jorgensen, R. Madsen and G.H. Peters. Molecular basis of phospholipase A<sub>2</sub> activity toward phospholipids with sn-1 substitutions, *Biophys. J.*: 2008; 94: 14-26
- [21] G.H. Peters, M.S. Moller, K. Jorgensen, P. Ronnholm, M. Mikkelsen and T.L. Andresen. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysis of phospholipid analogues is dependent on water accessibility to the active site, *J. Am. Chem. Soc.*: 2007; 129: 5451-5461
- [22] S.P. White, D.L. Scott, Z. Otwinowski, M.H. Gelb and P.B. Sigler. Crystal structure of cobra-venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition-state analogue, *Science*: 1990; 250: 1560-1563
- [23] A.G. Singer, F. Ghomashchi, C. Le Calvez, J. Bollinger, S. Bezzine, M. Rouault, M. Sadilek, E. Nguyen, M. Lazdunski, G. Lambeau and M.H. Gelb. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse

---

groups I, II, V, X and XII secreted phospholipases A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 2002; 277: 48535-48549

[24] M. Murakami, S. Masuda, S. Shimbara, S. Bezzine, M. Lazdunski, G. Lambeau, M. H. Gelb, S. Matsukura, F. Kokubu, M. Adachi and I. Kudo. Cellular arachidanate-releasing function of novel classes of secretory phospholipase A<sub>2</sub>s (groups III and XII), J. Biol. Chem.: 2003; 278: 10657-10667

[25] M. Murakami and I. Kudo. Phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biochem.: 2002; 131: 285-292

[26] S.K. Han, K.P. Kim, R. Koduri, L. Bittova, N.M. Munoz, A.R. Leff, D.C. Wilton, M.H. Gelb and W. Cho. Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 1999; 274: 11881-11888

[27] Y.H. Pan, B.Z. Yu, A.G. Singer, F. Ghomashchi, G. Lambeau, M.H. Gelb, M.K. Jain and B.J. Bahnson. Crystal structure of human group X secreted phospholipase A<sub>2</sub>. Electrostatically neutral interfacial surface targets zwitterionic membranes, J. Biol. Chem.: 2002; 277: 29086-29093

[28] M. Murakami, S. Shimbara, T. Kambe, H. Kuwata, M.V. Winstead, J.A. Tischfield and I. Kudo. The functions of five distinct mammalian phospholipase A<sub>2</sub>s in regulationg arachidonic acid release: type IIA and type V secretory phospholipase A<sub>2</sub>s are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 1998; 273: 14411-14423

[29] F. Alonso, P.M. Henson and C.C. Leslie. A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolazes arachidonoyl- containg phosphatidylcholine, Biochim. Biophys. Acta: 1986; 878: 273-280

[30] R.M. Kramer, G.C. Chesani, A. Deykin, C.R. Pritzker and D. Deykin. Solubilization and properties of Ca<sup>2+</sup> dependent human platelet phospholipase A<sub>2</sub>, Biochim. Biophys. Acta: 1986; 878: 394-403

[31] J.D. Sharp, D.L. White, X.G. Chiou, T. Goodson, G.C. Gamboa, D. McClure, S. Burgett, J. Hoskins, P.L. Skatrud, L.H. Kung, E.F. Roberts and R.M. Kramer. Molecular cloning and expression of human Ca<sup>2+</sup>- sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 1991; 266: 14850-14853

- 
- [32] O. Perisic, S. Fong, D.E. Lynch, M. Bycroft and R.L. Williams. Crystal structure of a calcium- phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 1596-1604
- [33] A. Dessen, J. Tang, H Schmidt, M. Stahl, J. D. Clark, J. Seehra and W.S. Somers. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism, *Cell*: 1999; 97: 349-360
- [34] R.T. Pickard, X.G. Chiou, B.A. Striffler, M.R. DeFelippis, P.A. Hyslop, A.L. Tebbe, Y.K. Lee, L.J. Reynolds, E.A. Dennis, R.M. Kramer and J.D. Sherr. Identification of essential residues for the catalytic function of 85 kDa cytosolic phospholipase A2. Prohibiting the role of histidine, aspartic acid, cysteine and arginine, *J. Biol. Chem.*: 1996; 271: 19225-19231
- [35] M. Murakami, I. Kudo, M. Umeda, A. Matsuzawa, M. Takeda, M. Komada, Y. Futzimori, K. Takahashi and K. Inue. Detection of three distinct phospholipases A<sub>2</sub> in cultured mast cells, *J. Biochem.*:1992; 11(2) : 175-181
- [36] K.W. Underwood, C. Song, R.W. Kriz, X.J. Chang, J.L. Knopf and L.L. Lin. A novel calcium- independent phospholipase A2 cPLA2 that is prenylated and contains homology to cPLA2, *J. Biol. Chem.*:1998; 273: 21926-21932
- [37] N.Nakatani, N. Uozumi, K. Kume, M. Murakami, I. Kudo and T. Shimizu. Role of cytosolic phospholipase A2 in the production of lipid mediators and histamine release in mouse- marrow- derived mast cells, *Biochem. J.*: 2000; 352: 311-317
- [38] J.H. Evans, D.M. Spencer, A. Zweifach and C.C. Leslie. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> translocation to internal membranes, *J. Biol. Chem.*: 2001; 276: 30150-30160
- [39] J.H. Evans and C.C. Leslie. The cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 6005-6016
- [40] Y. Shirai, J. Balsinde and E.A. Dennis. Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V and Ca-independent Group VI phospholipase A<sub>2</sub>s in P388D<sub>1</sub> macrophages using GFP/RFP constructs, *Biochim. Biophys. Acta*: 2005; 1735: 119-129

- 
- [41] J. Rizo and T.C. Sudhof. C2- domains, structure and function of a universal  $\text{Ca}^{2+}$ - binding domain, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 15879-15882
- [42] M. A. Gijon, D.M. Spencer, A.L. Kaiser and C.C. Leslie. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Cell Biol.*: 1999; 145: 1219-1232
- [43] D.A. Six and E.A. Dennis. Essential  $\text{Ca}^{2+}$ -independent Role of the Group IVA Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> C2 Domain for Interfacial Activity, *J. Biol. Chem.*: 2003; 278: 23842-23850
- [44] S. Glover, M.S. de Carvalho, T. Bayburt, M. Jonas, E. Chi, C.C. Leslie and M.H. Gelb. Translocation of the 85 kDa phospholipase A<sub>2</sub> from the cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 15359-15367
- [45] S. Jaud, D.J. Tobias, J.J. Falke and S.H. White. Seif-induced docking site of a deeply embedded peripheral membrane protein, *Biophys. J.*: 2007; 92: 517-524
- [46] J.A. Corbin, J.H. Evans, K.E. Landgraf and J.J. Falke. Mechanism of specific membrane targeting C2 domains: localized pools of target lipids enhance  $\text{Ca}^{2+}$  affinity, *Biochemistry*: 2007; 46: 4322-4336
- [47] L.L. Lin, M. Watmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth and R.J. Davis. CPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell*: 1993; 72: 269-278
- [48] M.G. de Carvalho, A.L. McCormak, E. Olson, F. Ghomashchi, M. H. Gelb, J. R. Yates<sup>3rd</sup> and C.C. Leslie. Identification of phosphorylation of human 8-kDa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> expressed in insect cells and present in human monocytes, *J. Biol. Chem.*: 1996; 271: 6987-6997
- [49] T. Bayburt and M.H. Gelb. Interfacial catalysis by human 85 kDa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> on anionic vesicles in the scooting mode, *Biochemistry*: 1997; 36: 3216-3231
- [50] M.M. Muthalif, Y. Hefner, S. Canaan, J. Harper, H. Zhou, J. H. Parmentier, R. Aebersold, M. H. Gelb and K. U. Malik. Functional interaction of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 2001; 276: 39653-39660
- [51] S. Das, J.D. Rafter, K.P. Kim, S.P. Gygi and W. Cho. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation by phosphorylation, *J. Biol. Chem.*: 2003; 278: 41431-41442

- 
- [52] W. Tian, G.T. Wijewickrama, J.H. Kim, S. Das, M.P. Tun, N. Gokhale, J.W. Jung, K.P. Kim and W. Cho. Mechanism of regulation of group IVA PLA<sub>2</sub> phospholipase A<sub>2</sub> activity by Ser727 phosphorylation, *J. Biol. Chem.*: 2008; 283: 3960-3971
- [53] M. Mosior, D.A. Six and E.A. Dennis. Group IV cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 2184-2191
- [54] T. Tamiya-koizumi, H. Umekawa, S. Yoshida, H. Ishihara and K. Kojima. A novel phospholipase A<sub>2</sub> associated with nuclear matrix: stimulation of the activity and modulation of the Ca<sup>2+</sup> dependency by phosphoinositides, *Biochim. Biophys. Acta*: 1989; 1002: 182-188
- [55] J. Balsinde, M.A. Balboa, W.H. Li, J. Liopis and E.A. Dennis. Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A<sub>2</sub> by phosphatidylinositol bisphosphate levels, *J. Immunol.*: 2000; 164: 5398-5402
- [56] J. Casas, M.A. Gijon, A.G. Vigo, M.S. Crespo, J. Balsinde and M.A. Balboa. Phosphatidylinositol 5,5-bisphosphate anchors cytosolic Group IVA phospholipase A<sub>2</sub> to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells, *Mol. Biol. Cell*: 2006; 17: 155-162
- [57] S. Das and W. Cho. Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of Group IV cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 23838-23846
- [58] P. Subramanian, R.V. Stahelin, Z. Szulc, A. Bielawska, W. Cho, and C.E. Chalfant. Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.*: 2005; 280: 17601-17607
- [59] R.V. Stahelin, P. Subramanian, M. Vora, W. Cho and C.E. Chalfant. Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> via a novel site in the C2 domain, *J. Biol. Chem.*: 2007; 282: 20467-20474
- [60] P. Subramanian, M. Vora, L. B. Ggentile, R. V. Stahelin and C.E. Chalfant. Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> via distinct and separate mechanisms, *J. Lipid Res.*: 2007; 48: 2701-2708

