

Διδακτορική Διατριβή
Κοινής Επίβλεψης

A

426

της
ΕΙΡΗΝΗΣ Ι. ΚΗΤΣΙΟΥΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΥ

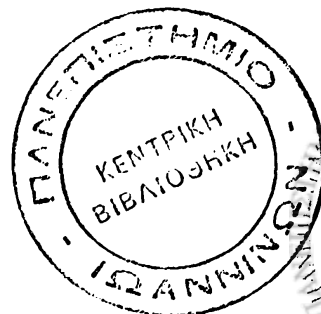
Βιοχημική και ανοσοχημική μελέτη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS).

Ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου ανίχνευσης ενεργοτήτων φωσφολιπάσης A₂ και PAF-ακετυλυδρολάσης σε βιολογικά υγρά.

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

LABORATOIRE DE BIOGENESE MEMBRANAIRE
UNIVERSITE VICTOR SEGALEN
BORDEAUX-2

Ιωάννινα, 2000



Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2000

Thèse n°

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 2

Mention: Sciences Biologiques et Médicales

Option: Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement le:

11 Avril 2000

par

Kitsiouli I. Eirini

Etudes biochimique et immunochimique du liquide bronchoalvéolaire de patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë. Développement d'une méthode fluorimétrique pour le dosage des activités phospholipase A₂ et PAF-acétylhydrolase dans les fluides biologiques.

Membres du Jury: Claude Cassagne, Professeur, (Président)
Lilly Maneta-Peyret, Maître de Conférences, (Directeur de thèse)
Maria-Eleni Lekka, Professeur Assistant, (Directeur de thèse)
Maria Sakarellou, Professeur
Orestis Tsolas, Professeur
Antonios Kalokairinos, Professeur Suppléant
Dimitrios Kyriakidis, Professeur



Αφιερώνεται

στους γονείς μου Γιάννη και Μαρία,
στην αδελφή μου Στέλλα,
στον παππού μου Ανδρέα
και στη γιαγιά μου Ειρήνη



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο Βίβλος... (faded text)

Το... (faded text)

στο Γρηγόρη

για τη στήριξη, υπομονή και βοήθεια

που μου προσέφερε

... (faded text)

... (faded text)



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

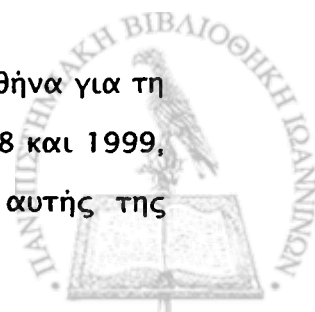
Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε με τη διαδικασία της "συνεπίβλεψης" (*co-tutelle*) στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Εργαστήριο Biogenèse Membranaire, του Πανεπιστημίου Victor Segalen, Bordeaux-2, της Γαλλίας (Διευθυντής Εργαστηρίου: Καθηγητής κ. Claude Cassagne), από το 1996 έως το 2000. Το ερευνητικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων με επιβλέπουσα την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαρία-Ελένη Λέκκα, και στο Πανεπιστήμιο Victor Segalen, Bordeaux-2 με επιβλέπουσα την κ. Lilly Maneta-Peyret, Maître de Conference.

Το κλινικό μέρος της διατριβής σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΠΓΝΙ), υπό την επίβλεψη του Διευθυντή της ΜΕΘ κ. Γιώργου Νάκου.

Το ερευνητικό μέρος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων αφορούσε τη μελέτη βιοχημικών παραμέτρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), καθώς και την ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου ανίχνευσης ενεργοτήτων φωσφολιπάσης A_2 και PAF-ακετυλυδρολάσης σε βιολογικά υγρά (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και ορό).

Το ερευνητικό μέρος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Biogenèse Membranaire, του Πανεπιστημίου Victor Segalen, Bordeaux-2, με επιβλέπουσα την κ. Lilly Maneta-Peyret, Maître de Conference, αφορούσε την ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αυτό-αντισωμάτων στο BAL ασθενών με ARDS ή αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και ARDS, τον έλεγχο εξειδίκευσης αυτών των αντισωμάτων και τέλος τη μελέτη αν η στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G καθαρίζει τις ανοσοσφαιρίνες G από τα λιπίδια. Η παρούσα διατριβή υποστηρίχθηκε από το πρόγραμμα Ελληνο-Γαλλικής συνεργασίας PLATON 96.

Ευχαριστώ το Επιστημονικό Τμήμα της Γαλλικής Πρεσβείας στην Αθήνα για τη χορήγηση τριών διμηνων υποτροφιών για τα ακαδημαϊκά έτη 1997, 1998 και 1999, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η επίτευξη του ερευνητικού τμήματος αυτής της



διατριβής, με τη διαδικασία της συνεπίβλεψης, στο Εργαστήριο Biogenèse Membranaire, του Πανεπιστημίου Victor Segalen, Bordeaux-2.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Biogenèse Membranaire, του Πανεπιστημίου Victor Segalen, Bordeaux-2, για τη ζεστή τους φιλοξενία. Ευχαριστώ ιδιαίτερως την κ. Lilly Maneta-Peyret για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε διάφορα θέματα διεκπεραίωσης που αντιμετώπισα σχετικά με τη διατριβή στο Πανεπιστήμιο του Bordeaux-2. Την ευχαριστώ επίσης για τη βοήθεια που μου προσέφερε στο πειραματικό μέρος της μελέτης, για διορθώσεις στη διατριβή, καθώς και για το ενδιαφέρον που έδειξε σε όλα τα στάδια της διατριβής. Ευχαριστώ τον κ. Claude Cassagne, Διευθυντή του Εργαστηρίου, για τις επισημάνσεις του στο ερευνητικό μέρος της διατριβής. Τα φάσματα μάζας που παρουσιάζονται στο πειραματικό μέρος της διατριβής λήφθηκαν στο Εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Victor Segalen Bordeaux-2, από τον κ. M. Valeins τον οποίο και ευχαριστώ.

Ευχαριστώ την κ. Μαρία-Ελένη Λέκκα για όλα όσα διδάχτηκα από αυτή κατά τη διαδικασία επιστημονικής έρευνας (όπως η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων με δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά) και κυρίως διότι έμαθα να σκέφτομαι με ένα σωστό και αποτελεσματικό τρόπο. Την ευχαριστώ επίσης για διορθώσεις στη διατριβή καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή της στο αίσιο τέλος της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γιώργο Νάκο για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του και τη βοήθειά του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν στο Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) και στο Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο (APLAS), καθώς και για διορθώσεις στη διατριβή.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Ηρακλή Τσαγκάρη, Ιατρό της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του ΠΠΓΝΙ, για διορθώσεις στο κεφάλαιο της Εισαγωγής που αναφέρεται στο Σύνδρομο της Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Μαίρη Δαϊτσιώτου-Σακαρέλλου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, για τη γενικότερη συμπαράστασή της σε όλο το διάστημα της παρουσίας μου στον Πανεπιστημιακό χώρο.



Ευχαριστώ τον κ. Αντώνη Καλοκαϊρινό, Αναπληρωτή Καθηγητή της Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τις υποδείξεις του στο ερευνητικό μέρος της φθορισμομετρίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Μαυρουδή Δεμερτζή, Επίκουρο Καθηγητή της Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ευγενική παραχώρηση που έκανε στη χρήση του φθορισμομέτρου Perkin-Elmer LS-3.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους Κώστα Τέλλη, Σόνια Καραμπίνα, Αγγελική Καρακατσάνη, Θοδωρή Λιαπικό και Αφροδίτη Ταμπάκη για τη συμβολή τους στο φιλικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αποσπάσματα της Εισαγωγής που αφορούν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων (lung surfactant) και τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), έχουν ληφθεί από το Εισαγωγικό μέρος της Διατριβής μου Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης (ΜΔΕ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1998). Αυτό έγινε διότι κρίθηκε αναγκαίο για την κάλυψη του θεωρητικού μέρους και για την καλύτερη κατανόηση των υπολοίπων τμημάτων της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, μερικά από αυτά αποσπάσματα έχουν εμπλουτισθεί με πρόσφατη βιβλιογραφία.

Ειρήνη Κητσιούλη

Φεβρουάριος 2000,

Ιωάννινα

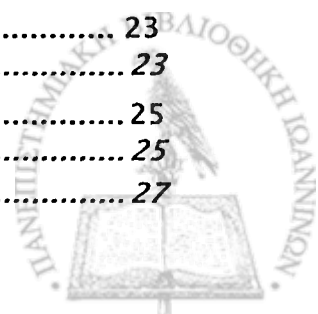


... (faint, illegible text) ...

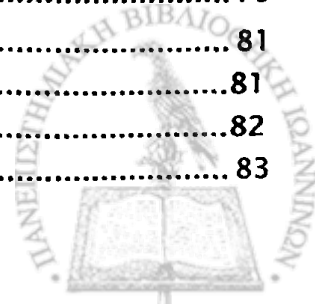


ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

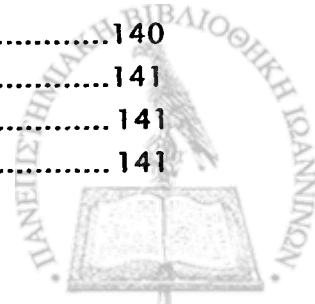
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	V
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	IX
ΣΚΟΠΟΣ	XIX
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	XXI
SUMMARY	XXV
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	XXIX
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1) ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	1
ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ	2
Κυψελιδικό επιθήλιο	3
Κυψελιδικά τριχοειδή αγγεία	3
Η ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	4
Επιφανειακή τάση	4
<i>Επιφανειοδραστικό υλικό</i>	<i>5</i>
2) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (LUNG SURFACTANT)	7
ΣΥΣΤΑΣΗ	7
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	12
Λιπίδια.....	12
Πρωτεΐνες.....	13
<i>Ρόλος, δομή και βιοσύνθεση των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού</i>	<i>παράγοντα.....</i>
.....	13
ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΥΓΡΩΝ ΣΤΟΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	18
Ισορροπία υγρών στον πνεύμονα.....	18
Επίδραση της επιφανειακής τάσης στις δυνάμεις διήθησης υγρών	19
Ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και ισορροπία υγρών.....	19
ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	21
Αλληλεπίδραση των SP-A και SP-D με gram-αρνητικά βακτήρια και	
λιποτοπολυσακχαρίτες.....	22
SP-A και ιοί	22
SP-A, SP-D και μακροφάγα.....	23
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	23
Υποστρώματα.....	23
Στάδια βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης	25
<i>"De novo" σύνθεση</i>	<i>25</i>
<i>Πορεία "ανάπλασης"</i>	<i>27</i>



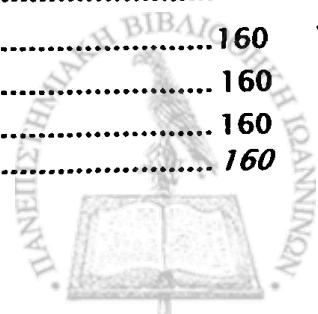
Σύνθεση άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα	28
Ρύθμιση της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων	29
<i>Ρύθμιση της σύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης</i>	29
<i>Ρύθμιση της σύνθεσης της φωσφατιδυλογλυκερόλης και της φωσφατιδυλινοσιτόλης</i>	31
ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	31
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΙΣ ΚΥΤΕΛΙΔΕΣ	33
ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	34
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	35
3) ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ (ARDS).....	37
ΓΕΝΙΚΑ.....	37
Κλινική ταξινόμηση	37
<i>Αίτια εμφάνισης του ARDS</i>	39
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	40
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ	40
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	41
Ανταλλαγή αερίων αίματος.....	41
Μηχανικές παράμετροι.....	41
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ.....	41
Δημιουργία πνευμονικού οιδήματος.....	42
<i>Ρόλος της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης</i>	42
Φλεγμονή στον πνεύμονα.....	43
<i>Κύτταρα</i>	44
<i>Λιποπολυσακχαρίτες (ή ενδοτοξίνες)</i>	47
<i>Μεσολαβητές της φλεγμονής</i>	47
Οξειδωτικοί παράγοντες	63
Πρωτεΐνάσες.....	64
Επιφανειοδραστικός παράγοντας και ARDS	66
<i>Φωσφολιπίδια</i>	66
<i>Πρωτεΐνες</i>	68
<i>Αναστολή της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από φωσφολιπάσες</i>	69
<i>Φωσφολιπάση A₂ και ARDS</i>	73
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	75
Μηχανικός αερισμός.....	75
Χορήγηση φαρμάκων	75
Χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα.....	76
<i>Φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας</i>	77
<i>Τροποποιημένος φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας</i>	78
<i>Συνθετικός επιφανειοδραστικός παράγοντας</i>	79
<i>Πρόγνωση</i>	79
4) ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂	81
ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ	81
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A ₂ (PLASES A ₂).....	82
Ταξινόμηση των φωσφολιπασών A ₂	83



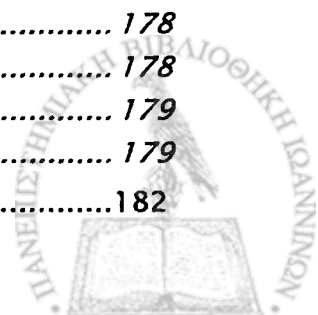
Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A_2	83
Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A_2 εξαρτώμενες Ca^{2+}	84
Ενδοκυττάρια φωσφολιπάσες A_2 ανεξάρτητες Ca^{2+}	87
«Ενεργοποίηση μεσόφασης»	88
PLase A_2 των ομάδων VII και VIII (ή PAF-AcH).....	90
Κατηγορίες PAF-Ακετυλυδρολάσης (AcH).....	90
PAF-AcH και οξειδωμένα φωσφολιπίδια	95
Αναστολείς των φωσφολιπασών A_2	96
Χημικοί αναστολείς	96
Φυσικοί αναστολείς.....	97
Αναστολείς της PAF-AcH.....	98
PLASE A_2 ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	99
PAF-AcH και ασθένειες	100
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLASE A_2	100
Ραδιομετρικές μέθοδοι.....	102
Μέθοδος με <i>Escherichia coli</i>	103
Ανίχνευση iPLase A_2 -VI.....	103
Ανίχνευση cPLase A_2 -IV	103
Ανίχνευση sPLase A_2 -V	104
Ανίχνευση sPLase A_2 -IIA	104
Φθορισμομετρικές μέθοδοι.....	104
Φωταύγεια	106
Φθορίζοντα υποστρώματα της φωσφολιπάσης A_2	121
5) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	127
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	127
ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	128
aPL κατά β_2 -γλυκοπρωτεΐνης I	129
Συσχέτιση aCL με ασθένειες / Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS).....	130
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και πνεύμονες	132
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και ARDS.....	133
Σχέση των aCL με την εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 (sPLase A_2)	134
Χειρισμός των ασθενών με APLAS	134
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ APL	134
Χρωματογραφία συγγένειας πρωτεΐνης G-σεφαρόζης.....	135
Πρωτεΐνη G του στρεπτόκοκκου.....	135
Η πρωτεΐνη G δεσμεύει την αλβουμίνη.....	136
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	140
Α. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	140
Διαδικασία λήψης του BAL.....	140
Κατεργασία του BAL	140
ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ BAL	140
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ BAL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LOWRY	141
Αρχή της μεθόδου	141
Αντιδραστήρια	141



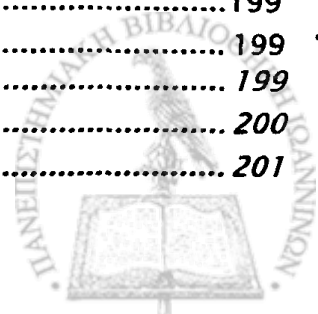
Διαλύματα	142
Πειραματική πορεία	143
<i>Πρότυπη καμπύλη</i>	143
<i>Προετοιμασία των δειγμάτων</i>	143
<i>Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων</i>	143
<i>Επεξεργασία των αποτελεσμάτων</i>	144
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΟ BAL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΒΡΩΜΟΚΡΕΣΟΛΗΣ (BCG)	144
Αρχή της μεθόδου	144
Αντιδραστήρια	144
Διαλύματα εργασίας	145
Πειραματική πορεία	145
<i>Επεξεργασία του BAL</i>	145
<i>Συμπύκνωση BAL</i>	146
<i>Κατεργασία προτύπων και δειγμάτων</i>	147
<i>Επεξεργασία των αποτελεσμάτων</i>	147
Αρίθμηση κυττάρων	147
ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ	147
<i>Υλικά-Αντιδραστήρια</i>	147
<i>Βασικά διαλύματα</i>	148
Φάσματα διέγερσης και εκπομπής	150
Προσδιορισμός κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης (CMC) φθορίζοντων φωσφολιπιδίων	151
<i>Αρχή της μεθόδου</i>	151
<i>Διαλύματα</i>	151
<i>Πειραματική πορεία</i>	152
Επίδραση BSA στο φθορισμό των C ₆ - ή C ₁₂ -NBD-PC	152
<i>Διαλύματα</i>	152
<i>Πειραματική πορεία</i>	152
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLASE A ₂ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΤΗ ΘΕΣΗ SM-2	153
Ραδιομετρική μέθοδος	153
<i>Αρχή της μεθόδου</i>	153
<i>Υλικά-αντιδραστήρια</i>	153
<i>Διαλύματα</i>	154
<i>Πειραματική πορεία</i>	156
<i>Επεξεργασία αποτελεσμάτων</i>	157
Φθορισμομετρική μέθοδος	158
<i>Αρχή της μεθόδου</i>	158
<i>Υλικά-Αντιδραστήρια και Διαλύματα</i>	158
<i>Πειραματική πορεία</i>	158
<i>Χρήση εσωτερικού προτύπου</i>	159
<i>Έκφραση των αποτελεσμάτων</i>	159
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-ACH	160
Φθορισμομετρική μέθοδος	160
Ραδιομετρική μέθοδος	160
<i>Αρχή της μεθόδου</i>	160



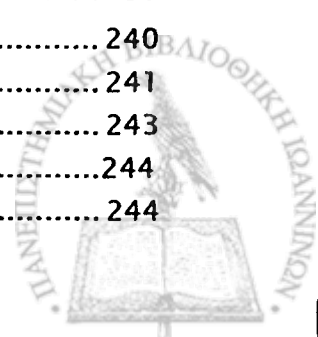
Αντιδραστήρια	160
Διαλύματα εργασίας	161
Πειραματική διαδικασία	162
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	163
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΙΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ PLASE A ₂ ΚΑΙ PAF-ACH	164
Αντιδραστήρια	164
Διαλύματα	164
Πειραματική πορεία	165
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ PLASE A ₂ ΚΑΙ PAF-ACH ΟΡΡΟΥ..	
.....	165
Πειραματική πορεία	165
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BUGH-DYER	166
Αρχή της μεθόδου	166
Αντιδραστήρια	167
Πειραματική πορεία	167
Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC	167
Αρχή της μεθόδου	167
Υλικά	167
Διαλύματα	168
Πειραματική πορεία	168
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ	169
Αρχή της μεθόδου	169
Αντιδραστήρια	170
Διαλύματα εργασίας	170
Α) Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου λιπιδικού εκχυλίσματος	171
Πειραματική πορεία	171
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	172
Β) Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC	172
Πειραματική πορεία	172
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων	173
Παρατηρήσεις	173
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ PAF ΣΕ BAL, ΜΕ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	
ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ	173
Αντιδραστήρια	173
Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού	174
Διαλύματα	174
Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)	175
Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων	177
Αρχή της μεθόδου	177
Υλικά-αντιδραστήρια	178
Διαλύματα	178
Πρότυπα διαλύματα PAF	178
Παρατηρήσεις	179
Πειραματική πορεία	179
ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (ELISA)	182



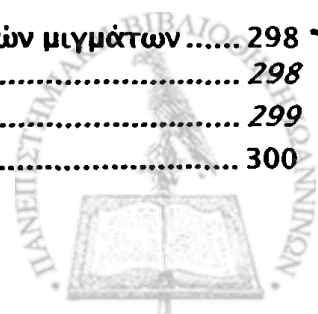
Αρχή της μεθόδου	182
Αντιδραστήρια	183
Διαλύματα εργασίας	185
Πειραματική πορεία	186
<i>Επίστρωση των πλακιδίων με λιπίδια</i>	186
<i>Προσθήκη δειγμάτων BAL ή ορού</i>	186
<i>Επώαση με αντι-ανθρώπινα IgG αντισώματα</i>	186
<i>Ανίχνευση δεσμευμένων αντισωμάτων</i>	187
Επεξεργασία αποτελεσμάτων	187
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ 12 % ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)	187
Αρχή της μεθόδου	187
Αντιδραστήρια	188
Διαλύματα εργασίας	189
Πειραματική πορεία	190
<i>Παρασκευή των πηκτωμάτων</i>	190
<i>Προετοιμασία των δειγμάτων</i>	192
<i>Τοποθέτηση των δειγμάτων</i>	192
<i>Χρώση των πρωτεϊνών του πηκτώματος</i>	192
<i>Αποχρωματισμός του πηκτώματος</i>	193
<i>Στέγνωμα και στερέωση του πηκτώματος</i>	193
ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ IgG	193
Αρχή της μεθόδου	193
Αντιδραστήρια-υλικά	194
Διαλύματα εργασίας	194
Πειραματικό μέρος	195
<i>Προετοιμασία της μεμβράνης PVDF</i>	195
<i>Μεταφορά των πρωτεϊνών</i>	195
<i>Σήμανση των IgG στη μεμβράνη</i>	195
<i>Εμφάνιση των IgG</i>	196
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ IgG ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G-ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ	196
Αρχή της μεθόδου	196
Αντιδραστήρια-υλικά	197
Διαλύματα εργασίας	197
Πειραματική πορεία	198
<i>Προετοιμασία της στήλης</i>	198
<i>Προετοιμασία του δείγματος</i>	198
<i>Προετοιμασία στήλης, φόρτωση δείγματος</i>	199
<i>Έκλουση και συλλογή των IgG</i>	199
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G-ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ BSA	199
Παρασκευή διαλυμάτων BSA με πρότυπα λιπίδια	199
<i>Χοληστερόλη σε διάλυμα BSA</i>	199
<i>Μίγμα λιπιδίων σε διάλυμα BSA 2.5 mg/ml</i>	200
<i>3 μίγματα λιπιδίων σε διάλυμα BSA 4 mg/ml</i>	201



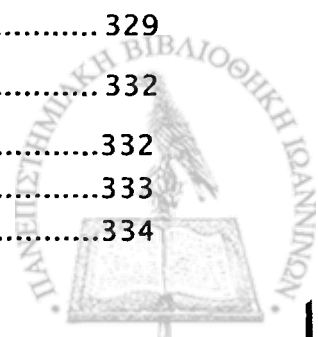
Συλλογή κλάσματος που κατακρατήθηκε από τη στήλη.....	202
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ IgG (ΜΕΘΟΔΟΣ BLIGH-DYER).....	202
Πειραματική πορεία.....	202
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPTLC).....	202
Αρχή της μεθόδου.....	202
Υλικά-Αντιδραστήρια.....	202
Διαλύματα.....	203
Πειραματική πορεία.....	203
<i>Τοποθέτηση δειγμάτων</i>	203
<i>Θάλαμοι ανάπτυξης</i>	204
<i>Εμφάνιση λιπιδίων</i>	204
ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC/MS).....	205
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	206
1) ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	206
Μελέτη συμπεριφοράς των προτύπων NBD-λιπιδίων.....	206
<i>Έλεγχος καθαρότητας των NBD-λιπιδίων</i>	206
Φάσματα διέγερσης και εκπομπής.....	208
<i>Εκχύλιση των NBD-λιπιδίων από υδατικό διάλυμα</i>	215
<i>Προσδιορισμός κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης</i>	215
Επίδραση διαφόρων παραμέτρων στο φθορισμό των NBD-λιπιδίων.....	216
<i>Συστατικά του μίγματος αντίδρασης</i>	217
<i>Θερμοκρασία</i>	218
<i>Υπέρηχοι</i>	218
<i>pH</i>	219
<i>Επίδραση BSA στο φθορισμό των αυθεντικών NBD-PCs</i>	222
<i>Επίδραση BAL, ορρού και BSA στο φθορισμό των αυθεντικών NBD-λιπαρών οξέων</i>	227
<i>Επίδραση του BAL στο φθορισμό των NBD-PCs</i>	228
Προσδιορισμός ενεργότητας PLase A ₂ σε BAL.....	230
<i>BAL και παγκρεατική PLase A₂</i>	231
Καμπύλες αναφοράς.....	231
<i>C₆- και C₁₂-NBD-FAs</i>	231
<i>C₆- και C₁₂-NBD-PC</i>	233
Πειράματα αναφοράς με παγκρεατική PLase A ₂ εμπορίου και PAF-AcH ανθρωπίνου ορρού.....	233
<i>Εξειδίκευση υποστρώματος και ο ρόλος του Ca²⁺</i>	234
Εξειδίκευση υποστρώματος για την PAF-AcH του BAL.....	236
Αναστολείς.....	237
<i>Ραδιομετρικά πειράματα παγκρεατικής PLase A₂ παρουσία φθοριζόντων υποστρωμάτων</i>	239
Ταυτόχρονος προσδιορισμός PAF-AcH και παγκρεατικής PLase A ₂	240
Ταυτόχρονος προσδιορισμός των PAF-AcH και PLase A ₂ του BAL.....	241
PLases A ₂ στο BAL.....	243
2) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS.....	244
Πρωτόκολλο μελέτης.....	244



<i>Ασθενείς</i>	244
Κλινικές μετρήσεις	246
<i>Διαδικασία λήψης του BAL</i>	247
<i>ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</i>	248
<i>ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ</i>	249
<i>ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ</i>	250
<i>ΕΙΔΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ BAL</i>	251
<i>ΕΠΙΠΕΔΑ ΡΑΦ ΚΑΙ ΡΑΦ-Α₂Η</i>	257
<i>Φωσφολιπάση A₂</i>	259
<i>ΚΥΤΤΑΡΑ</i>	261
<i>ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ</i>	265
3) <i>ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΥΤΟ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ BAL</i>	269
<i>Ασθενείς</i>	269
<i>Ανίχνευση IgG στο BAL</i>	270
<i>Απομόνωση των IgG με στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G</i>	272
<i>Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL</i>	273
<i>ELISA με καθαρισμένες IgG</i>	276
<i>ELISA με BAL και αυξημένες συγκεντρώσεις PA</i>	278
4) <i>ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ BAL ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΑΝΤΙ-ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΑΝΕΠΤΥΞΕ ARDS</i>	279
<i>Ασθενής</i>	279
<i>Κύτταρα</i>	280
<i>Πρωτεΐνες και αλβουμίνη</i>	281
<i>Φωσφολιπίδια</i>	282
<i>Επίπεδα ΡΑΦ</i>	284
<i>Ανίχνευση των IgG στο BAL με APLAS</i>	285
<i>Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL με APLAS</i>	287
<i>Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στον ορρό</i>	288
5) <i>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΑ IgG ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΚΛΟΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΤΗΛΗ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G</i>	289
<i>Συνοπτικά</i>	289
<i>BAL και ορροί ασθενών</i>	290
<i>Καθαρισμός των IgG από BAL και ορρούς</i>	290
<i>SDS-PAGE κλασμάτων IgG</i>	292
<i>Εκχύλιση λιπιδίων και HPTLC του κλάσματος που συγκρατήθηκε από τη στήλη</i>	292
<i>ELISA δειγμάτων BAL και ορρών</i>	293
<i>Μίγματα προτύπων λιπιδίων με BSA</i>	295
<i>Ανάπτυξη ουδετέρων λιπιδίων</i>	295
<i>Ανάπτυξη πολικών λιπιδίων</i>	296
<i>SDS-PAGE εκλούσματος</i>	297
<i>Διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδικών μιγμάτων</i>	298
<i>Ανάπτυξη πολικών λιπιδίων του εκλούσματος</i>	298
<i>Ανάπτυξη ουδετέρων λιπιδίων του εκλούσματος</i>	299
<i>Εκχύλιση του R₁της χοληστερόλης των δειγμάτων</i>	300



<i>φάσματα μάζας (MS)</i>	300
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	305
1) ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	305
ΚΡΙΣΙΜΗ ΜΙΚΥΛΛΙΑΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ.....	305
ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΚΑΙ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ.....	306
ΦΑΣΜΑΤΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ.....	307
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΤΩΝ NBD-ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	307
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΡΗ.....	307
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ.....	308
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ.....	308
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ.....	309
Επίδραση αλβουμίνης.....	309
Υπολογισμός δεσμευτικής ικανότητας της BSA.....	310
Επίδραση του BAL ή του ορρού.....	311
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	312
ΔΙΑΦΟΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΝΖΥΜΩΝ.....	313
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....	313
ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	314
2) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS.....	314
ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	315
ΕΠΙΠΕΔΑ PAF ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-ACH.....	316
ΚΥΤΤΑΡΑ.....	317
ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	317
Μεταβολές στα είδη των φωσφολιπιδίων.....	318
PC.....	319
Λυσο-PC.....	319
PG.....	320
Sph, PE, PS,.....	320
PI.....	321
ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ BAL.....	321
ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A ₂ (PLase A ₂).....	322
Κατανομή ενεργότητας PLase A ₂	324
3) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS.....	324
ELISA.....	324
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΩΝ ICG.....	325
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ BAL ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ PA.....	325
4) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (APLAS) ΚΑΙ ARDS.....	326
ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	327
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ APL ΣΤΟ BAL.....	328
5) ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G.....	329
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	332
ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	332
ARDS.....	333
ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G.....	334



RESUME.....	335
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	340
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	342
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΟΡΩΝ.....	349
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	289



ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της συνεισφοράς βιοχημικών και ανοσοχημικών παραμέτρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) στη διαδικασία εξέλιξης του Συνδρόμου Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) και η ανεύρεση προγνωστικών δεικτών της εξέλιξης της νόσου. Για το σκοπό αυτό έγινε:

- ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας φθορισμομετρικής μεθόδου για την ανίχνευση και διαφορικό προσδιορισμό των ενεργοτήτων της φωσφολιπάσης A_2 (PLase A_2) και PAF-ακετυλυδρολάσης (PAF-AcH) σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και ορό αίματος,
- προσδιορισμός των πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων, δεικτών φλεγμονώδους αντίδρασης όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), η PLase A_2 και οι μεταβολές των κυττάρων στο BAL κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του ARDS,
- διερεύνηση της ύπαρξης και εξειδίκευσης αυτοαντισωμάτων κατά φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με ARDS,
- προσδιορισμός των βιοχημικών χαρακτηριστικών, ανίχνευση και έλεγχος εξειδίκευσης αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο BAL ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS) και ARDS και τέλος
- μελέτη εάν η χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνη G καθαρίζει τις ανοσοσφαιρίνες G των βιολογικών υγρών από τα λιπίδια.



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ
ΜΕΘΟΔΟΥ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ

Ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟΣ ΚΑΡΤΟΣ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (ΕΚΔΕΛ) ΕΙΣ
ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΝ ΜΕΘΟΔΟΝ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ

ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ (ΗΜΕΡΑ - ΚΑΤΗΜΕΡΑ)

ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ (ΗΜΕΡΑ - ΚΑΤΗΜΕΡΑ)

ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ (ΗΜΕΡΑ - ΚΑΤΗΜΕΡΑ)

ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΤΕΤΑΡΤΟΒΑΘΜΙΑΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ (ΗΜΕΡΑ - ΚΑΤΗΜΕΡΑ)

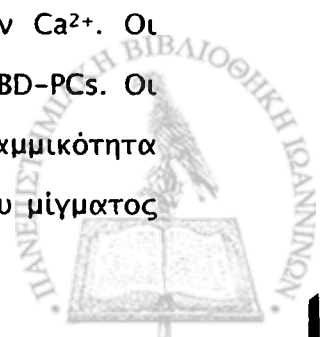
ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
ΕΙΣ ΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΙΝ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΒΑΘΜΙΑΣ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΩΣ (ΗΜΕΡΑ - ΚΑΤΗΜΕΡΑ)



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της συνεισφοράς βιοχημικών και ανοσοχημικών παραμέτρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) στη διαδικασία εξέλιξης του Συνδρόμου Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) και η ανεύρεση προγνωστικών δεικτών της εξέλιξης της νόσου. Για το σκοπό αυτό έγινε: α) ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας φθορισμομετρικής μεθόδου για την ανίχνευση και διαφορικό προσδιορισμό των ενεργοτήτων της φωσφολιπάσης A_2 (PLase A_2) και PAF-ακετυλιδρολάσης (PAF-AcH) σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και ορρό αίματος, β) προσδιορισμός των πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων, δεικτών φλεγμονώδους αντίδρασης όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), η PLase A_2 και οι μεταβολές των κυττάρων στο BAL κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του ARDS, γ) διερεύνηση της ύπαρξης και εξειδίκευσης αυτοαντισωμάτων κατά φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με ARDS, δ) προσδιορισμός των βιοχημικών χαρακτηριστικών, ανίχνευση και έλεγχος εξειδίκευσης αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο BAL ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και ARDS και τέλος ε) μελέτη εάν η χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνη G καθαρίζει τις ανοσοσφαιρίνες G των βιολογικών υγρών από τα λιπίδια.

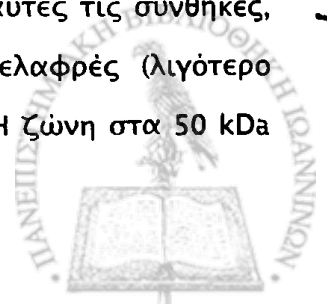
α) Αρχικά έγινε ανάπτυξη φθορισμομετρικής μεθόδου για μέτρηση ενεργότητας PLase A_2 και PAF-AcH σε βιολογικά υγρά. Η PLase A_2 προσδιορίστηκε με τη χρήση της C_{12} -NBD-φωσφατιδυλοχολίνης παρουσία Ca^{2+} , από την κλίση της καμπύλης αύξησης της έντασης φθορισμού λόγω του σχηματισμού του C_{12} -NBD-λιπαρού οξέος. Η PAF-AcH προσδιορίστηκε με τη χρήση της C_6 -NBD-φωσφατιδυλοχολίνης, από την κλίση της καμπύλης λόγω του σχηματισμού του C_6 -NBD-λιπαρού οξέος απουσία Ca^{2+} . Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μετά από ανάλυση TLC. Εκτιμήθηκε η εξειδίκευση της μεθόδου σε σύγκριση με ραδιομετρικό προσδιορισμό. Στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή από σκέδαση του φωτός ούτε φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου. Διερευνήθηκε η επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και των ιόντων Ca^{2+} . Οι πρωτεΐνες προκάλεσαν μια αρχική αύξηση του φθορισμού των δύο NBD-PCs. Οι πρότυπες καμπύλες των NBD-λιπαρών οξέων είχαν όμοια κλίση. Η γραμμικότητα επεκτάθηκε μέχρι τουλάχιστον τα 4.5 nmoles λιπαρού οξέος ανά ml του μίγματος



αντίδρασης σε pH 7.4. Ο φθορισμός των NBD-λιπαρών οξέων παρέμεινε σταθερός για αυξανόμενες συγκεντρώσεις του BAL και του ορρού καθώς και για BSA μέχρι τα 100 µg/ml του μίγματος αντίδρασης. Η παγκρεατική PLase A₂ έδειξε προτίμηση στην υδρόλυση της C₁₂-NBD-PC παρουσία Ca²⁺, ενώ απουσία Ca²⁺ η PAF-AcH υδρόλυσε μόνο την C₆-NBD-PC. Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη, ακριβής και επαναλήψιμη και μπορεί να εφαρμοστεί για το διαφορικό προσδιορισμό της PLase A₂ και της PAF-AcH στο BAL και στον ορρό. Ακολούθως, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας PLase A₂ σε BAL ασθενών με ARDS.

β) Σε 19 μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς με ARDS και 10 ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση (ομάδα ελέγχου), έγινε λήψη BAL κατά τη διάρκεια της πρώιμης, ενδιάμεσης και όψιμης φάσης του ARDS. Υψηλά επίπεδα PAF, PLase A₂, ουδετερόφιλων και πρωτεϊνών καθώς και ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων ανιχνεύθηκαν στο BAL ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα του PAF, των ουδετερόφιλων και των πρωτεϊνών βρέθηκαν υψηλότερα στο πρώιμο σε σύγκριση με το ενδιάμεσο ή το όψιμο ARDS. Τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων παρουσίασαν αύξηση στην πρώιμη και μείωση στην ενδιάμεση και όψιμη φάση του συνδρόμου. Οι ποιοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνίστανται σε μειωμένα επίπεδα φωσφολιπιδίων στο κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Επιπλέον, υπήρξε μια σημαντική μείωση στο ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλογλυκερόλης και αύξηση στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλινοσιτόλη και σφιγγομυελίνη σε όλες τις φάσεις του ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη ήταν ανιχνεύσιμη μόνο στην όψιμη φάση του συνδρόμου. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες που μεταβλήθηκαν θα μπορούσαν να έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και εξέλιξη της νόσου.

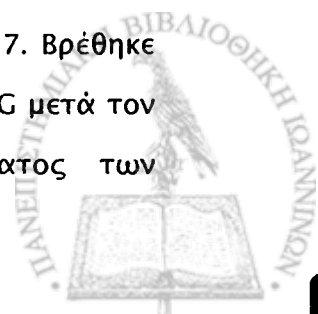
γ) Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η παρουσία αυτοαντισωμάτων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με ARDS. Το BAL αναλύθηκε αρχικά με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του και ανοσοαποτύπωση των ανοσοσφαιρινών G (IgG) χρησιμοποιώντας αντι-ανθρώπινα-IgG αντισώματα. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι IgGs εμφάνισαν δύο ζώνες πρωτεϊνών, τις βαριές και ελαφρές (λιγότερο σημασμένες) αλυσίδες των IgG, στα 50 και 25 kDa αντίστοιχα. Η ζώνη στα 50 kDa



ανιχνεύθηκε στο BAL όλων των ασθενών με ARDS, ενώ η ζώνη στα 25 kDa δεν ήταν πάντα ορατή. Υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών G έναντι διαφόρων φωσφολιπιδίων ανιχνεύθηκαν στο BAL των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η δέσμευση των αντισωμάτων του BAL με ELISA παρατηρήθηκε για διάφορα φωσφολιπίδια. Τα αυτοαντισώματα δεσμεύτηκαν με PS ή PG, ή μερικές φορές με PI, αλλά όλα αντέδρασαν με το φωσφατιδικό οξύ, πιθανώς διότι το PA είναι κοινό τμήμα όλων των ανιονικών φωσφολιπιδίων. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική δέσμευση με σφισγομυελίνη ή με PC και PE. Ασθενής δέσμευση παρουσιάστηκε με τη χοληστερόλη όχι όμως με την εστεροποιημένη χοληστερόλη. Τα καθαρισμένα αντισώματα από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G, παρουσίασαν την ίδια προτίμηση για PS και PA υποδεικνύοντας ότι αυτά τα αντι-λιπιδικά αντισώματα αναγνωρίζουν τα λιπίδια που δοκιμάστηκαν απουσία οποιουδήποτε συμπαράγοντα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι αυτοαντισώματα υπάρχουν στο BAL ασθενών με ARDS και κατευθύνονται κατά των ανιονικών φωσφολιπιδίων και αυτό μπορεί να υποδηλώνει συμμετοχή αυτοάνοσων μηχανισμών στην παθογένεση της ανεπάρκειας του επιφανειοδραστικού παράγοντα ή διαίωνιση της φλεγμονώδους αντίδρασης στο επίπεδο του πνευμονικού παρεγχύματος.

δ) Μελετήθηκαν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, η ύπαρξη και εξειδίκευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS) και ARDS. Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα βρέθηκαν στο BAL ασθενούς με APLAS. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης, φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδικού οξέος. Παρατηρήθηκε επίσης ποιοτική και ποσοτική ανεπάρκεια των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και αυξημένα επίπεδα ουδετερόφιλων.

ε) Κατά τη διάρκεια της μελέτης εάν η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας πρωτεΐνης G καθαρίζει τις περιεχόμενες ανοσοσφαιρίνες G βιολογικών υγρών από τα λιπίδια, διάφορα δείγματα BAL και ορών καθώς και διάφορα λιπίδια δεσμευμένα με αλβουμίνη περάστηκαν από τη στήλη. Η έκλουση του υλικού που συγκρατήθηκε από τη στήλη έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης pH 2.7. Βρέθηκε ότι όλα τα δείγματα BAL που δοκιμάστηκαν περιείχαν υψηλά επίπεδα IgG μετά τον χρωματογραφικό καθαρισμό. Στο λιπιδικό εκχύλισμα του κλάσματος των



εκλουομένων IgG ανιχνεύθηκαν, μετά από διαχωρισμό ΗΡΤLC, ουδέτερα λιπίδια και ίχνη πολικών λιπιδίων. Τα πολικά λιπίδια μετατοπίστηκαν στο R_f της PC και PS, ενώ η ανάλυση των ουδετέρων λιπιδίων έδειξε την παρουσία ενός λιπιδίου που μετατοπίστηκε στο R_f της χοληστερόλης. Χημικός χαρακτηρισμός αυτού του συστατικού με φασματομετρία μάζας απέδειξε ότι ήταν πράγματι η χοληστερόλη. Όταν πρότυπα διαλύματα χοληστερόλης με BSA χρωματογραφήθηκαν από τη στήλη πρωτεΐνης G, βρέθηκε ότι το έκλουσμα περιείχε χοληστερόλη όχι όμως ανιχνεύσιμες με ανάλυση SDS-ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ποσότητες BSA. Όταν αυξανόμενες συγκεντρώσεις μίγματος λιπιδίων σε διάλυμα BSA διαπέρασαν τη στήλη, παρατηρήθηκε ότι το λιπιδικό εκχύλισμα του εκλούσματος με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης pH 2.7 περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις χοληστερόλης. Επίσης, ανιχνεύθηκαν σε αυτό PC, PS, PG και PE. Συμπερασματικά, το κλάσμα των καθαρισμένων IgG δειγμάτων BAL ή ορρών, περιέχει, εκτός από τις ανοσοσφαιρίνες, ίχνη φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης ως το κύριο λιπίδιο.

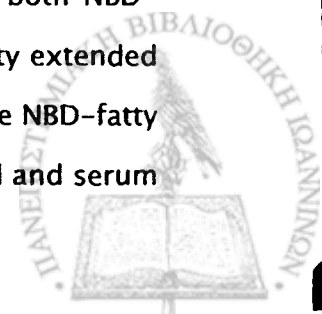


SUMMARY

The purpose of the present study was the investigation whether biochemical and immunochemical parameters of bronchoalveolar lavage contribute to the evolution processes of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and the research for prognostic markers of the evolution of the syndrome. In this direction, the aim of the study was:

a) To develop and evaluate a fluorimetric method for the screening and differential determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase in Bronchoalveolar Lavage (BAL) fluid and serum, b) to determine the concentration of proteins and phospholipids, markers of inflammatory reaction such as platelet-activating factor (PAF), PLase A₂ and cell alterations in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid during the evolution of the acute respiratory distress syndrome (ARDS), c) to investigate the presence and specificity of autoantibodies in bronchoalveolar lavage fluid from patients with ARDS, d) to determine the biochemical characteristics, the existence of antiphospholipid antibodies and their specificity in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from a patient with both antiphospholipid antibodies syndrome (APLAS) and ARDS and finally e) to investigate whether protein G affinity chromatography purifies the immunoglobulin G content of biological fluids from lipids.

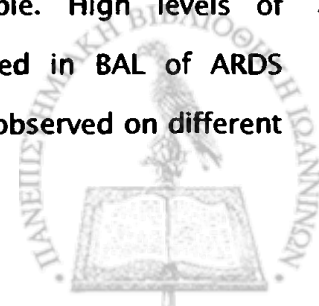
a) In the beginning, we developed a fluorimetric method for the measurement of phospholipase A₂ and PAF-AcH activities in biological fluids. Phospholipase A₂ was determined using C₁₂-NBD-PC in the presence of Ca²⁺, from the slope of the fluorescence enhancement due to the formation of C₁₂-NBD-fatty acid. PAF-acetylhydrolase was determined using C₆-NBD-PC, from the slope of the curve due to C₆-NBD-fatty acid formation in the absence of Ca²⁺. The results were confirmed after TLC analysis. The method's selectivity was evaluated by comparing to radiometric measurements. Light scattering did not interfere and inner filter effect was not observed under our experimental conditions. The effect of pH, temperature, Ca²⁺ was investigated. Protein caused an increase in the background fluorescence of both NBD-PCs. Both NBD-fatty acids' standard curves exhibited the same slope. Linearity extended at least up to 4.5 nmoles per ml of reaction mixture at the normal pH 7.4. The NBD-fatty acids' fluorescence remained stable for increasing concentrations of BAL fluid and serum



and for BSA up to 100 µg/ml of reaction mixture. Porcine pancreatic PLase A₂ showed preference for C₁₂-NBD-PC in the presence of Ca²⁺, while without Ca²⁺, serum PAF-AcH hydrolysed only C₆-NBD-PC. The method is highly sensitive, accurate and reproducible and can be applied for the differential determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase activities in BAL fluid and serum. Particularly, this method was used in this study for the measurement of phospholipase A₂ activity in BAL fluids from patients with ARDS.

b) In 19 mechanically ventilated patients, 9 patients with ARDS and 10 patients without cardiopulmonary disease (controls), BAL was performed during the early, intermediate, and late phases of ARDS. High levels of PAF, PLase A₂, an increase in neutrophils and proteins, and quantitative as well as qualitative alterations in phospholipids in BAL fluid were observed in ARDS patients compared to the control group. PAF, proteins, and neutrophils were higher in early ARDS than in intermediate or late ARDS. The surfactant pool increased in the early phase and decreased in the intermediate or late phase of the syndrome. The qualitative alterations of surfactant consisted of reduced phospholipid content in the surfactant structures with good surface properties. Moreover, there was a considerable decrease in the percentage of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol, followed by an increase in phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and sphingomyelin in all three phases of ARDS compared to the control group. Lyso-phosphatidylcholine was detectable only in late ARDS. All the above factors, undergoing quantitative alterations during the course of ARDS, could have a significant role in the pathogenesis and evolution of the syndrome.

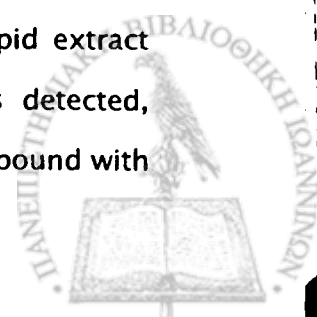
c) Afterwards, the presence and specificity of autoantibodies in bronchoalveolar lavage fluid from patients with ARDS was investigated. Bronchoalveolar lavage fluids were first analyzed by electrophoresis and immunoblotting, using anti-immunoglobulin G antibodies in order to detect any eventual immunoglobulin G (IgG). Under the conditions used, IgG were expected to show 2 bands: one for the heavy chains at 50 kDa and one (less labeled) for the light chains at 25 kDa; the band at 50 kDa was observed for all patients and that for 25 kDa was not always visible. High levels of immunoglobulin G towards different phospholipids were detected in BAL of ARDS patients compared to control patients. ELISA antibody binding was observed on different



phospholipids. Generally, antibodies bound PS or PG, or, exceptionally PI, but all reacted with PA, probably because the structure and charge of PA is the common part of all anionic phospholipids. No significant reaction was observed with sphingomyelin or with zwitterionic phospholipids PC and PE. A weak binding was observed for cholesterol but not for esterified cholesterol. Purified antibodies from sepharose-protein G affinity column showed the same preference towards PS and PA phospholipids suggesting that the anti-lipid antibodies evidenced in this study, recognize the lipids tested in the absence of any cofactor. These results show that autoantibodies are present in BAL of ARDS patients, they are directed against anionic phospholipids and this may suggest involvement of autoimmune mechanisms in the pathogenesis of surfactant deficiency, or perpetuation of the inflammatory reaction at the lung parenchyma level.

d) The biochemical characteristics, the existence of antiphospholipid antibodies and their specificity in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from a patient with both antiphospholipid antibodies syndrome (APLAS) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) were investigated. Antiphospholipid antibodies were found to be present in BAL fluid from patient with APLAS. Especially anticardiolipin, antiphosphatidylserine and antiphosphatidic acid IgG antibodies (Abs) were detected in high levels in BAL fluid from the patient with APLAS. A quantitative as well as qualitative deficiency of surfactant phospholipids was also observed.

e) Finally, during the investigation whether protein G affinity chromatography purifies the immunoglobulin G content of biological fluids from lipids, BAL fluid and serum samples or various lipids bound to bovine serum albumin were loaded on the column. Elution of the retained material was performed with a glycine-HCl buffer solution pH 2.7. The eluent was analysed by HPTLC and SDS-PAGE. Analysis of the neutral lipids detected in the eluent was performed by gas chromatography/mass spectrometry. It was found that all the samples of BAL fluid tested had high amounts of IgGs after protein G-sepharose affinity purification. The lipid profile after polar HPTLC separation, from the recovered IgG fractions of BAL fluids and sera revealed the presence of neutral lipids and trace amounts of polar lipids. The polar lipids migrated to the R_f values of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS). When the lipid extract was developed in the neutral solvent system, only one lipid residue was detected, migrating to the R_f value of cholesterol. Chemical characterization of this compound with



mass spectrometry confirmed that it was cholesterol. It was observed that when the BSA-cholesterol standard solution was applied to protein-G-sepharose column and eluted, the eluent contained cholesterol, but not detectable quantities of BSA. 3 mixtures of BSA with increasing concentrations in standard lipids passed through the protein G-sepharose column. The levels of the unbound albumin were continuously monitored with a UV detector. When protein was no more detected, the buffer was changed so as the bound substances to be eluted. The lipid extract of this fraction revealed increasing amounts of the substance with the same R_f to cholesterol. In addition, PC, PS, PG and PE were also detected. In conclusion, the eluted IgG fraction from human serum or BAL, apart from immunoglobulins, contains traces of phospholipids and cholesterol as a major lipid contaminant.



ΣΥΝΤΥΜΗΣΕΙΣ

A₄₇₅, Απορρόφηση στα 475 nm

AACOCF₃, ή AATTFMK, αραχιδονυλο-τριφθορο-μεθυλο-κετόνη

aCL (anticardiolipin autoantibodies), αυτοαντισώματα κατά της καρδιολιπίνης

ADP (Adenosine diphosphate), Διφωσφορική αδενοσίνη

ALI (Acute Lung Injury), Οξεία Πνευμονική Βλάβη

aPL (antiphospholipids autoantibodies), αυτοαντισώματα κατά φωσφολιπιδίων

APLAS (Antiphospholipid Antibody Syndrome), Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο

ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας

αSpG-Fc, τμήμα της πρωτεΐνης G του στρεπτόκοκκου το οποίο δεσμεύει την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών, προϊόν γενετικού ανασυνδυασμού

β₂-GPI (β₂-Glycoprotein I), β₂-Γλυκοπρωτεΐνη I

BAL (Bronchoalveolar Lavage), Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

BCG (Bromocresol green), Πράσινο της βρωμοκρεσόλης

BEL (Bromo-enol-lactone), Βρωμοενολολακτόνη

BSA (Bovine Serum Albumin), Αλβουμίνη ορού βοός

C₁₂-NBD-FA, 12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid

C₁₂-NBD-PC, 1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine

C₆-NBD-FA, 6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoic acid

C₆-NBD-PC, 1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine

CaLB (Calcium Binding domain), Περιοχή δέσμευσης ασβεστίου

¹⁴C-DPPC, ιχνηθετημένη με ¹⁴C διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη

CDP (Cytidyl-diphosphate), Κυτιδυλο-διφωσφορικό οξύ

CI (Cardiac Index), Καρδιακός Δείκτης

CL (Cardiolipin), Καρδιολιπίνη

CMC (Critical Micellar Concentration), Κρίσιμη Μικυλλιακή Συγκέντρωση

CP (PhosphoCreatine), Φωσφοκρεατίνη

ĈPK (PhosphoCreatine Kinase), Κινάση της Φωσφοκρεατίνης

cPLase A₂ (cytosolic Phospholipase A₂), κυτοσολική Φωσφολιπάση A₂



cpm (counts per minute), κρούσεις ανά λεπτό

Crs (Compliance of the Respiratory System), Διατασιμότητα του Αναπνευστικού Συστήματος

DAG (Diacylglycerol), Διακυλογλυκερόλη

DFP (diisopropyl-fluoro-phosphate), Διisοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό οξύ

DLPE, 1-παλμιτυλο-2-λινολεοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλαιθανολαμίνη

DPPC (Dipalmitoyl-phosphatidylcholine), Διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη

DSPC (Disaturated-phosphatidylcholine), Δικορεσμένη-φωσφατιδυλοχολίνη

EDTA (Ethylene-diamine-tetra-acetic acid), Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ

EGF (Epidermal Growth Factor), Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Ανοσοενζυμική μέθοδος στερεάς φάσης

Fab (Fragment antigen-binding), τμήμα του μορίου της ανοσοφαιρίνης το οποίο δεσμεύεται με αντιγόνο

Fc (Fragment crystallizable), τμήμα του μορίου της ανοσοφαιρίνης το οποίο δεν παρουσιάζει ενεργότητα δέσμησης με αντιγόνο

FiO₂ (Fraction of Inspired Oxygen), Κλάσμα εισπνεόμενου Οξυγόνου

FPF (Fibroblast Pneumonocyte Factor), Παράγοντας Πνευμονοκυτταρικού Ινοβλάστη

FRC (Functional Residual Capacity), Λειτουργική Υπολειπόμενη Χωρητικότητα

GSH (Glutathione), Γλουταθειόνη

HDL (High Density Lipoprotein), Υψηλής Πυκνότητας Λιπόπρωτεΐνες

HETE, Υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), Υψηλής Απόδοσης Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος

HSA (Human Serum Albumin), Αλβουμίνη Ανθρώπινου Ορρού

¹²⁵I-HSA, Ιχνηθετημένη με ¹²⁵I ανθρώπινη αλβουμίνη του ορρού

IgG (Immunoglobulin G), Ανοσοσφαιρίνες G

IgA (Immunoglobulin A), Ανοσοσφαιρίνες A

IgE (Immunoglobulin E), Ανοσοσφαιρίνες E

IgM (Immunoglobulin E), Ανοσοσφαιρίνες E

IL-1 (Interleukin 1), Ιντερλευκίνη 1

IL-10 (Interleukin 10), Ιντερλευκίνη 10

IL-13 (Interleukin 13), Ιντερλευκίνη 13

IL-4 (Interleukin 4), Ιντερλευκίνη 4

IL-8 (Interleukin 8), Ιντερλευκίνη 8



SpG-Fab (Streptococcal protein G region which binds to Fab region of immunoglobulins), Τμήμα της πρωτεΐνης G του στρεπτόκοκκου το οποίο δεσμεύει την Fab περιοχή των ανοσοσφαιρινών

SpG-Fc (Streptococcal protein G region which binds to Fc region of immunoglobulins), Τμήμα της πρωτεΐνης G του στρεπτόκοκκου το οποίο δεσμεύει την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών

Sph (Sphingomyelin), Σφιγγομυελίνη

sPLase A₂ (secretory Phospholipase A₂), εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂

SvO₂ (mixed venous O₂ saturation), Κορεσμός μικτού φλεβικού αίματος

TAG, Τριγλυκερίδιο

TGF-β (Transforming Growth Factor), Παράγοντας ανάπτυξης β

TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), Αναστολέας της μεταλλοπρωτεΐνάσης των ιστών

TLC (Thin Layer Chromatography), Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

TNF (Tumor necrosis factor), Ογκονεκρωτικός Παράγοντας

TxA₂ (Thromboxan A₂), Θρομβοξάνιο A₂



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

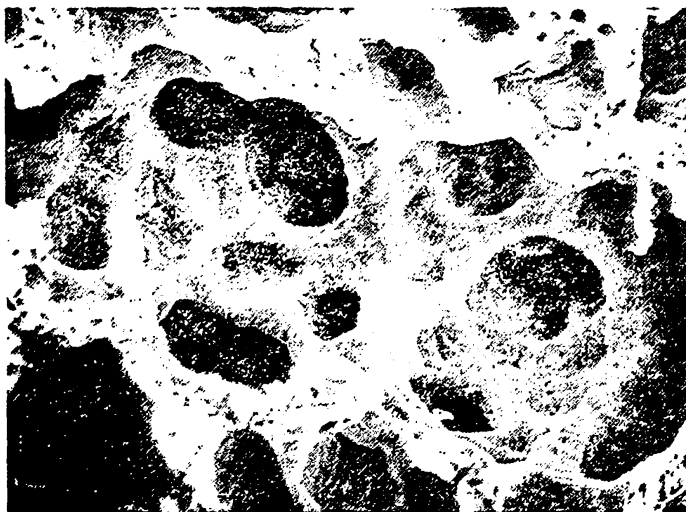
IL
IL
IL
IL



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1) ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ

Ο φυσιολογικός πνεύμονας ενήλικα ζυγίζει περίπου 300 με 400 g. Αποτελείται από τρεις λοβούς δεξιά (άνω, μέσο και κάτω) και δέκα βρογχοπνευμονικά τμήματα. Ο αριστερός αποτελείται από δύο λοβούς (άνω και κάτω) και εννέα βρογχοπνευμονικά τμήματα. Οι πνεύμονες έχουν διπλή παροχή αίματος, από την πνευμονική κυκλοφορία και από τις βρογχικές αρτηρίες. Η πνευμονική κυκλοφορία μεταφέρει το αίμα από τη δεξιά καρδιά διαμέσου της πνευμονικής αρτηρίας και των πνευμονικών φλεβών στον αριστερό κόλπο. Οι βρογχικές αρτηρίες αποτελούν μέρος της συστηματικής κυκλοφορίας. Συγκεκριμένα, προέρχονται από την αορτή και παρέχουν οξυγονωμένο αίμα στο πνευμονικό παρέγχυμα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πνευμονικό παρέγχυμα, δομή των κυψελίδων [1].

Οι πνεύμονες αποτελούνται από ένα σύστημα αγωγών μεταφοράς των εισπνεόμενων και εκπνεόμενων αερίων μεταξύ της ατμόσφαιρας και του κυψελιδικού χώρου. Μεταξύ κυψελιδικού χώρου και αίματος γίνεται παθητική ανταλλαγή αερίων (οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα). Το σύστημα αγωγών εκινάει σαν ένας σωλήνας ο οποίος διαιρείται συνεχώς για να σχηματίσει ολοένα και μικρότερης διαμέτρου αεραγωγούς, οι απολήξεις των οποίων είναι οι

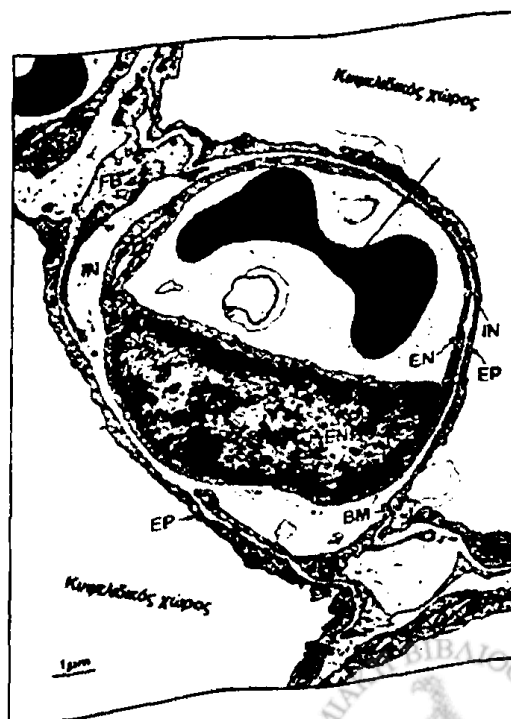
κυψελίδες. Οι κυψελίδες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του πνευμονικού ιστού και είναι δομές με λεπτά τοιχώματα που περιβάλλονται από πυκνό δίκτυο τριχοειδών αγγείων, τα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία. Αυτή η διευθέτηση παρέχει μια τεράστιας έκτασης επιφάνεια, ελάχιστου πάχους, ιδανική για την ανταλλαγή των αερίων. Η ανταλλαγή γίνεται με συνεχή διάχυση των αερίων διαμέσου της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης και με περιοδική αναπλήρωση των κυψελιδικών αερίων από την ατμόσφαιρα [2].

Οι κατώτεροι αεραγωγοί ξεκινούν από τον λάρυγγα, συνεχίζουν στην τραχεία και διαιρούνται σε ολοένα και μικρότερους αεραγωγούς μέχρι τα τελικά βρογχιόλια. Από τα τελικά βρογχιόλια και μετά θεωρείται ότι αρχίζει το πνευμονικό παρέγχυμα. Η διαίρεση αυτή είναι σχηματική. Το πνευμονικό παρέγχυμα είναι η περιοχή όπου πρακτικά αρχίζει η ανταλλαγή των αερίων και όχι η απλή μεταφορά τους. Τα τελικά βρογχιόλια διακλαδίζονται περαιτέρω σε αναπνευστικά βρογχιόλια, κυψελιδικούς σάκους, κυψελιδικούς πόρους και τέλος στις κυψελίδες.

ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ

Το τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα αποτελείται από το επιθήλιο, τη βασική μεμβράνη και το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Ηλεκτρονική μικρογραφία ενός πνευμονικού τριχοειδούς αγγείου στο κυψελιδικό τοίχωμα. Το βέλος δείχνει την πορεία διάχυσης του κυψελιδικού αέρα στο εσωτερικό ενός ερυθροκυττάρου, διαπερνώντας το στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα (δεν φαίνεται), το κυψελιδικό επιθήλιο (EP), το διάμεσο χώρο ή μεσοδιάστημα (IN), το ενδοθήλιο του τριχοειδούς (EN) και το πλάσμα. Φαίνονται επίσης, τμήματα κυττάρων που λέγονται ινοβλάστες (FB), η βασική μεμβράνη (BM) και ο πυρήνας ενός ενδοθηλιακού κυττάρου [3].



Κυψελιδικό επιθήλιο

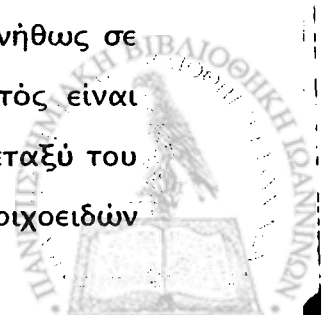
Το επιθήλιο γενικά, εκτός από σπάνιες εξαιρέσεις, επικαλύπτει όλες τις επιφάνειες του σώματος, κοιλότητες και σωληνώδεις αγωγούς. Λειτουργεί έτσι ως μεσόφαση μεταξύ των βιολογικών διαμερισμάτων. Οι επιθηλιακές μεσοφάσεις μετέχουν σε ευρέως φάσματος δραστηριότητες όπως απορρόφηση, έκκριση και προστασία. Το επιθήλιο αποτελείται από ένα ή περισσότερα στρώματα κυττάρων. Όλο το επιθήλιο υποστηρίζεται από μια μεμβράνη μεταβλητού πάχους.

Το κυψελιδικό επιθήλιο λοιπόν, σχηματίζει μια κυψελδική επένδυση και αποτελείται από κύτταρα δύο τύπων. Η μεγαλύτερη κυψελδική επιφάνεια καλύπτεται από μεγάλα, επίπεδα κύτταρα, τα πνευμονοκύτταρα τύπου I. Ένας δεύτερος τύπος επιθηλιακών κυττάρων είναι τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (βλ. σελ. 32, Εικόνα 4). Αυτά τα κύτταρα έχουν σφαιρικό σχήμα και έτσι καλύπτουν μικρότερη κυψελδική επιφάνεια (περίπου 3%). Τα πνευμονοκύτταρα τύπου I αποτελούν μέρος του εξαιρετικά λεπτού φράγματος διάχυσης των αερίων, ενώ τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι αυτά που παράγουν και εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα, ένα πολύ σημαντικό επιφανειοδραστικό υλικό το οποίο μειώνει την επιφανειακή τάση στις κυψελίδες (βλ. σελ. 5).

Κυψελδικά τριχοειδή αγγεία

Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζουν μια σειρά διακλαδιζόμενων σωληνώσεων από την πνευμονική αρτηρία μέχρι τα τριχοειδή αγγεία, στη συνέχεια τα τριχοειδή αγγεία μεταπίπτουν στα φλεβικά τριχοειδή αγγεία και τελικά σχηματίζουν τις πνευμονικές φλέβες. Τα τριχοειδή αγγεία σχηματίζουν ένα πολύ πυκνό πλέγμα μέσα στο τοίχωμα κάθε κυψελίδας [4]. Η διάμετρος του κάθε τριχοειδούς αγγείου στην απόληξή του είναι περίπου όση και ενός ερυθρού κυττάρου.

Τα μήκη κάθε τριχοειδικού τμήματος είναι τόσο μικρά ώστε το πυκνό δίκτυο να σχηματίζει μια συνεχή επιφάνεια αίματος στο κυψελδικό τοίχωμα, μια πολύ αποτελεσματική διάταξη για την ανταλλαγή των αερίων. Κάθε ερυθροκύτταρο βρίσκεται περίπου για ένα δευτερόλεπτο στο τριχοειδικό δίκτυο και συνήθως σε αυτό το διάστημα ταξιδεύει σε δύο ή τρεις κυψελίδες. Ο χρόνος αυτός είναι επαρκής για την εξισορρόπηση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ του κυψελδικού αέρα και του τριχοειδικού αίματος. Το εσωτερικό των τριχοειδών



αγγείων καλύπτεται από το ενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο μοιράζεται τη βασική μεμβράνη με το κυψελιδικό επιθήλιο (Εικόνα 2).

Η ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΔΥΝΑΜΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Παλαιότερα πιστευόνταν ότι η ελαστική επαναφορά των πνευμόνων οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στη διάταση των ελαστικών ινών του πνευμονικού παρεγχύματος. Ο von Neergaard απέδειξε το 1929 ότι μέρος της ελαστικής επαναφοράς οφείλεται στην επιφανειακή τάση των κυψελίδων [5].

Επιφανειακή τάση

Επιφανειακή τάση είναι η δύναμη (σε dynes) που δρα εγκάρσια σε μια υποθετική γραμμή (μήκους 1 cm) στην επιφάνεια ενός υγρού. Δημιουργείται επειδή οι δυνάμεις μεταξύ των μορίων ενός υγρού είναι πολύ πιο ισχυρές από αυτές μεταξύ υγρού και αερίου, με αποτέλεσμα η επιφανειακή έκταση του υγρού να τείνει να γίνει όσο το δυνατόν πιο μικρή. Έτσι για παράδειγμα η πίεση στο εσωτερικό μιας φυσαλίδας από σαπωνοδιάλυμα είναι πάντα μεγαλύτερη από την εξωτερική πίεση και εξαρτάται από την επιφανειακή τάση του υγρού και την ακτίνα της φυσαλίδας, σύμφωνα με το νόμο Laplace:

$P = 2T/R$	<u>P είναι η πίεση μέσα στη φυσαλίδα (dyn/cm²)</u>
	<u>T είναι η επιφανειακή τάση του υγρού (dyn/cm)</u>
	<u>R είναι η ακτίνα της φυσαλίδας (cm)</u>

Στο διεθνές σύστημα μονάδων (SI, System International) η πίεση εκφράζεται σε Pascals (Pa), η επιφανειακή τάση σε newtons/μέτρο (N/m) και η ακτίνα σε μέτρα (m). (Το mN/m είναι το ίδιο με τη dyn/cm). Ο κυψελιδικός χώρος των πνευμόνων μοιάζει με φυσαλίδες, παρότι ο κυψελιδικός αέρας συνδέεται με τον εξωτερικό χώρο με τους αεραγωγούς.

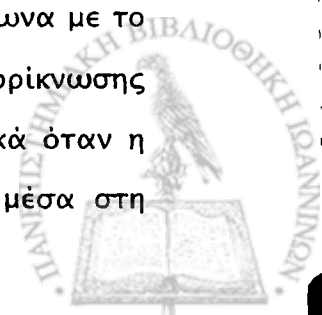


Επιφανειοδραστικό υλικό

Η χαμηλή επιφανειακή τάση του υγρού που επικαλύπτει τις κυψελίδες και η εξάρτηση αυτής από την επιφάνεια, οφείλεται σε ένα επιφανειακά δραστικό υλικό [6]. Αυτό είναι γνωστό ως **επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων** και αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια [7] (βλ. σελ. 7). Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που είναι υδρόφοβα κατευθύνονται προς την αέρια φάση, ενώ το άλλο άκρο του μορίου που είναι υδρόφιλο βρίσκεται στο υγρό που επικαλύπτει τις κυψελίδες. Έτσι, τα μόρια αυτά περιορίζονται στην επιφάνεια, όπου δρώντας ως απορρυπαντικά μειώνουν την επιφανειακή τάση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στη μεσόφαση. Κατά τη διάρκεια της εκπνοής, καθώς μικραίνει η επιφάνεια των κυψελίδων, τα μόρια του επιφανειοδραστικού παράγοντα συνωθούνται μεταξύ τους, ασκώντας έτσι αύξηση της επιφανειακής τάσης, η οποία στη συνέχεια τείνει να μειωθεί. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία στο χώρο έχουν δομές ευθύγραμμες, «πἀκετάρονται» μεταξύ τους πιο αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της εκπνοής από ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, των οποίων η δομή δεν είναι ευθύγραμμη. Έτσι, για την επίδραση στην επιφανειακή τάση, κυρίως ευθύνεται η διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC).

Η έξοδος υγρών από τα τριχοειδή αγγεία προς τον πνεύμονα (transudation, διίδρωση) επηρεάζεται επίσης από τις επιφανειοδραστικές δυνάμεις. Η επιφανειακή τάση διατηρεί την πίεση μέσα στο κυψελιδικό υγρό μικρότερη από την κυψελιδική πίεση. Αφού η πίεση των πνευμονικών τριχοειδών είναι μεγαλύτερη από την κυψελιδική πίεση αυτό θα ευνοούσε τη μεταφορά υγρών προς τις κυψελίδες. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας όμως μειώνοντας την επιφανειακή τάση, ελαττώνει τη διαφορά πίεσης και αποτρέπει αυτή τη μεταφορά των υγρών. Έτσι, ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να συνεισφέρει στη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος (βλ. σελ.18).

Οι επιφανειοδραστικές δυνάμεις επηρεάζουν επίσης το βαθμό ατελεκτασίας των κυψελίδων. Οι φυσαλίδες που βρίσκονται σε νερό για παράδειγμα, εξαφανίζονται πιο γρήγορα καθώς μικραίνει η ακτίνα τους, αφού σύμφωνα με το νόμο Laplace αυξάνει η πίεση στο εσωτερικό τους. Ο ρυθμός όμως της συρρίκνωσης των φυσαλίδων αυξάνεται προοδευτικά μέχρι να εξαφανιστούν ξαφνικά όταν η ακτίνα τους φτάσει μία ελάχιστη τιμή. Σε αυτό το στάδιο, η πίεση μέσα στη



Εισαγωγή. 1) Πνεύμονες

φουσαλίδα έχει γίνει τόσο υψηλή ώστε ο αέρας που περιέχεται μέσα σε αυτή να μεταφέρεται γρήγορα στο διάλυμα. Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει όταν υπάρχει επιφανειοδραστικός παράγοντας, όπου παρατηρείται απεριόριστη καθυστέρηση στην εξαφάνιση των πολύ μικρών φουσαλίδων. Το ίδιο γεγονός θα καθυστερούσε την απορρόφηση του αέρα από κατεστραμμένες κυψελίδες μικρού μεγέθους.



2) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (LUNG SURFACTANT)

ΣΥΣΤΑΣΗ

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων είναι μίγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που επικαλύπτει το εσωτερικό των πνευμόνων [8, 9]. Μειώνει την επιφανειακή τάση στις κυψελίδες και τις προστατεύει από τη σύγκλιση, ιδίως κατά το τέλος της εκπνοής [10, 11]. Επίσης ασκώντας πίεση στο επιθήλιο περιορίζει τη μεταφορά υγρών από τα τριχοειδή αγγεία στο διάμεσο χώρο και στις κυψελίδες [12].

Το μεγαλύτερο μέρος του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων αποτελείται από λιπίδια (~90%) [13, 14] (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Ανάλυση της σύνθεσης των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, για έναν μεγάλο αριθμό ζωντανών οργανισμών [8, 15, 16] έδειξε ότι το 80-90% των λιπιδίων της ενεργής επιφανειοδραστικής ουσίας είναι φωσφολιπίδια, ενώ η χοληστερόλη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των ουδέτερων λιπιδίων (βλ. σελ. 24).

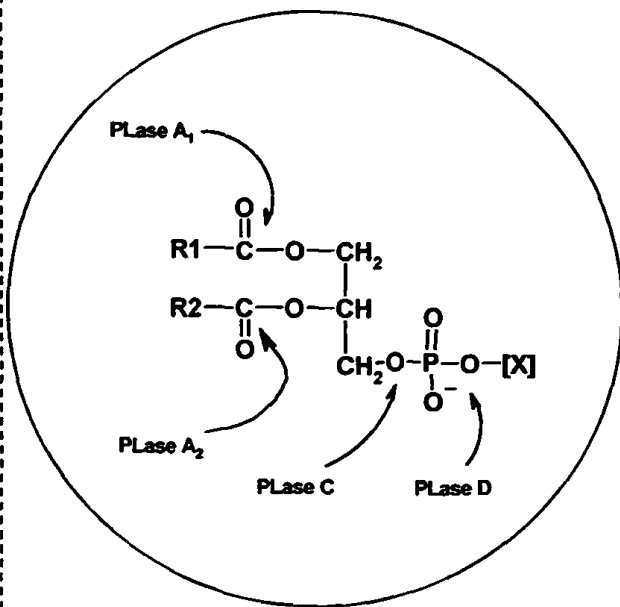
Πίνακας 1. Σύσταση λιπιδίων και πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

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

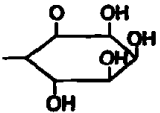


ΛΙΠΙΔΙΑ

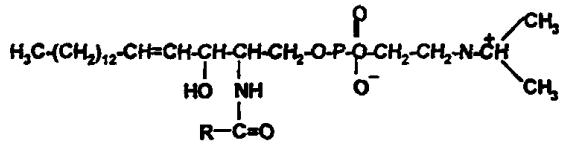
Φωσφολιπίδιο



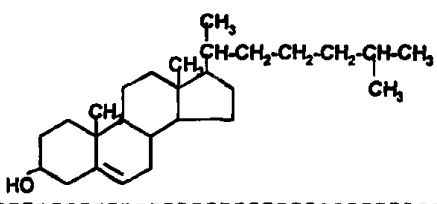
αν X =

- H ΦΩΣΦΑΤΙΔΙΚΟ ΟΞΥ (PA)
- CH₂CH₂NH₂⁺ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗ (PE)
- CH₂CH₂N(CH₃)₃⁺ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗ (PC)
- CH₂-CH(OH)-CH₂-OH ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗ (PG)
- CH₂CH₂(NH₂)COOH ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗ (PS)
-  ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗ (PI)

R, R₁, R₂ = Λιπαρή αλυσίδα μεγάλου μήκους



ΣΦΙΓΓΟΜΥΕΛΙΝΗ (Sph)



ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ (Chol)

Σχήμα 1. Είδη λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και οι δράσεις των φωσφολιπασών.

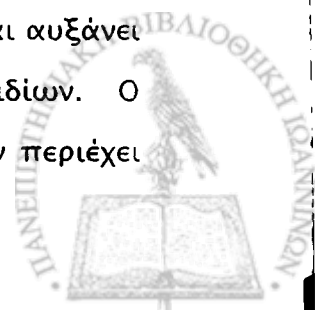


Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) κυριαρχεί με το 70-80% των φωσφολιπιδίων. Γενικώς, το 60% περίπου των μορίων της PC περιέχουν δύο κορεσμένες λιπαρές αλυσίδες. Το μεγαλύτερο ποσοστό της κορεσμένης PC είναι κυρίως διπαλμιτυλο-PC (DPPC).

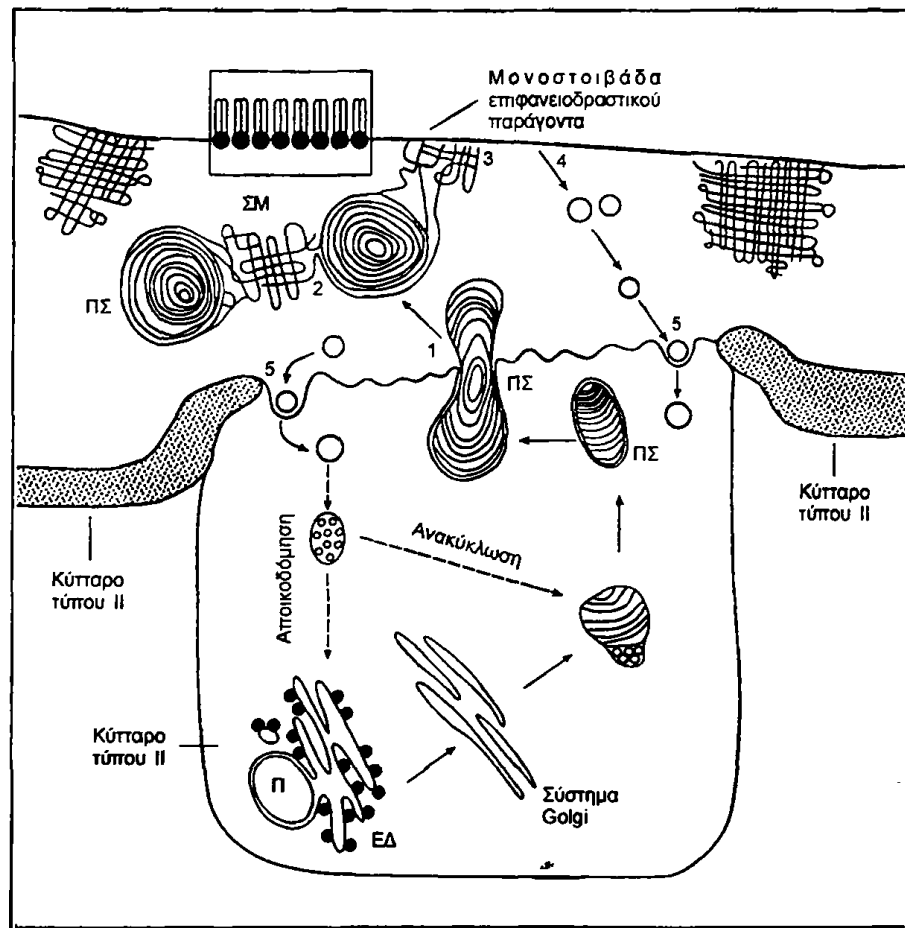
Το αμνιακό υγρό κατά τον τοκετό είναι εμπλουτισμένο σε επιφανειοδραστικό παράγοντα διότι βρίσκεται σε συνεχή επαφή με τους πνεύμονες εμβρύου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ωριμότητας των πνευμόνων των εμβρύων. Έχει διαπιστωθεί ότι η ωριμότητα των πνευμόνων σχετίζεται με την αναλογία της περιεκτικότητας φωσφατιδυλοχολίνης/σφιγγομυελίνης (PC/Sph) στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων. Αν ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος του 2, μπορεί πριν από τη γέννηση να αποκλεισθεί με σημαντική ακρίβεια (>98%) η ανάπτυξη συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας στο νεογνό. Στις περιπτώσεις όμως που ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 2 δεν υπάρχει ικανοποιητική πρόβλεψη (πιθανότητα ανάπτυξης RDS <33%) [17, 18].

Σε πολλά ζωικά είδη όπως στον άνθρωπο, στον αρουραίο και στο κουνέλι, το δεύτερο κύριο φωσφολιπίδιο στον επιφανειοδραστικό παράγοντα ενήλικου είναι η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), η οποία είναι όξινο φωσφολιπίδιο και αποτελεί έως το 10% των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ποσοστό ασύνηθες υψηλό. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η PG είναι σχεδόν ανύπαρκτη σε έκπλυμα πνευμόνων βρεφών με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας. Αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η PG παίζει σημαντικό συμπληρωματικό ρόλο στην ωριμότητα των πνευμόνων και η απουσία της (ποσοστό μικρότερου του 3% των ολικών φωσφολιπιδίων), αποτελεί ικανοποιητικό δείκτη πρόβλεψης της ανωριμότητας των πνευμόνων εμβρύων. Στους περισσότερους ιστούς, η PG αποτελεί την πρόδρομη ένωση για την καρδιολιπίνη και συναντάται σε ποσότητες της τάξεως του 1%.

Μεταξύ των άλλων φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα βρίσκεται και η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI). Μετά την 25^η εβδομάδα κύησης παρατηρείται στο αμνιακό υγρό συσσώρευση όξινων λιπιδίων. Η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση την 35^η εβδομάδα και μετά παρουσιάζει κάμψη. Η PC παρουσιάζεται μετά την 35^η εβδομάδα και αυξάνει μέχρι τη γέννηση σε ποσοστό 7-10% των ολικών φωσφολιπιδίων. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων ανώριμων θηλαστικών περιέχει



υψηλό ποσοστό PI αντί για PG [19, 20, 21, 22, 23]. Στους ανθρώπους και στον αρουραίο, η χαμηλή αναλογία PG/PI είναι σημάδι μη ωρίμανσης. Ωστόσο, αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για όλα τα θηλαστικά.



Σχήμα 2. Βιοσύνθεση, οργάνωση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. ΕΔ, ενδοπλασματικό δύκτιο; ΠΣ, πολυστοιβαδωτά σωματίδια; ΣΜ, σωληνώδης μυελίνη [24].

Εκτός από λιπίδια, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας περιέχει και διάφορες πρωτεΐνες σε ποσοστό 10 % περίπου κατά βάρος. 80 % από αυτές είναι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον ορό του αίματος. Το υπόλοιπο 20 % είναι ειδικές πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα που αποκαλούνται επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες [25, 8]. Αυτές είναι: οι επιφανειοδραστική πρωτεΐνη-A ή surfactant protein-A ή SP-A, SP-B, SP-C και SP-D [26, 27, 28].

Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, παράγονται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II [7, 22, 29]. Οι SP-A, SP-B και SP-D

παράγονται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αποκλειστικά, ενώ η SP-D παράγεται και από επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων. Στα κύτταρα τύπου II ο επιφανειοδραστικός παράγοντας συσσωρεύεται υπό τη μορφή πολυστοιβαδωτών σωματίων (Εικόνα 3). Αυτά υφίστανται εξοκύτωση στην υδατική επικάλυψη του επιθηλίου όπου μετατρέπονται σε σύμπλεγμα γνωστό ως σωληνώδης μυελίνη (Σχήμα 2). Η σωληνώδης μυελίνη στη συνέχεια «ξεδιπλώνεται» στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, παίρνει τη μορφή μονοστοιβάδας και επικαλύπτει όλα τα τοιχώματα. Υλικό που περισσεύει ή δεν περιλαμβάνεται στη μονοστοιβάδα μπορεί να επαναπροσληφθεί από τα κύτταρα τύπου II [7, 30].



Εικόνα 3. Πολυστοιβαδωτά σωματίια (φωτογραφία από μικροσκόπιο) [1].

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Λιπίδια

Είναι γενικώς παραδεκτό ότι η DPPC, το πιο κυρίαρχο λιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, είναι και το κύριο επιφανειοδραστικό συστατικό του. Ο φυσιολογικός της ρόλος θεωρείται ότι είναι η εξασφάλιση της σταθερότητας του επιθηλίου μειώνοντας την επιφανειακή τάση στην επιφάνεια του επιθηλίου σε τιμές κάτω από 0.01 Newton/m στο τέλος της εκπνοής [10, 11]. Ο ρόλος των άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι λιγότερο βέβαιος. Μπορεί να συντελούν στη γρήγορη προσρόφηση και εξάπλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην αέρια-υγρή μεσόφαση [13, 30]. Εάν τα όξινα φωσφολιπίδια είναι απαραίτητα για την κανονική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα τότε η PI θα μπορούσε να υποκαταστήσει την PG. Με βάση την υπόθεση αυτή ερευνητές διεξήγαγαν πειράματα στα οποία ενήλικα κουνέλια προσλάμβαναν με την τροφή τους μυο-ινοσιτόλη. Παρατήρησαν ότι οι επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν άλλαξαν παρά το γεγονός ότι η χορήγηση ινοσιτόλης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της PI και την μείωση της PG [31, 32]. Παρατηρήθηκε ότι στον επιφανειοδραστικό παράγοντα νεογέννητων κουνελιών η PG εμφανίζεται μειωμένη τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση με ακόλουθη μείωση του ποσοστού της PI [20] και παρόλο το πολύ μικρό ποσοστό της PG στη γέννηση, τα νεογέννητα κουνέλια δεν εμφανίζουν αναπνευστική δυσχέρεια. Αυτό σημαίνει ότι η PG δεν είναι απαραίτητη αποκλειστικά στην ικανότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα να μειώνει την επιφανειακή τάση.

Έχει επίσης βρεθεί ότι η PG αποτελεί φυσικό αναστολέα του PAF [33] καθώς και άλλων μεσολαβητών όπως θρομβίνης και ADP. Συνεπώς η PG στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων του εμβρύου πιθανώς να παίζει προστατευτικό ρόλο αναστέλλοντας τις δράσεις αυτών των μεσολαβητών.

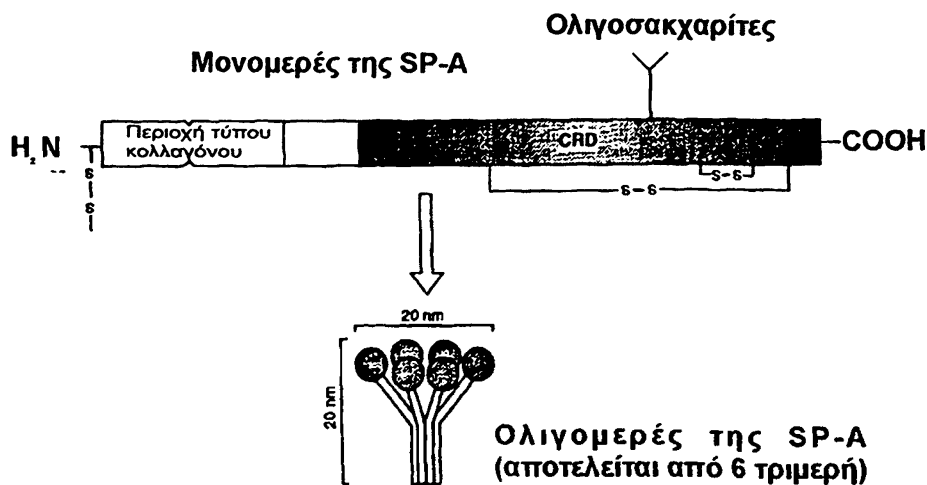


Πρωτεΐνες

Ρόλος, δομή και βιοσύνθεση των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα

SP-A

Η SP-A που αποτελεί περίπου το 50% των πρωτεϊνών, είναι υδρόφιλη, με υψηλό βαθμό γλυκοζυλίωσης πολυμερής πρωτεΐνη, μοριακού βάρους περίπου 650 kDa (Σχήμα 3). Το μονομερές της μοριακό βάρος κυμαίνεται από 28 ως 36 kDa αναλόγως με το βαθμό γλυκοζυλίωσης (Πίνακας 2, σελ. 18) [26, 28].



Σχήμα 3. Δομή της υδρόφιλης πρωτεΐνης SP-A [34].

Η λειτουργική μορφή της SP-A είναι πιθανώς ένα σύμπλεγμα 18 μονομερών (6 τριμερή), που συγκρατούνται μαζί με δισουλφιδικές γέφυρες και με μη ομοιόπολικούς δεσμούς στις περιοχές του κολλαγόνου [35, 36]. Συντίθεται στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II [26, 28, 38], στα μη βλεφαριδοφόρα επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιόλιων [26, 28, 38], και σε μερικά επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων [37]. Η σχετική συνεισφορά των κυττάρων τύπου II και των επιθηλιακών κυττάρων των βρογχιόλιων στη δεξαμενή της SP-A είναι ακόμη άγνωστη.



Η SP-A είναι γνωστό ότι δεσμεύει λιπίδια [7, 38] και ιδιαίτερώς DPPC [39] και προκαλεί συσσώρευση των φωσφολιπιδικών κυστιδίων παρουσία Ca^{2+} [26, 38]. Βοηθάει στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης από το εκκρινόμενο υλικό των πολυστοιβαδωτών σωματίων. Πειράματα ανασύστασης *in vitro*, έδειξαν ότι ο σχηματισμός της σωληνώδους μυελίνης εξαρτάται από την παρουσία λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (DPPC και PC), από τις πρωτεΐνες SP-A και SP-B καθώς και από Ca^{2+} [40]. Από το γεγονός ότι η SP-A εντοπίζεται στις γωνίες του πλέγματος της σωληνώδους μυελίνης [41] συμπεραίνεται ότι αυτή παρέχει τις βάσεις στήριξης για το σχηματισμό αυτής της δομής. Σε συνεργασία δε με την SP-B, αυξάνει την κατανομή των λιπιδίων στη μεσόφαση αέρα-υγρού (Πίνακας 2, σελ. 18).

Ένας ακόμη φυσιολογικός ρόλος της SP-A μπορεί να είναι η ρύθμιση της ομοιοστασίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η SP-A πιστεύεται ότι ρυθμίζει τις μεταβολικές διαδικασίες ανταλλαγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα μεταξύ των κυττάρων τύπου II και του κυψελιδικού διαστήματος, πιθανώς μέσω υποδοχέων. Μετά από *in vitro* πειράματα, αναφέρθηκε ότι η SP-A μειώνει την έκκριση των πολυστοιβαδωτών σωματίων από τα κύτταρα τύπου II [42, 43] και αυξάνει την πρόσληψη της DPPC από αυτά τα κύτταρα [44, 45]. Ωστόσο, η αναφερόμενη αύξηση ενδοκύττωσης της DPPC στα κύτταρα τύπου II από την SP-A αμφισβητήθηκε στη συνέχεια [46]. Τρίτος ρόλος που προτάθηκε για την SP-A μετά από *in vitro* πάλι πειράματα, είναι η συμμετοχή της στον αμυντικό μηχανισμό, δρώντας ως μία λεκτίνη τύπου-C.

SP-B

Η SP-B είναι υδρόφοβο πολυπεπτίδιο με 79 αμινοξέα (εκ' των οποίων 7 είναι κυστεΐνες) με τρεις δισουλφιδικές γέφυρες [28, 47, 48]. Το μοριακό βάρος του μονομερούς της είναι 8 kDa (βλ. σελ. 18, Πίνακας 2). Υπό μη αναγωγικές συνθήκες η SP-B βρίσκεται συνήθως με τη μορφή διμερούς, αλλά μερικές φορές και σαν ολιγομερές [28, 47]. Έχει ισχυρό θετικό φορτίο που επιλεκτικά απωθεί και απομακρύνει ανιοντικά και ακόρεστα λιπίδια από τη μεμβράνη που επικαλύπτει τις κυψελίδες, αυξάνοντας έτσι την επιφανειακή τάση. Η SP-B εκφράζεται στα

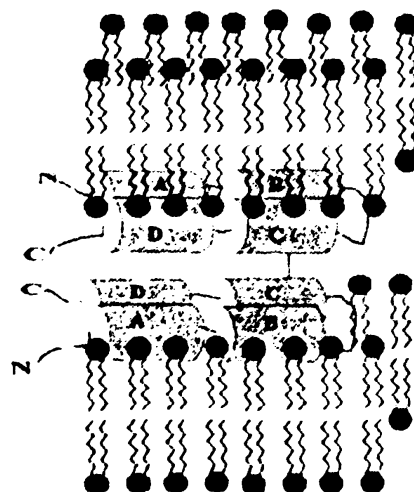


κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II και στα επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιόλιων [28, 49].

Ο ρόλος της SP-B στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι σημαντικός, αφού η έλλειψή της οδήγησε σε εξασθένηση των πνευμόνων και αναπνευστική ανεπάρκεια [50]. Χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της SP-B στους αεραγωγούς μετά τη γέννηση, αποτελεί έναυσμα για οξεία ανοσολογική αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται από απενεργοποίηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα με ταυτόχρονη πτώση της διατασιμότητας του πνεύμονα, νέκρωση του επιθηλίου των αεραγωγών, ανάπτυξη υάλινων μεμβρανών στο κυψελιδικό επιθήλιο, συσσώρευση ουδετερόφιλων και διαρροή των πρωτεϊνών του ορού στον κυψελιδικό χώρο [51].

Κάποια πειράματα έδειξαν ότι τόσο η SP-A όσο και η SP-B μετέχουν στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης από το εκκρινόμενο υλικό των πολυστοιβαδωτών σωματίων, καθώς και πολύ πιθανώς στο σχηματισμό της μονοστοιβάδας του επιφανειοδραστικού παράγοντα [40]. Το τελευταίο υποστηρίχθηκε μετά από παρατηρήσεις ότι η SP-B ενισχύει την προσρόφηση των μορίων φωσφολιπιδίων από τις αιωρούμενες μεμβράνες στη μεσόφαση αέρα-υγρού [52, 53, 54, 55, 56]. Η συμμετοχή της SP-B στον μετασχηματισμό των πολυστοιβαδωτών σωματίων σε σωληνώδη μυελίνη και στην ακόλουθη δημιουργία της φωσφολιπιδικής μονοστοιβάδας μπορεί να σχετίζεται με την επαγωγή της ανάμιξης των λιπιδίων από την SP-B [57].

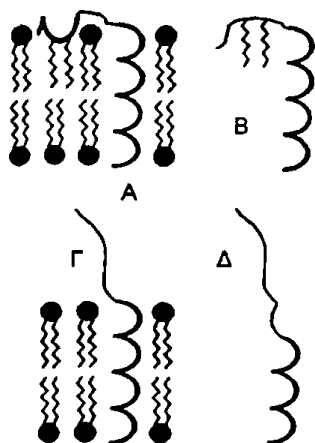
Σχήμα 4. Πιθανή δομή ενός διμερούς της SP-B σε ένα φωσφολιπιδικό περιβάλλον [58].



Η SP-A από μόνη της έχει μικρή συνεισφορά στην προσρόφηση των φωσφολιπιδίων, αλλά επιταχύνει ακόμα πιο πολύ την προσρόφηση την οποία αυξάνει η SP-B [53, 56]. Η SP-B μπορεί να αλληλεπιδρά ειδικά με την όξινη PG [56, 59]. Έχει προταθεί ότι η SP-B όχι μόνο αυξάνει την προσρόφηση των φωσφολιπιδίων αλλά προάγει επίσης την απομάκρυνση της PG καθώς και των υπολοίπων μη-DPPC μορίων από τη μονοστοιβάδα κατά τη διάρκεια των επανειλημμένων συστολών και διαστολών στην αναπνοή, εμπλουτίζοντας έτσι τη μονοστοιβάδα σε DPPC [56, 60]. Αντίστοιχη δράση πιθανώς να έχει και η SP-A. Η πιθανή δομή ενός διμερούς της SP-B σε ένα φωσφολιπιδικό περιβάλλον φαίνεται στο Σχήμα 4.

SP-C

Η SP-C είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο πολυπεπτιδίο που αποτελείται από 35 αμινοξέα, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τις λιπαρές (παλμιτυλο) αλυσίδες των φωσφολιπιδίων (βλ. σελ. 18, Πίνακας 2). Έχει μοριακό βάρος 4 kDa και περιέχει μια συνεχής περιοχή, μήκους 23 αμινοξέων, πλούσια σε βαλίνη [28, 47, 61]. Η SP-C συντίθεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, αλλά όχι από τα επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιόλιων [62, 63, 64].

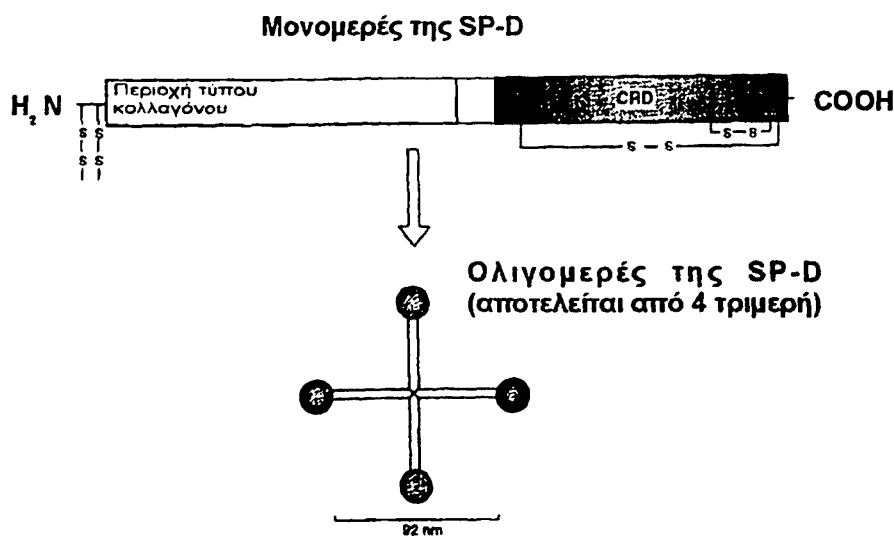


Σχήμα 5. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της SP-C και των φωσφολιπιδίων. Α) Φυσική SP-C σε φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Β) Φυσική SP-C σε οργανικούς διαλύτες. Γ) Διπαλμιτυλο-SP-C σε φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Δ) Διπαλμιτυλο-SP-C σε οργανικούς διαλύτες [58].

Η SP-C επιταχύνει την εναπόθεση και προσρόφηση των φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων που έχουν εκκριθεί στο υλικό που επικαλύπτει τις κυψελίδες, με παράλληλο μετασχηματισμό τους σε μονοστοιβάδα. Η απορρόφηση των φωσφολιπιδίων στη μεσόφαση αέρα-υγρού ενισχύεται λιγότερο αποτελεσματικά με την SP-C από ότι με την SP-B [52, 54, 55, 56]. Οι SP-B και SP-C έχουν ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα. Παραλαμβάνονται με οργανικούς διαλύτες από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα και αποτελούν το 1% περίπου των πρωτεϊνών. Στο Σχήμα 5 αναπαριστώνται οι προτεινόμενες δομές της SP-C και της διπαλμιτυλο-SP-C σε ένα φωσφολιπιδικό περιβάλλον.

SP-D

Η SP-D είναι υδατοδιαλυτή δωδεκαμερής γλυκοπρωτεΐνη τύπου κολλαγόνου [65]. Τα μονομερή της σχηματίζουν τριμερή γεφυρωμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς, τα οποία στη συνέχεια διαμέσου του N-τελικού άκρου σχηματίζουν ένα πολυμερές το οποίο αποτελείται από 12 όμοια πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 43 kDa το καθένα [66] (Σχήμα 6, Πίνακας 2).



Σχήμα 6. Δομή της υδρόφιλης πρωτεΐνης SP-D [34].

Η SP-D όπως και η SP-A έχει δομικές ομοιότητες με τις λεκτίνες τύπου-C και θεωρείται επίσης και αυτή ότι παίζει κάποιο ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς. Θεωρείται ότι ενεργοποιεί τα κυψελιδικά μακροφάγα και δεσμεύει τους πολυσακχαρίτες. Η SP-D συντίθεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II [67, 68] και από κύτταρα Clara [67].



Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών SP-A, SP-B, SP-C και SP-D.

	Μοριακή μάζα (kDa)	Υδροφοβικότητα	Μοριακά χαρακτηριστικά
SP-A	26-38	-	Υβρίδιο κολλαγόνου /λεκτίνης
SP-B	9	+++	Δισουλφιδικοί δεσμοί
SP-C	4	++++	Πλούσια σε υδρόφοβη βαλίνη
SP-D	43	-	Υβρίδιο κολλαγόνου /λεκτίνης

ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΥΓΡΩΝ ΣΤΟΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η ανακάλυψη ότι το σύνδρομο της αναπνευστικής δυσχέρειας στα πρόωρα νεογνά οφείλεται στην ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα καθώς και η αναγνώριση ότι το πνευμονικό οίδημα ήταν χαρακτηριστικό αποτέλεσμα αυτού του συνδρόμου, οδήγησε στην αναζήτηση εύρεσης της σχέσης μεταξύ της λειτουργίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα και του σχηματισμού οιδήματος στο πνευμονικό παρέγχυμα.

Ισορροπία υγρών στον πνεύμονα

Ο βαθμός της εισροής των υγρών στο διάμεσο χώρο των πνευμόνων ρυθμίζεται από την υδροστατική διατοιχωματική πίεση, την κολλοειδωσμητική πίεση του αίματος, την επιφανειακή έκταση των αγγείων και τη διαπερατότητα του αγγειακού φράγματος. Μια αύξηση στη διαφορά μεταξύ των μικροαγγειακών και περιμικροαγγειακών υδροστατικών πιέσεων ή μια μείωση της διαφοράς των μικροαγγειακών και περιμικροαγγειακών κολλοειδωσμητικών πιέσεων του αίματος, θα αυξήσει τη διαρροή των υγρών από την πνευμονική μικροκυκλοφορία. Ομοίως, μια αύξηση της μικροαγγειακής επιφάνειας, ή μια αύξηση στη διαπερατότητα των πνευμονικών μικροαγγείων, θα προωθήσει τη ροή των υγρών μέσα στον πνεύμονα [69].



Επίδραση της επιφανειακής τάσης στις δυνάμεις διήθησης υγρών

Η επιφανειακή τάση στη μεσόφαση αέρα-υγρού παράγει δυνάμεις οι οποίες τείνουν να μειώσουν την επιφάνεια της μεσόφασης (βλ. σελ. 4). Επιφανειοδραστικό υλικό το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια των μεσοδιαστημάτων, μειώνει την επιφανειακή τάση στη μεσόφαση αέρα-υγρού, ενώ αλλαγές στη μεσόφαση αέρα-υγρού μπορεί να επηρεάζουν τη διήθηση των υγρών διαμέσου των αγγείων [70]. Η αγγειακή αιμάτωση των πνευμόνων αυξάνεται όταν η επιφανειακή τάση είναι μεγάλη. Μία αύξηση στην επιφανειακή τάση μπορεί να αυξήσει τις υδροστατικές δυνάμεις που ασκούνται στα τοιχώματα, μειώνοντας ίσως την τριχοειδική πίεση [71, 72].

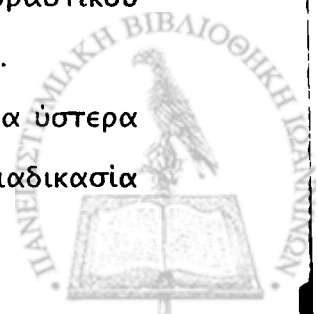
Ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και ισορροπία υγρών

Η σχέση μεταξύ ανεπάρκειας επιφανειοδραστικού παράγοντα και πνευμονικού οιδήματος προήλθε από ιστολογικές παρατηρήσεις των πνευμόνων πρόωρων νεογνών και ζώων [73]. Πρόωρα νεογνά και ζώα που έχουν αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω πρόωρης γέννησης, εμφανίζουν περίσσεια υγρών στον πνεύμονα. Οι κυψελίδες, γεμίζουν με υγρό, το οποίο περιέχει πρωτεΐνες και αυτό προκαλεί διαστολή των λεμφαγγείων. Το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας το οποίο εμφανίζεται μετά από πρόωρη γέννηση είναι άμεσο αποτέλεσμα της ημιτελούς ανάπτυξης του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.

Μελέτες φυσιολογίας έδειξαν επίσης, περίσσεια υγρών στον πνεύμονα πρόωρα γεννημένων νεογνών και ζώων με αναπνευστική ανεπάρκεια [74]. Έχει βρεθεί ότι το εξωαγγειακό πνευμονικό υγρό, στην αναπνευστική δυσχέρεια, ήταν περισσότερο από αυτό στους πνεύμονες χωρίς αναπνευστική δυσχέρεια [75].

Το πνευμονικό οίδημα και οι πρωτεΐνες του πλάσματος μέσα στις κυψελίδες, πιθανώς να σχετίζονται με τη μη φυσιολογική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (ARDS) [76].

Διάφοροι ερευνητές μελέτησαν την ισορροπία υγρών στον πνεύμονα ύστερα από ενστάλλαξη απορροπαντικών μέσα στους πνεύμονες. Αυτή η διαδικασία



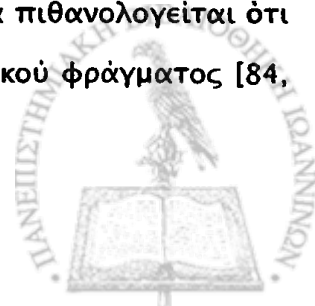
καταστρέφει τη φυσιολογική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα και δημιουργεί άκαμπτους πνεύμονες με μη φυσιολογική επιφανειακή τάση. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η απώλεια της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα που οφείλεται στα απορρυπαντικά, αυξάνει το περιεχόμενο υγρό στους πνεύμονες [77, 78, 79].

Η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να έχει διάφορες επιδράσεις στις πνευμονικές αρτηριακές πιέσεις. Κάποιοι μελέτησαν *in vivo* την ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα που προκλήθηκε με έκπλυση των πνευμόνων με απορρυπαντικά και έδειξαν ότι δεν επηρεάζονται οι πνευμονικές αρτηριακές πιέσεις. Από άλλες *in situ* μελέτες, παρατηρήθηκε ότι η πνευμονική αρτηριακή πίεση αυξάνει όταν ο επιφανειοδραστικός παράγοντας εκπλυθεί με απορρυπαντικά [77, 78, 80].

Η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, επίσης, μπορεί να επηρεάζει την ισορροπία υγρών στον πνεύμονα επηρεάζοντας την κολλοειδωσμητική πίεση του αίματος. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του αίματος είναι πιο χαμηλή στην αναπνευστική δυσχέρεια από ότι είναι φυσιολογικά και το αναπνευστικό σύνδρομο συχνά σχετίζεται με υποπρωτεϊναιμία, αναφέρουν κάποιοι μελετητές [75]. Ωστόσο, μετά από έκπλυση του επιφανειοδραστικού παράγοντα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του αίματος δεν άλλαξε [77, 78].

Απουσία επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλάζει η έκταση της επιφάνειας των αγγείων και αυτό θα μπορούσε να συνεισφέρει στην αυξημένη διήθηση υγρών και στο πνευμονικό οίδημα. Ο αριθμός των κυψελιδικών τριχοειδών διπλασιάζεται όταν η λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα διαταραχθεί ύστερα από ενστάλλαξη απορρυπαντικών μέσα στους πνεύμονες [80] και αυτή η δυσλειτουργία σχετίζεται με μείωση της πίεσης των υγρών μέσα στον κυψελιδικό χώρο [81, 82]. Σε πνεύμονες με ανεπάρκεια επιφανειοδραστικού παράγοντα, έχει μετρηθεί η κυψελιδική πίεση των υγρών και βρέθηκε ότι υπάρχει άμεση σχέση αυτής με την ποσότητα των φωσφολιπιδίων στις κυψελίδες [83]. Πνεύμονες με λίγα ή καθόλου φωσφολιπίδια είχαν χαμηλή πίεση υγρών στο διάμεσο κυψελιδικό χώρο.

Τέλος, η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα πιθανολογείται ότι προκαλεί διαταραχή (αύξηση) της διαβατότητας του επιθηλιακού φράγματος [84, 85, 79], υπάρχουν όμως και αντίθετες απόψεις.



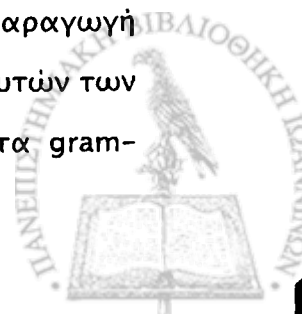
ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ενώ η κύρια παθοφυσιολογική λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων είναι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σταθεροποίηση του πνεύμονα με τη μείωση της επιφανειακής τάσης, φαίνεται ότι συνεισφέρει και στην άμυνα των πνευμόνων. Συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να αλληλεπιδρούν με εισπνεόμενους μικροοργανισμούς και με φαγοκύτταρα. Στους ανώτερους και κεντρικούς αεραγωγούς, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί απομακρύνονται μηχανικά με το φτάρνισμα, το βήχα και τη βλέννα. Στην κυψελιδική περιοχή, η οποία δεν είναι εξοπλισμένη με τέτοιους μηχανισμούς, τα φαγοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση και εξολόθρευση των παθογόνων. Κεντρικό ρόλο στην άμυνα του κυψελιδικού χώρου παίζουν τα μακροφάγα τα οποία πολύ γρήγορα απομακρύνουν τα εισπνεόμενα βακτήρια [86, 87]. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια φλεγμονής του πνεύμονα και τα μονοκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος, συμμετέχουν στην απενεργοποίηση των παθογόνων [88].

Διάφοροι ερευνητές υποστήριξαν ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας ή τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα ενεργοποιούν τα μακροφάγα για τη φαγοκύτωση και θανάτωση των βακτηρίων [89, 90, 91], ενώ άλλοι ερευνητές αντιθέτως, βρήκαν ότι τα αναστέλλουν [92]. Τα πειράματα όμως αυτά διεξήχθησαν με πλήρη επιφανειοδραστικό παράγοντα ή με το λιπιδικό κλάσμα αυτού, γεγονός που κάνει δύσκολη την αναλυτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων [93].

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A και SP-D παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα με τα φαγοκύτταρα και παθογόνα.

SP-A: Η SP-A είναι η κυρίαρχη υδρόφιλη πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το καρβοξυτελικό άκρο της εμφανίζει ομοιότητες στη αλληλουχία του με έναν αριθμό λεκτινών τύπου-C, εξαρτωμένων από Ca^{2+} όπως οι πρωτεΐνες του πλάσματος κονγλουτίνη και αυτή που δεσμεύει τη μαννόζη [94]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η SP-A ενεργοποιεί τη φαγοκύτωση βακτηρίων και ιών, την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα μακροφάγα, αυξάνει τη χημειοταξία αυτών των κυττάρων και καθαρίζει τους λιποπολυσακχαρίτες (ενδοτοξίνες) από τα gram-



αρνητικά βακτήρια. Επίσης, αναστέλλει ειδικά τη φωσφολιπάση A₂ από δηλητήριο φιδιού, και ο μηχανισμός της αναστολής είναι η δέσμευση του ενζύμου με την SP-A [95].

SP-D: Η δεύτερη υδρόφιλη πρωτεΐνη είναι η SP-D. Η περιοχή της που αναγνωρίζει τους υδρογονάνθρακες (carbohydrate recognition domain) έχει και αυτή ομοιότητες στην αλληλουχία με την αντίστοιχη περιοχή άλλων λεκτινών τύπου-C.

Αλληλεπίδραση των SP-A και SP-D με gram-αρνητικά βακτήρια και λιποπολυσακχαρίτες

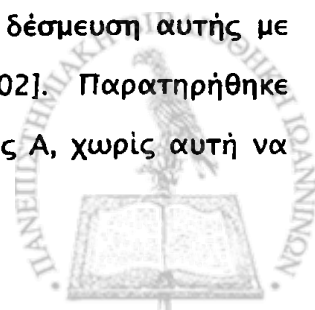
Συστατικά των εξωτερικών μεμβρανών των gram-αρνητικών βακτηρίων είναι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή ενδοτοξίνες, οι οποίοι έχουν διάφορες τοξικές δράσεις στον οργανισμό και επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα [96, 97]. Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη SP-D του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων δεσμεύεται με gram-αρνητικά βακτήρια και προκαλεί συσσώρευση αυτών παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η περιοχή των μορίων των LPS που δεσμεύεται με την SP-D είναι πιθανώς η πλούσια σε υδρογονάνθρακες κεντρική περιοχή [98].

Η SP-A δεσμεύεται επίσης με τους LPS, όχι με την κεντρική περιοχή τους, αλλά πιθανώς με τη λιπιδική περιοχή αυτών, παρουσία ιόντων ασβεστίου και νατρίου. Οι υδρογονανθρακική περιοχή της SP-A δεν συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τους LPS [99, 100].

Σύνδεση των LPS με φαγοκύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα οδηγεί σε ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων για να παράγουν ρίζες οξυγόνου και κυτταροκίνες, όπως ο ογκονεκρωτικός παράγοντας (TNF). Η δέσμευση της SP-A με τους LPS μεσολαβεί σε αυτήν την διαδικασία.

