

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265306



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑΣ Δ.Α. ΠΑΝΤΑΖΗ**

**ΧΗΜΙΚΟΥ, MSc**

36

**"ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟ  
ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ  
ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ ΣΕ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II".**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2007**



Η διδακτορική διατριβή της κυρίας Δ. Πανταζή με τίτλο «Ανοσολογικοί μηχανισμοί στο πνευμονικό παρέγχυμα: επίδραση της μηχανικής τάσης στη βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης σε πνευμονοκύτταρα τύπου II» υποστηρίχθηκε οικονομικά για 24 μήνες από το έργο «Ηράκλειτος». Ευχαριστίες εκφράζονται στη Γραμματεία του προγράμματος ΕΠΕΑΚ.

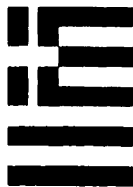
**Το ερευνητικό έργο** συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» το οποίο εντάσσεται στο ΕΠΕΑΕΚ II του 3<sup>ου</sup> Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ.

**The research Project** is co-funded by the European Union - European Social Fund (ESF) & National Sources, in the framework of the program "ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3<sup>rd</sup> Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education.

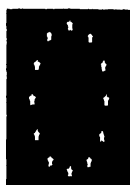


*Ανάπτυξη παντού. Ανάπτυξη για όλους.*

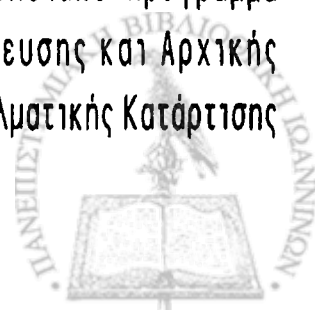
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ  
ΣΥΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ  
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Εκπαίδευσης και Αρχικής  
Επαγγελματικής Κατάρτισης



**ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ**

**Αμαλία & Δημήτρη**

**ΣΤΙΣ ΑΔΕΛΦΕΣ ΜΟΥ**

**Ειρήνη και Χαρά**

**και τον Jose Miguel**



“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”.

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παρ. 2)



## Πορεία διδακτορικής διατριβής

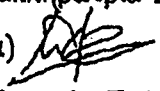
1. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στη Χημεία Βιομορίων και Βιοχημεία με τίτλο «Μελέτη υδρολυτικής δράσης φωσφολιπάσης D σε λιπιδικά υποστρώματα»: 6-11-2003
2. Ορισμός-τριμελούς εισηγητικής επιτροπής διδακτορικής διατριβής: 6-11-2003
3. Ορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής: 13-2-2004
4. Παρουσίαση πρωτοκόλλων διδακτορικής διατριβής: 18-10-2004
5. Άδεια συγγραφής διδακτορικής διατριβής: 15-12-2006
6. Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 15-6-07 & 2-11-2007
7. Παρουσίαση διδακτορικής διατριβής: 14-12-2007

## Επταμελής εξεταστική επιτροπή

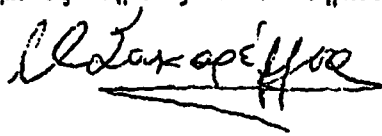
1. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Επιβλέπουσα)
2. Νάκος Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Μέλος τριμελούς επιτροπής)
3. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊσιώτου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Μέλος τριμελούς επιτροπής)
4. Αγνή Μυλωνά-Κοσμά, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Θεώνη Τράγκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ευγενία Πάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Ντία Γαλανοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών




**ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**


1. Μαριλένα Λέκκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (σπιβλέπουσα) 

2. Γεώργιος Νάκος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής 

3. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής 

4. Αγνή Μυλωνά-Κοσμά, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

5. Θεώνη Τράγκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 

6. Ευγενία Πάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 

7. Ντία Γαλανοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών 

*συμφωνία  
Καβτζ*



# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Π.Ι.) σε συνεργασία με τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Την επίβλεψη και άμεση καθοδήγηση της διατριβής είχε η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Π.Ι. κυρία Μαρία-Ελένη Λέκκα. Θα ήθελα αρχικά να την ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα πραγματικά ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Επίσης να την ευχαριστήσω για τη βοήθεια που μου παρείχε, τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέφερε, για την εκπαίδευση σε εργαστηριακά ζητήματα και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της διατριβής. Τέλος, την ευχαριστώ για τη στήριξή της σε διοικητικά θέματα που αφορούσαν το διορισμό μου στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων ως υπάλληλο ΙΔΑΧ το Μάρτιο του 2007 (κατηγορίας ΠΕ, κλάδου Χημικών, Αρ. ΦΕΚ 333/12-03-2007 τ.Β΄, Αρ. Πρυτανικής Πράξης 12260/20-03-2007).

Ώερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας του Τμήματος Ιατρικής και Διευθυντή της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, κ. Γεώργιο Νάκο. Τον ευχαριστώ που μου προσέφερε τον πολύτιμο χρόνο του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του σε κύρια ζητήματα της διατριβής. Ακόμη, τον ευχαριστώ για το συνεχές ενδιαφέρον του για το διορισμό μου στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Π.Ι., κυρία Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για το ενδιαφέρον της για την πορεία των σπουδών μου.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω πολλές ευχαριστίες προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κυρίες Αγνή Μυλωνά-Κοσμά, Θεώνη Τράγκα, Ευγενία Πάνου και Ντία Γαλανοπούλου για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και τα ενδιαφέροντα σχόλια τους στη διατριβή.

Ευχαριστώ πολύ και τους Διδάκτορες Χημείας κ. Κωνσταντίνο Τέλλη και κυρία Ειρήνη Κητσιούλη (Λέκτορα, βάσει του Π.Δ. 407/1980, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Π.Ι.) για την εκμάθηση εργαστηριακών τεχνικών και τη συνεργασία τους κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ την κυρία Ε. Κητσιούλη για τις παρατηρήσεις της κατά τη συγγραφή της διατριβής.





Ευχαριστώ θερμά τις συναδέλφους κυρίες Ελεάνα Χατζηδάκη, Ευαγγελία Χατζηαντωνίου, Γεωργία Αντωνίου, Ελευθερία Λέτσιου, Κατερίνα Ρέντζιου, Ελίζα Μαρκατζίνου, Ευαγγελία Βότη και τον κ. Θανάση Καρκαμπούνα για τη συνεργασία και στήριξή τους στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστίες εκφράζονται και στους νεότερους συναδέλφους κυρία Βανέσσα Γαρδίκη και κ. Νικόλα Σάϊμον-Κουσουρή για τη συνεργασία τους στο εργαστήριο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους συναδέλφους των υπολοίπων ερευνητικών ομάδων του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας για το φιλικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην κυρία Βασιλική Ντάτση, παρασκευάστρια της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας, για τη βοήθειά της σε τεχνικά ζητήματα της διατριβής.

Η διατριβή αυτή όμως δε θα μπορούσε ποτέ να λάβει χώρα χωρίς την οικονομική στήριξη και ηθική συμπαράσταση των γονιών μου. Οι θυσίες και οι αγώνες τους ήταν καθοριστικής σημασίας για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής η οποία κυριολεκτικά τους ανήκει. Τους ευχαριστώ πάρα πολύ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου. Τις αδελφές μου Ειρήνη και Χαρά, αλλά και τον Jose Miguel που μοιράστηκαν τις αγωνίες μου και τους προβληματισμούς μου κατά τη διάρκεια των σπουδών μου ευχαριστώ επίσης θερμά.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο και ταπεινό ευχαριστώ στους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου και μου πρόσφεραν απλόχερα το χαμόγελο κατά της διάρκεια της διατριβής μου.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	VII
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	IX
ΣΚΟΠΟΣ	XVI
SUMMARY	XVII
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	XX
1 <sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	2
ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ	6
ΜΗΧΑΝΙΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	10
Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα	10
Μηχανικές καταπονήσεις στους πνεύμονες και στα κύτταρα	12
Περιγραφή μηχανικών καταπονήσεων στον πνεύμονα	13
Είδη «συσκευών» μηχανικής διάτασης	13
Πειραματικές τεχνικές για την εφαρμογή δυνάμεων σε κύτταρα	14
Μηχανική διάταση	15
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	19
ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ	22
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΙΤΑΙ ΤΟ ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ	25
2 <sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ - ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	29
ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	29
Λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα	29
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	33
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	36



Ρύθμιση της επιφανειοδραστικής τάσης	36
Ισορροπία υγρών στον πνεύμονα	36
Άμυνα στον πνεύμονα	37
Σύνθεση	37
Έκκριση	38
	41
Μετατροπή	
Ανακύκλωση	41
Αποικοδόμηση	41
Βιοφυσικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα	43
Άλλες λειτουργίες - Ανοσολογικοί μηχανισμοί	45
<b>ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ</b>	45
<b>ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ</b>	48
Εισαγωγή	48
Σύνθεση λιπαρών οξέων (FA)	50
Παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA)	51
<b>ΠΟΡΕΙΕΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ PC</b>	52
<i>De novo</i> πορεία	52
Πορεία ανάπλασης (Remodeling)	54
<b>ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ</b>	57
A. Ορμονική ρύθμιση	57
	59
B. Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PC	
1. Ρύθμιση της CTP:κυτιδυλυλοτρανσφεράση της φωσφοχολίνης	59
2. Άλλα ένζυμα που μπορεί να ελέγχουν τη βιοσύνθεση της PC	61
<b>ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ</b>	62
Εισαγωγή	62
Ταξινόμηση φωσφολιπασών A <sub>2</sub>	64



PAF -PLA <sub>2</sub>	65
iPLA <sub>2</sub> s	65
Η aiPLA <sub>2</sub> στην παραγωγή της PC	66
Αναστολείς των PLA <sub>2</sub>	68
Μηχανισμός δράσης του αναστολέα MJ33	69
Η PLA <sub>2</sub> στους πνεύμονες, σε ATII & στην κυτταρική σειρά A549	71
<b>3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ - ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ</b>	<b>74</b>
<b>A. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ</b>	<b>74</b>
Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα	74
<b>B. ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ</b>	<b>76</b>
Εισαγωγή	76
Κορτικοστεροειδή	78
Μηχανισμός δράσης στεροειδών	81
Ο μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών για αντιφλεγμονώδη δράση και ανοσοκαταστολή συνδέονται μεταξύ τους	83
Επίδραση γλυκοκορτικοειδών σε μεσολαβητές φλεγμονής	84
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στον πνεύμονα και στα ATII	85
Δράση των γλυκοκορτικοειδών στον πνεύμονα	85
Παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης	88
Χορήγηση γλυκοκορτικοειδών για τη θεραπεία του IRDS	89
Αποτελέσματα δράσης των κορτικοστεροειδών δεξαμεθαζόνη & βητα-μεθαζόνη	90
Επίδραση του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη σε κυτταρικές σειρές πνευμονοκυττάρων τύπου II (ATII)	91
<b>ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>93</b>
<b>1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A549 &amp; H441</b>	<b>94</b>
1.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549	94



1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς H441	94
<b>2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b>	<b>97</b>
2.1 Καμπύλη ανάπτυξης	98
<b>3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΗΤΑ-ΜΕΘΑΖΟΝΗΣ</b>	<b>99</b>
3.1 Συσκευή μηχανικής διάτασης	99
3.2 Επίδραση βητα-μεθαζόνης	100
<b>4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ</b>	<b>101</b>
4.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	102
4.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	103
<b>5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΔΕΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (LDH)</b>	<b>103</b>
5.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	103
<b>6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ</b>	<b>104</b>
6.1 Εκτέλεση εκχύλισης	104
6.2 Εκχύλιση προσροφημένων λιπιδίων από πυριτικό οξύ πλάκας TLC	105
<b>7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ</b>	<b>105</b>
7.1 Πειραματική διαδικασία	107
7.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	107
<b>8. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ TLC</b>	<b>108</b>
8.1 Εκτέλεση	109
8.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	110
<b>9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΗΣ PC</b>	<b>110</b>
9.1 Πειραματική διαδικασία	113
9.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	113
<b>10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΩΣΦΟΧΟΛΙΝΟΦΩΣΦΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ (CPT)</b>	<b>114</b>
10.1 Πειραματική διαδικασία	116
10.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	118
<b>11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΑΚΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ (LPCAT)</b>	<b>119</b>
11.1 Πειραματική διαδικασία	120



11.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	121
12. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $PLA_2$ & $PAF-AcH$	122
12.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	124
12.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	125
13. ΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $PAF-AcH$	125
13.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	127
13.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	128
14. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	128
14.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	132
14.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	135
15. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ $a\beta PLA_2$	135
15.1 Πειραματική διαδικασία	138
15.2 Εμφάνιση του φιλμ	139
16. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ $a\beta PLA_2$ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ MJ33	141
16.1 Εκτέλεση προσδιορισμού	142
16.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	143
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	144
Πρωτόκολλο εργασίας	145
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	146
1. Επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη	147
2. Καμπύλη ανάπτυξης	147
3. Αριθμός κυττάρων - έλεγχος βιωσιμότητας	148
4. Επίπεδα πρωτεΐνης	148
5. Προσδιορισμός γαλακτικής δεύδρογονάσης	150
6. Προσδιορισμός ολικού λιπιδικού φωσφόρου	150
7. Ανάλυση λιπιδίων κυττάρων A549 με TLC	151
8. Επίπεδα λιπιδίων	153
8.1 Επίπεδα PE	153
8.2 Επίπεδα λιπιδίου με $R_f$ μεταξύ PC & PE	154



	154
8.3 Επίπεδα Lyso-PC	155
8.4 Επίπεδα Sph	155
8.5 Επίπεδα PC	156
Ανάλυση λιπαρών οξέων της PC	159
8.6 Μελέτη του λόγου PC/Sph	160
9. Ενζυμικές ενεργότητες που συμμετέχουν στην παραγωγή της PC	160
9.1 Ενεργότητα CPT	163
Συσχέτιση μεταξύ PC & CPT	164
9.2 Ενεργότητα LPCAT	167
9.3 Ενεργότητα PLA <sub>2</sub>	169
9.4 Ενεργότητα PAF-AcH	171
10. Μελέτη της αιPLA <sub>2</sub>	174
10.1 Ανοσοαποτύπωση της αιPLA <sub>2</sub>	175
10.2 Ενεργότητα της αιPLA <sub>2</sub>	177
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ H441</b>	<b>177</b>
1. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων H441	178
2. Αριθμός κυττάρων - Έλεγχος βιωσιμότητας	178
3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης	179
4. Προσδιορισμός ολικού λιπιδικού φωσφόρου	179
5. Διαχωρισμός λιπιδίων κυττάρων H441 μετά από TLC	180
6. Ενζυμικές ενεργότητες που συμμετέχουν στην παραγωγή της PC	180
6.1 Ενεργότητα PLA <sub>2</sub>	182
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>183</b>
Κύρια ευρήματα της εργασίας	185
<b>ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ</b>	<b>185</b>
Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη	186
Φωσφατιδυλοχολίνη	186
Ανάλυση λιπαρών οξέων της PC	186
Επίπεδα Sph	186



Μεταβολές του λόγου PC/Sph	187
ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC	187
Α) Ενεργότητα CPT	187
Β) Ολική ενεργότητα PLA <sub>2</sub>	189
Γ) Ενεργότητα αιPLA <sub>2</sub>	190
Δ) Ενεργότητα LPCAT	191
Σύνοψη αποτελεσμάτων	193
• Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης μηχανικού ερεθίσματος	194
Σχολιασμός αποτελεσμάτων στα κύτταρα H441	195
Ανακοινώσεις των αποτελεσμάτων της διατριβής σε συνέδρια	196
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>198</b>





# ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της μηχανικής διάτασης και του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη στη βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) σε κύτταρα A549, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

- Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ μηχανικής τάσης 26.6 mm Hg (ή 36.2 cm H<sub>2</sub>O) σε καλλιέργειες κυττάρων A549 που είχαν ετοιμαστεί σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη (μηχανικό ερέθισμα).
- Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη σε συγκέντρωση  $37.8 \times 10^{-6}$  M (χημικό ερέθισμα).
- ο συνδυασμός του μηχανικού και χημικού ερεθίσματος στα κύτταρα A549.

Προσδιορίσθηκαν:

- ❖ οι ενζυμικές ενεργότητες της CDP-χολινοφωσφοτρανσφεράσης (CPT), φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), PAF-ακετυλυδρολάσης (PAF-AcH), της όξινης ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου PLA<sub>2</sub> (aiPLA<sub>2</sub>) και της ακυλοτρανσφεράσης (LPCAT), που μπορεί να εμπλέκονται στην παραγωγή της PC.
- ❖ τα επίπεδα των λιπιδίων PC, PE, Sph και η τιμή του λόγου PC/Sph.



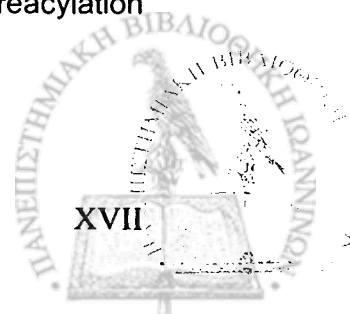
# SUMMARY

Phosphatidylcholine (PC) is the major component of lung surfactant, a tensioactive material that lines alveoli and protects them from collapsing. The most important task of surfactant is to decrease the surface tension and therefore to reduce the tendency of alveoli to collapse during expiration. Extracellular surfactant can be harvested from the lungs by bronchoalveolar lavage (BAL).

Biosynthesis of PC includes reactions that take place in alveolar type II cells (ATII), which synthesize, organize and secrete lung surfactant into the alveolar space. In a little detail, PC is formed via the *de novo* (CDP-choline) pathway the last step of which involves the transfer of phosphocholine group to the diacylglycerol. CDP-choline mediated by cholinephosphotransferase activity (CPT) giving PC. Enrichment of the *sn*-2 position of PC with saturated (palmitoyl-) acyl- chain (giving dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) occurs through a remodelling pathway during which a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase  $\text{A}_2$  cleaves and subsequently replaces the acyl- moiety with palmitoyl group.

$\text{PLA}_2$  controls the deacylation of the predominant tissue phospholipids, 1-acyl-2-unsaturated phosphatidylcholine to produce DPPC. As it is known  $\text{PLA}_2$  is one broad of family that takes part in a lot of reactions in every biological system.  $\text{PLA}_2$  can affect pulmonary function either directly, by hydrolyzing lung surfactant phospholipids and increasing surfactant tension or indirectly, through the production of biologically active molecules. The distinguishing of various isoforms of  $\text{PLA}_2$  had achieved with the use of specific inhibitors.

Further, had proved that in normal rat lung, the internalized DPPC is degraded predominantly via a lysosomal-type  $\text{PLA}_2$  and that activity of this enzyme is also required for synthesis of DPPC via the deacylation/reacylation pathway. As a lysosomal-type enzyme has acidic pH optimum (pH=4.0), has mentioned that is a  $\text{Ca}^{2+}$  independent form and it has been named as acidic calcium independent  $\text{PLA}_2$  (ai $\text{PLA}_2$ ). This type of  $\text{PLA}_2$  belongs to the superfamily of peroxiredoxins (Prdxs), in particularly ai $\text{PLA}_2$  is a Prdx6, a recently described superfamily of Se-independent peroxidases. ai $\text{PLA}_2$  activity is inhibited by the competitive transition state inhibitor MJ33. Inhibited ai $\text{PLA}_2$  function resulted in both decreased degradation of internalized DPPC as well as decreased DPPC synthesis by the reacylation pathway.



The final step of remodelling pathway comprises an acylation with the action of a 1-palmitoyl-2-lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) with palmitoyl-CoA via a Lyso-phosphatidylcholine acyltransferase activity (LPCAT) that was identified and characterized recently in alveolar type II cells.

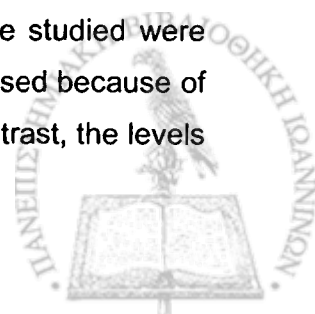
A lot of factors in vitro influence the production and secretion of pulmonary surfactant such as glucocorticoids, fatty acids, calcium, phorbol esters etc. Hormones, especially glucocorticoids, were found to be effective in accelerating foetal lung maturation by stimulating surfactant synthesis. Interestingly, clinical trials indicated that administration of steroids was effective in preventing newborn respiratory distress syndrome (IRDS).

In addition to these stimuli, cellular stressors, including osmotic shock and cyclic stretch, induce release of surfactant. ATII cells in the lung are subjected to mechanical distortion during development, normal breathing and clinical ventilation. It is widely believed that mechanical distortion or stretch of ATII cells, which occurs during normal breathing, is the predominant physiological trigger for surfactant release. Hence, while stretch clearly stimulates the release of surfactant from ATII cells in the lung, its composition within the alveolar compartment is likely to be influenced by multiple factors, including lung function mechanics.

In spite of the enormous bulk of the literature about the release of surfactant because of stretch, according to our knowledge there are no references about the enzyme activities that participate in metabolism of PC in ATII under mechanical stretch. As we can know, there is one study that had been investigated the effect of stretch in metabolism of PC in cultured rat astrocytes in which studied, between the others, the levels of PLA<sub>2</sub> and phospholipase C (PLC).

The aim of the our study was to investigate whether mechanical stretch promotes not only the secretion as it is known, but also the biosynthesis of phosphatidylcholine (PC) and to evaluate the effect of beta-methasone. To this direction we studied the effect of a single mechanical stretch (26.6 mm Hg or 36.2 cm H<sub>2</sub>O) and beta-methasone (37.8x10<sup>-6</sup> M) in the levels of PE, Sph, the ratio of PC/Sph, PC, and it's the % constitution of fatty acids. Further, the main enzyme activities that participate in the metabolism of PC such as CPT, various isoforms of PLA<sub>2</sub>(s) and LPCAT. In our study, the immortalized cell line A549 was used as a model for ATII cells.

Our results showed that mechanical stretching for 1 hr caused an increase in PC production in comparison with control. The levels of the parameters that we studied were maintained in control conditions after 4 hrs stretching. CPT activity was increased because of stretching (at 47.3 %) and was unaffected because of beta-methasone. In contrast, the levels



of total PLA<sub>2</sub> activity and PAF-AcH were increased (29.5 % and 26.3 % respectively) because of stretching and a reduction because of beta-methasone (27.3 % and 27.2 % respectively) was observed. The aiPLA<sub>2</sub> isoform, which was detected for first time in A549 cells, seemed to increase (12.2 %) after stretching as indicated by the immunoblotting analysis, while beta-methasone caused a reduction of the enzyme, which means that aiPLA<sub>2</sub> had the same tendency as total PLA<sub>2</sub> activity. Furthermore in all occasions, the activity of aiPLA<sub>2</sub> was reduced at 60 % because of the inhibitor MJ33. The last enzyme activity that we studied was LPCAT that seems to increase because of stretching and had a tendency of increased because of beta-methasone.

As far the levels of lipids, stretching and the combination of the two effectors also caused an increase in PC (32.4 % & 35.4 % respectively), PE (16.0 % & 23.9 % respectively), and the ratio PC/Sph (32.8 % because of the combination of the two stressors), while beta-methasone caused a reduction only in the levels of Sph (25.0 %). Finally the fatty acid analysis of PC was showed that the parallel effect of stretching and beta-methasone caused a 4 times increase in palmitic acid while myristic acid was reduced (59.9 %).

In conclusion, our labor has focused on the alterations of PC metabolism mainly after mechanical stretching in A549 cells and could provide mainly evidence for the role of stretch in physiological lung development. Mechanical stretch seems to be a signal for the production of PC in contrast with beta-methasone. Understanding the regulation of enzyme activities will offer important insight into surfactant phospholipids biosynthesis.



# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- ❖ **AA** (*Arachidonic Acid*), Αραχιδονικό οξύ
- ❖ **AACOCF<sub>3</sub>** (*Arachidonyl trifluoromethyl ketone*), Αραχιδονούλο-τριφθορομεθυλοκετόνη
- ❖ **AC** (*Adenylate Cyclase*), Αδενυλική κυκλάση
- ❖ **ACTH** (*Adrenocorticotropic Hormone*), Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη
- ❖ **ADP** (*Adenosine Diphosphate*), Διφωσφορική αδενοσίνη
- ❖ **ALI** (*Acute Lung Injury*), Οξεία πνευμονική βλάβη
- ❖ **AMP** (*Adenosine MonoPhosphate*), Μονοφωσφορική αδενοσίνη
- ❖ **ATII** (*Alveolar Type II cells*), Πνευμονοκύτταρα τύπου II
- ❖ **ATP** (*Adenosine Triphosphate*), Τριφωσφορική αδενοσίνη
- ❖ **aiPLA<sub>2</sub>** (*Acidic Independent Phospholipase A<sub>2</sub>*), Φωσφολιπάση A<sub>2</sub> ανεξάρτητη ιόντων Ca<sup>2+</sup> με ενεργότητα σε όξινο pH
- ❖ **ANSA** (*1-Amino-2-Naphthol-4-Sulfonic Acid*), 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ
- ❖ **ARDS** (*Acute Respiratory Distress Syndrome*), Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας
- ❖ **BAL** (*Bronchoalveolar Lavage*), Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα
- ❖ **BEL** (*BromoenoL Lactone*), Βρωμοενολολακτόνη
- ❖ **BSA** (*Bovine Serum Albumin*) Αλβουμίνη ορού βοός
- ❖ **CSA** (*Cellular Surface Area*), Επιφάνεια κυττάρου
- ❖ **CDP** (*Cytidine Diphosphate*), Κυτιδυνο-διφωσφορική ομάδα
- ❖ **COX** (*Cyclogenase*), Κυκλοοξυγενάση
- ❖ **CPT** (*Choline PhosphoTransferase*), Φωσφοχολινοτρανσφεράση
- ❖ **CTP** (*Phosphocholine CytidylylTransferase*), Κυτιδυλοτρανσφεράση της φωσφοχολίνης
- ❖ **CL** (*Cardiolipin*), Καρδιολιπίνη
- ❖ **C<sub>L</sub>** (*Lung Compliance*), Πνευμονική διατασιμότητα
- ❖ **CoA** (*Coenzyme A*), Συνένζυμο A
- ❖ **CO<sub>2</sub>** (*Carbon dioxide*), Διοξείδιο του άνθρακα
- ❖ **CP** (*PhosphoCreatine*), Φωσφοκρεατίνη
- ❖ **CPK** (*PhosphoCreatine Kinase*), Κινάση της φωσφοκρεατίνης
- ❖ **cPLA<sub>2</sub>** (*cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>*), Κυτοσολική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>



- ❖ **cpm** (*counts per minute*), Κρούσεις ανά λεπτό
- ❖ **DAG** (*Diacylglycerol*), Διακυλογλυκερόλη
- ❖ **DHAP** (*Dihydroxyacetone phosphate*), Φωσφορική διϋδροξυακετόνη
- ❖ **DFP** (*Diisopropylfluorophosphate*), Διϊσοπροπυλο-φθοροφωσφορικό οξύ
- ❖ **DNA** (*Deoxyribonucleic Acid*), Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
- ❖ **DPFC** (*Dipalmitoylphosphatidylcholine*), Διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη
- ❖ **DSPC** (*Disaturated phosphatidylcholine*), Δικορεσμένη φωσφατιδυλοχολίνη
- ❖ **EDTA** (*Ethylene-diamine-tetra-acetic acid*), Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
- ❖ **EGF** (*Epidermal Growth Factor*), Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- ❖ **EGTA** (*Ethylene-bis-oxyethylenitrilo-tetra-acetic acid*), Αιθυλενο-δισ-οξυαιθυλενο-τετρα-οξικό οξύ
- ❖ **FA** (*Fatty Acid*), Λιπαρό οξύ
- ❖ **FAS** (*Fatty Acid Synthase*), Συνθάση λιπαρών οξέων
- ❖ **FBS** (*Fetal Bovine Serum*), Ορός εμβρύου βοός
- ❖ **FPF** (*Fibroblast-Pneumonocyte Factor*), Παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης
- ❖ **GR** (*Glucocorticoid Receptor*), Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδούς
- ❖ **GREs** (*Glucocorticoid Response Elements*), Στοιχεία απόκρισης του γλυκοκορτικοειδούς
- ❖ **HPLC** (*High Performance Liquid Chromatography*), Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
- ❖ **HDL** (*High-Density Lipoproteins*), Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
- ❖ **Hsp** (*Heat shock protein*), Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
- ❖ **IL-** (*Interleukin-*), Ιντερλευκίνη
- ❖ **IP<sub>3</sub>** (*Inositol Triphosphate*), Τριφωσφορική ινοσιτόλη
- ❖ **iPLA<sub>2</sub>** (*Independent Phospholipase A<sub>2</sub>*), Φωσφολιπάση A<sub>2</sub> ανεξάρτητη ιόντων Ca<sup>2+</sup>
- ❖ **LB** (*Lamellar Bodies*), Στιβαδωτά σωμάτια
- ❖ **LDH** (*Lactate Dehydrogenase*), Γαλακτική δεϋδρογονάση
- ❖ **LDL** (*Low Density Lipoproteins*), Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
- ❖ **5-LO** (*5-Lipoxygenase*), 5-Λιποξυγονάση
- ❖ **LY311727**, 3-(3-ακεταμιδο-1-βενζυλο-2-αιθυλινδολυλο-5-οξυ)προπανο-θειϊκό οξύ
- ❖ **Lyso-PC** (*Lysophosphatidylcholine*), Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
- ❖ **Lyso-PA** (*Lysophosphatidic Acid*), Λυσοφωσφατιδικό Οξύ
- ❖ **MAFP** (*methyl-arachidonyl-fluorophosphonate*), Μεθυλο-αραχιδοנוύλο-φθοροφωσφορικό οξύ

- ❖ **MAPK** (*Mitogen Activated Protein Kinase*), Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
- ❖ **MJ33** (*1-hexadecyl-3-trifluoroethylglycero-sn-2-phosphomethanol*), 1-παλμιτούλο-3-τριφθορο-αιθυλ-γλυκερο- sn-2-φωσφομεθανόλη
- ❖ **MO** (*Mean*), Αριθμητικός μέσος όρος
- ❖ **NF-κB** (*Nuclear Factor-κB*), Πυρηνικός παράγοντας -κB
- ❖ **RNA** (*Ribonucleic Acid*), Ριβονουκλεϊκό Οξύ
- ❖ **mRNA** (*messenger RNA*), Αγγελιοφόρο RNA
- ❖ **NBD** [*(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino*], 7-νιτρο-2-οξυ-1,3-διαζολιο-4-υλαμινο
- ❖ **O<sub>2</sub>** (*Oxygen*), Οξυγόνο
- ❖ **P** (*Phosphorous*), Φωσφόρος
- ❖ **PA** (*Phosphatidic Acid*), Φωσφατιδικό Οξύ
- ❖ **PaCO<sub>2</sub>**, Μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα
- ❖ **PAGE** (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου
- ❖ **PAF** (*Platelet Activating Factor*), Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
- ❖ **PAF-AcH** (*PAF-acetylhydrolase*), Ακετυλυδρολάση του PAF
- ❖ **PAFR** (*Platelet Activating Factor Receptor*), Υποδοχέας του PAF
- ❖ **PaO<sub>2</sub>**, Μερική πίεση οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα
- ❖ **PAPC**, 1-Παλμιτούλο-2-αραχιδονυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη
- ❖ **pBPB** (*para-bromophenacylbromide*), παρα-βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο
- ❖ **PC** (*Phosphatidylcholine*), Φωσφατιδυλοχολίνη
- ❖ **PE** (*Phosphatidylethanolamine*), Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
- ❖ **PEEP** (*Positive End Expiratory Pressure*), Θετική τελοεκπνευστική πίεση
- ❖ **PG** (*Phosphatidylglycerol*), Φωσφατιδυλογλυκερόλη
- ❖ **PGD<sub>2</sub>** (*Prostaglandin D<sub>2</sub>*), Προσταγλαδίνη D<sub>2</sub>
- ❖ **PGE<sub>2</sub>** (*Prostaglandin E<sub>2</sub>*), Προσταγλαδίνη E<sub>2</sub>
- ❖ **PI** (*Phosphatidylinositol*), Φωσφατιδυλοϊνσιτόλη
- ❖ **PKA** (*Protein Kinase A*), Πρωτεϊνική κινάση A
- ❖ **PKC** (*Protein Kinase C*), Πρωτεϊνική κινάση C
- ❖ **PMA** (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*), Οξικός εστέρας της μυριστυλο-φορβόλης
- ❖ **PIP<sub>2</sub>** (*Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*), Διφωσφορική ινσιτόλη
- ❖ **PLA<sub>2</sub>** (*Phospholipase A<sub>2</sub>*), Φωσφολιπάση A<sub>2</sub>
- ❖ **PLC** (*Phospholipase C*), Φωσφολιπάση C
- ❖ **PLD** (*Phospholipase D*), Φωσφολιπάση D
- ❖ **PMSF** (*Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride*), Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο



# 1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ -

ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ



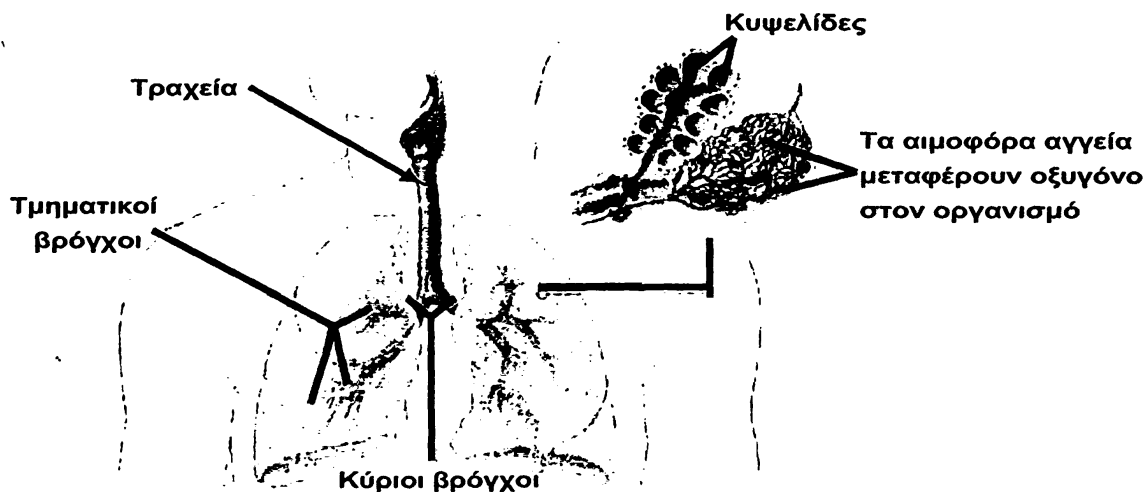


# ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ

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

Ο λάρυγγας προς τα κάτω συνεχίζεται με την τραχεία που είναι ένας σωλήνας μήκους 10 cm. Στο κάτω άκρο της η τραχεία χωρίζεται σε δύο κλάδους, τον αριστερό και δεξιό (Σχήμα 1). Κάθε βρόγχος μπαίνει στο σύστοιχο πνεύμονα από την πύλη (είναι το σημείο από το οποίο μπαίνουν στον πνεύμονα ο βρόγχος και η πνευμονική αρτηρία και βγαίνουν οι πνευμονικές φλέβες).

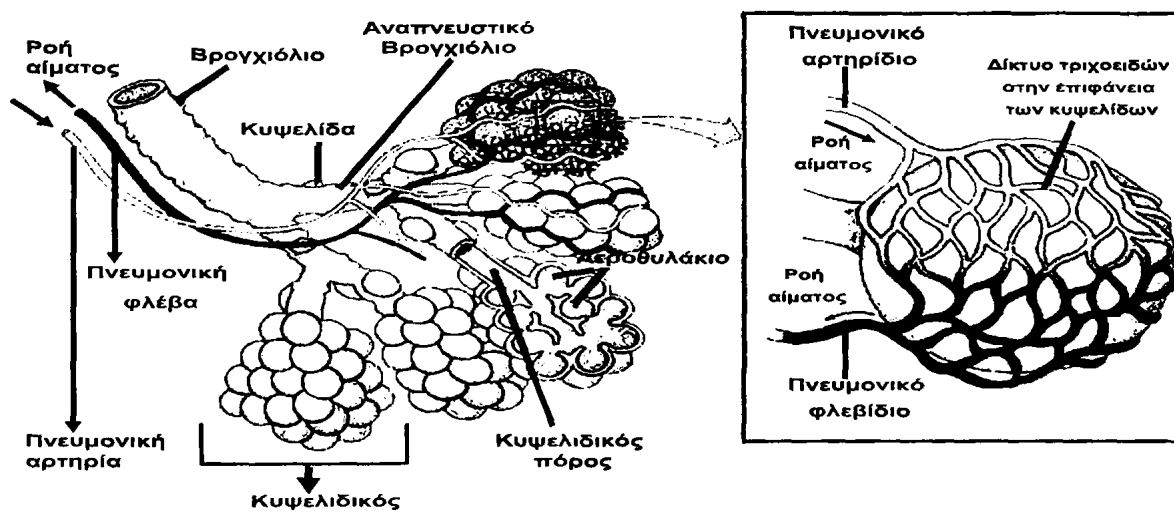


**Σχήμα 1.** Όταν παίρνουμε μία αναπνοή, ο αέρας ταξιδεύει μέσα από ένα συνεχώς διακλαδιζόμενο σύστημα αγωγών από την τραχεία στους βρόγχους και τελικά σε μικροσκοπικούς ασκούς, τις κυψελίδες. Στη συνέχεια ο αέρας απορροφάται από ένα σύστημα μικροσκοπικών τριχοειδών αγγείων και μεταφέρεται στον οργανισμό.

Ο βρόγχος, αφού μπει στο σύστοιχο πνεύμονα διαιρείται, όπως τα κλαδιά ενός δένδρου (βρογχικό δένδρο), σε μικρότερους κλάδους οι οποίοι όταν αποκτήσουν διάμετρο 1 mm,

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

καλούνται βρογχιόλια. Κάθε βρογχιόλιο συνεχίζει να διακλαδίζεται και οι τελικές διακλαδώσεις του εμφανίζουν στα τοιχώματά τους μικρά εκκολπώματα που λέγονται κυψελίδες. Οι διακλαδώσεις αυτές επειδή έχουν κάποια αναπνευστική λειτουργία, εξαιτίας των κυψελίδων, λέγονται αναπνευστικά βρογχιόλια. Κάθε αναπνευστικό βρογχιόλιο χωρίζεται σε 2-3 μικρούς κλάδους (κυψελωτοί πόροι) και κάθε ένας από αυτούς χωρίζεται σε 2-3 διευρυμένους κλάδους τα αεροθυλάκια. Στο τοίχωμα των κυψελωτών πόρων και των αεροθυλακίων υπάρχουν πολλές κυψελίδες. Οι κυψελίδες περιβάλλονται από πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων και σε αυτές γίνεται η ανταλλαγή των αερίων κατά την εισπνοή και την εκπνοή (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2.** Οι κυψελίδες περιβάλλονται από πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων. Η διάμετρος κάθε τριχοειδούς αγγείου στην απόληξή του είναι περίπου όση και ενός ερυθροκυττάρου.

Οι κυψελίδες αποτελούνται από τη βασική μεμβράνη και από δύο είδη κυττάρων τα τύπου I, που είναι και τα πολυπληθέστερα και τα τύπου II. Τα κύτταρα τύπου II (ATII) είναι λιγότερα (αποτελούν μόλις το 3 %) και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι περιέχουν μικρά σωμάτια, τα στιβαδωτά σωμάτια (Lamellar Bodies, LB). Τα σωμάτια αυτά εμπλέκονται στην παραγωγή, αποθήκευση και έκκριση του επιφανειοδραστικού υλικού που ονομάζεται επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (lung surfactant).

### Βασική λειτουργία των πνευμόνων

Η βασική λειτουργία των πνευμόνων είναι η ανταλλαγή του οξυγόνου ( $O_2$ , πρόσληψη) και του διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ , αποβολή) μεταξύ του αίματος, των πνευμονικών τριχοειδών και του κυψελιδικού αέρα μέσω της τριχοειδικής μεμβράνης, μιας διαχωριστικής

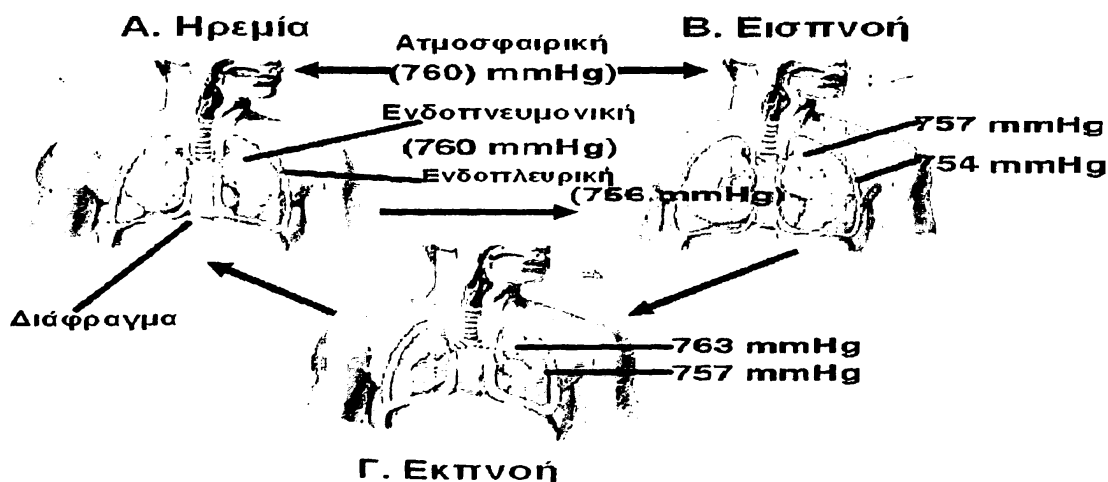
## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

μεμβράνης μεταξύ του κυψελιδικού χώρου και του αίματος. Η επιτέλεση αυτή της λειτουργίας απαιτεί, εκτός των άλλων, τη μετακίνηση μεγάλων όγκων αέρα από το περιβάλλον προς τις κυψελίδες και αντίθετα. Η μετακίνηση αυτή γίνεται μέσω του συστήματος των αεραγωγών που αρχίζει από τη μύτη και το στόμα, συνεχίζεται με το φάρυγγα, το λάρυγγα, τους αεραγωγούς μεγαλύτερης διαμέτρου (τραχεία 2 cm) και φθάνει σε αεραγωγούς πολύ μικρής διαμέτρου (βρογχιόλια <2 mm).

### Μετακίνηση του αέρα

Ο αέρας μετακινείται προς τους πνεύμονες επειδή η πίεση στις κυψελίδες και τους κυψελιδικούς σάκους γίνεται αρνητική σε σχέση με την ατμοσφαιρική (σημειώνεται ότι ως αρνητική πίεση θεωρείται κάθε πίεση μικρότερη της ατμοσφαιρικής, δηλαδή <760 mm Hg). Η διαφορά πίεσης παράγεται από τη σύσπαση των εισπνευστικών μυών (διάφραγμα και μεσοπλευρικοί μύες) που διατείνει το θώρακα και κατά συνέπεια τους πνεύμονες, με αποτέλεσμα τη μείωση της κυψελιδικής πίεσης. Στο τέλος της εισπνοής, οι αναπνευστικοί μύες χαλαρώνουν με συνέπεια ο θώρακας και οι πνεύμονες να επανέρχονται σε θέση ηρεμίας.

Στην εκπνοή αέρας βγαίνει από τους πνεύμονες επειδή η κυψελιδική πίεση για μικρό χρονικό διάστημα γίνεται μεγαλύτερη από την ατμοσφαιρική. Στην ήρεμη αναπνοή γίνεται ενεργητική σύσπαση των εισπνευστικών μυών κατά την εκπνοή. Κατά τη βίαιη ή εργώδη αναπνοή επιπλέον συσπώνται οι επικουρικοί αναπνευστικοί μύες. Οι κοιλιακοί μύες αυξάνουν την ενδοκοιλιακή πίεση η οποία ωθεί προς τα πάνω το διάφραγμα και επιταχύνουν την εκπνοή (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3.** Τιμές πιέσεων κατά την αναπνοή. Ο αέρας κατευθύνεται στους πνεύμονες και με βάση το νόμο των Boyle & Marriott το γινόμενο της πίεσης και του όγκου είναι σταθερό για μία ισόθερμη διαδικασία.



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

### Η διαχωριστική μεμβράνη αίματος –αερίων

Το  $O_2$  και το  $CO_2$  κινούνται μεταξύ του ατμοσφαιρικού αέρα και του αίματος με απλή διάχυση, μετακινούνται δηλαδή από μία περιοχή με υψηλή μερική πίεση προς μία περιοχή με χαμηλότερη μερική πίεση, όπως ακριβώς συμβαίνει και με το νερό που ρέει από την υψηλότερη στη χαμηλότερη στάθμη. Σύμφωνα με το νόμο του Fick ( $J=-εΔc$ ), το ποσό του αερίου που διακινείται μέσα από μία ιστική μεμβράνη είναι ανάλογο προς το εμβαδόν της επιφάνειας της μεμβράνης αυτής και αντιστρόφως ανάλογο προς το πάχος της. Η διαχωριστική μεμβράνη μεταξύ του αίματος και των αερίων είναι εξαιρετικά λεπτή και καταλαμβάνει εμβαδόν 50 έως 100  $m^2$ . Το γεγονός αυτό την καθιστά εξαιρετικά κατάλληλη για τη λειτουργία της ανταλλαγής των αερίων.

Το τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα αποτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, τα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων και τη βασική μεμβράνη μεταξύ των τριχοειδών και των κυψελίδων. Η λεπτότητα του τριχοειδοκυψελιδικού τοιχώματος διευκολύνει την εύκολη διάχυση των αναπνευστικών αερίων μεταξύ αίματος και κυψελιδικού αέρα. Το πάχος του τριχοειδοκυψελιδικού τοιχώματος δεν είναι το ίδιο σε όλη του την έκταση. Στις περιοχές που είναι παχύτερο περιέχει περισσότερο κολλαγόνο και ελάχιστες ινοβλάστες. Μερικές απ' αυτές περιέχουν ακτινομουσίνη και γι' αυτό εμφανίζουν συσταλτική ικανότητα.

*Τίθεται όμως το ερώτημα πώς καθίσταται δυνατή η παρουσία μιας τόσο μεγάλης επιφάνειας για τη διάχυση των αερίων μέσα στον περιορισμένο χώρο της θωρακικής κοιλότητας; Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαπλοκή πολλών μικρών αιμοφόρων αγγείων (τριχοειδών) γύρω από ένα τεράστιο αριθμό μικρών αερόσακων που ονομάσαμε κυψελίδες. Οι πνεύμονες του ανθρώπου περιέχουν 300 εκατομμύρια κυψελίδες που η κάθε μία έχει διάμετρο από 0.1 έως 0.5 mm. Το τοίχωμα κάθε κυψελίδας επικοινωνεί με το τοίχωμα των παρακείμενων. Όταν μία κυψελίδα αυξάνει σε μέγεθος, αυξάνει το μέγεθος των παρακείμενων λόγω της επικοινωνίας τους. Η αλληλεπίδραση αυτή λέγεται και αλληλεξάρτηση και συνεισφέρει στη σταθερότητα και ομοιογένεια της πνευμονικής έκπτυξης.*

Αν οι κυψελίδες είχαν σχήμα σφαιρικό –το σχήμα κάθε κυψελίδας δεν είναι σφαιρικό αλλά πολυεδρικό και δεν είναι όλη η κυψελιδική επιφάνεια διαθέσιμη για τη διάχυση των αερίων- θα καταλάμβαναν συνολική επιφάνεια 85  $m^2$  και θα είχαν ολικό όγκο 4 λίτρων. Η ύπαρξη αυτής της μεγάλης επιφάνειας, που διευκολύνει σημαντικά τη διάχυση οφείλεται στη διαίρεση του πνευμονικού παρεγχύματος σε εκατομμύρια μικρές λειτουργικές μονάδες (κυψελίδες). Τα αέρια μεταφέρονται προς τη μία επιφάνεια της διαχωριστικής μεμβράνης διαμέσου των αεραγωγών, ενώ το αίμα μεταφέρεται προς την απέναντι επιφάνεια με τα αιμοφόρα αγγεία.



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

### Η σταθερότητα των κυψελίδων

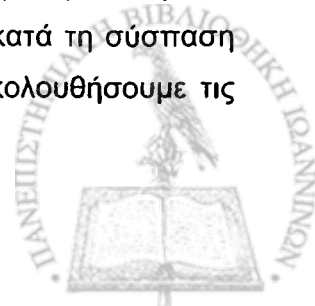
Αναφέρθηκε ότι οι πνεύμονες μπορεί να θεωρηθούν ως το άθροισμα 300 εκατομμυρίων μικρών φύσαλιδων που η κάθε μία έχει διάμετρο από 0.1 έως 0.5 mm. Μία τέτοια κατασκευή είναι από τη φύση της ασταθής λόγω της επιφανειακής τάσης του υγρού που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των κυψελίδων, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται ισχυρές δυνάμεις οι οποίες τείνουν να προκαλέσουν τη σύμπτωση των τοιχωμάτων τους. Ευτυχώς όμως, που μερικά από τα κύτταρα του εσωτερικού τοιχώματος των κυψελίδων εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα (surfactant) ο οποίος ελαττώνει δραστικά την επιφανειακή τάση στην εσωτερική επιφάνεια των κυψελίδων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση της σταθερότητας των κυψελίδων αν και η σύμπτωση των πολύ μικρών κυψελίδων είναι ένα δυνητικό πρόβλημα που συχνά εμφανίζεται σε παθολογικές καταστάσεις.

## ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ

### Φυσιολογική αναπνοή

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

1. **Ελαστικότητα.** Ελαστικότητα πνευμόνων και θωρακικών τοιχωμάτων.
2. **Αντίσταση.** Αντίσταση των αεραγωγών στη ροή αέρα μέσω αυτών.
3. **Αντίσταση των ιστών του πνεύμονα και του θωρακικού κλωβού.** Δηλαδή την αντίσταση στην παραμόρφωση των πνευμόνων του θωρακικού κλωβού και των μορίων της κοιλιάς.
4. **Αδράνεια του συστήματος.** Το εύρος των αναπνευστικών κινήσεων και το επίπεδο ισορροπίας του συστήματος (θώρακας-πνεύμονας) στο τέλος της εκπνοής (ο όγκος των πνευμόνων στο τέλος μιας φυσιολογικής ήρεμης εκπνοής, Functional Residual Capacity, FRC) καθορίζονται από τη σχέση που υπάρχει μεταξύ διατασιμότητας (compliance) του θωρακικού τοιχώματος και του πνεύμονα, και της πίεσης που παράγεται κατά τη σύσπαση των εισπνευστικών μυών. Τα προηγούμενα γίνονται κατανοητά αν παρακολουθήσουμε τις



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ – ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

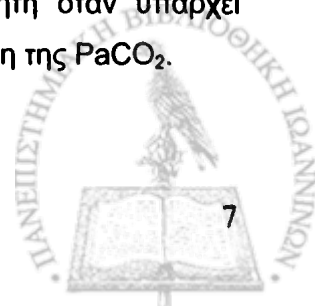
μεταβολές των ελαστικών δυνάμεων του συστήματος (θώρακας-πνεύμονας) στον αναπνευστικό κύκλο. Η πίεση που προκαλεί διάταση του πνεύμονα προέρχεται από σύσπαση των αναπνευστικών μυών. Η διάταση προκαλεί ανάπτυξη δυνάμεως ελαστικής επαναφοράς από τον πνεύμονα που είναι ανάλογη με τη διάτασή του δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του μεγέθους του πνεύμονα τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η αναπτυσσόμενη δύναμη ελαστικής επαναφοράς που θα τείνει να τον επαναφέρει στο μέγεθος που είχε πριν αρχίσει η διεργασία της διάτασής του. Σε οποιαδήποτε φάση του αναπνευστικού κύκλου ακόμη και στο τέλος της ήρεμης εκπνοής και στο τέλος της ήρεμης εισπνοής το μέγεθος του θωρακικού κλωβού είναι μικρότερο του «φυσικού» για αυτό ο θωρακικός κλωβός αναπτύσσει πίεση ελαστικής επαναφοράς με φορά από μέσα προς τα έξω. Δηλαδή η αναπτυσσόμενη πίεση τείνει να τον επαναφέρει στο «φυσικό» του μέγεθος. Στο επίπεδο της ολικής πνευμονικής χωρητικότητας (Total Lung Capacity, TLC<sub>L</sub>) το μέγεθος του θωρακικού κλωβού υπερβαίνει ελάχιστα το «φυσικό» του μέγεθος και τότε αναπτύσσει πίεση ελαστικής επαναφοράς από έξω προς τα μέσα. Η ολική πνευμονική χωρητικότητα (TLC<sub>L</sub>) είναι ο όγκος του αέρα που περιέχεται μέσα στους πνεύμονες στο τέλος της βαθύτατης εισπνοής.

### Μηχανικός αερισμός

Στην ηρεμία ή την άσκηση οι πνεύμονες διατηρούν φυσιολογικά επίπεδα της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα (PaO<sub>2</sub>) και της μερικής πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα (PaCO<sub>2</sub>). Στην κλινική πράξη θεωρείται ότι υπάρχει αναπνευστική ανεπάρκεια όταν σε ηρεμία η PaO<sub>2</sub> < 60 mmHg και η PaCO<sub>2</sub> > 50 mmHg και ενώ ο ασθενής αναπνέει σε συνθήκες δωματίου.

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

1. Για τον έλεγχο της PaCO<sub>2</sub> και την αύξηση της PaO<sub>2</sub>. Σε ασθενή που δεν είναι δυνατόν να γίνει ικανοποιητική οξυγόνωση δίχως επικίνδυνη αύξηση της PaCO<sub>2</sub> ή σε ασθενή που η PaCO<sub>2</sub> είναι υψηλή επειδή δεν αναπνέει, η εφαρμογή μηχανικού αερισμού αυξάνει τον κυψελιδικό αερισμό και μειώνει την PaCO<sub>2</sub>. Αν εφαρμόζεται σωστά ξεκουράζει και τους αναπνευστικούς μυς. Η εφαρμογή μηχανικού αερισμού είναι απαραίτητη όταν υπάρχει κόπωση των αναπνευστικών μυών που μπορεί να ευθύνεται για την αύξηση της PaCO<sub>2</sub>.



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

2. Μηχανικός αερισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την  $PaO_2$  όταν αυτή δεν αυξάνει ικανοποιητικά με τη χορήγηση  $O_2$ . Αυτό γίνεται όταν υπάρχει διαφυγή αέρα (Shunt) από δεξιά προς τα αριστερά. Η συχνότερη αιτία Shunt είναι η ύπαρξη υγρού στις κυψελίδες ή η ύπαρξη κολαψαρισμένων κυψελίδων όπως γίνεται στο πνευμονικό οίδημα. Σε αυτές τις καταστάσεις η εφαρμογή θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (Positive End Expiratory Pressure, PEEP) γίνεται με τον αναπνευστήρα. Κατά την εφαρμογή τέτοιας πίεσης η πίεση στις κυψελίδες διατηρείται μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής συνεχώς. Όταν υπάρχουν κυψελίδες κολαψαρισμένες ή γεμάτες με υγρό η εφαρμογή της PEEP φαίνεται ότι ανοίγει αυτές τις αναπνευστικές μονάδες με αποτέλεσμα να αυξάνει ο τελοεκπνευστικός όγκος αέρα με κατάληξη την αύξηση της  $PaO_2$ . Η εκλογή της ορθής τιμής της θετικής πίεσης είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το αν θα επιτευχθεί τελικά ικανοποιητική  $PaO_2$ . Σπάνια υπερβαίνει τα 10 cm  $H_2O$ .

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

Οι αναπνευστήρες μπορεί να αυξήσουν υπερβολικά τη θετική πίεση με αποτέλεσμα να προκληθεί βλάβη στο πνευμονικό παρέγχυμα. Αν από τη βλάβη προκληθεί ρήξη τότε ο αέρας συσσωρεύεται μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα (πνευμονοθώρακας) ή μέσα στο μεσοθωράκιο. Μπορεί από το μεσοθωράκιο να φθάσει υποδερμικά προς το πρόσωπο και το θώρακα και να προκληθεί υποδερμικό εμφύσημα. Η εφαρμογή PEEP αυξάνει τον κίνδυνο ρήξης του πνεύμονα. Επίσης αυξάνει την ενδοϋπεζωκοτική πίεση που αυξάνει την πίεση στη δεξιά κοιλία. Έτσι μειώνεται η διαφορά πίεσης μεταξύ των περιφερικών φλεβών και της δεξιάς καρδιάς με αποτέλεσμα στάση στην περιφέρεια, μείωση της φλεβικής επαναφοράς αίματος και τελική μείωση της καρδιακής παροχής [1,2].



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ



Εικόνα 1. Διασωλήνωση ασθενούς που νοσηλεύεται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ).

Ο μηχανικός αερισμός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της βασικής υποστήριξης της αναπνοής στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Ήδη από την αρχή της εφαρμογής του αναγνωρίστηκαν δυνητικές επιπλοκές, όπως αυξημένος κίνδυνος πνευμονίας, διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας, προβλήματα που σχετίζονται με την καταστολή του ασθενούς. Παρά τη σημαντική πρόοδο στην εντατική θεραπεία η θνητότητα των ασθενών στην οξεία πνευμονική βλάβη (Acute Lung Injury, ALI) αλλά κυρίως του συνδρόμου της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) παραμένει υψηλή. Η αρνητική κλινική πορεία αυτών των ασθενών που βρίσκονται σε αναπνευστήρα πιθανολογείται ότι οφείλεται σε βλάβες στον πνεύμονα που ονομάζονται VALI (πνευμονικές βλάβες συνδεόμενες με τον αναπνευστήρα, Ventilator-Associated Lung Injury) και είναι αντίστοιχες των πνευμονικών βλαβών που προκαλούνται πειραματικά σε πειραματόζωα και ονομάζονται VILI (προκαλούμενες από τον αναπνευστήρα πνευμονικές βλάβες, Ventilator Induced Lung Injury). Οι περισσότεροι ασθενείς πεθαίνουν από ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων και όχι από υποξία, όπως θα περίμενε κανείς. Η επικρατέστερη υπόθεση που έχει προταθεί για να εξηγήσει αυτά τα φαινόμενα είναι ότι ο ίδιος ο μηχανικός αερισμός είναι υπεύθυνος όχι μόνο για την επιδείνωση της προϋπάρχουσας πνευμονικής βλάβης, αλλά και για την ανάπτυξη μιας συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS, Systemic Inflammatory Reaction Syndrome) και της ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων (MSOF, MultiSystem Organ Failure) [3]. Η μηχανική αναπνοή πιθανώς μπορεί να δώσει το έναυσμα μιας φλεγμονώδους απόκρισης, η οποία στη συνέχεια ενισχύεται και εξαπλώνεται με τρόπο χαρακτηριστικό για τη μεταγωγή των σημάτων σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα. Ο μηχανικός αερισμός των πνευμόνων αποτελεί ένα *in vivo* μοντέλο μελέτης της μηχανικής διάτασης που θα δούμε στη συνέχεια σε *in vitro* συνθήκες στην εργασία μας.



### ΜΗΧΑΝΙΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

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

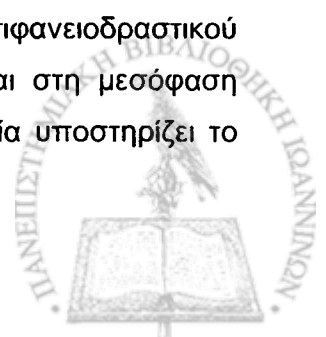
### Δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα

Μετά τη γέννηση, το πνευμονικό αγγειακό σύστημα εμφανίζει πολύ χαμηλές αντιστάσεις. Ο πνεύμονας δέχεται την ίδια ροή αίματος με όλα τα άλλα όργανα. Το αίμα στον πνεύμονα προέρχεται από τις πνευμονικές και βρογχικές αρτηρίες (Σχήμα 2, σελ. 3). Συνήθως, η πίεση στις πνευμονικές αρτηρίες είναι χαμηλότερη από αυτή των άλλων οργάνων. Συνεπώς, τα αιμοφόρα αγγεία υφίστανται την επίδραση διατμηματικών τάσεων (shear stress) από τη ροή του αέρα καθώς και διάτασης λόγω της ροής του αίματος. Οι μεταβολές του όγκου του πνεύμονα που συμβαίνουν κατά την αναπνοή επηρεάζουν το άθροισμα των τάσεων που ασκούνται στο αγγειακό σύστημα του πνεύμονα.

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

### Επιφανειακή τάση

Το κύριο μέρος του στατικού έργου της αναπνοής προέρχεται από την έκπτυξη των κυψελιδικών αερόσακων έναντι των δυνάμεων επιφανειακής τάσης. Η ενέργεια που ασκείται ανά μονάδα επιφάνειας ονομάζεται επιφανειακή τάση και στη συνέχεια στην εργασία μας θα εννοείται η τάση που ασκείται στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα που παράγουν τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, οργανώνονται στη μεσόφαση αέρα-υγρού και επηρεάζουν την επιφανειακή τάση. Η υγρή φάση η οποία υποστηρίζει το



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

λεπτό υμένιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα συχνά αναφέρεται και ως υπόφαση. Ένα λεπτό υμένιο επιφανειοδραστικού παράγοντα πάντα μειώνει την επιφανειακή τάση σε τιμές χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίζονται χωρίς την παρουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης μειώνει την ανισοροπία δυνάμεων, επειδή οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και των μορίων του υγρού είναι μικρότερες από τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του υγρού. Εάν τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα είχαν μεγαλύτερη έλξη για τα μόρια του υγρού από την έλξη μεταξύ τους, τότε αναγκαστικά θα διαλύονταν και εξ' ορισμού δε θα διέθεταν επιφανειοδραστική ικανότητα.

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

$$P=T_0-T$$

όπου

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

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

Παρότι η επιφανειακή τάση και η επιφανειακή πίεση μετρούνται με τις ίδιες μονάδες, έχουν όμως αντίθετη κατεύθυνση. Όταν η επιφανειακή τάση είναι υψηλή, η επιφανειακή πίεση είναι χαμηλή και αντιστρόφως. Οι αριθμητικές τιμές της επιφανειακής πίεσης  $P$  κυμαίνονται μεταξύ 0 και  $T_0$ . Για το νερό ή το φυσιολογικό ορρό, το  $T_0$  είναι περίπου 70 mN/m στους 37 °C. Όταν η  $P=0$  τότε σημαίνει ότι δεν έχει συμβεί καμία μείωση της επιφανειακής τάσης, κατάσταση η οποία υπάρχει σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Σε ακραία κατάσταση η τιμή του  $P=T_0$  και σημαίνει πως η επιφανειακή τάση έχει μειωθεί στο μηδέν από τη μονοστιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η μέγιστη μείωση παρατηρείται όταν η μονοστιβάδα βρίσκεται στην πιο συμπιεσμένη της μορφή, κατά την οποία το πακετάρισμα των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι όσο το δυνατόν πιο συμπαγές και η συγκέντρωση των μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μονοστιβάδα είναι μέγιστη [4].

Επειδή ο κυψελιδικός χώρος των πνευμόνων μοιάζει με φουσαλίδες έχει δοθεί ο ορισμός ότι η επιφανειακή τάση είναι η δύναμη που δρα πάνω σε μία υποθετική γραμμή, μήκους 1

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

cm, στην ελεύθερη επιφάνεια ενός υγρού και ισχύει ο νόμος του Laplace (στη γενική του μορφή):

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

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

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

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

### Μηχανικές καταπονήσεις στους πνεύμονες και στα κύτταρα

Στον πνεύμονα ασκούνται τρία είδη βασικών μηχανικών καταπονήσεων:

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

β) Διατμητικές τάσεις (shear stress). Αυτές προκαλούνται:

- όταν ρευστά, όπως το αίμα ή ο αέρας κινούνται κατά μήκος μιας επιφάνειας με κύτταρα. Τότε δημιουργείται μία τάση παράλληλη προς την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η οποία προκαλεί μια παραμόρφωση κατά την επαφόμενη της. Τέτοιες τάσεις αναπτύσσονται στους αεραγωγούς, από τη ροή αέρα και στα αγγεία λόγω της ροής του αίματος.
- από διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις στις κυψελίδες όταν έχουμε σχηματισμό οιδήματος.

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

γ) Μηχανική παραμόρφωση (mechanical strain). Τροπή αναπτύσσεται όταν ασκηθεί δύναμη σε ελαστικό κύτταρο οπότε προκαλείται **μηχανική διάταση (mechanical stretch)** (εφελκυσμός), ή παραμορφωτική στρέβλωση (*distortion*). Αν και πολλοί υποστηρίζουν ότι οι



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

κυψελίδες τείνουν να αυξήσουν την επιφάνειά τους κατά την εισπνοή ξεδιπλώνοντας τις πτυχώσεις μάλλον παρά εφελκύνοντας τις κυψελίδες, όμως ακόμη και στην περίπτωση αυτή, οι τάσεις που ασκούνται από τον πλευρικό χώρο, μεταφέρονται από τον πνεύμονα στα κυψελιδικά τοιχώματα κατά την ελαστική επαναφορά. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας του ενήλικα (ARDS), έχουμε αύξηση της ελαστικής επαναφοράς, οι δυνάμεις αυτές αυξάνουν και κατά συνέπεια η τροπή μεταβάλλεται.

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

Κατά την αναπνοή, οι τάσεις που προκαλούν την παραμόρφωση είναι πιο έντονες στα κύτταρα του κυψελιδικού τοιχώματος και του επιθηλίου, ενώ οι διατμητικές τάσεις επιδρούν στα τοιχώματα των αγγείων, μειούμενες από το αγγειακό ενδοθήλιο του πνεύμονα προς τα τριχοειδή. Αντίστοιχες δυνάμεις ασκούνται και σε άλλα σημεία εκτός από το ενδοθήλιο των αγγείων, όπως η επίδραση του πλευριτικού υγρού στα κύτταρα του πλευρικού μεσοθηλίου καθώς και της υγρής υπόφασης στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και στα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων [5].

### **Περιγραφή μηχανικών καταπονήσεων στον πνεύμονα**

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

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

### **Είδη «συσκευών» μηχανικής διάταξης**

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



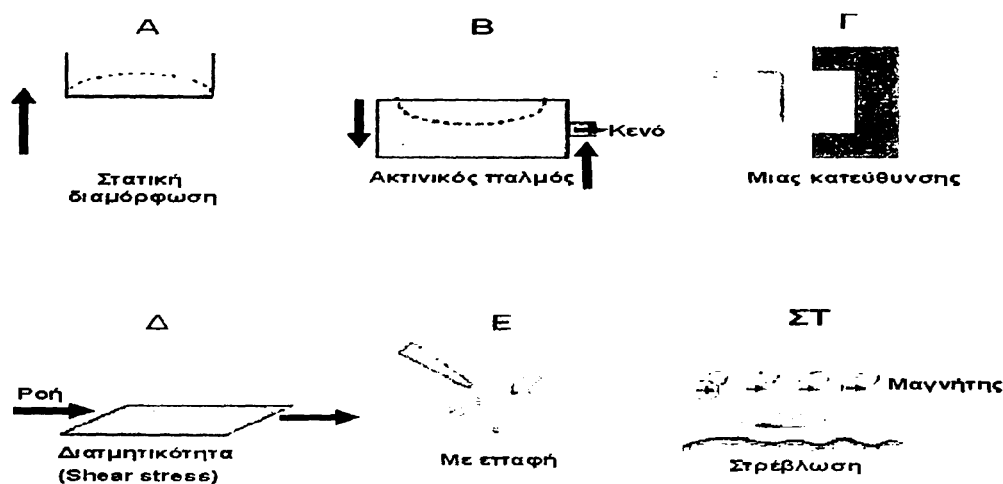
## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

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

### Πειραματικές τεχνικές για την εφαρμογή δυνάμεων σε κύτταρα

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

Στο επόμενο σχήμα περιγράφονται συσκευές που έχουν αναπτυχθεί ή που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε πνευμονοκύτταρα (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4.** Πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται για μηχανική διέγερση πνευμονικών κυττάρων. Α. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη που πιέζεται σε κοίλη επιφάνεια άπασ ή περιοδικά. Β. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη που κυρτώνεται μετά από εφαρμογή κενού. Γ. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ένα σπόγγο (Gelfoam), το ένα άκρο του οποίου προσκολλάται στον πυθμένα του τρυβλίου ενώ το άλλο προσκολλάται σε μία μεταλλική βάση. Μία μαγνητική δύναμη δημιουργείται μέσω υπολογιστή και εφαρμόζεται ιδιαίτερα σε συγκαλλιέργειες κυττάρων. Δ. Εφελκυσμός. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα και εφαρμόζεται ροή ρευστού σε παράλληλο επίπεδο. Η ροή αυτή προκαλεί διατμητική τάση στα κύτταρα (shear stress). Ε. Μία μικροπιπέττα εφαρμόζεται στη μεμβράνη ενός κυττάρου και προκαλείται παραμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης. ΣΤ. Σε υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων συνδέονται

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

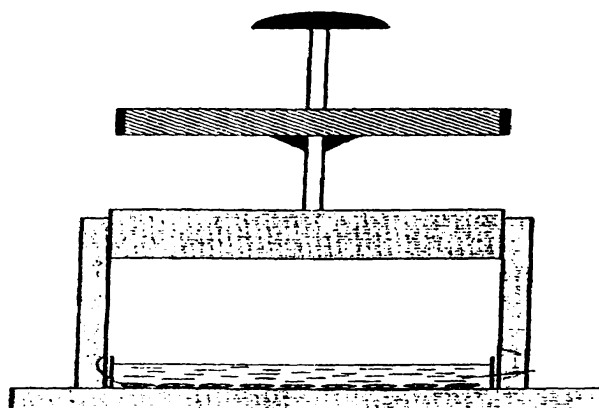
μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με προσδέτες, ενώ τα μικροσφαιρίδια μαγνητίζονται προς μία κατεύθυνση. Στη συνέχεια εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο ασθενέστερο σε διεύθυνση κάθετη προς την προηγούμενη που συστρέφει τα σφαιρίδια με ελεγχόμενη διατμητική τάση [6].

### Μηχανική διάταση

Η διάταση του πνεύμονα και η χαλάρωση κατά την αναπνοή προκαλούν παραμόρφωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, με τη διατμητικότητα (shear stress) ο όγκος του αέρα και η ροή των υγρών επίσης δημιουργούν πιέσεις οι οποίες διατείνουν τα τοιχώματα των αεραγωγών και των αιμοφόρων αγγείων. Ωστόσο, αρκετές συσκευές έχουν σχεδιαστεί να προκαλούν αυτή τη μηχανική διέγερση στα πνευμονικά κύτταρα. Αυτές μπορεί να κατανεμηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το είδος της φυσικής δύναμης όπως για παράδειγμα στατική έναντι κυκλικής διάτασης, μονοαξονική έναντι διαξονικής διάτασης και δύο διαστάσεων έναντι τριών διαστάσεων διάταση.

### Στατική διάταση (Static stretch)

Παρόλο που ο πνεύμονας υποβάλλεται σε κυκλική διάταση με παλμική ροή αέρα και αίματος κατά τη διάρκεια της αναπνοής, η στατική διάταση που γίνεται άπαξ θεωρείται πάρα πολύ απλή για να περιγράψει την *in vivo* διάταση. Έχει το πλεονέκτημα ότι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων, στη διακίνηση ιόντων ασβεστίου και άλλα ενδοκυττάρια σήματα μπορεί να παρατηρηθούν απευθείας στο μικροσκόπιο. Στο **Σχήμα 4A** φαίνεται μία συσκευή στατικής διάτασης όπου γίνεται διαξονική παραμόρφωση (strain) κυττάρων, που καλλιεργούνται σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη, ασκώντας θετική πίεση στον πυθμένα του τρυβλίου [7] που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάταση πνευμονοκυττάρων τύπου II αρουραίου προκειμένου να μελετηθεί η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης, στο **Σχήμα 5** φαίνεται αντίστοιχη συσκευή που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάταση κυττάρων οστού της γνάθου προκειμένου να μελετηθεί η φωσφορυλίωση της υπεροικογένειας των Ras πρωτεϊνών [8].



Σχήμα 5. Η "συσσκευή" που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάταση κυττάρων οστού γνάθου [8].

#### Κυκλική διάταση (Cyclic stretch)

Μία εμπορικά διαθέσιμη συσκευή, η Flexercell, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για να προκαλέσει κυκλική παραμόρφωση πολλών κυττάρων, όπως εμβρυϊκών, οστικών και μυϊκών. Σε αυτή τη συσκευή χρησιμοποιείται αντλία κενού με την οποία προκαλείται παραμόρφωση της ελαστικής μεμβράνης προς τα κάτω (Σχήμα 4B). Η μεμβράνη μπορεί να καλυφθεί με μία σειρά χημικών και εξωκυττάρων υλικών (extracellular matrix, ECM) Η προβλεπόμενη παραμόρφωση απλώνεται σε όλη την ελαστική μεμβράνη της συσκευής [9].

Πολλές είναι οι συσκευές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή διάτασης σε κύτταρα του πνεύμονα [10,11]. Οι Wirtz & Dobbs [7] παρατήρησαν ότι η επιφάνεια των κυττάρων ήταν μικρότερη σε σχέση με την επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων που είχαν δεχθεί την επίδραση στατικής διάτασης. Κατά τη διάταση πιθανόν να έχουν σπάσει δεσμοί μεταξύ των κυττάρων.

Η παραμόρφωση των κυττάρων αλλά και του υποστρώματος όπου έχουν τοποθετηθεί έχει μελετηθεί και συσχετιστεί. Η παραμόρφωση που εφαρμόζεται στα κύτταρα δεν είναι πάντα ισοδύναμη με αυτή που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα και έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 60 % αυτής που εφαρμόζεται στο υπόστρωμα [12]. Το ποσοστό της παραμόρφωσης εξαρτάται από το είδος της διάτασης αλλά και το είδος των κυττάρων. Για παράδειγμα, σε ινοβλάστες -που απομονώθηκαν από καρδιά αρουραίου- που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία και τοποθετήθηκαν σε συσκευή διαξονικής παραμόρφωσης, βρέθηκε ότι η παραμόρφωσή τους συσχετίζεται πολύ καλά με την παραμόρφωση του υποστρώματος [13]. Αντίθετα, σε μία παρόμοια συσκευή ετοιμάστηκαν επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα ενήλικα αρουραίου και διαπιστώθηκε ότι η παραμόρφωση ήταν δυσδιάκριτη σε σχέση με την παραμόρφωση του υποστρώματος όπου είχαν τοποθετηθεί [14].

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

### *Τριαξονική παραμόρφωση κυττάρων*

Είναι γνωστό ότι για να διατηρηθεί ο φαινότυπος πνευμονοκυττάρων σε *in vitro* συνθήκες, κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα, είναι πολύ δύσκολο. Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μικρές πυκνότητες χάνουν την ικανότητά τους να παράγουν επιφανειοδραστικό παράγοντα. Καλλιεργώντας όμως αυτά τα κύτταρα σε σύστημα τριών διαστάσεων μέσα σε σπόγγους τότε αυξάνονται οι πιθανότητες να διατηρηθεί η μορφολογία και ο φαινότυπος των κυττάρων. Σε αυτές τις καλλιέργειες ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται μετουσιωμένο κολλαγόνο για την καλύτερη πρόσφυση των κυττάρων. Τα πνευμονοκύτταρα οργανώνονται σε δομές που μοιάζουν με κυψελίδες, ενώ περιβάλλονται από μεσεγχυματικά κύτταρα. Στις καλλιέργειες αυτές διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μεσεγχυματικών -επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και τα περιοριστικά όρια των κυττάρων και οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι. Τα συστήματα αυτά έχουν αναπτυχθεί και εμπορικά (Bio-Stretch System) (Σχήμα 4Γ) [15].

### *Διατμητικότητα (Shear stress)*

Διατμητικότητα ορίζεται ως η δύναμη τριβής ανά μονάδα επιφάνειας με κατεύθυνση προς την άσκησης ροής ρευστού στη μεσόφαση υγρού-στερεού. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα, οπότε από κάποιο διάυλο διοχετεύεται ρεύμα αέρα που τείνει να παραμορφώσει τα κύτταρα. Επίσης, επιθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα μπορεί να αναπτυχθούν στην επιφάνεια μικροσφαιριδίων [16]. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε στήλη χρωματογραφίας η οποία εκλούεται με κάποιο υγρό σύστημα.

Τα επίπεδα τυπικών διατμητικών τάσεων για τη μελέτη ενδοθηλιακών κυττάρων κυμαίνονται από 1-20 dyn/cm<sup>2</sup> (0.1-2 Pa). Η διατμητικότητα επάγει την απελευθέρωση σημάτων που σχετίζονται με αλλαγές στη μορφολογία και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά και τη ρευστότητα των μεμβρανών.

### *Διατμητικότητα και μηχανική διάταση (Shear stress and mechanical stretch)*

Πάντα τα πνευμονικά αιμοφόρα αγγεία και ο πλευρικός χώρος επηρεάζονται όχι μόνο από τη διατμητικότητα αλλά επίσης και από τη μηχανική διάταση. Ο πνεύμονας εμβρύου δέχεται μία ροή αίματος ισοδύναμη με αυτή ολόκληρης της συστημικής κυκλοφορίας αλλά με μικρότερη αγγειακή αντίσταση. Ωστόσο η σχετική συνεισφορά της διατμητικότητας των υγρών και της μηχανικής παραμόρφωσης στα πνευμονικά αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα πρέπει να είναι διαφορετική από αυτή που υπάρχει σε άλλα όργανα.





## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

### *Συσκευές επαφής και συστροφής*

Επίσης, έχει αναπτυχθεί μία απλή συσκευή που εφαρμόζει πίεση σε μεμονωμένα κύτταρα προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση φυσικών δυνάμεων σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα του αεραγωγού. Μία γυάλινη πιπέττα με διάμετρο άκρου 1 μm τοποθετείται κοντά στη μεμβράνη ενός κυττάρου με τη βοήθεια ενός μικροχειριστή. Η πιπέττα ελέγχεται με τη βοήθεια υπολογιστή προκειμένου να γίνει καταστροφή της μεμβράνης (Σχήμα 4Ε). Αυτή η συσκευή έχει ιδιαίτερα χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η συσταλτή ενεργότητα ανθρώπινων αναπνευστικών λείων μυϊκών κυττάρων [17].

### *Εφαρμογή μαγνητικής δύναμης*

Οι μαγνήτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή είτε γραμμικής δύναμης (Εικόνα 2) ή ζεύγους συστροφής (Σχήμα 4ΣΤ). Στην περίπτωση της εφαρμογής ευθύγραμμης δύναμης, η συσκευή κατασκευάζεται με έναν ή περισσότερους ηλεκτρομαγνητικούς πόλους που αποτελούνται από ένα μαγνητικό πυρήνα που περιτυλίγεται με σύρματα. Όταν το ρεύμα περάσει τα σύρματα οι πόλοι μαγνητίζονται και μικρά σφαιρικά μαγνητικά σωματίδια προσδένονται στους πόλους [18].



**Εικόνα 2.** Μαγνητική παγίδα -όπου ασκείται δύναμη σε κύτταρα- και αποτελείται από έναν ηλεκτρομαγνήτη με μία μυτερή άκρη που ελέγχεται με μικροχειριστή [18].

### *Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μηχανική διέγερση των κυττάρων*

Τα κύτταρα δέχονται την υδροστατική πίεση με διάφορους τρόπους και ο πιο απλός είναι να χρησιμοποιηθεί πεπιεσμένος αέρας ή στήλη με υγρό υπεράνω των κυττάρων που πρόκειται να διεγερθούν. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πηκτώματα ή ιστούς και συμπιέζονται με τη βοήθεια πιστονιών που έχουν συνδεθεί με μηχανές. Οι τεχνικές αυτές βρίσκουν εφαρμογή στη μελέτη της υπέρτασης αρτηριών και της παραμόρφωσης οστεοβλαστών. Επίσης έχει αναφερθεί και η χρήση υπερήχων για τη διέγερση διαφόρων άμεσα πρώιμων αποκρινόμενων γονιδίων τα οποία είναι μηχανοευαίσθητα [19].

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

#### Διαφοροποίηση πνευμονοκυττάρων τύπου II σε τύπου I

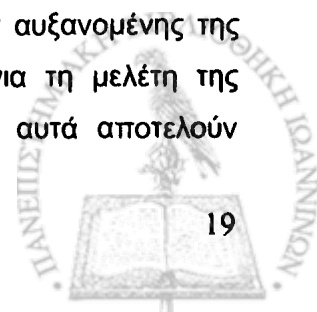
Τα μηχανικά σήματα ρυθμίζουν τη μετάβαση και τη διατήρηση του φαινότυπου των κυττάρων τύπου II σε κύτταρα τύπου I στο κυψελιδικό επιθήλιο. Έτσι έχει αναφερθεί σε εμβρυϊκά εμφυτεύματα πνεύμονα, που έχουν προέλθει από ζώο που έχει διασωληνωθεί, μία μείωση του αριθμού των κυττάρων τύπου II που οφείλεται σε φαινόμενα διαφοροποίησης των κυττάρων τύπου II σε τύπου I. Επίσης, σε *in vitro* συνθήκες οι Gutierrez et al έδειξαν ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II αρουραίου η εφαρμογή μηχανικής διάτασης για 18 ώρες έδειξε μία αύξηση στην έκφραση δεικτών των κυττάρων τύπου I και μία αντίστοιχη μείωση των κυττάρων τύπου II [20].

#### Πολλαπλασιασμός

Η μηχανική διάταση έχει βρεθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό πνευμονοκυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη της καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς IMR-90, (εμβρυϊκοί ινοβλάστες από πνεύμονα ανθρώπου) αυξήθηκε μετά από εφαρμογή κυκλικής διάτασης [21]. Σε *in vivo* συνθήκες για την επίδραση της διάτασης στον πολλαπλασιασμό κυττάρων τύπου II θα πρέπει να συμπεριληφθούν επιπλέον και παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του πνεύμονα. Συγκεκριμένα θα πρέπει να επισημαίνονται διάφοροι παράγοντες όπως οι ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες καθώς επίσης και η αλληλεπίδραση των κυττάρων τύπου II με άλλα είδη κυττάρων. Για να βρεθούν οι μεσεγχυματικές-επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις, απομονωμένα εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες υπεβλήθησαν σε μηχανική διάταση το καθένα χωριστά ή σε συγκαλλιέργειες. Η παραμόρφωση αύξησε τη σύνθεση του DNA και στα δύο είδη κυττάρων [22].