- 
- [61] C. Song, X.J. Chang, K.M. Bean, M.S. Proia, J.L. Knopf and R.W. Kriz. Molecular characterization of cytosolic A<sub>2</sub>-beta, J. Biol. Chem.: 1999; 274: 17063-17067
- [62] R. T. Pickard, B.A. Striffler, R.M. Kramer and J. D. Sharp. Molecular cloning of two new human paralogs of 85 kDa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 1999; 274: 8823-8831
- [63] K.K. Lucas and E.A. Dennis. The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, Biochim. Biophys. Acta: 2004; 1636: 213-218
- [64] D.E. Tucker, A. Steward, L. Nallan, P. Bendale, F. Ghomashchi, M.H. Gelb and C.C. Leslie. Group IVC cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> gamma is farnesylated and palmitoylated in mammalian cells, J. Lipid Res.: 2005; 46: 2122-2133
- [65] H. Chiba, H. Michibata, K. Wakimoto, M. Seishima, S. Kawasaki, K. Okubo, H. Mitsui, H. Torii and Y. Imai. Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>delta, induced in psoriatic skin, J. Biol. Chem.: 2004; 279: 12890-12897
- [66] T. Ohto, N. Uozumi, T. Hirabayashi and T. Shimizu. Identification of novel cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>s, murine cPLA<sub>2</sub>delta, epsilon and zeta, which form a gene cluster with cPLA<sub>2</sub> beta, J. Biol. Chem.: 2005; 280: 24576-24583
- [67] P.K. Larsson, H.E. Claesson and B.P. Kennedy. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and their effect on the enzyme activity, J. Biol. Chem.: 1998; 273: 207-214
- [68] E.J. Ackermann, E.S. Kempner and E.A. Dennis. Ca<sup>2+</sup>- independent cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from macrophage-like P388D<sub>1</sub>, isolation and characterization, J. Biol. Chem.: 1994; 269: 9227-9233
- [69] M.A. Balboa, J. Balsinde, S.S. Jones and E.A. Dennis. Identity between the Ca<sup>2+</sup> independent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from P388D<sub>1</sub> macrophages and Chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem.: 1997; 272: 8576-8580
- [70] J. Tang, R.W. Kriz, N. Wolfman, M. Shaffer, J. Seehra and S.S. Jones. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> contains eight ankyrin motifs, J. Biol. Chem.: 1997; 272: 8567-8575
- [71] M.V. Winstead, J. Balsinde and E.A. Dennis. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>: structure and function, Biochim. Biophys. Acta: 2000; 1488: 28-39

---

[72] D. J. Mancuso, C.M. Jenkins and R.W. Gross. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 2000; 275: 9937-9945

[73] M. Murakami, S. Masuda, K. Ueda-Semmyo, E. Yoda, H. Kuwata, Y. Takanezawa, J. Aoki, H. Arai, H. Sumimoto, Y. Ishikawa, T. Yshii, Y. Nakatani and I. Kudo. Group VIB Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> gamma promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 2005; 280: 14028-14041

[74] C.M. Jenkins, X. Han, D.J. Mancuso and R.W. Gross. Identification of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) beta and not iPLA<sub>2</sub> gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism based discrimination of mammalian iPLA<sub>2</sub>s, J. Biol. Chem.: 2002; 277: 32807-32814

[75] C. M. Jenkins, D.J. Mancuso, W. Yan, H.F. Sims, B. Gibson and R.W. Gross. Identification, cloning, expression and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities, J. Biol. Chem.: 2004; 279: 48968-48975

[76] M. van Teinhoven, J. Atkins, Y. Li and P. Glynn. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids, J. Biol. Chem.: 2002; 277: 20942-20948

[77] S.G Sedgwick and S.J. Smerdon. The antikylin repeat diversity of interaction on a common structural framework, Trends Biochem. Sci.: 1999; 24: 311-316

[78] R. Perez, R. Melero, M.A. Balboa and J. Balsinde. Role of Group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide, J. Biol. Chem.: 2004; 279: 40385-40391

[79] C.R. Yellaturu and G.N. Rao. A requirement for calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in thrombin-induced arachidonic acid release and growth in vascular smooth muscle cells, J.Biol. Chem.: 2003; 278: 43831-43837

[80] J. M. Moran, R.M.L. Buller, J. McHowat, J. Turk, M. Wohltmann, R.W. Gross and J.A. Corbett. Genetic and pharmacologic evidence that calcium-

---

independent phospholipase A<sub>2</sub> beta regulates virus-induced inducible nitric-oxide synthase expression by macrophages, *J. Biol. Chem.*: 2005; 280: 28162-28168

[81] M.A. Balboa, Y. Saez and J. Balsinde. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for lysozyme secretion in U937 promocytes, *J. Immunol.*: 2003; 170: 5276-5280

[82] Z. Ma, S. Ramanadham, M Wohltmann, A. Bohrer, F.F. Hsu and J. Turk. Studies of insulin secretory responses and oh arachidonic acid incorporation into phospholipids of stably transfected insulinoma cells that over express Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub> beta) indicate a signaling rather than housekeeping role for iPLA<sub>2</sub> beta, *J. Biol. Chem.*: 2001; 276: 13198-13208

[83] S. Bao, Y. Li, X. Lei, M. Wohltmann, W. Jin, A. Bohrer, C.F. Semenkovich, S. Ramanadham, I. Tabas and J. Turk. Attenuated free cholesterol loading-induced apoptosis but preserved phospholipid composition of peritoneal macrophages from mice that do not express group VIA phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 2007; 282: 27100-27114

[84] S.P. Herbert and J.H. Walker. Group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> mediates endothelial cee S phase progression, *J. Biol. Chem.*: 2006; 281: 35709-35716

[85] Y. Song, P. Wilkins, W. Hu, K.S. Murthy, J. Chen, Z. Lee, R Oyesanya, J. Wu, S.E. Barbour and X. Fang. Inhibition of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> suppresses proliferation and tumorigenicity of ovarian carcinoma cells, *Biochem. J.*: 2007; 406: 427-436

[86] R. Perez, X. Matabosch, A. Llebaria, M.A. Balboa and J. Balsinde. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promocytic cells, *J. Lipid Res.*: 2006; 47: 484-491

[87] G. Atsumi, M. Murakami, K. Kojima, A. Hadamo, M. Tajima and I. Kudo. Distinct roles of two intracellular phospholipase A<sub>2</sub>s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> augments spontaneous fatty acid release, *J. Biol. Chem.*: 2000; 275: 18248-18258

[88] J. Balsinde, R. Perez and M.A. Balboa. Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1344-1350



- 
- [89] R. Perez, M.A. Balboa and J. Balsinde. Involvement of Group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells, *J. Immunol.*: 2006; 176: 2555-2561
- [90] T.S. Kim, C.S. Sundaresh, S.I. Feinstein, C. Dodia, W.R. Skach, M.K. Jain, T. Nagase, N. Seki, K. Ishikawa, N. Nomura and A.B. Fisher. Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> and properties of the expressed protein, *J. Biol. Chem.*: 1997; 272: 2542-2550
- [91] S.W. Kang, I.C. Baines and S.G. Rhee. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 6303-6311
- [92] A.B. Fisher, C. Dodia, Y. Manivish, J.W. Chen and S.I. Feinstein. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non selenium glutathione peroxidase, *J. Biol. Chem.*: 1999; 274: 21326-21334
- [93] Y. Wu, S.I. Feinstein, Y. Manevish, I. Chowdhury, J.H. Pak, A. Kazi, C. Dodia, D.W. Speicher and A.B. Fisher. Mitogen activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A<sub>2</sub> activity, *Biochem. J.*: 2009; 419: 669-679
- [94] J.W. Chen, C. Dodia, S.I. Feinstein, M.K. Jain and A.B. Fischer. 1-Cys-peroxiredoxin, a bifunctional enzymewith glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities, *J. Biol. Chem*: 2000; 275: 28421-28427
- [95] C.A. Demopoulos, R.N. Pinkard and D.J. Hanahan. Platelet activating factor. Evidence for 1-O-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component( a new class of lipid chemical mediators), *J. Biol. Chem.*: 1979; 254(19): 9355-9358
- [96] R.L. Wykle, S.C. Olson and J.T. O'Flaherty. Biochemical pathways of platelet-activating factor synthesis and breakdown, *Adv. Inflam. Res.*: 1986; 11: 71-81
- [97] T.C. Lee, B. Malone and F.A. Snyder. New de novo pathway for the formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor. Biochemical characterization of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-P:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen, *J. Biol. Chem.*: 1986; 261: 5373-5377
- [98] J.F. Barbaro and N.J. Zvaifler. Antigen induced histamine release from platelets of rabbits inducing PCA antibody, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 1966; 122: 1245-1246

- 
- [99] J. Benveniste. Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils, *Nature*: 1974; 249: 581-582
- [100] Z.S. Derewenda and U. Derewenda. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases, *Cell Mol. Life Sci.*: 1998;54: 446-455
- [101] D. Skula. Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms, *FASEB J.*: 1992; 6: 2296-2301
- [102] T. Izumi, T. Takano, H. Bito, M. Nakamura, H. Mutoh, Z. Honda and T. Shinizu. Platelet-activating factor receptor, *J. Lipid Med.*: 1995; 12: 429-442
- [103] J.H. Beer, B. Wuthrich and A. von Felten. Allergen exposure in acute asthma causes the release of platelet -activating factor (PAF) as demonstrated by the desensitization of platelets to PAF, *Int. Arch. Allergy Immunol.*: 1995; 106: 291-296
- [104] M. Kagoshima, N. Tomomatsu, Y. Iwahisa, S. Matsuura, Y. Kawakami and M. Terasawa. Suppressive effects of Y-24180, a receptor antagonistic to platelet activating factor (PAF), on antigen-induced asthmatic responses in guinea pigs, *Inflamm. Res.*: 1997; 46: 147-153
- [105] H. Narahara, Y. Tanaka, Y. Kawano, I. Miyakawa and J.M. Johnston. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human follicular fluid, *Adv. Exp. Med. Biol.*: 1996; 416: 121-127
- [106] W.J. Houlihan, P.G. Munder, D.A. Handley, S.H. Cheon and V.A. Parrino. Antitumor activity of 5-aryl-2,3-dihydroimidaz[2,1-*b*]isoquinolines, *J. Med. Chem.*: 1995; 38: 234-240
- [107] S.A. Bennett, L.C. Leite and H.C. Birnboim. Platelet activating factor, an endogenous mediator of inflammation, induces phenotypic transformation of rat embryo cells, *Carcinogenesis*: 1993; 14: 1289-1296
- [108] S. Esquenazi and H.E. Nazan. Role of platelet-activating factor in cell death signalling in the cornea: A review, *Mol. Neurobiol.*: 2010; 42(1): 32-38
- [109] S.M. Prescott G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini and T.M. McIntyre. Platelet- activating factor and related lipid mediators, *Annu. Rev. Biochem.*: 2000; 69: 419-445
- [110] L.M. McManus. Pathobiology of platelet activating factor, *Pathol. Immunopathol. Res.*: 1986; 5: 7-19