SP-A και ιού

Μελέτες δέσμευσης της SP-A που πραγματοποιήθηκαν με τον ιό του έρπητα, έδειξαν ότι αυτή δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες του ιού. Μετά από απομάκρυνση του υδρογονανθρακικού τμήματος της SP-A με ενζυμική υδρόλυση δεν παρατηρήθηκε δέσμευση με τις πρωτεΐνες του ιού, ενώ δεν επηρεάστηκε η δέσμευση αυτής με λιπίδια και η ενεργοποίηση των μακροφάγων [101, 102]. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της SP-A με τις πρωτεΐνες του ιού της γρίπης A, χωρίς αυτή να



επιηρεάζεται ύστερα από μπλοκάρισμα της υδρογονανθρακικής περιοχής της SP-A. Αυτό σημαίνει ότι η SP-A δεσμεύεται διαμέσου του τμήματος του σιαλικού οξέος [103]. Υψηλά επίπεδα της SP-A βρέθηκαν σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ορροθηκών HIV-ασθενών μολυσμένων με τον ιό του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS), με πνευμονία [104]. Συμπερασματικά, η SP-A μπορεί να εμποδίζει έτσι τη μόλυνση ενεργοποιώντας τα μακροφάγα.

SP-A, SP-D και μακροφάγα

Η περιοχή τύπου κολλαγόνου της SP-A συμμετέχει στη διέγερση της μετανάστευσης των μακροφάγων [105]. Η SP-A καθώς και η SP-D διεγείρουν την παραγωγή υπεροξειδίων από τα κυψελιδικά μακροφάγα υποστηρίζουν κάποιοι ερευνητές [106, 107] ενώ άλλοι υποστηρίζουν για την SP-A το αντίθετο [108]. Η SP-A διεγείρει τη φαγοκύτωση βακτηρίων διαμέσου υποδοχέων των μακροφάγων [106, 109].

Συμπερασματικά, οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες μπορεί να συμμετέχουν στο σύστημα άμυνας με δύο τρόπους:

- αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες των παθογόνων προκαλώντας συσσώρευση αυτών (όπως με gram-αρνητικά βακτήρια, ιούς)
- ενεργοποιούν τα κυψελιδικά μακροφάγα οδηγώντας τα στη φαγοκύτωση.

Ο ρόλος έτσι του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν περιορίζεται στην μηχανική σταθερότητα των πνευμόνων αλλά συμβάλλει και στην άμυνα.

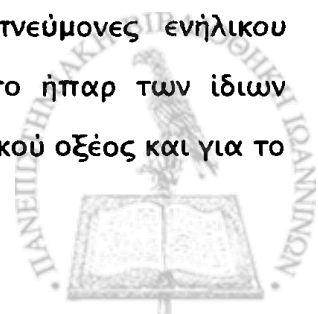
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Υποστρώματα

Η κύρια πηγή προέλευσης του σκελετού της γλυκερόλης για τη σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε ώριμα κύτταρα τύπου II, είναι η γλυκέρη από την κυκλοφορία. [110]. Η γλυκερόλη μπορεί να είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα για τη σύνθεση της PC στην αρχική εμβρυϊκή περίοδο [111]. Στην ύστερη εμβρυϊκή περίοδο, το γλυκογόνο το οποίο έχει συσσωρευτεί στα κύτταρα τύπου II, μπορεί να είναι σημαντική πηγή ατόμων άνθρακα για τη βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα [22, 23, 112].



Τα λιπαρά οξέα που απαιτούνται για τη σύνθεση των λιπιδίων εξασφαλίζονται από την κυκλοφορία ως ελεύθερα λιπαρά οξέα από τα τριγλυκερίδια που βρίσκονται στις λιποπρωτεΐνες. Πιθανώς η πρόσληψη των λιπαρών οξέων στα κύτταρα τύπου II από το αίμα, διαμεσολαβείται από μια μεμβρανική πρωτεΐνη [113]. Λιπαρά οξέα σχηματίζονται επίσης στο εσωτερικό των κυττάρων τύπου II κατά την υδρόλυση των φωσfolιπιδίων, όταν αυτά προσλαμβάνονται από τις κυψελίδες [114]. Μπορούν τέλος να συντεθούν στα κύτταρα τύπου II *de novo*, σε υψηλή αναλογία [115, 116], σε αυτή τη διαδικασία όμως προτιμάται το γαλακτικό οξύ από τη γλυκόζη ως υπόστρωμα [116]. Στην ύστερη εμβρυϊκή περίοδο, το γλυκογόνο μπορεί να αποτελεί μια σημαντική πρόδρομη ένωση των λιπαρών οξέων [22, 112], ενώ το ακετοξικό οξύ μπορεί να αποτελεί σημαντική πρόδρομη ένωση των λιπαρών οξέων που μετέχουν στη βιοσύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα νεογνά [117]. Η σχετική συμβολή των διαφόρων πηγών λιπαρών οξέων δεν είναι πλήρως γνωστή και ποικίλει με την ηλικία και τη διατροφή. Στους πνεύμονες εμβρύου αρουραίου, ο ρυθμός σύνθεσης λιπαρών οξέων και οι ειδικές ενεργότητες της συνθάσης των λιπαρών οξέων και της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης, οι οποίες μετατρέπουν το ακετυλο-CoA διαμέσου μηλονυλο-CoA σε λιπαρό οξύ, αυξάνουν παράλληλα με την αύξηση της παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα [22, 23, 118]. Οι αναστολές της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων μειώνουν το ρυθμό της σύνθεσης της DSPC σε πνεύμονα εμβρύου αρουραίου ακόμα και όταν προστίθεται παλμιτικό οξύ [119]. Συγκρίνοντας με το εξωγενές παλμιτικό οξύ, τα λιπαρά οξέα που συντίθενται από το ακετοξικό οξύ προτιμούν να ενσωματωθούν στην PC και DSPC του επιφανειοδραστικού παράγοντα στους πνεύμονες νεογέννητων κουνελιών [120]. Στους πνεύμονες ποντικίου και αρουραίου, οι ενεργότητες της συνθάσης λιπαρών οξέων και της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης μειώνονται με νηστεία και αυξάνονται με την επαναπρόσληψη τροφής, όμοια με ότι συμβαίνει στο ήπαρ στις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, έχει δειχθεί [121] ότι μετά τη νηστεία και πρόσληψη τροφής στη συνέχεια, με ελεύθερη διαίτα πλούσια σε υδατάνθρακες, η ακετυλο-CoA καρβοξυλάση και συνθάση των λιπαρών οξέων στους πνεύμονες ενήλικου αρουραίου άλλαξαν σε μικρότερο βαθμό από ότι αυτές στο ήπαρ των ίδιων αρουραίων. Το ίδιο παρατηρήθηκε για τη λιγάση του ATP-κιτρικού οξέος και για το



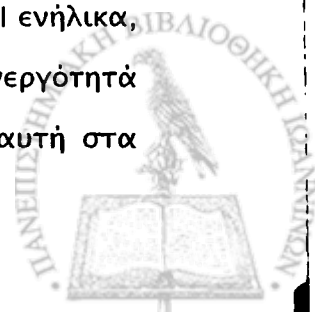
μηλικό ένζυμο, δύο ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταφορά του ακετυλο-CoA από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο κυτοσόλιο, όπου αυτό μετατρέπεται σε λιπαρό οξύ [121].

Η χολίνη που απαιτείται, από τα κύτταρα τύπου II, για τη σύνθεση της PC, πιθανώς προέρχεται κυρίως από τη διατροφή [122]. Τα κύτταρα τύπου II μπορούν να συσσωρεύσουν τη χολίνη με διαδικασία ενεργειακά-εξαρτώμενης μεταφοράς [123]. Η μυο-ινοσιτόλη που χρειάζεται για το σχηματισμό της PI του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά και για την PI που συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος, μπορεί να συντεθεί από διάφορους ιστούς του σώματος, όμως μερικές φορές απαιτείται επιπλέον συμπλήρωμα με τη διατροφή [124]. Η χορήγηση ινοσιτόλης σε πρόωρα νεογνά με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας που διατρέφονται παρεντερικά, οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση, χωρίς βρογχοπνευμονική δυσπλασία [124]. Ιστός πνεύμονα κουνελιού μπορεί να παράγει ινοσιτόλη από τη γλυκόζη [125]. Τα κύτταρα τύπου II μπορούν να προσλάβουν ινοσιτόλη με μηχανισμούς που απαιτούν ή δεν απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας [125, 126]. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι αυτά τα κύτταρα προσλαμβάνουν την ινοσιτόλη που χρειάζονται για τον σχηματισμό της PI είτε μερικώς εξωγενώς, είτε από άλλα πνευμονοκύτταρα, είτε από το αίμα.

Στάδια βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης

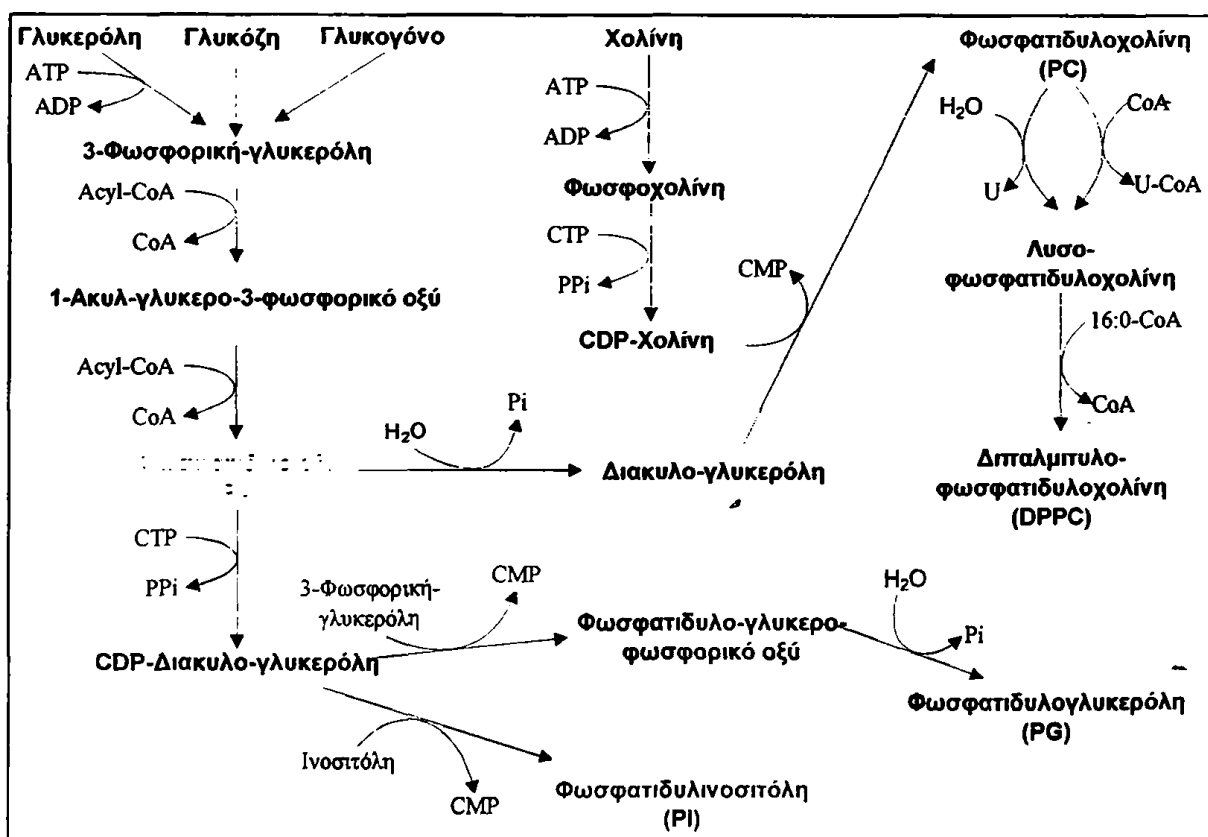
“*De novo*” σύνθεση

Άμεση *de novo* σύνθεση από διπαλμιτυλο-PA συμβαίνει μόνο για το 50 % της συνολικής παραγόμενης DPPC [127, 128]. Η *de novo* σύνθεση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα ξεκινάει με τον σχηματισμό του φωσφατιδικού οξέος (PA) (Σχήμα 7), μετά από ακυλίωση της 3-φωσφορικής-γλυκερόλης. Τα λιπαρά οξέα που χρειάζονται για τα στάδια ακυλίωσης μετατρέπονται σε ακυλο-CoAs με την δράση της ακυλο-CoA συνθετάσης. Το πρώτο βήμα σύνθεσης του PA είναι ο σχηματισμός του 1-ακυλο-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος από την ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης. Στα κύτταρα τύπου II ενήλικα, αυτό το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο [22]. Η ενεργότητά του στα μικροσωμάτια των κυττάρων τύπου II είναι υψηλότερη από αυτή στα μικροσωμάτια ολοκλήρου πνεύμονα [22].



Το δεύτερο βήμα ακυλίωσης καταλύεται από την ακυλοτρανσφεράση του 1-ακυλο-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος. Οι πορείες για τη βιοσύνθεση της PC αφένος και της PC και PI από την άλλη, διαχωρίζονται μετά τη δημιουργία του PA.

Για τη σύνθεση της PC, το PA υδρολύεται προς διακυλογλυκερόλη με τη δράση μιας φωσφατάσης του φωσφατιδικού οξέος. Σε ιστό πνεύμονα, έχουν αναγνωρισθεί αρκετές διαφορετικές μορφές αυτού του ενζύμου, οι οποίες διαφέρουν στην κυτταρική τους διαμερισματοποίηση (κυτοσολικό ή μεμβρανικό ένζυμο) και στη μορφή του υποστρώματος που προτιμούν (PA δεσμευμένο με μεμβράνη ή διασκορπισμένο στο κυτόπλασμα) [129].



Σχήμα 7. Στάδια σύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) [6].

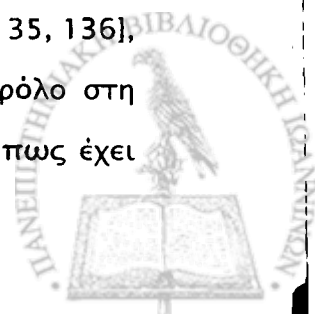
Στη συνέχεια, συντίθεται PC από διακυλογλυκερόλη και CDP-χολίνη με το ένζυμο CDP χολίνη:φωσφοχολινοτρανσφεράση. Η CDP-χολίνη σχηματίζεται από χολίνη με διαδοχικές δράσεις της κινάσης της χολίνης και της κυτιδυλοτρανσφεράσης της φωσφοχολίνης. Η κινάση της χολίνης είναι κυτοσολικό ένζυμο. Στο κυτοσόλιο των κυττάρων τύπου-II, βρέθηκε ότι η ειδική της ενεργότητα

είναι πέντε φορές μεγαλύτερη από ότι στο κυτοσόλιο ολοκλήρου πνεύμονα [130]. Η κυτιδυλοτρανσφεράση της χολίνης έχει βρεθεί και στο διαλυτό κλάσμα αλλά και στο μεμβρανικό [16, 131, 132]. Το διαλυτό κλάσμα από πνεύμονες και από κυψελιδικά κύτταρα τύπου II περιέχει δύο μορφές του ενζύμου. Την L-μορφή, ένα διμερές με MW της καταλυτικής υπομονάδας 45 kDa, το οποίο είναι ανενεργό απουσία λιπιδίων. Η κυρίαρχη διαλυτή μορφή από κύτταρα ολοκλήρου πνεύμονα και από κύτταρα τύπου II, η H-μορφή, η οποία φαίνεται ότι είναι μια λιποπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους και που είναι ένα σύμπλεγμα της αποπρωτεΐνης της L-μορφής με λιπίδια, μπορεί να είναι η ενεργός μορφή του ενζύμου [133]. Η μεμβρανική μορφή της κυτιδυλοτρανσφεράσης της φωσφοχολίνης, είναι παρόμοια, αν όχι ίδια με την διαλυτή H-μορφή [131]. Μετατροπή της μιας μορφής του ενζύμου στην άλλη μπορεί να έχει σημασία σε ότι αφορά τη ρύθμιση σχηματισμού της PC. Το τελευταίο στάδιο σύνθεσης της PC καταλύεται από την φωσφοχολινοτρανσφεράση και πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο [16, 22].

Πορεία "ανάπλασης"

Ο μηχανισμός "ανάπλασης", με τον οποίο σχηματίζεται το υπόλοιπο 50 % της DPPC, περιλαμβάνει απομάκρυνση του ακόρεστου λιπαρού οξέος από την sn-2 θέση της αρχικής συντιθέμενης PC η οποία έχει παλμιτικό οξύ στην θέση 1 και ακόρεστη λιπαρή ακυλομάδα στη θέση sn-2 και επανακυλίωση της παραγόμενης 1-παλμιτυλο-λυσω-φωσφατιδυλοχολίνης με παλμιτυλο-CoA με το μικροσωματιακό ένζυμο ακυλοτρανσφεράση της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης. Το τελευταίο ένζυμο βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα τύπου II και εμφανίζει προτίμηση για παλμιτυλο-CoA [22, 134].

Η απακυλίωση της PC με την πορεία ανάπλασης θεωρείται ότι συμβαίνει με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂ [22]. Γνωστές μορφές του ενζύμου αυτού είναι εξαρτώμενες αλλά και μη-εξαρτώμενες από Ca²⁺. Η θεώρηση ότι η φωσφολιπάση A₂ συμμετέχει στην πορεία ανάπλασης στηρίχθηκε από παρατηρήσεις ότι στα κύτταρα τύπου II οι αναστολείς της φωσφολιπάσης A₂ μείωσαν το βαθμό κορεσμού της PC που είχε συντεθεί από διάφορες ραδιενεργές πρόδρομες ενώσεις [135, 136], ενώ ενεργοποίηση του ενζύμου οδήγησε σε αύξηση [137, 138]. Κύριο ρόλο στη σύνθεση της διπαλμιτυλο-PC σε πνευμονοκύτταρα τύπου II φαίνεται δε πως έχει



μια όξινη φωσφολιπάση A_2 ανεξάρτητη Ca^{2+} [139]. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η απακυλίωση μπορεί να γίνει και με την ακυλοτρανσφεράση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης με ανάδρομη κατεύθυνση [22]. Φωσφολιπάση A_2 ανεξάρτητη Ca^{2+} ενεργή σε όξινο pH έχει βρεθεί σε ομογενοποίηση πνευμόνων, πνευμονοκύτταρα τύπου II, πολυστοιβαδωτά σωματίδια, λυσοσώματα και κυψελιδικά μακροφάγα [136, 140, 141, 479].

Σύνθεση άλλων λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Τα όξινα λιπίδια PG και PI συντίθενται από CDP-διακυλογλυκερόλη (Σχήμα 7), η οποία παράγεται από PA με την κυτιδυλοτρανσφεράση του φωσφατιδικού οξέος. Πιθανώς, στη σύνθεση της PG και PI του επιφανειοδραστικού παράγοντα μετέχει η μικροσωμική ενζυμική ενεργότητα και όχι η μιτοχονδριακή [20].

Η PI μπορεί να παραχθεί από την CDP-διακυλογλυκερόλη με αντίδραση με μιο-ινοσιτόλη. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση, η φωσφατιδυλο-τρανσφεράση της CDP-διακυλο-γλυκερόλης-ινοσιτόλης, εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων τύπου II [142, 143].

Εναλλακτικά, η CDP-διακυλογλυκερόλη μπορεί να μετατραπεί με την φωσφατιδυλο-τρανσφεράση του γλυκερο-φωσφορικού οξέος σε φωσφατιδυλο-γλυκερο-φωσφορικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποφωσφορυλιώνεται σε PG με την φωσφατάση της φωσφατιδυλο-γλυκερόλης. Η φωσφατιδυλο-τρανσφεράση του γλυκερο φωσφορικού οξέος σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια τόσο στα ώριμα [143], όσο και στα εμβρυϊκά κύτταρα τύπου II [142]. Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι με τη δημιουργία της PG σχετίζεται η μικροσωμική φωσφατιδυλο-τρανσφεράση του γλυκερο φωσφορικού οξέος [20, 142].

Μελέτες σε απομονωμένους ιστούς πνευμόνων αρουραίων έδειξαν ότι ποσοστό 7-10% της χοληστερόλης που βρίσκεται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα παράγεται ενδογενώς και ότι η περισσότερη χοληστερόλη προέρχεται από τις χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνες ή από τις υψηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνες μέσω υποδοχέων [144]. Τα επίπεδα αυτών των λιποπρωτεϊνών στην κυκλοφορία ρυθμίζουν πιθανώς τη σύνθεση της χοληστερόλης ενδογενώς στα κύτταρα τύπου II [144].



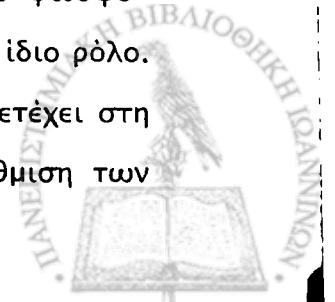
Ρύθμιση της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων

Ρύθμιση της σύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης

Πειράματα με ιχνηθετημένη χολίνη [145, 146], μετρήσεις των αποθεμάτων χολίνης και των μεταβολιτών της [146, 147] και μελέτες με απομονωμένα κύτταρα τύπου II [22, 148], έδειξαν ότι η κυτιδυλο-τρανσφεράση καταλύει το στάδιο κατά το οποίο η PC εισρρέει μέσα στα κύτταρα τύπου II. Στην ίδια κατεύθυνση κινήθηκαν ορμονικές και αναπτυξιολογικές μελέτες που έγιναν σε ιστό ολοκλήρου πνεύμονα [16, 19, 23].

Πειράματα με διάφορα είδη κυττάρων [149], δείχνουν ότι η ενεργότητα της κυτιδυλο-τρανσφεράσης ρυθμίζεται με μετατόπιση (translocation) του ενζύμου από το κυτοσόλιο, όπου βρίσκεται σε ανενεργό μορφή, στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου είναι ενεργή. Αυτό φαίνεται να ρυθμίζεται αντιστρεπτά από τη φωσφορυλίωση της κυτιδυλο-τρανσφεράσης καθώς και από την παρουσία των λιπαρών οξέων [149]. Αυτό το συμπέρασμα φαίνεται να υποστηρίζουν μελέτες που έγιναν σε ολόκληρο πνεύμονα [132], αλλά μέχρι τώρα δεν υπάρχουν μελέτες με απομονωμένα κύτταρα τύπου II. Σε κύτταρα τύπου II εκτεθειμένα σε λιπαρά οξέα [150], σε κύτταρα τύπου II που αναπτύσσονται *in vivo* [151] και σε κύτταρα τύπου II εμβρύου αρουραίου κατεργασμένα με δεξαμεθαζόνη [152], η αυξημένη σύνθεση της PC συνοδεύτηκε από αυξημένη ενεργότητα της μικροσωματιακής κυτιδυλο-τρανσφεράσης, αλλά χωρίς επακόλουθη μείωση της κυτοσολικής ενεργότητας. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι ο ρυθμός σύνθεσης της PC ελέγχεται από τη μικροσωματιακή κυτιδυλο-τρανσφεράση. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η κυτοσολική μορφή του ενζύμου ρυθμίζει το μεταβολισμό της PC στους πνεύμονες. Αλληλομετατροπή των κυτοσολικών H- και L-μορφών [133] μπορεί επίσης να λαμβάνει μέρος σε αυτή τη ρύθμιση.

Μολονότι το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην κυτιδυλο-τρανσφεράση της φωσφοχολίνης, πιθανώς δεν είναι το μοναδικό ρυθμιστικό ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της PC. Υπό ειδικές συνθήκες, η ακυλο-τρανσφεράση της 3-φωσφογλυκερόλης [130] και η κινάση της χολίνης [147] μπορεί να παίξουν τον ίδιο ρόλο. Επιπλέον και η φωσφατάση του φωσφατιδικού οξέος μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του σχηματισμού της PC στους πνεύμονες [16, 19, 23]. Ρύθμιση των



ενζύμων που μετέχουν στην προμήθεια υποστρώματος για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων στους πνεύμονες μπορεί να συνεισφέρει στην επιτάχυνση της σύνθεσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα [19, 23].

Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την ενεργότητα της συνθάσης των λιπαρών οξέων *in vivo* στους πνεύμονες εμβρύου αρουραίου, τη συνθάση λιπαρών οξέων αλλά και τη σύνθεση λιπαρών οξέων σε εξωσωματική καλλιέργεια κυττάρων από πνεύμονα εμβρύου [118, 153]. Η σύνθεση της συνθάσης των λιπαρών οξέων αυξάνεται από τα γλυκοκορτικοειδή στο στάδιο πριν από τη μετάφραση της [154]. Σε κύτταρα τύπου II εμβρύου, ο ρυθμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων αυξάνεται μετά από έκθεσή τους σε μέσο συντήρησης ινοβλαστών που περιέχει κορτιζόλη [155]. Ο FPF (Fibroblast-Pneumonocyte Factor, παράγοντας πνευμονοκυτταρικού ινοβλάστη) ο οποίος διεγείρει το σχηματισμό DSPC και της κυτιδυλο-τρανσφεράσης της φωσφοχολίνης σε εμβρυϊκά κύτταρα τύπου II, μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη διέγερση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων σε αυτά τα κύτταρα. Αν και τα γλυκοκορτικοειδή αύξησαν την ενεργότητα της κυτιδυλο-τρανσφεράσης η ποσότητα του ενζύμου δεν φάνηκε να αλλάζει [156]. Με βάση το γεγονός ότι τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε κύτταρα τύπου II, τη γνώση ότι η ενεργότητα της κυτιδυλο-τρανσφεράσης μπορεί να αυξηθεί από λιπαρά οξέα και από μερικά φωσφολιπίδια, την παρατήρηση ότι η αναστολή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων καταργεί τη δυνατότητα των γλυκοκορτικοειδών να διεγείρουν την κυτιδυλο-τρανσφεράση σε πνεύμονες εμβρύου, έχει προταθεί ότι ο διεγερτικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην ενεργότητα της κυτιδυλο-τρανσφεράσης σε πνεύμονες εμβρύου, έρχεται δεύτερος στην αυξημένη σύνθεση των λιπαρών οξέων, τα οποία είτε ως ελεύθερα λιπαρά οξέα είτε μετά την ενσωμάτωσή τους στα φωσφολιπίδια, ενεργοποιούν την κυτιδυλο-τρανσφεράση [157]. Είναι έτσι πολύ πιθανό η διέγερση της κυτιδυλο-τρανσφεράσης σε κύτταρα τύπου II εμβρύου από τον FPF να προέρχεται τουλάχιστον κατά ένα μέρος από την αυξημένη από αυτόν τον παράγοντα σύνθεση λιπαρών οξέων. Ωστόσο, ρύθμιση της κυτιδυλο-τρανσφεράσης μπορεί να γίνεται και πριν τη μετάφρασή της.



Ρύθμιση της σύνθεσης της φωσφατιδυλογλυκερόλης και της φωσφατιδυλινοσιτόλης

Το ποσοστό της PI μεταξύ των άλλων φωσφολιπιδίων στο ανθρώπινο αμνιακό υγρό αρχίζει να ανεβαίνει μετά την 28^η εβδομάδα της κύησης. Μετά από 35 εβδομάδες το ποσοστό αυτό μειώνεται και πάλι, ενώ την ίδια στιγμή ανεβαίνει το ποσοστό της PG [21]. Αυτό δείχνει τις αλλαγές που γίνονται στα είδη των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα που εκκρίνεται από πνεύμονα εμβρύου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια απομονωμένα από αμνιακό υγρό. Σε διάφορα πειραματόζωα έχει βρεθεί, επίσης, ότι συμβαίνει αύξηση του ποσοστού της PI στην προγεννητική περίοδο και μείωση στο χρονικό διάστημα περίπου της γέννησης με ακόλουθη αύξηση του ποσοστού της PG. Η αλλαγή σύνθεσης από PI σε PG οφείλεται κατά ένα μέρος στη μείωση της ινοσιτόλης του ορρού στο τέλος της κύησης και στην μειούμενη διαπερατότητα των κυττάρων τύπου II στην PI, μαζί με το γεγονός ότι η διαθεσιμότητα σε ινοσιτόλη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον καταμερισμό της CDP-διακυλογλυκερόλης μεταξύ της σύνθεσης της PI και της PG [158]. Τέλος, ενδοκυττάρια αύξηση της μονοφωσφορικής κυτιδίνης η οποία προέρχεται από αυξημένη σύνθεση της PC και μειωμένη ενεργότητα της μικροσωματιακής φωσφατιδυλο-τρανσφεράσης του γλυκεροφωσφατιδικού οξέος μπορεί να συμμετέχει στην διέγερση της σύνθεσης της PG [159].

ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα εκκρίνονται από τα κύτταρα τύπου II με εξωκύτωση των πολυστοιβαδωτών σωματίων [46] (Εικόνα 4). Σε αυτήν την εκκριτική διαδικασία φαίνεται να συμμετέχουν μικροσωληνίσκοι και μικρονημάτια [160]. Η έκκριση διεγείρεται από αυξημένο αερισμό [161]. Παράμόρφωση των κυττάρων τύπου II ή αλλαγή του pH ενδοκυττάρια μπορεί να λαμβάνουν μέρος σε αυτή τη διέγερση. Επιπλέον, η έκκριση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα διεγείρεται από αγωνιστές για τον β-αδρενεργικό, πουρινεργικό και του υποδοχέα της βασοπρεσίνης [160, 161]. Η διέγερση συνοδεύεται από αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του cAMP και της



κυτοσολικής συγκέντρωσης Ca^{2+} και περιλαμβάνει ενεργοποίηση της πρωτεΐνο-κινάσης A και της πρωτεΐνο-κινάσης C [7, 29]. Στη ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να συμμετέχουν και ανασταλτικοί μηχανισμοί: μελέτη έδειξε ότι η έκκριση της PC από απομονωμένα κύτταρα τύπου II αναστέλλεται από κορεσμένες PCs κάτω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης τους (π.χ. DPPC στους $37^{\circ}C$) [162]. Έτσι, όταν σχηματίζονται κυστίδια από καθαρή DPPC *in vivo*, μπορεί αυτά να ενεργούν ως ανασταλτικοί ρυθμιστές του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η έκκριση της PC από απομονωμένα κύτταρα τύπου II αναστέλλεται και από την SP-A όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω.

Εικόνα 4. Έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην επιφάνεια των κυψελίδων από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II.

1) Πνευμονοκύτταρα τύπου II
2) Πνευμονοκύτταρα τύπου I
3) Το στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα
4) Κυψελιδικό τριχοειδές αγγείο
5) Ερυθροκύτταρα [1].



Δεν είναι βέβαιο αν η SP-A εκκρίνεται μαζί με τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια. Αν και υπάρχουν μελέτες που συμφωνούν με αυτό, υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν ότι η SP-A εκκρίνεται με διαφορετικό τρόπο και όχι με την έκκριση των πολυστοιβαδωτών σωματιίων [163, 164]. Η απουσία της SP-D από τα πολυστοιβαδωτά σωματίδια δείχνει ότι αυτή η πρωτεΐνη εκκρίνεται ανεξάρτητα από την έκκριση της DPPC, ενώ η αυξημένη παρουσία των SP-B και SP-C στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια υποδεικνύει ότι αυτές οι υδρόφοβες πρωτεΐνες εκκρίνονται μαζί με τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα [165].

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι στη ρύθμιση της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμμετέχει το ένζυμο φωσφολιπάση A_2 το οποίο με

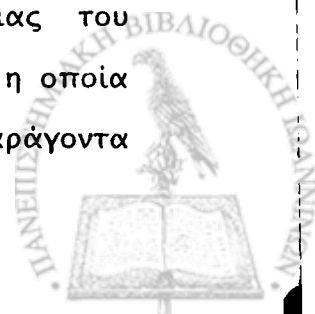
τη δράση του στα φωσφολιπίδια απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια είναι αυτό που διεγείρει την έκκριση από τα κύτταρα τύπου II. Με χρήση ειδικών αναστολέων των φωσφολιπασών A_2 βρέθηκε ότι η κυτοσολική PLase A_2 εξαρτώμενη Ca^{2+} μπορεί να μετέχει στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II αρουραίου [166].

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΙΣ

ΚΥΨΕΛΙΔΕΣ

Μετά την έκκριση τους στον κυψελιδικό χώρο, τα πολυστοιβαδωτά σωματίδια μετατρέπονται σε μορφή σωληνώδους μυελίνης [29, 167] (Σχήμα 2). Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, σε αυτή την ανακατανομή των φωσφολιπιδίων πιθανώς παίρνουν μέρος οι SP-A, SP-B και το Ca^{2+} . Η σωληνώδης μυελίνη είναι μάλλον η πρόδρομη μορφή της μονοστοιβάδας του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη μεσόφαση αέρα-υγρού. Οι SP-B, SP-C και SP-A μπορεί να συμμετέχουν στην εισαγωγή των φωσφολιπιδίων από τη σωληνώδη μυελίνη στη μονοστοιβάδα. Αυτή η επιφανειακή μεμβράνη εμπλουτίζεται σε DPPC, πιθανώς λόγω της επανειλημμένης διαστολής και συστολής η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των μορίων ακόρεστης PC. Η SP-B ίσως και η SP-A μπορεί να εμπλέκεται σε αυτόν τον εμπλουτισμό [7, 29, 40, 56, 60].

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας που ανακτάται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των πνευμόνων μπορεί να διαχωριστεί σε διαφορετικά υποκλάσματα με φυγοκεντρήσεις [29, 167]. Τα βαριά μεγάλα συσσωματώματα που περιέχουν τη σωληνώδη μυελίνη είναι πρόδρομες μορφές των ελαφρότερων, μικρών συσσωματωμάτων, τα οποία είναι κυρίως κυστίδια. Οι ελαφρές μορφές περιέχουν λιγότερες πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα, απορροφώνται λιγότερο εύκολα στη μεσόφαση αέρα-υγρού από ότι οι βαρύτερες μορφές και θεωρούνται μη χρήσιμος επιφανειοδραστικός παράγοντας χωρίς καλές λειτουργικές ιδιότητες. *In vitro*, η βαριά μορφή μπορεί να μετατραπεί στην ελαφριά μορφή. Η μετατροπή αυτή απαιτεί επαναλαμβανόμενη διαστολή και συστολή της επιφάνειας του επιφανειοδραστικού παράγοντα και τη δράση μιας σερίνο-πρωτεάσης η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα



και μπορεί να είναι ένα προϊόν των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II. Πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η SP-B αποικοδομείται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας [168]. Έχει υποτεθεί ότι μέσα στα μεγάλα συσσωματώματα η SP-B είναι δυσπρόσιτη στη σερίνο-πρωτεάση, αλλά κατά τη διάρκεια της ελάττωσης της επιφάνειας, όταν ο επιφανειοδραστικός παράγοντας απορροφάται στην αέρια-υγρή μεσόφαση, η SP-B μπορεί να διασπαστεί από την πρωτεάση. Κατά τη διάρκεια της ακόλουθης μείωσης της επιφάνειας, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, χωρίς πλέον την SP-B, σχηματίζει μικρά συσσωματώματα.

ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα απομακρύνονται από τις κυψελίδες κάθε 5-10 ώρες [7]. Αυτό μπορεί να γίνεται με αποδόμηση από τα κυψελιδικά μακροφάγα, μεταφορά τους από τους κροσσούς πιο ψηλά στους αεραγωγούς, ή με την κίνησή τους διαμέσου του επιθηλίου και ενδοθηλίου στο αίμα και στη λέμφο. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ένα μεγάλο μέρος των φωσφολιπιδίων επαναπροσλαμβάνεται και ξαναχρησιμοποιείται από τα κύτταρα τύπου II [167, 169]. Η αποτελεσματικότητα αυτού, η οποία μπορεί να ποικίλει με την ηλικία, μπορεί να φτάνει στο 85%. Μέρος των φωσφολιπιδίων αποδομούνται πιθανώς από τα λυσοσώματα και τα προϊόντα αποικοδόμησης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ένα άλλο μέρος ανακυκλώνεται αυτούσιο σε πολυστοιβαδωτά σωματίδια [161].

Η SP-A επαναπροσλαμβάνεται από τα κύτταρα τύπου II με ενδοκύττωση, πιθανώς διαμέσου υποδοχέων [161, 170, 171], και εναποτίθεται στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια χωρίς να αποδομηθεί [172]. Παρομοίως, η SP-B προσλαμβάνεται από τα κύτταρα τύπου II, ανακυκλώνεται χωρίς να αποδομηθεί στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια με τα οποία και επανεκκρίνεται ξανά [173]. Ωστόσο, μέρος της SP-B αποδομείται μέσα στα κύτταρα τύπου II [174]. Αν και η πρόσληψη της φτωχής σε φωσφολιπίδια SP-B από τα κύτταρα τύπου II δεν γίνεται διαμέσου υποδοχέων, υπάρχουν ενδείξεις ότι παρουσία φωσφολιπιδίων, η SP-B μπορεί να δεσμευτεί με ειδικές περιοχές στη μεμβράνη των κυττάρων τύπου II [175]. Επίσης, μετά από ενδοτραχειακή ενστάλαξη ιχνηθετημένης SP-C στους πνεύμονες

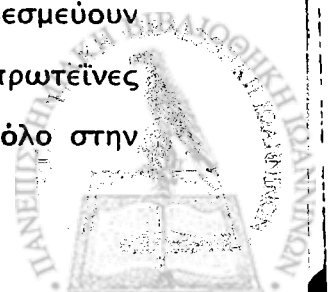


αρουραίου ανιχνεύθηκε πολύ γρήγορα ραδιενέργεια στα πολυστοιβαδωτά σωματία [176]. -

Για τη διατήρηση σταθερής κατάστασης, η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα καθώς και η απομάκρυνσή του πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία. Ένας ρυθμιστικός σύνδεσμος μεταξύ αυτών των διαδικασιών μπορεί να προέρχεται από τους β-αδρενεργικούς αγωνιστές. Αυτό όχι μόνο διεγείρει την έκκρισή του αλλά και της επαναπρόσληψή του. Έχει προταθεί ότι ένας τέτοιος ακόμη σύνδεσμος παρέχεται και από την SP-A, η οποία έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την έκκριση και έχει προταθεί ότι αυτό είναι ένα σήμα αναγνώρισης για την επαναπρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα κύτταρα τύπου II. Αυτό όμως αμφισβητείται. Είναι άγνωστο όμως μέχρι τώρα πως η ρύθμιση της σύνθεσης νέου επιφανειοδραστικού υλικού συζεύγνυται με τον έλεγχο της έκκρισης και με την απομάκρυνσή του. Στην κυψελιδική πρωτεΐνωση υπάρχει πλεόνασμα επιφανειοδραστικού υλικού στον κυψελιδικό χώρο. Το αν αυτό προέρχεται από υπερπαραγωγή, ατελή μεταβολισμό μέσα στις κυψελίδες ή από ατέλεια στην επαναπρόσληψη, παραμένει προς διευκρίνιση.

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Πριν την έκκρισή του ο επιφανειοδραστικός παράγοντας βρίσκεται αποθηκευμένος στα πολυστοιβαδωτά σωματία [29]. Αυτά τα οργανίδια στερούνται αριθμού ενζύμων που χρειάζονται για τη *de novo* σύνθεση της PC και της PG και για την ανάπλαση της PC σε DPPC, γεγονός που κάνει απίθανη τη συνεισφορά τους στη σύνθεση των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Έτσι, τα λιπίδια πρέπει με κάποιον τρόπο να μεταφέρονται στα πολυστοιβαδωτά σωματία κατά τη στιγμή δημιουργίας τους. Οι λεπτομέρειες αυτής της διαδικασίας δεν έχουν γίνει ακόμη κατανοητές. Μπορεί να περιλαμβάνεται μεταφορά κυστιδίων ή μεταφορά φωσφολιπιδίων μέσω ειδικών πρωτεϊνών [177, 178], ή/και συγχώνευση των μικρών κυστιδίων με τα πολυστοιβαδωτά σωματία από τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν φωσφολιπίδια [179]. Στα κύτταρα τύπου II, έχουν αναφερθεί διάφορες πρωτεΐνες που μεταφέρουν φωσφολιπίδια και υπάρχουν ενδείξεις ότι παίζουν ρόλο στην



ενδοκυττάρια μεταφορά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα πρώτα πειράματα που υποστήριζαν τη μεταφορά με κυστίδια [180], φανέρωσαν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα που συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων τύπου II, μεταφέρεται από το σύστημα Golgi στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια διαμέσου των αποκαλούμενων μικρών πολυστοιβαδωτών σωματίων. Το ίδιο συμπέρασμα υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες [181, 182]. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι πυκνά σωματίδια, με χαμηλή αναλογία φωσφολιπιδίων/πρωτεϊνών, αναπτύχθηκαν σε ώριμα πολυστοιβαδωτά σωματίδια. Άλλες μελέτες, προτείνουν ότι στα κύτταρα τύπου II οι SP-B, SP-C και μέρος της SP-A η οποία εκκρίνεται με τα πολυστοιβαδωτά σωματίδια, μεταφέρονται στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια μαζί με την ίδια βιοσυνθετική πορεία διαμέσου πολυκυστιδιακών σωμάτων [183]. Τα πολυκυστιδιακά σώματα του συστήματος Golgi τα οποία σχετίζονται με τη μεταφορά των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το σύστημα Golgi στα πολυστοιβαδωτά σωματίδια πιθανώς δεν έχουν καμία σχέση με τη μεταφορά των φωσφολιπιδίων.



3) ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΟΞΕΙΑΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΥΣΧΕΡΕΙΑΣ (ARDS)

ΓΕΝΙΚΑ

Το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) περιγράφηκε κλινικά για πρώτη φορά από τον Ashbaugh et al το 1967 [76]. Αρχικά, είχε περιγραφεί με τον όρο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (Adult Respiratory Distress Syndrome, ARDS) σε παραλληλισμό με το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών (Infant Respiratory Distress Syndrome, IRDS) το οποίο είχε περιγραφεί νωρίτερα. Το ARDS είναι η βαρύτερη μορφή της οξείας πνευμονικής βλάβης (Acute Lung Injury, ALI) (Πίνακας 3). Η οξεία πνευμονική βλάβη είναι ένας γενικός όρος που αναφέρεται σε οξείες καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από υποξυγοναιμία και παθολογική ακτινογραφία θώρακα.

Το ARDS είναι ένα σύνδρομο με οξεία έναρξη, χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και αυξημένη διαβατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης που συνδυάζεται με κλινικές και ακτινολογικές διαταραχές, που δεν μπορούν να αποδοθούν σε υπέρταση του αριστερού κόλπου ή των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων.

Σήμερα θεωρείται ότι το ARDS είναι ένα παθοφυσιολογικό αποτέλεσμα που προκαλείται από διάχυτη πνευμονική βλάβη και επηρεάζει το πνευμονικό παρέγχυμα, το τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα, τα αγγεία και τους αεραγωγούς.

Κλινική ταξινόμηση

Το Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων (ARDS) αποτελεί την κατάληξη μιας σειράς νοσημάτων. Χαρακτηρίζεται από πνευμονικό οίδημα, λόγω της αυξημένης διαπερατότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης [184], και είναι μέρος του συνδρόμου ανεπάρκειας ή δυσλειτουργίας πολλαπλών οργάνων. Η θνησιμότητα των ασθενών παραμένει υψηλή, σε ποσοστό 40-60 %, 25 και πλέον χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή του. Η αντιμετώπισή του, παρά τη μεγάλη συσσώρευση πληροφοριών σχετικά με την παθογένεσή του παραμένει συμπτωματική.



Πίνακας 3. Σύστημα αξιολόγησης της βαρύτητας της πνευμονικής βλάβης (Murray's score) [185]. (Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με τη διαίρεση του αθροίσματος της κάθε μιας παραμέτρου δια του αριθμού των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν).

Βαθμολόγηση ακτινογραφίας θώρακος		Βαθμολόγηση υποξυγοναιμίας (PaO_2/FiO_2)		Διατασιμότητα (ml/cm H ₂ O)		PEEP που εφαρμόζεται	
Χωρίς κυψελιδική διήθηση	0	≥ 300	0	≤ 80	0	≤ 5	0
Διήθηση του 1/4 των πνευμονικών πεδίων	1	225-229	1	60-79	1	6-8	1
Διήθηση των 2/4 των πνευμονικών πεδίων	2	175-224	2	40-59	2	9-11	2
Διήθηση των 3/4 των πνευμονικών πεδίων	3	100-174	3	20-39	3	12-14	3
Διήθηση των 4/4 των πνευμονικών πεδίων	4	≤ 100	4	≤ 19	4	≥ 15	4
Βαθμολόγηση							
Χωρίς βλάβη						0	
Ελαφρά έως σοβαρή βλάβη						0.1-2.5	
Σοβαρή βλάβη (ARDS)						> 2.5	



Η φάση της δημιουργίας του πνευμονικού οιδήματος αυξημένης διαπερατότητας χαρακτηρίζεται ως εξιδρωματική (exudative) φάση του ARDS και διαρκεί μέχρι τρεις μέρες από την έναρξη της οξείας πνευμονικής βλάβης. Μετά την εξιδρωματική φάση, και μεταξύ της τρίτης και της έβδομης περίπου μέρας από την έναρξη του συνδρόμου, ακολουθεί η παραγωγική (proliferative) φάση του ARDS [186], που έχει αναπλαστικό χαρακτήρα. Στη συνέχεια, ορισμένοι ασθενείς μεταπίπτουν στην επόμενη φάση, που χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία ινώδους ιστού στο διάμεσο ιστό και στις κυψελίδες. Η φάση αυτή τοποθετείται χρονικά μετά την πρώτη εβδομάδα από την έναρξη του ARDS και ονομάζεται ινωτική (fibrotic). Σε άλλους ασθενείς, η εξέλιξη της παραγωγικής φάσης γίνεται προς την κατεύθυνση της αποκατάστασης της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του πνευμονικού παρεγχύματος (tissue repair) και της πλήρους ίασης.

Στις περιπτώσεις όπου η διάχυτη κυψελιδική βλάβη εξελίσσεται μέχρι το ινωτικό στάδιο, η αναπνευστική λειτουργία δε βελτιώνεται και η πρόγνωση συχνά είναι κακή. Μετά από μια παρατεταμένη περίοδο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (πυρετός, ταχύπνοια, ταχυκαρδία), σήψης και δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας πολλών οργάνων (Multiple Organ Dysfunction Syndrome-MODS και Multiple Organ Failure-MOF αντίστοιχα) παρά την συνεχή μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, οι ασθενείς καταλήγουν. Αντίθετα, όσοι ασθενείς θεραπεύονται από την οξεία βλάβη του πνεύμονα, ανακτούν φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία [187].

Έτσι, το ARDS κατατάσσεται σε πρώιμο (early) (1-3 ημέρες από την εκδήλωσή του), ενδιάμεσο (intermediate) (4-6 ημέρες) και όψιμο (late) (≥ 7 ημέρες από την εκδήλωσή του).

Αίτια εμφάνισης του ARDS

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών του ARDS είναι η βλάβη της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης είτε από την πλευρά του αέρα (κυψελιδικό επιθήλιο), είτε από την πλευρά του αίματος (τριχοειδικό ενδοθήλιο). Οι παράγοντες που προσβάλλουν το κυψελιδικό επιθήλιο χαρακτηρίζονται ως άμεσοι (εισρρόφηση, εισπνοή τοξικών ουσιών,), ενώ αυτοί που προσβάλλουν το κυψελιδικό ενδοθήλιο ως έμμεσοι (σήψη, λιπώδης εμβολή,) (Πίνακας 4).



Παρά τις διαφορετικές αιτιολογίες, οι κλινικές, παθοφυσιολογικές και ιστοπαθολογικές διαταραχές στο ARDS είναι κοινές και παρουσιάζουν αρκετές ομοιομορφίες με εκείνες που παρατηρούνται στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών (RDS) που συχνά συνοδεύει την πρόωρη γέννηση πριν την ωρίμανση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Πίνακας 4. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS

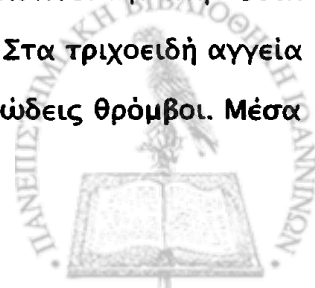
Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS	
άμεσοι	έμμεσοι
εισρρόφηση	σήψη
εισπνοή τοξικών ουσιών	σοβαρός τραυματισμός
πνευμονική λοίμωξη	πολλαπλές μεταγγίσεις
παρολίγον πνιγμός	λιπώδης εμβολή
θλάση πνεύμονος	καρδιοπνευμονική παράκαμψη

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η έναρξη της αναπνευστικής δυσχέρειας επέρχεται μόλις λίγες ώρες μετά τη δράση του αιτίου που προκάλεσε την αρχική βλάβη (στο 80 % των περιπτώσεων μέσα σε 24 ώρες). Δύσπνοια και ταχύπνοια μπορεί να εμφανιστούν πριν την εμφάνιση ακτινολογικών ευρημάτων. Η κλινική εικόνα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υποκείμενη νόσο που προδιαθέτει στο ARDS. Στη φυσική εξέταση παρατηρούνται ταχύπνοια, ταχυκαρδία, σημεία αυξημένου έργου αναπνοής, κυάνωση, υπόταση.

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Η μακροσκοπική εξέταση των πνευμόνων με ARDS δείχνει αιμορραγικούς διηθηματώδεις πνεύμονες. Εξέταση με το μικροσκόπιο αποκαλύπτει την παρουσία οιδήματος στον κυψελιδικό χώρο αλλά και στο διάμεσο χώρο. Στα τριχοειδή αγγεία συχνά συναντώνται φλεγμονώδη κύτταρα, αιμοπετάλια και ινώδεις θρόμβοι. Μέσα



στις κυψελίδες διακρίνονται ερυθρά κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και σε μερικές περιπτώσεις ηωσινόφιλα. Τα επιθηλιακά κύτταρα που επικαλύπτουν τις κυψελίδες συχνά παρουσιάζουν στοιχεία βλάβης, ενώ σε πολλές περιοχές (κυρίως στις ραχιαίες περιοχές του πνεύμονα) διακρίνονται κλειστές κυψελίδες [188].

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Άνταλλαγή αερίων αίματος

Κατά την εισβολή του ARDS παρατηρείται χαρακτηριστικά μεγάλη ταχύπνοια και υποξυγοναιμία, που δεν διορθώνεται με χορήγηση οξυγόνου. Η υποξυγοναιμία που οφείλεται σε ενδοπνευμονικό βραχυκύκλωμα το οποίο φτάνει το 25-80 % (φυσιολογικές τιμές <10 %) της καρδιακής παροχής. Για τον ίδιο λόγο αυξάνεται και ο κατά λεπτόν αερισμός. Η πτώση της μερικής πίεσης του οξυγόνου σε μια κυψελίδα προκαλεί σύσπαση των αγγείων που την αιματώνουν και υποξική πνευμονική αγγειοσύσπαση στην προσπάθεια να συνδυαστεί καλύτερος ο αερισμός και η αιμάτωση. Η υποξαιμική πνευμονική αγγειοσύσπαση περιορίζει το ποσοστό του βραχυκυκλώματος, εκτρέποντας την αιμάτωση από τις μη αεριζόμενες στις αεριζόμενες περιοχές.

Μηχανικές παράμετροι

Στο ARDS, η πνευμονική διατασιμότητα (compliance) μειώνεται και αποτελεί το μέτρο της μεταβολής των μηχανικών ιδιοτήτων του πνεύμονα. Οι αντιστάσεις ροής αυξάνουν εξαιτίας της ύπαρξης εκκρίσεων, οιδήματος και βρογχόσπασμου. Το έργο της αναπνοής είναι αυξημένο, με αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής κατανάλωσης οξυγόνου (από < 5 % σε > 30 %). Για την εξυπηρέτηση των αυξημένων ενεργειακών αναγκών γίνεται ανακατανομή της ροής του αίματος από άλλα ζωτικά όργανα προς τους αναπνευστικούς μύες.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Η οξεία αναπνευστική βλάβη περιλαμβάνει διαταραχές του ενδοθηλίου των τριχοειδών αγγείων και του κυψελιδικού επιθηλίου. Ο μηχανισμός της βλάβης είναι είτε άμεσος στα κύτταρα του πνεύμονα, είτε έμμεσος ως αποτέλεσμα οξείας συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης.

Δημιουργία πνευμονικού οιδήματος

Το κύριο χαρακτηριστικό του ARDS είναι η δημιουργία οιδήματος στον πνεύμονα. Ως πνευμονικό οίδημα ορίζεται η παθολογική συσσώρευση εξωαγγειακού ύδατος στους πνεύμονες και κατατάσσεται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την αιτιολογία:

➤ **Οίδημα αυξημένων υδροστατικών πιέσεων**

Η συχνότερη αιτία των αυξημένων υδροστατικών πιέσεων στην πνευμονική κυκλοφορία είναι η αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια και η αύξηση της πίεσης του αριστερού κόλπου.

➤ **Οίδημα αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων του πνεύμονα**

Είναι το πνευμονικό οίδημα που οφείλεται στην αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης

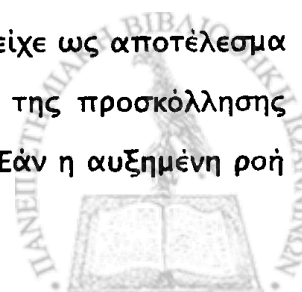
➤ **Οίδημα μικτό ή αδιευκρίνιστο**

Στην κατηγορία αυτή αναφέρονται το πνευμονικό οίδημα από πνευμονική εμβολή, το πνευμονικό οίδημα από μεγάλο υψόμετρο, το νευρογενές πνευμονικό οίδημα, το πνευμονικό οίδημα μετά από σπασμούς και το πνευμονικό οίδημα μετά από επανέκπτυξη.

Πως όμως συγκεντρώνονται τα υγρά στον κυψελιδικό χώρο των πνευμόνων ασθενών με ARDS;

Ρόλος της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης

Το πρώτο μηχανικό φράγμα που δεν επιτρέπει τη διαροή πλάσματος από τον αγγειακό χώρο είναι το ενδοθηλίο των τριχοειδών αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται ενωμένα μεταξύ τους ώστε να παρεμποδίζεται η έξοδος των πρωτεϊνών του πλάσματος. Το ενδοθηλίο έχει φυσιολογική μικρή διαπερατότητα [189]. Πρωτεϊνικά μόρια μικρού μοριακού βάρους μπορούν να εισέρχονται στο διάμεσο χώρο κατά ένα ελεγχόμενο τρόπο. Στη συνέχεια απομακρύνονται από εκεί δια μέσου του λεμφικού συστήματος. Αυξημένη διέλευση μακρομορίων και υγρών από το στρώμα του ενδοθηλίου στο διάμεσο χώρο θα συμβεί ύστερα από οποιαδήποτε προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων που θα είχε ως αποτέλεσμα την χαλάρωση των ενώσεων μεταξύ των κυττάρων, μείωση της προσκόλλησης αυτών στη βασική μεμβράνη ή μείωση της ζωτικότητάς τους. Εάν η αυξημένη ροή



υγρών στο διάμεσο χώρο είναι μεγαλύτερη από αυτή την οποία μπορεί να διαχειριστεί το λεμφικό σύστημα, ο όγκος του διαμέσου χώρου θα εκπτυχθεί (διάμεσο πνευμονικό οίδημα). Επειδή όμως ο χώρος αυτός είναι περιορισμένος, στη συνέχεια τα υγρά θα κατευθυνθούν στον κυψελιδικό χώρο.

Το κύριο φράγμα που περιορίζει το πέρασμα των υγρών από το τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα στον κυψελιδικό χώρο είναι το κυψελιδικό επιθήλιο, το οποίο επικαλύπτεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου I και πνευμονοκύτταρα τύπου II. Αυτά τα κύτταρα είναι ενωμένα μεταξύ τους πολύ πιο ισχυρά από ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, το επιθήλιο σχηματίζει ένα φράγμα πιο ισχυρό έναντι στη μετακίνηση υγρών από ότι το ενδοθήλιο. Οποιαδήποτε βλάβη που θα επέφερε χαλάρωση στις συνδέσεις των επιθηλιακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη ή θα μείωνε τη ζωτικότητα τους, θα προκάλούσε διαρροή υγρών από το διάμεσο χώρο στις κυψελίδες και κυψελιδικό πνευμονικό οίδημα [190].

Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, εκτός από τη συμμετοχή τους στο φυσικό φραγμό του κυψελιδικού επιθηλίου, παίζουν και έναν ακόμη ρόλο στη ρύθμιση της διακίνησης των υγρών στον κυψελιδικό χώρο, μέσω της σύνθεσης και έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η μείωση της επιφανειακής τάσης στη μεσόφαση αέρα/υγρού ελαττώνει τη δραστική πίεση μετακίνησης υγρού από τα αγγεία στο διάμεσο χώρο.

Συμπερασματικά, οποιαδήποτε βλάβη στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων, στο κυψελιδικό επιθήλιο ή στο σύστημα του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να προκαλέσει ARDS. Η αυξημένη διαβατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης στο ARDS έχει καταδειχθεί σε πολλές πειραματικές μελέτες [191, 192, 193, 194].

Φλεγμονή στον πνεύμονα

Παρότι μεγάλη ποικιλία υποκείμενων καταστάσεων προδιαθέτουν για την εμφάνιση ARDS, οι παθοφυσιολογικές διαταραχές που παρατηρούνται στον πνεύμονα έχουν πολλές ομοιότητες. Αυτές οι ομοιότητες έχουν οδηγήσει πολλούς ερευνητές στο να θεωρούν δεδομένη την ύπαρξη μιας τελικής κοινής πορείας στην εμφάνιση του ARDS. Ωστόσο δεν έχει αναγνωρισθεί μέχρι τώρα ένας μοναδικός παθοφυσιολογικός μηχανισμός σε όλες τις περιπτώσεις. Υπάρχουν περισσότεροι του ενός μηχανισμοί που οδηγούν στη φλεγμονή [195] και στη δημιουργία



οιδήματος. Σε μερικές μόνο περιπτώσεις ο μηχανισμός είναι σχετικά απλός, όπως όταν ένας εξωγενής παράγοντας προκαλεί άμεση βλάβη στα κύτταρα του τριχοειδοκυψελιδικού τοιχώματος [196].

Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις που οδηγούν σε ARDS, η εξήγηση δεν είναι τόσο απλή όπως η άμεση τοξική επίδραση ενός εξωγενούς παράγοντα. Χωρίς αμφιβολία, πολλαπλοί μηχανισμοί συμμετέχουν. Σε πολλές περιπτώσεις ARDS, φαίνεται ότι μια γενική φλεγμονώδη αντίδραση είναι αυτή που οδηγεί στη διάχυτη βλάβη των κυψελίδων και στο οίδημα [197]. Όμως ποια είναι ακριβώς τα γεγονότα που προκαλούν αύξηση της διαβατότητας του τριχοειδοκυψελιδικού φράγματος;

Κύτταρα

Η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση περιλαμβάνει κυτταρικούς και χυμικούς παράγοντες. Στην κυτταρική αντίδραση μπορεί να συμμετέχουν τα ουδετερόφιλα και τα αιμοπετάλια καθώς και κύτταρα που βρίσκονται εγκατεστημένα στο κυψελιδικό επιθήλιο (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) καθώς και ινοβλάστες. Προσκόλληση, χημειοταξία και ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων με έκφραση των μορίων προσκόλλησης είναι κάποιες από τις πιθανές δράσεις. Καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής μπορεί να παίζει επίσης η μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στο κυψελιδικό διάστημα και η τοπική απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών [198]. Διαπιστώθηκε συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων σε ιστό πνεύμονα [199] καθώς και σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα [200] ασθενών με ARDS.

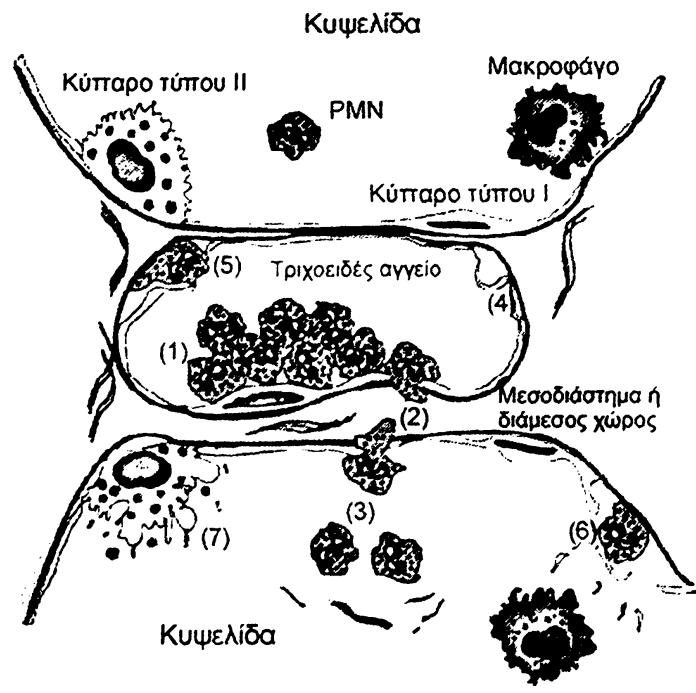
✓ Ουδετερόφιλα

Το ενδιαφέρον αρχικά επικεντρώθηκε στα ουδετερόφιλα τα οποία θεωρήθηκαν ότι προκαλούν άμεση βλάβη στις κυψελίδες [201]. Τα δεδομένα που υπήρχαν έδειχναν ότι:

- τα ουδετερόφιλα και τα προϊόντα που εκκρίνουν συσσωρεύονται στους πνεύμονες ασθενών με ARDS [202]

Από ιστολογικές μελέτες παρατηρήθηκαν συσσωματώματα ουδετερόφιλων στους πνεύμονες ασθενών με ARDS. Μερικά από αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν από τον αγγειακό χώρο στο διάμεσο χώρο και μετά στον κυψελιδικό χώρο (Σχήμα 8). Βρέθηκε αυξημένο ποσοστό ουδετερόφιλων σε BAL ασθενών με ARDS (μέχρι και 80 %)

σε σύγκριση με ομάδα φυσιολογικών (~3 %) [224, 203]. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους πνεύμονες διαμέσου πολλών μηχανισμών, όπως με την έκκριση του περιεχομένου των λυσοσωμάτων τους και των προϊόντων οξειδωσης που απελευθερώνουν μετά από ενεργοποίησή τους [204, 205]. Η συσσώρευση των ουδετερόφιλων σχετίζεται με ενεργοποίησή τους [206]. Αυξημένες συγκεντρώσεις προϊόντων έκκρισης των ουδετερόφιλων έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα ασθενών με ARDS [207]. Επιπλέον, μια μελέτη ασθενών με ήπια πνευμονική βλάβη και ουδετεροπενία, έδειξε ότι η βλάβη των πνευμόνων αυξάνονταν όσο βελτιώνονταν η αιματολογική τους εικόνα και το επίπεδο των ουδετερόφιλων [208].



Σχήμα 8. Τα ουδετερόφιλα στην ανάπτυξη του ARDS. (1) Ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται στα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία και προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. (2) Ένας μικρός πληθυσμός ουδετερόφιλων μεταναστεύουν στο διάμεσο χώρο. (3) Ένας μικρός πληθυσμός ουδετερόφιλων μεταναστεύουν στον κυψελιδικό χώρο. (4) τα ουδετερόφιλα προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο δημιουργώντας κύστες και νέκρωση. (5) Περιοχές του ενδοθηλίου αποκολλώνται από τη βασική μεμβράνη. (6) Στον κυψελιδικό χώρο, τα ουδετερόφιλα αποκολλούν και προκαλούν βλάβη σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου I. (7) Σε σοβαρή βλάβη, τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II καταστρέφονται [209].



Παρά το γεγονός ότι τα ουδετερόφιλα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές περιπτώσεις ασθενών με ARDS, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι δεν συμμετέχουν σε όλες τις περιπτώσεις. Αναφέρθηκε η ανάπτυξη ARDS σε ασθενείς με σοβαρή ουδετεροπενία για ημέρες πριν την έναρξη της πνευμονικής βλάβης [210, 211, 212]. Επίσης, αυξημένος αριθμός ουδετερόφιλων βρέθηκε σε υγρό BAL ασθενών που παρότι θεωρήθηκαν σε κίνδυνο να αναπτύξουν ARDS, αυτό δεν συνέβη [225].

- σε πολλά μοντέλα ζώων με ARDS η απομάκρυνση των ουδετερόφιλων προστατεύει τους πνεύμονες

Ενδοφλέβια χορήγηση ενδοτοξίνης σε μοντέλο ζώου προκάλεσε μια σειρά γεγονότων, ένα από τα οποία ήταν και η αύξηση της διαβατότητας της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης με δημιουργία οιδήματος στον κυψελιδικό χώρο [213], ενώ η απομάκρυνση των ουδετερόφιλων πριν τη χορήγηση της ενδοτοξίνης έδρασε προστατευτικά μειώνοντας την έκταση του πνευμονικού οιδήματος [214].

- ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε καλλιέργειες κυττάρων

Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα με καλλιέργειες ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων από τα οποία προέκυψε ότι τα ουδετερόφιλα αποκολλούν τα ενδοθηλιακά ή τα επιθηλιακά κύτταρα από την επιφάνεια της καλλιέργειας στο τρυβλίο [215, 216]. Προφανώς εάν αυτό συνέβαινε και *in vivo*, οι απογυμνωμένες επιφάνειες θα επέτρεπαν την ακόλουθη διαρροή των πρωτεϊνών του πλάσματος. Επιπλέον μελέτες παρείχαν στοιχεία όπως ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα είναι ικανά να λύουν καλλιέργειες αγγειακών ενδοθηλιακών [217, 218] και επιθηλιακών κυττάρων [219].

✓ **Μακροφάγα**

Τα μακροφάγα, τα οποία βρίσκονται στον κυψελιδικό χώρο και στον διάμεσο χώρο μεταξύ ενδοθηλίου και κυψελιδικού επιθηλίου, είναι ικανά να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες τοπικά, όπως και τα ουδετερόφιλα. Περιέχουν ποικιλία αποικοδομητικών ενζύμων και απελευθερώνουν προϊόντα οξειδωσης. Μπορούν να προσλάβουν ένζυμα τα οποία ελευθερώνονται από άλλα είδη κυττάρων και να τα χρησιμοποιήσουν για αποικοδόμηση διαφόρων ουσιών [220]. Εκτός από την άμεση

βλάβη που μπορούν να προκαλέσουν, μπορούν να συμμετέχουν και στην απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, IL-1, IL-8, TNF- α και ιντερφερόνες.

✓ Ηωσινόφιλα

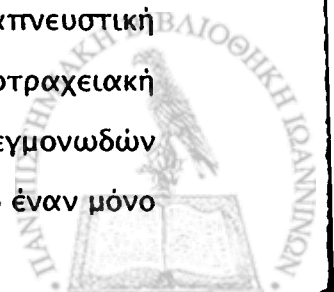
Η παρουσία αυτών των κυττάρων σε υγρό BAL ασθενών με ARDS υποδεικνύει τη συμμετοχή τους κατά τη διάρκεια του συνδρόμου [221]. Βρέθηκε ότι ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα έχουν την ικανότητα να προκαλούν βλάβη στα κύτταρα του πνευμονικού παρεγχύματος *in vitro* [222].

Λιποπολυσακχαρίτες (ή ενδοτοξίνες)

Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) φαίνεται ότι μπορεί να είναι παράγοντες πυροδότησης του ARDS. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με ARDS [223]. Μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη με διάφορους τρόπους [96]. Το πιο πιθανό όμως είναι να δρουν σε συνεργασία με άλλους παράγοντες. Μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση κυτταροκινών από διάφορα κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την απόκριση των ουδετερόφιλων και/ή των μακροφάγων (βλ. σελ. 22). Έχουν την ικανότητα να προκαλούν οξεία πνευμονική βλάβη σε μοντέλα ζώων, ενώ σε ανθρώπους η παρουσία τους μόνο δεν φαίνεται να είναι επαρκής για να προκληθεί ARDS.

Μεσολαβητές της φλεγμονής

Η ακριβής αλληλουχία των σταδίων στη φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγούν σε πνευμονική βλάβη, δεν είναι πλήρως κατανοητή. Έχουν διαπιστωθεί μεταβολές στα επίπεδα των φλεγμονωδών μεσολαβητών που εκκρίνονται από τα κύτταρα, όπως κυτταροκίνες, λιπιδικοί μεσολαβητές, οξειδωτικοί παράγοντες, πρωτεάσες, οξειδίο του αζώτου, παράγοντες ανάπτυξης, νευροπεπτίδια και επαγωγή των πρωτεϊνών σύνθεσης. Μεσολαβητές της φλεγμονής βρέθηκαν σε έκπλυμα πνευμόνων ή/και σε ορρό ασθενών, οι οποίοι ως γνωστόν προσελκύουν ή απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα [224, 225, 226]. Αναπνευστική δυσχέρεια μπορεί να αναπτυχθεί σε μοντέλα ζώων ύστερα από ενδοτραχειακή ενστάλλαξη ή ενδοφλεβική διάχυση ενός ευρέως φάσματος φλεγμονωδών μεσολαβητών [227]. Είναι σχεδόν βέβαιο ότι το ARDS δεν προκαλείται από έναν μόνο



μεσολαβητή [228], στοιχείο που ενισχύεται από τη φτωχή θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών σε χορήγηση μεμονωμένων ανταγωνιστών των μεσολαβητών.

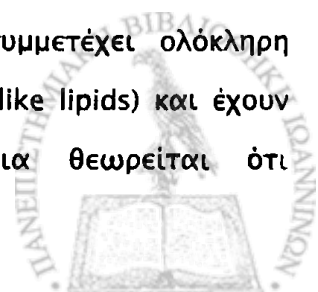
Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Λιπιδικοί μεσολαβητές

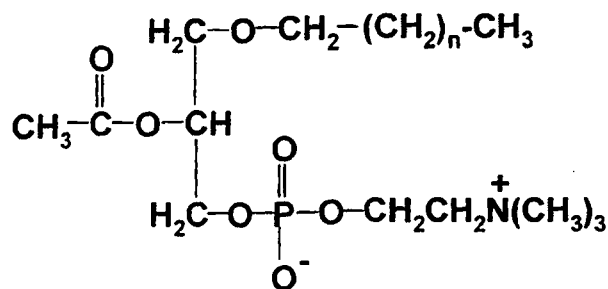
Οι λιπιδικοί μεσολαβητές είναι μια μεγάλη οικογένεια βιολογικά δραστικών μορίων που προέρχονται από φωσφολιπίδια και παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Η πιο καλά μελετημένη τάξη λιπιδικών μεσολαβητών είναι αυτοί που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ και ονομάζονται εικοσανοειδή. Από αυτά τα πιο σημαντικά είναι οι προσταγλανδίνες, το θρομβοξάνιο A_2 , η προστακυκλίνη και τα λευκοτριένια. Με τη δράση της κυκλοξυγονάσης στο αραχιδονικό οξύ σχηματίζονται οι προσταγλανδίνες PGE_2 και PGD_2 , η προστακυκλίνη PGI_2 και το θρομβοξάνιο A_2 (TXA_2). Η δράση της κυκλοξυγονάσης αναστέλλεται από το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) το οποίο ακετυλιώνει μη αντιστρεπτά το ένζυμο έτσι ώστε να μην είναι δυνατή η σύνδεσή του με το αραχιδονικό οξύ. Τα λευκοτριένια σχηματίζονται από το αραχιδονικό οξύ με τη δράση του ενζύμου 5-λιποξυγονάση το οποίο εκκινεί την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος.

Στους λιπιδικούς μεσολαβητές, οι οποίοι έχουν δράση τοπικής ορμόνης και ονομάζονται και αυτακοειδή, οφείλεται ένα σημαντικό μέρος της ρύθμισης της φλεγμονής, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δρουν κατά τη διάρκεια αυτής. Οι λιπιδικοί μεσολαβητές δεν βρίσκονται αποθηκευμένοι ως προσχηματισμένοι μεσολαβητές, αλλά δημιουργούνται ταχύτατα ύστερα από ερεθισμό ή ενεργοποίηση των κυττάρων. Η παρουσία αυτών των λιπιδίων θεωρείται απαραίτητη στη ρύθμιση της φλεγμονής, ενώ ερευνάται η συμμετοχή τους στη βλάβη των ιστών και στις ασθένειες.

Ένας ισχυρότατος λιπιδικός μεσολαβητής της αλλεργίας και της φλεγμονής είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet-activating factor ή PAF), ενώ τώρα θεωρείται ότι στις διαδικασίες αυτές συμμετέχει ολόκληρη οικογένεια μορίων που ομοιάζουν δομικά προς τον PAF (PAF-like lipids) και έχουν αντίστοιχες παθοφυσιολογικές δράσεις. Αντίστοιχα μόρια θεωρείται ότι



προκύπτουν και κατά την οξείδωση των λιπιδίων, οπότε προκύπτουν οξειδωμένα προϊόντα που ενέχονται στην παθοφυσιολογία διαφόρων παθήσεων (αθηρωμάτωση κ.τ.λ.).



Σχήμα 9. Χημικός τύπος του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF).

Ο PAF [229] είναι ένα ακετυλιωμένο φωσφογλυκερίδιο, 1-Ο-αλκυλ-2-ακετυλ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF) (Σχήμα 9), ο οποίος είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής, έχει την ικανότητα να προκαλεί οξείες και χρόνιες αλλεργικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις [230], ενέχεται στις οξείες αλλά και στις διαρκείς πνευμονικές επιπλοκές, ρυθμίζει φυσιολογικές καθώς και παθοφυσιολογικές διαδικασίες [231] και συμμετέχει επίσης σε μια ποικιλία άλλων βιολογικών φαινομένων, ρυθμίζοντας την καρδιαγγειακή, πνευμονική, νεφρική, ηπατική λειτουργία. Η συμμετοχή του στη νευροφυσιολογία και στην αναπαραγωγική φυσιολογία έχει επίσης αναφερθεί.

Ο PAF ανακαλύφθηκε το 1966, οπότε ανακοινώθηκε ότι το μίγμα αιμοπεταλίων κουνελιού και λευκοκυττάρων ενεργοποιημένων με επίδραση ειδικού αντιγόνου, παράγουν ισταμίνη [232]. Η λιπιδική του φύση καθώς και η συσσωρευτική του δράση στα αιμοπετάλια διαπιστώθηκε μετά [233, 234]. Το 1979 αναγνωρίστηκε πλέον ο βιολογικός του ρόλος σαν χημικού μεσολαβητή στην αλλεργία και στη δημιουργία φλεγμονής, διευκρινίστηκε η χημική του δομή [235, 236], παρασκευάστηκε συνθετικά και βρέθηκαν διάφορα μοριακά του είδη.

Ο PAF παράγεται και εκκρίνεται, μετά από διέγερση, από διάφορα είδη κυττάρων όπως, τα φλεγμονώδη ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα [237] (αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, νεφρικά κύτταρα) και βρίσκεται σε ιστούς και βιολογικά υγρά όπως, αίμα, δέρμα, αμφιβληστροειδή χιτώννα, πνεύμονες, μυοκάρδιο, αμνιακό υγρό εγκύου, ήπαρ, σάλιο,

εγκέφαλο και νεφρά [229]. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο PAF παίζει έναν σημαντικό ανοσορυθμιστικό ρόλο επηρεάζοντας την παραγωγή κυτταροκινών [238, 239].

Μεταβολισμός του PAF

Πορεία ανάπλασης (Remodeling pathway)

Για τη βιοσύνθεσή του PAF στα φλεγμονώδη κύτταρα έχει προταθεί ενζυμική πορεία απακυλίωσης και κατόπιν ακετυλίωσης [240]. Διέγερση του κυττάρου και παραγωγή ιόντων Ca^{2+} , έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας φωσφολιπάσης A_2 (PLase A_2), ένζυμο το οποίο υδρολύει τον εστερικό δεσμό με μεγάλης αλυσίδας λιπαρό οξύ (κυρίως αραχιδονικό οξύ) της *sn*-2 θέσης της αλκυλ-ακυλο-GPC. Το παραγόμενο λυσο-φωσφολιπίδιο, η 1-*O*-αλκυλ-2-λυσο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, ακετυλιώνεται στη συνέχεια από μια ειδική ακετυλοτρανσφεράση για να σχηματίσει το βιολογικά δραστικό μόριο PAF [241]. Η μεταβολική αποδόμηση του PAF πραγματοποιείται με τη δράση της ακετυλυδρολάσης (AcH), ένα ένζυμο που πολύ γρήγορα υδρολύει την ακετυλομάδα του PAF [242, 243] παράγοντας λυσο-PAF. Ο βιολογικά ανενεργός λυσο-PAF, που σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμφανίζει κυτταροτοξική δράση λόγω των γενικών απορρυπαντικών ιδιοτήτων των λυσοφωσφολιπιδίων, μπορεί να επανακυλιωθεί με ένα λιπαρό οξύ μεγάλης λιπαρής αλυσίδας με τη δράση της ακυλοτρανσφεράσης, κλείνοντας έτσι το μεταβολικό κύκλο [244].

De novo πορεία βιοσύνθεσης

Μια δευτέρα ενζυμική πορεία εξ αρχής (*de novo*) βιοσύνθεσης του PAF έχει επίσης περιγραφεί. Η πορεία ξεκινά με το 1-*O*-αλκυλο-2-λυσο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικό οξύ το οποίο ακετυλιώνεται στη θέση *sn*-2 με την δράση μιας ακετυλοτρανσφεράσης αναξάρτητης του ακετυλο-CoA [245]. Ακολουθεί υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στην *sn*-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού με τη δράση της φωσφοϋδρολάσης του 1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού οξέος [246, 247]. Το τελικό στάδιο καταλύεται από το ένζυμο φωσφοχολινοτρανσφεράση, η οποία χρησιμοποιεί CDP-χολίνη και 1-*O*-αλκυλ-2-ακετυλ-*sn*-γλυκερόλη [248, 249, 250] για να σχηματιστεί ο PAF.



Μοριακά είδη του PAF

Ο PAF που συντίθεται από ανθρώπινα ενεργοποιημένα PMN αποτελείται από έναν αριθμό διαφορετικών μοριακών ειδών περιλαμβάνοντας, κορεσμένα και ακόρεστα 1-Ο-αλκυλ- ομόλογα του PAF, 1-Ο-ακυλ- ανάλογα και ακετυλιωμένα φωσφογλυκερίδια έχοντας πολικά άκρα άλλα εκτός της χολίνης. Ωστόσο οι μεγαλύτερες και περισσότερες βιολογικές δράσεις του PAF προέρχονται από τον C16:0- και/ή C18:0-PAF [251].

Αλληλεπιδράσεις με διάφορους μεταβολίτες

Πολλές από τις βιολογικές δράσεις του PAF μπορούν να ρυθμιστούν διαμέσου συνέργιστικών αλληλεπιδράσεων με διάφορους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος που προέρχονται από τα στάδια της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης. Αυτή η σχέση μεταξύ των δύο τάξεων ισχυρών μεσολαβητών ενδυναμώνεται περισσότερο από το γεγονός ότι οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος και ο PAF, οι οποίοι παράγονται συνακόλουθα από διηγεργμένα φλεγμονώδη κύτταρα, προέρχονται πιθανώς από μια κοινή πρόδρομη ένωση, την 1-Ο-αλκυλ-2-αραχιδονυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Έτσι μπορεί να υποθεθεί ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα έχουν μια ειδική φωσφολιπάση A_2 για την 1-Ο-αλκυλ-2-αραχιδονυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του PAF [252].

Ρύθμιση των επιπέδων του PAF

Βρέθηκε ότι η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) είναι ένας φυσικός ενδογενής αναστολέας του PAF [33]. Ο κύριος ρυθμιστής όμως των επιπέδων του PAF είναι η γρήγορη αποδόμησή του με τη βοήθεια ενός ενζύμου. Το ένζυμο αυτό είναι η PAF-ακετυλυδρολάση η οποία απομακρύνει την οξική ομάδα από την *sn*-2 θέση του μορίου του PAF, παράγοντας τον βιολογικά ανενεργό λυσο-PAF.

Παθοφυσιολογικές δράσεις του PAF

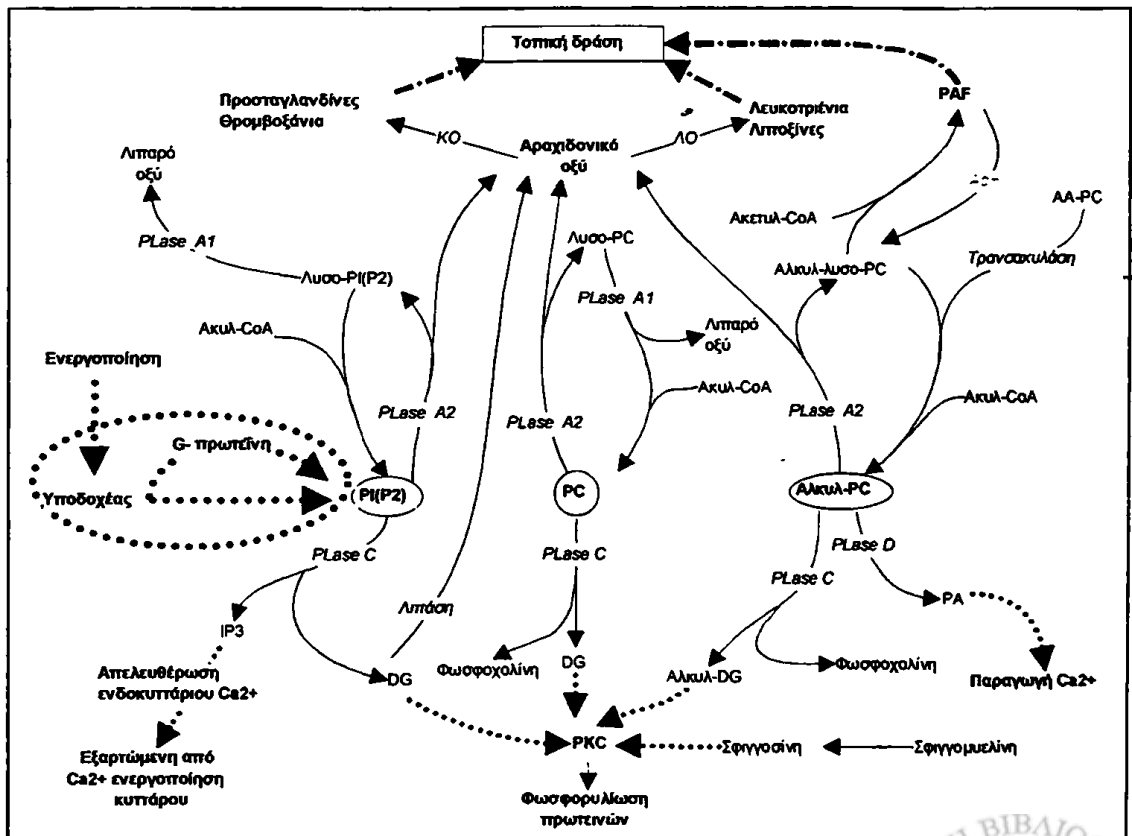
Ο PAF είναι ένας ισχυρός αγωνιστής όχι μόνο για τα περισσότερα φλεγμονώδη κύτταρα, αλλά για τα αγγειακά λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς επίσης και για τα νεφρικά και επιθηλιακά κύτταρα.



Μηχανισμοί δράσης-μεταγωγή σήματος

Η ενεργοποίηση που προκαλεί ο PAF στα κύτταρα θεωρείται ότι ξεκινάει με αλληλεπίδρασή του με ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα που συνδέεται με μια G-πρωτεΐνη. Σε πολλά φλεγμονώδη κύτταρα όπως αιμοπετάλια, PMN, μονοκύτταρα/μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα, το αρχικό αποτέλεσμα που έχει παρατηρηθεί αμέσως μετά την ενεργοποίηση από τον PAF, είναι απότομη αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} στο κυτσοσόλιο [253].

Η φωσφολιπάση C (PLase C), ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP_2), ενεργοποιείται από μια G-πρωτεΐνη και παράγονται διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3). Η IP_3 προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτοπλασματική επιφάνεια των αποθηκών Ca^{2+} , ανοίγει τις ενδοκυττάρειες αποθήκες Ca^{2+} οπότε και παρατηρείται απότομη αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} . Στη συνέχεια, τα ιόντα ασβεστίου που ελευθερώνονται ενεργοποιούν την PLase A_2 η οποία καταλύει την έκκριση του αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Μεταγωγή σήματος και τα στάδια δημιουργίας των λιπιδικών μεσολαβητών.



Η DAG εντωμεταξύ ενεργοποιεί μια πρωτεϊνοκινάση C που φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες C του κυτταροπλάσματος με διαφορετικές δράσεις στα κύτταρα στόχους, ενώ η ίδια φωσφορυλιώνεται σε φωσφατιδικό οξύ, το οποίο μπορεί επίσης να συμμετέχει στην εκκίνηση παραγωγής Ca^{2+} . Εναλλακτικά η DAG μπορεί να υδρολυθεί στη θέση sn-2, που είναι εστεροποιημένη με αραχιδονικό οξύ, από μια λιπάση απελευθερώνοντας το αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ που προκύπτει μπορεί να μεταβολιστεί διαμέσου του κύκλου της κυκλοξυγονάσης και/η της λιποξυγονάσης

Ενεργοποίηση κυττάρων

Όλα τα κύτταρα τα οποία παράγουν PAF αποτελούν τα ίδια και στόχους των βιολογικών δράσεων που προκαλούνται από τον PAF.

Στα ουδετερόφιλα ο PAF προκαλεί έκκριση λυσοσωμικών ενζύμων, χημειοταξία, συσσώρευση, αυξημένη προσκόληση, σύνθεση λευκοτριενίων, πρόσληψη ασβεστίου, εκκίνηση του κύκλου του φωσφατιδυλινοσίτη, έκκριση υπεροξειδίων, παραγωγή υδροξυεικοσατετραενοϊκού οξέος (HETE).

Στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί προσκόλληση ουδετερόφιλων, απελευθέρωση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και πρόσληψη ασβεστίου.

Στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα ενεργοποιεί τον κύκλο της φωσφατιδυλινοσιτόλης, τη σύνθεση προσταγλαδινών και προκαλεί εκροή Ca^{2+} .

Στα μονοκύτταρα/μακροφάγα προκαλεί χημειοταξία, συσσώρευση, παραγωγή προσταγλανδινών, θρομβοξανίων και ανιόντων υπεροξειδίων, πρόσληψη ασβεστίου, διαφοροποίηση και αυξημένη μετανάστευση αυτών [229].

Στα ηωσινόφιλα προκαλεί χημειοταξία, παραγωγή λευκοτριενίων και ανιόντων υπεροξειδίων.

Στα μεσαγγειακά κύτταρα προκαλεί συστολή, σύνθεση προσταγλανδινών και παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίων.

Στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιεί τον κύκλο του φωσφατιδυλινοσίτη και προκαλεί σύνθεση προσταγλανδινών [229].



Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια κουνελιού παράγουν PAF κατά τη διέγερσή τους διαμέσου των υποδοχέων τους [254]. Η ποσότητα του παραγόμενου PAF εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ενεργοποιητών (θρομβίνη, κολλαγόνο, ADP, TxA_2) [255], αλλά είναι πολύ μικρή σε σχέση με τον παραγόμενο από τα κύτταρα που συμμετέχουν στην αλλεργία και φλεγμονή. Η παρουσία ιόντων ασβεστίου είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του PAF.

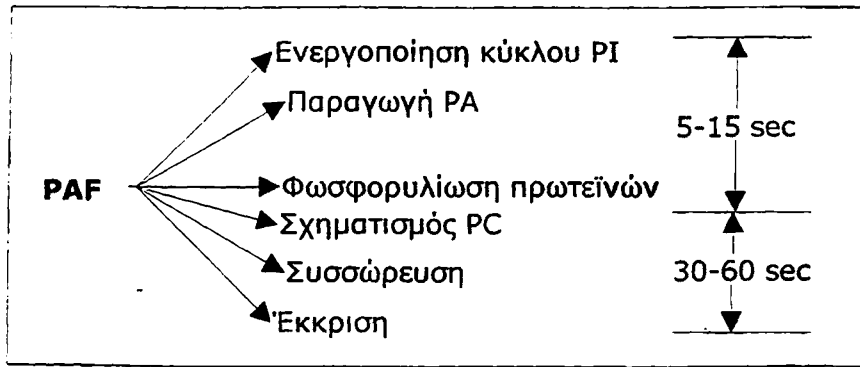
Ο PAF είναι ένας ισχυρός αγωνιστής για τα αιμοπετάλια πολλών ειδών. Προκαλεί εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου μη αντιστρεπτή συσσώρευση αυτών [256], ακολουθούμενη από έκκριση του περιεχομένου των πυκνών σωματίων (σεροτονίνη, ισταμίνη), του περιεχομένου των α -κοκκίων και παραγωγή θρομβοξανίων [257]. Επιπλέον, προκαλεί εκκίνηση του κύκλου του φωσφατιδυλινοσίτη και φωσφορυλίωση πρωτεϊνών (Σχήμα 11, Σχήμα 12). Η παρουσία EDTA, που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF καθώς και την παραγωγή PAF από αυτά [258]. Η συσσώρευση που προκαλεί ο PAF στα αιμοπετάλια είναι η πιο ισχυρή, αφού προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού σε συγκεντρώσεις 10-100 μM .

Η συσσώρευση που προκαλεί ο PAF δεν επηρεάζεται από τους αναστολείς του ADP φωσφοκρεατίνη/κινάση της φωσφοκρεατίνης (CP/CPK), ούτε από τα μη στεροειδή, αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ασπιρίνη που είναι αναστολέας της κυκλοξυγονάσης. Η συσσωρευτική οδός δηλαδή του PAF είναι ανεξάρτητη των συσσωρεύσεων που προκαλούν το ADP και το αραχιδονικό οξύ [259].

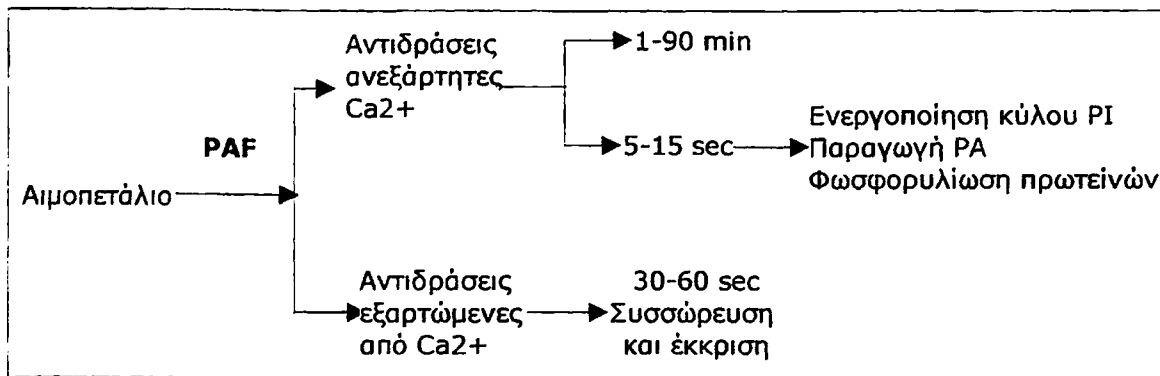
Φλεγμονώδεις δράσεις του PAF

Ενδοφλέβια χορήγηση PAF προκαλεί ενδοαγγειακή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, επακόλουθη θρομβοκυτοπενία και ουδετεροπενία με συσσώρευση ουδετερόφιλων. Τα ενδοαγγειακά επίπεδα θρομβοξανίου B_2 αυξάνονται επίσης. Όταν ο PAF χορηγηθεί σε πειραματόζωα ενδοφλέβια, προκαλεί αγγειοδιαστολή και υπόταση, αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλεί οίδημα.





Σχήμα 11. Σειρά γεγονότων που ακολουθούν τη δέσμευση του PAF με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων.



Σχήμα 12. Επίδραση εξωκυτταρικού Ca²⁺.

Ενεργοποίηση οργάνων

Στους πνεύμονες [260] ο PAF (αλκυλ-ακετυλο-GPC) αυξάνει την αντίσταση της ροής του αέρα, μειώνει την δυναμική διατασιμότητα, προκαλεί αγγειοσύσπαση του πνευμονικού παρεγχύματος, επάγει την παραγωγή λευκοτριενίων, προκαλεί υπεραιμία και οίδημα. Στο αναπνευστικό σύστημα ο PAF προκαλεί βρογχόσπασμο και άσθμα.

Στο καρδιαγγειακό σύστημα προκαλεί αρρυθμίες, μειώνει την καρδιακή παροχή, προκαλεί αγγειοσύσπαση, πνευμονική υπέρταση, συστηματική υπόταση και αυξάνει τη διαβατότητα των αγγείων. Στο ήπαρ εκκινεί τον κύκλο του φωσφατιδυλινοσίτη, προκαλεί αγγειοσύσπαση και γλυκογονόλυση. Στο δέρμα δημιουργεί ερύθημα, οίδημα, πόνο, συσώρευση ουδετερόφιλων. Στα νεφρά

προκαλεί σύνθεση προσταγλανδινών, μείωση της έκκρισης των ηλεκτρολυτών, μείωση του ρυθμού ροής των ούρων, μείωση της ροής του νεφρικού αίματος [229].

Συσχέτιση του PAF με ασθένειες

Ο PAF επίσης συσχετίζεται με πολλές ασθένειες όπως: άσθμα, συστηματική αναφυλαξία, υδρονέφρωση, κίρρωση του ήπατος, υπέρταση, λευκοπενία προερχόμενη κατά την αμοδιάλυση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, θρόμβωση, απόρριψη μοσχευμάτων, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ενδοτοξικό σοκ, έγκαυμα, ψωρίαση [229], περιοδοντίτιδα [261].

Στο αναπνευστικό σύστημα ο PAF θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο στη δημιουργία και επιδείνωση του άσθματος. Ενέχεται στις οξείες και χρόνιες πνευμονικές επιπλοκές. Προκαλεί βρογχόσπασμο, μακράς διάρκειας φλεγμονές, παρατεταμένα, μη ειδική υπερευαισθησία, αύξηση της διβατότητας των αγγείων και συσσώρευση φλεγμονωδών υτάρων όπως ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια στους πνεύμονες. [262].

Παρόλη όμως την εμπλοκή του PAF σε διάφορες ασθένειες, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για τον ρόλο του σε φυσιολογικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος όπως στην ωθηλακιορρηξία, στην κινητικότητα του σπέρματος, στην ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου και τέλος στην έναρξη του τοκετού λόγω της ισχυρής μητροσυσταλτικής δράσης του. Θεωρείται δε ένας από τους παράγοντες που συμμετέχει στην πρόκληση πρόωρου τοκετού. Έχουν βρεθεί ειδικοί υποδοχείς πρόσδεσης του PAF σε μεμβράνες του ενδομητρίου κουνελιού, ενώ έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στις παραμέτρους της πρόσδεσης, εξαρτώμενες από τις φάσεις της κύησης. Εφόσον παράγεται σε αυξημένες ποσότητες κατά τον τοκετό, είναι λογικό να αναμένεται η ανάπτυξη αναπνευστικών προβλημάτων στο νεογνό, εκτός εάν υπάρχει κάποιος ενδογενής αναστολέας που παρεμποδίζει είτε την πρόσδεση του PAF στους υποδοχείς, είτε δρα σε επόμενο στάδιο, αναστέλλοντας κάποια(ες) σηματοδοτική πορεία που ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση.



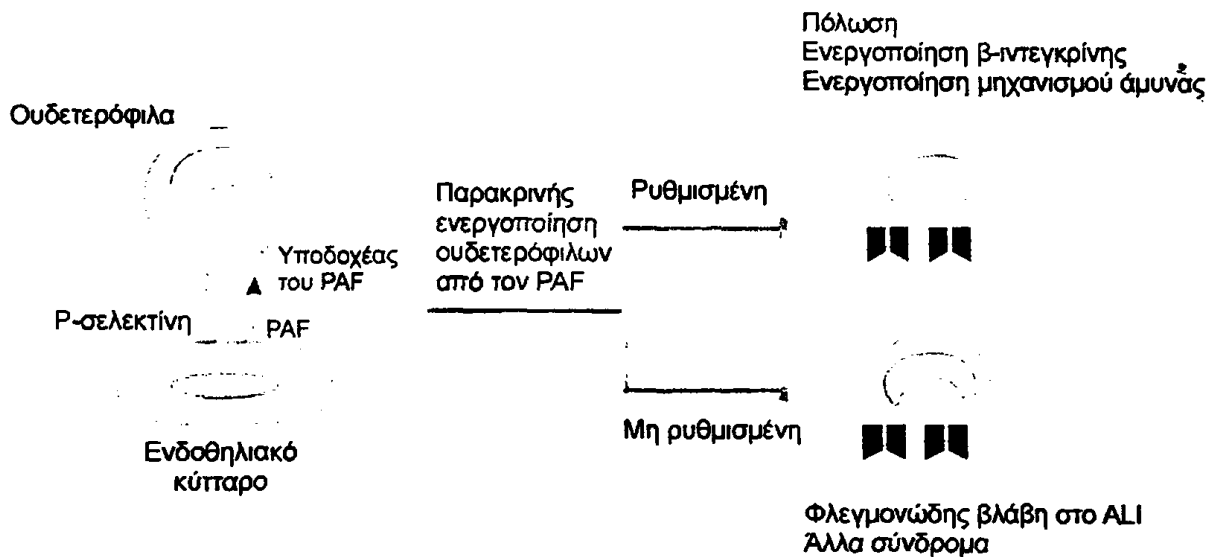
❖ **PAF και ARDS**

Ο PAF προκαλεί πνευμονική υπέρταση και αύξηση της διαβατότητας του ενδοθηλίου [263]. Όταν χορηγηθεί σε αρουραίους σε συνδυασμό με μικρή ποσότητα ενδοτοξίνης ανεπαρκή να προκαλέσει από μόνη της φλεγμονή, ο PAF μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη όμοια με το ARDS [264]. Επιπλέον, ο PAF βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα στο BAL ασθενών με ARDS [265]. Μπορεί να αυξήσει τη σύνθεση του TNF από τα Β-κύτταρα. Επειδή και τα φλεγμονώδη κύτταρα αλλά και τα κύτταρα των ιστών εκκρίνουν είτε TNF είτε PAF, είναι δύσκολο κανείς να γνωρίζει πιο από αυτά είναι κυρίως υπεύθυνο για την οξεία φλεγμονή.

Ο PAF παρεμβάλλεται επίσης στις αντιδράσεις οξειδωσης που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Η βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σύνηθες χαρακτηριστικό της πνευμονικής βλάβης και τα ουδετερόφιλα παίζουν κύριο ρόλο. Ο PAF διεγείρει την παραγωγή αυξημένων επιπέδων υπεροξειδίων από τα ουδετερόφιλα και την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος κατά τη διάρκεια της προσκόλλησής τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα [266].

Πρόσφατη μελέτη ενοχοποιεί τον PAF και τον υποδοχέα του στην οξεία πνευμονική βλάβη [267]. Οι ερευνητές για να εξετάσουν την υπόθεση ότι ο PAF συμμετέχει στην πνευμονική βλάβη, χρησιμοποίησαν ποντικούς οι οποίοι εξέφραζαν τον υποδοχέα του PAF και άλλους που στερούνταν αυτού του υποδοχέα. Στη συνέχεια προκάλεσαν βλάβη στον πνεύμονα με υδροχλωρικό οξύ και βρέθηκε ότι οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου απεβίωσαν πολύ γρήγορα αφού ανέπτυξαν φλεγμονή, πνευμονικό οίδημα και επιδεινωμένη οξυγόνωση. Στα ζώα που υπερ-εξέφραζαν τον υποδοχέα του PAF, η απόκριση ήταν πολλαπλάσια, ενώ αυτά που είχαν έλλειψη του υποδοχέα δεν απεβίωσαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, είχαν καλύτερη οξυγόνωση και λίγο οίδημα. Ωστόσο, παρότι η πνευμονική βλάβη είχε προληφθεί στους ποντικούς με έλλειψη του υποδοχέα, τα ουδετερόφιλα συσσωρεύτηκαν στους πνεύμονες των ζώων αυτών όπως και στην ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι τα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται με διάφορους μηχανισμούς και δεν οδηγούν πάντοτε στην πνευμονική βλάβη. Τα πειράματα αυτά προτείνουν ένα μοντέλο φλεγμονής (Σχήμα 13).





Σχήμα 13. Η σηματοδότηση από τον PAF προκαλεί ενεργοποίηση ουδετερόφιλων. Ο PAF που εμφανίζεται στη μεμβράνη των φλεγμονωδών ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί σήμα στα ουδετερόφιλα τα οποία προσκολλούνται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου της Ρ-σελεκτίνης. Το σήμα αυτό, που μεσολαβείται από τον υποδοχέα του PAF, ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα για αυξημένη έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων τους και παραγωγή ριζών οξυγόνου μεταξύ άλλων φλεγμονωδών αντιδράσεων. Υπό φυσιολογική ρύθμιση, αυτή η πολλαπλή προσκόλληση και σηματοδότηση συνεισφέρει στην άμυνα. Όμοια μοριακά γεγονότα, όταν δεν είναι ελεγχόμενα και ρυθμιζόμενα, μπορούν να προκαλέσουν οξεία πνευμονική βλάβη καθώς και διάφορα άλλα φλεγμονώδη σύνδρομα βλάβης των ιστών [268].

❖ Λιπιδικοί μεσολαβητές και ARDS

Πολλοί μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος συμμετέχουν σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαταραχές που συναντώνται στο ARDS, προκαλώντας αγγειοσύσπασση, συσσώρευση των αιμοπεταλίων, χημειοταξία των ουδετερόφιλων και αύξηση της διαβατότητας των μικροαγγείων.

• Προσταγλανδίνες και θρομβοξανία

Αυξημένα επίπεδα θρομβοξανίου B_2 και 6-κετο-προσταγλανδίνης $F_{1\alpha}$ έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ARDS [269]. Οι κυτταρικές πηγές αυτών των προϊόντων δεν είναι ακριβώς γνωστές. Τα αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και κυψελιδικά μακροφάγα είναι πλούσιες πηγές σε θρομβοξανίο A_2 . Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα

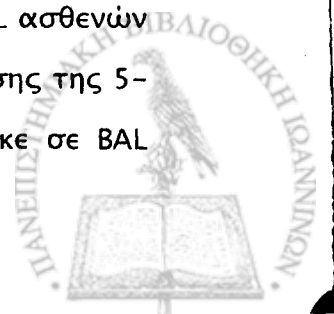
παράγουν προσταγλανδίνη E_2 και προστακυκλίνη [270]. Από *in vitro* πειράματα παρατηρήθηκε ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα ύστερα από ενεργοποίηση μπορούν να μεταφέρουν αραχιδονικό οξύ αμφίδρομα [271].

Σε πολλά μοντέλα ζώων ανιχνεύθηκαν προϊόντα μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος κατά τη διάρκεια της πρόκλησης πνευμονικής βλάβης. 6-Κετο-προσταγλανδίνη $F_{1\alpha}$ καθώς και προσταγλανδίνη $F_{2\alpha}$ και E_2 έχουν ανιχνευθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε μοντέλα ζώων στα οποία έχει προκληθεί ARDS πειραματικά [272]. Χορήγηση αναστολέων της κυκλοξυγονάσης ή της συνθετάσης των θρομβοξανίων σε ζώα, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της πνευμονικής υπέρτασης που είχε προκληθεί αμέσως μετά τη χορήγηση ενδοτοξίνης ή θρομβίνης [273]. Ωστόσο, σε μερικά μοντέλα ζώων, η αναστολή αυτών των ενζύμων δεν απέτρεψε την ακόλουθη αύξηση της διαβατότητας των μικροαγγείων, υποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη της αυξημένης διαβατότητας δεν εξαρτάται από το θρομβοξανίο. Αντιθέτως, από άλλες μελέτες σε ζώα, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα που αναστέλλουν τη συνθετάση της κυκλοξυγονάσης, μείωσαν την έκταση της πνευμονικής βλάβης [274]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ένας αναστολέας της κυκλοξυγονάσης, μπορεί να προκαλέσει ARDS σε ανθρώπους εάν ληφθεί σε υπερβολική δόση [275].

Συμπερασματικά, τα προϊόντα της δράσης της κυκλοξυγονάσης παρότι έχουν έναν ρυθμιστικό ρόλο, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη του ARDS.

- **Λευκοτριένια**

Επιπλέον της κυκλοξυγονάσης, έχουν μελετηθεί μερικώς και τα προϊόντα της δράσης της 5-λιποξυγονάσης. Τα λευκοτριένια, και ειδικά το λευκοτριένιο B_4 , είναι ισχυροί ενεργοποιητές των ουδετερόφιλων, μπορούν να προκαλέσουν πνευμονικό οίδημα αυξάνοντας την αγγειακή διαβατότητα, τη χημειοταξία και μετανάστευση των πολυμορφοπυρήνων κυττάρων και δρώντας αγγειοσυσπαστικά συμμετέχουν στην ανάπτυξη πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης [276]. Το λευκοτριένιο C_4 παράγεται σε μεγάλα ποσά από ενεργοποιημένα μακροφάγα, μαστοκύτταρα και βασεόφιλα. Υψηλά επίπεδα λευκοτριενίων C_4 και D_4 ανιχνεύθηκαν σε BAL ασθενών με ARDS σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου [277]. Ένα άλλο προϊόν της δράσης της 5-λιποξυγονάσης, το 5-υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ (5-HETE), ανιχνεύθηκε σε BAL



ζώνων [278] και συσχετίζεται με την έναρξη του υψηλής διαβατότητας πνευμονικού οιδήματος.

Δεν μπορεί να προκύψει ασφαλές συμπέρασμα για το ρόλο των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος στο ARDS. Φαίνεται ότι αυτά τα προϊόντα συνεισφέρουν στην πλήρη ανάπτυξη της πνευμονικής βλάβης, πιθανώς όμως όχι ουσιαστικά.

❖ *Κυτταροκίνες (cytokines) και ARDS*

Ένας μεγάλος αριθμός πολυπεπτιδίων, τα οποία απελευθερώνονται από κύτταρα μετά από ενεργοποίησή τους, έχουν χαρακτηριστεί και εμφανίζονται να είναι σημαντικοί ρυθμιστές των φλεγμονωδών αντιδράσεων (κυτταροκίνες). Ο ογκοκρωτικός παράγοντας α (TNF- α), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) είναι μερικές από τις κυτταροκίνες οι οποίες φαίνεται να συσχετίζονται με το ARDS.

Οι κυτταροκίνες έχουν χωριστεί σε δύο ομάδες: οι κυτταροκίνες που επάγουν τη φλεγμονή (proinflammatory cytokines) είναι οι IL-1, IL-8, TNF- α και LIF και οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (anti-inflammatory cytokines) που είναι οι IL-4, IL-10, IL-13 και TGF- β (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Κατάταξη κυτταροκινών.

φλεγμονώδεις κυτταροκίνες	αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες
IL-1	IL-4
IL-6	IL-10
IL-8	IL-13
TNF- α	TGF- β
LIF	

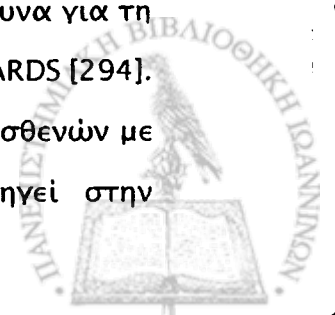
Ο TNF είναι μια πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 17 kDa, η οποία απελευθερώνεται από τα μακροφάγα ύστερα από ενεργοποίησή τους από έναν αριθμό παραγόντων, περιλαμβανομένου της ενδοτοξίνης. Όταν ο TNF- α χορηγηθεί σε πειραματόζωα, προκαλεί υπόταση, μεταβολική οξέωση, αιμορραγία του γαστρεντερικού, και ARDS [279]. Βρέθηκε ότι ο TNF- α αυξάνει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα

ενδοθηλιακά κύτταρα [280, 281]. Προηγούμενη έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον TNF- α αυξάνει την ευαισθησία τους στην προσβολή από τα ουδετερόφιλα [282]. Ο TNF- α μπορεί να πυροδοτήσει την απελευθέρωση κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών από τα κύτταρα του πνεύμονα, όπως η IL-1, η IL-6, η IL-8, ο PAF και παράγοντες ανάπτυξης από τα μακροφάγα [283]. Αυξημένα επίπεδα TNF- α ανιχνεύθηκαν σε πλάσμα μερικών ασθενών με σηπτικό σοκ, ενώ ασθενείς με ανιχνεύσιμα επίπεδα TNF- α έχουν περισσότερες πιθανότητες να εκδηλώσουν πνευμονική βλάβη [284]. TNF- α ανιχνεύθηκε σε πλάσμα [285] και σε BAL ασθενών με ARDS [286]. Το γονίδιο του TNF εκφράζεται και στα κυψελιδικά μακροφάγα υποδεικνύοντας ότι αυτά τα κύτταρα συνθέτουν την κυτταροκίνη τοπικά στο σημείο της οξείας φλεγμονής [287].

Η IL-1 παράγεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα ύστερα από απόκρισή τους σε ένα ερέθισμα, όπως η ενδοτοξίνη και ο TNF. Η IL-1 προκαλεί ενεργοποίηση και χημειοταξία των ουδετερόφιλων και ανιχνεύθηκε σε αυξημένα επίπεδα στο BAL ασθενών με ARDS [288]. Η IL-1, η οποία ανιχνεύεται στο BAL, πιθανώς προέρχεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία εκκρίνουν υψηλά επίπεδα IL-1 αυθόρμητα αλλά και ύστερα από *in vitro* ενεργοποίησή τους [289].

Η πρωτεΐνη ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων ή αλλιώς IL-8, είναι ένα πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους 8.4 kDa, η οποία εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων, όπως μονοκύτταρα/ μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Μελέτες έδειξαν ότι ο χημειοτακτικός παράγοντας των ουδετερόφιλων σε BAL ασθενών με ARDS, ήταν η IL-8 [283, 290, 291, 292]. Αυξημένα επίπεδα IL-8 ανιχνεύθηκαν σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αλλά όχι στο αίμα ασθενών με ARDS σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου ασθενών με πνευμονική βλάβη χωρίς ARDS, υποδεικνύοντας ότι αυτό μπορεί να είναι ένας προγνωστικός δείκτης για την ανάπτυξη του ARDS [293]. Η IL-8 και ο αριθμός των ουδετερόφιλων συσχετίζονται με αυξημένη θνητότητα. Τα κύτταρα που ανιχνεύονται στον κυψελιδικό χώρο ασθενών με ARDS παράγουν IL-8 και θεωρούνται υπεύθυνα για τη συγκέντρωση των ουδετερόφιλων σε μεγάλο αριθμό στους πνεύμονες με ARDS [294].

Υψηλά επίπεδα TNF- α , IL-1 β , IL-6 και IL-8 βρέθηκαν στο πλάσμα ασθενών με σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, που συχνά οδηγεί στην



ανάπτυξη και εξελίσσεται σε οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) καθώς και σε σύνδρομο δυσλειτουργίας πολλαπλών οργάνων. Τα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών βρέθηκαν αυξημένα στην έναρξη του ARDS και συσχετίζονται με υψηλή θνητότητα. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η τελική έκβαση των ασθενών με ARDS σχετίζεται με το μέγεθος και τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης και είναι ανεξάρτητη της αιτίας που προκάλεσε το ARDS ή της ανάπτυξης νοσοκομιακής λοίμωξης [295].

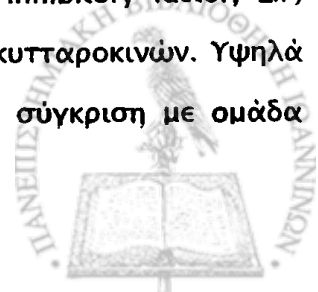
Όταν ο TGF- β χορηγηθεί ενδοτραχειακώς με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σε μοντέλο ζώου με οξεία πνευμονική βλάβη (ALI), μειώνει τα παραγόμενα επίπεδα TNF, μειώνει τον αριθμό των κυψελιδικών ουδετερόφιλων και αναστέλλει την ανάπτυξη του ALI [296].