#### Τριχοειδοκυψελιδική διαπερατότητα κυττάρων πνεύμονα

Η διαπερατότητα των πνευμονικών ενδοθηλιακών κυττάρων είναι διαδικασία αυστηρά ελεγχόμενη. Για να μελετηθεί η επίδραση διατμητικών τάσεων σε αρτηριακά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα βοός, έγινε καλλιέργεια σε διαπερατά μικροσφαιρίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε στήλες. Το μέγεθος της διατμητικής τάσης ρυθμιζόταν από τη ροή υγρού έκλουσης. Παρατηρήθηκε ότι η διαπερατότητα των κυττάρων αυξανόταν αυξανόμενης της ροής αντιστρεπτά. Αντίστοιχη πειραματική διάταξη εφαρμόστηκε και για τη μελέτη της επίδρασης διατμητικών τάσεων σε μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

φραγμό μεταξύ του πνεύμονα και των γύρω υγρών και ιστών. Υπόκεινται λοιπόν σε σημαντική καταπόνηση κατά την αναπνοή, οπότε διατείνονται και συρρικνώνονται κυκλικά. Κατά τήν κίνηση αυτή, ορισμένες περιοχές των σπλαχνικών πλευρών διολισθαίνουν έναντι των πλευρικών, που βρίσκονται στο στέρνο. Οι τάσεις λοιπόν που ασκούνται είναι διατμητικές, τα δε μεσοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται σ' αυτές.

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

Η διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι μεγάλης σημασίας. Έχουν περιγραφεί μηχανισμοί που βοηθούν στη διατήρηση της τάσης της μεμβράνης των παραμορφωμένων κυττάρων κάτω από τα επίπεδα που οδηγούν σε λύση. Μελέτες σε πνευμονοκύτταρα τύπου II (ATII) έχουν δείξει ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης οδηγεί σε αύξηση της πλασματικής μεμβράνης για τη διατήρηση της ακεραιότητάς της και την εξασφάλιση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την παραγωγή ενέργειας και αναστέλλεται από το κρύο, τα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης και από πιθανή βλάβη στο σύστημα διόρθωσης του κυτταροσκελετού [3].

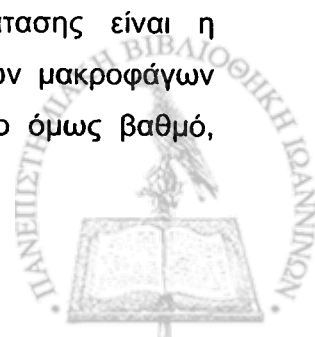
### **Απόπτωση**

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II υφίστανται απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης του πνεύμονα, διαδικασία που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του φυσιολογικού ρυθμού αναπλήρωσης των κυττάρων. Επίσης, η απόπτωση εκκινείται από μηχανικές δυνάμεις σε αρκετά διαφορετικά είδη κυττάρων και σε ιστούς. Η κυκλική διάταση έχει αποδειχθεί ότι επάγει αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα τύπου II λόγω απόπτωσης. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που μετράται με την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάταση επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, κύριων δεικτών της απόπτωσης, στα κύτταρα τύπου II [23].

### **Φλεγμονώδεις διαβιβαστές**

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

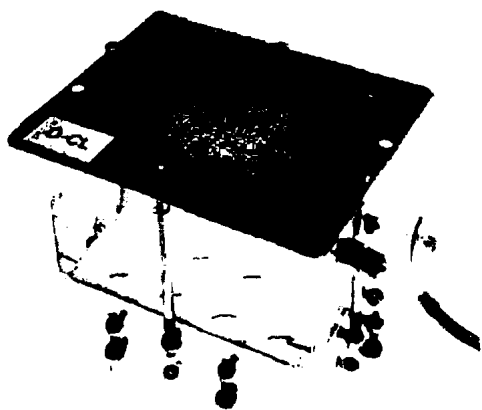
Φλεγμονώδεις παράγοντες που παράγονται σε απόκριση της διάτασης είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), οι προστακυκλίνες και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (Macrophage Inflammatory Protein-2, MIP-2). Επιπρόσθετα, σε μικρότερο όμως βαθμό,



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

παράγονται ο ογκοκρωτικός παράγοντας  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), η IL-1 $\beta$ , η IL-6 και οι αποικιοδιεγερτικοί παράγοντες που είναι γνωστό ότι εκκρίνουν τα κύτταρα τύπου II [23].

Ενδεικτικά οι Pugin et al ανέπτυξαν ένα *in vitro* μοντέλο (Εικόνα 3) στο οποίο απομονωμένα πνευμονοκύτταρα (κυψελιδικά μακροφάγα) υπεβλήθησαν σε συνεχή κυκλική διάταση σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του μηχανικού αερισμού. Συγκεκριμένα σε ένα μοντέλο τεχνητού πνεύμονα, το οποίο αποτελείται από μία διατατή πλαστική μεμβράνη, καλλιεργήθηκαν μακροφάγα προκαλώντας αύξηση 12 % της επιφάνειας των κυττάρων και 7 % επιμήκυνση της αρχικής διαμέτρου τους (Εικόνα 4). Χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά μακροφάγα επειδή είναι υπεύθυνα για την παραγωγή φλεγμονωδών διαβιβαστών όπως της IL-8, IL-6, της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (matrix metalloproteinase-9). Οι παράγοντες αυτοί μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Επιπλέον, σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες βρέθηκε ενεργοποιημένος και ο παράγοντας μεταγραφής κΒ (NF-κΒ). Επιπλέον όταν τα κυψελιδικά μακροφάγα -που απομονώθηκαν από άνθρωπο- προεπώαστηκαν για 2 ώρες με το κορτικοστεροειδές δεξαμεθαζόνη τότε παρεμποδίστηκε η παραγωγή της IL-8 και του TNF- $\alpha$ . Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και κυτταρικές σειρές -όπως η σειρά A549- και ινοβλάστες και βρέθηκε μία πολύ μικρή παραγωγή της IL-8 [24].



**Εικόνα 3.** «Πλαστικός πνεύμονας» όπου τα πνευμονοκύτταρα υπεβλήθησαν σε μηχανικό αερισμό [24].



**Εικόνα 4.** Φωτογραφία που λήφθηκε από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (μεγέθυνση x32) κυψελιδικού μακροφάγου που είχε τοποθετηθεί στον «πλαστικό πνεύμονα» και έχει δεχθεί πίεση 60 cm H<sub>2</sub>O (=44.1 mm Hg). Η επιμήκυνση του κυττάρου ήταν 5.7 %, ενώ με μπλε γραμμή διακρίνεται η διάμετρος του κυττάρου μετά την άσκηση πίεσης [24].

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

Τέλος, σε άλλη εργασία σε *in vivo* συνθήκες σε 17 ασθενείς που έπασχαν από ARDS βρέθηκε ότι η μείωση της ελαστικότητας του πνεύμονα μετά από εφαρμογή πίεσης 0 και 10 cm H<sub>2</sub>O συσχετίστηκε με βιολογικούς δείκτες αποικοδόμησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα και αποικοδόμησης του κολλαγόνου του πνεύμονα [25].

### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί δέχονται την επίδραση μηχανικών δυνάμεων ξεκινώντας από τις μικρές δυνάμεις του υγρού σε ένα βακτήριο μέχρι τις μεγάλες δυνάμεις στο ανθρώπινο γόνατο κατά τη διάρκεια της ορειβασίας. Η διαδικασία της μετατροπής φυσικών δυνάμεων σε βιοχημικά σήματα και η ολοκλήρωση αυτών των σημάτων σε κυτταρικές αποκρίσεις ονομάζεται *μεταγωγή μηχανικού σήματος*. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα μετατρέπουν μηχανικά σήματα σε βιοχημικά παραμένει απροσδιόριστος και κανένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος από μόνο του δε μπορεί να ρυθμίζει ολόκληρη τη διαδικασία της μεταγωγής μηχανικού σήματος. Ο μηχανισμός μάλλον αντιπροσωπεύεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιμέρους οδών μεταγωγής σήματος παρά από τη σύζευξη ενός μηχανικού-βιοχημικού σήματος του κάθε μονοπατιού ξεχωριστά.

Μέχρι σήμερα δεν είναι ακόμη κατανοητή πλήρως η διαδικασία της μεταγωγής μηχανικού σήματος ώστε να προβλεφθούν κυτταρικές αποκρίσεις και για αυτό μελετούνται καθολικές αποκρίσεις σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων μετά τη μηχανική διέγερση. Παρόλο που αρκετές κυτταρικές αποκρίσεις μεταβάλλονται κατά τη διαδικασία της απομόνωσης των κυττάρων και την παρουσία αυξητικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες (για παράδειγμα ο ορρός εμβρύου βοός -FBS- μπορεί από μόνος του να διεγείρει τη μεταγραφή μερικών γονιδίων που ενεργοποιούνται μηχανικά), πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές αποκρίσεις δεν έχουν ερμηνευθεί ακόμη σε καλλιέργειες κυττάρων που έχουν δεχθεί μηχανική διέγερση. Έτσι οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται σε κύτταρα των οστών, του δέρματος και των πνευμόνων όπου οι μηχανικές δυνάμεις είναι απαραίτητες για την επιτέλεση των κύριων λειτουργιών τους.

Συγκεκριμένα η διάταση αλλά και τα άλλα είδη μηχανικών τάσεων που σχολιάσαμε, διεγείρουν κυτταρικές αποκρίσεις μέσω μηχανισμών μεταγωγής σήματος οι οποίοι λειτουργούν κατά τον ίδιο τρόπο με τα χημικά σήματα. Έτσι η ενεργοποίηση και η αλληλεπίδραση ποικίλων ενδοκυττάρων σημάτων περιλαμβάνουν 1) την παραγωγή δευτέρων αγγελιοφόρων, 2) την ενεργοποίηση ειδικών πρωτεϊνικών κινασών, 3) τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων, 4) την ενίσχυση σημάτων μέσω ενζυμικών καταρρακτών και 5) την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Στην περίπτωση



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

πολλών ορμονών και χημικών σημάτων η διέγερση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας συνδέεται με τα προηγούμενα γεγονότα. Όμως στην περίπτωση των μηχανικών σημάτων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο τα προηγούμενα φαινόμενα συνδέονται με ενδοκυττάρια σήματα.

Είναι γνωστό για παράδειγμα ότι η διάταση ενεργοποιεί ιοντικούς διαύλους σε πνευμονοκύτταρα τύπου II. Στην εργασία αυτή έχει διευκρινισθεί, ότι η κυκλική διάταση επάγει τη ροή ιόντων ασβεστίου και διαπιστώθηκε η ευαισθησία στο γαδολίνιο, αναστολέα των ενεργοποιημένων από τη διάταση ιοντικών διαύλων [26].

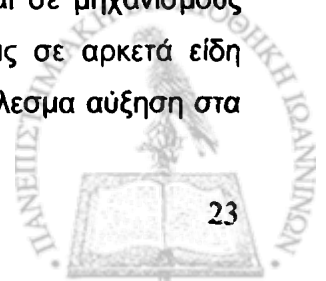
Επιπλέον έχει δειχθεί ότι κατά τη διαστολή του εμβρυϊκού πνεύμονα η όποια αλλαγή στη φύση της εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix, ECM) κατά την καλλιέργεια κυττάρων επηρεάζει την ρύθμιση της έκφρασης στο φαινότυπο των κυττάρων τύπου II και τον πολλαπλασιασμό τους. Στηριζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η εξωκυττάρια ουσία ρυθμίζει τα αποτελέσματα της διάτασης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II *in situ*. Το πώς αυτό λαμβάνει χώρα και ποιος είναι ο ρόλος των ιντεγκρινών, τα διαμεμβρανικά μόρια προσκόλλησης τα οποία με φυσικό τρόπο συνδέουν την εξωκυττάρια ουσία στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, αποτελεί ένα σημαντικό θέμα [27].

### Πρωτεϊνικές κινάσες

Αρκετές πρωτεϊνικές κινάσες διεγείρονται από την εφαρμογή της διάτασης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Επιπλέον, λόγω μηχανικής διάτασης αποκρίνονται οι πρωτεϊνικές κινάσες A και C (PKA & PKC) και οι κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK). Παρόλο που αρκετά από αυτά τα ένζυμα εμπλέκονται σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών διαδικασιών, η ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί με επαγωγή της απόπτωσης σε πολλές περιπτώσεις.

Συγκεκριμένα, η PKA, εξαρτώμενη από το cAMP, ενεργοποιείται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II λαγού μετά από διαδοχική και μεγάλη σε έκταση παραμόρφωση [28]. Σε οργανοτυπικές καλλιέργειες κυττάρων τύπου II αρουραίου παραμόρφωση κατά 18 % προκαλεί αύξηση στην παραγωγή του cAMP, ενώ παραμόρφωση κατά 5 % δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στα επίπεδα του cAMP και στην ενεργοποίηση της PKA [29], αποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKA στα κύτταρα τύπου II εξαρτάται από το ποσοστό της παραμόρφωσης.

Η PKC είναι επίσης ένα σημαντικό ενζυμικό σύστημα που εμπλέκεται σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος και ενεργοποιείται από τις μηχανικές καταπονήσεις σε αρκετά είδη κυττάρων. Κυκλική περιοδική διάταση σε κύτταρα τύπου II είχε ως αποτέλεσμα αύξηση στα



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

ενδοκυττάρια επίπεδα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_3$ ) και της διακυλογλυκερόλης (DAG), δύο πολύ σημαντικών δευτέρων αγγελιοφόρων που ενεργοποιούν την PKC [27]. Ακόμη έχει βρεθεί για την PKC ότι μετατοπίζεται η ανενεργό μορφή της από το κυτοσόλιο στην ενεργό μορφή της στη μεμβράνη σε κύτταρα τύπου II και επιπλέον μπορεί να παραμείνει σε αυτή την κατάσταση για 48 ώρες εφαρμογής διάτασης. Σε αυτή τη μελέτη, η διάταση ενεργοποιεί την PKC όπως επίσης και τη σύνθεση του DNA, αποδεικνύοντας ότι αυτά τα φαινόμενα είναι αλληλοσυνδεόμενα μεταξύ τους.

Επιπρόσθετα, με τις προηγούμενες κινάσες, πολλά μέλη της οικογένειας των MAPK ενεργοποιούνται από τη μηχανική διάταση στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Συγκεκριμένα, σε κυτταρική σειρά πνευμονικού επιθηλίου (κυτταρική σειρά H441) η άσκηση μηχανικής τροπής ενεργοποίησε ταχύτατα κινάσες ενεργοποιούμενες από εξωκυττάρια σήματα (ERKs). Περιοδική διάταση κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων προκαλεί ενεργοποίηση των ERK1/2 μέσω G πρωτεϊνών [30]. Επιπλέον, στην κυτταρική σειρά A549 έχει δειχθεί ότι εφαρμογή στατικής μηχανικής διάτασης για 15 min προκάλεσε αύξηση της κυτοσολικής φωσφολιπάσης  $A_2$  (cPLA<sub>2</sub>), αύξηση των ERK1/2 αλλά όχι αύξηση της κινάσης c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) [31].

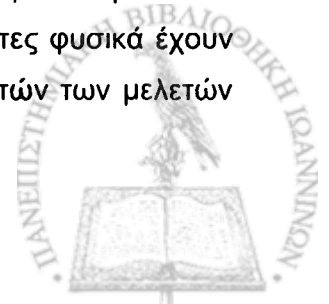
### **Ρύθμιση μηχανοαπόκρισης σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο**

Παρόμοια, η μηχανική σηματοδότηση οδηγεί σε κυτταρική απόκριση σε διάφορα επίπεδα και συγκεκριμένα μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, την πρωτεϊνοσύνθεση, να προκαλεί μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και έκκριση πρωτεϊνών. Κάθε είδος κυτταρικής απόκρισης ρυθμίζεται από διαφορετικές πορείες σε πολλά επίπεδα.

Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο του υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAFR) αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης σε συνθήκες διάτασης. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε το πώς η κυκλική μηχανική διάταση ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα του PAF λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells) που απομονώθηκαν από πνευμονικές αρτηρίες. Διαπιστώθηκε ότι η μηχανική διάταση επάγει την έκφραση του γονιδίου του PAFR και μάλιστα ότι αυτή ρυθμίζεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [32].

### **Μεταβολισμός και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα**

Σε αρκετές *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μεταβάλλεται κατά τη μηχανική αναπνοή. Αυτές οι *in vivo* μελέτες φυσικά έχουν πραγματοποιηθεί και σε πειραματόζωα. Παρόλο που τα αποτελέσματα αυτών των μελετών



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

διαφέρουν από το εκάστοτε πειραματικό μοντέλο, έχει αποδειχθεί ότι τα μεγάλα συσσωματώματα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, που ανακτώνται από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των πειραματόζων, σε συνθήκες μηχανικής αναπνοής με χαμηλή PEEP, προκάλεσαν αυξημένη επιφανειοδραστική τάση και μείωση της ελαστικότητας του πνεύμονα [33]. Περισσότερα όμως για το θέμα αυτό θα δούμε στο 3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΙΤΑΙ ΤΟ ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ

Το κυψελιδικό επιθήλιο αποτελείται από κύτταρα σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπιπέδου (cuboidal), τα κύτταρα τύπου II και τα λεπιδώδη κύτταρα (squamous) τα κύτταρα τύπου I (Σχήμα 6). Τα τύπου II κύτταρα έχουν σχήμα ορθογωνίου παραλληλεπιπέδου διαμέτρου 9 μm. Απαντούν ως μικρές ομάδες στο κυψελιδικό επιθήλιο και χαρακτηρίζονται από μικρολάχνες 0.1 μm. Συνήθως τα AII έχουν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις ίδιες λειτουργίες σε όλα τα θηλαστικά. Στις κύριες λειτουργίες περιλαμβάνεται η σύνθεση, η αποθήκευση και η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επίσης συμμετέχουν στην επανόρθωση του επιθηλίου μετά από βλάβη, στη μεταφορά διαλυτών ουσιών για να μειωθεί ο όγκος του υγρού στην κυψελίδα και ενδεχομένως στην ρύθμιση της σύστασης του κυψελιδικού υγρού.

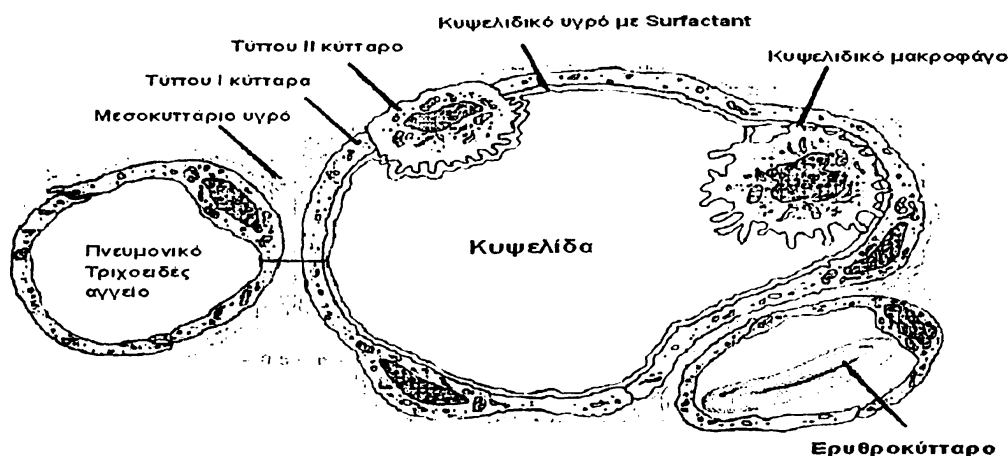
Ένα μοναδικό μορφολογικό χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων είναι η παρουσία μεγάλων στιβαδωτών σωματίων (διαμέτρου 0.2 -2 μm), δομής που οφείλεται στην οργάνωση των φωσφολιπιδίων, και τα οποία αποτελούν το 18-24 % του κυτοπλάσματος. Τα στιβαδωτά σωματίδια αποτελούν τις αποθήκες του νεοσυντιθέμενου επιφανειοδραστικού παράγοντα και έχει αποδειχθεί ότι έχουν παρόμοια σύσταση με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Έτσι περιέχουν σε υψηλό ποσοστό φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), σε μικρότερο ποσοστό φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) [34] και τέλος περιέχουν την πρωτεΐνη SP-A και την πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης SP-B [35]. Επίσης, όπως και στον επιφανειοδραστικό παράγοντα, στα στιβαδωτά σωματίδια έχει αναφερθεί η παρουσία ενζύμων λυσισωμιακής προέλευσης [36].

Το γεγονός ότι τα AII παράγουν επιφανειοδραστικό παράγοντα στηρίζεται κυρίως σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και σε παρατηρήσεις που συσχετίζονται με την ανάπτυξη των κυττάρων. Η μελέτη όμως των φαινομένων της έκκρισης και της παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα παρεμποδίζεται από το διαφορετικό του κυτταρικού πληθυσμού του πνεύμονα και από το πολυσύνθετο των *in vivo* διαδικασιών. Πρωτογενείς καλλιέργειες μίγματος κυττάρων και καλλιέργειες οργάνων βοήθησαν εν μέρει στην επίλυση αυτών των προβλημάτων. Στο πέρασμα των χρόνων βέβαια δημιουργήθηκαν κυτταρικές



## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

σειρές, έχοντας παρόμοια χαρακτηριστικά με τα κύτταρα πρωτογενών καλλιιεργειών, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της παραγωγής και της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα.



Σχήμα 6. Τα κύτταρα που υπάρχουν σε μία κυψελίδα πνεύμονα.

### Κυτταρική σειρά A549

Αναφέρθηκε ότι η κυτταρική σειρά A549 αποτελεί μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II (ATII) [37,38]. Έχει τονιστεί ότι τα A549 αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο σε *in vitro* συνθήκες προκειμένου να μελετηθεί η παραγωγή και η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [39].

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μπορεί να αναπτύσσεται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες και να διατηρεί τα φαινοτυπικά της χαρακτηριστικά της στην καλλιέργεια. Για τη μελέτη της παραγωγής της PC *in vitro* γίνεται επώαση των κυττάρων με [μεθυλο-<sup>3</sup>H] χλωριούχο χολίνη για ορισμένα χρονικά διαστήματα (συνήθως μέχρι 24 ώρες), στη συνέχεια ανάλυση του λιπιδικού περιεχομένου με TLC και τέλος μέτρηση της παραγόμενης PC σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Παράλληλα, για τη μελέτη της έκκρισης επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει αναφερθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως το ιοντοφόρο ασβεστίου A23187 και το οποίο προκάλεσε αύξηση της έκκρισης.

Τα κύτταρα A549 μορφολογικά μοιάζουν με τα ATII τα οποία παραλαμβάνονται από διάφορα θηλαστικά. Τα ευδιάκριτα χαρακτηριστικά των ATII, τα στιβαδωτά σωμάτια, είναι σε μεγάλες ποσότητες στα A549 (Πίνακας 1). Τα κύτταρα είναι πλούσια σε PC αλλά δεν περιέχουν υψηλά ποσοστά σε κορεσμένη PC. Η ανάλυση της % σύστασης των λιπαρών οξέων της μεμβρανικής PC των κυττάρων A549 έδειξε ότι περιέχουν 1.8 % C16:0, 7.7 % C16:1 και 30.8 % C18:1. Για τη PE βρέθηκε ότι περιέχουν 15 % C16:0 και 18.3 % C18:0 [40]. Ωστόσο, η ποσότητα της κορεσμένης PC που παράγεται από τα κύτταρα μπορεί να αυξηθεί

## ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ - ΜΗΧΑΝΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ

με τροποποιήσεις της σύστασης του θρεπτικού υλικού. Σε μελέτη του Smith το 1977 [38] αποδείχθηκε ότι διαφορετικά θρεπτικά υλικά σε καλλιέργειες κυττάρων A549 επηρεάζουν τα επίπεδα της PC.

Πίνακας 1. % σύσταση των λιπιδίων σε κύτταρα A549 και στα LB αυτών [38].

ΣΥΣΤΑΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	ΚΥΤΤΑΡΑ	ΣΤΙΒΑΔΩΤΑ ΣΩΜΑΤΙΑ (LB)
PC	41.3 ± 1.0	55.8 ± 1.5
DPPC (% PC)	16.0	39.0
PE	28.0 ± 0.5	18.7 ± 2.2
Sph	6.3 ± 0.1	3.8 ± 1.5
PI + PS	14.2 ± 0.6	10.5 ± 2.5
PG + Card	5.4 ± 0.3	4.5 ± 0.9
Lyso-bis-PA	2.7 ± 0.5	3.0 ± 0.4
Lyso-PC	2.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2

Ενδιαφέρον ακόμη αποτελεί το γεγονός ότι τα κύτταρα A549 φαίνεται να διαθέτουν έναν υποδοχέα κολλεκτίνης (C1q) για την πρωτεΐνη SP-A, την κύρια πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Δεν έχουν αναφερθεί άλλες μελέτες ή ακόμη η ύπαρξη της ίδιας της πρωτεΐνης SP-A στα κύτταρα A549, τουλάχιστον μέχρι το 1993 [41].

### Άλλες κυτταρικές σειρές

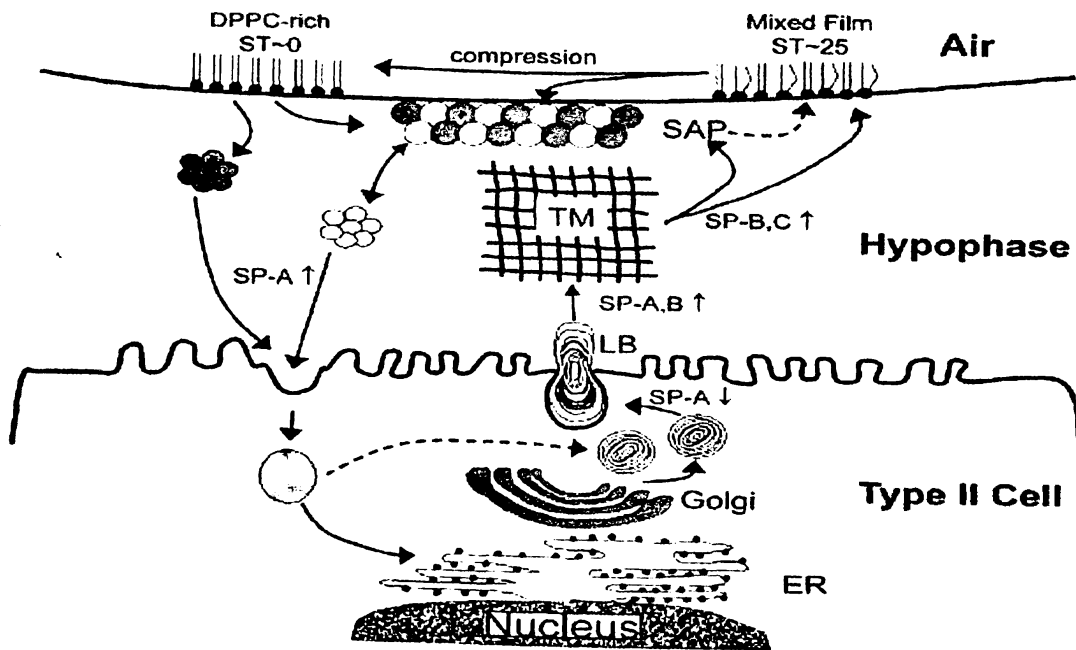
Η κυτταρική σειρά H441 χρησιμοποιείται εκτενώς κυρίως για τη μελέτη πρωτεϊνικών συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα H441 μοιάζουν στη μορφολογία τους με τα κύτταρα Clara ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης SP-B είναι παρόμοια με αυτή των ATII [42]. Στα κύτταρα H441 έχει αναφερθεί η μέτρηση κύριων ενζυμικών ενεργοτήτων (CTP & CPT) που εμπλέκονται στην παραγωγή της PC χωρίς όμως να έχουν μετρηθεί υπό την επίδραση μηχανικής διάτασης ή βητα-μεθαζόνης [43]. Τέλος, οι κυτταρικές σειρές MLE-12 & MLE-15 (Mouse Lung Epithelial Cells) αποτελούν καλά μοντέλα μελέτης των ATII. Σε μελέτες των Mallampalli et al οι προηγούμενες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα και έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν PC σε ποσοστό 60 % των ολικών φωσφολιπιδίων [44], ενώ σε άλλη μελέτη τους έχει μετρηθεί και η ενζυμική ενεργότητα της κυτιδυλοτρανσφεράσης της φωσφοχολίνης (CTP) [45].

Αφού αναφέρθηκε ότι τα ATII χρησιμοποιούνται προκειμένου να μελετηθεί η παραγωγή και η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα ας δούμε στη συνέχεια κάποια στοιχεία για τον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων.

## 2° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

# ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ

# ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (LUNG SURFACTANT)

### Εισαγωγή

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων είναι ένα λιποπρωτεϊνικό μίγμα που καλύπτει το εσωτερικό των κυψελίδων στους πνεύμονες. Συντίθεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (ATII) τα οποία καλύπτουν το 5 % του κυψελιδικού χώρου στον πνεύμονα ενώ ο υπόλοιπος χώρος καλύπτεται από πνευμονοκύτταρα τύπου I [46].

Η κύρια και περισσότερο μελετημένη λειτουργία του είναι η μείωση της επιφανειακής τάσης στις κυψελίδες και να τις προστατεύει από τη σύγκλιση κυρίως στο τέλος της εκπνοής. Επίσης πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μηχανισμούς άμυνας και σε διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες του πνεύμονα. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική λειτουργία του πνεύμονα. Η παρουσία ικανοποιητικής ποσότητας επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αναπνοή αλλά και αντίθετα η διαδικασία της αναπνοής από μόνη της επηρεάζει το σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα [47].

### ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

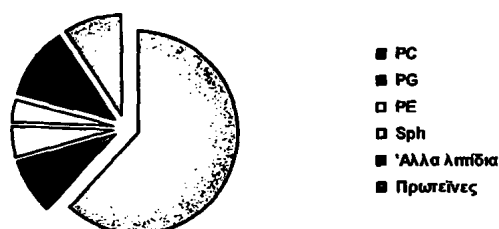
#### Λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας είναι ένα λιποπρωτεϊνικό μίγμα του οποίου η σύσταση φαίνεται στο **Σχήμα 6**. Συγκεκριμένα, αποτελείται κατά 90 % από λιπίδια και το υπόλοιπο 10 % της σύστασης περιλαμβάνει πρωτεΐνες. Υπάρχουν τέσσερα είδη πρωτεϊνών στον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Αυτές είναι η SP-A, SP-D σε ποσοστά 50 και 49 % αντίστοιχα του ποσοστού των πρωτεϊνών και βιοσυντίθενται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι SP-A και οι SP-D είναι μεγάλες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που μπορούν να συνδέονται με τα λιπίδια. Αντίθετα, οι άλλες δύο πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, η SP-B



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

και η SP-C, είναι υδρόφοβες και αποτελούν το υπόλοιπο 1 % των πρωτεϊνών. Τα λιπίδια, από τα οποία το 80 % είναι φωσφολιπίδια, αποτελούν το 90 % του επιφανειοδραστικού παράγοντα και βιοσυντίθενται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο.



Σχήμα 6. Σύσταση επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Από τα ουδέτερα λιπίδια η χοληστερόλη αποτελεί το κυριότερο συστατικό (8 %) ενώ έχει αναφερθεί και η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων και ιδιαίτερα παλμιτικού οξέος. Η ποσότητα των γλυκολιπιδίων είναι πολύ μικρή και η λειτουργία τους δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Το κύριο φωσφολιπίδιο είναι η PC ενώ το ποσοστό της διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνης (DPPC) αποτελεί το 40-50 % ή το 68-70 % της PC όπως έχει αναφερθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες [48].

Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί φαίνεται η % λιπιδική σύσταση του πνεύμονα λαγού (Adachi et al) [49], των πνευμονοκυττάρων τύπου II, καλλιέργειας ινοβλαστών (Mason & Williams) [50] από την κυτταρική σειρά WI-38 και κυψελιδικών μακροφάγων (Kikkawa et al) [51]. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) είναι αμφιτερικά φωσφολιπίδια και έχουν ιδιαίτερα μελετηθεί. Ωστόσο μεταξύ των δύο λιπιδίων υπάρχουν αρκετές διαφορές ως προς τις ιδιότητες και το ρόλο τους. Σε pH=7.4 η PE είναι κυρίως αρνητικά φορτισμένη και μπορεί να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω της ιονίζουσας αμινομάδας που περιέχει [52]. Και τα δύο λιπίδια όμως είναι απαραίτητα και τη λειτουργία του ενός δεν είναι εφικτό να πραγματοποιήσει το άλλο λιπίδιο.

Κύρια φωσφολιπίδια, αρνητικά φορτισμένα, αποτελούν η PG, η φωσφατιδυλοϊννοσιπόλη (PI) και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS).

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Πίνακας 2. % Σύσταση των φωσφολιπιδίων σε πνευμονικό ιστό λαγού και σε πνευμονοκύτταρα.

Φωσφολιπίδιο	% Σύσταση φωσφολιπιδίων					
	Πνευμονικός ιστός			Πνευμονοκύτταρα		
	Εξωκυττάρια	Ενδοκυττάρια	Μικροσωμάτια	ΑΤΙΙ	Μακροφάγα	Ινοβλάστες
PC	82.3	72.9	48.7	71.8	44.3	45.6
Lyso-PC	0.3	0.5	1.5	0.3	-	-
PE	6.1	8.0	19.7	12.1	17.4	27.8
PI	1.8	1.5	5.8	0.4	-	6.3
PS	0.1	3.0	4.8	0.1	-	8.0
PG	7.5	6.8	3.9	10.4	1.6	-
Φωσφορική δις- μονακυλογλυκερόλη	1.1	5.3	8.2	1.3	15.5	8.0
Άλλα λιπίδια	0.1	1.1	4.9	1.8	7.1	1.7

### Ο ρόλος των λιπιδίων

Από τη στιγμή που το υλικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελείται κυρίως από λιπίδια και ειδικότερα από φωσφολιπίδια τότε αρκετές από τις ιδιότητές του οφείλονται στις ιδιότητες των λιπιδίων. Οι μονοστιβάδες των λιπιδίων στη μεσόφαση αέρα-υγρού αποτελούν τη βάση για τη μελέτη του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Οι μονοστιβάδες των λιπιδίων σχηματίζουν διάφορες φάσεις που εξαρτώνται από τη σύστασή τους, τη θερμοκρασία, και την επιφανειοδραστική πίεση ( $P$ ). Η επιφανειοδραστική πίεση εξαρτάται από την επιφανειοδραστική τάση ( $T$ ) στην καθαρή μεσόφαση όπου περιέχεται η μονοστιβάδα των λιπιδίων. Πιστεύεται ότι η συμπίεση και η εξάπλωση του λιπιδικού επιφανειοδραστικού υμενίου στον πνεύμονα λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της αναπνοής (εισπνοή και εκπνοή αντίστοιχα).

### Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG)

Η PG, κορεσμένη και ακόρεστη, έχει ιδιαίτερο ρόλο στον επιφανειοδραστικό παράγοντα από τη στιγμή που η PG δεν απαντάται σε μεγάλα ποσοστά σε άλλες πηγές στα θηλαστικά. Σε σχέση με άλλους ιστούς το ποσοστό της PG στον πνεύμονα είναι πολύ υψηλό: 5-10 % του συνόλου των φωσφολιπιδίων. Όταν η PG είναι σε μικρά ποσοστά τα επίπεδα της PI συνήθως είναι υψηλά και αυτό έχει να κάνει με το γεγονός της λειτουργικής απαίτησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα για ένα όξινο και πιθανώς υδροξυλιωμένο φωσφολιπίδιο, κυρίως κατά την έναρξη της αναπνοής. Έτσι θεωρείται ότι ο δείκτης PG/PI αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης και ωρίμανσης των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Από την άλλη



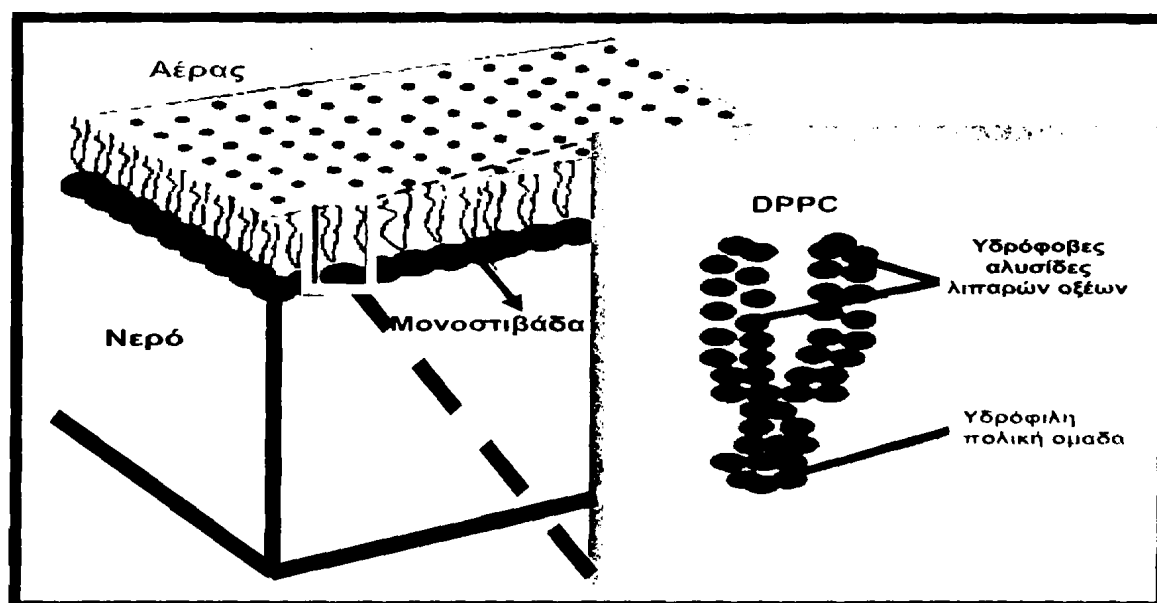
## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

όμως η PG δε φαίνεται να συνεισφέρει ιδιαίτερα στη μείωση της επιφανειακής τάσης σε σχέση με τη PI [53,54].

Ο ρόλος της PG στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι αμφιλεγόμενος. Έχει δείχθει ότι μπορεί να αναδεικνύει τη συσχέτιση των πρωτεϊνών με τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και επιπλέον να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανακύκληση του τελευταίου στο κυψελιδικό επιθήλιο.

### Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και ο ρόλος της στην αναπνοή

Αναφέρθηκε ότι η PC αποτελεί το κύριο συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Οι κορεσμένες ακυλο-αλυσίδες της τοποθετούνται σε ευθεία γραμμή, επιτρέποντας έτσι τη στίβαση των μορίων της DPPC. Η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των αλυσίδων των λιπαρών οξέων και του πολικού άκρου της DPPC είναι 40 nm. Η μεγάλη υδρόφοβη παλμιτική αλυσίδα εκτείνεται πάνω στη μεσόφαση αέρα-υγρού όταν η επιφανειοδραστική περιοχή μειώνεται σε μικρούς όγκους πνεύμονα. Το λιπίδιο αυτό έχει την ικανότητα να μειώνει την επιφανειοδραστική τάση ( $10 \text{ mN/m}^2$ ) σε μικρούς όγκους πνεύμονα [55]. Αντίθετα, μονοστιβάδα από ακόρεστη PC θα επέτρεπε σημαντική επαφή μεταξύ του αέρα και της υγρής φάσης και η επιφανειακή τάση δε θα μειωνόταν επαρκώς.



**Σχήμα 7.** Όταν η επιφανειοδραστική περιοχή μειώνεται σε μικρούς όγκους πνεύμονα, η DPPC σχηματίζει μονοστιβάδα. Η υδρόφιλη πολική κεφαλή κατευθύνεται προς την υδατική φάση ενώ τα υδρόφοβα λιπαρά οξέα προεκτείνονται στον αέριο χώρο. Επειδή τα λιπαρά οξέα είναι κορεσμένα ευθυγραμμίζονται και έτσι πραγματοποιείται η στοιβάση της DPPC. Με πολύ στενή στοιβάση υπάρχει αμοιβαία άπωση των μορίων της DPPC, η οποία μειώνει την επιφανειοδραστική τάση και εμποδίζει τη σύγκλιση των κυψελίδων.

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Από την άλλη, η πολική κεφαλή της χολίνης έχει φορτίο και προσελκύει μόρια νερού στην κυψελιδική υπόφαση. Η πολική κεφαλή εμβαπτίζεται στη υδάτινη υπόφαση, ενώ το υπόλοιπο υδρόφοβο τμήμα του λιπιδίου περνάει στην αέρια φάση τείνοντας να ευθυγραμμιστεί δίπλα σε ένα άλλο μόριο φωσφολιπιδίου. Έτσι μόρια νερού αντικαθίστανται από τη μεσόφαση και η υψηλή επιφανειοδραστική τάση μειώνεται. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της εκπνοής, συμπίεση του φωσφολιπιδικού υμενίου με μείωση της κυψελιδικής περιοχής αυξάνει την ικανότητα μείωσης της επιφανειοδραστικής τάσης. Αυτή η αυξημένη ικανότητα μείωσης της πίεσης αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα ένα φαινόμενο που δεν παρατηρείται στα εμπορικά σκευάσματα surfactant ή άλλα απορρυπαντικά και τα οποία ενδεχομένως βοηθούν στη λειτουργία του συστήματος. Υπό συμπίεση, η τάση παρουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να φτάσει την τιμή  $0 \text{ dyn/cm}^2$ .

Δίνοντας τη συμπίεση που απαιτείται για τη μείωση της επιφανειοδραστικής περιοχής, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας χάνει το σημαντικό του ρόλο, εξαιτίας της πίεσης που ασκείται στο υλικό κατά την εκπνοή. Κατά τη διάρκεια επόμενων εισπνοών στον πνεύμονα και εκ νέου άπλωμα του φωσφολιπιδικού υμενίου νέο υλικό προσροφάται στη μεσόφαση αέρα-υγρού.

## ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

### Η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A (SP-A)

Η κύρια πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι η υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη A (SP-A). Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης έχει μελετηθεί σε πολλά είδη. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει δύο παρόμοια αντίγραφα γονιδίων της SP-A, την SP-A1 και SP-A2, καθώς και ένα ψευδογονίδιο της SP-A. Το mRNA της SP-A έχει εντοπιστεί στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αλλά όχι στα κύτταρα Clara [56]. Η SP-A περιέχει 228 αμινοξέα και είναι μοριακού βάρους 29000 -36000 Da. Η SP-A περιέχει δύο ευδιάκριτες περιοχές, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που είναι τύπου κολλαγόνου και σχηματίζει τριπλή έλικα, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο έχει ιδότητες λεκτίνης. Σε κάθε κυψελίδα η SP-A σχηματίζει έξι τριπλές ελικοειδείς δομές (18 πολυπεπτιδικές αλυσίδες) μοριακού βάρους 700000 [35]. Η σύνθεση και η έκκριση της SP-A μπορεί να ρυθμίζονται ανεξάρτητα, ως μέρος του κυψελιδικού συστήματος άμυνας, από τα υπόλοιπα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση της SP-A μπορεί να αυξηθεί από την





## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ιντερφερόνη- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) χωρίς να προκαλείται κάποια επίδραση στα υπόλοιπα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα [57].

Η SP-A έχει την ικανότητα να προσδένει λιπίδια και υδρογονάνθρακες και να αλληλεπιδρά με υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης προσδένεται ισχυρά στα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα παρουσία ιόντων ασβεστίου, ενώ η SP-B και η SP-C προάγουν το δομικό σχηματισμό των στιβαδωτών σωματίων στη σωληνώδη μυελίνη [58]. Ακόμη, ένας άλλος σημαντικός ρόλος της SP-A είναι να βοηθά στο «άπλωμα» των φωσφολιπιδίων από τη στιγμή που έχει γίνει η έκκρισή τους στον κυψελιδικό χώρο. Η SP-A βοηθάει, σε συνεργασία με τις SP-B και SP-C, να προάγει το γρήγορο σχηματισμό του υμενίου των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα το οποίο διευκολύνει τη μείωση της επιφανειοδραστικής τάσης [59]. Επίσης, ουδέτερα λιπίδια συνεργάζονται με την SP-A στην οργάνωση της DPPC στο επιφανειοδραστικό υμένιο [60].

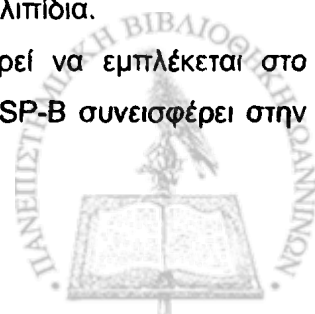
Το εύρημα ότι η καθαρή SP-A αναστέλλει την έκκριση φωσφολιπιδίων από απομονωμένα πνευμονοκύτταρα τύπου II, αποδεικνύει ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί με έναν αναδρασικό (feed-back) μηχανισμό να έχει έναν ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ακόμη η πρωτεΐνη μπορεί να προσδένεται με τα κυψελιδικά μακροφάγα ενώ *in vitro* μελέτες έχουν αποδείξει το ρόλο της στο να παρεμποδίζει τη δράση φωσφολιπασών που επάγουν την αποδόμηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [61].

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η SP-A μεσολαβεί στην ενδοκύτωση και στην επαναχρησιμοποίηση συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχουν εκκριθεί μέσω πρόσδεσης σε ειδικές θέσεις υψηλής συγγένειας υποδοχείς στην επιφάνεια των πνευμονοκυττάρων τύπου II [62]. Η SP-A εμφανίζεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του ρυθμού αναπλήρωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα [63], στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης [64] και σε ανοσολογικούς μηχανισμούς στον πνεύμονα [65].

### Η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη B (SP-B)

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας περιέχει δύο μικρότερες πρωτεΐνες τις SP-B και SP-C με μοναδικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η σύνθεση της ανθρώπινης SP-B λαμβάνει χώρα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και στα βρογχικά κύτταρα. Η SP-B που απομονώνεται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα περιέχει μόνο 79 αμινοξέα. Η λειτουργική πρωτεΐνη περιλαμβάνει δύο περιοχές περιέχοντας σε υψηλό ποσοστό υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία πιθανόν αποτελούν περιοχές αλληλεπίδρασης με τα φωσφολιπίδια.

Η λειτουργία της SP-B δεν είναι καλά κατανοητή, αλλά μπορεί να εμπλέκεται στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η SP-B συνεισφέρει στην



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

κύρια επιφανειοδραστική ιδιότητα, στην ενδομοριακή και διαμοριακή διαδοχή της στιβάδας των φωσφολιπιδίων [66]. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι το αμινο-τελικό άκρο της SP-B σταθεροποιεί τη στιβάδα των φωσφολιπιδίων με αύξηση της πίεσης σύγκλισης η οποία μπορεί να παρεμποδίζει το συνωστισμό των φωσφολιπιδίων από τις μονοστιβάδες στη μεσόφαση αέρα-υγρού [67]. Μία ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του κατιοντικού πεπτιδίου και ενός ανιοντικού λιπιδίου όπως της PG μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτή τη σταθεροποίηση. Ανεπάρκεια της SP-B έχει ως αποτέλεσμα παρέκκλιση από την επεξεργασία της πρωτεΐνης της SP-C, οδηγώντας στη συσσώρευση ενός ενδιάμεσου μοριακού βάρους 11000 και σε μία μείωση των επιπέδων της ώριμης SP-C. Έλλειψη της SP-B έχει ως αποτέλεσμα αδυναμία αναπνοής του νεογνού κατά τη γέννηση ενώ μείωση της SP-B έχει ως αποτέλεσμα μείωση της διατασιμότητας του πνεύμονα [68]. Τα προηγούμενα στοιχεία αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης SP-B στη διαδικασία της αναπνοής.

### Η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη C (SP-C)

Η υδρόφοβη πρωτεΐνη SP-C έχει 197 αμινοξέα με μοριακό βάρος 20000 Da και εκφράζεται αποκλειστικά σε πνευμονοκύτταρα τύπου II στον ώριμο πνεύμονα. Και οι δύο πρωτεΐνες SP-B και SP-C έχουν σημαντικό ρόλο στο «άπλωμα» των λιπιδίων ενώ έχει αποδειχθεί ότι επιταχύνουν το ρυθμό με τον οποίο το υμένιο σχηματίζεται στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Τέλος, ευνοεί την πρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα τύπου II κύτταρα, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στη διακίνηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [69].

### Η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη D (SP-D)

Η SP-D είναι μία γλυκοκοπρωτεΐνη η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συντίθεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και έχει βρεθεί και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα λαγού η SP-D βρίσκεται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα και δε συνδέεται με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Η SP-D δομικά μοιάζει με την SP-A όπως και με άλλα μέλη της οικογένειας των λεκτινών. Επίσης συμμετέχει στην ανοσολογική άμυνα του πνεύμονα.

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η SP-D αλληλεπιδρά με το *Escherichia coli* με έναν ασβεστιοεξαρτώμενο τρόπο, μία πρόσδεση που αναστέλλεται από την παρουσία σακχάρων. Η SP-D αλληλεπιδρά με μακροφάγα και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί συγκόλληση βακτηρίων [70]. Σε αντίθεση με την SP-A η οποία ειδικά προσδένεται με τη DPPC, η SP-D δένεται ειδικά με τη PI με ένα μηχανισμό εξαρτώμενο από ιόντα ασβεστίου [71]. Η SP-D εντοπίζεται στα κύτταρα Clara όπως επίσης και στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου. Η



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

έκφραση του γονιδίου της SP-D ρυθμίζεται στον πνεύμονα νεογνού μετά από επαγωγή συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνδεδεμένων με πρωτεΐνες και λιπίδια [72].

### ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

#### Ρύθμιση της επιφανειοδραστικής τάσης

Στα θηλαστικά η κύρια λειτουργία του είναι να ρυθμίζει την επιφανειοδραστική τάση σε σχέση με το μέγεθος της κυψελίδας, που αποτελεί παράγοντα κλειδί για την επίτευξη φυσιολογικής αναπνοής και κυψελιδικής σταθερότητας. Σύμφωνα με το νόμο των Young & Laplace, η πραγματική επιφανειοδραστική τάση είναι μικρότερη σε κυψελίδες από ότι θα αναμενόταν σε γεωμετρικά κυκλικές επιφάνειες. Επειδή οι γειτονικές κυψελίδες επικοινωνούν μέσω κυψελιδικών αγωγών και πόρους του Kohn (Εικόνα 5) η επιφανειοδραστική τους τάση πρέπει να είναι διαφορετική (εάν πρόκειται για κυψελίδες διαφορετικού μεγέθους) προκειμένου να αποφευχθεί η σύγκλιση μικρών κυψελίδων για χάρη των μεγαλύτερων. Η μηχανική σύνδεση των κυψελίδων μέσω του διάμεσου ιστού του διαφράγματος αποτελεί βασικό στοιχείο προκειμένου να παρεμποδιστεί η σύγκλιση των κυψελίδων. Ωστόσο, απουσία ή απενεργοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα τη σύγκλιση των κυψελίδων στο τέλος της εκπνοής και ατελεκτασία [73].



**Εικόνα 5.** Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης πνεύμονα ανθρώπου. Δύο πνευμονοκύτταρα τύπου II (P2) φαίνεται να προεξέχουν πάνω στη λεία κυψελιδική επιφάνεια του επιθηλίου. Ένας πόρος του Kohn (K) και η σύνδεση κυττάρου-κυττάρου μεταξύ των δύο πνευμονοκυττάρων τύπου II σημειώνονται με βέλη.

#### Ισορροπία υγρών στον πνεύμονα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας αποτελεί βασικότατο παράγοντα για την αποφυγή οιδήματος λόγω επίδρασης της τάσης, η οποία δρα ως μία επιπρόσθετη δύναμη για να

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

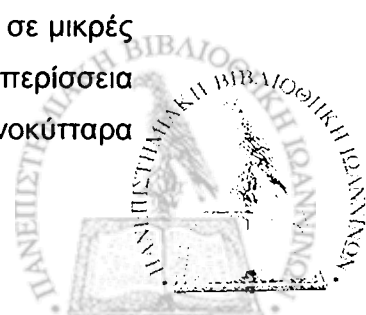
κατευθύνει την ομαλή ροή υγρών μέσω του φράγματος αέρα-αίματος. Προκειμένου ο ελεύθερος κυψελιδικός χώρος να προστατευθεί από την περίσσεια υγρών, ιόντων και πρωτεϊνών, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II περιέχουν έναν αριθμό από διαύλους και αντλίες ιόντων όπως επίσης και από υποδοχείς ανοσοσφαιρινών συνδεδεμένων με αλβουμίνη. (Πίνακας 3). Ωστόσο προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς η περίσσεια υγρού, ένα λεπτό υμένιο διατηρείται, που χαρακτηρίζει την υπόφαση, καλύπτοντας την κυψελιδική επιφάνεια. Η υπόφαση στον κυψελιδικό χώρο καθορίζεται από το επιφανειοδραστικό στρώμα και τη διαφραγματική πάνω επιφάνεια στο κυψελιδικό επιθήλιο. Στο πρόβατο έχει υπολογιστεί ότι είναι  $0.37 \pm 0.15$  ml/Kg του θηλαστικού [74]. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II πιστεύεται ότι ελέγχουν σημαντικούς παράγοντες σε αυτό το εξωκυττάριο υδάτινο περιβάλλον, όπως το pH και τη ροή ιόντων ασβεστίου, από τους οποίους εξαρτάται η πορεία φαινομένων όπως για παράδειγμα η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

### Άμυνα στον πνεύμονα

Επιπλέον, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας συνεισφέρει στην άμυνα του πνεύμονα. Η σημασία αυτής της λειτουργίας στηρίζεται κυρίως στις ιδιότητες των πρωτεϊνών SP-A και SP-D. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι εφικτό να προσδένονται στις επιφάνειες παθογόνων μικροοργανισμών δρώντας έτσι ως οψωνίνες διευκολύνοντας και το ρόλο των κυψελιδικών μακροφάγων. Επιπλέον, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι ικανά να εκκρίνουν αρκετά προϊόντα τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα, όπως η λυσοζύμη. Σε πνεύμονες αρουραίων η λυσοζύμη ανιχνεύθηκε στα πνευμονοκύτταρα τύπου II ενώ σε ανθρώπους ανιχνεύθηκε σε βλεννώδη υλικά αλλά όχι στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [75].

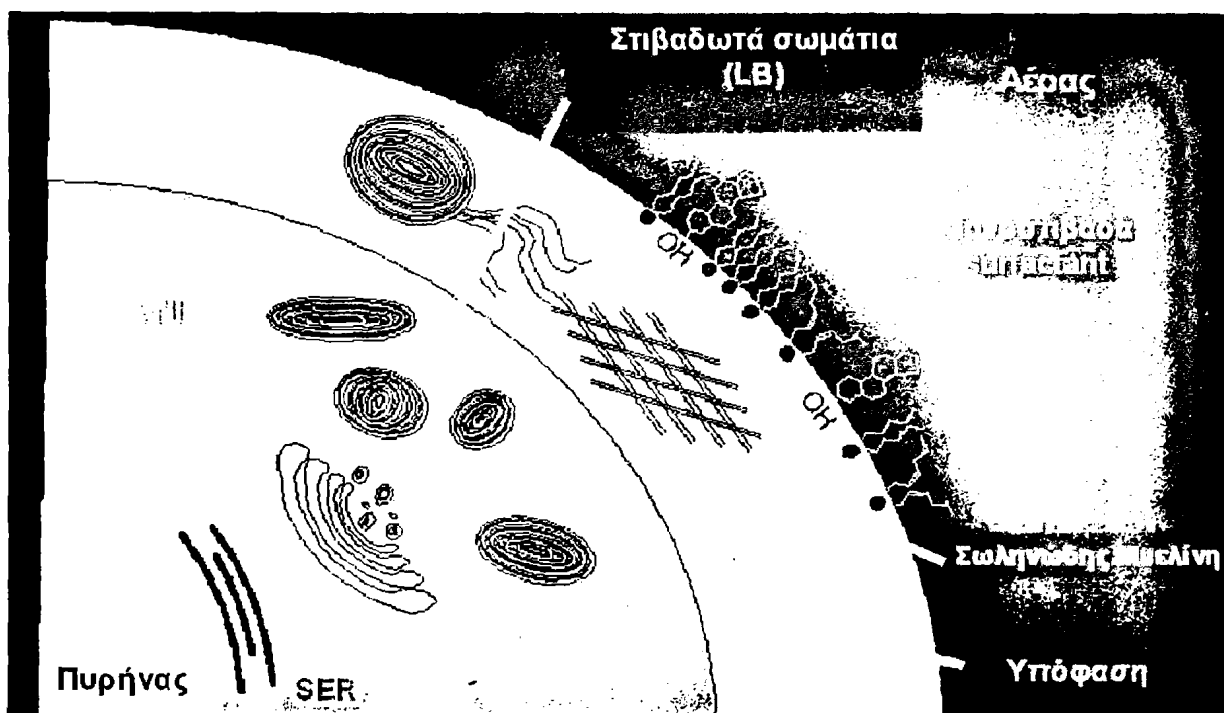
### Σύνθεση

Παρόλο που τα βρογχιικά κύτταρα Clara συνθέτουν και απελευθερώνουν τις ώριμες πρωτεΐνες SP-A, SP-B και SP-D τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι τα μοναδικά κύτταρα που παράγουν λιπίδια. Επίσης, η ώριμη 3.5 -3.7 kDa μικρή SP-C πιστεύεται ότι παράγεται μόνο από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών περιλαμβάνει οργανίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τη συσκευή Golgi, πολυκυστικά σωμάτια και σπιβαδωτά σωμάτια. Με τεχνικές μικροσκοπίας έχουν αποδειχθεί τα επιμέρους βήματα βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών. Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι τα σπιβαδωτά σωμάτια είναι πλούσια σε SP-A ενώ άλλες μελέτες ότι η SP-A βρίσκεται σε μικρές ποσότητες. Αυτές οι αντιφατικές απόψεις ίσως αποτελούν απόδειξη για το ότι η περίσσεια της SP-A απελευθερώνεται στην υπόφαση και παραλαμβάνεται από τα πνευμονοκύτταρα



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

τύπου II. Επανεκκρίση της SP-A μπορεί να γίνει πολύ γρήγορα, τουλάχιστον *in vitro* και συμβαίνει με διαφορετικό μηχανισμό απ' ό τι γίνεται στα λιπίδια [76]. Για τη βιοσύνθεση όμως των λιπιδίων θα αναφερθούμε στη συνέχεια.



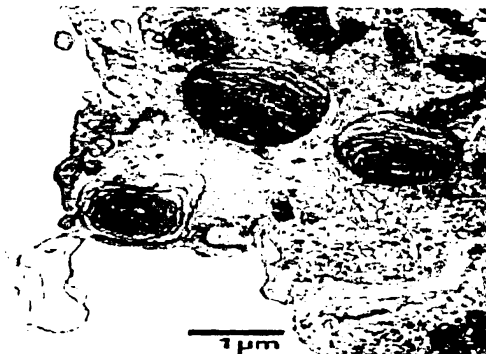
**Σχήμα 8.** Πνευμονοκύτταρο τύπου II όπου φαίνεται η σύνθεση και η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. ΑΤII=πνευμονοκύτταρα τύπου II, SER=λείο ενδοπλασμικό δίκτυο.

### Έκκριση

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων έχει αναφερθεί ότι διεγείρουν την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, όπως το AA, οι προσταγλαδίνες, η ισταμίνη και η ενδοθελίνη-1. Δύο όμως είναι οι κύριοι φυσιολογικοί παράγοντες που είναι γνωστό ότι διεγείρουν την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα *in vivo*: η αναπνοή, η οποία διεγείρει την έκκριση σε νεογνά και ενήλικες και δεύτερον οι ωδίνες στον τοκετό. Το 1990 σε εργασία των Wirtz & Dobbs στο Science [7] αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή μηχανικής διάταξης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ωστόσο, σε άλλη εργασία αποδείχθηκε ότι η διαστολή του πνεύμονα αρουραίου προκαλεί διακυμάνσεις στα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου σε όλα τα κυψελιδικά κύτταρα και στα στιβαδωτά σωμάτια των πνευμονοκυττάρων τύπου II συγχρόνως. Σε αυτή την εργασία υποστηρίζεται ότι τα πνευμονοκύτταρα τύπου I μπορούν να μετατρέπουν τη μηχανική διέγερση σε ένα ενδοκυττάριο σήμα ασβεστίου, στη συνέχεια να

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

διαβιβάζεται μέσω χασμοσυνδέσμων στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και να ρυθμίζεται τέλος η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [77].

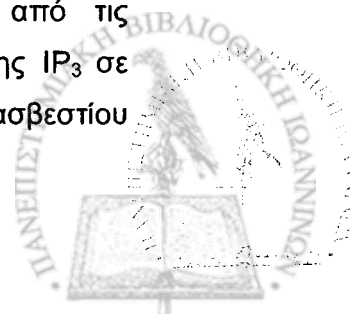


**Εικόνα 6.** Σφιβαδωτό σωματίο κατά την εξωκύτωση από πνευμονοκύτταρο τύπου II [78].

Τρία μονοπάτια μεταγωγής σήματος είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (**Σχήμα 9**) [79]. Το πρώτο δρα μέσω ενεργοποίησης της αδενυλοκυκλάσης (AC), περιλαμβάνει σχηματισμό της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) και ενεργοποίηση του κυκλικού AMP (cAMP) που εξαρτάται από την πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A, PKA). Αυτό το μονοπάτι ακολουθείται για παράδειγμα όταν οι παράγοντες διέγερσης της έκκρισης προσδένονται σε β-αδρενεργικούς και  $A_2\beta$  υποδοχείς αδενοσίνης. Το μονοπάτι της AC επίσης ενεργοποιείται από εκκριματογωγούς που δρουν μέσω υποδοχέων, όπως η τοξίνη της χολέρας που ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες G και τη φορσκολίνη που ενεργοποιεί απευθείας την AC.

Το δεύτερο μονοπάτι δρα μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), είτε άμεσα λόγω αλληλεπίδρασης με διαλυτές ουσίες (π.χ. οξικός εστέρας της μυριστυλοφορβόλης, TPA) ή έμμεσα ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης μεμβρανικών υποδοχέων. Το ATP και η τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) συνδέονται σε πουρινεργικούς ( $P_2Y$ ) υποδοχείς που συνδέονται απευθείας στη φωσφολιπάση C (PLC) μέσω G πρωτεϊνών. Η PLC έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση της διφωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_2$ ) και το σχηματισμό διακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_3$ ). Η DAG ενεργοποιεί την PKC η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση D (PLD) οδηγώντας στο σχηματισμό χολίνης και φωσφατιδικού οξέος (PA).

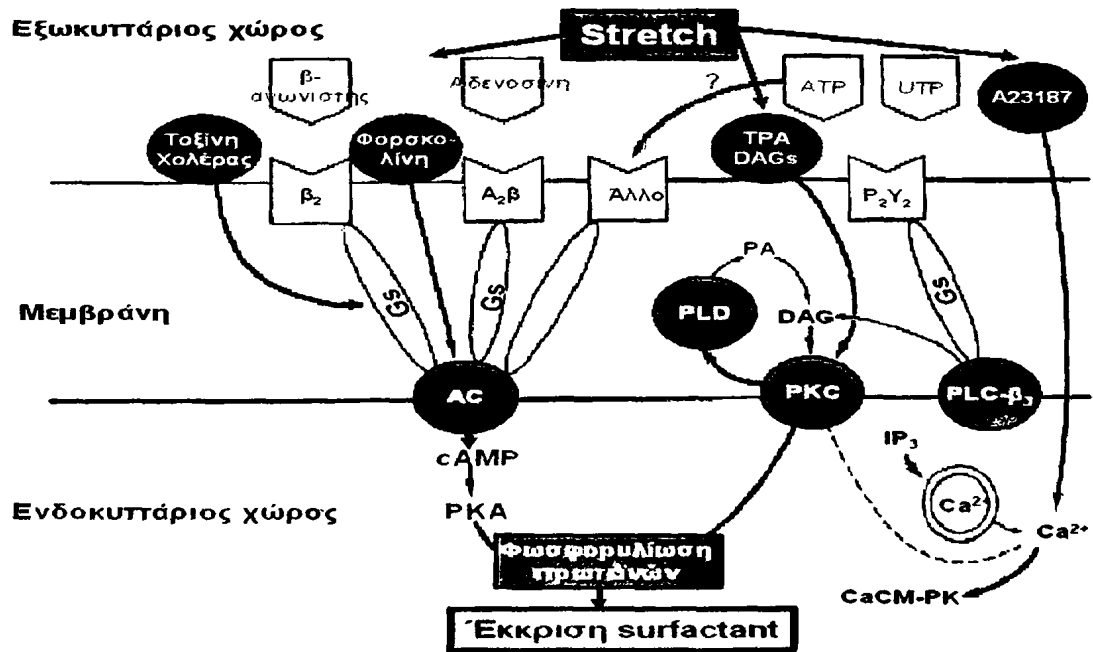
Το τρίτο γνωστό μονοπάτι ως τώρα δρα μέσω αύξησης των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου, τη μεταβίβαση ιόντων ασβεστίου μέσω χασμοσυνδέσμων από τα γειτονικά πνευμονοκύτταρα τύπου I, ή την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Αυτή η πορεία μπορεί να ολοκληρωθεί με αύξηση της  $IP_3$  σε απόκριση της ενεργοποίησης της PLC. Η  $IP_3$  προάγει την κινητοποίηση ιόντων ασβεστίου



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

από ενδοκυττάρειες αποθήκες. Τα ιόντα ασβεστίου ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση (CaCM-PK) και μπορεί να δρα συνεργιστικά με τη DAG και έτσι να ενεργοποιούνται ορισμένες ισομορφές των PKC. Η ενεργοποίηση των PKA, PKC ή των CaCM-PK οδηγούν τελικά στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Η όποια ενεργοποίηση κάθε μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα δύο με τρεις φορές αύξηση στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Όταν όμως γίνεται επίδραση με παράγοντες που ενεργοποιούν παράλληλα περισσότερα από ένα μονοπάτια, όπως το ATP, τότε παρατηρείται 5 με 12 φορές αύξηση στην έκκριση [80].



**Σχήμα 9.** Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος που μεσολαβούν στην έκκριση φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε πνευμονοκύτταρα τύπου II. Συντμήσεις: A<sub>2</sub>β=υποδοχείς αδενοσίνης, AC=αδενυλοκυκλάση, CaCM-PK= εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση από ασβέστιο/καλμοδουλίνη, DAG=διακυλογλυκερόλη, IP<sub>3</sub>=τριφωσφορική ινοσιτόλη, PA=φωσφατιδικό οξύ, PKA=πρωτεϊνική κινάση A (κινάση εξαρτώμενη από cAMP), PKC=πρωτεϊνική κινάση C, PLC=φωσφολιπάση C, PLD=φωσφολιπάση D, TPA=μυριστυλο-φορβόλη, Gs=G πρωτεΐνη (δράση μέσω του ετεροτριμερούς της GTP-binding πρωτεΐνης G) [79].

Το τελευταίο στάδιο του μηχανισμού έκκρισης ολοκληρώνεται με εξωκύτωση, όπου πλέον ο επιφανειοδραστικός παράγοντας μεταφέρεται από τα σιβαδωτά σωμάτια στην κυψελίδα. Η έκκριση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα όπως και της SP-A μπορεί να αναστέλλεται διαδοχικά από έναν αρνητικά αναδρασικό μηχανισμό, παρόλο που δεν έχει αποδειχθεί ακόμη *in vivo* [81].

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

### Μετατροπή

Το πρώτο βήμα της μετατροπής των εκκρινόμενων στιβαδωτών σωματίων σε σωληνώδη μυελίνη απαιτεί την παρουσία ιόντων ασβεστίου και της πρωτεΐνης SP-A. Η παρουσία της σωληνώδους μυελίνης εμφανίζεται να συνδέεται με την ικανότητα των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα να προσροφούνται άμεσα στο στρώμα της μεσόφασης αέρα/υγρού. Αυτό το δεύτερο βήμα της μετατροπής φαίνεται να προάγεται από την πρωτεΐνη SP-B. Επίσης σημαντικό βήμα αποτελεί ο εμπλουτισμός του υμενίου με DPPC. Αυτή η διαδικασία όπως προαναφέρθηκε απαιτεί την παρουσία των πρωτεϊνών SP-B και SP-C.

### Ανακύκληση

Έχει διευκρινιστεί ότι το 85 % του επιφανειοδραστικού παράγοντα προσλαμβάνεται ξανά, μεταβολίζεται και εκκρίνεται εκ νέου από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Πρόσληψη ξανά (re-uptake) και ανακύκληση έχει αναφερθεί για τα λιπίδια και για τις 4 πρωτεΐνες SP-A, SP-B, SP-C και SP-D. Οι πρωτεΐνες SP-A, SP-B και SP-C τονίζεται ότι αυξάνουν την πρόσληψη λιπιδίων από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II *in vitro*. Η σημασία της πρόσληψης λιπιδίων από τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες *in vivo* δεν έχει διευκρινιστεί ως τώρα. Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη SP-A είναι απαραίτητη για την ανακύκληση των λιπιδίων και μάλιστα η DPPC συνδέεται με την SP-A και από τα στιβαδωτά σωματία γίνεται επανέκκριση. Έχει βρεθεί ότι η SP-A επάγει την ενσωμάτωση ραδιοσημασμένης DPPC στα στιβαδωτά σωματία σε πνεύμονα λαγού και σε απομονωμένα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Μετά από 2 ώρες έγχυσης του ραδιοσημασμένου λιπιδίου στα στιβαδωτά σωματία βρέθηκαν σημασμένες και η SP-A και η DPPC και ο λόγος DPPC/SP-A είχε την τιμή δύο. Η ύπαρξη ραδιενέργειας στα απομονωμένα στιβαδωτά σωματία αντιπροσωπεύει λιπίδια τα οποία μεταφέρθηκαν με SP-A. Ωστόσο, λιπίδια που βιοσυντίθενται ξανά χρησιμοποιώντας τα προϊόντα αποδόμησης της DPPC βοηθούν προς την κατεύθυνση αυτή. Η αποδόμηση της DPPC μειώνεται παρουσία της SP-A, πιθανόν με αναστολή μιας όξινης ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάσης A2 (aiPLA<sub>2</sub>) [82]. Έτσι η SP-A συνεισφέρει στην απευθείας μεταφορά της DPPC στα στιβαδωτά σωματία ή αναστέλλει την αποδόμηση του λιπιδίου. Οι αντίστοιχοι μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη [83].

### Αποικοδόμηση

Η αποικοδόμηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα επιτελείται από τα κυβελιδικά μακροφάγα με πολύ μικρή έως καθόλου συνεργασία με τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Τα φωσφολιπίδια και η πρωτεΐνη SP-A αποικοδομούνται με διαφορετικούς μηχανισμούς.



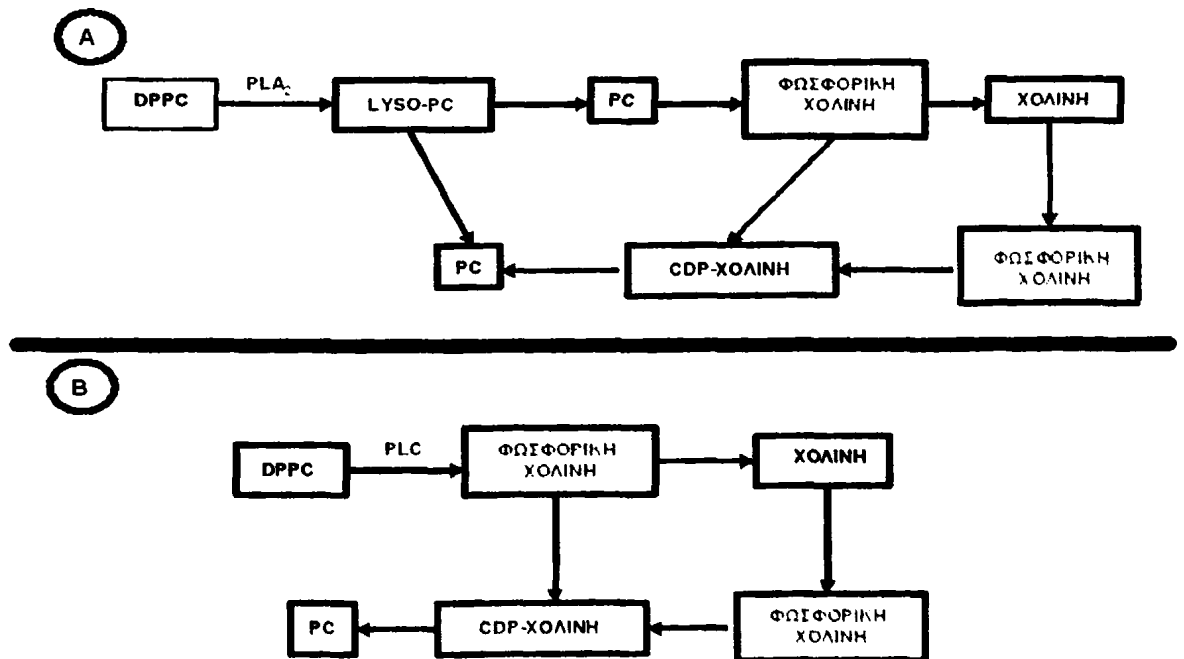


## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Ανικανότητα αποικοδόμησης ή απομάκρυνσης περίσσειας του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να αποτελεί ένα βασικό λόγο για την εμφάνιση κυψελιδικής πρωτεΐνωσης [84].

### Αποικοδόμηση της εσωτερικευμένης (internalized) DPPC

Σε αρουραίο που έχει γίνει ενδοτράχεια έγχυση σημασμένης DPPC μετά από 2 ώρες βρέθηκε μείωση των επιπέδων της PC. Σε αυτό το πείραμα, επίπεδα σημασμένης χολίνης εντοπίζονται σε όλες τις ενώσεις, στη PC, στη φωσφορική χολίνη και ελεύθερη χολίνη όπως αναμενόταν και παρουσιάζεται στο **Σχήμα 10**. Η εκχύλιση του πνευμονικού ιστού έδειξε ότι στην υδατική φάση εντοπίζεται ραδιοσημασμένη CDP-χολίνη αποδεικνύοντας μετατροπή της χολίνης για την παραγωγή της PC μέσω της *de novo* πορείας. Στην οργανική φάση ανιχνεύεται σημασμένη DPPC (το αρχικό υπόστρωμα), λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (Lyso-PC) (με ακόρεστο λιπαρό οξύ) και PC με ακόρεστα επίσης λιπαρά οξέα. Η ύπαρξη της τελευταίας αποδεικνύει την επαναχρησιμοποίηση της σημασμένης χολίνης για την εκ νέου βιοσύνθεση της PC, είτε μέσω της επανακυλίωσης της Lyso-PC (με ακόρεστο λιπαρό οξύ) είτε μέσω της *de novo* πορείας. Αποικοδόμηση του λιπιδίου και επαναχρησιμοποίηση των προϊόντων αποικοδόμησης έχει αποδειχθεί και σε πνευμονοκύτταρα τύπου II που έχουν επωαστεί με λιποσώματα ή σκεύασμα επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) [85].



**Σχήμα 10.** Πορείες καταβολισμού και επαναχρησιμοποίησης της σημασμένης στη χολίνη DPPC μέσω φωσφολιπασών (PLA<sub>2</sub> & PLC).



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

### Φωσφολιπάσες και καταβολισμός της DPPC

Είναι γνωστό ότι η  $PLA_2$  παράγει Lyso-PC και ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ. Η Lyso-PC στη συνέχεια μπορεί να ακυλωθεί σε PC ή να αποικοδομηθεί από φωσφολιπάσες σε απλούστερα διαλυτά συστατικά όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 10B**. Καταβολισμός με PLD επίσης λαμβάνει χώρα και οδηγεί απευθείας στην παραγωγή της χολίνης. Ενεργότητες φωσφολιπασών έχουν βρεθεί στον πνευμονικό ιστό πολλών θηλαστικών και σε πνευμονοκύτταρα τύπου II [86].

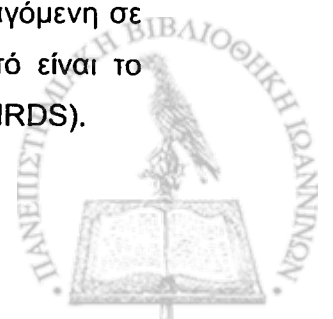
- Η αποικοδόμηση της DPPC σε απομονωμένα πνευμονοκύτταρα τύπου II μειώνεται όταν η SP-A προστίθεται με λιποσώματα στα κύτταρα. Μία εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα είναι ότι η SP-A μεσολαβεί στην απευθείας μεταφορά της DPPC στα στιβαδωτά σωμάτια. Μία άλλη εξήγηση είναι ότι η SP-A απευθείας αναστέλλει ένζυμα αποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί *in vitro* αναστολή της  $aiPLA_2$  από τη φυσική μορφή της SP-A [87]. Η ενεργότητα της  $aiPLA_2$  μπορεί να αυξηθεί όταν προστεθούν αναγωγικοί παράγοντες, κυρίως μέσω της *in situ* αναστροφής της SP-A, από τη στιγμή που η ενζυμική ενεργότητα από μόνη της δεν επηρεάζεται από τέτοιους παράγοντες [86]. Έτσι η παρουσία της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης A (SP-A) στα στιβαδωτά σωμάτια μπορεί να «προστατέψει» τη DPPC από την αποικοδόμηση που λαμβάνει χώρα μέσω των φωσφολιπασών. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν το ρόλο της SP-A στην ρύθμιση της αποικοδόμησης της ενδοκυττάριας DPPC μέσω της ρύθμισης της ενεργότητας της  $aiPLA_2$ .

### Βιοφυσικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Οι βιοφυσικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα εστιάζονται στα εξής σημεία:

- ❖ τα πνευμονοκύτταρα τύπου II μπορούν να εκκρίνουν επιφανειοδραστικό παράγοντα.
- ❖ η μείωση της επιφανειοδραστικής τάσης στις κυψελίδες σε πολύ μικρές τιμές.
- ❖ οι υδρόφοβες πρωτεΐνες, SP-B και SP-C, είναι οι πιο γνωστές μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες.
- ❖ η μοναδική δομική ιδιαιτερότητα της σωληνώδους μυελίνης.

Στη μήτρα, οι πνεύμονες του νεογνού είναι γεμάτες με αμνιωτικό υγρό. Με την πρώτη αναπνοή κατά τη γέννηση σχηματίζεται αμέσως η μεσόφαση αέρα-υγρού και η επιφανειοδραστική τάση τότε υπερσχύει των μηχανικών δυνάμεων στον πνεύμονα. Απουσία του επιφανειοδραστικού παράγοντα προκαλείται σύγκλιση των κυψελίδων στο τέλος της εκπνοής. Εάν συμβεί αυτό τότε πρέπει να παραχθεί μία σημαντική δύναμη, παραγόμενη σε κάθε αναπνοή, για να ανοίξει τις κυψελίδες που έχουν υποστεί σύγκλιση. Αυτό είναι το κυριότερο πρόβλημα για τα νεογνά που αντιμετωπίζουν αναπνευστική δυσχέρεια (IRDS).



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

**Πίνακας 3.** Κύριες λειτουργίες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [88].

Λειτουργία	Σημασία
<p><b>Επιφανειοδραστικός παράγοντας</b></p> <p><b>1. Σύνθεση</b></p> <p><i>Συστατικά</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Φωσφολιπίδια</li> <li>➤ Πρωτεΐνες                             <ul style="list-style-type: none"> <li>SP-A</li> <li>SP-B</li> <li>SP-C</li> <li>SP-D</li> </ul> </li> </ul> <p><i>Συστατικά που εκκρίνονται μαζί με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Λυσοζύμη</li> <li>Πλασμαλογόνα</li> </ul> <p><b>2. Ωρίμανση</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ενδοκυττάρια καθεψίνη Η</li> </ul> <p><b>3. Έκκριση</b></p> <p><i>Υποδοχείς σήματος</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>β-αδρενεργικοί υποδοχείς</li> <li>P1 πουρινοϋποδοχείς</li> <li>P2Y πουρινοϋποδοχείς</li> </ul> <p><i>Συστατικά έκκρισης</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Μικροσωληνίσκοι</li> <li>Ακτίνη</li> <li>Ανεξίνη II, IV, VII (=συνεξίνη)</li> </ul> <p><b>4. Εξωκυττάριος μετασχηματισμός</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Κονβερτάση</li> </ul> <p><b>5. Ανακύκλωση</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Υποδοχέας SP-A</li> <li>Λυσισωμιακά ένζυμα</li> <li>Αλκαλική φωσφατάση</li> <li>α-γλυκοσιδάση, α-μαννόζη</li> </ul> <p><b>Επισκευή κυψελιδικού επιθηλίου</b></p> <p><i>Πολλαπλασιασμός</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Κυκλίνη Α</li> </ul>	<p>Επιφανειοδραστική τάση</p> <p>Σχηματισμός σωληνώδους μυελίνης &amp; άμυνα</p> <p>Προσρόφηση των λιπιδίων στη μονοστιβάδα</p> <p>Άμυνα</p> <p>Άμυνα</p> <p>Προστασία έναντι οξειδωσης</p> <p>Έλεγχος των SP-B, SP-C</p> <p>Μετατροπή της λιπιδικής μονοστιβάδας σε κυστίδια</p> <p>Δείκτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II</p> <p>Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση</p>



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Κυκλίνη D1, D2 Κυκλίνη εξαρτώμενη φωσφοκινάση PTHrP Καλμοδουλίνη Διαφοροποίηση Υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος Αμινοπεπτιδάση N	Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση Αναστολή πολλαπλασιασμού Πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση  Αναστολή διαφοροποίησης
Απόπτωση CD95 (Υποδοχέας του προσδέματος Fas) Πρόσδεμα Fas Bax Bcl-2 Κασπάση-3	Προ-αποπτωτικό πεπτιδίο Αντι-αποπτωτικό πεπτιδίο

### Άλλες λειτουργίες - Ανοσολογικοί μηχανισμοί

Η ακεραιότητα των επιθηλίων αποτελεί μία από τις αναγκαϊότερες προϋποθέσεις για την ικανοποιητική άμυνα ενός συστήματος. Στο αναπνευστικό σύστημα η ακεραιότητα του επιθηλίου είτε στο επίπεδο των βρόγχων είτε στο επίπεδο των κυψελίδων δρα και ως μηχανικός προστατευτικός παράγοντας που δεν επιτρέπει την εύκολη διείσδυση βλαπτικών παραγόντων (μικροβίων και /ή ουσιών) αλλά δρα και λειτουργικά με την έκκριση διαφόρων προστατευτικών ενζύμων και ανοσοσφαιρινών. Αρκετοί είναι οι παράγοντες που έχουν τη δυνατότητα να δράσουν στην ακεραιότητα του επιθηλίου και να αυξήσουν τη διαβατότητά του σε βλαπτικούς παράγοντες (Πίνακας 3) διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη κάποιας νόσου.

## ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ

### A. Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνού (IRDS)

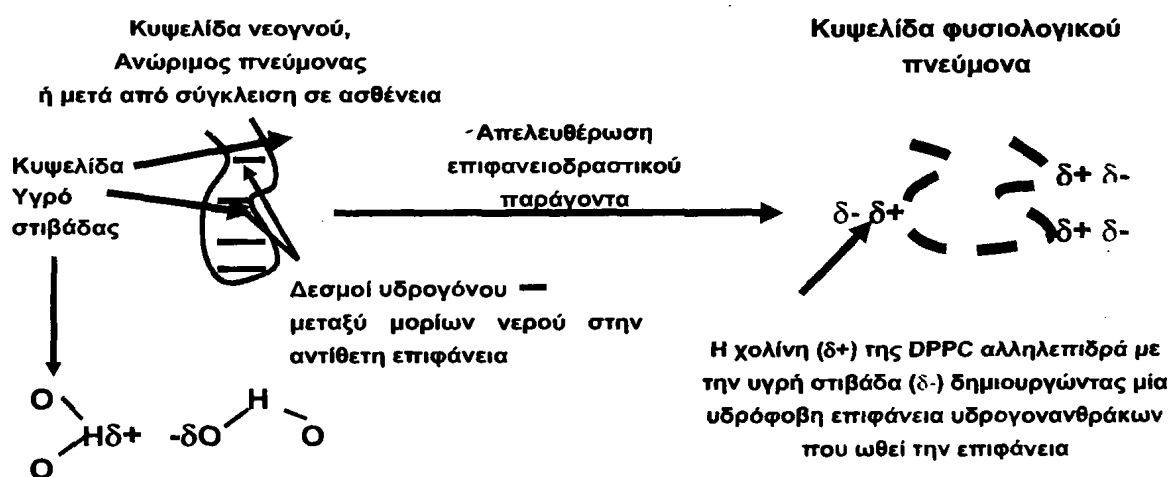
Ανώριμος πνεύμονας που δεν περιέχει επαρκή ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να οδηγήσει στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (Respiratory Distress Syndrome, RDS) μία σημαντική ασθένεια των πρόωρων νεογνών (Infant RDS, IRDS). Ένας σημαντικός αριθμός ορμονών επιταχύνει την ωρίμανση του πνεύμονα που διεγείρουν την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην τελική φάση της ωρίμανσης του εμβρύου. Το IRDS μπορεί να προληφθεί με χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και άλλων ορμονών στην εγκυμονούσα μητέρα. Ήδη από το 1961 η λιπιδική σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα είχε μελετηθεί και διευκρινιστεί [89], ενώ μία δεκαετία



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

αργότερα αναφέρθηκε ότι μπορεί να γίνει πιθανή η πρόβλεψη του IRDS πριν τη γέννηση του νεογνού υπολογίζοντας το λόγο λεκιθίνη/σφιγγομυελίνη (PC/Sph) στο αμνιωτικό υγρό [90]. Εάν ο λόγος είναι μικρότερος από δύο τότε θα πρέπει να χορηγηθούν γλυκοκορτικοειδή στην εγκυμονούσα μητέρα.

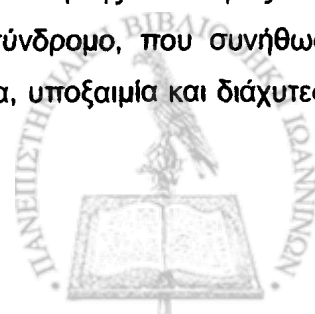
Όσον αφορά τη θεραπευτική αγωγή στο νεογνό προτείνεται να χορηγηθεί οξυγόνο σε μικρές ποσότητες (συνεχής θετική αναπνευστική πίεση, Continuous Positive Airway Pressure, CPAP) και παράλληλα να χορηγούνται ενδοφλέβια υγρά προκειμένου να σταθεροποιηθεί η γλυκόζη, τα άλατα και η πίεση του αίματος. Εάν η κατάσταση του νεογνού χειροτερεύει τότε ένας ενδοτραχειακός σωλήνας (αναπνευστικός σωλήνας) τοποθετείται στο νεογνό και δίνονται περιοδικά αναπνοές με τη βοήθεια ειδικής συσκευής. Η διάρκεια της μηχανικής αναπνοής μπορεί να είναι για αρκετούς μήνες. Επίσης, το IRDS μπορεί να θεραπευθεί με τη χορήγηση σκευασμάτων επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant) τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα.



**Σχήμα 11.** Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη διαστολή της κυψελίδας. Στα πρώτα βρέφη ο λόγος της λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης είναι πολύ μικρός και η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία του IRDS.

### Β. Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας του ενήλικα (ARDS)

Το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας του ενήλικα (Adult Respiratory Distress Syndrome -ARDS) αποτελεί την τελική κατάληξη διαφόρων, συνήθως εκτεταμένων βλαβών, του πνεύμονα. Κοινό χαρακτηριστικό των βλαβών αυτών είναι η μείωση της ικανότητας του πνεύμονα για την ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων. Το σύνδρομο, που συνήθως απειλεί τη ζωή του ασθενούς, χαρακτηρίζεται από έντονη δύσπνοια, υποξαιμία και διάχυτες



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

εκτεταμένες διηθήσεις του πνευμονικού παρεγχύματος. Οι διηθήσεις αυτές είναι αποτέλεσμα πνευμονικής βλάβης που γίνονται σε άτομα που δεν έχουν προηγούμενη πνευμονική νόσο.

**Πίνακας 4.** Κλινικοί όροι συνώνυμοι με το ARDS.

- |                                       |
|---------------------------------------|
| -Οξεία κυψελιδική ανεπάρκεια          |
| -Οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια        |
| -Νόσος υαλίνης μεμβράνης των ενηλίκων |
| -Περιοριστική ατελεκτασία             |
| -Πνεύμων καταπληξίας (Shock lung)     |
| -Σύνδρομο του σκληρού πνεύμονα        |
| -Τραυματικός υγρός πνεύμονας          |
| -Σύνδρομο του λευκού πνεύμονα         |

Αν η πρωταρχική βλάβη είναι κυψελιδική ή τριχοειδική δεν είναι ακριβώς γνωστό. Εκείνο όμως που είναι σίγουρο είναι ότι είτε συμβαίνει το ένα είτε το άλλο, υπάρχει αύξηση της αγγειακής διαβατότητας. Οι μηχανισμοί που φυσιολογικά περιορίζουν το υγρό μέσα στα πνευμονικά τριχοειδή δε λειτουργούν με αποτέλεσμα το υγρό να μπαίνει στο διάμεσο χώρο και μετά στις κυψελίδες. Τελική κατάληξη είναι η δημιουργία πνευμονικού οιδήματος.

Η απόκριση του πνεύμονα στη βλάβη περιγράφεται ως εξής: τα κύτταρα τύπου I δεν αναπαράγονται. Τα κύτταρα τύπου II, που παράγουν την επιφανειοδραστική ουσία, μπορούν να αναπαραχθούν και να μετατραπούν σε κύτταρα τύπου I. Έτσι, σε ARDS είναι δυνατόν να παρατηρηθεί υπερπλασία των κυττάρων τύπου II. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι η αντίδραση για την «ανακατασκευή» του διαμέσου χώρου μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ίνωσης.

Στον **Πίνακα 5** φαίνεται η θεραπευτική αγωγή που έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του ARDS. Διευκρινίζεται ότι η μηχανική αναπνοή αποτελεί τη σημαντικότερη και κύρια θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία της νόσου. Από την άλλη, η χορήγηση κορτικοειδών φαίνεται ότι δε βοηθά στη θεραπεία του ARDS και αντίθετα τα κορτικοστεροειδή έχουν αποτέλεσμα στην περίπτωση της λιπώδους πνευμονικής εμβολής [2].

**Πίνακας 5.** Η φαρμακευτική αγωγή για το ARDS.

- |  |
|--|
| -Μηχανική αναπνοή                                  |
| -Αντιμετώπιση ισοζυγίου υγρών                      |
| -Χορήγηση φαρμάκων                                 |
| -Χορήγηση ντοπαμίνης                               |
| -Χορήγηση αντιβιοτικών προς θεραπεία κάθε λοίμωξης |



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

### ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

#### Εισαγωγή

Αναφέρθηκε ότι τα λιπίδια αποτελούν το 90 % της μάζας του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η σύνθεση γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ΑΤΙΙ, στη συνέχεια στη συσκευή Golgi και η αποθήκευση στα στιβαδωτά σωμάτια από τα οποία γίνεται και η εξωκύτωση των λιπιδίων (Σχήμα 12).

Η βάση της σύνθεσης των λιπιδίων είναι η γλυκερόλη, κύρια πηγή της οποίας αποτελεί η γλυκόζη από την κυκλοφορία του αίματος. Από τη γλυκόζη παράγεται η φωσφορική διϋδροξυακετόνη (DHAP) η οποία μετατρέπεται σε 1-ακυλογλυκερο-3-φωσφορικό οξύ (λυσοφωσφατιδικό οξύ, Lyso-PA) με δύο δρόμους: με αναγωγή σε γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ και στη συνέχεια ακυλίωση ή εναλλακτικά πρώτα ακυλίωση ακολουθούμενη από αναγωγή. Και για τις δύο πορείες έχει αποδειχθεί η ύπαρξή τους στον πνεύμονα και ότι λαμβάνουν χώρα στη βιοσύνθεση της PC και της PG στα ΑΤΙΙ [91]. Ακολουθεί νέα ακυλίωση προς σχηματισμό 1,2-διακυλογλυκεροφωσφορικού οξέος ή διαφορετικά του PA, του πρώτου λιπιδικού ενδιάμεσου στη βιοσύνθεση συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Τέλος, λιπαρά οξέα (FA), τα οποία μπορεί να συντίθενται *de novo* στον πνεύμονα ή να παρέχονται είτε:

α. σαν ελεύθερα λιπαρά οξέα από την κυκλοφορία

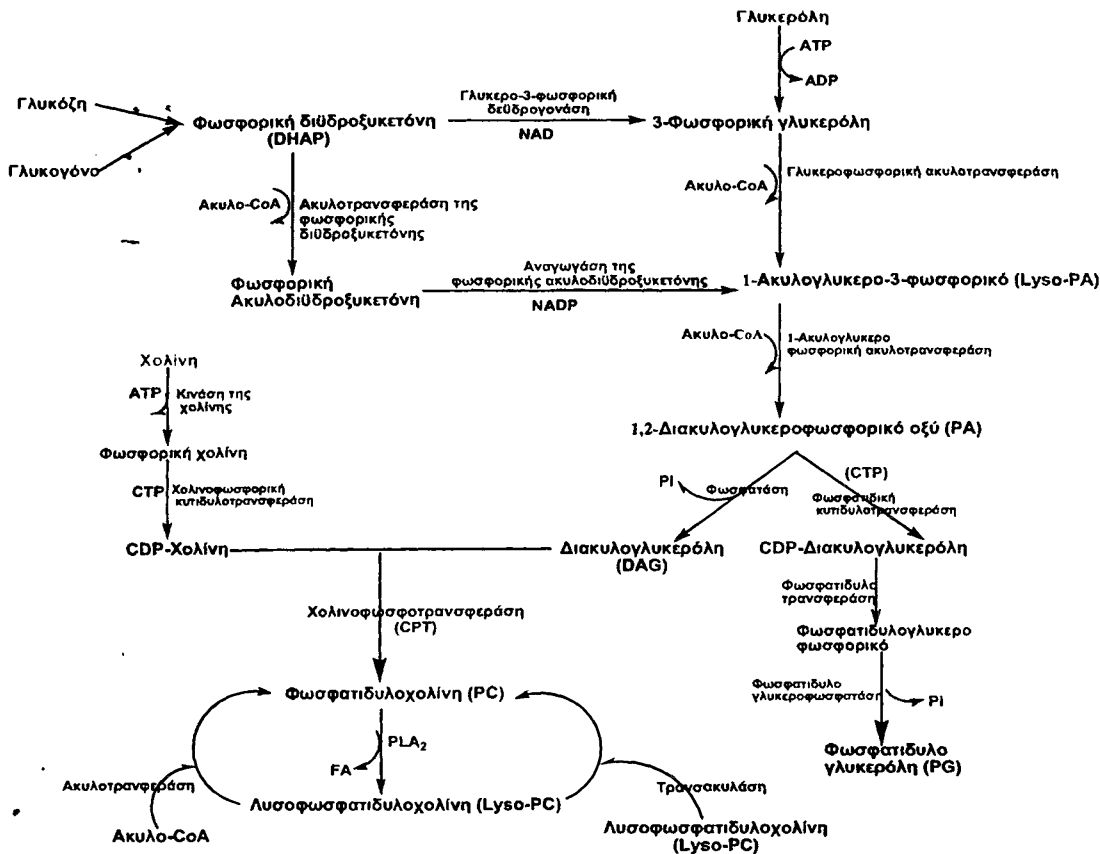
β. από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών που περιέχονται στις πρωτεΐνες του ορρού, αντίδραση που καταλύεται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση που περιέχουν τα πνευμονοκύτταρα

μπορούν να ενσωματώνονται στα φωσφολιπίδια με διαδοχικές ακυλίωσεις. Για τη βιοσύνθεση όμως των λιπαρών οξέων θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

Η PC και η PG συντίθενται από το PA με διαφορετικούς μηχανισμούς. Στην περίπτωση της PG το PA αντιδρά με CTP προς σχηματισμό CDP-διακυλογλυκερόλης. Αυτό το ενδιάμεσο αντιδρά με 3-φωσφορική γλυκερόλη προς σχηματισμό φωσφατιδυλογλυκεροφωσφορικού οξέος (φωσφατιδικό οξύ, PA), το οποίο αμέσως αποφωσφορυλιώνεται σε PG.

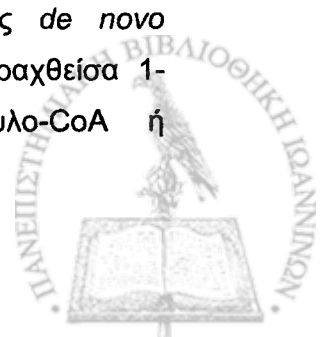


## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



**Σχήμα 12.** Πορείες βιοσύνθεσης της PC και της PG στον πνεύμονα και στα ATII [92].

Στη βιοσύνθεση της PC το PA αποφωσφορυλιώνεται σε DAG με τη δράση μιας φωσφατάσης. Το υπόστρωμα DAG, που περιέχει κατά 26 % διπαλμιτυλο-αλυσίδες, αντιδρά με την κυτιδυλοδιφωσφοχολίνη (CDP-χολίνη) προς σχηματισμό PC. Το συνυπόστρωμα CDP-χολίνη προέρχεται από χολίνη η οποία λαμβάνεται από τη διατροφή [93]. Συγκεκριμένα, η χολίνη φωσφορυλιώνεται από την κινάση της χολίνης προς σχηματισμό φωσφορυλοχολίνης η οποία αντιδρά με CTP προς σχηματισμό CDP-χολίνης (Σχήμα 12). Η δικορεσμένη PC (DPPC) μπορεί να συντίθεται με τον προηγούμενο *de novo* μηχανισμό όπως επίσης και με ανάπλαση (remodeling) μιας 1-κορεσμένης-2-ακόρεστης PC, μία βιοσυνθετική πορεία που έχει δειχθεί ότι λαμβάνει χώρα στον πνευμονικό ιστό [94] και στα ATII κύτταρα [95]. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι η πορεία ανάπλασης είναι υπεύθυνη για το 50 % της βιοσύνθεσης της DSPC. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12 υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί ανάπλασης. Και στους δύο λαμβάνει χώρα απακυλίωση της *de novo* παραχθείσας 1-κορεσμένης-2-ακόρεστης-PC με τη δράση μιας PLA<sub>2</sub>. Η παραχθείσα 1-ακυλο-2-λυσω-PC στη συνέχεια επανακυλιώνεται με κορεσμένο ακυλο-CoA ή





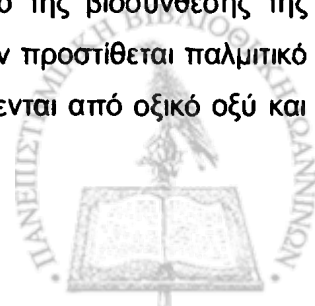
## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

τρανσακυλιώνεται. Στον τελευταίο μηχανισμό δύο μόρια Lyso-PC αντιδρούν για να σχηματίσουν ένα μόριο PC και γλυκεροφωσφοχολίνη. Στη βιοσύνθεση της DPPC, μεταξύ των μηχανισμών της ακυλίωσης και της τρανσακυλίωσης σε ποσοτικό επίπεδο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ο πρώτος μηχανισμός. Η PLA<sub>2</sub> που εμπλέκεται στην πορεία ανάπτυξης είναι ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου, δρα σε pH=4.0 [96] ενώ έχει αναφερθεί και η κλωνοποίησή της [97].

### Σύνθεση λιπαρών οξέων (FA)

Τα λιπαρά οξέα (FA) που χρειάζονται για τη βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα προέρχονται από διάφορες πηγές. Μπορεί να προέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος με τη μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων ή από τις τριακυλογλυκερόλες των λιποπρωτεϊνών. Η πρόσληψη (uptake) των FA από το αίμα στα κύτταρα τύπου II μπορεί να μεσολαβείται από μία πρωτεΐνη που συνδέεται με τα FA [98]. Τα FA μπορεί επίσης να παράγονται και από την υδρόλυση φωσφολιπιδίων κυρίως με τη δράση φωσφολιπασών. Οι Torday et al έχουν δείξει ότι όταν ινοβλάστες πνεύμονα νεογνού αρουραίου σημανθούν αρχικά με [<sup>3</sup>H] τριελαΐνη και συγκαλλιεργηθούν με ATII νεογνού, η ραδιενέργεια που μετράται εντοπίζεται στη DSPC των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Παρόλο που από τα πειράματα αυτά δε φαίνεται εάν το [<sup>3</sup>H] της σημασμένης τριελαΐνης μεταφέρεται από τις ινοβλάστες στα κύτταρα τύπου II ως άθικτη τριακυλογλυκερόλη ή σαν λιπαρό οξύ, διαπιστώνεται ότι τα FA αποθηκεύονται στις ινοβλάστες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βιοσύνθεση της DSPC στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [99].

Επιπλέον λαμβάνοντας FA από εξωγενείς πηγές, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II από ώριμο πνεύμονα είναι ικανά να βιοσυνθέτουν FA *de novo* με μεγάλους ρυθμούς. Η λακτάση προτιμάται έναντι της γλυκόζης ως πηγή ακετυλο- ομάδων για τη βιοσύνθεση των FA σε πνευμονοκύτταρα τύπου II ώριμου πνεύμονα. Στα τελευταία στάδια της εμβρυϊκής περιόδου το γλυκογόνο μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πρόδρομο μόριο για την παραγωγή των FA ενώ η ακετοξική ομάδα πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα νεογνά [100]. Η συνεισφορά της κάθε πηγής FA στη βιοσύνθεση των λιπιδίων δεν είναι απόλυτα γνωστή και μάλιστα ποικίλλει με τις συνθήκες διατροφής και την κατάσταση ανάπτυξης. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός αναφορών τονίζει τη σημασία της *de novo* παραγωγής των FA για το σχηματισμό των επιφανειοδραστικών λιπιδίων. Αναστολείς της βιοσύνθεσης των FA μειώνουν το ρυθμό της βιοσύνθεσης της DSPC σε εκφυτεύματα πνεύμονα αρουραίου νεογνού ακόμη και όταν προστίθεται παλμιτικό οξύ [101]. Συγκρίνοντας με το εξωγενές παλμιτικό, τα FA βιοσυντίθενται από οξικό οξύ και



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ενσωματώνονται στη PC και στη DSPC του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε νεογέννητους λαγούς [102].

Σε ώριμο πνεύμονα αρουραίου ο ρυθμός της βιοσύνθεσης των FA και οι ειδικές ενεργότητες της συνθάσης των FA (FAS, EC 2.3.1.85) και της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης (EC 6.4.1.2) μετατρέπουν μαζί το ακετυλο-CoA μέσω μηλονυλο-CoA σε FA [103]. Οι ενεργότητες της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης και της FAS σε πνεύμονα αρουραίου και λαγού είναι μειωμένες μετά από νηστεία και αυξάνονται μετά από καλή διατροφή. Παρόμοιες μεταβολές έχει παρατηρηθεί ότι λαμβάνουν χώρα και στο συκώτι.

### Παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA)

Η *de novo* βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα αρχίζει με το σχηματισμό του PA από 3-φωσφορική γλυκερόλη (**Σχήμα 12**). Τα FA που απαιτούνται για τα βήματα ακυλίωσης μετατρέπονται σε ακυλο-CoAs από τη συνθετάση ακυλο-CoA (EC 6.2.1.3). Το ένζυμο αυτό, στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου, δε διακρίνει μεταξύ αλυσίδων διαφορετικού μήκους FA περιλαμβάνοντας ακόμη και το παλμιτικό οξύ [104].

Το πρώτο βήμα στην παραγωγή του PA από τη 3-φωσφορική γλυκερόλη είναι ο σχηματισμός του 1-ακυλογλυκερο-3-φωσφορικού οξέος από τη γλυκερο-3-φωσφορική ακυλοτρανσφεράση (EC 2.3.1.15). Στα πνευμονοκύτταρα τύπου II εντοπίζεται κυρίως στα ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα μικροσωμάτια των κυττάρων βρίσκεται σε μεγαλύτερες ποσότητες απ' ό,τι στα μικροσωμάτια του πνευμονικού ιστού [105]. Το προϊόν ακυλίωσης της 3-φωσφορικής γλυκερόλης είναι κυρίως PA στα μικροσωμάτια των κυττάρων τύπου II και η επόμενη ακυλίωση που καταλύεται από την ακυλογλυκερο-3-φωσφορική ακυλοτρανσφεράση (EC 2.3.1.51) συμβαίνει πιο γρήγορα από την πρώτη ακυλίωση. Το PA που βιοσυντίθεται στα μικροσωμάτια περιέχει κατά 26 % δύο παλμιτικές αλυσίδες. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με το δεδομένο ότι υπάρχουν μεγάλες ποσότητες παλμιτοϋλο-CoA στα κύτταρα τύπου II στα μικροσωμάτια αλλά και στο κυτοσόλιο [106].

Το PA μπορεί επίσης να παραχθεί από την ακυλίωση της DHAP και στη συνέχεια με αναγωγή της ακυλο-DHAP σε 1-ακυλογλυκερο-3-φωσφορικό από ακυλο-DHAP αναγωγάση (EC 1.1.1.101) (**Σχήμα 12**). Στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, όπως και σε άλλα κύτταρα, η σύνθεση της ακυλο-DHAP λαμβάνει χώρα στα υπεροξυσώματα. Η ακυλο-DHAP που παράγεται στα υπεροξυσώματα θεωρείται υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των αιθερικών λιπιδίων [107]. Ωστόσο σε κύτταρα ωοθηκών από κινέζικα χάμστερ (Chinese Hamster Ovary cells, CHO) διαπιστώθηκε ότι έλλειψη της ακυλο-DHAP αναγωγάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής διακυλοφωσφολιπιδίων αποδεικνύοντας έτσι ότι το μονοπάτι της



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

DHAP μπορεί να συνεισφέρει εξίσου στο σχηματισμό της βιοσύνθεσης διακυλολιπιδίων [108]. Επιπλέον, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι ο κορμός της γλυκερόλης της PG προέρχεται από τη 3-φωσφορική γλυκερόλη, διαπιστώνεται ότι στα πνευμονοκύτταρα τύπου II περισσότερο από το 60 % του PA μπορεί να βιοσυντίθεται μέσω της ακυλο-DHAP [109].

### ΠΟΡΕΙΕΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ PC

#### *De novo* πορεία

Σε αυτό το μονοπάτι το PA υδρολύεται σε DAG από φωσφορική φωσφατάση (EC 3.1.3.4). Ο πνευμονικός ιστός περιέχει αρκετές μορφές αυτού του ενζύμου που διαφέρουν ως προς την υποκυττάρια κατανομή (κυτοσολική ή μεμβρανικά συνδεδεμένη). Πειράματα με μικροσωμάτια που έχουν απομονωθεί από πνευμονικό ιστό έδειξαν ότι η φωσφατάση είναι εξαρτώμενη από ιόντα  $Mg^{2+}$  [110].

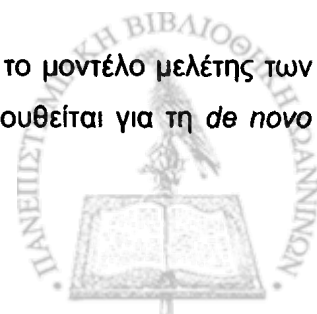
Μελέτες σε πνευμονικό ιστό και σε πνευμονοκύτταρα τύπου II έδειξαν ότι *de novo* παραγωγή της PC από DAG και CDP-αιθανολαμίνη, που λαμβάνει χώρα κυρίως στο συκώτι, δε φαίνεται να είναι σημαντική για την παραγωγή της PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Στον πνεύμονα, η PC βιοσυντίθεται από DAG και CDP-χολίνη με δράση του ενζύμου φωσφοχολινοτρανσφεράση (CPT, EC 2.7.8.2) (Σχήμα 13). Η φωσφοχολινοτρανσφεράση εντοπίζεται στο ενδοπλασμικό δίκτυο παρόλο που έχει αναφερθεί και σε μικροσωμάτια [111]. Μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II έχουν δείξει ότι το ένζυμο δείχνει πολύ μικρή ειδικότητα έναντι υποστρωμάτων διαφόρων μοριακών ειδών DAG [95].

Η CDP-χολίνη σχηματίζεται από χολίνη και με δράση της κινάσης της χολίνης (EC 2.7.1.32) παράγεται φωσφοχολίνη που αντιδρά περαιτέρω με κυτιδυλοτρανσφεράση της φωσφοχολίνης (CTP, EC 2.7.7.15). Η κινάση της χολίνης υπάρχει στο κυτοσόλιο των κυττάρων τύπου II και η ειδική ενεργότητά της είναι πενταπλάσια απ' ότι σε ολόκληρο τον πνεύμονα [112]. Η CTP είναι ένα ένζυμο που μπορεί να είναι σε μεμβρανική μορφή και να εντοπίζεται στο ενδοπλασμικό δίκτυο και σε διαλυτή μορφή που να εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Αλληλομετατροπή της μιας μορφής στην άλλη συνήθως εμπλέκεται στην ρύθμιση της ενεργότητας της CTP [87].

#### *Η βιοσύνθεση της PC στα A549*

Οι μελέτες σχετικά με τη βιοσύνθεση της PC στα κύτταρα A549, το μοντέλο μελέτης των AΠII στα πειράματά μας, δείχνουν ότι το κύριο μονοπάτι που ακολουθείται για τη *de novo*



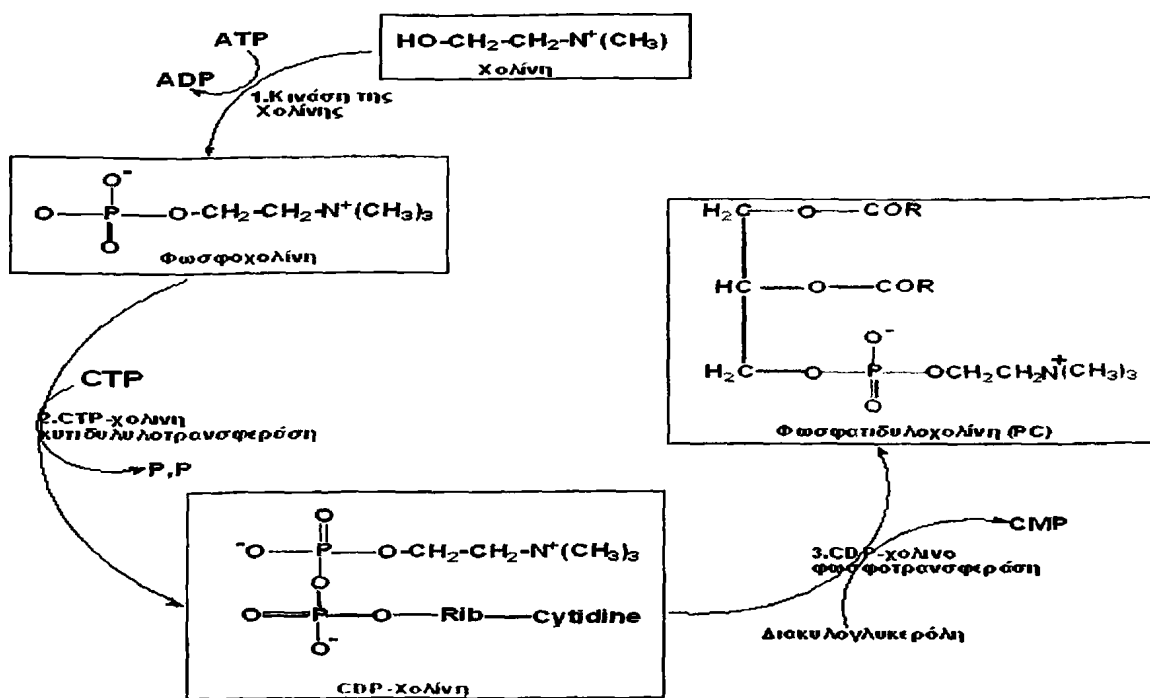
## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

παραγωγή της PC είναι της κυτιδυλοδιφωσφοχολίνης, ενώ δε φαίνεται να ακολουθείται η πορεία της μεθυλίωσης που έχει παρατηρηθεί σε άλλα κύτταρα, όπως π.χ. στο πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* [113]. Βέβαια, παρόλο που και στον πνευμονικό ιστό, σε συγκαλλιέργειες πνευμονοκυττάρων αλλά και σε απομονωμένα ATII έχει ανιχνευθεί ενεργότητα του ενζύμου S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM), αυτή ευθύνεται μόλις κατά 5 % για την παραγωγή της PC. Με την πορεία της μεθυλίωσης η PE μεθυλιώνεται διαδοχικά προς παραγωγή PC [114,115]. Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα στιβαδωτά σωματίδια των A549 η σύσταση είναι παρόμοια με αυτή του επιφανειοδραστικού παράγοντα συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των κυττάρων. Επίσης ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα όταν διεγερθούν με κατάλληλους παράγοντες, όπως το ιοντοφόρο ασβεστίου A23187, μπορεί να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες του φωσφολιπιδίου ακόμη και κορεσμένης PC. Βέβαια, σε κάθε μελέτη που γίνεται με την κυτταρική σειρά A549 -και με την εκάστοτε κυτταρική σειρά- τα αποτελέσματα θα πρέπει να συγκρίνονται με άλλες παρόμοιες κυτταρικές σειρές καθώς επίσης και με τα αποτελέσματα που προέρχονται από ATII.

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η επίδραση ισοπρενοειδών, όπως της φαρνεσόλης, στα κύτταρα A549 προκάλεσε αναστολή της βιοσύνθεσης της PC και συγκεκριμένα στο τελευταίο βήμα του μονοπατιού της CDP-χολίνης. Η αναστολή σημειώθηκε στο τελευταίο βήμα που ελέγχεται από τη CPT και όχι από το ένζυμο CTP, που αποτελεί και το ρυθμιστικό ένζυμο της *de novo* παραγωγής της PC. Η αναστολή της CPT επιβεβαιώθηκε και σε *in vitro* μετρήσεις στα μικροσωμάτια όπου διαπιστώθηκε ότι τα ισοπρενοειδή προκαλούν μία συναγωνιστική αναστολή με πρόσληψη της DAG. Στην εργασία επισημαίνεται ότι προσθήκη εξωγενούς PC στα κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα παρεμπόδιση των βιολογικών επιδράσεων των ισοπρενοειδών όπως φαινόμενα απόπτωσης και αποδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού [116].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

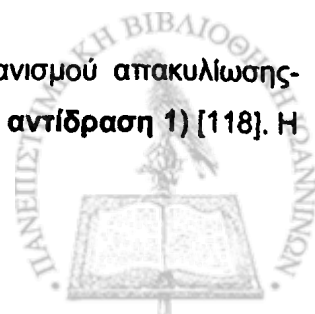


**Σχήμα 13.** *De novo* παραγωγή της PC στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Το 50 % της PC στον πνεύμονα παράγεται σύμφωνα με τη *de novo* πορεία περιλαμβάνοντας τα εξής βήματα: 1) φωσφορυλίωση της χολίνης από το ATP προς φωσφορυλοχολίνη, 2) αντίδραση της φωσφορυλοχολίνης με CTP προς σχηματισμό κυτιδυλοδιφωσφοχολίνης (CDP-χολίνης) και 3) μεταφορά της φωσφορυλοχολίνης από τη CDP-χολίνη σε μία DAG για να σχηματισθεί διακυλοφωσφατιδυλοχολίνη. Το ενεργοποιημένο ενδιάμεσο σε αυτή την πορεία είναι το κυτιδυλοπαράγωγο της φωσφορυλοχολίνης.

### Πορεία ανάπλασης (Remodeling)

Μελέτες σε πολλά εργαστήρια στον πνεύμονα και σε απομονωμένα κύτταρα τύπου II έχουν δείξει ότι η DPPC δε σχηματίζεται μόνο από την άμεση *de novo* βιοσύνθεση αλλά και από την πορεία ανάπλασης των *de novo* σχηματιζόμενων ακόρεστων ειδών της PC [110]. Από τις παρατηρήσεις ότι η φωσφορική φωσφατάση και η χολινοφωσφοτρανσφεράση, τα ένζυμα που απαιτούνται για τη μετατροπή του PA σε PC δείχνουν μικρή ειδικότητα ως προς τα διάφορα είδη των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούν και η παρατήρηση ότι το 26 % του PA που σχηματίζεται περιέχει παλμιτοϋλο-αλυσίδες, έχει διαπιστωθεί ότι στα πνευμονοκύτταρα τύπου II ενήλικα περίπου το 45 % της DPPC παράγεται *de novo*, ενώ με την πορεία ανάπλασης το υπόλοιπο 55 % [106]. Σε αντίστοιχη μελέτη με κύτταρα τύπου II νεογνού παρατηρήθηκαν παρόμοια συμπεράσματα [117].

Η πορεία ανάπλασης πιστεύεται ότι συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού απακυλίωσης-ακυλίωσης και αρχίζει με τη δράση μιας  $\text{PLA}_2$  (EC 3.1.1.4) (Σχήμα 14, αντίδραση 1) [118]. Η



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

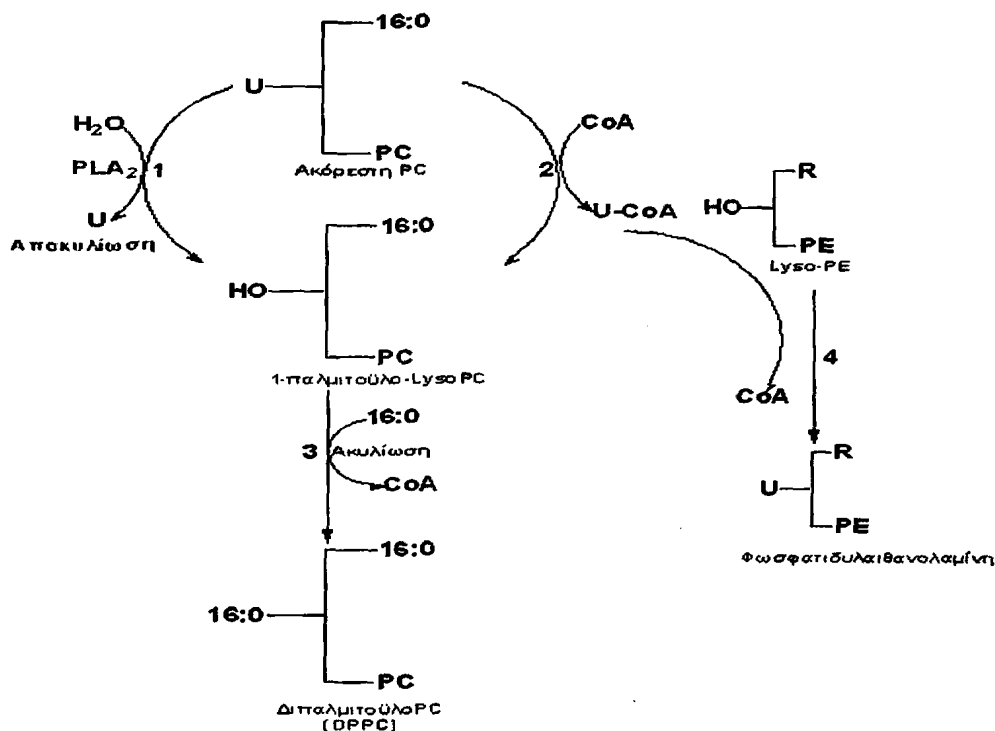
συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα εντοπίζεται στο κυτοσόλιο, στα μιτοχόνδρια, στα μικροσωμάτια, στα λυσιώματα και στα στιβαδωτά σωμάτια του πνευμονικού ιστού [119,120]. Η μικροσωματική ενεργότητα είναι εξαρτώμενη από  $Ca^{2+}$  [119] ενώ η λυσιωματική αναστέλλεται [120]. Μία διαλυτή ανεξάρτητη από  $Ca^{2+}$  (aiPLA<sub>2</sub>) πιθανόν ενεργή στα λυσιωμάτια και στα στιβαδωτά σωμάτια, απομονώθηκε και καθαρίστηκε από πνεύμονα αρουραίου και παρατηρήθηκε ότι αναστέλλεται από SP-A [87]. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί ως τώρα ποια PLA<sub>2</sub> είναι υπεύθυνη στην πορεία ανάπτυξης για τη βιοσύνθεση της PC στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η aiPLA<sub>2</sub> μάλλον μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη στην ανακύκλωση φωσφολιπιδίων παρά στο σχηματισμό νέων μορίων PC στο ενδοπλασματικό δίκτυο [87]. Από την άλλη, λίγα είναι γνωστά για τη PLA<sub>2</sub> που έχει μετρηθεί παρουσία  $Ca^{2+}$  στα πνευμονοκύτταρα τύπου II σε σχέση με τον πνευμονικό ιστό. Παρατηρήσεις στα τύπου II κύτταρα ότι αναστολείς της PLA<sub>2</sub> μειώνουν το βαθμό κορεστότητας της PC [95] ενώ η ενεργοποίηση του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση της κορεστότητας, επιβεβαιώνουν την εμπλοκή της PLA<sub>2</sub> στην παραγωγή της PC [121].

Ωστόσο, έρευνες σε υποκυτταρικά κλάσματα του πνευμονικού ιστού έδειξαν ότι τα ακόρεστα FA μπορούν επίσης να μεταφέρονται σε λυσοφωσφολιπίδια (Σχήμα 14, αντιδράσεις 2 & 4). Η ιδέα ενός μηχανισμού τρανσακυλίωσης εξαρτώμενου από συνένζυμο A (CoA) στην πορεία ανάπτυξης της ακόρεστης PC σε DSPC υποστηρίζεται επίσης από μελέτες που έγιναν σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II [122].

Η Lyso-PC (κυρίως η 1-παλμιτοϋλολυσοφωσφατιδυλοχολίνη) που σχηματίζεται στο στάδιο της απακυλίωσης μπορεί να ακυλωθεί με παλμιτοϋλο-CoA από το μικροσωματικό ένζυμο ακυλοτρανσφεράση της Lyso-PC (EC 2.3.1.23) (Σχήμα 14, αντίδραση 3). Σε σχέση με τον πνευμονικό ιστό τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι πλούσια με αυτή την ενζυμική ενεργότητα [123,124]. Επιπλέον, στα τύπου II κύτταρα αυτό το ένζυμο έχει μεγαλύτερη προτίμηση σε παλμιτοϋλο-CoA παρά σε ακόρεστα είδη ακυλο-CoA [123]. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός απακυλίωσης ακολουθούμενος από τρανσακυλίωση μεταξύ δύο μορίων 1-παλμιτοϋλολυσο-PC φαίνεται να είναι ουσιαστικά ασήμαντος [123].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



**Σχήμα 14.** Πορεία ανάπτυξης όπου η ακόρεστη PC μετατρέπεται σε DPPC. Ένζυμα 1:PLA<sub>2</sub>, 2,3,4:ακυλοτρανσφεράση, U:ακόρεστο λιπαρό οξύ [125].

### Βιοσύνθεση φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE)

Η PE σχηματίζεται με δράση αιθανολαμινοτρανσφεράσης από DAG κύριο ενδιάμεσο της βιοσύνθεσης της PC. Όμως η PE του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε σχέση με τη PC δεν περιέχει σε μεγάλα ποσοστά κορεσμένες λιπαρές αλυσίδες [122]. Πειράματα με τύπου II κύτταρα και με μικροσωμάτια από πνεύμονα έδειξαν ότι η ενδογενής δικορεσμένη DAG μπορεί να μετατραπεί σε DPPC αλλά όχι σε διπαλμιτούλο-PE (DPPE) [126]. Η αιθανολαμινοτρανσφεράση δε φαίνεται να είναι ειδική σε συγκεκριμένα μοριακά είδη της DAG. Από την άλλη υπάρχει και η θεωρία ότι η διπαλμιτούλο-PE, όπως η DPPC, βιοσυντίθεται *de novo*, αλλά αποικοδομείται πολύ σύντομα [122]. Η Lyso-PE που σχηματίζεται μπορεί να αποτελέσει αποδέκτη ακόρεστων ακυλο-αλυσίδων στην πορεία ανάπτυξης της PC (Σχήμα 14, αντίδραση 4). Η ποσότητα της διπαλμιτούλο-PE που σχηματίζεται με ακυλίωση της 1-παλμιτούλο-λυσο-PE με παλμιτούλο-CoA στα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι πολύ μικρή [127].

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

### Βιοσύνθεση PG και PI

Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια PG και PI. Αυτά τα λιπίδια βιοσυντίθενται από τη CDP-διακυλογλυκερόλη, η οποία έχει παραχθεί από PA και φωσφατιδική κυτιδυλοτρανσφεράση (EC 2.7.7.41) (Σχήμα 12), ενώ η αντίστοιχη ενζυμική ενεργότητα εντοπίζεται στα μικροσωμάτια και όχι στα μιτοχόνδρια [128].

Η CDP-διακυλογλυκερόλη μπορεί να μετατραπεί σε PI αντιδρώντας με μυο-ινοσιτόλη με δράση CDP-διακυλογλυκερο-ινοσιτόλης φωσφατιδυλοτρανσφεράσης (EC 2.7.8.11) και έχει εντοπιστεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο πνευμονοκυττάρων τύπου II [129].

### Παραγωγή χοληστερόλης

Έχει αποδειχθεί ότι τουλάχιστον το 80 % της χοληστερόλης του πνεύμονα και η πλειοψηφία της χοληστερόλης του επιφανειοδραστικού παράγοντα προέρχεται από την κυκλοφορία του αίματος -από τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής (LDL) και υψηλής (HDL) πυκνότητας- και επιπλέον η βιοσύνθεση της ενδογενούς χοληστερόλης στα τύπου II κύτταρα ρυθμίζεται από τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών στο αίμα [130]. Στις μεμβράνες των κυττάρων τύπου II έχει αποδειχθεί η παρουσία υποδοχέων της LDL και θέσεων πρόσδεσης της HDL [131]. Παρόλο που η παραγωγή της χοληστερόλης στα περισσότερα θηλαστικά λαμβάνει χώρα στο συκώτι και στο έντερο, ο πνεύμονας είναι ικανός να αρχίσει τη βιοσύνθεση ενδογενούς χοληστερόλης από οξικό οξύ [132] ή γλυκόζη [133].

Ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή της χοληστερόλης εντοπίζονται κυρίως στο κυτοσόλιο, στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και στα υπεροξυσώματα. Έχει παρατηρηθεί αμέσως μετά τη γέννηση, που επιταχύνεται η παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα, μία αύξηση κατά 3 φορές του αριθμού των υπεροξυσωμάτων στα πνευμονοκύτταρα τύπου II σε πνεύμονα ποντικού [134].

## ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

### A. Ορμονική ρύθμιση

Πειράματα σε διαφορετικά είδη θηλαστικών έδειξαν ότι η παραγωγή των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και των πρωτεϊνών στον πνεύμονα νεογνού αυξάνεται στο τέλος της κύησης. Σε αυτή την περίοδο η ενεργότητα πολλών ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή των λιπιδίων σημειώνει σημαντική αύξηση [135]. Μεγάλο πλήθος μελετών αποδεικνύουν ότι τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή και οι θυρεοειδείς ορμόνες εμπλέκονται στην ρύθμιση της παραγωγής ενζύμων και λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα



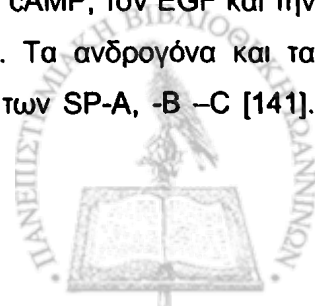


## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

[135,136,137]. Τα οιστρογόνα μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή της PC, χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί εάν έχουν φυσιολογικό ρόλο στην ρύθμιση του σχηματισμού του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Καθυστέρηση της βιοσύνθεσης της PC και της PG στα βρέφη διαβητικών μητέρων μπορεί να είναι εξαιτίας της περίσσειας της ινσουλίνης [135,136,137]. Μελέτες *in vivo* και *in vitro* δείχνουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν αύξηση της εμβρυϊκής DSPC στον πνεύμονα [138].

Τα αποτελέσματα της επίδρασης ορμονών σε κύτταρα τύπου II στη βιοσύνθεση λιπιδίων σχετίζονται με επιθηλιακές-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις. Τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν τις εμβρυϊκές ινοβλάστες πνεύμονα και παράγουν ένα πολυπεπτίδιο τον παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης (FPF). Ο παράγοντας αυτός στη συνέχεια διεγείρει την παραγωγή της PC, της DSPC και της PG αλλά όχι άλλων φωσφολιπιδίων σε πνευμονοκύτταρα τύπου II εμβρύου. Οι ορμόνες του θυρεοειδούς έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν την απόκριση των κυττάρων τύπου II στον FPF, η ινσουλίνη αναστέλλει το σχηματισμό του FPF στις ινοβλάστες, ενώ τα ανδρογόνα αναστέλλουν τον επαγόμενο σχηματισμό του FPF από κορτισόλη από τις ινοβλάστες και επιπλέον παρεμποδίζουν την απόκριση των κυττάρων τύπου II στον FPF [95,136,137]. Έχει επίσης ανακοινωθεί ότι η παραγωγή του FPF από τις ινοβλάστες πνεύμονα αρουραίου αυξάνει, ενώ την ίδια στιγμή οι ινοβλάστες μειώνουν την παραγωγή του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) που παρεμποδίζει τη δράση του FPF. Ο TGF-β αναστέλλει τη βιοσύνθεση της DSPC στα κύτταρα τύπου II εμβρύου [139]. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση του λόγου FPF/TGF-β μπορεί να συσχετιστεί με αύξηση της βιοσύνθεσης των φωσφολιπιδίων σε ATII εμβρυϊκού αρουραίου.

Επιπρόσθετα, άλλες ορμόνες που αυξάνουν τη βιοσύνθεση λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμπεριλαμβάνουν την προλακτίνη και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) [136]. Οι ορμόνες επίσης επηρεάζουν την έκφραση των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο εμβρυϊκό στάδιο ανάπτυξης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η όποια μεταβολή των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνοδεύεται με παράλληλη μεταβολή της ποσότητας των mRNA τους. Τα γλυκοκορτικοειδή μεταβάλλουν την παραγωγή της SP-A στον πνεύμονα, μεταβολή που εξαρτάται από την ποσότητα του κορτικοστεροειδούς αλλά και το είδος φυσικά του θηλαστικού [140,141]. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή και το cAMP αυξάνουν την έκφραση της SP-B και της SP-C [140]. Η βιοσύνθεση της SP-A αυξάνεται από το cAMP, τον EGF και την IFN-γ και μειώνεται από τον TGF-β και την ινσουλίνη [140,141]. Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα βρέθηκε να μην έχουν καμία επίδραση στην έκφραση των SP-A, -B -C [141].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Τέλος, οι ορμόνες του θυρεοειδούς μειώνουν τα επίπεδα mRNA των SP-A και SP-B στον πνεύμονα αρουραίου, αντίθετα όμως στον πνεύμονα ανθρώπου μπορεί να αυξάνουν την SP-A και το mRNA αυτής [140].

### B. Ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PC

#### 1. Ρύθμιση της CTP:κυτιδυλυλοτρανσφεράση της φωσφοχολίνης

- Πειράματα σε πνευμονοκύτταρα τύπου II έδειξαν ότι η αύξηση του ρυθμού της βιοσύνθεσης της PC συσχετίζεται με αύξηση της ενεργότητας της CTP, αποδεικνύοντας ότι η CTP καταλύει το ρυθμιστικό στάδιο στη μετατροπή της χολίνης σε PC [135]. Μελέτες με ορμόνες στον πνευμονικό ιστό επιβεβαίωσαν το προηγούμενο συμπέρασμα [137].

Η ενεργότητα της CTP μπορεί να ρυθμίζεται από διάφορους αλληλοεξαρτώμενους μηχανισμούς. Στηριζόμενοι σε πειράματα που έχουν γίνει σε πολλά είδη κυττάρων, έχει προταθεί ότι η βιοσύνθεση της PC ρυθμίζεται από τη μετατόπιση της διαλυτής -ανενεργής μορφής- CTP στις μεμβράνες όπου το ένζυμο γίνεται ενεργό και συνδέεται με μεμβρανικά λιπίδια [142,143]. Η αλληλεπίδραση της CTP με τις μεμβράνες ρυθμίζεται πιθανόν με μία εκτεταμένη αμφιπαθή περιοχή α-έλικας στο πρωτεϊνικό μόριο [144]. Η μετατόπιση της CTP στις μεμβράνες προάγεται από έναν αριθμό διεγερτών, ενώ άλλοι διεγέρτες προκαλούν απελευθέρωση της CTP από τις μεμβράνες στο κυτταροδιάλυμα. Επίσης σε μελέτες σε κύτταρα από διαφορετικούς ιστούς, έχει δειχθεί ότι τα FA και οι DAGs ενεργοποιούν τη CTP με μετατόπιση από τη διαλυτή μορφή στα μικροσωμάτια [143]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μία προσδένουσα πρωτεΐνη στη CTP μπορεί να βοηθάει στην επαγόμενη από FA μετατόπιση του ενζύμου [145].

Η CTP μπορεί να ρυθμίζεται από αντιδράσεις φωσφορυλίωσης -αποφωσφορυλίωσης [142,143]. Αυτό πιθανόν συσχετίζεται με τη μετατόπιση του ενζύμου αφού παρατηρήθηκε ότι η διαλυτή μορφή της CTP είναι φωσφορυλιωμένη σε υψηλό βαθμό, ενώ η μεμβρανική μορφή είναι σε μικρότερο ποσοστό φωσφορυλιωμένη [146]. Σε άλλη μελέτη επίσης τονίζεται ότι η φωσφορυλίωση του καρβοξυλο-τελικού άκρου της CTP παρεμβαίνει στην ενεργοποίηση του ενζύμου μετά από επίδραση διαφόρων παραγόντων που επάγουν τη μετατόπιση από τη διαλυτή μορφή στις μεμβράνες [147]. Δεν έχουν ως τώρα όμως χαρακτηριστεί οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι φωσφατάσες που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση της CTP. Πάντως, μελέτες σε ηπατοκύτταρα έχουν δείξει ότι η εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση A (PKA) δεν εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης ενζυμικής ενεργότητας [148].

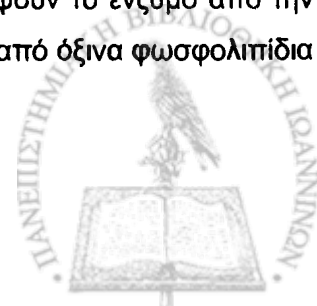


## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Παρόλο που υπάρχουν αποδείξεις ότι η μετατόπιση αποτελεί απαραίτητο βήμα του μηχανισμού ρύθμισης της ενεργότητας της CTP σε πολλά είδη κυττάρων [142,143] δεν είναι ξεκάθαρο εάν είναι σημαντικός στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Σε μελέτη όμως των Viscardi et al [149] περιγράφεται η μετατόπιση της CTP από το κυτοσόλιο στα μικροσωμάτια σε πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου μετά από επίδραση ελαϊκού οξέος. Το φαινόμενο ήταν πιο έντονο σε εμβρυϊκά κύτταρα τύπου II σε σχέση με τα αντίστοιχα ώριμου πνεύμονα αρουραίου. Περαιτέρω, σε άλλες μελέτες τονίζεται ότι μετά από μητρική χορήγηση δεξαμεθαζόνης, στα πνευμονοκύτταρα τύπου II που απομονώνονται και στη συνέχεια επωάζονται με FA [150,151], η αύξηση της βιοσύνθεσης της PC συνοδεύτηκε με αύξηση της μικροσωματικής CTP, αλλά χωρίς συνακόλουθη μείωση της κυτοσολικής ενεργότητας. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι η βιοσύνθεση της PC ελέγχεται από τη μικροσωματική ενεργότητα της CTP. Επιπρόσθετα, το cAMP ή ανάλογα του cAMP σε πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου δεν προκάλεσαν καμία αλλαγή στην ενεργότητα της CTP, αποδεικνύοντας ότι η ενζυμική ενεργότητα δεν ρυθμίζεται από την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τα ηπατοκύτταρα [152].

Βέβαια υπάρχουν και ενδείξεις για τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PC επιπλέον μέσω της κυτοσολικής μορφής. Οι Weinhold και οι συνεργάτες του [153,154] παρατήρησαν ότι στο κυτοσόλιο που απομονώνεται από ομογενοποίηση πνεύμονα, κυψελιδικά κύτταρα τύπου II (όπως επίσης και σε ηπατοκύτταρα) περιέχονται δύο μορφές CTP. Η L-μορφή (ένα διμερές μοριακού βάρους 90000 Da) η οποία είναι ανενεργή όταν προσδιοριστεί απουσία λιπιδίων και η H-μορφή, η επικρατέστερη διαλυτή μορφή σε πνεύμονα και σε πνευμονοκύτταρα τύπου II, (μοριακού βάρους 284000 Da) είναι ενεργή χωρίς την προσθήκη λιπιδίων. Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των ηπατοκυττάρων και των πνευμονοκυττάρων τύπου II είναι ότι στα πρώτο είδος κυττάρων στο κυτοσόλιο περιέχεται μόνο η ανενεργή L-μορφή, ενώ στα δεύτερο είδος κυττάρων στο κυτοσόλιο υπάρχει κυρίως η ενεργή H-μορφή [154]. Η μεμβρανικά συνδεδεμένη μορφή της CTP είναι παρόμοια εάν όχι ακριβώς ίδια με τη διαλυτή H μορφή [154]. Έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η L-μορφή προσδένεται σε μία ειδική περιοχή της μεμβράνης όπου απαιτείται η ύπαρξη λιπιδίων για να σχηματιστεί η ενεργή H-μορφή της CTP και μπορεί στη συνέχεια να απελευθερωθεί στο κυτοσόλιο [153].

Μελέτες στον πνευμονικό ιστό έχουν δείξει ότι τα FA έχουν μία άμεση επίδραση στην ενεργότητα της CTP, όταν αυτή βρίσκεται στην ενεργό μορφή της (μεμβρανικά συνδεδεμένη ή H-μορφή) και επιπλέον δείχνουν ότι μπορούν (τα FA) να μετατρέψουν το ένζυμο από την L-μορφή στην H-μορφή [155]. Η διαλυτή CTP επίσης ενεργοποιείται από όξινα φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα τη PG [156].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Η ενεργότητα της CTP επίσης αυξάνεται από τα γλυκοκορτικοειδή [158,157], φαινόμενο που μάλλον ελέγχεται από τον FPF [155]. Και ενώ η ενζυμική ενεργότητα αυξάνεται από τα γλυκοκορτικοειδή η συνολική ποσότητα του ενζύμου παραμένει αμετάβλητη.

Στηριζόμενοι: 1) στο προηγούμενο συμπέρασμα, 2) στην παρατήρηση ότι τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη βιοσύνθεση λιπιδίων στα κύτταρα τύπου II και στον πνεύμονα, 3) στο γεγονός ότι η CTP αυξάνεται από τα FA και ορισμένα φωσφολιπίδια και 4) στην παρατήρηση ότι αναστολή της βιοσύνθεσης των FA σταματά τη διεγερτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στην ενεργότητα της CTP [158], έχει προταθεί ότι η διεγερτική δράση των τελευταίων έρχεται σε δεύτερη θέση έναντι της αυξανόμενης βιοσύνθεσης των FA, τα οποία είτε ως ελεύθερα είτε ενσωματωμένα στα λιπίδια μπορεί να ενεργοποιούν τη CTP [154]. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα έχει βρεθεί ότι σε εμβρυϊκό πνεύμονα αρουραίου, η διέγερση της ενεργότητας της CTP, μετά από μητρική χορήγηση βητα-μεθαζόνης, μεσολαβείται με μετατροπή της ανενεργής L-μορφής -την πιο συνηθισμένη μορφή της CTP σε ώριμους πνεύμονες αρουραίου- στην ενεργή H-μορφή [159].

Επίσης η ενεργότητα της CTP μπορεί να ρυθμιστεί μετά από αύξηση της έκφρασης των γονιδίων. Σε καλλιέργειες εμφυτευμάτων εμβρυϊκού πνεύμονα παρατηρήθηκε μία αυθόρμητη αύξηση του mRNA της CTP και αύξηση κατά 3 φορές στα κύτταρα τύπου II σε *in vivo* συνθήκες [160]. Τέλος, τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να επηρεάσουν το mRNA της CTP αλλά σε πολύ μικρό βαθμό. Συγκεκριμένα, σε *in vivo* μελέτη σε ώριμο πνεύμονα αρουραίου διαπιστώθηκε ότι η αύξηση στην ενεργότητα της CTP μετά από ένεση βητα-μεθαζόνης συνοδεύτηκε με 2-φορές αύξηση στα επίπεδα του mRNA της CTP [161].



Σχήμα 15. Κρυσταλλική δομή της CTP.

### 2. Άλλα ένζυμα που μπορεί να ελέγχουν τη βιοσύνθεση της PC

Όπως φαίνεται από τα προηγούμενα η CTP αποτελεί το ένζυμο-κλειδί στη βιοσύνθεση της PC. Υπό ορισμένες συνθήκες τα ένζυμα της ακυλοτρανσφεράσης [112], της κινάσης της



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

χολίνης [162] και της φωσφατάσης [135] μπορεί να αποτελέσουν ρυθμιστικά ένζυμα στην παραγωγή της PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η αύξηση της ενεργότητας της ακυλοτρανσφεράσης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου στο τέλος της κύησης [163] είναι πολύ σημαντική για την αύξηση της DPPC. Επιπρόσθετα, οι όποιες αλλαγές των προηγούμενων ενζυμικών ενεργοτήτων άμεσα εμπλέκονται στο σχηματισμό της PC.

Μεγάλης σημασίας όμως αποτελούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των FA. Στον πνεύμονα αρουραίου *in vivo*, έχει βρεθεί ότι τα ένζυμα FAS, ακετυλο-CoA καρβοξυλάση και ATP-κιτρική λυάση [164] διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της PC. Έτσι η αύξηση των προηγούμενων ενζυμικών ενεργοτήτων έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της παραγωγής των FA, οπότε και αύξηση στην παραγωγή των φωσφολιπιδίων. Επιπλέον, αύξηση στην παραγωγή των FA προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης της CTP.

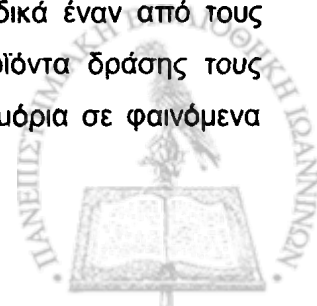
Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την ενεργότητα της FAS στον πνεύμονα αρουραίου *in vivo* [165]. Σε εμβρυϊκά εμφυτεύματα πνεύμονα ανθρώπου έχει βρεθεί ότι η αύξηση της FAS από τα γλυκοκορτικοειδή είναι μεγαλύτερη στα πνευμονοκύτταρα τύπου II απ' ό τι στις ινοβλάστες [166]. Η αύξηση της FAS από τα γλυκοκορτικοειδή οφείλεται σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων που εκφράζουν το ένζυμο [167]. Σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II ο ρυθμός της σύνθεσης των FA αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθεί υπερκείμενο από καλλιέργειες ινοβλαστών και οι οποίες έχουν προεπωαστεί με κορτιζόλη [167]. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με αύξηση των mRNAs των ενζύμων της FAS, της καρβοξυλάσης της ακετυλο-CoA και της ATP-κιτρικής λυάσης τα οποία απαιτούν την παρουσία γλυκοκορτικοειδών και ινοβλαστών [168]. Ο FPF επίσης διεγείρει το σχηματισμό της DSPC και της CTP στα εμβρυϊκά πνευμονοκύτταρα τύπου II και μπορεί επίσης να εμπλέκεται στη διέγερση της σύνθεσης των FA σε αυτά τα κύτταρα. Είναι πιθανόν η διέγερση της CTP στα κύτταρα τύπου II από τον FPF να οφείλεται, έστω κατά ένα μέρος, στην αύξηση της σύνθεσης των FA που προκαλείται από αυτόν τον παράγοντα [157].

Στη συνέχεια θα δούμε τα ένζυμα βιοσύνθεσης της πορείας ανάπτυξης δίνοντας έμφαση στην οικογένεια των φωσφολιπασών λόγω του πολύ σημαντικού ρόλου τους.

## ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ

### Εισαγωγή

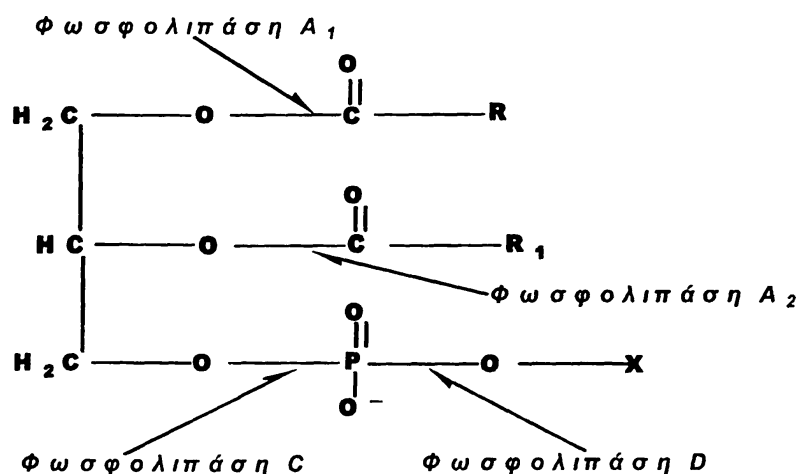
Οι φωσφολιπάσες είναι μία κατηγορία ενζύμων που υδρολύουν ειδικά έναν από τους τέσσερις φωσφολιπιδικούς εστερικούς δεσμούς (**Σχήμα 16**). Τα προϊόντα δράσης τους (ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια) αποτελούν σημαντικά μόρια σε φαινόμενα



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

μεταγωγής σήματος και στη βιοσύνθεση βιολογικά δραστικών λιπιδίων, όπως τα εικοσανοειδή και τα ανάλογα του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Σημαντικοί παράγοντες της δράσης αυτών των ενζύμων αποτελούν η πολική κεφαλή και η φυσική κατάσταση του φωσφολιπιδίου. Για παράδειγμα ορισμένες φωσφολιπάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό υδρόλυσης σε υποστρώματα που σχηματίζουν συσσωματώματα απ' ό,τι σε μονομερή [169,170]. Ο ρόλος αυτών των ενζύμων επικεντρώνεται σε δύο σημεία:

- A) Στην *in vitro* και *in vivo* σύνθεση λιπιδικών υποστρωμάτων [171].
- B) Στο γεγονός ότι ορισμένες φωσφολιπάσες ( $A_2$ , C και D) συμμετέχουν σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος μέσω της παραγωγής δευτέρων αγγελιοφόρων, όπως η διακυλογλυκερόλη (DAG), το αραχιδονικό οξύ (AA) και η τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $IP_3$ ).



Σχήμα 16. Δράση φωσφολιπασών  $A_1$ ,  $A_2$ , C και D.

Η φωσφολιπάση  $A_1$  ( $PLA_1$ ) υδρολύει το φωσφοδιεστερικό δεσμό στην πρώτη θέση των φωσφολιπιδίων, η  $PLA_2$  στη θέση *sn*-2 και η  $PLC$  στη θέση *sn*-3 των φωσφολιπιδίων παράγοντας DAG. Τέλος, η  $PLD$ , ανάλογα με τις συνθήκες του μίγματος της αντίδρασης, παρουσιάζει δύο διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες: να υδρολύει φωσφολιπίδια παράγοντας PA ή να μετέχει σε αντιδράσεις τρανσφωσφατιδυλίωσης παράγοντας φωσφατιδυλαλκοόλες [172,173]. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ενεργότητες  $PLA_1$ ,  $PLC$  και  $PLD$  έχουν ανιχνευθεί σε πνευμονοκύτταρα τύπου II και σε πνευμονικό ιστό διαφόρων θηλαστικών [174,175,176]. Γενικότερα όμως οι φωσφολιπάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών του πνεύμονα επηρεάζοντας άμεσα τις ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

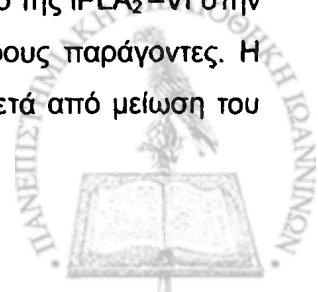
### Ταξινόμηση φωσφολιπασών $A_2$

Η οικογένεια των  $PLA_2$  διαιρείται σε τρεις κύριες κατηγορίες με διαφορές ως προς την απαίτηση σε ιόντα ασβεστίου, στην ειδικότητά τους ως προς τα υποστρώματα και την κατανομή τους σε ιστούς.

**1<sup>η</sup> Κατηγορία.** *Εκκρινόμενες  $PLA_2$  ( $sPLA_{2s}$ )*. Πρόκειται για μικρά ένζυμα (περίπου 14 kDa) που απαιτούν ιόντα ασβεστίου σε συγκέντρωση millimolar (mM) για τη δράση τους. Μέχρι το 2000 πέντε  $sPLA_{2s}$  είχαν περιγραφεί σε ιστούς θηλαστικών [177]. Διαφέρουν ως προς την κατανομή τους σε ιστούς και στη συμμετοχή τους σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου. Μερικές από αυτές εμπλέκονται σε φαινόμενα μεταγωγής σήματος των νεφρικών μεσεγχυματικών κυττάρων που ενεργοποιούνται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Εκτός από την ενζυματική τους δράση είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με διαλυτούς υποδοχείς που συνδέονται με τη μεμβράνη. Ο ακριβής ρόλος αυτών των υποδοχέων δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως αλλά δύο τύποι αυτών, ο M (μυϊκός)-τύπος (muscle-type), ο N-νευρικός τύπος του εγκεφάλου (neuronal type) έχουν περιγραφεί [178].

**2<sup>η</sup> Κατηγορία.** *Κυτοσολικές ( $cPLA_{2s}$ )*. Οι  $cPLA_{2s}$  (περίπου 85 kDa) απαντούν σε μεγάλο πλήθος ιστών διαφόρων θηλαστικών. Οι  $cPLA_{2s}$  απαιτούν την παρουσία ιόντων  $[Ca^{2+}]$  σε συγκέντρωση 1  $\mu M$  για τη μέγιστη δράση τους και εμφανίζουν μεγάλη προτίμηση για το αραχιδονικό οξύ (AA) -που περιέχεται στα γλυκεροφωσφολιπίδια- (ομάδα IVA,  $cPLA_2$ - $\alpha$ ) και ακολούθως μετατρέπεται σε προστανοειδή και λευκοτριένια [179]. Όταν τα κύτταρα διεγερθούν από κάποιο αίτιο η  $cPLA_2$  μετατοπίζεται με μία εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου πορεία από το κυτοσόλιο στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή τις περιπυρηνικές μεμβράνες [180]. Αυτό το ένζυμο υφίσταται φωσφορυλίωση σε ελάχιστες θέσεις, για παράδειγμα στο αμινοξύ σερίνη (Ser505), από PKC και κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs) [31,181].

**3<sup>η</sup> Κατηγορία.**  $PLA_2$  ανεξάρτητες από ιόντα ασβεστίου ( $iPLA_{2s}$ ). Οι  $iPLA_{2s}$  (ομάδες VI ή VIA, IVC, VII, VIII) είναι μία ιδιόμορφη κατηγορία  $PLA_{2s}$ , δεν απαιτούν ιόντα ασβεστίου για τη δράση τους και υποδιαιρούνται σε τρεις κατηγορίες: 1.  $iPLA_2$  που εντοπίζονται στα λυσιζώματα 2. ενδοκυττάριας τύπου I και II και υδρολάσες III του PAF·εμφανίζουν ιδιαίτερη προτίμηση στον PAF και σε οξειδωμένα λιπίδια. 3. 85 kDa  $iPLA_2$  -VI σχηματίζοντας ολιγομερή περίπου 300 kDa. Το τελευταίο ένζυμο δεν εμφανίζει προτίμηση σε κανένα λιπαρό οξύ και θεωρείται ότι είναι από τα πλέον κύρια που εμπλέκονται στην πορεία ανάπτυξης των φωσφολιπιδίων [182]. Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα δείχνουν το ρόλο της  $iPLA_2$ -VI στην απελευθέρωση του AA μετά από διέγερση των κυττάρων από διάφορους παράγοντες. Η  $iPLA_2$  -VI έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται στα κύτταρα του μυοκαρδίου μετά από μείωση του



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η ενεργότητα αυτού του ενζύμου ήταν χαμηλότερη σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και αυξήθηκε παρουσία αναστολέων καλμοδουλίνης [183]. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η iPLA<sub>2</sub> αναστέλλεται από το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>-καλμοδουλίνης και μείωση των επιπέδων ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της iPLA<sub>2</sub> και το σχηματισμό σηματοδοτικών μορίων [184]. Η ομάδα IVC, γνωστή και ως cPLA<sub>2</sub>-γ, και η ομάδα IVA (cPLA<sub>2</sub>-α) παρουσιάζουν κατά 30 % ομοιότητα αλλά η ομάδα IVC δεν περιέχει την C2 περιοχή (περιοχή πρόσδεσης ασβεστίου και λιπιδίου) που είναι παρούσα στα ένζυμα της ομάδας IVA.

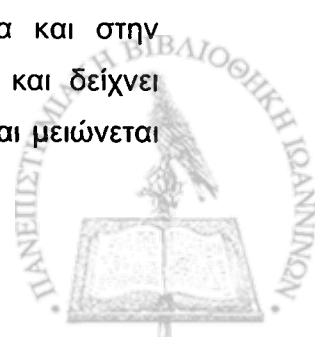
Επομένως, στηριζόμενοι στα προηγούμενα και σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα του Dennis –που έχει ασχοληθεί ιδιαίτερα με αυτά τα ένζυμα- το 2006 ανακοινώθηκε ότι η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών αποτελείται από 15 ομάδες και αρκετές υποομάδες, περιλαμβάνοντας 5 τύπους ενζύμων: τις εκκρινόμενες, τις κυτοσολικές, τις ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου, τις PAF-AcH και τις λυσισωμιακές PLA<sub>2</sub> [185]. Στην παρούσα εργασία θα σχολιαστούν ειδικά οι ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάσες.

### PAF - PLA<sub>2</sub>

Ο PAF είναι ένα αλκυλοφωσφολιπίδιο με ακετυλομάδα στην sn-2 θέση και έχει την ιδιότητα να εμπλέκεται σε μεγάλο πλήθος παθολογικών και φυσιολογικών καταστάσεων. Η PLA<sub>2</sub> που είναι υπεύθυνη για την υδρόλυσή του, η PAF-ακετυλυδρολάση (PAF-AcH ή PAF-PLA<sub>2</sub>), ρυθμίζει τα επίπεδα του PAF σε κύτταρα πολλών θηλαστικών. Η PAF-AcH υπάρχει σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ισομορφές: Ia, Ib και II [186]. Η ισομορφή Ia είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο με υπομονάδες 29-30 kDa. Η ισομορφή Ib είναι ένα ετεροτριμερές ένζυμο με υπομονάδες 29, 30 και 45 kDa που συμβολίζονται αντίστοιχα γ, β και α. Διακρίνονται από την υψηλή συγγένεια για υδρόλυση του PAF και την αδυναμία τους να υδρολύσουν προπιονυλο- ή βουτυρυλο- αλυσίδες στην sn-2 θέση. Η ισομορφή II είναι ένα πολυπεπτίδιο 40 kDa (συμβολίζεται ως α) και έχει την ικανότητα να υδρολύει οξειδωμένη PC.

### iPLA<sub>2</sub>s

Οι iPLA<sub>2</sub>s έχουν απομονωθεί από μυοκάρδιο, από την κυτταρική σειρά μακροφάγων P388D1, με μοριακή μάζα 80 kDa και ενεργοποιείται από το ATP και μειώνεται από τους αναστολείς HELSS και PACOCF<sub>3</sub>. Μελέτες έδειξαν ότι η iPLA<sub>2</sub> μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εστεροποίηση του AA στα μεμβρανικά φωσφολιπίδια και στην ενδοκύτωση [187]. Η iPLA<sub>2</sub> από το μυοκάρδιο έχει μοριακή μάζα 40 kDa και δείχνει προτίμηση για πλασμαλογόνα. Η ενεργότητά της διεγείρεται επίσης από ATP και μειώνεται





## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

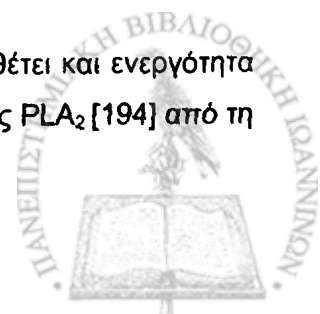
από τον αναστολέα HELSS. Αυτή η φωσφολιπάση επίσης εκφράζεται στα β -κύτταρα του παγκρέατος και στα λεία αγγειακά μυϊκά κύτταρα. Παρόλο που η ύπαρξη της  $iPLA_2$  είναι γνωστή στον πνεύμονα από το 1988 [188] δεν είχε διευκρινισθεί εάν η ισομορφή που δημοσιεύτηκε στα προηγούμενα κυτταρικά συστήματα υπήρχε και στα πνευμονοκύτταρα τύπου II.

Μία δεκαετία αργότερα σε μελέτη στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου, αναφέρθηκε ότι οι αναστολείς της  $iPLA_2$  PACOCF<sub>3</sub> και HELSS δεν είχαν καμία επίδραση στην έκκριση της PC προτείνοντας έτσι ότι η  $iPLA_2$  δεν αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στον πνεύμονα [189]. Σχεδόν παράλληλα, το 1997, ανακοινώνεται η απομόνωση και η κλωνοποίηση μίας όξινης  $iPLA_2$  ( $aiPLA_2$ ) μοριακής μάζας 26 kDa από πνεύμονα αρουραίου [190]. Αυτή η όξινη ισομορφή έχει μέγιστη δράση σε  $pH=4.0$ , δεν επηρεάζεται από τον παράγοντα  $\rho$ -βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο ( $\rho$ BPB) που αποτελεί καλό αναστολέα της  $sPLA_2$ , το ATP και το αραχιδονυλο-τριφθορομεθυλο-κετόνη (AACOCF<sub>3</sub>) αλλά αναστέλλεται από τον παράγοντα 1-παλμιτοϋλο-3-τριφθορο-αιθυλ-γλυκερο- *sn*-2-φωσφομεθανόλη (MJ33) και την SP-A. Η ενεργότητά της εντοπίζεται κυρίως στα στιβαδωτά σωμάτια και στα λυσισώματα. Η  $aiPLA_2$  εμφανίζεται να εμπλέκεται στην πορεία ανάπτυξης της PC, στην αποικοδόμηση της DPPC και στα κοκκιώδη πνευμονοκύτταρα. Αντίθετα δε δείχνει προτίμηση για PCs που είναι εστεροποιημένες στην *sn*-2 θέση με AA [191].

### Η $aiPLA_2$ στην παραγωγή της PC

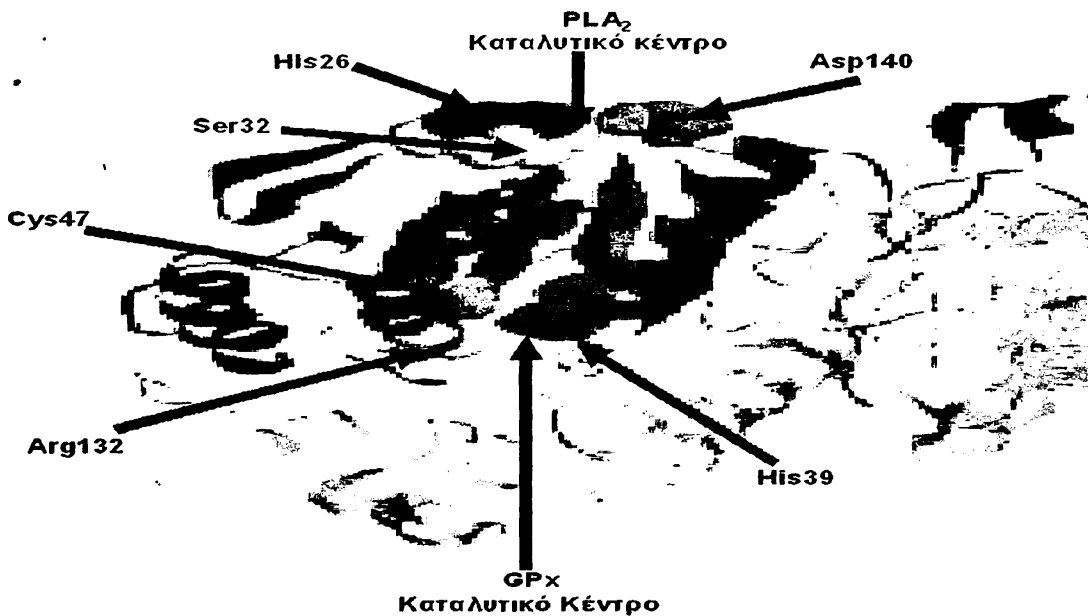
Αναφέρθηκε ότι η  $aiPLA_2$  εμφανίζεται να εμπλέκεται στην πορεία ανάπτυξης της PC, στην αποικοδόμηση της DPPC στα κοκκιώδη πνευμονοκύτταρα. Η συγκεκριμένη ισομορφή έχει εντοπιστεί σε μεγάλη ενεργότητα στα λυσισώματα των πνευμονοκυττάρων τύπου II και στον πνεύμονα αρουραίου [192]. Αργότερα ανακοινώθηκε ότι  $aiPLA_2$  εντοπίστηκε σε κυψελιδικά μακροφάγα αλλά όχι στα μονοκύτταρα του αίματος αρουραίου ή μέχρι τότε σε ιστούς. Όμως αυτή η ισομορφή της  $PLA_2$  που έχει εντοπιστεί στα μακροφάγα είναι διαφορετική από την αντίστοιχη ισομορφή που έχει εντοπιστεί στα λυσισώματα και που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της DPPC στον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Έτσι η  $aiPLA_2$  των μακροφάγων εντοπίζεται στο κυτοσόλιο, έχει σχετικά μεγάλη ενεργότητα και δεν περιέχει δομικά ομάδες μαννόζης που είναι χαρακτηριστικές των λυσισωμιακών πρωτεϊνών. Επίσης παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε όξινες συνθήκες [193].

Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι η πρωτεΐνη των 24 kDa  $aiPLA_2$  διαθέτει και ενεργότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH) και μάλιστα είναι μεγαλύτερη της  $PLA_2$  [194] από τη



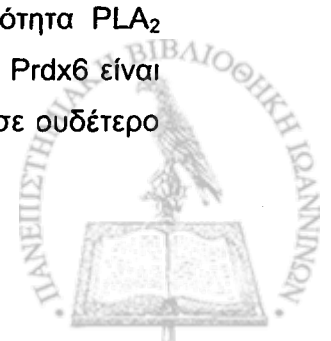
## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

στιγμή που διαθέτει δύο καταλυτικά κέντρα, γεγονός που δεν ισχύει στη PLA<sub>2</sub> των μακροφάγων που προαναφέρθηκε [193]. Αυτές οι διπλολειτουργικές πρωτεΐνες ονομάζονται υπεροξυρεδιξίνες (Peroxiredoxin, Prdx6). Οι υπεροξυρεδιξίνες (Prdxs) είναι μία υπεροικογένεια, ανεξαρτήτων σεληνίου (Se), υπεροξειδασών που έχουν περιγραφεί σχετικά πρόσφατα. Ταξινομούνται με βάση τον αριθμό (1 ή 2) των προστατευομένων κυστεϊνών (Cys) που εμπλέκονται στην υπεροξειδωση. Από τις 6 υπεροξυρεδιξίνες η Prdx6 έχει μία προστατευόμενη κυστεΐνη ενώ οι πέντε πρώτες (Prdx1-5) έχουν 2 κυστεΐνες (2-Cys). Η Prdx6 αποτελείται από 224 αμινοξέα με μέση μοριακή μάζα 25.1 kDa, εκφράζεται σε πολλούς ιστούς αλλά απαντά σε μεγάλες ποσότητες στον πνεύμονα και στον εγκέφαλο. Η Prdx6 του πνεύμονα εντοπίζεται επίσης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, στα κυψελιδικά μακροφάγα και στο βρογχικό επιθήλιο. Η υποκυτταρική κατανομή του πνεύμονα έδειξε την παρουσία αυτής της πρωτεΐνης στα στιβαδωτά σωμάτια, στα λυσισώματα και στο κυτοσόλιο. Η Prdx6 προστατεύει επίσης τα φωσφολιπιδία μικρών αλυσίδων και τα υπεροξειδία στα κύτταρα έναντι οξειδωτικού stress από την ανηγμένη γλουταθειόνη [195].