- 
- [111] P.V. Peplow. Regulation of platelet activating factor activity in human diseases by phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors, PAF-acetylhydrolases, PAF-receptor antagonists and free radical scavengers, *Prostaglandins Leukotriens and Essential Fatty Acids*: 1999; 61: 65-82
- [112] D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman and S.M. Prescott. Platelet-activating factor acetylhydrolases, *J. Biol. Chem.*: 1997; 272: 17895-17898
- [113] M. Hattori, J. Aoki, H. Arai and K. Inoue. PAF and PAF acetylhydrolase in the nervous system, *J. Lipid Mediat. Cell Signal*: 1997; 14: 99-102
- [114] T. Kriska, G.K. Marathe, J.C. Schmidt, T.M. McIntyre and A.W. Girotti. Phospholipase action of platelet activating acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides, *J. Biol. Chem.*: 2007; 282: 100-108
- [115] D.M. Stafforini, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman and T.M. McIntyre. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases, *Biochim. Biophys. Acta*: 1996; 11: 161-173
- [116] Z.S. Derewenda and Y.S. Ho. PAF-acetylhydrolases, *Biochim. Biophys. Acta*: 1999; 1441: 229-236
- [117] H.C.C.F. Neto, D.M. Stafforini, S.M. Prescott and G.A. Zimmerman. Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor acetylhydrolase, *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.*: 2005; 100: 83-91
- [118] L.W. Tjoelker, C. Wilder, C. Eberhardt, D.M. Stafforini, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Hooper, Le Trong H, L.S. Cousens, G.A. Zimmerman et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase, *Nature*: 1995; 374(6522): 549-553
- [119] L.W. Tjoelker, C. Eberhardt, J. Unger, H.L. trong, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, D.M. Stafforini, S.M. Prescott and P.W. Gray. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is se secreted phospholipase A<sub>2</sub> with a catalytic triad, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 25481-25487
- [120] Y. Wei, L. Swenson, C. Castro, U. Derewenda, W. Minor, H. Arai, J. Aoki, K. Inoue, L. Servin-Gonzalez and Z.S. Derewenda. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution, *Structure*: 1998; 6: 511-519

- 
- [121] U. Samanta and B.J. Bahnson. Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis, *J. Biol. Chem.*: 2008; 283: 31617-31624
- [122] M.L. Blank, T.C. Lee, V. Fitzgerald and A. Snyder. A specific acetylhydrolase for a-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-phosphocholine ( a hypotensive and platelet-activating lipid), *J. Biol. Chem.*: 1981; 256: 175-178
- [123] D.M. Stafforini, S.M. Prescott and T.M. McIntyre. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties *J. Biol. Chem.*: 1987; 262: 4223-4230
- [124] J.M. Heery, M. Kozak, D.M. Stafforini, D.A. Jones, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre and S.M. Prescott. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.*: 1995; 96: 2322-2330
- [125] V.S. Subramanian, J. Goyal, M. Miwa, J. Sugatami, M. Akiyama, M. Liu and P.V. Subbaiah. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet activating factor acetylhydrolase-deficient plasma, *BBA, Mol. Cell Biol. Lipids*: 1999; 1439: 95-109
- [126] D.M. Stafforini, J.R. Sheller, T.S. Blackwell, A. Sapirstein, F.E. Yull, T.M. McIntyre, J.V. Bonventre, S.M. Prescott and L.J. Roberts. Release of free F<sub>2</sub>-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases, *J. Biol. Chem.*: 2006; 281: 4616-4623
- [127] K.E. Stremmler, D.M. Stafforini, S.M. Prescott and T.M. McIntyre. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates, *J. Biol. Chem.*: 1991; 266: 11095-11003
- [128] B. Davis, G. Koster, L.J. Douet, M. Scigelowa, G. Woffendin, J.M. Ward, A. Smith, J. Humphries, K.G. Burnand, C.H. Macphie and A.D. Postle. Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> in oxidized human low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.*: 2008; 283: 6428-6437
- [129] M.R. Elstad, D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, S.M. Prescott and G.A. Zimmerman. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor, *J. Biol. Chem.*: 1989; 264: 8467-8470

- 
- [130] K. Nakajima, M. Murakami, R. Yanoshita, Y. Samejima, K. Karasawa, M. Setaka, S. Nojima and I. Kudo. Activated mast cells release extracellular type platelet-activating factor acetylhydrolase that contributes to autocrine inactivation of platelet-activating factor, *J. Biol. Chem.*: 1997; 272: 275-281
- [131] D.M. Stafforini, M.R. Elstad, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman and S.M. Prescott. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase, *J. Biol. Chem.*: 1990; 265: 9682-9687
- [132] K. Karasawa. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1359-1372
- [133] D.M. Stafforini. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, Lipoprotein Associated Phospholipase A<sub>2</sub>), *Cardiovasc. Drugs Ther.*: 2009; 23: 73-83
- [134] X. Wu, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott and D.M. Stafforini. The p38 MAPK pathway mediates transcriptional activation of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages stimulated with lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 36158-36165
- [135] S.A. Karabina and E. Ninio. Plasma PAF-acetylhydrolase: An unfulfilled promise?, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1351-1358
- [136] G. Ostermann, G.M. Kostner, A. Gries, E. Malle and U. Till. The contribution of individual lipoproteins to the degradation of platelet-activating factor in human serum, *Haemostasis*: 1989; 19: 160-168
- [137] D.C. Tew, C. Southan, S.Q.J. Rice, G.M.P. Lawrence, H. Li, H.F. Boyd, K. Moors, I.S. Ginger and C.H. Macphee. Purification properties sequencing and cloning of a lipoprotein-associated serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins, *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*: 1996; 16: 591-599
- [138] J.F. Carlquist, J.B. Muhlestein and J.L. Anderson. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>: a new biomarker for cardiovascular risk assessment and potential therapeutic target, *Expert Rev. Mol. Diagn.*: 2007; 7: 511-517
- [139] A. Zalewski, J.J. Nelson, L. Hegg and C. Macphee. Lp-PLA<sub>2</sub>: a new kid on the block, *Clin. Chem.*: 2006; 52: 1645-1650
- [140] M.R. McCall, M. La Belle, T.M. Forte, R.M. Krauss, Y. Takanami and T.L. Tribble. Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor

---

acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility, *Biochim. Biophys. Acta*: 1999; 1437: 23-36

[141] S. Benitez, J.L. Sanchez-Quesada, V. Ribas, O. Jorda, F. Blanco-Vaca, F. Gonzalez-Sastre and J. Ornodez-Lianos. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction, *Circulation*: 2003; 108: 92-96

[142] D.M. Stafforini, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre and S.M. Prescott. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoproteins, *Trans. Assoc. Am. Physicians*: 1992; 105: 44-63

[143] J.W. Gaubatz, B.K. Gillard, J.B. Massey, R.C. Hoogeveen, M. Huang, E.E. Lloyd, J.R. Raya, C.Y. Yang and H.J. Pownall. Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Lipid Res.*: 2007; 48: 348-357

[144] K. Okamura, S. Miura, B. Zhang, Y. Uehara, K. Matsuo, K. Kumagai and K. Saku. Ratio of LDL- to HDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase may be a marker of inflammation in patients with paroxysmal atrial fibrillation, *Circulation*: 2007; 71: 214-219

[145] A.A. Gardner, E.C. Reichert, M.K. Topham and D.M. Stafforini. Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.*: 2008; 283: 17099-17106

[146] K. Karasawa, A. Harada, N. Satoh, K. Inoue and M. Setaka. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH), *Prog. Lipid Res.*: 2003; 42: 93-114

[147] C.H. Chen. Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you?, *Curr. Opin. Lipidol.*: 2004; 337-341

[148] M.J. Caslake and C.J. Pickard. Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (platelet-activating factor acetylhydrolase) and cardiovascular disease, *Curr. Opin. Lipidol.*: 2003; 14: 347-352

[149] A. Zalewski and C. Macphee. Role of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> in atherosclerosis: biology, epidemiology and possible therapeutic target, *Arterioscler.*: 2005; 25: 923-931

- 
- [150] K. Hattori, M. Hattori, H. Adachi, M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue. Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 22308-22313
- [151] K. Hattori, H. Adachi, A. Matsuzawa, K. Yamamoto, M. Tsujimoto, J. Aoki, M. Hattori, H. Arai and K. Inoue. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF-acetylhydrolase, *J. Biol. Chem.*: 1996; 271: 33032-33038
- [152] A. Matsuzawa, K. Hattori, J. Aoki, H. Arai and K. Inoue. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet activating factor-acetylhydrolase, *J. Biol. Chem.*: 1997; 272: 32315-32320
- [153] M. Hattori, H. Adachi, M. Tsujimoto, K. Arai and K. Inoue. The catalytic subunit of bovine brain platelet activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase, *J. Biol. Chem.*: 1994; 269: 23150-23155
- [154] M. Hattori, H. Adachi, J. Aoki, M. Tsujimoto, K. Arai and K. Inoue. Cloning and expression of a cDNA encoding the b subunit (30 kDa subunit) of bovine brain platelet activating factor acetylhydrolase, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 31345-31352
- [155] H. Many, J. Aoki, H. Kato, J. Ishii, S. Hino, H. Arai and K. Inoue. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase, *J. Biol. Chem.*: 1999; 274: 31827-31832
- [156] N.R. Morris. Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain, *J. Cell Biol.*: 2000; 148: 1097-1101
- [157] H. Many, J. Aoki, M. Watanabe, T. Adachi, H. Asou, Y. Inoue, H. Arai and K. Inoue. Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 18567-18572
- [158] A. Abe, J.A. Shayman and N.S. Radin. A novel enzyme that catalyzes the esterification of N-acetylsphingosine. Metabolism of C2-deramides, *J. Biol. Chem.*: 1996; 271: 14383-14389
- [159] A. Abe and J.A. Shayman. Purification and characterization of 1-O-acyl-ceramide synthase, a novel phospholipase A<sub>2</sub> with transacylase activity, *J. Biol. Chem.*: 1998; 273: 8467-8474
- [160] M. Hiraoka, A. Abe and J.A. Shayman. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A<sub>2</sub>, 1-O-acylceramide synthase, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 10090-10099

- 
- [161] M. Nardini and B.W. Dijkstra. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Curr. Opin. Struct. Biol.*: 1999; 9: 732-737
- [162] Y. Taniyama, S. Shibita, S. Kita, K. Horikoshi, H. Fuse, H. Shirafuji, Y. Shumino and M. Fujino. Cloning and expression of a novel lysophospholipase which structurally resembles lecithin cholesterol acyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 1999; 250: 50-56
- [163] S. Abe, M. Hiraoka and J.A. Shayman. Position specificity of lysosomal phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Lipid Res.*: 2006; 47: 2268-2279
- [164] A.K. Whiting and W.L. Peticolas. Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis, *Biochemistry*: 1994; 33: 552-561
- [165] J.A. Shayman, R. Kelly, J. Kollmeyer, Y. He and A. Abe. Group XV phospholipase A<sub>2</sub>, lysosomal phospholipase A<sub>2</sub>, *Prog. Lip. Res.*: 2011; 50: 1-13
- [166] A. Abe, M. Hiraoka, S. Wild, S.E. Wilcoxen, R. Paine 3<sup>rd</sup> and J.A. Shayman. Lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> is selectively expressed in alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 42605-42611
- [167] A. Abe, R. Kelly, J. Kollmeyer, M. Hiraoka, Y. Lu and J.A. Shayman. The secretion and uptake of lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> by alveolar macrophages, *J. Immunol.*: 2008; 181: 7873-7881
- [168] J. Balsinde, M.A. Balboa, P.A. Insel and E.A. Dennis. Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*: 1999; 39: 175-189
- [169] W.L. Smith. Eicosanoid biosynthesis and mechanisms of actions, *Am. J. Physiol.*: 1992; 263: F181-F191
- [170] M. Katan and R.L. Williams. Phosphoinositide-specific phospholipase C: structural basis for catalysis and regulatory interactions, *Semin. Cell Dev. Biol.*: 1997; 8: 287-296
- [171] S.G. Rhee. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C, *Annu. Rev. Biochem.*: 2001; 70: 281-312
- [172] X. Tang, E.M. Edwards, B.B. Holmes, J.R. Falck and W.B. Campbell. Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*: 2006; 290: H37-H45