Η IL-4 αρχικά περιγράφηκε ως παράγοντας ανάπτυξης των Β-κυττάρων. Είναι το προϊόν των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων, με μοριακή μάζα 20 kDa. Θεωρείται μια αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη αφού αναστέλλει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1, TNF- α , IL-6 από τα μακροφάγα. Αναστέλλει επίσης την παραγωγή της προσταγλανδίνης E₂ από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες και μεσαγγειακά κύτταρα καθώς και την έκφραση της cPLase A₂ [297].

Η IL-10 συντίθεται από Τ-κύτταρα, Β-κύτταρα ή μονοκύτταρα και αναστέλλει την *in vitro* παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα και από τα κυψελιδικά μακροφάγα στο ARDS. Η ρύθμιση της ενεργότητας της πρωτεϊνοκινάσης C φαίνεται να παρεμβάλλεται σε αυτή την αναστολή [298]. Σε μοντέλο ζώου με ALI φαίνεται ότι η χορήγηση IL-10 αναστέλλει την ανάπτυξη του ALI [299]. Σε μια άλλη μελέτη φαίνεται ότι η αναλογία TNF- α /IL-10 στο BAL είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με ARDS από ότι σε ασθενείς που βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν ARDS, θεωρώντας ότι η σχέση μεταξύ φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών αντιδράσεων μπορεί να αποδοθεί με την αναλογία TNF- α /IL-10 στους πνεύμονες [300].

Η IL-13 συντίθεται από Τ-κύτταρα ή Β-κύτταρα και αναστέλλει την παραγωγή όλων των φλεγμονωδών κυτταροκινών καθώς και της IL-10 [301].

Ο παράγοντας αναστολής της λευχαιμίας (Leukaemia inhibitory factor, LIF) θεωρείται επίσης μέλος της οικογένειας των φλεγμονωδών κυτταροκινών. Υψηλά επίπεδα αυτού ανιχνεύονται στο BAL ασθενών με ARDS σε σύγκριση με ομάδα

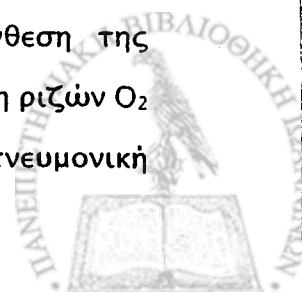


ελέγχου, ενώ τα επίπεδα αυτού συσχετίζονται με τον αριθμό των ουδετερόφιλων στο BAL [302].

Οξειδωτικοί παράγοντες

Οι μεταβολίτες του οξυγόνου είναι φυσικά προϊόντα ενός φυσιολογικού ενδοκυττάρου μεταβολισμού. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες όπως, υψηλή συγκέντρωση O_2 , ακτινοβολία, φάρμακα ή ακόμη ύστερα από ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, η παραγωγή αυτών των ελευθέρων ριζών O_2 μπορεί να αυξηθεί και να προάγει ένα ανεπιθύμητο οξειδωτικό στρες στην περιοχή του παρακείμενου ιστού. Πράγματι, το οξειδωτικό ζέσπασμα είναι αναγκαίο όπλο των κυττάρων έναντι των βακτηρίων, αλλά τα ίδιο όπλο μπορεί να γίνει επικίνδυνο στρεφόμενο εναντίον του ίδιου του οργανισμού όταν η αντίδραση δεν είναι ελεγχόμενη. Ένα εξειδικευμένο αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας ρυθμίζει την αντίδραση και αποτελείται από ενζυμικά (δισμουτάση των υπεροξειδίων (SOD), υπεροξειδάση ή καταλάση της γλουταθειόνης) και μη ενζυμικά συστήματα (γλουταθειόνη (GSH), βιταμίνες E ή C). Όταν η ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και του συστήματος άμυνας διαταραχθεί, η ακόλουθη οξείδωση των πρωτεϊνών, DNA και λιπιδίων θα έχει ως συνέπεια καταστροφή κυττάρων, φλεγμονώδη αντίδραση και διαδικασία επιδιόρθωσης [303]. Η κύρια πηγή των οξειδωμένων προϊόντων είναι τα ουδετερόφιλα. Η οξειδωτική δραστηριότητα στον κυψελιδικό χώρο που συμβάλλει στην παθογένεση του ARDS έχει περιγραφεί. Η οξείδωση μπορεί να παρεμβληθεί και με άλλες διεργασίες που παρατηρούνται στο ARDS, όπως η πρωτεόλυση. Οξείδωση του αναστολέα της α -1 πρωτεΐνάσης θα είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση της ενεργότητας των πρωτεϊνών. [304]. Ένας από τους κύριους παράγοντες στην πνευμονική βλάβη θεωρείται επίσης η έλλειψη περισυλλεκτών ριζών O_2 [305], ενώ η γλουταθειόνη, η οποία είναι αντι-οξειδωτικός παράγοντας, ανιχνεύθηκε σε αυξημένα επίπεδα στο BAL ασθενών με ARDS [306].

• Ο TNF προκαλεί μείωση των επιπέδων της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσολαβώντας έτσι στην υπεροξείδωση και αύξηση της διαβατότητάς τους *in vitro* [307]. Αντιθέτως, αυξάνει τη γονιδιακή έκφραση και έτσι τη σύνθεση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου (MnSOD), ενός περισυλλέκτη ριζών O_2 στα μιτοχόνδρια, αυξάνοντας έτσι την προστασία των κυττάρων στην πνευμονική



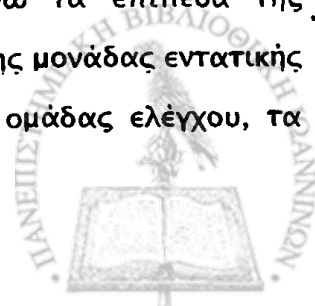
βλάβη [308]. Αυτό το παράδοξο αντανακλά για άλλη μια φορά την επισφαλή ισορροπία που διατηρείται σε μια φυσιολογική κατάσταση, αλλά που εύκολα διαταράσσεται κατά τη διάρκεια της βλάβης.

Υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου (MnSOD) καθώς και καταλάσης) ανιχνεύθηκαν στον ορρό ασθενών με σήψη και κίνδυνο να εμφανίσουν ARDS. Στην ίδια ομάδα ασθενών, υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων βρέθηκαν στους ασθενείς οι οποίοι ακολούθως ανέπτυξαν ARDS σε σύγκριση με τους ασθενείς οι οποίοι δεν ανέπτυξαν τελικά ARDS [309].

Ο ρόλος της φερριτίνης στην πνευμονική βλάβη περιγράφηκε προσφάτως. Παρουσία ελεύθερου σιδήρου, η ρίζα του οξυγόνου (O_2) αντιδρά με υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και σχηματίζει την τοξική ρίζα υδροξυλίου (OH). Η φερριτίνη είναι ένα μεγάλο μόριο αποθήκευσης σιδήρου, βρίσκεται ενδοκυττάρια αλλά και στον ορρό. Φυσιολογικά, η φερριτίνη αποθηκεύει σίδηρο, αλλά παρουσία υπεροξειδίων ή οξέωσης απελευθερώνει σίδηρο. Επιπλέον η σύνθεση της φερριτίνης επάγεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IL-6, IL-8 και TNF. Αυξημένα επίπεδα φερριτίνης ανιχνεύθηκαν σε ορρό ασθενών θηλυκού και αρσενικού φύλου, οι οποίοι βρίσκονταν σε κίνδυνο και τελικά ανέπτυξαν ARDS, σε σύγκριση με ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνισαν ARDS [310]. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη αξιόπιστων δεικτών πρόβλεψης του ARDS θα διευκόλυνε την κατανόηση της παθογένεσης και θεραπείας του [311].

Πρωτεϊνάσες

Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), όπως η γελατινάση καθώς και ο ειδικός της αναστολέας, όπως ο αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης των ιστών (TIMP), συμμετέχουν ενεργά στις διαδικασίες ανάπλασης στην πνευμονική βλάβη [312]. Αυτά τα ένζυμα παράγονται από μονοκύτταρα και μακροφάγα καθώς και από κύτταρα του συνδετικού ιστού και βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε διάφορες χρόνιες ασθένειες του πνεύμονα. Η γελατινάση και η TIMP-1 ανιχνεύθηκαν σε αυξημένα επίπεδα στο BAL ασθενών με ARDS [313]. Ενώ τα επίπεδα της γελατινάσης ήταν το ίδιο αυξημένα σε όλους τους ασθενείς της μονάδας εντατικής θεραπείας με ή χωρίς ARDS σε σύγκριση με ασθενείς της ομάδας ελέγχου, τα



επίπεδα της TIMP ήταν σημαντικά υψηλότερα σε όλους τους σοβαρά ασθενείς. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο αυτών των ενζύμων στην ανάπτυξη και πορεία της ασθένειας.

Μελέτες κυττάρων *in vitro* εστιάστηκαν μόνο σε έναν τύπο κυττάρου κάθε φορά σαν να λειτουργούσαν μόνα τους στον οργανισμό. Σήμερα είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονωδών και μη φλεγμονωδών κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, παίζουν έναν σημαντικό και κύριο ρόλο στην οξεία αντίδραση. Επίσης, η εξωκυττάρια μήτρα μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα. Τα μακροφάγα που καλλιεργούνται μαζί με διάφορα συστατικά, αντιδρούν διαφορετικά: η παραγωγή των IL-1 και IL-6 αυξάνεται ύστερα από 5 ημέρες καλλιέργειας με εξωκυττάρια μήτρα ινοβλάστη, ενώ αυτή μειώνεται στην καλλιέργεια με πλαστικό ή κολλαγόνο [314]. Η εξωκυττάρια μήτρα μπορεί έτσι να επηρεάσει την φλεγμονή και αντιστρόφως. Πράγματι, η δράση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP), η οποία επηρεάζει τη σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας, μπορεί να ρυθμιστεί από τις κυτταροκίνες, όπως οι TNF, TGF ή IL-6. Η IL-6 προκαλεί την παραγωγή του TIMP [315], ενώ η IL-4 ή η ιντερφερόνη-γ μπορεί να καταστείλει τη βιοσύνθεση των μεταλλοπρωτεϊνών στα κυψελιδικά μακροφάγα *in vitro* [316, 317]. Πως όμως αυτή η ισορροπία μπορεί να επηρεάσει την αποκατάσταση της πνευμονικής βλάβης, ή την εξέλιξη σε ίνωση;

Παρατηρήθηκε ότι και άλλες πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες φαγοκύτωσης, ελασάση των PMN και καθεψίνη Β μπορεί να είναι σημαντικοί συμπαράγοντες στην ανάπτυξη της πτώσης των λειτουργιών πολλαπλών οργάνων όπως οι πνεύμονες [318]. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ισχυροί παράγοντες μη ειδικής πρωτεόλυσης ζωτικών πρωτεϊνών *in vitro*, όπως δομικές πρωτεΐνες, καθώς και συμπληρωματικοί παράγοντες λύσης θρόμβων, ανοσοσφαιρίνες, βασικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, κολλαγόνο, υποδοχείς κυττάρων κ.α. Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων στην οποία μεσολαβεί η ελασάση και η πρωτεολυτική καταστροφή των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι ιδιαίτερα σημαντικά γεγονότα. Από την άλλη πλευρά, η ελασάση αδρανοποιεί τον TNF και τον υποδοχέα του, δείχνοντας έτσι μια αυτορύθμιση στη διαδικασία της φλεγμονής. Επιπλέον, αυτοί οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί ρυθμίζονται ανασταλτικά από



παράγοντες αναστολής όπως ο αναστολέας της α-1 αντιπρωτεΐνάσης ή της αντιθρομβίνης III.

Άμεση βλάβη στις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα συμβαίνει στους πνεύμονες ασθενών με ARDS, πιθανώς λόγω πρωτεόλυσης από προϊόντα των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων [319].

Επιφανειοδραστικός παράγοντας και ARDS

Αρχικές θεωρίες σχετικά με την παθογένηση του ARDS έδιναν έμφαση στις ομοιότητες του με το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών (RDS). Θεωρήθηκε τότε ότι στο ARDS ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, που επικαλύπτει την επιφάνεια των κυψελίδων, μπορεί να υποστεί μεταβολές όπως και στο RDS λόγω της μη ωρίμανσης αυτού. Κάποιες αρχικές αναλύσεις δειγμάτων πνευμόνων από ασθενείς με ARDS φανέρωσαν δε και κάποια λειτουργική ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα [320, 321].

Οι δυσκολίες όμως στη λήψη επιφανειοδραστικού παράγοντα από τους ασθενείς *in vivo* δυσχέραιναν για πολύ καιρό τη συγκέντρωση δεδομένων. Όταν στη συνέχεια έγινε εφικτή η διαδικασία λήψης του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στις μονάδες εντατικής θεραπείας, έγινε δυνατή η πραγματοποίηση μερικών μελετών.

Μετατροπή των μεγάλων συσσωματωμάτων (Large Aggregates, LA) του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε μικρά συσσωματώματα (Small Aggregates, SA) στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ARDS, έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη μείωση των επιπέδων της SP-B στα μεγάλα συσσωματώματα. Η μείωση αυτή συσχετίζεται με την απώλεια της καλής επιφανειακής δράσης [322].

Φωσφολιπίδια

Παρατηρήθηκαν μεταβολές στη σύσταση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με ARDS. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) [323, 324, 325, 326].

Ωστόσο, και παρά τις ομοιότητες που παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα αυτών των μελετών, πολύς λόγος έγινε σχετικά με το κατά πόσον οι απόλυτες τιμές συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων ήταν πραγματικές, δεδομένου του περιορισμού



στην τεχνική λήψης του BAL. Οι απόλυτες τιμές συγκέντρωσης ουσιών στο BAL μπορεί να εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση. Σε αυτό συμμετέχουν οι παράγοντες:

1. Οι διαφορετικοί όγκοι βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος που ανακτώνται κάθε φορά
2. Η εκπλυθείσα επιφάνεια του πνεύμονα

Μερικά από αυτά τα προβλήματα μπορεί να ξεπεραστούν με τη χρήση ουσιών δεικτών των οποίων η συγκέντρωση δεν επηρεάζεται από κλινικές καταστάσεις ή χρησιμοποιώντας τους λόγους των απολύτων τιμών διαφόρων μεταβλητών [327]. Παρ' όλα αυτά, το υγρό BAL που ανακτάται μπορεί να είναι αραιωμένο από το υγρό του οιδήματος που υπάρχει στον κυψελιδικό χώρο του πνεύμονα, όπως επίσης και να μολυνθεί από πρωτεΐνες του πλάσματος και κύτταρα διαφορετικά από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορούν να αναλυθούν σε υγρό BAL ελεύθερο κυττάρων [323, 325] ή σε ίζημα μετά από φυγοκέντρηση αυτού [326]. Διαφορές στις απόλυτες τιμές των φωσφολιπιδίων μπορεί επίσης να οφείλονται και στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα για ποσοτικές μετρήσεις.

Παρά τους περιορισμούς που υφίστανται στη διαδικασία λήψης του BAL, φαίνεται ότι οι ερευνητές ανιχνεύουν τα ίδια είδη φωσφολιπιδίων στο BAL, τα οποία είναι τα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το κύριο συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μείωση της επιφανειακής τάσης στην επιφάνεια των κυψελίδων του πνεύμονα. Τα μειωμένα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης (PC), που παρατηρούνται στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ARDS, πιθανώς να συνεισφέρουν σε βιοφυσικές μεταβολές ότι αφορά στην επιφανειακή δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Μέτρηση της επιφανειακής τάσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα που ανακτήθηκε με τη διαδικασία του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από ασθενείς με ARDS, έδειξε αντίκρουόμενα αποτελέσματα [321, 323, 325, 326]. Αυτό ίσως οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο προετοιμάστηκε το υλικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση της επιφανειακής τάσης.

Επίσης, σε άλλη μελέτη, βρέθηκε ότι η αναλογία μικρών προς μεγάλων συσσωματωμάτων (SA/LA) του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι σημαντικά



υψηλότερη στους ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με ομάδα ασθενών ελέγχου χωρίς ARDS. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι, αυτή η αυξημένη αναλογία αντιπροσωπεύει έναν δείκτη μεταβολών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο ARDS, η οποία είναι ανεξάρτητη της τεχνικής λήψης του BAL και μπορεί να προσδιοριστεί σε μικρή ποσότητα δείγματος επιφανειοδραστικού παράγοντα [328].

Πρωτεΐνες

Από τις πρωτεΐνες που συνήθως ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα στο BAL ασθενών με ARDS, η αλβουμίνη [329], αιμοσφαιρίνη [330] και ειδικά το ινωδογόνο [331, 332, 333] φαίνεται να έχουν ανασταλτική επίδραση στον επιφανειοδραστικό παράγοντα. *In vitro* προσθήκη πρωτεϊνών σε λιπιδικά παρασκευάσματα επιφανειοδραστικού παράγοντα αύξησαν την αντίσταση αυτών των παρασκευασμάτων έναντι στην αναστολή τους από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να έχουν σημαντική σημασία στη χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα εξωγενώς ως θεραπευτική αγωγή [334, 335]. Η δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα πιθανώς αναστέλλεται όχι μόνο από τις πρωτεΐνες του πλάσματος αλλά και από διάφορους κυτταρικούς μεσολαβητές, όπως πρωτεολυτικά ένζυμα [336], προϊόντα οξειδωσης [337, 338], ελεύθερες ρίζες αζώτου καθώς και από φωσφολιπάσες [339].

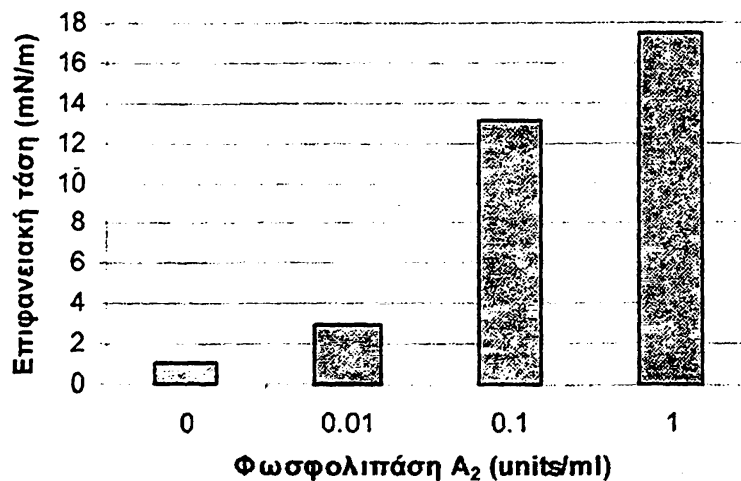
Σήμερα θεωρείται ότι ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν είναι μόνο η μείωση της επιφανειακής τάσης. Θεωρείται ότι έχει επίσης έναν πολύ σημαντικό ανοσολογικό ρόλο στη φλεγμονή [340]. Ο ανοσορυθμιστικός του ρόλος φαίνεται να σχετίζεται με τα πρωτεϊνικά συστατικά του, τις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [27, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 341].

Οι διαταραχές που παρατηρούνται στη σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν φαίνεται να είναι ένα πρωταρχικό παθολογικό αίτιο στο ARDS όπως πιστεύονταν στο παρελθόν, αλλά μάλλον ένας ειδικός δείκτης πνευμονικής βλάβης.

Ωστόσο, οι μελέτες σε βρογχολυσελιδικό έκπλυμα ασθενών με ARDS που υπάρχουν δεν είναι αρκετές ώστε να προκύπτει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με το τι μπορεί να συμβαίνει τοπικά στον πνεύμονα κατά τη διάρκεια της νόσου.



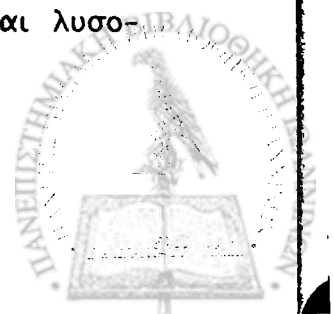
Αναστολή της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από φωσφολιπάσες

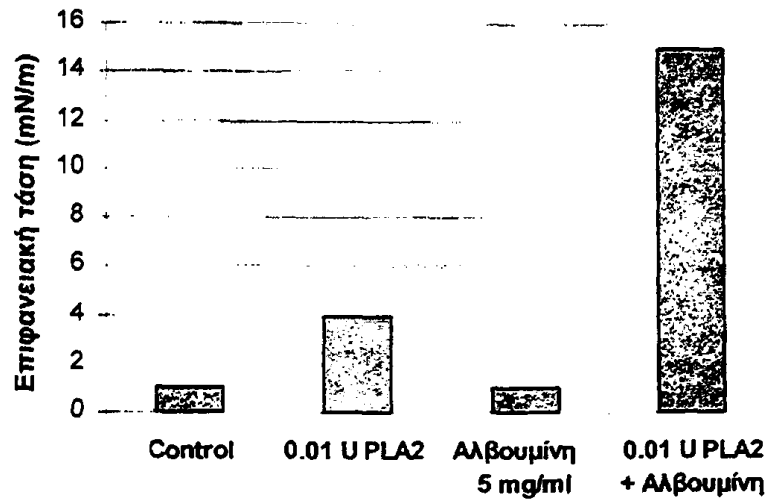


Σχήμα 14. Επίδραση της PLase A₂ στις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [339].

Μια άλλη ομάδα παραγόντων που αναστέλλουν τη δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, μπορούν να εισέλθουν στο κυψελιδικό χώρο και να προκαλέσουν άμεσα οξεία πνευμονική βλάβη [339]. Μελέτες δείχνουν ότι η αναπνευστική δυσχέρεια που σχετίζεται με οξεία παγκρεατίτιδα συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης και αυξημένα επίπεδα ενεργότητας φωσφολιπάσης A₂ στο BAL [342, 343, 344]. Είναι επίσης γνωστό ότι ποικιλία βακτηρίων εκκρίνουν φωσφολιπάσες [345].

Παρατηρείται ότι διάφορες συγκεντρώσεις PLase A₂ επιδρούν στην επίφανειοδραστική ικανότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα (Σχήμα 14). Ακόμη και μικρές συγκεντρώσεις PLase A₂ αποτρέπουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα από το να μειώνει την επιφανειακή τάση κάτω των 15 mN/m. Φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας χοίρου υδρολύθηκε *in vitro* από sPLases A₂ ομάδας I και II και αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ελάχιστης επιφανειακής τάσης [346]. Με την υδρόλυση απελευθερώθηκαν ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια.





Σχήμα 15. Επίδραση PLase A₂ στην ευαισθησία της αναστολής του επιφανειοδραστικού παράγοντα από την αλβουμίνη [339].

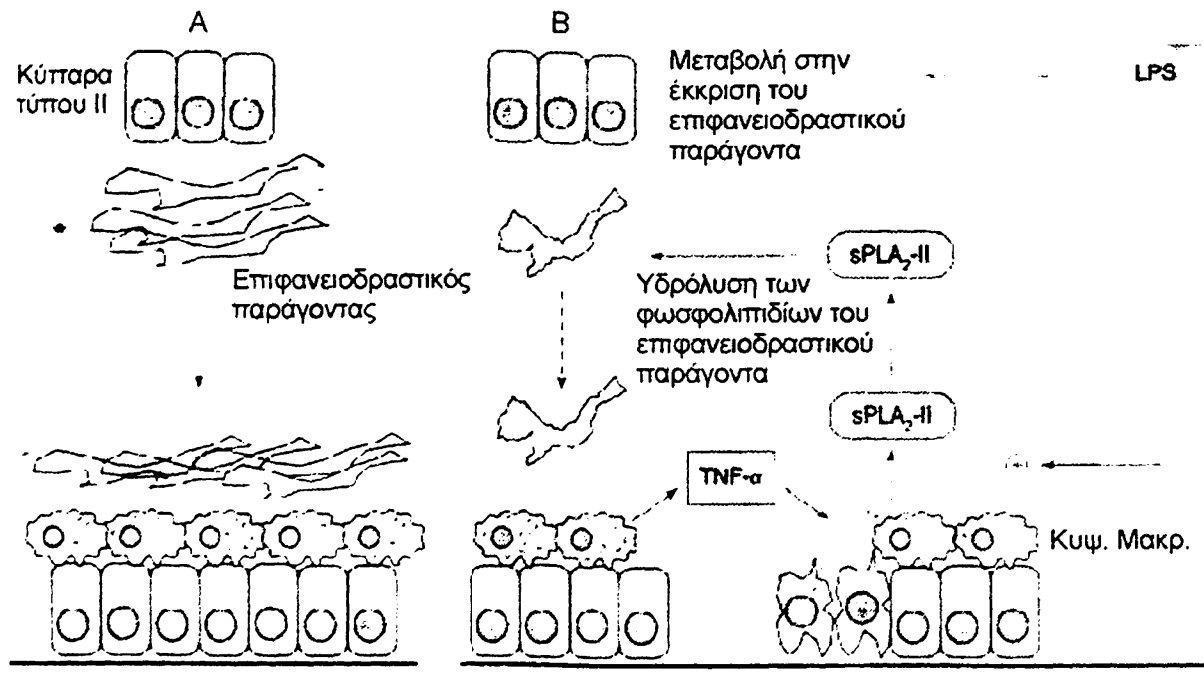
Προσθήκη PLase A₂ ή αλβουμίνης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα δεν είχε σημαντική επίδραση στην επιφανειακή τάση, ενώ όταν PLase A₂ και αλβουμίνη προστέθηκαν μαζί, η επιφανειακή τάση διατηρήθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα (Σχήμα 15) [339].

Παρόμοια έκθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε PLase C είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης αυτού και την αύξηση της ευαισθησίας του στην αναστολή από τις πρωτεΐνες [339].

Έτσι, φυσιολογικά επίπεδα φωσφολιπάσης είναι ικανά να προκαλέσουν δυσλειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα και μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία κάποιων μορφών πνευμονικής βλάβης.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, επόμενη μελέτη με επικεφαλή τον ίδιο ερευνητή, υποστηρίζει ότι η παρουσία αλβουμίνης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα έχει αντιφατικά αποτελέσματα ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της επιφανειακής τάσης. Τα πειράματα αυτά έγιναν με μίμηση υδρόλυσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από PLase A₂. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν διαφορετικές αναλογίες DPPC και λυσο-PC/παλμιτικού οξέος τα οποία είναι τα προϊόντα υδρόλυσης της DPPC από PLase A₂. Οι επιφανειοδραστικές ιδιότητες της πλήρους υδρολυμένης DPPC, παρουσία αλβουμίνης, βελτιώθηκαν σε σφαιρική επιφάνεια, αλλά παρατηρήθηκε αναστολή

της επιφανειακής λειτουργίας με την προσθήκη ελάχιστης ποσότητας αλβουμίνης, όταν η μέτρηση έγινε σε κυλινδρική επιφάνεια [347].



Προστατευτικός ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα:

- 1) σταθερότητα κυψελίδων
- 2) περιορισμένη σύνθεση sPLA₂-II, κυταροκινών και παραγωγή ελευθέρων ριζών

Απομάκρυνση της ανασταλτικής επίδρασης του επιφανειοδραστικού παράγοντα: έκκριση TNF-α

Επαγωγή σύνθεσης και έκκρισης sPLA₂-II από τον LPS

Σχήμα 16. Α) Επιφανειοδραστικός παράγοντας σε φυσιολογικό πνεύμονα. Β) Μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο ARDS. Η ενεργοποίηση των κυψελιδικών μακροφάγων από λιποπολυσακχαρίτη προκαλεί παραγωγή της sPLase A₂-II. Συσσώρευση sPLase A₂-II στον κυψελιδικό χώρο οδηγεί στην υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και στην απαρχή ενός φαύλου κύκλου [348].

Μετά από ενδοτράχειακή χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη σε μοντέλο χοίρου, αναγνωρίστηκε η *in vivo* εμπλοκή της εκκρινόμενης PLase A₂-II από τα κυψελιδικά μακροφάγα των θηλαστικών [349], στην οξεία παραγωγή των προ-φλεγμονωδών λιπιδικών μεσολαβητών στον πνεύμονα, η οποία προέρχεται κυρίως από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (Σχήμα 16). Ο κύριος στόχος της ενζυμικής ενεργότητας φαίνεται να είναι η διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνη η οποία είναι υπεύθυνη για τη μείωση της επιφανειακής

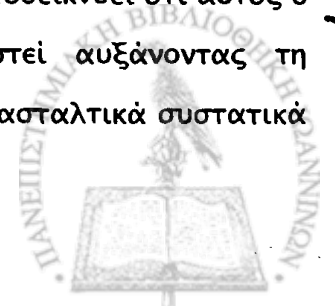
τάσης. Προτείνεται επίσης, ότι η SP-A παίζει σημαντικό ρόλο στην *in vivo* ρύθμιση της υδρόλυσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα δρώντας ως ειδικός αναστολέας της εκκρινόμενης PLase A₂-II και ότι η ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο πρωτεϊνών μπορεί να έχει κρίσιμη σπουδαιότητα στην ανάπτυξη του ARDS [350]. Ενδιαφέρον φαίνεται να είναι το γεγονός ότι η SP-A έχει ομολογία στην αλληλουχία της με έναν αναστολέα της PLase A₂ από πλάσμα φιδιού (*Trimeresurus flavoridis*), υποδεικνύοντας ότι η SP-A θα μπορούσε να δράσει ως αναστολέας της sPLase A₂ [351].

Η ανασταλτική επίδραση της SP-A στη δράση της sPLase A₂-II είναι σημαντική και μπορεί να εξηγεί κλινικές μελέτες στις οποίες παρατηρείται μια σημαντική μείωση των επιπέδων της SP-A στο BAL ασθενών με ARDS [326], πιθανώς λόγω της πρωτεολυτικής αποδόμησης της πρωτεΐνης από την ελαστάση των ουδετερόφιλων [352].

Επίδραση λυσο-φωσφολιπιδίων

Η λυσο-PC είναι τοξική στους πνεύμονες ακόμα και σε μικρές ποσότητες αλλά σε φυσιολογικές συνθήκες ανακυκλώνεται με το μηχανισμό ανακύκλωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα (βλ. σελ. 34).

Αυξανόμενες συγκεντρώσεις PLase A₂ όταν επωαστούν με μίγμα φωσφολιπιδίων, προκαλούν μείωση των επιπέδων της PC και παραγωγή αυξημένων συγκεντρώσεων λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης και παλμιτικού οξέος. Τα προϊόντα που απελευθερώνονται από την υδρολυτική δράση της PLase A₂ έχουν σοβαρή επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Φαίνεται ότι η μείωση απλά των επιπέδων της PC δεν μεταβάλλει σημαντικά την επιφανειακή τάση του μίγματος [344]. Ωστόσο, προσθήκη λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα απουσία PLase A₂, προκαλεί μεγάλη αύξηση στην ελάχιστη επιφανειακή τάση του μίγματος, σε επίπεδα τα οποία δεν συμβαδίζουν με την κανονική φυσιολογική λειτουργία. Επιπλέον, αναστολή της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα λιπίδια του οιδήματος, όπως η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, υποδεικνύει ότι αυτός ο τύπος της αναστολής δεν μπορεί εύκολα να ξεπεραστεί αυξάνοντας τη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, εάν τα ανασταλτικά συστατικά



παράγονται συνεχώς, όπως συμβαίνει σε μια πνευμονική βλάβη που εξελίσσεται [339]. –

Ωστόσο, χορήγηση συνθετικού επιφανειοδραστικού παράγοντα με υψηλά επίπεδα λυσο-PC σε νεογέννητα κουνέλια, δεν επέφερε καμία σημαντική επίδραση στα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών στο BAL, ενώ χορήγηση καθαρής λυσο-PC εναιωρημένης σε φυσιολογικό ορό προκάλεσε σημαντική καταστροφή των ιστών, πτώση της διατασιμότητας του θώρακος και αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στο BAL [353]. Έτσι, η μείωση της τοξικότητας της λυσο-PC στα παρασκευάσματα επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση με τα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Χορήγηση λυσο-PC είχε σημαντική επίδραση στη λειτουργία του πνεύμονα νεογέννητων, απενεργοποιώντας τον επιφανειοδραστικό παράγοντα και αυξάνοντας τη διαβατότητα στο τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα. Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αυτή η τοξική δράση της λυσο-PC μπορεί να αντισταθμιστεί με χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα εξωγενώς αρκεί η χορήγηση αυτή να γίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση της λυσο-PC [354].

Φωσφολιπάση A₂ και ARDS

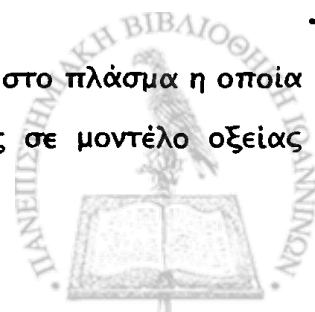
Ενδοτραχειακή χορήγηση PLase A₂ από δηλητήριο *naja naja* σε μοντέλο αρουραίων, προκάλεσε οξεία πνευμονική βλάβη η οποία χαρακτηρίστηκε ιστολογικώς από οίδημα στον κυψελιδικό χώρο και στο διάμεσο χώρο και συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων [355]. Επίσης, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε αύξηση του ολικού αριθμού κυττάρων, αυξημένα επίπεδα ουδετερόφιλων και ολικών πρωτεϊνών στο BAL. Η φωσφολιπάση A₂ λοιπόν θεωρείται ως ισχυρός μεσολαβητής στη φλεγμονή του πνεύμονα και προτείνεται η χρήση αυτού του μοντέλου για τη διερεύνηση των βιοχημικών και κυτταρικών μηχανισμών που συνδέονται με την επικείμενη ανάπτυξη του ARDS. Στη σήψη η οποία εμφανίστηκε μετά από περιτονίτιδα σε αρουραίους οδήγησε σε ιστολογικά ευρήματα πνευμονικής εμβολής, αυξημένη ενεργότητα PLase A₂, μειωμένα επίπεδα PC, αυξημένα επίπεδα λυσο-PC και μη φυσιολογικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [356].



Αυξημένα επίπεδα PLase A₂ και TNF βρέθηκαν στο πλάσμα ασθενών με ARDS και σύνδρομο ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου [357]. Πρόκληση οξείας πνευμονικής βλάβης σε μοντέλο μετά από χορήγηση ενδοτοξίνης είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση υψηλών επιπέδων ενεργότητας PLase A₂ στον πνευμονικό ιστό [358]. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η PLase A₂ μπορεί να είναι ο κύριος ρυθμιστής στην ανάπτυξη φλεγμονωδών διαταραχών που οδηγούν στην εμφάνιση ARDS [359]. Αυξημένα επίπεδα PLase A₂ και PAF βρέθηκαν στο πλάσμα και στο BAL ασθενών με τραύμα και ακόμη πιο υψηλά επίπεδα στους ασθενείς με σηπτικό σοκ σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου. Τα υψηλά επίπεδα αυτών συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της νόσου [360]. Υψηλά επίπεδα PLase A₂-II ανιχνεύθηκαν στον ορρό ασθενών με πολύ σοβαρές λοιμώξεις (περιτονίτιδα και σήψη) και αυτό θα μπορούσε να συμβάλλει σημαντικά στην εκτίμηση κινδύνου για ανάπτυξη του συνδρόμου ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων [361].

Αυξημένη ενεργότητα φωσφολιπάσης A₂ ανιχνεύθηκε στο BAL ασθενών με ARDS και παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων αυτής με τη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης [362]. Στη μελέτη αυτή διαχωρίστηκαν δύο διαφορετικά είδη ενζυμικής ενεργότητας τα οποία βρέθηκαν αυξημένα και τα δύο. Η μία ενεργότητα χαρακτηρίστηκε παρόμοια με τη PLase A₂ της ομάδας II, λόγω της δέσμευσής της με ηπαρίνη, των χρωματογραφικών της χαρακτηριστικών, της αναστολής της από διθειοθρεϊτόλη, της εξειδίκευσής της στο να υδρολύει *sn*-2-αραχιδονυλο- φωσφατιδυλαιθανολαμίνη κατά προτίμηση και της μοριακής της μάζας (14 kDa). Η δεύτερη χαρακτηρίστηκε ως ενεργή σε ουδέτερο pH, ικανή να υδρολύει φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (*sn*-2-αραχιδονυλο-) το ίδιο αποτελεσματικά, η δράση της εξαρτημένη της παρουσίας ιόντων Ca²⁺, και η μοριακή της μάζα 80-90 kDa. Η συμβολή αυτών των δύο ενεργοτήτων φωσφολιπάσης A₂ στην παθοφυσιολογία του ARDS δεν είναι ξεκάθαρη. Ωστόσο, τονίζεται ότι τα πολύ υψηλά επίπεδα αυτής στο BAL ασθενών με ARDS υποδεικνύουν ότι αυτή η ενεργότητα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής που χαρακτηρίζει το ARDS.

Ενεργότητα sPLase A₂ -IIA ανιχνεύθηκε στο BAL όχι όμως στο πλάσμα η οποία είχε συσχέτιση με τη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης σε μοντέλο οξείας



πνευμονικής βλάβης που προκλήθηκε από ελαϊκό οξύ [363]. Η κρίσιμη συμμετοχή της sPLase A₂ - II στην παραγωγή λυσο-PC και λιπαρών οξέων στους πνεύμονες, λόγω της υδόλυσης της διπαλμιτυλο-PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα βρέθηκε κατά τη διάρκεια χορήγησης του ειδικού αναστολέα LY311727 (βλ. σελ. 96) της sPLase A₂ - II σε μοντέλο ζώου με πρόκληση οξείας πνευμονικής βλάβης με λιποπολυσακχαρίτη [350].

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Μηχανικός αερισμός

Η αντιμετώπιση των ασθενών με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας γίνεται με μηχανική υποστήριξη της αναπνοής. Ο βασικός στόχος είναι η επίτευξη επαρκούς ανταλλαγής αερίων με το χαμηλότερο δυνατό μίγμα οξυγόνου (FiO₂) και τις χαμηλότερες δυνατές πιέσεις. Ο παρατεταμένος όμως μηχανικός αερισμός συνεπάγεται και κινδύνους. Έχει συνδεθεί με πνευμονικές λοιμώξεις, με πολυοργανική ανεπάρκεια και αυξημένη θνητότητα. Συγκεκριμένα, η επανειλημμένη άσκηση πίεσης σε φυσιολογικό πνευμονικό παρέγχυμα, μπορεί να αυξάνει την τριχοειδική διαπερατότητα, να προάγει την ανάπτυξη οιδήματος και τη φλεγμονή.

Χορήγηση φαρμάκων

Η αντίληψη ότι η οξεία πνευμονική βλάβη (ALI) θα μπορούσε να επηρεαστεί από ουσίες οι οποίες ρυθμίζουν την φλεγμονώδη αντίδραση οδήγησε στη δοκιμή ουσιών όπως κορτικοστεροειδή [364], προσταγλανδίνη E₁ [365], μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα [366], αντισώματα κατά της ενδοτοξίνης [367]. Καμία μελέτη δεν απέδειξε δυστυχώς αυξημένη επιβίωση αυτών των ασθενών.

Σε μοντέλα ζώων βρέθηκε ότι χορήγηση ανταγωνιστών ή αντισωμάτων του TNF, και της IL-1 μείωσαν την φλεγμονώδη αντίδραση [368], ενώ χορήγηση ανταγωνιστών του PAF [369] μείωσε τη διαρροή υγρών από τα μικροαγγεία. Δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους που να αναφέρουν θετικά αποτελέσματα στο ARDS [370].



Χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα

Όπως ειπώθηκε και πιο πάνω, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών οφείλεται στην ατελή ανάπτυξη των πνευμόνων και στην ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το 1980 χορηγήθηκε για πρώτη φορά επιφανειοδραστικός παράγοντας για τη θεραπεία του IRDS [371]. Οι μεγάλες κλινικές μελέτες που ακολούθησαν καθιέρωσαν τη χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα σαν θεραπεία εκλογής στην αντιμετώπιση του IRDS [372].

Η χορήγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο ARDS δεν έδειξε ένα σαφές όφελος στην επιβίωση. Αρκετά ευρήματα που αφορούν την ποσότητα, τον τρόπο χορήγησης αλλά και τη σύνθεση του χορηγούμενου επιφανειοδραστικού παράγοντα παραμένουν αναπάντητα. Στην κλινική θεραπεία αναπλήρωσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα χρησιμοποιούνται τρία βασικά είδη αυτού: φυσικός, τροποποιημένος φυσικός και συνθετικός επιφανειοδραστικός παράγοντας [373] (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Είδη επιφανειοδραστικού παράγοντα που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές.

Είδη	Πηγή	Περιεχόμενες πρωτεΐνες
Φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας	Ανθρώπινο αμνιακό υγρό	SP-A, SP-B, SP-C, SP-D
τροποποιημένος φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας	Εκχύλισμα από πνεύμονες βοός ή χοίρου (Survanta, Surfactant TA, Infasurf, Alveofact, Curosurf)	SP-B, SP-C
συνθετικός επιφανειοδραστικός παράγοντας.	DPPC, PG, tyloxapol, hexadecanol (Exosurf) DPPC : PG (7:3), συνθετικό συστατικό διαστολής των πνευμόνων (ALEC)	-



Φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας

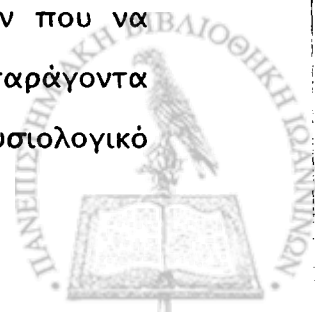
Χορήγηση φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα προβάτου σε κουνέλια, στα οποία το 80 % των κυψελιδικών φωσφολιπιδίων είχαν απομακρυνθεί ύστερα από επανειλημμένη έκπλυση, έδειξε επιστροφή των αερίων του αρτηριακού αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα και βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων του πνεύμονα [374].

Μελέτη σε ανθρώπους και συγκεκριμένα σε 10 ασθενείς με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια και σήψη έδειξε ότι, με τη χορήγηση πολύ υψηλής δόσης φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα διαμέσου του βρογχοσκοπίου μπορεί να ξεπεραστεί η ανασταλτική δράση των διαφόρων παραγόντων που βρίσκονται στον κυψελιδικό χώρο αυτών των ασθενών, καθώς επίσης και να υπάρξει μια ασφαλής προσέγγιση στη βελτίωση της ανταλλαγής των αερίων στο σοβαρό ARDS [375]. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε μια άμεση και εντυπωσιακή βελτίωση στην αρτηριακή οξυγόνωση φαίνεται όμως, ότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα επιφανειοδραστικού υλικού για επιτυχή και παρατεταμένα αποτελέσματα στην ανταλλαγή των αερίων, γεγονός όμως το οποίο σημαίνει ένα τεράστιο οικονομικό κόστος.

Ενστάλλαξη BAL με εναιώρημα επιφανειοδραστικού παράγοντα στους πνεύμονες μοντέλου ARDS, προκάλεσε σταθερή βελτίωση της λειτουργίας του πνεύμονα. Αυτή η βελτίωση είναι συγκρίσιμη με τα αποτελέσματα που παρατηρούνται μετά από ενστάλλαξη επιφανειοδραστικού παράγοντα αμέσως μετά την έκπλυση του πνεύμονα [376].

Η αναστολή της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τις πρωτεΐνες του πλάσματος ή από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του από πρωτεάσες, μπορεί να αντισταθμιστεί με επιπλέον χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα εξωγενώς σε μοντέλα ζώων με ARDS [377].

Ένα ακόμη συστατικό που ανιχνεύεται στον φυσικό επιφανειοδραστικό παράγοντα και όχι στον συνθετικό, είναι και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) [378]. Στην ίδια μελέτη, ανιχνεύονται πολύ χαμηλά επίπεδα PAF-AcH σε τραχειακό υγρό νεογνών με RDS και απουσία δεδομένων που να υποστηρίζουν ότι η παρουσία του PAF στον φυσικό επιφανειοδραστικό παράγοντα μπορεί να είναι επιβλαβής, υποστηρίζεται ότι ο PAF πιθανώς έχει έναν φυσιολογικό



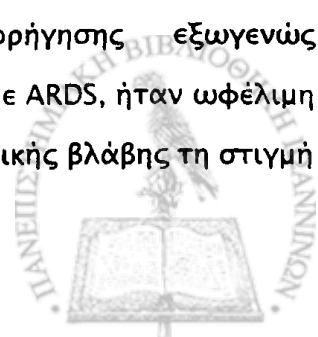
ρόλο. Μπορεί να δεσμεύεται στους υποδοχείς των τύπου II κυττάρων και να επάγει μια φυσιολογική ακολουθία γεγονότων στα κύτταρα του πνεύμονα.

Τροποποιημένος φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας

Χορήγηση τροποποιημένου φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα σε μοντέλα ζώων, στα οποία προκλήθηκε αναπνευστική δυσχέρεια παρόμοια με το ARDS ύστερα από απομάκρυνση των φωσφολιπιδίων του πνεύμονα με έκπλυση, συνοδεύτηκε από σημαντική βελτίωση στην ανταλλαγή των αερίων και στη διατασιμότητα των κυψελίδων σε σύγκριση με ομάδες ελέγχου χωρίς χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα [379, 380]. Χορήγηση τροποποιημένου φυσικού επιφανειοδραστικού παράγοντα βοός έδειξε να βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία και την ανταλλαγή των αερίων σε μοντέλο αρουραίου με πνευμονία [381, 382] και να εξασθενίζει την αύξηση της διαβατότητας των κυψελίδων στην πνευμονική βλάβη που προκαλείται από υπεροξυγοναιμία [383].

Ωστόσο, επιφανειοδραστικός παράγοντας από εκχύλισμα πνευμόνων χοίρου δεν βελτίωσε τα αέρια αίματος ούτε τη διατασιμότητα σε όψιμο στάδιο πνευμονικής βλάβης που προκαλείται από υπεροξυγοναιμία σε πειραματόζωα, πιθανώς λόγω της παρουσίας ανασταλτικών συστατικών που υπάρχουν στο υγρό οιδήματος [384]. Παρατηρήθηκε επίσης ότι, η αναστολή της δράσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το υγρό του οιδήματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση αυτού [385].

Επιφανειοδραστικός παράγοντας από εκχύλισμα πνευμόνων χοίρου μείωσε τη συσπείρωση σε πνεύμονες με βλάβη λόγω εισρρόφησης οξέος αλλά η ανταλλαγή των αερίων δεν βελτιώθηκε [386]. Οι ερευνητές στη μελέτη αυτή επισημαίνουν ότι, οι ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα που είναι υπεύθυνες για τη βελτίωση της διατασιμότητας του πνεύμονα είναι εντελώς διαφορετικές από αυτές που συμβάλλουν στη βελτίωση της ανταλλαγής των αερίων. Θεωρήθηκε ότι ο εξωγενής επιφανειοδραστικός παράγοντας θα μπορούσε να ξεπεράσει εν μέρει τις ανασταλτικές δράσεις των διαφόρων πρωτεϊνών του πλάσματος στο πνευμονικό οίδημα. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της χορήγησης εξωγενούς επιφανειοδραστικού παράγοντα σε διάφορα μοντέλα ζώων με ARDS, ήταν ωφέλιμη αλλά εξαρτώμενη από τον τύπο ζώου, το βαθμό της πνευμονικής βλάβης τη στιγμή



της δοκιμής και την έναρξη της θεραπείας. Επιπλέον, μπορεί να θεωρηθεί ότι ενώ υπάρχει βελτίωση, αυτή είναι ασήμαντη όταν συγκριθεί με τα διαφορετικά παρασκευάσματα του επιφανειοδραστικού παράγοντα ή με ομάδες ελέγχου.

Χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα (Curosurf) διαμέσου του βρογχοσκοπίου σε ασθενή με ARDS μετά από παρολίγον πνιγμό, βελτίωσε την αναπνευστική λειτουργία και τα επίπεδα των αερίων του αίματος αλλά δεν είχε αποτέλεσμα στην επιβίωση του ασθενούς [387].

Συνθετικός επιφανειοδραστικός παράγοντας

Μια πρόσφατη μελέτη σε 725 ασθενείς (εκ' των οποίων οι 364 είχαν ARDS που είχε προκληθεί από σήψη και οι 361 ήταν η ομάδα ελέγχου), έδειξε ότι συνεχής χορήγηση αερολύματος συνθετικού επιφανειοδραστικού παράγοντα στους ασθενείς με ARDS που προκλήθηκε από σήψη, δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών, παραμονή τους στη μονάδα εντατικής θεραπείας, χρονική διάρκεια μηχανικού αερισμού ή πνευμονική λειτουργία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [388].

Πρέπει να επισημανθεί ότι τα συνθετικά παρασκευάσματα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που χρησιμοποιούνται δεν περιέχουν πρωτεϊνικά συστατικά, ενώ φαίνεται ότι η SP-B παίζει σημαντικό ρόλο στις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [389]. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η μη επιβίωση των ασθενών με ARDS μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη της SP-A από τον τροποποιημένο φυσικό ή από τον συνθετικό επιφανειοδραστικό παράγοντα που χορηγείται [350].

Ωστόσο, η αποτυχία των δοκιμών χορήγησης επιφανειοδραστικού παράγοντα με περιεχόμενες πρωτεΐνες μπορεί να προέρχεται από τη συνεχή βλάβη του επιφανειοδραστικού παράγοντα από προϊόντα των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων [319].

Πρόγνωση

Σε πολλές περιπτώσεις στην εξέλιξη του ARDS εμφανίζεται ανεπάρκεια των λειτουργιών πολλαπλών οργάνων (ήπαρ, νεφρούς, κεντρικό νευρικό σύστημα, καρδιά) και ο ίδιος ο πνεύμονας απελευθερώνει φλεγμονώδεις μεσολαβητές στη



συστηματική κυκλοφορία, οι οποίοι επίσης επηρεάζουν δυσμενώς τη λειτουργία πολλαπλών οργάνων [390].

Παρά τη συνεχή πρόοδο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ARDS, η πρόγνωση των ασθενών παραμένει χαμηλή. Η θνητότητα υπερβαίνει το 50 % και έχει βελτιωθεί ελάχιστα τις τελευταίες δεκαετίες. Η εφαρμογή μοντέλων αερισμού, φιλικών προς το πνευμονικό παρέγχυμα, έχει αποδειχθεί ευεργετική για τη μείωση της θνητότητας και αποτελεί έναν από τους κύριους τομείς στους οποίους επικεντρώνεται η προσπάθεια βελτίωσης της πρόγνωσης [391].

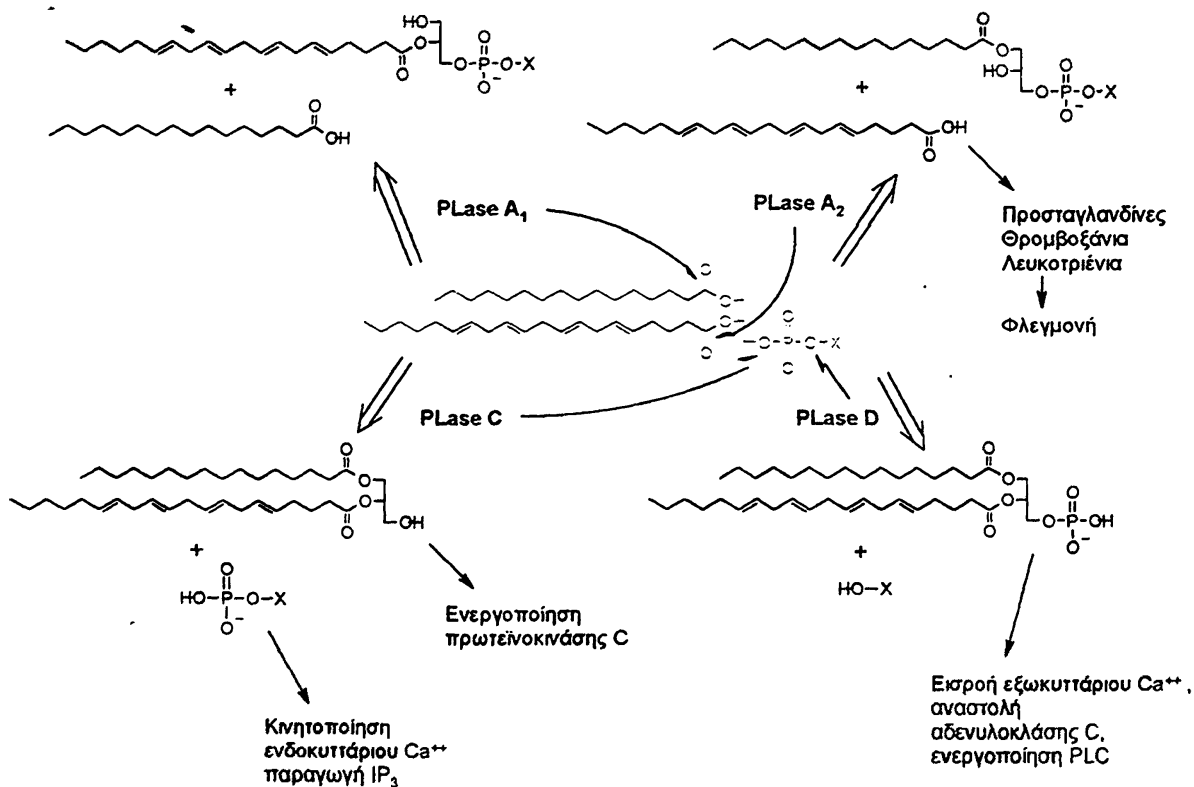
Ωστόσο, με την εύρεση ουσιών που θα μπορούσαν να σταματούν, να περιορίζουν ή να αποκαθιστούν τη βλάβη θα ήταν πιθανή η επιτυχής έκβαση της νόσου. Δυστυχώς, οι προτεινόμενες παρεμβάσεις πρέπει να γίνονται προφυλακτικά ή τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της νόσου για να είναι αποτελεσματικές. Επειδή με το ARDS συχνά εμφανίζονται προβλήματα και με άλλα όργανα, κάθε θεραπεία θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη και αυτά τα προβλήματα. Ασθενείς που έχουν την τύχη να επιζούν τις πρώτες ημέρες συχνά υποκύπτουν από επιπλοκές των υπολοίπων συστημάτων από λοιμώξεις. Έτσι, οποιαδήποτε αντιμετώπιση της γενικευμένης συστηματικής φλεγμονής δεν θα πρέπει να μειώνει την ικανότητα του οργανισμού να αντιμετωπίζει τους μικροοργανισμούς. Τέλος, η καλύτερη κατανόηση των φλεγμονωδών διαδικασιών που οδηγούν στο ARDS αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την ανάπτυξη μιας επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης.



4) ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂

ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ

Οι φωσφολιπάσες είναι μια σειρά διαφόρων ενζύμων που καταλύουν τον καταβολισμό των φωσφολιπιδίων. Ταξινομούνται σε κατηγορίες σύμφωνα με τον εστερικό δεσμό των φωσφολιπιδίων που υδρολύουν. Έτσι έχουμε τις φωσφολιπάσες (PLases) A₁, A₂, C και D (Σχήμα 17). Ως PLase B χαρακτηρίζεται το ένζυμο με δράσεις PLase A₁ και PLase A₂.



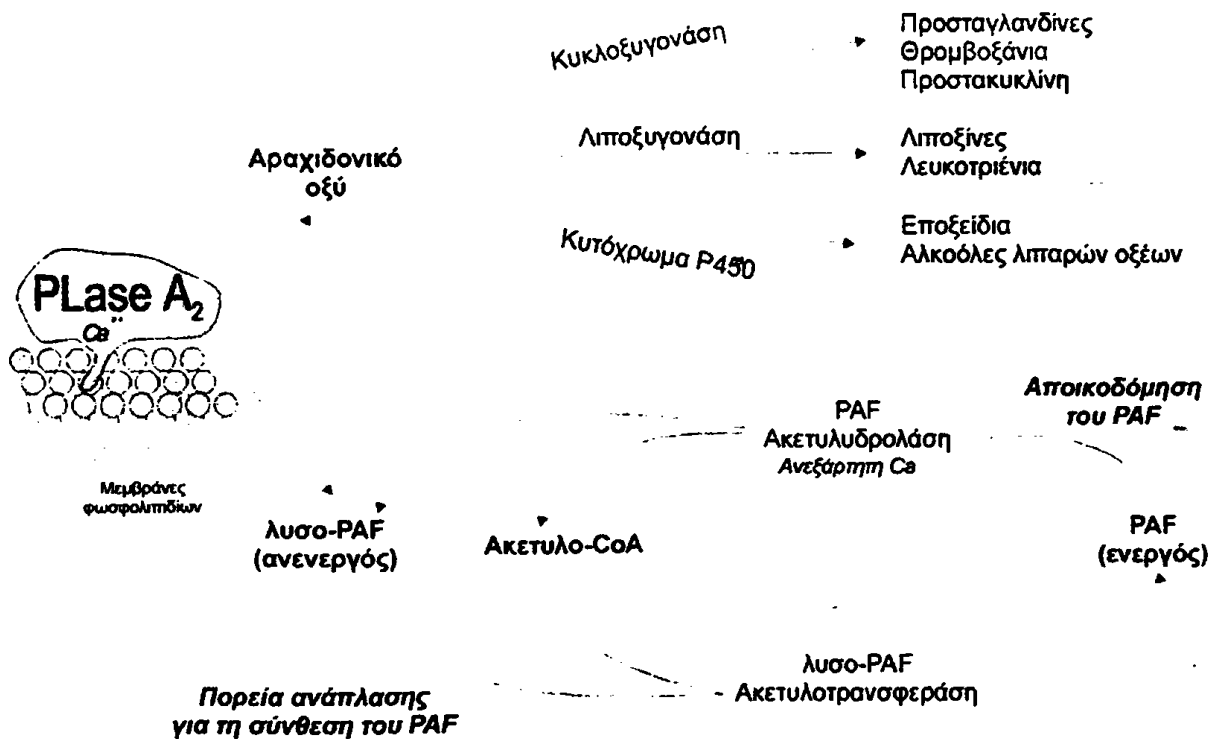
Σχήμα 17. Αντιδράσεις που καταλύουν οι φωσφολιπάσες A₁, A₂, C και D.

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων στα κυτταρικά συστήματα. Αυτό το ενδιαφέρον πηγάζει κυρίως από την ανακάλυψη ότι τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια δεν έχουν μόνο δομικό ρόλο αλλά είναι επίσης πηγές μορίων δευτερογενών διαβιβαστών στην κυτταρική μεταγωγή σήματος.



ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂ (PLases A₂)

Η φωσφολιπάση A₂ (PLase A₂) είναι το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού των φωσφολιπιδίων στη θέση sn-2 απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια (Σχήμα 17) [392]. Εκτός του ρόλου τους στη μεταγωγή σήματος, οι PLases A₂ συμμετέχουν στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων καθώς και σε ένα ευρύ φάσμα συστηματικών και οξέων φλεγμονωδών αντιδράσεων. Η συμμετοχή τους σε φλεγμονώδεις καταστάσεις υποδηλώνει ρόλο άμυνας σ' αυτό το ένζυμο. Το αραχιδονικό οξύ το οποίο απελευθερώνεται από τη δράση της φωσφολιπάσης A₂ αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τη δημιουργία εικοσανοειδών. Η PLase A₂ συμμετέχει στην πορεία ανάπλασης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) όταν στην sn-1 θέση των φωσφολιπιδίων που υδρολύει υπάρχει αιθερικός δεσμός (Σχήμα 18).



Σχήμα 18. Συμμετοχή της PLase A₂ στη δημιουργία των εικοσανοειδών και στην πορεία ανάπλασης του PAF.

Οι PLases A₂ είναι ποικίλης τάξεως ένζυμα ότι αφορά τη διαμερισματοποίηση, την κυκλοφορία, το μηχανισμό, την αλληλουχία, τη δομή και τέλος το ρόλο δισθενών

μεταλλικών ιόντων. Οι όροι "κυτοσολική" και "εκκρινόμενη" PLase A₂ έχουν αποδοθεί επίσης σ' αυτό το ένζυμο για να διακριθούν διαφορετικοί τρόποι δράσεως αυτού. Έχουν βρεθεί φωσφολιπάσες A₂ που η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου και άλλες όχι [393].

Ταξινόμηση των φωσφολιπασών A₂

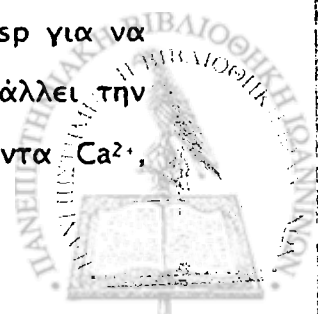
Οι PLases A₂ έχουν βρεθεί σε σημαντικές ποσότητες στο πάγκρεας των θηλαστικών, σε ανθρώπινο πλάσμα και αρθρικό υγρό, σε αδένες με δηλητήριο φιδιών ή μελισσών, σε εκκρίσεις βακτηρίων, σε ανθρώπινα αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα, μακροφάγα, σε νεφρούς, καρδιά, πνεύμονες, εγκέφαλο, σκελετικούς μύες κ. α. [394].

Μία ταξινόμηση των φωσφολιπασών A₂ που έχει παρουσιαστεί μέχρι τώρα στηρίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων τους (394, 395). Σύμφωνα με αυτή, οι PLases A₂ ταξινομούνται σε 10 ομάδες (Πίνακας 7). Εάν όμως θελήσουμε να ταξινομήσουμε αυτή τη σειρά των ενζύμων σύμφωνα με τις βιολογικές τους ιδιότητες, τότε έχουμε τρεις ομάδες:

1. *Εκκρινόμενη PLase A₂ (sPLase A₂)*
2. *Κυτοσολική PLase A₂ εξαρτώμενη από Ca²⁺ (cPLase A₂)*
3. *Ενδοκυττάρια PLase A₂ ανεξάρτητη Ca²⁺ (iPLase A₂)*

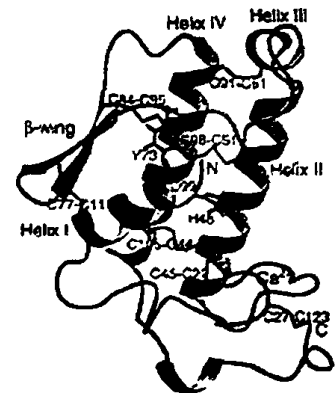
Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂

Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A₂ (sPLases A₂) είναι ένζυμα χαμηλής μοριακής μάζας, περίπου 14 kDa (Πίνακας 7), με μια πολύ άκαμπτη τεταρτοταγή μοριακή δομή, η οποία οφείλεται στην παρουσία 5-8 δισουλφιδικών δεσμών. Αυτό παρέχει σε αυτά τα ένζυμα σταθερότητα κατά της πρωτεόλυσης και αντίσταση στη μετουσίωση, έτσι ώστε να επιτρέπεται να διατηρούν την ενεργότητά τους στα εξωκυττάρια υγρά όπου και βρίσκονται. Στην καταλυτική περιοχή των αμινοξέων τους υπάρχει το ζεύγος His-Asp. Στην κατάλυση που επιτελεί η sPLase A₂ δεν μεσολαβεί ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο όπως παρατηρείται στις σερινεστεράσες. Αντιθέτως, η sPLase A₂ χρησιμοποιεί το αμινοξύ His με βοήθεια την Asp για να πολώσει ένα δεσμευμένο μόριο νερού, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα [393]. Τα δεσμευμένα στο πρωτεϊνικό μόριο ιόντα Ca²⁺,



απαιτούνται για τη σταθεροποίηση της ενδιάμεσης μεταβατικής κατάστασης τετραέδρου [393].

Εικόνα 5. Δομή της παγκρεατικής PLase A₂ βοός. Φαίνονται 7 δισουλφιδικοί δεσμοί, η καταλυτική δυάδα D99-H48 και το αμινοξύ Y73 [396].



Οι sPLases A₂ δεν επιδεικνύουν εξειδίκευση στα λιπαρά οξέα *in vitro*, αλλά απαιτούν ιόντα ασβεστίου σε συγκεντρώσεις μεγέθους mM για να δράσουν. Στα κύτταρα των θηλαστικών αναγνωρίστηκαν 5 διαφορετικά είδη sPLase A₂, που ανήκουν στις ομάδες I, IIΑ, IIС, V και X (Πίνακας 7) [397]. Η ικανότητα της sPLase A₂ των θηλαστικών να υδρολύει καρδιολιπίνη (διφωσφατιδυλογλυκερόλη) μελετήθηκε και βρέθηκε ότι η ενεργότητα της sPLase A₂ της ομάδας I για το υπόστρωμα αυτό ήταν μεγάλη ενώ της ομάδας II μικρή [398]. Η sPLase A₂ της ομάδας V ρυθμίζει την έκφραση της κυκλοξυγονάσης σε ενεργοποιημένα μακροφάγα με έναν μηχανισμό που εξηγείται με την υδρολυτική δράση του ενζύμου στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων, παίζοντας έτσι κρίσιμο ρόλο στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και στη σύνθεση των προσταγλανδινών [399]. Επιπλέον, η έκφραση της sPLase A₂ εξαρτάται από την ενεργοποίηση της cPLase A₂ [400]. Μια νέα εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ της ομάδας II βρέθηκε στο δηλητήριο κροταλία και χαρακτηρίστηκε ως παράγοντας αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [401].

Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A₂ εξαρτώμενες Ca²⁺

Η κυτοσολική φωσφολιπάση A₂ (cPLase A₂) είναι ένζυμο με υψηλή μοριακή μάζα, (85 kDa), και έχει βρεθεί στο κυτοσολικό κλάσμα σε όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων που έχουν μελετηθεί. Σημαντικό ρόλο για την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων βρέθηκε ότι παίζουν τα αμινοξέα Ser-228, Asp-549 και Arg-200, γεγονός που δείχνει ότι τα καταλυτικά αυτά συστατικά μπορεί να είναι τα ίδια με

αυτά της PLase B [402]. Αντίθετα με ότι συμβαίνει με την sPLase A₂, η cPLase A₂ λειτουργεί σαν μια σερίνεστεράση, δρώντας σχηματίζοντας ως ενδιάμεσο ακυλοένζυμο. Η cPLase A₂ απαιτεί Ca²⁺ για την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη όπου και εντοπίζεται το υπόστρωμα [393, 404].

Η cPLase A₂ συμμετέχει στη συγκέντρωση αραχιδονικού οξέος στα αρχικά στάδια ενεργοποίησης των P388D₁ μακροφάγων και υπάρχει πιθανότητα μια λειτουργικά ενεργή cPLase A₂ να είναι απαραίτητη για τη μετέπειτα δράση της sPLase A₂, διότι η δράση της cPLase A₂ προηγείται της δράσης της sPLase A₂ [400].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cPLase A₂ συμμετέχει στις διαδικασίες μεταγωγής σήματος με ενεργοποίηση διαμέσου υποδοχέα. Το ένζυμο μετατοπίζεται στις μεμβράνες μετά από απόκριση στην ενδοκυττάρια αύξηση Ca²⁺ και ακολουθεί φωσφορυλίωση αυτού μέσω της πρωτεϊνοκινάσης C [403]. Παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται ύστερα από φωσφορυλίωσή του από κινάσες. Η δέσμευση με τα ιόντα Ca²⁺ πραγματοποιείται διαμέσου της ειδικής περιοχής-δέσμευσης-Ca²⁺ (calcium-binding domain, CaLB ή C-2) στο μόριο. Η cPLase A₂ προτιμάει να υδρολύει φωσφολιπίδια τα οποία είναι εστεροποιημένα με αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2 [404], δεν υδρολύει την καρδιολιπίνη, ενώ υδρολύει την μονο-λυσσο και δι-λυσσο καρδιολιπίνη [398].

Αναφέρεται επίσης η σημαντική αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από υψηλής συγγένειας δέσμευση και εξειδίκευση με την 4,5-διφωσφοφωσφατιδυλινοσιτόλη οργανωμένη σε λιπιδικά κυστίδια [405].

Ο φυσιολογικός ρόλος της cPLase A₂ έχει ερευνηθεί μερικώς. Με επέμβαση στο γονιδίωμα, δημιουργήθηκαν ποντικοί οι οποίοι είχαν έλλειψη στο ένζυμο αυτό. Παρατηρήθηκε ότι ενώ οι ποντικοί αναπτύσσονται φυσιολογικά, τα θηλυκά παράγουν μικρά σε μέγεθος νεογέννητα, πολλά από τα οποία είναι συνήθως νεκρά [406]. Τα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα των ζώων αυτών, δεν παράγαν προσταγλανδίνη E₂, λευκοτριένιο B₄ ή C₄ ή PAF [407]. Επίσης, οι ποντικοί με έλλειψη σε cPLase A₂ εμφανίζουν μειωμένα αλλεργικά συμπτώματα και απώλεια στη βρογχική υπεραντίδραση στη μεταχολίνη καθώς και εξασθένιση στις αναπαραγωγικές λειτουργίες [407].



Εισαγωγή. 4) Φωσφολιπάσες A₂

Ομάδα	Πηγή	Προέλευση	ΜΒ (kDa)	Απαιτήση σε Ca ²⁺	Δι-σουλφιδικοί δεσμοί	Μοριακά χαρακτηριστικά
I						
A	Δηλητήριο κόμπρας	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζεύγος His-Asp
B	Πάγκρεας ανθρώπου/χοίρου	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζεύγος His-Asp, elapid loop
II						
A	Κροταλίας, έχιδνα, ανθρώπινο αρθρικό υγρό/ αιμοπετάλια	Εκκρινόμενη	13-15	mM	7	Ζεύγος His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
B	Έχιδνα gaboon	Εκκρινόμενη	13-15	MM	6	Ζεύγος His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
C	Όρχεις αρουραίου/ποντικίου	Εκκρινόμενη	15	MM	8	Ζεύγος His-Asp, καρβοξυλική προέκταση
III						
	Μέλισσες, σαύρες	Εκκρινόμενη	16-18	MM	5	Ζεύγος His-Asp
IV						
A	Raw 264.7/Νεφρός αρουραίου, ανθρώπινα U937/αιμοπετάλια	Κυτοσολική	85	<μM		Ser-228 σε GLSGS συγκαταβατική ακολουθία, Arg-200, Asp-549 απαιτείται; Θέση φωσφορυλίωσης Ser-505; Περιοχή Cal B; Περιοχή PH
B	Ανθρώπινος εγκέφαλος	Κυτοσολική	100	<μM		N-Τελική προέκταση, Ser-228
C	Ανθρώπινη καρδιά/σκελετικός μυς	Κυτοσολική	65	καμία		Ser-228; έλλειψη περιοχής CalB και θέσεις φωσφορυλίωσης Ser-505/Ser-727
V						
	Μακροφάγα P388D ₁ ανθρώπου/αρουραίου/καρδιάς ποντικού/πνευμόνων	Εκκρινόμενη	14	MM	6	Ζεύγος His-Asp, όχι καρβοξυλική προέκταση
VI						
	Μακροφάγα P388D ₁ , κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ	Κυτοσολική	80-85	καμία		GXSXC συγκαταβατική ακολουθία, επαναλήψεις αγκυρίνης, σύμπλοκο 340 kDa
VII						
A	Ανθρώπινο πλάσμα	Εκκρινόμενη	45	καμία		GXSXC συγκαταβατική ακολουθία, Ser-273, Asp-296, His-351
B	Εγκέφαλος βοός	Κυτοσολική	42	καμία		Μυριστυλιωμένο στο N-τελικό άκρο
VIII						
	Εγκέφαλος βοός	Κυτοσολική	29	καμία		Ser-47
IX						
	Θαλάσσιο σαλιγκάρι	Εκκρινόμενη	14	MM	6	Ζεύγος His-Asp
X						
	Ανθρώπινα λευκοκύτταρα	Εκκρινόμενη	14	mM	7	Ζεύγος His-Asp

Πίνακας 7. Ταξινόμηση ομάδων φωσφολιπάσες A₂ σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους (394).

Στην ομάδα IV ανήκει μια κυτοσολική PLase A₂, εξαρτώμενη από Ca²⁺, με προτίμηση στο αραχιδονικό οξύ, αλλά με επιπλέον ιδιότητες PLase A₁ και τρανσακυλάσης, καθώς επίσης άλλες δύο μορφές του ενζύμου που αναγνωρίστηκαν πρόσφατα. Πρόκειται για δύο κυτοσολικά ένζυμα με μοριακή μάζα 61 και 110 kDa και δρουν χωρίς την παρουσία Ca²⁺ ή σε μικρές συγκεντρώσεις Ca²⁺ (μM) αντίστοιχα, με προτίμηση στα ακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως στο αραχιδονικό οξύ κατά 3.5 φορές περισσότερο από το παλμιτικό [408, 409].

Ενδοκυττάρια φωσφολιπάσες A₂ ανεξάρτητες Ca²⁺

Ενδοκυττάρια φωσφολιπάσες A₂ ανεξάρτητες Ca²⁺ (iPLases A₂) έχουν βρεθεί σε όλους τους ιστούς και κύτταρα. Ωστόσο, ο ρόλος τους στον έλεγχο της λειτουργίας του κυττάρου δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Το μέγεθος (80 kDa), η ενδοκυτταρική διαμερισματοποίηση καθώς και στοιχεία από τον καταλυτικό της μηχανισμό είναι όμοια με αυτά της cPLase A₂. Ένα μοναδικό όμως χαρακτηριστικό της είναι τα οκτώ σχήματα αγκυρίνης που περιέχει στο NH₂-τελικό άκρο του μορίου [410]. Παρόμοια με την cPLase A₂, η iPLase A₂ φαίνεται να έχει καταλυτικό μηχανισμό σερινο-υδρολάσης, με το αμινοξύ σερίνη (Ser) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [411, 412]. Παρατηρήθηκε αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας από αναστολείς των σερινο-εστερασών (τριφθορομεθυλο-κετόνες, μεθυλο-αραχιδονυλο-φθοροφωσφορικό οξύ, βρωμοενολολακτόνη, τρικαρβονυλικό-αραχιδονικό οξύ / ή παλμιτικό οξύ) υποδεικνύοντας ότι στο μηχανισμό κατάλυσης συμμετέχει ενδιάμεσο σύμπλοκο ακυλο-σερίνης [413].

Ένα πιθανό στάδιο στο οποίο μεσολαβεί η iPLase A₂ φαίνεται να είναι η πορεία ανάπλασης των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων στα μακροφάγα. iPLases A₂ από τα P388D₁ μακροφάγα ποντικού [414] και από κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ [410] έχουν χαρακτηριστεί, έχει βρεθεί η αλληλουχία των αμινοξέων τους και κλωνοποιηθεί [412]. Αυτά τα δύο ένζυμα είναι παρόμοια και φαίνεται ότι είναι απλά μορφές είδους του ίδιου ενζύμου [412]. Ανήκει στην ομάδα VI των φωσφολιπασών A₂, έχει μερικά παρόμοια χαρακτηριστικά με τις sPLases A₂ και με τις cPLases A₂ [415] και δεν παρατηρείται να έχει εξειδίκευση για αραχιδονικό οξύ. Η iPLase A₂ δεν συμμετέχει στην κινητοποίηση του αραχιδονικού οξέος στα P388D₁ μακροφάγα [416]. Παρότι το ένζυμο αυτό δεν φαίνεται να συμμετέχει στην

απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος μετά από ενεργοποίηση, είναι σημαντικό για το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων. Συμμετέχει στις διαδικασίες κατά τις οποίες το κύτταρο προσλαμβάνει αραχιδονικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα για το σχηματισμό των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων.

Επιπλέον, η ανεξάρτητη Ca²⁺ κυτοσολική PLase A₂ (από P388D₁ μακροφάγα ποντικού), της ομάδας VI, εμφανίζει ιδιότητες λυσο-φωσφολιπάσης, τρανσακυλάσης [413] και PAF-ακετυλυδρολάσης. Εμφανίζει επίσης, ενεργοποίηση σε μικυλλιακές μεσοφάσεις φωσφολιπιδίων εστεροποιημένων με λιπαρές αλυσίδες μικρού ή μεγάλου μήκους. Η παρουσία του ATP ή της γλυκερόλης φαίνεται να προστατεύει το ένζυμο από την απώλεια της δράσης του μετά από παρατεταμένη επώαση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης [413].

«Ενεργοποίηση μεσόφασης»

Επειδή πολλά από αυτά τα ένζυμα είναι υδατοδιαλυτά, ενώ τα υποστρώματά τους δεν είναι υδατοδιαλυτά, έχει αναπτυχθεί μοναδικός τρόπος για τη ρύθμιση της κατάλυσης στη φυσική διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων του συστήματος, δηλαδή στη μεσόφαση (Εικόνα 6). Ένα κύριο χαρακτηριστικό μιας φωσφολιπάσης είναι η μεγάλη αύξηση της ενεργότητας της με ένα υπόστρωμα οργανωμένο σε συσσωμάτωμα (π. χ. μικύλλιο) σε σύγκριση με το ίδιο υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται στο διάλυμα ως μονομερές [393, 413]. Αυτή η «ενεργοποίηση μεσόφασης» περιπλέκει την ανάλυση της κινητικής του ενζύμου αφού εισάγει ένα επιπλέον βήμα στη δέσμευση αυτού με την επιφάνεια, το οποίο μπορεί να είναι διαφορετικό από τη δημιουργία του συμπλόκου Michaelis με το υπόστρωμα (417).

Η κατάλυση στη μεσόφαση μπορεί να περιγραφεί με τα εξής βήματα [396]:

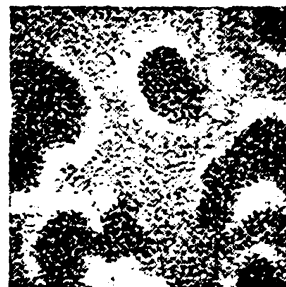
1. $E \rightleftharpoons E^*$
2. $E^* \rightleftharpoons E^*S$ (σύμπλοκο ενζύμου -υποστρώματος στη διεπιφάνεια)
3. $E^*S \rightleftharpoons E^*P$ (σύμπλοκο ενζύμου -προϊόντος στη διεπιφάνεια)
4. $E^*P \rightleftharpoons E^* + P$ (προϊόν)

Η δέσμευση των ενζύμων σε μια οργανωμένη διεπιφάνεια, το οποίο μπορεί να αποτελείται από τα μόρια του υποστρώματος, των προϊόντων, απορρυπαντικών, ή



άλλων αμφίφιλων μορίων, μπορεί να ενισχύεται από το υπόστρωμα, το φορτίο της επιφάνειας, ή από τροποποιήσεις στη διαμόρφωση του ενζύμου (418, 419).

Εικόνα 6. Διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) και ιχνηθετημένη με φλουορεσκεΐνη-PLase A₂. Στην εικόνα φαίνεται η προσρόφηση του σημασμένου ενζύμου στην επιφάνεια της DPPC. Το ένζυμο ενσωματώνεται κατά προτίμηση στη μεσόφαση. Η ένταση του λευκού χρώματος δείχνει την ποσότητα του προσροφημένου ενζύμου [420].



Η υδρόλυση λοιπόν του οργανωμένου σε συσσωμάτωμα υποστρώματος από τη PLase A₂ μπορεί να είναι μέχρι και 10000 φορές πιο γρήγορη σε σύγκριση με μονομερή υποστρώματα. Οι βασικότερες θεωρίες αποδίδουν αυτή τη σημαντική αύξηση της ενεργότητας στη συμμετοχή των φυσικών μορφών του υποστρώματος (μοντέλο υποστρώματος) και στην αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου (μοντέλο ενζύμου). Αναλυτικότερα έχουν προταθεί οι εξής θεωρίες [421]:

Μοντέλο αναγνώρισης μεσόφασης

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το ένζυμο αλληλεπιδρά με το μικύλλιο του υποστρώματος διαμέσου μιας περιοχής αμινοξέων που αναγνωρίζουν τη μεσόφαση, και που είναι διαφορετική από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό επάγει αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου, η οποία περιλαμβάνει μια αναπροσαρμογή των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου με ακόλουθη αύξηση της ενεργότητας.

Διαδικό φωσφολιπιδικό μοντέλο (Dual phospholipid model)

Το μοντέλο αυτό προτάθηκε αρχικά για τις φωσφολιπάσες από δηλητήρια φιδιών, βρέθηκε όμως να εφαρμόζεται και σε PLase A₂ θηλαστικών [422]. Κατά το μοντέλο αυτό, μόριο φωσφολιπιδίου αλληλεπιδρά με μια περιοχή αμινοξέων του ενζύμου διαφορετική από το ενεργό κέντρο. Το γεγονός αυτό επηρεάζει τη δομή του ενεργού κέντρου ενός άλλου μορίου ενζύμου, το οποίο είναι ο καταλυτικός συνεταιρισμός ενός ενζυμικού διμερούς. Επειδή δύο μόρια φωσφολιπιδίων με διαφορετικούς ρόλους συμμετέχουν στο μοντέλο αυτό, καλείται διαδικό φωσφολιπιδικό μοντέλο.



Μοντέλο υποστρώματος

Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι το ένζυμο παραμένει σε μια σταθερή δομή και ότι η αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας προέρχεται από το γεγονός ότι τα φωσφολιπίδια στα μικύλλια εξαναγκάζονται σε διαμορφώσεις οι οποίες ευνοούν τη δέσμευση και υδρόλυση.

Μηχανισμός απελευθέρωσης προϊόντος

Στο μοντέλο αυτό προτείνεται ότι τα υδρόφοβα προϊόντα διαχέονται έξω από την ενεργή περιοχή πιο εύκολα μέσα σε ένα μικύλλιο παρά στο υδατικό διάλυμα. Εάν το καθοριστικό στάδιο είναι η απελευθέρωση προϊόντος (το οποίο δεν είναι γνωστό) τότε η δέσμευση με το μικύλλιο θα αυξήσει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων.

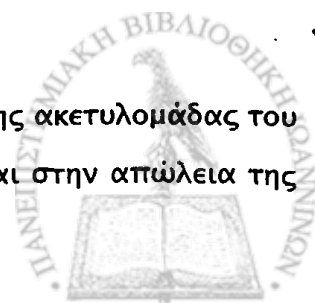
Επιπλέον μελέτες υποστηρίζουν μάλλον περισσότερο το «μοντέλο αναγνώρισης μεσόφασης» [423, 424, 425]. Πειράματα φθορισμού έδειξαν δομικές μεταβολές των συμπλεγμάτων ενζύμου-συσσωματώματος φωσφολιπιδίων γύρω στη αμινο-τελική περιοχή, στο ενεργό κέντρο καθώς και σε μια περιοχή πλησίον του καρβοξυ-τελικού άκρου του ενζύμου. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης μπορεί να ευθύνεται για την ενεργοποίηση του ενζύμου με τη δέσμευση στα μικύλλια των λιπιδίων [425].

PLase A₂ των ομάδων VII και VIII (ή PAF-AcH)

Δύο άλλες ομάδες (VII, VIII) φωσφολιπάσης A₂, (Πίνακας 7) υδρολύουν μικρού μήκους λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2, χωρίς ταυτόχρονη απαίτηση σε Ca²⁺. Δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση σε ακετυλομάδες και χαρακτηρίζονται ως PAF-ακετυλυδρολάσες (PAF-AcH), εξαιτίας της ικανότητάς τους να καταλύουν την υδρόλυση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF). Η PAF-AcH της ομάδας VII είναι μια εκκρινόμενη μορφή, η οποία ανιχνεύεται στο ανθρώπινο πλάσμα (426, 427), και διαθέτει αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες. Ενδοκυττάριας μορφής του ενζύμου έχουν επίσης βρεθεί (428, 429) (αναλυτικά για τις PAF-AcHs βλ. παρακάτω).

Κατηγορίες PAF-Ακετυλυδρολάσης (AcH)

Η PAF-AcH είναι το ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ακετυλομάδας του PAF (Σχήμα 19), οδηγώντας έτσι στην απενεργοποίησή του και στην απώλεια της



βιολογικής του δραστηριότητας. Η παρουσία της περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1980, όταν παρατηρήθηκε ότι ο PAF χάνει τη βιολογική του δραστηριότητα αν βρεθεί σε ορρό κουνελιού [430]. Ακολούθως, η απενεργοποίηση του PAF αποδόθηκε σε υδρολυτική δράση η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του μορίου, απελευθερώνοντας οξικό οξύ και τον βιολογικά ανενεργό λυσο-PAF [431].

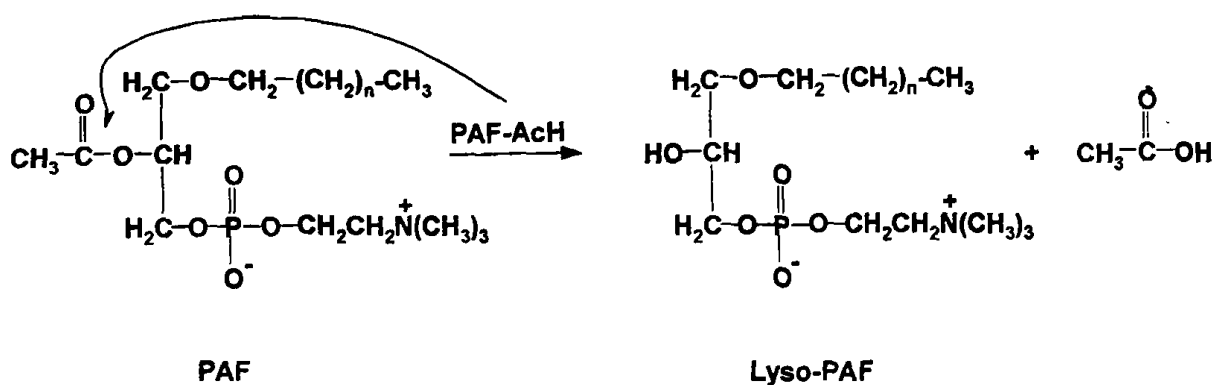
Με δεδομένη την ενζυμική εξειδίκευση και τη χημική φύση του υποστρώματος, οι PAF-AsHs ταξινομούνται ως PLases A₂ [394]. Αποτελούν ετερογενή ομάδα ενζύμων με ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες. Από κοινού με την πανταχού παρούσα κατανομή του PAF, οι PAF-AsHs εντοπίζονται στο πλάσμα του αίματος καθώς και στο κυτταρόπλασμα [432] (Πίνακας 8).

Η εξειδίκευση υποστρώματος του ενζύμου αυτού δείχνει ότι το εύρος της δράσης του είναι πολύ πιο μεγάλο από ότι αρχικά θεωρούνταν. Δεν υδρολύει μόνο τον PAF αλλά και άλλα παρόμοια ακετυλιωμένα φωσφογλυκερίδια καθώς και φωσφολιπίδια με μικρού μήκους λιπαρή ή οξειδωμένη αλυσίδα (βλ. παρακάτω).

Πίνακας 8. Ακετυλυδρολάσες του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων [439].

Προέλευση	Τύπος	Μοριακή μάζα (kDa)	Αμινοξέα ενεργού κέντρου
Ανθρώπινο πλάσμα	Εκκρινόμενη	45	Ser-273, Asp-296, His-351
Πλάσμα ινδικού χοιρίδιου	Εκκρινόμενη	63(φυσική) 49 (cDNA)	Ser (:)
<i>N. brasiliensis</i>	Εκκρινόμενη	25 38	Ser (:), His (:), Ca ²⁺
Ανθρώπινα ερυθροκύτταρα	Κυτοσολική	25	Σουλφυδρική ομάδα (:)
Ήπαρ βοός	Κυτοσολική	40	Ser-236, Asp-259, His-314
Εγκέφαλος βοός	Κυτοσολική	26 (α ₁) 26 (α ₂)	Ser-47, Asp-192, His-195 Ser-48, Asp-193, His-196
Αιμοπετάλια ποντικού	Κυτοσολική	270	Ser ή Cys (:)





Σχήμα 19. Δράση της PAF-AcH στον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF).

Στα κύτταρα, το προϊόν αυτής της αντίδρασης (ο λυσο-PAF και άλλα φωσφολιπίδια) επανακυκλώνεται πολύ γρήγορα στη θέση sn-2 με ένα μεγάλης αλυσίδας λιπαρό οξύ.

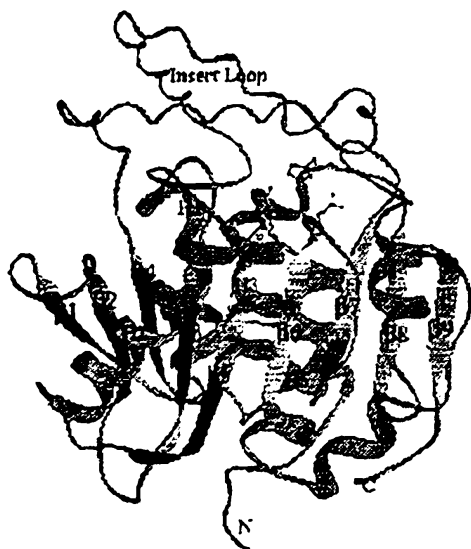
Από τα μέχρι τώρα γνωστά ένζυμα, τρεις ακετυλδωρολάσες έχουν χαρακτηριστεί ὀχρητικά λεπτομερώς σε επίπεδο ανασυνδυασμένου cDNA και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αυτά τα ένζυμα είναι η PAF-AcH του πλάσματος (πPAF-AcH), η ενδοκυττάρια ισομορφή II (PAF-AcH II) και το ετεροτριμερές του εγκεφάλου PAF-AcH (Ib) (βλ. παρακάτω). Η PAF-AcH που ανιχνεύεται στα αιμοπετάλια ποντικού αναφέρεται ότι έχει βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες πιο περίπλοκες από τις υπόλοιπες PAF-AcHs που βρίσκονται σε άλλα είδη [433].

PAF-AcH του πλάσματος

Η PAF-AcH του πλάσματος (ή πPAF-AcH) [426, 434, 435] έχει δομικές ιδιότητες χαρακτηριστικές των ουδετέρων λιπασών και εστερασών (Εικόνα 7). Εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα και η μοριακή της μάζα είναι 45 kDa. Αποτελείται από ένα μοναδικό πολυπεπτιδίο 441 αμινοξέων και στο καταλυτικό της κέντρο εντοπίζονται τα αμινοξέα Ser-273, Asp-296 και His-351 [442, 436].

Το 70 % της πPAF-AcH που κυκλοφορεί στο πλάσμα βρίσκεται δεσμευμένο με τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) [437] και το υπόλοιπο 30 % με τις υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL). Ρόλο κλειδί στη δέσμευσή της με τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας φαίνεται να παίζει το καρβοξυτελικό άκρο της απολιποπρωτεΐνης B [438].





Εικόνα 7. Υποθετικό τριδιάστατο μοντέλο της PAF-AcH του πλάσματος και της ισομορφής II [439].

Η πPAF-AcH είναι ειδική στο να υδρολύει μικρές λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2. Αναφέρεται να διατηρεί το 50 % της ενεργότητάς της με ανθρακική αλυσίδα στη θέση sn-2 του φωσφολιπιδίου μήκους 5 ατόμων άνθρακα και υδρολύει ακόμα και αλυσίδα 9 ατόμων άνθρακα [439].

Η ενεργότητα της πPAF-AcH δεν εξαρτάται από κανένα μεταλλικό ιόν όπως τα ιόντα Ca²⁺. Είναι μια σερινεστεράση και υδρολύει κατά προτίμηση την ακετυλομάδα των αναλόγων του PAF με ακυλομάδα στη θέση 1, δεν υδρολύει ανάλογα του PAF με αιθανολαμίνη ενώ τα τελευταία αναστέλλουν την υδρόλυση του PAF από την AcH του πλάσματος [242].

Ο τρόπος της κατάλυσης της πPAF-AcH δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς, τα μέχρι τώρα στοιχεία όμως υποδεικνύουν ότι η κινητική ανάλυση του ενζύμου περιλαμβάνει στάδιο κατά το οποίο η πPAF-AcH προσεγγίζει το υπόστρωμα από την υδατική φάση [440]. Αν πράγματι ισχύει αυτό, τότε η πPAF-AcH δεν είναι ένζυμο που δρα στη μεσόφαση.

Ενδοκυττάρια PAF-AcHs

Η ενδοκυττάρια AcH είναι διαφορετικό ένζυμο από την PLase A₂ κυρίως γιατί η δράση της είναι ανεξάρτητη της παρουσίας ιόντων ασβεστίου και είναι ειδική στο

να υδρολύει μικρές λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2 [441]. Ενδοκυττάρια μορφές της PAF-AcH έχουν βρεθεί κυρίως στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και στους νεφρούς και διακρίνονται σε δύο ισομορφές (I και II) [442]. Όλες οι ενδοκυττάρια μορφές, όπως και οι εκκρινόμενες, περιέχουν στο καταλυτικό κέντρο το πενταπεπτιδίο Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly ή Gly-Xaa-Ser-Xaa-Val που υπάρχει στις λιπάσες και στις εστεράσες.

Ενδοκυττάρια μορφή PAF-AcH βρίσκεται και στα ερυθροκύτταρα, η οποία αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες των 25 kDa [443].

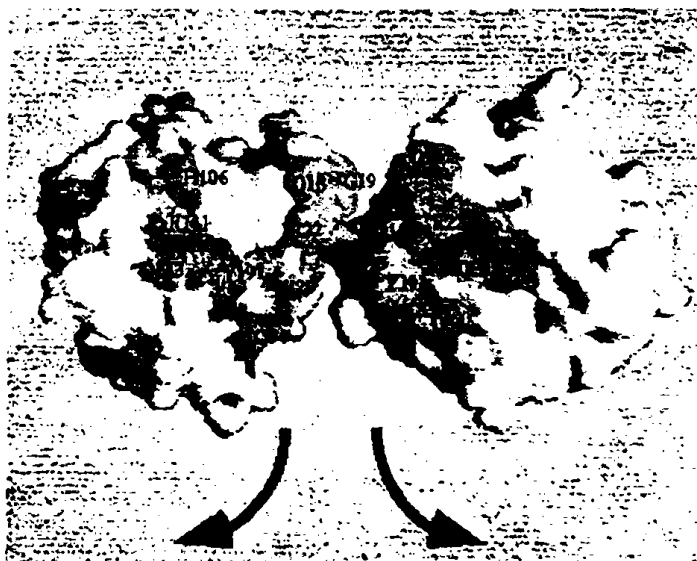
Ισομορφή I (PAF-AcH I)

Η ισομορφή I φαίνεται να αποτελείται από δύο ή και περισσότερες υπομονάδες (Ia και Ib). Από τις πιο μελετημένες ενδοκυττάρια ισομορφές της PAF-AcH είναι η Ib.

Ισομορφή Ib (PAF-AcH Ib)

Η ισομορφή Ib που καθарίστηκε από τον εγκέφαλο βοός [444, 445] αποτελείται από δύο ομόλογες καταλυτικές υπομονάδες (63 % ομοιότητα) με μοριακή μάζα 26 kDa η κάθε μία γνωστές ως α-υπομονάδες (Εικόνα 8) και από μια β-αλυσίδα (45 kDa). Το σύμπλοκο PAF-AcH Ib μπορεί εύκολα να διαχωριστεί στο καταλυτικό διμερές α₁/α₂ και τη β-υπομονάδα [446]. Όλη η καταλυτική ενεργότητα βρίσκεται στο διμερές α₁/α₂ και κυρίως στην α₁-υπομονάδα.

Εικόνα 8. Αναπαράσταση της τεταρτοταγούς δομής της α-υπομονάδας του συμπλέγματος PAF-AcH Ib [446].



Η α₁ υπομονάδα περιέχει την καταλυτική τριάδα αμινοξέων Ser-47, Asp-192, His-195 [442]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι είναι το μόνο λιπολυτικό ένζυμο

γνωστό να έχει τεταρτοταγή διαμόρφωση που θυμίζει μικρές GTPάσες [446]. Οι δύο ενεργές περιοχές του α-διμερούς εντοπίζονται πολύ κοντά μεταξύ των δύο μονομερών. Ποια είναι όμως η λειτουργική συσχέτιση μεταξύ των α-υπομονάδων και της β-υπομονάδας; Είναι πιθανό η α₁-υπομονάδα να παίζει έναν πιο γενικό ρόλο στους μηχανισμούς μετανάστευσης των κυττάρων στους νευρώνες [439].

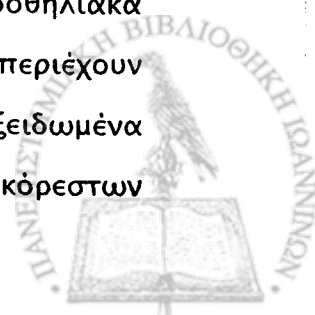
Είναι γνωστό ότι η β-υπομονάδα είναι αδρανής, αλλά φαίνεται να ρυθμίζει με διάφορους τρόπους την καταλυτική ενεργότητα ενζύμου [447]. Το ομοδιμερές α₂/α₂ υδρολύει τον PAF και την 1-Ο-αλκυλ-2-ακετυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλαιθανολαμίνη (AAGPE) πιο αποτελεσματικά από τα 1-Ο-αλκυλ-2-ακετυλ-φωσφολιπίδια. Ωστόσο, τα α₁/α₁ και α₁/α₂ διμερή υδρόλυσαν το 1-Ο-αλκυλ-2-ακετυλ-sn-γλυκερο-φωσφορικό οξύ πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τον PAF, ενώ η AAGPE ήταν φτωχό υπόστρωμα [447]. Η β-υπομονάδα δεσμεύεται και με τα τρία καταλυτικά διμερή. Επιταχύνει την ενεργότητα του α₂/α₂ ομοδιμερούς αλλά μειώνει αυτή του α₁/α₁ και δεν έχει σχεδόν καμία επίδραση στο ετεροδιμερές α₁/α₂.

Ισομορφή II (PAF-AcH II)

Η ισομορφή II εκφράζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς, η μοριακή της μάζα είναι 40 kDa [448]. Εμφανίζει ομοιότητες στην τεταρτοταγή δομή με την PAF-AcH του πλάσματος, αφού το 41 % της αλληλουχίας των αμινοξέων της είναι όμοιο με αυτό της πPAF-AcH (Εικόνα 7). Ο βιολογικός ρόλος της PAF-AcH II δεν είναι ξεκάθαρος και παρότι υδρολύει κατά προτίμηση οξειδωμένα φωσφολιπίδια καθώς και PAF *in vitro*, διαθέτει αντι-οξειδωτικές λειτουργίες υποδεικνύοντας ότι μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο [449].

PAF-AcH και οξειδωμένα φωσφολιπίδια

Οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, μέσω ελευθέρων ριζών, επιφέρει σπάσιμο των αλυσίδων και οδηγεί στο σχηματισμό μορίων με ισχυρές παθοφυσιολογικές δράσεις, παρόμοιων και στη δομή αλλά και στη δράση με τις προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια [450, 451]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκτίθενται σε υπεροξειδία, απελευθερώνουν κυστίδια που περιέχουν οξειδωμένα φωσφολιπίδια τα οποία μιμούνται τις δράσεις του PAF. Τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, τα οποία παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων



λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στη θέση sn-2 τους, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη καρβονυλικής (-CHO), καρβοξυλικής (-COOH) και υδροξυλομάδας (-OH) στο τελικό άκρο της ακυλομάδας. Βρέθηκε ότι αυτά ενεργοποιούν και προσκολλούν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα στο ενδοθήλιο [452]. Όπως και ο PAF, αυτά τα μόρια (PAF-like lipids) υδρολύονται από τις PAF-ακετυλυδρολάσες [453, 454] στο πλάσμα και στους ιστούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο PAF μπορεί να είναι προστατευτικός στα φλεγμονώδη σύνδρομα. Η οξειδωση λοιπόν των φωσφολιπιδίων μπορεί να έχει διάφορες παθολογικές δράσεις, όπως ισχαιμία, σύνδρομο επαναιμάτωσης, φλεγμονές, καρκίνο, γήρανση ενώ η PAF-AcH μπορεί να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στα γεγονότα αυτά [455].

Αναστολείς των φωσφολιπασών A₂

Χημικοί αναστολείς

Η πιο ασφαλής προσέγγιση για να εκτιμήσει κανείς τη συμμετοχή μιας συγκεκριμένης PLase A₂ σε μια διαδικασία είναι η αναστολή της ενεργότητάς της με χρήση χημικών αναστολέων. Η αναστολή μιας συγκεκριμένης PLase A₂ παρέχει ένα χρήσιμο αντιφλεγμονώδες μέσο στις οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές. Δυστυχώς όμως, ισχυροί και ειδικοί αναστολείς για κάθε συγκεκριμένο τύπο PLase A₂ δεν υπάρχουν διαθέσιμοι στους ερευνητές. Ωστόσο, ένας αριθμός ουσιών συμπεριφέρονται ως ισχυροί και ειδικοί αναστολείς.

Οι εκκρινόμενες PLases A₂ ήταν τα πρώτα είδη των φωσφολιπασών A₂ που αναγνωρίστηκαν, απομονώθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και αναφέρθηκαν διάφοροι αναστολείς τους. Μερικοί από αυτούς αναφέρονται ως κλασσικοί και περιλαμβάνουν φάρμακα για την ελονοσία, όπως μεπακρίνη, κινακρίνη [456], αμινογλυκοζίτες, αλκοόλες και πολυαμίνες [457]. Ωστόσο, η έλλειψη εξειδίκευσης αυτών των ουσιών δείχνει ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναστολείς της PLase A₂.

Το μανοαλίδιο [458] και το p-βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο (pBPB) [459] είναι δύο μη-ειδικοί αναστολείς της sPLase A₂ οι οποίοι τροποποιούν το ένζυμο με ομοιοπολική δέσμευση με το αμινοξύ λυσίνη (Lys) ή ιστιδίνη (His). Δεν αναστέλλουν όμως την cPLase A₂ ή iPLase A₂. Σε μικτά συστήματα λοιπόν, αναμένεται οι αναστολείς αυτοί να αλληλεπιδρούν με πολλές και διαφορετικές πρωτεΐνες [394].

Ωστόσο, σε κυτταρικές μελέτες, το rBPB θεωρείται και χρησιμοποιείται ως ειδικός αναστολέας της PLase A₂.

Διάφορα φωσφολιπιδικά ανάλογα δρουν ως αντιστρεπτοί αναστολείς της PLase A₂ και μπορεί να εμφανίζουν προτίμηση στις sPLase A₂. Τέτοιοι είναι τα θειοαιθερικά αμιδο-φωσφολιπίδια [460] και φωσφονικά ανάλογα μεταβατικής κατάστασης [461], αλλά κανένας από αυτούς δεν φαίνεται να είναι ισχυρός αναστολέας *in vitro* ή *in vivo*. Τα συστατικά αυτά συνήθως συσσωρεύονται ή διαμοιράζονται στα μικύλλια ή στις μεμβράνες [136].

Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί επιπλέον ειδικοί αναστολείς της sPLase A₂. Ένας ισχυρός αναστολέας της sPLase A₂ της ομάδας IIA και V και όχι της ομάδας IIB, είναι το 3-(3-ακεταμιδο-1-βενζυλο-2-αιθυλινδοδυλο-5-οξύ) προπανο-θειικό οξύ ή LY311727 [462, 394].

Η αραχιδονυλο τριφθορομεθυλο κετόνη (AATTFMK ή AACOCF₃) και το μεθυλο αραχιδονυλο φθοροφωσφονικό (MAFP) [463] είναι δύο άλλα συστατικά τα οποία έχουν παρόμοια χημική δομή, (αραχιδονικό οξύ συζευγμένο με ομάδα που αντιδρά με τη Ser) και αναστέλλουν ισχυρά την cPLase A₂ *in vitro* καθώς και τη iPLase A₂ της ομάδας VI [394, 464]. Σε ολόκληρα κυτταρικά συστήματα φαίνεται ότι προτιμάται το MAFP, διότι η AATTFMK είναι αντιστρεπτός αναστολέας, χρειάζεται πολύ χρόνο για να δράσει πλήρως και αναστέλλει επίσης τις κυκλοξυγονάσες.

Η βρωμοενολογακτόνη (BEL) αναστέλλει ειδικά τη iPLase A₂ [465], σε μεγάλες συγκεντρώσεις όμως αναστέλλει και τη cPLase A₂. Επίσης αναστέλλει και άλλα σημαντικά ένζυμα που μετέχουν στη σηματοδότηση όπως τη φωσφοϋδρολάση του φωσφατιδικού οξέος [466]. Έτσι λοιπόν, αν μια ενεργότητα αναστέλλεται από AATTFMK και από MAFP αλλά όχι από τη BEL, αυτό θα σήμαινε ότι πρόκειται για ενεργότητα cPLase A₂ [394].

Φυσικοί αναστολείς

Οι αννεξίνες (λιποκορτίνες) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, (μεσολαβητές των φλεγμονωδών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να δεσμεύονται στις διεπιφάνειες των φωσφολιπιδίων και θεωρούνται ως αντιστρεπτοί αλλά μη ειδικοί αναστολείς της εκκρινόμενης και κυτοσολικής PLase A₂ [467].



Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η PLase A₂ από το δηλητήριο φιδιού *T. viridis*, αναστέλλεται ειδικά από την πρωτεΐνη A του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων (SP-A) βοός ή αρουραίου. Στο μηχανισμό της αναστολής φαίνεται να διαμεσολαβεί δέσμευση της SP-A με το ένζυμο, όχι όμως διαμέσου του τμήματος του μορίου της SP-A που μοιάζει με τις λεκτίνες η εκείνου που δεσμεύει φωσφολιπίδια. Ωστόσο, η SP-A δεν ανέστειλε άλλες εκκρινόμενες PLase A₂ των ομάδων I και II [95].

Παρατηρήθηκε *in vitro* αναστολή της έκφρασης της εκκρινόμενης PLase A₂ στα κυψελιδικά μακροφάγα πειραματικού ινδικού χοιριδίου, όταν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αυτών είχε προστεθεί επιφανειοδραστικός παράγοντας *Cygosurf*, υποδεικνύοντας ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας έχει ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή του ενζύμου [468]. Τα φωσφολιπιδικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα και κυρίως η ελαΰλο-φωσφατιδυλογλυκερόλη ευθύνεται για την αναστολή της έκφρασης της sPLase A₂ στα κυψελιδικά μακροφάγα και το γεγονός αυτό συμβαίνει τουλάχιστον εν μέρει διαμέσου της αναστολής της έκκρισης του TNF-α [469].

Αναστολείς της PAF-AcH

Η ενεργότητα της PAF-AcH αναστέλλεται από το δισοπροπυλο-φθορο-φωσφορικό οξύ (DFP), 4-[2-αμινοαιθυλ]βενζυλο-σουλφονυλο φθορίδιο (*refablock*), φαινυλο-μεθυλο σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF) [445, 470, 471], γεγονός που υποδεικνύει ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχει σερίνη.

Μόρια φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν ομάδα καρβαμυλεστέρα στη θέση *sn*-2 του μορίου τους, όπως η 1-*O*-εξαδεκυλο-2-δεσοξυ-2-αμινο-μεθυλκαρβαμυλο-2-μεθυλο-γασ-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, καθώς και μόρια φωσφοχολίνης συνδεδεμένα με ομάδα πυρένιου στη θέση 1, βρέθηκε να δρουν ως ειδικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς της pPAF-AcH και της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης PAF-AcH, [472]. Η αζετιδινόνη ή SB-222657 είναι ένας καινούργιος αναστολέας, ο οποίος προκαλεί ισχυρή στερεοειδική αναστολή της δράσης της PAF-AcH των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (LDL), ενώ δεν αναστέλλει την sPLase A₂-IIA του ανθρώπινου αρθρικού υγρού [473].



PLase A₂ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ

Οι PLases A₂ παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ή στη διακίνηση της φλεγμονής στον πνεύμονα, και αυτό επηρεάζει άμεσα την ισορροπία του επιφανειοδραστικού παράγοντα [474].

Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα υγιών ενηλίκων ανιχνεύθηκε μια εκκρινόμενη PLase A₂, με μοριακή μάζα 14 kDa, σταθερή σε όξινες συνθήκες, ευαίσθητη σε αναγωγικές συνθήκες και απαιτεί ιόντα ασβεστίου για τη δράση της. Έδειξε εξειδίκευση στην υδρόλυση φωσφατιδυλοχολίνης εστεροποιημένη στη θέση sn-2 με αραχιδονικό οξύ έναντι του λινολεϊκού ή παλμιτικού οξέος [475]. Όταν το ένζυμο επωάστηκε με καλλιέργειες ανθρωπίνων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων απελευθέρωσε αυξημένες ποσότητες αραχιδονικού οξέος και PAF. Η PLase A₂ λοιπόν, μπορεί να μετέχει στη δημιουργία των λιπιδικών φλεγμονωδών μεσολαβητών σε φυσιολογικές καθώς και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις του πνεύμονα.

Αυξημένα επίπεδα PLase A₂ ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα και στο BAL ασθενών με σηπτικό σοκ [343, 360, 476]. Αυξημένα επίπεδα βρέθηκαν επίσης σε πειραματικά μοντέλα με αλλεργικό άσθμα το οποίο είχε προκληθεί από εισπνεόμενο αντιγόνο [477, 478].

Μια όξινη PLase A₂ ανεξάρτητης Ca²⁺ (aiPLase A₂) με μοριακή μάζα 26-29 kDa απομονώθηκε από πνεύμονες αρουραίου και βοός [479]. Το ένζυμο αυτό δείχνει προτίμηση στην υδρόλυση της PC έναντι της PE και των ανιονικών φωσφολιπιδίων, ενώ δεν έχει καμία προτίμηση για οξειδωμένα υποστρώματα. Παρατηρήθηκε αναστολή της ενεργότητά της με το φωσφολιπιδικό ανάλογο μεταβατικής κατάστασης MJ33 και με αναστολείς των σερινο-εστερασών. Καμία επίδραση στην ενεργότητα δεν είχαν οι αναστολείς αραχιδονυλο-τριφθορομεθυλο-κετόνη, βρωμοενολολακτόνη, p-βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο και ATP. Ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων έδειξε υψηλή ομολογία με την ανθρώπινη aiPLase A₂. Στοιχεία λοιπόν, συνηγορούν στη συμμετοχή του ενζύμου αυτού στο μεταβολισμό της PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων.



Ανιχνεύθηκε κυτοσολική και λυσοσωμική ενεργότητα PLase A₂ σε ενεργοποιημένα κυψελιδικά μακροφάγα βοός. Η λυσοσωμική ενεργότητα χαρακτηρίστηκε όξινη και ανεξάρτητη Ca²⁺ [480].

PAF-AcH και ασθένειες

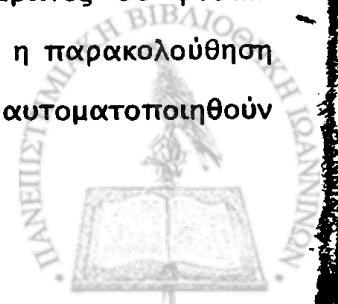
Η PAF-AcH που ανιχνεύεται σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα φυσιολογικών, ή ασθενών με άσθμα ή ασθενών με ίνωση χαρακτηρίστηκε ως διαφορετικό ένζυμο από την εκκρινόμενη PLase A₂, από την PAF-AcH του πλάσματος και από την PAF-AcH των ερυθροκυττάρων [481]. Εκκρίνεται από κυψελιδικά μακροφάγα χωρίς προηγούμενη διέγερση αυτών ή μετά από διέγερση με TNF-α και είναι ευαίσθητη σε βλάβη από ελεύθερες ρίζες. Υψηλά επίπεδα PAF-AcH ανιχνεύονται στο BAL ασθενών με πνευμονική ίνωση [481], με υδροστατικό πνευμονικό οίδημα [186] και πνευμονική εμβολή [482], ενώ η έλλειψη αυτής συσχετίζεται με τη σοβαρότητα του βρογχικού άσθματος [481, 483]. Ενεργότητα PLase A₂ ανεξάρτητης ιόντων Ca²⁺ ανιχνεύεται επίσης στον ορρό καθώς και στον εγκέφαλο ασθενών με σχιζοφρένεια [484, 485].