**Σχήμα 17.** Θέση του καταλυτικού κέντρου της Prdx6 (GPx) στην κρυσταλλική δομή του ενζύμου. Η καταλυτική τριάδα Ser32-His26-Asp140 στην πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα της PLA<sub>2</sub> και η καλυμμένη Cys47 με τα αμινοξέα His39 και Arg132 είναι υπεύθυνα για τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης [196].

Αντίθετα, με άλλα μέλη της οικογένειας των Prdxs, η Prdx6 έχει δραστικότητα PLA<sub>2</sub> επιπρόσθετα με την ενεργότητα της υπεροξειδάσης. Η ενεργότητα της PLA<sub>2</sub> της Prdx6 είναι μέγιστη σε όξινο pH και ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου ενώ της υπεροξειδάσης σε ουδέτερο



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

pH. Το 1997 οι Kim et al στηριζόμενοι στην ιδιότητα αυτή, ότι δηλαδή η ενεργότητα της  $PLA_2$  είναι μέγιστη σε όξινο pH, προσδιόρισαν την ενεργότητα αυτής της  $PLA_2$  και την χαρακτήρισαν ως  $aiPLA_2$  [197,198]. Η  $aiPLA_2$  (E.C. 1.11.1.7) της *Prdx6* έχει καταλυτικό κέντρο στο αμινοξύ σερίνη (Ser32) ενώ της υπεροξειδάσης απαιτεί κυστεΐνη (Cys47). Η ενεργοποίηση της  $aiPLA_2$  (E.C. 1.11.1.7) γίνεται στα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη μέσω PKC [199,200].

Η ερευνητική ομάδα του Aron Fisher έχει ασχοληθεί συστηματικά με την ισομορφία της  $aiPLA_2$  –και σε συνδυασμό με τον αναστολέα MJ33- σχετικά με την παραγωγή της PC στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Αναφέρονται ενδεικτικά από εργασίες του ότι σε πνευμονοκύτταρα τύπου II, που είχαν απομονωθεί από αρουραίο, επωάστηκαν με [ $^3H$ ]-παλμιτικό οξύ αλλά και άλλα λιπαρά οξέα (π.χ. ελαϊκό) και [ $^3H$ -μεθυλο]χολίνη προκειμένου να βρεθεί η ενσωμάτωση αυτών των σημασμένων ενώσεων στη PC, τα επίπεδα της οποίας μετρήθηκαν. Επιπλέον, τα πειράματα έγιναν και με την παρουσία του αναστολέα MJ33 που προστέθηκε στην καλλιέργεια με τη μορφή λιποσωμάτων. Έτσι παρουσία αναστολέα βρέθηκε μία μείωση της ενσωμάτωσης των προηγούμενων ενώσεων σημειώνοντας ταυτόχρονη αύξηση στην παραγωγή της ακόρεστης PC [201,202]. Η παρουσία αυτού του αναστολέα έδειξε ότι η  $aiPLA_2$  είναι υπεύθυνη για το 50 % της αποικοδόμησης της DPPC [203].

Σε εργασία τους περαιτέρω το 2003 ανακοινώθηκε ότι η πρωτεΐνη SP-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα ρυθμίζει την ενεργότητα της *Prdx6*. Η προσθήκη της SP-A σε ομογενοποίημα πνεύμονα αρουραίου, απομονωμένα στιβαδωτά σωματίδια ή απομονωμένα πνευμονοκύτταρα τύπου II ανέστειλε την ενεργότητα της  $aiPLA_2$  και την αποικοδόμηση της DPPC [204]. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκαν ουσίες ως αναστολείς της SP-A τότε παρατηρήθηκε αύξηση στην ενεργότητα της  $aiPLA_2$ .

### Αναστολείς των $PLA_2$

Βασικό και κύριο εργαλείο για το διαχωρισμό διαφορετικών τάξεων φωσφολιπασών είναι η χρήση ειδικών αναστολέων (Πίνακα 6). Για την  $sPLA_2$  το rBPB -και παρόμοιας δομής ενώσεις- αποτελούν από τους πλέον ισχυρούς αναστολείς. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς στην ενεργή περιοχή και δεν αποτελούν αναστολείς των  $cPLA_2$ . Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστέλλουν ενεργότητες ορισμένων  $iPLA_2$ . Ο MJ33 αποτελεί αναστολέα πολλών ισομορφών  $PLA_2$ , περιλαμβάνοντας τις περισσότερες  $sPLA_2$  και τουλάχιστον μία  $iPLA_2$ , που όπως τονίστηκε προηγούμενα, έχει εντοπιστεί στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [205].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Για τις cPLA<sub>2</sub>s αρκετοί αναστολείς έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες, με τους πλέον χαρακτηριστικούς N-μεθυλαμίδιο, μεθυλο-αραχιδονυλο-φθοροφωσφονικό οξύ (MAFP) και AACOCF<sub>3</sub>. Για τη δράση του αναστολέα διίσοπροπυλο-φθοροφωσφορικού οξέος (DFP) έχει σημειωθεί ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ακυλο-σερίνης, παρόμοιο με αυτό του ομοιοπολικού δεσμού σερίνης των πρωτεασών [206].

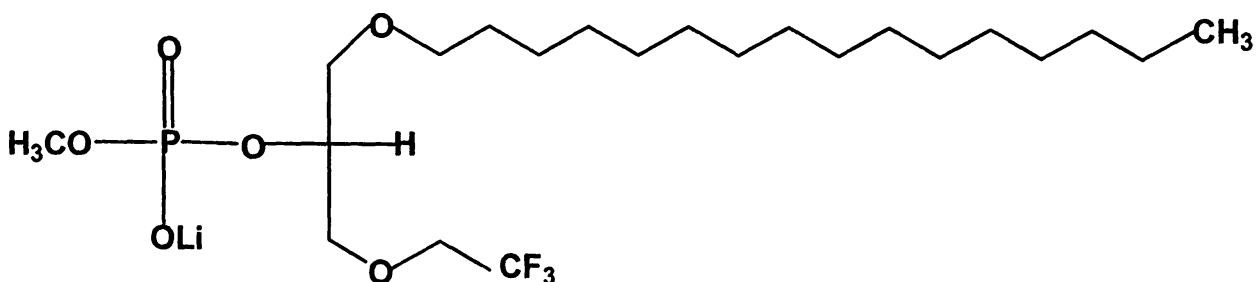
Πίνακας 6. Αναστολείς διαφόρων ισομορφών PLA<sub>2</sub> [206].

Ένωση	Αναστολή			
	sPLA <sub>2</sub>	cPLA <sub>2</sub>	iPLA <sub>2</sub>	PAF - PLA <sub>2</sub>
AACOCF <sub>3</sub>	-	+	+	+
MAFP	-	+	+	+
BEL	-	-	+	?
p-BPB	+	-	- / +*	-
MJ33	-	+	+	?
DFP	-	-	?	+

\*Αναστέλλεται η iPLA<sub>2</sub> των πνευμονοκυττάρων τύπου II.

### Μηχανισμός δράσης του αναστολέα MJ33

Αναφέρθηκε πριν ότι η aiPLA<sub>2</sub> είναι η κυρία ισομορφή που εμπλέκεται στην παραγωγή της PC στον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Ο αναστολέας MJ33 φαίνεται να είναι ο πλέον ειδικός που χρησιμοποιείται σε πειράματα προκειμένου να διερευνηθεί η βιοσύνθεση της PC στον πνεύμονα [201,202].

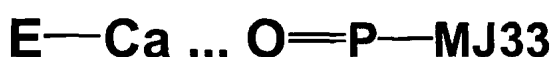


Σχήμα 18. Δομή του αναστολέα MJ33.

## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Στο **Σχήμα 18** φαίνεται η δομή του αναστολέα MJ33. Η φωσφομεθυλομάδα του αναστολέα είναι ανάλογη ή τουλάχιστον μιμείται σε μερικά βήματα την υποτιθέμενη τετραεδρική μεταβατική κατάσταση για την υδρόλυση της *sn*-2 ακυλομάδας του υποστρώματος. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι η πρόσδεση του αναστολέα στο ένζυμο πραγματοποιείται παρουσία ασβεστίου αλλά όχι βαρίου, ενώ ανάλογες ενώσεις του αναστολέα με ασθενή πρόσδεση με ιόντα ασβεστίου παρουσιάζουν μειωμένη ανασταλτική δράση (MJ57, 58, 60 και 64).

Από πλευράς μηχανισμού, ο αναστολέας MJ33 και τα ανάλογά του, πιθανόν συνδέονται με το ένζυμο με έναν δεσμό τύπου:



όπου **E** = Ένζυμο

**Ca** = Ιόντα ασβεστίου

**O** = Οξυγόνο στο μόριο του αναστολέα

**P** = Φωσφόρος στο μόριο του αναστολέα

Στο σύμπλεγμα αυτό, υποκατάσταση του O με S ή NH<sub>2</sub> ή του δεσμού O = P με O = C – O έχει ως αποτέλεσμα μείωση της αναστολής.

Όπως τονίστηκε προηγουμένα, έχει βρεθεί ότι πολλές ενώσεις αποτελούν ειδικό αναστολείς διαφόρων PLA<sub>2</sub> οπότε και χρησιμοποιούνται στη μελέτη του ρόλου της οικογένειας του ενζύμου που μετέχουν σε βιολογικά φαινόμενα σε κύτταρα, ιστούς και πειραματόζωα. Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου βοήθησε στην αναγνώριση θέσεων πρόσδεσης με τον εκάστοτε αναστολέα. Συγκεκριμένα, έχουν δοκιμαστεί περισσότεροι από 100 φωσφοεστέρες ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ενεργό θέση των PLA<sub>2</sub>. Ο MJ33 είναι ένας συναγωνιστικός με ενεργό θέση διευθυνόμενος ειδικός αναστολέας, ο οποίος συνδέεται με τις τύπου IB PLA<sub>2s</sub> (παγκρεατική και η όξινη PLA<sub>2</sub> του πνεύμονα) αναστέλλοντας το σχηματισμό λυσοφωσφολιπιδίων [207].

Από κρυσταλλογραφικές μελέτες έχει βρεθεί ότι ο MJ33 και πέντε θειικά ή φωσφορικά ανιόντα συνδέονται με δύο υπομονάδες του διμερούς της PLA<sub>2</sub>. Η *sn*-2-φωσφορική θέση του MJ33 προσδένεται στην ενεργό θέση της A υπομονάδας της PLA<sub>2</sub> και η αλκυλαλυσίδα επεκτείνεται σε μία εγκοπή (slot) της ενεργούς θέσης της B υπομονάδας, εγκάρσια της μεσόφασης της υπομονάδας (**Σχήμα 19**) [208].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ



**Σχήμα 19.** Κρυσταλλογραφική δομή  $PLA_2$  με τον αναστολέα MJ33 να μοιράζεται μεταξύ δύο υπομονάδων που έχουν πέντε γεφυρωτικά ανιόντα φωσφόρου στο ίδιο επίπεδο. Τα ιόντα ασβεστίου της υπομονάδας A συντονίζονται με τη φωσφορική ομάδα της *sn-2* θέσης του MJ33. Η αλκυλοουρά του αναστολέα συναντάται με τη μεσόφαση των δύο υπομονάδων και καταλαμβάνει την ενεργό περιοχή της γειτονικής υπομονάδας B. Στο σχήμα, τα φωσφορικά ανιόντα συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο MJ33 είναι ένα αμφίφιλο μόριο οπότε δε διαπερνά κατευθείαν τη μεμβρανική διπλοστιβάδα. Προκειμένου λοιπόν να διευκολυνθεί η εσωτερίκευση του αναστολέα λαμβάνουν χώρα διάφορες δοκιμές. Αναφέρονται κάποιες από αυτές, όπως της διαπερατότητας με συγχώνευση και ενδοκύττωσης κυστιδίων που περιέχουν τον αναστολέα, της χρήσης ουσιών που επιτρέπουν τη διαμεμβρανική μεταφορά του αμφίφιλου αναστολέα ή τέλος της παρατεταμένης επώασης ώστε ο αναστολέας να εισχωρήσει με ενδοκύττωση ή με εγκάρσια διάχυση (flip-flop) [209].

Συμπερασματικά λοιπόν ο αναστολέας MJ33:

- ☒ προσδένεται απευθείας στην πρωτεΐνη-ένζυμο.
- ☒ ενώνεται με ιόντα ασβεστίου στην A υπομονάδα του ενζύμου.
- ☒ είναι περισσότερο αποτελεσματικός σε  $pH=4.0$  και λιγότερο σε  $pH=8.0$ .
- ☒ ο ρυθμός ενσωμάτωσης του αναστολέα σε κυστίδια είναι γρήγορος ( $< 5$  s).

### Η $PLA_2$ στους πνεύμονες, σε A11 & στην κυτταρική σειρά A549

Ο πνεύμονας πολλών θηλαστικών αποτελεί μία καλή πηγή  $PLA_2$ . Στις περισσότερες εργασίες περιγράφεται μία  $PLA_2$  που απαιτεί συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου σε  $mM$ . Οι πρώτες αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης έδειξαν μία μικρού μοριακού βάρους  $PLA_2$  στον πνεύμονα χοίρου και αρουραίου. Όμως λίγα ήταν τα στοιχεία που θα μπορούσαν να αποδείξουν την ύπαρξη ενζυμικής ενεργότητας στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [210].



## ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Όσον αφορά τα ATII, έχει αναφερθεί ότι ο ρόλος του ενζύμου στη βιοσύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και στην παραγωγή λιπιδικών μεσολαβητών που εμπλέκονται σε φαινόμενα φλεγμονής είναι πάρα πολύ σημαντικός. Συγκεκριμένα, σε καλλιέργειες ATII αρουραίου διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στο κυτοσόλιο και είναι μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης, στην ίδια εργασία, παρουσιάζονται τα βιοχημικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά PLA<sub>2</sub> που έχει χαρακτηριστεί σε άλλα κύτταρα όπως στα αιμοπετάλια και σε αρκετές κυτταρικές σειρές -μοντέλα μελέτης των ATII. Αντίθετα, στο κυτοσόλιο πνεύμονα αρουραίου περιέχονται χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες παρόλο που το ένζυμο έχει κυρίως χαρακτηριστικά πρωτεΐνης χαμηλού μοριακού βάρους. Τέλος, στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι στην κυτταρική σειρά A549 εντοπίζεται κυτοσολική PLA<sub>2</sub> με παρόμοια χαρακτηριστικά ενζυμικής ενεργότητας που βρέθηκε σε ATII. Το στοιχείο αυτό ενισχύει το γεγονός της ευρύτατης χρήσης της κυτταρικής σειράς A549 ως μοντέλο μελέτης των ATII [211]. Δεν έχει όμως διευκρινισθεί ως τώρα, όσο αυτό είναι εφικτό να είναι γνωστό, η ύπαρξη αιPLA<sub>2</sub> στην κυτταρική σειρά A549.

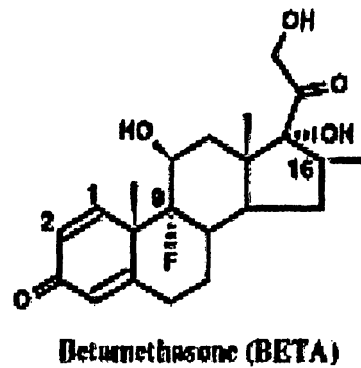
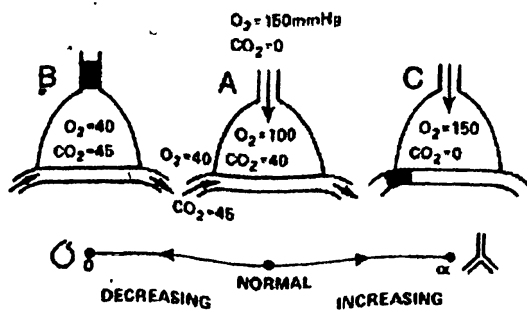
Τέλος, μεγάλο είναι το πλήθος των εργασιών από το εργαστήριό μας όσον αφορά τη PLA<sub>2</sub> στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), στα κύτταρα του BAL, στον ορρό ασθενών με ARDS αλλά και σε περιπτώσεις ασθενών με λιπώδη εμβολή [212]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στο BAL αυτών των ασθενών υπάρχει κυρίως sPLA<sub>2</sub> τύπου IIΑ και cPLA<sub>2</sub>. Στο πλάσμα βρέθηκε επιπλέον και ενδοκυττάρια iPLA<sub>2</sub> ενώ στα κύτταρα του BAL ανιχνεύθηκε cPLA<sub>2</sub> και sPLA<sub>2</sub> τύπου IIΑ με πολύ μικρή ενεργότητα. Σε αυτή την εργασία οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των ισομορφών της PLA<sub>2</sub> ήταν ο LY311727, ειδικός για την sPLA<sub>2</sub> τύπου II, και ο ML3176 για την κυτοσολική μορφή του ενζύμου [213].

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα προηγούμενα για την παραγωγή της PC θα πρέπει να τονιστεί ότι τουλάχιστον στα πνευμονοκύτταρα τύπου II δεν έχει γίνει κάποια συσχέτιση των ισομορφών της PLA<sub>2</sub> αλλά και ακόμη άλλων φωσφολιπασών. Σε πρόσφατη μελέτη όμως έχει τονιστεί ότι η ομοιοστασία της PC ρυθμίζεται από αντιδράσεις υδρόλυσης (PLA<sub>2</sub>, PLC και PLD) και σύνθεσης. Αυξητική ρύθμιση (up-regulation) των PLA<sub>2</sub>, PLC και PLD και καθοδική ρύθμιση της CTP είχε ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων της PC τα οποία στη συνέχεια αποκαθίστανται μετά από χορήγηση CDP-χολίνης στις αρτηρίες, μετά από απόφραξη, σε αρουραίους με υπερθυρεοειδή. Μάλιστα η χορήγηση CDP-χολίνης στα πειραματόζωα στην περίπτωση ισχαιμίας είχε ως αποτέλεσμα επίδραση στην sPLA<sub>2</sub>-IIΑ, στη PLC και στην ισομορφή α- της CTP (CTP-α) με έναν αλληλοεξαρτώμενο μηχανισμό [214].



# 3° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC





## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

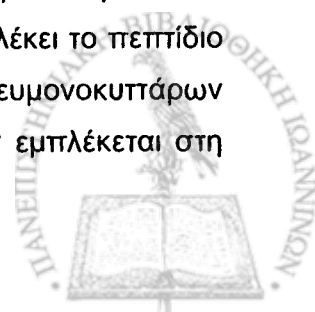
Η μελέτη της παραγωγής της PC στην παρούσα εργασία έγινε υπό την επίδραση δύο παραγόντων: α) της μηχανικής διάτασης και β) του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη.

### A. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ

#### Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα

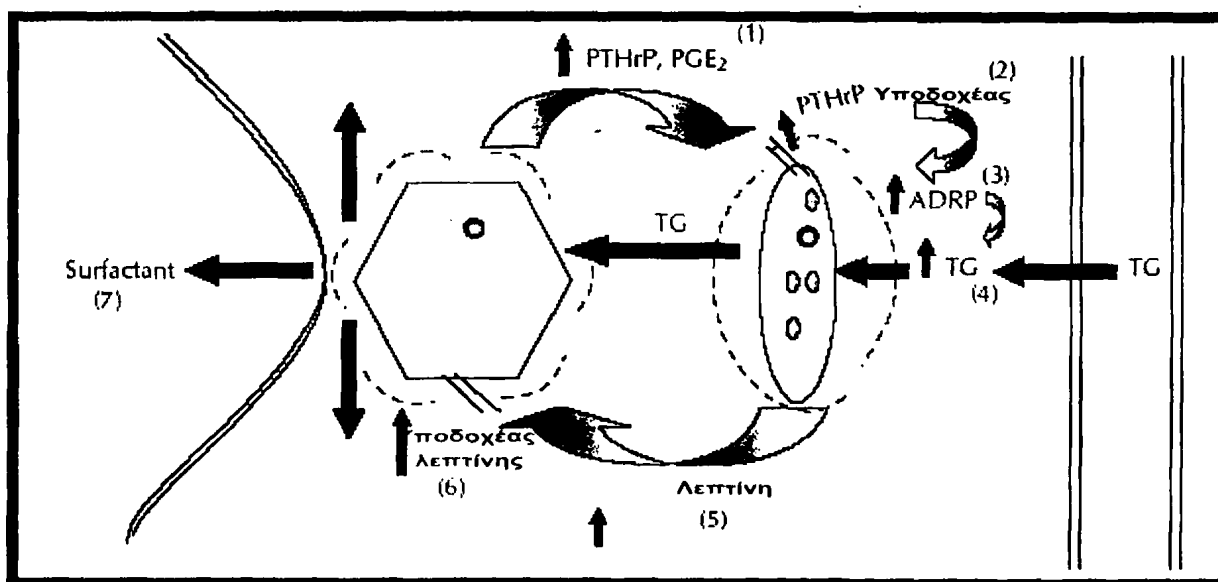
Σε αρκετές *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μεταβάλλεται κατά τη μηχανική αναπνοή. Αυτές οι *in vivo* μελέτες φυσικά έχουν πραγματοποιηθεί και σε πειραματόζωα. Το 1990, οι Wirtz & Dobbs [7] έδειξαν σε *in vitro* συνθήκες ότι σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II αρουραίου η κυκλική παραμόρφωση προκάλεσε αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η οποία συνοδεύεται με εξωκύτωση των στιβαδωτών σωματίων. Από τότε πάρα πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με το μηχανισμό της εξωκύτωσης λόγω παραμόρφωσης σε διάφορα κυτταρικά συστήματα [23,215,216]. Έτσι έχει δειχθεί ότι η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και η απελευθέρωση των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών Β και C είναι μηχανοευαίσθητες διαδικασίες αντίθετα από ότι συμβαίνει με την SP-A [217]. Η παραμόρφωση της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης, ως αποτέλεσμα της αύξησης του όγκου του κυψελιδικού αέρα ή της πίεσης στα τριχοειδή αγγεία, αποτελεί σημαντικό παράγοντα διέγερσης για την εξωκύτωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, μηχανισμό που εξαρτάται από ιόντα ασβεστίου [218].

Οι Torday et al έδειξαν ότι το μεσέγχυμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα στα κυψελιδικά κύτταρα σε φαινόμενα μεταγωγής σήματος και επικοινωνίας. Μετά από 7 χρόνια μελετών σχετικά με το ρόλο των λιποϊνοβλαστών στην ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο ίδιος ερευνητής προτείνει ότι ένας παρακρινής δακτύλιος εμπλέκει το πεπτιδίο της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTHrP) και της λεπτίνης μεταξύ των πνευμονοκυττάρων τύπου II και των λιποϊνοβλαστών (Σχήμα 20). Η μηχανοευαίσθητη PTHrP εμπλέκεται στη



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

ρύθμιση της διαφοροποίησης επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων. Ο ερευνητής απέδειξε ότι η κυκλική μηχανική διάταση σε συγκαλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II και λιποϊνοβλαστών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απελευθέρωσης της PC και ότι η μηχανική διάταση και η λεπτίνη συνεργιστικά προκάλεσαν την αύξηση της PC. Επιπρόσθετα ότι, η διάταση από μόνη της αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα της PTHrP και την πρόσληψη των τριγλυκεριδίων στις λιποϊνοβλάστες. Αυτές οι αποκρίσεις μπορούν να παρεμποδιστούν με αντισώματα έναντι της PTHrP και της λεπτίνης. Σε συνέχεια των πειραμάτων της ερευνητικής του ομάδας, διαπιστώθηκε ότι ο υποδοχέας της λεπτίνης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II αλλά και η διάταση βοηθούν στην απελευθέρωση της PTHrP από τα τύπου II κύτταρα. Έτσι ο Torday συμπέρανε ότι η απελευθέρωση της PTHrP που επάγεται λόγω παραμόρφωσης διεγείρει τη λιποϊνοβλάστη να παράγει λεπτίνη, η δράση της οποίας προκαλεί αύξηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [219,220].



**Σχήμα 20.** Ο παρακρινής δακτύλιος μεταξύ των επιθηλιακών πνευμονοκυττάρων τύπου II και των λιποϊνοβλαστών ως ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της διάτασης που επάγει την απελευθέρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συντμήσεις: ADRP=adipocyte differentiation-related protein, PGE<sub>2</sub>=προσταγλαδίνη E<sub>2</sub>, PTHrP=παραθυροειδής ορμόνη, TG=τριγλυκερίδιο.

Στο **Σχήμα 20** φαίνεται ο μηχανισμός με τον οποίο η διάταση και η λεπτίνη επιδρούν στην παραγωγή φωσφολιπιδίων σε συγκαλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II και ινοβλαστών. Αναλυτικά, παρατηρήθηκε συνεργιστική επίδραση της διάτασης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (σημειώνεται με βέλος) στην έκφραση της PTHrP και της PGE<sub>2</sub> (1) -παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή φωσφολιπιδίων- τον υποδοχέα της PTHrP στις λιποϊνοβλάστες

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

(2), την καθοδική της επίδραση στην έκφραση της ADRP των λιποϊνοβλαστών (3) και στην πρόσληψη των τριγλυκεριδίων (4) και στην αλληλεπίδραση μεταξύ της παραγόμενης από τις λιποϊνοβλάστες λεπτίνης (5) και τον υποδοχέα της λεπτίνης στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (6), διεγείροντας τη *de novo* παραγωγή φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (7). Τα τριγλυκερίδια παράγονται από τις λιποϊνοβλάστες και αποτελούν υποστρώματα για την παραγωγή φωσφολιπιδίων στα κύτταρα τύπου II και η πρωτεΐνη ADP αποτελεί την πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ρύθμιση της πρόσληψης των τριγλυκεριδίων από τις ινοβλάστες.

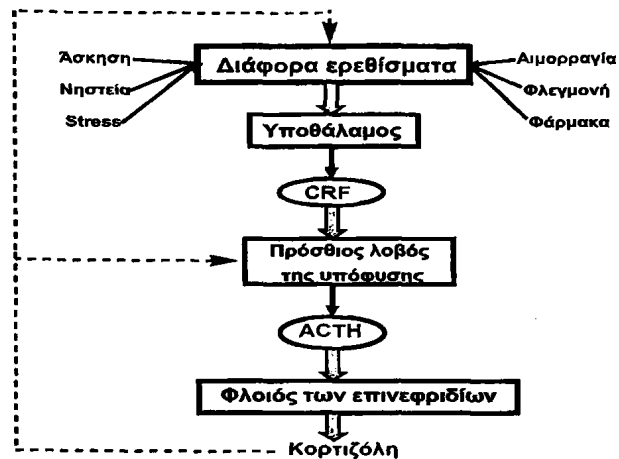
## B. ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

### Εισαγωγή

Τα επινεφρίδια είναι επίπεδες δομές που βρίσκονται κοντά στους πάνω πόλους των νεφρών. Η βασική λειτουργία των επινεφριδίων είναι να διατηρεί βασικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς, δηλαδή τη χημική σύσταση του μεσοκυττάριου και εξωκυττάριου υγρού. Αυτό εύκολα μπορεί να γίνει κατανοητό αν κανείς αναλογιστεί όλες τις δράσεις που έχουν οι ορμόνες αυτού του αδένου. Μια μεγάλη ποικιλία από φυσιολογικά ερεθίσματα όπως επίσης παθολογικές καταστάσεις –stress, νηστεία, αλλαγές της θερμοκρασίας, φλεγμονές, φάρμακα, άσκηση, αιμορραγία- επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και ερεθίζοντας την υποθαλαμική έκκριση του απελευθερωτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Factor, CRF), προκαλούν μία αύξηση στην παραγωγή της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotropic Hormone, ACTH) από την υπόφυση (Σχήμα 21). Η αύξηση που ακολουθεί στην παραγωγή ορμονών των επινεφριδίων επιτρέπει στον οργανισμό να αντιρροπήσει την επίδραση τέτοιων ερεθισμάτων. Επειδή ο οργανισμός δέχεται συνέχεια τέτοια ερεθίσματα, τα επινεφρίδια και άλλοι ομοιοστατικοί οργανισμοί λειτουργούν συνέχεια, είτε με σύμφωνη είτε με αντίθετη στάθμιση, με σκοπό τη διατήρηση του ισοζυγίου στο εσωτερικό περιβάλλον.

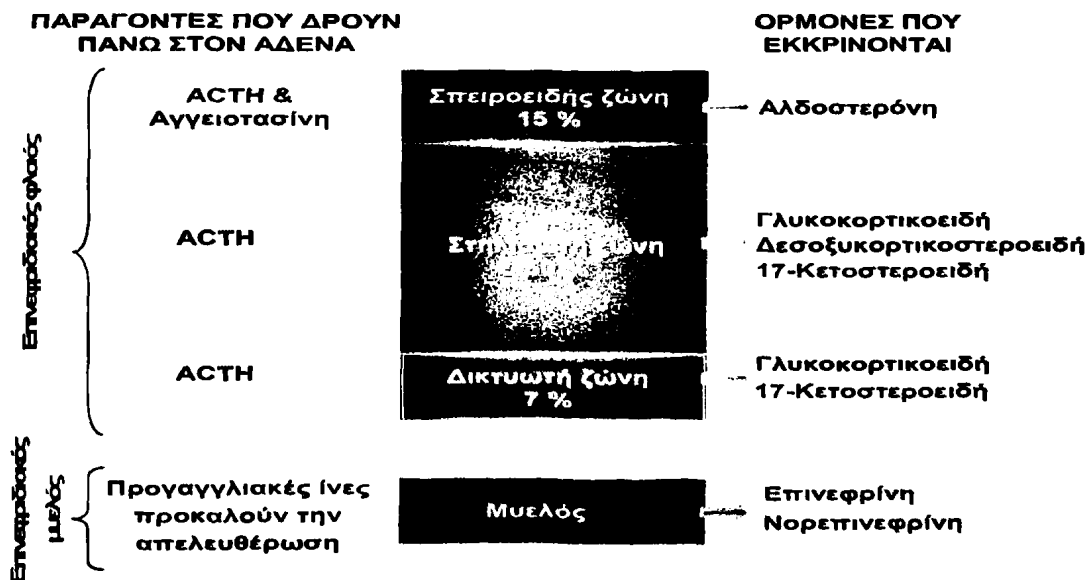


## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC



**Σχήμα 21.** Μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης ACTH και έκκρισης γλυκοκορτικοειδών. Τα συνεχή βέλη δείχνουν ερεθισμό, τα κομμένα βέλη δείχνουν αναστολή.

Εξαιτίας της διαφορετικής τοποθέτησης των κυττάρων του, ο επινεφριδιακός φλοιός μπορεί στον άνθρωπο να διαιρεθεί σε τρεις ομόκεντρες στιβάδες που είναι τις πιο πολλές φορές καθορισμένες με ακρίβεια: η σπειροειδής, η στηλιδωτή και η δικτυωτή ζώνη σε ποσοστά 15, 50 και 7 % του ολικού όγκου των επινεφριδίων. Η λειτουργία του φλοιού των επινεφριδίων είναι να παράγει στεροειδή. Τα στεροειδή που εκκρίνονται από το φλοιό μπορεί να διαιρεθούν σε τρεις ομάδες σύμφωνα με τις κύριες φυσιολογικές δραστηριότητες τους: γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή και 17-κετοστεροειδή.



**Σχήμα 22.** Δομή του επινεφριδίου. Αριστερά φαίνονται οι παράγοντες που δρουν στον αδένα και δεξιά οι ορμόνες που εκκρίνονται.

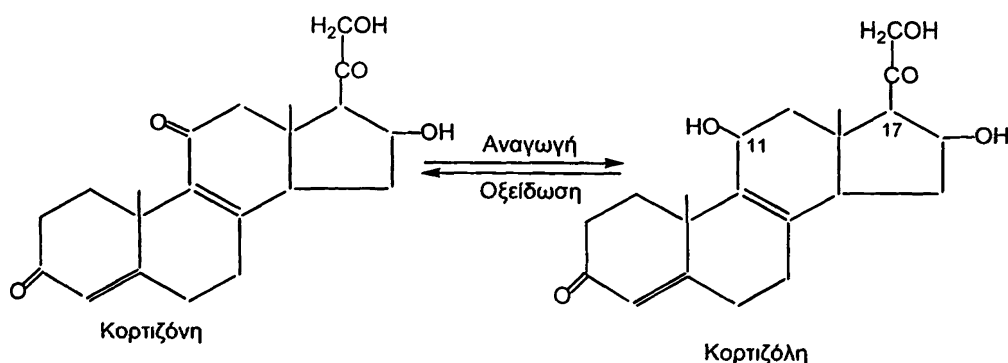
## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡC

Τα γλυκοκορτικοειδή –με πιο σημαντικά την κορτιζόλη και κορτικοστερόνη- δρουν κύρια στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Προκαλούν καταβολισμό πρωτεϊνών με μία παράλληλη αύξηση στη σύνθεση του γλυκογόνου και αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Επιπρόσθετα, κινητοποιούν τα λιπίδια από τις φυσιολογικές τους αποθήκες στο λιπώδη ιστό.

Τα αλατοκορτικοειδή, που από αυτά η αλδοστερόλη είναι η πιο σημαντική, μπορούν μεταξύ άλλων να αυξήσουν τη συγκέντρωση του καλίου και να ελαττώσουν εκείνη του νατρίου στα μυϊκά και εγκεφαλικά κύτταρα. Η διϋδροεπιανδροστερόνη είναι η μόνη γεννητική ορμόνη του φύλου που εκκρίνεται σε σημαντικές φυσιολογικές ποσότητες από το φλοιό των επινεφριδίων [221].

### Κορτικοστεροειδή

Τα κορτικοστεροειδή είναι φάρμακα που μοιάζουν με την κορτιζόλη (Σχήμα 22), την ορμόνη που παράγουν τα επινεφρίδια στον οργανισμό. Τα κορτικοστεροειδή, τα οποία συχνά αναφέρονται και ως στεροειδή, είναι διαφορετικά από τις ορμόνες -στεροειδή που λαμβάνουν αθλητές για να αυξήσουν τις επιδόσεις τους. Μερικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική περιλαμβάνουν κορτιζόνη, πρεδνισόνη, μεθυλοπρεδνισολόνη. Η πρεδνισόνη είναι το πιο συχνά διαδεδομένο στεροειδές που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αρκετών ρευματολογικών παθήσεων.



**Σχήμα 23.** Ισορροπία μεταξύ κορτιζόνης και κορτιζόλης. Το ένζυμο δεϋδρογονάση 11β-υδροξυστεροειδούς (11β-OHSD) καταλύει τη μετατροπή του 11-κετο-γλυκοκορτικοειδούς (κορτιζόνη) σε 11β-υδροξυ-γλυκοκορτικοειδές (κορτιζόλη) και αντίστροφα. Η κορτικοστερόνη και η δεϋδροκορτικοστερόνη διαφέρουν από την κορτιζόλη και την κορτιζόνη αντίστοιχα στο ότι δεν έχουν μία υδροξυλομάδα στον C<sub>17</sub> [222].



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡC

Το 1945 τα στεροειδή φαίνεται να αποτελούν θαυματουργό φάρμακο για την αρθρίτιδα μειώνοντας τη φλεγμονή και την απότομη παραμόρφωση. Αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για την αποφυγή μυοκαρδιακών βλαβών, νόσους του κολλαγόνου (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, σκληροδερμία) στις αλλεργικές ρινίτιδες ως spray και στο νεφρικό σύνδρομο, μειώνοντας την πρωτεϊνουρία και αυξάνοντας την αλβουμίνη. Ακόμη, στο χρόνιο άσθμα σημαντική είναι η εισπνοή των γλυκοκορτικοειδών, με πιο διαδεδομένη τη βητα-μεθαζόνη, στην αρχή της θεραπείας. Σε ασθενείς που κάνουν θεραπεία με κορτικοστεροειδή και υπόκεινται σε οποιοδήποτε ασυνήθιστη ένταση (stress), ενδείκνυται η χορήγηση μεγάλων δόσεων κορτικοστεροειδών ταχείας δράσης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την κατάσταση της έντασης.

Τέλος, στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών (IRDS) η βητα-μεθαζόνη ή η δεξαμεθαζόνη χορηγούνται 24 -48 ώρες πριν τη γέννηση προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι όταν θεωρηθεί απαραίτητη η πρόκληση τοκετού πριν τη 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης ή όταν είναι αναπώτερος ο πρόωρος τοκετός πριν την 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης λόγω μαιευτικών επιπλοκών, να γίνεται ενδομυϊκή χορήγηση βητα-μεθαζόνης παρατεταμένης δράσης τουλάχιστον 24 ωρών πριν τον αναμενόμενο χρόνο του τοκετού. Εάν δε συμβεί ο τοκετός τότε γίνεται επανάληψη της ένεσης της βητα-μεθαζόνης. Επειδή η προφυλακτική χρήση των κορτικοστεροειδών μετά την 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης είναι ακόμη αμφιλεγόμενη οι γιατροί θα πρέπει να σταθμίζουν τα οφέλη έναντι των πιθανών κινδύνων για τη μητέρα και το έμβρυο όταν χρησιμοποιηθούν κορτικοστεροειδή μετά την 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψιν η προφυλακτική αγωγή της βητα-μεθαζόνης αν είναι γνωστό ότι το έμβρυο έχει χαμηλό λόγο λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης. Αντίθετα, τα κορτικοστεροειδή δεν ενδείκνυται στην αντιμετώπιση της πάθησης της υαλίνης μεμβράνης του νεογνού.

Σε κάθε ασθένεια όμως προκειμένου το στεροειδές να έχει τα μέγιστα δυνατά αποτελέσματα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν παράγοντες όπως η δοσολογία, το είδος του γλυκοκορτικοειδούς, η διάρκεια της θεραπείας, ο χρόνος δράσης και γενικότερα τη φαρμακολογία κάθε στεροειδούς.

Έχει αναφερθεί ότι το 90-95 % των στεροειδών συνδέονται στο πλάσμα (πρωταρχικά στο κορτικοστεροειδές συνδέεται η γλοβουλίνη –CBG-) με ημίσεια ζωή 60 με 90 min. Ενδογενή και συνθετικά γλυκοκορτικοειδή υφίστανται μεταβολισμό στο ήπαρ (αναγωγή και σύζευξη με το γλυκουρονικό οξύ) και εκκρίνονται από τους νεφρούς.

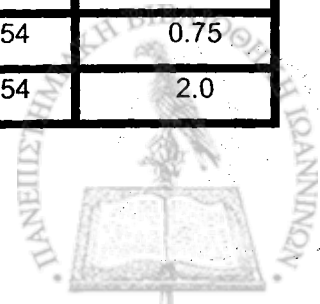


## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡC

Τα φυσιολογικά αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να είναι είτε άμεσα σε κυτταρικό επίπεδο είτε έμμεσα μέσω ομοιοστατικής απόκρισης άλλων ορμονών. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι διεγείρουν το σχηματισμό γλυκόζης, διευκολύνουν τη δράση της νορεπινεφρίνης και επινεφρίνης και τέλος ανταγωνίζονται τη δράση βιταμίνης D στο έντερο (μειώνοντας την απορρόφηση ιόντων ασβεστίου). Ειδικά για τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν την απορρόφηση και έκκριση των ιόντων  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ , λειτουργίες σημαντικές για τους μυς, το καρδιαγγειακό και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπρόσθετα στο αναπνευστικό σύστημα έχει αναφερθεί ότι διευκολύνουν την αδρενεργική χαλάρωση των αναπνευστικών μυών ενώ η ωρίμανση ενός εμβρυϊκού πνεύμονα εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την κορτιζόλη. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα δράσης τους στη φλεγμονή και στο ανοσοποιητικό σύστημα.

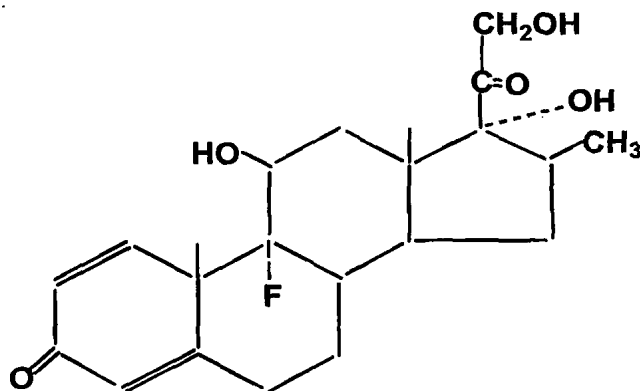
**Πίνακας 7.** Στον πίνακα φαίνονται μερικά από τα πιο συνηθισμένα κορτικοστεροειδή [223].

Χρόνος Δράσης	Αντιφλεγμονώδη ικανότητα (antiinflammatory potency)	Ικανότητα κατακράτησης νατρίου (Sodium retaining potency)	Ημίσεια ζωή στο πλάσμα (Plasma half life (min)	Βιολογική ημίσεια ζωή (hrs) (Biological half life (hrs))	Ισοδύναμη δόση κατά προσέγγιση (mg) (Approximate equivalent dose (mg))
<b>Μικρής διάρκειας</b>					
Κορτιζόνη	1.0	1.0	30	8 -12	20
Υδροκορτιζόνη	0.8	0.8	80 -118	8 -12	25
Φλοϋδροκορτιζόνη	10	125	μικρή	-	-
<b>Ενδιάμεσης διάρκειας</b>					
Πρεδνιζόνη	4.0	0.8	16	18 -36	5
Πρενισολόνη	4.0	0.8	115 -212	18 -36	5
Μεθυλοπρεδνισολόνη	5.0	0.5	78 -188	18 -36	4
Τριαμνικολόνη	5.0	0	200+	18 -36	4
<b>Μεγάλης Διάρκειας</b>					
Βητα-μεθαζόνη	25.0	0	300+	36-54	0.75
Δεξαμεθαζόνη	25.0	0	110-210	36-54	0.75
Παραμεθαζόνη	12.5	0	300+	36-54	2.0



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

Δύο πολύ συνηθισμένα και ισχυρά στεροειδή, η βητα-μεθαζόνη και η δεξαμεθαζόνη έχουν ένα άτομο φθορίου στη θέση 9<sup>α</sup> και ένα υπόλειμμα C-16 που φαίνεται να αυξάνει περαιτέρω τη συγγένεια με τον υποδοχέα. Για τα κύτταρα A549 έχει βρεθεί ότι υπάρχουν 200000 θέσεις πρόσδεσης ανά κύτταρο [224].



Σχήμα 23. Δομή βητα-μεθαζόνης.

### Μηχανισμός δράσης στεροειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι παράγωγα της χοληστερόλης. Μόλις διαπεράσουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης συνδέονται ισχυρά και αντιστρεπτά με ενδοκυττάριους πρωτεϊνικής φύσεως υποδοχείς στο κυτσοσόλιο. Δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα υπομονάδες του υποδοχέα. Ο υποδοχέας τους έχει πολλές ομοιότητες με τον υποδοχέα της ορμόνης του θυρεοειδούς και του ρετινοϊκού οξέος.

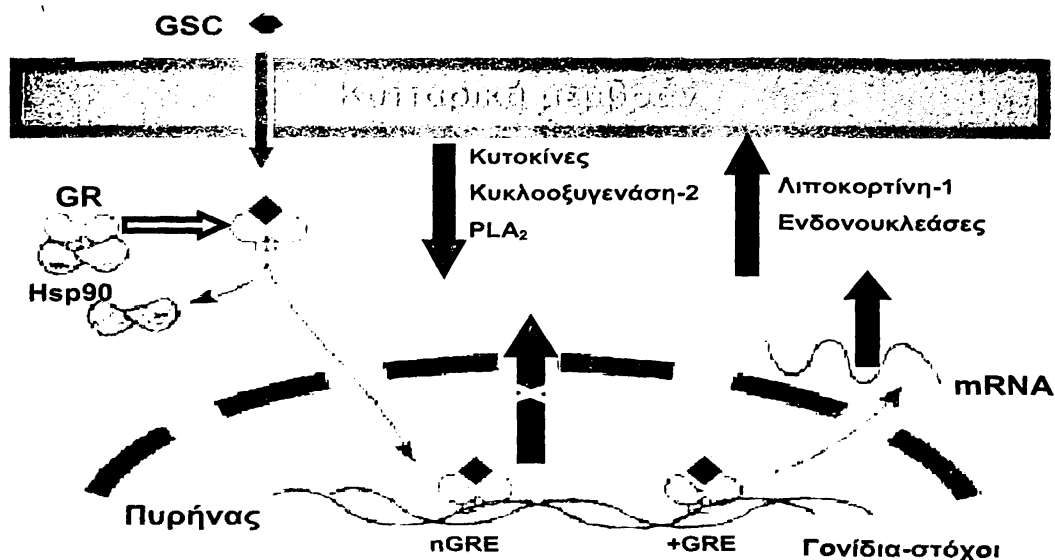
Πριν την πρόσδεση, ο υποδοχέας στην ανενεργό του μορφή, βρίσκεται συνήθως προσδεδεμένος με δύο μόρια πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 kDa (Hsp90). Μετά την πρόσδεση του στεροειδούς ο υποδοχέας αλλάζει διαμόρφωση –διαδικασία που παρατείνεται αρκετά- ενεργοποιείται, απελευθερώνονται τα μόρια Hsp90 από τον υποδοχέα και το σύμπλοκο στεροειδούς-υποδοχέα μετακινείται μέσα στον πυρήνα. Η περιοχή πρόσδεσης του γλυκοκορτικοειδούς είναι στο C-τελικό άκρο του υποδοχέα του γλυκοκορτικοειδούς (Glucocorticoid Receptor, GR). Η ενδιάμεση περιοχή, που σταθεροποιείται με δύο ιόντα ψευδαργύρου, αλληλεπιδρά με DNA. Το N-τελικό άκρο περιλαμβάνει μία περιοχή που επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων μετά από πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Ο μηχανισμός αποδείχθηκε το 1983 με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA [225]. Η περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου με το DNA έχει κατά 50 % ομολογία με υποδοχείς άλλων στεροειδών, δεν είναι ικανή από μόνη της για την ρύθμιση των γονιδίων οπότε και απαιτούνται άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες.



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

Στη συνέχεια, το σύμπλοκο στεροειδούς-υποδοχέα προσδένεται –η πρόσδεση διαρκεί κάποια δευτερόλεπτα- σε στοιχεία απόκρισης του γλυκοκορτικοειδούς (Glucocorticoid Response Elements, GREs) –που βρίσκονται σε ορισμένα γονίδια- και διαμορφώνει (αυξάνει ή μειώνει) το ρυθμό μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Σε αυτή την περίπτωση ο μηχανισμός δράσης των κορτικοστεροειδών είναι άμεσος. Τα GREs αποτελούνται από μία αλληλουχία 15 ζευγών βάσεων DNA. Έτσι το σύμπλοκο στεροειδούς -υποδοχέα δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να επάγει ή να καταστέλλει την έκφραση ειδικών γονιδίων. Όταν όμως το σύμπλοκο στεροειδούς-υποδοχέα προσδένεται απευθείας σε μεταγραφικούς παράγοντες και όχι σε στοιχεία απόκρισης (GREs) τότε ο μηχανισμός είναι έμμεσος. Ο αριθμός των γονιδίων που αποκρίνονται στα στεροειδή είναι 10 -100 ανά κύτταρο.

Η απόκριση ενός κυττάρου σε ένα γλυκοκορτικοειδές μπορεί να σχετίζεται με: 1. τον αριθμό των στοιχείων απόκρισης (GREs) που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο και 2. την παρουσία άλλων μεταγραφικών παραγόντων που μπορεί να δρουν από κοινού με το σύμπλοκο γλυκοκορτικοειδούς-υποδοχέα για να διαμορφώσουν την έκφραση γονιδίων. Το κύτταρο επομένως είναι έτοιμο να ρυθμίσει την εκ νέου παραγωγή ενζύμων μετά την επίδραση του κορτικοστεροειδούς [226] (Σχήμα 24).



**Σχήμα 24.** Επίδραση κορτικοστεροειδούς στη μεταγραφή γονιδίων. Τα γλυκοκορτικοειδή (GSC) προσδένονται στον κυτταρικό υποδοχέα (GR) ο οποίος συνήθως είναι συνδεδεμένος με δύο μόρια πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 kDa (Hsp90). Το σύμπλοκο GSC -GR μετατοπίζεται στον πυρήνα και προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης του γλυκοκορτικοειδούς, +GRE & nGRE, στον προαγωγό των γονιδίων -στόχων προκαλώντας αντίστοιχα αύξηση ή μείωση της μεταγραφής [227].



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

Έχει αναφερθεί ότι η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων μπορεί να οφείλεται στους εξής λόγους: **1.** στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής του συμπλόκου στεροειδούς-υποδοχέα να επεμβαίνουν παράγοντες οι οποίοι και δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής των γονιδίων, **2.** η πρόσδεση του συμπλόκου στεροειδούς-υποδοχέα να παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι μειώνουν την έκφραση των ίδιων των γονιδίων, **3.** το σύμπλοκο στεροειδούς/υποδοχέα μπορεί να προσδένεται σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (όπως τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1) οι οποίοι αναστέλλουν την έκφρασή τους, **4.** τα γλυκοκορτικοειδή επίσης να επάγουν τη μεταγραφή ριβονουκλεασών οι οποίες μειώνουν τη σταθερότητα του mRNA, μειώνοντας έτσι τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

### **Ο μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών για αντιφλεγμονώδη δράση και ανοσοκαταστολή συνδέονται μεταξύ τους**

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αντιμιτωτική δράση στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μειώνουν την επιβίωση κύριων κυττάρων. Η δράση τους εντοπίζεται σε αλλαγές του ρυθμού έκφρασης των γονιδίων και δε μειώνουν τη χυμική ή κυτταρική ανοσοαπόκριση. Η λειτουργία των λευκοκυττάρων καταστέλλεται παρεμβαίνοντας στη σύνθεση και την απελευθέρωση των λεμφοκινών έχοντας ως αποτέλεσμα προσωρινή διακοπή της ενδοκυττάριας επικοινωνίας και ανοσολογικών αποκρίσεων.

*Επίδραση γλυκοκορτικοειδών στις κυτοκίνες. I)* Τα γλυκοκορτικοειδή παρεμποδίζουν τη σύνθεση αρκετών κυτοκινών αναστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Το σύμπλοκο στεροειδούς-υποδοχέα αλληλεπιδρά με στοιχεία nGREs των γονιδίων-στόχων που είναι υπεύθυνα για τη δράση ορισμένων ιντερλευκινών (IL-1,3,4,5,6 & 8), του TNF-α και του αποικιοδιεγερτικού παράγοντα κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF). Επίσης, μπορεί το σύμπλοκο στεροειδούς-υποδοχέα να προσδένεται σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που μειώνουν την έκφραση γονιδίων των κυτοκινών (κυρίως για την IL-1, IL-3 & GM-CSF). *II)* Τα γλυκοκορτικοειδή παρεμποδίζουν τη δράση αρκετών κυτοκινών κυρίως με δύο τρόπους: α. με το να παρεμποδίζουν τη σύνθεση υποδοχέων τους (του υποδοχέα της IL-2) και β. με απευθείας αλληλεπίδραση και από κοινού αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και του συμπλόκου γλυκοκορτικοειδούς-υποδοχέα [227].

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

### Επίδραση γλυκοκορτικοειδών σε μεσολαβητές φλεγμονής

Έχει αναφερθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη σύνθεση της λιποκορτίνης I, ενός φυσικού αναστολέα της PLA<sub>2</sub>. Η PLA<sub>2</sub> είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην παραγωγή λιπιδικών παραγώγων, όπως προσταγλαδινών, λευκοτριενίων και PAF που οδηγούν σε φλεγμονή σε επιθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα. Από την άλλη, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη δράση ενζύμων, π.χ. της PLA<sub>2</sub> που εμπλέκονται στην παραγωγή φλεγμονωδών λιπιδικών προϊόντων. Επίσης, αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων μορίων προσκόλλησης που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα κύτταρα κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Τέλος, επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων για την παραγωγή πρωτεϊνών που αποικοδομούν ορισμένους μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως το μετατρέπον ένζυμο της αγγειοτενσίνης (angiotensin converting enzyme, ACE) [227].

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται μερικά παραδείγματα μεταγραφής που ρυθμίζονται από τη δράση του συμπλόκου-κορτικοστεροειδούς. Όταν τα στεροειδή, μετά την πρόσδεσή τους στον υποδοχέα, αυξάνουν την έκφραση γονιδίων τότε αναφερόμαστε σε μία *trans*-ενεργοποίηση, ενώ όταν αναστέλλουν τότε πρόκειται για μία *trans*-καταστολή [228]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα στεροειδή έχουν παρόμοια *trans*-μέγιστη ενεργοποίηση σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M [224].

Πίνακας 8. Παραδείγματα ρύθμισης γονιδίων από στεροειδή [232].

Μείωση μεταγραφής	Αύξηση μεταγραφής
<b>Χημειοκίνες</b> IL-8, RANTES, φλεγμονώδης πρωτεΐνη 1α, πρωτεΐνη μονοκυττάρων (monocyte chemoattractant protein MCP-1, MCP-3, MCP-4)	Λιποκορτίνη-1/ αννεξίνη-1 (αναστολείς PLA <sub>2</sub> )
<b>Κυτοκίνες</b> (IL-1,2,3,4,5,6,9,11,12,13,16,17,18, TNF-α, GM-CSF)	Πρωτεΐνη κυττάρων Clara (CC10, αναστολέας PLA <sub>2</sub> )
<b>Επαγωγίμα ένζυμα</b> (συνθάση νιτρικού οξέος, κυκλοοξυγενάση-2, cPLA <sub>2</sub> )	Ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1
<b>Υποδοχείς</b> (ενδοθηλίνης-1, νευροκινίνης NK <sub>1</sub> , NK <sub>2</sub> )	Iκ-Bα (αναστολέας του NF-κB)
Μόρια προσκόλλησης (E-σελεκτίνη)	Φωσφατάση-1 της MAPK (MKP-1)



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

### Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στον πνεύμονα και στα AΠII

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία κυτοσολικού υποδοχέα στον εμβρυϊκό πνεύμονα σε ένα μεγάλο αριθμό ζώων καθώς επίσης και στον άνθρωπο. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) στον πνεύμονα εμφανίζεται να είναι παρόμοιος με αυτόν άλλων ιστών. Ο αριθμός των υποδοχέων στον πνεύμονα σε αρκετά είδη αυξάνει με αύξηση της ωρίμανσης του πνευμονικού ιστού. Ήδη από το 1975, οι Torday et al. μελέτησαν την επίδραση αρκετών στεροειδών στη βιοσύνθεση της PC σε συγκαλλιέργειες κυτάρων πνεύμονα λαγού [229].

Έχει αναφερθεί ότι τα στεροειδή διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: στα γνωστά γλυκοκορτικοειδή που προσδένονται στον υποδοχέα και διεγείρουν τη βιοσύνθεση της PC, τα μη γλυκοκορτικοειδή που δεν έχουν συγγένεια πρόσδεσης και τέλος τα αντι-γλυκοκορτικοειδή. Τα τελευταία μπορούν να προσδένονται στους υποδοχείς αλλά δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δράσης τους -αναστέλλοντας τη δράση της κορτιζόλης- κυρίως με το να αντικαθιστούν το γλυκοκορτικοειδές από τον υποδοχέα. Παρατηρήσεις ότι η διέγερση της βιοσύνθεσης της κορεσμένης PC από κορτιζόλη είναι αναστρέψιμη [230] και ότι μπορεί να παρεμποδιστεί από αναστολείς σύνθεσης πρωτεϊνών [231] περαιτέρω επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι οι υποδοχείς ρυθμίζουν την επίδραση γλυκοκορτικοειδών στη βιοσύνθεση συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Παρότι η ειδική πρόσδεση γλυκοκορτικοειδών έχει δείχθει στα AΠII αρουραίου, σε κυτταρικές σειρές AΠII και σε ινοβλάστες, δεν είναι σαφές ποιο κυτταρικό σύστημα αποτελεί πρωταρχικά στόχο για τα στεροειδή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Και ενώ είναι γνωστό ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας συντίθεται στα AΠII, λογικό να αναμένεται ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν απευθείας στα AΠII προκειμένου να αυξηθεί η βιοσύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δράσης των γλυκοκορτικοειδών στη βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε καλλιέργειες AΠII εμβρύου φάνηκε να μετριάζονται πάρα πολύ σε σύγκριση με συγκαλλιέργειες κυτάρων που περιλαμβάνουν εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες [232].

### Δράση των γλυκοκορτικοειδών στον πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μητρική χορήγηση κορτικοστεροειδών αυξάνει την ωρίμανση του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, τα στεροειδή αυξάνουν την ποσότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο βρογχοκυψελιδικό υγρό εμβρυϊκού πνεύμονα, αυξάνουν την ενσωμάτωση πρόδρομων ενδιάμεσων προς σχηματισμό PC και PG στον πνεύμονα, αυξάνουν την παραγωγή πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα, επιταχύνουν το

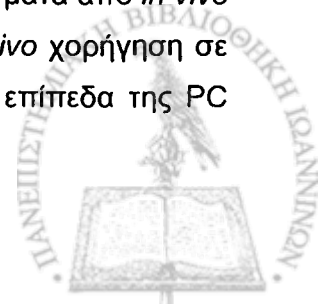
## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

σχηματισμό σπιβαδωτών σωματίων (LB) και μειώνουν τα επίπεδα του γλυκογόνου στον εμβρυϊκό πνεύμονα. Επίσης αυξάνουν την ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων [233]. Η βιοχημική βάση της αύξησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα λόγω της δράσης των κορτικοστεροειδών αποτελεί ακόμη αντικείμενο μελέτης.

Παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκε η ενεργότητα πολλών ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της DPPC όπως της CPT [234], της CTP [235], της ακυλοτρανσφεράσης της Lyso-PC (LPCAT) [236], της φωσφατάσης [237], της συνθάσης λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase, FAS) [238] και της φωσφατιδυλοτρανσφεράσης [239]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενζυμικές ενεργότητες της CPT και της LPCAT δε μεταβάλλονται όταν χορηγηθεί βητα-μεθαζόνη σε λαγό που βρίσκεται στη 18<sup>η</sup> μέρα της κύησής του [240]. Έτσι, μερικά από τα ευρήματα διαφόρων εργασιών είναι αντιφατικά γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό του κάθε ζωικού οργανισμού ή/και στο κάθε πρωτόκολλο. Μελέτες με συγκαλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II και ινοβλάστες έδειξαν ότι η διεγερτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στη βιοσύνθεση της PC ρυθμίζεται περισσότερο κατά την ενεργοποίηση της CTP. Η ενεργοποίηση που σημειώθηκε στα κύτταρα τύπου II έχει παρατηρηθεί μόνο σε μικροσωμιακά ένζυμα και δε συνοδεύτηκε από κάποια μετατόπιση της CTP από το κυτοσόλιο στα μικροσωμάτια. Το γονίδιο της CTP δεν αυξάνεται από τα κορτικοστεροειδή.

Σε εμβρυϊκό πνεύμονα αρουραίου και σε ανθρώπινο πνεύμονα τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν τη σύνθεση λιπαρών οξέων με αύξηση των επιπέδων του mRNA της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS) [241]. Το γονίδιο της FAS είναι το μοναδικό γονίδιο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και του οποίου η μεταγραφή αυξάνεται με αύξηση των γλυκοκορτικοειδών [242]. Ο μηχανισμός δράσης των στεροειδών στη FAS είναι έμμεσος. Αύξηση στην ενεργότητα της FAS παρατηρήθηκε κυρίως στα ATIΙ που απομονώθηκαν από εμβρυϊκά εμφυτεύματα πνεύμονα μετά από έκθεσή τους σε γλυκοκορτικοειδή. Ακόμη έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση της CTP λόγω των γλυκοκορτικοειδών, οφείλεται σε αύξηση της παραγωγής των λιπαρών οξέων, αφού τα τελευταία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμισή της. Αντίθετα, αναστολή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων έχει ως αποτέλεσμα τη μη διεγερτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στη CTP σε εμβρυϊκό πνεύμονα αρουραίου [243].

Και ενώ οι *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων τα αποτελέσματα από *in vivo* μελέτες είναι διαφορετικά ανάλογα με το είδος του θηλαστικού. Έτσι η *in vivo* χορήγηση σε αρνί, που χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο μελέτης, προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα της PC



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

στον πνευμονικό ιστό και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό [244]. Όμως, οι *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι τα γλυκοκορτικοειδή δεν προκάλεσαν αύξηση στα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Σε μελέτη που περιελάμβανε 76 πρόωρα νεογνά διαπιστώθηκε ότι στα νεογνά που χορηγούνταν γλυκοκορτικοειδή απαιτούνταν μηχανική υποστήριξη σε μικρότερο βαθμό χωρίς όμως να παρατηρηθούν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της PC στο βρογχοκυψελιδικό υγρό [245].

Ο μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών σε κύτταρα για την ωρίμανση του πνεύμονα και την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Όπως προαναφέρθηκε, τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε καλλιέργειες οργάνων ή σε συγκαλλιέργειες κυττάρων ή σε καλλιέργειες ιστών εμβρυϊκού πνεύμονα. Αντίθετα, σε μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, η δράση των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται ότι μετριάζεται πάρα πολύ. Ωστόσο, εάν αυτά τα κύτταρα συγκαλλιεργηθούν με εμβρυϊκούς πνευμονικούς ινοβλάστες τότε παρατηρείται εξολοκλήρου η δράση των γλυκοκορτικοειδών στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ακόμη, σε καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II που αναπτύσσονται με θρεπτικό υλικό από καλλιέργειες εμβρυϊκών ινοβλαστών που έχουν επωαστεί με στεροειδή, τότε επίσης παρατηρείται η ολοκληρωμένη δράση των κορτικοστεροειδών στα κύτταρα τύπου II. Αυτές οι παρατηρήσεις φαίνεται να ισχύουν λόγω της παραγωγής του παράγοντα της πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης (Fibroblast Pneumonocyte Factor, FPF) [246].

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

Πίνακας 9. Αποτελέσματα δράσης γλυκοκορτικοειδών στην ωρίμανση του πνεύμονα [233].

Διεργασία	Επίδραση στεροειδούς	Επαγωγή γονιδίων	Είδος μηχανισμού δράσης κορτικοστεροειδών
Παραγωγή επιφανειοδραστικού παράγοντα	Αύξηση φωσφολιπιδίων	FAS (συνθάση λιπαρών οξέων)	Έμμεσος
	Αύξηση πρωτεϊνών	SP-A, SP-B, SP-C	Έμμεσος
		SP-D	Άμμεσος
Προσρόφηση υγρών στον πνεύμονα	Αύξηση προσρόφησης	ENAC (διάυλος νατρίου στο επιθήλιο) Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (ATPase νατρίου/καλίου)	Άμμεσος
Αντιοξειδωτικό σύστημα	Αύξηση ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων	Κατάλαση, Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Έμμεσος

### Παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης

Ο παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης (FPF) είναι ένα πολυπεπτίδιο σταθερό στη θερμοκρασία, ευαίσθητο στη θρυψίνη και έχει μοριακή μάζα 5-15 kDa. Η παραγωγή του από τις ινοβλάστες φαίνεται ότι είναι οργανο-ειδική. Η παραγωγή του από εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα αρουραίου είναι μέγιστη σε κύτταρα που έχουν απομονωθεί τη στιγμή της ωρίμανσης του πνεύμονα. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών, στο να επάγουν την παραγωγή του παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες, παρεμποδίζεται από το κυκλοεξαμίδιο και την ακτινομυκίνη D, αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα της σύνθεσης πρωτεϊνών και RNA [247].

Ο FPF δρα με το να αυξάνει την παραγωγή λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα κύτταρα τύπου II *in vitro* και *in vivo* [222]. Ο παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης διεγείρει τη σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα εμβρυϊκά κύτταρα τύπου II αλλά δε φαίνεται να μεταβάλλει τη σύστασή του. Ο FPF ενεργοποιεί τη CTP η οποία διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη βιοσύνθεση της PC. Η διέγερση του ενζύμου της CTP γίνεται γρήγορα φτάνοντας σε πλατώ στα 60 min επώασης

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

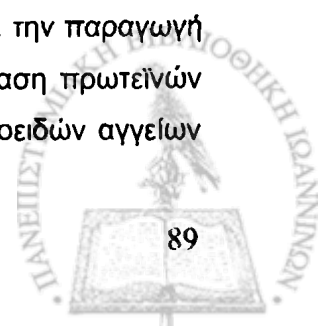
των ATII με τον παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης, υποδηλώνοντας ότι ίσως η δράση του παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης είναι μετα-μεταφραστική. Οι Zimmermann & Post [248] παρατήρησαν μία μετατόπιση του ενζύμου από το κυτοσόλιο στα μικροσωμάτια στα ATII κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πνεύμονα, προτείνοντας έναν ρυθμιστικό μηχανισμό μετατόπισης της CTP που μπορεί να υπάρχει σε εμβρυικά ATII. Όμως δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν ο παράγοντας πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης επάγει έναν τέτοιο μηχανισμό μετατόπισης.

Η ενεργότητα της CTP διπλασιάστηκε σε ATII που είχαν επωαστεί με κορτιζόλη. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε στη CTP όταν τα ATII επώαστηκαν με τον παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης. Ο μηχανισμός που ο FPF διεγείρει την παραγωγή της CTP δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε πνεύμονα αρουραίου που βρισκόταν τη 18<sup>η</sup> μέρα της κύησής του η δεξαμεθαζόνη αύξησε τη CTP κατά 34 % ενώ δεν είχε καμία επίδραση στη φωσφορική χολίνη και τη CPT. Στην ίδια εργασία όμως σε συγκαλλιέργειες κυττάρων που επώαστηκαν με κορτιζόλη παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση.

Τέλος, προκειμένου να αποδείξουν τη διεγερτική δράση του FPF που παράγεται από τις ινοβλάστες σε απόκριση στην κορτιζόλη, προχώρησαν σε απομόνωση και καθαρισμό της πρωτεΐνης FPF. Η απομόνωση έγινε σε υπερκείμενο καλλιέργειας ινοβλαστών που περιείχε κορτιζόλη. Επίδραση περαιτέρω του καθαρισμένου πλέον παράγοντα πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης σε ATII είχε ως αποτέλεσμα αύξηση στη CTP, δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα της χολίνης, της CDP-χολίνης, ενώ μείωσε τη φωσφορική χολίνη. Οι μεταβολές αυτές σε όλες τις περιπτώσεις ήταν πιο έντονες μετά από 1 ώρα επώαση με τον FPF [249].

### **Χορήγηση γλυκοκορτικοειδών για τη θεραπεία του IRDS**

Για την πρόληψη του IRDS στις περιπτώσεις πρόωρου τοκετού δύο φαρμακευτικές αγωγές έχουν αναφερθεί ως τώρα: η χορήγηση ορμονών στην εγκυμονούσα μητέρα πριν τον τοκετό, που επιταχύνουν την ωρίμανση του πνεύμονα του εμβρύου και προφυλακτική θεραπευτική αγωγή με surfactant αμέσως μετά τη γέννηση στο νεογνό. Η αποτελεσματικότητα κάθε θεραπευτικής προσέγγισης έχει μελετηθεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Τα κορτικοστεροειδή και ο surfactant λειτουργούν με εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς. Τα στεροειδή, όπως προαναφέρθηκε, διεγείρουν μέσω του παράγοντα της πνευμονοκυτταρικής ινοβλάστης, -σε απόκριση στα στεροειδή οι ινοβλάστες εμβρυϊκού πνεύμονα παράγουν μία πρωτεΐνη τον FPF-, το σχηματισμό κορεσμένης PC, την παραγωγή φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα ATII, την έκφραση πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα, μειώνοντας τη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων





## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

και επιταχύνοντας την ωρίμανση του πνεύμονα. Η χορήγηση εξωγενούς surfactant από την άλλη προάγει απευθείας την παραγωγή της DPPC και άλλων συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα που απαιτούνται για να σταθεροποιήσουν τον πνεύμονα. Επίσης προάγει την ομοιόμορφη κατανομή του αναπνεόμενου όγκου (tidal volume,  $V_t$ ) στις κυψελίδες και παρεμποδίζει τη διάσπαση του επιθηλίου κατά τη διάρκεια των αναπνευστικών κινήσεων χωρίς όμως να έχει κάποια επιρροή στη δομή του ανώριμου πνεύμονα [250].

Ωστόσο, η αύξηση στην παραγωγή συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα εξαιτίας των κορτικοστεροειδών σε εμβρυϊκό στάδιο είναι πολύ μικρή σε σχέση με την αύξηση που προκαλείται από τη χορήγηση εξωγενούς surfactant μετά τη γέννηση. Δεδομένα από πειράματα με ζώα έδειξαν ότι η προ γεννήσεως χορήγηση κορτικοστεροειδών και η μετά τη γέννηση αγωγή με surfactant είχαν συνεργιστικά θετικά αποτελέσματα στη λειτουργία εμβρυϊκού πνεύμονα. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν περαιτέρω να ενισχυθούν με χορήγηση της εκλυτικής ορμόνης της θυρεοτροπίνης (Thyrotrophin Releasing Hormone, TRH) σε περιπτώσεις πρόωρου τοκετού [251].

Ακόμη έχει αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα δράσης των κορτικοστεροειδών στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε πνεύμονα ενήλικα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς συγκριτικά με τη δράση τους σε πνεύμονα νεογνού. Οι Young & Silbajoris έδειξαν ότι σε ενήλικους αρουραίους η χορήγηση μεγάλης διάρκειας γλυκοκορτικοειδών, *in vivo*, προκαλεί κατά 4 φορές αύξηση στα επίπεδα της DSPC στο βρογχοκυψελιδικό υγρό [252]. Αυτό το γεγονός είναι πολύ σημαντικό λαμβάνοντας υπόψιν ότι η DSPC είναι το πλέον χαρακτηριστικό λιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα, λιπίδιο το οποίο κατά ένα μεγάλο ποσοστό βοηθά στη μείωση της επιφανειοδραστικής τάσης.

### Αποτελέσματα δράσης των κορτικοστεροειδών δεξαμεθαζόνη & βητα-μεθαζόνη

Τα πιο γνωστά και διαδεδομένα κορτικοστεροειδή είναι η βητα-μεθαζόνη και η δεξαμεθαζόνη. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η επίδραση της δεξαμεθαζόνης -σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  M- στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει άμεσα αποτελέσματα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και σε αυτό το φαινόμενο μεσολαβεί ο υποδοχέας του κορτικοστεροειδούς [253]. Άλλα άμεσα αποτελέσματα που έχει η δεξαμεθαζόνη είναι η αύξηση της λιποκορτίνης I στα ATII ενήλικα αρουραίου [254] και της έκφρασης της ATPase νατρίου-καλίου ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase) στην κυτταρική σειρά FD18, κυττάρων τύπου II από αρουραίο [255].

Οι Hallman et al μελέτησαν την επίδραση του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς βητα-μεθαζόνη στα φωσfolιπίδια βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος λαγού την 28<sup>η</sup> μέρα της κύησης



## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

του. Η βητα-μεθαζόνη αύξησε κύρια φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, τη PI και τη DSPC· συγκεκριμένα αύξησε το λόγο DSPC/Sph και το % της PI του συνόλου των φωσφολιπιδίων σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς [256]. Επίσης, σε εργασία τους οι Rooney et al αναφέρουν ότι η ενδομυϊκή χορήγηση βητα-μεθαζόνης (0.2 mg/Kg) σε κουνέλι την 26-27<sup>η</sup> μέρα της κύησής του είχε σημαντικά αποτελέσματα στα συστατικά του πνεύμονα του εμβρύου. Συγκεκριμένα αύξησε τη PC κατά 70 % στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, σχεδόν διπλασίασε το λόγο PC/Sph, αύξησε το ποσοστό ενσωμάτωσης της χολίνης στη PC κατά 90 %, αύξησε την ενεργότητα της CTP και της φωσφορικής φωσφατάσης κατά 50 % και μείωσε το γλυκογόνο στον πνεύμονα κατά 60 %. Η βητα-μεθαζόνη δεν είχε καμία επίδραση στη CPT ή στην LPCAT και μείωσε ελάχιστα την κινάση της χολίνης. Η χορήγηση βητα-μεθαζόνης σε έγκυο κουνέλι δεν προκάλεσε τόση αύξηση στην ποσότητα των φωσφολιπιδίων στον εμβρυϊκό πνεύμονα όση η απευθείας χορήγηση κορτιζόλης στο νεογνό. Έτσι υπέθεσαν ότι υπάρχουν άλλοι παράγοντες εκτός από τα γλυκοκορτικοειδή που ρυθμίζουν την προκαλούμενη από stress ωρίμανση του πνεύμονα και την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα [240, 257].

Επίσης, σε άλλη εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων ποσοτήτων βητα-μεθαζόνης σε αρουραίους που βρισκόταν τη 19<sup>η</sup> μέρα της κύησής τους, στη μορφολογία των κυττάρων στο περιεχόμενο και τα είδη της PC. Χορήγηση βητα-μεθαζόνης σε ποσότητες 0.10 ή 0.20 mg/kg βάρους προκάλεσαν διαφοροποίηση των ATII, αύξηση του αριθμού των στιβαδωτών σωματίων (LB) στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και τέλος σημαντική αύξηση στην ποσότητα της PC και τα μοριακά της είδη στον πνεύμονα του εμβρύου. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι προκειμένου να αποφευχθεί πιθανότητα εμφάνισης αναπνευστικού συνδρόμου απαιτούνται καθορισμένες ποσότητες βητα-μεθαζόνης από τη στιγμή που υψηλότερες ή χαμηλότερες δεν είχαν καμία επίδραση [258]. Τέλος, σε άλλη εργασία έχει τονισθεί ότι τα κορτικοστεροειδή δεξαμεθαζόνη και βητα-μεθαζόνη, σε συγκεντρώσεις 10 ng/ml, επηρεάζουν κατά τον ίδιο τρόπο το σχηματισμό στιβαδωτών σωματίων και τη σύνθεση φωσφολιπιδίων στα πνευμονοκύτταρα τύπου II εμβρυϊκού πνεύμονα ανθρώπου που βρισκόταν στην 7-12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης [259].

### **Επίδραση του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη σε κυτταρικές σειρές πνευμονοκυττάρων τύπου II**

Αναφέρθηκε ότι τα κορτικοστεροειδή μπορεί να διεγείρουν την παραγωγή επιφανειοδραστικών συστατικών. Στα κύτταρα A549 η γλυκοκορτικοειδής ορμόνη κορτιζόλη κυρίως αυξάνει την ενσωμάτωση σημασμένων ενδιάμεσων που συμμετέχουν στην

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ PC

παραγωγή της PC. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστό ότι αυξάνουν τη βιοσύνθεση της PC στον εμβρυϊκό πνεύμονα, ένα φαινόμενο που γίνεται απευθείας (direct) και γίνεται μέσω υποδοχέα που διαθέτουν τα κύτταρα. Η κορτιζόλη δρα μέσω συστήματος υποδοχέα σε αντίθεση με την 11-δεοξυκορτιζόλη. Η τελευταία είναι ένα αντιγλυκοκορτικοειδές λόγω της συναγωνιστικής αναστολής που παρουσιάζει στις θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα στα κύτταρα [260]. Μάλιστα στα κύτταρα A549 έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν 200000 θέσεις πρόσδεσης για τα γλυκοκορτικοειδή [224,261]. Η ανικανότητα της κορτιζόνης στα κύτταρα A549 να αυξήσει την ενσωμάτωση της [<sup>3</sup>H]χολίνης προς παραγωγή PC είναι αναμενόμενη επειδή τα συγκεκριμένα κύτταρα δε μπορούν να μετατρέψουν την κορτιζόνη στην ενεργό της μορφή, την κορτιζόλη. Παρόλο που ο πνευμονικός ιστός μπορεί να μετατρέψει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη δεν είναι γνωστό ακόμη εάν αυτό επιτυγχάνεται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, ενώ άλλα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες φαίνεται να είναι υπεύθυνα για αυτή τη μετατροπή [262].

Τα κορτικοστεροειδή επίσης έχει αναφερθεί ότι αποτελούν βασικό ρυθμιστή της έκφρασης των γονιδίων της πρωτεΐνης SP-B στα κύτταρα H441 μέσω του cAMP. Το cAMP αποτελεί σημαντικό διεγέρτη της σύνθεσης της PC και των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Παρόλο που πιο πρόσφατες κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η βητα-μεθαζόνη πλεονεκτεί έναντι της δεξαμεθαζόνης [263] στην προηγούμενη μελέτη στα H441 τα δύο κορτικοστεροειδή έχουν παρόμοια συμπεριφορά [229].



# ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



## 1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A549 & H441

Οι κυτταρικές σειρές A549 και H441 έχουν επίπεδο βιοασφάλειας (Biosafety Level) 1 και χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II για τη μελέτη πιθανής μεταβολής ενζυμικών ενεργοτήτων και λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα μετά την επίδραση χημικού και μηχανικού ερεθίσματος.

### 1.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549

#### Αρχή της μεθόδου

☐ Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1973 από τον D.J. Giard et al. [264] από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από πνεύμονα 58χρόνου άνδρα από τον Καύκασο. Περαιτέρω μελέτες από τον M. Lieber [265] έδειξαν ότι τα κύτταρα A549 μπορούν να παράγουν PC σε υψηλό ποσοστό ακόμη και με ακόρεστα λιπαρά οξέα μέσω της πορείας της κυτιδυλοτοτρανσφοράς της φωσφοχολίνης. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες.

### 1.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς H441

#### Αρχή της μεθόδου

☐ Η κυτταρική σειρά H441 (NCI-H441) δημιουργήθηκε το 1990 από τους Gazdar et al. [266] και προήλθε από κύτταρα που απομονώθηκαν από το υγρό περικαρδίου ασθενούς με αδενοκαρκίνο στον πνεύμονα. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει δείξει ότι τα κύτταρα διαθέτουν πολυστιβαδωτά σωματίδια και κυτοπλασματικές δομές που μοιάζουν με τους κοκκιώδεις σχηματισμούς που διαθέτουν τα κύτταρα Clara. Η κυτταρική σειρά H441 χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες κυρίως των πρωτεϊνικών συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάθε 58 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

#### Συσκευές

1. Θάλαμος επώασης. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών έγινε σε επωαστήρα με ατμοσφαιρική σύσταση 5 % CO<sub>2</sub>-95 % αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R)
2. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)



3. Θάλαμος νηματοειδούς ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)

#### Υλικά

1. Θρεπτικό υλικό Ham's F12K για την κυτταρική σειρά A549, Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1X, 500 ml, Cat. No. 21127022, Gibco-BRL (Life Technologies, Inc., Inchinnan, Scotland)
2. Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 για την κυτταρική σειρά H441 (500 ml, w/o glutamine, Cat. No. R-5886, Sigma)
3. Ανθρακικό νάτριο (7.5 % w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cat. No. 2080-060, Gibco-BRL, φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου)
4. Ορρός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS, Cat. No. A15-101, PAA, The Cell Culture Company)
5. Αποστειρωμένο φίλτρο 0.45 μm (Sterile Syringe Filter, Part. No. 431220, Corning, Germany)
6. Γλουταμίνη (200 mM L-Glutamine, Cat. No. K0282, Seromed, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20 °C)
7. Αντιβιοτικό (Antibiotic-Antimycotic, prepared with: 10000 U/ml Penicillin G sodium, 10000 μg/ml Streptomycin Sulfate, 25 μg/ml amphotericin B as fungizone, Cat. No. 15240-062, Invitrogen Corporation, Gibco-BRL, χωρίζεται σε αποστειρωμένα corning στο Hood, φυλάσσεται στους -20 °C)
8. Αιθανόλη (MB:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
9. Διμεθυλοσουλφοξειδίο αποστειρωμένο (DMSO, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 1X, 50 ml, Cat. No. 11101-011, Gibco)
10. Αποστειρωμένες πιπέττες μιας χρήσης των 5 και 10 ml, σωληνάκια corning των 15, 45 ml, τρυβλία petri των 10 ml (100/20 mm sterile 15 pieces, Cellstar)
11. Ειδικές θήκες φύλαξης κυττάρων στο υγρό άζωτο των 5 θέσεων (Cryocane, aluminium, pcs. 12, Cat. No. 5015-0001, Nunc)

#### Ψ Διαλύματα εργασίας

##### 1. Διάλυμα 12 N Αιθανόλης

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

##### 2. Αδρανοποίηση FBS



## Υλικά & Μέθοδοι

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

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

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

4. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων H441 τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml σε αντιβιοτικό

Σε 450 ml θρεπτικού υλικού RPMI προστίθενται 50 ml αδραντοποιημένου FBS, 5 ml γλουταμίνης και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πορτοκαλί πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

## Πάγωμα & Ξεπάγωμα των κυττάρων

### *Πάγωμα κυττάρων*

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

### *Ξεπάγωμα κυττάρων*

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



**2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ****Αρχή της μεθόδου**

☒ Η παραλαβή των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό έγινε με διαδοχικές φυγοκεντρίσεις και αιώρησή τους σε κατάλληλο ισότονο διάλυμα.