- 
- [173] T. Ishimoto, S. Akiba and T. Sato. Importance of the phospholipase D-initiated sequential pathway for arachidonic acid released and prostaglandin D<sub>2</sub> generation by rat peritoneal mast cells, *J. Biochem.*: 1996; 120: 616-623
- [174] E.A. Dennis. Phospholipase A<sub>2</sub> in eicosanoid generation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*: 2000; 161: S32-S35
- [175] J.Z. Haeggstrom, A. Rinaldo-Matthis, C.E. Wheelock and A. Wetterholm. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*: 2010; 396: 135-139
- [176] C.D. Funk. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in eicosanoid biology, *Science*: 2001; 294: 1871-1875
- [177] M. Ghosh, D.E. Tucker, S.A. Burchett and C.C. Leslie. Properties of the Group IV phospholipase A<sub>2</sub> family, *Prog. Lip. Res.*: 2006; 45: 487-510
- [178] O. Radmark, O. Werz, D. Steinhilber and B. Samuelsson. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity, *Trends Biochem. Sci.*: 2007; 32: 332-341
- [179] P.C. Rudberg, F. Tholander, M. Andberg, M.M. Thunnissen and J.Z. Haeggstrom. Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase: identification of a common carboxylate recognition site for the epoxide hydrolase and aminopeptidase substrates, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 27376-27382
- [180] M. Peters-Golden and T.G. Brock. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets, *FEBS Lett.*: 2001; 487: 323-326
- [181] N. Uozumi, K. Kume, T. Nagase, N. Nakatani, S. Ishii, F. Tashiro, Y. Komagata, K. Maki, K. Ikuta, Y. Ouchi, J. Miyazaki and T. Shimizu. Role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in allergic response and parturition, *Nature*: 1997; 390: 618-622
- [182] C.C. Leslie. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochem. Cell Biol.*: 2004; 82: 1-17
- [183] S. Marusic, P. Thakker, J.W. Pelker, N.L. Stedman, K.L. Lee, J.C. McKew, L. Xan, X. Xu, S.F. Wolf, A.J. Borey, J. Cui, M.W. Shen, F. Donahue, M. Hassan-Zahraee, M.W. Leach, T. Shimizu and J.D. Clark. Blockade of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and diminishes development Th1 and Th17 responses, *J. Neuroimmunol.*: 2008; 204: 29-37

- 
- [184] G. Lambeau and M.H. Gelb. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>, *Annu. Rev. Biochem.*: 2008; 77: 495-520
- [185] J.D. Bradley, A.A. Dmitrienko, A.J. Kivitz, O.S. Gluck, A.L. Weaver, C. Wiesenhuber, S.L. Myers and G.D. Sides. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A<sub>2</sub>, in the treatment of rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.*: 2005; 32: 417-423
- [186] W. Pruzanski. Phospholipase A<sub>2</sub>: quo vadis?, *J. Rheumatol.*: 2005; 32: 400-402
- [187] W. Pruzanski, P. Vadas and J. Browning. Secretory non-pancreatic group II phospholipase A<sub>2</sub>: role in physiologic and inflammatory processes, *J. Lipid Mediat.*: 1993; 8: 161-167
- [188] J.H. Fleisch, C.T. Armstrong, C.R. Roman, E.D. Mihelich, S.M. Spaethe, W.T. Jackson, J.L. Bobbitt, S. Draheim, N.J. Bach, R.D. Billard, M. Martinelli, R. Fouts and D.W. Snyder. Recombinant human secretory phospholipase A<sub>2</sub> released thromboxane from guinea pig bronchoalveolar lavage cells: in vitro and ex vivo evaluation of a novel secretory phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 1996; 278: 252-257
- [189] C.M. Mounier, F. Ghomashchi, M.R. Lindsay, S. James, A.G. Singer, R.G. Parton and M.H. Gelb. Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A<sub>2</sub> occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-α, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 25024-25038
- [190] Y.J. Kim, K.P. Kim, S.K. Han, N.M. Munoz, X. Zhu, H. Sano, A.R. Leff and W. Cho. Group V phospholipase A<sub>2</sub> induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 36479-36488
- [191] N.M. Munoz, Y.J. Kim, A.Y. Meliton, K.P. Kim, S.K. Han, E. Boetticher, E. O'Leary, S. Myou, X. Zhu, J.V. Bonventre, A.R. Leff and W. Cho. Human group V phospholipase A<sub>2</sub> induces group IVA phospholipase A<sub>2</sub>-independent cysteinyl leukotriene synthesis in human eosinophils, *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 38813-38820
- [192] S. Akiba, R. Hatazawa, K. Ono, K. Kitatani, M. Hayama and T. Sato. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> mediates cooperative prostaglandin generation by growth

---

factor and cytokine independently of preceding cytosolic phospholipase A2 expression in rat gastric epithelial cells, *J. Biol. Chem.*: 2001; 276: 21854-21862

[193] Z. Ni, N.M. Okeley, B.P. Smart and M.H. Gelb. Intracellular actions of group IIA secreted phospholipase A2 and group IVA cytosolic phospholipase A2 contribute to arachidonic acid release and prostaglandin production in rat gastric mucosal cells and transfected human embryonic kidney cells, *J. Biol. Chem.*: 2006; 281: 16245-16255

[194] M.A. Balboa, J. Balsinde and E.A. Dennis. Phosphorylation of cytosolic group IV phospholipase A(2) is necessary but not sufficient for Arachidonic acid release in P388D(1) macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 2000; 267: 145-148

[195] T. Kamble, M. Murakami and I. Kudo. Polyunsaturated fatty acids potentiate interleukin-1-stimulated arachidonic acid release by cells overexpressing type IIA secretory phospholipase A2, *FEBS Lett.*: 1999; 453: 81-84

[196] C.O. Bingham, M. Murakami, H. Fujishima, J.E. Hunt, K.F. Austen and J.P. Arm. A heparin sensitive phospholipase A2 and prostaglandin endoperoxide synthase 2 are functionally linked in the delayed phase of prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow-derived mast cells, *J. Biol. Chem.*: 1996; 271: 25936-25944

[197] J. Wijkander, J.T. O'Flaherty, A.B. Nixon and R.L. Wykle. 5-Lipoxygenase products modulate the activity of the 85-kDa phospholipase A2 in human neutrophils, *J. Biol. Chem.*: 1995; 270: 26543-26549

[198] M. Murakami, H. Kuwata, Y. Amakasu, S. Shimbara, Y. Nakatani, G. Atsumi and I. Kudo. Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2 - and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2, *J. Biol. Chem.*: 1997; 272: 19891-19897

[199] H. Kuwata, C. Fujimoto, E. Yoda, S. Shimbara, Y. Nakatani, S. Hara, M. Murakami and I. Kudo. A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2gamma) in the inducible expression of group IIA secretory PLA2 in rat fibroblastic cells, *J. Biol. Chem.*: 2007; 282: 20124-20132

[200] H. Shinohara, M.A. Balboa, C.A. Johnson, J. Balsinde and E.A. Dennis. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by

---

group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s, *J. Biol. Chem.*: 1999; 274: 12263-12268

[201] Y. Satake, B.L. Diaz, B. Balestrieri, B.K. Lam, Y. Kanaoka, M.J. Grusby and J.P. Arm. Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption, *J. Biol. Chem.*: 2004; 279: 16488-16494

[202] W.R. Henderson Jr, E.Y. Chi, J.G. Bollinger, Y.T. Tien, X. Ye, L. Casteli, Y.P. Rubtsov, A.G. Singer, G.K. Chiang, T. Nevalainen, A.Y. Rudensky and M.H. Gelb. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model, *J. Exp. Med.*: 2007; 204: 865-877

[203] M. Rouaoult, J.G. Bollinger, M. Lazdunski, M.H. Gelb and G. Lambeaou. Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity, *Biochemistry*: 2003; 42: 11494-11503

[204] C. Lee, D.W. Park, J. Lee, T.I. Lee, Y.J. Kim, Y.S. Lee and S.H. Baek. Secretory phospholipase A2 induces apoptosis through TNF- $\alpha$  and cytochrome c-mediated caspase cascade in murine macrophage RAW 264.7 cells, *Eur. J. Pharmacol.*: 2006; 536: 47-53

[205] J. Saegusa, N. Akakura, C.Y. Wu, C. Hoogland, Z. Ma, K.S. Lam, F.T. Liu, Y.K. Takada and Y. Takada. Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner, *J. Biol. Chem.*: 2008; 283: 26107-26115

[206] K. Hanasaki and H. Arita. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*: 2002; 68-69: 71-82

[207] E. Boilard, S.G. Bourgoin, C. Bernatcecz, P.E. Poubelle and M.E. Sourette. Interaction of low molecular weight group IIA phospholipase A2 with apoptotic human T cells: role of heparan sulfate proteoglycans, *FASEB J.*: 2003; 17: 1068-1080

[208] T.J. Brueseke and J.D. Bell. A new hat for an old enzyme: waste management, *Bioch. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1270-1279

[209] M. MacPhee, K.P. Chepenik, R.A. Liddell, K.K. Nelson, L.D. Siracusa and A.M. Buchnerd. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1

---

locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia, *Cell*: 1995; 81: 957-966

[210] M. Murakami, H. Sato, Y. Taketomi and K. Yamamoto. integrated lipidomics in the secreted phospholipase a(2) biology, *Int. J. Mol. Sci*: 2011; 12: 1474-1495

[211] Q. Dong, M. Patel, K.F. Scott, G.G. Graham, P.J. Russell and P. Sved. ncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer, *Cancer Lett.*: 2006; 240: 9-16

[212] B.S. Cummings, J. McHowat and R.G. Schnellmann. Phospholipase A2s in Cell Injury and Death, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 2000; 294: 793-799

[213] B.S. Cummings. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs, *Biochem. Pharmacol.*: 2007; 74: 949-959

[214] Y. Morioka, M. Ikeda, A. Saiga, N. Fujii, Y. Ishimoto, H. Arita and K. Hanasaki. Potential role of group X secretory phospholipase A(2) in cyclooxygenase-2-dependent PGE(2) formation during colon tumorigenesis, *FEBS Lett.*: 2000; 487: 262-266

[215] M. Murakami, S. Masuda, S. Shimbara, Y. Ishikawa, T. Ishii and I. Kudo. Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A(2), *J. Biol. Chem.*: 2005; 280: 24987-24998

[216] M. Mao-Qiang, M. Jain, K.R. Feingold and P.M. Elias. Secretory phospholipase A2 activity is required for permeability barrier homeostasis, *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106: 57-63