Λόγω της υδρολυτικής δράσης κατά του PAF, η AcH χαρακτηρίζεται ως αντιφλεγμονώδες ένζυμο. Εάν λοιπόν ο PAF είναι κεντρικό μόριο στα φλεγμονώδη σύνδρομα, η PAF-AcH θα μπορούσε να ελαχιστοποιήσει τη βλάβη. Δοκιμές χορήγησης ανασυνδυασμένης PAF-AcH πραγματοποιούνται σε ασθενείς υψηλού κινδύνου να αναπτύξουν ARDS [268].

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLase A₂

Όπως ειπώθηκε πιο πάνω, (σελ. 87), οι PLases A₂ είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα, αλλά η ενεργότητά τους αυξάνεται σε οργανωμένες διεπιφάνειες. Για το λόγο αυτό, τα υποστρώματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης (Critical Micellar Concentration, CMC).

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι προσδιορισμού ενεργότητας PLase A₂ (Πίνακας 9). Η επιλογή μεταξύ των διαφόρων μεθόδων εξαρτάται κυρίως από στο σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος. Για παράδειγμα, κάποιες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρισμένα ένζυμα αλλά είναι ασύμβατες σε φυσικά συστήματα. Κάποιες μέθοδοι είναι συνεχείς και γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της αντίδρασης, ενώ άλλες δεν είναι και κάποιες μπορούν να αυτοματοποιηθούν



ενώ άλλες όχι. Ωστόσο, το πιο σημαντικό κριτήριο επιλογής μιας μεθόδου ανίχνευσης είναι η ευαισθησία της μεθόδου που απαιτεί το συγκεκριμένο ένζυμο. Η απαιτούμενη ευαισθησία εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου στο προς μελέτη υλικό καθώς και από την ειδική του ενεργότητα [486].

Πίνακας 9. Μέθοδοι προσδιορισμού ενεργότητας φωσφολιπάσης A₂ [486].

Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης	Συνεχής παρακολούθηση	Φυσικό υπόστρωμα
Ογκομετρικές	20 nmol	+	+
Πεχαμετρικές	100 pmol	+	+
NMR	1 μmol	-	+/-
ESR	1 nmol	+	-
Μέθοδος μονοστοιβάδας	-	+	+
Πολαρογραφικές	40 nmol	+	+
Φασματοφωτομετρικές	200 pmol - 25 nmol	+/-	+/-
Ανοσοχημικές		-	
Ραδιενεργές	1 fmol - 1 pmol	-	-
Φθορισμομετρικές	1 pmol	+	-

Η ευαισθησία μιας μεθόδου επηρεάζεται από έναν αριθμό παραγόντων, ο πιο σημαντικός από τους οποίους είναι το όριο ανίχνευσης μιας συγκεκριμένης μεθόδου. Το όριο ανίχνευσης ορίζεται από τις φυσικές ιδιότητες της ίδιας της μεθόδου όπως ο συντελεστής σβέσης ενός χρωμοφόρου ή οι περιορισμοί λόγω τεχνικών προδιαγραφών των οργάνων. Όταν γίνεται σύγκριση μεθόδων, είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς ότι το όριο ανίχνευσης από μόνο του δεν αντανακλά απαραίτητα την ευαισθησία μιας μεθόδου για ένα συγκεκριμένο ένζυμο, αλλά η φαινόμενη διαφορά μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά υποστρώματα. Αυτό



μπορεί να είναι πολύ σοβαρό πρόβλημα για αρκετές φθορισμομετρικές μεθόδους, όπου η μέθοδος με ένα πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης χάνει σε ευαισθησία λόγω του υποστρώματος [486].

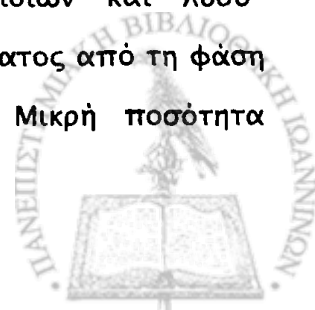
Αυτές όμως που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι οι ανοσοχημικές (παρασκευή μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων κατά του ενζύμου), οι ραδιομετρικές και οι φθορισμομετρικές.

Ραδιομετρικές μέθοδοι

Οι ραδιομετρικές μέθοδοι είναι όμως αυτές που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό των PLase A₂ καθώς και της PAF-AcH. Απαιτούν τη χρήση συνθετικών φωσφολιπιδίων, σημασμένων με ραδιενεργά ισότοπα ³H ή ¹⁴C ή ³²P. Τα πλεονεκτήματά τους είναι η υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση. Ωστόσο, είναι μέθοδοι χρονοβόρες, συχνά απαιτούν χρωματογραφικό καθαρισμό των προϊόντων, εμπεριέχουν ραδιοχημικούς κινδύνους και τα ραδιοσημασμένα υποστρώματα είναι υψηλού κόστους.

Η μέθοδος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού λιπιδίων. Στη μέθοδο αυτή, τα φωσφολιπίδια καθώς και τα προϊόντα του μίγματος αντίδρασης ανακτώνται από το υδατικό διάλυμα με εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Στη συνέχεια, γίνεται εξάτμιση των διαλυτών της οργανικής φάσης, τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο χλωροφορμίου ή/και μεθανόλης, τοποθετούνται σε πλάκα πυριτικού οξέος (TLC) και διαχωρίζονται μεταξύ τους με ανάπτυξη της πλάκας σε συστήματα διαλυτών. Οι διάφορες κηλίδες αποξύνονται και μετράται η ραδιενέργειά τους. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι τα αντιδρώντα και τα προϊόντα αναγνωρίζονται και ποσοτικοποιούνται. Επιπλέον, οποιαδήποτε απώλεια κατά τη διάρκεια της εκχύλισης επηρεάζει ισοδύναμα όλα τα συστατικά. Η μέθοδος όμως αυτή υστερεί σε ταχύτητα και ευκολία.

Η μέθοδος Dole στηρίζεται στην εκχύλιση Dole [487]. Τα λιπίδια εκχυλίζονται με προπανόλη-2, επτανίο και θειϊκό οξύ. Το ελεύθερο λιπαρό οξύ εκχυλίζεται στη φάση του επτανίου ενώ η πλειοψηφία των φωσφολιπιδίων και λυσοφωσφολιπιδίων παραμένει στην υδατική φάση. Ποσότητα δείγματος από τη φάση του επτανίου μετράται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Μικρή ποσότητα



φωσφολιπιδίων και λυσο-φωσφολιπιδίων εκχυλίζεται επίσης στη φάση του επτανίου και μπορεί να παρεμβάλεται η ραδιενέργειά τους με αυτή των λιπαρών οξέων. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα και η ευκολία, ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα όμως είναι ότι η ραδιενέργεια του υπερκείμενου δεν είναι αναγνωρισμένη.

Μέθοδος με *Escherichia coli*

Η Μέθοδος με *Escherichia coli* είναι μια άλλη ραδιομετρική μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται μεμβράνες *E. coli* που περιέχουν ραδιοσημασμένα φωσφολιπίδια. Μετά την επώαση των μεμβρανών με το ένζυμο, το προϊόν της αντίδρασης παραμένει στο διάλυμα και οι μεμβράνες φυγοκεντρούνται. Ποσότητα από το υπερκείμενο μεταφέρεται και μετράται η ραδιενέργεια. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ πιο γρήγορη από τις άλλες μεθόδους, το κύριο μειονέκτημα όμως είναι ότι η ραδιενέργεια του υπερκείμενου δεν είναι αναγνωρισμένη [486].

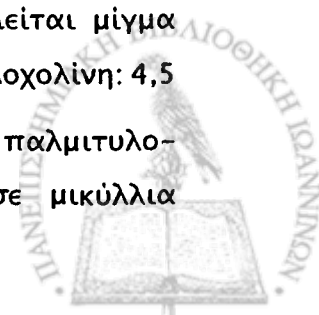
Πρόσφατα, ομάδα ερευνητών εφάρμοσαν ραδιομετρικές μεθόδους ανίχνευσης ενεργοτήτων PLase A₂, οι οποίες μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των τεσσάρων τύπων ενζύμων PLase A₂ των θηλαστικών [488]. Αυτό έγινε χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα και διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης. Συγκεκριμένα τα μίγματα αντίδρασης πριν την προσθήκη της πηγής του ενζύμου αποτελούνταν:

Ανίχνευση iPLase A₂-VI

Για την ανίχνευση της iPLase A₂-VI χρησιμοποιείται μίγμα DPPC (διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη) που περιέχει 100,000 cpm 1-παλμιτυλο-2-[1-¹⁴C]παλμιτυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνης σε μικύλλια αναμιγμένα με απορρυπαντικό (Triton X-100), σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7.5, 5 mM EDTA, 2 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) και 1mM ATP. Η προσθήκη του ATP συμβάλλει στη σταθεροποίηση της ενεργότητας της iPLase A₂ στο ομογενοποίημα.

Ανίχνευση cPLase A₂-IV

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας cPLase A₂-IV χρησιμοποιείται μίγμα PAPC/PIP₂ [405] (1-παλμιτυλο-2-αραχιδονυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη: 4,5 διφωσφο-φωσφατιδυλινοσιτόλη) (97/3) που περιέχει 100,000 cpm 1-παλμιτυλο-2-[1-¹⁴C]αραχιδονυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνης, σε μικύλλια



αναμιγμένα με απορρυπαντικό (Triton X-100), σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7.5, 80 μM Ca²⁺, 2 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) [414] και 0.1 mg/ml BSA. Υψηλότερες συγκεντρώσεις BSA μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς την ενεργότητα της sPLase A₂.

Ανίχνευση sPLase A₂-V

Για την ανίχνευση της sPLase A₂-V χρησιμοποιείται μίγμα DPPC/POPS (διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνη/1-παλμιτυλο-2-ελαΰλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοσερίνη) (3/1) σε μορφή μικρών μονοστοιβαδωτών κυστιδίων που περιέχουν 100,000 cpm 1-παλμιτυλο-2-[1-¹⁴C]παλμιτυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνης, σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7.5, 5 mM Ca²⁺ και 1 mg/ml BSA.

Ανίχνευση sPLase A₂-IIA

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας sPLase A₂-IIA χρησιμοποιείται μίγμα DLPE/POPS (1-παλμιτυλο-2-λινολεοΰλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλαιθανολαμίνη/1-παλμιτυλο-2-ελαΰλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλοσερίνη) (1/1) σε μορφή μικρών μονοστοιβαδωτών κυστιδίων που περιέχουν 100,000 cpm 1-παλμιτυλο-2-[1-¹⁴C]λινολεοΰλ-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορυλαιθανολαμίνης, σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes, pH 7.5, 1 mM Ca²⁺ και 1 mg/ml BSA. Η συγκέντρωση του Ca²⁺ ρυθμίστηκε έτσι ώστε να είναι η ιδανική σε αυτές τις συνθήκες.

Φθορισμομετρικές μέθοδοι

Οι φθορισμομετρικές μέθοδοι είναι επίσης ευαίσθητες (βλ. σελ. 101, Πίνακας 9) [486], παρότι ο φθορισμός ως φυσικό μέγεθος επηρεάζεται συνήθως από διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, το pH, η μικυλλιακή κατάσταση του υποστρώματος, η παρουσία των πρωτεϊνών κ. α. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν συνθετικά υποστρώματα φωσφολιπιδίων τα οποία είναι σημασμένα σε ένα από τα δύο λιπαρά οξέα με μια φθορίζουσα ομάδα. Οι περισσότερες φθορισμομετρικές μέθοδοι είναι ασυνεχείς και συνήθως απαιτείται διαχωρισμός φάσεων με TLC ή HPLC για να διαχωριστούν τα υποστρώματα από τα προϊόντα. Λίγες φθορισμομετρικές μέθοδοι συνεχείς έχουν επίσης αναπτυχθεί. Ένα κύριο χαρακτηριστικό μιας συνεχούς φθορισμομετρικής μεθόδου είναι η διάκριση του

φθορισμού του προϊόντος από το βασικό φθορισμό του υποστρώματος. Αυτό μπορεί να απαιτεί ή όχι το προϊόν και το υπόστρωμα να βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις. Οι συνθήκες για να επιτευχθεί αυτό ποικίλουν ανάλογα με το υπόστρωμα και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να απαιτείται η προσθήκη ή η απομάκρυνση αλβουμίνης και άλλων πρωτεϊνών που είναι φορείς λιπιδίων, έτσι ώστε να μεταφέρουν τα λιπαρά οξέα από τα μικύλλια στο διάλυμα. Επίσης, η προσθήκη αναστολέων ή πρωτεϊνών στο μίγμα της αντίδρασης μπορεί να επηρεάσει την κατανομή των προϊόντων.

Πριν όμως επικεντρωθούμε στις μεθόδους αυτές θα πρέπει να κατανοήσουμε το φθορισμό ως φαινόμενο.



Φωταύγεια [489, 490, 491, 492, 493, 494]**Μόρια στη διηγερμένη κατάσταση**

Πριν μια ουσία εκπέμψει φως, πρέπει να απορροφήσει ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Όταν ένα κβάντο φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος συγκρούεται με το μόριο, θα απορροφηθεί σε περίπου 10^{-15} sec (χρόνος που απαιτείται για ένα μόριο να μεταβεί από μια ηλεκτρονιακή κατάσταση σε μια άλλη). Το μόριο παραμένει στη διηγερμένη κατάσταση για περίπου 10^{-7} με 10^{-8} sec πριν χαθεί μερική ή όλη η περίσσεια ενέργειας. Ένα από τα τρία παρακάτω πράγματα μπορεί να συμβούν ακολούθως στο διηγερμένο μόριο:

- ❖ *Θα εκπέμψει ένα φωτόνιο της ίδιας συχνότητας με αυτό που απορροφήθηκε (resonance emission).*
- ❖ *Θα εκπέμψει φωτόνιο στην υπέρυθρη περιοχή, χάνοντας έτσι δονητική ενέργεια και θα καταλήξει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της ηλεκτρονιακώς διηγερμένης κατάστασης (δονητική επαναφορά) ή*
- ❖ *Θα υποβληθεί σε απώλεια δονητικής ενέργειας διαμέσου συγκρούσεων χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας και θα καταλήξει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της ηλεκτρονιακώς διηγερμένης κατάστασης (δονητική επαναφορά).*

Τα δύο πρώτα είναι πολύ σπάνιο να συμβούν, στην πραγματικότητα συμβαίνουν μόνο στα αέρια και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Στα τυπικά συστήματα (π. χ. αέρια σε συνήθεις πιέσεις, διαλύματα ή υγρά) η θερμική αποδιέγερση (thermal relaxation) του δονητικώς διηγερμένου μορίου είναι πιο πιθανό να συμβεί πολύ πριν το μόριο εκπέμψει φωτόνιο.

Αφού το μόριο βρεθεί στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διηγερμένης κατάστασης, έχει πάλι τρεις πιθανούς τρόπους με τους οποίους μπορεί να χάσει την υπολειπόμενη περισσή ενέργεια:

- *Χωρίς να εκπέμψει ακτινοβολία, μπορεί να υποβληθεί σε απώλεια ηλεκτρονιακής ενέργειας διαμέσου συγκρούσεων ή άλλων αλληλεπιδράσεων.*
- *Μπορεί να εκπέμψει υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία (φθορισμός).*



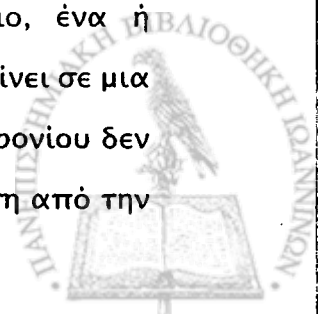
- **Μπορεί να μεταβεί σε μια μετασταθή τριπλή κατάσταση και λίγο αργότερα να επιστρέψει στη βασική κατάσταση, συνήθως με την εκπομπή υπεριώδους ή ορατού φωτός (φωσφορισμός).**

Γενικώς, οι τρεις παραπάνω τρόποι αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων αναφέρονται με σειρά μειούμενης πιθανότητας. Τα περισσότερα μόρια που απορροφούν υπεριώδες ή ορατό φως καταναλώνουν όλη αυτή την περίσσεια ενέργειας ως θερμότητα. Σχετικώς λίγα μόρια φθορίζουν και ακόμη πιο λίγα φωσφορίζουν. Ωστόσο, σε έναν αριθμό σημαντικών ουσιών (π. χ. αρωματικοί υδρογονάνθρακες), η απώλεια ηλεκτρονιακής ενέργειας, χωρίς να γίνει εκπομπή ακτινοβολίας, είναι γεγονός που έχει χαμηλή πιθανότητα να συμβεί, έτσι ο φθορισμός και ο φωσφορισμός προσλαμβάνουν μεγάλη σπουδαιότητα.

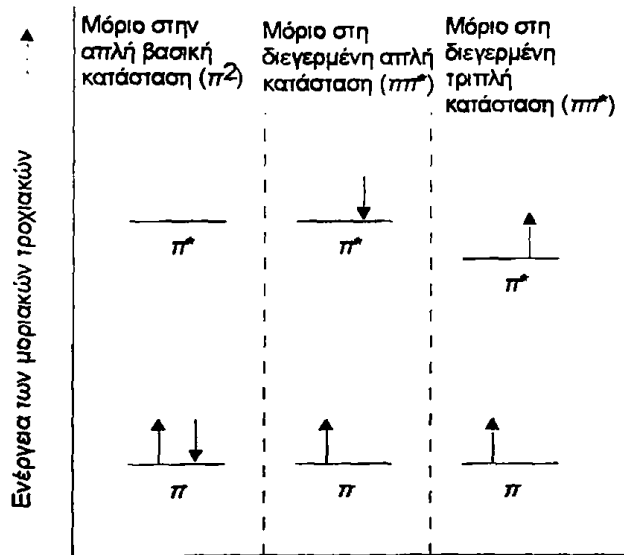
Απλές και τριπλές καταστάσεις

Οι όροι *απλή (single)* και *τριπλή κατάσταση (triple state)* προέρχονται από την ατομική φασματοσκοπία και υποδηλώνουν τον αριθμό των ασύζευκτων ηλεκτρονίων απουσία μαγνητικού πεδίου. Γενικώς, εάν n είναι ο αριθμός των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, θα υπάρχουν $n + 1$ φορές αντίστοιχες ενεργειακές καταστάσεις που σχετίζονται με το spin του ηλεκτρονίου, ασχέτως των κατειλημμένων μοριακών τροχιακών (Σχήμα 20). Έτσι, εάν δεν υπάρχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια ($n = 0$), υπάρχει μόνο $n + 1$ ή μία κατάσταση spin, η οποία λέγεται απλή κατάσταση. Παρομοίως, οι λέξεις διπλή, τριπλή, τετραπλή κ. τ. λ. αναφέρονται σε συστήματα τα οποία έχουν 1, 2, 3, ... ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η πλειοψηφία των μορίων που δεν διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια δεν έχουν μαγνητικό πεδίο, απωθούνται από αυτό και λέγονται διαμαγνητικά μόρια. Αντιθέτως, οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έλκονται από το μαγνητικό πεδίο και αποκαλούνται παραμαγνητικές.

Ο φθορισμός και ο φωσφορισμός σχετίζονται με μόρια κυρίως στη βασική κατάσταση, στην κατάσταση δηλαδή χαμηλότερης ενέργειας, τα οποία δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια (απλή κατάσταση). Όταν υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος απορροφάται από ένα τέτοιο μόριο, ένα ή περισσότερα συζευγμένα ηλεκτρόνια (συνήθως ένα n ηλεκτρόνιο) μεταβαίνει σε μια διηγερμένη απλή κατάσταση, στην οποία το spin του διηγερμένου ηλεκτρονίου δεν έχει αλλάξει και το καθαρό spin είναι ακόμη μηδέν. Η απευθείας μετάβαση από την



απλή βασική κατάσταση στην τριπλή διηγευμένη είναι απαγορευμένη (έχει πολύ μικρή πιθανότητα να συμβεί) και έτσι ο μόνος εφικτός μηχανισμός για την μετάβαση στην τριπλή διηγευμένη κατάσταση είναι η μετατροπή μιας διηγευμένης απλής σε μια διηγευμένη τριπλή κατάσταση (Σχήμα 20).



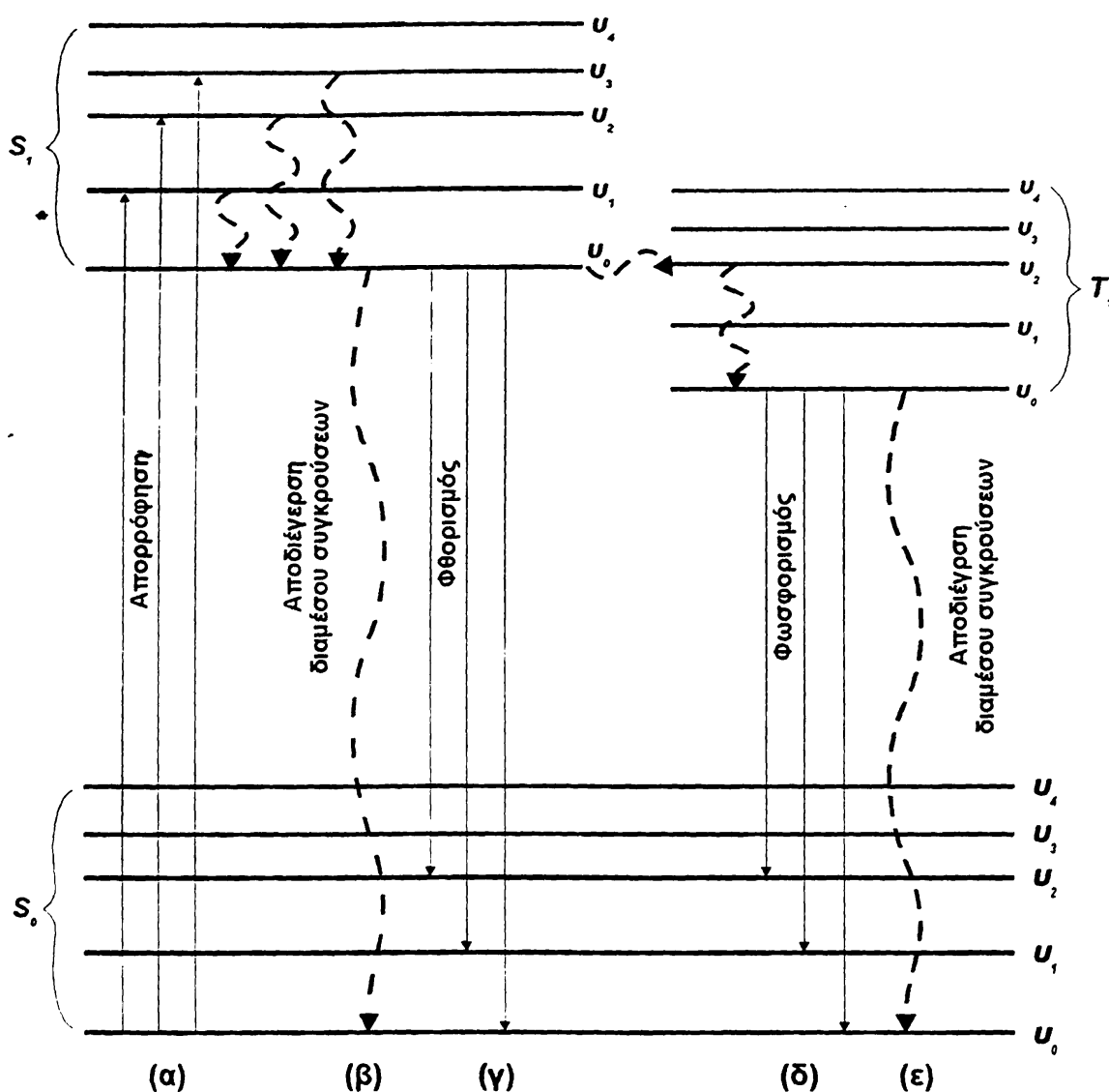
Σχήμα 20. Μόρια με π ηλεκτρόνια σε διάφορες καταστάσεις spin.

Διαδικασίες φωταύγειας

Στο σχήμα φαίνονται περιληπτικά οι μεταβολές της ενέργειας που συμβαίνουν στην απορρόφηση, στον φθορισμό και φωσφορισμό. Στην απορρόφηση (Σχήμα 21, α) το μόριο μεταβαίνει από τη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση σε μια ηλεκτρονιακώς διηγευμένη κατάσταση και σε άλλες πιθανές διηγευμένες δονητικές καταστάσεις. Το μόριο στη συνέχεια θα αποδιεγερθεί διαμέσου συγκρούσεων και θα μεταπέσει στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της διηγευμένης απλής κατάστασης.

Εάν η διηγευμένη απλή κατάσταση είναι σχετικώς ασταθής, το μόριο θα επιστρέψει στη βασική κατάσταση αφού αποδιεγερθεί διαμέσου των συγκρούσεων χωρίς να εκπέμψει ακτινοβολία (Σχήμα 21, β). Τα μόρια τα οποία βρίσκονται σε σχετικώς σταθερές διηγευμένες απλές καταστάσεις θα επιστρέψουν στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση με την εκπομπή φωτονίων φθορισμού (Σχήμα 21, γ). Η διηγευμένη απλή κατάσταση μπορεί να σταθεροποιηθεί και η απόδοση της εκπομπής φθορισμού να βελτιωθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας, σε

χαμηλές θερμοκρασίες και με χρήση διαλυτών υψηλού ιξώδους (π. χ. γλυκερόλη) όπου ελαχιστοποιείται η αποδιέγερση διαμέσου συγκρούσεων.



Σχήμα 21. Σχηματικό ενεργειακό διάγραμμα που παριστάνει τις μεταβολές που συμβαίνουν στην απορρόφηση, στο φθορισμό και φωσφορισμό. Τα βέλη δείχνουν την ακτινοβολία φωτονίων, ενώ τα διακεκομμένα βέλη παριστάνουν την αποδιέγερση διαμέσου συγκρούσεων). (u = δονητικά επίπεδα, S_0 = απλή βασική κατάσταση, S_1 = απλή πρώτη διηγερμένη κατάσταση, T_1 = τριπλή πρώτη διηγερμένη κατάσταση).

Για τα περισσότερα μόρια οι ενεργειακές διαφορές των δονητικών καταστάσεων είναι παρόμοιες στη βασική και στις διηγερμένες καταστάσεις, έτσι το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι συνήθως κατοπτρικό είδωλο του φάσματος



απορρόφησης, με το φάσμα εκπομπής φθορισμού να μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Τα μόρια τα οποία βρίσκονται σε σχετικώς σταθερές διηγευμένες απλές καταστάσεις και τα οποία είναι ικανά να μεταβούν σε μια τριπλή κατάσταση εκπέμπουν φωσφορισμό (Σχήμα 21, δ). Η διαδικασία της μετάβασης από μια απλή κατάσταση (κανένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο) σε μια τριπλή κατάσταση (δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια) καλείται διασυστηματικό πέρασμα (ΔΠ, intersystem crossing) (Σχήμα 21). Ο μηχανισμός στο διασυστηματικό πέρασμα περιλαμβάνει δονητική σύζευξη μεταξύ της διηγευμένης απλής κατάστασης και της διηγευμένης τριπλής κατάστασης.

Αφού η διηγευμένη τριπλή κατάσταση είναι γενικά χαμηλότερης ενέργειας από τη διηγευμένη απλή κατάσταση, το μόριο μετά το διασυστηματικό πέρασμα θα έχει πάλι περίσσεια δονητικής ενέργειας και θα αποδιεγερθεί δονητικά στο μηδενικό δονητικό επίπεδο της τριπλής κατάστασης. Η χαμηλότερη δονητική κατάσταση έχει μεγάλο χρόνο ζωής (της τάξεως του 10⁻⁴ έως μερικά sec) και έτσι αν το μόριο ευρισκόμενο στη χαμηλότερη τριπλή κατάσταση θα εκπέμψει φωσφορισμό ή θα αποδιεγερθεί διαμέσου συγκρούσεων (Σχήμα 21, ε), εξαρτάται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ο φωσφορισμός δεν παρατηρείται σχεδόν ποτέ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αφού η μεγάλη διάρκεια ζωής της τριπλής κατάστασης αυξάνει συνήθως την απώλεια ενέργειας διαμέσου συγκρούσεων. Εάν όμως το μόριο ακινητοποιηθεί σε ένα άκαμπτο περιβάλλον (π. χ. γυαλί) όπου ελαχιστοποιούνται οι συγκρούσεις, τότε ο φωσφορισμός μπορεί να παρατηρηθεί.

Εμφάνιση φθορισμού

Το μόριο είναι δυνατόν να παραμείνει στο κατώτατο δονητικό επίπεδο της κατώτατης διηγευμένης απλής κατάστασης για ~10⁻⁸ sec. Τότε συμβαίνει εκπομπή φθορισμού στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή, κάτι που εξαρτάται από το χάσμα ενέργειας μεταξύ διηγευμένης και βασικής κατάστασης. Το φθορίζον μόριο φτάνει σε κάποιο από τα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Ακολουθώς έχουμε απώλεια ενέργειας υπό μορφή θερμότητας (θερμική επαναφορά)



σε χρόνο $\sim 10^{-12}$ sec, και το μόριο φτάνει τελικώς στο κατώτατο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης.

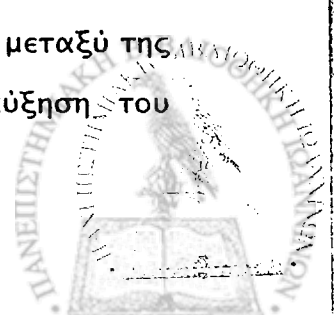
Επειδή οι πορείες δονητικής επαναφοράς στη διεγερμένη κατάσταση λαμβάνουν χώρα μετά την απορρόφηση του φωτός, αυτές δεν εμφανίζονται στο φάσμα απορρόφησης. Παρομοίως, επειδή οι πορείες δονητικής επαναφοράς στη βασική κατάσταση λαμβάνουν χώρα μετά την εκπομπή φωτός αυτές δεν εμφανίζονται στο φάσμα φθορισμού.

Συνεπώς, ο φθορισμός επέρχεται μόνο από τη μετάβαση από την κατώτατη διεγερμένη απλή κατάσταση στη βασική κατάσταση. Έτσι, το φάσμα φθορισμού απεικονίζει την δονητική δομή της βασικής κατάστασης. Πολύ συχνά, οι ζώνες μοριακού φθορισμού (ή φωσφορισμού) παρατηρούνται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από την απορρόφηση. Αυτή η μετατόπιση ονομάζεται μετατόπιση Stokes (Stokes shift) και αντιστοιχεί στη διαφορά των μηκών κύματος μεταξύ του μεγίστου μήκους κύματος διέγερσης (λ_{ex}) και εκπομπής (λ_{em}). Η σχέση αυτή ισχύει για τις περισσότερες φθορίζουσες ουσίες. Τα μόρια για τα οποία δεν ισχύει καλούνται αντι-Stokes μόρια.

Η παρουσία περισσότερων της μιας ζωνών φθορισμού στο φάσμα φθορισμού ενός μορίου είναι ενδεικτική ότι ο φθορισμός προέρχεται από περισσότερα του ενός χημικά στοιχεία ή από ακαθαρσίες.

Μοριακή δομή και φθορισμός

Η ικανότητα φθορισμού των περισσότερων οργανικών ενώσεων είναι πολύ μικρή. Αρχικά, η δομή του μορίου θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να απορροφά υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία. Γενικώς, όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση ενός μορίου τόσο πιο έντονη θα είναι η φωταύγειά του. Αυτό σημαίνει ότι αποκλείονται αλειφατικές και κορεσμένες κυκλικές οργανικές ενώσεις. Μόρια που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους, συζυγείς διπλούς δεσμούς, ειδικά, μόρια με υψηλή σταθερότητα μεσομέρειας είναι αυτά που θα φθορίσουν ή θα φωσφορίσουν. Το μεγάλο μέγεθος του αρωματικού τμήματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, επειδή η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της βασικής και των διεγερμένων καταστάσεων μικραίνει με την αύξηση του αρωματικού τμήματος του μορίου.



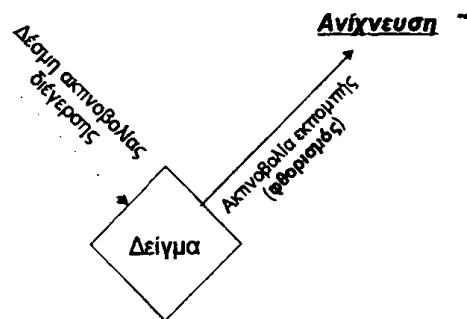
Οι υποκαταστάτες στους αρωματικούς δακτυλίους συχνά παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του φθορισμού. Αυτό συνήθως συσχετίζεται με την επίδρασή τους στο φάσμα απορρόφησης. Γενικώς:

- *Ομάδες δότες ηλεκτρονίων (-NH₂, -OH) συχνά αυξάνουν το φθορισμό επειδή τείνουν να αυξάνουν την πιθανότητα μετάβασης μεταξύ της χαμηλότερης διεγερμένης απλής κατάστασης και της βασικής κατάστασης.*
- *Ομάδες οι οποίες έχουν μικρή αλληλεπίδραση με το σύστημα των π ηλεκτρονίων (π. χ. -SO₃H, -NH₃⁺) και αλκυλομάδες δεν επιδρούν σημαντικά στο φθορισμό.*
- *Η παρουσία ατόμου με μεγάλο ατομικό αριθμό στο σύστημα των π ηλεκτρονίων συνήθως μειώνει το φθορισμό.*
- *Ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων (-COOH, -NO₂, -N=N-) μειώνουν ή ακόμα καταστρέφουν το φθορισμό.*

Οργανολογία

Η ακτινοβολία φθορισμού ενός δείγματος εκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις, έτσι η παρατήρησή της μπορεί γίνει από οποιαδήποτε γωνία. Συνήθως όμως παρατηρείται από γωνία 90° ως προς την κατεύθυνση της ακτινοβολίας διέγερσης, για την ελαχιστοποίηση της ανίχνευσης της δέσμης διέγερσης ή παράσιτης ακτινοβολίας.

Όργανα μέτρησης φθορισμού είναι τα φθορισμόμετρα φίλτρου (filter fluorimeters) και τα φασματοφθορισμόμετρα (spectrofluorimeters). Τα φθορισμόμετρα χρησιμοποιούν φίλτρα για την επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος διέγερσης ή εκπομπής, ενώ το φασματοφθορισμόμετρο χρησιμοποιεί έναν ή δύο συνήθως μονοχρωμάτορες για την απομόνωση του επιθυμητού μήκους κύματος. Ένα φασματοφθορισμόμετρο λοιπόν μπορεί να σαρώνει τα μήκη κύματος ενός φάσματος συνεχώς, ενώ στο φθορισμόμετρο η αλλαγή φίλτρου απαιτείται κάθε φορά για τη ρύθμιση συγκεκριμένου μήκους κύματος.



Φάσμα διέγερσης και φάσμα εκπομπής φθορισμού

Φάσμα διέγερσης φθορισμού ορίζεται η γραφική παράσταση της έντασης εκπομπής φθορισμού συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης. Πρακτικά, αυτό επιτυγχάνεται καταγράφοντας την ένταση φθορισμού μιας ουσίας μεταβάλλοντας το μήκος κύματος διέγερσης και διατηρώντας σταθερό το μήκος κύματος εκπομπής (επιλέγεται το μήκος κύματος εκπομπής στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη ένταση φθορισμού). Συνήθως το φάσμα διέγερσης μιας ουσίας, θεωρητικά τουλάχιστον, είναι όμοιο με το φάσμα απορρόφησης αυτής.

Φάσμα εκπομπής φθορισμού ορίζεται η γραφική παράσταση της έντασης εκπομπής φθορισμού συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής. Πρακτικά, αυτό επιτυγχάνεται καταγράφοντας την ένταση φθορισμού μιας ουσίας μεταβάλλοντας το μήκος κύματος εκπομπής και διατηρώντας σταθερό το μήκος κύματος διέγερσης (επιλέγεται το μήκος κύματος διέγερσης στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη ένταση φθορισμού). Το φάσμα εκπομπής, φυσικά, μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από ότι το φάσμα διέγερσης και είναι κατοπτρικό είδωλο περίπου του φάσματος διέγερσης.

Ποσοτικοποίηση φθορισμού

Η απορρόφηση ενός δείγματος εξαρτάται από τις ιδιότητες του δείγματος και είναι ανεξάρτητη από το όργανο με το οποίο έγινε η μέτρηση. Στη φθορισμομετρία, η τιμή της έντασης φθορισμού εξαρτάται όχι μόνο από το δείγμα, αλλά και από μια σειρά άλλων παραγόντων που έχουν να κάνουν με τη συσκευή μέτρησης, όπως η ένταση της πηγής διέγερσης, η οπτική ικανότητα, η αναλογία του φθορισμού που συλλέγεται από τον ανιχνευτή, η ευαισθησία του ανιχνευτή στο μήκος κύματος εκπομπής κ.α.

Έτσι, η φασματοσκοπία φθορισμού δεν εκφράζεται με μαθηματική σχέση ανάλογη με αυτή των Lambert-Beer που ισχύει στη φασματοσκοπία απορρόφησης. Θεωρητικά όμως, η εξάρτηση του φθορισμού από τη συγκέντρωση της χρωμοφόρου ουσίας μπορεί να εξαχθεί από το νόμο των Lambert-Beer. Σύμφωνα με αυτόν λοιπόν:

$$I_t = I_0 10^{-\epsilon c l}$$



Όπου I_t και I_0 είναι η ένταση της εκπεμπόμενης και της διερχόμενης ακτινοβολίας, ϵ είναι η μοριακή απορρόφηση, c η μοριακή συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας και l το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας διαμέσου του δείγματος.

Η ένταση της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε (I_a) είναι έτσι,

$$I_a = I_0 - I_t$$

$$I_a = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon c l})$$

Έτσι, η ακτινοβολία φθορισμού I_f θα είναι:

$$I_f = I_a \cdot Q_f$$

Όπου Q_f είναι τα κβάντα φωτός.

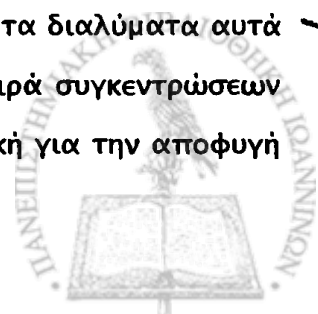
Και αν θεωρηθεί ότι $\epsilon c l < 0.05$

$$I_f = 2.303 \cdot I_0 \cdot Q_f \cdot \epsilon c l$$

Έτσι, μόνο σε πολύ αραιά διαλύματα ο φθορισμός είναι άμεσα ανάλογος με τη συγκέντρωση του δείγματος.

Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου (Inner filter effect)

Η γραφική απεικόνιση της έντασης φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας μπορεί να μην είναι γραμμική για διάφορους άλλους λόγους εκτός των μαθηματικών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο πιο σημαντικός μηχανισμός που επηρεάζει τη γραμμικότητα του φθορισμού και αυτός που είναι πιο εύκολο να διερευνηθεί, είναι το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου. Αυτό μπορεί να προέλθει είτε επειδή η ακτινοβολία διέγερσης μπορεί να απορροφηθεί ισχυρά από το διάλυμα που περιέχει τη φθορίζουσα ουσία ή πιο σπάνια η εκπεμπόμενη ακτινοβολία να απορροφηθεί ισχυρά. Σε διαλύματα φθορίζουσας ουσίας, παραδόξως, μερικές φορές παρατηρείται αύξηση της έντασης φθορισμού με τη μείωση της συγκέντρωσης της ουσίας. Αυτό συμβαίνει διότι ο ανιχνευτής «βλέπει» μέρος του διαλύματος της κυψελίδας, αφού η δέσμη της ακτινοβολίας διέγερσης δεν μπορεί να εισχωρήσει σε όλο το μήκος της κυψελίδας. Καθώς τα διαλύματα αυτά αραιώνονται ο φθορισμός αυξάνεται μέχρι που σε κάποια σειρά συγκεντρώσεων παρατηρείται γραμμικότητα του φθορισμού. Μια καλή πρακτική για την αποφυγή



του φαινομένου του εσωτερικού φίλτρου θα ήταν να ρυθμιστεί η απορρόφηση του δείγματος στο μήκος κύματος διέγερσης έτσι ώστε να μην ξεπερνάει το 0.05/cm για αναλυτικές μετρήσεις φθορισμού.

Δεν είναι όμως μόνο η φθορίζουσα ουσία η οποία μπορεί να απορροφήσει την ακτινοβολία διέγερσης και η αποφυγή του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου να επιτυγχάνεται διατηρώντας την ολική απορρόφηση του δείγματος χαμηλή. Σε περιπτώσεις όπου είναι αδύνατη η μείωση της απορρόφησης του δείγματος, το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου μπορεί να αποτραπεί μεταβάλλοντας τη γεωμετρία του πειράματος. Μπορεί λοιπόν η ανίχνευση φθορισμού να γίνει από την επιφάνεια του διαλύματος, αφού η δέσμη διέγερσης δεν χρειάζεται να εισχωρήσει πολύ βαθιά γία να καταγραφεί σήμα φθορισμού.

Τέλος, μερικά φασματοφθορισμόμετρα διαθέτουν ένα εξάρτημα για να καταγράφουν σήματα φθορισμού από υλικά τα οποία απορροφούν ισχυρώς. Σε αυτά τα εξαρτήματα, η κατοπτρική ανάκλαση του φωτός πρέπει να αποκλειστεί από τον ανιχνευτή, συνήθως με φίλτρα αποκλεισμού, ή μπορεί η ανίχνευση να γίνει σε γωνία όπου αποκλείεται η κατοπτρική ανάκλαση (θέτοντας π. χ. την επιφάνεια του διαλύματος σε γωνία 60° ως προς τη δέσμη διέγερσης).

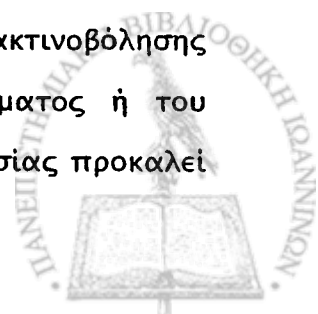
Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό

Διαλύτης

Ο φθορισμός ενός μορίου μειώνεται από διαλύτες που περιέχουν βαρέα άτομα ή από διαλύτες που περιέχουν τέτοια άτομα στη δομή τους. Μόρια που περιέχουν βαρέα άτομα ενσωματώνονται συνήθως στο διαλύτη για την αύξηση του φωσφορισμού και τη μείωση του φθορισμού, διότι οι αλληλεπιδράσεις των spin αυξάνουν το ρυθμό μετάβασης σε τριπλή κατάσταση. Η μείωση του ιξώδους του διαλύτη αυξάνει επίσης την πιθανότητα αποδιέγερσης μέσω συγκρούσεων.

Θερμοκρασία

Στην ποσοτική ανάλυση με φθορισμομετρία, η θερμοκρασία συνήθως προκαλεί προβλήματα. Στα περισσότερα φθορισμόμετρα η πηγή ακτινοβολίας είναι υψηλής έντασης με αποτέλεσμα τη θέρμανση του δείγματος ή του διαμερίσματος όπου τοποθετείται το δείγμα. Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί



συνήθως μείωση της έντασης φθορισμού. Αυτό συμβαίνει διότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την τυχαία κίνηση των μορίων, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα αποδιέγερσης των διεγερμένων μορίων διαμέσου των συγκρούσεων. Η ικανότητα φθορισμού μερικών ουσιών μεταβάλλεται κατά 5% περίπου για κάθε βαθμό Κελσίου.

pH Διαλυμάτων

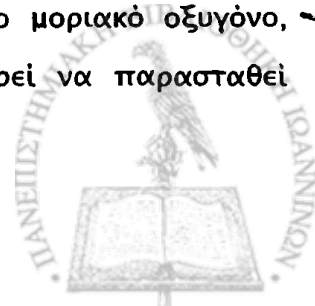
Το pH του διαλύματος συχνά επηρεάζει το φθορισμό των ουσιών. Αυτό είναι δυνατό να συμβεί διότι οι μεσομερείς μορφές της φθορίζουσας ουσίας μπορεί να αλλάξουν με τη μεταβολή του pH του διαλύματος. Για παράδειγμα, η ανιλίνη σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον φθορίζει στην ορατή περιοχή, ο φθορισμός αυτός όμως χάνεται όταν το διάλυμα οξινοσθεί.

Προσθήκη μικρών ποσοτήτων οξέος σε φθορίζοντα διαλύματα μπορεί να προκαλέσει μετατόπιση του φάσματος φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ, οξίνιση διαλύματος ουσίας μπορεί να εμφανίσει φθορισμό που δεν υπήρχε πριν.

Σβέση φθορισμού (quenching)

Η παρουσία ξένων μορίων στο διάλυμα όπου περιέχεται η φθορίζουσα ουσία μπορεί να απορροφά την ακτινοβολία διέγερσης ή την ακτινοβολία φθορισμού, προκαλώντας έτσι μείωση της παρατηρούμενης έντασης φθορισμού. Η σβέση φθορισμού συνήθως περιλαμβάνει τη μεταφορά ενέργειας από το διεγερμένο μόριο στο ξένο μόριο ως αποτέλεσμα των συγκρούσεων. Η ξένη ουσία μπορεί επίσης να αντιδρά με τα μόρια της φθορίζουσας ουσίας στη βασική ή στη διηγεμένη τους κατάσταση, και να προκαλεί έτσι σβέση φθορισμού. Η παρουσία ξένων μορίων που προκαλούν σβέση φθορισμού, αποτελεί πολλές φορές τη βάση μεθόδων προσδιορισμού αυτών των μορίων.

Η σβέση της έντασης του φθορισμού μπορεί να οφείλεται στην απενεργοποίηση των διεγερμένων μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα μη διεγερμένα μόρια, με άλλα διεγερμένα μόρια ή κατά την αλληλεπίδραση των διεγερμένων μορίων με άλλα μόρια στο διάλυμα, όπως το μοριακό οξυγόνο, αλογόνα, ιόντα μετάλλων μετάπτωσης κ.α. Η σβέση μπορεί να παρασταθεί σχηματικά (Πίνακας 10).



Ο μηχανισμός σβέσης του φθορισμού από το οξυγόνο είναι μάλλον περίπλοκος. Σε μερικές περιπτώσεις, το οξυγόνο οξειδώνει την οργανική φθορίζουσα ουσία. Συνήθως προκαλεί σβέση των διεγερμένων απλών και τριπλών καταστάσεων, προάγοντας το διασυστηματικό πέρασμα διαμέσου συγκρούσεων με τα διεγερμένα μόρια και παράγοντας μεταβατικό σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου. Η βασική κατάσταση του μορίου του οξυγόνου είναι τριπλή (έχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια) και αυτή η παραμαγνητική φύση του προφανώς αυξάνει τη σύζευξη spin-τροχιακού με τα ηλεκτρονικώς διεγερμένα μόρια.

Ωστόσο, το αποτέλεσμα είναι ότι το οξυγόνο καταλύει την χωρίς ακτινοβολία αποδιέγερση ενός φθορίζοντος μορίου και μετάβασή του στη βασική κατάσταση.

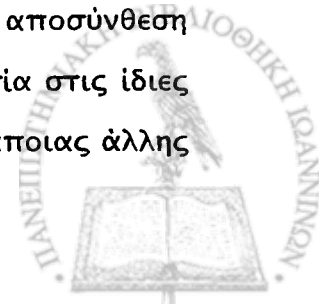
Πίνακας 10. Διαδικασίες φθορισμού. (Όπου F η φθορίζουσα ουσία και Q η ουσία που δύναται να προκαλέσει σβέση φθορισμού).

Απορρόφηση	$F + h\nu \rightarrow F^*$
Εσωτερική μετατροπή	$F^* \rightsquigarrow F$
Διασυστηματικό πέρασμα	$F^* \rightsquigarrow F$
Σβέση	$F^* + Q \rightarrow F + Q^*$ ή
	$F^* + Q \rightleftharpoons FQ^* \rightsquigarrow FQ$
Φθορισμός	$F^* \rightarrow F + h\nu$

Φωτοαποσύνθεση

Η φωτοαποσύνθεση είναι η εναλλακτική τύχη των διεγερμένων μορίων και η διαδικασία η οποία ανταγωνίζεται την εκπομπή φθορισμού. Η φωτοαποσύνθεση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την αύξηση της έντασης φθορισμού ενός δείγματος.

Μείωση στην ένταση φθορισμού μιας φθορίζουσας ουσίας θα μπορούσε να παρατηρηθεί με την αποσύνθεση αυτής σε προϊόντα που δεν φθορίζουν. Αντιθέτως, αύξηση της έντασης φθορισμού θα μπορούσε να παρατηρηθεί με την αποσύνθεση αυτής σε προϊόντα που φθορίζουν περισσότερο από την αρχική ουσία στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Μια άλλη πιθανότητα είναι η αποσύνθεση κάποιας άλλης



παρούσας ουσίας σε προϊόντα που φθορίζουν ή η καταστροφή ή δημιουργία μορίων που προκαλούν σβέση φθορισμού.

Πολλές οργανικές ουσίες αποσυντίθενται με την έκθεσή τους σε υπεριώδες φως, επειδή η ενέργεια του φωτονίου είναι συγκρίσιμη με την ενέργεια διάσπασης δεσμού. Μεγάλα και συζυγή μόρια, όπως οι χρωστικές ουσίες, είναι ευπαθείς στη φωτοαποσύνθεση. Γνωστό είναι το πρόβλημα με το ξεθώριασμα αυτών όταν εκτίθενται σε ορατή ακτινοβολία.

Η φωτοαποσύνθεση μπορεί να επιβεβαιωθεί πειραματικά παρατηρώντας τη μεταβολή (αύξηση ή μείωση) του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου και καταγράφοντας το φάσμα απορρόφησης πριν και μετά την ακτινοβόληση του δείγματος. Μια άλλη περίπτωση είναι τα προϊόντα αποσύνθεσης να είναι έγχρωμα οπότε η ύπαρξή τους μπορεί να είναι ορατή. Σε αυτή την περίπτωση το φάσμα φθορισμού θα ήταν διαφορετικό.

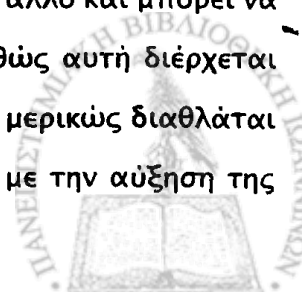
Η πιθανότητα φωτοαποσύνθεσης θα μπορούσε να ελαχιστοποιηθεί μειώνοντας τη διάρκεια έκθεσης του δείγματος στην ακτινοβολία. Εξάλλου, γι' αυτόν το λόγο, τα φθορισμόμετρα διαθέτουν ειδικό κάλυμμα ή/και διακόπτη για την απομόνωση του δείγματος από ακτινοβολία. Η χρήση ακτινοβολίας διέγερσης με το μεγαλύτερο δυνατό μήκος κύματος και με τη χαμηλότερη δυνατή ένταση, θα μπορούσε επίσης να βοηθήσει.

Αποτελεσματική σε μερικές περιπτώσεις θα ήταν επίσης, η απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου, επειδή με την υπεριώδη ακτινοβολία αυτό προκαλεί συχνά αυξημένη οξειδωση πολλών οργανικών μορίων.

Ανάκλαση - διάθλαση ακτινοβολίας (Reflection, Refraction)

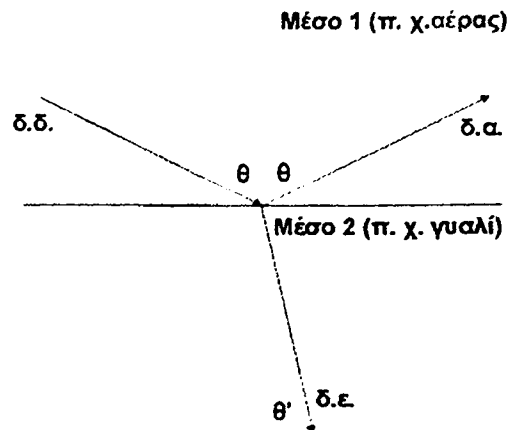
Όταν ακτινοβολία προσπίπτει σε μια επιφάνεια κατά μήκος μεταξύ δύο διαφορετικών υλικών συμβαίνει ανάκλαση (ή αντανάκλαση). Η ποιότητα της επιφάνειας σχετίζεται πολύ με τη φύση του φαινομένου. Όταν η επιφάνεια είναι λεία, η γωνία της διερχόμενης δέσμης φωτός είναι ίση με τη γωνία αντανάκλασης.

Ως *διάθλαση* ορίζεται η εκτροπή της ακτινοβολίας σε διαφορετικές γωνίες από την προσπίπτουσα καθώς μεταβαίνει από ένα υλικό σε ένα άλλο και μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική ταχύτητα αυτής στα δύο μέσα. Καθώς αυτή διέρχεται από ένα διηλεκτρικό υλικό σε ένα άλλο, ανακλάται μερικώς και μερικώς διαθλάται (ή εκπέμπεται) (Σχήμα 23). Η ανακλώμενη ενέργεια αυξάνεται με την αύξηση της



ταχύτητας στα δύο μέσα και είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη η μεταβολή στην πυκνότητα των δύο μέσων.

Σχήμα 23. Διάθλαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. (δ.δ. = δέσμη διέγερσης, δ.α. = δέσμη ανάκλασης, δ.ε. = δέσμη εκπομπής, θ' = γωνία ανάκλασης).



Στη φθορισμομετρία, ανάκλαση ή / και διάθλαση της ακτινοβολίας διέγερσης μπορεί να παρατηρηθεί όταν στο χώρο όπου τοποθετείται η κυψελίδα και κατά μήκος της δέσμης διέγερσης υπάρχει επιφάνεια που ανακλά ή / και διαθλά το φως (π. χ. κάτοπτρο, μεταλλική επιφάνεια κ. α.).

Επειδή, συνήθως, η προσπίπτουσα δέσμη είναι κάθετη με την εξωτερική επιφάνεια της κυψελίδας, και όταν μεταλλική επιφάνεια βρίσκεται στο τέλος της διαδρομής της δέσμης, η ανακλώμενη ακτινοβολία επιστρέφει στην ίδια διεύθυνση, διεγείροντας έτσι το δείγμα σχεδόν «διπλά». Στην περίπτωση αυτή, αυξάνεται η απορρόφηση της ουσίας και κατά συνέπεια και ο παρατηρούμενος φθορισμός.

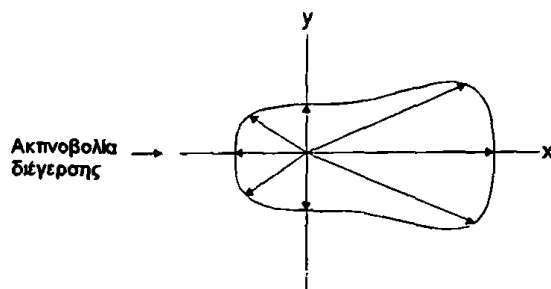
Σκέδαση φωτός (Light scattering)

Στο συνήθη τύπο σκέδασης, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στη διαδρομή της αλληλεπιδρά με πολύ μικρά σωματίδια, προκαλώντας ταλαντώσεις στο ηλεκτρικό φορτίο της ύλης (Σχήμα 25). Τα δίπολα που δημιουργούνται εκπέμπουν δευτερογενή κύματα προς όλες τις κατευθύνσεις. Στη διαδικασία αυτή, ενέργεια απόμακρύνεται από τη δέσμη της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπέμπεται χωρίς μεταβολή του μήκους κύματος.

Παρότι αυτός ο τύπος δευτερογενούς ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία της ανάκλασης ή της διάθλασης, το αναγκαίο κριτήριο για τον όρο σκέδαση είναι οι διαστάσεις των σωματιδίων να είναι του ίδιου ή μικρότερου



μεγέθους με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης και τα σωματίδια να είναι διάσπαρτα σε ένα μέσο με δείκτη διάθλασης διαφορετικό από τον δικό τους. Για μεγαλύτερα σωματίδια ($>2\lambda$) παρατηρείται ότι συμβαίνει μόνο ανάκλαση ή διάθλαση.



Σχήμα 25. Σκέδαση φωτός σε σωματίδιο μεγάλων διαστάσεων.

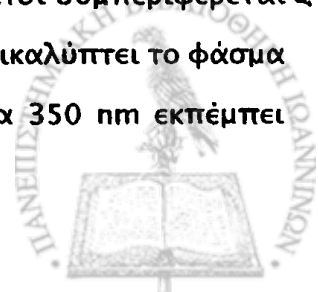
Η σκέδαση του φωτός μετρείται πειραματικά και σε φθορισμόμετρο. Αυτό γίνεται καταγράφοντας το σήμα εκπομπής στο ίδιο μήκος κύματος με το μήκος κύματος διέγερσης.

Σκέδαση Rayleigh και Raman

Εκτός από τη σκέδαση του φωτός που προκαλείται από μικρά σωματίδια, υπάρχουν άλλοι δύο τύποι σκέδασης. Αυτοί είναι η σκέδαση Rayleigh και Raman. Η σκέδαση Rayleigh παρατηρείται στο ίδιο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής και είναι πολύ πιο έντονη από τη σκέδαση Raman. Το σκεδαζόμενο αυτό φως δε φτάνει άμεσα στον ανιχνευτή αν ο μονοχρωμάτορας εκπομπής ρυθμιστεί σε διαφορετικό μήκος κύματος από το μήκος κύματος διέγερσης.

Η σκέδαση Rayleigh, αν ενισχυθεί από την παρουσία σωματιδίων στο διάλυμα, προσθέτει στην ένταση της εκτρεπόμενης ακτινοβολίας του οργάνου έτσι ώστε αν είναι πολύ ισχυρή μπορεί να επικαλύψει κατά ένα μέρος το φάσμα φθορισμού.

Η σκέδαση Raman αναφέρεται στο διαλύτη και παρότι πιο αδύνατη από τη σκέδαση Rayleigh, συμβαίνει σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και έτσι συμπεριφέρεται περίπου σαν εκπομπή φθορισμού μιας ακαθαρσίας, η οποία επικαλύπτει το φάσμα φθορισμού. Για παράδειγμα, όταν το νερό ακτινοβολείται στα 350 nm εκπέμπει

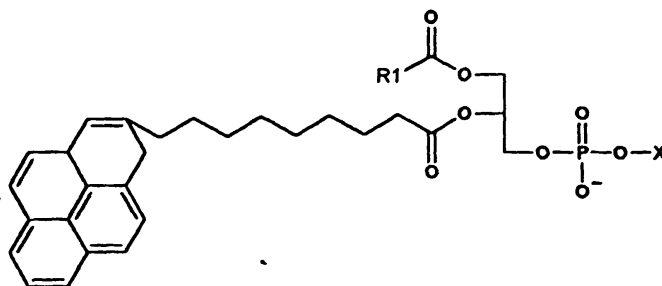


σήμα στα 395 nm. Είναι λοιπόν πιο δύσκολο να διακρίνει κανείς την εκπομπή φθορισμού μιας ουσίας από την εκπομπή Raman του διαλύτη όταν συμπίπτουν τα φάσματα εκπομπής αυτών. Η παρεμπόδιση από τη σκέδαση Raman μπορεί να ξεπεραστεί με την αλλαγή του διαλύτη, αλλαγή του μήκους κύματος διέγερσης ή αύξηση του πλάτους της σχισμής από την οποία διέρχεται η ακτινοβολία.

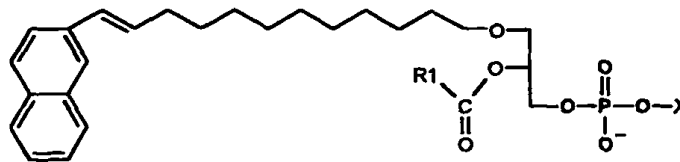
Εκτός των παραπάνω, οι φυσαλίδες αέρα σε διάλυμα συμπεριφέρονται παρόμοια και είναι ικανές να δημιουργήσουν πρόβλημα καθώς μετακινούνται μέσα και έξω από τη διαδρομή του φωτός.

Φθορίζοντα υποστρώματα της φωσφολιπάσης A₂

Διάφορα φθορίζοντα υποστρώματα έχουν αναπτυχθεί τα οποία περιέχουν ως φθορίζουσα ομάδα πυρένιο στο λιπαρό οξύ της sn-2 θέσης (Σχήμα 27) [495]. Πολλά από αυτά τα υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση ενεργότητας PLase A₁ και PLase A₂. Το κρίσιμο θέμα στις μεθόδους αυτές είναι η σβέση (quenching) του φθορισμού του υποστρώματος και η πρόληψη της σβέσης του φθορισμού των προϊόντων της υδρόλυσης λόγω της δημιουργίας μονομερών. Εκτός αυτών, πολλές φορές απαιτείται η σύνθεση των προϊόντων αυτών (υποστρωμάτων) διότι δεν είναι όλα διαθέσιμα στο εμπόριο. Πολλά από τα ελεύθερα φθορίζοντα λιπαρά οξέα επίσης δεν βρίσκονται διαθέσιμα στο εμπόριο.

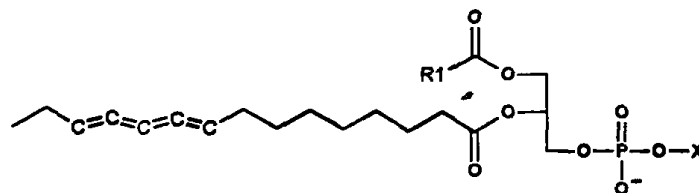


Σχήμα 27. Συνθετικό φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το πυρένιο.



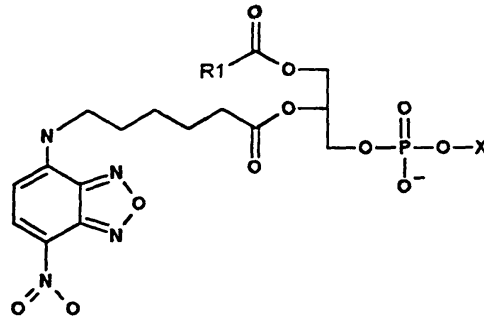
Σχήμα 28. Συνθετικό φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το βινυλο-ναφθαλένιο στη θέση 1 του μορίου.

Τρεις ακόμη φθορισμομετρικές μέθοδοι έχουν αναφερθεί οι οποίες δεν βασίζονται στην ομάδα του πυρένιου. Μία από αυτές χρησιμοποιεί ως φθορίζουσα ομάδα το βινυλο-ναφθαλένιο (Σχήμα 28) [496], είναι πολύ ευαίσθητη, ο αιθερικός δεσμός στη θέση 1 κάνει το υπόστρωμα ανθεκτικό στην υδρόλυση από PLase A₁ και λυσο-φωσφολιπάση, αλλά η μέθοδος είναι ασυνεχής και απαιτεί διαχωρισμό των προϊόντων από το υπόστρωμα με HPLC ή TLC.



Σχήμα 29. Φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το παριναρικό οξύ.

Η δεύτερη, έχει ένα υπόστρωμα το οποίο παρασκευάζεται από το παριναρικό οξύ και λυσο-φωσφολιπίδιο (Σχήμα 29) [497]. Η μέθοδος είναι συνεχής παρουσία αλβουμίνης και αρκετά ευαίσθητη (300 pMol/min). Μειονεκτεί όμως διότι το υπόστρωμα είναι πολύ ευαίσθητο στη φωτοαποσύνθεση και στην οξείδωση από τον αέρα.



Σχήμα 30. C₆-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη.

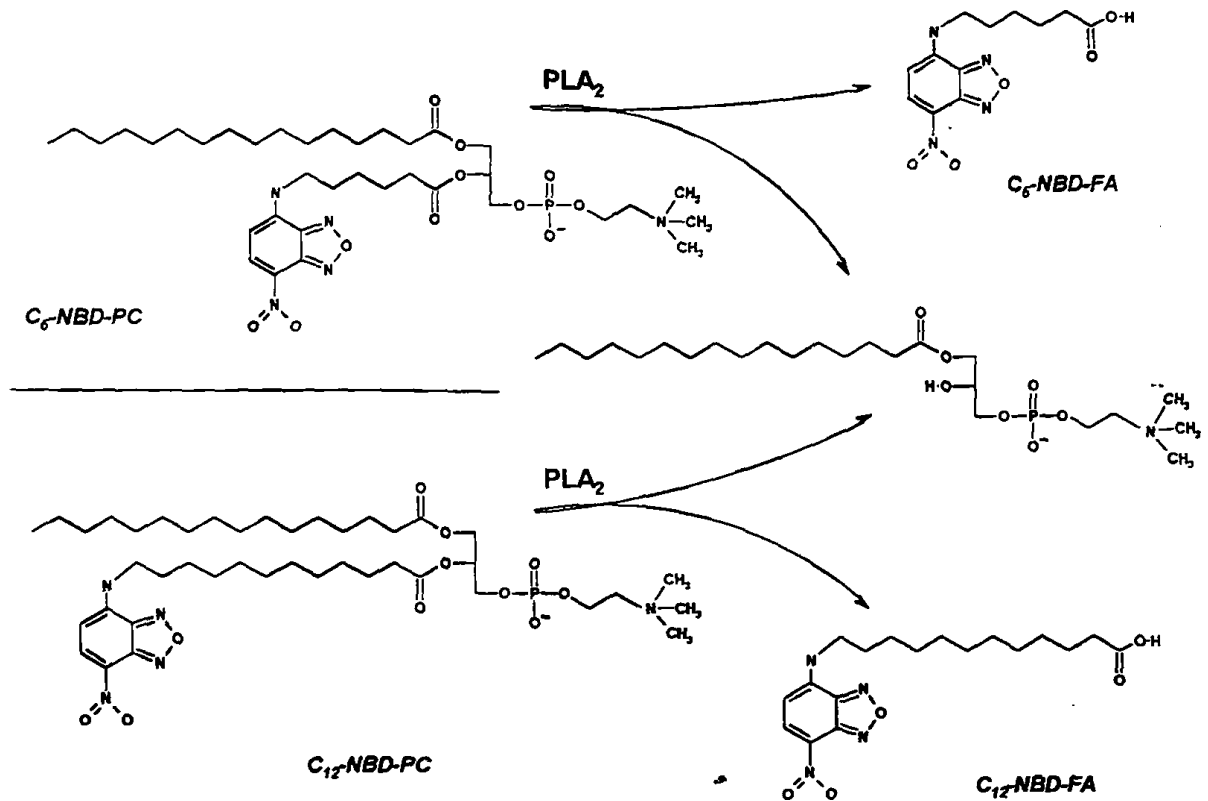
Η τρίτη φθορισμομετρική μέθοδος στηρίζεται στη χρήση υποστρώματος διαθέσιμου από το εμπόριο, με φθορίζουσα ομάδα στη θέση *sn*-2 την NBD (7-νιτροβενζο-2-οξα-1,3-διαζολ-4-υλ) (Σχήμα 30).

NBD-λιπίδια

Η Wittenauer et al. ανέπτυξε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό της καθαρής μορφής του ενζύμου της παγκρεατικής PLase A₂ από χοίρο και της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης από αποβουτυρωμένο γάλα, χρησιμοποιώντας C₆-NBD-PC ως υπόστρωμα [498]. Η ερευνητές έδειξαν ότι η αύξηση του φθορισμού ενός υδατικού διαλύματος φθορίζοντος φωσφολιπιδίου (C₆-NBD-PC) μετά την προσθήκη φωσφολιπάσης A₂ οφείλεται στην υδρολυτική δράση του ενζύμου αυτού. Κατά την υδρόλυση του φθορίζοντος φωσφολιπιδίου C₆-NBD-PC από PLase A₂, παράγονται ως προϊόντα λυσο-φωσφολιπίδιο και NBD-εξανοϊκό οξύ (Σχήμα 31). Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι το μονομερές NBD-εξανοϊκό οξύ, όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα, φθορίζει 50 φορές περισσότερο από το υπόστρωμα, και με κατασκευή προτύπων καμπυλών με διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου, έγινε εφικτός ο υπολογισμός της ενζυμικής ενεργότητας. Στην ίδια εργασία ελέγχθηκε το φάσμα εκπομπής του υποστρώματος και του μίγματος αντίδρασης. Η προσθήκη PLase A₂ στο υδατικό διάλυμα του φθορίζοντος φωσφολιπιδίου προκάλεσε αύξηση του φθορισμού χωρίς καμία μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής, ενώ η αύξηση του φθορισμού ήταν αυστηρώς εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του ενζύμου.



Επίσης, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση του φθορισμού σε συγκεντρώσεις λιπιδίου μεγαλύτερες του 0.1 μΜ, δηλαδή σε συγκεντρώσεις υψηλότερες της κρίσιμης μικυλιακής συγκέντρωσης, που αναφέρεται ότι είναι 0.2 μΜ.



Σχήμα 31. Αντίδραση υδρόλυσης της C₆- ή C₁₂-NBD-PC από PLase A₂.

Για να αποδειχθεί και πειραματικά η σχέση αύξησης φθορισμού και ενζυμικής κατάλυσης, τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με TLC και μετρήθηκαν ποσοτικά. Η ποσότητα του C₆-NBD-PC στην υδατική φάση μειώθηκε με ανάλογη αύξηση του φθορισμού στα προϊόντα της αντίδρασης.

Ο Moreau μελέτησε μερικές ιδιότητες των φθορίζοντων λιπιδίων C₆-NBD-PC και C₆-NBD-FA ως υποστρώματα για τις καθαρισμένες PLase A₂, PLase C, PLase D καθώς και για τις λιπάσες [499]. Κατασκεύασε πρότυπες καμπύλες C₆-NBD-FA και μελέτησε την επίδραση του pH και των απορρυπαντικών στο φθορισμό της C₆-NBD-PC. Οι Blanchard et al. χρησιμοποίησαν C₁₂-NBD-φωσφατιδυλαιθανολαμίνη για τη διερεύνηση των χαρακτηριστικών της καθαρισμένης ανθρώπινης PLase A₂ από

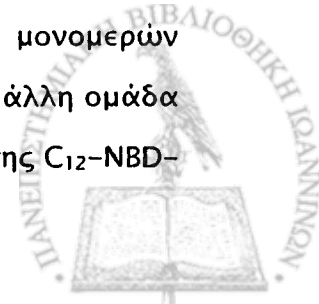
αρθρικό υγρό [500] με συνεχή παρακολούθηση της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης.

Η ιδιότητα της PAF-AcH να υδρολύει την C₆-NBD-PC βρέθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης των ενζυμικών ενεργοτήτων που μεσολαβούν στην υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της LDL [501].

Ωστόσο, μια ομάδα ερευνητών [502] απέτυχε να χρησιμοποιήσει την C₆-NBD-PC για τον προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας PLase A₂ με συνεχή παρακολούθηση του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης, σε συστήματα που περιέχουν λιπίδια (LDL κ.α.). Υποστηρίζουν ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια ένδειξη ότι στο δείγμα υπάρχει ενεργότητα PLase A₂ αλλά αμφισβητούν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Εξηγούν ότι οι περιορισμοί στη χρήση του υποστρώματος αυτού οφείλονται στο γεγονός ότι ο ρυθμός υδρόλυσης εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση του ενζύμου αλλά και από την φυσικοχημική κατάσταση των συσσωματωμάτων της φθορίζουσας φωσφατιδυλοχολίνης. Ο φθορισμός είναι υψηλός όταν η μοριακή αναλογία C₆-NBD-PC/λιπίδια είναι χαμηλή λόγω ελάττωσης της σβέσης φθορισμού, με αποτέλεσμα την αύξηση του βασικού φθορισμού του υποστρώματος σε υψηλές συγκεντρώσεις άλλων μη φθορίζόντων λιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, η απελευθέρωση των προϊόντων της υδρόλυσης από το συσσωμάτωμα στο υδατικό μέσο έχει δύο αντιφατικές επιδράσεις στο φθορισμό. Η παρουσία χαμηλότερων συγκεντρώσεων των φθορίζόντων υδατοδιαλυτών μονομερών να μειώνει τη συνολική ένταση φθορισμού και την ίδια στιγμή να αυξάνεται ο φθορισμός των συσσωματωμάτων λόγω της μείωσης της σβέσης του φθορισμού.

Μέτρηση ενεργοτήτων PLase A₂ και 1-αλκυλο-γλυκερο-φωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράσης σε ενεργοποιημένα κυψελιδικά μακροφάγα βοός, εφαρμόστηκε από ομάδα ερευνητών με χρήση sn-1-NBD-αιθερικών λιπιδίων και ανάλυση με HPLC [480].

Σε πειράματα σβέσης φθορισμού, η C₁₂-NBD-PC χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κινητικής της μεταφοράς των λιπιδίων μεταξύ των φωσφολιπιδικών κυστιδίων [503] και βρέθηκε ότι η ανταλλαγή γίνεται διαμέσου των μονομερών λιπιδίων και όχι με μεσολάβηση σύγκρουσης. Διαφορετική άποψη έχει άλλη ομάδα ερευνητών [504], οι οποίοι με ανάλογα πειράματα σβέσης φθορισμού της C₁₂-NBD-



PC, υποστήριξαν πρόσφατα ότι η ανταλλαγή λαμβάνει χώρα με συγκρούσεις μεταξύ των μικυλλίων, μηχανισμός μεταφοράς ο οποίος δεν περιλαμβάνει διάλυση ενός μορίου φωσφολιπιδίου από το μικύλλιο στην υδατική φάση. Αναφέρουν επίσης ότι, ο ρυθμός ανταλλαγής των φωσφολιπιδίων ήταν πολύ πιο γρήγορος από ότι το καθοριστικό στάδιο αντίδρασης των PLases A₂. Επίσης, με σβέση φθορισμού της C₁₂-NBD-PC μελετάται η αλληλοσυμπλοκή των λιπαρών αλυσίδων στα κυστιδία φωσφατιδυλοχολίνης [505].

Τα NBD φθορίζοντα λιπίδια χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ευρέως ως εργαλεία για τη μελέτη του μεταβολισμού των λιπιδίων σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες. Μπορεί να μελετηθεί η διαμεμβρανική κίνηση, μεταφορά, κατανομή, καθώς και η κυτταρική τους διαμερισματοποίηση [506, 507, 508]. NBD-παράγωγα διαφόρων λιπιδίων, μεταξύ των οποίων C₆-και C₁₂-NBD-PC διαχωρίζονται με HPLC κανονικής και ανάστροφης φάσης [509].

Πειράματα σβέσης φθορισμού χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του προσανατολισμού και εντοπισμού πρωτεϊνών που έχουν εισχωρήσει στις μεμβράνες, καθώς και για την εύρεση της σχέσης μεταξύ της χημικής δομής των φορτισμένων ή υδρόφοβων μορίων που είναι δεσμευμένα με τις μεμβράνες και του βάθους στο οποίο εντοπίζονται [510]. Οι NBD φθορίζουσα ομάδα χρησιμοποιείται επιπλέον στη σήμανση πεπτιδίων για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτών με λιποσώματα [511].

Μέθοδος φασματοσκοπίας φθορισμού με χρήση NBD-φωσφολιπιδίων εφαρμόζεται κατά την οποία καταγράφεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού της φθορίζουσας ομάδας που είναι ενσωματωμένη σε λιποσώματα, για τη διερεύνηση των μεταβολών της μοριακής δομής ή διαμόρφωσης που πραγματοποιείται μετά τη δέσμευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL) με τα φωσφολιπιδικά αντιγόνα [512].



5) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός ανοσοσφαιρινών, που ανιχνεύονται στο πλάσμα ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE) ή άλλες ανοσολογικές διαταραχές, καθώς και σε ανθρώπους χωρίς κανένα άλλο στοιχείο υποκείμενης νόσου. Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται διότι αντιδρούν με φωσφολιπίδια και κυρίως με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως καρδιολιπίνη (CL), φωσφατιδυλοσερίνη (PS), φωσφατιδικό οξύ (PA) κ. α. Σημαντικό ποσοστό των ανθρώπων που έχουν αυτά τα αντισώματα στο αίμα τους υποφέρουν από αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση, θρομβοκυτοπενία και επάναλαμβανόμενες αποβολές.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η μελέτη των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL) άρχισε όταν ανακαλύφθηκε μια εξέταση για τη σύφιλη στον ορρό του αίματος το 1906 [513]. Το 1941, βρέθηκε ότι το αντιγονικό συστατικό της εξέτασης ήταν ένα αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο, η καρδιολιπίνη [514]. Αργότερα παρατηρήθηκε ότι ένας αριθμός ασθενών είχε θετικό τεστ σύφιλης χωρίς να υπάρχει κανένα άλλο στοιχείο της νόσου. Αυτό το φαινόμενο αναφέρθηκε ως *βιολογικά ψευδώς θετικό τεστ ορρού για σύφιλη* και οφείλονταν στην παρουσία αντισωμάτων που δεσμεύουν φωσφολιπίδια, στον ορρό των ασθενών. Στους ασθενείς αυτούς παρουσιάστηκαν πολλές αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (SLE) και το σύνδρομο Sjögren.

Η παρουσία αντιθρομβωτικών στην κυκλοφορία των ασθενών με SLE αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1952 [515], παρόλα αυτά όμως αργότερα συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης [516]. Ο όρος «αντιθρομβωτικό του λύκου» (Lupus anticoagulant ή LA) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 [517], αλλά συναντάται πιο συχνά σε ασθενείς χωρίς SLE. Παρότι το αντιθρομβωτικό του λύκου καθυστερεί τις αντιδράσεις θρόμβωσης *in vitro*, κλινικά προκαλεί ασθένειες θρόμβωσης. Οι ασθενείς όμως με SLE δεν έχουν τάση να αιμορραγούν εκτός εάν έχουν κάποια δεύτερη ανωμαλία [518].



Η ανακάλυψη μιας ραδιοανοσοχημικής μεθόδου το 1983 [519] και λίγο αργότερα της ELISA, για την ανίχνευση και μέτρηση των αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης (aCL) [520], είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδιαφέροντος για τα aPL και των κλινικών τους συσχετίσεων.

Ακολούθως, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (Antiphospholipid antibody syndrome, APLAS), σύνδρομο που σχετίζεται με αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, περιγράφηκε κλινικά (βλ. σελ. 130) [521, 522].

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Από τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, η CL είναι το αντιγόνο που χρησιμοποιείται πιο συχνά στη δοκιμή ELISA για ανίχνευση aPL. Σε μελέτες όπου έγινε σύγκριση της απόκρισης των aPL σε άλλα φωσφολιπίδια εκτός της καρδιολιπίνης, παρατηρήθηκε ότι η PS, το φωσφατιδικό οξύ (PA) και σε μικρότερο βαθμό η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση aPL [523, 524].

Η PS θεωρείται πιο φυσιολογικά σχετική από την CL για τη χρήση της ως αντιγόνο στην ανίχνευση aPL, διότι εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων [525], ενώ η CL βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια των μεμβρανών. Επιπλέον, η PS συμμετέχει στη σειρά των γεγονότων θρόμβωσης [526] και παίζει ρόλο στη δημιουργία του θρόμβου. Συσχετίζεται καλύτερα με την παρουσία των LA από ότι με τα aCL [527, 528] και αναφέρεται ότι αναγνωρίζει τα καθαρισμένα από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G aCL αντισώματα ασθενών με APLAS, αλλά όχι τις καθαρισμένες από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G IgG ασθενών με σύφιλη. Αντιθέτως, η CL αναγνωρίστηκε από τα καθαρισμένα από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G αντισώματα ασθενών που είχαν και τις δύο νόσους [529].

Σε αντίθεση με αυτά τα δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τη χρήση PS ως αντιγόνου για την ανίχνευση aPL αντί της CL, άλλες μελέτες δεν έδειξαν κανένα επιπλέον πλεονέκτημα στη χρήση PS μόνη της ή μαζί με CL [557, 530, 531].

Έχει βρεθεί ότι η δέσμευση των aPL με τα φωσφολιπίδια οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ότι η διαμόρφωση των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων παίζει επίσης ρόλο [512].



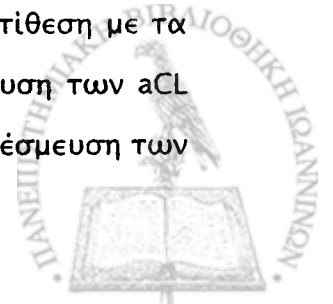
aPL κατά β_2 -γλυκοπρωτεΐνης I

Το 1990, αναφέρθηκε ότι τα aCL που ανιχνεύονται με ELISA δεν κατευθύνονται μόνο κατά της καρδιολιπίνης [532, 533, 534], αλλά και κατά πρωτεϊνών του πλάσματος καθώς και συμπλεγμάτων των φωσφολιπιδίων με πρωτεΐνες (535, 536). Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν όταν οι καθαρισμένες IgG ανοσοσφαιρίνες από ασθενείς θετικούς σε aCL δεσμεύθηκαν με λιποσώματα που περιείχαν CL ή PS όταν ένας πρωτεϊνικός συμπαράγοντας του πλάσματος ήταν παρών. Αυτός ο πρωτεϊνικός παράγοντας έδωσε επίσης θετική αντίδραση δέσμησης με τα aCL αντισώματα του πλάσματος ακόμα και απουσία λιπιδίων. Αυτή η πρωτεΐνη ήταν η β_2 -γλυκοπρωτεΐνη I (β_2 -GPI) [537]. Έτσι, πρότειναν ότι αυτά τα αντισώματα δεσμεύονται με επιτόπους οι οποίοι διαμοιράζονται μεταξύ της καρδιολιπίνης και της β_2 -GPI. Άλλοι ερευνητές [512] διαφωνούν με το ότι η β_2 -GPI είναι αντιγόνο από μόνη της [532], αφού τα aCL αντισώματα δεσμεύονται με τα φωσφολιπίδια ακόμα και απουσία αυτής [523].

Η β_2 -γλυκοπρωτεΐνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του ορού και του πλάσματος (200 μ g β_2 -γλυκοπρωτεΐνης /ml) με μοριακή μάζα 50 kDa. Ωστόσο, ο φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι καλά κατανοητός. Η β_2 -GPI δεσμεύεται *in vitro* με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και άλλα ανιοντικά μόρια όπως το DNA και η ηπαρίνη και εμφανίζει αντιθρομβωτικές ιδιότητες [538, 518, 539]. Ωστόσο, από *in vivo* πειράματα, φαίνεται ότι η κληρονομική έλλειψη στη β_2 -GPI δεν σχετίζεται με θρόμβωση ή άλλο κλινικό χαρακτηριστικό [540].

Η ανοσοποίηση υγείων ποντικών και κουνελιών με β_2 -γλυκοπρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα να παραχθούν αντισώματα κατά της β_2 -GPI και κατά της καρδιολιπίνης, ενώ η καρδιολιπίνη από μόνη της δεν ήταν ανοσογόνος [541]. Επίσης, παρατηρήθηκε επαγωγή της παραγωγής αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων ύστερα από ανοσοποίηση με β_2 -γλυκοπρωτεΐνη I δεσμευμένη με αποπτωτικά κύτταρα του θύμου αδένος [542].

Η απαίτηση για β_2 -GPI διαφοροποιεί τα aCL ασθενών με APLAS από τα aCL που σχετίζονται με σύφιλη και άλλες φλεγμονώδεις ασθένειες. Σε αντίθεση με τα αυτοάνοσα aCL, η παρουσία της β_2 -GPI δεν απαιτείται για τη δέσμηση των aCL από ορό ασθενών με σύφιλη, ενώ η προσθήκη β_2 -GPI αναστέλλει τη δέσμηση των aCL ασθενών με σύφιλη με την καρδιολιπίνη [534].



Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα aCL που σχετίζονται με μολυσματικές ασθένειες δεσμεύονται άμεσα με την καρδιολιπίνη και χαρακτηρίζονται ως β₂-GPI-ανεξάρτητα, ενώ αυτά που σχετίζονται με το APLAS, απαιτούν την παρουσία της β₂-GPI για να δεσμευτούν με την καρδιολιπίνη και άλλα ανιοντικά φωσφολιπίδια και χαρακτηρίζονται ως β₂-GPI-εξαρτώμενα [534]. Ωστόσο, β₂-GPI-ανεξάρτητα aCL έχουν ανιχνευθεί στον ορρό ενός αριθμού ασθενών με αυτοάνοσες διαταραχές [543] καθώς και β₂-GPI-εξαρτώμενα aCL έχουν περιγραφεί για μερικούς ασθενείς με λοιμώδεις ασθένειες [544].

Υποστηρίζεται ότι, η ανίχνευση των αντισωμάτων κατά της β₂-GPI με ELISA εξαρτάται από τον τύπο της πλάκας στην οποία ακινητοποιείται η β₂-GPI. Μια εξήγηση είναι ότι τα αντισώματα μπορεί να είναι ειδικά για διαμορφωτικούς επίτοπους οι οποίοι εκφράζονται όταν η β₂-GPI δεσμεύεται σε ορισμένες αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες όπως το κατεργασμένο πολυστυρένιο. Καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται με τη χρήση πλακών πολυστυρενίου «μέγιστης δέσμησης» (πλούσιο σε οξειδωμένες ομάδες λόγω της κατεργασίας του με γ-ακτινοβολία), ενώ μικρή δέσμηση παρατηρείται σε ακατέργαστο πολυστυρένιο «μεσαίας δέσμησης» [545]. Μια δεύτερη υπόθεση είναι ότι τα περισσότερα αντι β₂-GPI αντισώματα αναγνωρίζουν επίτοπους στη φυσική β₂-GPI αλλά με σχετικά χαμηλή συγγένεια [546]. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζουν τα δεδομένα όπως: α) τα αντισώματα δεσμεύουν τη β₂-GPI σε Western blot ανάλυση απουσία φωσφολιπιδίων ή οξειδωμένου πολυστυρενίου [547], β) τα αντισώματα αυτά καθαρίζονται με στήλη συγγένειας β₂-GPI ομοιοπολικά δεσμευμένη με αγαρόζη [546], γ) η δέσμηση των αντισωμάτων με τη β₂-GPI με ELISA μπορεί να ανασταλλεί από τη β₂-GPI υγρής φάσης [546].

Συσχέτιση aCL με ασθένειες / Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS)

Τα aPL συσχετίζονται και αναγνωρίζονται ως ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου σε ποικιλία διαταραχών θρόμβωσης περιλαμβάνοντας φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμική προσβολή και εγκεφαλικό επεισόδιο [518]. Η θρομβοκυτοπενία (χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων) συσχετίζεται



επίσης με τα aPL. Τα aPL πιθανώς μεσολαβούν στην καταστροφή των αιμοπεταλίων [548]. Επίσης, στις γυναίκες παρατηρούνται επαναλαμβανόμενες αποβολές.

Παρότι τα aPL περιγράφηκαν για πρώτη φορά στον SLE, δεν περιορίζονται μόνο στους ασθενείς με λύκο, αλλά συναντώνται συχνά σε ανθρώπους χωρίς καμία κλασική αυτοάνοση ασθένεια. Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ανιχνεύονται στον ορό όχι μόνο ασθενών αλλά και φυσιολογικών ανθρώπων σε χαμηλότερα όμως επίπεδα από αυτά των ασθενών [523]. Αυτά κυκλοφορούν στο αίμα ως ανοσοσύμπλοκα των οποίων το αντιγόνο μπορεί να απομακρυνθεί με θέρμανση, οξίνιση, χρήση πυκνών ρυθμιστικών διαλυμάτων ή κατεργασία με φωσφολιπάσες [549]. Δεν είναι β_2 -GPI-εξαρτώμενα και συναγωνίζονται με την β_2 -GPI για δέσμευση με τα φωσφολιπίδια.

Το APLAS λοιπόν, είναι η πιο συχνή αιτία επίκτητης θρομβοφιλίας. Ασθενείς με τέτοιες διαταραχές έχουν LA ή/και aCL στο αίμα τους και προδιάθεση για φλεβική, αρτηριακή θρόμβωση και θρομβοκυτοπενία ενώ οι γυναίκες που συλλαμβάνουν έχουν επαναλαμβανόμενες αποβολές [521]. Αγγεία όλων των μεγεθών μπορούν να προσβληθούν. Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο περιγράφηκε ως μια κλινική ολότητα και τα κριτήρια διάγνωσης του συνδρόμου αυτού (Πίνακας 11) καθορίστηκαν ως: ύπαρξη LA ή/και aCL και ενός ακόμη κλινικού χαρακτηριστικού από τα παραπάνω (πρωτεύον APLAS) [521, 550].

Το APLAS μπορεί να παρατηρηθεί ως κύρια διαταραχή ή να εμφανισθεί μαζί με άλλες συστηματικές ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος ή το σύνδρομο Sjogren [551]. Ο όρος πρωτεύον APLAS χρησιμοποιείται για να διακρίνονται οι ασθενείς χωρίς SLE, ενώ ο όρος δευτερεύον APLAS χρησιμοποιείται όταν το APLAS αποτελεί επιπλοκή του λύκου [550]. Ωστόσο, υπάρχουν λίγες διαφορές παρουσία ή απουσία λύκου, σε ότι αφορά τις επιπλοκές λόγω των aPL ή στην εξειδίκευση των αντισωμάτων. Θετικά aPL ανιχνεύονται στο 30-40 % των ασθενών με λύκο, όμως το ένα τρίτο αυτών των ασθενών αναπτύσσουν κλινικά χαρακτηριστικά του APLAS [552]. Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι καθαρισμένες aPS IgG μπορούν να προκαλέσουν APLAS [561]. Υψηλά επίπεδα aCL σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα αρτηριακής θρόμβωσης και πνευμονικής εμβολής [553].



Πίνακας 11. Κριτήρια για τη διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου (APLAS) [554].

Κλινικά	Εργαστηριακά
Φλεβική θρόμβωση	IgG aCL (μεσαίος/υψηλός τίτλος)
Αρτηριακή θρόμβωση	IgM aCL (μεσαίος/υψηλός τίτλος)
Επαναλαμβανόμενες αποβολές	Θετικό LA
Θρομβοκυτοπενία	

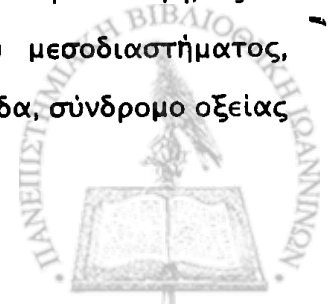
Ο μηχανισμός επαγωγής αυτών των αντισωμάτων και η φύση της σχέσης των aPL με τη θρόμβωση είναι άγνωστη. Ένα κύριο χαρακτηριστικό των aPL είναι ότι επηρεάζουν τις αντιδράσεις θρόμβωσης που καταλύονται από φωσφολιπίδια. Η αντίδραση που καλείται αντιθρομβωτική αντίδραση του λύκου (Lupus anticoagulant) οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα αντισώματα αναστέλλουν τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη [555]. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από φωσφολιπίδια ενώ μια αύξηση των φωσφολιπιδίων στα συστήματα αυτά αναστέλλει την αντίδραση.

Οι επαναλαμβανόμενες αποβολές είναι μια από τις πιο συχνές επιπλοκές του APLAS [528] και μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο της κύησης, παρόλο που η σχετιζόμενη με τα aPL αποβολή είναι πιο συχνή το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο [556].

Άλλα αντισώματα κατά των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων που μελετώνται για την εκτίμηση του APLAS, περιλαμβάνουν αντισώματα κατά της φωσφατιδυλοσερίνης (aPS) [557, 558, 559]. Αυτά τα αντισώματα θεωρήθηκαν υποσχόμενοι δείκτες και προτάθηκαν ως εναλλακτικά ή επιπλέον των aCL αντισώματα [560, 561].

Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και πνεύμονες

Πνευμονικές επιπλοκές του συστηματικού ερυθματώδη λύκου συμβαίνουν στο 50-70 % των ασθενών και περιλαμβάνουν πλευρίτιδα, πλευριτική συλλογή, οξεία πνευμονίτιδα του λύκου, διάχυτη νόσος του πνευμονικού μεσοδιαστήματος, ατελεκτασία, δυσλειτουργία του διαφράγματος και βρογχιολίτιδα, σύνδρομο οξείας αντιστρεπτής υποξαιμίας [562].



Από την ανακάλυψη των aPL ή aCL ή LA αντισωμάτων και των κλινικών επιπλοκών που σχετίζονται με την παρουσία τους, έχει φανεί ότι και άλλες πνευμονικές επιπλοκές μπορεί να σχετίζονται ειδικά με την παρουσία των aPL στους ασθενείς με λύκο καθώς και σε αυτούς με πρωτεύον αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS) [562]. Αυτές περιλαμβάνουν πνευμονική εμβολή και έμφραξη, θρομβοεμβολική και πιθανώς μη θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση, πνευμονική αρτηριακή θρόμβωση, πνευμονική μικροθρόμβωση, ενδοκυψελιδική πνευμονική αιμορραγία, κυψελιδική ίνωση, σύνδρομο μετά τον τοκετό και σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) [563, 564, 565].

Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και ARDS

Το ARDS έχει συνδεθεί με τον SLE τα τελευταία χρόνια, παρότι η πνευμονική αιμορραγία είναι μια επιπλοκή του SLE που παρατηρείται μερικές φορές. Βρέθηκε ότι η θνητότητα του 15 % των ασθενών με SLE σχετίζονταν άμεσα με το ARDS, αλλά στη μελέτη αυτή δεν είχαν ανιχνευθεί aPL [566].

Ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με APLAS αναπτύσει «καταστροφικό» αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο το οποίο εκφράζεται με πολυοργανική ανεπάρκεια. Η κύρια αιτία θανάτου φαίνεται να είναι καρδιακά προβλήματα, παρότι υπάρχει αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω διάχυτης κυψελιδικής αιμορραγίας [567].

Το ARDS έχει αναφερθεί ως κλινικό χαρακτηριστικό του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου [568]. Λίγες περιπτώσεις όμως με ARDS και APLAS έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα [562, 564, 565], στις οποίες το APLAS καθορίζεται από την ύπαρξη αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης. Στις περιπτώσεις αυτές αναφέρονται μικρές θρομβώσεις των στεφανιαίων αγγείων και των αγγείων των επινεφριδίων με χαρακτηριστικά υάλινης μεμβράνης, εκτεταμένη αιμορραγία του πνευμονικού μεσοδιαστήματος, καρδιακό θρόμβο, νεφρική δυσλειτουργία, αναπνευστική ανεπάρκεια, δύσπνοια και κυάνωση, θρομβοκυτοπενία καθώς και ύπαρξη αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων.



Σχέση των aCL με την εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ (sPLase A₂)

Έχει δειχθεί ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι ικανά να αναστέλλουν την εκκρινόμενη PLase A₂ [569]. Είναι λοιπόν πιθανό τα aPL να παρεμβαίνουν με τις διαδικασίες εσωτερικής και διακυτταρικής σηματοδότησης οι οποίες βασίζονται στην ενεργοποίηση της PLase A₂ και την επικείμενη παραγωγή προσταγλανδινών.

Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι τα aPL δεσμεύονται με την sPLase A₂ και ότι τα aPL με την sPLase A₂ συναγωνίζονται για το ίδιο υπόστρωμα, την καρδιολιπίνη [570]. Επίσης, ορρός πλούσιος σε aPL αναστέλλει την παραγωγή εικοσανοειδών σε καλλιέργειες κυττάρων. Έτσι, στο APLAS, η *in vivo* αλληλεπίδραση των aPL και με τη sPLase A₂ μπορεί να εξασθενίζει την επικοινωνία των κυττάρων.

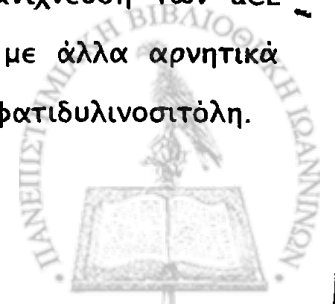
Χειρισμός των ασθενών με APLAS

Ο χειρισμός των ασθενών με APLAS βασίζεται κυρίως στην αντιθρομβωτική θεραπεία [521] και στη μετάγγιση αίματος. Τα στεροειδή και ανοσοκατασταλτικά για τη μείωση της ενεργότητας των αντισωμάτων δεν είναι αποτελεσματικά. Η μακροχρόνια αντιθρομβωτική θεραπεία μπορεί να χρειάζεται στις ασθενείς που έχουν θρόμβωση για την πρόληψη αποβολών [522].

Το γεγονός ότι τα aPL (LA ή/και aCL) συσχετίζονται με υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης και αποβολών οδηγεί στην ανάγκη να συνεχιστεί η έρευνα στο θέμα αυτό και να αναγνωριστούν αυτά τα αντισώματα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ APL

Η πιο διαδεδομένη, ευαίσθητη, ποσοτική και απλή μέθοδος προσδιορισμού aCL είναι η ELISA, η οποία μπορεί να προσδιορίσει τις υποκατηγορίες των IgG, IgM, και IgA ανοσοσφαιρινών. Σύμφωνα με αυτή, τα αντισώματα δεσμεύονται με την καρδιολιπίνη ή άλλα φωσφολιπίδια τα οποία είναι προσροφημένα στο στερεό υλικό της πλάκας (βλ. Γλικά και Μέθοδοι, σελ. 182). Η ανίχνευση των aCL αντισωμάτων μπορεί επίσης να γίνει με δέσμευση αυτών με άλλα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη ή φωσφατιδυλινοσιτόλη.



Η ποσοτικοποίηση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο εργαστήριο εκφράζεται με μονάδες (Units). Η μία μονάδα αντιστοιχεί στην ενεργότητα δέσμευσης 1 µg/ml καθαρισμένων aCL αντισωμάτων από στήλη συγγένειας. Τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται με χαμηλή, μεσαία και υψηλή θετική απόκριση όταν τα επίπεδα αυτών είναι χαμηλότερα των 20, μεταξύ 20-80 και υψηλότερα των 80 μονάδων αντίστοιχα.

• Άλλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία ιοντανταλλαγής και η χρωματογραφία στήλης συγγένειας χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και απομόνωση των IgG, IgM, ή IgA ανοσοσφαιρινών.

Ωστόσο, από κάποιους ερευνητές υποστηρίζεται ότι περισσότερες της μιας μέθόδου θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των LA αντισωμάτων που ανιχνεύονται σε διάφορους ασθενείς με APLAS [571].

Χρωματογραφία συγγένειας πρωτεΐνης G-σεφαρόζης

Πρωτεΐνη G του στρεπτόκοκκου

Πολλά στελέχη σταφυλόκοκκων και στρεπτόκοκκων εκφράζουν στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύονται με τις σταθερές περιοχές (Fc) των ανοσοσφαιρινών (Ig) των θηλαστικών [572, 573]. Ο βιολογικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών δεν είναι γνωστός. Τέτοια πρωτεΐνη απομονώθηκε και καθαρίστηκε για πρώτη φορά το 1966 από τα στελέχη του σταφυλόκοκκου *aureus* (πρωτεΐνη A) [572] και στη συνέχεια από στρεπτόκοκκους των ομάδων C και G (πρωτεΐνη G) [574].

Η πρωτεΐνη A του σταφυλόκοκκου *aureus* είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο και χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες ανοσοχημικές και ανοσολογικές τεχνικές. Δεσμεύει τις IgA, IgG, IgE και IgM κυνός ενώ η πρωτεΐνη G αντιδράει με τις IgA, IgG και λιγότερο με τις IgM [575]. Ωστόσο, η χρησιμότητα της πρωτεΐνης A περιορίζεται στο γεγονός ότι μερικά είδη και υποκατηγορίες ανοσοσφαιρινών G δεν αντιδρούν με το μόριο. Έτσι, η πρωτεΐνη A αναφέρεται ότι δε δεσμεύεται με τις ανθρώπινες IgG₃, με τις IgG αρουραίου και αιγός, ενώ δεσμεύεται ασθενώς με τις IgG₁ ποντικού. Βάσει των διαφορετικών χαρακτηριστικών των δύο πρωτεϊνών A και G είναι δυνατό να διαχωριστούν μερικές υποκατηγορίες IgG ίππου [576].



Επόμενα πειράματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη G δεσμεύεται πιο γενικά και με μεγαλύτερη συγγένεια με όλες τις κατηγορίες των IgG όλων σχεδόν των θηλαστικών, ακόμα και με τις ανοσοσφαιρίνες εκείνες που δε δεσμεύονται με την πρωτεΐνη A [577, 578]. Η πρωτεΐνη G δεσμεύει και τις 4 κατηγορίες ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών (IgG₁, IgG₂, IgG₃, και IgG₄). Διαλυτοποιείται από τα βακτηριακά κύτταρα με επίδραση παπαΐνης στο ομογενοποίημα αυτών, μετά καθαρίζεται από στήλη χρωματογραφίας ανιοντανταλλαγής, στήλη συγγένειας σεφαρόζης-IgG και τέλος από στήλη μοριακής διήθησης. Το μόριο της δεν περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς και η αλληλουχία των αμινοξέων δεν μοιάζει με αυτή της πρωτεΐνης A [577]. Η πρωτεΐνη που λαμβάνεται μετά την πέψη με παπαΐνη έχει μοριακή μάζα 65 kDa, ενώ η καθαρισμένη πρωτεΐνη αποτελείται από δύο υπομονάδες, των 34 και 36 kDa [578]. Η δομή και ο μηχανισμός της πρωτεΐνης G μελετήθηκε επίσης [579].

Η πρωτεΐνη G δεσμεύει την αλβουμίνη

Αργότερα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη G των ομάδων C και G στρεπτόκοκκων, εκτός από τις ανοσοσφαιρίνες, δεσμεύονταν και με την αλβουμίνη ορού διαφόρων ειδών, μεταξύ αυτών και της ανθρώπινης. Παρατηρήθηκε όμως ότι, με ήπια όξινη υδρόλυση του μορίου των 65 kDa, η πρωτεΐνη έχανε την ικανότητα αναγνώρισης της αλβουμίνης, αλλά διατηρούσε όλες τις ιδιότητες δέσμευσης με τις IgG [580].

Η πρωτεΐνη G που διαλυτοποιήθηκε από 31 στελέχη των στρεπτόκοκκων C και G μελετήθηκε και βρέθηκαν τρία είδη αυτής αναφορικά με τη μοριακή μάζα και τις ιδιότητες δέσμευσης. Αυτά προέρχονταν από τα στελέχη των G148, G43 και C40 στρεπτόκοκκων με μοριακή μάζα 65, 40 και 58 kDa αντίστοιχα. Για να μελετηθούν σε μοριακή βάση οι ιδιότητες δέσμευσης των τριών ειδών της πρωτεΐνης G, κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια και εκφράστηκαν σε *Escherichia coli*. Πειράματα δέσμευσης με ¹²⁵I-IgG και ¹²⁵I-HSA, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες G των G148, και C40 στελεχών δεσμεύονται με τις IgG και με την ανθρώπινη αλβουμίνη, ενώ του G43 στελεχούς αναγνώριζε μόνο τις IgG και όχι την ανθρώπινη αλβουμίνη [581].



Εικόνα 9. Περιοχή της πρωτεΐνης G που δεσμεύει την αλβουμίνη [582].



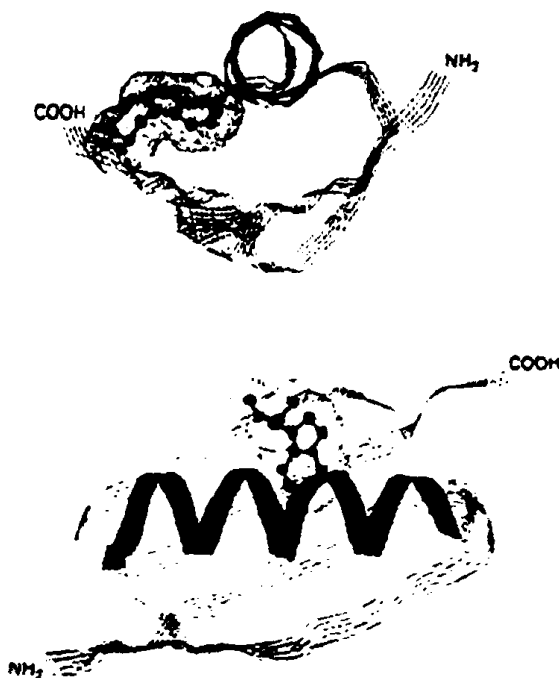
Η περιοχή του μορίου της πρωτεΐνης G που δεσμεύονται με την αλβουμίνη (Εικόνα 9) ήταν διαφορετική από αυτή που αναγνώριζε τις IgG. Το αμινο-τελικό άκρο της υπομονάδας των 35 kDa που αποτελείται από 56 αμινοξέα (35 kDa) ήταν υπεύθυνο για την δέσμευση με την αλβουμίνη, ενώ το καρβοξυ-τελικό άκρο του μισού μορίου ευθύνονταν για την αντίδραση με το Fc τμήμα των IgG [578].

Η αλληλουχία των αμινοξέων που αναγνωρίζει την αλβουμίνη βρίσκεται σε τρία αντίγραφα στο μόριο των 65 kDa της πρωτεΐνης G. Στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης G έχει επίσης βρεθεί μια διαφορετική περιοχή δέσμευσης με το Fab τμήμα των IgG [583].

Επιπλέον, ότι αφορά στην ανθρώπινη αλβουμίνη, αυτή διαθέτει μόνο μία περιοχή δέσμευσης με την πρωτεΐνη G και εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου της αλβουμίνης [584].

Έτσι, κατέστη δυνατό να εντοπιστούν οι 3 διαφορετικές περιοχές στην πρωτεΐνη G που αναγνωρίζουν την αλβουμίνη (SpG-alb), τις Fab (SpG-Fab) και Fc περιοχές των ανοσοσφαιρινών (SpG-Fc). Ακολούθως, με πειράματα γενετικής μηχανικής παράχθηκε ένα πλασμίδιο από το οποίο, οι αλληλουχίες που κωδικοποιούσαν τις περιοχές δέσμευσης με την αλβουμίνη καθώς και με το Fab τμήμα των IgG, είχαν απαλοιφθεί [585, 586].

Το ανασυνδυασμένο πρωτεϊνικό μόριο (α SpG-Fc, Εικόνα 10), (~35 kDa) δεν απώλεσε καμία από τις ιδιότητες δέσμευσης με την Fc περιοχή των IgG, ενώ δεν εμφάνιζε καμία αντίδραση με την αλβουμίνη. Η δέσμευση της α SpG-Fc με τις IgG δεν επηρεάστηκε ακόμα και παρουσία περισσειας ανθρώπινης αλβουμίνης [587].



Εικόνα 10. Ορθογώνιες όψεις της α SPG-Fc. Φαίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του μορίου και το αμινοξύ θρυπτοφάνη-48 στο κέντρο.

Συγκριτικά πειράματα δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικά είδη πρωτεΐνης G διαφόρων εταιριών όπως, φυσική πρωτεΐνη G (52 kDa, Calbiochem και 18 kDa, Sigma), και α SpG-Fc (35 kDa, Genex και Perstorp και 28 kDa, Pharmacia) [587]. Τα 5 είδη των πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν με SDS-PAGE και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου και επώαστηκαν με 125 I-HSA. Βρέθηκε ότι μόνο η φυσική πρωτεΐνη G (52 kDa, Calbiochem) δεσμεύτηκε με την ανθρώπινη αλβουμίνη ενώ οι άλλες όχι. Επίσης, αναφέρεται ότι οι ανθρώπινες IgG δεσμεύονται ισχυρότερα με τις α SpG-Fc σε σύγκριση με τη φυσική πρωτεΐνη [587].

Ομάδα ερευνητών, προσπαθώντας να μελετήσουν τον τρόπο σύνδεσης της πρωτεΐνης A με την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών, παρατήρησαν την σβέση φθορισμού ενός διαλύματος που περιείχε το τμήμα Fc των IgG κουνελιού κατά την

προσθήκη τμήματος της πρωτεΐνης A. Αφού η πρωτεΐνη A δεν περιέχει στα αμινοξέα της θρυπτοφάνη, η σβέση φθορισμού αποδόθηκε στη θρυπτοφάνη του Fc μορίου [588].

Για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης G η οποία περιέχει θρυπτοφάνη στο μόριό της, και του Fc τμήματος της IgG, χρησιμοποιήθηκε η αSPG-Fc η οποία δεσμεύονταν μόνο με την IgG. Με τα πειράματα αυτά, παρατηρήθηκε αλλαγή στη διαμόρφωση μετά τη δημιουργία του συμπλόκου αSPG-Fc [589].

Η χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνης G (που είναι πιο σωστό να αποκαλείται πρωτεΐνης αSPG-Fc), θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος διάχωρισμού των IgG από βιολογικά υγρά. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία καθώς και σε ερευνητικά εργαστήρια για τον καθαρισμό και απομόνωση όλων των υποκατηγοριών των ανοσοσφαιρινών G.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διαδικασία λήψης του BAL

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

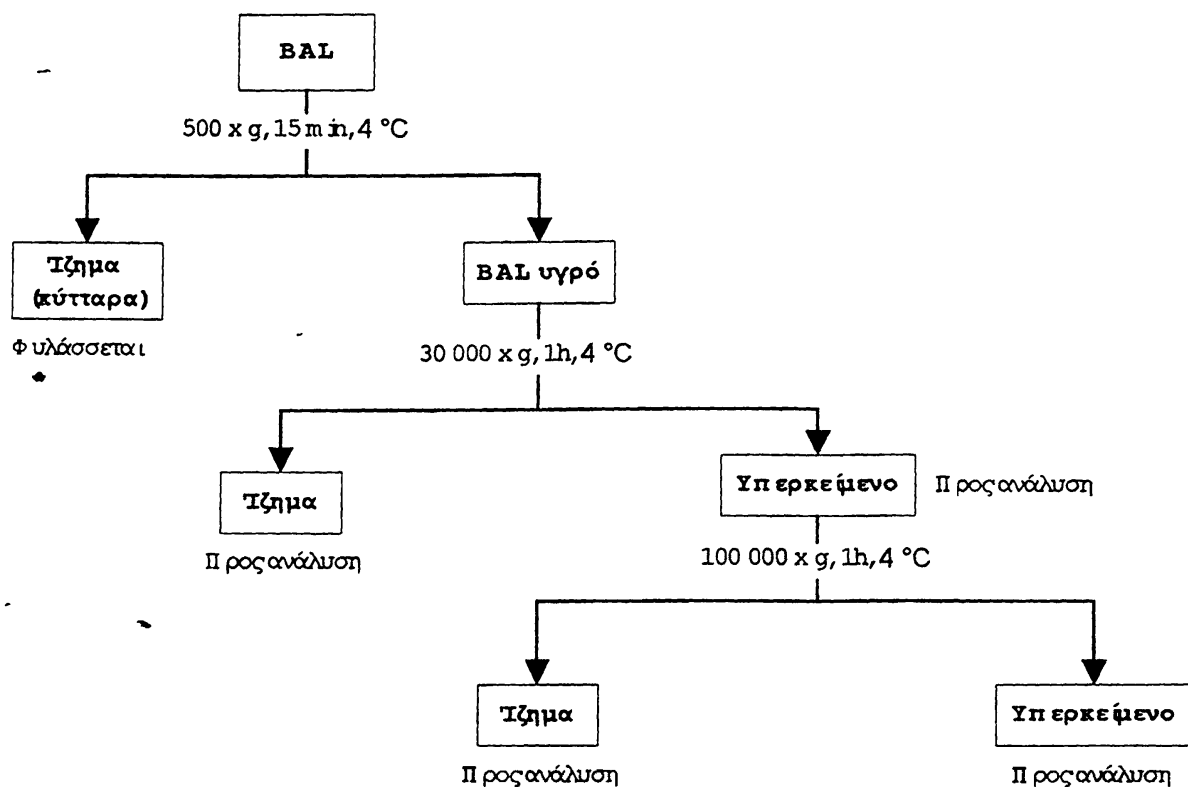
Κατεργασία του BAL

Το BAL στη συνέχεια διηθήθηκε από αποστειρωμένη γάζα για να απομακρυνθεί η βλέννα και φυγοκεντρήθηκε στα 500 x g για 15 min, στους 4 °C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sorvall RC-5B, Dupont, Canada) για να καθιζάνουν τα κύτταρα.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ BAL

Μετά τη φυγοκέντρηση του BAL στα 500 x g και την απομάκρυνση των κυττάρων, συνεχίζεται η φυγοκέντρηση στα 30000x g, στους 4°C, για 60 min (Sorvall RC-5B, Dupont, Canada) (Σχήμα 32). Το ίζημα των 30000x g ελαιωρείται σε μικρό όγκο φυσιολογικού ορού (1 ml περίπου) και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να γίνουν οι αναλύσεις ολικού λιπιδικού φωσφόρου και ολικών πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο των 30000 x g υποβάλλεται σε υπερφυγοκέντρηση στα 100000 x g, στους 4°C, για 1 ώρα (Beckman L5-65B με κεφαλή SW41). Το ίζημα κατεργάζεται όπως παραπάνω και το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται επίσης στους -20 °C.