**Υλικά –Συσκευές**

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

**☞ Διαλύματα εργασίας****1. Διάλυμα 1 M PMSF**

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

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

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



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

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

### 2.1 Καμπύλη ανάπτυξης

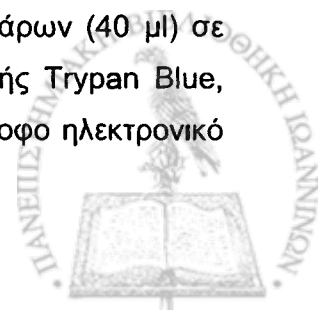
Προκειμένου να ετοιμαστούν καλλιέργειες κυττάρων σε τρυβλία ελαστικής μεμβράνης ετοιμάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης. Τα χρονικά διαστήματα παρακολούθησης των καλλιεργειών επιλέχθηκαν με βάση το χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς. Η καλλιέργεια των κυττάρων ( $4.1 \times 10^4/\text{cm}^2$  για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

### Συσκευές - Υλικά

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

### 2.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση - Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Υπό στείρες συνθήκες μεταφέρεται μικρή ποσότητα εναιωρήματος κυττάρων (40 μl) σε πλαστικό σωληνάκι. Ακολούθως, γίνεται αραιώση 1:1 με το διάλυμα βαφής Trypan Blue, τοποθετήθηκαν 10 μl στο αιματοκυτόμετρο και η μέτρηση έγινε σε ανάστροφο ηλεκτρονικό



μικροσκόπιο σε φακό  $\times 40$ . Τα ζωντανά κύτταρα έχουν μικρό σφαιρικό σχήμα και «λαμπυρίζουν» ενώ τα νεκρά έχουν μπλε χρώμα.

### 2.1.3 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

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

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

## 3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΒΗΤΑ-ΜΕΘΑΖΟΝΗΣ

### Αρχή της μεθόδου

☒ Η μηχανική διάταση (mechanical stretch) και το κορτικοστεροειδές βητα-μεθαζόνη αποτέλεσαν το μηχανικό και το χημικό ερέθισμα αντίστοιχα για τη μελέτη της μεταβολής συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στις κυτταρικές σειρές A549 και H441.

### Υλικά

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

### 3.1 Συσσκευή μηχανικής διάτασης

Καλλιέργειες κυττάρων A549 ( $4.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) (και H441,  $3.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη όπως περιγράφηκε πριν. Όταν τα κύτταρα είχαν σχηματίσει ταπήτιο (confluent 90 %, 48 ώρες για τα A549 και 82 ώρες για τα H441) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορρό και το σύστημα αφέθηκε για εξισορρόπηση για 30 min. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν πάνω σε Plexiglas και τοποθετήθηκαν βαρίδια για 1 και 4 ώρες. Η εφαρμογή της πίεσης έγινε στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C, συστάσεως 95 % σε οξυγόνο και 5 % σε CO<sub>2</sub>. Η δύναμη 35 g/cm<sup>2</sup> που εφαρμόστηκε αντιστοιχεί σε πίεση 26.6 mmHg ή αλλιώς 36.2 cm H<sub>2</sub>O [8].

### 3.2 Επίδραση βητα-μεθαζόνης

#### Εισαγωγή

Τα κορτικοστεροειδή ή γλυκοκορτικοειδή είναι ενώσεις με αντιφλεγμονώδη, αντιρευματική και αντιαλλεργική δράση. Τα πλέον διαδεδομένα αποτελούν η βητα-μεθαζόνη και η δεξαμεθαζόνη. Συγκεκριμένα, η άμεση θεραπευτική δράση στις καταστάσεις που ανταποκρίνονται στα κορτικοστεροειδή αρχίζει με τη δινάτριο φωσφορική βητα-μεθαζόνη, ένα διαλυτό εστέρα που απορροφάται γρήγορα από τους ιστούς, ενώ η παρατεταμένη δράση οφείλεται στην οξική βητα-μεθαζόνη που είναι λιγότερο διαλυτή και δημιουργεί ένα απόθεμα για αργή απορρόφηση. Ο συνδυασμός της ταχείας και παρατεταμένης δράσης αυτών των τύπων βητα-μεθαζόνης διευκολύνουν τόσο το γρήγορο έλεγχο όσο και τη σταθερή συντήρηση των αποτελεσμάτων του κορτικοστεροειδούς. Αντιπροσωπευτικές καταστάσεις που προτείνεται η χρήση του συγκεκριμένου κορτικοστεροειδούς είναι παθήσεις του κολλαγόνου (συστηματικός ερυθματώδης λύκος, σκληροδερμία), αλλεργικές καταστάσεις (ασθματική κατάσταση, χρόνιο βρογχικό άσθμα), και χρήση προ του τοκετού για την πρόληψη του συνδρόμου της αναπνευστικής δυσχέρειας στα πρόωρα βρέφη [249].

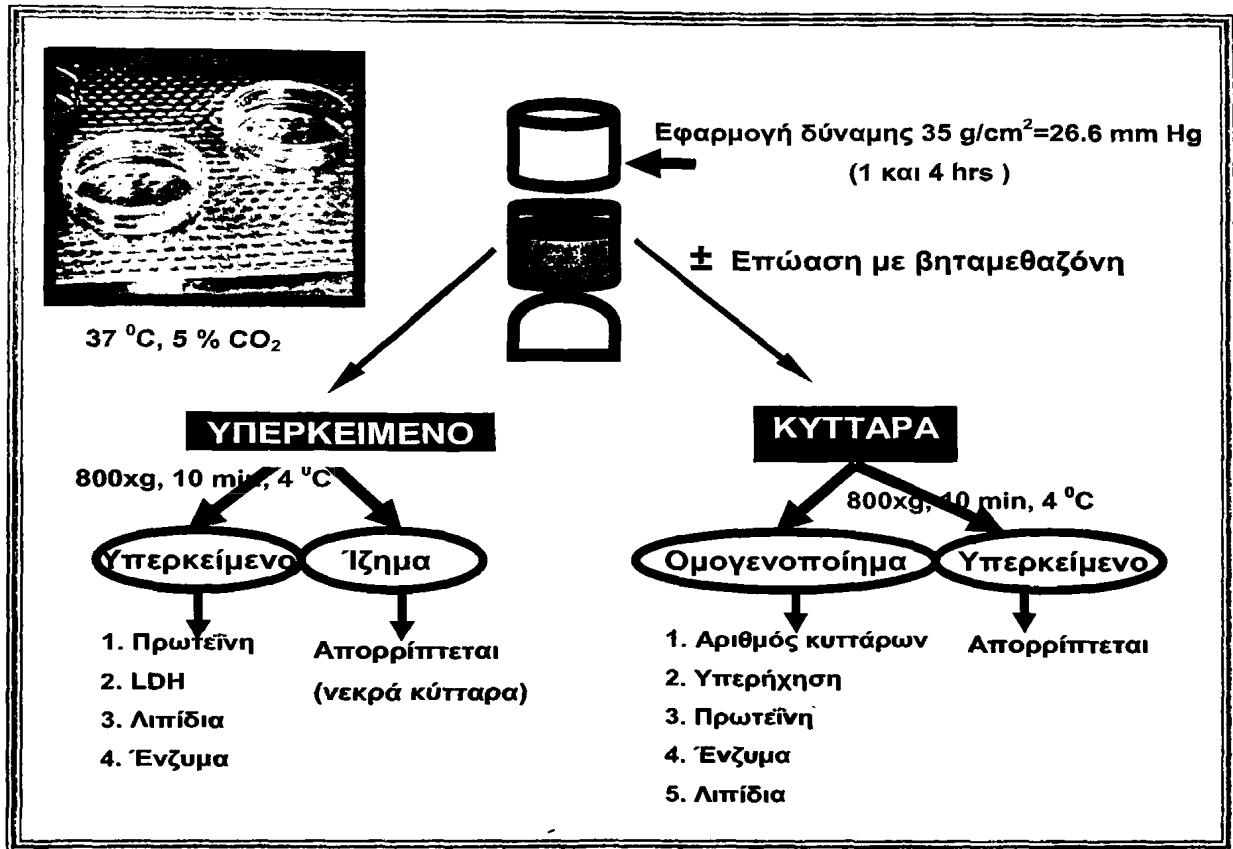
#### Υλικά

1. Βητα-μεθαζόνη (Beta-methasone acetate & Beta-methasone sodium phosphate, Celestone Chronodose, Schering-Plough, 3 mg beta-methasone/ml)

#### Πειραματική εκτέλεση

Σε πειράματα που απαιτούνταν η μελέτη της επίδρασης κορτικοστεροειδών έγινε επώαση των κυττάρων για 30 min με 30 μl βητα-μεθαζόνης (89.86 μg/5 ml υπερκειμένου ή 18 μg/ml ή 37.8 μM τελική συγκέντρωση) και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή μηχανικής διάταξης. Παράλληλα ετοιμάστηκαν και καλλιέργειες στις οποίες δεν έγινε εφαρμογή μηχανικής διάταξης.





Σχήμα 25. Διάγραμμα ροής επίδρασης μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης.

#### 4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

##### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Bradford είναι γρήγορη και ευαίσθητη στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Η τεχνική είναι απλή, πιο γρήγορη από τη μέθοδο Lowry και με λιγότερες παρεμπόδισεις, η δε βαφή G250 αντιδρά ειδικά με αργινυλο- και λυσινο- υπολείμματα πρωτεϊνών. Η μέθοδος δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες χημικές ουσίες ενώ αυτές που παρεμποδίζουν σε βιολογικά δείγματα είναι συνήθως τα απορρυπαντικά και οι αμφολύτες [267,268].

##### Αντιδραστήρια

1. Βαφή Brilliant Blue G-250 ( $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$ , FW:854.0, purity 98.0 %, Cat. No. B-0770, Sigma)
2. Αιθανόλη (MW:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
3. Φωσφορικό οξύ ( $H_3PO_4$ , MW:98.00, 1 L=1.71 Kg, assay 85 %, R: 34, S: 26-45, Cat. No. 30417, Riedel-de Haen)

4. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V, assay 96 %, Cat. No. A-2153, Sigma)
5. Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH, FW:32.04, assay 99.8 %, d=0.791 g/ml, R:11-23/25, S:1/2-7-16-24-25, Lab-Scan)

### Ψ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Διάλυμα 16.3 N αιθανόλης

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

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

50 mg Coomassie Blue G-250 διαλύονται σε 25 ml 95 % v/v αιθανόλης. Το διάλυμα αναμιγνύεται με 50 ml 85 % v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με δις απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε διήθηση σε χαρτί Whatman. Η μπλε βαφή φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη στους 4 °C για αρκετές εβδομάδες. Η διήθηση επαναλαμβάνονταν κάθε φορά πριν τη χρήση.

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

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

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

Ογκομετρική φιάλη των 50 ml που περιέχει 35 ml περίπου δις απεσταγμένο νερό τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C και προστίθενται 1.25 ml διαλύματος αλβουμίνης 1 mg/ml. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με δις απεσταγμένο νερό, αναδεύεται ήπια και μοιράζεται σε πλαστικά σωληνάκια των 10 ml. Φυλάσσονται στους -20 °C.

#### **4.1 Εκτέλεση Προσδιορισμού (Microassay 1-20 µg)**

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



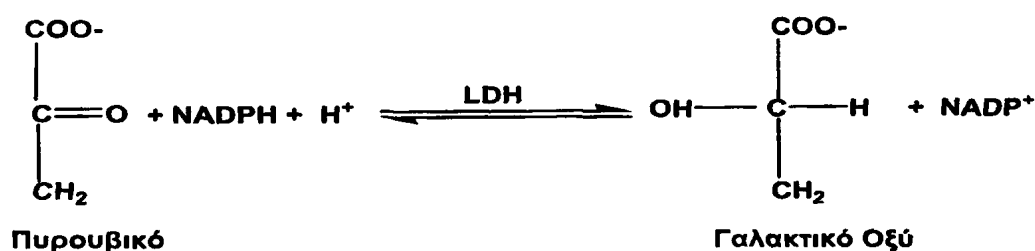
#### 4.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

### 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΔΕΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (LDH)

#### Αρχή της μεθόδου

☐ Η γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH, Lactate Dehydrogenase, EC 1.1.1.27) είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Η πλασματική μεμβράνη των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι διαπερατή από την LDH, αλλά σε περιπτώσεις βλάβης της μεμβράνης των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαπερατότητας της μεμβράνης και στη συνέχεια απώλεια της LDH στο εξωκυττάριο υγρό. Η *in vitro* απελευθέρωση της LDH από τα κύτταρα μας πληροφορεί για την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων [269,270].



Σχήμα 26. Αντίδραση που καταλύει η LDH.

#### 5.1 Εκτέλεση Προσδιορισμού

Η ενεργότητα της LDH (σε μονάδες Units/ml) μετρήθηκε φασματομετρικά σε υπερκείμενα καλλιεργειών κυττάρων A549 με τη βοήθεια αναλυτή Olympus.

## 6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

### Αρχή της μεθόδου

☑ Για την ανάλυση και χαρακτηρισμό των λιπιδίων των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν μίγματα χλωροφορμίου –μεθανόλης –νερού σε αναλογία (3:2:2 v/v), σύμφωνα με τη μέθοδο Bligh & Dyer [271]. Η μέθοδος Bligh-Dyer είναι από τις πλέον σημαντικές για την εκχύλιση λιπιδίων σε διάφορους ιστούς ή κύτταρα. Η μέθοδος είναι γρήγορη, αναπαραγώγιμη και έχει μεγάλη απόδοση. Το υδατικό ομογενοποίηση κατεργάζεται με ορισμένο όγκο μίγματος χλωροφορμίου -μεθανόλης και στη συνέχεια προστίθενται ένας όγκος  $H_2O$  και ένας όγκος  $CHCl_3$ . Σχηματίζεται διφασικό σύστημα στο οποίο τα λιπίδια μεταφέρονται στη χλωροφορμική φάση. Οι όγκοι του διφασικού συστήματος  $CHCl_3-CH_3OH$  (ή  $H_2O$ ) ρυθμίζονται κάθε φορά ανάλογα με την ποσότητα των λιπιδίων του δείγματος.

### Αντιδραστήρια

1. Χλωροφόρμιο ( $CHCl_3$ , FW:119.38, assay 99.5 %,  $d=1.489$  g/ml, R:22-38-40 48/20/22, Lab-Scan)
2. Μεθανόλη ( $CH_3OH$ , FW:32.04, assay 99.8 %,  $d=0.791$  g/ml, R:11-23/25, S:1/2-7-16-24-25, Lab-Scan)
3. Υδροχλωρικό οξύ (HCl, FW:36.46, assay 37 %,  $1l=1.19$  Kg, R:34-37, S:2-26, Cat. No 317, Merck)

### ☞ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Διάλυμα 2 N HCl

8.3 ml πυκνού HCl προστίθενται αργά και υπό ανάδευση σε 40 ml νερού. Μετά την ψύξη του διαλύματος ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 50 ml.

### 6.1 Εκτέλεση εκχύλισης

Ορισμένη ποσότητα ομογενοποιημένου κυττάρων αναμιγνύεται με κατάλληλο όγκο μίγματος χλωροφορμίου -μεθανόλης ώστε η τελική αναλογία μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης -νερού να είναι 1:1:0.9 (v/v). Προστίθεται ένας όγκος νερού και ένας όγκος χλωροφορμίου. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 min σε 1500xg και με γυάλινη πιπέττα Pasteur λαμβάνεται η χλωροφορμική φάση (κατώτερη). Στην υδατομεθανολική φάση προστίθεται ένας όγκος χλωροφορμίου και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση και



ενώνεται με την προηγούμενη. Οι χλωροφορμικές φάσεις ενώνονται και εξατμίζονται μέχρι ξηρού υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το ξηρό υπόλειμμα αναδιαλύεται σε ορισμένο όγκο μίγματος χλωροφορμίου –μεθανόλης (2:1 v/v).

## **6.2 Εκχύλιση προσροφημένων λιπιδίων από πυριτικό οξύ πλάκας TLC**

Όταν τα λιπίδια που έχουν απομονωθεί από τα κύτταρα αναλυθούν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) όπως περιγράφεται παρακάτω στην παράγραφο 8, τότε τα κύτταρα μπορούν να εκχυλιστούν ως εξής: τα λιπίδια αποξύνονται τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό σωλήνα και το πυριτικό οξύ εκχυλίζεται με 1.9 ml μίγματος χλωροφορμίου –μεθανόλης – νερού σε αναλογία 1:2:0.8, v/v [272]. Γίνεται ανάδευση για 1 min, φυγοκέντριση σε 1500xg για 10 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό γυάλινο σωλήνα. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά. Τα εκχυλίσματα ενώνονται και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα στον οποίο προστίθενται 1 ml χλωροφορμίου και 1 ml νερού. Το διφασικό σύστημα που δημιουργείται αναδεύεται για 1 min και φυγοκεντρείται σε 1500xg για 10 min. Η οργανική φάση παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και στην υδατομεθανολική φάση προστίθεται επιπλέον 1 ml χλωροφορμίου. Ακολουθεί ανάδευση, φυγοκέντριση και συλλογή της χλωροφορμικής φάσης. Οι ενωμένες χλωροφορμικές φάσεις εξατμίζονται σχολαστικά σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Τα λιπίδια αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (π.χ. 100 μl).

## **7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ**

### **Αρχή της μεθόδου**

☒ Ο προσδιορισμός φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett [273] βασίζεται στις ακόλουθες αντιδράσεις:

- ❶ Στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση με 70 % v/v HClO<sub>4</sub>
- ❷ Στο σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικού με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος
- ❸ Αναγωγή αυτού προς κυανού του φωσφορομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Σαν αναγωγικό χρησιμοποιείται το αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ (ANSA).

Το κυανό σύμπλοκο φωτομετρείται στα 820 nm.

### **Αντιδραστήρια**

1. Υπερχλωρικό οξύ (HClO<sub>4</sub>, MW:100.46, assay 70 %, 1l=1.67 Kg, R:5-8-35, S:23-26-36-45, Cat. No. 30755, Riedel-de Haen)





## Υλικά & Μέθοδοι

2. Μολυβδαινικό αμμώνιο  $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , MW:1235.86, assay 99 %, Cat. No. 31402, Riedel-de Haen)
3. Θειώδες νάτριο  $(\text{Na}_2\text{SO}_3)$ , MW:126.04, assay 98 %, Cat. No. 71988, Fluka)
4. Διθειώδες νάτριο  $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)$ , MW:190.10, assay 98 %, Cat. No. 6528, Merck)
5. 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ  $(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4\text{S})$ , (ANSA), FW:239.3, R:34, S:26-36/37/39-27, Cat. No. A0505, Sigma)
6. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ , MW:136.09, Cat. No. 4872, Merck)
7. Οξικός αιθυλεστέρας  $(\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5)$ , FW:88.11, assay 99.8 %,  $d=0.901$ , R:11, S:16-23-29-33, Cat. No. A 3511, Lab-Scan)
8. Νιτρικό οξύ  $(\text{HNO}_3)$ , MW:63.01, assay 65 %,  $l=1.40$  Kg, R:35, S:23-26-36-45, Cat. No. 30709, Riedel-de Haen)

### ☞ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Διάλυμα 3.5 mM μολυβδαινικό αμμώνιο

Ζυγίζονται 2.13 g ουσίας και διαλύονται με ανάδευση σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Το άχρωμο διάλυμα φυλάσσεται σε γυάλινη φιάλη στους 4 °C.

#### 2. Διάλυμα ANSA

Ζυγίζονται 28.5 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (0.6 M), 6 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0.19 M) και διαλύονται υπό ανάδευση σε 250 ml νερό. Στο άχρωμο διάλυμα προστίθεται 0.5 g ANSA (8.4 mM). Το καστανέρυθρο διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια διηθείται. Το υποκίτρινο διήθημα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη στους 4 °C.

#### 3. Αντιδραστήριο ANSA

Προκύπτει με ανάμιξη 4 ml διαλύματος ANSA με 6 ml νερό λίγο πριν την εκτέλεση του πειράματος.

#### 4. Διάλυμα 8.07 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ετοιμάζεται διάλυμα συγκεντρώσεως 250 μg P/ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Αρχικά μικρή ποσότητα ουσίας ξηραίνεται στους 105 °C για μία ώρα. Τοποθετείται σε ξηραντήρα και μετά από μισή ώρα ζυγίζονται 0.1098 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και διαλύονται σε 100 ml νερό. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20 °C για αρκετούς μήνες.

#### 5. Διάλυμα φωσφορικών 0.16 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Το διάλυμα εργασίας προκύπτει αραιώνοντας 2 ml από το διάλυμα 250 μg P/ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  στα 100 ml με νερό. Φυλάσσεται σε γυάλινη φιάλη στους 4 °C. Έτσι ετοιμάστηκε το διάλυμα εργασίας 5 μg P/ml.

#### 6. Διάλυμα 11.1 N ή 32.5 % v/v $\text{HNO}_3$



Σε 250 ml νερού προστίθενται αργά και υπό ανάδευση 250 ml 65 % v/v HNO<sub>3</sub>.

## 7.1 Πειραματική διαδικασία

### 7.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων και πρότυπης καμπύλης

- ❖ Ορισμένη ποσότητα δείγματος χλωροφορμικού εκχυλίσματος λιπιδίων (1-5 µg P) εξατμίζεται μέχρι ξηρού και προστίθεται 0.5 ml HClO<sub>4</sub>
  - ❖ Στην περίπτωση των προσροφημένων λιπιδίων σε πυριτικό οξύ πλάκας TLC αποξύνεται η επιθυμητή περιοχή και στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO<sub>4</sub>
  - ❖ Ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170 -180 °C για 5 ώρες
  - ❖ Μετά την καύση τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν και προστίθεται 1 ml νερό
- Για τη μέτρηση των δειγμάτων ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη ως εξής: Σε 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 1.0 ml πρότυπου διαλύματος φωσφορικών 5 µg P/ml. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με νερό και τέλος προστίθεται 0.5 ml HClO<sub>4</sub>.

### 7.1.2 Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά και με ισχυρή ανάδευση 3 ml διαλύματος 3.5 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Ακολουθεί θέρμανση σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Μετά τη ψύξη γίνεται φωτομέτρηση στα 820 nm.

Στην περίπτωση των προσροφημένων λιπιδίων σε πυριτικό οξύ πλάκας TLC, μετά τη ψύξη, προστίθενται σε κάθε σωλήνα 5 ml οξικού αιθυλεστέρα και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων λαμβάνεται η οργανική φάση του οξικού αιθυλεστέρα και φωτομετρείται σε γυάλινη κυψελίδα στα 780 nm.

## 7.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων


Από τις απορροφήσεις των προτύπων και την αντιστοιχία τους σε ποσότητα φωσφόρου, χαράσσεται γραφική παράσταση της μορφής  $y = ax$  και υπολογίζονται τα µg του φωσφόρου στα άγνωστα δείγματα. Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή από 1-5 µg P. Φωτομετρώντας στα 820 nm σημειώνεται ότι 1 µg P δίνει απορρόφηση 0.180. Στις μετρήσεις πάντα αφαιρούνταν η απορρόφηση τυφλού που είχε ετοιμαστεί χωρίς δείγμα ή στην περίπτωση των προσροφημένων λιπιδίων η απορρόφηση περιοχής πυριτικού οξέος που δεν είχε προσροφηθεί λιπίδιο.

### Παρατηρήσεις

Τα σκεύη πριν χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό φωσφόρου πλένονται με διάλυμα 32.5 % v/v HNO<sub>3</sub>. Αυτό γίνεται επειδή τα απορρυπαντικά περιέχουν φωσφορικά άλατα και μπορεί να αφήσουν στα τοιχώματα των γυάλινων σωλήνων ένα λεπτό φιλμ που περιέχει φώσφορο και δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

## 8. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ TLC

### Αρχή της μεθόδου

 Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC, Thin Layer Chromatography) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού των λιπιδίων που συνδυάζει απλότητα, ευαισθησία και χαμηλό κόστος. Η στάσιμη φάση είναι μία στερεή προσροφητική ουσία, με συνηθέστερη το ισχυρά πολικό πυριτικό οξύ, επιστρωμένη σε γυάλινη πλάκα ορισμένων διαστάσεων. Κινούμενη φάση είναι ένα μίγμα 3 ή και περισσότερων διαλυτών σε ορισμένη αναλογία. Ο διαχωρισμός ότηρίζεται σε φαινόμενα προσρόφησης που έχουν να κάνουν με τη διαφορετική πολικότητα του κάθε λιπιδίου ως προς το σύστημα ανάπτυξης. Η εμφάνιση των λιπιδίων γίνεται συνήθως με ολιγόλεπτη παραμονή της πλάκας σε ατμούς ιωδίου ή με ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. Το κάθε λιπίδιο χαρακτηρίζεται από την τιμή του R<sub>f</sub>, δηλαδή την τιμή του λόγου μετατόπισης της ουσίας προς την απόσταση του μετώπου του μίγματος διαλυτών [274].

### Υλικά - Συσκευές

1. Πλάκες TLC (TLC plates, Art. 5721, 20x20 cm, 33170050, Kieselgel 60, silica gel 60, Cat. No. 5721.0001, Merck)
2. Μικροσιφώνια –πουάρ -γυάλινος θάλαμος 27.5x27.5x7.5 cm (Cat. No. Z12, 619-5 Sigma)
3. TNS ((2-p-toluidinyl-naphthylene-6-sulfonate), C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>SK, FW:351.5, R:36/37/38, S:26-36, Cat. No. T-8753, Sigma)
4. Τρις-υδροχλωρικό οξύ (Tris-HCl, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.HCl, FW:157.6, assay 99 %, R:36/37/38, S:26-36, Cat. No. T-3253, Sigma)
5. Καυστικό νάτριο (NaOH pellets, MW:40.00, assay 99.9 %, R:35, S:26- 37/39-45, Cat. No. 30620, Fluka)
6. Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>, FW:119.38, assay 99.5 %, d=1.489 g/ml, R:22-38-40-48/20/22, Lab-Scan)



7. Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , FW:32.04, assay 99.8 %,  $d=0.791$  g/ml, R:11-23/25, S:1/2-7-16-24-25, Lab-Scan)
8. Πετρελαϊκός αιθέρας (Bp 60-80 °C,  $d_{20}=0.67$ , R:11-38-48/20-51/53-62-65-57, S:9-16-23-24-33-36/37-62, Code No. A42C11X, LabScan)
9. Οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , FW:60.05, assay 99.9 %,  $d=1.05$ , R:10-35, S:23-26-45, Cat. No. 401424, Carlo-Erba)
10. Συσκευή επίστρωσης πλακών Camag –Linomat και μικροσύριγγα τοποθέτησης δειγμάτων 500  $\mu\text{l}$ , Hamilton
11. Image Analyser (Vilber Lourmat, Bio-Rad)

### ☞ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Διάλυμα 1 N NaOH

Για διάλυμα τελικού όγκου 100 ml διαλύονται υπό ανάδευση 4.0 g ουσίας. Φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 2. Διάλυμα 50 mM Tris-HCl

Ζυγίζονται 2.0 g Tris-HCl και διαλύονται μέχρι τελικού όγκου 250 ml σε νερό. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.5 με 1 N NaOH.

#### 3. Διάλυμα 1 mM TNS

Σε 100 ml 50 mM Tris-HCl διαλύονται 0.0352 g TNS. Γίνεται έλεγχος του  $\text{pH}=7.5$ . Το άχρωμο διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη στους 4 °C.

### 8.1 Εκτέλεση

➤ Αρχικά ετοιμάζεται θάλαμος ανάπτυξης με σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο –μεθανόλη – νερό σε αναλογία 65:35:7 v/v και αφήνεται να κορεστεί. Στο σύστημα αυτό διαχωρίζονται πολικά λιπίδια. Σε συγκριτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα χλωροφόρμιο - πετρελαϊκός αιθέρας –μεθανόλη -οξικό οξύ (50:30:10:15 v/v) μέχρι την κορυφή και χλωροφόρμιο –μεθανόλη –νερό -οξικό οξύ (65:35:5:10 v/v) μέχρι την κορυφή ως προς την ίδια κατεύθυνση [275]. Στην περίπτωση ανάλυσης ουδετέρων λιπιδίων το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ (95:5:1, v/v).

➤ Στη συνέχεια μεταφέρεται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες η επιθυμητή ποσότητα λιπιδικού δείγματος και εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα αναδιαλύεται αμέσως σε μικρή ποσότητα μίγματος χλωροφορμίου -μεθανόλης 1:1 v/v.

## Υλικά & Μέθοδοι

- Η τοποθέτηση των δειγμάτων γίνεται με ρεύμα αέρα πίεσης 1.5 bar στη συσκευή επίστρωσης πλακών Camag-Linomat με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton.



Εικόνα 7. Συσκευή επίστρωσης πλακών TLC.

- Εναλλακτικά, η πλάκα χωρίζεται με τη βοήθεια χάρακα σε λωρίδες και σε ύψος 2 cm από τη βάση τοποθετούνται, με τη βοήθεια μικροσιφωνίων, τα δείγματα.
- Η πλάκα τοποθετείται στον κορεσμένο από ατμούς μίγματος διαλυτών για 1 ώρα περίπου για το σύστημα των πολικών λιπιδίων και μισή ώρα για το σύστημα των ουδετέρων λιπιδίων.
- Σημειώνεται το μέτωπο του διαλύτη και αφήνεται να εξατμιστεί πλήρως σε ρεύμα θερμού αέρα.

### 8.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η πλάκα ψεκάζεται με το αντιδραστήριο 1 mM TNS και με τη βοήθεια προτύπων δειγμάτων χαρακτηρίζονται οι αντίστοιχες κηλίδες των λιπιδίων. Τα λιπίδια προσδιορίζονται ποσοτικά με τη μέθοδο Bartlett που περιγράφηκε στην παράγραφο 7. Τέλος, γίνεται φωτογράφιση της πλάκας σε Image Analyser με φωτισμό UV.

## 9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΗΣ PC

### Αρχή της μεθόδου

☐ Τα λιπαρά οξέα της PC αναλύονται με αέρια χρωματογραφία αφού μετατραπούν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Για την αντίδραση μετεστεροποίησης χρησιμοποιείται μεθανολικό διάλυμα τριφθοριούχου βορίου ( $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ , 14 % v/v). Η μεθυλομάδα για το σχηματισμό του εστέρα παρέχεται από τη μεθανόλη ενώ το  $\text{BF}_3$  χρησιμεύει ως καταλύτης στην αντίδραση της μετεστεροποίησης.



**Υλικά -Συσκευές**

1. Αέριος χρωματογράφος Shimadzu GLC-14A (No. C10553015201)
2. Τριχοειδής στήλη SP-2340 (30 m x0.25 mm x0.2 μm film thickness, Cat. No. 24022, Supelco)
3. Ανιχνευτής φλόγας ιοντισμού (Flame Ionization Detector, FID)
4. Σύριγγα Hamilton για GC (Cat. No. 84851, Hamilton)
5. Πρόγραμμα καταγραφής και επεξεργασίας χρωματογραφήματος (DAPA Chromatography System, V1.4 X, Dapa Scientific Pty. Ltd, P.O. BOX 58 Kalamunda, Western Australia 6076)
6. Τριφθοριούχο Βόριο (14 % v/v BF<sub>3</sub> in methanol solution FW:99.85, Very toxic, Highly Flammable, Cat. No. B-1252, Sigma)
7. Εξάνιο (n-Hexane, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>4</sub>, assay (GC) 99 %, FW 86.15, R:11-48/20, S:9-16-24/25-29-51, Code No. A16C11X, Lab-Scan)
8. pH-μετρικό χαρτί
9. Πετρελαϊκός αιθέρας (Bp 60-80 °C, d<sub>20</sub>=0.67, R:11-38-48/20-51/53-62-65-57, S:9-16-23-24-33-36/37-62, Code No. A42C11X, LabScan)
10. Άνυδρο θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW:142.04 g/mol, assay 99 %, Cat. No. 31481, Riedel de Haen)
11. Πρότυπα δείγματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (10 mg/ml lipid standards, 20.0 % Linoleic acid, 20.1 % Linolenic acid, 20.1 % Oleic acid, 20.2 % Palmitic acid, 19.6 % Stearic acid, Cat. No. 1891, Sigma)
12. Πρότυπα δείγματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Mix GLC-10, 100 mg, palmitic acid methyl ester, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, 189-1 AM, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

**☞ Διαλύματα εργασίας****1. Πρότυπο διάλυμα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων 10 mg/ml (Πρότυπο Α)**

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

- Μεθυλεστέρας του οκτανοϊκού οξέος (C8:0)
- Μεθυλεστέρας του δεκανοϊκού οξέος (C10:0)
- Μεθυλεστέρας του λαυρικού οξέος (C12:0)



- Μεθυλεστέρας του μυριστικού οξέος (C14:0)

- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (C16:0)

**2. Διάλυμα εργασίας μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Πρότυπο Α)**

100 μl από το προηγούμενο μίγμα πρότυπων μεθυλεστέρων παραλαμβάνονται με πιπέττα και αραιώνονται με εξάνιο σε τελικό όγκο 5 ml. Φυλάσσονται σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -20 °C.

**3. Πρότυπο διάλυμα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων 10 mg /ml (Πρότυπο Β)**

- Ομοίως με το πρότυπο Α, παρασκευάζεται ισομοριακό πρότυπο διάλυμα 10 mg/ml σε εξάνιο των εξής μεθυλεστέρων:

- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (C16:0)

- Μεθυλεστέρας του στεατικού οξέος (C18:0)

- Μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (C18:1)

- Μεθυλεστέρας του λινολενικού οξέος (C18:3)

- Μεθυλεστέρας του αραχιδικού οξέος (C20:0)

**4. Διάλυμα εργασίας μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Πρότυπο Β)**

- 100 μl από το προηγούμενο διάλυμα μίγματος πρότυπων μεθυλεστέρων παραλαμβάνονται με πιπέττα και αραιώνονται με εξάνιο σε τελικό όγκο 5 ml. Φυλάσσονται σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -20 °C.

**5. Πρότυπο διάλυμα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων 10 mg /ml (Πρότυπο Γ)**

Ομοίως με τα πρότυπα Α και Β παρασκευάζεται ισομοριακό πρότυπο διάλυμα 10 mg/ml σε εξάνιο των εξής μεθυλεστέρων:

- Μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (C16:0)

- Μεθυλεστέρας του στεατικού οξέος (C18:0)

- Μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (C18:1)

- Μεθυλεστέρας του λινολενικού οξέος (C18:3)

- Μεθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος (C18:2)

**6. Διάλυμα εργασίας μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Πρότυπο Γ)**

100 μl από το προηγούμενο διάλυμα μίγματος πρότυπων μεθυλεστέρων παραλαμβάνονται με πιπέττα και αραιώνονται με εξάνιο σε τελικό όγκο 5 ml. Φυλάσσεται σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -20 °C.



## 9.1 Πειραματική διαδικασία

### 9.1.1 Ετοιμασία μεθυλεστέρων

Η PC που απομονώθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8, τοποθετήθηκε σε γυάλινο βιδωτό σωληνάκι, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, προστέθηκε 1 ml διαλύματος 14 % (v/v)  $\text{BF}_3$  σε μεθανόλη και ο σωλήνας πωματίστηκε με teflon και parafilm και τέλος αφήνεται σε αμμόλουτρο στους 100 °C. Η μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων της PC διαρκεί 15 min. Στη συνέχεια στον σωλήνα προστίθεται 1 ml νερό για τερματισμό της αντίδρασης μετεστεροποίησης. Ακολουθεί εκχύλιση 2 φορές με 2 ml πετρελαϊκού αιθέρα (κλάσματος 60-80 °C). Οι αιθερικές φάσεις συλλέγονται και εκπλένονται με 4 ml νερό μέχρι το pH=6-7 (όξινο pH υποδηλώνει την παρουσία λιπαρών οξέων που δε μετεστεροποιήθηκαν). Στην αιθερική φάση προστίθεται άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  προκειμένου να γίνει απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθεί διήθηση, εξάτμιση της πετρελαϊκής φάσης μέχρι ξηρού και τέλος αναδιάλυση σε 20 ml εξάνιο.

### 9.1.2 Ανάλυση λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία

Από κάθε δείγμα μεθυλεστέρων γίνεται ένεση δείγματος 1 ml στον αέριο χρωματογράφο. Τα δείγματα αναλύθηκαν ισοθερμικά σε τριχοειδή στήλη με τη βοήθεια ανιχνευτή φλόγας ιοντισμού (Flame Ionization Detector, FID). Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 30 min. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 170 °C, του ανιχνευτή 270 °C και η θερμοκρασία του εγχυτήρα 240 °C. Ο ανιχνευτής ήταν συνδεδεμένος με το πρόγραμμα επεξεργασίας Data Ver. 1.43.

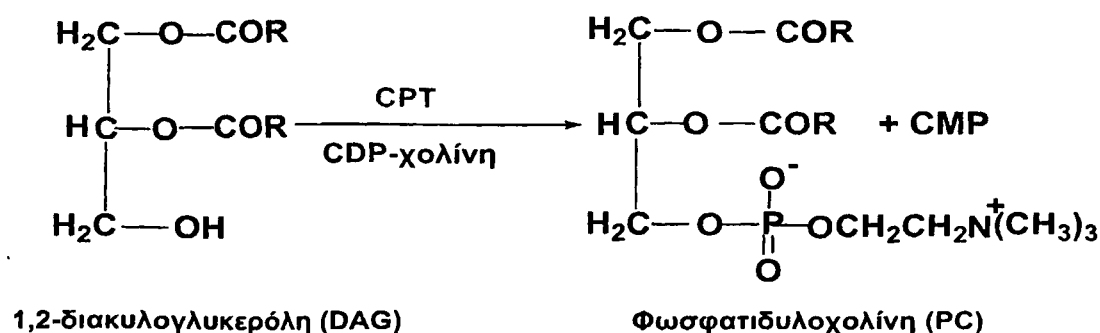
## 9.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων γίνεται με βάση τους χρόνους κατακράτησης των μεθυλεστέρων τους συγκρίνοντάς τους με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης των πρότυπων μεθυλεστέρων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται υπολογίζοντας το εμβαδόν επιμέρους κορυφών του χρωματογραφήματος, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του κάθε μεθυλεστέρα στο δείγμα.



**10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΩΣΦΟΧΟΛΙΝΟΦΩΣΦΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ****Αρχή της μεθόδου**

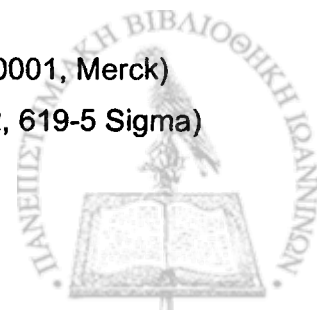
Η 1,2-διακυλογλυκεροφωσφοχολινοτρανσφεράση (CPT, CDPcholine:1,2-diacylglycerol cholinophosphotransferase, EC 2.7.8.2) καταλύει το τελευταίο βήμα της *de novo* πορείας βιοσύνθεσης της PC. Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 26. Τελευταίο βήμα της *de novo* πορείας για παραγωγή PC.

**Υλικά –Συσκευές**

1. TrizmaBase ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)
2. EDTANa<sub>2</sub> ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , MW:372.24, assay 99 %, Cat. No.34549, Riedel de Haen)
3. Χλωριούχο μαγνήσιο ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , MW:203.31, assay 99.0 %, Cat. No. 5833, Merck)
4. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Essentially Fatty Acid Free, prepared from fraction V albumin, assay 96 %, Cat. No. A-6003, Sigma)
5. Διπαλμιτυλογλυκερόλη (1,2-dipalmitoylglycerol,  $\text{C}_{35}\text{H}_{68}\text{O}_5$ , MW:568.9, assay 99 %, substantially free of 1,3-isomer, Cat. No. D-9135, Sigma)
6. CDP-χολίνη (Κυτιδυλοδιφωσφοχολίνη, Cytidine 5'-diphosphocholine sodium salt from yeast,  $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}_2$ , FW:488.3, assay 98 %, Cat. No. C-0256, Sigma)
7. [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνη (MW:488.3, SA=55.5 mCi/mmol, C=0.1 mCi/ml σε 70 % v/v αιθανόλη, 1.8 μmol/ml, 0.88 mg/ml, New England, Nuclear Boston MA, ARC-529)
8. Πλάκες TLC πυριτικού οξέος (TLC plates, 25DC-Platten 20x20 cm, Kieselgel 60, Cat. No.1.05721.0001, Merck)
9. Πλάκες TLC κελλουλόζης (TLC plates, 20x20 cm, Cellulose Cat. No. 5716.0001, Merck)
10. Μικροσιφώνια –πουάρ -γυάλινος θάλαμος 27.5x27.5x7.5 cm (Cat. No. Z12, 619-5 Sigma)



11. Οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , FW:60.05, assay 99.9 %,  $d=1.05$ , R:10-35, S:23-26-45, Cat. No. 401424, Carlo-Erba)
12. Αιθανόλη (FW:46.07, assay 99.8 %,  $l=0.788$  Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
13. Χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ , FW:119.38, assay 99.5 %,  $d=1.489$  g/ml, R:22-38-40-48/20/22, LabScan)
14. Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , FW:32.04, assay 99.8 %,  $d=0.791$  g/ml, R:11-23/25, S:1/2-7-16-24-25, LabScan)
15. Αντιδραστήριο εμφάνισης πλάκας TLC: ατμοί ιωδίου
16. Τολουόλιο ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ , FW: 92.14, assay 99.0 %, R:11-20, S:16-25-29-33, Labscan)
17. Απορρυπαντικό Triton X-100, (Polyethylene glycol tert-octylphenylether, MW:646.37, Cat. No. 93418, Fluka)
18. POPOP ( $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ , [1,4-bis[5-Phenyl-2-oxazolyl]benzene;2,2'-p-Phenylene-bis[5-phenyloxazole]], FW: 364.4, Cat. No. P-37541, Sigma)
19. PPO ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}$ , 2,5-Diphenyloxazole, FW:221.96, Cat. No. 43140, Fluka)
20. Πλαστικά βιδωτά σωληνάκια (vials) για μέτρηση ραδιενέργειας (vol. 5 ml, length 57/15.3 mm, Order No. 60.558 PP, Sarstedt)
21. Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (Liquid scintillation Counter Tri-Carb 2100 TR, Hewlett Packard, Packard Instrument Company)

#### ☞ Διαλύματα εργασίας

##### 1. Διάλυμα 0.5 M TrizmaBase, pH=8.5

Για τελικό όγκο 250 ml σε νερό ζυγίζονται 15.1 g ενώσεως. Ρυθμίζεται η τιμή του pH=8.5.

##### 2. Διάλυμα 0.1 M EDTANa<sub>2</sub>

Ζυγίζονται 1.9 g ενώσεως και διαλύονται σε 50 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$  σε πλαστική φιάλη.

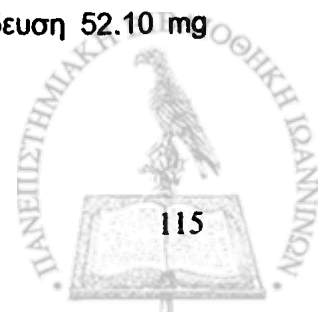
##### 3. Διάλυμα 0.5 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Ζυγίζονται 5.0 g ενώσεως και διαλύονται σε 50 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$  σε πλαστική φιάλη.

##### 4. Διάλυμα 1 mg/ml BSA

Σε 50 ml διαλύματος 0.5 M TrizmaBase pH=8.5 διαλύονται με ήπια ανάδευση 52.10 mg αλβουμίνης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$  σε πλαστικά σωληνάκια.

##### 5. Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης pH=8.5



## Υλικά & Μέθοδοι

Αναμιγνύονται 50 μl διαλύματος 0.1 M EDTA $\text{Na}_2$ , 200 μl διαλύματος 0.5 M MgCl $_2$ , 10 μl διαλύματος 1 mg/ml BSA. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 10 ml με 0.5 M Tris pH=8.5. Γίνεται ρύθμιση της τιμής του pH=8.5. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστικά σωληνάκια στους  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 6. Διάλυμα 12 N αιθανόλης

35 ml απόλυτης αιθανόλης αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 50 ml σε νερό.

### 7. Διάλυμα 0.35 N οξικού οξέος

1 ml οξικού οξέος αραιώνεται μέχρι τελικού όγκου 50 ml σε νερό.

### 8. Διάλυμα 20 mM διπαλμιτυλογλυκερόλης σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1, v/v.

Διαλύονται 0.0341 g διπαλμιτυλογλυκερόλης σε 3 ml μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης 1:1 v/v. Το διάλυμα φυλάσσεται σε ατμόσφαιρα αζώτου στους  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 9. Διάλυμα εργασίας 10 mM διπαλμιτυλογλυκερόλης σε απόλυτη αιθανόλη

Από το προηγούμενο διάλυμα 20 mM διπαλμιτυλογλυκερόλης λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και αναδιαλύεται σε διπλάσιο όγκο απόλυτης αιθανόλης. Το διάλυμα εργασίας ετοιμάζεται λίγο πριν την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης.

### 10. Διάλυμα 10 mM (ή 5.4 mg/ml) CDP-χολίνης

Ζυγίζονται 0.0540 g CDP-χολίνης σε μικρή ποσότητα (3 ml) Trizma base pH=8.5 και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 10 ml με 12 N αιθανόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  σε γυάλινο σωληνάκι.

### 11. Μίγμα 0.01 mCi θερμής CDP-χολίνης / 100 μl 10 mM ψυχρής CDP-χολίνης

Σε 100 μl διαλύματος 10 mM ψυχρής CDP-χολίνης προστίθενται 10 μl 0.1 mCi/ml θερμής CDP-χολίνης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  σε γυάλινο σωληνάκι.

### 12. Υγρό σπινθηρισμού

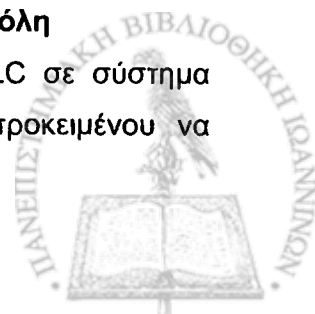
1 όγκος απορρυπαντικού Triton X-100 αναμιγνύεται με 2 όγκους τολουολίου. Σε όγκο 1 lit του προηγούμενου διαλύματος προστίθενται 0.4 g αντιδραστήριου POPOP, 4 g PPO και το διάλυμα αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 12 ώρες μέχρι να διαλυθούν πλήρως οι στερεές ουσίες. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

## 10.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πριν λάβει χώρα ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

### 10.1.1. Έλεγχος καθαρότητας του υποστρώματος 1,2 -διακυλογλυκερόλη

Ο έλεγχος καθαρότητας του υποστρώματος του εμπορίου έγινε με TLC σε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:οξικό οξύ (σε αναλογία 95:5:1, v/v) προκειμένου να



παρατηρηθεί εάν λαμβάνουν χώρα φαινόμενα ρακεμοποίησης σε υψηλό ποσοστό. Ο έλεγχος γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα από τη στιγμή που έχει αναφερθεί ότι παρατεταμένη φύλαξη του λιπιδίου, ακόμη και σε χαμηλή θερμοκρασία, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία 1,3 ισομερούς.

### 10.1.2. Έλεγχος καθαρότητας της [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνης

Ο έλεγχος καθαρότητας της [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνης έγινε με TLC κανονικής φάσης σε πλάκα 20x20 cm με πληρωτικό υλικό κελλουλόζη. Η δοκιμή στηρίχθηκε σε πληροφορίες που έδωσε η εταιρία American Radiolabeled Chemicals, (ARC) Inc (11624 Bowling Green St. Louis MO 64316). Συγκεκριμένα, ο έλεγχος καθαρότητας περιελάμβανε TLC με πληρωτικό υλικό κελλουλόζη (Cellulose, Merck) προς την ίδια κατεύθυνση στα εξής συστήματα: βουτανόλη-οξικό οξύ-νερό (50:20:30, v/v) και ακολούθως στο δεύτερο σύστημα 0.02 N οξικό οξύ σε 60 % v/v αιθανόλη (προσθήκη 120 λ οξικού οξέος σε 100 ml 60 % αιθανόλης). Η διάρκεια ανάπτυξης κάθε συστήματος ήταν περίπου 4 ώρες. Ακολούθησε ψεκασμός της πλάκας με TNS και εμφάνιση στο υπεριώδες. Η ζώνη της θερμής [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνης χωρίστηκε ανά 0.5 cm, αποξύθηκε, τοποθετήθηκε στα ειδικά πλαστικά σωληνάκια (vials) μέτρησης ραδιενέργειας, προστέθηκαν 2 ml υγρού σπινθηρισμού και μετρήθηκε η ραδιενέργεια.

### 10.1.3. Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας

Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της CPT έγινε αμέσως μετά την ετοιμασία των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και τα αντιδραστήρια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε γυάλινα σωληνάκια τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά: 10 ml ψυχρής CDP-χολίνης, 10 ml υποστρώματος 1,2-διακυλογλυκερόλης, η δε έναρξη της αντίδρασης έγινε με 100 μg πρωτεΐνης. Ο όγκος του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης συμπληρώθηκε στα 500 ml με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης pH=8.5. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 15 min και η διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης έγινε με 0.4 ml 0.35 N οξικού οξέος και τέλος ακολούθησε εκχύλιση κατά Bligh-Dyer. Η χλωροφορμική φάση, που περιέχει το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης PC, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και αναλύθηκε με TLC στο σύστημα χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:35:7, v/v). Γίνεται εμφάνιση της πλάκας με αμούς ιωδίου και στη συνέχεια η περιοχή που αντιστοιχεί στην περιοχή της PC αποξύνεται. Το ξύσμα τοποθετείται σε πλαστικό σωληνάκι (vial), προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού και αφού γίνει ανάδευση, μετράται η ραδιενέργεια σε μετρητή σπινθηρισμού υγρού (liquid scintillation counter, Packard).



**Αρνητικό control:** Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη πειραματική διαδικασία χωρίς όμως να χρησιμοποιηθεί πρωτεΐνη.

**Απόδοση A όλων των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας:** Χρησιμοποιήθηκε PAF σημασμένος με τρίτιο (1000 cpm/10 μl). Τοποθετούνται 10 μl διαλύματος PAF σε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης και ακολουθείται η προηγούμενη διαδικασία (εκτέλεση αντίδρασης) μέχρι το στάδιο της TLC σε C-M-W (65:35:7, v/v). Στη συνέχεια αποξύνεται όλη η λωρίδα σε 6 περιοχές, ως εξής: 1) αρχή, 2) Lyso-PC, 3) PAF, 4) PC, 5) περιοχή ως την PE και 6) ως το μέτωπο του διαλύτη. Τοποθετούνται τα ξύσματα σε πλαστικά σωληνάκια για μέτρηση των κρούσεων σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Τέλος, σε ξεχωριστό πλαστικό σωληνάκι τοποθετούνται 10 μl του σημασμένου <sup>3</sup>H-PAF με καθαρό ξύσμα από πλάκα για αποφυγή σφαλμάτων λόγω σβέσης (quenching).

### 10.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η ενεργότητα S της CPT εκφράζεται σε rpm PC/min/mg πρωτεϊνικού δείγματος και υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$S = \frac{(\text{cpm sample} - C)}{P \times t \times SA} \times \frac{1}{A}$$

<b>cpm sample</b>	Κρούσεις κηλίδας PC
<b>C</b>	Αρνητικό control
<b>P</b>	Ποσότητα πρωτεΐνης /δείγμα σε mg
<b>t</b>	Χρόνος ενζυμικής αντίδρασης σε min
<b>SA</b>	Ειδική ραδιενέργεια του μίγματος ψυχρής και θερμής CDP-χολίνης σε cpm/rpmol (τα cpm που αντιστοιχούν σε 10 μl του μίγματος ψυχρής θερμής CDP-χολίνης)
<b>A</b>	% Απόδοση των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας



Σε όλες τις περιπτώσεις οι κρούσεις στον τύπο είναι οι διορθωμένες τιμές που προκύπτουν μετά την αφαίρεση του τυφλού (πυριτικού).

Η % απόδοση A υπολογίζεται από τον τύπο:

$$A = 100 \times \frac{\Sigma i}{{}^3\text{H} - \text{PAF}_{\text{total}}}$$

όπου:

Σi: άθροισμα cpm περιοχών 1-6 της λωρίδας του PAF μείον τα cpm των τυφλών

${}^3\text{H}$ -PAF<sub>total</sub>: 10 μl του  ${}^3\text{H}$ -PAF<sub>total</sub> με καθαρό ξύσμα από πλάκα μείον τυφλό [276,277].

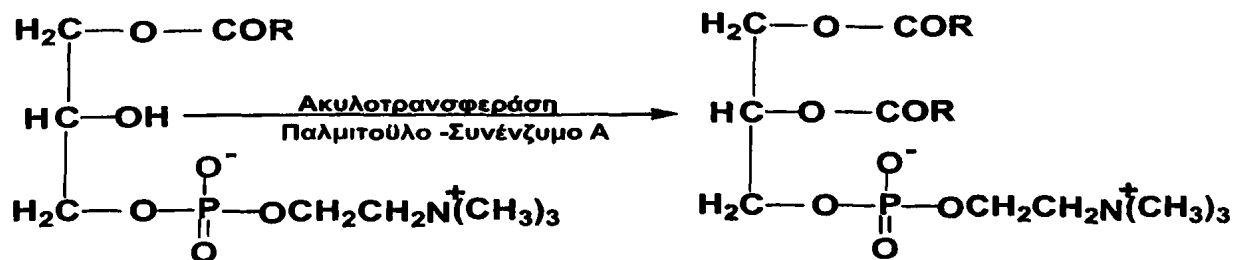
### ✍ Παρατηρήσεις

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος του εργαστηρίου μας επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αντίστοιχων ενζυμικών ενεργοτήτων CPT που εμπλέκονται στην παραγωγή της PC και του PAF.

## 11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΑΚΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ (LPCAT)

### Αρχή της μεθόδου

☒ Το ένζυμο ακυλοτρανσφεράση: λυσοφωσφατιδυλοχολίνη ακυλο-CoA (LPCAT, 2.3.1.23) καταλύει το τελευταίο βήμα της πορείας ανάπτυξης της βιοσύνθεσης της PC. Η ενζυμική ενεργότητα LPCAT έχει προσδιοριστεί σε πνευμονοκύτταρα τύπου II ποντικού [278]. Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (Lyso-PC)

Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)

Σχήμα 27. Ακυλίωση Lyso-PC προς παραγωγή PC.

### Αντιδραστήρια

1. Lyso-PC ( $C_{24}H_{50}NO_7P$ , 50 mg, FW:495.6, assay 99 %, Cat. No. L-5254, Sigma)
2. Tris-HCl ( $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ , FW:157.6, R:36/37/38, S:26-36, Cat. No. T-3253, Sigma)
3. Palmitoyl-Coenzyme A lithium salt (n-Hexadecanoyl Coenzyme A,  $C_{37}H_{65}LiN_7O_{17}P_3S$ , FW:1041.88, S:22-24/25, Cat. No. 76194, Fluka)
4. Palmitoyl Co-enzyme A [Palmitoyl- $1-^{14}C$ ] (2.2 GBq/mmol, 60.00 mCi/mmol, 0.5 ml in 0.1 M NaOAc buffer, pH=6.0, NEC-555, Dupont)

### ☞ Διαλύματα εργασίας

#### 1. 20 mM Lyso-PC σε αιθανόλη

30 mg ενώσεως διαλύονται σε 3.1 ml απόλυτης αιθανόλης σε γυάλινο σωληνάκι υπό ανάδευση και με ελαφριά θέρμανση. Το διάλυμα φυλάσσεται σε ατμόσφαιρα αζώτου στους  $-20\text{ }^{\circ}C$ . Ο έλεγχος καθαρότητας του υποστρώματος γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με TLC (σε σύστημα C:M:W, 65:35:7, v/v).

#### 2. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl pH=7.4

- Ζυγίζονται 0.7880 g Tris-HCl και διαλύονται σε 50 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη στους  $-20\text{ }^{\circ}C$ .

#### 3. 10 mM παλμιτοϋλο-CoA

Σε 0.5 ml δις απεσταγμένο νερό διαλύονται 5 mg παλμιτοϋλο-CoA. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 100 μl σε πλαστικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους  $-20\text{ }^{\circ}C$ .

#### 4. Διάλυμα εργασίας 500 μM παλμιτοϋλο-CoA pH=7.4

50 μl διαλύματος 10 mM παλμιτοϋλο-CoA αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 1000 μl σε Tris-HCl pH=7.4. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $-20\text{ }^{\circ}C$ .

## 11.1. Πειραματική διαδικασία

### Προκαταρκτικά Πειράματα

#### **A. Διαχωρισμός αντιδρώντων και προϊόντων**

Αρχικά έγινε έλεγχος διαχωρισμού των αντιδρώντων και προϊόντων (PC, Lyso-PC και παλμιτοϋλο-CoA) της ενζυμικής αντίδρασης με TLC μιας διάστασης με πληρωτικό υλικό πυριτικό οξύ στα ακόλουθα δύο συστήματα:

- 1) κλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (C-M-W, 65:35:7, v/v) για 1 ώρα και 15 min.
- 2) κλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό (C-M-AcA-W, 50:25:8:4, v/v) για 2 ώρες.

Η εμφάνιση των πλακών έγινε με ατμούς ιωδίου.



**B. Έλεγχος χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης**

Σε γυάλινα σωληνάκια αναμιγνύονται 860 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl pH=7.4, 10 μl 20 mM Lyso-PC σε αιθανόλη (τελική συγκέντρωση 200 μM), 50 μl 500 μM παλμιτοϋλο-CoA (τελική συγκέντρωση 25 μM), 5 μl παλμιτοϋλο-1-<sup>14</sup>C και γίνεται ανάδευση. Η έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης έγινε με 20 μg πρωτεΐνης. Επίσης ετοιμάστηκαν και δείγματα που περιείχαν τα προηγούμενα συστατικά χωρίς την ποσότητα της πρωτεΐνης (αρνητικό control). Ο τελικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης ήταν 1 ml. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 5, 15 και 30 min στους 37 °C και τερματίζεται με 2.2 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1, v/v). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα και οι σωλήνες αφήνονται όλο το βράδυ στους 4 °C. Την επόμενη απομακρύνεται η άνω φάση και η κάτω φάση (χλωροφορμική) εξατμίζεται μέχρι ξηρού και το ξηρό υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 100 μl χλωροφορμίου. Ο διαχωρισμός των προϊόντων από τα αντιδρώντα έγινε με TLC στο σύστημα που βρέθηκε από την προηγούμενη δοκιμή.

**Ενζυμική αντίδραση**

Στηριζόμενοι λοιπόν στις προηγούμενες παρατηρήσεις ακολούθησε ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας στα δείγματά μας:

Σε γυάλινα σωληνάκια τοποθετήθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα 900 μl Tris-HCl pH=7.4, 10 μl 20 mM Lyso-PC σε αιθανόλη (τελική συγκέντρωση 200 μM), 50 μl 500 μM παλμιτοϋλο-CoA (τελική συγκέντρωση 25 μM), 5 μl παλμιτοϋλο-1-<sup>14</sup>C και γίνεται ανάδευση. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με 20 μg πρωτεΐνης και έλαβε χώρα στους 37 °C για 5 min. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με 2.2 ml μίγματος C:M (v/v). Ακολούθησε ο διαχωρισμός αντιδρώντων και προϊόντων στο σύστημα χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό (C-M-AcA-W, 50:25:8:4, v/v) για 2 ώρες.

**11.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ενεργότητα S της LPCAT εκφράζεται σε nmol/min/mg πρωτεΐνης και υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$S = \frac{A \times C_{PCoA} \times 10}{t \times P}$$

<b>A:</b>	% παραγωγή της PC δείγματος – % παραγωγή της PC του τυφλού
<b>C<sub>PCoA</sub> :</b>	Τελική συγκέντρωση παλμιτοϋλο-CoA στο μίγμα της αντίδρασης



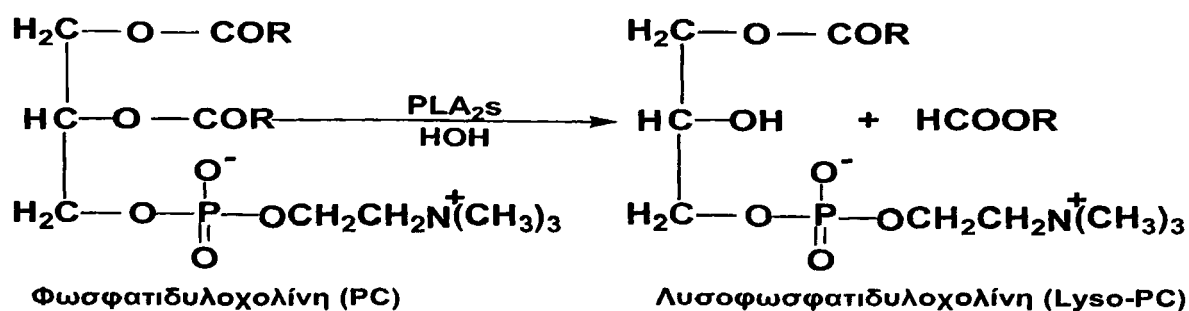
<b>P :</b>	Ποσότητα πρωτεΐνης ανά δείγμα σε µg
<b>t :</b>	Χρόνος ενζυμικής αντίδρασης σε min

## 12. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PLA<sub>2</sub> & PAF-AcH

### Αρχή της μεθόδου

Οι φωσφολιπάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων παράγοντας λυσοφωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Διαδεδομένο λιπαρό οξύ αποτελεί το αραχιδονικό οξύ (AA) το οποίο μπορεί να δώσει προϊόντα εικοσανοειδών περιλαμβάνοντας προσταγλαδίνες και λευκοτριένια, ενώ κύριες τάξεις λυσοφωσφολιπιδίων μπορεί περαιτέρω να ακετυλιωθούν προς παραγωγή PAF. Επειδή αυτοί οι λιπιδικοί μεσολαβητές μπορεί να ρυθμίζουν ανοσολογικούς μηχανισμούς σε διάφορα συστήματα, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη ενεργοτήτων PLA<sub>2</sub>(s) αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών εργαστηρίων.

Η φθορισμομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα PC η οποία στην sn-2 θέση είναι εστεροποιημένη με λιπαρό οξύ το οποίο στην άκρη έχει φθορίζουσα ομάδα (C<sub>12</sub>-NBD-PC για τη PLA<sub>2</sub> και C<sub>6</sub>-NBD-PC για την PAF-AcH). Το φθορίζων υπόστρωμα (C<sub>x</sub>-NBD-PC) όταν βρίσκεται σε μικκυλιακή κατάσταση σε υδατικό διάλυμα και διεγερθεί στα 475 nm φθορίζει ελάχιστα στα 535 nm. Υδρόλυση του C<sub>x</sub>-NBD-PC από μία PLA<sub>2</sub> έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του C<sub>x</sub>-NBD-λιπαρού οξέος το οποίο σε υδατικό διάλυμα φθορίζει 50 φορές περισσότερο από το υπόστρωμα στα 535 nm χωρίς καμία μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής [279]. Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο είναι η εξής:



Σχήμα 28. Δράση PLA<sub>2</sub>s σε PC.

**Όργανα –Αντιδραστήρια**

1. Φθορισμόμετρο (Luminescence Spectrometer LS55, Part No. L2250107, Serial No. 68002, Perkin Elmer)
2. C<sub>12</sub>-NBD-PC (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine, Cat.No. 810131, Avanti Polar Lipids, Pelham, AL, USA)
3. C<sub>12</sub>-NBD-FA (12-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid, Cat. No. N678, Molecular Probes Europe BV, Netherlands)
4. 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, Cat. No. 810130, Avanti Polar Lipids, Pelham, AL, USA)
5. C<sub>6</sub>-NBD-FA (6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoic acid, Cat. No. N316, Molecular Probes Europe BV, Netherlands)
6. Αιθανόλη (MW:46.07, assay 99.8 %, 1l=0.788 Kg, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)
8. Tris-HCl (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.HCl, FW:157.6, R:36/37/38, S:26-36, T-3253, Sigma)
9. EDTANa<sub>2</sub> (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O, MW:372.24, assay 99 %, Cat. No. 34549, Riedel de Haen)
10. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>, FW:110.98, assay 96 %, R:36, S:22 24, Cat. No. C-4901, Sigma)

**☞ Διαλύματα εργασίας**

**1. Διάλυμα 0.5 mM C<sub>12</sub>-NBD-PC**

Ποσότητα ίση με 1 mg C<sub>12</sub>-NBD-PC διαλύεται σε 2.33 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Διατηρείται στους -20 °C.

**2. Διάλυμα 1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη**

Ποσότητα ίση με 1 mg C<sub>12</sub>-NBD-FA διαλύεται σε 2.64 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Διατηρείται στους -20 °C.

**3. Διάλυμα εργασίας 0.1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη**

100 μl διαλύματος 1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

**4. Διάλυμα 0.5 mM C<sub>6</sub>-NBD-PC**

Ποσότητα ίση με 2 mg C<sub>6</sub>-NBD-PC διαλύεται σε 5.18 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

**5. Διάλυμα 1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη**

Ποσότητα ίση με 2 mg C<sub>6</sub>-NBD-FA διαλύεται σε 6.80 ml αιθανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

### 6. Διάλυμα εργασίας 0.1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA σε αιθανόλη

100 μl διαλύματος 1 mM C<sub>6</sub>-NBD-FA αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### 7. Διάλυμα 0.5 M CaCl<sub>2</sub> pH=7.4

Ζυγίζονται 2.8 g CaCl<sub>2</sub> και διαλύονται σε 50 ml νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### 8. Διάλυμα 0.34 M EDTANa<sub>2</sub> pH=7.4

Ζυγίζονται 10 g EDTANa<sub>2</sub> και διαλύονται σε 80 ml νερό περίπου ρυθμίζοντας το pH=7.4 μέχρι να διαλυθεί πλήρως το EDTANa<sub>2</sub>. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml και φυλάσσεται στους 4 °C.

### 9. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM TrisHCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, pH=7.4

0.1576 g TrisHCl διαλύονται σε 100 ml νερού. Προστίθενται 400 μl 0.5 M CaCl<sub>2</sub>. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

### 10. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM TrisHCl, 10 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH=7.4

0.1576 g TrisHCl διαλύονται σε 100 ml νερού και στη συνέχεια προστίθενται 2.94 ml 0.34 M EDTANa<sub>2</sub>. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

## 12.1 Εκτέλεση προσδιορισμού

### 12.1.1 Προσδιορισμός PLA<sub>2</sub>

Σε πλακίδιο 96 θέσεων προστίθενται τα αντιδραστήρια με την ακόλουθη σειρά: 240 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM TrisHCl, 2 mM Ca<sup>2+</sup> pH=7.4, 2.5 μl υποστρώματος C<sub>12</sub>-NBD-PC και 5 μg πρωτεΐνης (περίπου 7-10 μl δείγματος) οπότε και σημειώνεται ο χρόνος έναρξης της ενζυμικής αντίδρασης. Η μεταβολή του φθορισμού παρακολουθείται για 4 ώρες στους 37 °C και οι τιμές καταγράφονται κάθε 20 min. Το μήκος κύματος διέγερσης της ακτινοβολίας έχει ρυθμιστεί στα 475 nm ενώ το μήκος κύματος εκπομπής στα 535 nm. Στο τέλος της καταγραφής της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης προστίθενται 2 μl διαλύματος 0.1 mM C<sub>12</sub>-NBD-FA (χρήση εσωτερικού προτύπου) και μετράται η ένταση του φθορισμού. Επαναλαμβάνεται η προσθήκη του εσωτερικού προτύπου.

### 12.1.2 Προσδιορισμός PAF-AcH

Στο ίδιο πλακίδιο και σε διαφορετικές θέσεις επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM TrisHCl, 10 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH=7.4 και ως υπόστρωμα C<sub>6</sub>-NBD-PC. Η ενζυμική αντίδραση παρακολουθείται κατά τον ίδιο τρόπο ενώ ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται το C<sub>6</sub>-NBD-FA.



### ✍ Παρατηρήσεις

Οι μετρήσεις των ενζυμικών ενεργοτήτων έγιναν σε ομογενοποίημα κυττάρων και σε υπερκείμενα καλλιεργειών. Επίσης, σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις χωρίς πρωτεϊνικό δείγμα και με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης των κυττάρων.

### 12.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη των τιμών του φθορισμού ως προς τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παρακολούθησής του. Η γραμμική περιοχή στα δείγματά μας παρατηρήθηκε μετά από 2 ώρες ενζυμικής αντίδρασης οπότε και με αυτές τις τιμές σχεδιάστηκε ευθεία. Η γραφική παράσταση της συνάρτησης είναι της μορφής  $y=ax+b$  ( $y$ = τιμές φθορισμού,  $x$ = χρόνος παρακολούθησης αντίδρασης).

Η ενεργότητα της PLA<sub>2</sub> υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο.

$$S = \frac{6 \times a \times 10^4}{5 \times DFA \times V_{\text{Δείγμ}}}$$

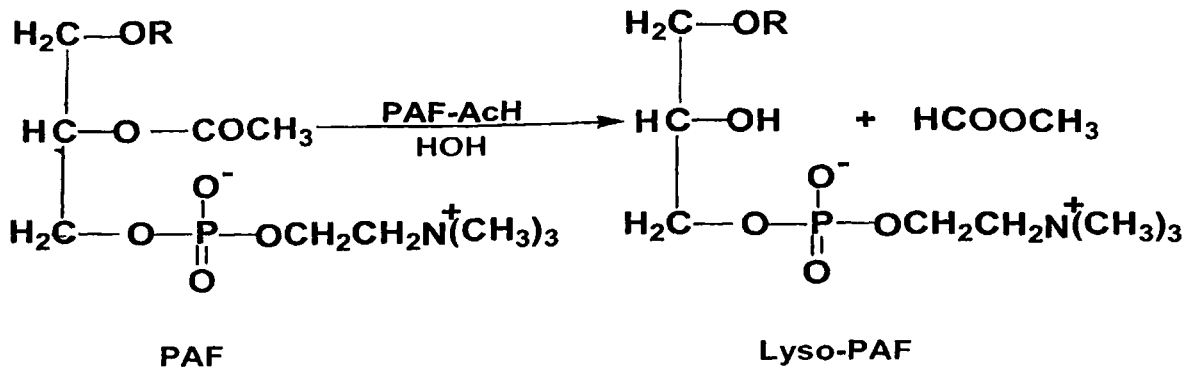
<b>S</b>	Ενεργότητα της PLA <sub>2</sub> (nmoles FA/h/ml)
<b>a</b>	Η κλίση της ευθείας $y = ax + b$
<b>DFA</b>	Η διαφορά των τιμών του φθορισμού του αντιστοίχου διαλύματος C <sub>x</sub> -NBD-FA που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο
<b>V<sub>Δείγμ</sub></b>	Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιείται στην ενζυμική αντίδραση

Η ενζυμική ενεργότητα υπολογίζεται σε nmoles C<sub>x</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης όταν η τιμή S που υπολογίζεται από τον προηγούμενο τύπο διαιρεθεί με την ποσότητα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

## 13. ΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PAF-AcH

### Αρχή της μεθόδου

☒ Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση των σημασμένων με τρίτιο [<sup>3</sup>H] οξικών ομάδων που απελευθερώνεται μετά την επώαση του [<sup>3</sup>H] –PAF με την πηγή του ενζύμου PAF-AcH που περιέχεται στα κύτταρα και στα αντίστοιχα υπερκείμενα των καλλιεργειών μας. Ο διαχωρισμός του μη υδρολυμένου [<sup>3</sup>H]–PAF από τις ελεύθερες οξικές ομάδες γίνεται με καταβύθιση του συμπλόκου HSA –[<sup>3</sup>H] –PAF με τριχλωροξικό οξύ (TCA).



Σχήμα 29. Υδρόλυση PAF από PAF-AcH προς παραγωγή Lyso-PAF.

### Αντιδραστήρια –Συσκευές

1. Χλωριούχο νάτριο (NaCl, assay 99.8 %, MW:58.44, Cat. No. 31434, Riedel-de Haen)
2. Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, MW:137.99, Cat. No. 71507, Fluka)
3. Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, MW:177.99, Cat. No. 71637, Fluka)
4. Αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (HSA, Human Serum albumin, Fraction V, assay 96-99 %, Cat. No. A-1653, Sigma)
5. PAF (sn-1:C16, MW:523.7, Cat. No. O-1270, Bachem)
6. PAF (Hexadecyl-2-acetyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholine, 1-O-[acetyl-<sup>3</sup>H], 9.25 MBq, 0.25 mCi, 262.76 GBq /mmol, 7.10 Ci/mmol, 2.5 ml of Ethanol, Lot. 3145-014, Cat. No. NET-910, Dupont)
7. Τριχλωροξικό οξύ (TCA, C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, MW:163.39, assay 99.5 %, R:35-50/53, S:1/2-26-36/37/39-45-60-61, Cat. No. 33731, Riedel de-Haen)

### Ψ Διαλύματα εργασίας

#### 1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH=7.4

Ζυγίζονται 8.2 g NaCl (0.14 M), 1.4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.010 M) και 1.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.010 M) και διαλύονται σε 1 L νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 7.4 μοιράζεται σε πλαστικά φιαλίδια και φυλάσσεται στους -20 °C.

#### 2. Διάλυμα 1 mg/ml HSA σε PBS pH=7.4

25 mg HSA διαλύονται με ήπια ανάδευση και χαμηλή θερμοκρασία σε 10 ml PBS pH=7.4 που ετοιμάστηκε προηγούμενα. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 25 ml με PBS. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο 0.45 μ, μοιράζεται σε γυάλινα αποστειρωμένα φιαλίδια και φυλάσσεται στους -20 °C. Οι ποσότητες που απαιτούνται παραλαμβάνονται με αποστειρωμένη σύριγγα, χωρίς να ανοίγεται το φιαλίδιο.

**3. Διάλυμα 1.8 mM PAF**

Ζυγίζονται 9.524 mg PAF (C16, sn-1) και διαλύονται σε 10 ml μίγματος χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1, v/v σε γυάλινο σωληνάκι. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

**4. Διάλυμα 20 μM [<sup>3</sup>H]acetate –PAF σε HSA/PBS**

Σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα (των 15 ml) παραλαμβάνεται 1 ml διαλύματος 1.8 mM PAF και 100 μl διαλύματος  $1.4 \times 10^{-5}$  M [<sup>3</sup>H]acetate –PAF και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στο γυάλινο σωλήνα τοποθετούνται 9 ml διαλύματος 1 mg/ml HSA σε PBS και το διάλυμα αφήνεται σε υδρόλουτρο στους 37 °C υπό περιοδική και ήπια ανάδευση για 15 min τουλάχιστον προκειμένου να επιτευχθεί πλήρη διαλυτοποίηση του PAF. Η ειδική ραδιενέργεια του διαλύματος είναι  $5 \times 10^4$  cpm/nmole περίπου.

**5. Διάλυμα 1.22 M TCA**

20 g TCA διαλύονται σε 100 ml νερού και φυλάσσονται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους -20 °C.

**13.1 Εκτέλεση προσδιορισμού**

Ετοιμάζεται παγόλουτρο στο οποίο τοποθετούνται 3 σειρές πλαστικών σωλήνων (erpendorfs) του 1 ml και σε κάθε σωλήνα τοποθετούνται 50 μl 20 % w/v TCA. Σε υδρόλουτρο 37 °C τοποθετούμε την πηγή του ενζύμου και το διάλυμα [<sup>3</sup>H]acetate-PAF/HSA/PBS για 10 min. Ακολούθως, στο υδρόλουτρο τοποθετείται πλαστικός σωλήνας όπου αναμιγνύονται 100 μl της πηγής του ενζύμου με το σημασμένο διάλυμα PAF (χρόνος μηδέν) και αναδεύονται (Reaction Mixture, RM). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 1 ώρα. Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια παραλαμβάνονται μετά από ανάδευση 50 μl και μεταφέρονται σε 2 σειρές σωλήνων που περιέχουν 50 μl 20 % w/v TCA στο παγόλουτρο όπου και παραμένουν για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 2 min σε 3000xg. Παραλαμβάνονται από το υπερκείμενο 50 μl και τοποθετούνται στο vial για μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Παράλληλα ετοιμάζονται θετικό και αρνητικό δείγμα αναφοράς (control).

**Θετικό control (TC).** 50 μl του μίγματος από το RM στο πλαστικό σωληνάκι (vial) για μέτρηση ραδιενέργειας.

**Αρνητικό control (AC).** 25 μl της πηγής του ενζύμου τοποθετούνται στην 3<sup>η</sup> σειρά με τους πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μl 20 % w/v TCA και αναδεύονται. Στη συνέχεια προστίθενται 25 μl του ραδιενεργού διαλύματος PAF. Το δείγμα φυγοκεντρείται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και παραλαμβάνονται από το υπερκείμενο 50 μl για μέτρηση ραδιενέργειας.

**13.2 Επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Η ενεργότητα S της PAF -ακετυλυδρολάσης σε nmoles/min/ml υπολογίζεται από τον τύπο:

$$S = \frac{(cpm_{\text{Δείγμα}} - cpm_{\text{AC}})}{t \times SA}$$

όπου:

<b>S</b>	Ενεργότητα PAF-AcH σε nmoles/ml/min
<b>cpm<sub>Δείγμα</sub></b>	Κρούσεις του δείγματος (από τα 50 μl που λήφθηκαν μετά τη φυγοκέντρωση)
<b>cpm<sub>AC</sub></b>	Κρούσεις αρνητικού control
<b>SA</b>	Ειδική ραδιενέργεια διαλύματος PAF (τα cpm που αντιστοιχούν σε 10 μl του διαλύματος PAF/HSA/PBS αντιστοιχούν σε 0.2 nmoles PAF)
<b>T</b>	Χρόνος επώασης σε min

Η ενεργότητα S υπολογίζεται και σε nmoles/min/mg πρωτεΐνης όταν η τιμή της ενεργότητας που υπολογίστηκε από τον προηγούμενο τύπο διαιρεθεί με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο που αντιστοιχεί στον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην ενζυμική αντίδραση [280].

**14. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ****Αρχή της μεθόδου**

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

*Κινητικότητα του Μορίου = (εφαρμοζόμενη τάση) \* (καθαρό φορτίο του μορίου) / (Τριβή του μορίου)*

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

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

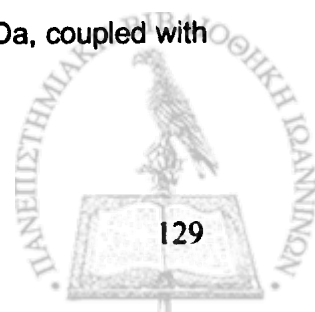


## Υλικά & Μέθοδοι

Σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) η μετανάστευση των πρωτεϊνών γίνεται όχι με βάση το ηλεκτρικό φορτίο αλλά με βάση το μοριακό βάρος τους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών ενώ προστίθεται και μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η μετατόπιση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το λογάριθμο της μάζας τους. Ο ακριβής καθορισμός των ζωνών των πρωτεϊνών μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες χρωστικές. Διαφορετικές πρωτεΐνες, σπάνια μετατοπίζονται κατά το ίδιο ποσοστό οπότε ανιχνεύονται και ελάχιστες ποσότητες πρωτεΐνης, επιτρέποντας έτσι και ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων. Η ένταση του χρώματος της χρωματισμένης πρωτεΐνης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης πραγματοποιώντας έτσι και ποιοτική και ημιποσοτική εκτίμηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών [281].

### Υλικά

1. Bromophenol Blue Sodium Salt ( $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$ , MW:691.9, Cat. No. B-8026, Sigma)
2. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400,  $\lambda_{max}=550$  nm, S:22, 24/25, Bio-Rad)
3. Ammonium Persulfate (APS) (Cat. No.161-0700, MW:228.20, R:8,22,37,42/43, S:17,24,26,43, Bio-Rad)
4. SDS (MW:288.38, Cat. No.161-0301, R: 22,36/38, S: 22, Bio-Rad)
5. Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (MW:154.17, Cat. No. 161-0200, 5 g, R: 22,37/38, S: 22,24/25, Bio-Rad)
6. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide,  $C_3H_5NO$ , MW:71.08, R:45-46-24/25-48/23/24/25, S:53-45, Merck)
7. Γλυκερόλη (Glycerol,  $CH_2OHCHOHCH_2OH$ , MW:92.09, Assay 99.5 %, 2.5 L, Analar)
8. TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ , MW:116.2, 99 %, Cat. No.T-8133, R:11-20/22-34, S:16-26-36/37/39-45, Sigma)
9. Γλυκίνη (Glycine, MW:75.07, Cat. 161-0718, Bio-Rad)
10. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol,  $C_2H_6OS$ , FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma)
11. Πρότυπα μοριακά βάρη (Marker, prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one-72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas)
12. Trizma Base ( $C_4H_{11}NO_3$ , MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)





13. Μεθανόλη (Methanol, 1l=0.79 Kg, MW:32.04, R:11-23/24/25-39/23/24/25, S:7-16-36/37-45, Riedel-de Haen)
14. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba)
15. Απόλυτη Αιθανόλη (Ethanol absolute, 1L=0.788 Kg, assay=99.8 %, MW:46.07, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen)

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

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

#### Ψ Διαλύματα εργασίας

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

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

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

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

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

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

##### 4. Διάλυμα 0.35 M SDS

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

##### 5. Υπερθειικό αμμώνιο 0.44 M APS

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



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

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

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

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

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

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

**9. Διάλυμα εργασίας προτύπων μοριακών βαρών**

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

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

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

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

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

**12. Διάλυμα 2.06 N αιθανόλης**

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

**✍ Παρατηρήσεις**

Όλα τα διαλύματα ετοιμάζονται με δις απεσταγμένο νερό.

## 14.1 Εκτέλεση προσδιορισμού

### 14.1.2 Ετοιμασία της ηλεκτροφόρησης

Αρχικά στήνεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μία γυάλινη πλάκα και μία από αλουμίνιο και ανάμεσά τους τοποθετούνται 2 μαύρες πλαστικές λωρίδες (spacers). Τοποθετούνται στο dual caster και βιδώνονται με προσοχή παράλληλα ανά δύο οι 6 βίδες. Ακολούθως ετοιμάζεται το πήκτωμα διαδρομής (separating gel) επιλέγοντας κάθε φορά το ποσοστό πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με τη μοριακή μάζα της υπό ανάλυση πρωτεΐνης στο δείγμα μας (Πίνακας 10). Το διάλυμα τοποθετείται με μικροσύριγγα ανάμεσα στις 2 πλάκες χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. Τοποθετούνται λίγες σταγόνες νερού προς σταθεροποίηση του πήκτωματος και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 min τουλάχιστον. Αφαιρούμε τις σταγόνες νερού με λίγο διηθητικό χαρτί.