[217] G.A. Scott, S.E. Jacobs and A.P. Pentland. sPLA2-X stimulates cutaneous melanocyte dendricity and pigmentation through a lysophosphatidylcholine-dependent mechanism, *J. Invest. Dermatol.* 2006; 126: 855-861

[218] D.S. Grass, R.H. Felkner, M.Y. Chiang, R.E. Wallace, T.J. Nevalainen, C.F. Bennett and M.E. Swanson. Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate, *J. Clin. Invest*: 1996; 97: 2233-2241

[219] H. Sato, Y. Taketomi, Y. Isogai, S. Masuda, T. Kobayashi, K. Yamamoto and M. Murakami. Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation, *Biochem. J.*: 2009; 421: 17-27

- 
- [220] H. Sato, Y. Taketomi, Y. Isogai, Y. Miki, K. Yamamoto, S. Masuda, T. Hosono, S. Arata, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, H. Nakanishi, K. Ikeda, R. Taguchi, S. Hara, I. Kudo and M. Murakami. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice, *J. Clin. Invest.*: 2010; 120: 1400-1414
- [221] A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, M.A. Lomize and H.I. Mosberg. The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes, *BMC Struct. Biol.*: 2007; 7: 44
- [222] C.M. Mounier, C. Bon and R.M. Kini. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A(2): protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action, *Haemostasis*: 2001; 3-6: 279-287
- [223] T.W. Stief. Phospholipase a(2) activates hemostasis, *Drug Target Insights*: 2009; 2: 83-96
- [224] I. Munoz-Sanjuan and A.H. Brivanlou. Induction of ectopic olfactory structures and bone morphogenetic protein inhibition by Rossy, a group XII secreted phospholipase A2, *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 3608-3619
- [225] E. Valentin, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, M. Lazdunski and G. Lambeau. On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes, *J. Biol. Chem.*: 1999; 274: 31195-31202
- [226] M. Lappas and G.E. Rice. Phospholipase A2 isozymes in pregnancy and parturition, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat Acids*: 2004; 70: 87-100
- [227] M. Murakami and I. Kudo. New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.*: 2003; 14: 431-436
- [228] N.R. Webb. Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis, *Curr. Opin. Lipidol.*: 2005; 16: 341-344
- [229] B. Rosengren, A.C. Jonsson-Rylander, H. Peilot G. Camejo and E. Hurt-Camejo. Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1301-1308
- [230] M. Kimura-Matsumoto, Y. Ishikawa, K. Komiyama, T. Tsuruta, M. Murakami, S. Masuda, Y. Akasaka, K. Ito, S. Ishiguro, H. Morita, S. Sato and T. Ishii. Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development, *Atherosclerosis*: 2008; 196: 81-91

- 
- [231] E. Hurt-Camejo, G. Camejo, H. Peilot, K. Oorni and P. Kovanen. Phospholipase A(2) in vascular disease, *Circ. Res.*: 2001; 89: 298-304
- [232] K. Kugiyama, Y. Ota, K. Takazoe, Y. Moriyama, H. Kawano, Y. Miyao, T. Sakamoto, H. Soejima, H. Ogawa, H. Doi, S. Sugihaya and H. Yashoue. Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease, *Circulation*: 1999; 100: 1280-1284
- [233] Z. Mallat, J. Benessiano, T. Simon, S. Ederthy, C. Sebella-Arquelles, A. Cohen, V. Huart, N.J. Wareham, R. Luben, K.T. Khaw, A. Tedqui and S.M. Boekholdt. Circulating secretory phospholipase A2 activity and risk of incident coronary events in healthy men and women: the EPIC-Norfolk study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*: 2007; 27: 1177-1183
- [234] N. R. Webb, M.A. Bostrom, S.J. Szilvassy, D.R. van den Westhuyzen, A. Daugherty and F.C. de Beer. Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice, *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*: 2003; 23: 263-268
- [235] S.A. Ghesquiere, M.J. Gijbels, M. Anthonsen, P.J. van Gorp, I. van der Made, B. Johansen, M.H. Hofker and M.P. de Winther. Macrophage-specific overexpression of group IIA sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition, *J. Lip. Res.*: 2005; 46: 201-210
- [236] L. Gesquiere, W. Cho and P.V. Subbaiah. Role of group IIA and group V secretory phospholipases A(2) in the metabolism of lipoproteins. Substrate specificities of the enzymes and the regulation of their activities by sphingomyelin, *Biochemistry*: 2002; 41: 4911-4920
- [237] K. Hanasaki, K. Yamada, S. Yamamoto, Y. Ishimoto, A. Saiga, T. Ono, M. Ikeda, M. Notoya, S. Kamitani and H. Arita. Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 29116-29124
- [238] W. Pruzanski, G. Lambeau, M. Lazdunski, W. Cho, J. Kopilov and A. Kuksis. Hydrolysis of minor glycerophospholipids of plasma lipoproteins by human group IIA, V and X secretory phospholipases A2, *Biochim. Biophys. Acta*: 2007; 1771: 5-19
- [239] M.A. Bostrom, B.B. Boyanovsky, C.T. Jordan, M.P. Wadsworth, D.J. Taatjes, F.C. de Beer and N.R. Wedd. Group V secretory phospholipase A2 promotes

---

atherosclerosis: evidence from genetically altered mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*: 2007; 27: 600-606

[240] K. Yamamoto, Y. Isogai, H. Sato, Y. Taketomi and M. Murakami. Secreted phospholipase A<sub>2</sub>, lipoprotein hydrolysis, and atherosclerosis: integration with lipidomics, *Anal. Bioanal. Chem.*: 2011; 400: 1829-1842

[241] D.G. Ashbaugh, D.B. Bigelow, J. L. Petty and B.E. Levine. Acute respiratory distress in adults, *Lancet*: 1967; 2: 319-323

[242] L.B. Ware. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome, *Semin. Respir. Crit. Care Med*: 2006; 27(4): 337-349

[243] S.K. Leaver and T.W. Evans. Acute respiratory distress syndrome, *BMJ*: 2007; 335: 389-394

[244] B.O. Anderson, E.E. Moore and A. Banerjee. Phospholipase A<sub>2</sub> regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure, *J. Surg. Res.*: 1994; 56(2): 199-205

[245] L. Arbibe, D. Vial and L. Touqui. Phospholipase A<sub>2</sub> and acute respiratory distress syndrome, *Prog. Surg.*: 1997: 79-87

[246] G. Nakos, E.I. Kitsioulis, I. Tsangaris and M.E. Lekka. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early, intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leucocytes, proteins, PAF and surfactant components, *Intensive Care Med.*: 1998; 24: 296-303

[247] G. Nakos, E.I. Kitsioulis and M.E. Lekka. Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*: 1998; 158: 1504-1510

[248] M.E. Lekka, S. Liokatis, C. Nathanail, V. Galani and G. Nakos. The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*: 2004; 169: 638-644

[249] G. Karagiorga, G. Nakos, E. Galiatsou and M.E. Lekka. Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in embolism, *Intensive Care Med.*: 2006; 32: 116-123

[250] G. Kostapanagiotou, K.A. Kalimeris, N.P. Arkadopoulos, A. Rafiti, D. Panagopoulos, V. Smyrniotis, D. Vlahakos, C. Routsis, M.E. Lekka and G. Nakos. Desferrioxamine attenuates minor lung injury following surgical acute liver failure, *Eur. Respir. J.*: 2008; 33: 1429-1436



- 
- [251] D. Rae, J. Porter, N.B. Newman, N. Sumar, D. Bennett and J.H. Taylor. Type I phospholipase A<sub>2</sub> propeptide in acute lung injury, *Lancet*: 1994; 344: 1472-1473
- [252] T.J. Nevalainen, A.J. Hietaranta and J.M. Gronroos. Phospholipase A<sub>2</sub> in acute pancreatitis: new biochemical and pathological aspects, *Hepatogastroenterology*: 1999; 46: 2731-2735
- [253] L. Touqui and L. Arbibe. A role for phospholipase A<sub>2</sub> in ARDS pathogenesis, *Mol. Med. Today*: 1999; 5: 244-249
- [254] T.J. Nevalainen, M.M. Haapamaki and G.M. Gronroos. Roles of secretory phospholipases A<sub>2</sub> in inflammatory diseases and trauma, *Biochim. Biophys. Acta*: 2000; 1488: 83-90
- [255] G. Nakos, E.I. Kitsiouli, E. Hatzidaki, V. Koulouras, L. Touqui and M.E. Lekka. Phospholipases A<sub>2</sub> and platelet factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome, *Crit. Care Med.*: 2005; 33: 772-779
- [256] S. Furue, K. Mikawa, K. Nishima, M. Shiga, M. Ueno, Y. Tomita, K. Kuwabara, I. Teshirogi, T. Ono, Y. Hori, A. Matsukawa, M. Yoshinaga and H. Obara. Therapeutic time-window of a group IIA phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor in rabbit acute lung injury: correlation with lung surfactant protection, *Crit. Care Med.*: 2001; 29: 719-727
- [257] M. Murakami and I. Kudo. Secretory phospholipase A<sub>2</sub>, *Biol. Pharm. Bull*: 2004; 27(8): 1158-1164
- [258] M. Ohtsuki, Y. Taketomi, S. Arata, S. Masuda, Y. Ishikawa, T. Ishii, Y. Takenazawa, J. Aoki, H. Arai, K. Yamamoto, I. Kudo and M. Murakami. Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A<sub>2</sub> in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction, *J. Biol. Chem.*: 2006; 281: 36420-36433
- [259] R.D. Hite, M.C. Seeds, A.M. Safta, R.B. Jacinto, J.I. Gyves, D.A. Bass and B.M. Waite. Lysophospholipid generation and phosphatidylglycerol depletion in phospholipase A<sub>2</sub>-mediated surfactant dysfunction, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*: 2005; 288: L618-L624
- [260] B.P. Hurley and B.A. McCormick. Multiple Roles of Phospholipase A<sub>2</sub> during Lung Infection and Inflammation, *Infect. Immun.*: 2008; 76: 2259-2272