Σχήμα 32. Διάγραμμα ροής: στάδια των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ BAL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

LOWRY

(για 40–200 μg πρωτεΐνης)

Αρχή της μεθόδου

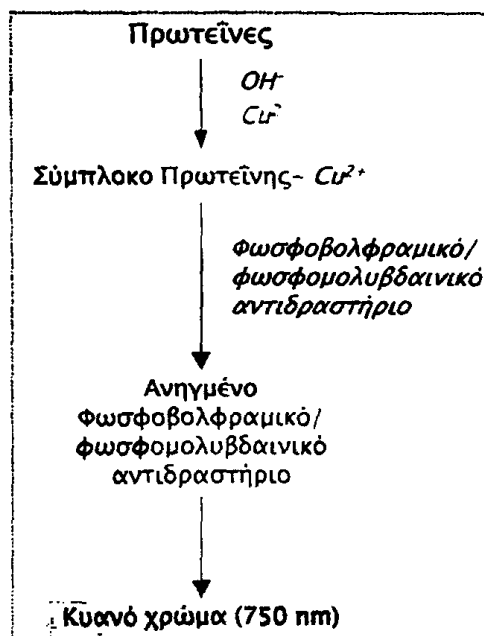
Οι πρωτεΐνες αρχικά δεσμεύονται με τα ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Folin & phenol (φωσφο-μολυβδαινικό-φωσφο-βολφραμικό αντιδραστήριο) το οποίο ανάγεται από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών- Cu^{2+} με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανού χρώματος που απορροφά στα 750 nm [590] (Σχήμα 33).

Αντιδραστήρια

- ❖ NaOH (M.B.: 40, Merck)
- ❖ Na_2CO_3 (M.B.: 105.99, Fluca)



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



Σχήμα 33. Διάγραμμα προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

Διαλύματα

Διάλυμα 1 N NaOH

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

Διάλυμα 0.5 N NaOH

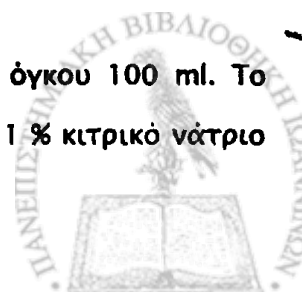
2 g NaOH διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 2 % Na_2CO_3

20 g Na_2CO_3 διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 1 lt. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 1 % κιτρικού νατρίου

1.139 g κιτρικού νατρίου διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C. Διάλυμα 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1 % κιτρικό νάτριο



0.5 g CuSO_4 διαλύονται σε 100 ml διαλύματος 1 % κιτρικού νατρίου. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Μίγμα διαλυμάτων 2 % Na_2CO_3 και 0.5 % CuSO_4 σε αναλογία 50:1

Σε 50 ml διαλύματος 2 % Na_2CO_3 προστίθεται 1 ml διαλύματος 0.5% CuSO_4 . Το μίγμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πρότυπο διάλυμα BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε 0.5 N NaOH

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

Αντιδραστήριο φαινόλης

Ορισμένος όγκος αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu αναμιγνύεται με ίσο όγκο H_2O . Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική πορεία

Πρότυπη καμπύλη

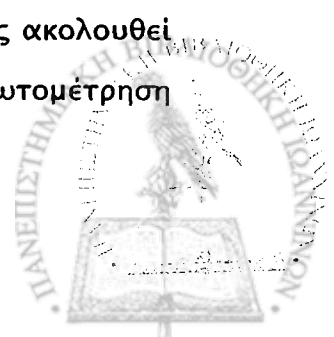
Προστίθενται 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml προτύπου διαλύματος BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0-200 μg BSA αντίστοιχα) σε 5 πλαστικούς σωλήνες και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 ml με 0.5 N NaOH.

Προετοιμασία των δειγμάτων

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

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

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



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

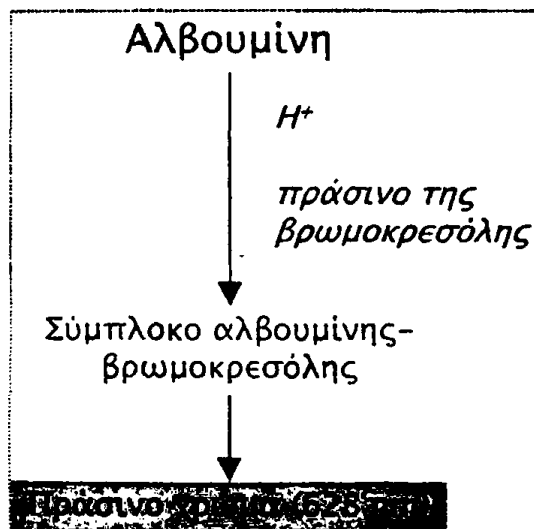
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΟ BAL ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΒΡΩΜΟΚΡΕΣΟΛΗΣ (BCG)

(για 50 έως 300 μg αλβουμίνης)

Αρχή της μεθόδου

Το μόριο της αλβουμίνης τείνει να δεσμεύεται ισχυρώς με ανιοντικά έντονα χρωμοφόρα μόρια, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Το σύμπλοκο αλβουμίνης-χρωμοφόρων μορίων έχει διαφορετικό χρώμα από την ελεύθερη χρωμοφόρο ουσία και μπορεί να ανιχνευθεί παρουσία περισσειας αυτής. Έτσι, το πράσινο της βρωμοκρεσόλης δεσμεύεται με αλβουμίνη και το πράσινο σύμπλοκο που προκύπτει ανιχνεύεται με φωτομέτρηση στα 628 nm [591] (Σχήμα 34).

Σχήμα 34. Προσδιορισμός αλβουμίνης με τη μέθοδο της βρωμοκρεσόλης.



Αντιδραστήρια

- ❖ Φυσιολογικός ορός (Sterile sodium chloride 0.9%, Cooper Hellas)
- ❖ Κιτρικό οξύ (M. B.: 192.13, Merck)



- ❖ Αζίδιο του Νατρίου (NaN_3 , M. B.: 65.01, Sigma)
- ❖ Πράσινο της βρωμοκρεσόλης (Bromocresol green, 3',3'',5',5''-Tetrabromo-m-cresolsulfonephthalein, M. B.: 720, Sigma)

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M κιτρικού οξέος, pH 4.2

Διαλύουμε 19.213 g κιτρικού οξέος και 100 mg αζιδίου του νατρίου (NaN_3) ως συντηρητικό, σε 800ml νερό. Ρυθμίζουμε το pH με 0.25 M NaOH και μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη του 1lt συμπληρώνοντας ως τη χαραγή με νερό.

Διάλυμα 0.6 mM βρωμοκρεσόλης

Ζυγίζουμε 432 mg βρωμοκρεσόλης και 100 mg οζιδίου του νατρίου. Διαλύουμε πρώτα σε 10 ml 0.1 M NaOH και μετά με νερό σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου ως τη χαραγή.

Διάλυμα βρωμοκρεσόλης έτοιμο για χρήση (BCG)

Αναμιγνύουμε 1 όγκο του παραπάνω πυκνού διαλύματος βρωμοκρεσόλης με 3 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος 0.1 M και ρυθμίζουμε το pH στο 4.2 (αν είναι υψηλό, διορθώνουμε με κιτρικό οξύ).

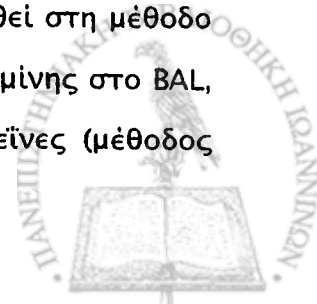
Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml αλβουμίνης ορρού βοός (BSA)

Ζυγίζουμε 200 mg αλβουμίνης και τα διαλύουμε σε 10 ml φυσιολογικού ορρού. Το διάλυμα αφήνεται προς μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να διαλυθεί πλήρως η BSA. Κατόπιν αραιώνουμε 1ml από το διάλυμα προσθέτοντας 9 ml φυσιολογικού ορρού και αναδεύουμε. Το έτοιμο προς χρήση τελικό διάλυμα διαμοιράζεται σε πλαστικούς σωλήνες, σε ποσότητες του 1 ml και φυλάσσεται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Πειραματική πορεία

Επεξεργασία του BAL

Ο μέγιστος όγκος δείγματος που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο είναι 200 μl. Πριν όμως γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλβουμίνης στο BAL, πρέπει να είναι γνωστή η περιεκτικότητα αυτού σε ολικές πρωτεΐνες (μέθοδος



Lowry). Έτσι, πρέπει αυτό, εάν έχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες, να συμπυκνωθεί, έτσι ώστε η περιεκτικότητά του σε αλβουμίνη, να βρίσκεται μεταξύ των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Στη συνέχεια γίνεται ένας υπολογισμός του όγκου του BAL που πρέπει να συμπυκνωθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι ο μέγιστος όγκος BAL συμπυκνωμένου ή μη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτή τη μέθοδο δεν μπορεί να ξεπερνάει τα 200 μl.

Έγινε λοιπόν χρήση του παρακάτω τύπου για την εύρεση του όγκου BAL που πρέπει να συμπυκνωθεί:

$$V = \frac{100 \cdot m_{\alpha}}{\Pi \cdot m_{\pi}}$$

όπου:

V ,	ο ζητούμενος όγκος BAL που θα συμπυκνωθεί
m_{α} ,	τα μg αλβουμίνης που ανιχνεύει η μέθοδος (π. χ. 150 μg, που βρίσκονται στη μέση της γραμμικής περιοχής ανίχνευσης)
m_{π} ,	τα μg των ολικών πρωτεϊνών που περιέχονται σε 1 ml δείγματος BAL, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry
Π ,	το % ποσοστό της αλβουμίνης επί των ολικών πρωτεϊνών του BAL που συνήθως έχει το BAL (Έγιναν αρχικά πειράματα σε πολλά και διαφορετικά δείγματα BAL, από τα οποία υπολογίστηκε ότι η αλβουμίνη κατέχει σε μέσο όρο το 25 % περίπου των ολικών πρωτεϊνών)

Εάν, $V \leq 200$ μl, το BAL δεν συμπυκνώνεται αλλά χρησιμοποιείται ως έχει.

Συμπύκνωση BAL

Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιούνται πλαστικά φίλτρα Centricon-3 με μεμβράνη polycarbonate (Amicon), cut off 3000 M. B. Η μέγιστη χωρητικότητα αυτών είναι 2.5 ml. Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε φυγόκεντρο Sorval, κεφαλής σταθερής



γωνίας, με μέγιστη φυγοκεντρική δύναμη 7500 g, μέχρι τελικού όγκου 200 μl ή λιγότερο, στους 4 °C (συνήθως 1 ώρα περίπου).

Κατεργασία προτύπων και δειγμάτων

Σε πλαστικές κυψελίδες προσθέτουμε 1 ml αντιδραστηρίου βαφής (διάλυμα βρωμοκρεσόλης BCG έτοιμο για χρήση). Για τη σειρά των προτύπων προστίθενται 0, 25, 50, 75, 100, 125 και 150 μl προτύπου διαλύματος 2 mg/ml BSA (0-300 μg BSA αντίστοιχα), ενώ για το άγνωστο δείγμα προσθέτουμε 200 μl ή λιγότερο BAL συμπυκνωμένο ή μη. Τέλος, συμπληρώνουμε με φυσιολογικό ορρό σε τελικό όγκο 1.2 ml. Ανακινούμε προσεκτικά τις κυψελίδες και μετά από πάροδο 10 min φωτομετρούμε στα 628 nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και τη γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία της μορφής $y = \alpha x + \beta$ (απορρόφηση συναρτήσει μg αλβουμίνης), βάση της οποίας υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση της αλβουμίνης του δείγματός μας. Τέλος γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης σε μg αλβουμίνης ανά ml δείγματος BAL.

Αρίθμηση κυττάρων

Η διαφορική αρίθμηση των κυττάρων του BAL γίνεται μετά από χρώση τους με ηωσίνη-αιματοξυλίνη. Σε κάθε παρασκευάσμα μετρούνται κάθε φορά τουλάχιστον 300 κύτταρα.

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Υλικά-Αντιδραστήρια

- ❖ Φασματοφθορισμόμετρο Perkin-Elmer LS-3, με λάμπα ξένου και φωτοπολλαπλασιαστή RCA 931
- ❖ Κυψελίδα φθορισμού (Hellma cuvette 104F-05, 10 mm light path, Windaus Labortechnik GMBH & Co., Mullheim/Baden)



- ❖ C₆-NBD-PC, (1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810130, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) / ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, P-3412, Sigma)
- ❖ C₆-NBD-FA, (6-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] hexanoic acid; σε στερεή κατάσταση, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA) / ή σε χλωροφορμικό διάλυμα, N-5013, Sigma)
- ❖ C₁₂-NBD-PC, (1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine; σε στερεή κατάσταση, 810131, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA))
- ❖ C₁₂-NBD-FA, σε στερεή κατάσταση, (12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] dodecanoic acid; 790440, Avanti Polar Lipids (Pelham, AL, USA))
- ❖ Αιθανόλη (M. B.: 46, Labscan)
- ❖ Tris-HCl, ([[Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride], C₄H₁₁NO₃, M. B.: 157.6, Sigma)
- ❖ EDTA (ethylenediamino-tetraacetic acid; C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂•2H₂O, M. B.: 372.2, Sigma)
- ❖ CaCl₂, (M.B.: 110.99, Sigma)
- ❖ Λουτρό υπερήχων, (Fritsch Laborette, type 17.202, Germany)

Βασικά διαλύματα

Διάλυμα 0.5 mM C₆-NBD-PC σε αιθανόλη.

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

Πυκνό διάλυμα 1 mM C₆-NBD-FA σε αιθανόλη

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



Διάλυμα 0.1 mM C₆-NBD-FA σε αιθανόλη

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

Διάλυμα 0.5 mM C₁₂-NBD-PC σε αιθανόλη

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

Πυκνό διάλυμα 1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

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

Διάλυμα 0.1 mM C₁₂-NBD-FA σε αιθανόλη

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

Διάλυμα 10 % EDTA, pH 7.4

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

Διάλυμα 0.5 M CaCl₂ pH 7.4

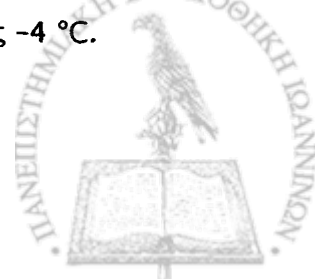
Ζυγίζονται 2.7747 g CaCl₂ και διαλύονται σε 50 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

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

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

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4

Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε 80 ml νερού και προστίθενται 400 μl διαλύματος 0.5 M CaCl₂ pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -4 °C.



Διάλυμα BSA 2 mg/ml

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

Διάλυμα BSA 2.5 mg/ml

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

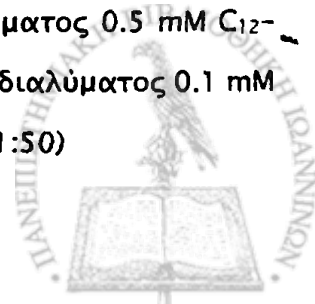
Φάσματα διέγερσης και εκπομπής

Για τη λήψη των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής κάθε φθορίζουσας ουσίας χωριστά ή σε μίγματα αυτών χρησιμοποιήθηκαν 990 μl ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο προστέθηκαν σε κάθε περίπτωση οι εξής ποσότητες:

- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-PC
- 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-FA
- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-PC + 5 μl (0.5 nmoles) διαλύματος 0.1 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-FA

Η προσθήκη των παρακάτω ποσοτήτων έγινε σε αρχικό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος στην κυβελίδα φθορισμού έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1 ml.

- 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-FA + 100 μl BAL (500 μg πρωτεΐνης)
- 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-FA + 100 μl ορρού (αραιωμένου 1:50)
- 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-FA + 15-100 μl BSA 2 mg/ml
- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-PC + 100 μl BAL (500 μg πρωτεΐνης)
- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-PC + 100 μl ορρού (αραιωμένου 1:50)
- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆- (ή C₁₂)-NBD-PC + 50 μl BSA 2 mg/ml
- 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₆-NBD-PC + 10 μl διαλύματος 0.5 mM C₁₂-NBD-PC + 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₆-NBD-FA + 5 μl διαλύματος 0.1 mM C₁₂-NBD-FA + 100 μl BAL + 100 μl ορρό (αραιωμένο 1:50)



Τα φάσματα λαμβάνονται με σάρωση των μηκών κύματος στα 60 nm/min και ταχύτητα καταγραφικού χαρτιού 15 mm/min. Για τη λήψη των φασμάτων διέγερσης, η εκπομπή ρυθμίζεται στα 535 nm και το δείγμα διεγείρεται με σάρωση της περιοχής από 300-700 nm. Για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής, η διέγερση ρυθμίζεται στα 475 nm και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης εκπομπής φθορισμού στην περιοχή από 300-800 nm.

* Προσδιορισμός κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης (CMC) φθορίζοντων φωσφολιπιδίων

Αρχή της μεθόδου

Τα λιπίδια σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες μιας κρίσιμης συγκέντρωσης στα υδατικά διαλύματα σχηματίζουν μικύλλια. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση ενός φθορίζοντος λιπιδίου στο διάλυμα, η μεταβολή του φθορισμού είναι γραμμική σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης, ενώ παρατηρείται σβέση φθορισμού όταν τα λιπίδια σχηματίζουν μικύλλια. Η καμπύλη της έντασης φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του φθορίζοντος λιπιδίου εμφανίζει λοιπόν δύο ευθύγραμμα τμήματα. Το σημείο τομής της προέκτασης των ευθειών αυτών αντιστοιχεί στην κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση του λιπιδίου [503].

Διαλύματα

Διαλύματα 0.5 μM, 0.01, 0.05, 0.1 και 0.25 mM C₆- ή C₁₂-NBD-PC

10 μl του αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C₆-NBD-PC μεταφέρονται σε 5 γυάλινα βιδωτά σωληνάκια όπου προστίθενται 10 ml, 490, 90, 40 και 10 μl αιθανόλης. Τα διαλύματα αναδεύονται και φυλάσσονται στους -20 °C.

Διαλύματα 1, 1.5, 2.0, 2.5 και 3.0 mM C₆- ή C₁₂-NBD-PC σε αιθανόλη

200, 300, 400, 500 και 600 μl του αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C₆-NBD-PC μεταφέρονται χωριστά σε σειρά γυάλινων βιδωτών σωληνών. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και τα υπολείμματα επαναδιαλύονται σε 100 μl αιθανόλης το καθένα. Τα διαλύματα αναδεύονται και φυλάσσονται στους -20 °C.



Πειραματική πορεία

990 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4 προστίθενται στην κυψελίδα φθορισμού. Στη συνέχεια προστίθενται 10 μl του διαλύματος 0.5 μM , 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 1, 1.5, 2.0, 2.5 ή 3.0 mM C_6 - ή C_{12} -NBD-PCs. Σε πειράματα στα οποία δεν είναι επιθυμητή η παρουσία ιόντων Ca^{2+} χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4. Η κυψελίδα πωματίζεται με το ειδικό πώμα και αναποδογυρίζεται 3 με 4 φορές για να αναδευτεί πριν τοποθετηθεί στο φθορισμόμετρο. Το διάλυμα διεγείρεται με δέσμη ακτινοβολίας στα 435 nm και μετρείται η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού που εκπέμπεται στα 535 nm. Ο φθορισμός του ρυθμιστικού διαλύματος μετρείται για τυφλό και αφαιρείται ακολούθως από τις άλλες μετρήσεις.

Επίδραση BSA στο φθορισμό των C_6 - ή C_{12} -NBD-PC

Διαλύματα

βλ. σελ. 148.

Πειραματική πορεία

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} /ή 10 mM EDTA, pH 7.4 προστίθεται στην κυψελίδα φθορισμού και μετά προστίθενται κατά σειρά 10 μl διαλύματος 0.5 mM C_6 - (ή C_{12})-NBD-PC και 10, 20, 30, 40, 50 ή 100 μl του διαλύματος BSA 2.5 mg/ml. Ο αρχικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζεται έτσι ώστε ο τελικός όγκος του μίγματος να είναι 1 ml.

Μετά από κάθε προσθήκη, η κυψελίδα αναδευεται αμέσως. Μετά την προσθήκη του διαλύματος της BSA και σε χρόνο μικρότερο του ενός λεπτού (~30 sec) η κυψελίδα τοποθετείται στο φθορισμόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του διαλύματος στα 535 nm συναρτήσει του χρόνου. Η διέγερση ρυθμίζεται στα 475 nm.

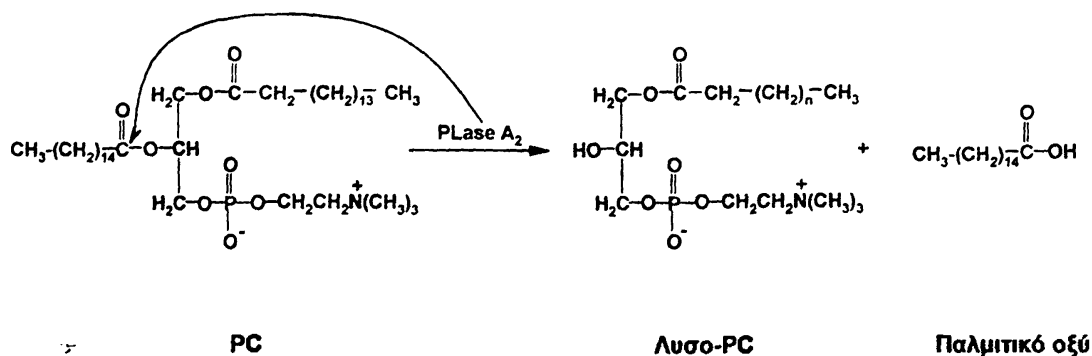


ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PLASE A₂ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΣΤΗ ΘΕΣΗ sn-2

Ραδιομετρική μέθοδος

Αρχή της μεθόδου

Επώαση της ιχνηθετημένης με [¹⁴C]-διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνης με φωσφολιπάση A₂, έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του εστερικού δεσμού της sn-2 θέσης του φωσφολιπιδίου και απελευθέρωση λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης και παλμιτικού οξέος (Σχήμα 35). Τα λιπίδια του μίγματος της αντίδρασης μπορούν ακολούθως να εκχυλισθούν και διαχωριστούν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) [486]. Τα τρία ιχνηθετημένα λιπίδια (φωσφατιδυλοχολίνη, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη και παλμιτικό οξύ) μετατοπίζονται σε διαφορετικά R_f. Οι ζώνες των λιπιδίων που αντιστοιχούν στη λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη καθώς και στη φωσφατιδυλοχολίνη που δεν αντέδρασε αποξύνονται από την πλάκα και μετρείται η ραδιενέργειά τους σε ειδικό μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Από το ποσοστό υδρόλυσης της αρχικής φωσφατιδυλοχολίνης προσδιορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου.



Σχήμα 35. Αντίδραση υδρόλυσης της διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνης από το ένζυμο PLase A₂.

Υλικά-αντιδραστήρια

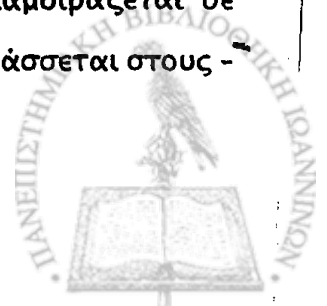
- ❖ ¹⁴C-DPPC (Phosphatidylcholine L-α-dipalmitoyl [dipalmitoyl-1-¹⁴C], 100 mCi/mmol, 0.1 mCi/ml, M. B.: 734, 207755, ARC-657)

- ❖ DPPC (L- α - Phosphatidylcholine, dipalmitoyl, M. B.: 734, P-6267, Sigma)
- ❖ Φωσφολιπάση A₂, (Phospholipase A₂ from porcine pancreas, 700 U/mg, 10 mg/ml, Böhringer)
- ❖ Αιθανόλη (M. B.: 46, Labscan)
- ❖ Tris-HCl, ([Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride], C₄H₁₁NO₃, M. B.: 157.6, Sigma)
- ❖ EDTA (ethylenediamino-tetraacetic acid; C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂•2H₂O, M. B.: 372.2, Sigma)
- ❖ CaCl₂ (M.B.: 110.99, Sigma)
- ❖ Χλωροφόρμιο (CHCl₃, M. B.: 119.38, Labscan)
- ❖ Μεθανόλη (CH₃OH, M. B.: 32.04, Labscan)
- ❖ HCl (M. B.: 36.5, Labscan)
- ❖ Τολουόλιο (C₇H₈, M. B.: 92.14, Labscan)
- ❖ Απορρυπαντικό Triton X-100, (M. B.:646.37, Merck)
- ❖ POPOP (M. B.: 364.4, [1,4-bis[5-Phenyl-2-oxazolyl]benzene;2,2'-p-Phenylene-bis[5-phenyloxazole]], Sigma)
- ❖ PPO (M. B.:221.3, 2,5-Diphenyloxazole, Sigma)
- ❖ Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 20 cm x 20 cm και πάχους 250 μm (Silica gel 60A, K6, Whatman)
- ❖ Θάλαμοι χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm
- ❖ Πλαστικά βιδωτά σωληνάκια (vials) για μέτρηση ραδιενέργειας, χωρητικότητας 4 ml
- ❖ Μετρητής σπινθηρισμού υγρών, (Hewlett Packard)

Διαλύματα

Διάλυμα παγκρεατικής Plase A₂ 2 μg/100 μl

10 μl του διαλύματος της φωσφολιπάσης A₂ 10 mg/ml αραιώνονται με φυσιολογικό ορό σε τελικό όγκο 5 ml. Το διάλυμα αυτό διαμοιράζεται σε ποσότητες των 100 μl σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και φυλάσσεται στους -20 °C.



Πυκνό διάλυμα 10 mg/ml ψυχρής DPPC (13.624 mM)

10 mg DPPC διαλύονται σε 1 ml χλωροφορμίου. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Αιθανολικό διάλυμα 1 mM ψυχρής DPPC

73.4 ml του χλωροφορμικού διαλύματος ψυχρής DPPC 10 mg/ml εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου. Στο υπόλειμμα προστίθεται 1 ml αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.

Διάλυμα ιχνηθετημένης ¹⁴C-DPPC 100000 cpm/5 μl

Ποσότητα ιχνηθετημένης ¹⁴C-DPPC ίσης με 2000000 cpm τοποθετείται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και στο σωλήνα προστίθενται 100 μl αιθανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται και φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα 2 N HCl

10 ml πυκνού ατμίζοντος HCl αραιώνονται σε 50 ml νερού. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα 10 % EDTA, pH 7.4

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

Διάλυμα 0.5 M CaCl₂ pH 7.4

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

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

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

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4

Ζυγίζονται 0.1576 g Tris-HCl, διαλύονται σε 80 ml νερού και προστίθενται 400 μl διαλύματος 0.5 M CaCl₂ pH 7.4. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -4 °C.



Υγρό σπινθηρισμού

1 όγκος απορρυπαντικού triton αναμιγνύεται με 2 όγκους τολουόλιου. Σε όγκο 1 lt του προηγούμενου διαλύματος προστίθενται 0.4 g POPOP και 4 g PPO και το διάλυμα αφήνεται προς μαγνητική ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία, για λίγα λεπτά μέχρι να διαλυθούν πλήρως οι στερεές ουσίες. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πειραματική πορεία

Εναρξη της αντίδρασης

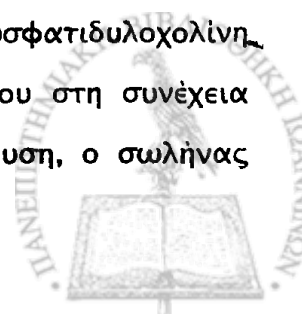
Σε ρυθμιστικό διάλυμα προστίθενται 5 ml διαλύματος ψυχρής DPPC και 5 ml διαλύματος ιχνηθετημένης ^{14}C -DPPC (τελική συγκέντρωση 5 μM). Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα Vortex. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη της πηγής του ενζύμου (50 ml (1 μg) διαλύματος PLase A₂ του εμπορίου ή 100 ml BAL), ενώ ο τελικός όγκος του μίγματος αντίδρασης ρυθμίζεται στο 1 ml. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min για το πρότυπο ένζυμο και 4 ώρες για το BAL. Προετοιμάζονται επίσης δείγματα αρνητικού ελέγχου τα οποία περιέχουν μόνο το υπόστρωμα της αντίδρασης.

Εκχύλιση των λιπιδίων

Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 ml διαλύματος 2 N HCl και ακολουθεί εκχύλιση των λιπιδίων του μίγματος της αντίδρασης με τη μέθοδο Bligh-Dyer όπως περιγράφεται στη σελ. 166.

Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων γίνεται με ανάπτυξη της πλάκας σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (65:35:7) v/v για 1 ώρα περίπου. Οι ζώνες των λιπιδίων γίνονται ορατές αφού τοποθετήσουμε την πλάκα σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς ιωδίου για λίγα λεπτά. Σύμφωνα με τη μετατόπιση των προτύπων λιπιδίων, γίνεται απόξυση των περιοχών του πυριτικού οξέος της πλάκας όπου μετατοπίστηκαν η φωσφατιδυλοχολίνη και λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη χωριστά. Τοποθετούνται σε ειδικό πλαστικό σωλήνα (vial) όπου στη συνέχεια προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού και αφού γίνει ανάδευση, ο σωλήνας



τοποθετείται σε μεγαλύτερο γυάλινο βιδωτό σωλήνα για μέτρηση ραδιενέργειας. Η μέτρηση των κρούσεων γίνεται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counter, Hewlett Packard).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων γίνεται σύμφωνα με τους παρακάτω μαθηματικούς τύπους:

$$T = \frac{200 \cdot \text{cpm}_{T \text{ lyso-PC}}}{\text{cpm}_{T \text{ PC}} + 2 \cdot \text{cpm}_{T \text{ lyso-PC}}} \quad \Delta = \frac{200 \cdot \text{cpm}_{\Delta \text{ lyso-PC}}}{\text{cpm}_{\Delta \text{ PC}} + 2 \cdot \text{cpm}_{\Delta \text{ lyso-PC}}}$$

Όπου:

Δ ,	Το % ποσοστό υδρόλυσης της PC προς lyso-PC ύστερα από επώαση με δείγμα BAL
T ,	Το % ποσοστό υδρόλυσης της PC προς lyso-PC στα αρνητικά δείγματα ελέγχου
$\text{cpm}_{T \text{ lyso-PC}}$,	Οι κρούσεις που μετρήθηκαν στο R_f της lyso-PC στα αρνητικά δείγματα ελέγχου
$\text{cpm}_{T \text{ PC}}$,	Οι κρούσεις που μετρήθηκαν στο R_f της PC στα αρνητικά δείγματα ελέγχου
$\text{cpm}_{\Delta \text{ lyso-PC}}$,	Οι κρούσεις που μετρήθηκαν στο R_f της lyso-PC στα δείγματα BAL
$\text{cpm}_{\Delta \text{ PC}}$,	Οι κρούσεις που μετρήθηκαν στο R_f της PC στα δείγματα BAL

Αφού υπολογιστεί το % ποσοστό υδρόλυσης που παρατηρήθηκε στα δείγματα αρνητικού ελέγχου και στα δείγματα BAL, γίνεται χρήση του επόμενου τύπου για την εύρεση της ενεργότητας της PLase A_2 :

$$E = \frac{(\Delta - T) \cdot C_{PC} \cdot 600}{m_{\pi} \cdot t}$$

όπου:

E ,	Η ενεργότητα της PLase A_2 σε nmoles lyso-PC/mg πρωτεΐνης/ώρα
-------	---



C_{PC} ,	Τα nmol της PC που υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης
$m_{π}$,	Η ολική πρωτεΐνη του δείγματος στο μίγμα της αντίδρασης (σε μg)
t ,	Ο χρόνος της αντίδρασης σε λεπτά (min)

Φθορισμομετρική μέθοδος

Αρχή της μεθόδου

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

Υλικά-Αντιδραστήρια και Διαλύματα

Για τα υλικά, αντιδραστήρια και διαλύματα βλ. σελ. 147, 153.

Πειραματική πορεία

Προετοιμασία του διαλύματος με το υπόστρωμα

Η συγκέντρωση του υποστρώματος ρυθμίζεται να είναι μεγαλύτερη της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης. Τα κυστίδια του υποστρώματος δημιουργούνται με την προσθήκη 10 μl του αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C_{12} -NBD-PC σε 940 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4 [592] σε κυψελίδα φθορισμού του 1 ml. Σε πειράματα στα οποία δεν είναι επιθυμητή η παρουσία ιόντων Ca^{2+} χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4. Η κυψελίδα πωματίζεται με το ειδικό πώμα και αναποδογυρίζεται 3 με 4 φορές για να αναδευτεί. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φθορισμόμετρο, το διάλυμα διεγείρεται στα 475 nm και μετρείται η ένταση της ακτινοβολίας που

εκπέμπεται στα 535 nm. Η τιμή αυτή του φθορισμού αφαιρείται στη συνέχεια από τις υπόλοιπες μετρήσεις.

Έναρξη της αντίδρασης

Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 μl της πηγής του ενζύμου (παγκρεατική PLase A₂ του εμπορίου ή 100 μl BAL) στο προηγούμενο διάλυμα. Ακολουθεί άμέσως ανάδευση και συνεχής καταγραφή της μεταβολής του φθορισμού του διαλύματος.

Πρότυπη καμπύλη

Σε μια σειρά από κυψελίδες που περιέχουν 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 10 μl αιθανολικού διαλύματος 0.5 mM C₁₂-NBD-PC προστίθενται 0, 2, 4, 6, 8, και 10 μl (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 nM) του προτύπου αιθανολικού διαλύματος 0.1 mM C₁₂-NBD-FA. Κάθε δείγμα πρέπει να είναι διπλό. Μετρείται ο φθορισμός τους και από αυτόν αφαιρείται η τιμή φθορισμού που αντιστοιχεί στο διάλυμα περιέχει μόνο την C₁₂-NBD-PC. Χαράσσεται πρότυπη καμπύλη της έντασης του φθορισμού συναρτήσει της ποσότητας του C₁₂-NBD-FA σε nM ανά ml.

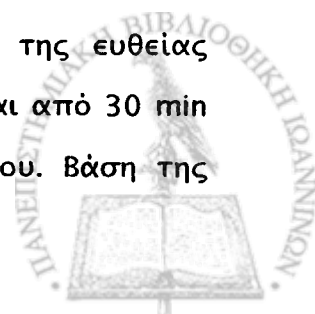
Χρήση εσωτερικού προτύπου

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

Έτσι, στο τέλος της καταγραφής της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης προστίθενται 5 μl του προτύπου αιθανολικού διαλύματος 0.1 mM C₁₂-NBD-FA. Η προσθήκη ίδιας ποσότητας προτύπου επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά. Η μέση τιμή της αύξησης του φθορισμού που θα παρατηρηθεί μετά τις δύο διαδοχικές προσθήκες αντιστοιχεί στο φθορισμό του 0.5 nM του C₁₂-NBD-FA.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

Η ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας μεταβολής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου, που παρατηρείται από 30 min περίπου μέχρι 3 ώρες μετά την προσθήκη της πηγής του ενζύμου. Βάση της



πρότυπης καμπύλης ή του εσωτερικού προτύπου ο φθορισμός μετατρέπεται σε ημοί προϊόντος της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται για το BAL ως ημοί C_{12} -NBD-FA/ώρα/ml BAL ή ως ημοί C_{12} -NBD-FA/ώρα/mg πρωτεΐνης του BAL. Για την παγκρεατική PLase A_2 εκφράζονται ως ημοί C_{12} -NBD-FA/min/mg ενζύμου.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-ACH

Φθορισμομετρική μέθοδος

Ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στον φθορισμομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας φωσφολιπάσης A_2 (βλ. σελ 158) με τη μόνη διαφορά ότι στον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAF-Ach χρησιμοποιείται η C_6 -NBD-PC ως υπόστρωμα της αντίδρασης και το αντίστοιχο C_6 -NBD-FA ως πρότυπο αντί των C_{12} -NBD-PC και C_{12} -NBD-FA αντίστοιχα. Ωστόσο, σε συγκριτικά πειράματα δοκιμάζονται και τα δύο υποστρώματα.

Ραδιομετρική μέθοδος

Αρχή της μεθόδου

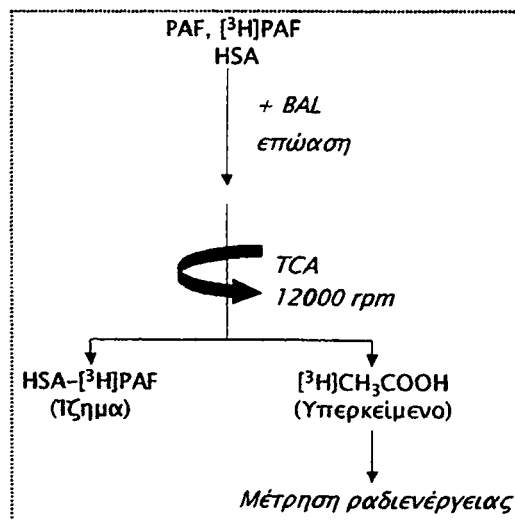
Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση των σήμασμένων με τρίτιο [3H] οξικών ομάδων που απελευθερώνονται μετά την επώαση του [3H]-PAF με την πηγή του ενζύμου PAF-Ach που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το BAL και ο ανθρώπινος ορός αίματος (Σχήμα 36). Ο διαχωρισμός του μη υδρολυμένου [3H]-PAF από τις ελεύθερες οξικές ομάδες γίνεται με καταβύθιση του συμπλόκου HSA-[3H]-PAF με τριχλωροξικό οξύ (TCA) [428].

Αντιδραστήρια

- ❖ NaCl (M. B.:58.44, Merck)
- ❖ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (M. B.: 137.99, Merck)
- ❖ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (M. B.: 177.99, Merck)
- ❖ Τολουόλιο (C_7H_8 , M. B.: 92.14, Labscan)
- ❖ Απορρυπαντικό Triton X-100, (M. B.:646.37, Merck)



- ❖ POPOP (M. B.: 364.4, [1,4-bis[5-Phenyl-2-oxazolyl]benzene;2,2'-p-Phenylene-bis[5-phenyloxazole]], Sigma)
- ❖ PPO (M. B.:221.3, 2,5-Diphenyloxazole, Sigma)
- ❖ Αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human serum albumin, HSA, Sigma)
- ❖ Τριχλωροξικό οξύ (TCA, M.B.: 163.39, Sigma)
- ❖ PAF (1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, M. B.: 523.7, Bachem)
- ❖ [³H]PAF: 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine-[acetyl-1-³H]; (NET-910 M. B.: 523.7, ειδική ραδιενέργεια: 7.1 Ci/mmol, 0.014 μmol/ml, 0.074 mg/ml, New England)



Σχήμα 36. Διάγραμμα ροής του ραδιομετρικού προσδιορισμού ενεργότητας PAF-ACh στο BAL.

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS, pH 7.4

Ζυγίζονται 8.16 g NaCl, 1.38 g NaH₂PO₄•H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄•2H₂O. Διαλύονται με νερό σε τελικό όγκο 1 lt. Ρυθμίζεται το pH στα 7.4, μοιράζεται σε πλαστικά φιαλίδια και φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα HSA/PBS, 1 mg/ml, pH 7.4

Ζυγίζονται 25 mg HSA και διαλύονται σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Η HSA (human serum albumin) διαλύεται με ήπια ανάδευση και χαμηλή θερμοκρασία

σε 10 ml PBS και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώνεται στα 25 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι ποσότητες που απαιτούνται παραλαμβάνονται με αποστειρωμένη σύριγγα, χωρίς να ανοίγεται το φιαλίδιο. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί BSA αντί HSA, αν τα δείγματα δεν είναι ανθρώπινα.

Διάλυμα 1.8 mM PAF

Ζυγίζονται 9.524 mg PAF (16), και διαλύονται σε 10 ml μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1) v/v. Το διάλυμα φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Διάλυμα [^3H]-acetate-PAF 20 μM σε HSA/PBS

Παραλαμβάνονται σε γυάλινο βιδωτό σωλήνα (των 15 ml) 1 ml του διαλύματος PAF 1.8 mM και 100 μl του ραδιενεργού διαλύματος [^3H]-acetate-PAF 1.4×10^{-5} M. Οι προηγούμενες ποσότητες εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου. Στο σωλήνα τοποθετούνται 9 ml διαλύματος HSA/PBS και το διάλυμα αφήνεται σε υδρόλουτρο $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, υπό περιοδική και ήπια ανάδευση για 15 min τουλάχιστον προς πλήρη διαλυτοποίηση του PAF. Ειδική ραδιενέργεια διαλύματος (SA): περίπου 5×10^4 cpm/nmole.

Διάλυμα 20 % (w/v) τριχλωροξικού οξέος

Ζυγίζονται 20 g TCA και διαλύονται σε 100 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Υγρό σπινθηρισμού

Για την παρασκευή του βλ. Διαλύματα σελ. 154.

Πειραματική διαδικασία

Ετοιμάζονται 4 σειρές πλαστικών σωλήνων πολυπροπυλενίου erpendorf του 1 ml. Ετοιμάζεται παγόλουτρο στο οποίο τοποθετούνται οι 3 σειρές των σωλήνων (erpendorf). Σε κάθε σωλήνα που βρίσκεται στο παγόλουτρο, τοποθετούνται 50 μl διαλύματος 20 % TCA. Η μία σειρά χρησιμοποιείται για τα αρνητικά control, ενώ οι άλλες δύο για τα διπλά δείγματα.

Σε υδρόλουτρο $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ τοποθετούμε την πηγή του ενζύμου (BAL ή αραιωμένος ορός 1:50) και το διάλυμα [^3H]-PAF/HSA/PBS. Παραμένουν για 10 min για να αποκτήσουν την κατάλληλη θερμοκρασία και αναδεύονται.



Στο υδρόλουτρο τοποθετούμε την 4^η σειρά των σωλήνων erpendorf. Στον σωλήνα αυτό αναμιγνύονται ίσοι όγκοι της πηγής του ενζύμου με το σημασμένο διάλυμα PAF (χρόνος μηδέν), συνήθως από 100 μl, και αναδεύονται.

Στον κατάλληλο χρόνο επώασης (t), συνήθως 20 min για το BAL, παραλαμβάνονται μετά από ανάδευση 50 μl (δύο διπλά δείγματα για κάθε σωληνάκι για στατιστική) και μεταφέρονται στο παγόλουτρο, σε αντίστοιχους σωλήνες (erpendorf) που περιέχουν TCA.

Οι σωλήνες παραμένουν στο παγόλουτρο για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται σε φυγόκεντρο ειδική για σωλήνες erpendorf, στις 12000 στροφές για 2 min. Παραλαμβάνονται προσεκτικά από το υπερκείμενο 50 μl και τοποθετούνται σε ειδικό πλαστικό σωλήνα (vial) για μέτρηση ραδιενέργειας, όπου στη συνέχεια προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού και αφού γίνει ανάδευση, ο σωλήνας τοποθετείται σε μεγαλύτερο γυάλινο βιδωτό σωλήνα. Η μέτρηση των κρούσεων γίνεται σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών (liquid scintillation counter, Packard).

Θετικό control (T): 25 μl του μίγματος αντίδρασης από το erpendorf τοποθετούνται στο vial για μέτρηση ραδιενέργειας. (Η ποσότητα ραδιενέργειας αντιστοιχεί στην ποσότητα αυτής που μετριέται τελικά στο δείγμα).

Αρνητικό control (C): 25 μl πηγής του ενζύμου τοποθετούνται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 50 μl TCA και αναδεύεται. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 μl του διαλύματος [³H]-PAF/HSA/PBS. Το δείγμα φυγοκεντρείται κατά τα γνωστά και παραλαμβάνονται από το υπερκείμενο 50 μl για μέτρηση ραδιενέργειας. (Η ποσότητα ραδιενέργειας που μετριέται αντιστοιχεί σε 12.5 μl του αρχικού διαλύματος [³H]-PAF/HSA/PBS).

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η ενεργότητα της PAF-AcH σε nmoles/ml/min (S) υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$S = \frac{\text{cpm}_{\text{δείγματος}} - C \cdot K}{t \cdot SA}$$

όπου:



S,	Ενεργότητα PAF-AcH (nmol/ml/min)
SA,	Ειδική ραδιενέργεια διαλύματος [³ H]-PAF/HSA/PBS (cpm/nmol) (τα cpm που αντιστοιχούν σε 10 μl του διαλύματος [³ H]-PAF/HSA/PBS αντιστοιχούν σε 0.2 nmoles PAF)
cpm δείγματος,	cpm των 50 μl κάθε δείγματος μετά την φυγοκέντρωση
C,	Αρνητικό control (cpm των 50 μl του τυφλού δείγματος)
t,	Χρόνος επώασης (min)
K,	Συντελεστής αραιώσης δείγματος. Για BAL: K = 80, (=1000/12.5)

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΙΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ PLase A₂ ΚΑΙ PAF-ACH

Αντιδραστήρια

- ❖ pBPB, (2, 4, -dibromoacetophenone C₈H₆Br₂O, M. B.: 277.9, B-2006, Sigma)
- ❖ PMSF, (Phenylmethylsulfonyl fluoride, C₇H₇FO₂S, M. B.:174.2, P-7626, Sigma)
- ❖ Pefablock, (4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluoride C₈H₁₀FNO₂S HCl, M. B.: 239.7, A-8456, Sigma)
- ❖ DFP, (diisopropyl fluorophosphonate [(CH₃)₂CHO]₂P(O)F, M. B.:184.15, D-0879, Sigma)

Διαλύματα

Διάλυμα 500 mM pBPB σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Ζυγίζονται 138.95 mg pBPB και διαλύονται σε 1 ml DMSO. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα 200 mM PMSF σε αιθανόλη

Ζυγίζονται 34.8 mg PMSF και διαλύονται σε 1 ml αιθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.



Διάλυμα 100 mM 4-[2-αμινοαιθυλ]βενζυλο-σουλφονυλο φθοριδίου (refablock)

Ζυγίζονται 0.0215 g και διαλύονται σε 897 μl νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα 1 % DFP σε ισοπροπανόλη

Ποσότητα 5 μl από την εμπορική συσκευασία του DFP αναμιγνύεται πολύ προσεκτικά με 495 μl ισοπροπανόλης σε γυάλινο βιδωτό σωληνάκι. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε απαγωγό εστία με χρήση γαντιών. Στο τέλος της διαδικασίας, τα αντικείμενα που έρχονται σε επαφή με αυτή την εξαιρετικά τοξική και επικίνδυνη ουσία όπως το DFP, τοποθετούνται σε διάλυμα 1N NaOH.

Διάλυμα 1N NaOH

Βλ. Διαλύματα σελ. 142.

Πειραματική πορεία

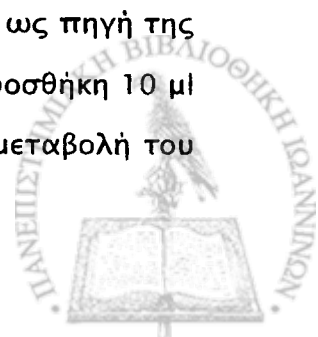
Χρησιμοποιούνται τελικές συγκεντρώσεις αναστολέων 5 mM pBPB, 2 mM PMSF, 1 mM refablock και 20 mM DFP. Αναλυτικά, 5 μl του διαλύματος του αναστολέα προστίθενται σε 500 μl BAL ή διαλύματος παγκρεατικής PLase A₂. Τα δείγματα επωάζονται για 15 min με το διάλυμα του αναστολέα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. 100 μl δείγματος προεπωασμένου με τον αναστολέα χρησιμοποιούνται για την έναρξη της αντίδρασης. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται είναι όμοιες με αυτές που προαναφέρονται στο ραδιομετρικό ή φθορισμομετρικό προσδιορισμό ενεργότητας PLase A₂ και PAF-AcH.

ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗΣ

PLase A₂ ΚΑΙ PAF-ACH ΟΡΡΟΥ

Πειραματική πορεία

Με σκοπό τον προσδιορισμό ενεργοτήτων PLase A₂ και PAF-AcH στο ίδιο δείγμα, το ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4, περιέχει αρχικά 2 μg (50 μl) παγκρεατικής PLase A₂ και ανθρώπινο ορρό αίματος (50 μl) ως πηγή της PAF-AcH αραιωμένο 1:50. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 10 μl της C₁₂-NBD-PC (5 μM τελική συγκέντρωση) και παρακολουθείται η μεταβολή του φθορισμού. Σε αυτό το σημείο ο όγκος του διαλύματος είναι 1 ml.

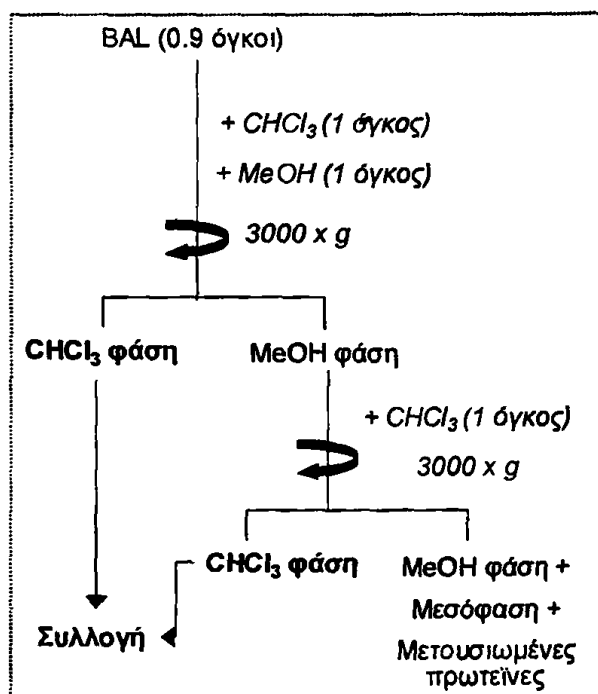


Στη συνέχεια, η δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} του μίγματος επιτυγχάνεται με την προσθήκη 90 μl διαλύματος 10 % EDTA pH 7.4 (30 mM τελική συγκέντρωση) και η κλίση της καμπύλης μηδενίζεται λόγω της απενεργοποίησης της παγκρεατικής PLase A₂. Τέλος, με την προσθήκη 10 μl του διαλύματος 0.5 mM της C₆-NBD-PC (5 μM τελική συγκέντρωση) είναι δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης υδρόλυσης που οφείλεται στη δράση της PAF-AcH απουσία ιόντων Ca^{2+} .

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BLIGH-DYER

Αρχή της μεθόδου

Με το σχηματισμό κατάλληλης πολικότητας συστήματος διαλυτών επιτυγχάνεται η απελευθέρωση των λιπιδίων του μίγματος αντίδρασης. Στο διφασικό σύστημα, τα λιπίδια κατανέμονται στην χλωροφορμική φάση ενώ τα υδατοδιαλυτά συστατικά κατανέμονται στην υδατομεθανολική φάση [593] (Σχήμα 37).



Σχήμα 37. Διάγραμμα ροής της εκχύλισης λιπιδίων του BAL.

Αντιδραστήρια

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

Πειραματική πορεία

Σε όγκο 1 ml μίγματος αντίδρασης περιέχονται το φθορίζον υπόστρωμα της φωσφατιδυλοχολίνης, δείγμα BAL καθώς και τα προϊόντα της αντίδρασης. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 50 ml 2 N HCl. Η εκχύλιση των λιπιδίων του μίγματος γίνεται στη συνέχεια με την προσθήκη 2.2 ml διαλύματος μεθανόλης-χλωροφορμίου (1:1) έτσι ώστε η τελική αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-υδατικού διαλύματος να είναι 1:1:0.9. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα Vortex για 1 min. Αφού φυγοκεντρηθεί για 10 min σε 3000 στροφές για να διαχωριστούν οι φάσεις, παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέττα *pasteur* η χλωροφορμική φάση (κατώτερη) και τοποθετείται σε καθαρό γυάλινο σωλήνα.

Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά με την προσθήκη επιπλέον 1.1 ml χλωροφορμίου στο υδατομεθανολικό μέρος. Μετά από ισχυρή ανάδευση για 1 min το μίγμα ξαναφυγοκεντρείται για διαχωρισμό των φάσεων και συλλέγεται ξανά η χλωροφορμική φάση. Οι δύο χλωροφορμικές φάσεις, οι οποίες περιέχουν τα λιπίδια ενώνονται.

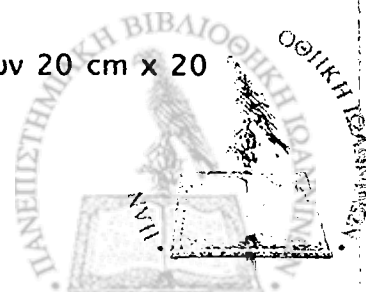
Διαχωρισμός των λιπιδίων με TLC

Αρχή της μεθόδου

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

Υλικά

- ❖ Πλάκες TLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 20 cm x 20 cm και πάχους 250 μm (Silica gel 60A, K6, Whatman)
- ❖ Θάλαμοι χρωματογραφίας 25 x 10 x 25 cm



- ❖ NaOH (M.B.: 40, Merck)
- ❖ Χλωροφόρμιο (CHCl_3 , M. B.: 119.38, Labscan)
- ❖ Μεθανόλη (MeOH, M. B.: 32.04, Labscan)
- ❖ Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M. B.: 60.053, Carlo Erba Reagenti)
- ❖ Πρότυπα λιπίδια του εμπορίου: PC, λυσο-PC, Sph, PE, PG, PS, PI (βλ. Διαλύματα σελ. 183)
- ❖ TNS [[2-p-toluidinyl-naphthylene-6-sulfonate], M. B.: 351.5, Sigma]
- ❖ Trizma hydrochlorica, [[Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 157.6, Sigma] ή Trizma base, [[Tris[hydroxymethyl]aminomethane], $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, M. B.: 121.1, Sigma]

Διαλύματα

Διάλυμα 1 N NaOH

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

Διάλυμα 50 mM Trizma hydrochlorica

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

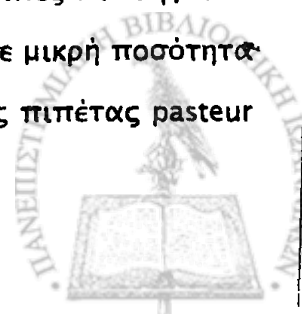
Διάλυμα 1 mM TNS

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

Πειραματική πορεία

Τοποθέτηση δειγμάτων

Χωρίζουμε τις πλάκες TLC σε παράλληλες, λωρίδες, πλάτους αναλόγου της ποσότητας των λιπιδίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε, συνήθως 1-2 cm. Στις ακραίες λωρίδες τοποθετούμε τα πρότυπα λιπίδια και στις υπόλοιπες τα δείγματα. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης σε ρεύμα N_2 , τα λιπίδια διαλύονται σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (80 μl) και τοποθετούνται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας pasteur



στην πλάκα TLC για να διαχωριστούν. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά για ποσοτική παραλαβή των λιπιδίων.

Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων

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

Διαχωρισμός ουδετέρων λιπιδίων

Η ανάπτυξη της πλάκας γίνεται σε θάλαμο που περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-οξικού οξέος σε αναλογία (95:5:1) για 45 min περίπου και η πλάκα στεγνώνεται όπως πριν.

Εμφάνιση λιπιδίων

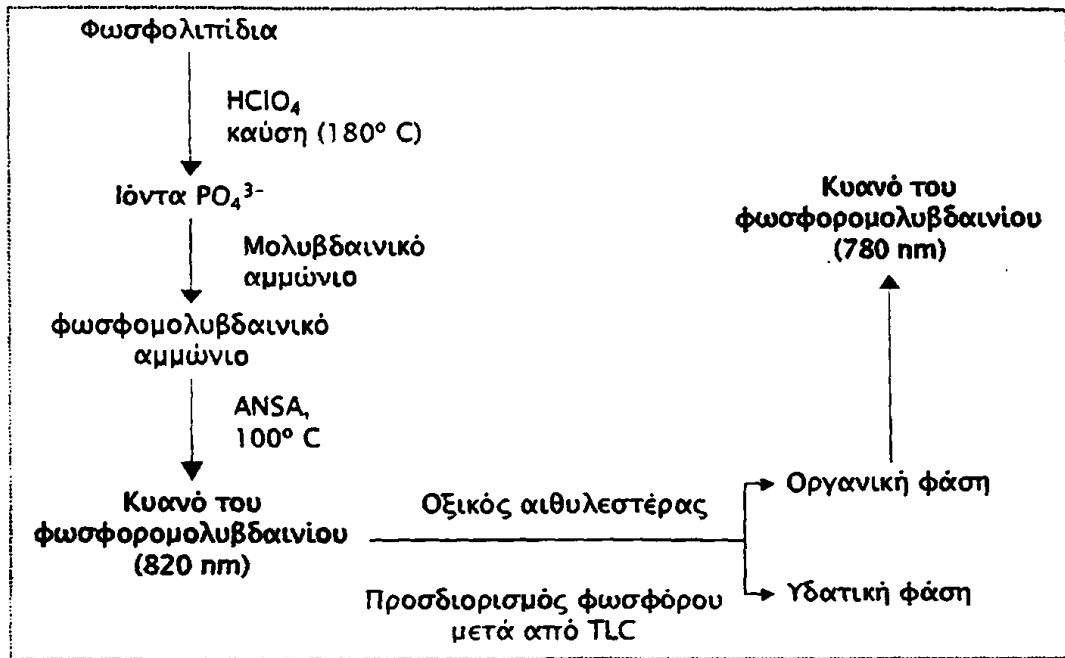
Τα φθορίζοντα NBD-λιπίδια μετά τον διαχωρισμό τους είναι ορατά από το κίτρινο χρώμα τους. Οι ζώνες τους όμως εμφανίζονται πιο έντονες στο υπεριώδες φως. Η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα TNS και οι περιοχές των υπολοίπων μη φθορίζόντων λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου των φωσφολιπιδίων σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση με υπερχλωρικό οξύ. Στη συνέχεια με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφορομολυβδαινικό, το οποίο τέλος ανάγεται από το αμίνοναφθοσουλφονικό οξύ (ANSA) σε κυανού του φωσφομολυβδαινίου, με θέρμανση, σε όξινο περιβάλλον [594]. Το κυανούν σύμπλοκο που παράγεται φωτμετρείται στα 820 nm (Σχήμα 38).





Σχήμα 38. Διάγραμμα ροής του προσδιορισμού φωσφόρου.

Αντιδραστήρια

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

Οξικός αιθυλεστέρας (CH₃OOC₂H₅, M. B.:88.11, Labscan)

Διαλύματα εργασίας

Πρότυπο διάλυμα φωσφορικού 5 μg /ml

Ποσότητα KH₂PO₄ ξηραίνεται στους 105 °C επί μία ώρα και τοποθετείται σε ξηραντήρα. Στη συνέχεια ζυγίζονται 2.202 mg και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

0.4 % μολυβδαινικό αμμώνιο

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

Διάλυμα αμινοναφθοσουλφονικού οξέος (ANSA)

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

Αντιδραστήριο ANSA

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

A) Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου λιπιδικού εκχυλίσματος

Πειραματική πορεία

Κατεργασία δείγματος

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

Πρότυπα δείγματα

Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες ryrex προστίθενται, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1 ml (0–5 μg φωσφόρου) προτύπου διαλύματος φωσφόρου 5 μg/ml και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO_4 .

Κατεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου. Με συνεχή ανάδευση προστίθεται 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA και στη συνέχεια τα δείγματα



θερμαίνονται σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Αφού οι σωλήνες ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου, το κυανό του φωσφορομολυβδαινίου που έχει σχηματιστεί φωτομετρείται στα 820 nm σε γυάλινη κυψελίδα.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Σχηματίζεται γραφική παράσταση των απορροφήσεων των προτύπων διαλυμάτων συναρτήσει της ποσότητας φωσφόρου που περιέχουν σε μg . Χαράσσεται η βέλτιστη ευθεία που περνάει από τα σημεία και υπολογίζεται η εξίσωσή της που είναι της μορφής $y = ax + b$. Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα αυτών σε φωσφόρο. Τέλος, τα αποτελέσματα ανάγονται σε $\mu\text{g P/ml}$ δείγματος BAL.

B) Προσδιορισμός φωσφόρου μετά από TLC

Πειραματική πορεία

Πρότυπα δείγματα

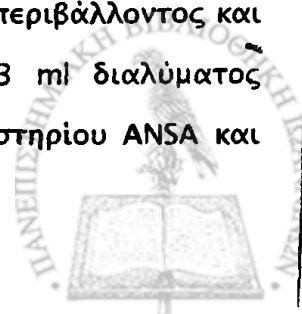
Σε μια σειρά από 6 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex προστίθενται, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 και 1.0 ml (0–5 μg φωσφόρου) πρότυπου διαλύματος φωσφόρου 5 $\mu\text{g/ml}$ και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό στο 1 ml σε όλους τους σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθεται 0.5 ml HClO_4 .

Προετοιμασία δειγμάτων

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

Επεξεργασία δειγμάτων και προτύπων

Ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο στους 170–180 °C για 5 ώρες. Μετά την καύση τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml H_2O . Ακολουθεί προσθήκη 3 ml διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου, με συνεχή ανάδευση 0.5 ml αντιδραστήριου ANSA και



θέρμανση σε υδρόλουτρο 100 °C για 15 min. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 5 ml οξικού αιθυλεστέρα. Οι σωλήνες αναδεύονται και αφήνονται να ηρεμήσουν. Διαχωρίζονται δύο φάσεις με το χρώμα να έχει εκχυλιστεί στην οργανική φάση του οξικού μεθυλεστέρα (ανώτερη). Παραλαμβάνεται προσεκτικά με πιπέτα pasteur σε γυάλινη κυψελίδα και φωτομετρείται στη συνέχεια στα 780 nm (Σχήμα 38).

*Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται όπως και πριν (βλ. σελ. 172). Από την εξίσωση και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα των περιοχών του πυριτικού οξέος της πλάκας σε μg φωσφόρου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων.

Παρατηρήσεις

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

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΑΦ ΣΕ ΒΑΛ, ΜΕ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ

ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Αντιδραστήρια

- ❖ EGTA (Ethylene glycol bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid, M. B.: 380.4, Serva)
- ❖ EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, M. B.: 372.2, Sigma)
- ❖ Ζελατίνη (Merck)
- ❖ KCl (M.B.: 74.56, Ferak)
- ❖ NaCl (M.B.: 58.44, Merck)
- ❖ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (M.B.: 203.31, Fluka)



- ❖ NaHCO_3 (M. B.: 84.01, Merck)
- ❖ Γλυκόζη (M. B.: 136.09, Fluka)
- ❖ Ακετυλοσαλικυλική λυσίνη (Egicalm)
- ❖ Οξαλικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M. B.:142.11, Mallinckrodt)
- ❖ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M.B.:147, Sigma)
- ❖ Φωσφοκρεατίνη ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{P} \cdot \text{Na}_2$ (N-[imino (phosphonoamino) methyl]-N-methylglycine) ή CP, M.B.: 255.1, Sigma)
- ❖ Κινάση της φωσφοκρεατίνης (creatine phosphokinase ή CPK, 17500 units, 310 units/mg, Sigma)
- ❖ PAF (O 1270, C_{16} , MB: 523.7, O 1355, C_{18} , MB: 551.8, Bachem)

Απομόνωση αιμοπεταλίων κουνελιού

Διαλύματα

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

7.4440 g EDTA•(Na) και 0.9 g NaCl διαλύονται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 0.2 M EGTA

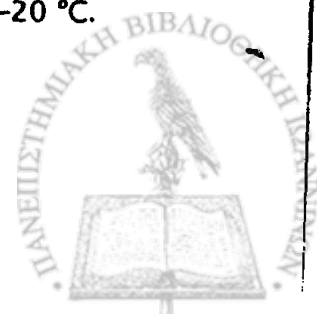
7.6080 g EGTA διαλύονται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 10 % ζελατίνης

5 g ζελατίνης διαλύονται σε περίπου 40 ml H_2O . Το διάλυμα αναδεύεται ήπια με θέρμανση μέχρι να διαλυθεί η ζελατίνη πλήρως. Αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 ml με H_2O . Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης των αιμοπεταλίων, pH 6.5

195 mg KCl, 212.5 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 g NaCl, 1.0150 g NaHCO_3 , 1 ml διαλύματος 0.2 M EGTA, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος ζελατίνης 10 % διαλύονται σε 1 lt H_2O . Ρυθμίζεται το pH στο 6.5 με μικρή ποσότητα HCl. Το διάλυμα χωρίζεται σε όγκους των 80 ml και διατηρείται στους -20 °C.



Διάλυμα 0.1 M ακετυλοσαλικυλικού

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

Διάλυμα 1 % οξαλικού αμμωνίου

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

Διάλυμα 0.2 M φωσφοκρεατίνης (CP)

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

Διάλυμα κωάσης της φωσφοκρεατίνης (CPK) 10 units/ml

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

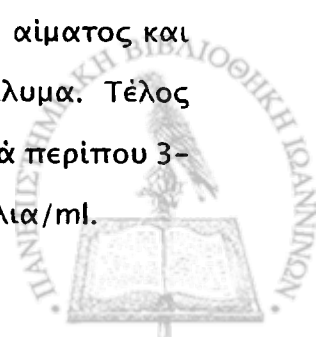
Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)

Χειρισμός του πειραματόζωου

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

Συλλογή του αίματος

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



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

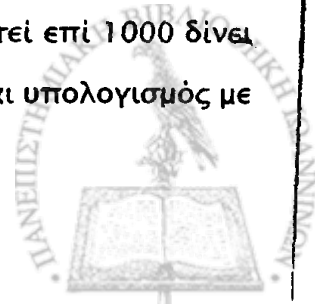
Παραλαμβάνεται το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα με φυγοκέντρηση του αίματος σε 375 x g για 20 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε φυγόκεντρο χωρίς φρένο. Το υπερκείμενο (πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP)), μεταφέρεται με πλαστική αυτόματη πιπέττα σε καθαρό πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml.

2η φυγοκέντρηση: παραλαβή ιζήματος αιμοπεταλίων

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

Μέτρηση των αιμοπεταλίων

Κατά τη διάρκεια της επώασης του εναιωρήματος με το ακετυλοσαλικυλικό γίνεται η μέτρηση των αιμοπεταλίων: 100 ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων προστίθενται σε 1.9 ml διαλύματος 1 % οξαλικού αμμωνίου (αραίωση 1:20). Το μίγμα ομογενοποιείται ήπια με αυτόματη πιπέττα. 10 ml δείγματος τοποθετούνται με πιπέττα και στις δύο πλευρές του αιματοκυτομέτρου (Newbauer), πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί γυάλινη καλυπτρίδα. Το αιματοκυτόμετρο τοποθετείται για 30 min σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιέχει κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με κοινό οπτικό μικροσκόπιο (Olympus) του οποίου το σύστημα Abbé βρίσκεται στην κατώτερη θέση του, χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης x 40. Τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν μικρά διαθλαστικά σωμάτια που διακρίνονται εύκολα. Γίνεται μέτρηση των αιμοπεταλίων 5 τετραγώνων (80 μικρά) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιματοκυτομέτρου. Το συνολικό άθροισμα (ΣΔ) αν πολλαπλασιαστεί επί 1000 δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος. Στη συνέχεια γίνεται υπολογισμός με τη χρήση του παρακάτω τύπου:



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

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

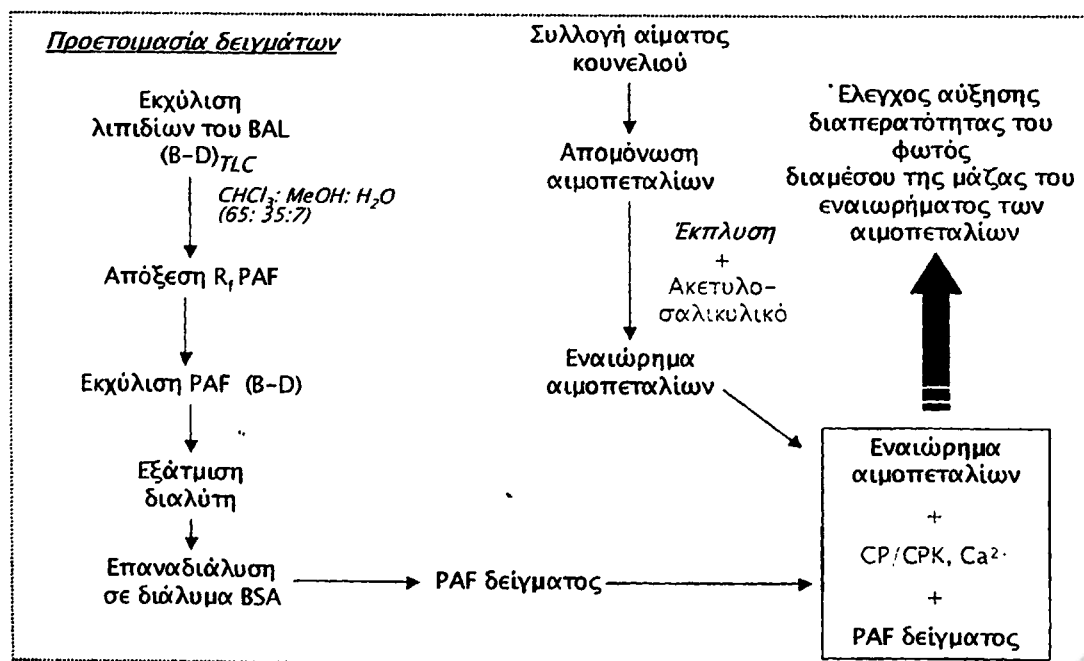
3η φυγοκέντρηση: ρύθμιση συγκέντρωσης αιμοπεταλίων

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

Έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PAF των δειγμάτων επιτυγχάνεται με μέτρηση του βαθμού συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων PAF. Η συσσώρευση έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του φωτός διαμέσου της μάζας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, η οποία μετρείται σε ειδικό νεφελόμετρο [595] (Σχήμα 39).



Σχήμα 39. Σχηματικό διάγραμμα του βιολογικού προσδιορισμού του PAF σε BAL, με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

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

Υλικά-αντιδραστήρια

βλ. σελ. 173

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα Tyrode με ζελατίνη και ασβέστιο, 2.6 mM KCl, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 137 mM NaCl, 7.6 mM Tris-HCl, 1.3 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 g/lt γλυκόζη, 0.25 % ζελατίνη και pH 7.4

Διαλύονται 195 mg KCl, 212.5 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 8 g NaCl, 1.21 g Tris-HCl, 191 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 g άνυδρης γλυκόζης και 25 ml διαλύματος 10 % ζελατίνης, σε νερό τελικού όγκου 1 lt. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4. Το διάλυμα χωρίζεται σε ποσότητες των 40 ml και διατηρείται στους $-20^\circ C$.

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης αιμοπεταλίων, pH 7.4

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

Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA

250 mg BSA διαλύονται σε 100 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα διατηρείται στους $-20^\circ C$.

Πρότυπα διαλύματα PAF

1^ο διάλυμα PAF:

Διαλύονται 10 mg PAF σε 10 ml χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1). Προκύπτει διάλυμα 1 mg/ml, ή 1.91×10^{-3} M PAF (C_{16}) και 1.8×10^{-3} M PAF (C_{18}). Γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου σε 2 δείγματα των 30 ml.



A' αραίωση PAF:

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

B' αραίωση PAF:

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

Διάλυμα εργασίας PAF, 5 και 10 pg/ml:

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

Παρατηρήσεις

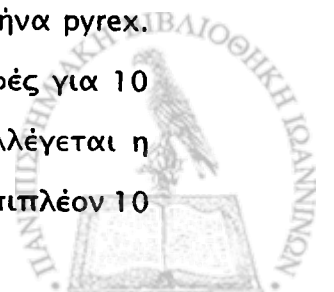
Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να πλυθούν με άλκαλι, μετά με σαπούνι, ξέπλυμα με νερό, νιτρικό οξύ, ξανά νερό και τέλος με απεσταγμένο νερό. Στα πώματα τοποθετείται αλουμινόχαρτο για την αποφυγή ρύπανσης αυτών με PAF.

Πειραματική πορεία

Επεξεργασία δειγμάτων

Εκχύλιση των λιπιδίων του BAL

Ποσότητα δείγματος BAL ίση με 9 ml εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer (βλ. σελ. 164) με προσθήκη 10 ml μεθανόλης και 10 ml χλωροφορμίου σε γυάλινο σωλήνα pyrex. Αφού γίνει ανάδευση για 1 min το μίγμα φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 10 min, έτσι ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση και η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη επιπλέον 10



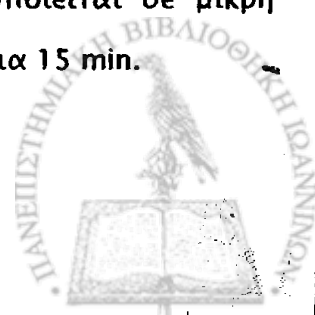
ml χλωροφορμίου στην υδατομεθανολική φάση. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα ενώνονται και εξατμίζονται σε ρεύμα N_2 .

TLC

Το λιπιδικό υπόλειμμα που βρίσκεται στον γυάλινο σωλήνα επαναδιαλύεται δύο ή τρεις φορές σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου (100 ml) και τοποθετείται σε πλάκα TLC ποσοτικά (Silica gel 60, 20 x 20 cm, Merck). Στην πλάκα τοποθετούνται, επίσης, πρότυπα διαλύματα λιπιδίων: PC, λυσο-PC, σφιγγομυελίνης. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται σε κορεσμένο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος περιέχει μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σε αναλογία (65:35:7, v/v). Αφήνεται για ανάπτυξη για 50-60 min περίπου. Αφού εξατμιστούν οι διαλύτες από την πλάκα, αυτή ψεκάζεται με διάλυμα TNS (βλ. Διαλύματα, σελ. 168) και οι περιοχές των λιπιδίων γίνονται ορατές με υπεριώδες φως.

Εκχύλιση του PAF

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



Ρύθμιση του συσσωρευόμετρου

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

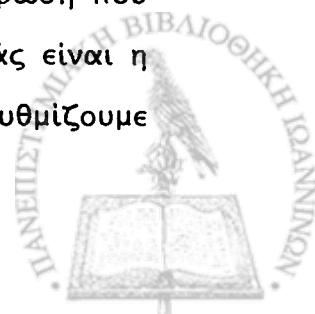
Ρυθμίσεις οργάνου

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

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

Πρότυπη καμπύλη/Προσδιορισμός του EC₅₀

Σε γυάλινη κυψελίδα συσσώρευσης, που περιέχει ειδικό μαγνητάκι, προστίθενται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, pH 7.4, και 100 μl του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 1 min. Στη συνέχεια προστίθενται αυξανόμενοι όγκοι (μερικά μl) των προτύπων διαλυμάτων PAF (C16:0) και καταγράφονται οι συσσωρεύσεις. Αν το λιπίδιο είναι διαλυμένο σε 60 % αιθανόλη δεν μπορούμε να υπερβούμε τα 10 μl. Αν είναι διαλυμένο σε BSA δεν υπάρχει περιορισμός όγκου αρκεί να μη μεταβάλλεται σημαντικά ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Δοκιμάζονται ποσότητες προτύπου διαλύματος PAF από 10 pg ως 50 pg, ώστε να βρεθεί η περιοχή γραμμικής απόκρισης η οποία ποικίλει ανάλογα με το πειραματόζωο. Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέσο της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς είναι η ημίσεια αποτελεσματική συγκέντρωση (effective concentration, EC₅₀). Ρυθμίζουμε ώστε οι τιμές να βρίσκονται γύρω στο EC₅₀ για να είναι αξιόπιστες.



Μέτρηση των δειγμάτων

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

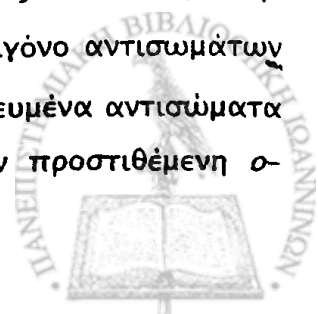
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

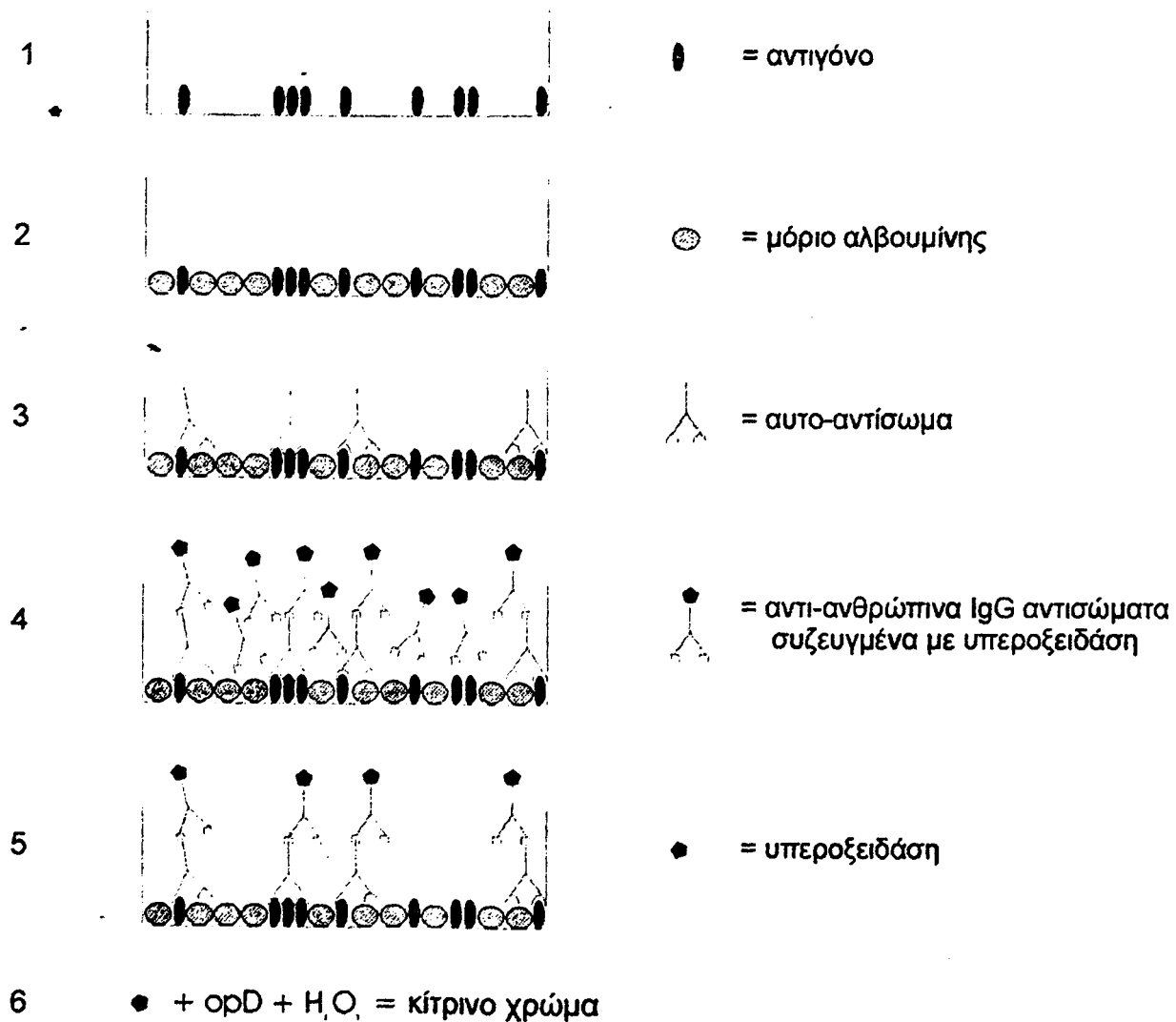
ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (ELISA)

Αρχή της μεθόδου

Αρχικά, το αντιγόνο προστίθεται στην κυψελίδα της πλάκας και δεσμεύεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις με το πλαστικό υλικό. Η δέσμευση αυτή είναι ισχυρή με αποτέλεσμα την ακινητοποίηση και μη απομάκρυνσή του με την έκπλυση της πλάκας (Σχήμα 40-1). Προσθήκη διαλύματος BSA καλύπτει τα κενά της πλάκας τα οποία δεν είχαν καλυφθεί από το αντιγόνο (Σχήμα 40-2). Αν το δείγμα που προστίθεται στη συνέχεια περιέχει αντισώματα κατά του συγκεκριμένου αντιγόνου, αυτά θα δεσμευτούν (Σχήμα 40-3). Με την έκπλυση της πλάκας απομακρύνονται όλα τα υπόλοιπα συστατικά που δεν δεσμεύτηκαν με το αντιγόνο. Η προσθήκη των συζευγμένων με υπεροξειδάση αγριοραπανιού (horseradish peroxidase) αντιανθρωπίνων IgG αντισωμάτων που γίνεται ακολούθως, έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση της Fc περιοχής των ήδη δεσμευμένων με το αντιγόνο αντισωμάτων (Σχήμα 40-4). Η έκπλυση της πλάκας απομακρύνει τα μη δεσμευμένα αντισώματα (Σχήμα 40-5) και η υπεροξειδάση ανάγει στη συνέχεια την προστιθέμενη ο-



φαινυλενοδιαμίνη (ορD) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, με αποτέλεσμα την παραγωγή χρώματος που φωτομετρείται στα 490 nm [596] (Σχήμα 40-6). Η ένταση του χρώματος εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα των αντισωμάτων που περιείχε το δείγμα.



Σχήμα 40. Σταδιακή αναπαράσταση της ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA.

Αντιδραστήρια

- ❖ Φωσφορικό οξύ, (H₃PO₄, ortho-phosphoric acid 85 %, M. B.: 98, d 20/4 1.70, SDS France)
- ❖ NaCl (M.B.: 58.5, Merck)



- ❖ H_2SO_4 (M.B.: 98, Merck)
- ❖ NaOH (M.B.: 40, Merck)
- ❖ Εξάνιο, (Labscan)
- ❖ Πλάκες ELISA πολυστυρένιου (Nunc)
- ❖ Αλβουμίνη ορού βοός, (BSA, Bovine Serum Albumin, 100 g, A-9647, Sigma)
- ❖ Tween 20, (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate, 100 ml, P-7949, Sigma)
- ❖ Anti-human IgG, (Peroxidase Conjugate Antibody developed in Goat, Fc specific, 1 ml, A-0170, Sigma)
- ❖ *ο*-φαινυλενοδιαμίνη, (o-phenylenediamine-dihydrochloride $C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$, M. B.: 181.1, 25 g, P-1526, Sigma)
- ❖ Υπεροξειδιο του υδρογόνου, (H_2O_2 , Hydrogen Peroxide 30 % w/w, 100 ml, H-1009, Sigma)
- ❖ Κιτρικό οξύ, ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, citric acid monohydrate, M. B.: 210.1, C-7129, Sigma)
- ❖ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, (di-sodium hydrogenophosphate, M. B.: 358.14, 28028.29 Prolabo)
- ❖ PC, (L- α , phosphatidylcholine, dipalmitoyl, 20 mg/ml, Sigma)
- ❖ PG, (L- α , phosphatidyl-DL-glycerol, dioleoyl, 10 mg/ml, P-9664, Sigma)
- ❖ PS, (L- α , phosphatidyl-L-serine, 10 mg/ml, P-6641, Sigma)
- ❖ PI, (L- α , phosphatidylinositol, ammonium salt, 10 mg/ml, Sigma)
- ❖ PE, (L- α , phosphatidylethanolamine, Sigma)
- ❖ PA, (phosphatidic acid, Sigma)
- ❖ λυσο-PC, (lyso-phosphatidylcholine, Sigma)
- ❖ Sph, (sphingomyelin, Sigma)
- ❖ CL, (cardiolipin, Sigma)
- ❖ Χοληστερόλη (Sigma)
- ❖ Εστεροποιημένη χοληστερόλη (Sigma)



Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα 10 N NaOH

Ζυγίζονται 40 g στερεού NaOH και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml νερού. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει. Διατηρείται σε πλαστικό δοχείο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M, NaCl 9 %, pH 7.2 (PBS)

Σε περίπου 700 ml νερό διαλύονται 6.8 ml H_3PO_4 και 90 g NaCl. Αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.2 ο όγκος συμπληρώνεται με νερό στο 1 λίτρο και διορθώνεται το pH. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.01 M, NaCl 9 %, pH 7.2 (PBS)

100 ml του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) 0.1 M, NaCl 9 %, pH 7.2, αραιώνονται με νερό σε τελικό όγκο 1000 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 0.01 M PBS/0.05 % Tween-20, pH 7.2

Σε όγκο 1 λίτρου του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) 0.01 M προστίθεται 0.5 ml Tween-20. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 1 % BSA σε 0.01 M PBS, pH 7.2

1 g BSA προστίθεται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 0.01 M. Το διάλυμα αφήνεται προς ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να διαλυθεί η BSA. Διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα αντι-ανθρώπινων IgG αντισωμάτων 1:10 000 σε διάλυμα 0.05 % Tween-20/0.01 M PBS, pH 7.2

Τα συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ανθρώπινα IgG αντισώματα διαμοιράζονται σε όγκους των 10 ml σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf χωρητικότητας 100 ml και φυλάσσονται στους -20 °C. Μετά την απόψυξή τους διατηρούνται στους 4 °C για 5-6 ημέρες. Τρία ml (2.4 μg) αντι-ανθρώπινων IgG αντισωμάτων αραιώνονται σε τελικό όγκο 30 ml διαλύματος 0.05 % Tween-20/0.01 M PBS. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M κιτρικών-φωσφορικών, pH 5.5

Ζυγίζονται 10.505 g κιτρικού οξέος και 17.907 g ένυδρου μονόξινου φωσφορικού νατρίου ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$). Διαλύονται σε τελικό όγκο 500 ml νερού αφού πρώτα ρυθμιστεί το pH σε 5.5. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.



**Διάλυμα 1 mg ο-φαιτυλενοδιαμίνης και 1 μl H₂O₂ / ml ρυθμιστικού διαλύματος
κιτρικών 0.1 M, pH 5.5**

30 mg ο-φαιτυλενοδιαμίνης και 30 μl διαλύματος H₂O₂ προστίθενται σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 0.1 M, pH 5.5. Παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα 4N H₂SO₄

Πειραματική πορεία

Επίστρωση των πλακιδίων με λιπίδια

Παρασκευάζονται διαλύματα λιπιδίων, συγκεντρώσεων 0.1, 50 και 500 μg /ml εξανίου, λίγο πριν τη χρήση τους. Ποσότητες διαλυμάτων λιπιδίων ίσες με 100 μl τοποθετούνται με αυτόματη πιπέττα στα κελιά της πλάκας ELISA. Η πλάκα αφήνεται προς εξάτμιση του διαλύτη, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό διαρκή ανακίνηση [596].

Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, η πλάκα επωάζεται με διάλυμα 1 % BSA σε 0.01 M PBS, pH 7.2 για 30 min στους 20 °C και υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται και γίνεται έκπλυση της πλάκας 3 φορές με διάλυμα 0.01 M PBS/0.05 % Tween-20, pH 7.2.

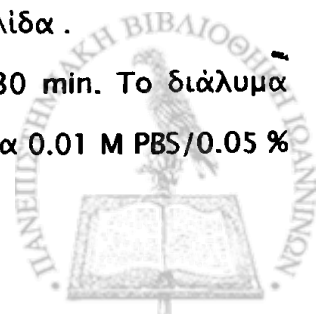
Προσθήκη δειγμάτων BAL ή ορρού

300 μl δείγματος BAL ή ορρού, αραιωμένων 1/3 και 1/60 αντιστοίχως με διάλυμα 0.01 M PBS/0.05 % Tween-20, pH 7.2, προστίθενται σε κάθε κυψελίδα της πλάκας ELISA. Τα δείγματα επωάζονται υπό συνεχή ανακίνηση για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί απόχυση και έκπλυση της πλάκας 3 φορές με διάλυμα 0.01 M PBS/0.05 % Tween-20, pH 7.2.

Επώαση με αντι-ανθρώπινα IgG αντισώματα

300 μl διαλύματος αντι-ανθρωπίνων IgG αντισωμάτων 1:10 000 σε διάλυμα 0.05 % Tween-20/0.01 M PBS, pH 7.2 προστίθενται σε κάθε κυψελίδα.

Η πλάκα τοποθετείται σε θάλαμο επώασης 37 °C για 30 min. Το διάλυμα αποχύνεται και γίνεται έκπλυση της πλάκας 3 φορές με διάλυμα 0.01 M PBS/0.05 % Tween-20, pH 7.2.



Ανίχνευση δεσμευμένων αντισωμάτων

Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 300 μl διαλύματος 1 mg ο-φαινουλενοδιαμίνης και 1 μl H₂O₂ / ml ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών 0.1 M, pH 5.5. Η πλάκα αφήνεται στο σκοτάδι για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου, για να αναπτυχθεί το χρώμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 μl διαλύματος 4 M H₂SO₄. Η απορρόφηση μετρείται στα 496 nm σε φωτόμετρο MR5000 Dynatech.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Υπολογίζουμε τη μέση τιμή των απορροφήσεων των διπλών δειγμάτων καθώς και των τυφλών δειγμάτων (κελιά στα οποία δεν είχε προστεθεί δείγμα). Από τη μέση τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος αφαιρείται η τιμή του τυφλού. Αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, η τιμή αυτή λαμβάνεται υπόψη ως μηδέν.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ 12 %

ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)

Αρχή της μεθόδου

Ηλεκτροφόρηση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός φορέα. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η τριβή εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται ευρέως ως μέσα μετακίνησης, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και το μέγεθος των πόρων τους μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου. Τα μόρια που είναι μικρά, μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους.

Σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν κυρίως βάσει της μάζας τους. Οι πρωτεΐνες



διαλύονται πρώτα σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ανιόντα SDS δεσμεύονται σε αναλογία μορίων SDS/αμινοξέων 1:2. Έτσι, το σύμπλοκο SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης αποκτά ένα πολύ μεγάλο αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης να καθίσταται αμελητέο. Η απόσταση, στην οποία θα μετακινηθούν οι πρωτεΐνες είναι ανάλογο με το λογάριθμο της μάζας τους.

Αντιδραστήρια

- ❖ Γλυκίνη, (M. B.: 75.07, Merck)
- ❖ 30 % Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1, 500 ml, 161-0158, Biorad
- ❖ TEMED, (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, M. B.: 116.2, T-8133, Sigma)
- ❖ Υπερθειϊκό αμμώνιο, (Ammonium Persulfate, M. B.: 228.2, A-3678, Sigma)
- ❖ Σελοφάν για στέγνωμα των gels, (διαστάσεις 24 x 30 cm, κωδ. 620003, POLY-LABO)
- ❖ Πρότυπα μοριακά βάρη, (Wide Molecular Weight Range, Sigma M-4038, (205 / 116 / 97 / 84 / 66 / 55 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14.2 / 6.5 kDa)
- ❖ Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M. B.: 60,053, Carlo Erba Reagenti)
- ❖ Μεθανόλη (MeOH, M. B.: 32.04, Labscan)
- ❖ Αιθανόλη, (M. B.: 46, Labscan)
- ❖ Tris-base, (M. B.: 121.14, Merck)
- ❖ Κουανούν της βρωμοφαινόλης
- ❖ Κουανούν του Coomassie R-250 (Coomassie brilliant blue R-250, C₄₅H₄₄N₃O₇S₂Na M. B.: 826, B-0149, Sigma)
- ❖ SDS, (C₁₂H₂₅O₄SNa)
- ❖ Μερκαπτοαιθανόλη
- ❖ Γλυκερόλη



Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.025 M Tris-base, 0.192 M γλυκίνης, 0.1 %

SDS, pH 8.3

12 g Tris-base, 57.6 g γλυκίνης και 40 ml διαλύματος SDS 10 % προστίθενται σε νερό και ρυθμίζεται το pH σε 8.3.

Ο όγκος συμπληρώνεται στα 4 λίτρα. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 1.5 M, pH 8.8 ζυγίζονται 36.3 g Tris-base και διαλύονται σε 200 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH σε 8.8 με διάλυμα HCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 0.5 M, pH 6.8

Ζυγίζονται 3 g Tris-base και διαλύονται σε 50 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH σε 6.8 με διάλυμα HCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 0.125 M, pH 6.8

Διάλυμα SDS 10 %

Ζυγίζονται 50 g SDS και διαλύονται με νερό σε τελικό όγκο 500 ml. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακρυλαμίδιο/Δις-ακρυλαμίδιο 30 %

Ζυγίζονται 58.4 g ακρυλαμιδίου και 1.6 g δις-ακρυλαμίδιο. Διαλύονται με νερό μέχρι τελικού όγκου 200 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτάδι στους 4 °C.

Διάλυμα εμπορίου N,N-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη TEMED

Υπερθειικό αμμώνιο 10 %

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

Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0.25 w/v

2.5 mg βρωμοφαινόλης διαλύονται σε 1 ml νερού.

Διάλυμα μερκαπτοαιθανόλης

Ποσότητες 2.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-base 0.125 M, pH 6.8, 4 ml διαλύματος SDS 10 %, 2 ml γλυκερόλης, 1 ml μερκαπτοαιθανόλης και 0.5 ml νερού αναμιγνύονται. Προστίθενται λίγα ml του διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης για χρωματισμό. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε ποσότητες του 0.5 ml σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf και φυλάσσεται στους -20 °C



Διάλυμα 12 % αιθανόλης

Αναμιγνύονται 60 ml αιθανόλης με 440 ml νερού. Φυλάσσεται στους -4°C .

Διάλυμα χρωματισμού 1 % κυανού του coomassie R-250

Δύο g κυανού του coomassie R-250 διαλύονται σε 200 ml νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα χρωματισμού 0.125 % κυανού του coomassie R-250, 50 % μεθανόλης, 10 %

οξικού οξέος

Αναμιγνύονται 250 ml μεθανόλης, 50 ml οξικού οξέος και 62.5 ml διαλύματος χρωματισμού 1 % κυανού του coomassie R-250. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 500 ml.

Διάλυμα αποχρωματισμού

Αναμιγνύονται 300 ml μεθανόλης, 50 ml οξικού οξέος και 650 ml νερού.

Πειραματική πορεία

Παρασκευή των πηκτωμάτων

Πήκτωμα διαδρομής (resolving gel)

Σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα διαλύματα με τη σειρά που εμφανίζονται (Πίνακας 12). Επειδή το διάλυμα του υπερθειϊκού αμμωνίου είναι αυτό το οποίο εκκινεί τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου, πρέπει να προστίθεται τελευταίο. Αμέσως μετά την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου, τοποθετούμε το μίγμα του πηκτώματος διαδρομής ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Το ύψος της πρέπει να φτάνει μέχρι 0.5 cm περίπου κάτω από το χτένι. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια γυάλινης πιπέττας pasteur, προσθέτουμε νερό, πολύ προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου, μέχρι να σχηματίσει στοιβάδα ύψους 3-4 mm περίπου. Το στάδιο αυτό αποβλέπει στην προστασία του πηκτώματος από την επαφή της με τον αέρα. Αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου (30 min περίπου).



Πίνακας 12. Ποσότητες διαλυμάτων που απαιτούνται για την παρασκευή των πήκτωμάτων.

	Ποσότητες (μl) I Πήκτωμα διαδρομής	Ποσότητες (μl) I Πήκτωμα επιστοιβάσης
H ₂ O	1750	1525
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 1.5 M, pH 8.8	1250	0
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 0.5 M, pH 6.8	0	625
SDS 10 %	50	25
Ακρυλαμίδιο 30%	2000	325
TEMED	2.5	2.5
Υπερθειικό αμμώνιο	25	25
Τελικός όγκος	5 ml	2.5 ml

Πήκτωμα επιστοιβάσης (stacking gel)

Αφού πολυμεριστεί το πήκτωμα διαδρομής, αποχύνουμε το νερό αναποδογυρίζοντας τη συσκευή πάνω σε απορροφητικό χαρτί. Μεταξύ των γυάλινων πλακών τοποθετείται χτένι ώστε μόλις το πήκτωμα επιστοιβάσης πολυμεριστεί να δημιουργηθούν οι θέσεις όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Αναμιγνύουμε τα διαλύματα για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάσης και με τελευταία την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου, το μίγμα τοποθετείται πάνω στην ήδη πολυμερισμένο πήκτωμα διαδρομής, μέχρι να καλύψει όλον τον υπόλοιπο κενό χώρο. Σε λιγότερο από μιάμιση ώρα το υλικό πολυμερίζεται. Με τον πολυμερισμό ο όγκος του υλικού μπορεί να μειωθεί ελάχιστα και να μείνει κάποιος χώρος κενός. Στην περίπτωση αυτή, παρασκευάζεται λίγη επιπλέον ποσότητα μίγματος. Αφού το πήκτωμα επιστοιβάσης πολυμεριστεί το χτένι αφαιρείται. Προσθέτουμε λίγο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.025 M Tris-base, 0.192 M γλυκίνης, 0.1 % SDS, pH 8.3, για να μην παραμείνει το πήκτωμα σε επαφή με τον αέρα και στεγνώσει, μέχρι να τοποθετηθούν τα δείγματα.



Προετοιμασία των δειγμάτων

Ποσότητα δείγματος BAL ή ορού που περιέχει 15 μg πρωτεΐνης τοποθετείται σε βιδωτούς πλαστικούς σωλήνες erpendorf όπου προστίθεται ίση ποσότητα διαλύματος μερκαπτοαιθανόλης. Ο μέγιστος τελικός όγκος του μίγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε θέση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 30 μl . Επωάζονται στους 100 $^{\circ}\text{C}$ για 3 min, για να γίνει η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το ίδιο γίνεται και στα πρότυπα δείγματα μοριακών βαρών.

Τοποθέτηση των δειγμάτων

Ετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Αφαιρείται το χτένι από το πήκτωμα, το σύστημα των πλακών αποσυνδέεται από την βάση στήριξής του και τοποθετείται στην θέση του μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γεμίζουμε τον χώρο μεταξύ των 2 πηκτωμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.025 M Tris-base, 0.192 M γλυκίνης, 0.1 % SDS, pH 8.3 καθώς και τον εξωτερικό χώρο των πηκτωμάτων μέχρι ύψος 5 cm περίπου. Τα δείγματα παραλαμβάνονται και τοποθετούνται αργά με αυτόματη πιπέττα και με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης, στις ειδικές θέσεις που έχουν δημιουργηθεί με το χτένι, οι οποίες είναι γεμάτες με το ρυθμιστικό διάλυμα. Στο πρώτο ή/και στο τελευταίο κυψελίδα τοποθετούνται τα διαλύματα των προτύπων μοριακών βαρών.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 200 volts, 0.04 ampere για 30 min περίπου. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν η κυανή χρωστική που περιέχεται σε όλα τα δείγματα φτάσει στο τέλος του πηκτώματος διαδρομής.

Χρώση των πρωτεϊνών του πηκτώματος

Μόλις η ηλεκτροφόρηση τελειώσει, οι πλάκες αποσυνδέονται από τη θέση στήριξής τους. Το πήκτωμα μεταφέρεται προσεκτικά σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρώσης. Αφήνεται για 1 ώρα περίπου, ή και περισσότερο, υπό συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο τέλος της χρώσης, οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να έχουν σκούρο κυανού χρώμα.



Αποχρωματισμός του πήκτωματος

Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετείται στο διάλυμα αποχρωματισμού. Αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό συνεχή ανακίνηση, μέχρι να μείνουν χρωματισμένες στον επιθυμητό βαθμό μόνον οι ζώνες των πρωτεϊνών.

Στέγνωμα και στερέωση του πήκτωματος

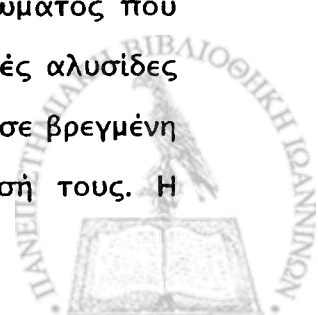
• Το ειδικό σελοφάν εμβαπτίζεται στο διάλυμα 12 % αιθανόλης για 2-3 min. Η μισή επιφάνεια του απλώνεται πάνω σε ένα πλαίσιο (ή σε πλαστική τετράγωνη επιφάνεια) ενώ η υπόλοιπη μισή προεξέχει προς τα κάτω. Οι διαστάσεις του πλαισίου πρέπει να είναι μικρότερες από το μισό των διαστάσεων του σελοφάν. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στο σελοφάν, στο κέντρο του πλαισίου, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Το σελοφάν που προεξέχει αναδιπλώνεται, σκεπάζοντας το πήκτωμα με τον ίδιο τρόπο, ενώ οι άκρες του διπλώνονται πίσω από το πλαίσιο. Ένα ακόμη πλαίσιο στερεώνεται πάνω στο προηγούμενο με τη βοήθεια συνδετήρων. Το δεύτερο πλαίσιο πρέπει να εφάπτεται με το σελοφάν μόνο στην πάνω, αριστερή και δεξιά πλευρά. Τα πλαίσια με το πήκτωμα τοποθετούνται κάθετα και αφήνονται για 2-3 ημέρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή για 12-16 ώρες σε ρεύμα αέρα [597].

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ IgG

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης αναπτύχθηκε για να γίνει δυνατή η ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρητο πήκτωμα και ο διαχωρισμός τους από τις άλλες πρωτεΐνες με όμοιο καθαρό φορτίο.

Αρχικά γίνεται μετουσιωτική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του δείγματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία ισχυρού ανιοντικού απορρυπαντικού (SDS). Τα μετουσιωμένα αντισώματα μετακινούνται σε περιοχές του πήκτωματος που αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη των 25 και 50 kDa (ελαφρές και βαριές αλυσίδες αντιστοιχώς). Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε βρεγμένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF όπου διατηρείται η διαμόρφωσή τους. Η



μεταφορά πραγματοποιείται είτε με άσκηση πίεσης στο πήκτωμα που εφάπτεται στη μεμβράνη (παθητική μεταφορά), είτε εφαρμόζοντας ηλεκτρικό ρεύμα.* Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα των αντι-ανθρώπινων IgG αντισωμάτων και ακολουθεί προσθήκη του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει λουμινόλη, η οποία οξειδούμενη εκπέμπει ακτινοβολία. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στις ανοσοσφαιρίνες αποτυπώνονται στη συνέχεια σε φωτογραφικό φιλμ.

Αντιδραστήρια-υλικά

- ❖ Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών
- ❖ Διηθητικό χαρτί, (Filter paper, Grade 1F 200 x 250 mm, M 944600, Pharmacia)
- ❖ Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF, (NEF-1000, Polyscreen, Oupont)
- ❖ Anti-human IgG, (Peroxidase Conjugate Antibody developed in Goat, Fc specific, 1 ml, A-0170, Sigma)
- ❖ Αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας λουμινόλης, (Enhanced Luminol Reagent, Botle 1, Oxidising Reagent, Botle 2)
- ❖ Autoradiography films 18 x 24 cm, NEF 485, 563 4016 579 2, DUPONT)
- ❖ Υγρό εμφάνισης των φιλμς, (Hydroquinone X-ray developer, pH 9-12, 328091C, KODAK LX 24)
- ❖ Υγρό στερέωσης των φιλμς, (X-ray fixer, pH 3-6, 328092B, KODAK AL 4)

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

2.93 g γλυκίνης, 5.81 g Tris-base, 3.75 ml 10 % SDS και 200 ml μεθανόλης αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 λίτρου. Διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Διάλυμα υγρού εμφάνισης των φίλμς

Αναμιγνύονται 200 ml υγρού εμφάνισης των φίλμς με 800 ml νερού. Φυλάσσεται σε πλαστική σκουρόχρωμη φιάλη στο σκοτάδι.

Πειραματικό μέρος [598]

Προετοιμασία της μεμβράνης PVDF

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα χρησιμοποιείται μεμβράνη PVDF διαστάσεων όμοιων με αυτών του πηκτώματος. Δεν πρέπει να αγγίζουμε ποτέ τη μεμβράνη με γυμνά χέρια. Η μεμβράνη διαβρέχεται με λίγη αιθανόλη ή μεθανόλη απλά για να υγρανθεί, ξεπλένεται με νερό και μετά τοποθετείται προσωρινά μεταξύ 18 διηθητικών χαρτιών (9 + 9) ίδιου μεγέθους σε ένα δοχείο το οποίο περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.

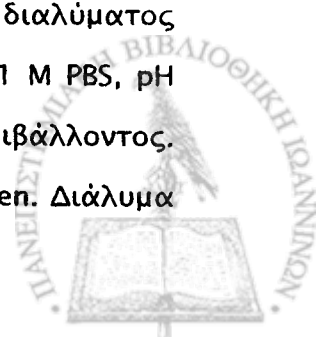
Μεταφορά των πρωτεϊνών

Στην επιφάνεια της συσκευής μεταφοράς τοποθετούνται κατά σειρά τα 9 διηθητικά χαρτιά, η μεμβράνη, το πήκτωμα και τα υπόλοιπα 9 διηθητικά χαρτιά, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Η δεύτερη πλάκα της συσκευής τοποθετείται από πάνω και η συσκευή κλείνει. Ρυθμίζεται η ένταση του ρεύματος στα 100 mA και η χρονική διάρκεια της μεταφοράς στα 50 min. Η ένταση του ρεύματος και ο χρόνος μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη εξαρτώνται από το μοριακό τους βάρος.

Με το πέρας της μεταφοράς, το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση (βλ. σελ. 192) για να διαπιστωθεί η επαρκής μεταφορά των πρωτεϊνών.

Σήμανση των IgG στη μεμβράνη

Η μεμβράνη στην οποία μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες, τοποθετείται για 30 min σε πλαστικό δοχείο το οποίο περιέχει διάλυμα BSA-Tween PBS για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Το διάλυμα αποχύνεται και γίνεται έκπλυση με PBS-tween. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 ml διαλύματος αντι-ανθρώπινων IgG αντισωμάτων 1:10000 σε 0.05 % Tween-20/0.01 M PBS, pH 7.2. Αφήνουμε για 30 min υπό ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 3 φορές με PBS-/Tween. Διάλυμα



PBS-Tween ξαναπροστίθεται και αφήνεται όλη νύχτα με ήπια ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα αποχύνεται το ρυθμιστικό διάλυμα, γίνεται έκπλυση της μεμβράνης μια φορά ακόμη και τέλος ξαναπροστίθεται λίγο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο παραμένει για να μη στεγνώσει.

Εμφάνιση των IgG

Σε σκοτεινό θάλαμο φωτογραφίας απομαρύνουμε τη μεμβράνη από το ρυθμιστικό διάλυμα και την τοποθετούμε για λίγο κατακόρυφα σε ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθούν τα υγρά. Μετά την τοποθετούμε σε καθαρό πλαστικό δοχείο. Αναμιγνύονται τα δύο διαλύματα χημειοφωταύγειας, αποχύνονται στο δοχείο με τη μεμβράνη έτσι ώστε να σκεπάζεται η μεμβράνη και παραμένουν για 1 min. Η μεμβράνη τοποθετείται μεταξύ μιας καθαρής διαφάνειας (κοινή εκτυπώσιμη διαφάνεια, διαστάσεων A4). Στη συνέχεια κόβεται ένα κομμάτι φιλμ στο μέγεθος περίπου της μεμβράνης και τοποθετείται, με γρήγορη κίνηση και κάθετα, ακριβώς πάνω από τη μεμβράνη ώστε να εφαρμόζει καλά. Το φιλμ παραμένει μερικά δευτερόλεπτα ή και παραπάνω αν χρειαστεί.

Τοποθετούμε το φιλμ σε υγρό εμφάνισης (για περίπου 3 min) μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των IgG πρωτεϊνών. Μετά ξεπλένουμε το φιλμ πολύ καλά με άφθονο νερό βρύσης πριν το τοποθετήσουμε στο δεύτερο υγρό εμφάνισης. Εκεί παραμένει για λίγα λεπτά μέχρι οι ζώνες να διακριθούν καλά και το φόντο του φιλμ να αποχρωματιστεί μερικώς (συνήθως 3 min).

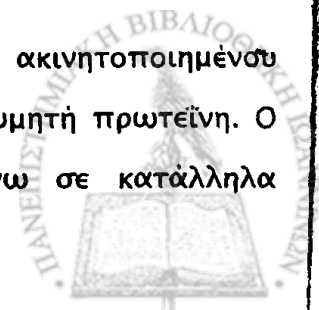
Τέλος, ξεπλένουμε το φιλμ πάρα πολύ καλά με άφθονο νερό βρύσης και το αφήνουμε να στεγνώσει στερεώνοντάς το από μια άκρη σε σχοινί στον αέρα σε θερμοκρασία δωματίου.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ IgG ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G-ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ

Αρχή της μεθόδου

Η χρωματογραφία συγγένειας σχετίζεται με τη χρήση ακινητοποιημένου φυσικού προσδέτη ο οποίος αλληλεπιδρά ειδικά με την επιθυμητή πρωτεΐνη. Ο προσδέτης ακινητοποιείται, ομοιοπολικά δεσμευμένος, πάνω σε κατάλληλα



σωματίδια (αγαρόζη, σεφαρόζη κ.α.), τα οποία μπορούν να πακεταριστούν σε μια στήλη. Στη συνέχεια το δείγμα που περιέχει την πρωτεΐνη περνάει διαμέσου της στήλης και με ειδικές αλληλεπιδράσεις συγκρατείται η πρωτεΐνη ενώ τα άλλα συστατικά περνούν ελεύθερα. Η δέσμευση της πρωτεΐνης με το φυσικό της προσδέτη οφείλεται σε δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως. Με αυτόν τον τρόπο μια πρωτεΐνη μπορεί να διαχωριστεί από μίγμα και να ανακτηθεί κατόπιν με έκλουσή της από τη στήλη με χαμηλό pH, μεταβολή της ιοντικής ισχύος του διαλύματος ή με τρόπο που μπορεί να σπάσει τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης με τον προσδέτη.

Η πρωτεΐνες A και G, που προέρχονται από τη μεμβράνη ενός σταφυλόκοκκου και στρεπτόκοκκου αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται ευρέως στη χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση και καθαρισμό των ανοσοσφαιρινών G (IgG) από βιολογικά υγρά.

Αντιδραστήρια-υλικά

- ❖ Στήλη χρωματογραφίας (Pharmacia)
- ❖ Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη G στρεπτόκοκκου. Η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε *E. coli* και από αυτή είχε απαλοιφθεί γενετικά η περιοχή των αμινοξέων που δεσμεύει την αλβουμίνη. Αυτή ήταν ομοιοπολικά δεσμευμένη με στερεή φάση σεφαρόζης 4B fast flow. Το παρασκεύασμα ήταν εναιωρημένο σε διάλυμα 20 % αιθανόλης από το οποίο χρησιμοποιήθηκε 1 ml. Η δεσμευτική ικανότητα του παρασκευάσματος ήταν 20 mg ανθρώπινων IgG ανά ml (Protein G, P-3296, Sigma).
- ❖ Φωσφορικό οξύ, (H_3PO_4 , ortho-phosphoric acid 85 %, M. B.: 98, d 20/4 .1.70, SDS France)
- ❖ Tris-base, (M. B.: 121.14, Merck)
- ❖ Γλυκίνη, (M. B.: 75.07, Merck)

Διαλύματα εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM, pH 7.4

0.68 ml φωσφορικού οξέος προστίθενται σε νερό. Αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.



Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 0.1 M, pH 2.7

Ζυγίζονται 3.7535 g γλυκίνης και διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml αφού ρυθμιστεί το pH σε 2.7. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 1.5 M, pH 8.8

Ζυγίζονται 3.633 g Tris-base και διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 20 ml αφού ρυθμιστεί το pH σε 8.8. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.

Διάλυμα 20 % αιθανόλης

20 ml αιθανόλης αραιώνονται στα 100 ml νερού.

Πειραματική πορεία

Προετοιμασία της στήλης

1 ml διαλύματος πρωτεΐνης G-σεφαρόζης τοποθετείται στη στήλη. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20 mM, pH 7.4 και στη συνέχεια η στήλη κλείνεται με προσοχή έτσι ώστε να μην υπάρχει αέρας στο εσωτερικό της. Η ροή ρυθμίζεται αντίθετα από τη φορά της δύναμης της βαρύτητας με τη βοήθεια αντλίας στο 1 ml/min. Η ευαισθησία του φωτομέτρου ρυθμίζεται στα 5 mV και η ταχύτητα του καταγραφικού στο 0.2 mm/sec. Η διαδικασία που ακολουθεί πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Προετοιμασία του δείγματος

BAL

Το δείγμα BAL συνήθως χρησιμοποιείται ως έχει, χωρίς να αραιωθεί. Σε μερικές περιπτώσεις, όταν περιέχει υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, το αραιώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM, pH 7.4 σε αναλογία 1:2.

Ορρός

Χρησιμοποιείται αραιωμένος ορρός 10 % (v/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Συγκεκριμένα, 500 μl ορρού αραιώνονται σε τελικό όγκο 5 ml.



Προετοιμασία στήλης, φόρτωση δείγματος

Η στήλη εξισορροπείται για λίγα λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM. Στη συνέχεια, περνάμε το δείγμα με την ίδια ροή και με τη βοήθεια φωτομέτρου υπεριώδους (280 nm) στην έξοδο της στήλης παρακολουθείται η μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών οι οποίες δεν συγκρατούνται από το υλικό της. Όταν τελειώσει ο όγκος του δείγματος, αλλάζουμε το σωληνάκι στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών μέχρις ότου να μην ανιχνεύονται πρωτεΐνες στην έξοδο της στήλης.

Έκλυση και συλλογή των IgG

Η έκλυση των IgG που συγκρατήθηκαν από τη στήλη γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης pH 2.7. Παρακολουθείται ξανά η μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με το φωτόμετρο στην έξοδο της στήλης. Μόλις αρχίσουμε να ανιχνεύουμε πρωτεΐνες, τοποθετούμε καθαρό διαβαθμισμένο πλαστικό σωλήνα στην έξοδο για τη συλλογή του κλάσματος των IgG. Ταυτοχρόνως με τη συλλογή, γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος Tris-base 1.5 M pH 8.8 σε κάθε μισό ml συλλεχθέντος κλάσματος, έτσι ώστε να ρυθμιστεί το pH στο 7.4. Για την πραγματοποίηση αυτού του σταδίου γίνονται προηγούμενες δομικές με τα ρυθμιστικά διαλύματα, όπου το pH ελέγχεται με ειδικό πεχαμετρικό χαρτί.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G-ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ ΤΩΝ

ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ BSA

Παρασκευή διαλυμάτων BSA με πρότυπα λιπίδια

Χοληστερόλη σε διάλυμα BSA

Διάλυμα BSA 2.5 mg/ml

Ζυγίζονται 250 mg BSA και τοποθετούνται σε γυάλινη κωνική φιάλη των 250 ml. Προσθέτονται 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.02 M φωσφορικών, pH 7.3 και το διάλυμα αναδεύεται ήπια με ήπια θέρμανση.



Διάλυμα χοληστερόλης 20 μg/ml διαλύματος BSA 2.5 mg/ml

Χρησιμοποιείται διάλυμα χοληστερόλης 5 mg/ml εξανίου. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με ζύγιση ανάλογης ποσότητας του λιπιδίου και διάλυσή του σε εξάνιο. Παραλαμβάνονται 40 μl του διαλύματος αυτού και τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα των 20 ml όπου γίνεται εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αέρος. Αμέσως προστίθενται 10 ml διαλύματος BSA 2.5 mg/ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.02 M φωσφορικών, pH 7.3. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία 40°C για 30 min.

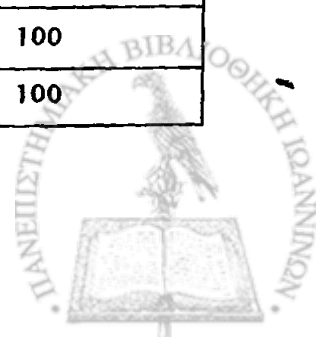
Μίγμα λιπιδίων σε διάλυμα BSA 2.5 mg/ml

Διάλυμα μίγματος λιπιδίων 13.3 μg το καθένα /ml διαλύματος BSA 2.5 mg/ml

Παραλαμβάνονται οι ποσότητες των λιπιδίων που αναγράφονται (Πίνακας 13) και τοποθετούνται σε γυάλινη φιάλη. Οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται σε ρεύμα αέρα στους 40°C.

Πίνακας 13. Λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μίγματος αυτών σε διάλυμα BSA.

Λιπίδιο	Συγκέντρωση διαλύματος λιπιδίου (mg/ml)	Ποσότητα που παραλήφθηκε (μl)
<i>PC</i>	20	10
<i>PG</i>	10	20
<i>PS</i>	10	20
<i>CL</i>	4.7	40
<i>PI</i>	10	20
<i>PA</i>	5	40
<i>PE</i>	10	20
<i>Chol</i>	5	40
<i>Sph</i>	2	20
<i>MAG (μονογλυκερίδιο)</i>	1	200
<i>TAG (τριγλυκερίδιο)</i>	2	100
<i>Λιπαρό οξύ (C18:2)</i>	2	100



Ακολουθεί η προσθήκη 15 ml διαλύματος BSA 2.5 mg/ml και το μίγμα αφήνεται στους 40 °C με ανάδευση με γυάλινη ράβδο, μέχρι να ομογενοποιηθεί. Η συνολική ποσότητα του κάθε λιπιδίου στο μίγμα είναι 200 μg.

3 μίγματα λιπιδίων σε διάλυμα BSA 4 mg/ml

Μίγματα λιπιδίων 10, 50 και 200 μg το καθένα σε 15 ml διαλύματος BSA 4 mg/ml

Παραλαμβάνονται οι ποσότητες των λιπιδίων που αναγράφονται (Πίνακας 14) και τοποθετούνται σε γυάλινη φιάλη. Οι οργανικοί διαλύτες εξατμίζονται σε ρεύμα αέρα στους 40 °C. Ακολουθεί η προσθήκη 15 ml διαλύματος BSA 4 mg/ml και το μίγμα αφήνεται στους 40 °C με ανάδευση με γυάλινη ράβδο, μέχρι να ομογενοποιηθεί. Η συνολική ποσότητα του κάθε λιπιδίου είναι 10, 50 και 200 μg για τα μίγματα Α, Β και Γ αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των 3 διαφορετικών μιγμάτων αυτών σε διάλυμα BSA.

Λιπίδιο	Συγκέντρωση διαλύματος λιπιδίου (mg/ml)	Μίγμα Α	Μίγμα Β	Μίγμα Γ
		Ποσότητα που παραλήφθηκε (μl)		
PC	2	5	25	100
PG	10	1	5	20
PS	10	1	5	20
CL	4.7	2	10	40
PI	2	5	25	100
PA	5	2	10	40
PE	10	1	5	20
Chol	5	2	10	40
Sph	2	5	25	100
DAG	2	5	25	100
TAG	2	5	25	100



Συλλογή κλάσματος που κατακρατήθηκε από τη στήλη

Ακολουθούνται οι ίδιες ακριβώς διαδικασίες που εφαρμόζονται κατά την απομόνωση και συλλογή του κλάσματος των IgG δειγμάτων BAL και ορρών (βλ. σελ. 196, Απομόνωση των IgG με χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνης G). Μετά την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος των φωσφορικών με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης, συλλέγονται 6-9 ml εκλούσματος. Αμέσως, προστίθεται σε αυτό ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-base pH 9 (10-20 ml / 0.5 ml) έτσι ώστε το τελικό pH του εκλούσματος να είναι 7.3.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ IgG (ΜΕΘΟΔΟΣ BLIGH-DYER)

Πειραματική πορεία

Ποσότητα δείγματος IgG από 2-6 ml τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα. Προστίθενται κατά σειρά μεθανόλη και χλωροφόρμιο έτσι ώστε η τελική αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-υδατικού διαλύματος να είναι 1:1:0.9 [593]. Η διαδικασία συνεχίζεται όπως αναγράφεται στη σελ. 167.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΟΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPTLC)

Αρχή της μεθόδου

βλ. σελ. 167.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- ❖ Πλάκες HPTLC επιστρωμένες με πυριτικό οξύ, διαστάσεων 10 cm x 10 cm, (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)
- ❖ Θάλαμοι χρωματογραφίας 15 x 5 x 15 cm
- ❖ Χλωροφόρμιο (CHCl₃, M. B.: 119.38, Labscan)
- ❖ Μεθανόλη (MeOH, M. B.: 32.04, Labscan)
- ❖ Διαιθυλαιθέρας (Labscan)
- ❖ KCl (M.B.: 74.56, Ferak)



- ❖ n-προπανόλη
- ❖ Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, M. B.: 60,053, Carlo Erba Reagenti)
- ❖ PC, (L-α, phosphatidylcholine, dioleoyl, 20 mg/ml, Sigma)
- ❖ PG, (L-α, phosphatidyl-DL-glycerol, dioleoyl, 10 mg/ml, P-9664, Sigma)
- ❖ PS, (L-α, phosphatidyl-L-serine, 10 mg/ml, P-6641, Sigma)
- ❖ PI, (L-α, phosphatidylinositol, ammonium salt, 10 mg/ml, Sigma)
- ❖ PE, (L-α, phosphatidylethanolamine, Sigma)
- ❖ λυσο-PC, (lyso-phosphatidylcholine, Sigma)
- ❖ Sph, (sphingomyelin, Sigma)
- ❖ Οξικός χαλκός
- ❖ Φωσφορικό οξύ, (H_3PO_4 , ortho-phosphoric acid 85 %, M. B.: 98, d 20/4 1.70, SDS France)
- ❖ Γυάλινος θάλαμος οξικού χαλκού 30x20x30 cm

Διαλύματα

Διάλυμα KCl 0.25 %

Ζυγίζονται 250 mg KCl και διαλύονται σε 100 ml νερού.

Διάλυμα 3 % οξικού χαλκού (w/v)-8 % φωσφορικού οξέος (v/v)

8 ml πυκνού φωσφορικού οξέος και 3 g οξικού χαλκού διαλύονται σε νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα τοποθετείται στο γυάλινο θάλαμο και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πειραματική πορεία

Τοποθέτηση δειγμάτων

Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα N_2 και τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα (80-100 μl) χλωροφορμίου. Σε νοητή οριζόντια ευθεία που βρίσκεται 1.5 cm από την κάτω πλευρά της πλάκας χωρίζουμε τις περιοχές στις οποίες θα τοποθετηθούν τα προς ανάλυση δείγματα. Με χάρακα και μολύβι σημειώνουμε γραμμές μήκους 7 και 8 mm εναλλάξ ξεκινώντας από τη μια άκρη της πλάκας. Τα διαστήματα μήκους 8 mm δεν τα σημειώνουμε με μολύβι και είναι αυτά πάνω στα οποία γίνεται η τοποθέτηση των δειγμάτων. Στα διαστήματα μήκους 7 mm δεν



τοποθετείται τίποτα. Στις ακραίες περιοχές τοποθετούμε τα πρότυπα λιπίδια και στις υπόλοιπες τα δείγματα. Σε κάθε πλάκα μπορούν να τοποθετηθούν 6 δείγματα.

Θάλαμοι ανάπτυξης

Διαχωρισμός φωσfolιπιδίων

Η ανάπτυξη των φωσfolιπιδίων γίνεται σε θάλαμο που περιέχει σύστημα διαλυτών οξικός μεθυλεστέρας: n-προπανόλη: CHCl₃: MeOH: KCl 0.25 % σε αναλογία (12.5:12.5:14:5:3.5, v/v) [599].

Η πλάκα αναπτύσσεται σε κορεσμένο με ατμούς θάλαμο που περιέχει το μίγμα διαλυτών. Αφήνεται να αναπτυχθεί, μέχρι το μέτωπο των διαλυτών να φτάσει ένα εκατοστό περίπου κάτω από την κορυφή της πλάκας. Στη συνέχεια η πλάκα στεγνώνεται με θερμό αέρα για μερικά λεπτά για να εξατμιστούν πολύ καλά οι εμποτισμένοι στο πυριτικό οξύ διαλύτες.

Διαχωρισμός ουδετέρων λιπιδίων

Η ανάπτυξη των ουδετέρων λιπιδίων έγινε σε θάλαμο που περιείχε σύστημα διαλυτών εξανίου: διαιθυλαιθέρα: οξικού οξέος σε αναλογία (70:30:2, v/v) [600]. Η πλάκα στεγνώνεται όπως πριν.

Εμφάνιση λιπιδίων

Μετά το διαχωρισμό τους, τα λιπίδια απανθρακώνονται. Η πλάκα εμβαπτίζεται σε θάλαμο που περιέχει διάλυμα 3 % οξικού χαλκού (w/v)-8 % φωσφορικού οξέος (v/v) για λίγα δευτερόλεπτα, μέχρι να διαβραχεί καλά. Στη συνέχεια τοποθετείται στους 130 °C για 30 min. Οι ζώνες των λιπιδίων γίνονται ορατές αφού αποκτούν μαύρο χρώμα. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, με μέτρηση της έντασης της πυκνότητας του χρώματος των κηλίδων, είναι τα 20 ng λιπιδίων. Καλή γραμμική απόκριση της πυκνότητας των κηλίδων λαμβάνεται συνήθως σε εύρος 1-10 μg λιπιδίων περίπου [601].



ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC/MS)

Το χλωροφορμικό εκχύλισμα από το πυριτικό οξύ της πλάκας υποβλήθηκε στη συνέχεια, σε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας. Η GC/MS πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (Varian 3400) συνδεδεμένο σε σειρά με φασματογράφο μάζας Finnigan Mat TSQ700 / Dec Station 5000 / 33. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο. Χησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη OV1, μήκους 30 m και εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm. Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας έγινε στα 70 eV και ο χημικός ιοντισμός με αμμώνιο. Επελέγη πρόγραμμα γραμμικής αύξησης της θερμοκρασίας στήλης από 170 °C σε 300 °C, με ρυθμό 10 °C / min. Η θερμοκρασία εγχυτήρα ήταν 220 °C.



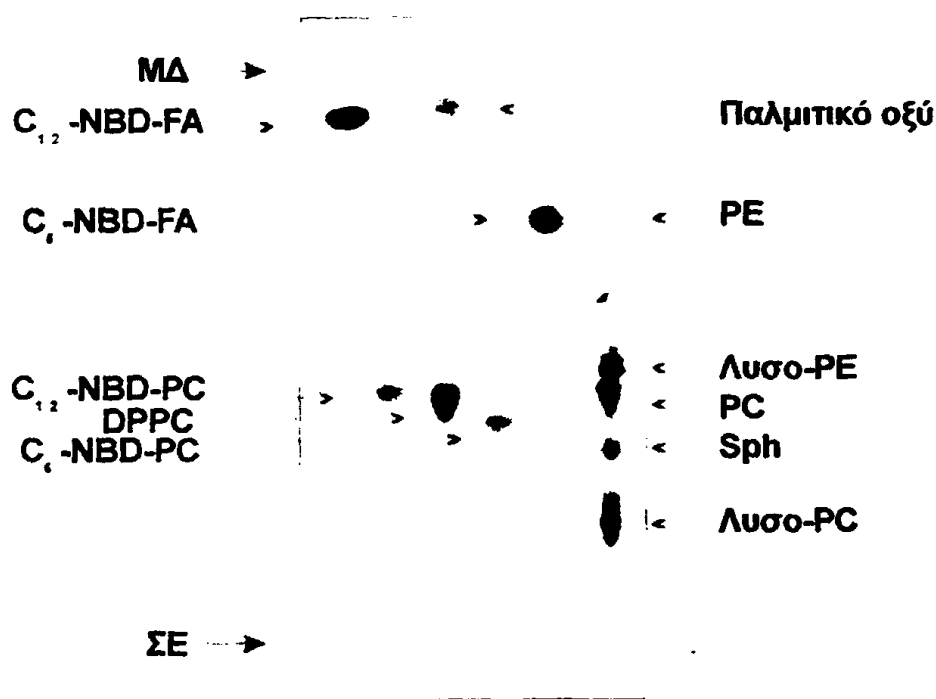
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελέτη συμπεριφοράς των προτύπων NBD-λιπιδίων

Έλεγχος καθαρότητας των NBD-λιπιδίων

Τα φθορίζοντα λιπίδια του εμπορίου που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν: C₁₂-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη (C₁₂-NBD-PC), C₆-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη (C₆-NBD-PC), C₁₂-NBD-λιπαρό οξύ (C₁₂-NBD-FA) και C₆-NBD-λιπαρό οξύ (C₆-NBD-FA). Η καθαρότητά τους ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

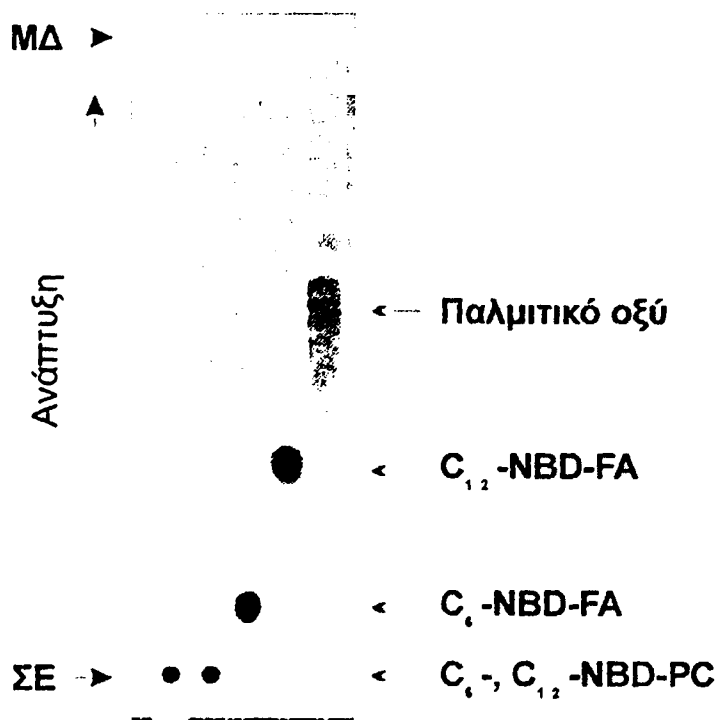


Εικόνα 11. Μετατοπίσεις λιπιδίων σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού, (65:35:7, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel. (ΣΕ = σημείο εκκίνησης, ΜΔ = μέτωπο διαλύτη).



Ανάπτυξη αυτών σε σύστημα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (65:35:7, v/v), είχε ως αποτέλεσμα τη διαφορετική μετατόπισή τους. Συγκεκριμένα, η C₁₂-NBD-PC μετατοπίστηκε σε R_f 0.40, όπως και η αυθεντική φωσφατιδυλοχολίνη (PC), ενώ η C₆-NBD-PC μετατοπίστηκε σε R_f 0.35. Το C₆-NBD-FA μετατοπίστηκε σε R_f 0.75, ενώ το C₁₂-NBD-FA σε 0.92, όπως και το αυθεντικό παλμιτικό οξύ (Εικόνα 11, Πίνακας 15).

Σε σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου-μεθανόλης-οξικού οξέος (95:5:1, v/v), τα NBD-λιπαρά οξέα διαχωρίστηκαν πολύ καλά. Το C₆-NBD-FA μετατοπίστηκε σε R_f 0.11, το C₁₂-NBD-FA σε 0.33, και το παλμιτικό οξύ σε 0.57 (Εικόνα 12). Τα λιπαρά οξέα μετακινήθηκαν κατά σειρά πολικότητας (Πίνακας 15). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι όλα τα παρασκευάσματα των φθορίζοντων NBD-λιπιδίων ήταν καθαρά.



Εικόνα 12. Μετατοπίσεις των NBD-λιπιδίων και του παλμιτικού οξέος σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου-μεθανόλης-οξικού οξέος, (95:5:1, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel. (ΣΕ = σημείο εκκίνησης, ΜΔ = μέτωπο διαλύτη).

Πίνακας 15. Μετατοπίσεις λιπιδίων σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

Λιπίδια	R_f	R_f
	C-M-W (65:35:7, v/v)	C-M-AcA (95:5:1, v/v)
C ₆ -NBD-FA	0.75	0.11
C ₁₂ -NBD-FA	0.92	0.33
Παλμιτικό οξύ	0.94	0.57
C ₆ -NBD-PC	0.35	0
C ₁₂ -NBD-PC	0.40	0
Διπαλμιτυλο-PC	0.42	0

Φάσματα διέγερσης και εκπομπής

Φάσματα διέγερσης και εκπομπής των φθορίζοντων NBD-υποστρωμάτων καθώς και των NBD-λιπαρών οξέων του εμπορίου, λήφθηκαν κάτω από διάφορες πειραματικές συνθήκες, για να βρεθούν τα μέγιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στη συγκεκριμένη συνδεσμολογία. Ελέγχθηκε επίσης η επίδραση συστατικών του μίγματος αντίδρασης στα μέγιστα μήκη κύματος εκπομπής ή διέγερσης. Αναλυτικά, έγινε καταγραφή των φασμάτων των παρακάτω μιγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl:

- 5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-PC
- 0.5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-FA
- 5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-PC + 0.5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-FA
- 0.5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-FA + BAL (50-500 μg πρωτεΐνης/ ml μίγματος αντίδρασης)
- 0.5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-FA + 100 μl ορού (αραιωμένου 1:50)
- 0.5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-FA + BSA (30-200 μg / ml μίγματος αντίδρασης)
- 5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-PC + BAL (50-500 μg πρωτεΐνης / ml μίγματος αντίδρασης)



- 5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-PC + 100 μl ορρού (αραιωμένου 1:50)
- 5 nmoles C₆-(ή C₁₂)-NBD-PC + BSA (100 μg / ml μίγματος αντίδρασης)
- 5 nmoles C₆-NBD-PC + 5 nmoles C₁₂-NBD-PC + 0.5 nmoles C₆-NBD-FA + 0.5 nmoles C₁₂-NBD-FA + 100 μl BAL + 100 μl ορρό (αραιωμένο 1:50)

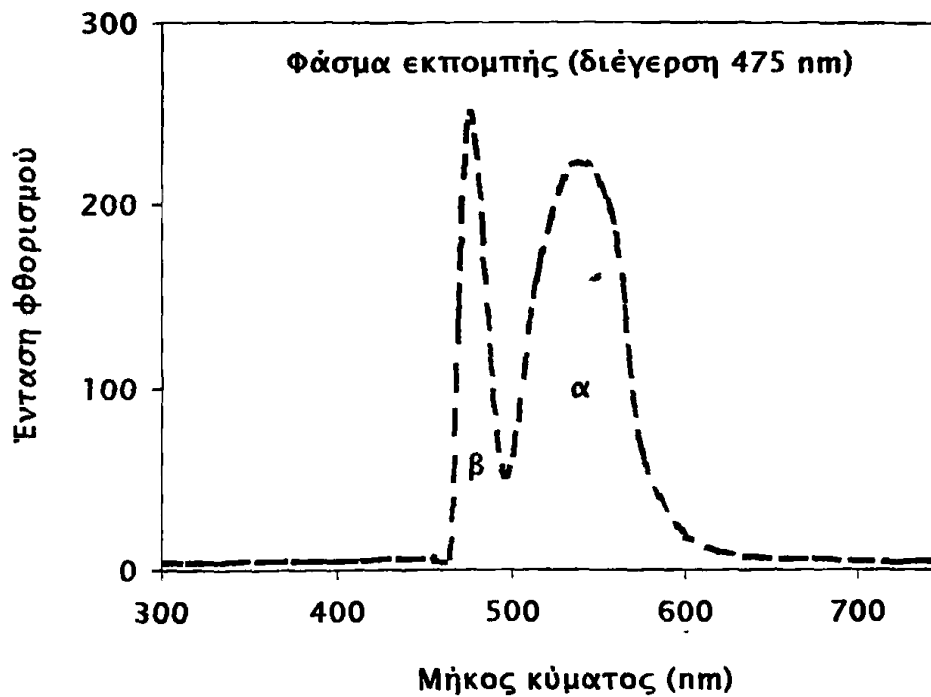
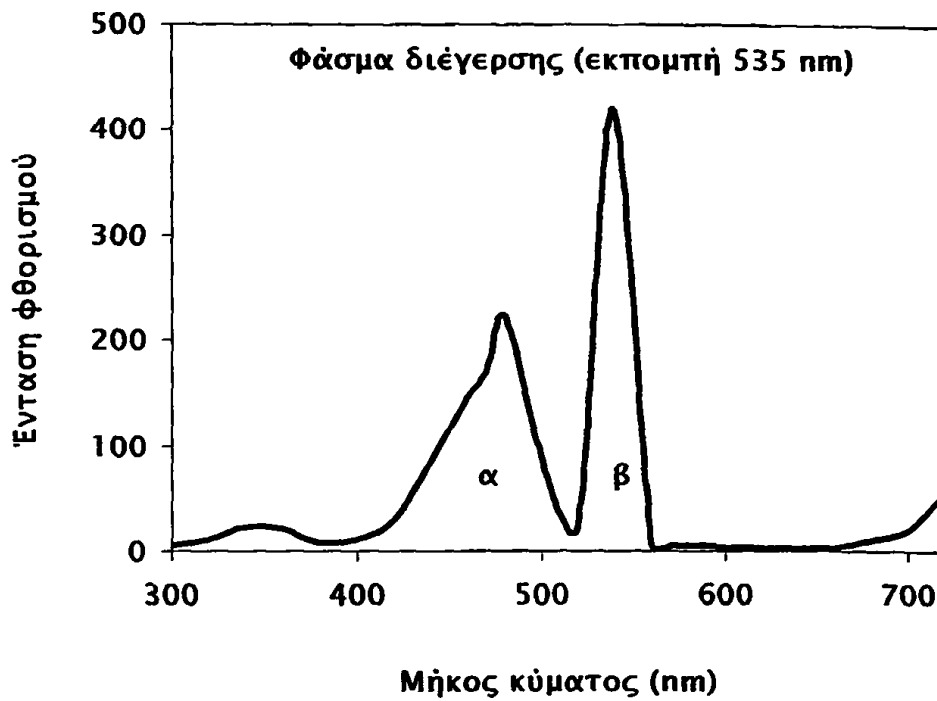
Το μήκος κύματος διέγερσης όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη εκπομπή φθορισμού για όλα τα φθορίζοντα λιπίδια βρέθηκε στα 475 nm, ενώ η μέγιστη ένταση φθορισμού παρατηρήθηκε σε μήκος κύματος 535 nm, (Σχήμα 41, Σχήμα 42).

Καμία σημαντική μετατόπιση των μεγίστων μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής δεν παρατηρήθηκε σε όλα τα παραπάνω διαλύματα των NBD-λιπιδίων παρουσία BSA, BAL ή ορρού (Σχήμα 43, Σχήμα 44, Σχήμα 45). Βρέθηκε επίσης ότι η σκέδαση Rayleigh δεν προκάλεσε σημαντική αύξηση στην ένταση της εκτρεπόμενης ακτινοβολίας του οργάνου. Η επικάλυψη με το φάσμα εκπομπής φθορισμού που παρατηρήθηκε ήταν αμελητέα.

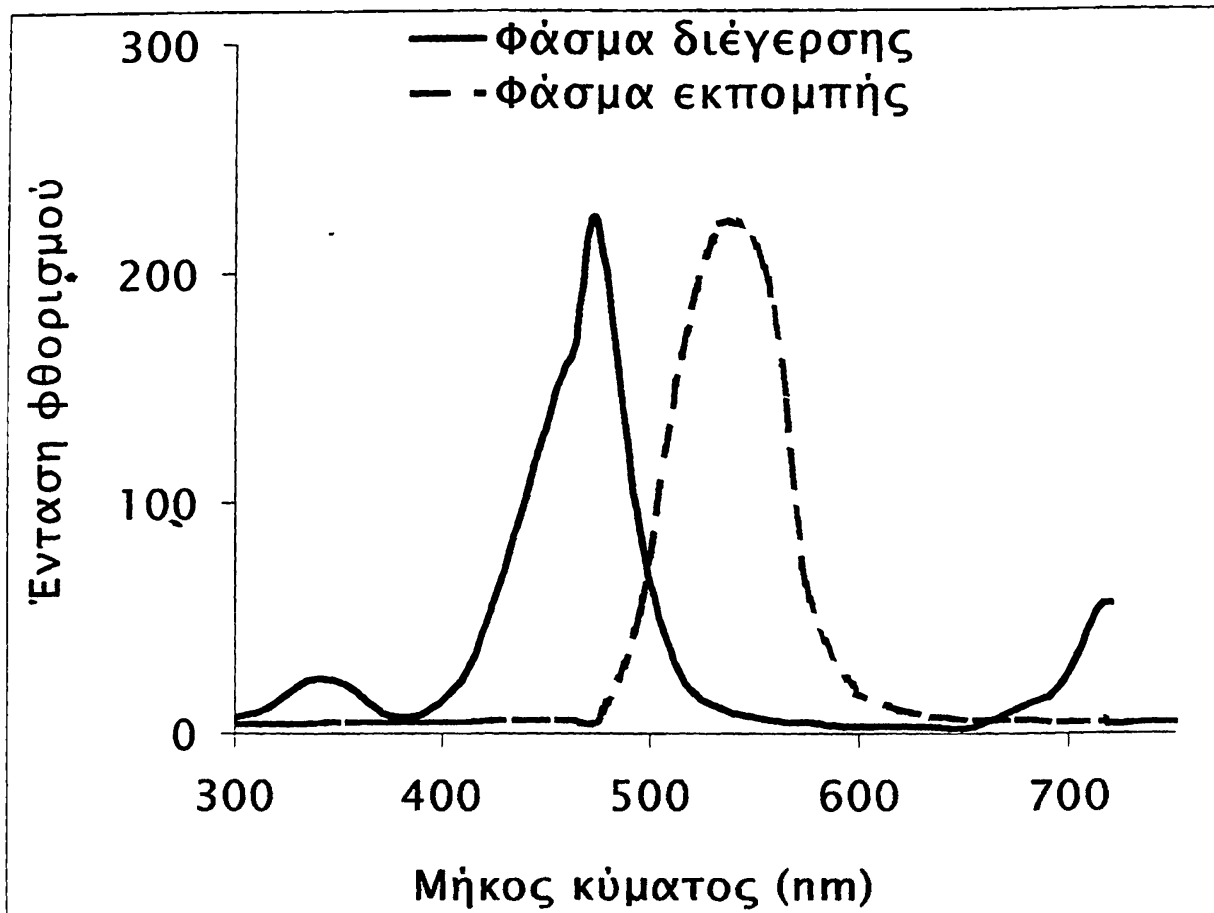
Ωστόσο, παρουσία συγκεντρώσεως BSA μεγαλύτερης των 100 μg / ml διαλύματος, το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής του C₁₂-NBD-FA μετατοπίστηκε κατά 15 nm χαμηλότερα (Σχήμα 44). Αντιθέτως, το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής των C₆-NBD-FA, C₆-NBD-PC και C₁₂-NBD-PC δεν μετατοπίστηκε. Η παρουσία ιόντων Ca²⁺ ή EDTA δεν έδειξε να επηρεάζει κανένα από τα παραπάνω αποτελέσματα.

Σημείωση: παρά το γεγονός ότι η ένταση φθορισμού είναι μέγεθος σχετικό και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά και τις ρυθμίσεις του οργάνου που χρησιμοποιείται κάθε φορά (βλ. Εισαγωγή, Ποσοτικοποίηση φθορισμού, σελ. 113), όλα τα σχήματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη έχουν κατασκευαστεί έτσι ώστε να έχουν συγκρίσιμη κλίμακα έντασης φθορισμού μεταξύ τους.

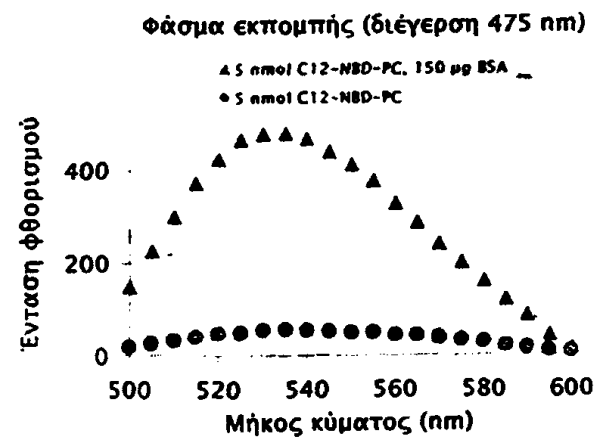
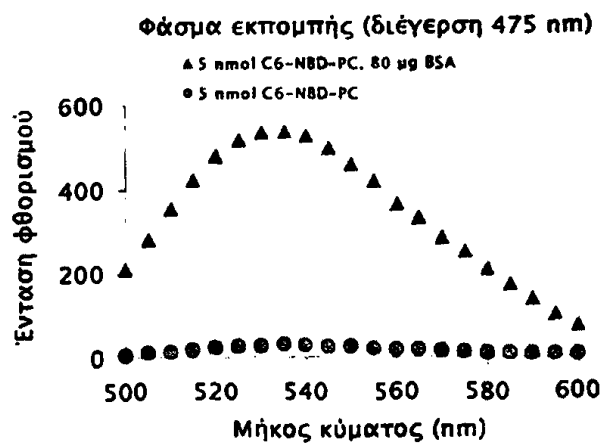
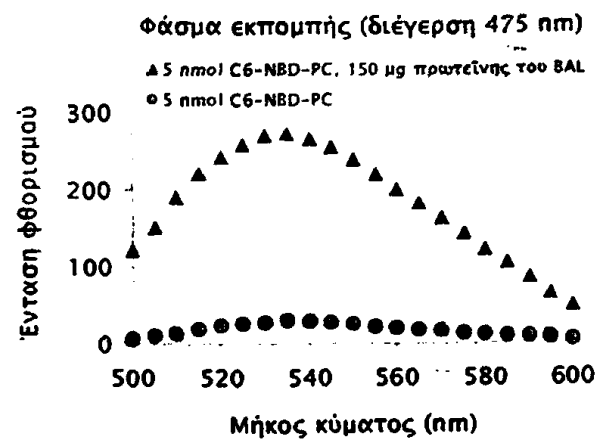
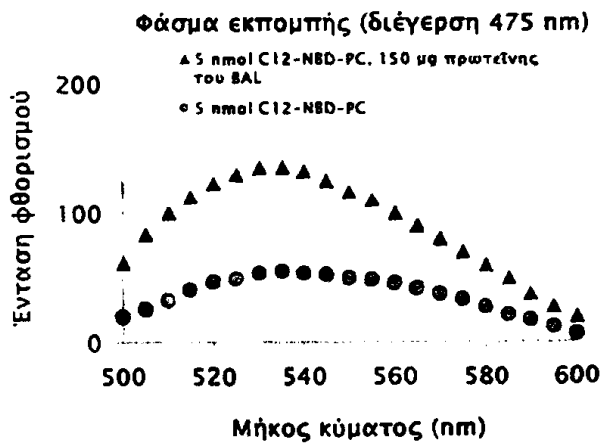
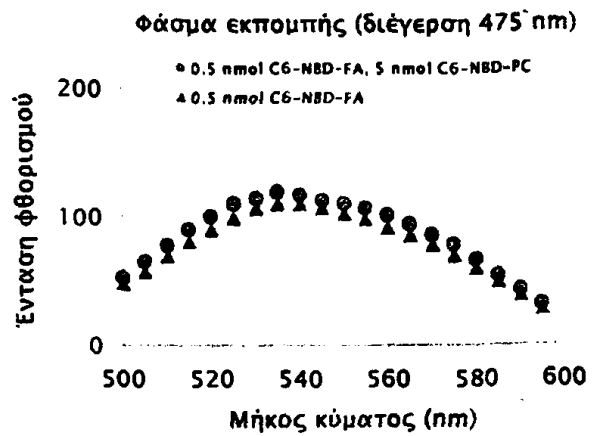
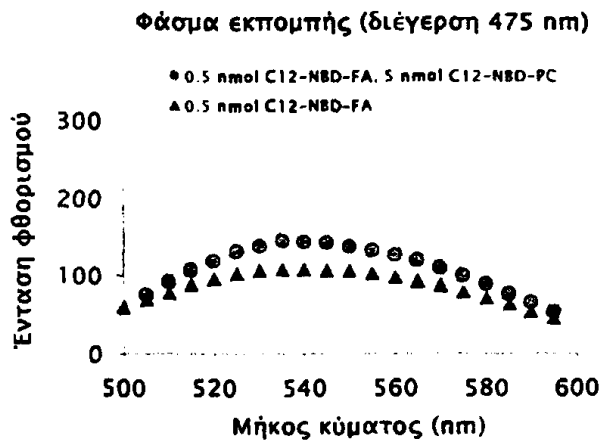




Σχήμα 41. Φάσμα διέγερσης (πάνω) και φάσμα εκπομπής (κάτω) του μίγματος των 4 φθοριζόντων λιπιδίων (2.5 μM $C_6\text{-NBD-PC}$, 0.5 μM $C_6\text{-NBD-FA}$, 2.5 μM $C_{12}\text{-NBD-PC}$, 0.5 μM $C_{12}\text{-NBD-FA}$) σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, παρουσία Ca^{2+} ή EDTA. Οι κορυφές β αντιστοιχούν στο σήμα που λαμβάνεται στην έξοδο όταν τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής συμπίπτουν (σκέδαση Rayleigh).

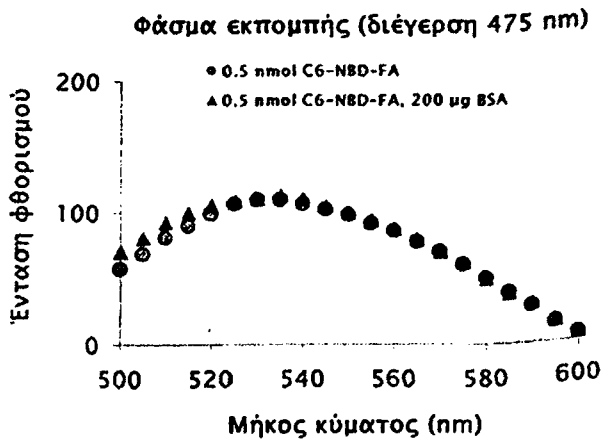
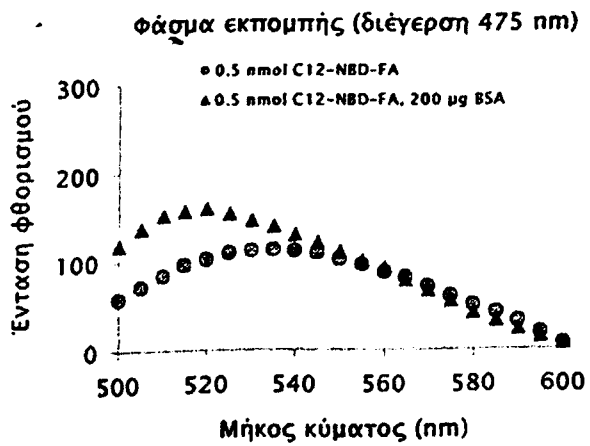
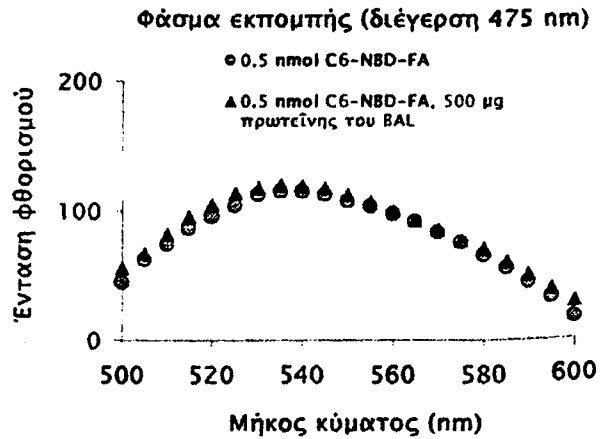
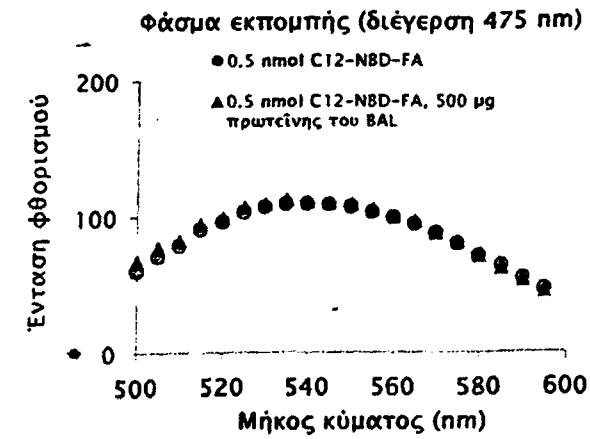


Σχήμα 42. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του μίγματος των 4 φθοριζόντων λιπιδίων ($2.5 \mu\text{M}$ $C_6\text{-NBD-PC}$, $0.5 \mu\text{M}$ $C_6\text{-NBD-FA}$, $2.5 \mu\text{M}$ $C_{12}\text{-NBD-PC}$, $0.5 \mu\text{M}$ $C_{12}\text{-NBD-FA}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία Ca^{2+} ή EDTA. Τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής καθενός λιπιδίου χωριστά είναι όμοια με αυτά σε ότι αφορά στα μέγιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής. Το σχήμα αυτό προήλθε από τη συνένωση των δύο προηγούμενων σχημάτων και αφαιρέθηκαν οι κορυφές β που οφείλονταν στη σκέδαση Rayleigh.



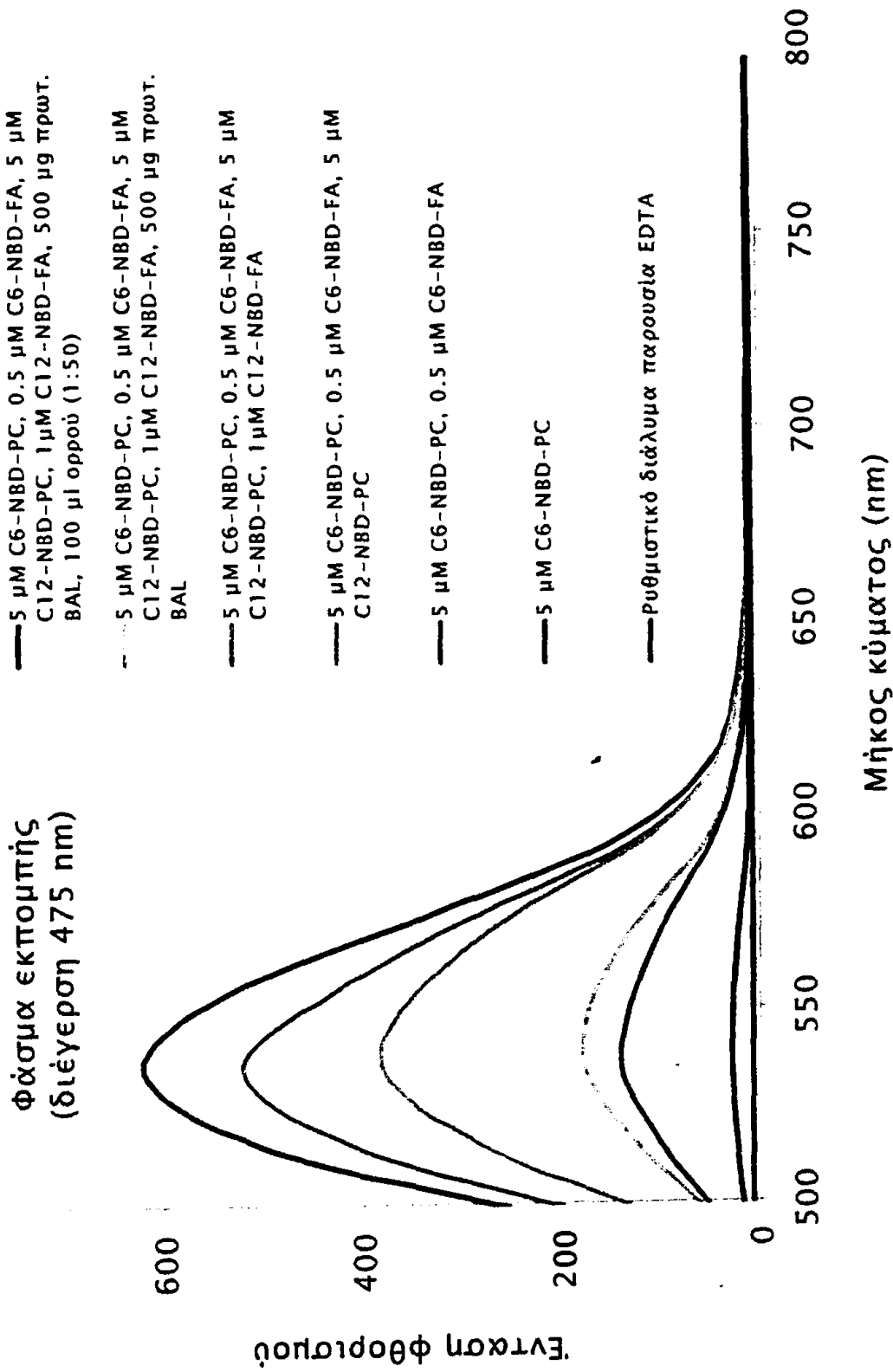
Σχήμα 43. Φάσματα εκπομπής των C12- ή C6-NBD-PCs παρουσία C12- ή C6-NBD-FAs αντίστοιχα, BAL ή BSA.





Σχήμα 44. Φάσματα εκπομπής των C12- ή C6-NBD-FAs παρουσία BAL ή BSA.

Β. Αποτελέσματα: 1) Φθορισμομετρική μέθοδος



Σχήμα 45. Φάσματα εκπομπής φθορισμού σε διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Εκχύλιση των NBD-λιπιδίων από υδατικό διάλυμα

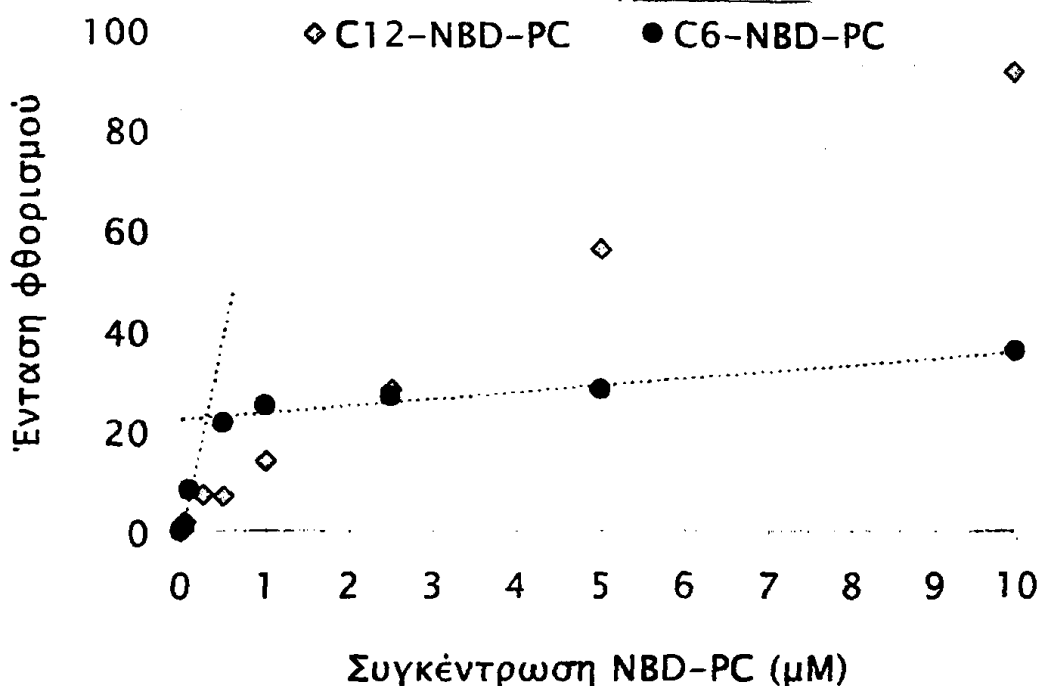
Κατά την προσπάθεια εκχύλισης των NBD-λιπιδίων από υδατικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό (1:2:0.8) σύμφωνα με τη μέθοδο Bligh-Dyer (βλ. υλικά και μέθοδοι). Παρατηρήθηκε ότι, σε ουδέτερες συνθήκες pH, τα C₆-NBD-PC, C₁₂-NBD-PC και C₁₂-NBD-FA ανακτήθηκαν ποσοτικά στη χλωροφορμική φάση, ενώ το C₆-NBD-FA παρέμεινε στην υδατομεθανολική φάση. Ωστόσο, σε όξινες συνθήκες εκχύλισης (0.1 N HCl στην υδατική φάση), τα τέσσερα φθορίζοντα λιπίδια ανακτήθηκαν ποσοτικά στην οργανική φάση του χλωροφορμίου. Για το λόγο αυτό, εφαρμόστηκαν όξινες συνθήκες εκχύλισης των NBD-λιπιδίων σε όλα τα πειράματα που ακολούθησαν.

Προσδιορισμός κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης

Όπως είναι γνωστό, τα φωσφολιπίδια σε υδατικό περιβάλλον και σε χαμηλές συγκεντρώσεις βρίσκονται με τη μορφή μονομερών, ενώ πάνω από μια κρίσιμη τιμή συγκέντρωσης, σχηματίζουν μικύλλια.

Η φωσφολιπίδαση A₂ δρα κατά προτίμηση σε οργανωμένες λιπιδικές στοιβάδες, όπως η εξωτερική επιφάνεια των μικυλλίων [418]. Ήταν επομένως αναγκαίος ο προσδιορισμός της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης (critical micellar concentration, CMC) για να γνωρίζουμε εάν τα φωσφολιπίδια βρίσκονται στο διάλυμα με τη μορφή μικυλλίων. Έτσι, έγινε προσπάθεια υπολογισμού της CMC των C₆- και C₁₂-NBD-PC. Για το σκοπό αυτό τα φωσφολιπίδια προστέθηκαν υπό τη μορφή αιθανολικού διαλύματος στο υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της έντασης φθορισμού. Η γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του φωσφολιπιδίου δίνει δύο ευθύγραμμα τμήματα των οποίων οι προεκτάσεις τέμνονται στο σημείο που αντιστοιχεί η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (βλ. υλικά και μέθοδοι).



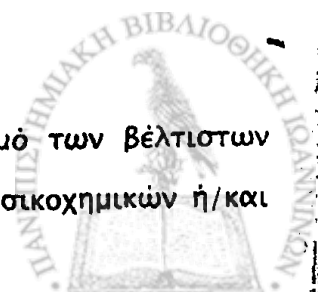


Σχήμα 46. Κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC) των C₆-NBD-PC στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε 10 mM Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ και αυξανόμενες συγκεντρώσεις C₆-NBD-PC ή C₁₂-NBD-PC αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Η απόκλιση των μετρήσεων από τη μέση τιμή ήταν μικρότερη από ±10 %.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 46 η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση της C₆-NBD-PC βρέθηκε να είναι 0.18 μM, ενώ της C₁₂-NBD-PC δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστεί φθορισμομετρικά. Αυτό πιθανώς συνέβη διότι η CMC του NBD-λιπαρού οξέος με τη μεγαλύτερη λιπαρή αλυσίδα είναι πιο χαμηλή από 0.18 μM και δεν μπόρεσε να καταγραφεί λόγω της έλλειψης ευαισθησίας της μεθόδου στην περιοχή αυτή. Έτσι, σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση των NBD-PCs μεγαλύτερη της CMC (5 μM).

Επίδραση διαφόρων παραμέτρων στο φθορισμό των NBD-λιπιδίων

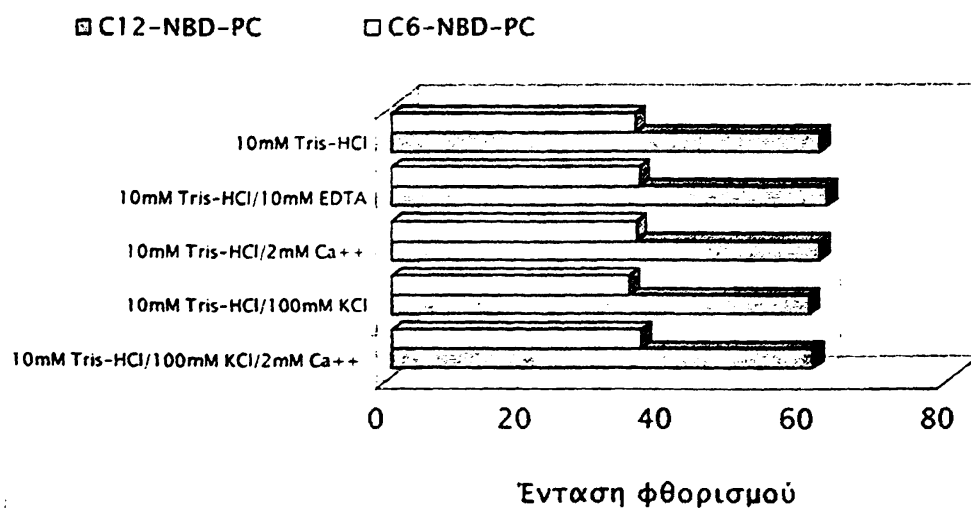
Η σειρά αυτή πειραμάτων είχε ως σκοπό τον καθορισμό των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών. Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων φυσικοχημικών ή/και



χημικών παραμέτρων (συστατικών της αντίδρασης) στον εκπεμπόμενο φθορισμό ως φυσικό μέγεθος και στη συνέχεια η επίδραση των βιοχημικών χαρακτηριστικών του ενζύμου στο φθορισμό. Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχθηκε η αξιοπιστία των μετρήσεων λαμβάνοντας υπόψη τη σκέδαση της δέσμης διέγερσης και το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.

Συστατικά του μίγματος αντίδρασης

Τα ιόντα ασβεστίου, το χλωριούχο κάλιο ή το EDTA δεν επηρέασαν το φθορισμό των διαλυμάτων σε συγκεντρώσεις 5 μM των $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$ ή $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ (Σχήμα 47).

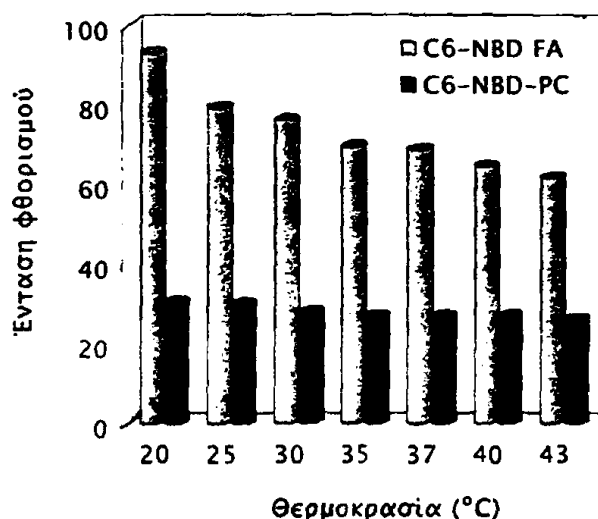


Σχήμα 47. Επίδραση ιόντων στο φθορισμό των NBD-φωσφατιδυλοχολινών. Έγινε προσθήκη 10 μl αιθανολικού διαλύματος $\text{C}_6\text{-}$ ή $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ σε 990 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl pH 7.4 παρουσία ή απουσία 10 mM σε EDTA ή 2 mM Ca^{2+} ή 100 mM KCl ή 100 mM KCl/2 mM Ca^{2+} . Ακολούθησε ανάδευση και καταγραφή της έντασης εκπομπής φθορισμού στα 535 nm. Οι τιμές της έντασης φθορισμού αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Η απόκλιση των μετρήσεων από τη μέση τιμή ήταν μικρότερη από $\pm 10\%$.

Θερμοκρασία

Παρατηρήθηκε γραμμική μείωση της έντασης του φθορισμού των NBD-οξέων με την αύξηση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, στους 43 °C η ένταση του φθορισμού μειώθηκε κατά 34 % σε σύγκριση με τους 20 °C. Η αντίστοιχη μείωση για τις NBD-PCs βρέθηκε να είναι 14 % (Σχήμα 48). Είναι γνωστό ότι τα ένζυμα έχουν βέλτιστες θερμοκρασίες δράσεις στους 37 °C περίπου. Λόγω όμως της μεγάλης μείωσης της έντασης του φθορισμού σε αυτές τις θερμοκρασίες επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 25 °C για μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας στα πειράματα που ακολούθησαν. Παρότι η ένταση του φθορισμού στους 20 °C ήταν η μεγαλύτερη, δεν επιλέχθηκε η θερμοκρασία αυτή επειδή θεωρήθηκε πολύ χαμηλή για τη δράση της PLase A₂.

Σχήμα 48. Επίδραση θερμοκρασίας στο φθορισμό των NBD-λιπιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 5 μM NBD-PC και 0.3 μM NBD-FA σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4.

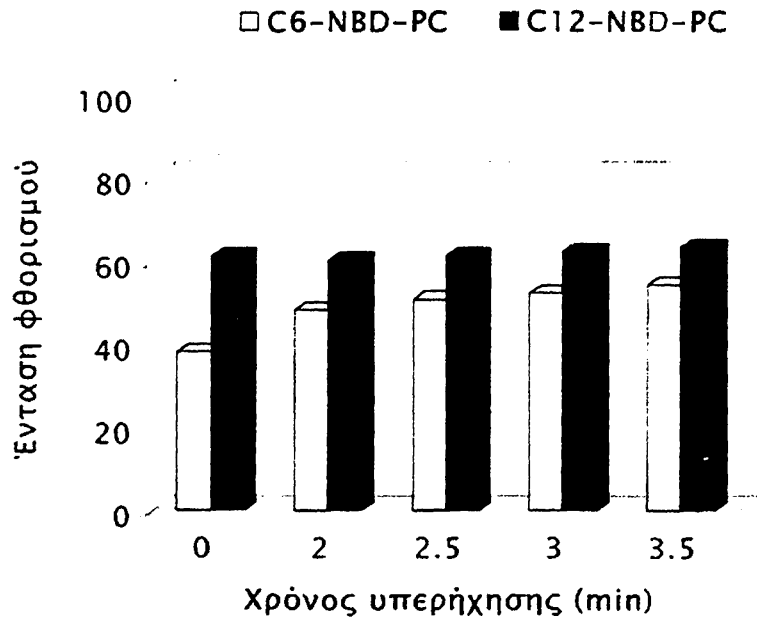


Υπέρηχοι

Για να ερευνήσουμε τη σχέση του φθορισμού με τη μικυλλιακή κατάσταση των υποστρωμάτων, μελετήσαμε την επίδραση των υπερήχων στα υδατικά διαλύματα της C₆- ή C₁₂-NBD-PC. Στα πειράματα αυτά, η συγκέντρωση των υποστρωμάτων ήταν μεγαλύτερη της CMC. Τα ερωτήματα που τέθηκαν ήταν α) κατά πόσο η διασπορά των μικυλλίων θα επηρέαζε τον εκπεμπόμενο βασικό φθορισμό των υποστρωμάτων, με τι τρόπο και β) μήπως η καλύτερη διασπορά των μικυλλίων θα ενίσχυε την ενζυμική ενεργότητα. Παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του φθορισμού της C₆-NBD-PC κατά 25 % μετά την παραμονή του διαλύματος αυτής σε λουτρό υπερήχων για 30 sec (Σχήμα 49). Αντιθέτως, η αύξηση του φθορισμού της C₁₂-NBD-PC ήταν αμελητέα. Ο φθορισμός των αντιστοιχών NBD-οξέων δεν επηρεάστηκε.

Έτσι, κρίθηκε ότι ήταν καλύτερο να μη χρησιμοποιηθεί υπερήχηση στα διαλύματα των υποστρωμάτων διότι αυτό προκαλούσε αύξηση του βασικού φθορισμού του διαλύματος της C₆-NBD-PC, η οποία δεν ήταν επιθυμητή.

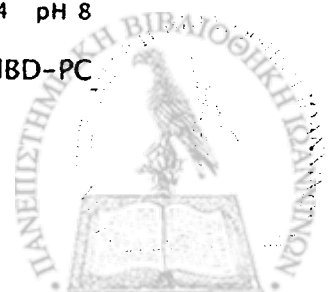
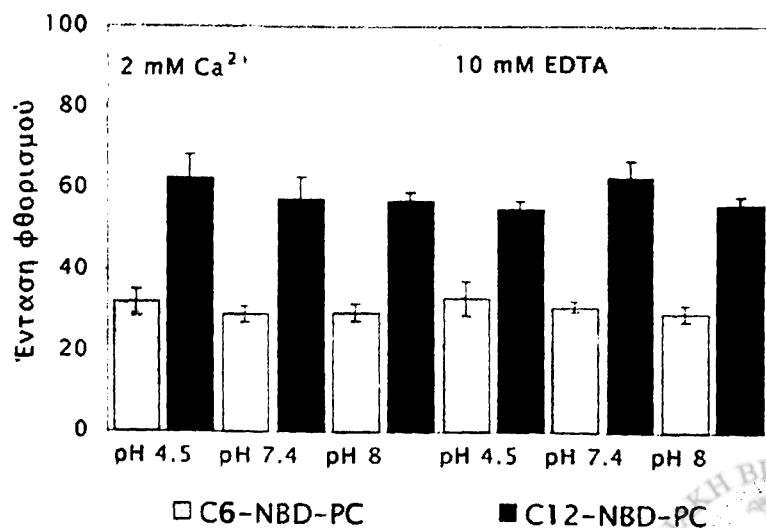
Σχήμα 49. Επίδραση υπερήχων στο φθορισμό των NBD-PCs στους 25°C. 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA ή 2 mM Ca²⁺, 5 μM C₆- ή C₁₂-NBD-PC τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.



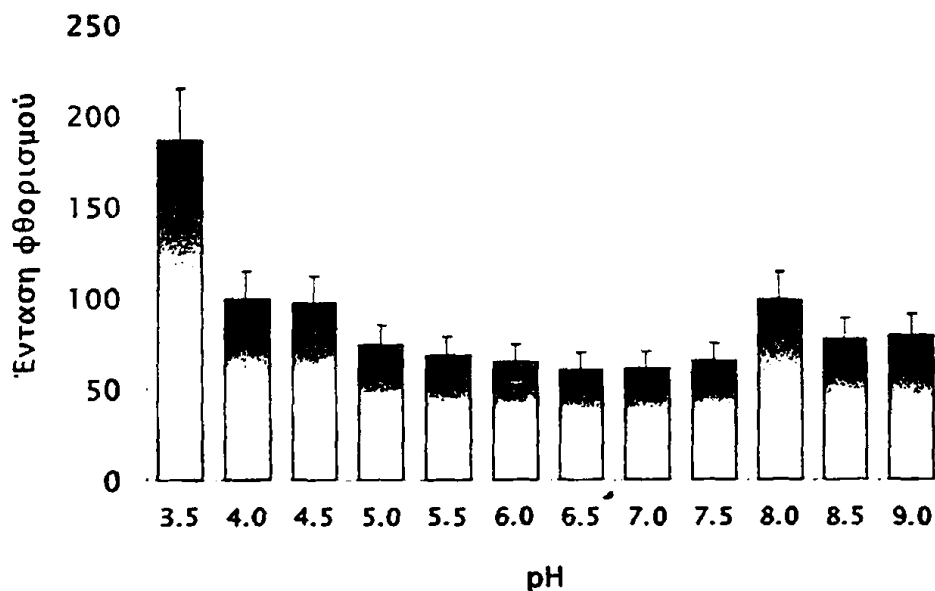
pH

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού των C₆- ή C₁₂-NBD-PC συναρτήσει του pH. Η παρουσία ιόντων Ca²⁺ ή EDTA δεν επηρέασε το φθορισμό τους σε όξινες, ουδέτερες ή αλκαλικές συνθήκες (Σχήμα 51). Στη συνέχεια, τα περισσότερα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε pH 7.4.

Σχήμα 51. Επίδραση pH, ιόντων Ca²⁺ και EDTA στο φθορισμό των NBD-PCs συγκέντρωσης 5 μM. Οι τιμές της έντασης φθορισμού αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών μετρήσεων ± SD.



Ωστόσο, παρουσία των πρωτεϊνών του BAL και σε pH 3.5 πριν την έναρξη της αντίδρασης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης το οποίο περιείχε το υπόστρωμα C₆-NBD-PC και BAL. Αυτή η αύξηση δεν αντιστοιχούσε στη δημιουργία προϊόντος, όπως επιβεβαιώθηκε από ανάλυση TLC που πραγματοποιήθηκε μετά. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του βασικού φθορισμού του υποστρώματος που κυμαίνονταν από 15-25 % σε pH 4.0, 4.5 και 8.0 σε σύγκριση με το φθορισμό σε pH 7.4. Η ένταση του φθορισμού παρέμεινε σταθερή σε pH 5.0 έως 7.0 (Σχήμα 52).

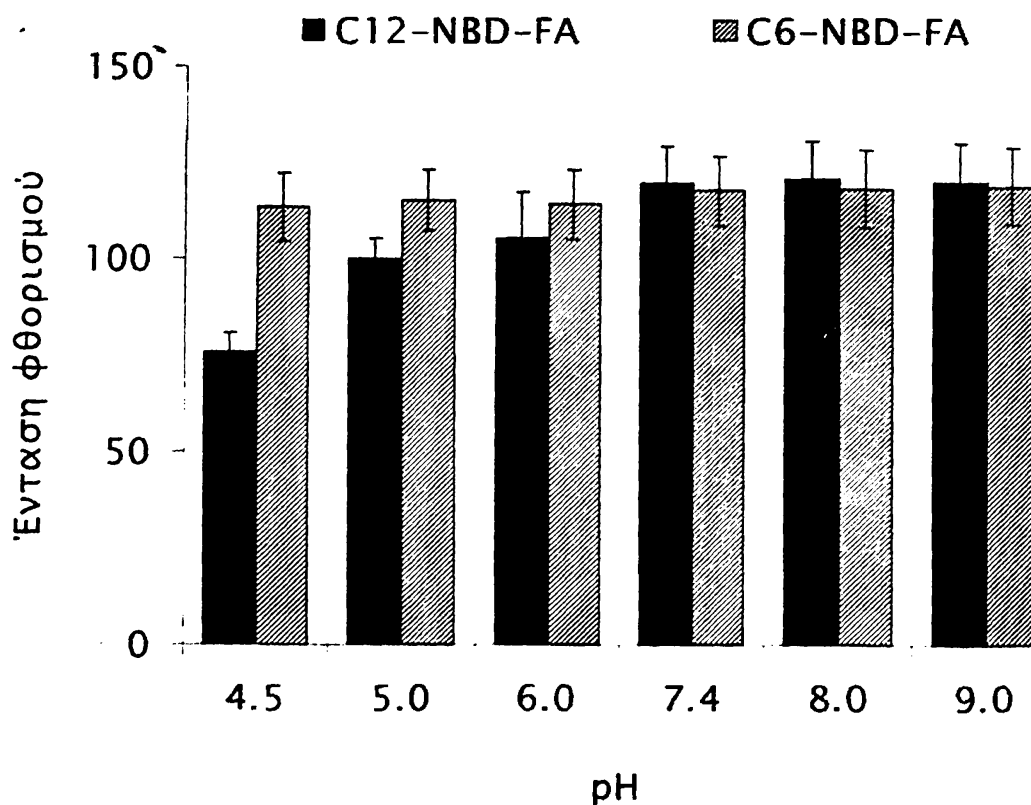


Σχήμα 52. Επίδραση pH στο φθορισμό της C₆-NBD-PC παρουσία BAL στους 25 °C: 1 ml τελικού όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος περιείχε 5 μM C₆-NBD-PC και 40 μg πρωτεΐνης του BAL. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 3.5 έως 5.5; Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 5.5 έως 7.0 και ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl για την περιοχή του pH από 7.0 έως 9.0 αντίστοιχα. Οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού λήφθηκαν πριν την έναρξη της αντίδρασης και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Ο βασικός φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις.

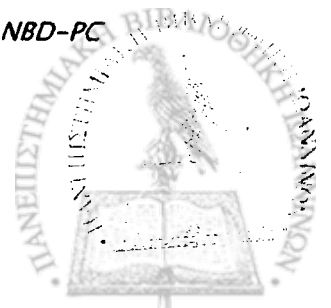


Ότι αφορά στα NBD-λιπαρά οξέα, ίδιες ποσότητες από το καθένα είχαν την ίδια ένταση φθορισμού σε ουδέτερες καθώς και σε αλκαλικές συνθήκες. Ωστόσο, ο φθορισμός του C₁₂-NBD-FA μειώθηκε σε όξινες συνθήκες παράλληλα με τη μείωση του pH του μίγματος της αντίδρασης, αντίθετα με το C₆-NBD-FA του οποίου ο φθορισμός παρέμεινε σταθερός σε όλες τις περιοχές του pH (Σχήμα 53).

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι υπάρχει μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου σε όξινες συνθήκες.

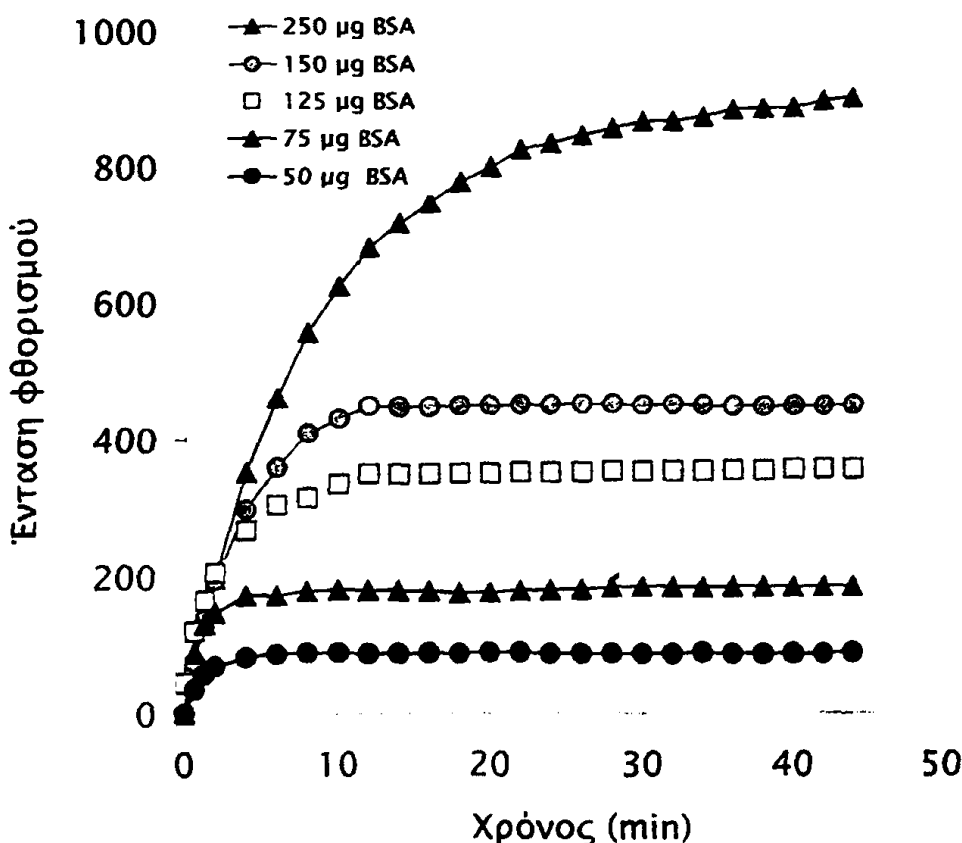


Σχήμα 53. Επίδραση pH στο φθορισμό των NBD-FAs στους 25 °C: το μίγμα επίωασης περιείχε 5 μM NBD-PC. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 3.5 έως 5.5. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 5.5 έως 7.0 και ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl για την περιοχή του pH από 7.0 έως 9.0 αντίστοιχα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών μετρήσεων. Ο βασικός φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις.



Επίδραση BSA στο φθορισμό των αυθεντικών NBD-PCs

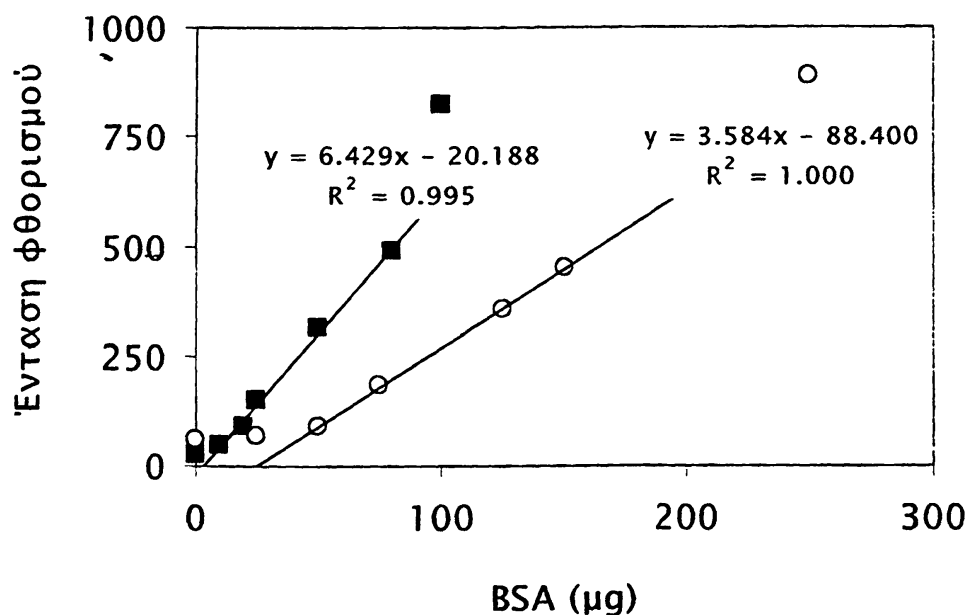
Οι πρωτεΐνες του ανθρώπινου ορού αίματος αποτελούνται κατά 50 % από αλβουμίνη, ενώ αυτή αποτελεί το 20-30 % των πρωτεϊνών του BAL. Με δεδομένο το γεγονός ότι η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει λιπίδια και συνεπώς μπορεί να επηρεάσει τη μικυλλιακή κατάσταση του υποστρώματος στο διάλυμα, ελέγχθηκε αρχικά η επίδραση προτύπων διαλυμάτων BSA.



Σχήμα 54. Επίδραση συγκέντρωσης BSA στο φθορισμό της C_{12} -NBD-PC στους 25 °C. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 2 mM Ca^{2+} ή 10 mM EDTA, 5 μ M C_{12} -NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA. Έγινε άμεση παρακολούθηση της αύξησης του φθορισμού του μίγματος. Ο βασικός φθορισμός των NBD-PC πριν την προσθήκη της BSA αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις.

Αμέσως μετά την προσθήκη BSA παρατηρήθηκε μια απότομη αύξηση του φθορισμού του διαλύματος, το οποίο περιείχε C_6 -NBD-PC ή C_{12} -NBD-PC. Ακολούθως, μετά από λίγα λεπτά, η κλίση της καμπύλης άρχισε να μικραίνει, φτάνοντας τελικά σε ένα πλατώ. Το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο η αρχική

αύξηση του φθορισμού σταθεροποιήθηκε, έδειξε μια εξάρτηση από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης (Σχήμα 54). Το επίπεδο της αρχικής αύξησης του φθορισμού, για σταθερή συγκέντρωση φθορίζοντος φωσfolιπιδίου, ήταν ανάλογο με τη συγκέντρωση της BSA. Παρατηρήθηκε γραμμικότητα στην καμπύλη έντασης φθορισμού της C₆-NBD-PC συναρτήσει της συγκέντρωσης της BSA, στην περιοχή των συγκεντρώσεων από 20 μέχρι 80 μg BSA/ml ρυθμιστικού διαλύματος. Για την C₁₂-NBD-PC, το εύρος της γραμμικότητας βρέθηκε από 50 μέχρι 150 μg BSA/ml ρυθμιστικού διαλύματος (Σχήμα 55).



Σχήμα 55. Επίδραση συγκέντρωσης BSA στο φθορισμό της C₁₂-NBD-PC και C₆-NBD-PC στους 25 °C. Το μίγμα περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ ή 10 mM EDTA, 5 μM NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την τιμή της έντασης φθορισμού που καταγράφηκε με συνεχή διέγερση του μίγματος, μετά την αποκατάσταση του πλατώ (40 min) (βλ. Σχήμα 54).

Υπολογισμός δεσμευτικής ικανότητας BSA σε μόρια NBD-PCs

Συμπεραίνεται ότι, η αύξηση του φθορισμού υδατικού διαλύματος των NBD-PCs που προκαλείται από την προσθήκη BSA πιθανώς οφείλεται στη δέσμευση κάποιων μορίων φωσφατιδυλοχολίνης από τα μόρια της BSA και μεταφορά αυτών από τη μικυλλιακή σε άλλη μορφή, πιθανώς σε μονομοριακή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού του διαλύματος πιθανώς λόγω μείωσης της σβέσης φθορισμού των NBD-PCs όταν αυτά βρίσκονται με τη μορφή μικυλλίων. Οι μονομερείς NBD-PCs παρουσιάζουν την ίδια ένταση φθορισμού με τα αντίστοιχα μονομερή NBD-FAs. Έτσι, από το παραπάνω αποτέλεσμα, θα μπορούσε να υπολογιστεί ο αριθμός των μορίων της C₆- ή C₁₂-NBD-PC που δεσμεύονται σε ένα μόριο της BSA.

Υπολογίστηκε στη συνέχεια η αύξηση φθορισμού του υδατικού διαλύματος του κάθε υποστρώματος (συγκέντρωσης 5 μM) που προκαλείται από 1 nMol BSA. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις γραμμικές περιοχές στο Σχήμα 55, με τη χρήση των εξισώσεων των ευθυγράμμων τμημάτων των καμπυλών βρέθηκε το εξής: η προσθήκη 1 μg BSA προκάλεσε αύξηση του φθορισμού του διαλύματος της C₁₂-NBD-PC κατά 3.6 μονάδες ενώ της C₆-NBD-PC κατά 6.4 μονάδες. Αν αντιστοιχήσουμε στη συνέχεια αυτές τις μονάδες έντασης φθορισμού με την ποσότητα των C₆- ή C₁₂-NBD-λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε διάλυμα με τη μορφή μονομερών, υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί σε 16.3 pMol C₁₂-NBD-FA και 29.2 pMol C₆-NBD-FA.

Έτσι, βρέθηκε ότι ένα μόριο BSA δέσμευσε δύο μόρια C₆-NBD-PC ή ένα μόριο C₁₂-NBD-PC (Πίνακας 16). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η αναλογία μορίων NBD-PC:BSA παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των NBD-PCs στη θέση sn-2. Αντίστροφη συσχέτιση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των NBD-PCs στη θέση sn-2 παρατηρήθηκε επίσης με τις κλίσεις των ευθυγράμμων τμημάτων των καμπυλών στο Σχήμα 55.

Πίνακας 16. Αναλογία μορίων NBD-PC/BSA που δεσμεύονται.

C ₆ -NBD-PC:BSA	C ₁₂ -NBD-PC:BSA
2:1	1:1



Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

Το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου μελετήθηκε σε κάθε στάδιο όπου παρατηρήθηκε μεταβολή του φθορισμού του διαλύματος. Αυτό έγινε για να διαπιστωθεί κατά πόσο η μεταβολή του φθορισμού του διαλύματος οφείλεται στην παρουσία κάποιου συστατικού ή σε άλλους φυσικοχημικούς λόγους που σχετίζονται με την αύξηση της απορρόφησης του διαλύματος στο μήκος κύματος διεγέρσης.

Έτσι, στο στάδιο αυτό, όπου παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού του διαλύματος των C_6- ή C_{12} -NBD-PC μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων BSA, μετρήθηκε η απορρόφηση των μιγμάτων των φθορίζόντων φωσφολιπιδίων με BSA. Η απορρόφηση του διαλύματος συγκέντρωσης 5 μ M C_6- ή C_{12} -NBD-PC στα 475 nm βρέθηκε να είναι της τάξεως του 0.06 και δεν παρατηρήθηκε μεταβολή με την προσθήκη χαμηλών ή υψηλών συγκεντρώσεων BSA (Πίνακας 17). Έτσι, η κάμψη της καμπύλης σε συγκεντρώσεις BSA μεγαλύτερες των 80 ή 150 μ g /ml ρυθμιστικού διαλύματος δε φαίνεται να οφείλεται σε φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.



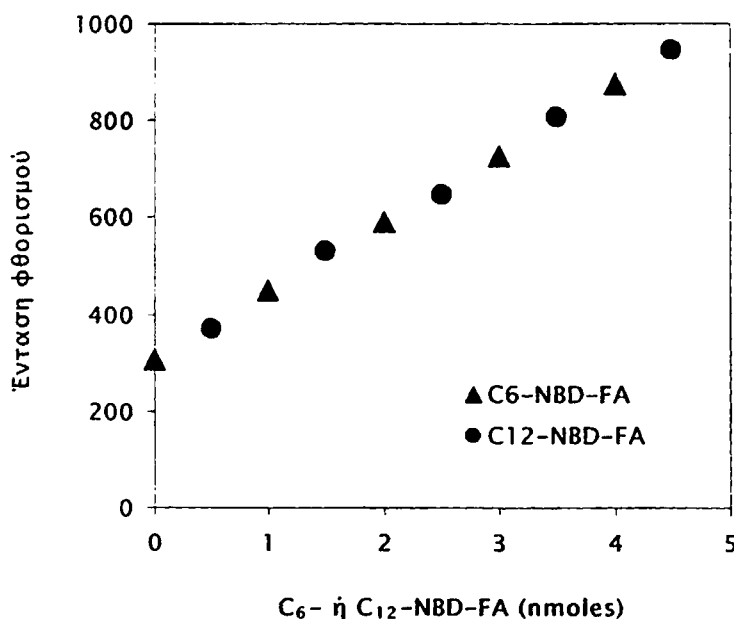
Πίνακας 17. Απορροφήσεις διαλυμάτων φθορίζοντων λιπιδίων παρουσία BSA, BAL ή ορού, στο μήκος κύματος διέγερσης (475 nm).

Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca ²⁺	A ₄₇₅	Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA	A ₄₇₅
2.5 μM C ₁₂ -NBD-PC	0.033	2.5 μM C ₆ -NBD-PC	0.028
5 μM C ₁₂ -NBD-PC	0.064	5 μM C ₆ -NBD-PC	0.061
7.5 μM C ₁₂ -NBD-PC	0.094	7.5 μM C ₆ -NBD-PC	0.090
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 0.5 μM C ₁₂ -NBD-FA	0.075	5 μM C ₆ -NBD-PC, 0.5 μM C ₆ -NBD-FA	0.071
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 1 μM C ₁₂ -NBD-FA	0.087	5 μM C ₆ -NBD-PC, 1 μM C ₆ -NBD-FA	0.083
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 1.5 μM C ₁₂ -NBD-FA	0.098	5 μM C ₆ -NBD-PC, 1.5 μM C ₆ -NBD-FA	0.096
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 500 μg πρωτεΐνης του BAL /ml	0.061	5 μM C ₆ -NBD-PC, 500 μg πρωτεΐνης του BAL /ml	0.062
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 1.5 μM C ₁₂ -NBD-FA, 500 μg πρωτεΐνης του BAL /ml	0.097	5 μM C ₆ -NBD-PC, 1.5 μM C ₆ -NBD-FA, 500 μg πρωτεΐνης του BAL /ml	0.097
5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 1.5 μM C ₁₂ -NBD-FA 80 μg BSA/ml	0.094	5 μM C ₆ -NBD-PC, 1.5 μM C ₆ -NBD-FA 80 μg BSA/ml	0.093
0.5 nmoles C ₁₂ -NBD-FA, 100 μl ορού 1:50	0.012	0.5 nmoles C ₆ -NBD-FA, 100 μl ορού 1:50	0.012



Επίδραση BAL, ορρού και BSA στο φθορισμό των αυθεντικών NBD-λιπαρών οξέων

Ποσότητα NBD-λιπαρού οξέος, ίση με 0.5 nmoles, προστέθηκε κατ' επανάληψη σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.5 μM NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA. Η αύξηση του φθορισμού του διαλύματος μετά από κάθε προσθήκη ήταν η ίδια με αυτή που παρατηρήθηκε όταν ίσες ποσότητες NBD-FAs προστέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα απουσία BAL ή ορρού (Σχήμα 56). Η γραμμικότητα της έντασης του φθορισμού διατηρήθηκε μέχρι τουλάχιστον τα 4.5 nmoles C_6 - ή C_{12} -NBD-FA / ml μίγματος αντίδρασης. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σχεδόν σε πλήρη υδρόλυση του υποστρώματος.



Σχήμα 56. Πρότυπες καμπύλες των NBD-FAs παρουσία BAL καθώς και παρουσία των δύο υποστρωμάτων στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca^{2+} ή 10 mM EDTA, 5 μM C_6 -NBD-PC, 5 μM C_{12} -NBD-PC και 100 μl BAL (500 μg πρωτεΐνης). Μετά τη σταθεροποίηση της αρχικής αύξησης του φθορισμού του υποστρώματος λόγω των πρωτεϊνών του BAL (χρόνος μηδέν), 5 ml του αιθανολικού διαλύματος των 0.1 mM C_6 -NBD-FA ή C_{12} -NBD-FA προστέθηκε στο μίγμα εναλλάξ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων.

Ωστόσο, η ένταση του φθορισμού του C_{12} -NBD-FA παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων BSA (>100 μg πρωτεΐνης ανά ml μίγματος αντίδρασης) στο μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής (το οποίο ήταν μετατοπισμένο στα 520 nm) βρέθηκε

αυξημένη κατά 50 % περίπου. Όταν όμως ο φθορισμός του διαλύματος μετρήθηκε στα 535 nm βρέθηκε να είναι ο ίδιος με αυτόν του διαλύματος χωρίς την παρουσία BSA (Σχήμα 44, σελ. 213).

Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

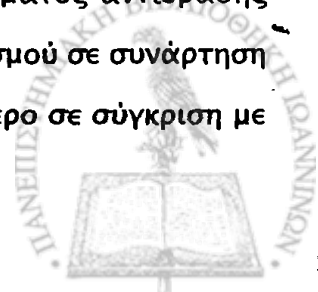
Η προσθήκη BAL ή ορρού αραιωμένου 1:50 δεν προκάλεσε αύξηση της απορρόφησης του διαλύματος που περιείχε 5 μM C_6 - ή C_{12} -NBD-PC στο μήκος κύματος διέγερσης (475 nm). Η απορρόφηση στα 475 nm του διαλύματος που περιείχε 0.5 nmoles C_6 - ή C_{12} -NBD-FA ήταν 0.012 (Πίνακας 17, σελ. 226). Επαναλαμβανόμενες προσθήκες 0.5 nmoles C_6 - ή C_{12} -NBD-FA στο μίγμα που περιείχε BSA, BAL ή ορρό προκάλεσε αύξηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 475 nm κατά τρόπο δόσο-εξαρτώμενο.

Η γραμμική απόκριση του φθορισμού διατηρήθηκε τουλάχιστον μέχρι τα 4.5 nmoles NBD-FA, παρόλο που η απορρόφηση αυτής της συγκέντρωσης στα 475 nm ήταν 0.200. Τα 4.5 nmoles του NBD-FA είναι μια συγκέντρωση που αντιστοιχεί σχεδόν στην πλήρη υδρόλυση του υποστρώματος (5 nmoles) και ήταν έξω από εύρος ανίχνευσης της μεθόδου.

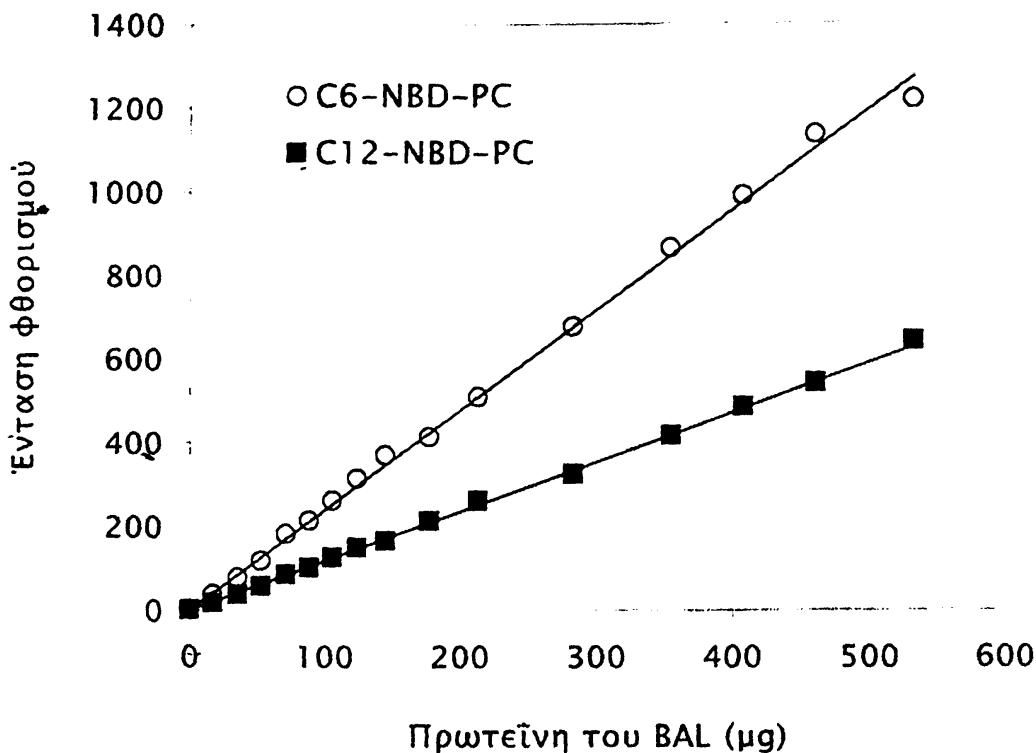
Επίδραση του BAL στο φθορισμό των NBD-PCs

Όταν προστέθηκε BAL αντί για BSA στο διάλυμα του υποστρώματος, παρατηρήθηκε μια αρχική αύξηση της έντασης του φθορισμού όμοια με αυτή που προκάλεσε η BSA, πριν την άμεση παρακολούθηση της αντίδρασης υδρόλυσης του υποστρώματος. Αυτή η αρχική αύξηση της έντασης του φθορισμού πιθανώς οφείλεται στην αλβουμίνη που περιέχει το BAL. Έτσι, ο προσδιορισμός της ενεργότητας της φωσφολιπάσης A_2 πραγματοποιήθηκε μετά της σταθεροποίησης της αλλαγής της κλίσης της καμπύλης και αποκατάσταση του πλατώ.

Το σημείο τομής των δύο ευθειών αντιστοιχεί στην αρχική αύξηση του φθορισμού (λόγω της παρουσίας των πρωτεϊνών). Παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση του αρχικού φθορισμού του υποστρώματος συναρτήσει της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του BAL μέχρι τα 500 μg πρωτεΐνης ανά ml του μίγματος αντίδρασης (Σχήμα 61). Το εύρος της γραμμικότητας της αύξησης του φθορισμού σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του BAL ήταν πολύ μεγαλύτερο σε σύγκριση με



αυτό της BSA (βλ. Επίδραση BSA στο φθορισμό των αυθεντικών NBD-PCs, σελ. 222, και Σχήμα 55).



Σχήμα 61. Επίδραση συγκέντρωσης πρωτεΐνης του BAL στο φθορισμό των NBD-PCs στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ ή 10 mM EDTA, 5 μM NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης του BAL. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την τιμή της έντασης φθορισμού που καταγράφηκε στην άμεση παρακολούθηση μετά τη σταθεροποίηση της αρχικής αύξησης του φθορισμού και πριν την παρακολούθηση της αντίδρασης.

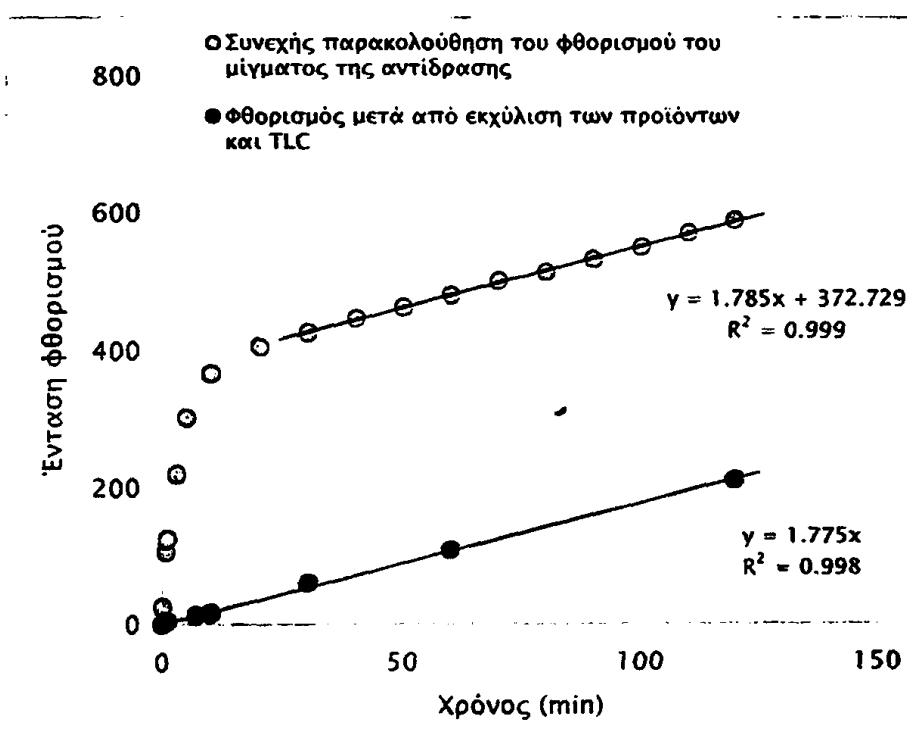
Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

Η απορρόφηση του μίγματος της αντίδρασης στο μήκος κύματος διέγερσης (475 nm) δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια των πρώτων λεπτών μετά την προσθήκη του BAL, κατά τη χρονική στιγμή δηλαδή που παρατηρείται η απότομη αύξηση του φθορισμού του διαλύματος (Πίνακας 17, σελ. 226). Επίσης, ρυθμιστικό διάλυμα με BAL και μέχρι τα 500 μg πρωτεΐνης του BAL/ml ρυθμιστικού διαλύματος, απουσία φθοριζόντων NBD-λιπιδίων, δεν έδωσε σήμα φθορισμού στα 535 nm ούτε απορρόφηση στα 475 nm.



Προσδιορισμός ενεργότητας PLase A₂ σε BAL

Μετά την αρχική αύξηση της έντασης του φθορισμού του υποστρώματος, η καμπύλη έγινε ευθεία γραμμή, με κλίση η οποία αντιστοιχούσε στην ταχύτητα παραγωγής προϊόντος. Αυτό επιβεβαιώθηκε μετά από μια σειρά πειραμάτων στα οποία, τα προϊόντα της αντίδρασης απομονώθηκαν με όξινη εκχύλιση των λιπιδίων και ανάλυση TLC, σε διάφορες χρονικές στιγμές. Η κλίση της καμπύλης που λήφθηκε με άμεση παρακολούθηση της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης βρέθηκε να είναι ίδια με αυτή μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης (Σχήμα 62).



Σχήμα 62. Ενεργότητα PLase A₂ του BAL στους 25 °C. Α) Συνεχής παρακολούθηση του φθορισμού (στα 535 nm) του μίγματος της αντίδρασης με συνεχή διέγερση στα 475 nm και Β) μέτρηση του φθορισμού του προϊόντος της αντίδρασης το οποίο είχε απομονωθεί και διαχωριστεί με ανάλυση TLC, σε διάφορες χρονικές στιγμές. Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺· 5 μM C₆-NBD-PC και 100 μl BAL ως πηγή του ενζύμου.

Έτσι, από το πείραμα αυτό φαίνεται ότι ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας με συνεχή παρακολούθηση της μεταβολής του φθορισμού του μίγματος

της αντίδρασης είναι εφικτός, αρκεί οι πρωτεΐνες του BAL να μην ξεπερνούν τα 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ μίγματος αντίδρασης (βλ. Σχήμα 61) και η αρχική αύξηση του φθορισμού του υποστρώματος (στα πρώτα 30 min λόγω των πρωτεϊνών), να μη λαμβάνεται υπόψη.

Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

Κατά τη διάρκεια σχηματισμού του προϊόντος, η απορρόφηση του μίγματος της αντίδρασης με BAL στα 475 nm αυξήθηκε ελάχιστα αλλά ποτέ δεν ξεπέρασε την τιμή 0.100 σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

BAL και παγκρεατική PLase A₂

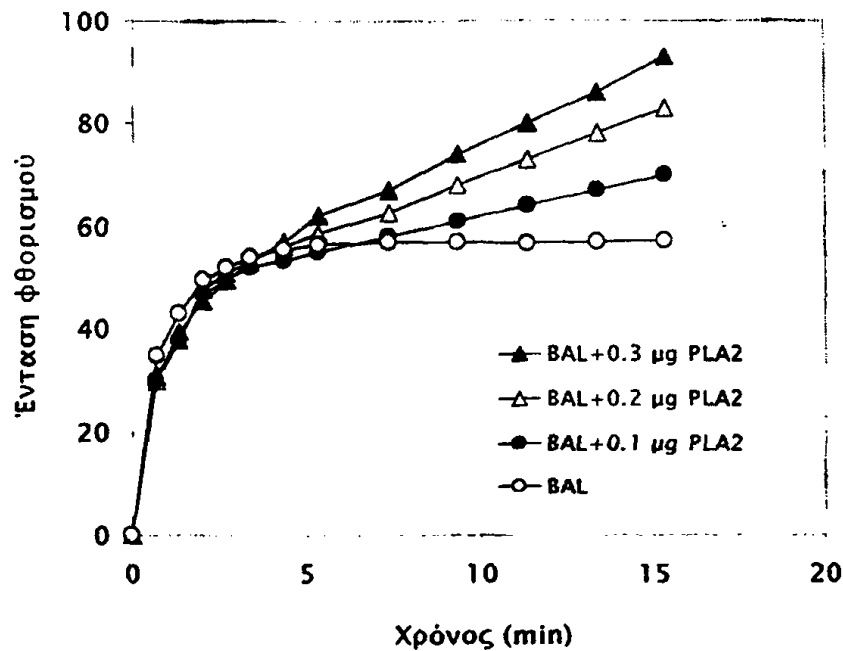
Όταν δείγμα BAL χωρίς ενεργότητα PLase A₂ συμπεριλήφθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα επώασης, δεν παρατηρήθηκε καμία ψευδώς θετική αντίδραση. Παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων πρότυπης παγκρεατικής PLase A₂, οι κλίσεις των ευθειών αυξήθηκαν αναλογικά (Σχήμα 63) επιβεβαιώνοντας έτσι το προηγούμενο συμπέρασμα (βλ. σελ. 230 και Σχήμα 62).

Καμπύλες αναφοράς

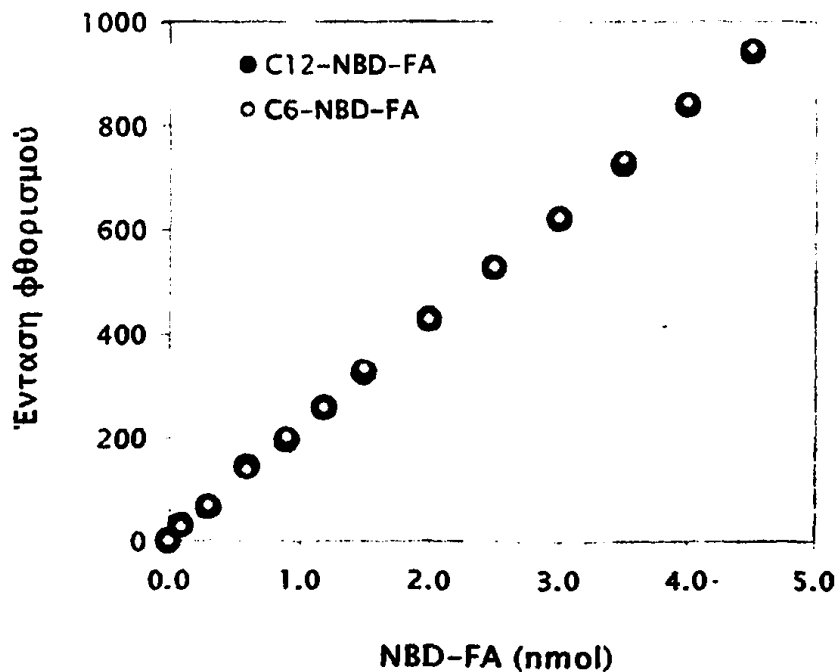
C₆- και C₁₂-NBD-FAs

Για να μελετηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου σε ότι αφορά το προϊόν που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες της έντασης του φθορισμού συναρτήσει προτύπων συγκεντρώσεων C₆-NBD-FA και C₁₂-NBD-FA σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7.4 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Ο φθορισμός των διαλυμάτων που περιείχαν κάθε NBD-λιπαρό οξύ χωριστά, αυξήθηκε γραμμικά για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, τουλάχιστον μέχρι τα 4.5 nmoles NBD-FA / ml. Παρατηρήθηκε σύμπτωση των δύο ευθειών (Σχήμα 64). Η ελάχιστη ποσότητα NBD-FA που ανιχνεύεται με το φθορισμόμετρο στη μέθοδο αυτή ήταν 100 pmoles για κάθε λιπαρό οξύ. Η απορρόφηση στα 475 nm του 0.5 nmoles C₆-NBD-FA ή C₁₂-NBD-FA ανά ml ρυθμιστικού διαλύματος ήταν 0.012.

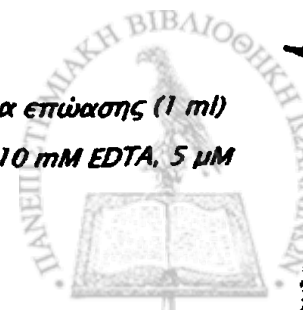




Σχήμα 63. Ενεργότητα παγκρεατικής PLase A₂ παρουσία BAL στους 25 °C: Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺, 5 μM C₆-NBD-PC, BAL και αυξανόμενες συγκεντρώσεις παγκρεατικής PLase A₂. Το BAL που χρησιμοποιήθηκε δεν εμφάνιζε ενεργότητα PLase A₂. Ο φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις.



Σχήμα 64. Πρότυπες καμπύλες των NBD-FAs στους 25 °C. Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ ή 10 mM EDTA, 5 μM



C₆-NBD-PC (ή C₁₂-NBD-PC) καθώς και αυξανόμενες ποσότητες C₆-NBD-FA (ή C₁₂-NBD-FA), αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Ο φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις.

C₆- και C₁₂-NBD-PC

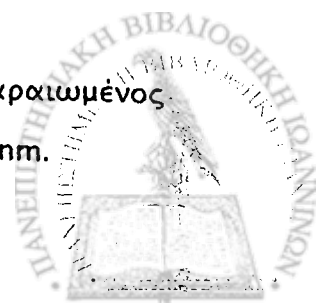
Η καμπύλη μεταβολής του φθορισμού συναρτήσκει συγκεντρώσεων της πρότυπης C₆-NBD-PC, ήταν ευθύγραμμη μέχρι τη συγκέντρωση 0.1 μΜ. Πάνω από 0.5 μΜ η κλίση μεταβλήθηκε, υποδεικνύοντας κάποια αλλαγή στη φυσικοχημική κατάσταση του διαλύματος. Το σημείο τομής των δύο καμπυλών που αντιστοιχεί στην κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση της C₆-NBD-PC βρέθηκε να αντιστοιχεί σε 0.18 μΜ (βλ. σελ. 215). Για την C₁₂-NBD-PC, η καμπύλη ήταν ευθύγραμμη από την αρχή. Η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση σε αυτή την περίπτωση δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστεί, πιθανώς λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου. Οι κλίσεις των δύο ευθειών διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Η συγκέντρωση της C₆- ή C₁₂-NBD-PC που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα υπόλοιπα πειράματα ήταν 5 μΜ. Η τιμή αυτή ήταν πολύ μεγαλύτερη της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης. Η απορρόφηση στα 475 nm των 5 nmoles C₆-NBD-PC και C₁₂-NBD-PC ανά ml ρυθμιστικού διαλύματος ήταν 0.061 και 0.064, αντίστοιχως (Πίνακας 17).

Πειράματα αναφοράς με παγκρεατική PLase A₂ του εμπορίου και PAF-AcH ανθρώπινου ορού

Η παγκρεατική PLase A₂ του εμπορίου καθώς και η ενεργότητα PAF-AcH του ανθρώπινου ορού χρησιμοποιήθηκαν ως ένζυμα αναφοράς για τον έλεγχο της απόκρισης της φθορισμομετρικής μεθόδου. Διερευνήθηκε η υδρολυτική δράση αυτών των ενζύμων στα δύο είδη NBD-φωσφατιδυλοχολίνης, με τη μεγαλύτερη (C₁₂-NBD-PC) και με τη μικρότερη αλυσίδα ανθράκων (C₆-NBD-PC) στη θέση sn-2 των μορίων τους.

Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

Όταν προστέθηκε παγκρεατική PLase A₂ του εμπορίου ή ορός (αραιωμένος 1:50) στο ρυθμιστικό διάλυμα δεν ανιχνεύθηκε σήμα φθορισμού στα 535 nm.

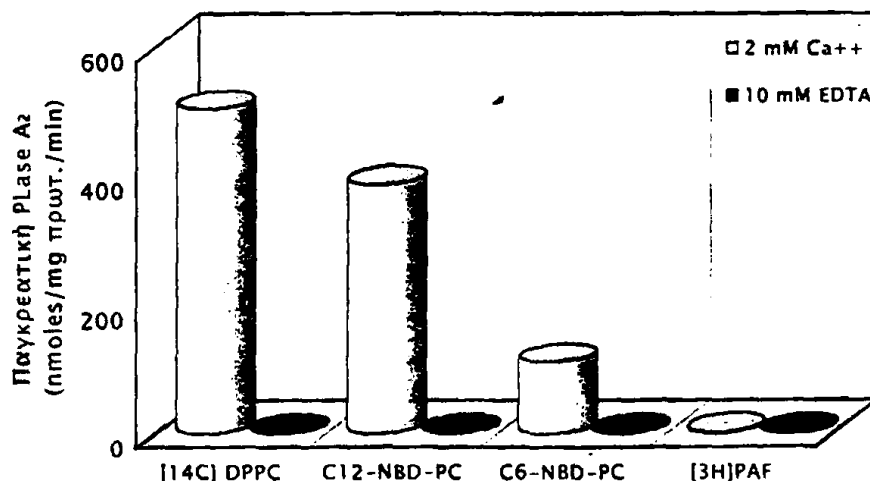


Εξειδίκευση υποστρώματος και ο ρόλος του Ca^{2+}

Οι ειδικές ενεργότητες της παγκρεατικής PLase A_2 και της PAF-AcH του ανθρωπίνου ορρού προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας NBD-φθορίζοντα και ραδιοσημασμένα υποστρώματα, παρουσία ή απουσία Ca^{2+} . Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM σε EDTA στο μίγμα της αντίδρασης για τη δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} . Η παρουσία του EDTA ήταν αναγκαία, διότι ακόμα και χωρίς την προσθήκη Ca^{2+} ή EDTA ανιχνεύθηκε μικρή ενεργότητα PLase A_2 .

Εξειδίκευση υποστρώματος για την παγκρεατική PLase A_2 ,

Η πρότυπη παγκρεατική PLase A_2 , απουσία ιόντων Ca^{2+} , ήταν τελείως ανενεργή με όλα τα υποστρώματα που ελέγχθηκαν. Ωστόσο, παρουσία ιόντων Ca^{2+} , η ενεργότητα αυξήθηκε με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας στη θέση $sn-2$ των υποστρωμάτων. Ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι η ενεργότητα αυτής στο υπόστρωμα του PAF ήταν πάρα πολύ χαμηλή (Σχήμα 70, Πίνακας 18).



Σχήμα 66. Εξειδίκευση υποστρώματος για την παγκρεατική PLase A_2 .

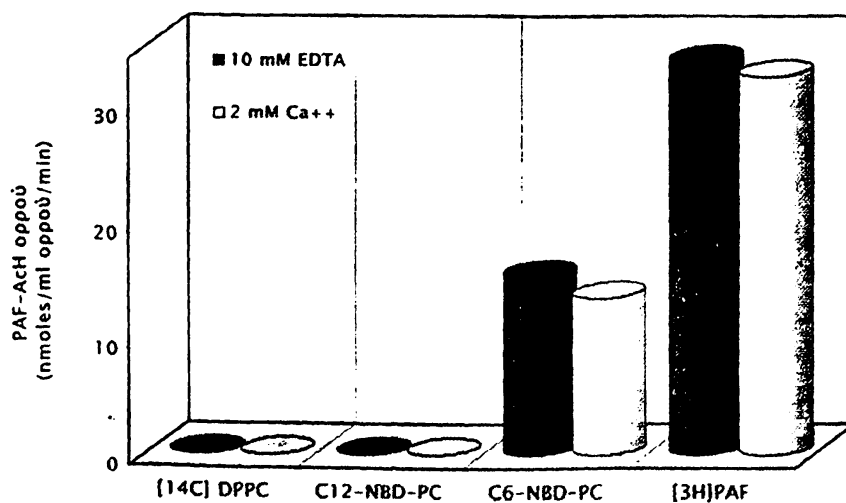
Εξειδίκευση υποστρώματος για την PAF-AcH ανθρωπίνου ορρού

Ωστόσο, η PAF-AcH ανθρωπίνου ορρού δεν υδρόλυσε το υπόστρωμα C_{12} -NBD-PC, ενώ το Ca^{2+} δεν φάνηκε να μεταβάλλει αυτή τη συμπεριφορά ακόμη και μετά από 4 ώρες συνεχούς παρακολούθησης της αντίδρασης. Η C_6 -NBD-PC ήταν όμως ένα καλό

υπόστρωμα για τη δράση της, όπως και ο PAF. Η PAF-AcH ανθρώπινου ορού υδρολύει αυτά τα υποστρώματα παρουσία ή απουσία Ca^{2+} (Σχήμα 67).

Πίνακας 18. Εξειδίκευση υποστρώματος για την παγκρεατική PLase A₂ και την PAF-AcH ορού. Κάθε αποτέλεσμα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριών μετρήσεων \pm SD.

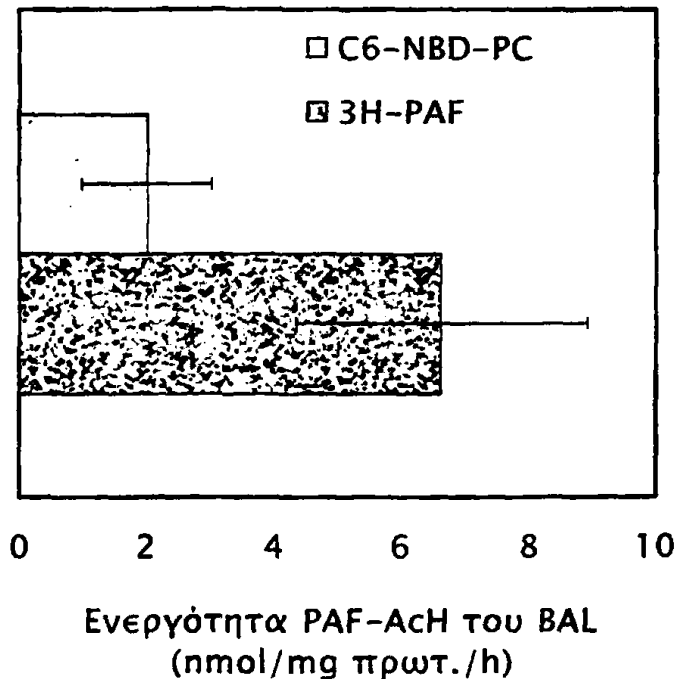
Υποστρώματα	PAF-AcH ορού (nmoles/ml ορού/min)		Παγκρεατική PLase A ₂ (nmoles/mg πρωτ/min)
	10mM EDTA	2mM Ca ²⁺	2mM Ca ²⁺
[¹⁴ C]Διπαλμιτυλο-PC	0	0	504 \pm 84
C ₁₂ -NBD-PC	0	0	387 \pm 77
C ₆ -NBD-PC	7.8 \pm 1.5	7.0 \pm 1.0	111 \pm 12
[³ H]PAF	24.7 \pm 3.2	24.0 \pm 3.0	2 \pm 0.1



Σχήμα 67. Εξειδίκευση υποστρώματος για την PAF-AcH του ανθρώπινου ορού.