**Πίνακας 10.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος σε διάφορα ποσοστά ακρυλαμιδίου.

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



Πίνακας 11. Ανάλυση SDS-Page διαφόρων ισομορφών PLA<sub>2</sub>.

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

### SDS-Page της aiPLA<sub>2</sub>

Η ανάλυση SDS-Page της aiPLA<sub>2</sub> έγινε σε ποσοστό 12.5 % σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [192]. Στη συνέχεια ετοιμάζεται το διάλυμα επιστοίβασης (stacking gel) σε πλαστικό σωληνάκι και τοποθετείται προσεκτικά πάνω από το διάλυμα διαδρομής χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. Αμέσως τοποθετείται ένα ειδικό χτενάκι μέχρι το πήκτωμα να πολυμεριστεί (1 ώρα περίπου). Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός τότε σημειώνονται οι θέσεις -well τοποθέτησης των δειγμάτων και αφαιρείται το χτενάκι. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (διάλυμα εργασίας 10x) στις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων μέχρι να τοποθετηθούν τα δείγματα.

### 14.1.3 Ετοιμασία δειγμάτων

Ετοιμάζονται καλλιέργειες κυττάρων στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, η μονοστιβάδα των κυττάρων πλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 που έχει τοποθετηθεί στους 4 °C και τα κύτταρα συλλέγονται με 200 μl διαλύματος βρωμοφαινόλης (2xsample buffer) σε πλαστικά σωληνάκια (erpendorfs). Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται για 10 min στους 95 °C και φυλάσσονται στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση.

### 14.1.4 Τοποθέτηση δειγμάτων

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

### 14.1.5 Χρώση των πρωτεϊνών του πηκτώματος

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

### 14.1.6 Αποχρωματισμός του πηκτώματος

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

### 14.1.7 Στέγνωμα και στερέωση του πηκτώματος

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



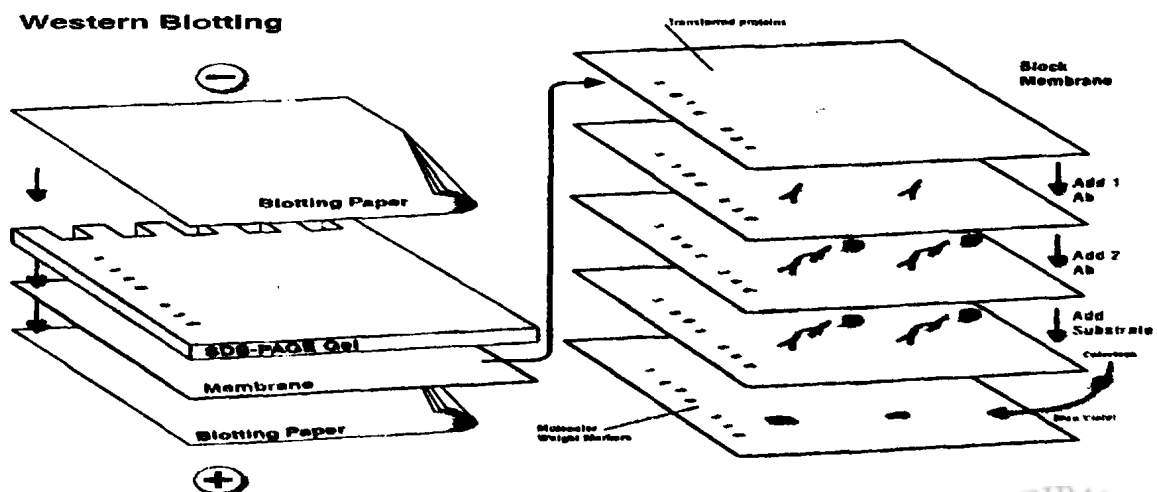
## 14.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

## 15. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ αΙPLA<sub>2</sub>

### Αρχή της μεθόδου

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



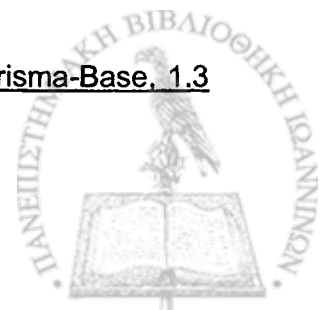
Σχήμα 30. Αρχή της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης.

**Συσκευές – Υλικά**

1. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Hoffer TE70 Semi-dry, Transpher unit, 80-6210-34, Serial No. 20098784, Amersham Biosciences Corp, USA)
2. Μembrάνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Immuno-Blot PVDF membrane for N-terminal sequencing, Polyvinylidene difluoride, 140-150 µg πρωτεΐνης/cm<sup>2</sup> μεμβράνης, Cat. No. 162-0177, 26 cm x 3.3 m, 1 roll, Bio-Rad)
3. Διηθητικό χαρτί Whatman
4. Blotter paper (14x16 cm, Cat. No. 80-6211-67, Amersham Biosciences)
5. Tween-20 (d=1.095, S:24/25, Cat. No. 27,434-8, Aldrich)
6. TrizmaBase (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, FW:121.14, min 99.8 %, ερεθιστικό, Cat. No. T-1503, Sigma)
7. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (Horseradish Peroxidase labelled antibodies, ECL 1 & 2 RPN 2209 AmershamBiosciences, UK, περιέχει τα εξής: Detection reagent 1, 125 ml, Cat. No. 1059243, Detection reagent 2, 125 ml, Cat. No. 1059250)
8. Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (LifeRay 24x30 cm, ID. No., LI000216034, Ferrania Incorp. Italy)
9. Φιλμ (Kodak Biomax Xar Film, Scientific Imaging Film for Biological Imaging, 13x18 cm, 50 sheets, Kodak Industrie, Cedex France)
10. Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12, Ref. Cat. No. 5070933, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)
11. Υγρό στερέωσης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer, Ref. Cat. No. 5071071, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France)
12. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου
13. Αντίσωμα aiPLA<sub>2</sub> (mouse anti-1-Cys Peroxiredoxin monoclonal antibody, isotype IgM, Cat. No. MAB 3478, Chemicon)
14. Δευτερεύων αντίσωμα (Mouse IgG, Prod.#31452 Pierce Biotechnology, Rockford USA)
15. Αντίσωμα β-ακτίνης (β-actin antibody, Cat No. 4967, Cell Signalling)
16. Βαφή Ponceau-S (0.1 % w/v Ponceau S solution in 5 % acetic acid, R:36/37/38, S:26-36, Cat. No. P-7170, Sigma)

**☞ Διαλύματα εργασίας**

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



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

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

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

**3. Διάλυμα εργασίας TBS**

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

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

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

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

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

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

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

**7. Διάλυμα εργασίας χημειοφωταύγειας**

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

**8. Διάλυμα εργασίας εμφάνισης του φιλμ**

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

**9. Διάλυμα εργασίας στερέωσης του φιλμ**

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

**10. Διάλυμα εργασίας πρωτεύοντος αντισώματος αιPLA<sub>2</sub>**

6 μl μονοκλωνικού αντισώματος του εμπορίου αραιώθηκαν με 3 ml διαλύματος TBS (αραίωση 1:500). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

**11. Διάλυμα εργασίας δευτερεύοντος αντισώματος**





## Υλικά & Μέθοδοι

2 ml αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 10 ml διαλύματος δέσμησης 10 % (αραίωση 1:10000). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### 12. Διάλυμα εργασίας αντισώματος β-ακτίνης

1 ml αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου με 7 ml διαλύματος δέσμησης 10 % w/v (αραίωση 1:7000). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

## 15.1 Πειραματική διαδικασία

### 15.1.1 Ετοιμασία μεμβράνης

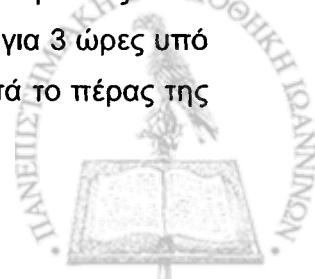
Η μεμβράνη PVDF κόβεται σε διαστάσεις 5x8 cm, δηλαδή στις διαστάσεις του πηκτώματος (χωρίς το πήκτωμα επιστοίβασης). Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της μεμβράνης απαιτείται ενεργοποίησή της με μεθανόλη και στη συνέχεια εξισορρόπησή της στο διάλυμα μεταφοράς 1-2 min (transfer buffer). Η μεμβράνη είναι έτοιμη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

### 15.1.2 Οριζόντια μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη

Αρχικά ετοιμάζονται διηθητικά χαρτάκια Whatman διαφορετικού πάχους που κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος. Διαβρέχονται στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) και τοποθετούνται στη συσκευή ανοσοαποτύπωσης. Αρχικά στη συσκευή τοποθετούνται το πλαστικό δοχείο, 2 μεγαλύτερα φύλλα Whatman και ένα πιο λεπτό, μετά η μεμβράνη και το πήκτωμα που έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση (αφού έχει απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοίβασης). Πάνω από το πήκτωμα τοποθετείται ένα ψηλό χαρτάκι και τα 2 πιο παχιά Whatman. Η συσκευή κλείνεται και συνδέεται με το τροφοδοτικό. Η ανοσοαποτύπωση διαρκεί 1 ώρα στα 75 V σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μεταφοράς, το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση προκειμένου να γίνει έλεγχος μεταφοράς των πρωτεϊνών όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 15.1.5.

### 15.1.3 Σήμανση (πρόσδεση) του αντισώματος της αιPLA<sub>2</sub> στη μεμβράνη

Η μεμβράνη PVDF, όπου μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες, τοποθετείται για 5-10 δευτερόλεπτα σε δις απεσταγμένο νερό και αμέσως εμβαπτίζεται σε διάλυμα δέσμησης 5 % (blocking) για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης για 3 ώρες υπό ανάδευση στους 4 °C. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτεΐν αντισώμα τουλάχιστον για 3 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (ή overnight σε θερμοκρασία 4 °C). Μετά το πέρας της



επώασης το διάλυμα απορρίπτεται και ακολουθούν 3 διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης: με TBST για 5 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 15.1.4 Εμφάνιση του ειδικού αντισώματος

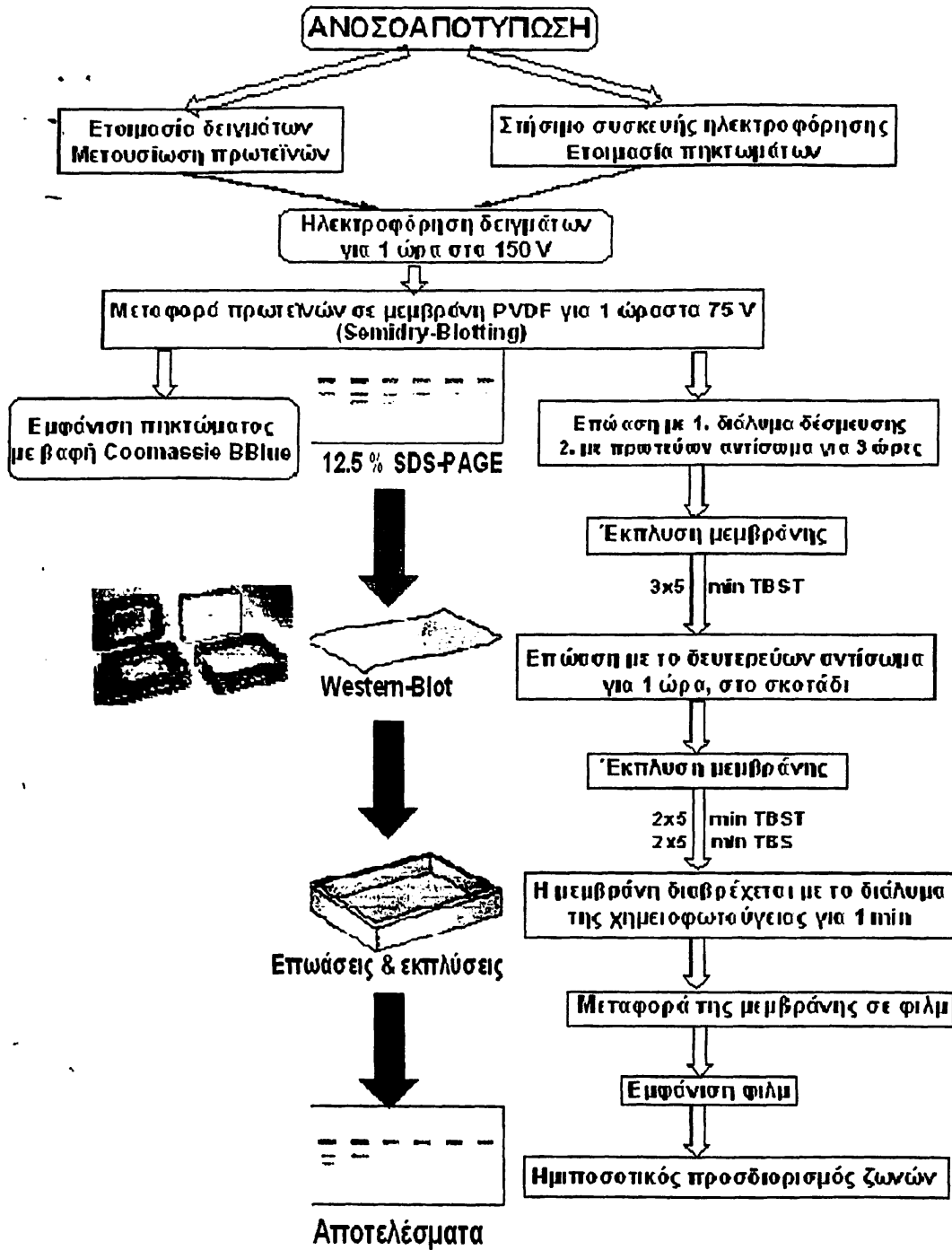
Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερεύων αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό με το πρωτεύων, για 60 min περίπου υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (στο σκοτάδι). Μετά το πέρας της επώασης το διάλυμα του αντισώματος απορρίπτεται και ακολουθούν 4 εκπλύσεις σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Συγκεκριμένα 2x5 min με TBST και 2x5 min με TBS. Οι εκπλύσεις της μεμβράνης είναι απαραίτητες προκειμένου να αποτραπεί μη ειδική πρόσδεση του πρωτεύοντος και του δευτερεύοντος αντισώματος και να μειωθούν πιθανά προβλήματα κατά την εμφάνιση του φιλμ (Σχήμα 31).

#### 15.2 Εμφάνιση του φιλμ

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

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι προκειμένου να διευκρινισθεί εάν έχει γίνει ισοφόρτωση των δειγμάτων τότε η μεμβράνη ξεπλένεται με νερό, τοποθετείται στο διάλυμα δέσμευσης για 1 ώρα και αφήνεται με το αντίσωμα της ακίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η εμφάνιση του αντισώματος και του φιλμ όπως αναφέρθηκε προηγουμένα. Ακόμη, διευκρινίζεται ότι ως θετικό δείγμα αναφοράς (control) στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ομογενοποίημα κυττάρων HeLa.

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



Σχήμα 31. Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.



**16. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ αiPLA<sub>2</sub> ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ MJ33****Αρχή της μεθόδου**

☒ Η διάκριση διαφόρων ισομορφών PLA<sub>2</sub>, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της PC σε διάφορα είδη κυττάρων, έχει μελετηθεί με τη χρήση ειδικών αναστολέων. Όταν μία PLA<sub>2</sub> σε όξινες συνθήκες και απουσία ιόντων ασβεστίου (αiPLA<sub>2</sub>) εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της DPPC κατά 50 % στον πνευμονικό ιστό και στα πνευμονοκύτταρα τύπου II τότε αυτή αναστέλλεται από την ουσία MJ33. Περαιτέρω διαπιστώθηκε και το αντίστροφο, δηλαδή όταν κάποια ενζυμική ενεργότητα κυρίως αiPLA<sub>2</sub> αναστέλλεται από την ουσία MJ33 τότε το ένζυμο θεωρείται ότι εμπλέκεται στο μεταβολισμό φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα [191].

**Υλικά**

1. Αναστολέας MJ33 (5 mg, 1-hexadecyl-3-(trifluoroethyl)-sn-glycero-2-phosphomethanol lithium, C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>F<sub>3</sub>O<sub>6</sub>PLi, MW:498.5, purity 90 %, Cat. No. M-3315, Sigma)
2. Οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa, MW:82.3, assay 99 %, Cat. No. 6264, Merck)
3. EDTANa<sub>2</sub> (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O, MW:372.24, assay 99 %, Cat. No. 34549, Riedel de Haen)
4. Οξικό Οξύ (Acetic Acid glacial, CH<sub>3</sub>COOH, MB:60.05, Carlo Erba)
5. Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH, HPLC grade, MB:32.04, Riedel de Haen)
6. Αιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, HPLC grade, MB:46.0, Riedel de Haen)
7. Στήλη ανάστροφης φάσης (Supercosil LC-18, 25 cmx4.6 mm, 5 μm, Supelco Bellefonte PA 16823)
8. Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector, RF-10AxL, Shimadzu, Model RF-10AXL, Cat. No. 228-35353-38, Shimadzu, Japan)
9. Χρωματογράφος LC (Μοντέλο LC-10ADnr, Cat. No 228-39000-38, με loop 7725i, Shimadzu)
10. Συσκευή διήθησης διαλυτών (Cat. No E000779, Supelco)
11. Μικροσύριγγα Gastight 50 μl (Pat. No 3150801, Hamilton)
12. Φιλτράκια (Teflon Millipore, Membrane Filter type 0.45 μm, Cat. No HVLP04700)
13. Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας χρωματογραφημάτων (DAPA Software V1.4x)

☞ **Διαλύματα εργασίας**

**1. Διάλυμα 10 mg/ml ή 20 mM MJ33**

5 mg του αναστολέα MJ33 διαλύονται σε 500 ml δις απεσταγμένο νερό σε στείρες συνθήκες. Ακολουθεί διάλυση στους 60 °C και στη συνέχεια χωρίζεται ανά 100 ml. Ο αναστολέας φυλάσσεται στους 4 °C σε σκοτεινό χώρο.

**2. Διάλυμα εργασίας 5 mM MJ33**

10 ml διαλύματος 20 mM MJ33 αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 1000 ml σε δις απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C σε σκοτεινό χώρο.

**3. Διάλυμα 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

Σε 50 ml νερού διαλύονται 0.1646 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Το διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

**4. Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 5 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH=4.0**

Σε 25 ml 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> προστίθενται 82.3 mg EDTANa<sub>2</sub>, το pH ρυθμίζεται στην τιμή 4.0 και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

**16.1 Εκτέλεση προσδιορισμού**

**16.1.1 Προσδιορισμός ενεργότητας αιPLA<sub>2</sub>**

Η ενεργότητα της αιPLA<sub>2</sub> στις πειραματικές μας συνθήκες μετρήθηκε με HPLC ανάστροφης φάσης με σύστημα ανάλυσης που είχε σχεδιαστεί στο εργαστήριό μας [282].

**Συνθήκες ανάλυσης HPLC**

Χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό σύστημα ανάλυσης CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (80:20, v/v), ταχύτητα ροής 0.4 ml/min και ευαισθησία ίση με 2. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής του φθορισμομετρικού ανιχνευτή ρυθμίζονται στα 475 nm και 535 nm αντίστοιχα. Η ανάλυση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

**Μέτρηση ενεργότητας**

Το πρωτεϊνικό δείγμα τοποθετείται σε πλαστικό σωληνάκι που περιέχει τα συστατικά της αντίδρασης, δηλαδή 250 ml ρυθμιστικού διαλύματος 40 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 5 mM EDTANa<sub>2</sub> (pH=4.0) και 2.5 ml υποστρώματος C<sub>12</sub>-NBD-PC (0.5 mM). Η αντίδραση αφήνεται τουλάχιστον για 1 ώρα στους 37 °C και το προϊόν μετράται στο χρωματογράφο (ένεση 20 ml) επαναλαμβάνοντας μετά από 2 ώρες περίπου.



**16.1.2 Επίδραση του αναστολέα MJ33 στην ενεργότητα της aiPLA<sub>2</sub>**

5 µg πρωτεΐνης (ομογενοποιηήματος κυττάρων) επωάζονται με 3 µl διαλύματος 5 mM MJ33 (τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 60 µM) στους 37 °C για 30 min [202]. Η ποσότητα του αναστολέα στα δείγματα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του τύπου:

$$\frac{\text{MJ33}}{\text{MJ33} + \text{Λιπίδια}} \times 100 = 3$$

όπου ο όρος λιπίδια αναφέρεται στην ποσότητα των ενδογενών επιπέδων των λιπιδίων που περιέχονται στην ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιούταν κάθε φορά στην ενζυμική αντίδραση.

Η ενεργότητα της φωσφολιπάσης στα δείγματά μας παρουσία του αναστολέα μετρούνται όπως αναφέρθηκε προηγούμενα.

**16.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Dara) υπολογίζονται τα εμβαδά των χρωματογραφημάτων στις χρονικές στιγμές που έγιναν οι ενέσεις των δειγμάτων και με τη βοήθεια των εμβαδών του προτύπου φθορίζοντος λιπαρού οξέος, σε διάφορες συγκεντρώσεις, υπολογίζεται η ενεργότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



# ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Σκοπός:** Η μελέτη της βιοσύνθεσης της PC στην κυτταρική σειρά A549, μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II, σε συνθήκες μηχανικής διάτασης παρουσία του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη.

Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι ενζυμικές ενεργότητες της φωσφοχολινοφωσφοτρανσφεράσης (CPT), της ακυλοτρανσφεράσης (LPCAT), φωσφολιπασών  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην aiPLA<sub>2</sub>. Μετρήθηκαν επίσης επίπεδα φωσφολιπιδίων όπως της PC, της PE και της Sph.

Σε πειραματικό στάδιο προγραμματίστηκαν να μελετηθούν τα εξής:

1. Καλλιέργειες κυττάρων A549 σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη συγκρίνοντας με καλλιέργειες που ετοιμάστηκαν σε τρυβλία με απλή μεμβράνη (καμπύλη ανάπτυξης, βιωσιμότητα).
2. Τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων A549 (πρωτεΐνες, λιπίδια).
3. Η «συσκευή» stretch στην οποία θα ασκηθεί η πίεση στα κύτταρα (μηχανικό stress).
4. Η επίδραση του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη στα κύτταρα (χημικό stress).
5. Ο συνδυασμός μηχανικού και χημικού stress στα κύτταρα.
6. Στις προηγούμενες συνθήκες, να μετρηθούν ενζυμικές ενεργότητες που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση της PC και τα επίπεδα κύριων φωσφολιπιδίων. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν:
  - 6Α. Μέτρηση επιπέδων των λιπιδίων PC, PE, Sph με προσδιορισμό φωσφόρου.
  - 6Β. Ραδιομετρικός προσδιορισμός των ενζυμικών ενεργοτήτων CPT και LPCAT.
  - 6Γ. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός ενεργοτήτων PLA<sub>2</sub> και PAF-AcH.
  - 6Δ. Για την aiPLA<sub>2</sub>:
    - ανοσοαποτύπωση της aiPLA<sub>2</sub>.
    - φθορισμομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας.
    - ενεργότητα aiPLA<sub>2</sub> παρουσία του αναστολέα MJ33.
7. Στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές και στην περίπτωση των ενζυμικών ενεργοτήτων τα δείγματα ήταν διπλά ή/και τριπλά. Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel της Microsoft Office Ver. 2000. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο Μέσος Όρος (ΜΟ) των μετρήσεων  $\pm$  SEM. Επίσης, ένας άλλος τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων ήταν ο ΜΟ των % διαφορών των επιμέρους πειραμάτων  $\pm$  SEM.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Ver. 13.0 για Windows. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με τη δοκιμή T-test (Independent Samples T-test). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney U κυρίως για τη στατιστική επεξεργασία του δευτέρου τρόπου έκφρασης των αποτελεσμάτων (ΜΟ των % διαφορών των επιμέρους πειραμάτων). Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στατιστικά όταν  $p < 0.05$ .



# Αποτελέσματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της μηχανικής διάτασης στην παραγωγή της PC παρουσία του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη στην κυτταρική σειρά A549, μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Επίσης, σε συγκριτικά πειράματα της μελέτης χρησιμοποιήθηκε και η κυτταρική σειρά H441.

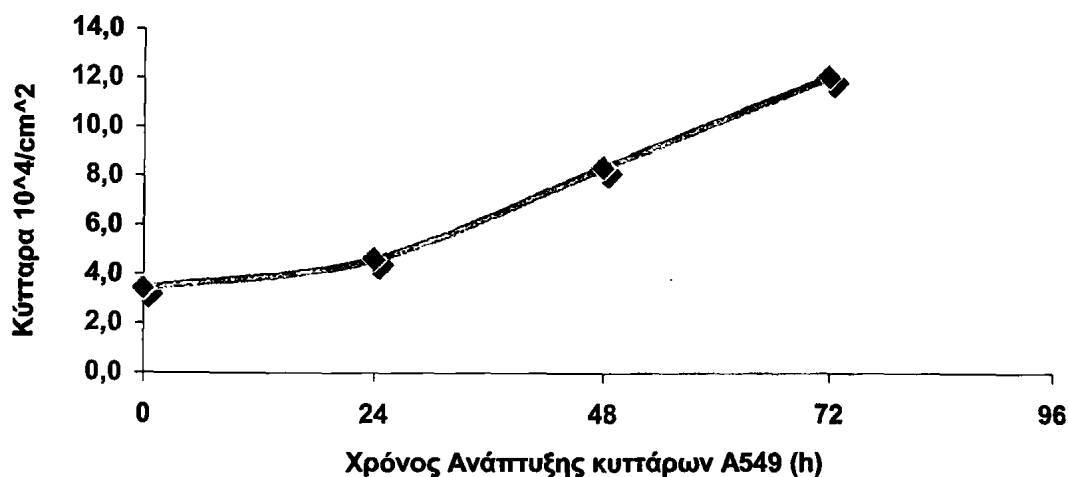
## 1. Επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη

Αρχικά ετοιμάστηκε η συσκευή της μηχανικής διάτασης όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο **Υλικά & Μέθοδοι** στην παράγραφο 3. Ο χρόνος εφαρμογής της μηχανικής διάτασης στα προκαταρκτικά πειράματα ήταν από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες προκειμένου να διαπιστωθεί η αντοχή του τρυβλίου υπό την επίδραση βαριδίου 712 g. Οι χρόνοι εφαρμογής της μηχανικής διάτασης κυμαινόταν από 15 min έως 24 ώρες στις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή σε θερμοκρασία 37 °C, 95 % O<sub>2</sub> και 5 % CO<sub>2</sub> (incubator). Στις πειραματικές μας συνθήκες διαπιστώθηκε ότι εφαρμογή κυκλικής διάτασης συχνότητας 1 Hz για 30 min είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή των τρυβλίων. Αντίθετα, άσκηση πίεσης άπαξ 35 g/cm<sup>2</sup> ακόμη και για χρονικό διάστημα 24 ωρών δεν προκάλεσε καταστροφή των τρυβλίων στις προηγούμενες συνθήκες.

Στη συγκεκριμένη εργασία, τα χρονικά διαστήματα εφαρμογής της διάτασης και επώασης με τη βητα-μεθαζόνη ήταν 1 και 4 ώρες. Η επιλογή αυτών των χρονικών διαστημάτων έγινε στηριζόμενοι σε μελέτες σχετικά με την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα και τις ιδιότητες των κορτικοστεροειδών. Περισσότερα όμως θα δούμε στο κεφάλαιο της **Συζήτησης-Συμπεράσματα**.

## 2. Καμπύλη ανάπτυξης

Έγινε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και τρυβλία απλής μεμβράνης ίδιας διαμέτρου μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων. Η καλλιέργεια ετοιμάστηκε με 8x10<sup>5</sup> κύτταρα/ml ή 4.1x10<sup>4</sup> κύτταρα/cm<sup>2</sup> ελαστικής μεμβράνης για τα κύτταρα A549. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



**Σχήμα 32.** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549 σε τρυβλία απλής μεμβράνης (5 cm), ίδιων διαστάσεων με τα αντίστοιχα της ελαστικής μεμβράνης.

Από την καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται ο διπλασιασμός των κυττάρων κάθε 24 ώρες για τα A549. Σε αντίστοιχες μετρήσεις που έγιναν υπό τις ίδιες συνθήκες σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη διαπιστώθηκαν παρόμοιες μετρήσεις.

### 3. Αριθμός κυττάρων - έλεγχος βιωσιμότητας

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έδειξε ότι η μηχανική διάταση δεν επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων. Το ίδιο συμπέρασμα φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη ή ακόμη και όταν έγινε συνδυασμός του γλυκοκορτικοειδούς με τη μηχανική διάταση. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό των νεκρών κυττάρων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 12.

### 4. Επίπεδα πρωτεΐνης

#### A. Στο ομογενοποίημα των κυττάρων

Επίσης στις πειραματικές μας συνθήκες διαπιστώθηκε ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο δεν επηρεάζεται από τη μηχανική διάταση ή/και την επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη (Πίνακας 12). Το πειραματικό αποτέλεσμα είναι λογικό, στηριζόμενο και στις προηγούμενες παρατηρήσεις, λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο αριθμός των κυττάρων δεν επηρεάστηκε από το μηχανικό και χημικό ερέθισμα. Επομένως, σε κάθε περίπτωση και υπό την επίδραση του κάθε παράγοντα δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

## Αποτελέσματα

**Πίνακας 12.** Αριθμός κυττάρων και πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε ομογενοποίηση κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO)  $\pm$  SEM 4 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	1 h			4 h		
	Κύτταρα ( $10^4/cm^2$ )		Πρωτεΐνη ( $\mu g/ml$ )	Κύτταρα ( $10^4/cm^2$ )		Πρωτεΐνη ( $\mu g/ml$ )
	Ζωντανά	Νεκρά		Ζωντανά	Νεκρά	
Control	7.0 $\pm$ 2.9	1.3 $\pm$ 0.4	915.63 $\pm$ 174.6	6.6 $\pm$ 3.8	0.7 $\pm$ 0.2	628.39 $\pm$ 28.2
Stretch	7.3 $\pm$ 3.3	1.0 $\pm$ 0.4	797.07 $\pm$ 138.5	5.7 $\pm$ 2.9	0.6 $\pm$ 0.2	912.24 $\pm$ 244.5
Stretch+Beta	7.4 $\pm$ 3.3	1.3 $\pm$ 0.2	1013.09 $\pm$ 145.2	7.4 $\pm$ 3.3	0.5 $\pm$ 0.1	877.72 $\pm$ 207.0
Beta	8.5 $\pm$ 4.3	1.0 $\pm$ 0.6	1128.05 $\pm$ 221.8	8.2 $\pm$ 3.6	0.7 $\pm$ 0.2	643.00 $\pm$ 56.5

### Σχόλιο:

Δηλαδή στις πειραματικές μας συνθήκες υπολογίζονται κατά μέσο όρο 864.40 $\pm$ 60.65  $\mu g/ml$  ολικής πρωτεΐνης σε κάθε τρυβλίο και για την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης περαιτέρω συλλέγονται σε 200  $\mu l$  2xsample buffer (SB). Οπότε σε 20  $\mu l$  δείγματος σε κάθε θέση ηλεκτροφόρησης –που έχουν δημιουργηθεί από το χτενάκι- φορτώνονται 86.45  $\mu g$  πρωτεΐνης.

### *B. Στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών*

Όσον αφορά τις μετρήσεις του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Οι πειραματικές τιμές φαίνονται στον Πίνακα 13 και έχουν προκύψει μετά από αφαίρεση της τιμής του τυφλού, δηλαδή θρεπτικού υλικού που δεν περιέχει FBS. Ο MO του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών ήταν 23.63 $\pm$ 1.21  $\mu g/ml$ .

**Πίνακας 13.** Πρωτεΐνη στα υπερκείμενα καλλιιεργειών κυττάρων A549.

Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το MO $\pm$ SEM 4 διαφορετικών πειραμάτων.

Πρωτεΐνη ( $\mu g/ml$ )	1 h	4 h
Control	22.41 $\pm$ 8.50	27.28 $\pm$ 12.29
Stretch	23.70 $\pm$ 7.42	23.97 $\pm$ 7.14
Stretch+Beta	16.39 $\pm$ 5.81	26.89 $\pm$ 12.42
Beta	22.91 $\pm$ 11.42	25.43 $\pm$ 11.58

### 5. Προσδιορισμός Γαλακτικής Δεϋδρογονάσης (LDH)

Η ενεργότητα της LDH, όπως αυτή μετρήθηκε στα υπερκείμενα των καλλιεργειών με τη βοήθεια αναλυτή Olympus, δεν παρουσίασε καμία μεταβολή λόγω διάτασης ή επίδρασης κορτικοστεροειδών.

### 6. Προσδιορισμός ολικού λιπιδικού φωσφόρου

#### A. Στο ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ομογενοποίηση των κυττάρων εκχυλίστηκε και προσδιορίστηκε το ολικό λιπιδικό περιεχόμενο προκειμένου να υπολογιστούν τα % ποσοστά των επιμέρους λιπιδίων μετά από TLC στο σύστημα C-M-W (65:35:7, v/v). Η μέση τιμή του λιπιδικού φωσφόρου ήταν  $7.05 \pm 0.09$   $\mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης.

**Πίνακας 14.** Επίπεδα λιπιδικού φωσφόρου σε  $\mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης.

Οι μετρήσεις αποτελούν τιμές ενός πειράματος.

Ομογενοποίηση Κυττάρων A549	$\mu\text{g P/mg}$ πρωτεΐνης	
	1 h	4 h
Control	6.84	6.85
Stretch	7.42	7.02
Stretch + Beta	7.43	6.87
Beta	7.09	6.88

#### B. Στα υπερκείμενα των καλλιεργειών

Αντίστοιχα, τα υπερκείμενα των καλλιεργειών των κυττάρων εκχυλίστηκαν και προσδιορίστηκε το ολικό λιπιδικό περιεχόμενο προκειμένου να υπολογιστούν τα % των επιμέρους λιπιδίων μετά από TLC στο σύστημα C-M-W (65:35:7, v/v). Η μέση τιμή του λιπιδικού φωσφόρου ήταν  $1.76 \pm 0.36$   $\text{ng P/mg}$  πρωτεΐνης. Η τιμή αυτή είναι πολύ μικρή και επιπλέον δε μπορεί να θεωρηθεί και αξιόπιστη με τη μέθοδο Bartlett που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρησή της (1-5  $\mu\text{g P}$ ).

## Αποτελέσματα

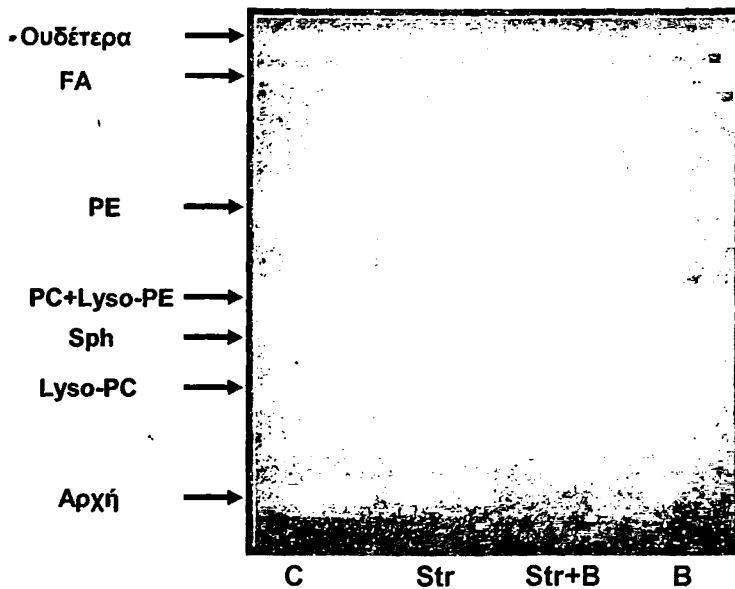
**Πίνακας 15.** Επίπεδα λιπιδικού φωσφόρου σε ng P/mg πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα αποτελούν τιμές ενός πειράματος.

Υπερκείμενα καλλιιεργειών A549	ng P/mg πρωτεΐνης	
	1 h	4 h
Control	3.36	1.36
Stretch	2.36	2.64
Stretch + Beta	0.98	2.15
Beta	0.46	0.76

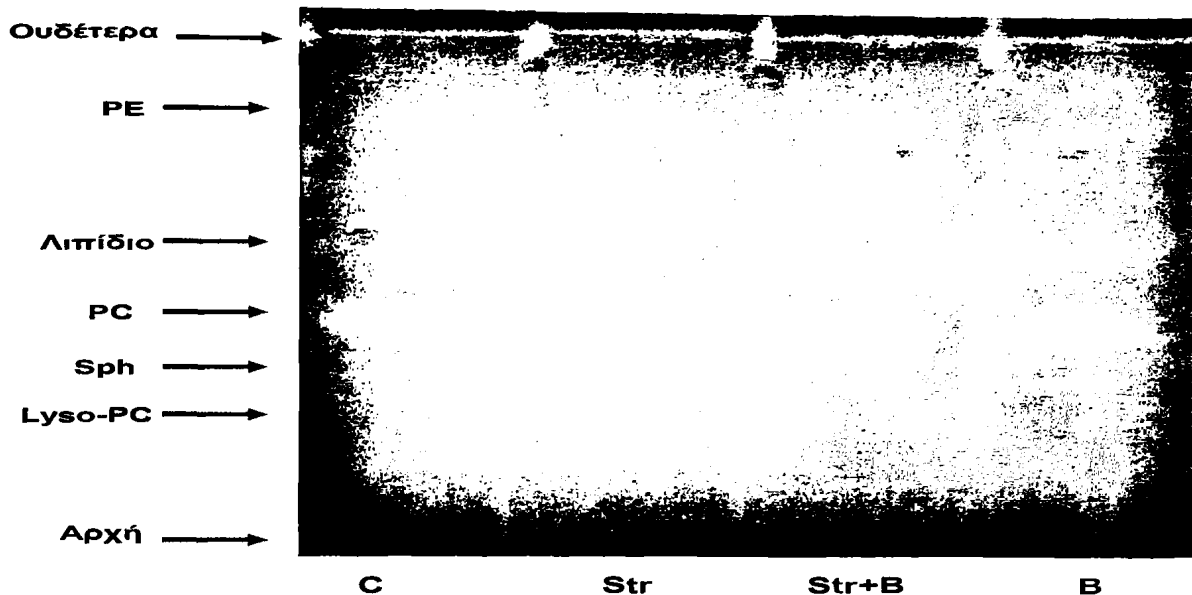
### 7. Ανάλυση λιπιδίων κυττάρων A549 με TLC

Η ανάλυση των λιπιδίων ομογενοποιηήματος κυττάρων A549 μετά από TLC σε δύο διαφορετικά συστήματα παρουσιάζεται στις ακόλουθες εικόνες:



**Εικόνα 8.** Διαχωρισμός λιπιδίων με TLC σε σύστημα διαλυτών C-M-W (65:35:7, v/v) ομογενοποιηήματος κυττάρων A549 μετά από 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και/ή βητα-μεθαζόνη. Η εικόνα είναι παρόμοια μετά από επίδραση παραγόντων για 4 ώρες. (C=Control, Str=Stretch, B=Beta-methasone).

## Αποτελέσματα



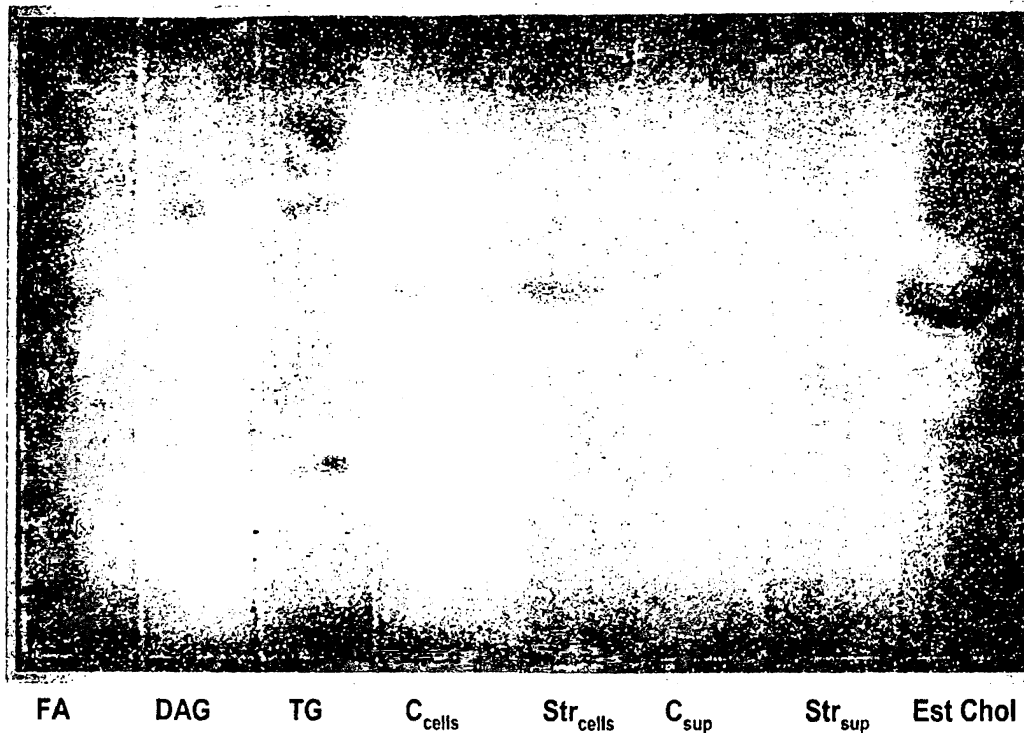
**Εικόνα 9.** Διαχωρισμός λιπιδίων με TLC (1<sup>ο</sup> σύστημα: χλωροφόρμιο -πετρελαϊκός αιθέρας - μεθανόλη-οξικό οξύ (50:30:10:15 v/v) μέχρι την κορυφή και 2<sup>ο</sup> σύστημα χλωροφόρμιο -μεθανόλη - νερό -οξικό οξύ, 65:35:5:10 v/v προς της ίδια κατεύθυνση) κυττάρων A549 μετά από 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης.

Στα υπερκείμενα των καλλιεργειών δεν ήταν εφικτό να ανιχνεύσουμε κάποια ζώνη, όπως ήδη είχε αποδειχθεί από το πολύ μικρό λιπιδικό περιεχόμενο (Πίνακας 15).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι έγινε δοκιμή ελέγχου ουδετέρων λιπιδίων στο σύστημα που περιγράφεται στην ενότητα **Υλικά και Μέθοδοι** στην παράγραφο 8.1. Ο έλεγχος έγινε μόνο σε κύτταρα ελέγχου (control) και σε κύτταρα που είχαν υποστεί την επίδραση μηχανικής διάτασης για 1 ώρα. Δεν έγινε αντίστοιχος έλεγχος στην περίπτωση της βητα-μεθαζόνης.

Σε εκχύλισμα ομογενοποιημένου κυττάρων διαπιστώθηκε η ύπαρξη μόνο παλμιτικού οξέος και κανενός άλλου ουδετέρου λιπιδίου. Και σε αυτό το σύστημα ανάλυσης στα υπερκείμενα δε βρέθηκαν λιπίδια όπως μπορεί να διαπιστωθεί και στην **Εικόνα 10**. Είναι ευνόητο ότι προκειμένου να βρεθούν πιθανές μεταβολές παλμιτικού οξέος λόγω διάτασης θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω αναλύσεις.





**Εικόνα 10.** Ανάλυση ουδετέρων λιπιδίων ομογενοποιημένου κυττάρων A549 και υπερκειμένων μετά από μηχανική διάταση για 1 ώρα. Όπου TG=Τριγλυκερίδια, C=Control, Str=Stretch, Est. Chol.=Εστέρες χοληστερόλης.

Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικά η επίδραση του μηχανικού και του χημικού ερεθίσματος για κάθε φωσφολιπίδιο ξεχωριστά.

## 8. Επίπεδα λιπιδίων

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η μηχανική διάταση και/ή βητα-μεθαζόνη επηρεάζουν την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα μελετήθηκαν τα επίπεδα των κύριων λιπιδίων όπως αυτά απομονώθηκαν μετά από TLC.

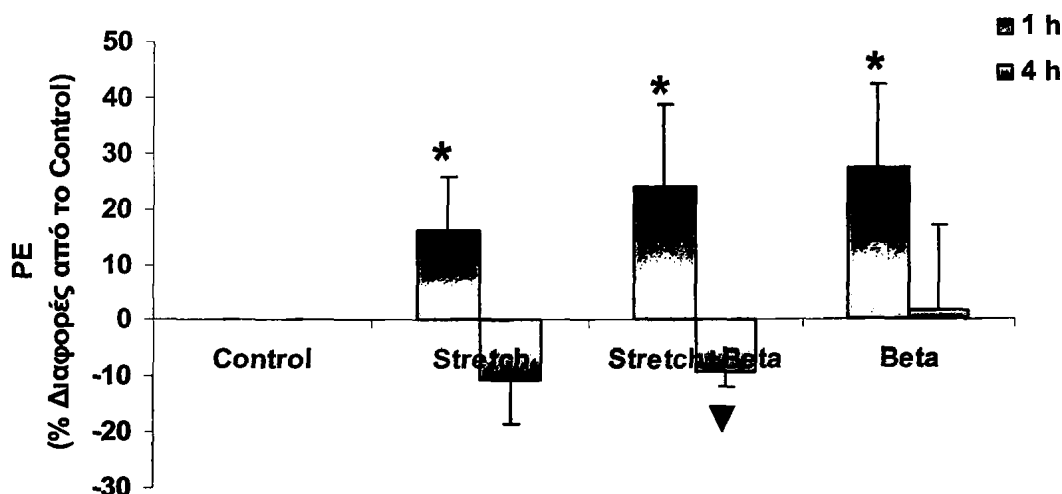
### 8.1 Επίπεδα PE

Η PE αποτελεί το 28.0 % του συνόλου των φωσφολιπιδίων των κυττάρων A549 ενώ τα σπιβαδωτά σωμάτια περιέχουν το λιπίδιο σε ποσοστό 18.7 % [38]. Με τη βοήθεια του test Mann-Whitney και θεωρώντας 0 % τις συνθήκες control, δηλαδή κύτταρα που δεν έχουν υποστεί την επίδραση μηχανικού ή χημικού ερεθίσματος, βρέθηκαν τα εξής: Αύξηση κατά  $16.0 \pm 9.8$  % λόγω της μηχανικής διάτασης ( $p=0.037$ ), αύξηση κατά  $27.4 \pm 14.9$  % λόγω επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη ( $p=0.037$ ) για 1 ώρα αλλά και αύξηση κατά  $23.9 \pm 14.9$  % λόγω της μηχανικής διάτασης και της βητα-μεθαζόνης ( $p=0.037$ ). Δηλαδή και



## Αποτελέσματα

στις τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε η ίδια αύξηση ( $p=0.037$ ). Επίδραση των παραγόντων για 4 ώρες προκάλεσε μείωση κατά  $9.3\pm 2.6\%$  λόγω της μηχανικής διάτασης ( $p=0.037$ ). Τέλος, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι δεν υπάρχουν μεταβολές όσον αφορά τις απόλυτες τιμές του λιπιδίου (Σχήμα 31) ενώ η μέση τιμή του λιπιδίου ήταν  $1.36\pm 0.08\ \mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης (όπου P=φώσφορος).



**Σχήμα 31.** % διαφορές της PE μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO\pm SEM$  των % μεταβολών του λιπιδίου 3 διαφορετικών πειραμάτων (4 πειραμάτων στην περίπτωση των 4 ωρών). \*,▼ στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τις συνθήκες control για 1 και 4 ώρες αντίστοιχα ( $p<0.05$ ).

### 8.2 Επίπεδα λιπιδίου με Rf μεταξύ PC & PE

Στην περίπτωση του λιπιδίου με  $Rf=0.55$ , που εντοπίζεται μεταξύ PC & PE, δε σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές Στην περίπτωση της μηχανικής διάτασης και της βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα παρατηρήθηκε τάση αύξησης. Μετά από εφαρμογή των παραγόντων για 4 ώρες παρατηρήθηκε τάση μείωσης. Αναφέρεται ότι η μέση τιμή του λιπιδίου ήταν  $0.51\pm 0.03\ \mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης.

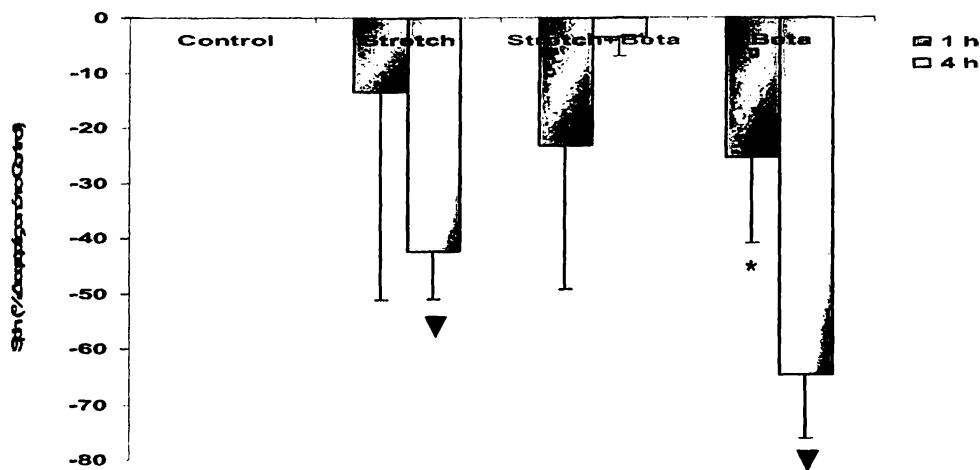
### 8.3 Επίπεδα Lyso-PC

Η Lyso-PC είναι το λιπίδιο που απαντάται σε πολύ μικρό ποσοστό στα κύτταρα A549 και με τον τρόπο που μετρήθηκε (μέθοδο Bartlett) δε μπορούμε να μιλήσουμε με ασφάλεια για μεταβολές του λιπιδίου. Η μέση τιμή του λιπιδίου στις πειραματικές μας συνθήκες ήταν  $0.34\pm 0.07\ \mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης.



#### 8.4 Επίπεδα Sph

Στο λιπίδιο αυτό σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει τάση μείωσης. Όμως οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται λόγω βητα-μεθαζόνης (αύξηση κατά  $25.4 \pm 15.5$  % ( $p=0.037$ ) για 1 ώρα και κατά  $64.6 \pm 11.5$  % για 4 ώρες ( $p=0.037$ ) ως προς τις συνθήκες control. Επίσης στατιστικά σημαντική μεταβολή (μείωση) παρατηρήθηκε και ως προς τις συνθήκες control κατά  $42.5 \pm 8.4$  % λόγω διάτασης ( $p=0.037$ ) για 4 ώρες (Σχήμα 32). Η μέση τιμή του λιπιδίου στις πειραματικές μας συνθήκες ήταν  $0.68 \pm 0.08$  μg P/mg πρωτεΐνης.



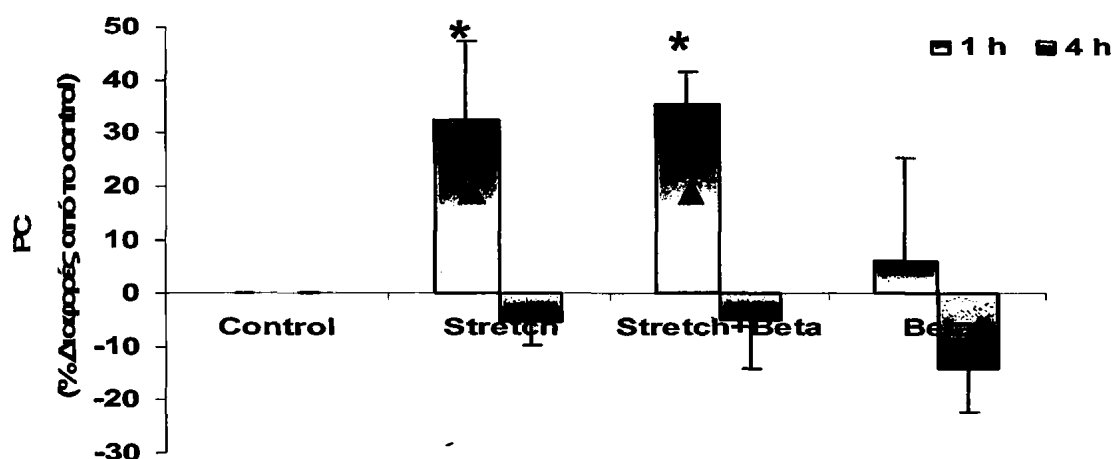
**Σχήμα 32.** % διαφορές της Sph μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των % μεταβολών του λιπιδίου 3 διαφορετικών πειραμάτων. \*, ▼ στατιστικά σημαντική μεταβολή (μείωση) ως προς τις συνθήκες control για 1 και 4 ώρες αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).

#### 8.5 Επίπεδα PC

Η PC αποτελεί το 41.3 % του συνόλου των φωσφολιπιδίων των κυττάρων A549 ενώ τα στιβαδωτά σωμάτια περιέχουν το λιπίδιο σε ποσοστό 55.8 % [38]. Τα αντίστοιχα ποσοστά της DPPC είναι 16 και 39 % της ολικής PC [38]. Με τη μέθοδο Bartlett που μετρήσαμε το λιπίδιο, δε μπορούμε να αναφερθούμε για κορεσμένη και ακόρεστη PC. Έτσι στις πειραματικές μας συνθήκες βρήκαμε αύξηση κατά  $32.4 \pm 15.0$  % λόγω της μηχανικής διάτασης ( $p=0.037$ ) και αύξηση κατά  $35.4 \pm 6.2$  % λόγω επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη σε συνδυασμό με τη μηχανική διάταση ( $p=0.037$ ) για 1 ώρα (Σχήμα 33). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η αύξηση που προκαλείται λόγω επίδρασης του μηχανικού και του χημικού ερεθίσματος για 1 ώρα αποδεικνύεται και με τα 2 στατιστικά τεστ είτε υπολογίζοντας τις απόλυτες τιμές είτε τις % διαφορές. Αναλυτικά, όσον αφορά τις απόλυτες τιμές με το T-test έχουμε  $p=0.023$ , με το test Mann-Whitney έχουμε  $p=0.034$ , με  $n=4$ . Ενώ υπολογίζοντας τις % διαφορές έχουμε με το T-test  $p=0.005$  και με το test Mann-Whitney έχουμε  $p=0.037$ .

## Αποτελέσματα

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι οι % μεταβολές της PC λόγω μηχανικής διάτασης για 1 ώρα ήταν στατιστικά σημαντικές (μεγαλύτερες) από τις % μεταβολές λόγω διάτασης για 4 ώρες ( $p=0.034$ ) και παρόμοια για το συνδυασμό των παραγόντων για 1 ώρα συγκριτικά με το συνδυασμό των παραγόντων για 4 ώρες ( $p=0.034$ ). Οι παρατηρήσεις ισχύουν στην περίπτωση που οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση τη στατιστική δοκιμή Mann-Whitney με τους MO των % διαφορών ως προς το control. Η μέση τιμή του λιπιδίου στις πειραματικές μας συνθήκες ήταν  $3.58 \pm 0.26$   $\mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης.

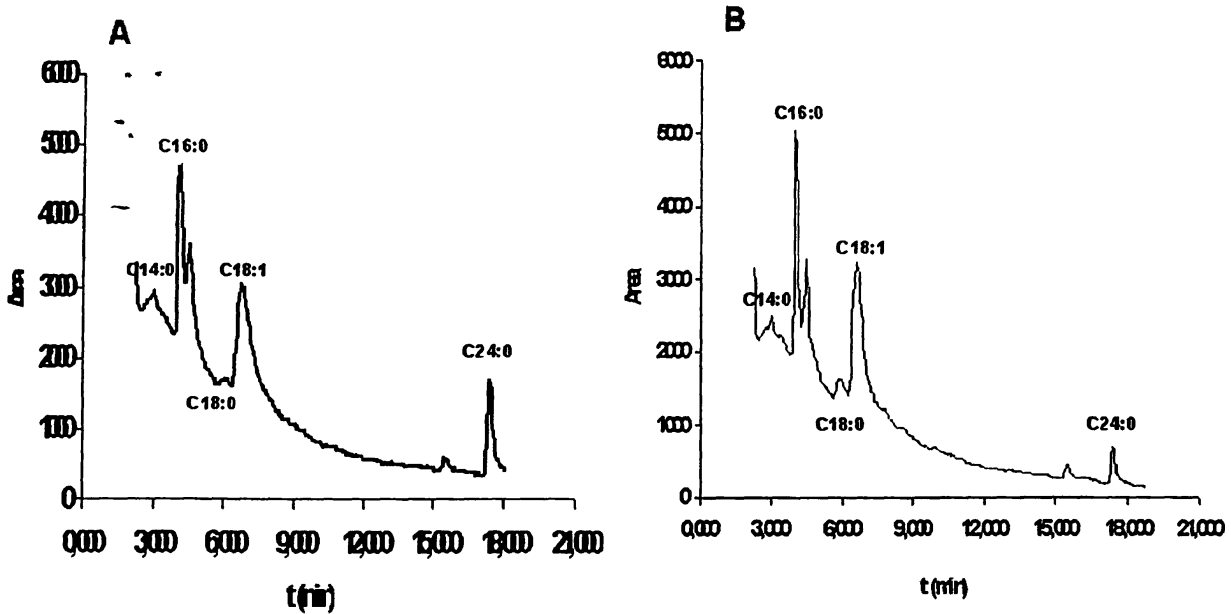


**Σχήμα 33.** % μεταβολές της PC μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των % μεταβολών του λιπιδίου 4 διαφορετικών πειραμάτων μετά από επίδραση παραγόντων για 1 και 4 ώρες. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p < 0.05$ ). ^ στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) της παραμέτρου που ασκήθηκε για 1 ώρα ως προς την αντίστοιχη παράμετρο που εφαρμόστηκε για 4 ώρες ( $p < 0.05$ ).

### Ανάλυση λιπαρών οξέων της PC

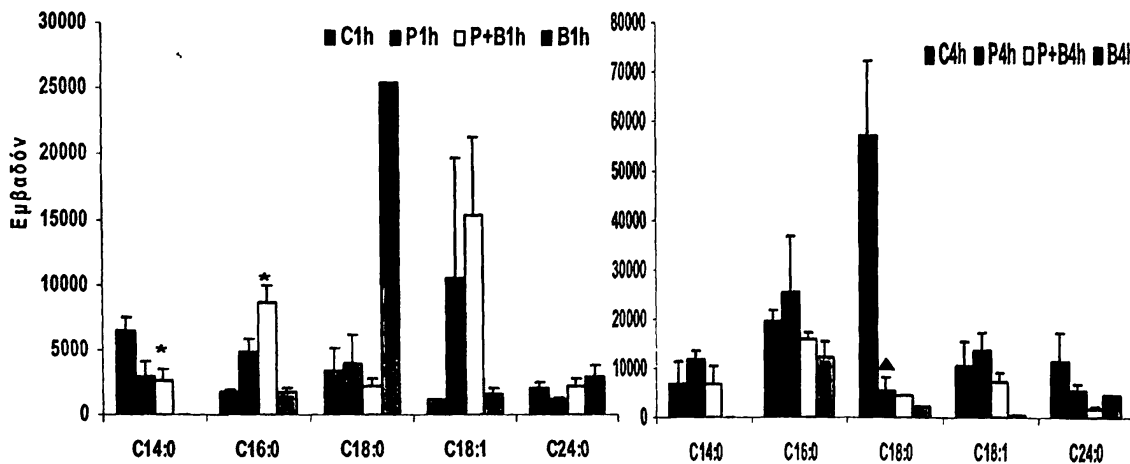
Στο **Σχήμα 34** φαίνεται ενδεικτικό αέριο χρωματογράφημα δείγματος control και stretch 4 ωρών. Οι χρόνοι κατακράτησης (MO) των λιπαρών οξέων με αλυσίδες C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 και λιγνοκερικό (C24:0) ήταν αντίστοιχα  $2.98 \pm 0.01$ ,  $4.36 \pm 0.04$ ,  $6.31 \pm 0.10$ ,  $6.82 \pm 0.04$  και  $17.56 \pm 0.03$  min.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Σχήμα 34.** Αντιπροσωπευτικό αέριο χρωματογράφημα της PC δείγματος **A.** Control και **B.** Stretch κυττάρων A549.

Το κλάσμα της PC (μέση τιμή  $3.58 \pm 0.26$   $\mu\text{g P/mg}$  πρωτεΐνης) βρέθηκε ότι αποτελείται κυρίως από μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0), στεατικό (C18:0), ελαϊκό (C18:1), και λιγνοκερικό (C24:0). Και για τις 2 χρονικές στιγμές διαπιστώθηκε ότι η μηχανική διάταση προκαλεί μία τάση αύξησης του παλμιτικού οξέος (C16:0). Αντίθετα, η βητα-μεθαζόνη προκάλεσε τάση μείωσης του παλμιτικού.



**Σχήμα 35.** % μεταβολές της PC μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των εμβαδών των λιπαρών οξέων της PC από τρία διαφορετικά πειράματα. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control για 1

ώρα ( $p < 0.05$ ). <sup>▲</sup> στατιστικά σημαντική μεταβολή (μείωση) ως προς τις συνθήκες control για 4 ώρες ( $p < 0.05$ ).

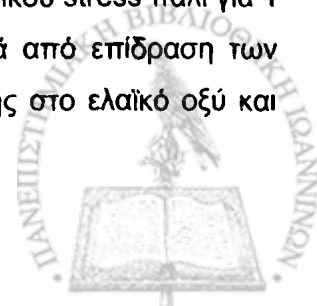
Έτσι από το **Σχήμα 35** μπορούμε να διαπιστώσουμε τα εξής:

Αρχικά για το μυριστικό οξύ (C14:0) παρατηρήθηκε τάση μείωσης μετά από 1 ώρα εφαρμογής μηχανικής διάτασης και συνδυασμού της με βητα-μεθαζόνη. Μάλιστα στη δεύτερη περίπτωση βρέθηκε ότι η μείωση κατά 59.85 % είναι στατιστικά σημαντική (με το στατιστικό πακέτο T-test το  $p = 0.047$  και με το στατιστικό πακέτο Mann-Whitney το  $p = 0.053$ ). Θα πρέπει να τονιστεί ότι στην περίπτωση των δειγμάτων με βητα-μεθαζόνη δε βρέθηκε το κλάσμα της PC να περιέχει μυριστικό (C14:0). Ίσως αυτή η παρατήρηση να μην ισχύει πραγματικά και να έχει συμβεί πειραματικό σφάλμα. Επίσης, επισημαίνεται ότι μετά από 4 ώρες επίδραση της μηχανικής διάτασης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες διάτασης για 1 ώρα (αύξηση κατά 308.4 %,  $p = 0.020$ ).

Όσον αφορά το παλμιτικό οξύ (C16:0) παρατηρήθηκε τάση αύξησης λόγω επίδρασης όλων των παραγόντων, εκτός από την περίπτωση της βητα-μεθαζόνης, η οποία δε φαίνεται να προκαλεί κάποια σημαντική μεταβολή. Θα πρέπει να τονιστεί ότι στην περίπτωση της επίδρασης των δύο ερεθισμάτων η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (κατά 370.38 %,  $p = 0.052$ ). Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) στο παλμιτικό οξύ (κατά 87.81 %,  $p = 0.014$ ) μετά από 4 ώρες επίδραση μηχανικού και χημικού ερεθίσματος έναντι του συνδυασμού των 2 παραγόντων για 1 ώρα. Επίσης η βητα-μεθαζόνη, για 4 ώρες επώαση των κυττάρων, αύξησε κατά 7 φορές τα επίπεδα του παλμιτικού οξέος σε σχέση με τα επίπεδα του παλμιτικού μετά από επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα (στατιστικά σημαντική αύξηση,  $p = 0.003$ ).

Για το στεατικό οξύ (C18:0) για 1 ώρα επίδραση των παραγόντων δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Παρατηρήθηκε όμως στατιστικά σημαντική μείωση λόγω διάτασης για 4 ώρες στο ελαϊκό οξύ (κατά 90.58 %,  $p = 0.007$ ), χωρίς να παρατηρηθεί άλλη σημαντική μεταβολή.

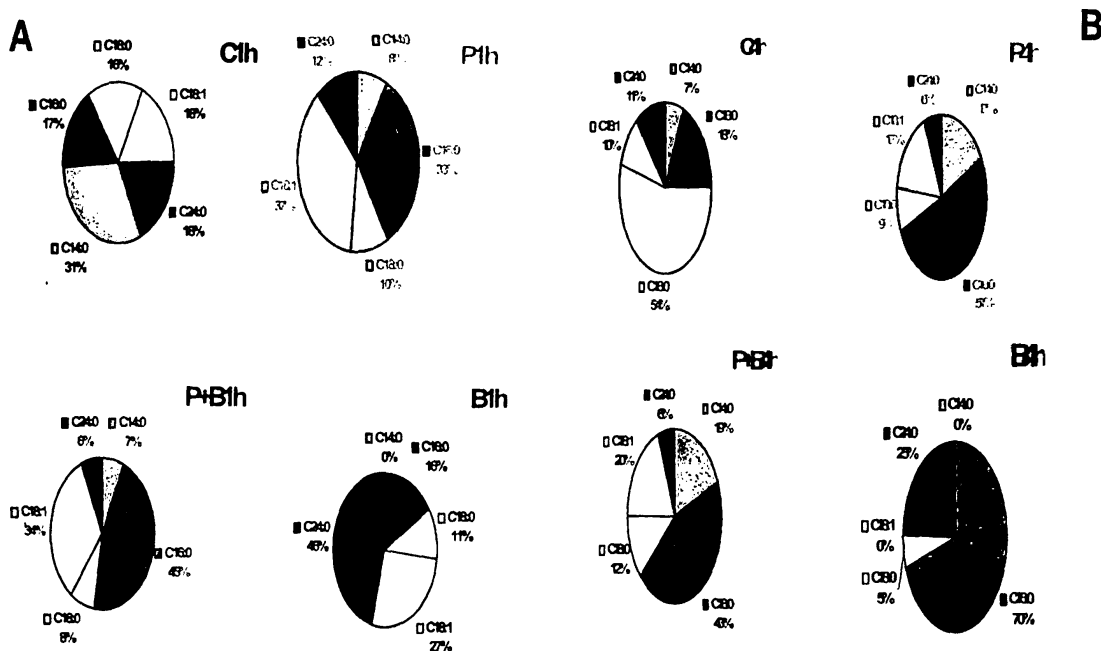
Στην περίπτωση του ελαϊκού οξέος (C18:1) και του λιγνοκερικού (C24:0) δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστική μεταβολή στις πειραματικές μας συνθήκες. Οπότε θα περιγραφεί η τάση μεταβολής αυτών των παραγόντων. Συγκεκριμένα για 1 ώρα, η μηχανική διάταση προκάλεσε τάση αύξησης για το ελαϊκό (C18:1) και μείωση για το λιγνοκερικό (C24:0). Η βητα-μεθαζόνη και ο συνδυασμός του χημικού και του μηχανικού stress πάλι για 1 ώρα προκάλεσε τάση αύξησης στις αλυσίδες C18:1 και C24:0. Μετά από επίδραση των παραγόντων για 4 ώρες η μηχανική διάταση προκάλεσε τάση αύξησης στο ελαϊκό οξύ και



## Αποτελέσματα

τάση μείωσης οι υπόλοιποι παράγοντες. Παρόμοια για το λιγνοκερικό (C24:0) παρατηρήθηκε τάση μείωσης από όλους τους παράγοντες.

Στο **Σχήμα 36 (A και B)** φαίνονται τα % ποσοστά των κλασμάτων των λιπαρών οξέων της PC κυττάρων A549 σε συνθήκες ελέγχου (control) αλλά και με την επίδραση των παραγόντων της μηχανικής διάτασης και της βητα-μεθαζόνης στις δύο χρονικές στιγμές.

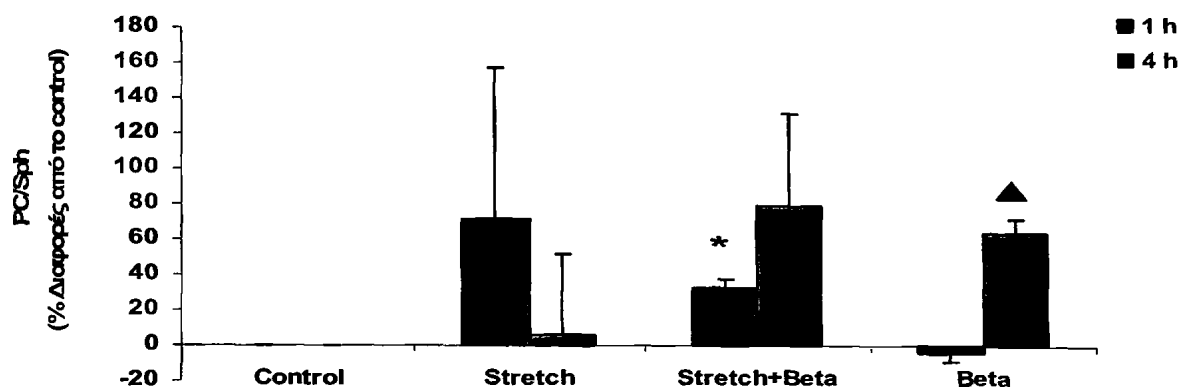


**Σχήμα 36 (A & B).** % σύσταση των λιπαρών οξέων της PC τις δύο χρονικές στιγμές που έγινε η επίδραση των δύο παραγόντων με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας.

### 8.6 Μελέτη του λόγου PC/Sph

Οι απόλυτες τιμές του λόγου PC/Sph -δείκτη ωρίμανσης των πνευμόνων- δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστική μεταβολή, αλλά σημείωσαν κυρίως τάση αύξησης ως προς τις συνθήκες control, η δε μέση τιμή του λόγου ήταν  $5.45 \pm 0.49$ . Όσον αφορά τις % μεταβολές του λόγου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) κατά  $32.8 \pm 5.4$  % ( $p=0.053$ ) όταν έγινε ο συνδυασμός των παραγόντων (διάτασης και βητα-μεθαζόνης) για 1 ώρα και επώαση με βητα-μεθαζόνη για 4 ώρες κατά  $64.6 \pm 8.0$  % ( $p=0.037$ ). Σε όλες όμως τις περιπτώσεις επίδρασης των παραγόντων υπάρχει τάση αύξησης.

## Αποτελέσματα



**Σχήμα 37.** % μεταβολές του λόγου PC/Sph μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των % μεταβολών του λιπιδίου 3 διαφορετικών πειραμάτων μετά από επίδραση παραγόντων για 1 και 4 ώρες. \*, ▲ στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control για 1 και 4 ώρες αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).

### Επίπεδα λιπιδίων στα υπερκείμενα των καλλιεργείων

Τα αντίστοιχα υπερκείμενα καλλιεργείων αναλύθηκαν με TLC στο σύστημα (C-M-W, 65:35:7 v/v) όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο **Υλικά και Μέθοδοι** στην παράγραφο 8. Δε βρέθηκαν επίπεδα λιπιδίων μετά από TLC γεγονός βέβαιο που επαληθεύεται και από το πολύ μικρό λιπιδικό περιεχόμενο  $1.76 \pm 0.36$  ng P/mg πρωτεΐνης (Πίνακας 19).

## 9. Ενζυμικές ενεργότητες που συμμετέχουν στην παραγωγή της PC

### 9.1 Ενζυμική ενεργότητα CPT

Στην εργασία μας μελετήθηκε η CPT, το τελευταίο ένζυμο που οδηγεί στην παραγωγή της PC στη *de novo* πορεία. Πριν γίνει μέτρηση όμως του συγκεκριμένου ένζυμου έλαβαν χώρα ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο **Υλικά και Μέθοδοι** στην παράγραφο 10.1.

#### Προκαταρκτικά πειράματα

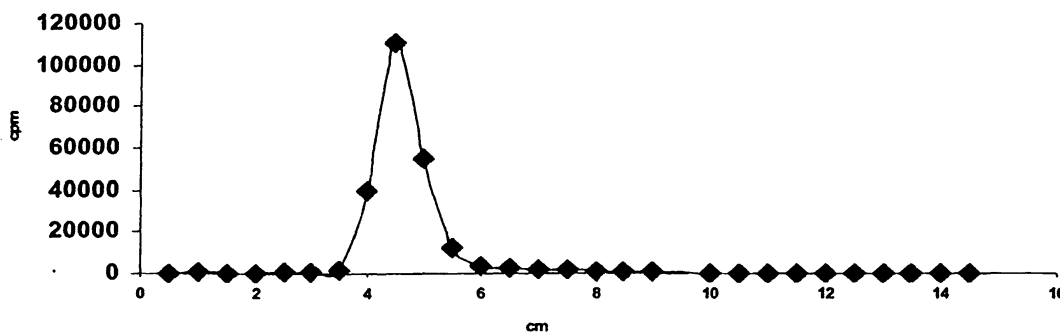
##### A. Έλεγχος καθαρότητας υποστρώματος και συνυποστρώματος

Ο έλεγχος καθαρότητας του υποστρώματος DAG στο σύστημα ανάλυσης ουδετέρων λιπιδίων έδειξε ότι το υποστρώμα δεν είχε υποστεί ισομερίωση. Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε μετά από ελέγχους σε διάφορα χρονικά διαστήματα φύλαξης του λιπιδίου που γινόταν οι αναλύσεις. Η τιμή  $R_f$  του λιπιδίου ήταν 0.72.



## Αποτελέσματα

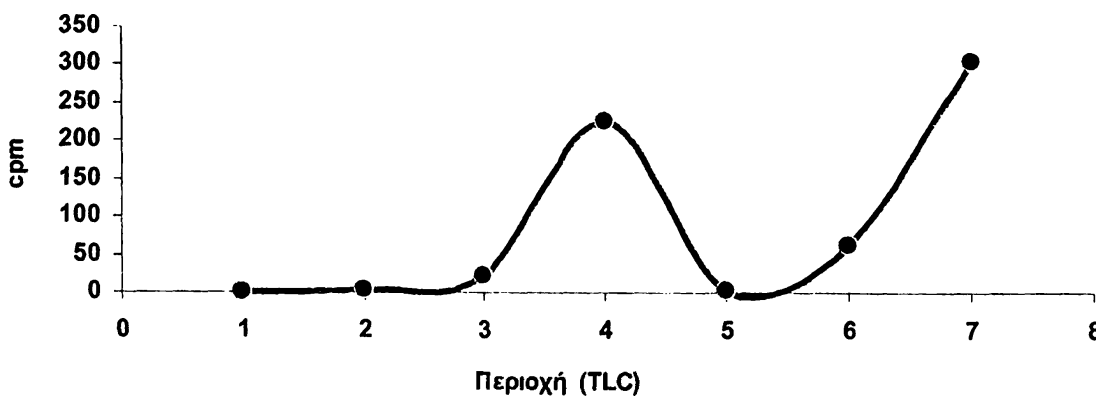
Από τον έλεγχο καθαρότητας του συνυποστρώματος CDP-χολίνης, όπως είχε προταθεί από την παρασκευάστρια εταιρία, διαπιστώθηκε ότι το νουκλεοτίδιο μπορούσε να μετατοπιστεί από τη γραμμή βάσης σε  $R_f$  ίσο με 0.35 ως προς το 1<sup>ο</sup> σύστημα και 0.39 ως προς το 2<sup>ο</sup> σύστημα. Επομένως, ήταν εφικτός ο έλεγχος καθαρότητας της [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνης. Η ραδιενέργεια του νουκλεοτιδίου φαίνεται πράγματι συγκεντρωμένη στην περιοχή από 4 έως 6 cm που αντιστοιχεί σε  $R_f=0.35$  περίπου.



**Σχήμα 38.** Έλεγχος καθαρότητας του νουκλεοτιδίου [μεθυλο-<sup>14</sup>C]CDP-χολίνης με TLC με πληρωτικό υλικό κελουλόζη.

### Β. Υπολογισμός απόδοσης όλων των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας

Οι μετρήσεις έδειξαν ότι 10 μl [<sup>3</sup>H]PAF έχουν την κατανομή ραδιενέργειας όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα και ο αντίστοιχος συντελεστής υπολογίστηκε ότι έχει τιμή 1.67. Η πειραματική αυτή τιμή είναι συγκρίσιμη με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας της CPT στα πειράματα αυτής της εργασίας.



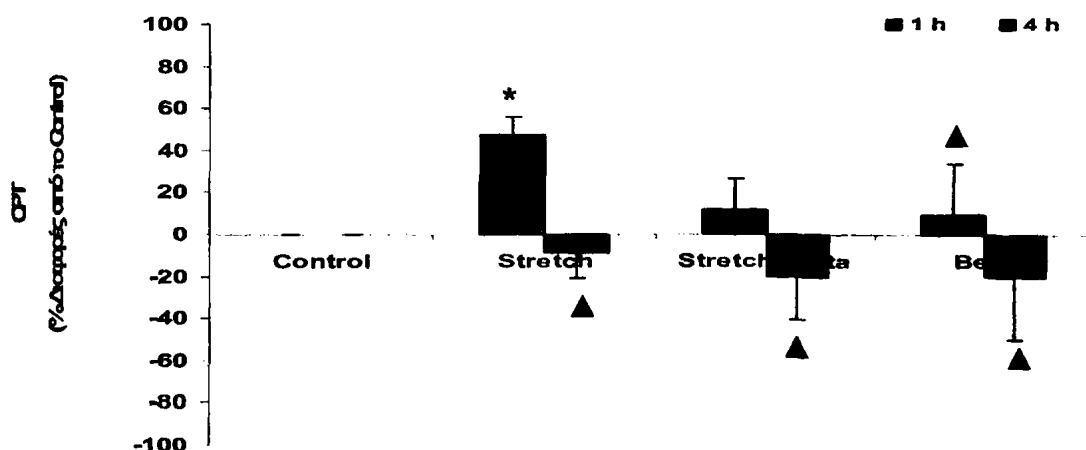
**Σχήμα 39.** Κατανομή ραδιενέργειας 10 μl [<sup>3</sup>H]PAF σύμφωνα με τη μέθοδο του εργαστηρίου μας, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι στην παράγραφο 10.1.



**Ενεργότητα CPT**

Η CPT μετρήθηκε ραδιομετρικά και διαπιστώθηκε ότι υφίσταται μεταβολές κυρίως λόγω του μηχανικού ερεθίσματος για 1 ώρα ενώ η βητα-μεθαζόνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην ενζυμική ενεργότητα. Αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι η CPT αυξάνει λόγω διάτασης κατά  $47.3 \pm 8.9\%$  ( $p=0.037$ ). Η αύξηση αυτή παρατηρείται ακόμη και όταν γίνει στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τις 2 στατιστικές δοκιμές και ως προς τις απόλυτες τιμές και ως προς τις % διαφορές. Αναλυτικά, όσον αφορά τις απόλυτες τιμές με το T-test έχουμε  $p=0.020$ , με το Mann-Whitney test έχουμε  $p=0.011$  με  $n=8$ . Υπολογίζοντας τις % διαφορές έχουμε με το T-test  $p=0.0006$  και με το Mann-Whitney έχουμε  $p=0.037$ ,  $n=3$  (Σχήμα 40).

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση που προκάλεσε το stretch για 1 ώρα ήταν μεγαλύτερη από την αύξηση στην ενεργότητα που προκάλεσε το stretch για 4 ώρες ( $p=0.050$ ). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση στη CPT που προκάλεσε το stretch για 1 ώρα ήταν μεγαλύτερη ως προς την επίδραση που είχε ο κάθε παράγοντας για 4 ώρες αλλά και τη βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα ( $p=0.050$ ). Με επίδραση των παραγόντων ξεχωριστά ή σε συνδυασμό για 4 ώρες παρατηρείται τάση μείωσης της ενζυμικής ενεργότητας ως προς τις control συνθήκες. Οι παρατηρήσεις σε αυτή την παράγραφο ισχύουν μελετώντας τις % διαφορές με το Mann-Whitney test. Η μέση τιμή της ενεργότητας της CPT ήταν  $46.50 \pm 3.41$  pmol PC/min/mg πρωτεΐνης.



**Σχήμα 40.** % μεταβολές της CPT μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των % μεταβολών του λιπιδίου 4 διαφορετικών πειραμάτων με τριπλά δείγματα για την επίδραση παραγόντων 1 h και 4 h. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p < 0.05$ ). ^ στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες διάτασης για 1 ώρα ( $p = 0.05$ ).