- 
- [261] M.C. Seeds, D.L. Bowton, R.D. Hite, G.I. Gyves and D.A. Bass. Human eosinophil group IID secretory phospholipase A<sub>2</sub> causes surfactant dysfunction, *Chest*: 2003; 123: 376S-377S
- [262] E. Kitsiouli, G. Nakos and M.E. Lekka. Phospholipase A<sub>2</sub> subclasses in acute respiratory distress syndrome, *Biochim. Biophys. Acta*: 2009; 1792: 941-953
- [263] T.J. Nevalainen, G.G. Graham and F.F. Scott. Antibacterial actions of secreted phospholipases A<sub>2</sub>, *Biochim. Biophys. Acta*: 2008; 1781: 1-9
- [264] P. Elsbach, J. Weiss, R.C. Francon. S. Beckerdite-Quagliata, A. Schneider and L. Harris. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A<sub>2</sub> from rabbit polymorphonuclear leukocytes. Observations on their relationship, *J. Biol. Chem*: 1979; 254: 11000-11009
- [265] Y. Weinrauch, C. Abad, N.S. Liang, S.F. Lowry and J. Weiss. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Clin. Invest.*: 1998; 102: 633-638
- [266] Y. Weinrauch, P. Elsbach, L.M. Madsen, A. Foreman and J. Weiss. The potent anti *Staphylococcus aureus* activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Clin. Invest.*: 1996; 97: 250-257
- [267] V.J. Laine, D.S. Grass and T.J. Nevalainen. Protection by group II phospholipase A<sub>2</sub> against *Staphylococcus aureus*, *J. Immunol.*: 1999; 162: 7402-7408
- [268] S.A. Beers, A.G. Buckland, R.S. Koduri, W. Cho, M.H. Gelb and D.C. Wilton. The antibacterial properties of secreted phospholipases A<sub>2</sub>: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 1788-1793
- [269] A. Piris-Gimenez, M. Paya, G. Lambeau, M. Chignard, M. Mock, L. Touqui and P.L. Goossens. In vivo protective role of human group IIA phospholipase A<sub>2</sub> against experimental anthrax, *J. Immunol.*: 2005; 175: 6786-6791
- [270] E. Boilard, Y. Lai, K. Larabee, B. Balestrieri, F. Ghomashchi, D. Fujioka, J.S. Coblyn, M.E. Weinblatt, E.M. Massarotti, T.S. Thornhill, M. Divangasi, H. Remold, G. Lambeau, M.H. Gelb, J.P. Arm and D.M. Lee. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A<sub>2</sub> in immune complex-mediated arthritis, *EMBO Mol. Med*: 2010; 2: 172-187

- 
- [271] K.M. Saari, V.Aho, V. Paavilainen and T.J. Nevalainen. Group II PLA(2) content of tears in normal subjects, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*: 2001; 42: 318-320
- [272] T.J. Nevalainen, L.I. Eerola, E. Rintala, V.J. Laine, G. Lambeau and M.H. Gelb. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum, *Biochim. Biophys. Acta.*: 2005; 1733: 210-223
- [273] T. Koprivnjak, A. Peschel, M.H. Gelb, N.S. Liang and J.P. Weiss. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 47636-47644
- [274] J.K. Femling, W.M. Nauseef and J.P. Weiss. Synergy between extracellular group IIA phospholipase A2 and phagocyte NADPH oxidase in digestion of phospholipids of *Staphylococcus aureus* ingested by human neutrophils, *J. Immunol.*: 2005; 175: 4653-4661
- [275] V.J. Laine, D.S. Grass and T.J. Nevalainen. Resistance of transgenic mice expressing human group II phospholipase A2 to *Escherichia coli* infection, *Infect. Immun.*: 2000; 68: 87-92
- [276] A.G. Buckland and D.C. Wilton. The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2), *Biochi. Biophys. Acta*: 2000; 1488: 71-82
- [277] H.T. Huhtinen, J.O. Gronroos, J.M. Gronroos, M.H. Gelb, T.J. Nevalainen and V.J. Laine. Antibacterial effects of human group IIA and group XIIA phospholipase A2 against *Helicobacter pylori* in vitro, *APMIS*: 2006; 114: 127-130
- [278] R.S. Koduri, J.O. Gronroos, V.J. Laine, C. Le Calvez, G. Lambeau, T.J. Nevalainen and M.H. Gelb. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2), *J. Biol. Chem.*: 2002; 277: 5849-5857
- [279] L.I. Eerola, F. Surrel, T.J. Nevalainen, M.H. Gelb, G. Lambeau and V.J. Laine. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 745-756
- [280] L. Paramo, B. Lomonte, J. Pizzaro-Cerda, J.A. Bengoechea, J.P. Gorvel and E. Moreno. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region, *Eur. J. Biochem.*: 1998; 253: 452-461
- [281] C. Santamaria, S. Larios, S. Quirós, J. Pizarro-Cerda, J.P. Gorvel, B.Lomonte, E. Moreno. Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic

---

peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A2, *Antimicrob. Agents Chemother.*: 2005; 49: 1340–1345

[282] L. Chioato, E.A. Aragao, T. Lopes Ferreira, A.I. Medeiros, L.H. Faccioli and R.D. Ward. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta*: 2007; 1768: 1247-1257

[283] D. Fenard, G. Lambeau, T. Maurin, J.C. Lefebvre and A. Doglio. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor, *Mol. Pharmacol.*: 2001; 60: 341-347

[284] J.O. Kim, B.K. Chakrabarti, A. Guha-Nijogi, M.K. Louder, J.R. Mascola, L. Ganesh and G.J. Nabel. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2, *J. Virol.*: 2007; 81: 1444-1450

[285] R. Meenakshisundaram, S. Sweni and P. Thirumalaikolundusubramanian. Hypothesis of snake and insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review, *AIDS Res. Ther.*: 2009; 6: 25

[286] M. Mitsuishi, S. Masuda, I. Kudo and M. Murakami. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells, *Biochem. J.*: 2006; 393: 97-106

[287] S. Deregnaucourt and J. Schrevel. Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components, *J. Biol. Chem.*: 2000; 275: 39973-39980

[288] I. Sitkiewicz, K.E. Stockbauer and J.M. Musser. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis, *Trends Microbiol.*: 2007; 15: 63-69

[289] A.P. Gimenez, Y.Z. Wu, M. Paya, C. Delclaux, L. Touqui and P.L. Goossens. High bactericidal efficiency of type iia phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin, *J. Immunol.*: 2004; 173: 521-530

[290] M.K. Jain and O.G. Berg. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipases A<sub>2</sub> and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting, *Biochim. Biophys. Acta*: 1989; 1002: 127-156

- 
- [291] O.G. Berg, B.Z. Yu, J. Rogers and M.K. Jain. Interfacial catalysis by phospholipase A2: determination of the interfacial kinetic rate constants, *Biochemistry*: 1991; 30: 7283-7297
- [292] O.G. Berg, M.H. Gelb, M.D. Tsai and M.K. Jain. Interfacial Enzymology: The Secreted Phospholipase A2-Paradigm, *Chem. Rev.*: 2001; 101: 2613-2653
- [293] J.M. Winget, Y.H. Pan and B.I. Bahnsen. The interfacial binding surface of phospholipase A2s, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1260-1269
- [294] R.A. Deems, B.R. Eaton and E.A. Dennis. Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes, *J. Biol. Chem.*: 1975; 250: 913-920
- [295] R. Verger, M.C. Mieras and G.H. de Haas. Action of phospholipase A at interfaces, *J. Biol. Chem.*: 1973; 248: 4023-4034
- [296] M.K. Jain, M.H. Gelb, J. Rogers and O.G. Berg. Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2, *Methods Enzymol.*: 1995; 249: 567-614
- [297] F. Ramirez and M.K. Jain. Phospholipase A2 at the bilayer interface, *Proteins*: 1991; 9: 229-239
- [298] M.H. Gelb, M.K. Jain, A.M. Hanel and O.G. Berg. Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: Lessons from secreted phospholipases A2, *Annu. Rev. Biochemistry*: 1995; 64: 653-688
- [299] D.L. Scott and P.B. Sigler. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2, *Adv. Protein. Chem.*: 1994; 245: 53-58
- [300] S.A. Tatulian, R.L. Biltonen and L.K. Tamm. Structural changes in a secretory phospholipase A2 induced by membrane binding: a clue to interfacial activation?, *J. Mol. Biol.*: 1997; 268: 809-815
- [301] Y.C. Lio and E.A. Dennis. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca<sup>2+</sup> independent phospholipase A2, *Biochem. Biophys. Acta*: 1998; 1392: 320-332
- [302] C.L. Wee, K. Balali-Mood, D. Gavaghan and M.S. Sansom. The interaction of phospholipase A2 with a phospholipid bilayer: coarse-grained molecular dynamics simulations, *Biophys. J.*: 2008; 95: 1649-1657
- [303] X. Lei, S.E. Barbour and S. Ramanadham. Group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 (iPLA2 $\beta$ ) and its role in beta-cell programmed cell death, *Biochimie*: 2010; 92: 627-637

- 
- [304] C. Yuan and M.D. Tsai. Pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>: new views on old issues, *Biochim. Biophys. Acta*: 1999; 1441: 215-222
- [305] M.M. Thunnissen, E. Ab, K.H. Kalk, J. Drenth, B.W. Dijkstra, O.P. Kuipers, R. Dijkman, G.H. de Haas and H.M. Verheij. X-ray structure of phospholipase A<sub>2</sub> complexed with a substrate-derived inhibitor, *Nature*: 1990; 347: 689-691
- [306] S.A. Tatulian. Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA<sub>2</sub> activation, *Biophys. J.*: 2001; 80; 789-800
- [307] P. Haimi, M. Hermansson, K.C. Batchu, J.A. Virtanen and P. Somerharju. Substrate efflux propensity plays a key role in the specificity of secretory A-type phospholipases, *J. Biol. Chem*: 2010; 285; 751-760
- [308] A.,R. Peters, N. Dekker, L. van del Berg, R. Boelens, R. Kaptein, A.J. Slotboom and G.H. de Haas. Conformational changes in phospholipase A<sub>2</sub> upon binding to micellar interfaces in the absence and presence of competitive inhibitors. A 1H and 15N NMR study, *Biochemistry*: 1992; 31: 10024-10030
- [309] K.M. Kilby, W.U. Primrose and G. C. Roberts. Changes in the structure of bovine phospholipase A<sub>2</sub> upon micelle binding, *Biochem. J.*: 1995; 305: 935-944
- [310] O.P. Kuipers, M. Vincent, J.C. Brochon, H.M. Verheij, G.H. de Haas and J. Gallay. Insight into the conformational dynamics of specific regions of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> from a time-resolved fluorescence study of a genetically inserted single tryptophan residue, *Biochemistry*: 1991; 30: 8771-8785
- [311] K. Sekar, S. Eawaramoorthy, M.K. Jain and M. Sundaralingam. Crystal structure of the complex of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> with the inhibitor 1-hexadecyl-3-(trifluoroethyl)-sn-glycero-2-phosphomethanol
- [312] G.H. de Haas, R. Dijkman, J.W. Boots and H.M. Verheij. Competitive inhibition of lipolytic enzymes. XI. Estimation of the interfacial dissociation constants of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> for substrate and inhibitor in the absence of detergents, *Biochim. Biophys. Acta*: 1995; 1257: 87-95
- [313]. W. Xu, L. Yi, Y. Feng, L. Chen and J. Liu. Structural insight into the activation mechanism of human pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.*: 2009; 284: 16659-16666