Εξειδίκευση υποστρώματος για την PAF-AcH του BAL

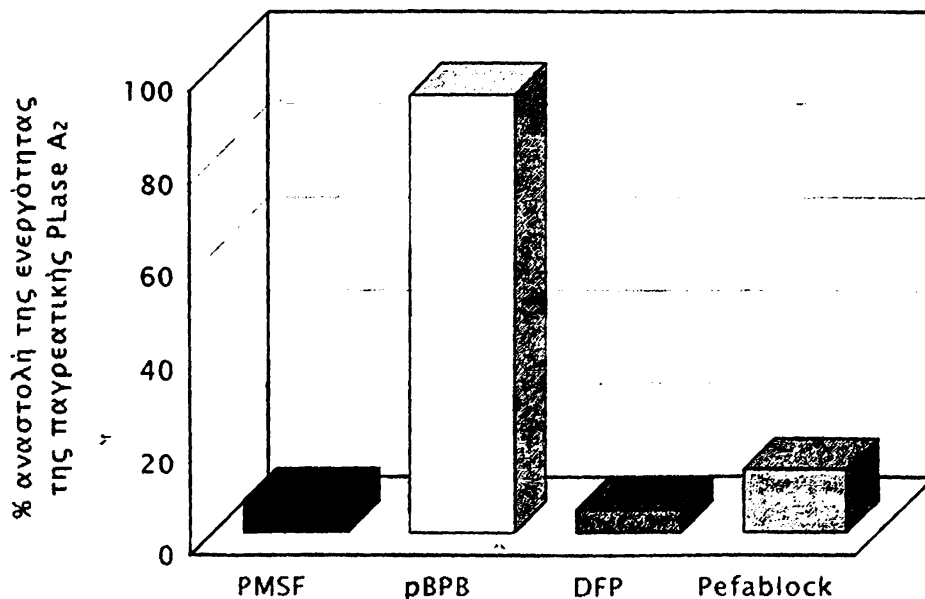
Για να συγκρίνουμε την υδρολυτική δράση φωσφολιπάσης A₂ του BAL στο ραδιενεργό υπόστρωμα του PAF και στο φθορίζον υπόστρωμα C₆-NBD-PC (με μεγαλύτερη λιπαρή αλυσίδα στη θέση sn-2 σε σύγκριση με τον PAF), διεξήχθη σειρά πειραμάτων με διαφορετικά δείγματα BAL. Διαπιστώθηκε ότι η υδρόλυση του [³H]PAF από το BAL ήταν 3 φορές περίπου ταχύτερη σε σύγκριση με την υδρόλυση της C₆-NBD-PC (Σχήμα 68). Η ενεργότητα PAF-AcH του BAL υπολογίστηκε σε 6.62 ± 2.29 nmol [³H]PAF ανά mg πρωτεΐνης του BAL ανά ώρα, και σε 2.01 ± 1.0 nmol C₆-NBD-FA ανά mg πρωτεΐνης του BAL ανά ώρα. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ανάλογα με αυτά του ορού.



Σχήμα 68. Εξειδίκευση υποστρώματος για την ενεργότητα φωσφολιπάσης A₂ του BAL για μικρές λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2. Για τη μέτρηση των ενεργοτήτων εφαρμόστηκε ο ραδιομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AcH (υπόστρωμα [³H]PAF) και ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός PLase A₂ για μικρές λιπαρές αλυσίδες (υπόστρωμα C₆-NBD-PC) απουσία Ca²⁺. Οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C).

Αναστολείς

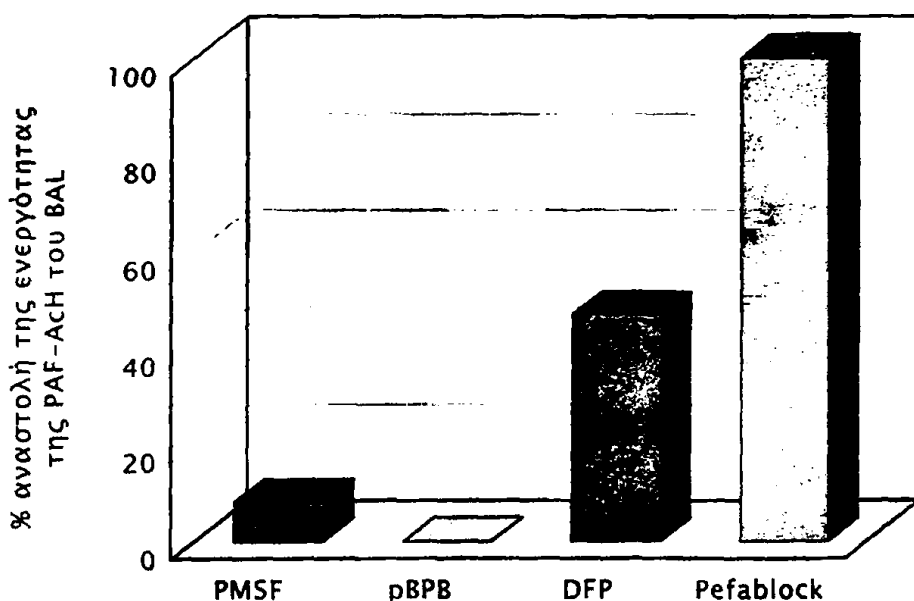
Για να υποστηρίξουμε με έναν ακόμη τρόπο την ορθότητα της φθορισμομετρικής μεθόδου, χρησιμοποιήσαμε κάποιους γνωστούς αναστολείς της παγκρεατικής PLase A₂ και της PAF-AcH. Ελέγχθηκε η επίδραση αυτών των αναστολέων στην αύξηση του φθορισμού των NBD-PCs που παρατηρείται μετά την προσθήκη των ενζυμικών διαλυμάτων. Είναι γνωστό ότι το pBPB αναστέλλει τη δράση των sPLases A₂, ενώ τα PMSF, pefablock και DFP απενεργοποιούν την PAF-AcH (βλ. Εισαγωγή). Έτσι, τα ένζυμα προεπώαστηκαν με τα διαλύματα των αναστολέων, ακολούθησε προσθήκη αυτών στο διάλυμα του υποστρώματος και καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης φθορισμού του μίγματος. Παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης αναστολή (94 ± 5 %) της αύξησης του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης με την παγκρεατική PLase A₂ όταν αυτή είχε προεπωαστεί με το pBPB. Το pefablock, PMSF και DFP ανέστειλαν ελάχιστα (13.5 ± 5 %, 7 ± 3 % και 5 ± 2 % αντίστοιχα) το φθορισμό του μίγματος αντίδρασης (Σχήμα 69). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αύξηση του φθορισμού των NBD-PC που καταγράφεται μετά την προσθήκη της PLase A₂ οφείλεται στη δράση του ενζύμου.



Σχήμα 69. Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της PLase A₂. Η παγκρεατική PLase A₂ επώαστηκε με τα διαλύματα των αναστολέων για 15 min στους 25 °C. Ακολούθησε προσθήκη αυτής στο υδατικό διάλυμα της C₁₂-NBD-PC παρουσία Ca²⁺ και καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του μίγματος συναρτήσει του

χρόνου. Η ενζυμική ενεργότητα υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης μεταβολής του φθορισμού. Η μεταβολή της έντασης του φθορισμού στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων και η απόκλιση ήταν μικρότερη του $\pm 5\%$.

Ότι αφορά την ενεργότητα της PAF-AcH του BAL που μετρείται φθορισμομετρικά, αυτή φάνηκε να αναστέλλεται πλήρως ($100 \pm 7\%$) από το refablock και κατά $47 \pm 15\%$ από το DFP. Το PMSF μείωσε ελάχιστα ($8 \pm 4\%$ μείωση) το φθορισμό του μίγματος αντίδρασης με το BAL, ενώ το pBPB δεν επηρέασε την υδρολυτική δράση της PAF-AcH του BAL στο υπόστρωμα C₆-NBD-PC (Σχήμα 70).

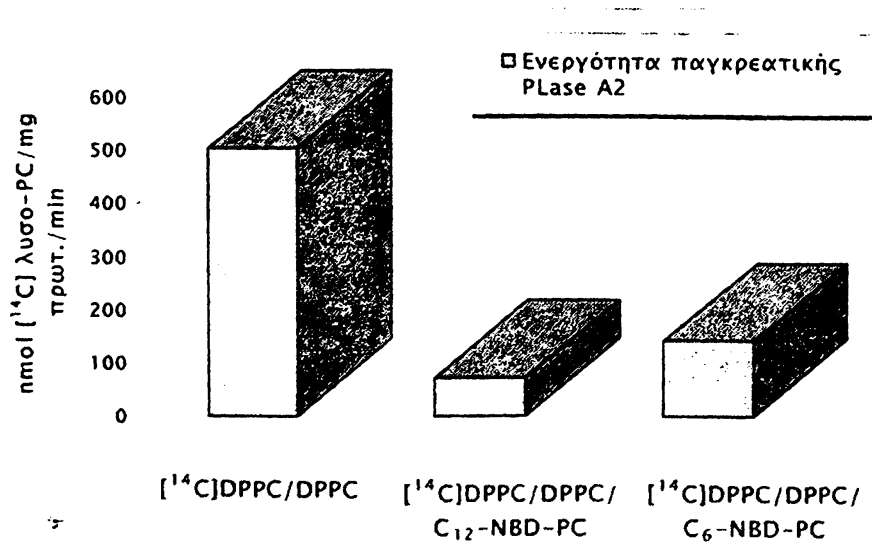


Σχήμα 70. Επίδραση αναστολέων στην υδρολυτική δράση της PAF-AcH του BAL στο φθορίζων υπόστρωμα C₆-NBD-PC. Το BAL επωάστηκε με τα διαλύματα των αναστολέων για 15 min στους 25 °C. Ακολούθησε προσθήκη αυτού στο υδατικό διάλυμα του υποστρώματος και καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του μίγματος συναρτήσει του χρόνου. Η ενεργότητα PAF-AcH υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης μεταβολής του φθορισμού. Η μεταβολή της έντασης του φθορισμού στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων και η απόκλιση των τιμών από το μέσο όρο ήταν μικρότερη του $\pm 15\%$.



Ραδιομετρικά πειράματα παγκρεατικής PLase A₂ παρουσία φθοριζόντων υποστρωμάτων

Η ενεργότητα της παγκρεατικής PLase A₂ στο υπόστρωμα της ραδιοσημασμένης DPPC προσδιορίστηκε παρουσία της C₆- ή C₁₂-NBD-PC. Αυτό έγινε για να μελετήσουμε την ενεργότητα του ενζύμου στο υπόστρωμα της [¹⁴C]DPPC, όταν στο ίδιο διάλυμα βρίσκεται ένα φθορίζον φωσφολιπίδιο, γνωρίζοντας ότι η παγκρεατική PLase A₂ υδρολύει το καθένα από τα τρία φωσφολιπίδια με διαφορετική προτίμηση (βλ. Εξειδίκευση υποστρώματος για την παγκρεατική PLase A₂, σελ. 234, Πίνακας 18). Παρατηρήθηκε ότι τα δύο φθορίζοντα υποστρώματα συναγωνίζονταν σε μεγάλο βαθμό την διπαλμιτυλο-PC στην υδρολυτική δράση του ενζύμου. Η C₁₂-NBD-PC φάνηκε να αναστέλλει κατά 85 ± 7 % την υδρόλυση της [¹⁴C]DPPC, ενώ η C₆-NBD-PC κατά 70 ± 18 %. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ένζυμο έχει μεγαλύτερη προτίμηση στο να υδρολύει την C₁₂-NBD-PC σε σύγκριση με την C₆-NBD-PC ακόμα και παρουσία της DPPC.



Σχήμα 71. Ραδιομετρικός προσδιορισμός ενεργότητας παγκρεατικής PLase A₂ στο υπόστρωμα της [¹⁴C] DPPC παρουσία φθοριζόντων υποστρωμάτων, στους 25 °C. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις υποστρωμάτων: α) 5 μM DPPC και 100000 cpm [¹⁴C] DPPC, β) 5 μM DPPC, 100000 cpm [¹⁴C] DPPC και 5 μM C₆-NBD-PC, γ) 5 μM DPPC, 100000 cpm [¹⁴C] DPPC και 5 μM C₁₂-NBD-PC. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων.



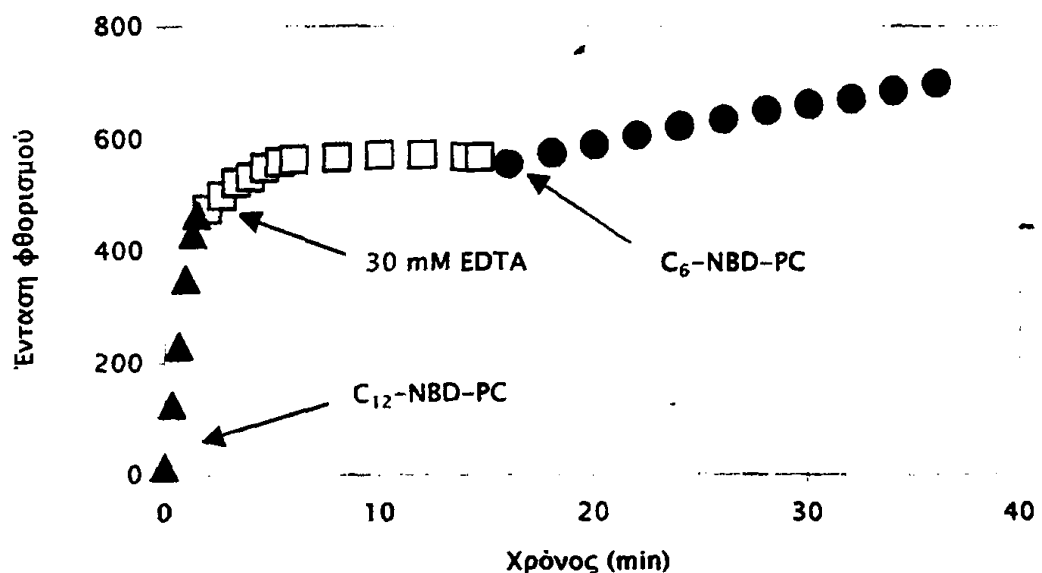
Ταυτόχρονος προσδιορισμός PAF-AcH και παγκρεατικής PLase A₂

Με σκοπό τον προσδιορισμό ενεργοτήτων PLase A₂ και PAF-AcH στο ίδιο δείγμα, έγιναν πειράματα στα οποία το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε αρχικά παγκρεατική PLase A₂ και ανθρώπινο ορρό αίματος (αραιωμένο 1:50) ως πηγή της PAF-AcH. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη της C₁₂-NBD-PC και έγινε παρακολούθηση της μεταβολής της έντασης φθορισμού συναρτήσει του χρόνου. Η αρχική κλίση της καμπύλης αντιστοιχούσε στην ενεργότητα της PLase A₂ η οποία υδρολύει μεγάλες λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2 των φωσφολιπιδίων ().

● Υδρολυτική δράση PAF-AcH ορρού στην C₆-NBD-PC

□ Απενεργοποίηση PLase A₂ μετά την προσθήκη EDTA

▲ Υδρολυτική δράση παγκρεατικής PLase A₂ στην C₁₂-NBD-F παρουσία Ca²⁺



Σχήμα 72. Ταυτόχρονος προσδιορισμός παγκρεατικής PLase A₂ και PAF-AcH ανθρώπινου ορρού. Το μίγμα επώασης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4, 2 μg παγκρεατικής PLase A₂ και 100 μl ορρού, αραιωμένου 1:50. Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 5 μM C₁₂-NBD-PC, και

παράκολουθήθηκε αμέσως η μεταβολή της έντασης του φθορισμού με συνεχή διέγερση. Η δέσμευση των Ca^{2+} πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 10% EDTA pH 7.4 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 30 mM. Μετά την απενεργοποίηση της PLase A₂, προστέθηκαν 5 μM C₆-NBD-PC και καταγράφηκε ακολούθως η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει η PAF-AcH.

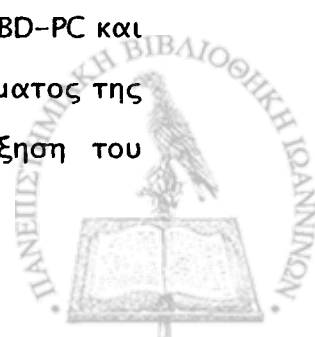
Η κλίση της καμπύλης μηδενίστηκε με τη δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} του μίγματος με την προσθήκη διαλύματος EDTA. Στη συνέχεια, με την προσθήκη της C₆-NBD-PC έγινε δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης που οφείλονταν στην ενεργότητα της PAF-AcH.

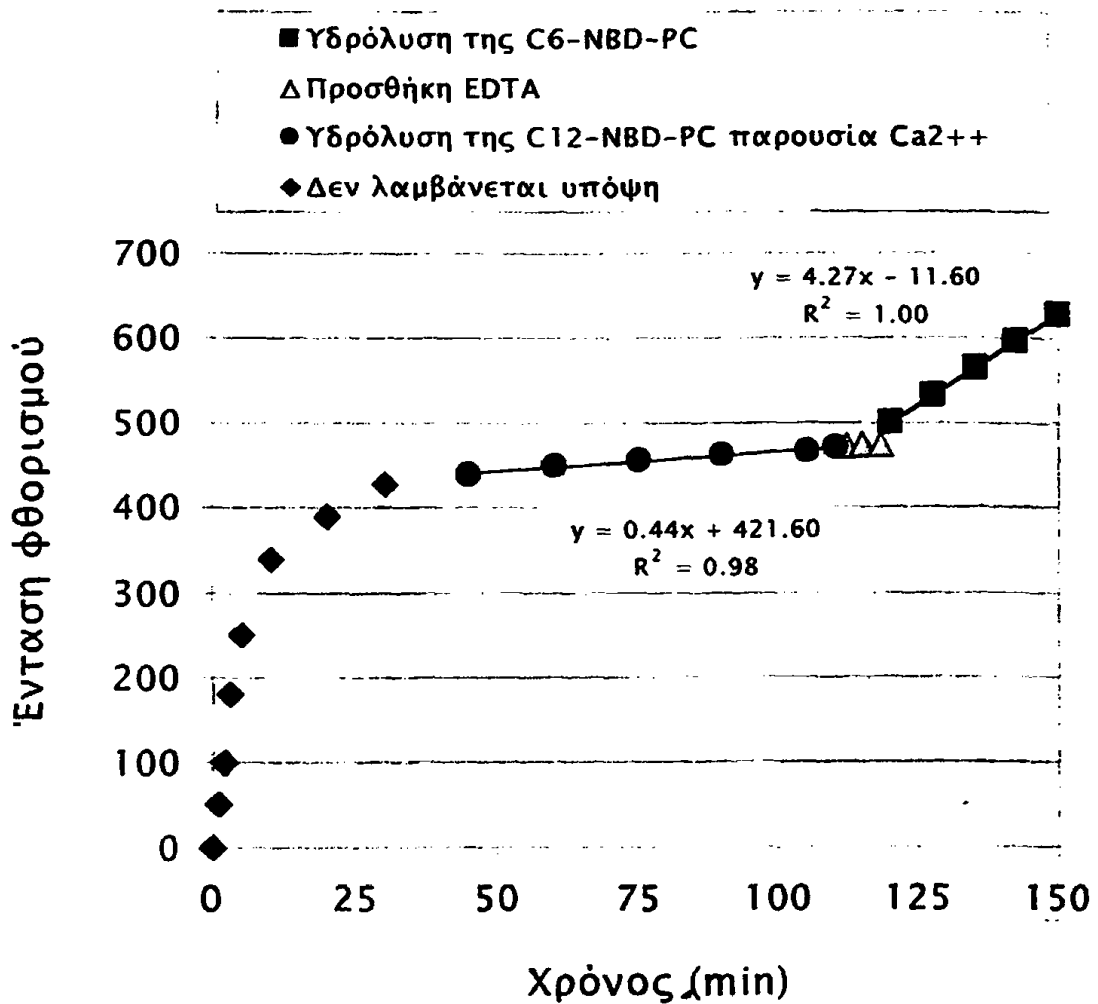
Ταυτόχρονος προσδιορισμός των PAF-AcH και PLase A₂ του BAL

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης με διαφορετικά δείγματα BAL που είχαν ελεγχθεί για την ύπαρξη ενεργοτήτων PLase A₂ και PAF-AcH αντί για τα αυθεντικά ένζυμα. Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια είτε οι ενεργότητες προσδιορίζονταν ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα είτε χωριστά. Το πρώτο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης αντιστοιχεί στην αύξηση του φθορισμού από τις πρωτεΐνες του BAL και δεν λαμβάνεται υπόψη. Το δεύτερο ευθύγραμμο τμήμα αντιστοιχεί στην ενεργότητα της PLase A₂ η οποία παρακολουθήθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αφού η ενεργότητα ήταν μικρότερη από αυτή του αυθεντικού ενζύμου. Η προσθήκη του EDTA ανέστειλε την ενεργότητα της PLase A₂ ενώ η ακόλουθη προσθήκη της C₆-NBD-PC επέτρεψε την παρακολούθηση της δράσης της PAF-AcH (τρίτο ευθύγραμμο τμήμα). Οι ενεργότητες των ενζύμων υπολογίστηκαν από τις κλίσεις των ευθυγράμμων τμημάτων (Σχήμα 73).

Φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου

Για να διερευνήσουμε τη συμπεριφορά των C₆-NBD-FA και C₁₂-NBD-FA στο φθορισμό του μίγματος της αντίδρασης, 0.5 nmoles από κάθε NBD-FA προστέθηκε διαδοχικά στο διάλυμα που περιείχε 5 nmoles C₆-NBD-PC, 5 nmoles C₁₂-NBD-PC και 500 μg πρωτεΐνης του BAL. Η απορρόφηση στα 475 nm του τελικού μίγματος της αντίδρασης έφτασε στο 0.250. Όμως, όπως παρατηρήθηκε, η αύξηση του φθορισμού ήταν γραμμική.

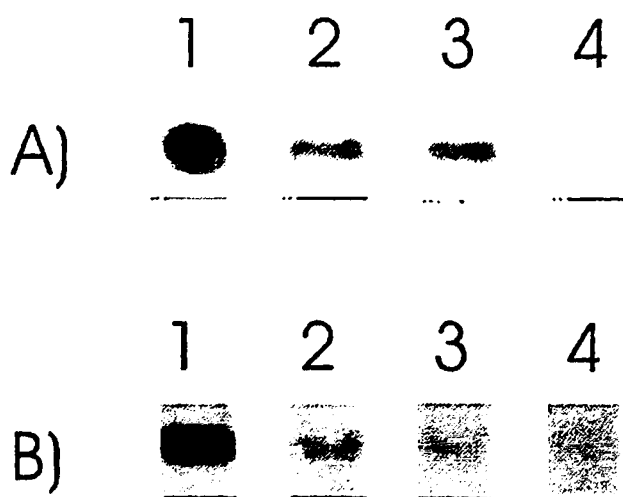




Σχήμα 73. Ταυτόχρονος προσδιορισμός PLase A₂ και PAF-AcH του BAL. Το μίγμα επώασης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca²⁺, pH 7.4, 100 μl BAL. Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 5 μM C₁₂-NBD-PC, και παρακολούθηθηκε αμέσως η μεταβολή της έντασης του φθορισμού με συνεχή διέγερση. Στο σημείο αυτό ο όγκος του διαλύματος ήταν 1 ml. Η μεταβολή του φθορισμού που καταγράφεται στα πρώτα 30 min δεν λαμβάνεται υπόψη. Η δέσμευση των Ca²⁺ πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 10 % EDTA pH 7.4 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 30 mM. Μετά την απενεργοποίηση της PLase A₂, προστέθηκαν 5 μM C₆-NBD-PC και καταγράφηκε ακολούθως η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει η PAF-AcH του BAL.

PLases A₂ στο BAL

Η διερεύνηση των υδρολυτικών δράσεων του BAL ασθενών με αναπνευστική δυσχέρεια έναντι των δύο φθορίζοντων υποστρωμάτων έδειξε ότι στο BAL υπάρχουν ποικίλες δράσεις φωσφολιπάσης A₂. Σε ουδέτερες συνθήκες, δείγμα BAL υδρόλυσε την C₁₂-NBD-PC κατά προτίμηση παρουσία Ca²⁺, ενώ η υδρόλυση αυτής απουσία Ca²⁺ βρέθηκε να είναι μειωμένη κατά 60 % περίπου. Επίδραση του BAL στην C₆-NBD-PC είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή C₆-NBD-FA ανεξαρτήτως της παρουσίας των ιόντων Ca²⁺ (Εικόνα 14). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός και υπάρχουν μερικά πρώιμα αποτελέσματα σχετικά με αυτό, ότι παρουσία Ca²⁺ η δράση του BAL επεκτείνεται και σε όξινες περιοχές pH. Αυτό το θέμα όμως χρήζει περαιτέρω μελέτης η οποία δεν καλύπτεται στην εργασία αυτή.



Εικόνα 14. Εικόνα από TLC. Ανάπτυξη σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:35:7, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel.

A) R_f C₆-NBD-FA. Στήλη 1 = πρότυπο C₆-NBD-FA, στήλη 2 = προϊόν του μίγματος αντίδρασης του BAL με C₆-NBD-PC παρουσία Ca²⁺, στήλη 3 = προϊόν του μίγματος αντίδρασης του BAL με C₆-NBD-PC παρουσία EDTA, στήλη 4 = δείγμα αρνητικού ελέγχου χωρίς BAL.

B) R_f C₁₂-NBD-FA. Στήλη 1 = πρότυπο C₁₂-NBD-FA, στήλη 2 = προϊόν του μίγματος αντίδρασης του BAL με C₁₂-NBD-PC παρουσία Ca²⁺, στήλη 3 = προϊόν του μίγματος αντίδρασης του BAL με C₁₂-NBD-PC παρουσία EDTA, στήλη 4 = δείγμα αρνητικού ελέγχου χωρίς BAL.

2) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS

Πρωτόκολλο μελέτης

Ασθενείς

Μελετήθηκαν δεκαεννιά (19) ασθενείς που υπόκειντο σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, εκ των οποίων οι 9 είχαν ARDS και οι 10 δεν είχαν καρδιοπνευμονική πάθηση. Οι ασθενείς με ARDS υποβλήθηκαν σε BAL κατά το πρώιμο, ενδιάμεσο, και όψιμο στάδιο, όπως περιγράφεται παρακάτω. Δέκα μηχανικά αεριζόμενοι ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση, μέσης ηλικίας 45 ± 13 έτη, ήταν η ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς ήταν αιμοδυναμικά σταθεροί και αεριζόνταν μηχανικά για 5 ± 2 ημέρες πριν τη διαδικασία λήψης του BAL.

Ορισμός των σταδίων του ARDS:

- **πρώιμο στάδιο:** < 36 ώρες μετά την εμφάνιση των κλινικών χαρακτηριστικών και της διάγνωσης του ARDS
- **ενδιάμεσο στάδιο:** > 36 ώρες και < 6 ημέρες μετά την εμφάνιση των κλινικών χαρακτηριστικών και της διάγνωσης του ARDS
- **όψιμο στάδιο:** > 6 ημέρες μετά την εμφάνιση των κλινικών χαρακτηριστικών και της διάγνωσης του ARDS

Όλοι οι ασθενείς νοσηλεύθηκαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΜΕΘ του ΠΠΓΝΙ). Στους ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια του ARDS έγινε εισαγωγή καθετήρα στην πνευμονική αρτηρία (Opticath, Abbott, IL, USA) διαμέσου της εσω σφαγίτιδας ή υποκλειδίου φλέβας για τον υπολογισμό των αιμοδυναμικών παραμέτρων (SvO_2 , CI, PAP, Pwr) και τοποθετήθηκε επίσης αρτηριακή γραμμή για μέτρηση αρτηριακής πίεσης. Σε κάθε ασθενή ελήφθησαν τρία διαδοχικά δείγματα BAL. Η λήψη του πρώτου BAL έγινε όταν οι ασθενείς σταθεροποιήθηκαν αιμοδυναμικά. Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της διάγνωσης του ARDS και της λήψης του πρώτου BAL ήταν μικρότερο των 12 ωρών. Η λήψη του δεύτερου και του τρίτου BAL από τους ασθενείς έγινε 3 και 6 ημέρες μετά τη διάγνωση του ARDS αντίστοιχα.

Πίνακας 19. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ARDS

Αρ.	Ηλικία (Έτη)	Φύλο	Παράγοντες κινδύνου	Πρώιμο ARDS (Ωρες μετά την έναρξη)	Ενδιάμεσο ARDS (Ημέρες μετά την έναρξη)	Ώψιμο ARDS (Ημέρες μετά την έναρξη)	Εξέλιξη
1	65	A	Πολλαπλοί τραυματισμοί	12	3	6	E
2	71	A	Ρήξη ανeurύσματος αορτής	10	4	6	A
3	38	Θ	Σήψη	8	3	6	E
4	50	Θ	Μετάγγιση αίματος	6	3	7	E
5	35	A	Πολλαπλοί τραυματισμοί	8	4	8	E
6	29	A	Πολλαπλοί τραυματισμοί	10	4	8	A
7	64	A	Πολλαπλοί τραυματισμοί	6	3	7	A
8	35	Θ	Παγκρεατίτιδα	8	3	6	E
9	22	A	Πολλαπλοί τραυματισμοί	8	3	7	E
MO	45			8	3	7	
SD	18			2	0.5	1	

(E επέζησαν, A απεβίωσαν)



Πίνακας 20. Αιμοδυναμικές παράμετροι, παράμετροι μηχανικής του αναπνευστικού συστήματος και αερίων αίματος των ασθενών με ARDS

	Πρώιμο ARDS	Ενδιάμεσο ARDS	Όψιμο ARDS
MAP (mm Hg)	90±18	100±17	85±12
mPAP (mm Hg)	30±5.1	28±3.9	31±5.0
PAWP (mm Hg)	11±3.0	7.5±2.5	8±2.8
CI (l/min per m ²)	4.7±1.2	3.7±1.4	3.3±0.8*
PaO ₂ /FiO ₂	120±29	169±27	180±35
SvO ₂ (%)	78±14	70±16	66±10
PEEP (cm H ₂ O)	12±4.2	8.5±1.7	8±2.4
Crs (ml/cm H ₂ O)	47±10	41±12	33±7.7*
ALI score	3.1±0.35	2.9±0.18	2.9±0.3

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων του ARDS

Κλινικές μετρήσεις

Οι κλινικές μετρήσεις έγιναν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας σύμφωνα με τις αρχές που ενσωματώθηκαν στη διακήρυξη του Ελσίνκι. Σε κάθε ασθενή με ΠΘΕ, έγινε καταγραφή των ακόλουθων παραμέτρων: ηλικία, χρονική διάρκεια της μηχανικής αναπνοής, αρτηριακή τάση οξυγόνου (PaO₂), κλάσμα εισπνεόμενου οξυγόνου (FiO₂), λόγος (PaO₂/FiO₂), κορεσμός μικτού φλεβικού αίματος (SvO₂), θετική τελοεκπνευστική πίεση (PEEP), καρδιακός δείκτης (CI), πνευμονική αρτηριακή πίεση,

συστηματική αρτηριακή πίεση, αναπνεόμενος όγκος (V_T), μέγιστη πίεση αεραγωγών (P_{peak}), πίεση πλατώ ($P_{plateau}$), εισπνευστική ροή (V_i), auto PEEP.

Η διατασιμότητα του αναπνευστικού συστήματος (Crs) υπολογίστηκε ως:

$$Crs = V_T / (P_{plateau} - \text{ολική PEEP})$$

Τέλος, υπολογίστηκε ο δείκτης της οξείας πνευμονικής βλάβης σύμφωνα με τους Murray et al [602].

Διαδικασία λήψης του BAL

Η λήψη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος έγινε σε όλα τα στάδια του ARDS. Το βρογχοσκόπιο εισήλθε με την προακαθορισμένη διαδικασία ώστε να εξασφαλίζεται η μηχανική αναπνοή κατά τη διάρκεια λήψης του BAL. Έξι δείγματα των 20 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού 37 °C εγχύθηκαν διαμέσου του βρογχοσκοπίου. Στο πρώτο κλάσμα υγρού που ανακτήθηκε και αντιστοιχεί σε βρογχικό έκκριμα, έγινε μικροβιολογικός έλεγχος, ενώ το υπόλοιπο υγρό (BAL) συλλέχθηκε σε παγωμένους σωλήνες για την αποφυγή αποδόμησης του PAF από την ενεργότητα ακετυλυδρολάσης.

Κατεργασία του BAL

Το BAL στη συνέχεια διηθήθηκε από αποστειρωμένη γάζα για να απομακρυνθεί η βλέννα και φυγοκεντρήθηκε στα 500 x g για 15 min, στους 4 °C, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sorvall RC-5B, Dupont, Canada) για να καθιζάνουν τα κύτταρα.

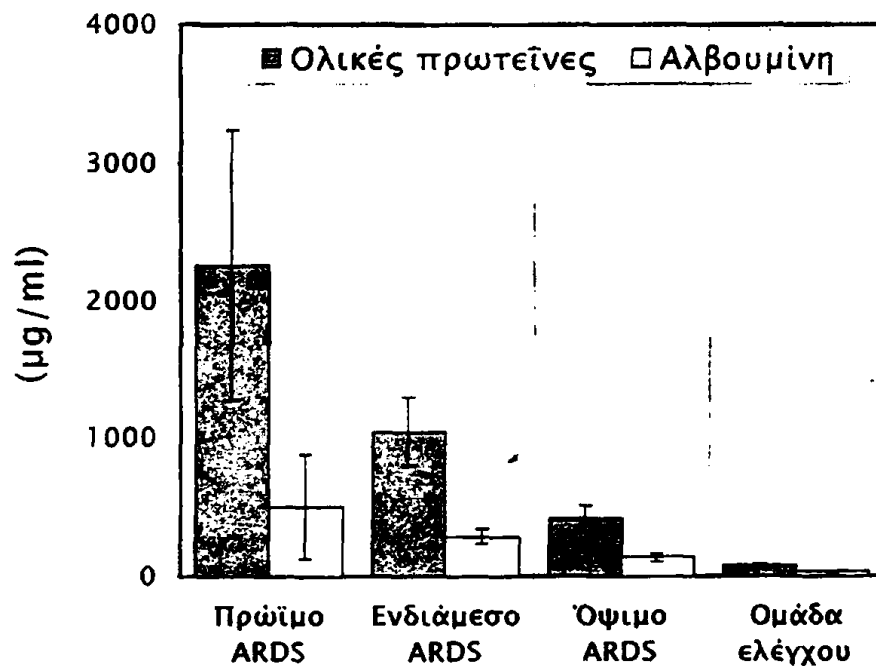
Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (S.D., Standard Deviation). Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγιναν χρησιμοποιώντας λογισμικό statistica 4.3. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας λογισμικό πακέτο Statview 51²¹. Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε ως $p < 0.05$.



ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι ολικές πρωτεΐνες του BAL ασθενών στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS βρέθηκαν εξαιρετικά υψηλές, (2255 ± 980 , 1050 ± 253 , 419 ± 92 $\mu\text{g/ml}$ BAL αντίστοιχα), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (80 ± 16 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ αντίστοιχα) (Σχήμα 74, Πίνακας 21). Σημαντική διαφορά στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε επίσης μεταξύ όλων των ομάδων του ARDS. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση από το πρώιμο στο ενδιάμεσο και στο όψιμο στάδιο της νόσου ($p < 0.01$).



Σχήμα 74. Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.

Η πτώση των ολικών πρωτεϊνών από το πρώιμο στο ενδιάμεσο στάδιο της νόσου ήταν της τάξεως του 50 % περίπου της αρχικής τιμής, από το ενδιάμεσο στο όψιμο περίπου 60 %, ενώ από το πρώιμο στο όψιμο η συνολική μείωση ήταν περίπου 80 %. Η τελευταία τιμή όμως (419 ± 92 $\mu\text{g/ml}$) ήταν τουλάχιστον πενταπλάσια (5 x) σε σύγκριση με αυτή της ομάδας ελέγχου (80 ± 16 $\mu\text{g/ml}$).

ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

Η αλβουμίνη φάνηκε να ακολουθεί συμπεριφορά ανάλογη αυτής των ολικών πρωτεϊνών (Πίνακας 21, Σχήμα 75). Τα επίπεδα αυτής στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS, βρέθηκαν εξαιρετικά υψηλά, (505 ± 375 , 290 ± 52 , 140 ± 30 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (30 ± 6.0) ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ αντίστοιχα). Η διαφορά στα επίπεδα της αλβουμίνης μεταξύ των φάσεων του ARDS υπήρξε επίσης σημαντική. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση από το πρώιμο στο όψιμο στάδιο της νόσου ($p < 0.01$).

Πίνακας 21. Επίπεδα πρωτεΐνης και αλβουμίνης στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

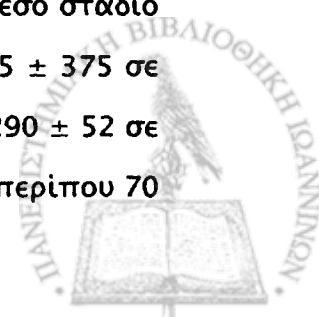
	Ομάδα ελέγχου	ARDS		
		πρώιμο	ενδιάμεσο	όψιμο
Ολική πρωτεΐνη ($\mu\text{g/ml}$)	80 ± 16	2255 ± 980 (*+)	1050 ± 253 (*+)	419 ± 92 (*+)
Αλβουμίνη ($\mu\text{g/ml}$)	30 ± 6.0	505 ± 375 (*+)	290 ± 52 (*+)	140 ± 30 (*+)

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο (M.O.) \pm τυπική απόκλιση (SD) για τους ασθενείς της κάθε ομάδας

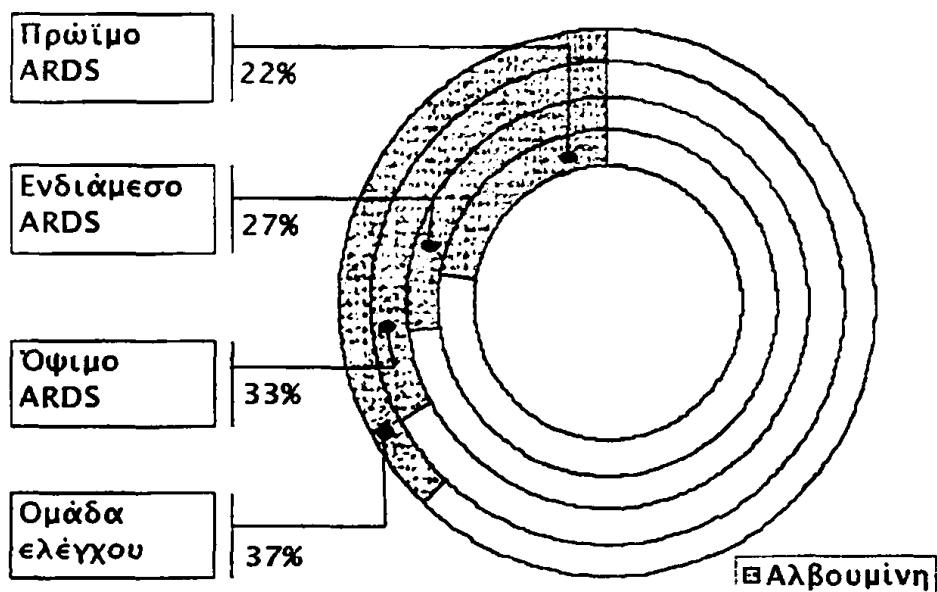
* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

+ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των διαφορετικών φάσεων του ARDS

Η πτώση των επιπέδων της αλβουμίνης από το πρώιμο στο ενδιάμεσο στάδιο της νόσου ήταν της τάξεως του 40% περίπου της αρχικής τιμής (από 505 ± 375 σε 290 ± 52 $\mu\text{g/ml}$), από το ενδιάμεσο στο όψιμο στάδιο περίπου 50% (από 290 ± 52 σε 140 ± 30 $\mu\text{g/ml}$), ενώ από το πρώιμο στο όψιμο η συνολική μείωση ήταν περίπου 70



% (από 505 ± 375 σε 140 ± 30 $\mu\text{g/ml}$). Η τελική τιμή όμως (140 ± 30 $\mu\text{g/ml}$) ήταν περίπου πενταπλάσια (5 x) από αυτή της ομάδας ελέγχου (30 ± 6.0 $\mu\text{g/ml}$).

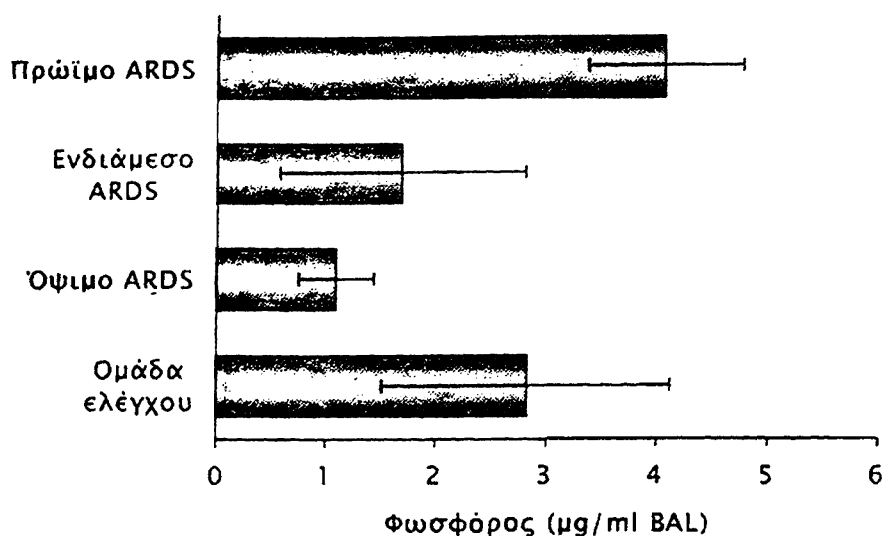


Σχήμα 75. Εκατοστιαία ποσοστά της αλβουμίνης επί των ολικών πρωτεϊνών στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι η αλβουμίνη αποτελούσε περίπου το 30% των ολικών πρωτεϊνών (22, 28, 33 % στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS αντιστοίχα), σε όλα τα δείγματα ασθενών. Στην ομάδα ελέγχου, η αλβουμίνη αποτελούσε το 37 % των ολικών πρωτεϊνών.

ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 76, στο πρώιμο στάδιο του ARDS παρατηρήθηκε εμφάνιση πολύ υψηλών επιπέδων των ολικών φωσφολιπιδίων, που έφτασαν σε (4.09 ± 1.3) $\mu\text{g P / ml}$ BAL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (2.82 ± 0.7 $\mu\text{g P / ml}$) ($p < 0.05$). Αντιθέτως, 3 και 6 ημέρες μετά την εμφάνιση της νόσου (ενδιάμεσο και όψιμο ARDS) τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων βρέθηκαν μειωμένα (1.7 ± 0.35 και 1.1 ± 0.12 $\mu\text{g P / ml}$ BAL) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$).



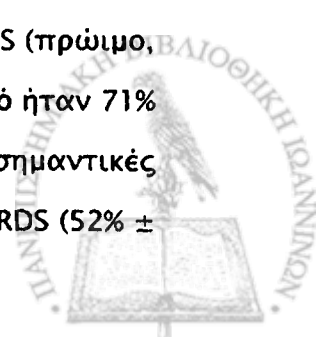
Σχήμα 76. Επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο ARDS καθώς και της ομάδας ελέγχου.

Η διαφορά στα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών μεταξύ των σταδίων του ARDS ήταν εξίσου στατιστικά σημαντική ($p < 0.01$). Η μείωση ήταν σταδιακή από το πρώιμο στο όψιμο ARDS και αντιστοιχούσε σε 60 % και 40% μείωση περίπου από το πρώιμο στο ενδιάμεσο και από το ενδιάμεσο στο όψιμο ARDS αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, 6 ημέρες μετά την εμφάνιση της νόσου, τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων μειώθηκαν κατά 70 % περίπου (από 4.09 ± 1.3 σε 1.1 ± 0.12 $\mu\text{g P} / \text{ml BAL}$).

ΕΙΔΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ BAL

Παρατηρήθηκαν, επίσης, ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα (Σχήμα 77 Α, Β, Γ, Δ, και Πίνακας 22). Συγκεκριμένα:

Η φωσφατιδυλοχολίνη βρέθηκε μειωμένη σε όλα τα στάδια του ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο) σε σύγκριση την ομάδα ελέγχου, της οποίας το ποσοστό ήταν $71\% \pm 3.4$. Η διαφορές σε σύγκριση την ομάδα ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.001$). Το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης στο πρώιμο ARDS ($52\% \pm$



4.6) φάνηκε να διατηρείται στα ίδια περίπου επίπεδα 3 και 6 ημέρες μετά ($50\% \pm 11$ και $47\% \pm 8.1$). Στους ασθενείς που επέζησαν, τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης αυξήθηκαν από το πρώιμο στο όψιμο ARDS, ενώ σε αυτούς που δεν επέζησαν, μειώθηκαν. Η διαφορά αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική στο όψιμο στάδιο ($p < 0.05$).

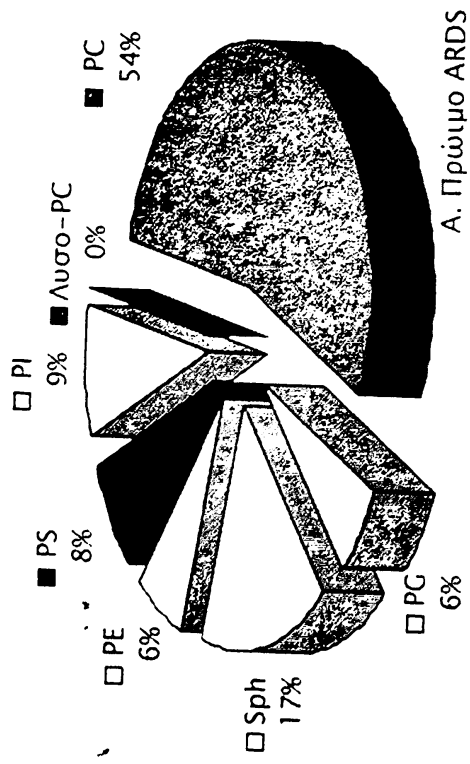
Το ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης επί των ολικών φωσφολιπιδίων μειώθηκε κατά τρόπο στατιστικώς σημαντικό ($p < 0.01$), σε όλους τους ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($10\% \pm 1.6$). Το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης στο πρώιμο ARDS ($6.1\% \pm 1.4$) φάνηκε να διατηρείται στα ίδια επίπεδα στο ενδιάμεσο ($6.7\% \pm 2.2$) καθώς και στο όψιμο στάδιο ($6.6\% \pm 1.4$).

Το ποσοστό της σφιγγομυελίνης βρέθηκε αυξημένο με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σε όλα τα στάδια του ARDS ($16\% \pm 3.3$, $14.8\% \pm 5.2$ και $14\% \pm 2.6$ στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο ARDS) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, της οποίας το ποσοστό ήταν $4.3\% \pm 0.4$. Οι διαφορές στο ποσοστό αυτής μεταξύ των ασθενών και των τριών σταδίων της νόσου δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές.

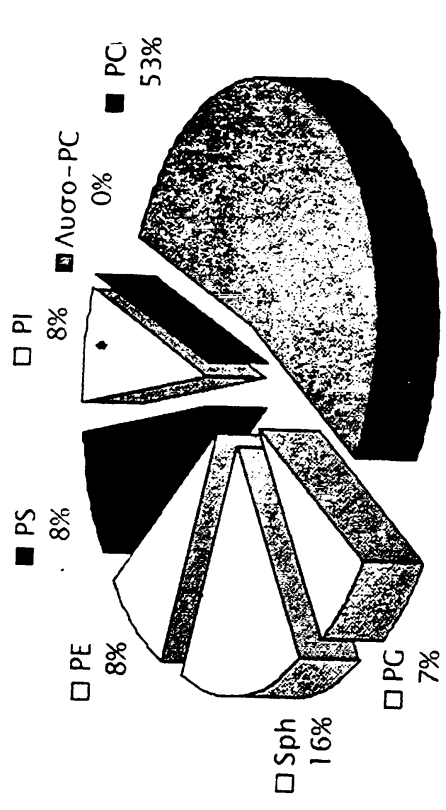
Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη βρέθηκε αυξημένη σε όλα τα στάδια του ARDS ($5.9\% \pm 1.2$, $7.7\% \pm 3.1$ και $6.8\% \pm 1.4$ στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($4.6\% \pm 0.8$). Στο ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο, οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ασθενών και των τριών σταδίων της νόσου.

Το ποσοστό της φωσφατιδυλοσερίνης αυξήθηκε επίσης σε όλα τα στάδια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα τα ποσοστά αυτής βρέθηκαν να είναι $7.5\% \pm 1.9$, $7.9\% \pm 3.4$ και $7.4\% \pm 1.5$ στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS αντίστοιχα και $4.8\% \pm 0.5$ στην ομάδα ελέγχου. Οι διαφορές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Τα επίπεδα αυτής δεν μεταβλήθηκαν μεταξύ των σταδίων της νόσου.

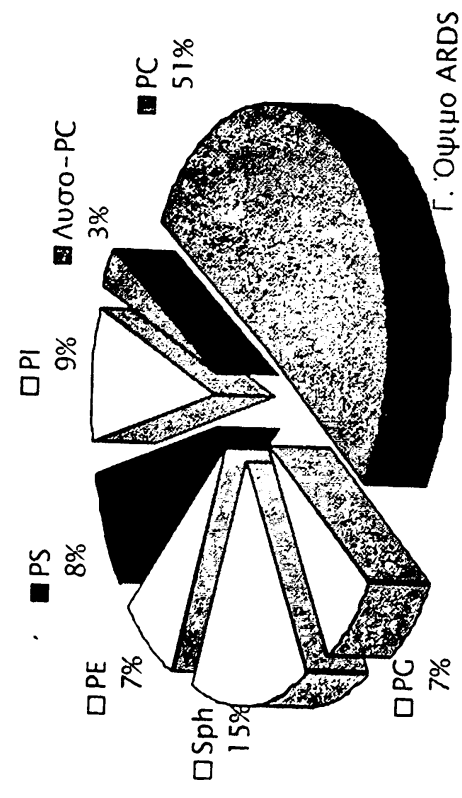




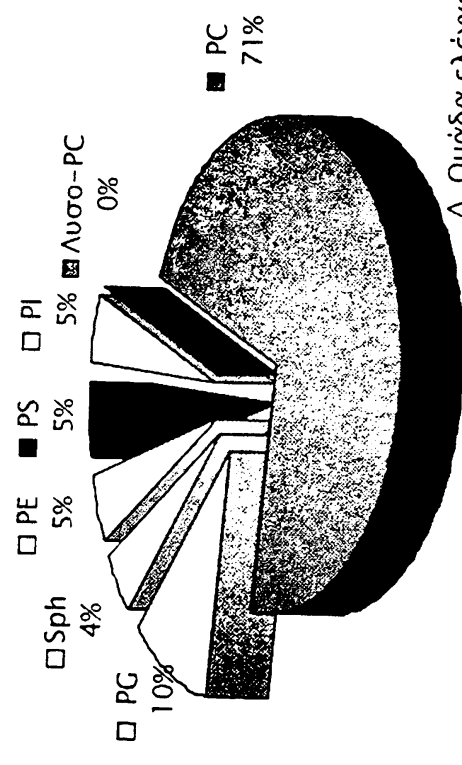
Α. Πρώιμο ARDS



Β. Ενδιάμεσο ARDS



Γ. Οψιμο ARDS



Δ. Ομάδα ελέγχου

Σχήμα 77. Ποσοστά επιμέρους φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.



Το ποσοστό της φωσφατιδυλινοσιτόλης αυξήθηκε σε όλα τα στάδια της νόσου ($8.3 \% \pm 1.2$, $7.1 \% \pm 2.8$ και $8.2 \% \pm 2.0$ στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο του ARDS αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($4.5 \% \pm 0.5$) και παρέμεινε αυξημένο 3 και 6 ημέρες μετά. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Μεταξύ των σταδίων του ARDS δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές του ποσοστού της.

Μικρά ποσοστά λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης, της τάξεως του $2.6 \% \pm 1.3$ ανιχνεύθηκαν στο BAL ασθενών στο όψιμο στάδιο του ARDS. Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.0001$). Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη δεν ανιχνεύθηκε ούτε στο πρώιμο αλλά ούτε και στο ενδιάμεσο στάδιο της νόσου.

Πίνακας 22. Φωσφολιπίδια στο BAL ασθενών με ARDS και ομάδας ελέγχου

Ομάδα	ARDS' πρώιμο	ARDS ενδιάμεσο	ARDS όψιμο
Ολικά φωσφολιπίδια (μg P/ml BAL)	2.82±0.7	4.09±1.3 (**)	1.7±0.35 (**)
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), % των ολικών PLs	71±3.4	52±4.6 (*)	47±8.1 (*)
Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), % των ολικών PLs	10±1.6	6.1±1.4 (*)	6.6±1.4 (*)
Σφιγγομυελίνη (Sph), % των ολικών PLs	4.3±0.4	16±3.3 (*)	14±2.6 (*)
Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE), % των ολικών PLs	4.6±0.8	5.9±1.2	6.8±1.4 (*)
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS), % των ολικών PLs	4.8±0.5	7.5±1.9 (*)	7.4±1.5 (*)
Φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), % των ολικών PLs	4.5±0.5	8.3±1.2 (*)	8.2±2.0 (*)
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), % των ολικών PLs	-	-	2.6±1.3 (**)

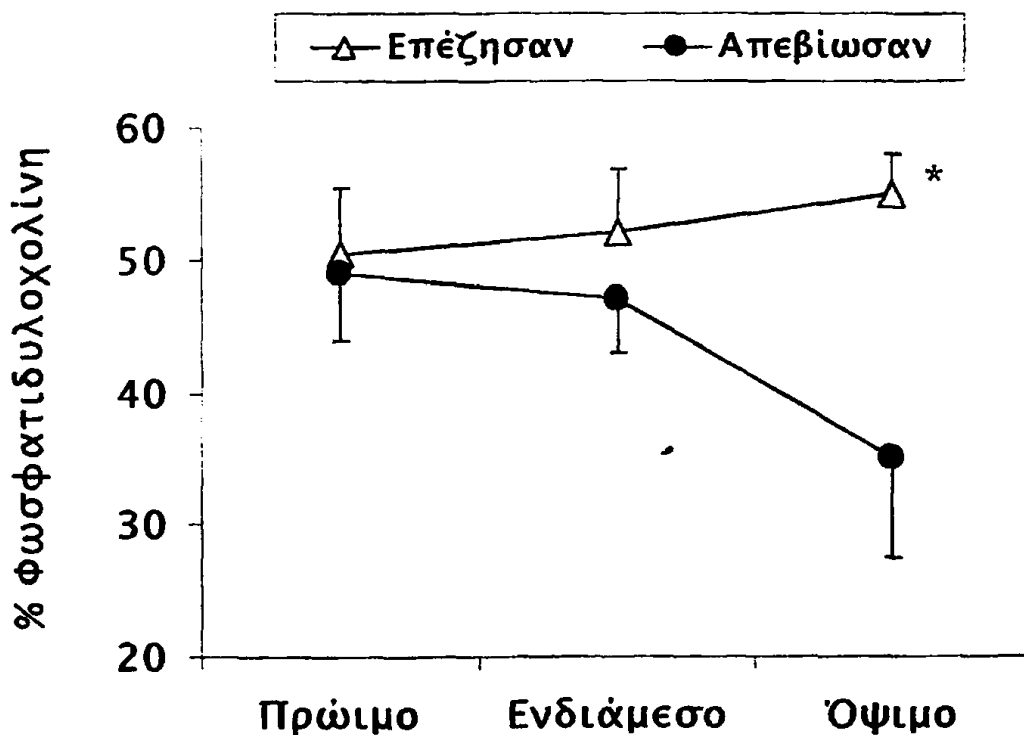
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο (M.O.) ± τυπική απόκλιση (SD) για τους ασθενείς της κάθε ομάδας

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

· στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων της PC που ανιχνεύεται στο BAL με την τελική έκβαση των ασθενών.

Παρατηρήθηκε ότι, τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης αυξήθηκαν από το πρώιμο στο ενδιάμεσο και από το ενδιάμεσο στο όψιμο στάδιο του ARDS στους ασθενείς που επέζησαν. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της PC στο BAL των ασθενών από την πρώιμη στην ενδιάμεση και από την ενδιάμεση στην όψιμη φάση του συνδρόμου στους ασθενείς που δεν επέζησαν. Η διαφορά αυτή κατέστη στατιστικά σημαντική στο όψιμο ARDS ($p < 0.05$) (Σχήμα 78).

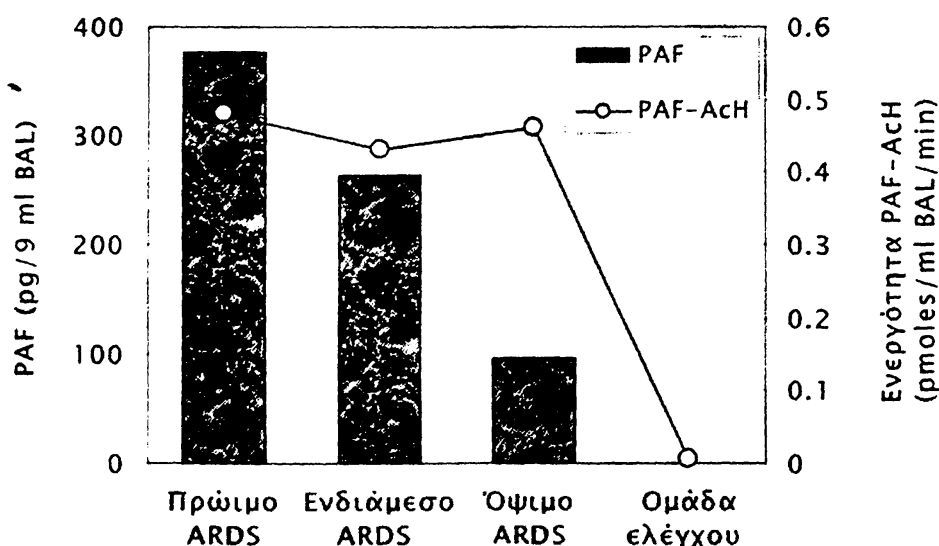


Σχήμα 78. Μεταβολές στα ποσοστά της φωσφατιδυλοχολίνης που ανιχνεύεται στο BAL των ασθενών κατά την πορεία εξέλιξης του ARDS σε σχέση με την τελική έκβαση των ασθενών. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.01$) μεταξύ αυτών που επέζησαν και αυτών που δεν επέζησαν στην όψιμη φάση του συνδρόμου.



ΕΠΙΠΕΔΑ PAF ΚΑΙ PAF-AcH

Υψηλά επίπεδα PAF ανιχνεύθηκαν στο BAL όλων των ασθενών με ARDS ($p < 0.001$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, όπου τα επίπεδα του PAF ήταν μη ανιχνεύσιμα. Οι διαφορές στα επίπεδα του PAF μεταξύ των ασθενών με πρώιμο και όψιμο καθώς και μεταξύ αυτών με πρώιμο και ενδιάμεσο στάδιο του ARDS ήταν επίσης στατιστικά σημαντικές ($p < 0.001$ και $p < 0.05$ αντίστοιχα) (Πίνακας 23, Σχήμα 79).



Σχήμα 79. Επίπεδα PAF και PAF-AcH στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.

Η PAF-AcH βρέθηκε αυξημένη στο BAL ασθενών με πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο ARDS (0.48 ± 0.53 , 0.43 ± 0.30 , 0.46 ± 0.37 pmol PAF/ml BAL/min) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (0.005 ± 0.006 pmol PAF/ml BAL/min) ($p < 0.01$). Η διαφορές στα επίπεδα αυτής μεταξύ των σταδίων της νόσου δεν ήταν σημαντικές (Πίνακας 23, Σχήμα 79).

Η PAF-AcH του ορού μετρήθηκε μόνο σε δύο δείγματα ασθενών με ARDS, όπου βρέθηκε αυξημένη (31.4 και 32.6 pmol PAF/ml BAL/min) σε σύγκριση με τα επίπεδα αυτής στον ορό της ομάδας ελέγχου (0.005 ± 0.006 pmol PAF/ml BAL/min).

Κριτήρια για την κατάταξη της ενζυμικής δράσης ως ειδικής για τον PAF (PAF-AcH) και όχι γενικής PLase A₂ αποτέλεσαν:

- Η ακετυλυδρολάση δεν απαιτήσε ιόντα ασβεστίου για να δράσει
- Δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 10 mM EDTA
- Δεν απενεργοποιήθηκε από το p-βρωμοφαινακυλο-βρωμίδιο, έναν τυπικό αναστολέα της φωσφολιπάσης A₂
- Δεν επηρεάστηκε από την παρουσία περίσσειας φωσφατιδυλοχολίνης (0.5x10⁻⁴ M)

Συνεπώς, διαφοροποιείται από την τυπική φωσφολιπάση A₂ και έτσι χαρακτηρίζεται ως ειδική για PAF.

Πίνακας 23. Επίπεδα PAF και PAF-AcH στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

	Ομάδα ελέγχου	ARDS πρώιμο	ARDS ενδιάμεσο	ARDS όψιμο
PAF (pg/9 ml BAL)	0	376±140 (**)	264±79 (**)	97±37 (**)
PAF-AcH (pmol PAF/ml BAL/min)	0.005±0.006	0.48±0.53 (*)	0.43±0.30 (*)	0.46±0.37 (*)

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο (M.O.) ± τυπική απόκλιση (SD) για τους ασθενείς της κάθε ομάδας

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

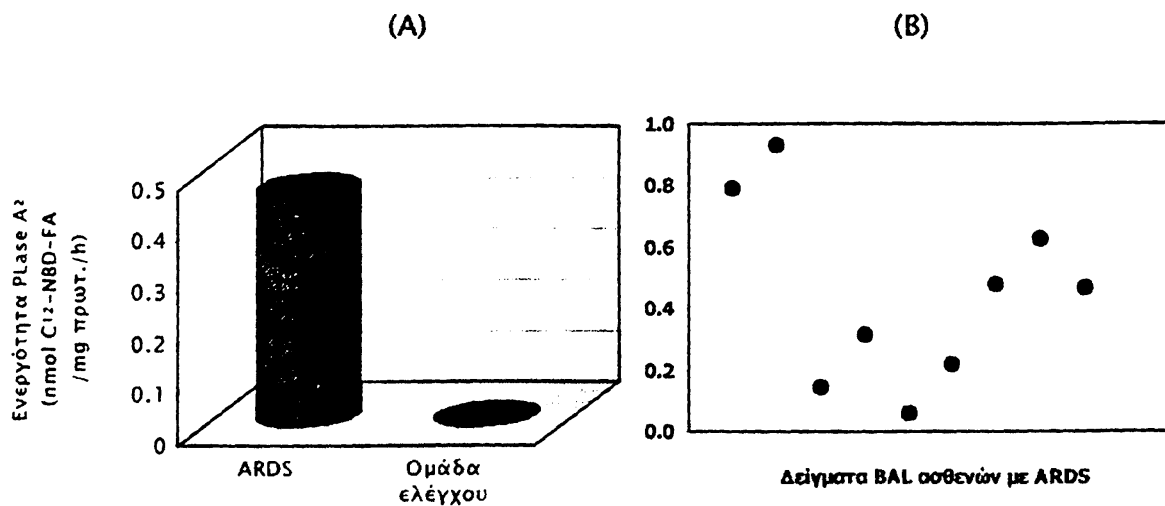
· στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS



Φωσφολιπάση A₂

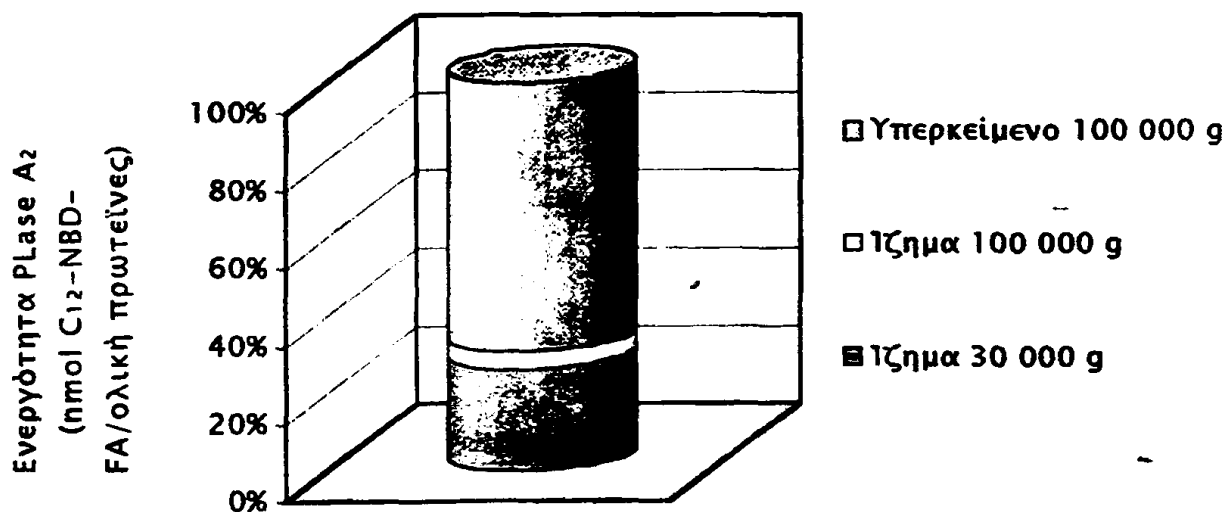
Η PLase A₂, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, καταλύει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων σχηματίζοντας λυσο-φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Για να ερευνησουμε τη σχέση του ενζύμου αυτού με το ARDS, έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας της PLase A₂ στο BAL ασθενών με ARDS και ομάδας ελέγχου.

Η ενεργότητα της PLase A₂ προσδιορίστηκε με τη φθορισμομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας τη C₁₂-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη ως υπόστρωμα. Έτσι, ενεργότητα PLase A₂ εξαρτώμενη από Ca²⁺ ανιχνεύθηκε σε όλα σχεδόν τα δείγματα BAL των ασθενών με ARDS (0.448 ± 0.279 nmol/mg/h) ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε δείγματα ελέγχου (Σχήμα 80).



Σχήμα 80. Μέση τιμή ενεργότητας PLase A₂ στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου (A), και ενεργότητα PLase A₂ του BAL κάθε ασθενούς χωριστά (B). Ο υπολογισμός της ενεργότητας έγινε με τη μέτρηση της αύξησης της έντασης του φθορισμού διαλύματος C₁₂-NBD-PC μετά από την προσθήκη BAL. Η μεταβολή του φθορισμού που καταγράφηκε στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Έγινε παρακολούθηση της αντίδρασης για 2-3 ώρες περίπου.

Με δεδομένη την ύπαρξη ενεργότητας PLase A₂ στο BAL των ασθενών με ARDS, προσπαθήσαμε στη συνέχεια να μελετήσουμε την κατανομή αυτής της ενεργότητας στα κλάσματα των διαφορετικών φυγοκεντρήσεων του BAL. Ανιχνεύθηκε το $26.4 \pm 8 \%$ της συνολικής ενεργότητας της PLase A₂ του BAL στο ίζημα των 30000 g, όπου βρίσκεται ο επιφανειοδραστικός παράγοντας με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Στο ίζημα των 100000 g παρουσιάστηκε το $4.7 \pm 2.3 \%$ και στο υπερκείμενο των 100000 g το $68.9 \pm 15 \%$ της ενεργότητας.

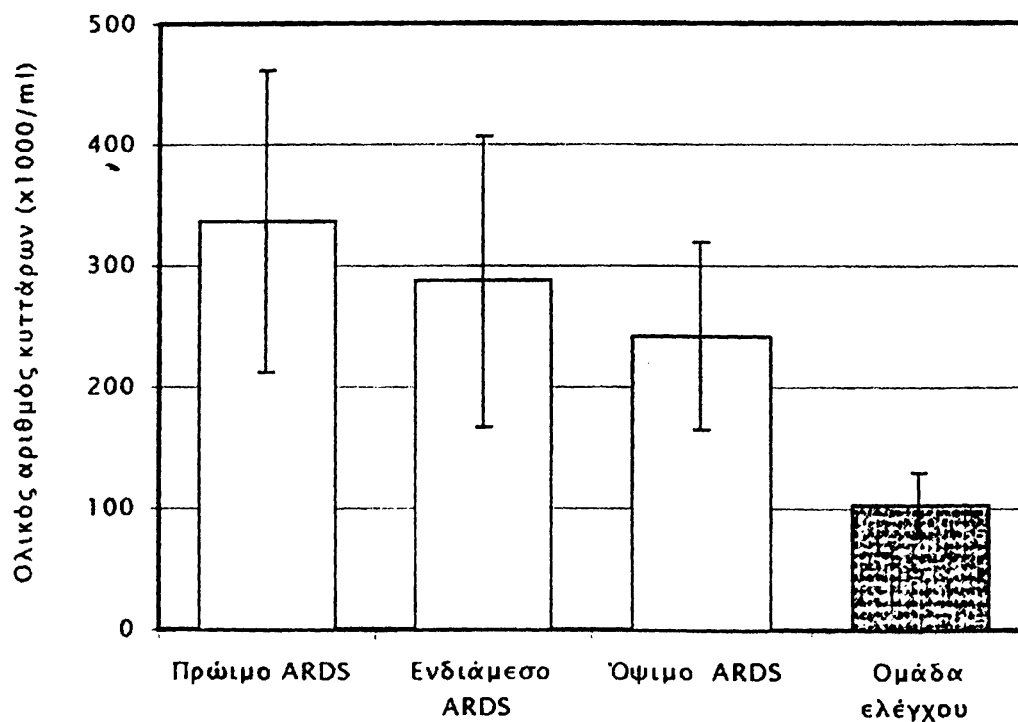


Σχήμα 81. Κατανομή της ολικής ενεργότητας PLase A₂ στα κλάσματα των διαφορετικών φυγοκεντρήσεων του BAL ασθενών με ARDS. Χρησιμοποιήθηκε η φθορισμομετρική μέθοδος ανίχνευσης PLase A₂ με τη χρήση της C₁₂-NBD-PC ως υπόστρωμα σε θερμοκρασία 25 °C.



ΚΥΤΤΑΡΑ

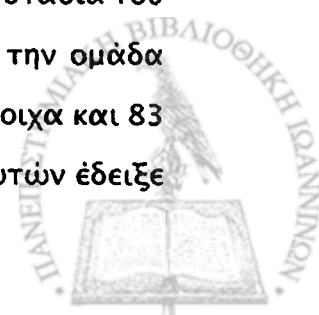
Ο ολικός αριθμός κυττάρων στο BAL ασθενών με ARDS βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος από αυτόν της ομάδας ελέγχου ($p < 0.01$). Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν μεταξύ πρώιμου και ενδιάμεσου σταδίου σε σύγκριση με το όψιμο στάδιο της νόσου ($p < 0.05$) (Σχήμα 82).



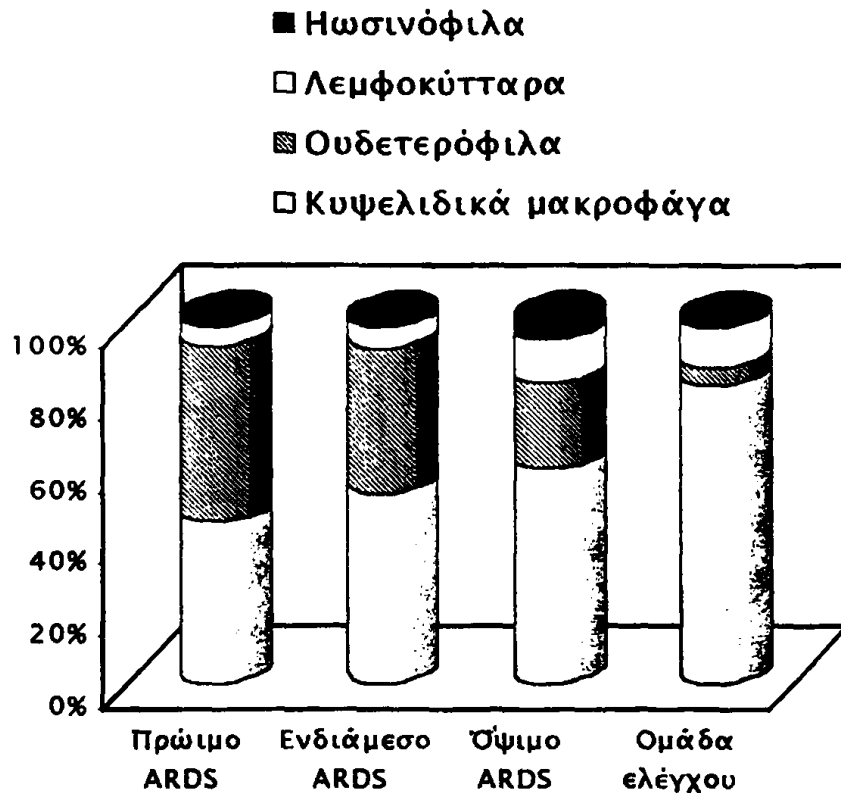
Σχήμα 82. Ολικός αριθμός κυττάρων στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

Αναλυτικά, οι επιμέρους κυτταρικοί πληθυσμοί είχαν ως εξής:

Μακροφάγα: Το ποσοστό των κυψελιδικών μακροφάγων σε όλα τα στάδια του ARDS βρέθηκε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ($p < 0.01$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (45, 52 και 63 % στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο αντίστοιχα και 83 % στην ομάδα ελέγχου). Από το πρώιμο στο όψιμο στάδιο το ποσοστό αυτών έδειξε



αύξηση ($p < 0.05$). Ωστόσο, ο απόλυτος αριθμός των κυψελιδικών μακροφάγων ήταν υψηλότερος σε όλους τους ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Μεταξύ των σταδίων του ARDS δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (Σχήμα 83, Πίνακας 24, Πίνακας 25).



Σχήμα 83. Ποσοστά επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

Πολύ σημαντική ήταν η μεταβολή που παρατηρήθηκε στα ουδετερόφιλα. Το ποσοστό αλλά και ο απόλυτος αριθμός αυτών στο BAL βρέθηκαν αυξημένα σε όλους τους ασθενείς με ARDS ($p < 0.01$ και $p < 0.001$ αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ο απόλυτος αριθμός των ουδετερόφιλων στο BAL ήταν υψηλότερος στο πρώιμο και στο ενδιάμεσο ARDS σε σύγκριση με το όψιμο ARDS ($p < 0.01$) (Σχήμα 83, Πίνακας 24, Πίνακας 25).

Πίνακας 24. Απόλυτος αριθμός κυττάρων στο BAL ασθενών με ARDS και ομάδας ελέγχου

	Ομάδα ελέγχου	ARDS Πρώιμο	ARDS Ενδιάμεσο	ARDS Όψιμο
Κυψελιδικά μακροφάγα (x1000/ml)	86±23	158±64*	144±58*	153±51*
Όυδετερόφιλα (x1000/ml)	5±1.4	162±55**	129±57**	58±16**
Λεμφοκύτταρα (x1000/ml)	12±1.0	15±2.5+	12±2.9+	22±6.1**
(Ηωσινόφιλα x1000/ml)	0.8±1.5	1.8±2.9+	2±2.2+	9±4.2**

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο (Μ.Ο.) ± τυπική απόκλιση (SD) για τους ασθενείς της κάθε ομάδας

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

+ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS

Στο πρώιμο και ενδιάμεσο ARDS το ποσοστό καθώς και ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων βρέθηκαν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το όψιμο ARDS ($p < 0.01$) (Σχήμα 83, Πίνακας 24, Πίνακας 25).



Τα ηωσινόφιλα παρουσίασαν ανάλογη συμπεριφορά με τα λεμφοκύτταρα. Το ποσοστό και ο απόλυτος αριθμός αυτών ήταν αυξημένα στο όψιμο ARDS σε σύγκριση με το πρώιμο και ενδιάμεσο στάδιο της νόσου ($p < 0.01$) (Σχήμα 83, Πίνακας 24, Πίνακας 25).

Πίνακας 25. Εκατοστιαία ποσοστά κυτταρικών πληθυσμών στο BAL ασθενών με ARDS και ομάδας ελέγχου

	Ομάδα ελέγχου	ARDS Πρώιμο	ARDS Ενδιάμεσο	ARDS Όψιμο
Κυψελιδικά μακροφάγα (%)	83±3.5	45±8(**)	52±5(*)	63±4(**)
Ουδετερόφιλα (%)	4.8±1.7	49±8.2(**)	40±7.4(**)	25±4.5(**)
Λεμφοκύτταρα (%)	11.5±2.4	5.5±1.5(**)	5.5±3.0(**)	13±4.7(+)
Ηωσινόφιλα (%)	0.8±0.5	0.8±1.0(+)	1.2±1.2(+)	4.5±1.5(**)

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο (M.O.) ± τυπική απόκλιση (SD) για τους ασθενείς της κάθε ομάδας.

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

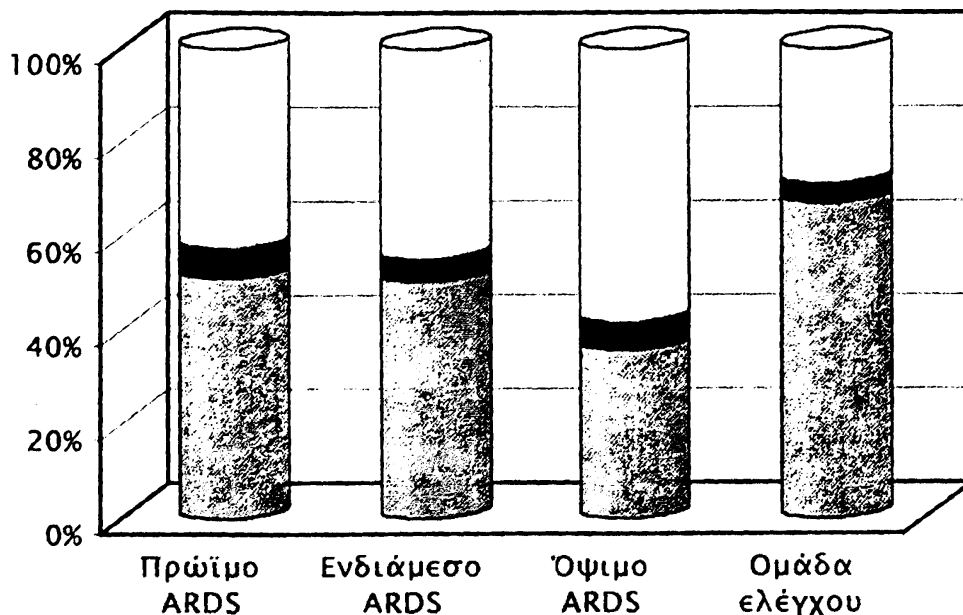
+ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ

Ολικά φωσφολιπίδια

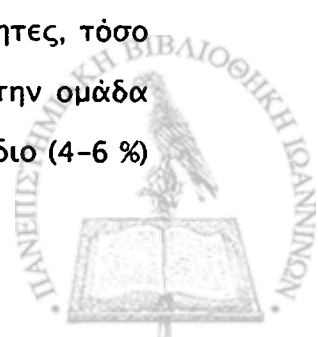
Στο ίζημα των 30 000x g του BAL το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, το ποσοστό των ολικών φωσφολιπιδίων την 1η, 3η και 6η ημέρα του ARDS (51, 50, 35 % αντίστοιχα), βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερο αυτό της ομάδας ελέγχου (68 %), ($p < 0.01$). Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ του όψιμου και του πρώιμου ή ενδιάμεσου ARDS. Το ποσοστό αυτών μειώθηκε από 50 και 51 % στο πρώιμο και ενδιάμεσο στάδιο αντίστοιχα, στο 35% στο όψιμο στάδιο της νόσου (Σχήμα 84, Πίνακας 26).

□ Ίζημα 30000 x g ■ Ίζημα 105000 x g □ Υπερκείμενο 105000 x g



Σχήμα 84. Κατανομή ολικών φωσφολιπιδίων στο ARDS

Στο ίζημα των 105 000 x g του BAL, το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με όχι καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, τόσο στο πρώιμο όσο και στο ενδιάμεσο και στο όψιμο ARDS, καθώς και στην ομάδα ελέγχου, το ποσοστό των ολικών φωσφολιπιδίων παρέμεινε σχεδόν το ίδιο (4-6 %) (Σχήμα 84, Πίνακας 26).



Στο υπερκείμενο των 105 000 x g φαίνεται να ανιχνεύεται μεγάλο μέρος των ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL όλων των ασθενών με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$). Στη σύγκριση μεταξύ των σταδίων της νόσου, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων μειώθηκαν 6 ημέρες μετά την εμφάνιση του ARDS (Σχήμα 84, Πίνακας 26).

Πίνακας 26. Κατανομή ολικών φωσφολιπιδίων στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

	Ίζημα 30 000 x g	Ίζημα 105 000 x g	Υπερκείμενο 105 000 x g
<i>Λιπίδια (%των ολικών)</i>			
Πρώιμο ARDS	51.0±8.0 (*)	6.0±3.0	42±3.0 (*)
Ενδιάμεσο ARDS	50.0±4.0 (*)	5.0±2.0	44±6 (*)
Όψιμο ARDS	35±7.0 (**)	6.0±1.5	57±7 (**)
Ομάδα ελέγχου	68.0±6.0	4.0±1.4	29±6

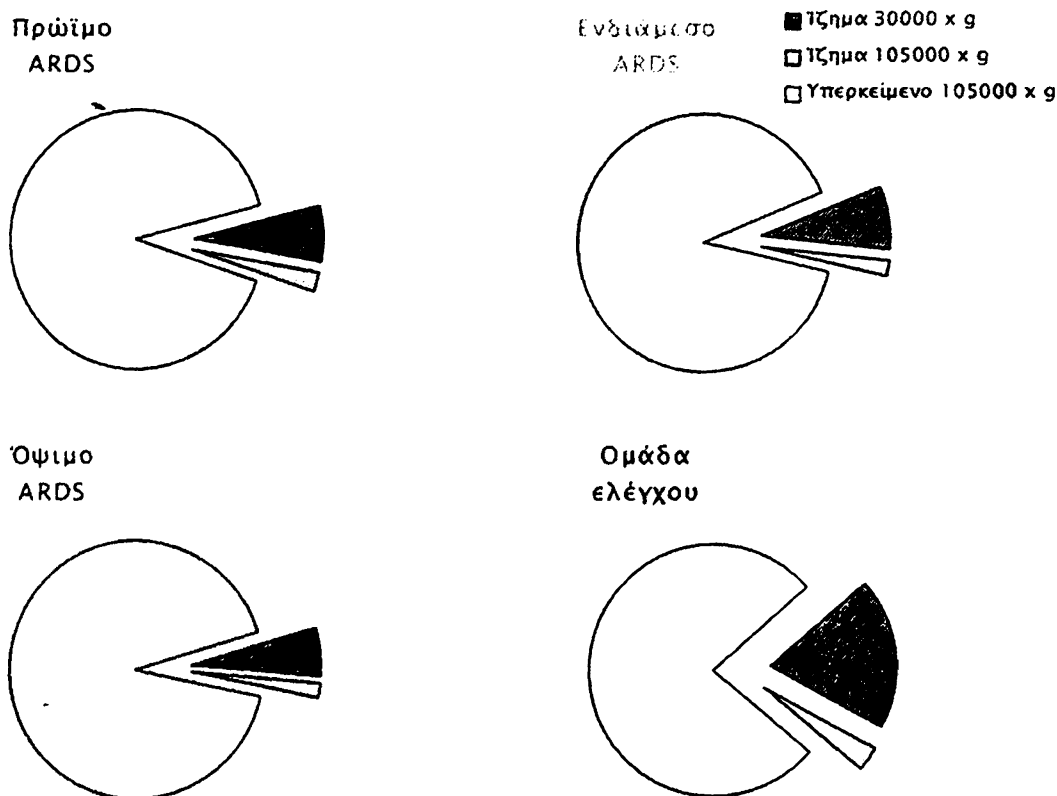
*στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

+ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS



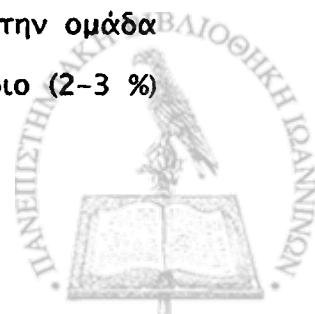
Πρωτεΐνες

Στο ίζημα των 30000 x g του BAL το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, το ποσοστό των ολικών πρωτεϊνών στο πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο ARDS (7, 8 και 6 % αντίστοιχα), βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερο από αυτό της ομάδας ελέγχου (19 %), ($p < 0.01$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της νόσου (Σχήμα 85).



Σχήμα 85. Κατανομή πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορετικών φυγοκεντρήσεων του BAL.

Στο ίζημα των 105 000 x g του BAL, το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα με όχι καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, τόσο την πρώτη όσο και την τρίτη και έκτη ημέρα του ARDS, καθώς και στην ομάδα ελέγχου, το ποσοστό των ολικών πρωτεϊνών παρέμεινε σχεδόν το ίδιο (2-3 %) (Σχήμα 76, Πίνακας 27).



Οι πρωτεΐνες φάνηκαν να ακολουθούν κατανομή αντίστοιχη με τα ολικά φωσφολιπίδια στο υπερκείμενο των 105 000 x g. Εκεί φαίνεται να ανιχνεύεται το μεγαλύτερο μέρος των ολικών πρωτεϊνών στο BAL όλων των ασθενών με ARDS. Τα επίπεδα αυτών εμφανίζονται αυξημένα (90, 90 και 92 % την 1η, 3η και 6η ημέρα του ARDS αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (77 %) ($p < 0.01$). Στη σύγκριση μεταξύ των σταδίων της νόσου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των επιπέδων των ολικών πρωτεϊνών (Σχήμα 76, Πίνακας 27)

Πίνακας 27. Κατανομή πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.

	Ώζημα 30 000x g	Ώζημα 105 000 x g	Υπερκείμενο 105 000 x g
Πρωτεΐνες (% των ολικών)			
Πρώιμο ARDS	7.0±1.4 (*)	2.0±1.4	90±3.0 (*)
Ενδιάμεσο ARDS	8.0±1.4 (*)	2.0±0.7	90±6.0 (*)
Όψιμο ARDS	6.0±1.7 (*)	2.0±0.7	92±5.0 (*)
Ομάδα ελέγχου	19.0±2.2	3.0±1.4	77±5.0

*στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση των σταδίων του ARDS



3) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΥΤΟ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ BAL

Πολλές δυσλειτουργίες του πνεύμονα συνδέονται με ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Συγκεκριμένα, το ARDS σχετίζεται με υψηλής διαβατότητας πνευμονικό οίδημα και φλεγμονή. Δημιουργείται είτε άμεσα με βλάβη στα πνευμονικά κύτταρα, είτε έμμεσα ως αποτέλεσμα οξείας συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (βλ. Εισαγωγή σελ. 37).

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο σχετίζεται με τη θρόμβωση φλεβών και αρτηριών και μπορεί να παρατηρηθεί ως κύρια διαταραχή ή να εμφανισθεί μαζί με άλλες συστηματικές ασθένειες [130]. Το ARDS έχει αναφερθεί ως κλινικό χαρακτηριστικό του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου [568], ενώ είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με ποιοτικές και ποσοτικές διαταραχές των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα (βλ. Εισαγωγή σελ. 66).

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να ελεγχθεί αν ανοσολογικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στην παθογένεση του ARDS. Στην κατεύθυνση αυτή ερευνήθηκε η ύπαρξη και εξειδίκευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο BAL ασθενών με ARDS. Η ύπαρξη αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων στο BAL δεν είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέχρι την πραγματοποίηση αυτής της έρευνας.

Ασθενείς

Για την πραγματοποίηση αυτής της σειράς των πειραμάτων, έγινε συλλογή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από 8 μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς με ARDS και από 12 μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση οι οποίοι δεν πληρούσαν τα κριτήρια του ARDS. Επιπλέον, μελετήθηκαν μερικοί ορροί ασθενών.



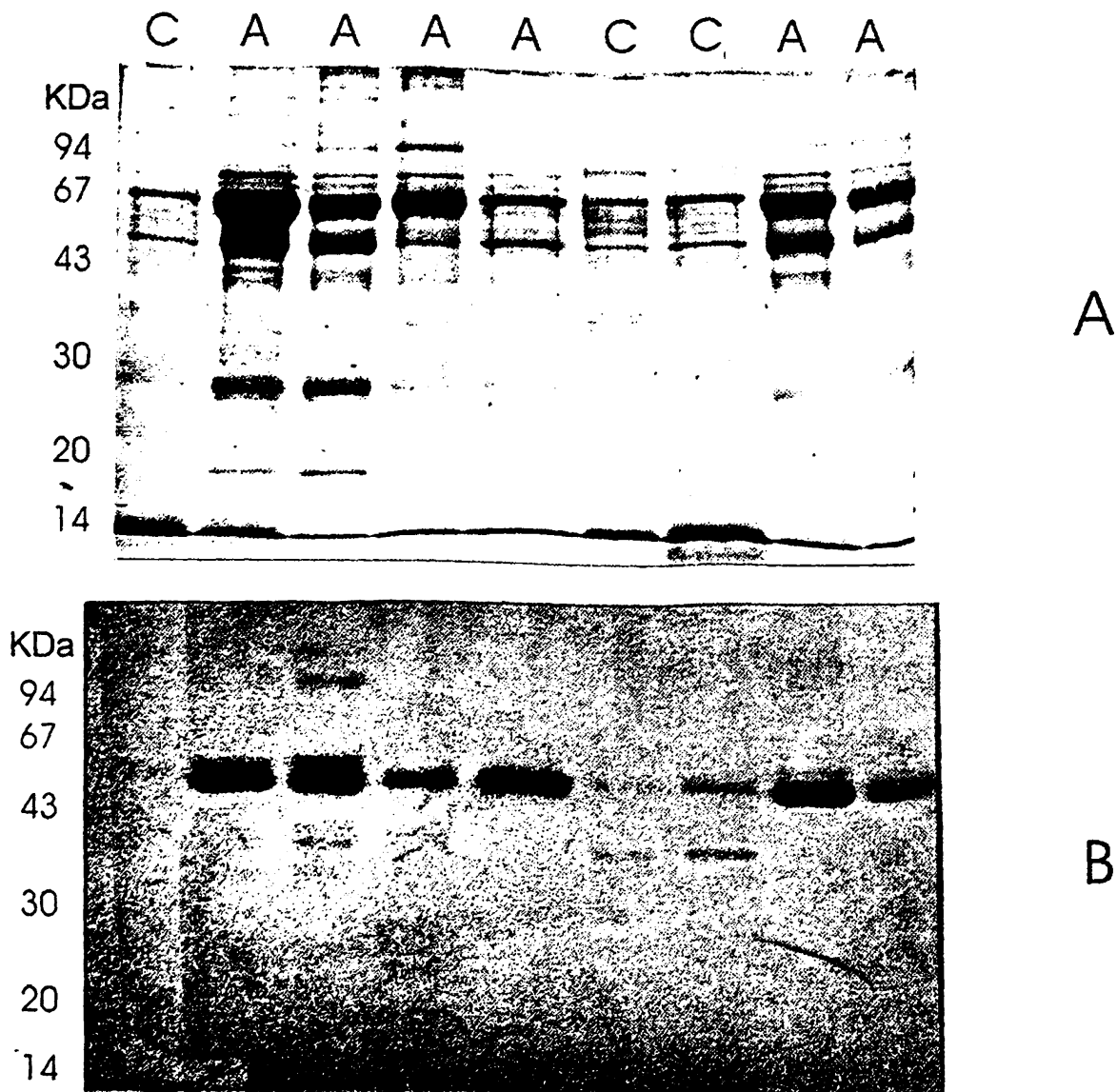
Ανίχνευση IgG στο BAL

Η παρουσία ανοσοσφαιρινών G (IgG) στο BAL των ασθενών με ARDS ανιχνεύθηκε, αρχικά, με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του υπό μετουσιωτικές συνθήκες, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12 % (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blot analysis).

Οι πρωτεΐνες του BAL ασθενών με ARDS καθώς και δειγμάτων ελέγχου διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Σύμφωνα με τα πρότυπα μοριακά βάρη, η κύρια πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 67 kDa στα δείγματα των ασθενών καθώς και στα δείγματα BAL ελέγχου, πιθανώς αντιστοιχεί στην αλβουμίνη. Στα 50 και 25 kDa παρατηρούνται επίσης δύο ζώνες πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να είναι οι βαριές και ελαφρές αλυσίδες των IgG ανοσοσφαιρινών, αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες πιθανώς είναι οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A, SP-B, SP-C και SP-D καθώς και άλλες (Εικόνα 15A).

Για να αναγνωριστούν οι ζώνες των IgG πρωτεϊνών, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, έγινε μεταφορά αυτών από το πήκτωμα σε ειδική μεμβράνη (PVDF) και επώαση με πολυκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν και δεσμεύονται με τις γ-αλυσίδες των ανθρωπίνων IgG ανοσοσφαιρινών. Παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες των 50 kDa των δειγμάτων ασθενών με ARDS σημάνθηκαν ισχυρά. Συνεπώς, οι ζώνες που πιθανώς αντιστοιχούν στις IgG αναγνωρίστηκαν από τα αντι-ανθρώπινα αντισώματα, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη αυτών στο BAL των ασθενών. Αντιθέτως, στα δείγματα BAL ελέγχου δεν παρατηρήθηκε σήμανση IgG. Εξαιρεση αποτέλεσε το δείγμα BAL ελέγχου ασθενούς που υπόκειντο σε θεραπεία με ανοσοσφαιρίνες, στο οποίο ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα (Εικόνα 15B, στήλες 1,6,7).





Εικόνα 15. Α. Ανάλυση SDS-PAGE διαφορετικών δειγμάτων BAL (15 μg πρωτεΐνη).

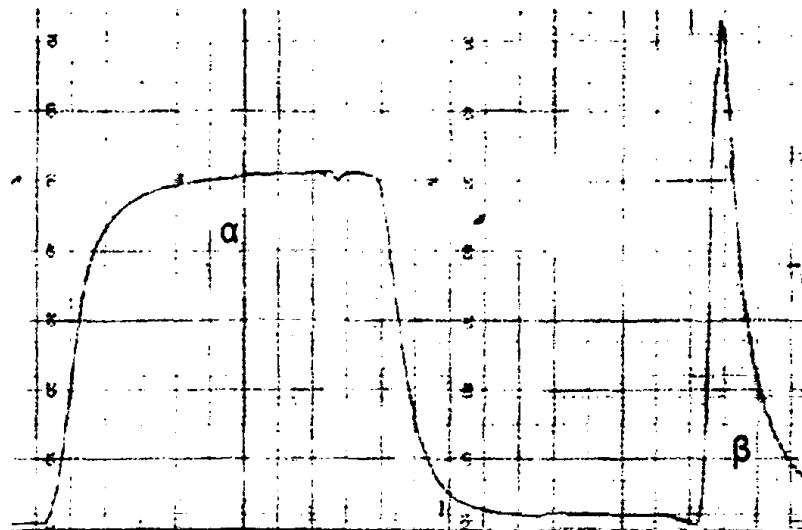
Β. Ανοσοαποτύπωση διαφορετικών δειγμάτων BAL μετά την ανάλυση SDS-PAGE (5 μg πρωτεΐνη). Α: δείγμα BAL ασθενούς με ARDS, C: δείγμα BAL ελέγχου, Ci: δείγμα BAL ελέγχου ασθενούς που υπόκειντο σε θεραπεία με ανοσοσφαιρίνες.



Απομόνωση των IgG με στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G

Η ύπαρξη IgG αντισωμάτων στο BAL ταυτοποιήθηκε, επιπλέον, με απομόνωσή τους με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G. Οι IgG ανοσοσφαιρίνες δεσμεύονται ειδικά με την πρωτεΐνη G όταν το BAL διαπερνάει τη στήλη. Η έκλουση αυτών από τη στήλη επιτυγχάνεται με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH. Η όλη διαδικασία παρακολουθείται συνεχώς με ανιχνευτή υπεριώδους (βλ. υλικά και μέθοδοι). Στο πρωτεϊνικό κλάσμα που συλλέχθηκε μετά την έκλουση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα με pH 2.7 έγινε μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες και υπολογίστηκαν τα επίπεδα της περιεχόμενης πρωτεΐνης.

Έτσι λοιπόν, IgG αντισώματα καθαρίστηκαν και απομονώθηκαν από τα δείγματα BAL όλων των ασθενών με ARDS (Σχήμα 86).



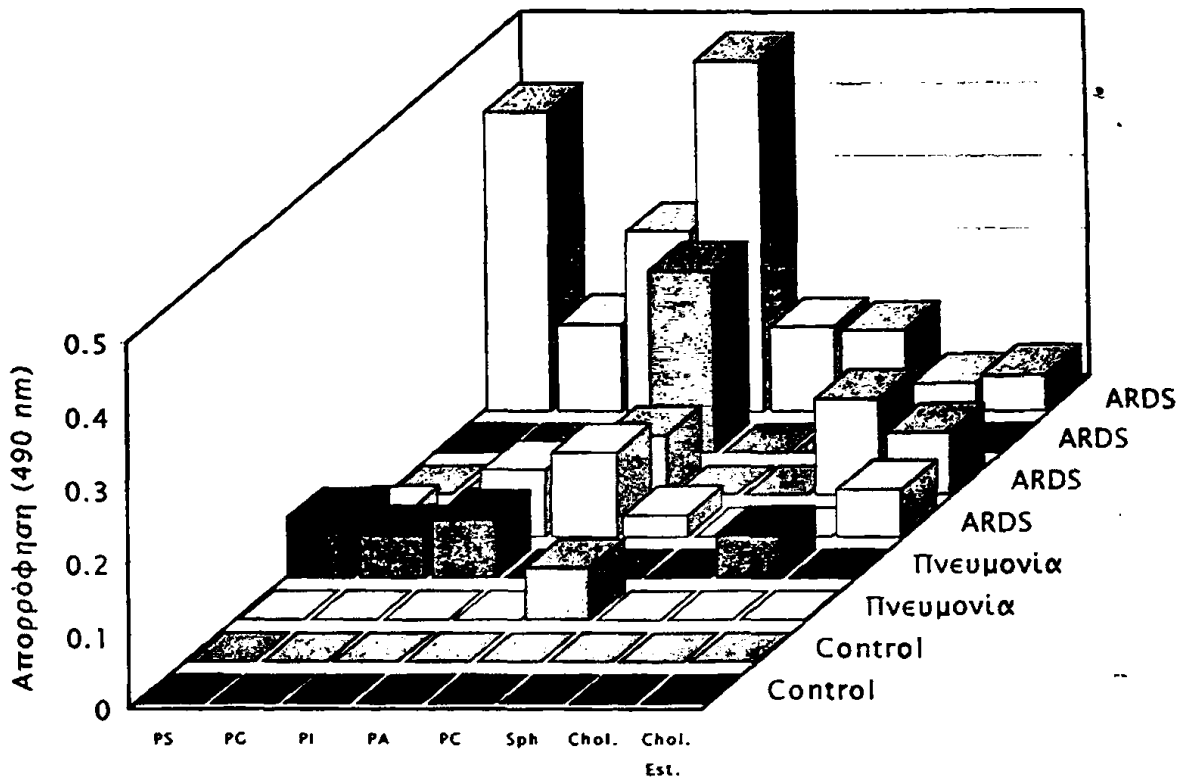
Σχήμα 86. Έκλουσμα πρωτεϊνών δείγματος BAL ασθενούς με ARDS από στήλη πρωτεΐνης G-σεφαρόζης. Το (α) είναι το έκλουσμα με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που δεν συγκρατήθηκαν από τη στήλη. Το (β) είναι το έκλουσμα με το ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης και αντιστοιχεί στο κλάσμα των IgG πρωτεϊνών που συγκρατήθηκαν από τη στήλη.

Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL

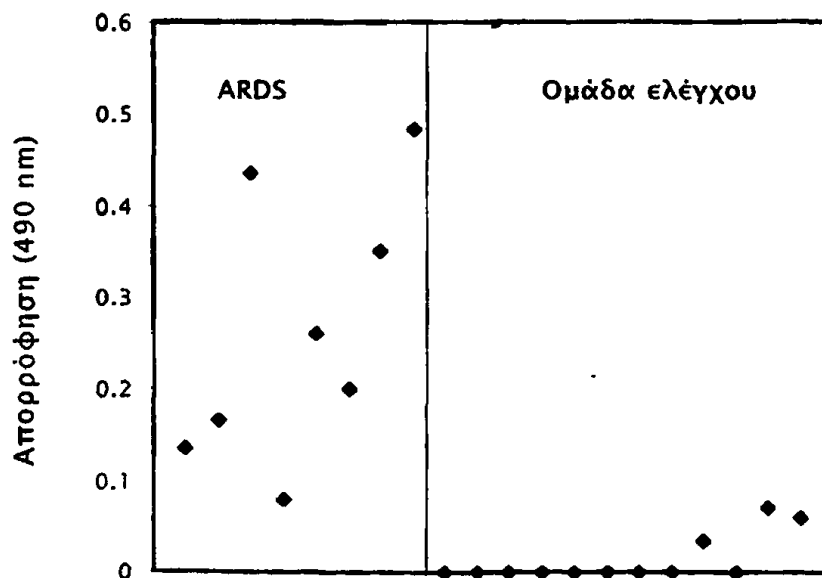
Με δεδομένη λοιπόν την ύπαρξη των IgG αντισωμάτων στο BAL των ασθενών ελέγχθηκε ακολούθως η εξειδίκευση αυτών με διάφορα φωσφολιπίδια. Για την ανίχνευση αντι-φωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο BAL χρησιμοποιήθηκε αρχικά η μέθοδος της ELISA. Δοκιμάστηκαν ως αντιγόνα, πρότυπα πολικά και ουδέτερα λιπίδια τα οποία ως γνωστόν, είναι συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων, τα οποία επωάστηκαν στην πλάκα ELISA. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η δέσμευση των αντισωμάτων του BAL με τα εξής λιπίδια: φωσφατιδυλοσερίνη (PS), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), φωσφατιδικό οξύ (PA), φωσφατιδυλαχολίνη (PC), σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη και εστέρες της χοληστερόλης. Το φωσφατιδικό οξύ, παρότι δεν αποτελεί συστατικό του επιφανειακού παράγοντα, συμπεριλήφθηκε στον έλεγχο επειδή είχε δειχθεί από προηγούμενες μελέτες, ότι σε μερικές περιπτώσεις, τα αντισώματα κατά των ανιονικών φωσφολιπιδίων μπορούν να ανιχνευθούν με το PA [603].

Παρατηρήθηκε δέσμευση των αντισωμάτων του BAL ασθενών με ARDS με τα ανιονικά φωσφολιπίδια, κυρίως PS και PA. Μικρή δέσμευση παρατηρήθηκε μερικές φορές με PI, PG και χοληστερόλη (Σχήμα 87, Σχήμα 88). Αντιθέτως, καμία σημαντική αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε με τα φωσφολιπίδια PC και PE. Παρουσιάστηκε ασθενής δέσμευση με τη χοληστερόλη αλλά όχι με την εστεροποιημένη χοληστερόλη. Στους ασθενείς με ARDS το επίπεδο των αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων βρέθηκε υψηλότερο από τα δείγματα ελέγχου όταν χρησιμοποιήθηκε PA στην ELISA. Δείγματα BAL ασθενών χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση δεν εμφάνισαν σημαντικά επίπεδα αντιλιπιδικών αντισωμάτων, ενώ δείγματα BAL ασθενών με πνευμονική μόλυνση είχαν χαμηλή μη ειδική αντιλιπιδική ενεργότητα (Σχήμα 87).



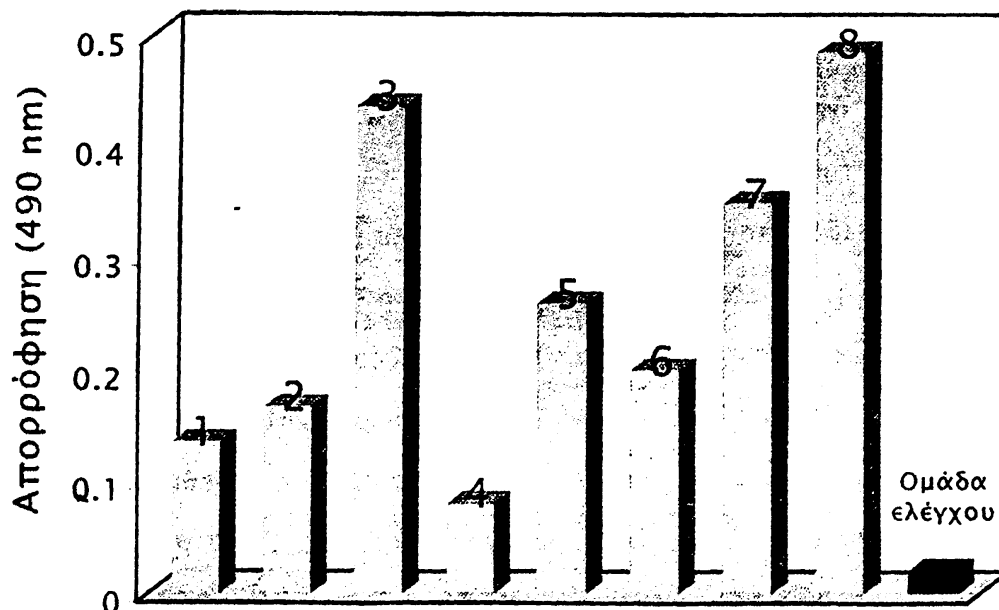


Σχήμα 87. Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL. Δέσμευση των BAL με διάφορα λιπίδια που προεπιβάστηκαν στην πλάκα ELISA (5 µg/κελί).



Σχήμα 88. Αποτελέσματα της ELISA. Δέσμευση αντισωμάτων των BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου με το φωσφατιδικό οξύ (5 µg/κελί).





Σχήμα 89. ELISA με φωσφατιδικό οξύ. Απόκριση των BAL ασθενών με ARDS και η μέση απόκριση της ομάδας ελέγχου.

1 - 8: BAL από διαφορετικούς ασθενείς με ARDS.

Ομάδα ελέγχου: μέση τιμή απόκρισης 12 δειγμάτων BAL ασθενών χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση, οι οποίοι δεν πληρούσαν τα κριτήρια του ARDS.



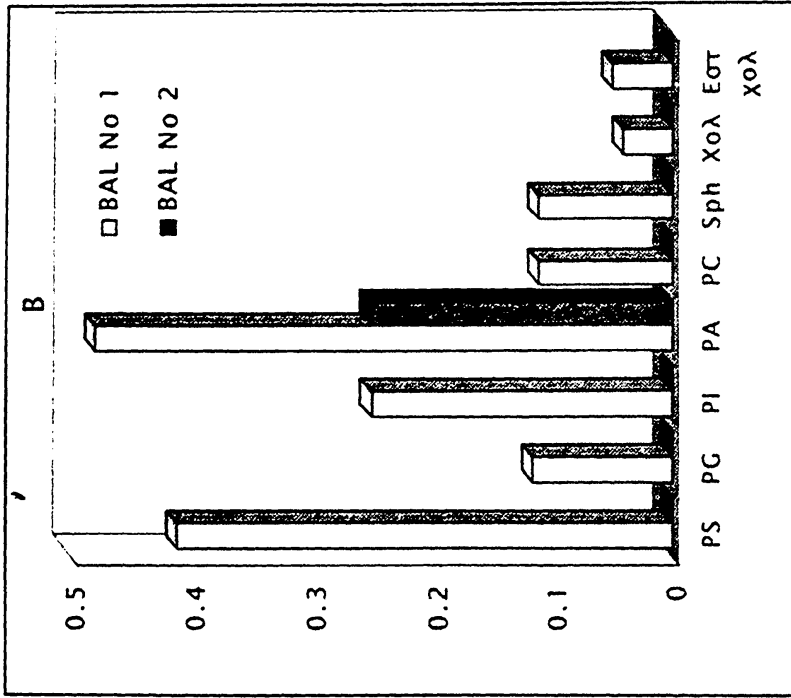
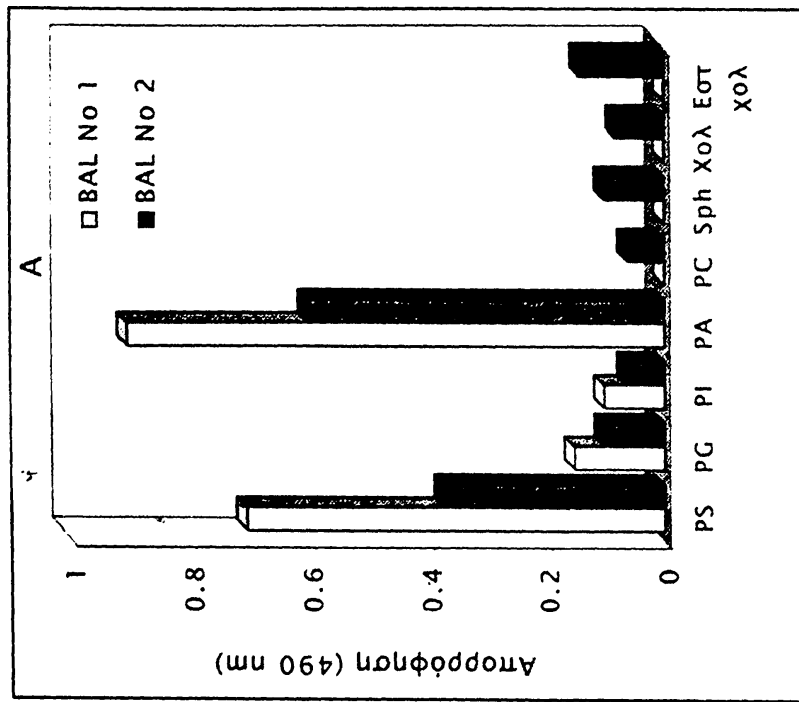
ELISA με καθαρισμένες IgG

Για να υποστηρίξουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, ελέγξαμε την δέσμευση των καθαρισμένων IgG με την ίδια σειρά λιπιδίων. Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι, μερικά είδη αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων απαιτούν την παρουσία της β₂-γλυκοπρωτεΐνης του πλάσματος για να δεσμευτούν με τα φωσφολιπίδια (βλ. Εισαγωγή). Στην περίπτωση αυτή, τα καθαρισμένα aPL από στήλη σεφαρόζης-πρωτεΐνης G δε θα αναγνώριζαν τα φωσφολιπίδια. Συγκρίναμε λοιπόν την δέσμευση των δειγμάτων BAL με τη δέσμευση των καθαρισμένων IgG από τα ίδια δείγματα BAL ασθενών με ARDS, με διάφορα λιπίδια με την τεχνική της ELISA.