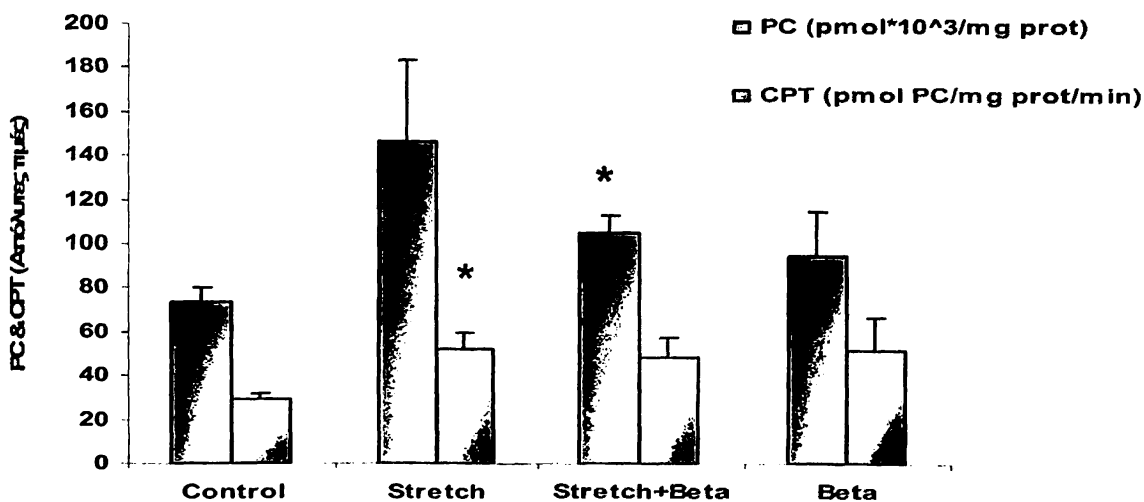


## Αποτελέσματα

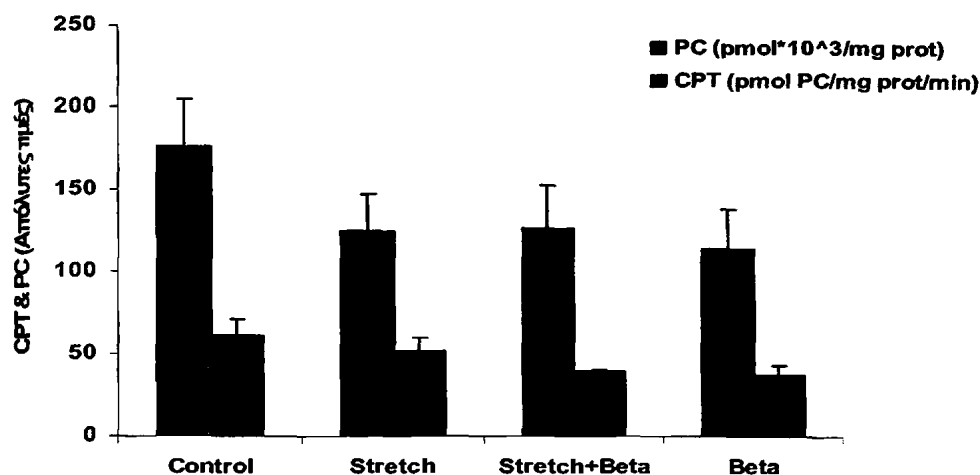
Ενδιαφέρον είναι να επισημανθεί ότι με τη ραδιομετρική μέθοδο του εργαστηρίου μας δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα CPT που καταλύει το τελευταίο βήμα της *de novo* παραγωγής του PAF.

### Συσχέτιση PC και CPT

Μεταξύ του ενζύμου CPT και της PC μπορεί να διαπιστωθεί ότι κάθε παράγοντας που δρα ξεχωριστά ή συνδυαστικά για 1 ώρα προκαλεί αυξητική τάση στις υπό μελέτη παραμέτρους PC & CPT. Όσον αφορά τις απόλυτες τιμές, η διάταση προκαλεί αύξηση στην ενεργότητα της CPT ( $p=0.011$  με το Mann-Whitney και  $p=0.020$  με το T-test) κατά 79.3 %. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στη PC από την ταυτόχρονη επίδραση του μηχανικού και του χημικού ερεθίσματος για 1 ώρα ήταν 42.4 % ( $p=0.034$  με το Mann-Whitney test και  $p=0.023$  με το T-test), χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια μεταβολή στην ενζυμική ενεργότητα. Η συσχέτιση των δύο παραμέτρων όσον αφορά τις απόλυτες τιμές φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 41). Τέλος, όπως προαναφέρθηκε η επίδραση των δύο παραγόντων για 4 ώρες δεν προκάλεσε καμία στατιστική μεταβολή αλλά αντίθετα προκάλεσε τάση μείωσης ως προς τις συνθήκες control (Σχήμα 42).

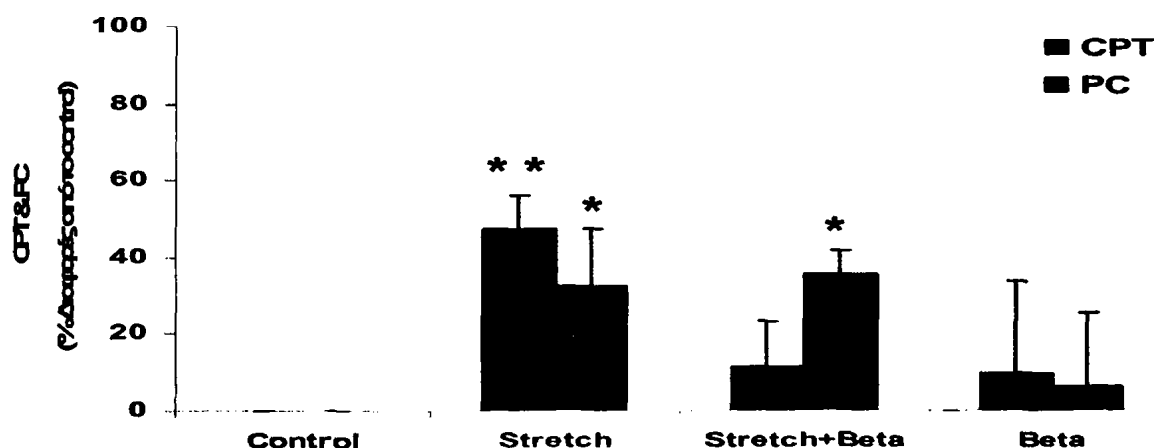


**Σχήμα 41.** Συσχέτιση μεταξύ των απόλυτων τιμών της CPT και της PC για 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα A549. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control ( $p < 0.05$ ).



**Σχήμα 42.** Συσχέτιση μεταξύ των απολύτων τιμών της CPT και της PC για 4 ώρες επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα κύτταρα A549.

Από την άλλη, η αντίστοιχη συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών ως προς τις % διαφορές των απολύτων τιμών δίνει τα ίδια συμπεράσματα, επιπλέον όμως το stretch για 1 ώρα προκαλεί και αύξηση στα επίπεδα της PC κατά  $32.4 \pm 15.0\%$  ( $p=0.037$ ) (Σχήμα 43). Για 4 ώρες επίδραση των παραγόντων δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστική σημαντική μεταβολή.



**Σχήμα 43.** Συσχέτιση μεταξύ των % διαφορών της CPT και της PC για 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα A549. \*, \*\* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) της PC και της CPT αντίστοιχα ως προς τις συνθήκες control ( $p<0.05$ ).

## 9.2 Ενεργότητα LPCAT

Η LPCAT καταλύει το τελευταίο βήμα της πορείας ανάπτυξης στην παραγωγή της PC.

**Προκαταρκτικά πειράματα**

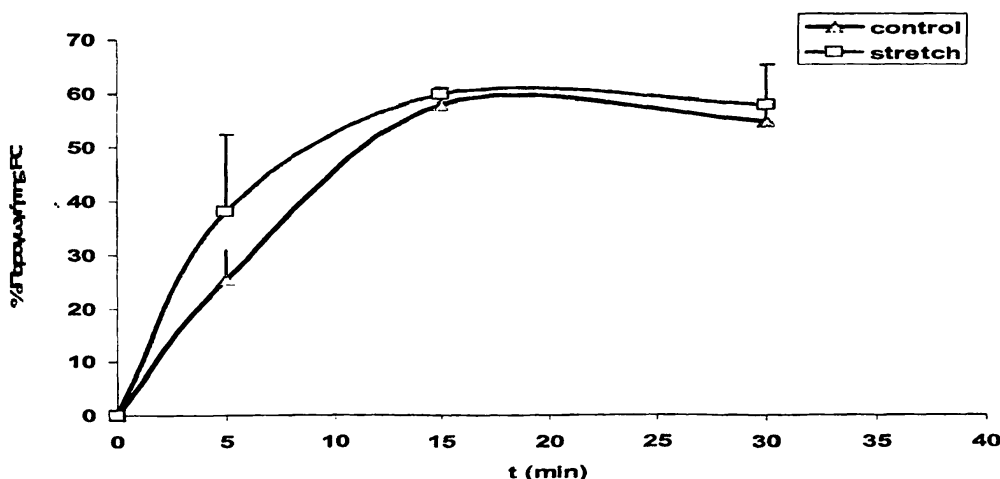
**A. Διαχωρισμός αντιδρώντων-προϊόντων**

Η TLC σε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (C:M:W, 65:35:7, v/v) που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό αντιδρώντων και προϊόντων έδειξε ότι τα  $R_f$  των PC, Lyso-PC και παλμιτοϋλο-CoA ήταν 0.30, 0.12 και 0.07 (κοντά στη γραμμή βάσης). Όταν όμως χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανάλυσης χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό (C-M-AcA-W, 50:25:8:4, v/v) τότε τα  $R_f$  των PC, Lyso-PC και παλμιτοϋλο-CoA ήταν 0.49, 0.15 και 0.10. Με το δεύτερο σύστημα ο διαχωρισμός των PC και παλμιτοϋλο-CoA ήταν περισσότερο ευδιάκριτος οπότε και επιλέχθηκε κυρίως το συγκεκριμένο σύστημα. Βέβαια το σύστημα ανάπτυξης C-M-AcA-W (50:25:8:4, v/v) έναντι του συστήματος C:M:W (65:35:7, v/v) μειονεκτεί ως προς το μεγαλύτερο του χρόνου ανάπτυξης.

Σημειώνεται ότι με ατμούς ιωδίου ανιχνεύονταν όλα τα αντιδρώντα και προϊόντα της αντίδρασης.

**B. Κινητική της αντίδρασης παραγωγής PC από LPCAT**

Άρχικά έγινε μελέτη της κινητικής της αντίδρασης. Οι χρόνοι που έγινε η ενζυμική αντίδραση ήταν 5, 15 και 30 min. Η αντίδραση έγινε σε δείγματα ελέγχου αναφοράς και δείγματα διάτασης για 1 h.



**Σχήμα 44.** Κινητική αντίδρασης σύνθεσης PC από Lyso-PC και Palmitoyl-CoA σε συνθήκες διάτασης για 1 ώρα. Οι τιμές αποτελούν το MO διπλών δειγμάτων ενός πειράματος.

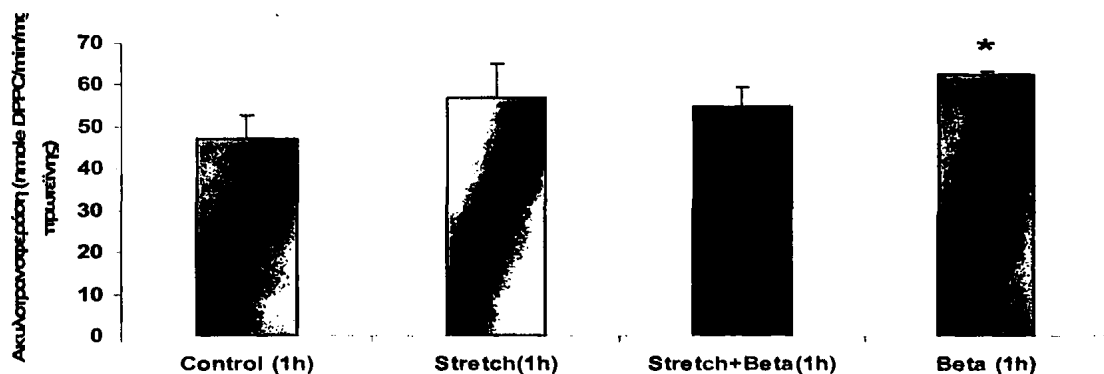
## Αποτελέσματα

Από το προηγούμενο σχήμα διαπιστώθηκε ότι στα 5 min ενζυμικής αντίδρασης παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ δειγμάτων αναφοράς (control) και διάτασης για 1 ώρα.

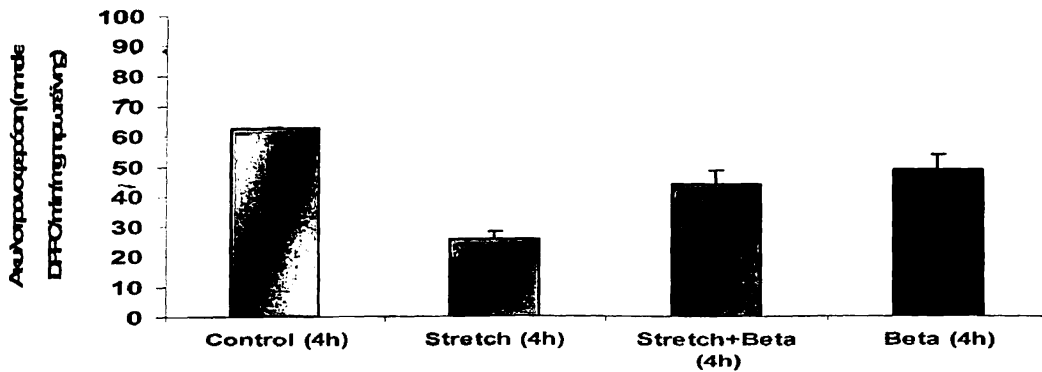
### Ενεργότητα LPCAT

Η LPCAT καταλύει το τελευταίο στάδιο της πορείας ανάπλασης. Το μηχανικό stretch για 1 ώρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας κατά  $20 \pm 10$  % ( $p=0.029$ , για 4 διαφορετικά πειράματα). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα διαπιστώθηκε ότι η ενζυμική ενεργότητα αυξάνει κατά 32.5 %, μεταβολή που είναι στατιστικά σημαντική και αποδεικνύεται με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου T-test ( $p=0.023$ ). Η παρατήρηση αυτή ισχύει για ένα πείραμα με τριπλά δείγματα. Στην περίπτωση του συνδυασμού των δύο παραγόντων-ερεθισμάτων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές αλλά τάση αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας.

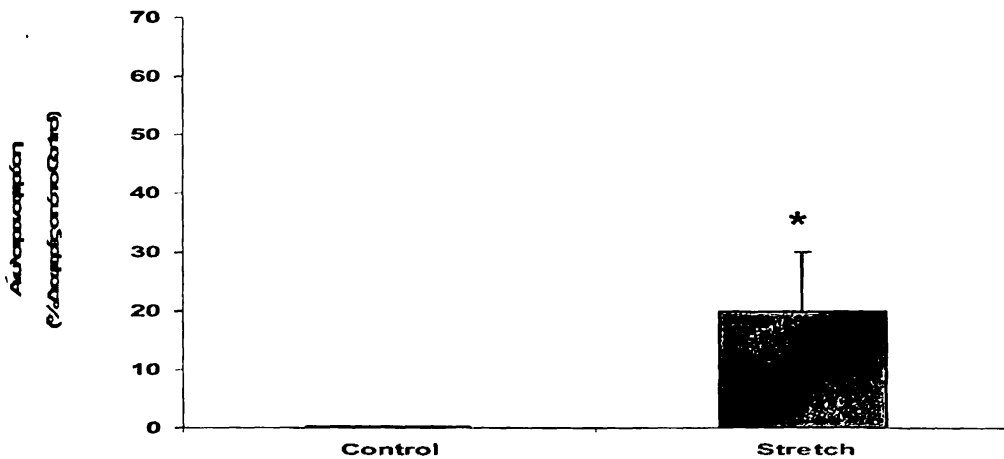
Για την LPCAT μετά από εφαρμογή των παραγόντων για 4 ώρες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τη στιγμή βέβαια που εδώ παρουσιάζονται αποτελέσματα ενός πειράματος με τριπλά δείγματα.



**Σχήμα 45.** Ενεργότητα LPCAT για 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα κύτταρα A549. \* στατιστικά σημαντική αύξηση ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p<0.05$ ). Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  των απολύτων τιμών 4 διπλών/τριπλών δειγμάτων στην περίπτωση του control & stretch και ενός πειράματος με τριπλά δείγματα στις υπόλοιπες περιπτώσεις.



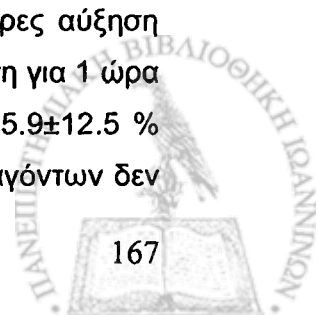
**Σχήμα 46.** Ενεργότητα LPCAT για 4 ώρες επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα κύτταρα A549. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM των απολύτων τιμών ενός πειράματος με τριπλά δείγματα.



**Σχήμα 47.** Ενεργότητα LPCAT μετά από 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης στα κύτταρα A549. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM των % διαφορών τεσσάρων πειραμάτων με διπλά/τριπλά δείγματα. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p < 0.05$ ).

### 9.3 Ενεργότητα PLA<sub>2</sub>

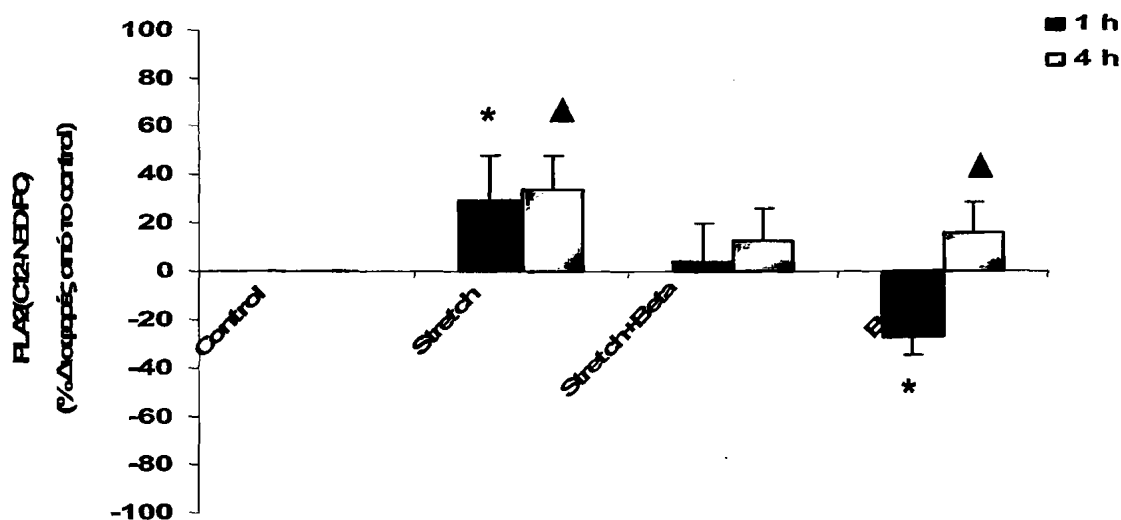
Η PC που παράγεται από τη *de novo* πορεία αποτελεί το υπόστρωμα για να δράσει η PLA<sub>2</sub> προς παραγωγή Lyso-PC για να ακολουθήσει τέλος η δράση της LPCAT. Η ολική ενεργότητα του ενζύμου PLA<sub>2</sub> μετρήθηκε φθορισμομετρικά. Οι % διαφορές της ενεργότητας του ενζύμου παρουσίασαν μεταβολές λόγω της επίδρασης των 2 παραγόντων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC. Συγκεκριμένα, η διάταση προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας κατά 29.5±18.3 % ( $p=0.040$ ) για 1 ώρα ενώ για 4 ώρες αύξηση 34.2±14.1 % ( $p=0.040$ ). Από την άλλη, η επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα προκάλεσε μείωση κατά 27.3±7.6 % ( $p=0.006$ ) ενώ για 4 ώρες αύξηση κατά 15.9±12.5 % ( $p=0.040$ ) (Σχήμα 48). Τέλος, ενδιαφέρον είναι ότι ο συνδυασμός των δύο παραγόντων δεν



## Αποτελέσματα

είχε καμία επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα, παρόλο που μεμονωμένα ο κάθε παράγοντας προκάλεσε κάποια μεταβολή.

Η μέση τιμή της ολικής ενζυμικής ενεργότητας της PLA<sub>2</sub> όταν αυτή μετρήθηκε με το υπόστρωμα C<sub>12</sub>-NBD-PC ήταν 4.99±0.49 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης.



**Σχήμα 48.** % μεταβολές της PLA<sub>2</sub> μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες όταν οι μετρήσεις της ενεργότητας έγιναν με υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM των % διαφορών του λιπιδίου 5 διαφορετικών πειραμάτων με διπλά δείγματα για την επίδραση παραγόντων 1 και 4 ώρες. \*, ^ στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τις συνθήκες control για 1 και 4 ώρες αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).

Ενδιαφέρον είναι να παρουσιαστεί η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της PLA<sub>2</sub> όταν αυτή μετράται με υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC και τη PC το υπόστρωμα υδρόλυσης του ενζύμου. Έτσι για 1 ώρα επίδρασης της μηχανικής διάτασης παρατηρήθηκε αύξηση κατά 32.35±15.00 % ( $p=0.037$ ) για τη PC και αύξηση κατά 29.50±18.26 % ( $p=0.040$ ) για τη PLA<sub>2</sub>. Η βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα προκάλεσε μείωση της PLA<sub>2</sub> κατά 27.30±7.60 % ( $p=0.006$ ). Τέλος, ο συνδυασμός των 2 παραγόντων για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση της PC κατά 35.38±6.22 % ( $p=0.037$ ) και δε σημείωσε κάποια μεταβολή στην περίπτωση της PLA<sub>2</sub>.

Από την άλλη, δε φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση των προηγούμενων μεγεθών μετά από επίδραση των δύο παραγόντων για 4 ώρες.

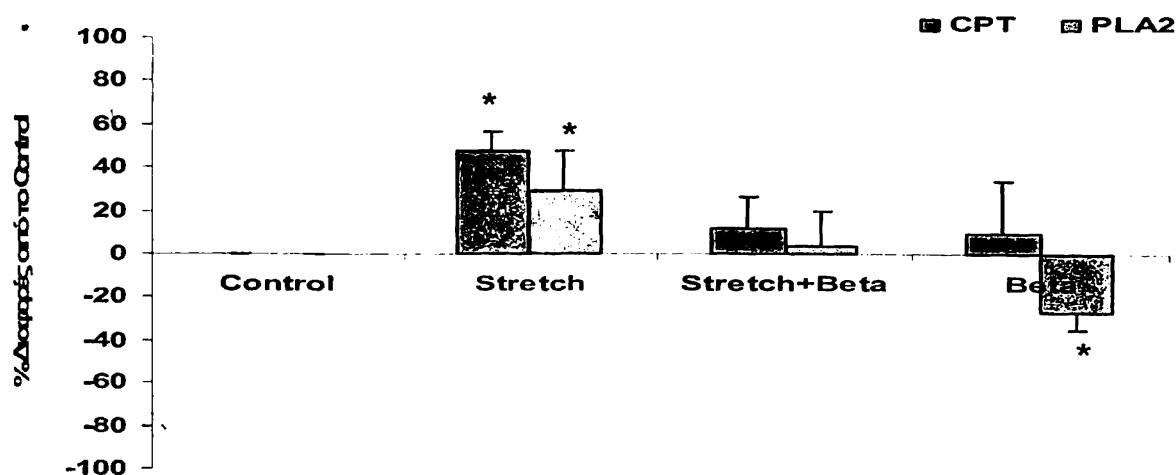


## Αποτελέσματα

**Πίνακας 16.** % διαφορές του  $MO \pm SEM$  της PC και του ενζύμου  $PLA_2$  για 1 ώρα επίδραση διάτασης και μετά από συνδυασμό με βητα-μεθαζόνη ως προς τις συνθήκες control.

	Stretch (1h)	Beta (1h)	Stretch + Beta (1h)	Μεταβολή
PC	$32.4 \pm 15.0 \%$ ( $p=0.037$ )	$6.2 \pm 19.2 \%$ ( $p>0.05$ )	$35.4 \pm 6.2 \%$ ( $p=0.037$ )	Αύξηση
$PLA_2$	$29.5 \pm 18.3 \%$ ( $p=0.040$ )	$-27.3 \pm 7.6 \%$ ( $p=0.006$ )	$3.8 \pm 16.1 \%$ ( $p>0.05$ )	Αύξηση/Μείωση

Στο επόμενο σχήμα παρουσιάζεται η συσχέτιση της  $PLA_2$  και της CPT. Υπό την επίδραση των 2 παραγόντων για 1 ώρα παρατηρήθηκε ότι η μηχανική διάταση αυξάνει και τις δύο ενζυμικές ενεργότητες ( $29.5 \pm 18.3 \%$ ,  $p=0.040$ , για τη  $PLA_2$  και  $47.3 \pm 8.9 \%$ ,  $p=0.037$ , για τη CPT) (Σχήμα 49). Από την άλλη η βητα-μεθαζόνη προκαλεί μείωση μόνο στη  $PLA_2$  ( $27.3 \pm 7.6 \%$ ,  $p=0.006$ ) και δεν προκαλεί κάποια μεταβολή στη CPT.



**Σχήμα 49.** Συσχέτιση μεταξύ των % διαφορών της  $PLA_2$  και της CPT για 1 ώρα επίδραση μηχανικής διάτασης και επώαση με βητα-μεθαζόνη στα A549. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τις συνθήκες control ( $p < 0.05$ ).

### 9.4 Ενεργότητα PAF-AcH

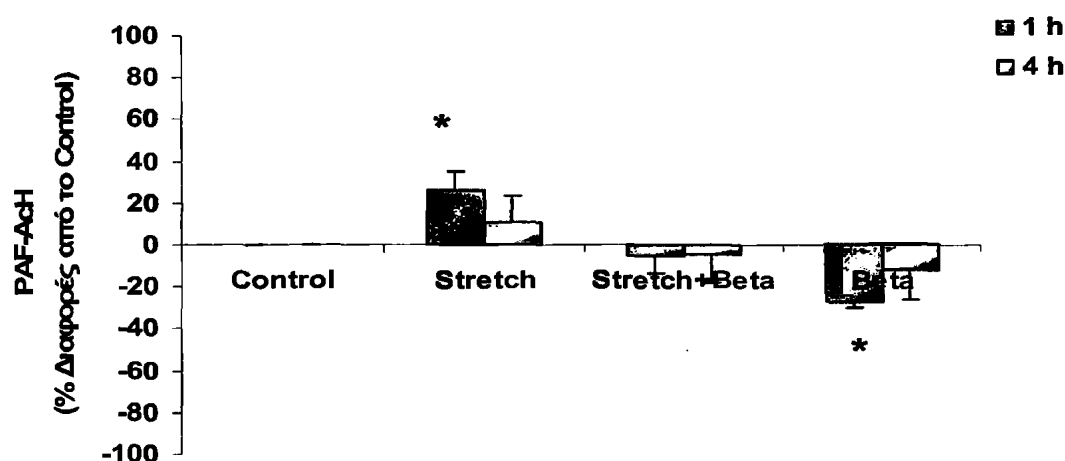
Τα επίπεδα της PAF-AcH μετρήθηκαν φθορισμομετρικά -βάση μεθόδου που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας- και βρέθηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκαλεί αύξηση κατά  $26.3 \pm 9.2 \%$  ( $p=0.037$ ) ως προς τις συνθήκες control, παρουσιάζοντας παρόμοια συμπεριφορά με τη  $PLA_2$ . Επιπλέον, επώαζοντας τα κύτταρα για 1 ώρα με βητα-μεθαζόνη παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας κατά  $27.2 \pm 2.7 \%$  ( $p=0.037$ ) ως



## Αποτελέσματα

προς τις συνθήκες control. Η βητα-μεθαζόνη και ο συνδυασμός της με το stretch δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή σε κανένα χρονικό διάστημα επίδρασής τους στα κύτταρα. Για 4 ώρες επίδραση των παραγόντων δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Η μέση τιμή της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AcH όπως αυτή μετρήθηκε με το υποστρώμα C<sub>6</sub>-NBD-PC ήταν 23.87±3.21 nmol C<sub>6</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης.



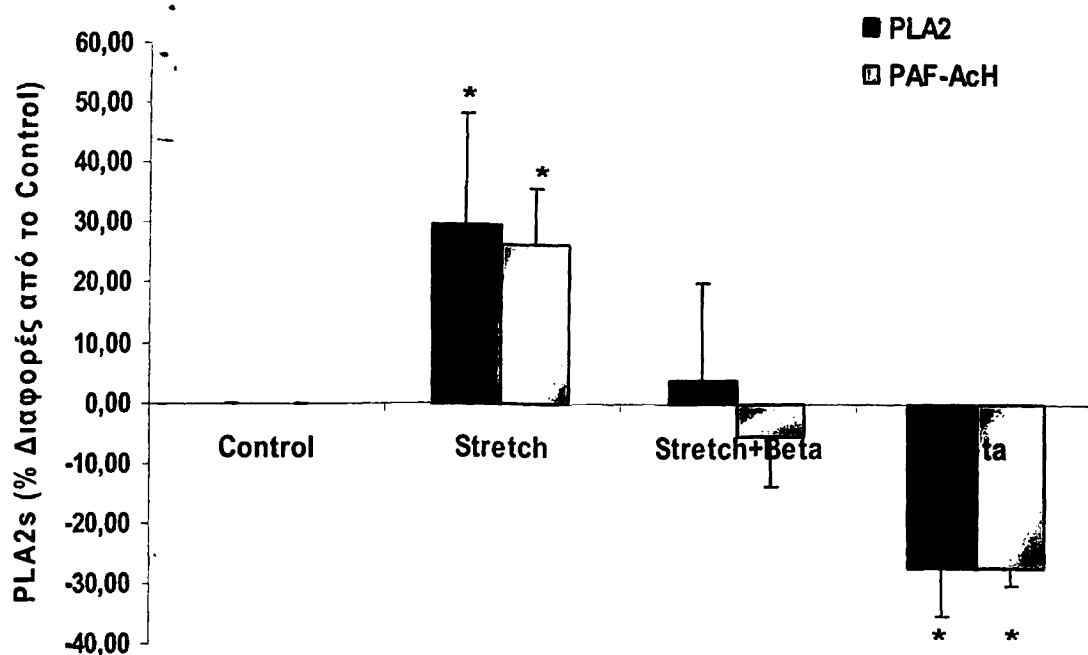
**Σχήμα 50.** % μεταβολές της PAF-AcH μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 και 4 ώρες όταν οι μετρήσεις της ενεργότητας έγιναν με υποστρώμα την C<sub>6</sub>-NBD-PC. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM των % διαφορών του ενζύμου 4 διαφορετικών πειραμάτων με διπλά δείγματα μετά από επίδραση παραγόντων για 1 και 4 ώρες. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p < 0.05$ ).

### PLA<sub>2</sub> και PAF-AcH

Στο **Σχήμα 51** φαίνονται οι % διαφορές της ενεργότητας της PLA<sub>2</sub> όταν έχει μετρηθεί με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>6</sub>-NBD-PC στα κύτταρα A549 και μετά την επίδραση της μηχανικής διάτασης και της βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα. Έτσι διαπιστώθηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκαλεί αύξηση σε PLA<sub>2</sub> που έχει μετρηθεί με C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>6</sub>-NBD-PC. Επιπλέον η βητα-μεθαζόνη προκαλεί μείωση σε PLA<sub>2</sub> που έχει μετρηθεί και με τα δύο υποστρώματα. Αντίθετα, μετά την επίδραση παραγόντων για 4 ώρες δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην ενζυμική ενεργότητα.

Συγκεντρωτικά, η ενζυμική ενεργότητα της PLA<sub>2</sub> όπως μετρήθηκε με τα δύο υποστρώματα υπό την επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά.





**Σχήμα 51.** % μεταβολές PLA<sub>2</sub> όταν έχει μετρηθεί με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>c</sub>-NBD-PC στα κύτταρα A549 μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM των % διαφορών της ενεργότητας 4 διαφορετικών πειραμάτων με διπλά δείγματα. \* στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τις συνθήκες control για 1 ώρα ( $p < 0.05$ ).

### PLA<sub>2</sub> στα υπερκείμενα των καλλιεργειών

Τέλος, δεν ανιχνεύθηκε PLA<sub>2</sub> στα υπερκείμενα των καλλιεργειών όταν αυτή μετρήθηκε και με τα δύο υποστρώματα (C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>c</sub>-NBD-PC) χρησιμοποιώντας τη φθορισμομετρική μέθοδο. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα PAF-AcH στα υπερκείμενα των καλλιεργειών όταν αυτή μετρήθηκε -σε συγκριτικά πειράματα- και με τη ραδιομετρική μέθοδο του εργαστηρίου μας.

## 10. Μελέτη της aiPLA<sub>2</sub>

### Προκαταρκτικά πειράματα

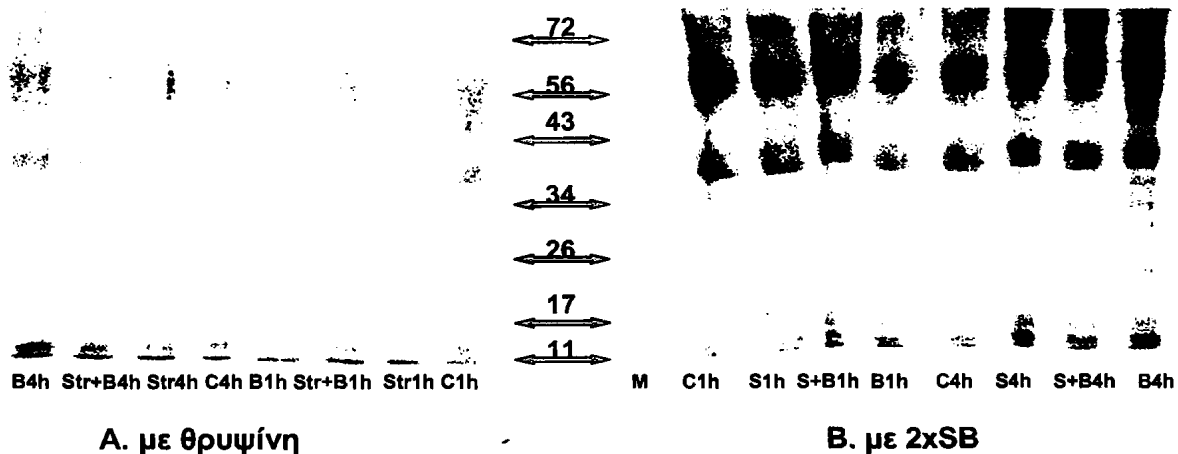
Αρχικά έγιναν επιμέρους δοκιμές σχετικά με τον τρόπο απομόνωσης των κυττάρων από τα τρυβλία προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις της ανοσοαποτύπωσης. Ο πρώτος τρόπος ήταν αυτός που περιγράφεται και στην παράγραφο 2 του κεφαλαίου **Υλικά και Μέθοδοι**, δηλαδή χρησιμοποιώντας θρυψίνη, απομάκρυνσή της με φυγοκεντρίσεις,



## Αποτελέσματα

εναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και τέλος ομογενοποίησή τους με υπέρηχους (Σχήμα 54A). Θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτός ο τρόπος ακολουθείται και στην περίπτωση που απαιτείται η μέτρηση των ενζυμικών ενεργοτήτων στο ομογενοποίημα των κυττάρων.

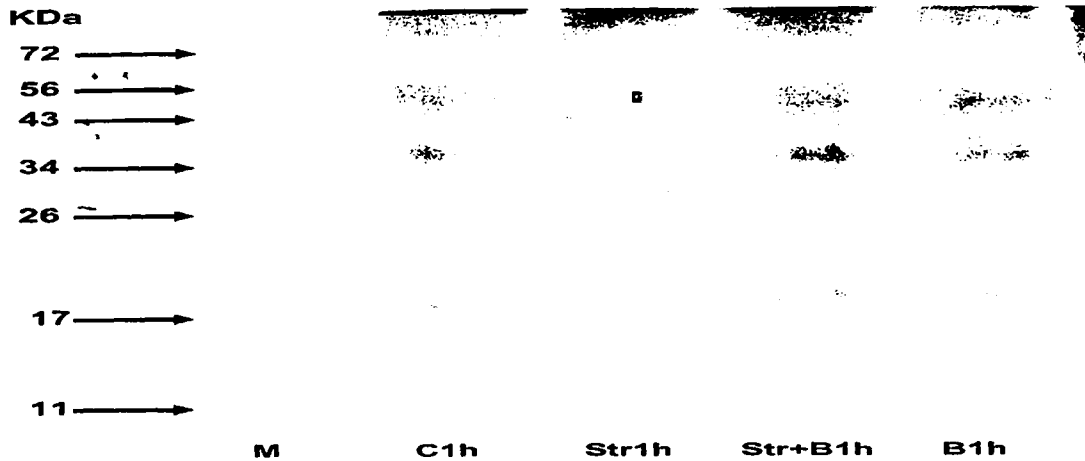
Ο δεύτερος τρόπος ήταν με ξύστρο και με ρυθμιστικό διάλυμα ετοιμασίας δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση (2xSB), ο πλέον συνηθισμένος τρόπος απομόνωσης κυττάρων για τις τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης.



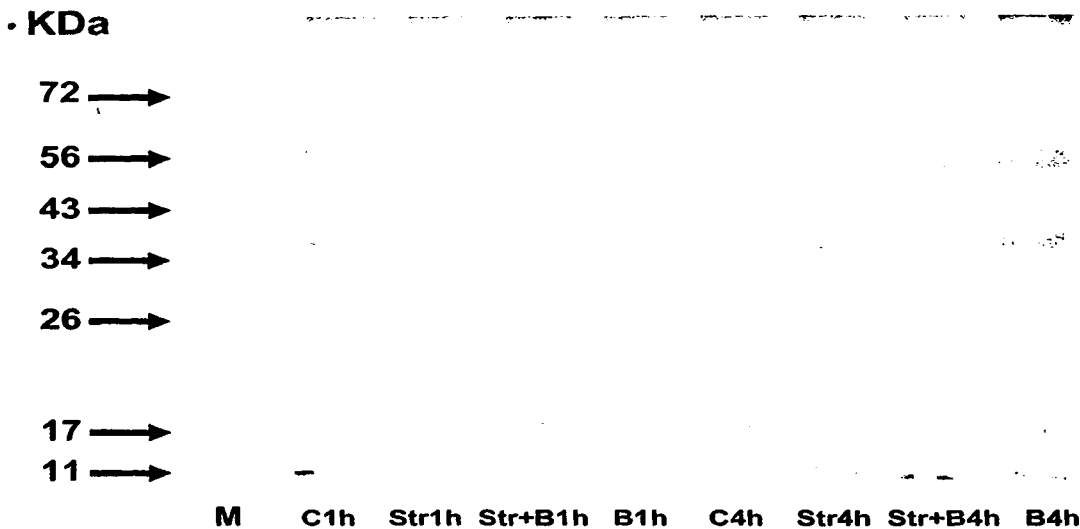
**Σχήμα 52.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών ομογενοποιηήματος κυττάρων A549 με μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση 12.5 % SDS-PAGE. Η απομόνωση των κυττάρων από τα τρυβλία έγινε A. με θρυψίνη και B. με ξύστρο και 2xSB. Η εμφάνιση του πηκτώματος έγινε με βαφή Coomassie Brilliant Blue R-250 και η επεξεργασία της εικόνας με το σχεδιαστικό πρόγραμμα της «Ζωγραφικής» της Microsoft Office.

Και στις δύο περιπτώσεις διακρίνεται πρωτεϊνική ζώνη μέσου MB 26 KDa. Ενδεχομένως όμως όταν τα κύτταρα απομονώνονται με ξύστρο και 2xSB οι ζώνες είναι πιο ευδιάκριτες οπότε και προτιμήθηκε στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης. Στη συνέχεια, σε ενδεικτικά πειράματα που έγιναν παρουσιάζεται ο διαχωρισμός πρωτεϊνών ομογενοποιηήματος κυττάρων A549 στις πειραματικές μας συνθήκες με SDS-PAGE σε ποσοστά πολυακρυλαμιδίου 12.5 % και 15 % (Σχήματα 53 & 54).

## Αποτελέσματα



**Σχήμα 53.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών ομογενοποιημένου κυττάρων A549 με μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση 12.5 % SDS-PAGE. Η απομόνωση των κυττάρων από τα τρυβλία έγινε με ξύστρο και με 2xSB. Η εμφάνιση του πηκτώματος έγινε με βαφή Coomassie Brilliant Blue R-250 και η επεξεργασία της εικόνας με το σχεδιαστικό πρόγραμμα της «Ζωγραφικής» της Microsoft Office (όπου M=Markers).



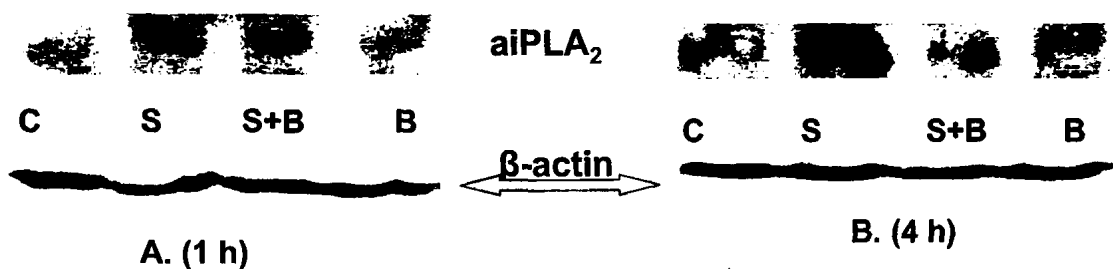
**Σχήμα 54.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών ομογενοποιημένου κυττάρων A549 με μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση 15 % SDS-PAGE. Η απομόνωση των κυττάρων από τα τρυβλία έγινε με ξύστρο και 2xSB. Η εμφάνιση του πηκτώματος έγινε με βαφή Coomassie Brilliant Blue R-250 και η επεξεργασία της εικόνας με το σχεδιαστικό πρόγραμμα της «Ζωγραφικής» της Microsoft Office.

Στο πήκτωμα 15 % ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών φαίνεται πιο ικανοποιητικός σε σχέση με το πήκτωμα 12.5 % αλλά στο πήκτωμα με μικρότερο ποσοστό θεωρείται ότι είναι πιο ευδιάκριτος ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην περιοχή από 20 -30 KDa. Επομένως από τα πειραματικά μας αποτελέσματα αλλά και με βάση τη βιβλιογραφία για τη μελέτη της aiPLA<sub>2</sub>

επιλέχθηκε ποσοστό πολυακρυλαμιδίου 12.5 %. Πάντως σε κάθε περίπτωση διακρίνονται 3 ζώνες πρωτεϊνών στην περιοχή με μοριακά βάρη 24, 26 και 28 KDa.

### 10.1 Ανοσοαποτύπωση της αιPLA<sub>2</sub>

Ακολούθησε μεταφορά του πηκτώματος 12.5 % σε μεμβράνη PVDF και πρόσδεση του αντισώματος της αιPLA<sub>2</sub> προκειμένου να διευκρινιστεί εάν πράγματι ανιχνεύεται η συγκεκριμένη ενζυμική ενεργότητα στα κύτταρα A549.



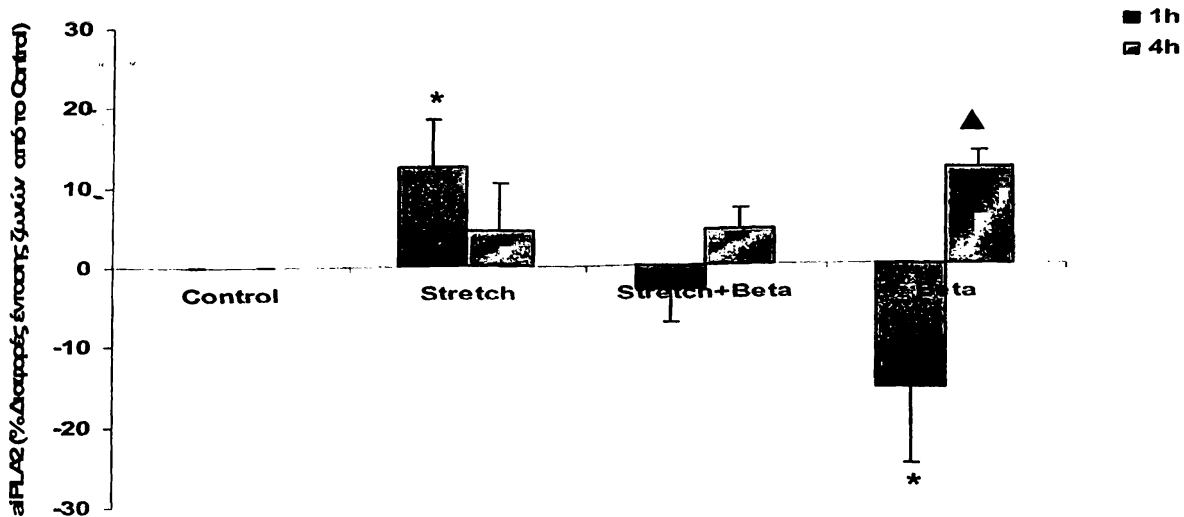
Σχήμα 55. αιPLA<sub>2</sub> στα κύτταρα A549 στις πειραματικές μας συνθήκες.

Διαπιστώθηκε επομένως η ύπαρξη πρωτεΐνης -μέσου μοριακού βάρους 26 kDa- στα κύτταρα A549.

Η ανοσοαποτύπωση επαναλήφθηκε τουλάχιστον σε τρεις διαφορετικές καλλιέργειες και ακολούθησε ημιοσοτικός προσδιορισμός των ζωνών με το πρόγραμμα ImageJ. Έτσι όπως φαίνεται και στο Σχήμα 56, το μηχανικό stretch προκάλεσε αύξηση της ζώνης κατά  $12.3 \pm 5.9$  % ( $p=0.037$ ), η βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα μείωση κατά  $15.5 \pm 9.5$  % ( $p=0.037$ ), ενώ ο συνδυασμός των δύο παραγόντων προκάλεσε τάση μείωσης χωρίς όμως να μπορούμε στατιστικά να αποδείξουμε την όποια μεταβολή.

Όταν όμως το κάθε ερέθισμα επιδρά μεμονωμένα ή συνδυαστικά για 4 ώρες τότε παρατηρήθηκε τάση αύξησης σε όλες τις περιπτώσεις, αποδεικνύοντας στατιστικά τη μεταβολή στην περίπτωση της βητα-μεθαζόνης. Έτσι παρατηρήθηκε ότι για 4 ώρες επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη η αιPLA<sub>2</sub> αυξήθηκε κατά  $11.9 \pm 2.0$  % ( $p=0.037$ , με το Mann-Whitney test &  $p=0.004$  με το T-test).

## Αποτελέσματα



**Σχήμα 56.** % Διαφορές της έντασης των ζωνών της aiPLA<sub>2</sub> μετά από ανοσοαποτύπωση. \*,▲ στατιστικά σημαντικές μεταβολές ως προς τις συνθήκες control για 1 και 4 ώρες αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).

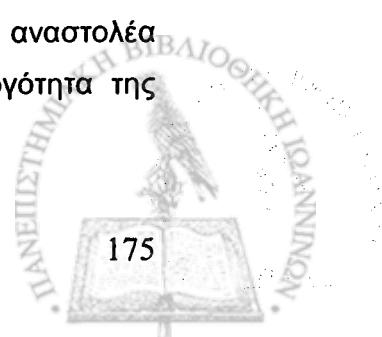
### 10.2 Ενεργότητα της aiPLA<sub>2</sub>

Άφου διαπιστώθηκε η ύπαρξη της συγκεκριμένης φωσφολιπάσης, στη συνέχεια έγινε μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας με τη μέθοδο της HPLC, όπως είχε σχεδιαστεί στο εργαστήριό μας. Προκειμένου περαιτέρω να ενισχυθεί η μελέτη μας για την aiPLA<sub>2</sub> η ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκε και παρουσία του αναστολέα MJ33.

#### Αποτελέσματα μέτρησης της aiPLA<sub>2</sub> με τη μέθοδο της HPLC

Αρχικά μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα σε pH=7.4 παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η μέση τιμή της ενζυμικής ενεργότητας παρουσία ιόντων ασβεστίου ήταν 1.67±0.53 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης ενώ απουσία ιόντων ασβεστίου η μέση τιμή ήταν 1.46±0.46 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης. Δηλαδή απουσία ιόντων ασβεστίου παρατηρήθηκε μείωση κατά 12.5 % στην τιμή της ενεργότητας.

Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της HPLC μετρήθηκε ενεργότητα PLA<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC σε pH=4.0 και απουσία ιόντων ασβεστίου. Η ενεργότητα μιας τέτοιας PLA<sub>2</sub> βρέθηκε ότι είναι 0.50 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης, δηλαδή σχεδόν η μισή τιμή ενεργότητας μιας PLA<sub>2</sub> που μετράται σε pH=7.4, απουσία ιόντων ασβεστίου και με το ίδιο υπόστρωμα. Όταν όμως η όξινη φωσφολιπάση μετρήθηκε παρουσία του αναστολέα MJ33 τότε η ενεργότητά της βρέθηκε μειωμένη κατά 60 %, δηλαδή η ενεργότητα της φωσφολιπάσης ήταν τότε 0.20 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης.

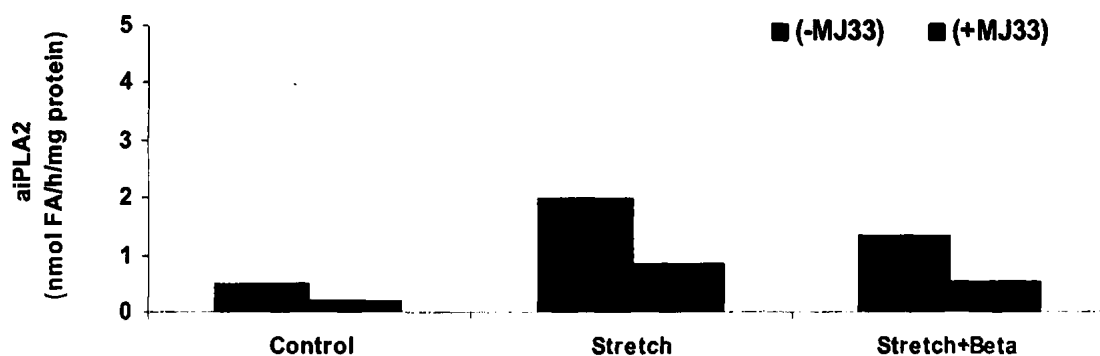


## Αποτελέσματα

Ας δούμε όμως τις τιμές της ενεργότητας όπως αυτή μετρήθηκε σε όξινο pH και απουσία ιόντων ασβεστίου υπό την επίδραση του αναστολέα MJ33 και στις πειραματικές συνθήκες αυτής της εργασίας. Έτσι βρέθηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση κατά 4 φορές της ενεργότητας (απόλυτη τιμή ενεργότητας 1.98 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης) σε σχέση με την ενεργότητα των δειγμάτων αναφοράς. Παρουσία του αναστολέα MJ33, η όξινη φωσφολιπάση λόγω διάτασης για 1 ώρα –και απουσία ιόντων ασβεστίου– βρέθηκε να μειώνεται κατά 57.1 % (η απόλυτη τιμή της ενεργότητας ήταν 0.85 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης).

Σε δείγματα που είχαν υποστεί την επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα βρέθηκε επίσης αύξηση της ενεργότητας κατά 168 % (απόλυτη τιμή 1.34 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης) σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς. Στα ίδια δείγματα -υπό την επίδραση των δύο stress- που μετρήθηκαν παρουσία του αναστολέα βρέθηκε μείωση κατά 60.5 % (απόλυτη τιμή 0.53 nmol C<sub>12</sub>-NBD-FA/h/mg πρωτεΐνης).

Δηλαδή σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση κατά 60 % περίπου λόγω του αναστολέα ανεξάρτητα από την επίδραση του χημικού και/ή του μηχανικού ερεθίσματος.



**Σχήμα 57.** Ενεργότητα aiPLA<sub>2</sub> όταν αυτή μετρήθηκε με υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC με τη μέθοδο της HPLC παρουσία και απουσία του αναστολέα MJ33 σε συνθήκες Control, Stretch και Stretch+Beta για 1 ώρα.

Μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης για 4 ώρες η ενζυμική ενεργότητα, που μετρήθηκε σε όξινο pH και απουσία ιόντων ασβεστίου, βρέθηκε διπλάσια σε σχέση με την ενεργότητα στις συνθήκες αναφοράς. Ο αναστολέας MJ33 στα δείγματα αναφοράς προκάλεσε μείωση κατά 32.2 % ενώ στα δείγματα που είχαν υποστεί την επίδραση μηχανικής διάτασης για 4 ώρες η μείωση που προκάλεσε ο αναστολέας ήταν 38.8 %.

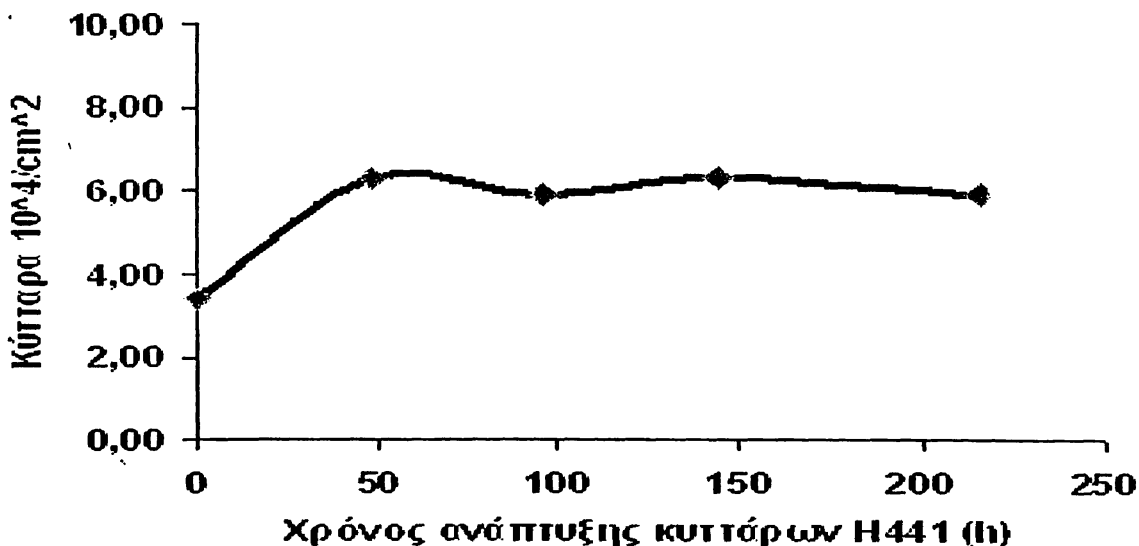
Δυστυχώς δεν ήταν εφικτό να μετρηθεί η τιμή της ενεργότητας σε δείγματα με βητα-μεθαζόνη για 1 και 4 ώρες καθώς και μετά από το συνδυασμό των παραγόντων για 4 ώρες.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ H441

### 1. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων H441

Έγινε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη και σε τρυβλία με απλή μεμβράνη ίδιας διαμέτρου μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων κάθε 48 ώρες περίπου (ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων H441 είναι 52 ώρες). Η καλλιέργεια των κυττάρων H441 ετοιμάστηκε με  $8 \times 10^5$  κύτταρα/ml ή  $3.4 \times 10^4$  κύτταρα/cm<sup>2</sup> σε απλή μεμβράνη για τα H441 κύτταρα.



**Σχήμα 58.** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων H441 σε τρυβλία απλής μεμβράνης (5 cm), ίδιων διαστάσεων με τα αντίστοιχα της ελαστικής μεμβράνης.

Από την καμπύλη ανάπτυξης διαπιστώνεται ο διπλασιασμός των κυττάρων κάθε 48 ώρες για τα H441 κύτταρα. Στην καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων H441 υπήρχαν πειραματικά σφάλματα στη μέτρηση των κυττάρων οπότε και κατά τη χρονική στιγμή 96 ώρες δεν υπολογίστηκε ο σωστός αριθμός κυττάρων. Σε αντίστοιχες μετρήσεις που έγιναν υπό τις ίδιες συνθήκες σε τρυβλία με ελαστική μεμβράνη διαπιστώθηκαν παρόμοιες μετρήσεις.



## Αποτελέσματα

Επομένως στα πειράματά μας οι καλλιέργειες ετοιμάστηκαν με  $3.1 \times 10^4/\text{cm}^2$  κύτταρα και για το σχηματισμό ταπήτιου η καλλιέργεια αφέθηκε για 92 ώρες και ακολούθως έγινε εφαρμογή μηχανικής διάτασης και επώαση με τη βητα-μεθαζόνη, κατά τον ίδιο τρόπο όπως στα A549 κύτταρα.

### 2. Αριθμός κυττάρων - έλεγχος βιωσιμότητας

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έδειξε ότι η μηχανική διάταση δεν επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων. Το ίδιο συμπέρασμα φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη ή ακόμη και όταν έγινε συνδυασμός του γλυκοκορτικοειδούς με τη μηχανική διάταση. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό των νεκρών και ζωντανών κυττάρων. Οι μετρήσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα από όπου φαίνεται ο μεγάλος αριθμός των νεκρών κυττάρων έναντι των ζωντανών.

Πίνακας 17. Αριθμός κυττάρων σε ομογενοποίηση κυττάρων H441.

Τα αποτελέσματα αποτελούν μετρήσεις ενός πειράματος.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	1 h		4 h	
	ΚΥΤΤΑΡΑ ( $10^4/\text{cm}^2$ )		ΚΥΤΤΑΡΑ ( $10^4/\text{cm}^2$ )	
	ΖΩΝΤΑΝΑ	ΝΕΚΡΑ	ΖΩΝΤΑΝΑ	ΝΕΚΡΑ
Control	4.08	2.55	5.60	2.55
Stretch	8.15	3.06	5.09	3.57
Stretch+Beta	6.62	2.55	5.60	3.06
Beta	3.57	1.53	4.08	2.04

### 3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Λόγω της επίδρασης των δύο παραγόντων δε βρέθηκε στατιστική μεταβολή στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Ο μέσος όρος του πρωτεϊνικού περιεχομένου στο ομογενοποίημα των κυττάρων H441 ήταν  $980.58 \pm 34.85 \mu\text{g/ml}$  (ή  $933.89 \mu\text{g}/10^6$  κύτταρα) και στο υπερκείμενο  $86.53 \pm 2.65 \mu\text{g}$  πρωτεΐνης/ml.



## Αποτελέσματα

**Πίνακας 18.** Πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε κύτταρα H441. Οι τιμές αποτελούν το  $MO \pm SEM$  2 διαφορετικών πειραμάτων με διπλά δείγματα για το ομογενοποίηση των κυττάρων και ενός πειράματος με διπλά δείγματα για τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών.

Συνθήκες	Πρωτεΐνη ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	1 h		4 h	
	Κύτταρα	Υπερκείμενα	Κύτταρα	Υπερκείμενα
<b>Control</b>	847.5 $\pm$ 124.1	96.9 $\pm$ 1.0	1105.7 $\pm$ 205.9	81.6 $\pm$ 0.0
<b>Stretch</b>	1021.8 $\pm$ 187.8	93.6 $\pm$ 0.5	1023.7 $\pm$ 273.4	76.9 $\pm$ 1.6
<b>Stretch+Beta</b>	1048.5 $\pm$ 214.5	90.7 $\pm$ 3.6	962.7 $\pm$ 188.6	91.1 $\pm$ 6.2
<b>Beta</b>	822.1 $\pm$ 83.7	83.1 $\pm$ 0.0	1012.8 $\pm$ 196.8	78.3 $\pm$ 2.6

### 4. Προσδιορισμός ολικού λιπιδικού φωσφόρου

Το ομογενοποίηση των κυττάρων εκχυλίστηκε και προσδιορίστηκε το ολικό λιπιδικό περιεχόμενο προκειμένου να υπολογιστεί η % ανάκτηση των επιμέρους λιπιδίων μετά από TLC στο σύστημα C-M-W (65:35:7, v/v). Ο μέσος όρος του λιπιδικού φωσφόρου στο ομογενοποίηση των κυττάρων H441 ήταν 12.64 $\pm$ 0.48  $\mu\text{g/ml}$ .

**Πίνακας 19.** Επίπεδα λιπιδικού φωσφόρου σε  $\mu\text{g/mg}$  πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα αποτελούν τιμές ενός πειράματος.

Κύτταρα H441	$\mu\text{g P/mg}$ πρωτεΐνης	
	1 h	4 h
<b>Control</b>	12.27	12.47
<b>Stretch</b>	12.69	11.08
<b>Stretch + Beta</b>	12.19	14.82
<b>Beta</b>	11.22	14.40

### 5. Διαχωρισμός λιπιδίων κυττάρων H441 μετά από TLC

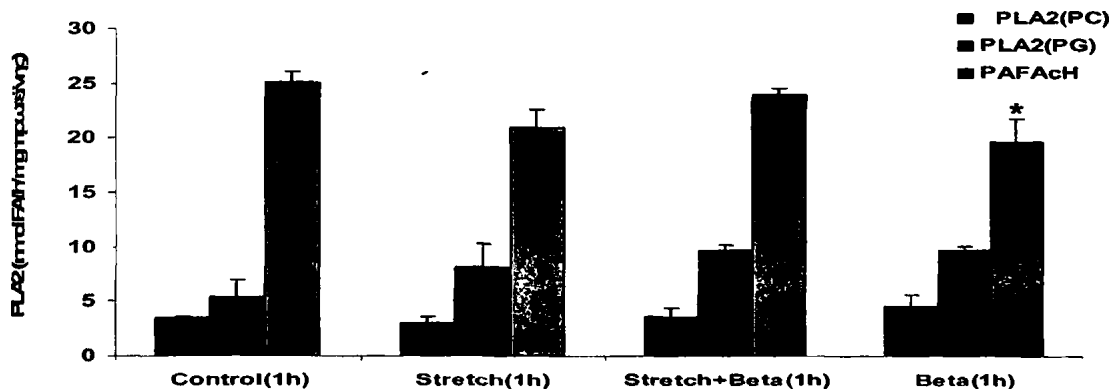
Η ανάλυση των λιπιδίων κυττάρων H441 με TLC σε σύστημα διαλυτών C:M:W (65:35:7, v/v) έδωσε την ίδια εικόνα με τα κύτταρα A549 (Βλέπε Εικόνα 8).

## 6. Ενζυμικές ενεργότητες που συμμετέχουν στην παραγωγή της PC

### 6.1 Ενεργότητα PLA<sub>2</sub>

Στις πειραματικές μας συνθήκες στο ομογενοποίημα των κυττάρων μετρήθηκε ενεργότητα φωσφολιπασών με 3 υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC, C<sub>12</sub>-NBD-PG και C<sub>6</sub>-NBD-PC. Συγκεκριμένα, μετά από επίδραση των παραγόντων για 1 ώρα, διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με καμία στατιστική δοκιμή για τη PLA<sub>2</sub> που μετρήθηκε με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC και C<sub>12</sub>-NBD-PG, είτε υπολογίζοντας το MO των μετρήσεων είτε υπολογίζοντας τις % διαφορές του MO των μετρήσεων.

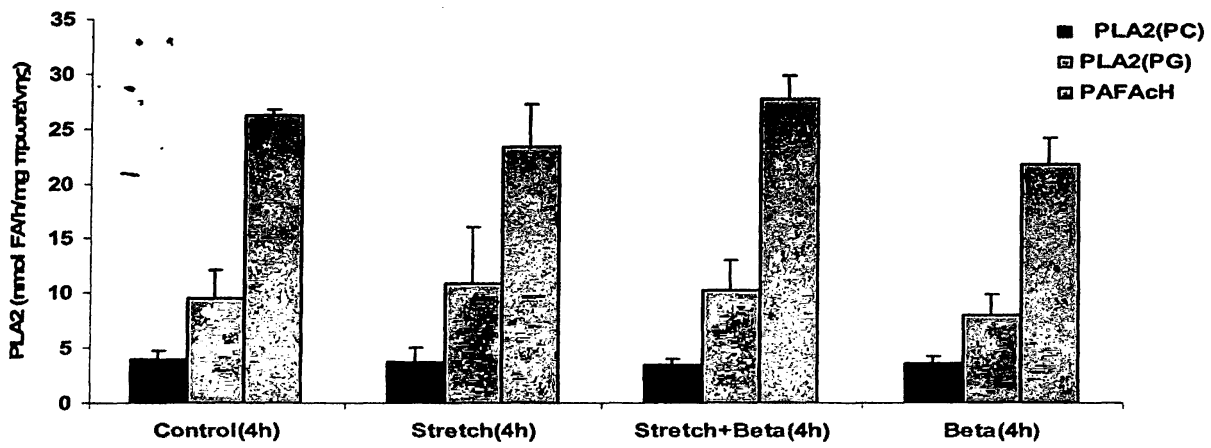
Για την PAF-AcH σημειώνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση κατά 21.36 % ( $p=0.052$ ) ως προς τις συνθήκες control με το παραμετρικό T-test λόγω επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε ακόμη και όταν έγινε ο υπολογισμός των % διαφορών του MO των μετρήσεων ( $p=0.009$ , T-test). Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από υπολογισμούς που έγιναν με το Mann-Whitney test.



**Σχήμα 59.** MO των ενεργοτήτων των PLA<sub>2</sub> όταν μετρούνται με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC, C<sub>12</sub>-NBD-PG και C<sub>6</sub>-NBD-PC στα κύτταρα H441 μετά από επίδραση μηχανικής διάτασης και βητα-μεθαζόνης για 1 ώρα. Οι τιμές αποτελούν το MO±SEM 2 διαφορετικών πειραμάτων με διπλά/τριπλά δείγματα.

Μετά από επίδραση των παραγόντων για 4 ώρες διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με καμία στατιστική δοκιμή για τη PLA<sub>2</sub> που μετρήθηκε με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC, (C<sub>12</sub>-NBD-PG και C<sub>6</sub>-NBD-PC είτε υπολογίζοντας το MO των μετρήσεων είτε υπολογίζοντας τις % διαφορές του MO των μετρήσεων.

## Αποτελέσματα



Σχήμα 60. ΜΟ των ενεργοτήτων των PLA<sub>2</sub> όταν μετρούνται με τα υποστρώματα C<sub>12</sub>-NBD-PC, C<sub>12</sub>-NBD-PG και C<sub>6</sub>-NBD-PC στα κύτταρα H441 μετά από επίδραση παραγόντων για 4 ώρες.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-**



**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η παραγωγή της PC, του κύριου συστατικού του επιφανειοδραστικού παράγοντα, σε συνθήκες μηχανικής διάτασης και παρουσία του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη στην κυτταρική σειρά A549.

Τα **κύρια ευρήματα** της εργασίας είναι:

1. Μετά από στατική διάταση για 1 ώρα (πίεση 36.2 cm H<sub>2</sub>O) παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της PC σε σχέση με το control. Τα επίπεδα των παραγόντων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της PC επανήλθαν στο κανονικό μετά από στατική διάταση διάρκειας 4 ωρών.
2. Η CPT αυξήθηκε μόνο από τη μηχανική διάταση και όχι από τη β-μεθαζόνη.
3. Η LPCAT αυξήθηκε από διάταση ενώ τάση αύξησης παρατηρήθηκε και λόγω της επίδρασης του κορτικοστεροειδούς.
4. Η διάταση των κυττάρων οδήγησε στην αύξηση των ολικών επιπέδων της PLA<sub>2</sub> και της PAF-AcH, ενώ αντίθετα η β-μεθαζόνη οδήγησε στη μείωση των επιπέδων αυτών.
5. Η aiPLA<sub>2</sub> ανιχνεύθηκε στα κύτταρα A549 παρουσιάζοντας παρόμοιες μεταβολές με τη PLA<sub>2</sub> μετά από επίδραση και των δύο ερεθισμάτων.
6. Η στατική μηχανική διάταση και η επώαση με β-μεθαζόνη για 1 ώρα είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού του παλμιτικού οξέος στο κλάσμα της PC και την ταυτόχρονη μείωση του μυριστικού οξέος σε σχέση με το control.
7. Τέλος, τα επίπεδα της PE αυξήθηκαν και από τους δύο τύπους ερεθισμάτων ενώ της Sph μειώθηκαν μόνο από τη β-μεθαζόνη.

Η κυτταρική σειρά A549 χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Πλεονεκτεί έναντι άλλων επιθηλιακών κυτταρικών σειρών ως προς το ότι αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα (χρόνος διπλασιασμού 24 ώρες). Επίσης, περιέχει υψηλά ποσοστά PC και μάλιστα στη δικορεσμένη της μορφή [38,39] που αποτελεί το μείζον φωσφολιπιδικό συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [283].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της β-μεθαζόνης, η οποία χορηγείται σε νεογνά και συμβάλλει στην ωρίμανση του πνεύμονα με επαγωγή της βιοσύνθεσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, καθώς και η επίδραση του μηχανικού stress, το οποίο οδηγεί στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II στον κυψελιδικό χώρο.

## Συζήτηση-Συμπεράσματα

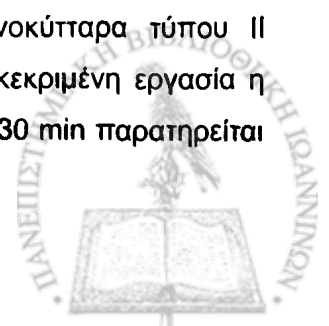
Ο ρόλος του ανοσολογικού μας συστήματος είναι η άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων εξωγενών εισβολέων, όπως βακτηρίων, ιών κλπ. ή ερεθισμάτων όπως είναι η μηχανική καταπόνηση, το φως κλπ. Τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους γίνεται αντιληπτό το εξωτερικό ερέθισμα και στη συνέχεια ενεργοποιούνται μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στην παραγωγή ενδοκυττάρων χημικών σημάτων που προετοιμάζουν το κύτταρο να αντιμετωπίσει τον «εισβολέα» ή το ερέθισμα. Η διαδικασία που συμπεριλαμβάνει όλα τα παραπάνω στάδια περιγράφεται με τον όρο μεταγωγή σήματος. Οι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος αποτελούν στρατηγικές αντιμετώπισης των εξωτερικών ερεθισμάτων (κυτταρική απόκριση). Κάθε εξωτερικό ερέθισμα, είτε είναι χημικό (π.χ. βητα-μεθαζόνη) είτε είναι μηχανικό, προκαλεί την κινητοποίηση πληθώρας βιολογικών αποκρίσεων απόλυτα εξειδικευμένων για το συγκεκριμένο ερέθισμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μεταβολή της συγκέντρωσης ή η εκ νέου δημιουργία ουσιών που θα οδηγήσουν, στην περίπτωση «ανθεκτικού οργανισμού», στην καταστροφή του εισβολέα, ή στην προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες, έτσι ώστε να αυτά να μπορέσουν να επιβιώσουν.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για κάθε εξωτερικό ερέθισμα κινητοποιούνται συγκεκριμένοι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος. Στην εργασία μας μελετάμε τη μηχανική καταπόνηση πνευμονοκυττάρων τύπου II. Η μελέτη του ερεθίσματος αυτού παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι συσχετίζεται με τη μηχανική καταπόνηση των κυττάρων κατά την αναπνοή σε υγιείς οργανισμούς ή με την εφαρμογή μηχανικής αναπνοής σε ασθενείς. Η συγκεκριμένη μεταβολική πορεία οδηγεί στην παραγωγή επιφανειοδραστικού πνευμονικού παράγοντα, που διατηρεί την ακεραιότητα του πνευμονικού παρεγχύματος.

Ειδικότερα, στα κύτταρα A549 η δύναμη που ασκήθηκε ήταν  $35 \text{ g/cm}^2$  ( $3.6 \text{ N/m}^2$ ) και αντιστοιχεί σε πίεση 26.6 mm Hg ή 36.2 cm H<sub>2</sub>O. Η πίεση αυτή σε κλινικό επίπεδο για έναν οργανισμό μπορεί να συσχετιστεί με φυσιολογικές πιέσεις. Η πίεση που εφαρμόστηκε δεν προκάλεσε ρήξη των κυττάρων όπως μπορεί να αποδειχθεί από το γεγονός ότι η LDH δεν παρουσίασε μεταβολές. Αυτό που μπορεί να σχολιαστεί είναι ότι η δύναμη  $35 \text{ g/cm}^2$  στις πειραματικές μας συνθήκες προκάλεσε αύξηση στην επιφάνεια του κυττάρου, γεγονός το οποίο έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες [7,24].

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι μετά από μηχανική διάταση 1 ώρας αυξήθηκε σημαντικά η ποσότητα της PC. Η αύξηση αυτή συμβαδίζει με την αύξηση της ενεργότητας της CPT, του ενζύμου που καταλύει το τελευταίο στάδιο βιοσύνθεσης της PC μέσω της *de novo* πορείας.

Η πρώτη αναφορά για στατικό μηχανικό ερέθισμα σε πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου έγινε μόλις το 1990 από τους Wirtz & Dobbs [7]. Στη συγκεκριμένη εργασία η κινητική του στατικού μηχανικού ερεθίσματος έδειξε ότι μέχρι τα πρώτα 30 min παρατηρείται



## Συζήτηση-Συμπεράσματα

αύξηση στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Μετά τα 30 min ο ρυθμός της έκκρισης μειώνεται και μετά από 100 min δε φαίνεται πλέον το μηχανικό stretch να προκαλεί καμία μεταβολή. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε παράλληλα και η επίδραση αγωνιστών της έκκρισης και βρέθηκε ότι μετά από 1 ώρα επίδρασής τους στα κύτταρα παρατηρείται αύξηση στην έκκριση της PC.

Αύξηση της παραγωγής της PC σε πρωτογενείς καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων τύπου II παρατηρήθηκε με την επίδραση κυκλικού stretch συχνότητας 50 Hz, για 4 ώρες. Η παραγωγή μετρήθηκε από την ενσωμάτωση [<sup>3</sup>H]χλωριούχου χολίνης στο κλάσμα της PC. Η αύξηση αυτή ενισχύθηκε περαιτέρω παρουσία ινοβλαστών [220].

Σε άλλη εργασία δημοσιεύθηκε ότι μετά από 4 ώρες επώαση των ATII διαφόρων θηλαστικών, με το κορτικοστεροειδές δεξαμεθαζόνη παρατηρήθηκε αύξηση στην έκκριση της PC. Όμως, η επίδραση πίεσης για 30 min και 2 ώρες δεν προκάλεσε αύξηση στην έκκριση της PC [284].

Εξ όσων γνωρίζουμε, μόνο μία εργασία έχει δημοσιευτεί όπου αναφέρεται η επίδραση της μηχανικής διάτασης στο μεταβολισμό της PC, σε αστροκύτταρα αρουραίου [285]. Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε ότι η βιοσύνθεση της PC αυξήθηκε 3-4 φορές για εφαρμογή πίεσης επί 1.5-4.5 ώρες. Μετά από 24 ώρες τα επίπεδα της PC επανήλθαν στις συνθήκες αναφοράς (control). Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση των ενεργοτήτων PLA<sub>2</sub>, CTP και PLC μετά από stretch.

Τέλος, στο πλαίσιο μελέτης για τις επιπτώσεις της μηχανικής αναπνοής σε πειραματόζωα, παρατηρήθηκε ότι εμφανίζονται βλάβες στον πνεύμονα, οι οποίες εκφράζονται με μεταβολές στη σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (που λήφθηκε με BAL) και με απελευθέρωση κυτοκινών μετά από 2 έως 4 ώρες εφαρμογής του αναπνευστήρα [286].

Αναλυτικά, περιγράφονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις μετρήσεις αυτής της εργασίας.

## ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ

### Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE)

Η PE, το λιπίδιο που βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό μετά τη PC, απαντά σε ποσοστό 28 % στα κύτταρα A549 [38]. Τα επίπεδα της PE βρέθηκε ότι αυξάνουν μετά την επίδραση μηχανικού stretch (κατά 16.0 %), βητα-μεθαζόνης (27.4 %) και συνδυασμού των δύο παραγόντων (23.9 %,  $p=0.037$ ) για 1 ώρα και μειώνονται μετά από εφαρμογή διάτασης για 4 ώρες (9.3 %). Ενδιαφέρον είναι να τονιστεί ότι το μη χολινούχο λιπίδιο φαίνεται να



## Συζήτηση-Συμπεράσματα

επιηρεάζεται και από τα δύο ερεθίσματα σε αντίθεση με τη PC. Είναι η πρώτη φορά που διαπιστώνονται μεταβολές PE στα κύτταρα A549 μετά από επίδραση μηχανικού και χημικού stress.

### Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)

Στην εργασία μας φάνηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) στα επίπεδα της PC μόνο με μηχανικό stretch, ενώ η βητα-μεθαζόνη δεν προκαλεί κάποια μεταβολή. Τα κύτταρα A549 διαθέτουν υποδοχείς κορτικοστεροειδών. Πιθανώς όμως για κάποιο λόγο να έχει «διακοπεί» η σηματοδότηση που θα μπορούσε να οδηγήσει στην επαγωγή της βιοσύνθεσης φωσφολιπιδίων. Μια άλλη πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι η ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης μπορεί να απαιτεί και διαφορετικό «συμπράγοντα», ο οποίος να παράγεται από άλλα κύτταρα. Έχει παραδείγματος χάριν αναφερθεί ότι στα πνευμονοκύτταρα τύπου II η παραγωγή επιφανειοδραστικού παράγοντα ενισχύεται σημαντικά όταν βρίσκονται σε συγκαλλιέργεια με ινοβλάστες, διότι τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν μια διαλυτή πρωτεΐνη που δρα στα AT-II και επάγει τη βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (για πιθανό μηχανισμό, βλ. Σχήμα 62).

### Ανάλυση λιπαρών οξέων της PC

Στην εργασία μας παρατηρήθηκε ότι τα κύρια λιπαρά οξέα του κλάσματος της PC ήταν το μυριστικό (C14:0), το παλμιτικό (C16:0), το στεατικό (C18:0) και το ελαϊκό οξύ (C18:1). Η επίδραση μηχανικής διάτασης και του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση) κατά 4 φορές περίπου του παλμιτικού οξέος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση και στα επίπεδα της PC. Υπό τις ίδιες συνθήκες διαπιστώθηκε μείωση του μυριστικού οξέος κατά 59.9 % ( $p=0.047$ ). Συγκρίνοντας με τη βιβλιογραφία διαπιστώνεται ότι η μεμβρανική PC των κυττάρων A549 αποτελείται κυρίως από μυριστικό, παλμιτικό και ελαϊκό οξύ [40].

### Επίπεδα Sph

Η Sph μειώνεται μετά από επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 1 και 4 ώρες (25.4 % και 64.6 %) και μετά από εφαρμογή διάτασης για 4 ώρες στα κύτταρα (42.5 %). Από την άλλη, ο συνδυασμός των δύο παραγόντων δε φαίνεται να προκαλεί κάποια μεταβολή στα επίπεδα του λιπιδίου. Από όσο είναι γνωστό, είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκαν τα επίπεδα αυτού του λιπιδίου μετά από επίδραση των δύο τύπων ερεθισμάτων.

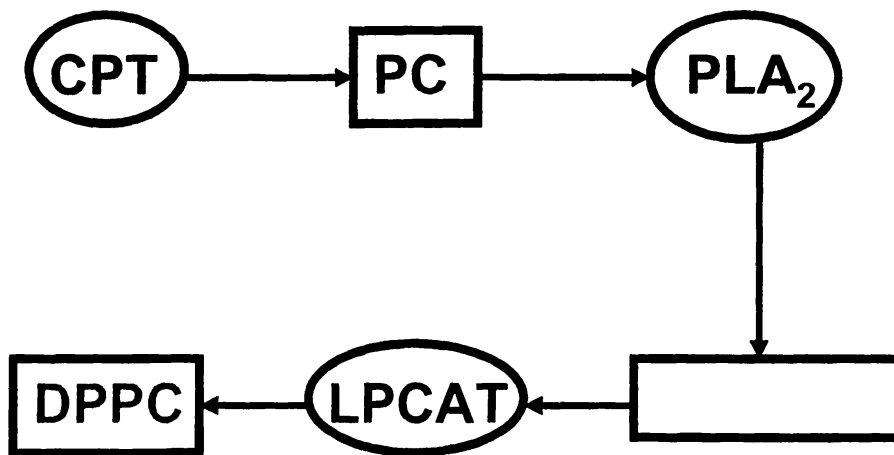


### Μεταβολές του λόγου PC/Sph

Ο λόγος PC/Sph αποτελεί δείκτη ωρίμανσης των πνευμόνων. Στα πειράματά μας παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου PC/Sph στο συνδυασμό των δύο παραγόντων για 1 ώρα (32.8 %) και εξαιτίας της επώασης των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 4 ώρες (64.6 %). Οι υπολογισμοί αυτοί δείχνουν ότι η διάταση για 1 ώρα και η βητα-μεθαζόνη μετά από 4 ώρες επηρεάζουν το πηλίκο λόγω μεταβολής των επιπέδων της PC και Sph, αντίστοιχα.

### Ενζυμικές ενεργότητες που συμμετέχουν στην παραγωγή της PC

Όσον αφορά τη μελέτη των ενζυμικών ενεργοτήτων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της PC διαπιστώθηκε και πάλι ότι η επίδραση της μηχανικής διάτασης, κυρίως για 1 ώρα, και σε σχέση με τη βητα-μεθαζόνη προκάλεσε τις πιο σημαντικές μεταβολές.



Σχήμα 61. Τελευταία στάδια παραγωγής DPPC.

#### A) Ενεργότητα της φωσφοχολινοτρανσφεράσης (CPT)

Στη βιοσύνθεση της PC είναι γνωστό ότι το κύριο ρυθμιστικό ένζυμο αποτελεί η CTP η οποία επίσης έχει αναφερθεί ότι έχει μετρηθεί στα κύτταρα A549 όχι όμως σε πειραματικές συνθήκες παρόμοιες με αυτές της εργασίας μας. Η CTP αποτελεί ρυθμιστικό ένζυμο στην παραγωγή της PC και είναι γνωστό ότι βρίσκεται σε δύο μορφές: την κυτοσολική και τη μεμβρανική. Αντίθετα η CPT, όσο τουλάχιστον μπορεί να είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, δεν εντοπίζεται σε ισομορφές. Επομένως, πρακτικά αποτελούσε έναν καλό ενζυμικό δείκτη της *de novo* παραγωγής της PC [287]. Η CPT μετρήθηκε επειδή καταλύει το τελευταίο στάδιο βιοσύνθεσης της PC.