- 
- [314] J.H. Min, M.K. Jain, C. Wilder, L. Paul, R.A. Castro, D.C. Aspleaf and M.H. Gelb. Membrane bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase, *Biochemistry*: 1999; 38: 12935-12942
- [315] M.H. Gelb, J.H. Min and M.K. Jain. Do membrane-bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: interfacial versus non-interfacial enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*: 2000; 1488: 20-27
- [316] U. Samanta, S.D. Kirby, P. Srinivasan, D.M. Cerasoli and B.J. Bahnson. Crystal structures of human group-VIIA phospholipase A2 inhibited by organophosphorus nerve agents exhibit non-aged complexes, *Biochem. Pharmacol.*: 2009; 78: 420-429
- [317] E.A. Dennis. Phospholipases, in the *Enzymes*, Academic Press, New York: 1983; XVI (9): 307-353
- [318] A. Pluckthun and E.A. Dennis. Activation, aggregation and product inhibition of cobra venom phospholipase A2 and comparison with other phospholipases, *J. Biol. Chem.*: 1985; 260: 11099-11106
- [319] M.Waite. *Handbook of lipid research. The phospholipases*, Plenum Press, σελ.: 211-221
- [320] A. Bertolini, A. Ottani and M. Sandrini. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks, *Curr. Med. Chem.*: 2002; 9: 1033-1043
- [321] F. Celotti and T. Durand. The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and of cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*: 2003; 71: 147-162
- [322] J.B. Raskin. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy, *Am. J. Med.*: 1999; 106(5B): 3S-12S
- [323] S. Mohammed and D.W. Croom 2<sup>nd</sup>. Gastropathy due to celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, *N. Engl. J. Med.* 1999; 340(25): 2005-2006
- [324] U. Tibes and W.G. Friebe. Phospholipase A2 inhibitors in development, *Expert Opin. Investig. Drugs.*: 1997; 6: 279-298
- [325] S. Yedgar, D. Lichtenberg and E. Schnitzer. Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as a therapeutic target, *Biochim. Biophys. Acta*: 2000; 1488: 182-187

- 
- [326] F. Snyder. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes, *Biochem. J.*: 1995; 305: 689-705
- [327] E.A. Dennis and R.D. Krell. Summary: the enzymes, accessory proteins, and receptors of leukotriene metabolism and their inhibition and antagonism, *Adv. Prostaglandin. Tromboxane Leukot. Res.*: 1994; 2: 63-67
- [328] S. Yedgar, Y. Cohen and D. Shoseyov. Control of phospholipase A<sub>2</sub> activities for the treatment of inflammatory conditions, *Biochim. Biophys. Acta*: 2006; 1761: 1373-1382
- [329] J. Chang, J.H. Musser and H. McGregor. Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation, *Biochem. Pharmacol.*: 1987; 36: 2429-2436
- [330] A.B. Mukherjee, L. Miele and N. Pattabiraman. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and physiological role, *Biochem. Pharmacol.*: 1994; 48: 1-10
- [331] R.J. Mayer and L.A. Marshall. New insights on mammalian phospholipase A<sub>2</sub>: comparison of arachidonoyl- selective –non selective enzymes, *FASEB J.*: 1993; 7: 339-348
- [332] H. Zhao, L. Tang, X. Wang, Y. Zhou and Z. Lin. Structure of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub> modified by p-bromo-phenacyl-bromide, *Toxicon.*: 1998; 36: 875-866
- [333] P. Vadas and W. Pruzanski. Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease, *Lab. Invest.*: 1986; 55: 391-404
- [334] P. Mustonen, J.Y. Lehtonen and P.K. Kinnunen. Binding of quinacrine to acidic phospholipids and pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Effects on the catalytic activity of the enzyme, *Biochemistry*: 1998; 37: 12051-12057
- [335] L.J. Reynolds, E.D. Mihelich and E.A. Dennis. Inhibition of venom phospholipase A<sub>2</sub> by manoalide and manoanalogue, *J. Biol. Chem.*: 1991; 266: 16512-16517
- [336] I.D. Bianco, M.J. Kelley, R.M. Crowl and E.A. Dennis. Identification of two specific lysines responsible for the inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by manoalide, *Biochim. Biophys. Acta*: 1995; 1250: 197-203
- [337] B.P. Smart, Y.H. Pan, A.K. Weeks, J.G. Bollinger, B.J. Bahnson and M.H. Gelb. Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub> by indole analogues: a structure-guided study, *Bioorg. Med. Chem.*: 2004; 12: 1737-1749



- 
- [338] D.Y. Hui, M.J. Cope, E.D. Labonte, H-T Chang, J. Shao, E. Goka, A. Abousalham, D. Charmot and J. Buysse. The phospholipase A2 inhibitor methyl indoxam suppresses diet-induced obesity and glucose intolerance in mice, *Br. J. Pharmacol.*: 2009; 157: 1263-1269
- [339] K. Sonoki, M. Iwase, N. Sasaki, S. Ohdo, S. Higuchi, Y. Tanaka and M. Iida. Secretory PLA2 inhibitor indoxam suppresses LDL modification and associated inflammatory responses in TNF $\alpha$ -stimulated human endothelial cells, *Br. J. Pharmacol.*: 2008; 153: 1399-1408
- [340] N. Suzuki, J. Ishizaki, Y. Yokota, K.I. Higashino, T. Ono, M. Ikeda, N. Fujii, K. Kawamoto and K. Kanasaki. Structures, enzymatic properties and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A<sub>2</sub>s, *J. Biol. Chem.*: 2000; 275: 5785-5793
- [341] R.B. Rey, J. Orlate and J.E.G. Marin. Evaluation of two inhibitors of invasion: LY311727 (3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indoyl-5-oxy) propane phosphonic acid and AEBSF (4-(2 (aminomethyl)- benzensulphonyl fluoride) in acute murine toxoplasmosis, *J. Ant. Chemoth.*: 2002; 49: 871-874
- [342] R.C. Reid. Inhibitors of secretory phospholipase A<sub>2</sub> group IIA, *Curr. Med. Chem.*: 2005; 12: 3011-3026
- [343] F. Bartoli, H.K. Lin, F. Ghomashci, M.H. Gelb, M.K. Jain and R. Apitz-Castro. Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets, *J. Biol. Chem.*: 1994; 269: 15625-15630
- [344] Z. Huang, P. Payette, K. Abdullah, W.A. Cromlish and B.P. Kennedy. Functional identification of the active-site nucleophile of the human 85-kDa cytosolic phospholipase A2, *Biochemistry*: 1996; 35: 3712-1321
- [345] Y.C. Lio, L.J. Reynolds, J. Balsinde and E.A. Dennis. Irreversible inhibition of Ca<sup>2+</sup> -independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphate, *Biochim. Biophys. Acta*: 1996; 1302: 55-60
- [346] P.J. Kell, M.H. Creer, K.N. Crown, K. Wirsig and J. McHowat. Inhibition of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase by methyl arachidonyl fluorophosphate potentiates PAF synthesis in thrombin-stimulated human coronary artery endothelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 2003; 307: 1163-1170

- 
- [347] D. Riendeau, J. Guay, P.K. Weech, F. Laliberte, J. Yergey, C. Li, S. Desmarais, H. Perrier, S. Liu, D. Nicoll-Griffith et al. Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub>, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets, *J. Biol. Chem.*: 1994; 269: 15619-15624
- [348] M. Lehr. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of 3-acylindole-2-carboxylic acids as inhibitors of the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Med. Chem.*: 1997; 40: 2694-2705
- [349] M. Lehr and A.S. Elfringhoff. Comparison of the inhibition of the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-mediated arachidonic acid release by several indole-2-carboxylic acids and 3-(pyrrol-2-yl)propionic acids in bovine and in human platelets, *Arch Farm*: 2000; 339: 312-314
- [350] T. Ono, K. Yamada, Y. Chikazawa, M. Ueno, S. Nakamoto, T. Okuno and K. Seno. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha, pyrrophenone, *Biochem. J.*: 2002; 363: 727-735
- [351] M.A. Balboa, R. Perez and J. Balsinde. Amplification mechanisms of inflammation: paracrine stimulation of arachidonic acid mobilization by secreted phospholipase A<sub>2</sub> is regulated by cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> derived hydroperoxyeicosatetraenoic acid, *J. Immunol.*: 2003; 171: 989-994
- [352] A. Saiga, N. Uozumi, T. Ono, K. Seno, Y. Ishimoto, H. Arita, T. Shimizu and K. Hanasaki. Group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> can induce arachidonic acid release and eicosanoid production without activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha, *Prostaglandins Other Lipid Mediators*: 2005; 75: 79-89
- [353] U.A. Kessen, R.H. Schaloske, D.L. Stephens, K. Killermann Lucas and E.A. Dennis. PGE<sub>2</sub> release is independent of upregulation of Group V phospholipase A<sub>2</sub> during long-term stimulation of P388D<sub>1</sub> cells with LPS, *J. Lip. Res.*: 2005; 46: 2488-2496
- [354] F. Ghomashchi, A. Stewart, Y. Hefner, S. Ramanadham, J. Turk, C.C. Leslie and M.H. Gelb. A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> alpha blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*: 2001; 1513: 160-166
- [355] S.L. Hazen, L.A. Zupan, R.H. Weiss, D.P. Getman and R.W. Gross. Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>.

---

Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A<sub>2</sub>, J. Biol. Chem.: 1991; 266: 7227-7232

[356] E.J. Ackermann, K. Conde-Frieboes and E.A. Dennis. Inhibition of macrophage Ca<sup>2+</sup>- independent phospholipase A<sub>2</sub> by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones, J. Biol. Chem.: 1995; 270: 445-450

[357] A.B. Fischer, C. Dodia, A. Chander and M. Jain. A competitive inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub> decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung, Biochem. J.: 1992; 288: 407-411

[358] R. Wang, C.R. Dodia, M. Jain and A.B. Fischer. Purification and characterization of a calcium-independent acidic phospholipase A<sub>2</sub> from rat lung, Biochem. J. : 1994; 304: 131-137

[359] Y.Z. Wu, Y. Manevich, J.L. Baldwin, C. Dodia, K. Yu, S.I. Feinstein and A.B. Fisher. Interaction of surfactant protein A with peroxiredoxin 6 regulates phospholipase A<sub>2</sub> activity, J. Biol. Chem.: 2006; 281: 7515-7525

[360] T. Hakkinen, S. Luoma, M.O. Hiltunen, C.H. Macphee, K.J. Milliner, L. Patel, S.Q. Rice, D.G. Tew, K. Karkola and S.Y. Herttuala. Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub>, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Is Expressed by Macrophages in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions, Arter. Thromb. Vasc. Biol.: 1999; 19: 2909-2917

[361] L. Rodrigo, B. Mackness, P.N. Durrinrtnon, A. Hernandez and M.I. Mackness. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase, Biochem. J.: 2001; 354: 1-7

[362] S.W. Kim, H.J. Rhee, J. Ko, H.J. Kim, H. Gu Kim, J.M. Yang, E.C. Choi and D.S. Na. Inhibition of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by annexin I, J. Biol. Chem.: 2001; 276: 15712-15719

[363] W. Yuan, D.M. Quinn, P.B. Sigler and M.H. Gelb. Kinetic and inhibition studies of phospholipase A<sub>2</sub> with short-chain substrates and inhibitors, Biochemistry: 1990; 29: 6082-6094