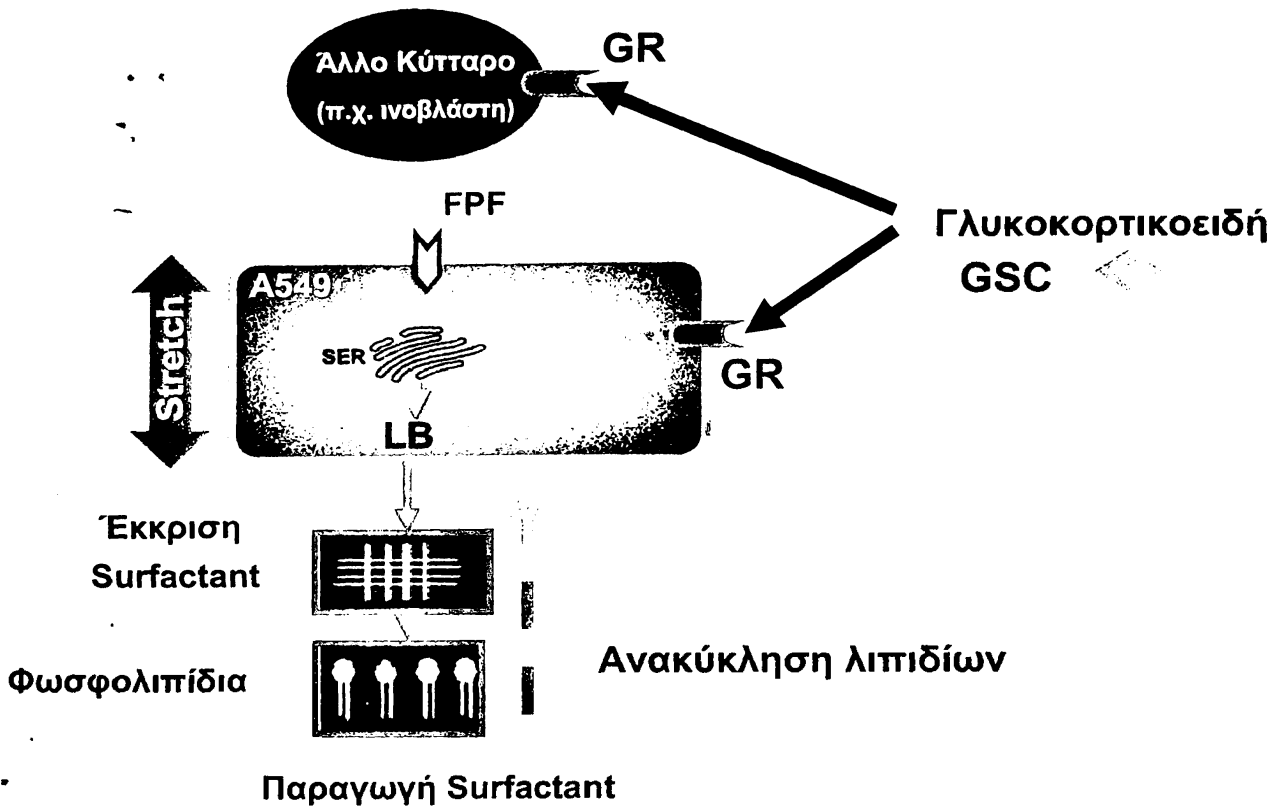
## Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ενεργότητα CPT έχει βρεθεί ότι έχει πειραματική τιμή 80 pmol/min/mg πρωτεΐνης στα κύτταρα A549 [116], παραπλήσια με τα δικά μας ευρήματα ( $46.50 \pm 3.41$  pmol/min/mg πρωτεΐνης).

Στην εργασία μας μελετάται για πρώτη φορά η επίδραση της μηχανικής διάτασης στην ενεργότητα της CPT στα κύτταρα A549. Λόγω stretch για 1 ώρα διαπιστώθηκε αύξηση στα επίπεδα της CPT κατά 47.3 %. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι οι όποιες μεταβολές που παρατηρούνται λόγω διάτασης για 1 ώρα δεν παρατηρούνται λόγω διάτασης για 4 ώρες. Παρόμοια και τα επίπεδα της PC δεν επηρεάστηκαν μετά από επίδραση της μηχανικής διάτασης για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης της CPT στα πειράματά μας συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα προσδιορισμού ολικής PC. Επομένως, η μηχανική διάταση φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή της PC σε αντίθεση με τη βητα-μεθαζόνη η οποία δε φαίνεται να επιδρά στη βιοσύνθεση της PC στις πειραματικές μας συνθήκες.

Σημειώνεται, ότι τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα σχετικά με την επίδραση της βητα-μεθαζόνης στην παραγωγή της PC. Έτσι στην πρώτη εργασία το 1973 είχε δημοσιευτεί ότι η CPT αυξάνει μετά την απευθείας χορήγηση κορτικοστεροειδών σε έμβρυα λαγών [234] ενώ σε άλλες εργασίες δεν αναφέρεται κάποια μεταβολή [235]. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό του κάθε πρωτοκόλλου αλλά και του κάθε οργανισμού. Όπως αναφέρθηκε και στο **Κεφάλαιο 3**, ο μηχανισμός δράσης των κορτικοστεροειδών στην παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι έμμεσος και διαμεσολαβείται από ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες μπορούν να παράγουν τον παράγοντα FPF ο οποίος μπορεί να διεγείρει τη βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα ATII [288].





**Σχήμα 62.** Παραγωγή surfactant μετά από επίδραση stretch και κορτικοστεροειδών σε συγκαλλιέργειες A549 και ινοβλαστών. Όπου GSC=γλυκοκορτικοειδή, GR=υποδοχέας γλυκοκορτικοειδούς.

### B) Ολική ενεργότητα φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Η πορεία ανάπτυξης αρχίζει με την υδρόλυση της PC από PLA<sub>2</sub> και τερματίζει με δράση μιας ακυλοτρανσφεράσης (LPCAT). Αναλυτικά, για το πρώτο στάδιο της πορείας διαπιστώθηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 και 4 ώρες προκάλεσε παρόμοια αύξηση στην ενεργότητα της PLA<sub>2</sub> (29.5 % και 34.2 %, αντίστοιχα με  $p=0.040$ ). Από την άλλη, η βητα-μεθαζόνη μετά από επώαση των κυττάρων για 1 ώρα προκάλεσε μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου ( $27.3 \pm 7.6$  %,  $p=0.003$ ). Δηλαδή, το κορτικοστεροειδές δε φαίνεται να επάγει την παραγωγή της DPPC στις πειραματικές μας συνθήκες αλλά αυτή η μεταβολή που προκαλεί στην ενεργότητα να σχετίζεται με διαφορετικά φαινόμενα από τη βιοσύνθεση της PC.

Από τα προηγούμενα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η αύξηση της ολικής ενεργότητας της PLA<sub>2</sub> μετά τη διάταση μπορεί να ενεργοποιεί γενικότερα μία φλεγμονώδη απόκριση στα κύτταρα A549, ενώ η μείωσή της από τη βητα-μεθαζόνη δείχνει ότι μπορεί να ρυθμίζει αυτή τη φλεγμονώδη απόκριση, γεγονός που συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία [289].

### PAF-AcH

Μία άλλη PLA<sub>2</sub> που μετρήθηκε στις πειραματικές μας συνθήκες ήταν η PAF-AcH η οποία είναι ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου και μετρήθηκε με υπόστρωμα την C<sub>6</sub>-NBD-PC. Οι μεταβολές που σημειώθηκαν στην PAF-AcH ήταν παρόμοιες με τις μεταβολές της PLA<sub>2</sub> που μετρήθηκε με υπόστρωμα την C<sub>12</sub>-NBD-PC. Έτσι βρέθηκε ότι η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας κατά 26.3 % (η αύξηση στη PLA<sub>2</sub> ήταν 29.5 %) και μείωση λόγω επίδρασης της βητα-μεθαζόνης κατά 27.2 % (η μείωση στη PLA<sub>2</sub> ήταν 27.3 %).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η PAF-AcH, ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου, παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από την όξινη ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου, η οποία – όπως αναφέρεται στην εισαγωγή- θεωρείται κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση της DPPC. Έτσι η ενεργότητα της PAF-AcH μετράται σε ουδέτερο pH, είναι μοριακού βάρους 45 kDa και υδρολύει κυρίως γλυκεριναιθερικά λιπίδια μικρού μήκους στην sn-2 θέση και χωρίς –έως τώρα τουλάχιστον- να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της PC. Αντίθετα, η ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου που έχει θεωρηθεί κυρίως ότι εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της PC, παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα σε όξινο pH, είναι μέσου μοριακού βάρους 26 kDa και υδρολύει φωσφολιπίδια με αλυσίδα μεγάλου μήκους στη θέση sn-2. Επομένως, η παρουσία της PAF-AcH και η μελέτη των μεταβολών της, πιθανώς σχετίζεται με μία φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων στις πειραματικές μας συνθήκες.

Από τα προηγούμενα διαπιστώνεται ότι η βητα-μεθαζόνη και η μηχανική διάταση επιδρούν με διαφορετικό μηχανισμό στη PLA<sub>2</sub>. Ενεργότητα PLA<sub>2</sub> σε υπερκείμενα καλλιέργειών, όπως αυτή μετρήθηκε φθορισμομετρικά [279] και ραδιομετρικά [280] δε βρέθηκε σε καμία περίπτωση.

*Ανακεφαλαιώνοντας*, η μηχανική διάταση για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση της PLA<sub>2</sub> (C<sub>12</sub>-NBD-PC), της PAF-AcH (C<sub>6</sub>-NBD-PC) και η βητα-μεθαζόνη μείωση στη PLA<sub>2</sub> (C<sub>12</sub>-NBD-PC) και την PAF-AcH (C<sub>6</sub>-NBD-PC). Οι μεταβολές αυτές μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε ομογενοποίηση κυττάρων A549 στα πλαίσια της βιοσύνθεσης της PC.

### Γ) Ενεργότητα αιPLA<sub>2</sub>

Μέχρι τώρα στα κύτταρα A549 έχει αναφερθεί η παρουσία cPLA<sub>2</sub> και εκκρινόμενης sPLA<sub>2</sub> [211]. Από την άλλη, έχει αναφερθεί ότι η όξινη PLA<sub>2</sub> ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου είναι κυρίως υπεύθυνη για την παραγωγή της PC (αιPLA<sub>2</sub>). Η συγκεκριμένη ισομορφή μελετάται για πρώτη φορά στα κύτταρα A549 και μάλιστα σε συνθήκες μηχανικής διάτασης και παρουσία του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη.



## Συζήτηση-Συμπεράσματα

Αρχικά, ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη ισομορφή με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης με μέσο μοριακό βάρος 26 kDa. Όταν η ενεργότητα μετρήθηκε φθορισμομετρικά σε όξινης συνθήκες, απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και με υπόστρωμα την  $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ , βρέθηκε ότι είναι ίση με 0.50 nmol  $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA/h/mg}$  πρωτεΐνης, ενώ σε ουδέτερο pH και απουσία ιόντων ασβεστίου η ενζυμική ενεργότητα ήταν 1.02 nmol  $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA/h/mg}$  πρωτεΐνης. Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω την ύπαρξη της συγκεκριμένης ισομορφής χρησιμοποιήθηκε αναστολέας, ειδικός ως προς τη συγκεκριμένη ισομορφή, ο MJ33, και η ενζυμική ενεργότητα βρέθηκε μειωμένη κατά 60 %.

Δηλαδή στο κυτταρικό μας σύστημα ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση μία ισομορφή φωσφολιπάσης  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου, η ενεργότητά της μετρήθηκε σε όξινο pH και βρέθηκε ότι αναστέλλεται από την ένωση MJ33 κατά 60 %. Από τις παρατηρήσεις αυτές μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ισομορφή που ικανοποιεί αυτούς τους όρους είναι μία  $\text{aiPLA}_2$  που πιθανώς συμμετέχει στην παραγωγή της PC.

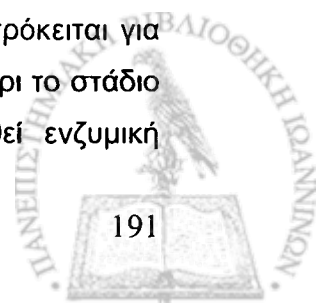
Σε συνθήκες μηχανικής διάτασης για 1 ώρα βρέθηκε αύξηση της συγκεκριμένης ισομορφής κατά  $12.3 \pm 5.9$  % ( $p=0.037$ ) όπως διαπιστώθηκε από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης. Η ενζυμική ενεργότητα αυξήθηκε κατά 4 φορές λόγω διάτασης για 1 ώρα (η απόλυτη τιμή της ενεργότητας τότε ήταν 1.98 nmol  $\text{C}_{12}\text{-NBD-FA/h/mg}$  πρωτεΐνης). Επιπλέον ο αναστολέας MJ33 και στις συνθήκες διάτασης βρέθηκε να προκαλεί μείωση κατά 57.1 % στην ενεργότητα.

Ο συνδυασμός των δύο παραγόντων για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας κατά 2.5 φορές σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς ενώ η επίδραση του αναστολέα σε αυτή την περίπτωση είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ενεργότητας κατά 60 %.

Όπως διαπιστώνεται και από τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης, η βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα προκάλεσε μείωση ( $15.5 \pm 9.5$  %,  $p=0.037$ ) στην  $\text{aiPLA}_2$ . Διαπιστώνεται λοιπόν ότι μία  $\text{aiPLA}_2$  στα κύτταρα A549 παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την ολική ενεργότητα της  $\text{PLA}_2$ , η μηχανική διάταση για 1 ώρα επιδρά στην παραγωγή της DPPC ενώ η βητα-μεθαζόνη πιθανώς εμπλέκεται σε φαινόμενα φλεγμονής στα κύτταρά μας.

### Δ) Ενεργότητα της Lyso-PC:ακυλοτρανσφεράσης (LPCAT)

Η πορεία ανάπτυξης τερματίζεται με τη δράση του ενζύμου ακυλοτρανσφεράση (LPCAT). Από τη στιγμή που σε πειραματικό στάδιο χρησιμοποιήθηκε παλμιτοϋλο-CoA και παλμιτοϋλο-Lyso-PC (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος 11) είναι ευνόητο ότι πρόκειται για την ενεργότητα της παλμιτοϋλο-ακυλοτρανσφεράσης. Από όσο είναι γνωστό μέχρι το στάδιο συγγραφής αυτής της εργασίας στην κυτταρική σειρά A549 έχει αναφερθεί ενζυμική



## Συζήτηση-Συμπεράσματα

ενεργότητα LPCAT 45 pmol PC/min/mg πρωτεΐνης [290] όταν στις πειραματικές μας συνθήκες η μέση τιμή της ενεργότητας ήταν  $52.15 \pm 5.01$  pmol DPPC/min/mg πρωτεΐνης.

Περαιτέρω, από όσο είναι γνωστό μέχρι τώρα, δεν έχει μετρηθεί ενεργότητα LPCAT σε συνθήκες μηχανικής διάταξης σε κανένα κυτταρικό σύστημα.

Στις πειραματικές μας συνθήκες διαπιστώθηκε αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας κατά  $20.0 \pm 10.0$  % ( $p=0.029$ ) λόγω μηχανικής διάταξης για 1 ώρα. Μετά από επώαση των κυττάρων με βητα-μεθαζόνη για 1 ώρα παρατηρήθηκε αύξηση στην ενεργότητα της LPCAT, κατά 32.5 %, και επίσης τάση αύξησης παρατηρήθηκε μετά το συνδυασμό των παραγόντων για 1 ώρα (κατά 16.3 %). Η επίδραση των παραγόντων για 4 ώρες μεμονωμένα ή συνδυαστικά στα κύτταρα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην ενεργότητα της LPCAT σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς. Από τη βιβλιογραφία τονίζεται ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες ATII αρουραίων ανιχνεύθηκε ενεργότητα LPCAT που καταλύει τη μετατροπή της Lyso-PC σε DPPC και ότι η έκφραση της LPCAT αυξάνει μετά από επώαση των κυττάρων με το κορτικοστεροειδές δεξαμεθαζόνη (σε συγκέντρωση  $10^{-7}$  M) [291]. Σχεδόν παράλληλα σε άλλη εργασία δημοσιεύτηκε η κλωνοποίηση μίας LPCAT από πνεύμονα ποντικού η οποία μπορεί να εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα [292].

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η LPCAT αλλά και η τρανσακυλάση που εμπλέκονται στην πορεία ανάπλασης των φωσφολιπιδίων και σε ορισμένες περιπτώσεις στην παραγωγή λιπιδικών ενδιάμεσων σε φαινόμενα φλεγμονής, διαδραματίζουν επιπλέον σημαντικό ρόλο σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος των λιπιδίων [293].

Στο σημείο αυτό επαναλαμβάνεται πως από την ανάλυση των λιπαρών οξέων διαπιστώθηκε ότι μετά από 1 ώρα επίδραση των παραγόντων αυξήθηκαν τα επίπεδα του παλμιτικού οξέος και μειώθηκαν του μυριστικού, γεγονός που πιθανώς συσχετίζεται με τη μεταβολή στην ενεργότητα της LPCAT.



# Σύνοψη αποτελεσμάτων

## 1) Λόγω επίδρασης της μηχανικής τάσης:

Μετά από 1 ώρα επίδραση της μηχανικής τάσης παρατηρήθηκε αύξηση των ενζυμικών ενεργοτήτων CPT, PLA<sub>2</sub>, PAF-AcH, aiPLA<sub>2</sub> (επιπλέον αύξηση διαπιστώνεται και από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης), LPCAT και των λιπιδίων PC (με τάση αύξησης του παλμιτικού οξέος της) και PE.

Για 4 ώρες επίδραση της μηχανικής τάσης δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις περισσότερες υπό μελέτη παραμέτρους. Για τη PLA<sub>2</sub> βρέθηκε επίσης αύξηση των επιπέδων λόγω μηχανικής διάτασης όπως και όταν υπήρχε αύξηση μετά από εφαρμογή της μηχανικής διάτασης για 1 ώρα. Η αύξηση (ή γενικότερα ή όποια άλλη μεταβολή) δεν παρατηρήθηκε σε άλλες φωσφολιπάσες όπως την PAF-AcH ή ακόμη την aiPLA<sub>2</sub>. Ενδεχομένως μετά από 4 ώρες το μηχανικό stretch δε φαίνεται να ασκεί κάποια επίδραση ή πλέον τα κύτταρα έχουν ήδη «κορεστεί» στη δύναμη που τους ασκήθηκε και δεν ανταποκρίνονται στο ερέθισμα.

## 2) Λόγω του χημικού ερεθίσματος βητα-μεθαζόνη:

Η επώαση των κυττάρων για 1 ώρα με βητα-μεθαζόνη στις πειραματικές μας συνθήκες είχε τα εξής αποτελέσματα: αύξηση στην PE και μάλιστα κατά τον ίδιο τρόπο όπως μετά από την επίδραση μηχανικής διάτασης, μείωση της Sph ενώ καμία μεταβολή δε σημειώθηκε στα επίπεδα της PC.

Στατιστικά σημαντική διαφορά (μείωση) βρέθηκε στις πειραματικές μας συνθήκες σε όλες τις φωσφολιπάσες. Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν αναμενόμενη και σύμφωνη με τη βιβλιογραφία [254]. Η μεγαλύτερη μείωση που παρατηρήθηκε ήταν στην περίπτωση της PLA<sub>2</sub> (C<sub>12</sub>-NBD-PC) και ακολούθως παρατηρήθηκε στην PAF-AcH (C<sub>6</sub>-NBD-PC). Επιπλέον, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στην aiPLA<sub>2</sub> όπως διαπιστώνεται από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

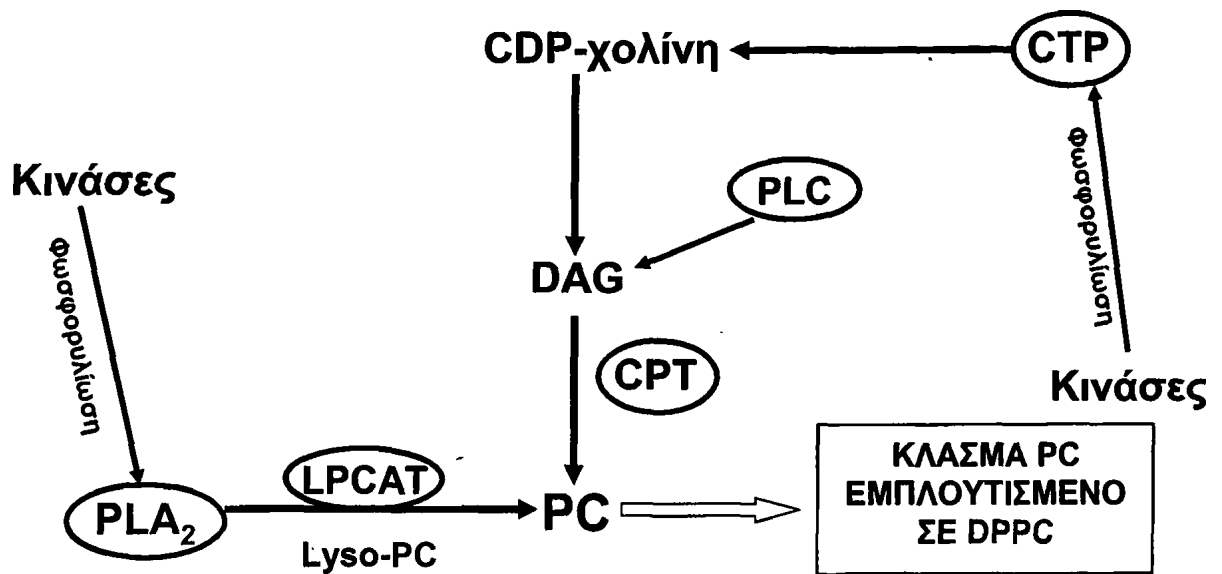
## 3) Συνδυασμός μηχανικού και χημικού ερεθίσματος:

Ο συνδυασμός του χημικού και του μηχανικού ερεθίσματος για 1 ώρα στα κύτταρα A549 προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα της PE, του λόγου PC/Sph και της PC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (μείωση) στο μυριστικό οξύ (C14:0) και αύξηση στο παλμιτικό οξύ (C16:0) του κλάσματος της PC. Ο συνδυασμός των παραγόντων για 1 ώρα δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στις υπό μελέτη ενζυμικές μας ενεργότητες.



## Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης μηχανικού ερεθίσματος

Προκειμένου να προτείνουμε έναν πιθανό μηχανισμό δράσης του μηχανικού ερεθίσματος στην παραγωγή της PC, στηριζόμενοι και σε βιβλιογραφικά δεδομένα, θα περιγράψουμε το ακόλουθο σχήμα:



**Σχήμα 63.** Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης στατικού μηχανικού ερεθίσματος στα κύτταρα A549 στην παραγωγή της PC, κύριου συστατικού του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας μας διαπιστώθηκε ότι το μηχανικό ερέθισμα αποτέλεσε «σήμα» για την παραγωγή της PC, προκαλώντας αύξηση σε κύριες ενζυμικές ενεργότητες που εμπλέκονται στην παραγωγή της PC και στην ανάπτυξή της σε μοριακά είδη εμπλουτισμένα σε DRPC. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ο σημαντικός ρόλος κινασών που ρυθμίζουν τη λειτουργία ισομορφών της CTP, του κύριου ρυθμιστικού ενζύμου της βιοσύνθεσης της PC [214,294]. Από την άλλη, ο έλεγχος της φωσφορυλίωσης της PLA<sub>2</sub> από κινάσες επίσης μπορεί να ρυθμίσει περαιτέρω την παραγωγή της PC σε συνθήκες διάτασης [200].

Στις πειραματικές μας συνθήκες λοιπόν φαίνεται ότι η βητα-μεθαζόνη επιδρά επιλεκτικά μόνο στην αναστολή της PLA<sub>2</sub>.

## Σχολιασμός αποτελεσμάτων στα κύτταρα H441

Τα κύτταρα H441 αποτελούν ένα άλλο μοντέλο μελέτης πνευμονοκυττάρων τύπου II που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές ανάγκες αυτής της εργασίας. Από το πλήθος των πειραμάτων που έλαβαν χώρα και περιγράφονται στην παρούσα διατριβή δεν είναι εφικτό να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Περαιτέρω μετρήσεις, που θα συμπληρώσουν το μικρό αριθμό πειραμάτων που περιγράφεται, ενδεχομένως να βοηθήσουν στη διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τα κύτταρα H441 αλλά και για να γίνουν συγκρίσεις με τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις στα κύτταρα A549.

**Από τη διδακτορική διατριβή έχουν προκύψει οι εξής ανακοινώσεις  
σε συνέδρια:**

1. **Pantazi D.**, Kitsioulis E., Nakos G., Lekka M.E. **Mechanical stretching induces Lyso-phosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) activity that mediates dipalmitoyl phosphatidylcholine formation in alveolar type II cells.** *Poster presentation.* Proceedings of the 59<sup>th</sup> meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, December 7-9, 2007, Athens, Greece.
2. **Pantazi D.**, Nakos G., Lekka M.E. **Mechanical stretching and beta-methasone induce phosphatidylcholine production in alveolar type II cells with the involvement of an acidic Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>.** *Poster presentation.* Proceedings of the 58<sup>th</sup> meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 53, p. 162-163, November 9-11, 2006, Patras, Greece.
3. **Pantazi D.**, Nakos G., Lekka M.E. **Effect of mechanical stretch and beta-methasone in phosphatidylcholine production in A549 cells: study of the last step of de novo pathway.** *Poster presentation.* FEBS Special Meeting European Lipidomics Initiative; New concepts in Lipidology: from lipidomics to disease. October 21-25, 2006, Noordwijkerhooft, Netherlands. **Η εργασία έλαβε υποτροφία.**
4. Lekka M.E., **Pantazi D.**, Tellis C., Matalon S., Nakos G. **Phospholipid metabolism in A549 cells under mechanical stretch in the presence of beta-methasone.** *Poster presentation.* Proceedings of the American Thoracic Society (ATS), Vol. 3, p. 435, May 19-24, 2006, San Diego, California, USA.
5. **Πανταζή Δ.**, Τέλλης Κ., Λέτσιου Ε., Νάκος Γ., Λέκκα, Μ.Ε. **Βιοσύνθεση φωσφατιδυλοχολίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα σε συνθήκες μηχανικής διάτασης παρουσία του κορτικοστεροειδούς βητα-μεθαζόνη.** *Προφορική παρουσίαση* στο 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, σελ. 78, 21-25 Σεπτεμβρίου, 2005, Ιωάννινα.
6. **Πανταζή Δ.**, Τέλλης Κ., Λέτσιου Ε., Νάκος Γ., Λέκκα Μ.Ε. **Βιοσύνθεση φωσφατιδυλοχολίνης σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα σε συνθήκες μηχανικής διάτασης: μελέτη της ενεργότητας της χολινοφωσφοτρανσφεράσης παρουσία και απουσία βητα-μεθαζόνης.** *Παρουσίαση poster* στο 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των Λιπών και των Ελαίων. 8 -9 Ιουνίου, 2005, Αθήνα.
7. **Pantazi D.**, Tellis C., Letsiou E., Nakos G., Lekka ME. **Phosphatidylcholine production in lung epithelial cells under mechanical stretch: cholinephosphotransferase activity**



## Βιβλιογραφία

**and the effect of beta-methasone. Poster presentation. 9<sup>th</sup> State of the Art Interdisciplinary Review Course, p. 82, April 22-24, 2005, Athens. Η εργασία τιμήθηκε με το 2<sup>ο</sup> βραβείο.**



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. West J.B. **Respiratory Physiology. The essentials.** 5<sup>th</sup> ed., Μετάφραση Μπεχράκης Π.Κ., Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, 1996.
2. Σπυρόπουλος Κ.Β. **Πνευμονολογία (Παθοφυσιολογία των αναπνευστικών νόσων)**, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1996, σελ. 172.
3. Μπατιστάτου Α., Καναβάρος Π. **Πνευμονικές βλάβες που σχετίζονται/ προκαλούνται από αναπνευστήρα (VALI/VILI). Ιστολογική εικόνα-παθογενετικοί μηχανισμοί. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας**, 2004, σελ. 55-62.
4. Λέκκα Μ.Ε., Καρκαμπούνας Α., Κητσιούλη Ε. **Επιφανειακή τάση και επιφανειοδραστικές ουσίες. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας**, 2002, Τόμος 6:1-10.
5. Λέκκα Μ.Ε., Μασσαλάς Χ.Β. **Μεταγωγή μηχανικού σήματος. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας**, 2004, Τόμος 6:29-47.
6. Mingyao L.A., Tanswell K., Post M. **Mechanical force-induced signal transduction in lung cells.** *Am. J. Physiol.*, 1999; 277:L667-L683.
7. Wirtz H.R.W., Dobbs L.G. **Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells.** *Science*, 1990; 250:1266-1269.
8. Basdra E., Huber L.A., Komposch G., Papavassiliou A.G. **Mechanical loading triggers specific biochemical responses in mandibular condylar chondrocytes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1222:315-322.
9. Gilbert J.A., Weinhold P.S., Banes A.J., Link G.W., Jones G.L. **Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro.** *J. Biomech.*, 1994; 27:1169-1177.
10. Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblin M.J., Vacek P., Low R.B. **Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.
11. Tschumperlin D.J., Margulies S.S. **Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelia cells in vitro.** *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)*, 1998; 275:L1173-L1183.
12. Winston F.K., Macarak E.J., Gorfien S.F., Thibault L.E. **A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell.** *J. Appl. Physiol.*, 1989; 67:397-405.

## Βιβλιογραφία

13. Lee A.A., Delhaas T., Waldman L.K., MacKenna D.A., Villarreal F.J., McCulloch A.D. **An equibiaxial strain system for cultured cells.** *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 40)*, 1996; 271:C1400-1408.
14. Boitano S., Sanderson M.J., Dirksen E.R. **A role for Ca<sup>2+</sup>-conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells.** *J. Cell Sci.*, 1994; 107:3037-3044.
15. Liu M., Montazeri S., Jedlovsky T., Van Wert R., Zhang J., Li R.-K., Yan J. **Bio-Stretch, a computerized cell-strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 1999; 35:87-93.
16. Tran-Son-Tay R. **Techniques for studying the effects of physical forces on mammalian cells and measuring cell mechanical properties.** *In:Physical Forces and the Mammalian Cell*, ed. by J.A. Frangos. San Diego, C.A:Academic, 1993; p.1-60.
17. Hubmayr R.D., Shore S.A., Fredberg J.J., Planus E., Panettieri R.A., Moller W.Jr., Heyder J., Wang N. **Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells.** *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 40)*, 1996; 271:C1660-C1668.
18. Huang H., Kamm R.D., Lee R.T. **Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes and physiology.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004; 287:C1-C11.
19. Naruse K., Miyauchi A., Itoman M., Mikuni-Takagaki Y. **Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound.** *J. Bone Miner Res.*, 2003; 18:360-369.
20. Gutierrez J.A., Gonzalez R.F., Dobbs L.G. **Mechanical distension modulates pulmonary alveolar epithelial phenotypic expression in vitro.** *Am. J. Physiol.*, 1998; 274:L196-L202.
21. Bishop J.E., Mitchell J.J., Absher P.M., Baldor L., Geller H.A., Woodcock-Mitchell J., Hamblinn M.J., Vacek P., Low R.B. **Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 9:126-133.
22. Xu J., Liu M., Tanswell A.K., Post M. **Mesenchymal determination of mechanical strain-induced fetal lung cell proliferation.** *Am. J. Physiol., (Lung Cell. Mol. Physiol.19)*, 1998; 275:L540-L550.
23. Edwards Y.S. **Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung.** *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2001; 129:245-260.



24. Pugin J., Dunn I., Jolliet P., Tassaux D., Magnenat J-L., Nicod L.P., Chevrolet J.-C. **Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro.** *Am. J. Physiol.*, 1998; 275:L1040-L1050.
25. Demoule A., Decailliot, Jonson B., Christov C., Maitre B., Touqui L., Brochard L., Delclaux C. **Relationship between pressure-volume curve and markers for collagen turn-over in early acute respiratory distress syndrome.** *Intensive Care Med.*, 2006; 32:413-420.
26. Liu M., Xu J., Tanswell K., Post M. **Inhibition of mechanical strain-induced fetal rat lung cell proliferation by gadolinium, a stretch-activated channel blocker.** *J. Cell Biol.*, 1994; 161:501-507.
27. Berman A.E., Kozlova N.I. **Integrins:structure and functions.** *Member. Cell Biol.*, 2000; 13:207-244.
28. Scott J.E., Yang S.Y., Stanik E., Anderson J.E. **Influence of strain on [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, surfactant-related phospholipids synthesis and cAMP levels in fetal type II alveolar cells.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993; 8:258-265.
29. Liu M., Xu J., Liu J., Kraw M.E., Tanswell A.K., Post M. **Mechanical strain-enhanced fetal lung cell proliferation is mediated by phospholipases C and D and protein kinase C.** *Am. J. Physiol.*, 1995; 268:L729-L738.
30. Correa-Meyer E., Pesce L., Guerrero C., Sznajder J.I. **Cyclic stretch activates ERK1/2 via G proteins and EGFR in alveolar epithelial cells.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2002; 282:L883-L891.
31. Letsiou E., Ziros P., Papavassiliou A., Nakos G., Lekka M.E. **Phospholipase A<sub>2</sub> and ERK1/2 activation in A549 cells after mechanical stretching.** *Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter*, 2005; Vol. 52:130.
32. Chaqour B., Howard P.S., Charlotte F.R., Macarak E.J. **Mechanical stretch induces platelet activating factor receptor gene expression through the NF-κB transcription factor.** *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1999; 31:1345-1355.
33. Vlahakis N.E., Hubmayr R.D. **Response of alveolar cells to mechanical stress.** *Current Opin. Critical Care*, 2003; 9:2-8.
34. Chander A., Dodia C.R., Gil J., Fisher A.B. **Isolation of lamellar bodies from rat granular pneumonocytes in primary culture.** *Biochim Biophys. Acta*, 1983; 753:119-129.
35. Walker S.R., Williams M.C., Benson B. **Immunocytochemical localization of the major surfactant apoprotein in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung.** *J. Histochem. Cytochem.*, 1986; 34:1137-1148.



## Βιβλιογραφία

36. Balis J.U., Conen P.E. **The role of alveolar inclusion bodies in the developing lung.** *Lab Invest.*, 1964; 13:1215-1229.
37. Schläme M., Rustow B., Kunze D., Rabe H., Reichmann G. **Phosphatidylglycerol of rat lung.** *Biochem J.*, 1986; 240:247-252.
38. Smith B.T. **Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function.** *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1977; 115:285-293.
39. Lieber M., Smith B., Szakai A., Nelson-Rees W., Todaro G. **A continuous tumor -cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int. J. Cancer*, 1976; 17:62-70.
40. Mukhopadhyay S., Muimo R., Campbell F.M., Gordon M.J., Monaghan A.S., Dutta-Roy A.K. **Preferential distribution of lung chain polyunsaturated fatty acids in phosphatidyl ethanolamine fraction of guinea pig alveolar apical membranes.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2000; 62:341-348.
41. Malhotra R., Haurum J., Thiel S., Jensenius J.-C., Sim R.B. **Pollen Grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A.** *Bioscience Reports*, 1993; 13:79-90.
42. Ramin S.M., Vidaeff A.C., Gilstrap L.C., Bishop K.D., Jenkins G.N., Alcorn J.L. **The effects of dexamethasone and beta-methasone on surfactant protein-B messenger RNA expression in human type II pneumocytes and human lung adenocarcinoma cells.** *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004; 190:952-959.
43. Vivekananda J., Smith D., King R.J. **Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and CTP:phosphocholine cytidyltransferase.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2001; 281:L98-L107.
44. Viscardi R.M., Strauss K., Hasday J.D. **Oleic acid stimulates rapid translocation of cholinephosphate cytidyltransferase in type II cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1349:157-170.
45. Mallampalli R.K., Ryan A.J., Carroll J.L., Osborne T.F., Thomas C.P. **Lipid deprivation increases surfactant phosphatidylcholine synthesis via a sterol-sensitive regulatory element within the CTP:phosphocholine cytidyltransferase promoter.** *Biochem J.*, 2002; 362:81-88.
46. Creuwels L.A.J.M., van Golde L.M.G., Haagman H.P. **The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects.** *Lung*, 1997; 175:1-39.
47. Wirtz H., Schmidt M. **Ventilation and secretion of pulmonary surfactant.** *Clin. Investig.*, 1992; 70:3-13.



48. Mason R.J., Nellenbogen J., Clements J.A. **Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide.** *J. Lipid Res.*, 1976; 17:281-284.
49. Adachi H., Hayashi H., Sato H., Tempo K., Akino T. **Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica.** *Biochem. J.*, 1989; 262:781-786.
50. Mason R.J., Williams M.C. **Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1980; 617:36-50.
51. Kikkawa Y. **Biochemistry and structure of pulmonary surfactant.** *J. Jap. Med. Soc. Biol. Interface*, 9:1-13.
52. Thurmond R.L., Dodd S.W., Brown M.F. **Molecular areas of phospholipids as determined by 2H NMR spectroscopy. Comparison of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines.** *Biophys. J.*, 1991; 59:108-113.
53. Akino T. **Lipid components of the surfactant system.** In: Robertson B., van Golde L.M.G., Batenburg J.J. eds. *Pulmonary Surfactant: Molecular Biology to Clinical Practise.* Amsterdam: Elsevier, 1992; p.19-31.
54. Hallman M., Gluck L. **Formation of acidic phospholipids in rabbit lung during perinatal development.** *Pediatr. Res.*, 1980; 14:1250-1259.
55. Gross N.J., Bublys V., D'Anja J., Brown C.L. **The role of alpha 1-antitrypsin in the control of extracellular surfactant metabolism.** *Am. J. Physiol.*, 1995; 268:L438-L445.
56. Korfhagen T.R., Glasser S.W., Bruno M.D., McMahon M.J., Whitsett J.A. **A portion of the human surfactant protein A (SP-A) gene locus consists of a pseudogene.** *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1991; 4:463-469.
57. Ballard P.L., Liley H.G., Gonzales L.W., Odom M.W., Ammann A.J., Benson B., White R.T., Williams M.C. **Interferon-gamma and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1990; 2:137-143.
58. Suzuki Y., Fujita Y., Kogishi K. **Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant.** *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1989; 140:75-81.
59. Hawgood S., Shiffer K. **Structures and properties of the surfactant-associated proteins.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1991; 53:375-394.
60. Yu S.H., Possmayer F. **Effect of pulmonary surfactant protein A and neutral lipid on secretion and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine in surface films.** *J. Lipid Res.*, 1996; 37:1278-1288.

## Βιβλιογραφία

61. Mathialagan N., Possmayer F. **Low-molecular-weight hydrophobic proteins from bovine pulmonary surfactant.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990; 1045:121-127.
62. Kuroki Y., Mason R.J., Voelker D.R. **Alveolar type II cells express a high affinity receptor for pulmonary surfactant protein A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85:5566-5570.
63. Wright J.R., Wager R.E., Hawgood S., Dobbs L., Clements J.A. **Surfactant apoprotein Mr-26000-36000 enhances uptake of liposomes by type II cells.** *J. Biol. Chem.*, 1987; 262:2888-2894.
64. Williams M.C., Hawgood S., Hamilton R.L. **Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B and SP-C.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991; 5:41-50.
65. Tenner A.J., Robinson S.L., Borchelt J., Wright J.R. **Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis.** *J. Biol. Chem.*, 1989; 264:13923-13928.
66. Cochrane C.G., Revak S.D. **Pulmonary surfactant protein B: structure-function relationships.** *Science*, 1991; 254:566-568.
67. Longo M.L., Bisagno A.M., Zasadzinski J.A.N., Bruni R., Waring A.J. **A function of lung surfactant protein SP-B.** *Science*, 1993; 261:453-456.
68. Tokieda K., Whitsett J.A., Clark J.C., Weaver T.E., Ikeda K., McConnell K.B., Jobe A.H., Ikegami M., Iwamoto H.S. **Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice.** *Am. J. Physiol.*, 1997; 273:L875-L882.
69. Johanson J. **Structure and properties of surfactant protein C.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1408:161-172.
70. Kuan S.F., Rust K., Crouch E. **Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an Escherichia coli-binding protein in bronchoalveolar lavage.** *J. Clin. Invest.*, 1992; 90:97-106.
71. Ogasawara Y., Kuroki Y., Akino T. **Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol.** *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:21244-21249.
72. Crouch E.C., Rust K., Mariencheck W.I., Parghi D., Chang D., Person A. **Developmental expression of pulmonary surfactant protein D (SP-D).** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1991; 5:13-18.
73. Bachofen H., Wilson T.A. **Micromechanics of the acinus and alveolar walls.** In *The Lung*. Scientific Foundations. Edited by Crystal R.G., West J.B., Barnes P.J., et al. Philadelphia -New York; Lippincott -Raven Publishers, 1997; 1159-1167.



74. Stephens R.H., Benjamin A.R., Walters D.V. **Volume and protein concentration of epithelial lining liquid in perfused in situ postnatal sheep lungs.** *J. Appl. Physiol.*, 1996; 80:1911-1920.
75. Singh G., Katyal S.L., Brown W.E., Collins D.L., Mason R.J. **Pulmonary lysozyme: a secretory protein of type II pneumocytes in the rat.** *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988; 138:1261-1267.
76. Wissel H., Zastrow S., Richter E., Stevens P.A. **Internalized SP-A and lipid are differentially resecreted by type II pneumocytes.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000; 278:L580-590.
77. Ashino Y., Ying X., Dobbs L.G., Bhattacharya J. **[Ca<sup>2+</sup>] oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000; 279:L5-13.
78. Rooney S.A., Young S.L., Mendelson C.R. **Molecular and cellular processing of lung surfactant.** *FASEB J.*, 1994; 8:957-967.
79. Rooney S.A. **Regulation of surfactant secretion.** *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2001; 129:233-243.
80. Rooney S.A. **Regulation of surfactant secretion.** *In Lung surfactant: cellular and molecular processing.* Edited by Rooney S.A. Austin Texas; R.G. Landes Company, 1998;139-163.
81. Strayer D.S., Pinder R., Chander A. **Receptor-mediated regulation of pulmonary surfactant secretion.** *Exp. Cell Res.*, 1996; 226:90-97.
82. Fisher A.B., Dodia C., Chander A. **Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> by surfactant protein A.** *Am. J. Physiol.*, 1994; 267:L335-L341.
83. Tsuzuki A., Kuroki Y., Akino T. **Pulmonary surfactant protein A -mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 265:L193-L199.
84. Baritussio A., Alberti A., Armanini D., Meloni F., Bruttomesso D. **Different pathways of degradation of SP-A and saturated phosphatidylcholine by alveolar macrophages.** *Am. J. Physiol.*, 2000; 279:L91-L99.
85. Chander A., Reicherter J., Fisher A.B. **Degradation of dipalmitoyl phosphatidylcholine by isolated rat granular pneumocytes and reutilization for surfactant synthesis.** *J. Clin. Invest.*, 1987; 79:1133-1138.
86. Fisher A.B., Dodia C. **Role of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes.** *J. Lipid Res.*, 1996; 37:1057-1064.

## Βιβλιογραφία

87. Fisher A.B., Dodia C., Chander A. **Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> by surfactant protein A.** *Am. J. Physiol.*, 1994; 267:L335-L341.
88. Fehrenbach H. **Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited.** *Respir. Res.*, 2001; 2:33-46.
89. Pattle R.E., Thomas L.C. **Lipoprotein composition of the film lining the lung.** *Nature, Lond*, 1961; 189:844.
90. Gluck L., Kulovich M.V., Borer R.C., Brenner P.H., Anderson G.G., Spellacy W.N. **Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis.** *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1971; 109:440-445.
91. Mason R.J. **Importance of the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine in alveolar type II cells.** *J. Biol. Chem.*, 1978; 253:3367-3370.
92. Rooney S.A. **Biosynthesis of lung surfactant during fetal and early postnatal development.** *Trends Biochem. Sci.*, 1979; 4:189-191.
93. Zeisel S.H., Blusztajn J.K. **Choline and human nutrition.** *Annu. Rev. Nutr.*, 1994; 14:269-296.
94. Van Heusden G.P.H., van den Bosch H. **Utilization of disaturated and unsaturated phosphatidylcholine and diacylglycerols by cholinephosphotransferase in rat lung microsomes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1982; 711:361-368.
95. Post M., Schurmans E.A., Batenburg J.J., Van Golde L.M. **Mechanisms involved in the synthesis of disaturated phosphatidylcholine by alveolar type II cells isolated from adult rat lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1983; 750:68-77.
96. Fisher A.B., Dodia C. **Role of acidic Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> in synthesis of lung dipalmitoyl phosphatidylcholine.** *Am. J. Physiol.*, 1997; 272:L238-L243.
97. Kim T.S., Sundaresh C.S., Feinstein S.I., Dodia C., Skach W.R., Jain M.K., Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Nomura N., Fisher A.B. **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.
98. Schaffer J.E., Lodish H.F. **Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein.** *Cell*, 1994; 79:427-436.
99. Torday J., Hua J., Slavin R. **Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1995; 1254:198-206.
100. Sheehan P.M., Yeh Y.Y. **Pulmonary surfactant lipid synthesis from ketone bodies, lactate, and glucose in newborn rats.** *Lipids*, 1985; 20:835-841.



101. Patterson C.E., Davis K.S., Rhoades R.A. **Regulation of fetal lung disaturated phosphatidylcholine synthesis by de novo palmitate supply.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 958:60-69.
102. Jobe A., Ikegami M., Sarton-Miller I. **The in vivo labeling with acetate and palmitate of lung phospholipids from developing and adult rabbits.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1980; 617:65-75.
103. Maniscalco W.M., Finkelstein J.N., Parkhurst A.B. **De novo fatty acid synthesis in developing rat lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1982; 711:49-58.
104. Haq R.U., Tsao F., Shrago E. **Activity of long chain acyl-CoA synthetase in isolated alveolar type II cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1987; 918:36-39.
105. Van Golde L.M.G., Den Breejen J.N., Batenburg J.J. **Isolated alveolar type II cells: a model for studies on the formation of surfactant dipalmitoylphosphatidylcholine.** *Biochem. Soc. Trans.*, 1985; 13:1087-1089.
106. Den Breejen J.N., Batenburg J.J., Van Golde L.M.G. **The species of acyl-CoA in subcellular fractions of type II cells isolated from adult rat lung and their incorporation into phosphatidic acid.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 1002:277-282.
107. Kennedy E.P. **In Lipids and Biomembranes. Past Present and Future.** ed. Op de Kamp J.A.F., Roelofsen B., Wirtz K.W.A. *Elsevier Amsterdam*, 1986; pp. 171-206.
108. James P.F., Lake A.C., Hajra A.K., Larkins L.K., Buchanan F.G., Zoeller R.A. **An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase activity.** *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:23540-23546.
109. Mason R.J. **Importance of the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine in alveolar type II cells.** *J. Biol. Chem.*, 1978; 253:3367-3370.
110. Walton P.A., Possmayer F. **The role of Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphohydrolase in pulmonary glycerolipid biosynthesis.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 796:364-372.
111. Batenburg J.J. **Surfactant phospholipids:synthesis and storage.** *Am. J. Physiol.*, 1992; 262:L367-L385.
112. Haagsman H.P., Schuurmans E.A.J.M., Batenburg J.J., Van Golde L.M.G. **Synthesis of phosphatidylcholines in ozone-exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung: is glycerolphosphate acyltransferase a rate-limiting enzyme?** *Exp. Lung Res.*, 1988; 14:1-17.

## Βιβλιογραφία

113. Pelech S.L., Vance D.E. **Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 779:217-251.
114. Smith B.T., Torday J.S. **Factors affecting lecithin synthesis by cultured fetal lung cells.** *Pediatr. Res.*, 1974; 8:848-851.
115. Kikkawa Y., Yoneida K., Smith F., Packard B., Suzuki K. **The type II epithelial cells of the lung. II Chemical composition and phospholipids synthesis.** *Lab Invest.*, 1975; 32:295-302.
116. Miquel K., Pradines A., Terce F., Selmi S., Favre G. **Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells.** *J. Biol. Chem.*, 1998; 273:26179-26186.
117. Zimmermann L.J., Hogan M., Carlson K.S., Smith B.T., Post M. **Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP:phosphocholine cytidyltransferase.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 264:L575-L580.
118. Batenburg J.J. **In Lung Development: Biological and Clinical Perspectives**, Vol. 1, ed. P.M. Farrell, *Academic Press, New York*, 1982; pp. 359-390.
119. Garcia A., Newkirk J.D., Mavis R. **Lung surfactant synthesis: a Ca<sup>++</sup>-dependent microsomal phospholipase A<sub>2</sub> in the lung.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975; 64:128-135.
120. Heath M.F., Jacobson W. **The nature of the phospholipases A<sub>2</sub> of lung lamellar bodies.** *Pediatr. Res.*, 1980; 14:846-847.
121. Chander A., Fisher A.B., Strauss J.F. **Role of an acidic compartment in synthesis of disaturated phosphatidylcholine by rat granular pneumocytes.** *Biochem. J.*, 1982; 208:651-658.
122. Rustow B., Schlame M., Haupt R., Wilhelm D., Kunze D. **Studies on the formation of dipalmitoyl species of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in pulmonary type II cells.** *Biochem. J.*, 1992; 282:453-458.
123. Crecelius C.A., Longmore W.J. **Acytransferase activities in adult rat type II pneumocyte-derived subcellular fractions.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 795:238-246.
124. Hoehn S.K., Lesperance E., Klass D.J. **Enzymes of phospholipid biosynthesis in rat alveolar type II cells.** *Lung*, 1983; 161:229-234.
125. Batenburg J.J., Haagsman H.P. **The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins.** *Prog. Lipid Res.*, 1998; 37(4):235-276.



126. Rustow B., Kunze D. **The availability of endogenous and exogenous disaturated diacylglycerol for the diacylglycerol-consuming reactions in lung microsomes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 796:359-363.
127. Funkhouser J.D., Batenburg J.J., Van Golde L.M.G. **Acylation of 1-palmitoyl-lysophosphatidylglycerol in alveolar type II cells from rat lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1981; 666:1-6.
128. Hallman M., Gluck L. **Formation of acidic phospholipids in rabbit lung during perinatal development.** *Pediatr. Res.*, 1980; 14:1250-1259.
129. Bleasdale J.E., Tyler N.E., Snyder J.M. **Subcellular sites of synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in type II pneumonocytes.** *Lung*, 1985; 163:345-359.
130. Davidson K.G., Acton S.M., Barr H.A., Nicholas T.E. **Effect of lowering serum cholesterol on the composition of surfactant in adult rat lung.** *Am. J. Physiol.*, 1997; 272:L106-L114.
131. Voyno-Yasenetskaya T.A., Dobbs L.G., Erickson S.K., Hamilton R.L. **Low density lipoprotein- and high density lipoprotein-mediated signal transduction and exocytosis in alveolar type II cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90:4256-4260.
132. Turley S.D., West C.E., Horton B.J. **Sterol synthesis in the liver, intestine, and lung of the guinea pig.** *Lipids*, 1976; 11:281-286.
133. Salisbury-Murphy S., Rubinstein D., Beck J.C. **Lipid metabolism in lung slices.** *Am. J. Physiol.*, 1966; 211:988-992.
134. Schneeberger E.E. **Development of peroxisomes in granular pneumocytes during pre- and postnatal growth.** *Lab Invest.*, 1972; 27:581-589.
135. Batenburg J.J., Hallman M. **In Pulmonary Physiology:Fetus, Newborn, Child and Adolescent**, ed. E.M. Scarpelli. Lea and Febiger, Philadelphia, 1990; pp.106-139.
136. Post M., Smith B.T. **In pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practise**, ed., B. Robertson, L.M.G. Van Golde and J.J. Batenburg. Elsevier, Amsterdam, 1992; pp.397-424.
137. Post M., Van Golde L.M.G. **Metabolic and developmental aspects of the pulmonary surfactant system.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 947:249-286.
138. Hallman M. **Effect of extracellular myo-inositol on surfactant phospholipid synthesis in the fetal rabbit lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 795:67-78.



## Βιβλιογραφία

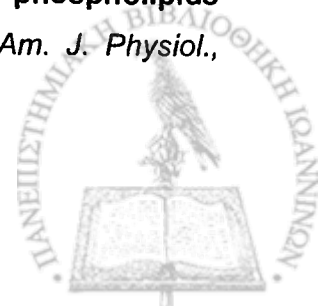
139. Caniggia I., Tseu I., Han R.N.N., Smith B.T., Tanswell K., Post M. **Spatial and temporal differences in fibroblast behaviour in fetal rat lung.** *Am. J. Physiol.*, 1991; 261:L424-L433.
140. Gross I. **Regulation of fetal lung maturation.** *Am. J. Physiol.*, 1990; 259:L337-L344.
141. Weaver T.E., Whitsett J.A. **Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins.** *Biochem. J.*, 1991; 273:249-264.
142. Kent C. **Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis.** *Prog. Lipid Res.*, 1990; 29:87-105.
143. Vance D.E. **Boehringer Mannheim Award lecture. Phosphatidylcholine metabolism: masochistic enzymology, metabolic regulation, and lipoprotein assembly.** *Biochem. Cell Biol.*, 1990; 68:1151-1165.
144. Wieder T., Geilen C.C., Wieprecht M., Becker A., Orfanos C.E. **Identification of a putative membrane-interacting domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from rat liver.** *Febs Lett.*, 1994; 345:207-210.
145. Weinhold P.A., Feldman D.A. **Fatty acids promote the formation of complexes between choline-phosphate cytidyltransferase and cytidyltransferase binding protein.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995; 318:147-156.
146. Houweling M., Jamil H., Hatch G.M., Vance D.E. **Dephosphorylation of CTP-phosphocholine cytidyltransferase is not required for binding to membranes.** *J. Biol. Chem.*, 1994; 269:7544-7551.
147. Yang W., Jackowski S. **Lipid activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase is regulated by the phosphorylated carboxyl-terminal domain.** *J. Biol. Chem.*, 1995; 270:16503-16506.
148. Jamil H., Utal A.K., Vance D.E. **Evidence that cyclic AMP-induced inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is caused by a decrease in cellular diacylglycerol levels in cultured rat hepatocytes.** *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:1752-1760.
149. Viscardi R.M., Strauss K., Hasday J.D. **Oleic acid stimulates rapid translocation of cholinephosphate cytidyltransferase in type II cells.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997; 1349:157-170.
150. Chander A., Fisher A.B. **Choline-phosphate cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in rat granular pneumocytes are increased with exogenous fatty acids.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 958:343-351.
151. Post M. **Maternal administration of dexamethasone stimulates choline-phosphate cytidyltransferase in fetal type II cells.** *Biochem. J.*, 1987; 241:291-296.



152. Zimmermann L.J., Lee W.S., Smith B.T., Post M. **Cyclic AMP-dependent protein kinase does not regulate CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity in maturing type II cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1211:44-50.
153. Feldman D.A., Rounsifer M.E., Charles L., Wienhold P.A. **CTP:phosphocholine cytidyltransferase in rat lung: relationship between cytosolic and membrane forms.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1045:49-57.
154. Wienhold P.A., Rounsifer M.E., Charles L., Feldman D.A. **Characterization of cytosolic forms of CTP: choline-phosphate cytidyltransferase in lung, isolated alveolar type II cells, A549 cell and Hep G2 cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1989;1006:299-310.
155. Mallampalli R.K., Salome R.G., Hunninghake G.W. **Lung CTP:choline-phosphate cytidyltransferase: activation of cytosolic species by unsaturated fatty acid.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 265:L158-L163.
156. Feldman D.A., Kovac C.R., Dranginis P.L., Wienhold P.A. **The role of phosphatidylglycerol in the activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from rat lung.** *J. Biol. Chem.*, 1978; 253:4980-4986.
157. Post M., Barsoumian A., Smith B.T. **The cellular mechanism of glucocorticoid acceleration of fetal lung maturation.** *J. Biol. Chem.*, 1986; 261:2179-2184.
158. Xu Z.X., Smart D.A., Rooney S.A. **Glucocorticoid induction of fatty-acid synthase mediates the stimulatory effect of the hormone on choline-phosphate cytidyltransferase activity in fetal rat lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1044:70-76.
159. Mallampalli R.K., Walter M.E., Peterson M.W., Hunninghake G.W. **Beta-methasone activation of CTP:cholinephosphate cytidyltransferase in vivo is lipid dependent.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1994; 10:48-57.
160. Hogan M., Zimmermann L.J., Wang J., Kuliszewski M., Liu J., Post M. **Increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in maturing type II cells.** *Am. J. Physiol.*, 1994; 267:L25-L32.
161. Mallampalli R.K., Mathur S.N., Warnock I.J., Salome R.G., Hunninghake G.W., Field F.J. **Beta-methasone modulation of sphingomyelin hydrolysis up-regulates CTP:cholinephosphate cytidyltransferase activity in adult rat lung.** *Biochem. J.*, 1996; 318:333-341.
162. Post M., Batenburg J.J., Smith B.T., Van Golde L.M.G. **Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; 795:552-557.

## Βιβλιογραφία

163. De Vries A.C.J., Batenburg J.J., Van Golde L.M.G. **Lysophosphatidylcholine acyltransferase and lysophosphatidylcholine: lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells from fetal rat lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1985; 833:93-99.
164. Batenburg J.J., Den Breejen J.N., Geelen M.J.H., Bijleveld C., Van Golde L.M.G. *Prog. Respir. Res.*, 1990; 25:96-103.
165. Rooney S.A. **Fatty acid biosynthesis in developing fetal lung.** *Am. J. Physiol.*, 1989; 257:L195-L201.
166. Gonzales L.W., Ertsey R., Ballard P.L., Froh D., Goerke J., Gonzales J. **Glucocorticoids stimulation of fatty acid synthesis in explants of human fetal lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1042:1-12.
167. Xu Z.X., Viviano C.J., Rooney S.A. **Glucocorticoid stimulation of fatty-acid synthase gene transcription in fetal lung:antagonism by retinoic acid.** *Am. J. Physiol.*, 1995; 268:L683-L690.
168. Batenburg J.J., Elfring R.H. **Pre-translational regulation by glucocorticoid of fatty acid and phosphatidylcholine synthesis in type II cells from fetal rat lung.** *FEBS Lett.*, 1992; 307:164-168.
169. Reynolds L.J., Washburn W.N., Deems R.A., Dennis E.A. **Assay strategies and methods for phospholipases.** *Methods Enzymol.*, 1991; 197:3-23.
170. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A., Simon G., Galli C., Bauman A.J. *Methods Enzymol.*, 1991; 14:291.
171. Πανταζή Δ. **ΜΕΛΕΤΗ υδρολυτικής δράσης φωσφολιπάσης D σε λιπιδικά υποστρώματα.** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Βιοχημεία και Χημεία Βιομορίων, Ιωάννινα, 2003.
172. Eibl H., Kovatsev S. **Preparation of phospholipids and their analogs by phospholipase D.** *Methods Enzymol.*, 1981; 72:632 -639.
173. Sarri E., Servitja J.M., Picatoste F., Claro E. **Two phosphatidylethanol classes separated by thin layer chromatography are produced by phospholipase D in rat brain hippocampal slices.** *FEBS Lett.*, 1986; 393:303 -306.
174. Heath M.F., Jacobson W. **Phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> in lamellar inclusion bodies of the alveolar epithelium of rabbit lungs.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 441:443-452.
175. Griese M., Gobran L.I., Rooney S.A. **ATP-stimulate inositol phospholipids metabolism and surfactant secretion in rat type II pneumonocytes.** *Am. J. Physiol.*, 1991; 258:L586-L593.



176. Rooney S.A., Gobran L.I. **Activation of phospholipase D in rat type II pneumocytes by ATP and other surfactant secretagogues.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 264:L133-L140.
177. Zablocki K., Wasniewska M., Duszynski J. **Participation of phospholipase A<sub>2</sub> isoforms in the control of calcium influx into electrically non-excitabile cells.** *Acta Biochim. Polonica*, 2000; 47:591-599.
178. Lambeau G., Lazdunski M. **Receptors for a growing family of secreted phospholipases A<sub>2</sub>.** *Trends Physiol. Sci.*, 1999; 20:162-170.
179. Clark J.D., Lin L.-L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L. **A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP.** *Cell*, 1991; 65:1043-1051.
180. Glover S., Bayburt T., Jonas M., Chi E., Gelb M.H. **Translocation of the 85 kDa phospholipase A<sub>2</sub> from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen.** *J. Biol. Chem.*, 1995; 270:15359-15367.
181. Lin L.-L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A., Davis R.J. **cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase.** *Cell*, 1993; 72:269-278.
182. Balboa M.A., Balsinde J., Jones S.S., Dennis E.A. **Identity between the Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from P3881 macrophages and Chinese Hamster Ovary cells.** *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:8576-8580.
183. Wolf M.J., Gross R.W. **The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial phospholipase A<sub>2</sub> –Implications for cardiac cycle-dependent alterations in phospholipolysis.** *J. Biol. Chem.*, 1996; 271:20989-20992.
184. Gross R.W. **Activation of calcium –independent phospholipase A<sub>2</sub> by depletion of internal calcium stores.** *Biochim. Soc. Trans.*, 1998; 26:345-349.
185. Schaloske R.H., Dennis E.A. **The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1761:1246-1259.
186. Hattori K., Hattori M., Adachi H., Tsujimoto M., Inoue K. **Purification and characterization of platelet activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol.** *J. Biol. Chem.*, 1995; 270:22308-22313.
187. Balsinde J., Bianco I.D., Ackermann E.J., Conde-Frieboes K., Dennis EA. **Inhibition of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> prevents arachidonic acid incorporation and phospholipids remodeling in P388D1 macrophages.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1995; 92:8527-8531.

## Βιβλιογραφία

188. Pierik A.J., Nijssen J.G., Aarsman A.J., Van den Bosch H. **Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in rat tissue cytosols.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 962:345-353.
189. Liu L. **Regulation of lung surfactant secretion by phospholipase A<sub>2</sub>.** *J. Cellular Biochem.*, 1999; 72:103-110.
190. Kim T-S., Sundaresh C.S., Feinstein S.I., Dodia C., Skash W.R., Jain M.K., Nagase T., Seki N., Ishikawa K.C., Nomura N., Fisher A.B. **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.
191. Fisher A.B., Dodia C. **Role of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes.** *J. Lipid Res.*, 1996; 37:1057-1064.
192. Kim T.S., Dodia C., Chen X., Hennigan B.B., Jain M., Feinstein S.I., Fisher A.B. **Cloning and expression of rat lung acidic Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub> and its organ distribution.** *Am. J. Physiol.*, 1998; 274:L750-L761.
193. Abe A., Hiraoka M., Wild S., Wilcoxon S.E., Paine R., Shayman J.A. **Lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> is selectively expressed in alveolar macrophages.** *J. Biol. Chem.*, 2004; 279:42605-42611.
194. Winstead M. V., Balsinde J., Dennis E.A. **Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>:structure and function.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000; 1488:28-39.
195. Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. **Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004; 101:3780-3785.
196. Manevich Y., Fisher A.B. **Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipids metabolism.** *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 38:1422-1432.
197. Kim T.S., Sundaresh C.S., Feinstein S.I., Dodia C., Skach W.R., Jain M.K., Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Nomura N., Fisher A.B. **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.
198. Chen J.W., Dodia C., Feinstein S.I., Jain M.K., Fisher A.B. **1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A<sub>2</sub> activities.** *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:28421-28427.



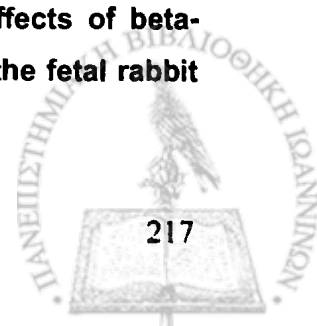
199. Fisher A.B., Dodia C., Yu K., Manevich Y., Feinstein S.I. **Lung phospholipids metabolism in transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1761:785-792.
200. Wu Y., Manevich Y., Feinstein S.I., Dodia C., Fisher A.B. **Phospholipase A<sub>2</sub> activity of peroxiredoxin 6 (Prdx6) is regulated by phosphorylation.** *Proceedings of the American Thoracic Society (ATS)*, Vol. 3, p. A437, May 19-24, 2006, San Diego, California.
201. Fisher A.B., Dodia C., Feinstein S.I., Ho Y.-S. **Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal-type phospholipase A<sub>2</sub>.** *J. Lipid Res.*, 2005; 46:1248-1256.
202. Fisher A.B., Dodia C. **Role of acidic Ca<sup>2+</sup> -independent phospholipase A<sub>2</sub> in synthesis of lung dipalmitoyl phosphatidylcholine.** *Am. J. Physiol.*, 1997; 272:L238-L243.
203. Fisher A.B., Dodia C. **Lysosomal-type PLA<sub>2</sub> and turnover of alveolar DPPC.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2001; 280:L748-L754.
204. Jain D., Dodia C., Bates S.R., Hawgood S., Poulain F.R., Fisher A.B. **SP-A is necessary for increased clearance of alveolar DPPC with hyperventilation or secretagogues.** *Am. J. Physiol.*, 2003; 283:L759-L765.
205. Fisher A., Dodia C., Chander A., Jain M. **A competitive inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub> decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung.** *Biochem J.*, 1992; 288:407-411.
206. Roberts M.F. **Phospholipases: Generation of lipid-derived second messengers.** *Introduction to Cellular Signal Transduction*, A. Sitaramayya Editor, Boston, 1999; Chapt. 5, 89-145.
207. Fisher A.B., Dodia C., Chandra A., Jain M.K. *FASEB J.*, 1990; 4:8277.
208. Pan Y.H., Epstein T.M., Jain M.K., Bahnsen B.J. **Five coplanar anion-binding sites on one face of phospholipase A<sub>2</sub>:relationship to interface binding.** *Biochemistry*, 2001; 40:609-617.
209. Jain M.K., Tao W., Rogers J., Arenson C., Eibl H., Yu B.-Z. **Active-site directed specific competitive inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>:novel transition-state analogues.** *Biochemistry*, 1991; 30:10256-10268.
210. Mason R., Dobbs L. **Synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by alveolar type II cells in primary culture.** *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 5101-5107.

## Βιβλιογραφία

211. Neagos G.R., Feysa A., Peters-Golden M. **Phospholipase A<sub>2</sub> in alveolar type II epithelial cells:biochemical and immunologic characterization.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 264:L261-L268.
212. Nakos G., Kitsioui E., Lekka M.E. **Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 158:1504-1510.
213. Nakos G., Kitsioui E., Hatzidaki E., Koulouras V., Touqui L., Lekka M.E. **Phospholipases A<sub>2</sub> and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome.** *Crit. Care Med.*, 2005; 33:772-779.
214. Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Larsen E.C., Chen X., Sun D., Tsao F.H.C. **CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A<sub>2</sub> and CTP:phosphocholine cytidyltransferase after stroke.** *J. Biol. Chem.*, 2006; 281:6718-6725.
215. Dobbs L.G., Gutierrez J.A. **Mechanical forces modulate alveolar epithelial phenotypic expression.** *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2001; 129:261-266.
216. Sanchez-Esteban J., Cicchiello L.A., Wang Y., Tsai S.-W., Lakisha K.W., Torday J.S., Rubin L.P. **Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation.** *J. Appl. Physiol.*, 2001; 91:589-595.
217. Nakamura T., Liu M., Mourgeon E., Slutsky A., Post M. **Mechanical strain and dexamethasone selectively increase surfactant protein C and tropoelastin gene expression.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000; 278:L974-L980.
218. Wang P.M., Fujita E., Bhattacharya J. **Vascular regulation of type II cell exocytosis.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2002; 282:L912-L916.
219. Torday J.S., Sanchez-Esterban J., Rubin L.P. **Paracrine mediators of mechanotransduction in lung development.** *Am. J. Med. Sci.*, 1998; 316:205-208.
220. Torday J.S., Rehan V.K. **Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHrP and leptin.** *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2002; 283:L130-L135.
221. Junqueira L.C., Carneiro J., Contopoulos A. **Basic Histology, 2<sup>nd</sup> Edition.** *Μετάφραση Κοντόπουλος Α.Ν.*, 1970; Κεφ. 22: σελ. 390-411.
222. Garbrecht M.R., Klein J.M., Schmidt T.J., Zinder J.M. **Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung:implications for lung development and the pulmonary surfactant system.** *Biol. Neonate*, 2006; 89:109-119.



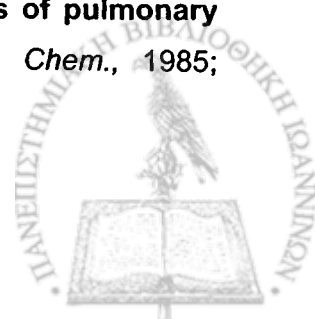
223. Schwertz D.W., Piano M.R., Kleinpell R., Johnson J. **Teaching pharmacology to advanced practice nursing students: issues and strategies.** *AACN Clin. Issues*, 1997; 8:132-146.
224. Jaffuel D., Roumestan C., Balaguer P., Henriquet C., Gougat C., Bousquet J., Demoly P., Mathieu M. **Correlation between different gene expression assays designed to measure *trans*-activation potencies of systemic glucocorticoids.** *Steroids*, 2001; 66:597-604.
225. Λέκκα Μ.Ε. **Βιοχημεία ΙΙΙ:Βιολογικές Μεμβράνες.** Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Ιωάννινα 1994; σελ. 66-67.
226. Grier D.G., Halliday H.L. **Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development.** *Treat. Respir. Med.*, 2004; 3(5):295-306.
227. Adcock I.M., Stevens D.A., Barnes P.J. **Interactions of glucocorticoids and  $\beta$ -agonists.** *Eur. Respir. J.*, 1996; 9:160-168.
228. Hayashi R., Wada H., Ito K., Adcock I.M. **Effects of glucocorticoids on gene transcription.** *Eur. J. Pharmacology*, 2004; 500:51-62.
229. Torday J.S., Smith B.T., Giroud C.J.P. **The rabbit fetal lung as a glucocorticoid target tissue.** *Endocrinology*, 1975; 96:1462-1467.
230. Gonzales L.W., Ballard P.L., Ertsey R., Williams MC. **Glucocorticosteroids and thyroid hormones stimulate biochemical and morphological differentiation of fetal human lung in organ culture.** *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1986; 62:678-691.
231. Gross I., Ballard P.L., Ballard R.A., Jones C.T., Wilson C.M. **Corticosteroid stimulation of phosphatidylcholine synthesis in cultured fetal rabbit lung. Evidence for de novo protein synthesis mediated by glucocorticoid receptors.** *Endocrinology*, 1983; 12:829-837.
232. Post M., Torday J.S., Smith B.T. **Alveolar type II cells isolated from fetal rat lung organotypic cultures synthesize and secrete surfactant-associated phospholipids and respond to fibroblast-pneumonocyte factor.** *Exp. Lung Res.*, 1984; 7:53-65.
233. Grier D.G., Halliday H.L. **Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development.** *Treat. Respir. Med.*, 2004; 3:295-306.
234. Farrell P.M., Zachman R.D. **Induction of choline phosphotransferase and lecithin synthesis in the fetal lung by corticosteroids.** *Science*, 1973; 179:297-298.
235. Rooney S.A., Gobran L.I., Marino P.A., Maniscalco W.M., Gross I. **Effects of beta-methasone on phospholipid content, composition and biosynthesis in the fetal rabbit lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1979; 572:64-76.





## Βιβλιογραφία

236. Oldenborg V., Van Golde L.M.G. **The enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis in the fetal mouse lung. Effects of dexamethasone.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1977; 489:454-465.
237. Brehier A., Benson B.J., Williams M.C., Mason R.J., Ballard P.L. **Corticosteroid induction of phosphatidic acid phosphatase in fetal rabbit lung.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977; 77:883-890.
238. Pope T.S., Smart D.A., Rooney S.A. **Hormonal effects on fatty acid synthase in cultured fetal rat lung; induction by dexamethasone and inhibition of activity by triiodothyronine.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 959:169-177.
239. Rooney S.A., Gross I., Gassenheimer L.N., Motoyama E.K. **Stimulation of glycerophosphate phosphatidyltransferase activity in fetal rabbit lung by cortisol administration.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1975; 398:433-441.
240. Rooney S.A., Gobran L.I., Marino P.A., Maniscalco W., Gross I. **Effects of beta-methasone on phospholipid content, composition and biosynthesis in the fetal rabbit lung.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1979; 572:64-76.
241. Palayoor T., Smart D.A., Rooney S.A. **Glucocorticoid-induced expression of the fatty acid synthetase gene in fetal rat lung explants.** *FASEB J.*, 1988; 2:A1540.
242. Xu Z.X., Stenzel W., Sasic S.M., Smart D.A., Rooney S.A. **Glucocorticoid regulation of fatty acid synthase gene expression in fetal rat lung.** *Am. J. Physiol.*, 1993; 265:L140-L147.
243. Xu Z.X., Viviano C.J., Rooney S.A. **Glucocorticoid stimulation of fatty acid synthase gene transcription in fetal lung:antagonism by retinoic acid.** *Am. J. Physiol*, 1995; 268:L683-L690.
244. Ballard P.L., Ning Y., Polk D., Ikegami M., Jobe A.H. **Glucocorticoid regulation of surfactant components in immature lambs.** *Am. J. Physiol.*, 1997; 273:L1048-L1057.
245. Kari M.A., Akino T., Hallman M. **Prenatal dexamethasone and endogenous surfactant therapy: surface activity and surfactant components in airway specimens.** *Pediatr. Res.*, 1995; 38(5):676-684.
246. Post M., Torday J.S., Smith B.T. **Alveolar type II cells isolated from fetal rat lung organotypic cultures synthesize and secrete surfactant-associated phospholipids and respond to fibroblast-pneumonocyte factor.** *Exp. Lung Res.*, 1984; 7:53-65.
247. Floros J., Post M., Smith B.T. **Glucocorticoids affect the synthesis of pulmonary fibroblast-pneumonocyte factor at a pretranslational level.** *J. Biol. Chem.*, 1985; 260:2265-2267.



248. Zimmerman L.J.I., Lee W. -S., Post M. **Regulation of CTP:phosphocholine cytidylytransferase by cytosolic lipids in rat type II pneumocytes during development.** *Pediatr. Res.*, 1995; 38:864-869.
249. Post M., Barsoumian A., Smith B.T. **The cellular mechanism of glucocorticoid acceleration on fetal lung maturation.** *J. Biol. Chem.*, 1986; 261(5):2179-2184.
250. Grossmann G., Nilsson R., Robertson B. **Scanning electron microscopy of epithelial lesions induced by artificial ventilation of the immature neonatal lung, the prophylactic effect of surfactant replacement.** *Eur. J. Pediatr.*, 1986; 145:361-367.
251. Robertson B. **Corticosteroids and surfactant for prevention of neonatal RDS.** *Ann. Med.*, 1993; 25(3):285-288.
252. Young S.L., Silbajoris R. **Dexamethasone increases adult rat surfactant lipids.** *J. Appl. Physiol.*, 1986; 60:1665-1672.
253. Isohama Y., Rooney S.A. **Glucocorticoid enhances the response of type II cells from newborn rats to surfactant secretagogues.** *Biochim Biophys. Acta*, 2001; 1531:241-250.
254. Ambrose M.P., Hunninghake G.W. **Corticosteroids increase lipocortin I in alveolar epithelial cells.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1990; 3:349-353.
255. Chalaka S., Ingbar D.H., Sharma R., Zhou Z., Wendt C.H. **Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -ATPase gene regulation by glucocorticoids in a fetal lung epithelial cell line.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 1999; 277:L197-L203.
256. Hallman M., Teramo K., Sipinen S., Raivio K. **Effects of beta-methasone and iodine on the fetal secretion of lung surfactant.** *J. Perinat. Med.*, 1985; 13(1):23-29.
257. Khosla S.S., Rooney S.A. **Stimulation of fetal lung surfactant production by administration of 17beta-estradiol to the maternal rabbit.** *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1979; 133(2):213-216.
258. Lohninger A.K., Bock P., Salzer H., Sevelde P., Lohninger A.F. **Antenatal beta-methasone dose effects on fetal rat lung morphology and surfactant.** *J. Perinat. Med.*, 1994; 22(4):319-328.
259. Zsolnai B., Gyevai A. **Induction of lamellar body synthesis by corticosteroids in first-trimester human fetal lungs.** *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1984; 17(5):258-264.
260. Munck A. **Glucocorticoid activity, specific binding and competition for cortisol binding sites on thymus cells: Cortisol as a potential antiglucocorticoid.** *Fed. Proc.*, 1968; 27:691.

## Βιβλιογραφία

261. Ballard P.L., Granberg J.P., Douglas W.H. **Glucocorticoid binding by lung cytosol and isolated type II epithelial cells of adult rat.** *Pediatr. Res.*, 1976; 10:457.
262. Giannopoulos G. **Uptake and metabolism of cortisone by the fetal rabbit lung.** *Steroids*, 1974; 23:845-853.
263. Crowley P. **Prophylactic corticosteroids for preterm birth (Cochrane review).** *In: The Cochrane library*, 2004; Issue 1, Chichester, UK:John Wiley and sons, LTD.
264. Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973; 51:1417-1423.
265. Lieber M., Smith B., Szakai A. **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int. J. Cancer.*, 1976; 17:62-70.
266. Gazdar A.F., Linnoila R.I., Kurita Y., Oie H.K., Mulshine J.L., Clark J.C., Whitsett J.A. **Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines.** *Cancer Res.*, 1990; 50(17):5481-5487.
267. Bradford M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.*, 1976; 72:248-254.
268. Kirazov L.P., Venkov L.G., Kirazov E.P. **Comparison of the Lowry and the Bradford protein assay as applied for protein estimation of membrane-containing fractions.** *Anal. Biochem.*, 1993; 208:44-48.
269. Wroblewski F., La Due J.S. **Lactic dehydrogenase activity in blood.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955; 90:210-213.
270. Koh J.Y., Choi D.W. **Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay.** *J. Neurosci. Methods*, 1987; 20:83-90.
271. Bligh E.G., Dyer W.J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959; 37:911-917.
272. Kates M. **Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of lipids.** Ed. T.S. Work, E. Work, North-Holland Publishing Company-Amsterdam, Oxford, American Elsevier Publishing Co., Inc.-New York, 1975; Chapt. 5:443-445.
273. Bartlett G.R. **Phosphorous assay in column chromatography.** *J. Biol. Chem.*, 1959; 234:466 -468.



274. Olsson N.U., Salem N.Jr. **Molecular species analysis of phospholipids.** *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1997; 692:245-256.
275. Nakos G., Pneumatikos J., Tsangaris H., Tellis K., Lekka M.E. **Protein and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pulmonary edema.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 155:945-951.
276. Nakos G., Kitsioulis E., Tsangaris I., Lekka M.E. **Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early, intermediate and late phases of ARDS.** *Intensive Care Med.*, 1998; 24:296-303.
277. Tsoukatos D.C, Tselepis A.D., Lekka M.E. **Studies on the subcellular distribution of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero activities involved in its biosynthesis within the ciliate Tetrahymena pyriformis.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1993; 1170:258-264.
278. Wykle R.L., Malone B., Blank M.L., Snyder F. **Biosynthesis of pulmonary surfactant: comparison of 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and palmitate as precursors of dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in adenoma alveolar type II cells.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980; 199:526-537.
279. Kitsioulis E.I., Nakos G., Lekka M.E. **Differential determination of phospholipase A<sub>2</sub> and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates.** *J. Lipid Res.*, 1999; 40:2346-2356.
280. Tselepis A.D., Lekka M.E., Tsoukatos D.C. **A PAF-acetylhydrolase activity in Tetrahymena pyriformis cells.** *FEBS Lett.*, 1991; 288:147-150.
281. Clark J. M. Jr., Switzer R.L. **Experimental Biology.** Sec. Ed. Μετάφραση Γ. & Μ. Παπαδόπουλος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 40-51, Ηράκλειο 1992.
282. Καρκαμπούνας Αθανάσιος. **Ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό ενεργοτήτων φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> και PAF – ακετυλυδρολάσης σε βιολογικά υγρά με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).** *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης*, Ιωάννινα 2003.
283. Shapiro D.L., Nardone L.L., Rooney S.A., Motoyama E.K., Munoz J.L. **Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1978; 530:197-207.
284. Miller N.J., Daniels C.B., Costa D.P., Orgeig S. **Control of pulmonary surfactant secretion in adult California sea lions.** *Biochem. Biophys. Resear. Commun.*, 2004; 313:727-732.

## Βιβλιογραφία

285. Lamb R.G., Harper C.C., McKinney J.S., Rzigalinski B.A., Ellis E.F. **Alterations in phosphatidylcholine metabolism of stretch-injured cultured rat astrocytes.** *J. Neurochem.*, 1997; 68:1904-1910.
286. Veldhuizen R.A.W., Slutsky A.S., Joseph M., McCaig L. **Effects of mechanical ventilation of isolated mouse lungs on surfactant and inflammatory cytokines.** *Eur. Respir. J.*, 2001; 17:488-494.
287. Tellis C., Pantazi D., Ioakim E., Galani V., Lekka M.E. **Localization of an alkyl-acetyl-glycerol-CDP-choline:cholinephosphotransferase activity in submitochondrial fractions of Tetrahymena pyriformis.** *Eur. J. Cell Biol.*, 2003; 82:573-578.
288. Carole R. Mendelson. **Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression.** *Annu. Rev. Physiol.*, 2000; 62:875-915.
289. Croxtall J.D., Th.W. van Hal P., Choudhury Q., Gilroy D.W., R.J. Flower. **Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells.** *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 135:511-519.
290. Stanford G.L., Frosolono M.F. **1-acyl-2-lysophosphatidylcholine: phosphatidylglycerol-2-acyltransferase in lung microsomes and type II pneumocyte-derived cultures.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1981; 665:339-344.
291. Chen X., Hyatt B.A., Mucenski M.L., Mason R.J., Shannon J.M. **Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006; 103:11724-11729.
292. Nakanishi H., Shindou H., hishikawa D., Harayama T., Ogasawara R., Suwabe A., Taguchi R., Shimizu T. **Cloning and Characterization of mouse lung-type acyl-CoA:Lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT1).** *J. Biol. Chem.*, 2006; 281:20140-20147.
293. Neville N.T., Parton J., Harwood J.L., Jackson S.K. **The activities of monocyte lysophosphatidylcholine acyltransferase and coenzyme A-independent transacylase are changed by the inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interferon gamma.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1733:232-238.
294. Ryan A.J., Andrews M., Zhou J., Mallampalli R.K. **c-Jun N-terminal kinase regulates CTP:phosphocholine cytidyltransferase.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 2006; 447:23-33.
295. Pantazi D., Drougas E., Loppinet B., Tellis C., Kosmas A.M., Lekka M.E. **Hydrolysis by phospholipase D of phospholipids in solution state or adsorbed on a silica matrix.** *Chem. Phys. Lipids*, 2006; 139:20-31.