[364] O.G. Berg, J. Rogers, B.Z. Yu, J. Yao, L.S. Romsted and M.K. Jain. Thermodynamic and kinetic basis of interfacial activation: resolution of binding and allosteric effects on pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at zwitterionic interfaces, Biochemistry: 1997; 36: 14512-14530

- 
- [365] O.G. Berg, B.Z. Yu, C. Chang, K.A. Koehler and M.K. Jain. Cooperative binding of monodisperse anionic amphiphiles to the i-face: phospholipase A<sub>2</sub>-paradigm for interfacial binding, *Biochemistry*: 2004; 43: 7999-8013
- [366] J.H. van Eijk, H.M. Verheij, R. Dijkman and G.H. de Haas. Interaction of phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja melanoleuca* snake venom with monomeric substrate analogs. Activation of the enzyme by protein-protein or lipid-protein interactions?, *Eur. J. Biochem.*: 1983; 132: 183-188
- [367] D. Lichtenberg, R.J. Robson and E.A. Dennis. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta*: 1983; 737: 285-304
- [368] A. Tan, A. Ziegler, B. Steinbauer and J. Seelig. Thermodynamics of sodium dodecyl sulfate partitioning into lipid membranes, *Biophys. J.*: 2002; 83: 1547-1556
- [369] S. Keller, H. Heerklotz, N. Jahnke and A. Blume. Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate, *Biophys. J.*: 2006; 90: 4509-4521
- [370] M.I. Καραγιάννη. Χημική Οργανολογία, Ιωάννινα:1992, σελίδες: 127-142
- [371] I. Taverniers, M. De Loose and E.V. Bockstaele. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry*: 2004; 23: 535-552
- [372] L.J Reynolds, WN Washburn, RA Deems and EA Dennis. Assay strategies and methods for phospholipases, *Methods in Enzymology*: 1991; 197:3-23
- [373] Dole V.P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose, *J. Clin. Invest.*: 1956; 35: 150-154
- [374] H.C. Yang, M. Mosior, C.A. Johnson, Y. Chen and E.A. Dennis. Group specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A<sub>2</sub>, *Anal. Biochem.*: 1999; 269: 278-288
- [375] W. Cho, S.K. Wu, E. Yoonand, L. Lichenbergova. Fluorimetric phospholipase assays based on polymerized liposome substrates, in the *Lipase and Phospholipase Protocols*, Humana Press, New Jersey: 1999: 7-17
- [376] F. Radvanyi, L. Jordan, F.M. Russo and C. Bon. A sensitive and continuous fluorimetric assay for phospholipase A<sub>2</sub> using pyrene- labeled phospholipids in the presence of serum albumin, *Analytical Biochemistry*: 1989; 177: 103-109

- 
- [377] T. Thuren, J.A. Virtanen, M. Lalla and P.K. Kinnunen. Fluorimetric assay for phospholipase A2 in serum, *Clin. Chem.*: 1985; 31: 714-717
- [378] T. Thuren, J.A. Virtanen, R. Verger and P.K. Kinnunen. Hydrolysis of 1-palmitoyl-2-[6-(pyren-1-yl)]hexanoyl-sn-glycero- 3-phospholipids by phospholipase A2: effect of the polar head-group, *Biochim. Biophys. Acta*: 1987; 917: 411-417
- [379] S.H. Hendrickson. Phospholipase A2 assays with fluorophore- labeled lipid substrates, *Methods in Enzymology*: 1989; 197: 90-94
- [380] H.S. Hendrickson, E.K. Hendrickson and T.J. Rustard. Synthesis of a naphthylvinyl-labeled glycerol ether analog of phosphatidylcholine and its use in the assay of phospholipase A2, *J. Lipid Res.*: 1987; 28: 864-872
- [381] H.S. Hendrickson, K.J. Klotz and E.K. Hendrickson. valuation of fluorescent and colored phosphatidylcholine analogs as substrates for the assay of phospholipase A2, *Anal. Biochem.*: 1990; 185: 80-83
- [382] A. Wittenauer, K. Shirai, R.L. Jackson and D. Johnson. Hydrolysis of s fluorescent phospholipid substrate by phospholipase A2 and lipoprotein lipase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 1984; 118: 894-902
- [383] J. Lasch, I. Willhardt, D. Kinder, H. Sauer and S. Smesny. Fluorometric assays of phospholipase A2 activity with three different substrates in biological samples of patients with schizophrenia, *Clin. Chem. Lab. Med.*: 2003; 41: 908-914
- [384] B. Kleuser, A. Meister, J. Sternfeld and G. Gerken. Measurement of phospholipase A2 and 1-alkylglycerophosphocholine acetyltransferase activities in stimulated alveolar macrophages by HPLC analysis of NBD-labeled ether lipids, *Chem. Phys. Lipids*, 1996; 79: 29-37
- [385] E.I. Kitsiouli, G. Nakos and M.E. Lekka. Differential determination of phospholipase A(2) and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates, *J. Lipid Res.*: 1999; 40: 2346-2356
- [386] E.I. Kitsiouli, G. Nakos and M.E. Lekka. Fluorimetric determination of phospholipase A2 and PAF-acetylhydrolase in biological fluids: The effect of protein, *Lipases and lipids: structure, function and biological applications*: 1999; 1: 253-263
- [387] A. Karkabounas, E.I. Kitsiouli, G. Nakos and M.E. Lekka. HPLC-fluorimetric assay of phospholipase A2. Application to biological samples with high protein content and various reaction conditions, *J. Chromatogr. B*: 2011; 879: 1557-1564

- 
- [388] H.S. Hendrickson. Phospholipase and phosphatidylinositol- specific phospholipase C assays by HPLC and TLC with fluorescent substrate, in the Lipase and Phospholipase Protocols, Humana Press, New Jersey: 1999: σελίδες: 1-6
- [389] D.A. Skoog, F.A. Holler and T.A. Nieman., μτφ. Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου και Ν. Χανιωτάκης. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη: 2005, σελίδες 417-445
- [390] Θ.Π. Χατζηϊωάννου. Εργαστηριακαί ασκήσεις ποσοτικής αναλυτικής χημείας, Αθήνα 1996 σελίδες: 545-55
- [391] E.L. Johnson and R. Stevenson. Basic Liquid Chromatography, Varian Associate Inc, USA: 1974: σελίδα: 2
- [392] D.A. Skoog, F.A. Holler and T.A. Nieman., μτφ. Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου και Ν. Χανιωτάκης. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη: 2005, σελίδες: 847-860
- [393] D.A. Skoog, D.M. West and F.J. Holler. Fundamentals of analytical chemistry, Saunders College publishing: σελίδες 665-670 και 712-720
- [394] Ε.Κ. Βουδούρη και Μ.Γ. Κοντομηνά. Ανάλυση τροφίμων : Θεωρία και εφαρμογές, ΟΕΔΒ: 1994., σελίδες 78-84 και 129-134
- [395] M.E. Lekka, D.C. Tsoukatos, A.D. Tselepis and V.M. Kapoulas. Semisynthetic preparation of 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (Platelet Activating Factor), Z. Naturforsch.: 1988; 43c: 665-670
- [396] C. Silversand and C. Haux. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids, J. Chromatogr. B: 1997; 703: 7-14
- [397] A.M. Decalzo, E.M. Insani and N.A. Pensel. Light scattering detection of phospholipids resolved by HPLC, Lipids: 2003; 38: 999-1003
- [398] Z. Suchocka, D. Gronostajska, P. Suchocki and J. Packecka. New high-performance liquid chromatographic method for the separation of blood plasma phospholipids, J. Pharm. Biomed. Anal.: 2003; 32: 859-865
- [399] Μ. Προδρομίδης. Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες, Ιωάννινα 2009, σελίδες: 113-147
- [400] L.R. Nemzer, A. Schwartz and A.J. Epstein. Enzyme Entrapment in Reprecipitated Polyaniline Nano- and Microparticles, Macromolecules: 2010; 43: 4324-4330

- 
- [401] Z. Shen and W. Cho. Highly efficient immobilization of phospholipase A<sub>2</sub> and its biomedical applications, *J. Lipid Res.*: 1995; 36: 1147-1151
- [402] M. Teke, S. Onal, A. Kilinc and A. Telefoncu. Immobilization of phospholipase A<sub>2</sub> on porous glass and its application for lowering serum cholesterol concentration, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*: 2003; 31: 467-478
- [403] R.R. Madoery, C.G. Gatonne and G.D. Fidelio. The effect of Phospholipase A<sub>2</sub> immobilization upon calcium interaction: a kinetic study, *J. Biochem.*: 1999; 126: 1060-1066
- [404] W. Cho and Z. Shen. Lipase and Phospholipase protocols, *Methods in Molecular Biology*: 1999; 19: 303-307
- [405] H.Y. Reynolds and H.H. Newball. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage, *J. Lab. Clin. Med.*: 1974; 84: 559-573
- [406] H.Y. Reynolds and J. Chretien. Respiratory track fluids: analysis of content and contemporary use in understanding lung disease, *DM*: 1984; 30: 100-103
- [407] L.A. Creuwels and L.M. van Golde. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects, *Lung*: 1997; 175: 1-39
- [408] J. Goerke and J.A. Clements. Alveolar surface tension and lung surfactant, *Handbook of physiology*: 1986: 247-261
- [409] R.L. Sanders. The composition of pulmonary surfactant, *Lung development: biological and clinical perspectives*, Farrell PM
- [410] F. Possmayer. The role of surfactant- associated proteins, *Am. Rev. Respir. Dis.* : 1990; 142: 749-752
- [411] P.von Wichert, K. Joseph, B. Muller and W.M. Frank. Bronchoalveolar lavage, *Am. Rev. Respir. Dis.*: 1993; 147: 148-152
- [412] H.Y. Reynolds. Bronchoalveolar lavage, *Am. Rev. Respir. Dis.*: 1987; 135: 250-163
- [413] C.G. Tsiafoulis, M.I. Prodromidis and M.I. Karayannis. Development of an amperometric biosensing method for the determination of L-fucose in pretreated urine, *Biosens. Bioelectron.*: 2004; 20: 620-627
- [414] E.G. Bligh and W.J. Dyer. A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*: 1959; 37: 911-917

- 
- [415] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*: 1951; 193: 265-275
- [416] C.G. Tsiafoulis, A.B. Florou, P.N. Trikalitis, T. Bakas and M.I. Prodromidis. Electrochemical study of ferrocene intercalated vanadium pentoxide xerogel/polyvinyl alcohol composite films: Application in the development of amperometric biosensors, *Electrochem. Comm.*: 2005; 7: 781-788
- [417] D.K. Kim, T. Fukuda, B.T. Thompson, B. Cockrill, C. Hales and J.V. Bonventre. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome, *Am. J. Physiol.*: 1995; 269: L109-L188
- [418] O.C. Martin and R.E. Pagano. Normal and reverse-phase HPLC separations of fluorescent (NBD) lipids, *Anal. Biochem.*: 1986; 159: 101-108