Η απόκριση των καθαρισμένων IgG αντισωμάτων, βρέθηκε ότι ήταν ποιοτικά παρόμοια με αυτή του BAL. Δέσμευση των καθαρισμένων αντισωμάτων του BAL ασθενών παρατηρήθηκε κυρίως με τη φωσφατιδυλοσερίνη και το φωσφατιδικό οξύ. Μικρή δέσμευση παρατηρήθηκε με PI και PC. Αντιθέτως, καμία σημαντική αντίδραση δεν ανιχνεύθηκε με τη χοληστερόλη και τους εστέρες της χοληστερόλης (Σχήμα 91).

Σε μερικές περιπτώσεις είχε προταθεί ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα που υπάρχουν στους ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο χρειάζονται την παρουσία συμπαραγόντα για να αντιδράσουν με τα φωσφολιπίδια, όπως η β₂ γλυκοπρωτεΐνη. Με το πείραμα αυτό φάνηκε πως οι καθαρισμένες IgG ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες στερούνται της παρουσίας άλλων συμπαραγόντων, αναγνωρίζουν τα φωσφολιπιδικά αντιγόνα με τον ίδιο τρόπο όπως το BAL.

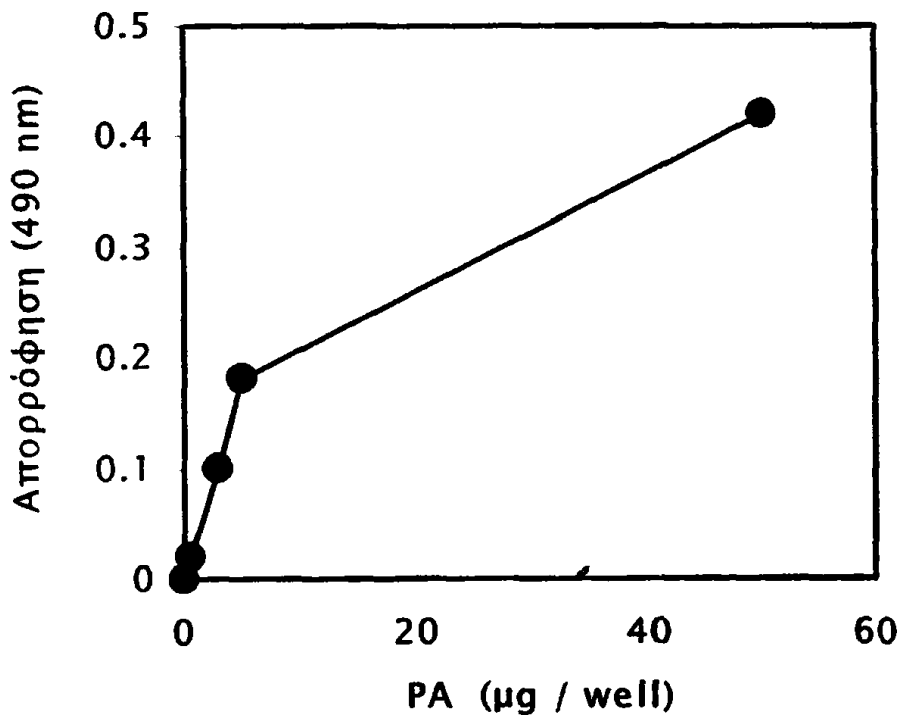




Σχήμα 91. ELISA με BAL (A) και με καθαρισμένες IgG από BAL με χρωματογραφία συγγένειας (B) σε διάφορα λιπίδια.

ELISA με BAL και αυξημένες συγκεντρώσεις PA

Στη συνέχεια των πειραμάτων, η δέσμευση των αντισωμάτων δείγματος BAL ασθενούς με ARDS ελέγχθηκε σε αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφατιδικού οξέος. Παρατηρήθηκε ότι, η δέσμευση αυξάνεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφατιδικού οξέος και επιβεβαιώθηκε με αυτόν τον τρόπο η εξειδίκευση των αντισωμάτων (Σχήμα 92).



Σχήμα 92. ELISA με BAL (αραιωμένο 1/4) ασθενούς με ARDS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φωσφατιδικού οξέος.

4) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ BAL ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΑΝΤΙ-ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΑΝΕΠΤΥΞΕ ARDS

Ο σκοπός αυτής της σειράς των πειραμάτων ήταν ο προσδιορισμός των βιοχημικών χαρακτηριστικών, ο έλεγχος της ύπαρξης αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων και η εξειδίκευσή τους στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS) και σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS).

Έτσι, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών και της αλβουμίνης, ολικά φωσφολιπίδια, κύτταρα, τα είδη των φωσφολιπιδίων, και IgG αυτοαντισώματα.

Ασθενής

Μία γυναίκα 40 ετών με πρωτεύων αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εισήχθη στη μονάδα εντατικής θεραπείας λόγω πυρετού, δύσπνοιας, υποξυγοναιμίας και αμφίπλευρες πνευμονικές διηθήσεις. Είχε ένα ιστορικό πολλαπλών αποβολών και τεσσάρων προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης κατά τη διάρκεια των τελευταίων 5 χρόνων. Τα κριτήρια του APLAS καθορίστηκαν από την ύπαρξη aCL (aCL IgG: 148, IgM: 357, φυσιολογικά επίπεδα <100) καθώς και από θρομβοκυτοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων 60.000/μL). Η λήψη του BAL έγινε 6 ώρες μετά την έναρξη του μηχανικού αερισμού.

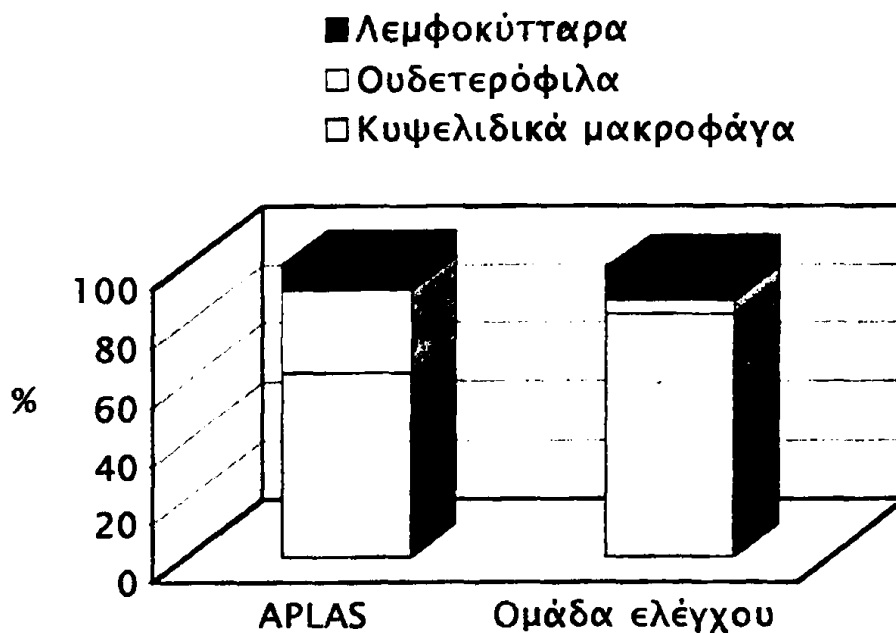


Κύτταρα

Το ποσοστό των κυψελιδικών μακροφάγων βρέθηκε μειωμένο (63%) στο BAL του ασθενούς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (83 ± 3.5), ενώ το ποσοστό των ουδετερόφιλων βρέθηκε υψηλότερο (28 %) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (4.8 ± 1.7). Το ποσοστό των λεμφοκυττάρων κατείχε το 9 % ενώ της ομάδας ελέγχου το 11 ± 2.4 % (Πίνακας 28, Σχήμα 93).

Πίνακας 28. Επίπεδα κυττάρων στο BAL ασθενούς με αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο

	BAL APLAS	Ομάδα ελέγχου
Κυψελιδικά μακροφάγα (%)	63	83 ± 3.5
Ουδετερόφιλα (%)	28	4.8 ± 1.7
Λεμφοκύτταρα (%)	9	11 ± 2.4



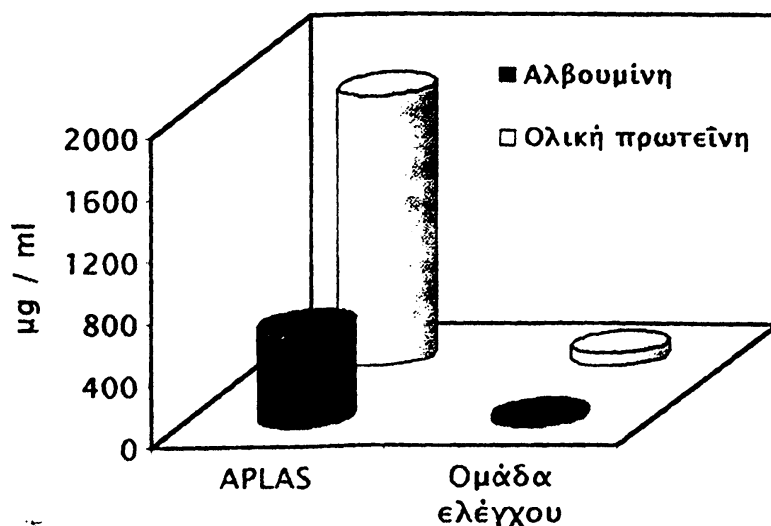
Σχήμα 93. Είδη κυττάρων στο BAL ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο ο οποίος ανέπτυξε ARDS.

Πρωτεΐνες και αλβουμίνη

Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ολικής πρωτεΐνης (1746 $\mu\text{g/ml}$) και αλβουμίνης (613 $\mu\text{g/ml}$) στο BAL του ασθενούς με APLAS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (80 ± 16 $\mu\text{g/ml}$ και 30 ± 6 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα), η οποία αποτελείται από μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση (Πίνακας 29, Σχήμα 94).

Πίνακας 29. Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου.

	APLAS	Ομάδα ελέγχου
Ολική πρωτεΐνη ($\mu\text{g/ml}$)	1746	80 ± 16
Αλβουμίνη ($\mu\text{g/ml}$)	613	30 ± 6



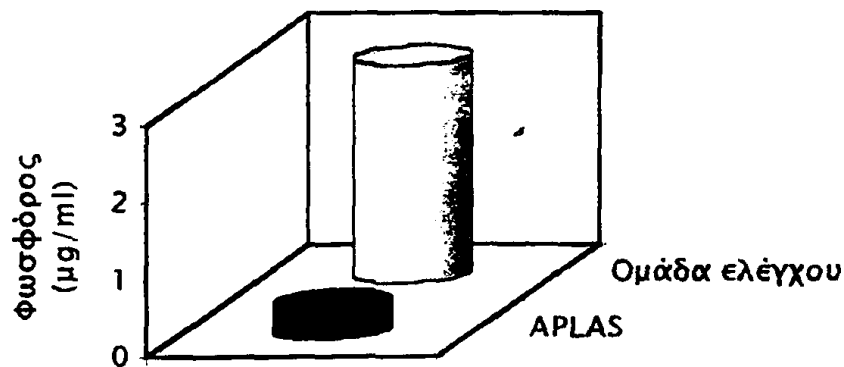
Σχήμα 94. Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου.

Φωσφολιπίδια

Παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στα επίπεδα των ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL του ασθενούς με APLAS (0.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($2.82 \pm 0.7 \mu\text{g P / ml}$). Η μείωση αυτή άγγιξε το 90 % της τιμής των επιπέδων της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 30, Σχήμα 95).

Πίνακας 30. Επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου.

	Ομάδα ελέγχου	APLAS
Φωσφόρος ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	2.82 ± 0.7	0.37



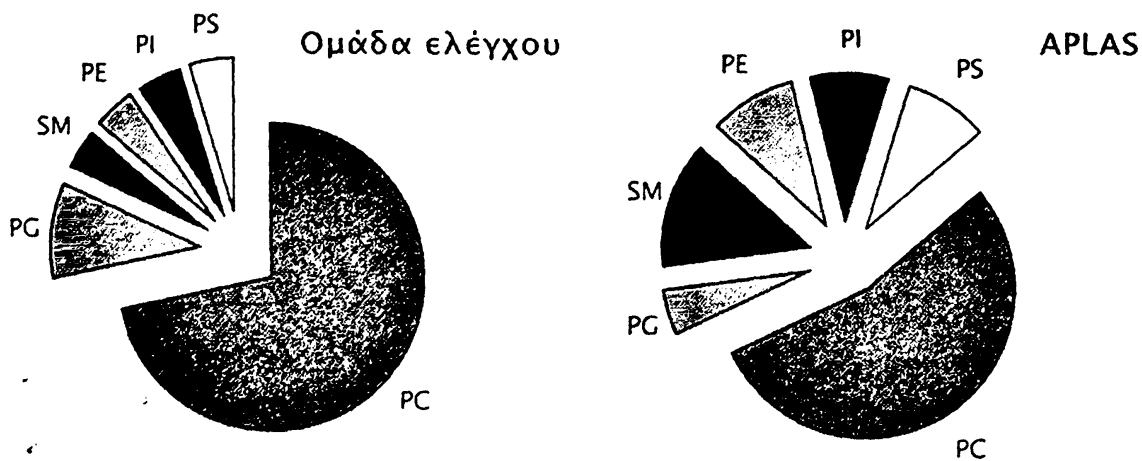
Σχήμα 95. Επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με APLAS και της ομάδας ελέγχου.

Παρατηρήθηκε επίσης ποιοτική μεταβολή στα επίπεδα των φωσφολιπιδίων στο BAL του ασθενούς με APLAS (Εικόνα 16). Συγκεκριμένα, η φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλογλυκερόλη βρέθηκαν σε μειωμένα επίπεδα (43 % και 4.2 % αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($71 \pm 3.4 \%$ και $10 \pm 1.6 \%$).

Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα σφίγγομυελίνης (11 %), φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (7.6 %), φωσφατιδυλινοσιτόλης (6.8 %) και φωσφατιδυλοσερίνης (7.4 %) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (4.3 ± 0.4 , 4.6 ± 0.8 , 4.5 ± 0.5 και 4.8 ± 0.5 αντίστοιχα) (Πίνακας 31, Σχήμα 96).

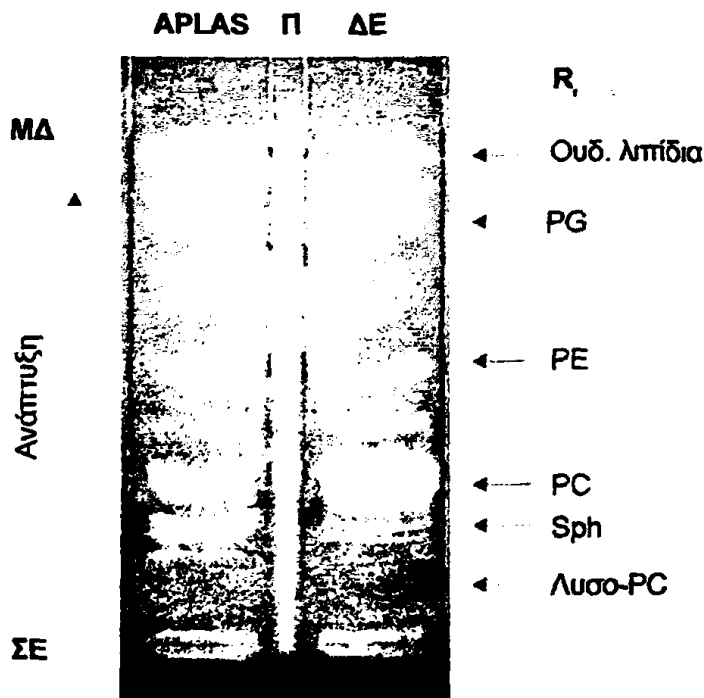
Πίνακας 31. Είδη φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενούς με APLAS και ομάδας ελέγχου.

	APLAS	Ομάδα ελέγχου
PC (%)	43	71 ± 3.4
PG (%)	4.2	10 ± 1.6
SM (%)	11	4.3 ± 0.4
PE (%)	7.6	4.6 ± 0.8
PI (%)	6.8	4.5 ± 0.5
PS (%)	7.4	4.8 ± 0.5
Υπόλοιπα (%)	20	-



Σχήμα 96. Ποσοτική κατανομή των ειδών των φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου.





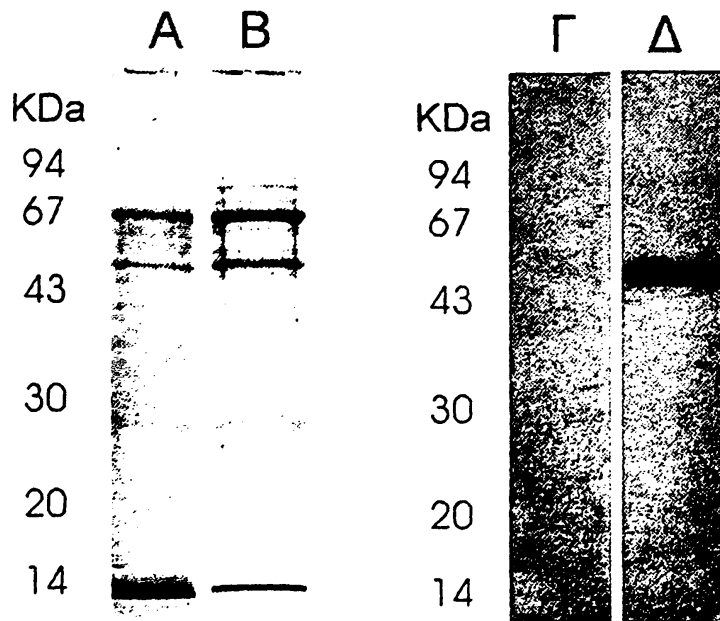
Εικόνα 16. TLC δείγματος BAL ασθενούς με APLAS και δείγματος ελέγχου (ΔΕ) σε σύστημα δαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (65:35:7, v/v). (ΜΔ = μέτωπο διαλύτη, ΣΕ = σημείο εκκίνησης, Π = πρότυπα λιπίδια).

Επίπεδα PAF

Η περιοχή του πυριτικού οξέος μεταξύ της σφιγγομυελίνης (Sph) και της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (λυσο-PC) του δείγματος BAL του ασθενούς με APLAS (Εικόνα 16) αποξύθηκε και εκχυλίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Η μέτρηση των επιπέδων του PAF έγινε με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού (βλ. υλικά και μέθοδοι). Δεν ανιχνεύθηκαν επίπεδα PAF στο δείγμα του BAL του ασθενούς.

Ανίχνευση των IgG στο BAL με APLAS

Η παρουσία των IgG αντισωμάτων στο BAL ανιχνεύθηκε με ηλεκτροφόρηση αυτού υπό μετουσιωτικές συνθήκες και ανοσοαποτύπωση. Η απομόνωση αυτών έγινε με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G. Όπως είναι γνωστό, οι βαριές αλυσίδες των IgG ανοσοσφαιρινών αναμένονται σε μοριακό βάρος 50 kDa και οι ελαφρές στα 25 kDa. Στο BAL του ασθενούς με APLAS (Εικόνα 17B) καθώς και της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 17A) εμφανίστηκε μια ζώνη πρωτεΐνης σε μοριακό βάρος 67 kDa, η οποία πιθανώς είναι η αλβουμίνη. Ζώνες σε μοριακά βάρη των 50, 43, και 25 kDa ανιχνεύθηκαν επίσης στο BAL με APLAS. Η πρωτεΐνη σε μοριακό βάρος 50 kDa πιθανώς αντιστοιχεί στις βαριές αλυσίδες των IgG.



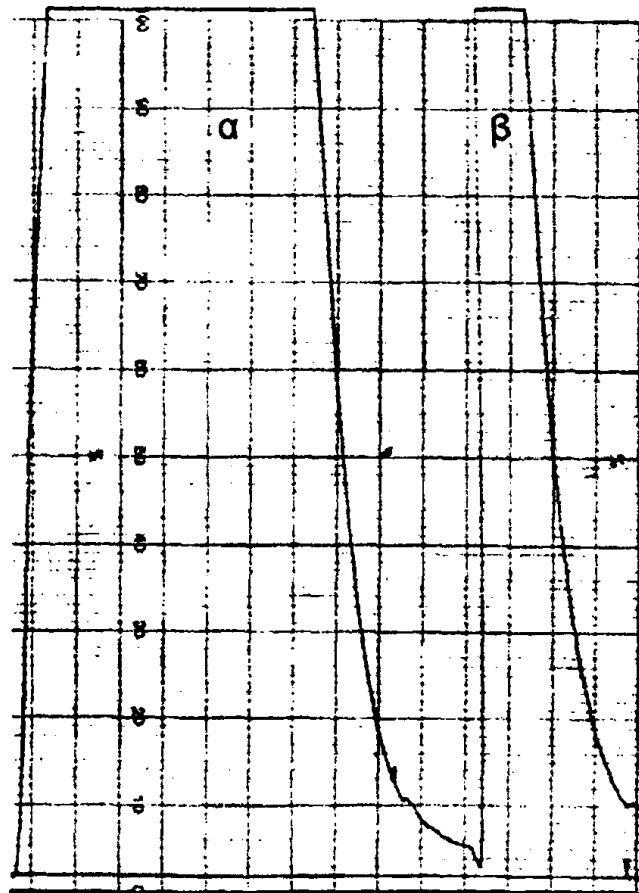
Εικόνα 17. Αποτελέσματα από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (A, B) και ανοσοαποτύπωση (Γ, Δ) των πρωτεϊνών του BAL ασθενούς με APLAS (B και Δ) και δείγματος ελέγχου (A και Γ).

Οι υπόλοιπες ζώνες στα 43 και <14 kDa πιθανώς αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A, SP-B, SP-C και SP-D.

Με ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών με αντι-ανθρώπινα IgG αντισώματα, η ζώνη στα 50 kDa στο BAL του ασθενούς με APLAS σημάνθηκε ισχυρά (Εικόνα 17Δ), υποδεικνύοντας ότι η ζώνη αυτή αντιστοιχεί σε IgG ανοσοσφαιρίνες. Αντιθέτως,

στο δείγμα ελέγχου δεν παρατηρήθηκε σήμανση στην πρωτεΐνη που αντιστοιχούσε σε μοριακό βάρος 50 kDa (Εικόνα 17Γ).

Οι IgG ανοσοσφαιρίνες του BAL του ασθενούς καθαρίστηκαν στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G. Το κλάσμα β που αντιστοιχούσε στις πρωτεΐνες IgG συλλέχθηκε (Σχήμα 97β). Τα επίπεδα των IgG πρωτεϊνών που εκλούστηκαν ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα δείγματα ασθενών με ARDS (βλ. Σχήμα 86, σελ. 272).

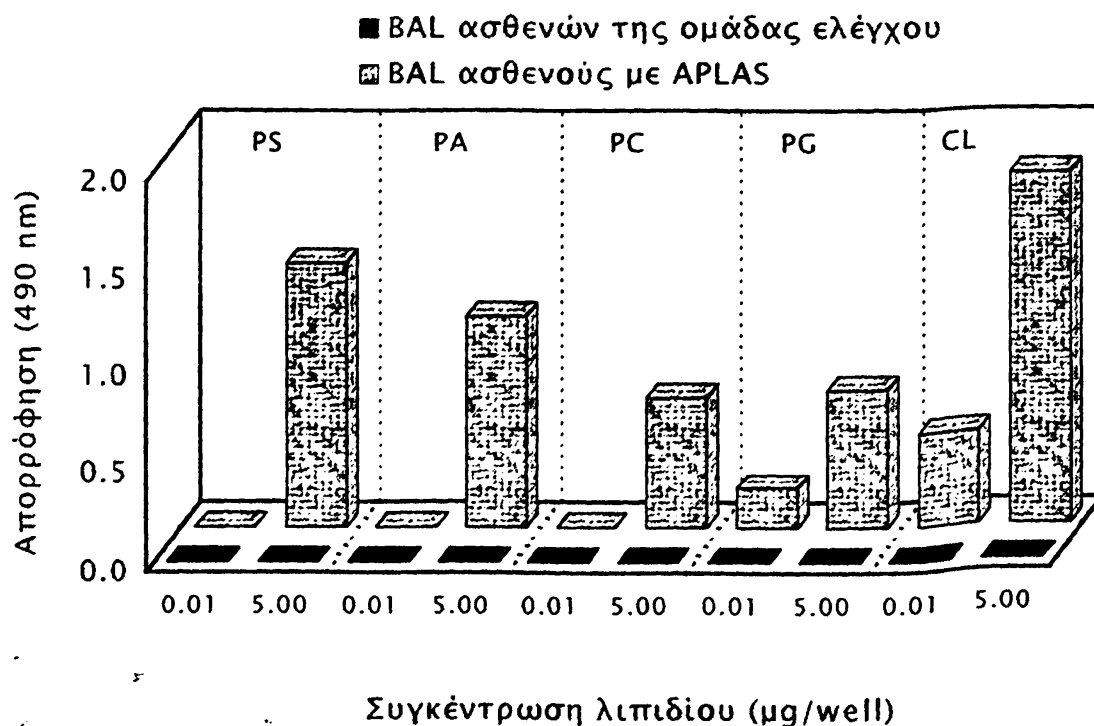


Σχήμα 97. Κατανομή πρωτεϊνών του δείγματος BAL του ασθενούς με APLAS που εκλούστηκαν από τη στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G. (α = υπόλοιπες πρωτεΐνες, β = IgG πρωτεΐνες).

Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL με APLAS

Αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα βρέθηκαν στο BAL του ασθενούς με APLAS. Ειδικά, IgG αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης, φωσφατιδυλοσερίνης και του φωσφατιδικού οξέος ανιχνεύθηκαν σε υψηλά επίπεδα, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν IgG αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στο BAL της ομάδας ελέγχου. Μικρή αντίδραση παρατηρήθηκε με τη φωσφατιδυλοχολίνη αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο με την καρδιολιπίνη, φωσφατιδυλοσερίνη ή το φωσφατιδικό οξύ. Μεγαλύτερη απόκριση του BAL παρατηρήθηκε όταν αυξημένες συγκεντρώσεις λιπιδίου επωάστηκαν στην ELISA (Σχήμα 99).

Όταν τα καθαρισμένα IgG αντισώματα του BAL από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G δοκιμάστηκαν με ELISA, βρέθηκε παρόμοια εξειδίκευση στα φωσφολιπίδια.

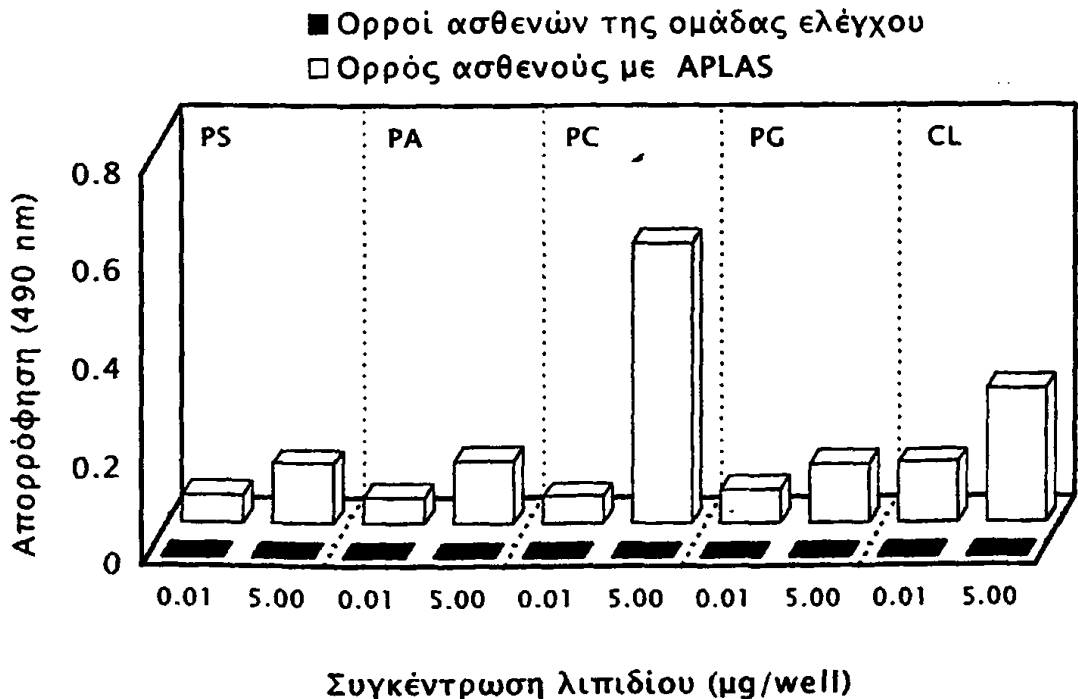


Σχήμα 99. Δέσμευση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων του BAL με διάφορα λιπίδια.



Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στον ορρό

aPL βρέθηκαν επίσης στον ορρό του ασθενούς με APLAS. Σε αντίθεση με το BAL, IgG αντισώματα κατά της φωσφατιδυλοχολίνης και της καρδιολιπίνης ανιχνεύθηκαν σε υψηλά επίπεδα στο ορρό του ασθενούς με APLAS, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν aPL στον ορρό της ομάδας ελέγχου. Τα IgG αντισώματα στον ορρό του ασθενούς έδειξαν να δεσμεύονται με τη φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη, και φωσφατιδικό οξύ αλλά με μικρότερη απόκριση από ότι με τη φωσφατιδυλοχολίνη ή την καρδιολιπίνη. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι, η μεγαλύτερη απόκριση σημειώθηκε με τη φωσφατιδυλοχολίνη. Παρόμοια με το BAL, η αντίδραση του ορρού με τα φωσφολιπίδια αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του λιπιδίου που επωάστηκε στην πλάκα. Η μεγαλύτερη απορρόφηση παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση λιπιδίου 5 μg.



Σχήμα 100. Δέσμευση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων του ορρού με διάφορα λιπίδια.



5) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΑ IgG ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΚΛΟΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΤΗΛΗ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ

Ένας αριθμός δειγμάτων BAL και ορρών ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό και απομόνωση των IgG αντισωμάτων που περιείχαν με χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνης G. Αρχικά, ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν, ο περαιτέρω έλεγχος της εξειδίκευσης των αντισωμάτων που όπως είχε δείχθει, αναγνώριζαν λιπίδια ως αντιγόνα. Η σκέψη που κυριάρχησε λοιπόν ήταν ότι, εφόσον οι IgG ανοσοσφαιρίνες ήταν συστατικά του BAL των ασθενών με ARDS και με δεδομένη την ύπαρξη των λιπιδίων σε αυτό, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι κάποια μόρια IgG θα έχουν ήδη, δεσμεύσει λιπίδια. Η στήλη σεφαρόζης-πρωτεΐνης G, όπως είναι γνωστό, συγκρατεί τα μόρια των αντισωμάτων από την σταθερή (F₂) περιοχή τους. Η μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων πιθανώς βρίσκεται δεσμευμένη με το αυτοαντιγόνο, ακόμα και όταν αυτά βρίσκονται ακινητοποιημένα στο υλικό της στήλης, δηλαδή στην πρωτεΐνη G.

Εάν ίσχυε αυτό, τότε τα δεσμευμένα με τις IgG αντιγόνα θα μπορούσαν πιθανώς να ανακτηθούν από τις IgG πρωτεΐνες που συγκρατήθηκαν από τη στήλη. Στην περίπτωση δε που τα αντιγόνα αυτά ήταν λιπίδια, αυτά θα ήταν ίσως δυνατόν να παραληφθούν με μια απλή εκχύλισή τους με οργανικούς διαλύτες από το υδατικό κλάσμα των IgG που εκλούεται από τη στήλη.

Στην κατεύθυνση αυτή, έγινε εκχύλιση των λιπιδίων των κλασμάτων της στήλης που αντιστοιχούσαν στις IgG ανοσοσφαιρίνες δειγμάτων BAL και ορρών ασθενών καθώς και δειγμάτων ελέγχου. Ακολούθησε ανάλυση αυτών των λιπιδίων με υψηλής απόδοσης χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (HPTLC).

Σε μια σειρά πειραμάτων, ανιχνεύσαμε την παρουσία ουδετέρου λιπιδίου στο κλάσμα των IgG από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) που εκλούστηκε ύστερα από χρωματογραφικό καθαρισμό με στήλη συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G. Οι ερωτήσεις που ανέκυψαν ήταν οι εξής:



- μήπως το λιπίδιο που ανιχνεύθηκε ήταν αυτο-αντιγόνο το οποίο είχε δεσμευθεί ειδικά με τις IgG του ΒΑΛ;
- μήπως το λιπίδιο είχε δεσμευθεί με τις IgG του ΒΑΛ κατά τρόπο μη ειδικό;
- ή συγκρατήθηκε από τη σεφαρόζη-πρωτεΐνη G;

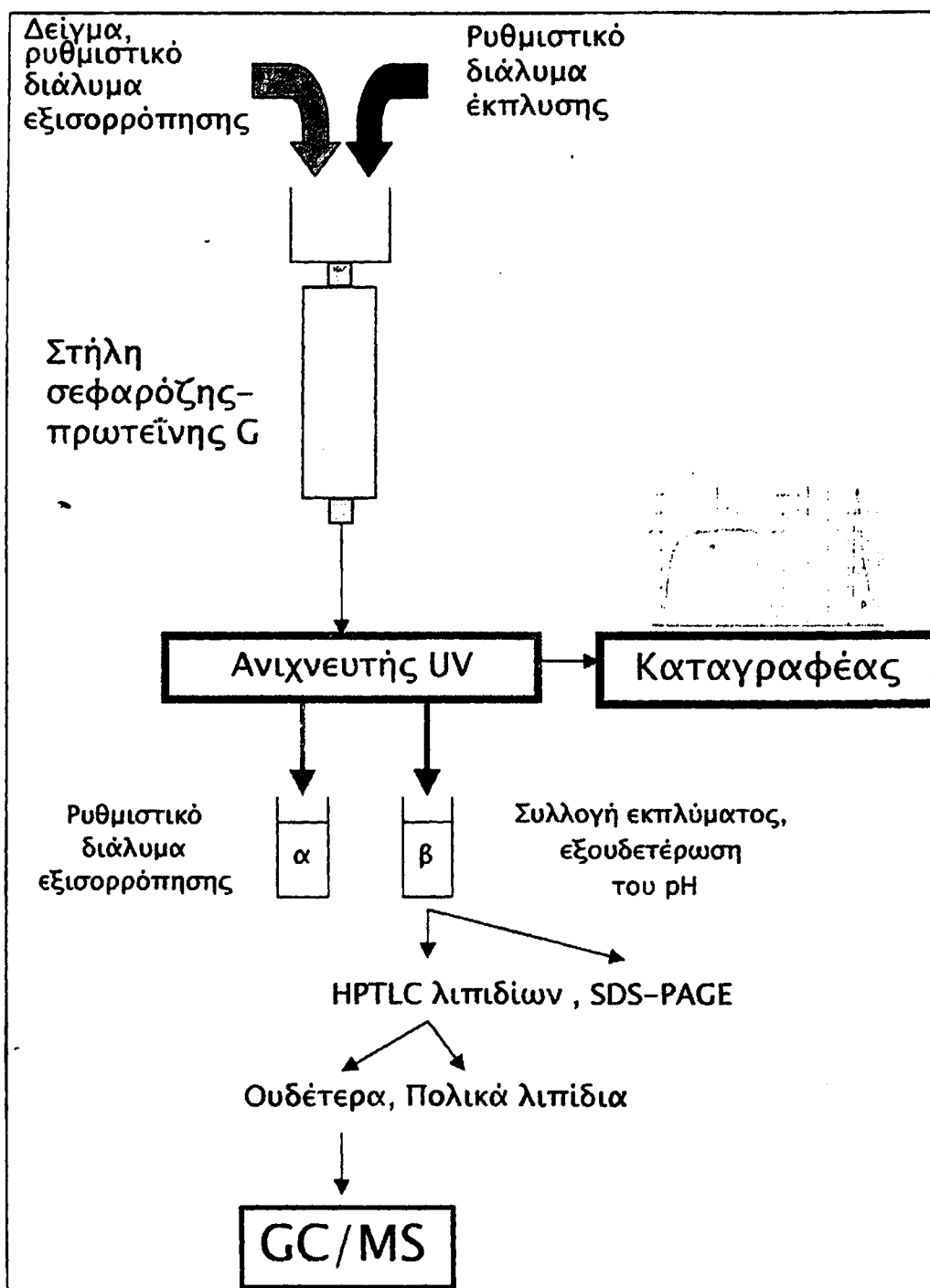
Στη μελέτη αυτή τα κλάσματα IgG δειγμάτων ΒΑΛ και ορρών που εκλούστηκαν από τη στήλη σεφαρόζης- πρωτεΐνης G, αναλύθηκαν περαιτέρω. Διαλύματα αλβουμίνης (BSA) με πρότυπα λιπίδια χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Έτσι, πρότυπα διαλύματα μιγμάτων χοληστερόλης ή/και άλλων λιπιδίων με BSA διαπεράστηκαν από τη στήλη πρωτεΐνης G-σεφαρόζης για να ελεγχθεί αν συγκρατούνται λιπίδια στο υλικό της στήλης. Το έκλουσμα της στήλης των προτύπων λιπιδικών παρασκευασμάτων εκχυλίστηκε για να παραληφθούν τα λιπίδια. Ανάλυση αυτών των λιπιδίων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος υψηλής απόδοσης (HPTLC). Παρατηρήθηκε μετατόπιση λιπιδίου στο R_f της χοληστερόλης. Σε μερικά δείγματα, η περιοχή της πλάκας που αντιστοιχούσε στο R_f της χοληστερόλης αποξύθηκε και εκχυλίστηκε από το πυριτικό οξύ. Τέλος, το εκχύλισμα αυτό αναλύθηκε με αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS) για να ταυτοποιηθεί η μοριακή του δομή (Σχήμα 100).

ΒΑΛ και ορροί ασθενών

Καθαρισμός των IgG από ΒΑΛ και ορρούς

Δείγματα ΒΑΛ και ορρών που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν να περιέχουν IgG αντισώματα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού καθαρισμού τους από στήλη συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G (βλ. Σχήμα 86, σελ. 272). Παρατηρήθηκε ότι τα μεγαλύτερα επίπεδα των πρωτεϊνών των δειγμάτων δεν συγκρατήθηκαν από το υλικό της στήλης, αφού εκλούστηκαν κατά τη διαδικασία φόρτωσης των δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών. Με την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος στο ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης pH 2.7, εκλούστηκαν οι πρωτεΐνες που συγκρατήθηκαν από τη σεφαρόζη-πρωτεΐνη G. Τα κλάσματα αυτά συλλέχθηκαν και αμέσως εξουδετερώθηκε το pH τους.

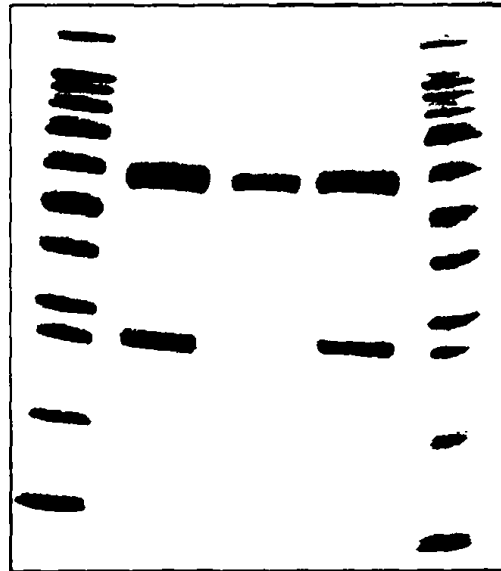




Σχήμα 101. Διάγραμμα ροής καθαρισμού, έκλουσης και συλλογής των IgG με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G καθώς και την ανάλυση των λιπιδίων που περιέχονται σε αυτό.

SDS-PAGE κλασμάτων IgG

Τα κλάσματα των IgG που εκλούστηκαν από τη στήλη (κλάσμα β) δειγμάτων BAL και ορρών, ελέγχθηκαν στη συνέχεια με 12 % SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για να διαπιστωθεί η καθαρότητά τους.



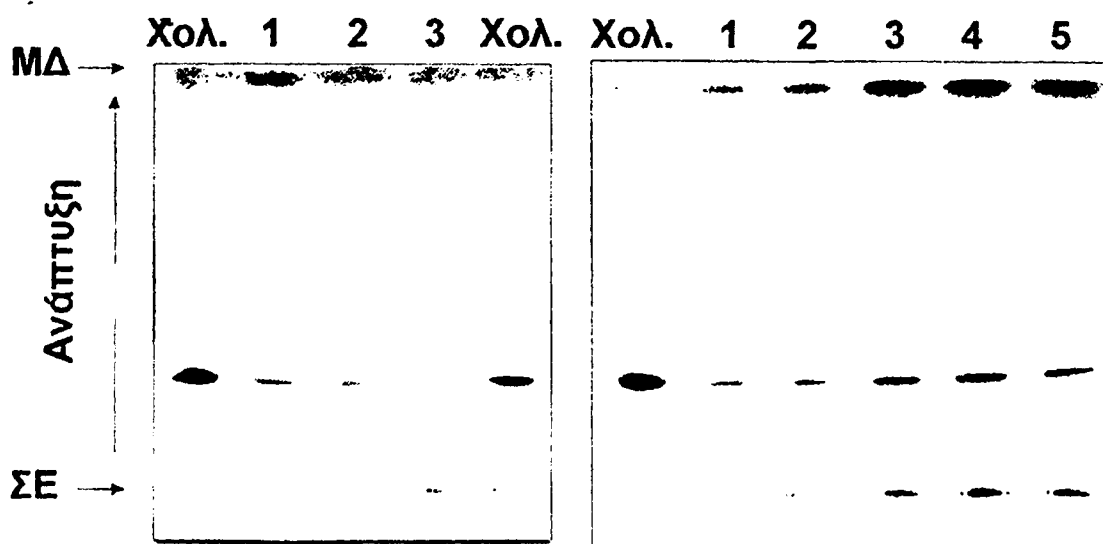
Εικόνα 18. 12% SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών των IgG κλασμάτων 3 δειγμάτων ανθρώπινων ορρών. (Χρησιμοποιήθηκε σειρά πρότυπων μοριακών βαρών 205 / 116 / 97 / 84 / 66 / 55 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14.2 / 6.5 kDa).

Εμφανίστηκαν δύο ζώνες (χρώση Coomassie), στα 50 και 25 kDa, όπου και αναμένονταν να μετακινηθούν οι βαριές και ελαφρές αλυσίδες των IgG αντιστοίχα (Εικόνα 18). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες ζώνες σε διαφορετικά μοριακά βάρη.

Εκχύλιση λιπιδίων και HPTLC του κλάσματος που συγκρατήθηκε από τη στήλη

Όλη η ποσότητα του υδατικού πρωτεϊνικού διαλύματος κάθε δείγματος BAL ή ορρού που εκλούστηκε από τη στήλη (κλάσματα β) εκχυλίστηκε με οργανικούς διαλύτες (βλ. υλικά και μέθοδοι) και απομονώθηκαν τα χλωροφορμικά εκχυλίσματα.

Για να διερευνηθεί η ύπαρξη λιπιδίων, έγινε διαχωρισμός των λιπιδίων του χλωροφόρμικου εκχυλίσματος σε συστήματα ανάπτυξης πολικών και ουδετέρων λιπιδίων με υψηλής απόδοσης χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC). Παρατηρήθηκε η ύπαρξη ουδετέρου λιπιδίου στο R_f της χοληστερόλης στα IgG κλάσματα όλων των δειγμάτων BAL και ορρών που κατακρατήθηκαν από τη στήλη (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. HPTLC λιπιδίων κλασμάτων IgG από δείγματα BAL (1,2,3) και ανθρώπινων ορρών (1,2,3,4,5). (Χολ.=χοληστερόλη, ΣΕ=σημείο εκκίνησης, ΜΔ=μέτωπο διαλύτη). Η ανάπτυξη έγινε σε σύστημα διαλυτών εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). (Χολ. = πρότυπη χοληστερόλη).

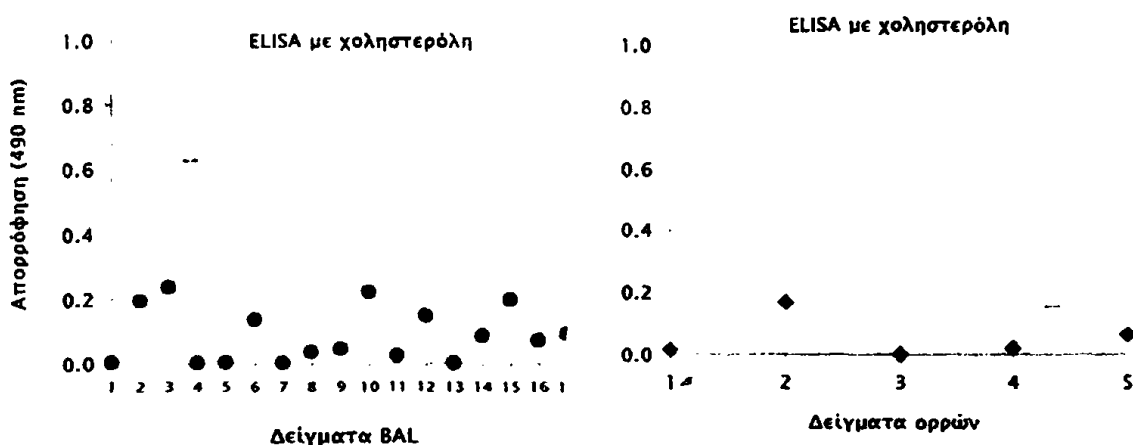
ELISA δειγμάτων BAL και ορρών

Με δεδομένα τα παραπάνω αποτελέσματα, προέκυψε το ερώτημα αν το λιπίδιο που ανιχνεύεται στα IgG κλάσματα που εκλούνται από τη στήλη σεφαρόζης-πρωτεΐνης G δειγμάτων BAL και ορρών είναι το αντιγόνο που ήταν δεσμευμένο ειδικά με τις IgG ανοσοσφαιρίνες του BAL ή του ορού οι οποίες συγκρατήθηκαν ειδικά από την πρωτεΐνη G της στήλης.



Για να απαντηθεί εν' μέρει αυτό το ερώτημα, εξετάστηκε στη συνέχεια η πιθανότητα ύπαρξης IgG αυτο-αντισωμάτων κατά της χοληστερόλης σε BAL και σε ορρούς ασθενών. Έγινε επίστρωση πρότυπης χοληστερόλης στα κελιά της πλάκας ELISA και επώαση ακολούθως με BAL ή ορρούς.

Δοκιμάστηκαν συνολικά 17 δείγματα BAL και 5 δείγματα ορρών. Τα δείγματα προέρχονταν από ομάδες ελέγχου και από ασθενείς με ARDS. Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα δείγματα BAL δεν έδειξε να αναγνωρίζει τη χοληστερόλη ως αντιγόνο. Οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν κυμάνθηκαν από 0 έως 0.2 για όλα τα δείγματα (Σχήμα 101).



Σχήμα 101. Έλεγχος δέσμευσης δειγμάτων BAL και ορρών με χοληστερόλη, με την τεχνική της ELISA (επίστρωση 20 μg χοληστερόλης ανά κελί).

Οι ορροί που ελέγχθηκαν δεν έδωσαν επίσης σημαντικές απορροφήσεις με τη χοληστερόλη. Οι 4 από τους πέντε ορρούς είχαν μηδενική απορρόφηση, ενώ ένας εμφάνισε απορρόφηση περίπου στο 0.2 (Σχήμα 101).

Μίγματα προτύπων λιπιδίων με BSA

Ανάπτυξη ουδετέρων λιπιδίων

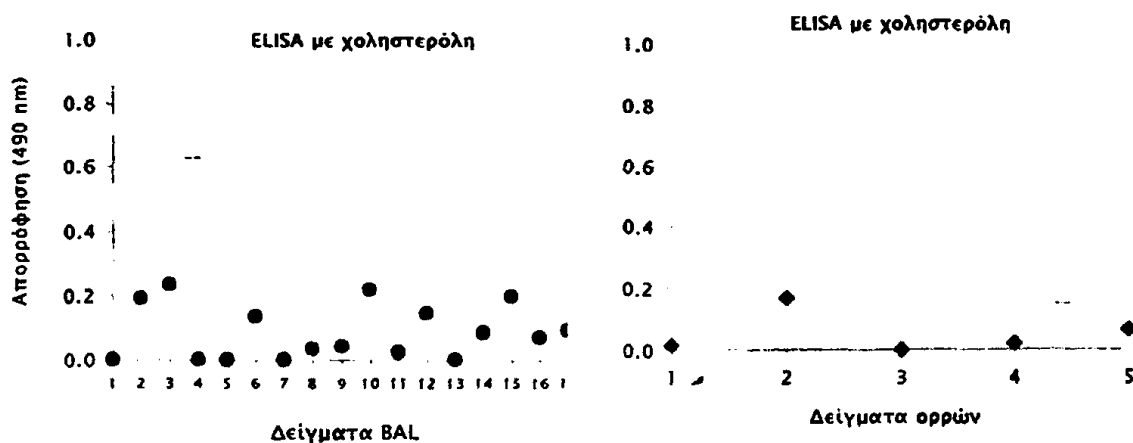
Παρατηρήθηκε η ύπαρξη χοληστερόλης στο υδατικό έκλουσμα της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης όταν προηγουμένως είχε περάσει από αυτή διάλυμα BSA με πρότυπη χοληστερόλη. Χοληστερόλη ανιχνεύθηκε επίσης στο υδατικό έκλουσμα της στήλης όταν προηγουμένως είχε περάσει από αυτή διάλυμα BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. HPTLC λιπιδίων σε σύστημα εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). Το λιπιδικό εκχύλισμα του εκλούσματος με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης της στήλης σεφαρόζης-πρωτεΐνης G αναπτύχθηκε στην πλάκα. Διάλυμα BSA με χοληστερόλη και διάλυμα BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων είχαν περάσει αρχικά από τη στήλη. (Χολ., χοληστερόλη; MAG, μονογλυκερίδιο; TAG, τριγλυκερίδιο).

Για να απαντηθεί εν' μέρει αυτό το ερώτημα, εξετάστηκε στη συνέχεια η πιθανότητα ύπαρξης IgG αυτο-αντισωμάτων κατά της χοληστερόλης σε BAL και σε ορρούς ασθενών. Έγινε επίστρωση πρότυπης χοληστερόλης στα κελιά της πλάκας ELISA και επώαση ακολούθως με BAL ή ορρούς.

Δοκιμάστηκαν συνολικά 17 δείγματα BAL και 5 δείγματα ορρών. Τα δείγματα προέρχονταν από ομάδες ελέγχου και από ασθενείς με ARDS. Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα δείγματα BAL δεν έδειξε να αναγνωρίζει τη χοληστερόλη ως αντιγόνο. Οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν κυμάνθηκαν από 0 έως 0.2 για όλα τα δείγματα (Σχήμα 101).



Σχήμα 101. Έλεγχος δέσμευσης δειγμάτων BAL και ορρών με χοληστερόλη, με την τεχνική της ELISA (επίστρωση 20 μ g χοληστερόλης ανά κελί).

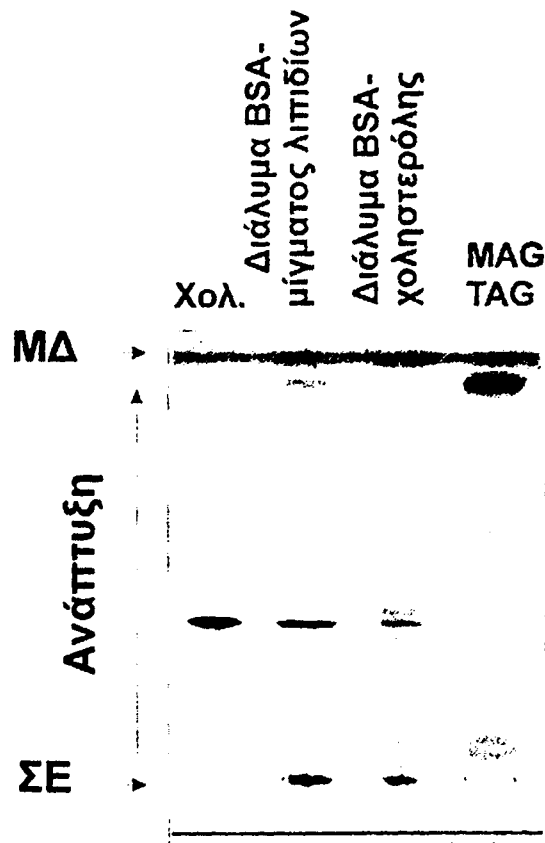
Οι ορροί που ελέγχθηκαν δεν έδωσαν επίσης σημαντικές απορροφήσεις με τη χοληστερόλη. Οι 4 από τους πέντε ορρούς είχαν μηδενική απορρόφηση, ενώ ένας εμφάνισε απορρόφηση περίπου στο 0.2 (Σχήμα 101).



Μίγματα προτύπων λιπιδίων με BSA

Ανάπτυξη ουδετέρων λιπιδίων

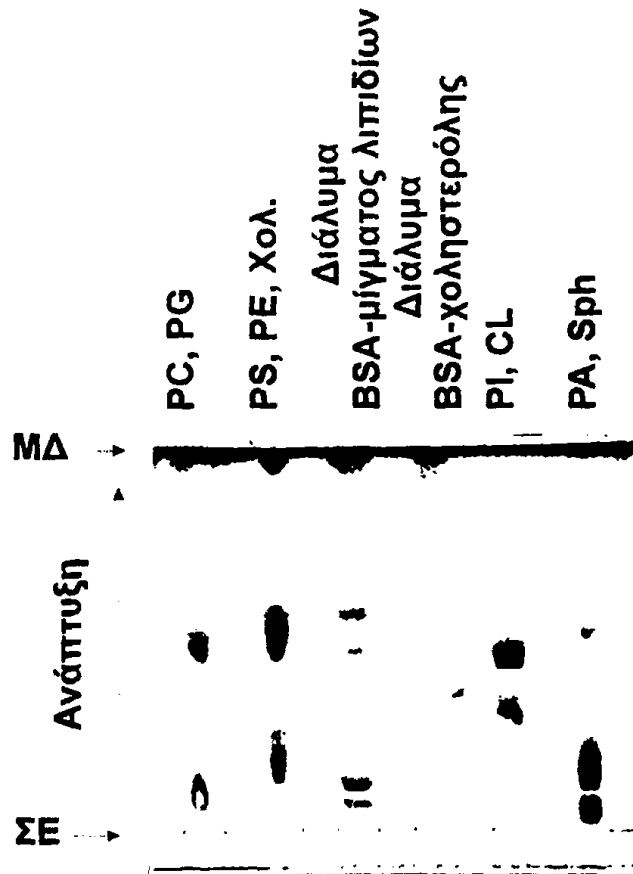
Παρατηρήθηκε η ύπαρξη χοληστερόλης στο υδατικό έκλουσμα της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης όταν προηγουμένως είχε περάσει από αυτή διάλυμα BSA με πρότυπη χοληστερόλη. Χοληστερόλη ανιχνεύθηκε επίσης στο υδατικό έκλουσμα της στήλης όταν προηγουμένως είχε περάσει από αυτή διάλυμα BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. HPTLC λιπιδίων σε σύστημα εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). Το λιπιδικό εκχύλισμα του εκλούσματος με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης της στήλης σεφαρόζης-πρωτεΐνης G αναπτύχθηκε στην πλάκα. Διάλυμα BSA με χοληστερόλη και διάλυμα BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων είχαν περάσει αρχικά από τη στήλη. (Χολ., χοληστερόλη; MAG, μονογλυκερίδιο; TAG, τριγλυκερίδιο).

Ανάπτυξη πολικών λιπιδίων

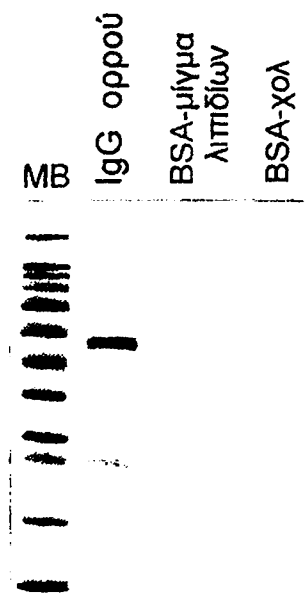
Ανιχνεύθηκαν 4 πολικά λιπίδια στο έκλουσμα της στήλης όταν προηγουμένως είχε περάσει από αυτή το διάλυμα της BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων. Τα λιπίδια που βρέθηκαν είχαν μετατοπιστεί στην πλάκα HPTLC στα R_f των PC, PE, PG, PS (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. HPTLC λιπιδίων των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού είχαν περάσει από αυτή διαλύματα BSA-μίγμα προτύπων λιπιδίων και BSA-χοληστερόλης. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών οξικού μεθυλεστέρα: *n*-προπανόλης: CHCl_3 : MeOH: KCl 0.25 % σε αναλογία (12.5:12.5:14:5:3.5, v/v).

SDS-PAGE εκλούσματος

Για να ελεγχθεί αν ποσότητα αλβουμίνης των διαλυμάτων BSA-προτύπων λιπιδίων συγκρατήθηκε από την πρωτεΐνη G, ποσότητα από το έκλουσμα ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE. Δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη της αλβουμίνης στο έκλουσμα της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης. Προηγουμένως, το παρασκεύασμα της χοληστερόλης με BSA ή το λιπιδικό μίγμα με τη BSA είχε τρέξει από τη στήλη (Εικόνα 22).

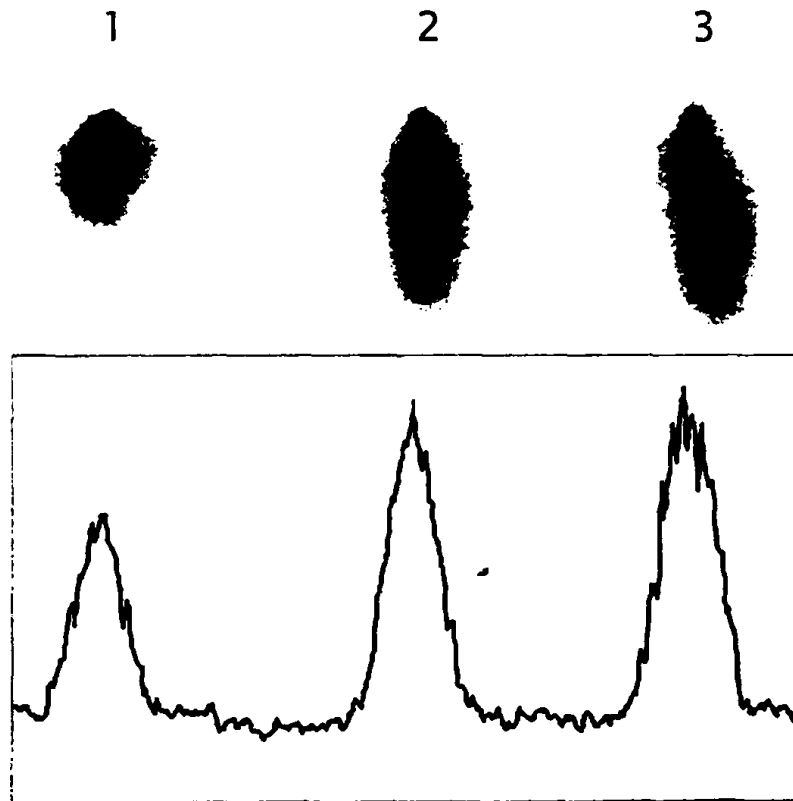


Εικόνα 22. SDS-PAGE του εκλούσματος της στήλης σεφαρόζης-πρωτεΐνης G με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης pH 2.7. Ορρός, διάλυμα BSA με πρότυπη χοληστερόλη και διάλυμα μίγματος προτύπων λιπιδίων με BSA είχαν περαστεί αρχικά από τη στήλη. (Χρησιμοποιήθηκε σειρά πρότυπων μοριακών βαρών 205 / 116 / 97 / 84 / 66 / 55 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14.2 / 6.5 kDa).

Διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδικών μιγμάτων

Ανάπτυξη πολικών λιπιδίων του εκλούσματος

Παρατηρήθηκε ότι ουδέτερα λιπίδια μετατοπίστηκαν στο μέτωπο του διαλύτη. Οι ποσότητες φαίνεται να είναι ανάλογες με τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις που είχαν τα διαλύματα των μιγμάτων των λιπιδίων με BSA (Σχήμα 102).

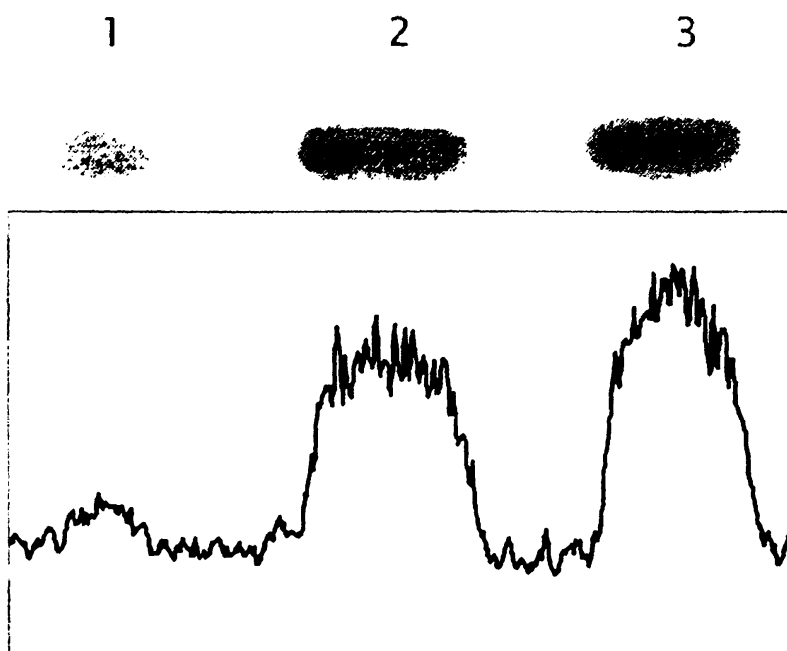


Σχήμα 102. Rf χοληστερόλης μετά από ανάλυση HPTLC λιπιδίων των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού προηγουμένως είχαν περάσει διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίων. (Γραμμή 1=10 μg κάθε λιπιδίου, 2=50 μg, 3=200 μg). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης οξικού μεθυλεστέρα: n-προπανόλης: CHCl₃: MeOH: KCl 0.25% σε αναλογία (12.5:12.5:14.5:3.5, v/v). Η εμφάνιση των πλακών έγινε σε ατμούς ιωδίου. Η φωτογραφία της πλάκας λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (image analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV. Η επεξεργασία της εικόνας έγινε αρχικά με χρήση λογισμικού Photo-paint 7, Corel. Η γραφική απεικόνιση της πυκνότητας των κηλίδων έγινε με λογισμικό Scion Image, NIH.

Ανάπτυξη ουδετέρων λιπιδίων του εκλούσματος

Ανιχνεύθηκε χοληστερόλη και στα τρία εκλούσματα της στήλης όταν τα διαλύματα της BSA με τα μίγματα των προτύπων λιπιδίων είχαν ήδη περάσει από αυτή. Οι ποσότητες της χοληστερόλης που εκλούστηκαν από τη στήλη βρέθηκαν να είναι αυξανόμενες με την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος της BSA σε λιπίδια που είχε τρέξει πριν (Σχήμα 103).

Επιπλέον εμφανίστηκαν ποσότητες ενός ακόμη ουδετέρου λιπιδίου το οποίο μετατοπίστηκε στο μέτωπο του διαλύτη. Το λιπίδιο όμως που φάνηκε να έχει την εντονότερη παρουσία στο κλάσμα που συγκρατήθηκε από το υλικό της στήλης ήταν η χοληστερόλη.



Σχήμα 103. Rf χοληστερόλης μετά από ανάλυση HPTLC των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού προηγουμένως είχαν περάσει διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίων. (Γραμμή 1=10 μg κάθε λιπίδιου, 2=50 μg, 3=200 μg). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). Η εμφάνιση των πλακών έγινε σε ατμούς ιωδίου. Η φωτογραφία της πλάκας λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (image analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV. Η επεξεργασία της εικόνας έγινε αρχικά με χρήση λογισμικού Photo-paint 7, Corel. Η γραφική απεικόνιση της πυκνότητας των κηλίδων έγινε με λογισμικό Scion Image, NIH.

Εκχύλιση του R_f της χοληστερόλης των δειγμάτων

Τα λιπιδικά εκχυλίσματα των κλασμάτων της στήλης που περιείχαν IgG αναπτύχθηκαν ακολούθως σε πλάκα HPTLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης εξάνιο:αιθέρας:οξικό οξύ (70:30:2, v/v). Το λιπίδιο που μετατοπίστηκε στο R_f της χοληστερόλης εκχυλίστηκε από το πυριτικό οξύ της πλάκας. Αυτό πραγματοποιήθηκε σε δείγμα ανθρώπινου ορρού, δείγμα ορρού κουνελιού και προτύπου δείγματος χοληστερόλης.

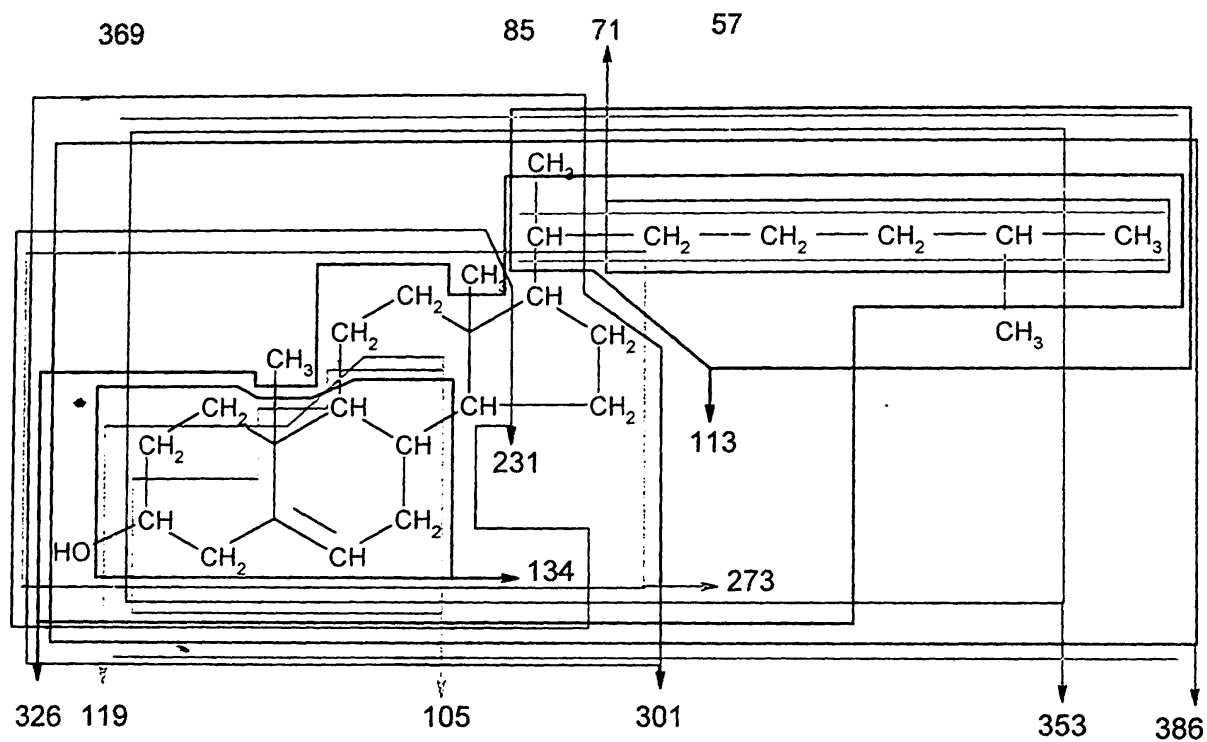
Φάσματα μάζας (MS)

Το τελικό χλωροφορμικό εκχύλισμα του πυριτικού οξέος στο R_f της χοληστερόλης υποβλήθηκε ακολούθως σε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας. Τα φάσματα που λήφθηκαν φαίνονται παρακάτω.

Παρατηρήθηκε ομοιότητα στο φάσμα των λιπιδίων που απομονώθηκε από την περιοχή του πυριτικού οξέος που αντιστοιχούσε στο R_f της χοληστερόλης δειγμάτων IgG ανθρώπινου ορρού και IgG ορρού κουνελιού, με αυτό της πρότυπης χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, εμφανίστηκαν θραύσματα στα m/z 105, 119, 134 και 147, χαρακτηριστικά των ιόντων ενός αρωματικού μορίου της σειράς των αλκυλοβενζενίων (C_nH_{2n-7}) [604]. Τα ιόντα σε m/z 57, 71, 85, 113 αντιστοιχούν σε κεκορεσμένους αλειφατικούς υδρογονάνθρακες της σειράς C_nH_{2n+2} . Το θραύσμα μοριακής μάζας 386 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της χοληστερόλης (Σχήμα 104). Τέλος, στο πρότυπο δείγμα της χοληστερόλης εμφανίστηκαν ιόντα σε m/z 326, 353, 368 (Πίνακας 32). Τα ίδια ιόντα εμφανίστηκαν στα δείγματα του λιπιδικού εκχυλίσματος ανθρώπινων IgG και IgG κουνελιού.

Τα δεδομένα αυτά αποτελούν ισχυρή ένδειξη για την ταυτοποίηση του λιπιδίου που ανιχνεύεται στο κλάσμα των καθαρισμένων IgG από ανθρώπινο ορρό ή από ορρό κουνελιού και μετατοπίζεται στο R_f της χοληστερόλης κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό (TLC), ως χοληστερόλη.





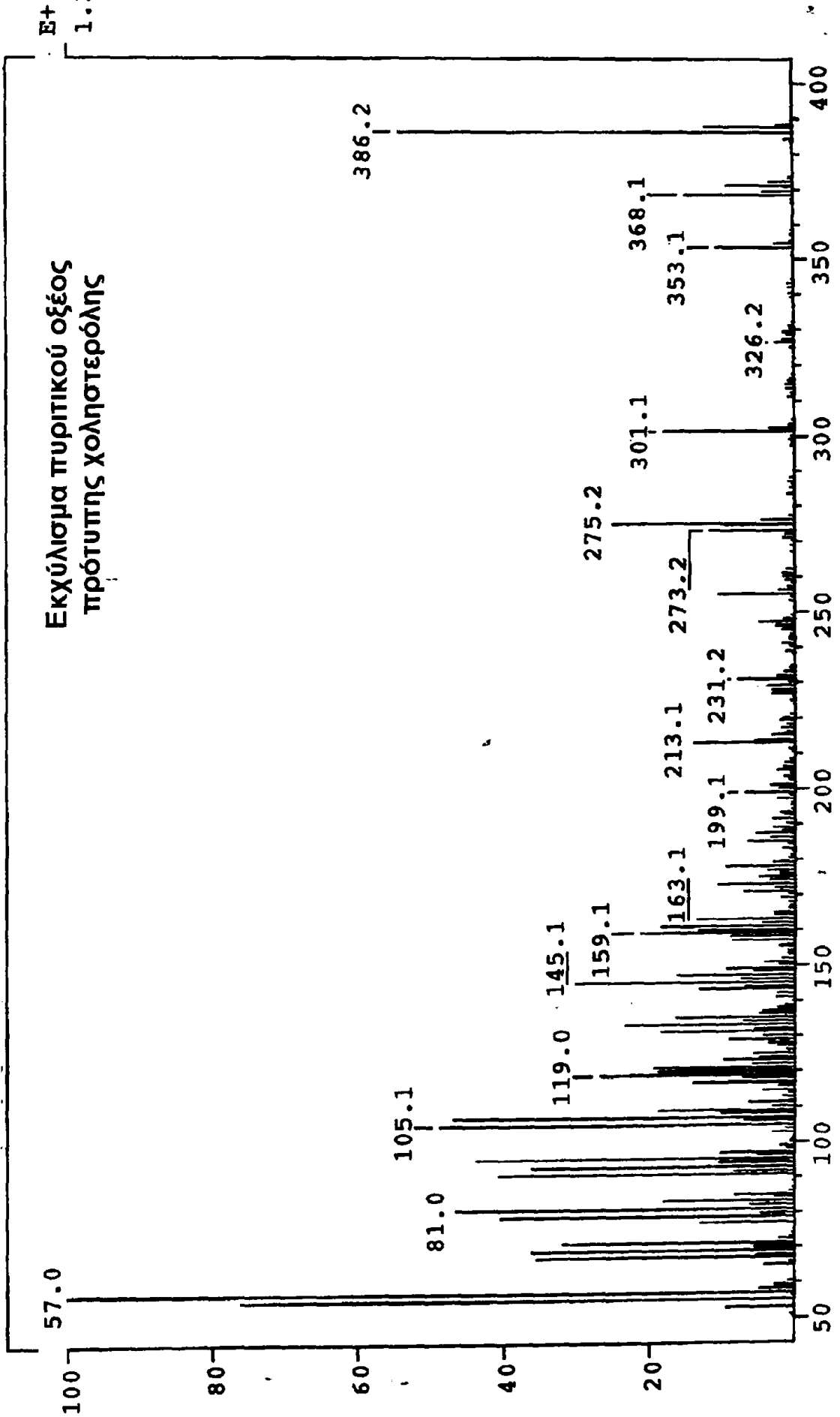
Σχήμα 104. Θραύσματα μάζας του μορίου της χοληστερόλης.

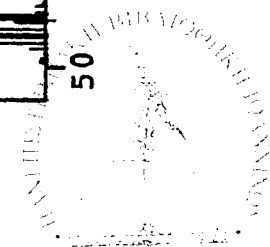
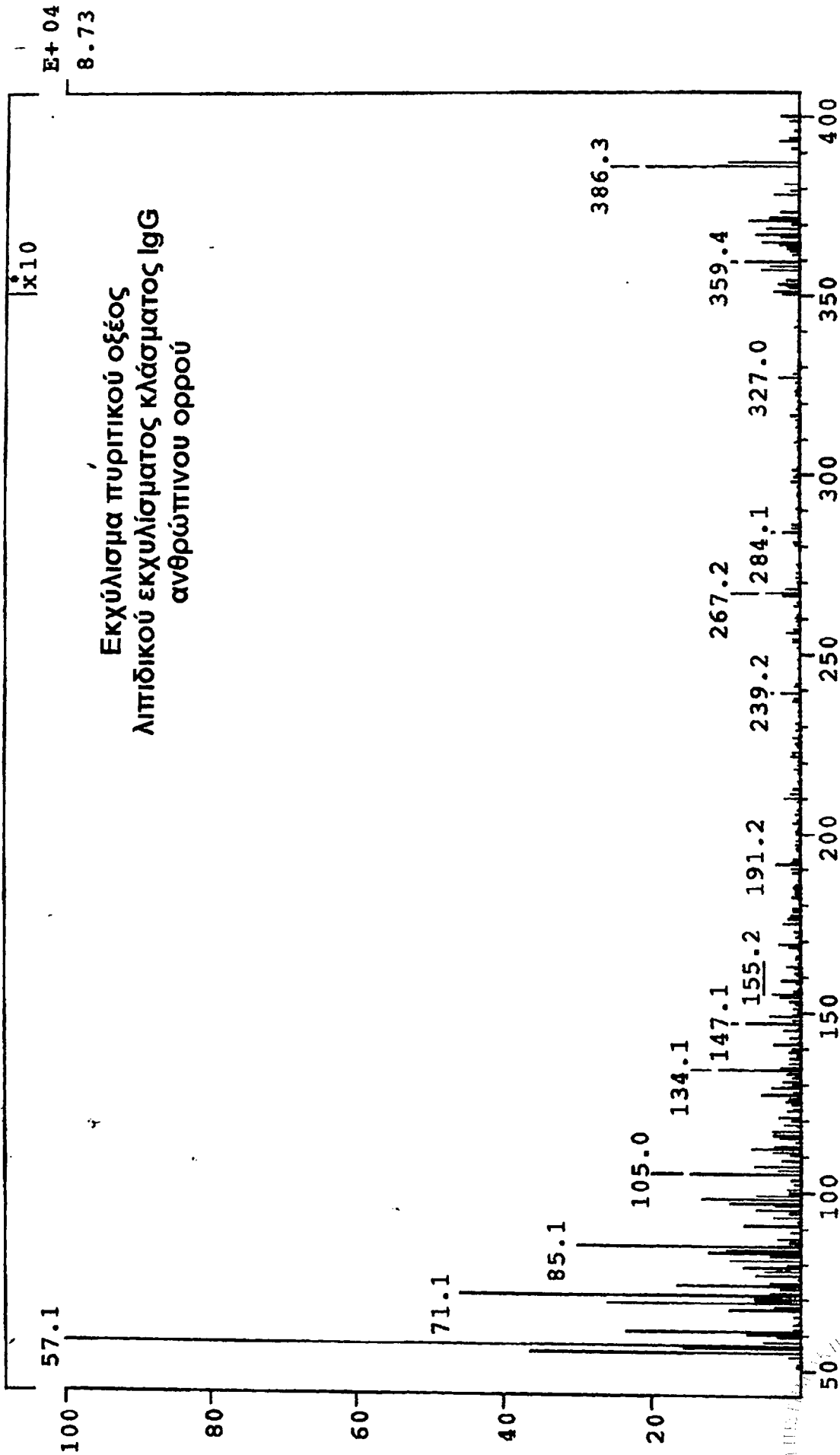
Πίνακας 32. Θραύσματα χοληστερόλης υψηλής μοριακής μάζας [605].

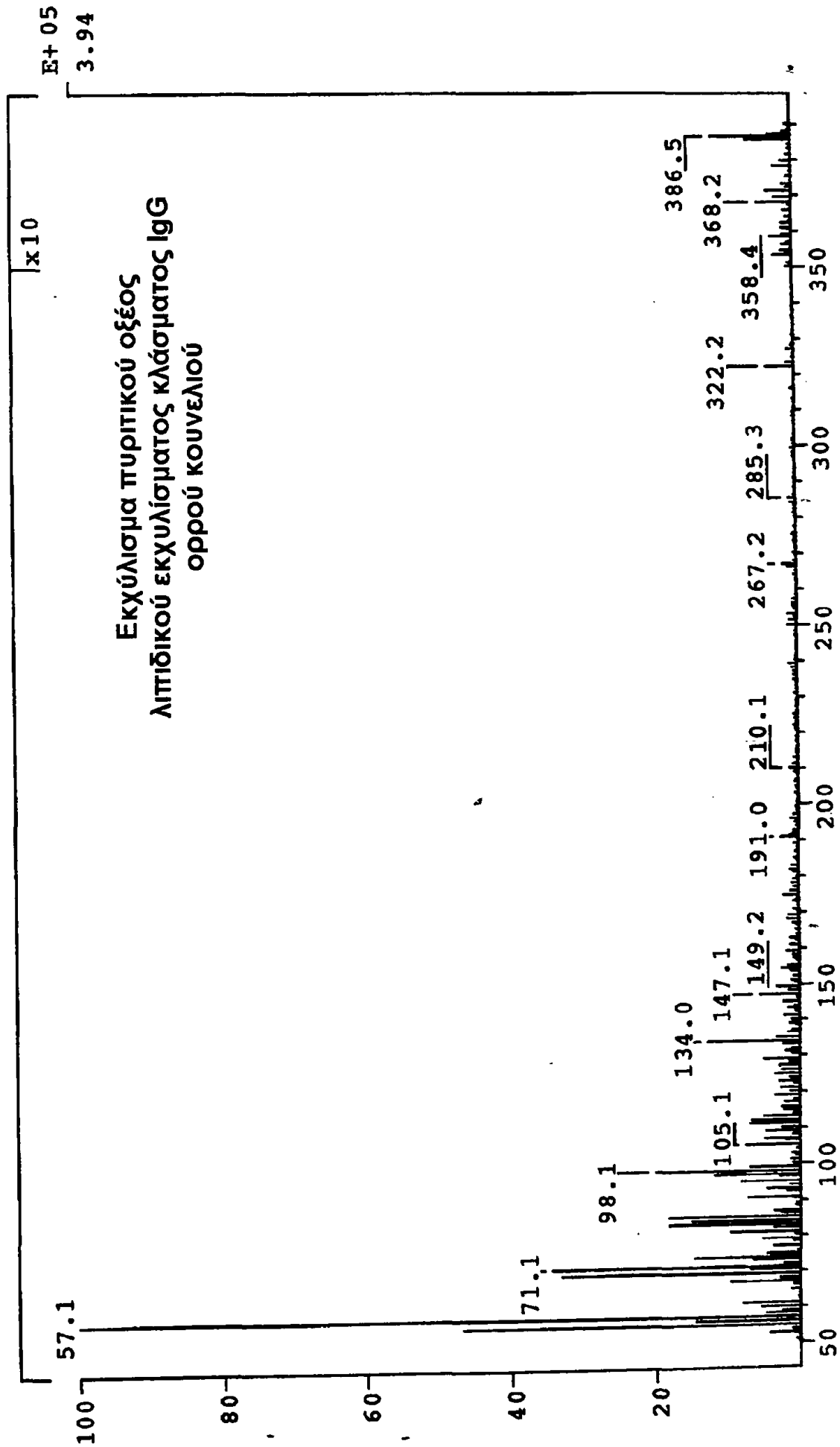
m/z	Ιόντα
386	[M] ⁺
368	[M-H ₂ O] ⁺
353	[M-H ₂ O-CH ₃] ⁺
326	
301	
275	[m/z 273+2H] ⁺
231	
213	[m/z 231-H ₂ O] ⁺

E+ 05
1.36

Εκχύλισμα πυριτικού οξέος
πρότυπης χοληστερόλης







E+ 05

3.94

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1) ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χρήση των C_6 -NBD-PC και C_{12} -NBD-PC ως υποστρωμάτων για τη διερεύνηση των ενεργοτήτων PLase A_2 και PAF-AcH στο BAL. Βρέθηκε ότι η C_6 -NBD-PC απουσία Ca^{2+} υδρολύεται μόνο από την PAF-AcH του ορρού και όχι από την παγκρεατική PLase A_2 . Σε αντίθεση, η C_{12} -NBD-PC παρουσία Ca^{2+} υδρολύθηκε μόνο από την παγκρεατική PLase A_2 . Με δεδομένες αυτές τις ιδιότητες, έγινε δυνατός ο προσδιορισμός των ενεργοτήτων PLase A_2 και PAF-AcH σε διαφορετικά δείγματα ή και ο διαφορικός προσδιορισμός τους στο ίδιο δείγμα.

Παρότι έχει αναφερθεί ότι η NBD-PE είναι καλύτερο υπόστρωμα όσον αφορά στην ευαισθησία του προσδιορισμού της ενεργότητας PLase A_2 -II από αρθρικό υγρό, [500], στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν είδη NBD-PC, διότι το κύριο φωσφολιπιδικό συστατικό που περιέχεται στο BAL είναι η PC. Έτσι, τα αποτελέσματα αναμένεται να είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά.

ΚΡΙΣΙΜΗ ΜΙΚΥΛΛΙΑΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

Στην πρώτη σειρά των πειραμάτων, μελετήθηκαν οι ιδιότητες φθορισμού των προτύπων υποστρωμάτων καθώς και των προϊόντων της αντίδρασης σε διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Η CMC της C_6 -NBD-PC βρέθηκε ότι ήταν $0.18 \mu\text{M}$. Η CMC της C_{12} -NBD-PC δεν ήταν δυνατό να υπολογισθεί, πιθανώς λόγω έλλειψης ευαισθησίας της μεθόδου σε περιοχές συγκέντρωσης μικρότερες των $0.1 \mu\text{M}$. Ωστόσο, αυτή θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από $0.18 \mu\text{M}$ λόγω της υψηλότερης υδροφοβικότητας της C_{12} -NBD-PC σε σύγκριση με την C_6 -NBD-PC. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά άλλων ερευνητών [498, 499, 500]. Οι NBD-PCs, πάνω από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα φθορισμού, πιθανώς λόγω της σβέσης του φθορισμού όταν αυτές βρίσκονται υπό τη μορφή μικυλλίων. Συνεπώς η συγκέντρωση $5 \mu\text{M}$ των NBD-PCs που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα επόμενα πειράματα ήταν μεγαλύτερη της CMC.



Ο φθορισμός που παρουσίασαν τα πρότυπα NBD-FAs ήταν σημαντικά υψηλότερος από αυτόν των αντίστοιχων NBD-PCs, επιτρέποντας έτσι τον ποσοτικό τους προσδιορισμό [498]. Η αύξηση αυτή του φθορισμού αποδόθηκε στο σχηματισμό μονομερών NBD-FAs στο υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα [495] σε αντίθεση με τις NBD-PCs οι οποίες βρίσκονται σε μικυλλιακή κατάσταση. Έτσι, υδατικό διάλυμα NBD-λιπαρού οξέος σε σχέση με διάλυμα NBD-φωσφατιδυλοχολίνης ίδιας συγκέντρωσης εμφάνισε 50 φορές υψηλότερη ένταση φθορισμού, λόγω της σβέσης φθορισμού που συμβαίνει στο δεύτερο διάλυμα. Ο συνωστισμός των μορίων της NBD-φωσφατιδυλοχολίνης στις μικυλλιακές δομές ευθύνεται για την απώλεια της ενέργειας των διεγερμένων φθοριζόντων μορίων (βλ. Σβέση φθορισμού (quenching), σελ. 116).

ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ ΚΑΙ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου είναι γνωστό ότι διαταράσσει την ευθύγραμμη απόκριση της μεταβολής του φθορισμού σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του φθοριζόντος συστατικού όταν η απορρόφηση του μίγματος αντίδρασης στο μήκος κύματος διέγερσης υπερβαίνει ένα όριο (βλ. Εισαγωγή, σελ. 114). Σχετικά με τα πειράματα μεμονωμένου προσδιορισμού PLase A₂ ή PAF-AcH στα δείγματα ορού, η A₄₇₅ δεν ξεπέρασε το 0.100. Επιπλέον, παρατηρήθηκε γραμμική απόκριση του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης των NBD-FAs τουλάχιστον μέσα στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (βλ. Σχήμα 56). Όταν χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις φθοριζόντων λιπιδίων υψηλότερες των συνηθών συνθηκών των πειραμάτων μας, η γραμμικότητα παρέμεινε ανεπηρέαστη. Στον ταυτόχρονο, διαφορικό προσδιορισμό των δύο ενζυμικών ενεργοτήτων και παρότι η A₄₇₅ ήταν περίπου 0.250, η γραμμική απόκριση των NBD-FAs δεν επηρεάστηκε. Έτσι, δεν παρατηρήθηκε φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου στις περιοχές συγκεντρώσεων των NBD-λιπιδίων των πειραματικών μας συνθηκών. Πιθανώς, οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν χαμηλές για να παρατηρηθεί μη γραμμική απόκριση της έντασης φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης των φθοριζόντων λιπιδίων στη δεδομένη οργανολογία.



Δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός στα 535 nm όταν δείγματα BAL ή ορρού αραιωμένου 1:50 διεγέρθηκαν στα 475 nm. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται ότι δεν υπήρξε παρεμβολή στις μετρήσεις μας από σκέδαση του φωτός.

ΦΑΣΜΑΤΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ

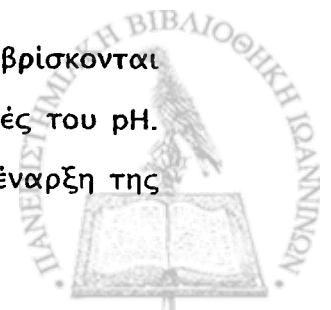
Τα φάσματα εκπομπής των NBD-PCs και των αντίστοιχων NBD-FAs παρουσίασαν το ίδιο μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής παρουσία BAL μέχρι τα 500 μg πρωτεΐνης /ml μίγματος επώασης ή ορρού αραιωμένου 1:50. Αυτό διασφαλίζει την ακρίβεια των μετρήσεων στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, για συγκεντρώσεις BSA υψηλότερες των 100 μg /ml, το C₁₂-NBD-FA παρουσίασε μια μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής και αύξηση της έντασης του φθορισμού σε αυτό το μέγιστο. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε για το C₆-NBD-FA. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα του C₁₂-NBD-FA. Επιπλέον, η ακρίβεια των μετρήσεων θα μπορούσε σε κάθε περίπτωση να επιβεβαιωθεί με τη χρήση εσωτερικών προτύπων.

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΤΩΝ NBD-ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της CMC, η αύξηση της έντασης του φθορισμού των C₆- και C₁₂-NBD-PC που ήταν εναιωρημένες στο ρυθμιστικό διάλυμα, ήταν χαμηλή και παρουσίασε γραμμική αύξηση σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Παρομοίως, η ένταση φθορισμού παρουσίασε γραμμική αύξηση σε σχέση με τη συγκέντρωση των προτύπων NBD-FAs. Η κλίση της ευθείας ήταν ίδια για τα δύο φθορίζοντα λιπαρά οξέα. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δύο NBD-FAs εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος 50 φορές πιο πολύ από τις αντίστοιχες NBD-PCs, χωρίς καμία μετατόπιση του μήκους κύματος μέγιστης εκπομπής φθορισμού, ακόμη και παρουσία BAL ή ορρού, επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΡΗ

Η ένταση του φθορισμού των προτύπων NBD-PCs που βρίσκονται εναιωρημένες στο ρυθμιστικό διάλυμα, δεν επηρεάστηκε από μεταβολές του pH. Ωστόσο, παρουσία των πρωτεϊνών του BAL, σε pH 3.5 και πριν την έναρξη της



αντίδρασης, παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη αύξηση του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταβολή της μικυλλιακής κατάστασης των υποστρωμάτων η οποία μείωσε την σβέση του φθορισμού. Σε ουδέτερες ή αλκαλικές περιοχές του pH, η ένταση του φθορισμού των δύο NBD-FAs δεν μεταβλήθηκε. Έτσι, σε αυτές τις περιοχές, η άμεση και συνεχής παρακολούθηση της αντίδρασης ήταν εφικτή, χωρίς να απαιτείται προηγούμενος καθαρισμός των προϊόντων. Όμως στην όξινη περιοχή του pH, η ένταση του φθορισμού του C₁₂-NBD-FA μειώθηκε σταδιακά, ενώ του C₆-NBD-FA παρέμεινε ανεπηρέαστη. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι σε όξινες περιοχές του pH, η διαλυτότητα του C₁₂-NBD-FA σε υδατικό περιβάλλον μειώνεται και ίσως δημιουργούνται κάποια συσσωματώματα στα οποία συμβαίνει σβέση του φθορισμού. Το γεγονός ότι σε χαμηλές τιμές του pH το υπόβαθρο φθορισμού των NBD-PCs παρουσία των πρωτεϊνών του BAL αυξάνεται, δείχνει ότι υπό αυτές τις συνθήκες της μεθόδου η εφαρμογή εσωτερικού προτύπου θα μπορούσε να είναι χρήσιμη. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι, δείγματα BAL ή ορού δεν μπορούν ποτέ να έχουν όξινες ή αλκαλικές τιμές pH αλλά γύρω στο 7.4.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25 °C, όπου και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, στους 37 °C που αντιστοιχεί στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της PLase A₂, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού για όλα τα λιπίδια που μελετήθηκαν, και αυτό εξαρτάται από τη φυσική συμπεριφορά των φθορίζοντων συστατικών. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται με όλα σχεδόν τα φθορίζοντα μόρια, αφού με την αύξηση της θερμοκρασίας οι συγκρούσεις μεταξύ των μορίων αυξάνουν την αποδιέγερση και οδηγούν σε απώλεια ενέργειας και κατά συνέπεια σε μείωση της έντασης του φθορισμού (βλ. Εισαγωγή, σελ. 115).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ

Η υπερήχηση εφαρμόστηκε για να διερευνήσουμε εάν η σύσταση του BAL επηρεάζει το φθορισμό ως φυσικό μέγεθος από τη μια πλευρά, ή την ταχύτητα της αντίδρασης από την άλλη. Στην περίπτωση που συνέβαινε έστω μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, δεν θα μπορούσαμε να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα

μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων BAL λόγω της διαφορετικής τους σύστασης. Είναι γνωστό ότι οι φωσφολιπάσες δρουν κατά προτίμηση σε οργανωμένες λιπιδικές διεπιφάνειες. Το BAL παρέχει τέτοιο ευνοϊκό περιβάλλον, με τα λιπίδια οργανωμένα σε διάφορες δομές όπως πολυ- ή μονο-στοιβαδωτά σωματίδια (βλ. Εικόνα 3, σελ. 11), κυστιδία, μονομερή κ.τ.λ., και περιέχει ποικίλες ποσότητες πρωτεϊνών [7].

Επίδραση υπερήχων στην πρότυπη C_6 -NBD-PC στο ρυθμιστικό διάλυμα επέφερε αύξηση της έντασης φθορισμού κατά 20 %, ενώ δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο φθορισμό της C_{12} -NBD-PC ή των NBD-FAs. Πιθανώς η υπερήχηση συνέβαλε στην καλύτερη διασπορά της C_6 -NBD-PC, λόγω της μεγαλύτερης πολικότητας σε σύγκριση με τα άλλα NBD-λιπίδια. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η υπερήχηση δεν είναι επιθυμητή αφού συνεισφέρει μόνο στην αύξηση του υπόβαθρου φθορισμού του υποστρώματος.

Συνοψίζοντας, για να έχουμε αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, και με δεδομένο ότι η χημική σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος δεν σχετίζεται με το φθορισμό του μίγματος της αντίδρασης, η τιμή του pH, οι συνθήκες υπερήχησης και η θερμοκρασία επώασης εάν εφαρμοστούν, θα πρέπει να διατηρούνται σταθερές. Σε ορισμένες συνθήκες η εφαρμογή εσωτερικού προτύπου θα ήταν χρήσιμη.

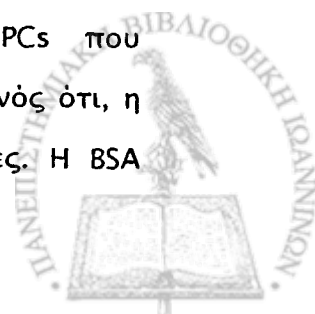
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ

Η ένταση του φθορισμού των NBD-PCs παρουσίασε αύξηση συναρτήσει της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Αυτό όμως δεν παρεμβλήθηκε στην ακρίβεια της μεθόδου, αφού αντιστοιχούσε στο υπόβαθρο φθορισμού ο οποίος αφαιρούνταν από όλες τις μετρήσεις.

Επίδραση αλβουμίνης

Η προσθήκη της BSA στο ρυθμιστικό διάλυμα επώασης προκάλεσε αύξηση του υπόβαθρου φθορισμού και των δύο υποστρωμάτων. Η αύξηση αυτή ήταν χαμηλή και ανάλογη με ένα στενό εύρος συγκέντρωσης BSA στο υδατικό διάλυμα των C_6 -NBD-PC και C_{12} -NBD-PC, αντίστοιχα.

Η αύξηση του φθορισμού υδατικού διαλύματος των NBD-PCs που παρατηρήθηκε λόγω της προσθήκης BSA πιθανώς οφείλονταν στο γεγονός ότι, η BSA είναι φορέας λιπιδίων και διατάραξε τις μικυλλιακές τους δομές. Η BSA



δέσμευσε τα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης και τα απόσπασε από τα μικύλλια όπου βρίσκονταν στην υδατική φάση. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση* του φθορισμού του διαλύματος λόγω μείωσης της σβέσης φθορισμού των NBD-PCs όταν αυτές βρίσκονταν με τη μορφή μικυλλίων. Είναι επίσης γνωστό ότι, οι μονομερείς NBD-PCs παρουσιάζουν την ίδια ένταση φθορισμού με τα αντίστοιχα μονομερή NBD-FAs στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, λόγω της ύπαρξης όμοιου φθορίζοντος οργανικού τμήματος και στα δύο είδη των NBD-λιπιδίων.

Υπολογισμός δεσμευτικής ικανότητας της BSA

Έτσι, βασιζόμενοι στην παραπάνω υπόθεση, υπολογίστηκε ότι ένα μόριο BSA είχε την ικανότητα δέσμευσης δύο μορίων C_6 -NBD-PC ή ενός μορίου C_{12} -NBD-PC. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται πολύ κοντά με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που αφορούν στην εύρεση του αριθμού των μορίων λιπιδίων που δεσμεύονται με ένα μόριο αλβουμίνης. Έχει ανακοινωθεί ότι ένα γραμμομόριο μονομερούς αλβουμίνης γάλακτος προβάτου, αλόγου και χοίρου μπορούσαν να δεσμεύσουν 4.5, 2.9 και 4.7 γραμμομόρια λιπαρών οξέων αντίστοιχα [606]. Όπως έχει δειχθεί από πειράματα σβέσης φθορισμού, η περιοχή της BSA που δεσμεύει λιπαρά οξέα και στεροειδή είναι πιθανώς παρόμοια, ενώ η μοριακή αναλογία BSA/λιπαρού οξέος αναφέρεται ότι είναι 1:1 [607]. Σε πιο πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι αναλογία μορίων λιπαρού οξέος/BSA μικρότερη του 2 συναγωνίζεται τη δέσμευση της ανθρακυκλίνης με τη BSA [608]. Το μόριο της BSA διαθέτει 3 περιοχές δέσμευσης με το ελαϊκό σξύ, εκ των οποίων η μια εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και οι δύο στο καρβοξυτελικό άκρο, όπως υποστηρίζεται από μελέτες NMR [609].

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στα αποτελέσματά μας η αναλογία μορίων NBD-PC:BSA φάνηκε να παρουσιάζει αντίστροφη συσχέτιση με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των NBD-PCs στη θέση *sn*-2 (Σχήμα 55). Πιθανώς, το μεγάλο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας της *sn*-2 θέσης του μορίου της C_{12} -NBD-PC, μαζί με τον NBD υποκαταστάτη, να εξαναγκάζει το μόριο να λάβει ογκώδεις στερεοχημικές δομές σε σύγκριση με την C_6 -NBD-PC. Έτσι, σε υδατικό διάλυμα, πιθανώς η παράμετρος που παίζει ρόλο στη δεσμευτική ικανότητα της BSA είναι το μέγεθος ή / και η διαμόρφωση των φωσφολιπιδίων.

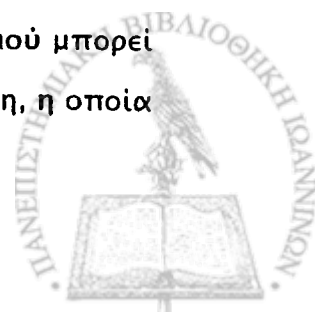


Πιθανώς, η δέσμευση του λιπιδίου με τη BSA δεν γίνεται διαμέσου της φθοριζουσας NBD-ομάδας. Το γεγονός ότι η προσθήκη της BSA στο διάλυμα της C₆- ή C₁₂-NBD-PC δεν προκάλεσε σβέση του φθορισμού του διαλύματος ενισχύει αυτή την υπόθεση. Αυτή η συμπεριφορά των φθοριζόντων μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με μη φθοριζόντα μόρια είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία: πειράματα παρακολούθησης της σβέσης φθορισμού χρησιμοποιούνται ευρέως για την εύρεση της περιοχής δέσμευσης του φθοριζόντος μορίου με άλλο μόριο [423, 424, 505, 511, 512, 588, 589, 610]. Συγκεκριμένα, όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με το φθορίζον μόριο διαμέσου του φθορίζοντος τμήματος του μορίου, ο φθορισμός του διαλύματος μειώνεται λόγω σβέσης (βλ. Εισαγωγή, Σβέση φθορισμού (quenching), σελ. 116).

Επίδραση του BAL ή του ορρού

Η προσθήκη του BAL στο μίγμα επώασης επηρέασε επίσης το υπόβαθρο φθορισμού των υποστρωμάτων, κατά παρόμοιο τρόπο. Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι δείγματα BAL ασθενών χωρίς πνευμονική πάθηση περιέχουν μέχρι 100 μg πρωτεΐνης / ml BAL. Σε ακραίες συνθήκες όμως, τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών μπορεί να φτάσουν σε υψηλές τιμές, με διακύμανση από 0.5 μέχρι 5.0 mg πρωτεΐνης / ml BAL [186]. Αυτή η συγκέντρωση πρωτεϊνών αντιστοιχεί σε 50-500 μg πρωτεΐνης ανά ml μίγματος αντίδρασης, αφού για την εκκίνηση της αντίδρασης χρησιμοποιούμε ποσότητα BAL ίση με 100 μl και όχι μεγαλύτερη. Έτσι, υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης του BAL θα μπορούσε να μειώσει το όριο ανίχνευσης των προϊόντων αντίδρασης και κατά συνέπεια την ευαισθησία της μεθόδου, αφού αυξάνει το υπόβαθρο φθορισμού της αντίδρασης.

Όταν στο μίγμα επώασης προστέθηκε BAL αντί για BSA, η γραμμικότητα της αύξησης του φθορισμού των NBD-PCs επεκτάθηκε σε ευρύτερη περιοχή συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών, τουλάχιστον μέχρι τα 500 μg πρωτεΐνης του BAL ανά ml μίγματος αντίδρασης. Αυτή η συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλή για τα δείγματα BAL, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, και αντιστοιχεί σε 5 mg πρωτεΐνης / ml BAL. Η επίδραση των πρωτεϊνών στο υπόβαθρο φθορισμού μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι διάφορες πρωτεΐνες, και ειδικά η αλβουμίνη, η οποία



δεσμεύει τα λιπίδια, μπορεί να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την ένταση του φθορισμού της κάθε NBD-PC.

Σε ότι αφορά στα προϊόντα της αντίδρασης, ο φθορισμός των μεμονωμένων NBD-FAs δεν επηρεάστηκαν παρουσία BAL ή ορρού, παρότι αυτά περιέχουν αλβουμίνη. Έτσι, ο προσδιορισμός των ενεργοτήτων PAF-AcH και PLase A₂ χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα C₆-NBD-PC και C₁₂-NBD-PC αντίστοιχα, σε δείγματα που περιέχουν αλβουμίνη, είναι ακριβής.

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Απουσία Ca²⁺, η πρότυπη παγκρεατική PLase A₂ ήταν τελείως ανενεργή, όπως ήταν αναμενόμενο. Παρουσία Ca²⁺, παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση της ενζυμικής ενεργότητας με το μήκος της αλυσίδας στη θέση sn-2 των διαφόρων ειδών PC. Θεωρώντας ότι η PLase A₂ παρουσίασε το 100 % της ενζυμικής ενεργότητας με την [¹⁴C]διπαλμιτυλο-PC ως υπόστρωμα, η ενεργότητα αυτής ήταν ικανοποιητική, της τάξεως του 80 %, όταν υπόστρωμα ήταν η C₁₂-NBD-PC. Δεν παρατηρήθηκε το ίδιο με την C₆-NBD-PC, με την οποία παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας στο 20 %. Στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε, ο [³H]PAF δεν αποτέλεσε κατάλληλο υπόστρωμα για την παγκρεατική PLase A₂.

Η PAF-AcH του ορρού, παρουσία Ca²⁺, δεν ήταν ικανή να υδρολύσει την [¹⁴C]διπαλμιτυλο-PC ή την C₁₂-NBD-PC. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η PAF-AcH του ορρού απουσία Ca²⁺, αναγνωρίζει ως υπόστρωμα την C₆-NBD-PC με ενεργότητα όμως 50 % αυτής που παρατηρείται όταν υπόστρωμα είναι ο [³H]PAF.

Συνεπώς, εάν η C₆-NBD-PC χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PLase A₂ σε δείγματα με υψηλή ενεργότητα PAF-AcH, όπως ο ορός ή το BAL [482], αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση των επιπέδων της PLase A₂. Αυτό πιθανώς θα μπορούσε να εξηγήσει την αντίφαση των αποτελεσμάτων που αναφέρθηκαν από άλλους ερευνητές για τη σύγκριση ραδιομετρικού και φθορισμομετρικού προσδιορισμού της PLase A₂ [484].

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η C₆-NBD-PC χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από τις ενζυμικές δράσεις που υδρολύουν οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη [501]. Η χρήση λοιπόν αυτής για τον προσδιορισμό της ενεργότητας PAF-AcH θα μπορούσε να οδηγήσει επίσης σε υπερεκτίμηση αυτής της ενεργότητας.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΝΖΥΜΩΝ

Χρησιμοποιώντας C_6 -NBD-PC και C_{12} -NBD-PC ήταν δυνατός ο διαφορικός και συνεχής προσδιορισμός των ενεργοτήτων PLase A_2 και PAF-AcH. Οι δύο ενεργότητες θα μπορούσαν να μετρηθούν στο ίδιο δείγμα. Αρχικά, η PLase A_2 προσδιορίζεται παρουσία 2 mM Ca^{2+} , και με την C_{12} -NBD-PC ως υπόστρωμα, τα Ca^{2+} στη συνέχεια δεσμεύεται με την προσθήκη EDTA, ενώ με την ακόλουθη προσθήκη της C_6 -NBD-PC προσδιορίζεται η PAF-AcH. Παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών, θα μπορούσε να προστεθεί κάποια ποσότητα C_6 -NBD-FA ως εσωτερικό πρότυπο.

Υπάρχει όμως ένας περιορισμός στην ταυτόχρονη μέτρηση. Αυτός ισχύει όταν τα δείγματα που ελέγχονται περιέχουν μαζί με την PAF-AcH και υψηλά επίπεδα ενεργότητας PLase A_2 ανεξάρτητης Ca^{2+} . Η ενεργότητα της PLase A_2 θα υδρολύει τότε την C_6 -NBD-PC ταυτόχρονα με την υδρόλυση αυτής από την PAF-AcH απουσία Ca^{2+} , όπως συμπεραίνεται από τα πειράματα εξειδίκευσης υποστρώματος. Το γεγονός αυτό βέβαια παρατηρείται σπάνια σε βιολογικά υγρά, όπου δεν υπάρχουν κύτταρα και οι κυρίαρχες μορφές ενζύμων PLase A_2 είναι οι εκκρινόμενες και εξαρτώμενες από Ca^{2+} . Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να εφαρμόζεται ο μεμονωμένος προσδιορισμός των διαφόρων ενεργοτήτων.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Παρατηρήθηκε ότι το rBPB ανέστειλε σχεδόν πλήρως (94 %) την ενεργότητα της παγκρεατικής PLase A_2 που προσδιορίζεται φθορισμομετρικά και αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία [459], όπου αναφέρεται ότι το rBPB αναστέλλει ειδικά τις εκκρινόμενες PLases A_2 . Αντίθετα, οι αναστολείς refablock, PMSF και DFP ανέστειλαν ελάχιστα (13.5, 7 και 5 % αντίστοιχα) την αύξηση του φθορισμού του μίγματος αντίδρασης που προκάλεσε η προσθήκη της παγκρεατικής PLase A_2 . Οι ουσίες αυτές αναστέλλουν τις σερίνεστεράσες, τα ένζυμα δηλαδή που περιέχουν στο καταλυτικό τους κέντρο το αμινοξύ σερίνη. Η παγκρεατική PLase A_2 δεν ανήκει στις σερίνεστεράσες (βλ. Εισαγωγή, σελ. 83).

Την υδρολυτική δράση του BAL στο υπόστρωμα C_6 -NBD-PC ανέστειλε κατά 100 % το refablock και κατά 47 % το DFP. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τη βιβλιογραφία για ότι αφορά το refablock [471], που είναι υδατοδιαλυτός



αναστολέας και εύκολα προσεγγίζει το ένζυμο σε ένα υδατικό διάλυμα. Αντίθετα, το DFP δεν είναι υδατοδιαλυτό μόριο και το διάλυμά του σε ισοπροπανόλη σχηματίζει διαφασικό σύστημα με το υδατικό διάλυμα του μίγματος αντίδρασης. Αυτός μπορεί να είναι ένας πιθανός λόγος για το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της PAF-AcH του BAL. Η μη αναστολή της αύξησης του φθορισμού της C₆-NBD-PC με το BAL επωασμένο με pBPB, είναι μια επιπλέον ένδειξη ότι η ενζυμική ενεργότητα δεν είναι εκκρινόμενης PLase A₂ για μεγάλο μήκος λιπαρή αλυσίδα στη θέση sn-2.

ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα φθορισμομετρική μέθοδος είναι αναπαραγώγιμη και ακριβής, όπως επιβεβαιώθηκε από τον καθαρισμό των προϊόντων και εκτιμήθηκε μετά από τη σύγκριση με ραδιομετρικές μεθόδους και επίδραση ειδικών αναστολέων. Το κόστος αυτής είναι εξαιρετικά χαμηλό, είναι εύκολη για άμεση και συνεχή παρακολούθηση και δεν παρουσιάζει τους κινδύνους της ραδιενέργειας. Μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο διαφόρων ενεργοτήτων PLase A₂ σε δείγματα όπως το BAL ή ο ορός, τα οποία περιέχουν ενεργότητες για μεγάλο και μικρό μήκος λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2 των μορίων PCs.

2) ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS

Τα κύρια ευρήματα της μελέτης των βιοχημικών παραμέτρων στο BAL ασθενών με ARDS, προέρχονται αφενός από τη σύγκριση με ομάδα ελέγχου και αφετέρου από τη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών φάσεων του ARDS. Στη σύγκριση με την ομάδα ελέγχου βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών, PAF, PLase A₂, ουδετερόφιλων καθώς και ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές των φωσφολιπιδίων στο BAL των ασθενών με ARDS. Κατά την πάροδο του χρόνου εξέλιξης του ARDS, τα ποσοστά των ουδετερόφιλων, πρωτεϊνών, ολικών φωσφολιπιδίων και PAF μειώθηκαν.

Οι ασθενείς στο όψιμο στάδιο του ARDS είχαν χαμηλότερο καρδιακό δείκτη (CI) και χαμηλότερη πνευμονική διατασιμότητα (Crs) και χρειάστηκαν λιγότερο PEEP σε

σύγκριση με την πρώιμη φάση, όπως ήταν αναμενόμενο. Η εξέλιξη από την πρώιμη στην ενδιάμεση και όψιμη φάση του ARDS στους ασθενείς συνοδεύτηκε από μείωση του PAF και των ουδετερόφιλων υποδεικνύοντας μια υποχώρηση της οξείας φλεγμονής, και από μια σχετική αύξηση στον αριθμό των μακροφάγων υποδεικνύοντας την έναρξη της επιδιόρθωσης του τραυματισμένου ιστού με τη διαδικασία της ίνωσης [611, 612].

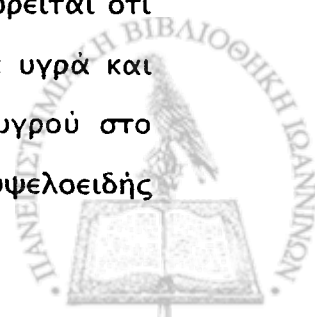
ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνών στο BAL των ασθενών με ARDS, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό μπορεί να αποδοθεί είτε:

- ❖ σε αύξηση του όγκου του κυψελιδικού υγρού που ανακτάται κατά τη έκπλυση, είτε
- ❖ σε αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στις κυψελίδες.

Ωστόσο, αυτή η διάκριση δεν είναι εφικτή λόγω της έλλειψης αξιόπιστων δεικτών όγκου του κυψελιδικού υγρού. Ενδογενείς δείκτες όπως η ουρεία, η ινουλίνη και το κυανούν του μεθυλενίου έχουν χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του όγκου του κυψελιδικού υγρού, αλλά καμία από αυτές τις μεθόδους δεν έχει καθολική αποδοχή και χρήση [613, 614]. Η αύξηση του όγκου του κυψελιδικού υγρού μπορεί να οφείλεται στην έκπλυση μεγαλύτερης σε έκταση επιφάνειας κυψελίδων. Ωστόσο, στο ARDS, υπάρχουν κλινικά και πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου και του επιθηλίου στις πρωτεΐνες, έτσι ώστε να παρατηρείται μεγάλη κίνηση των πρωτεϊνών στο διάμεσο χώρο καθώς και στον κυψελιδικό χώρο.

Από το πρώιμο στο όψιμο ARDS, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση στα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών καθώς και της αλβουμίνης ενώ η αναλογία αλβουμίνης/ολική πρωτεΐνη παρουσίασε αύξηση. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με την εξέλιξη του ARDS από την πρώιμη φάση, που χαρακτηρίζεται από αυξημένη διαβατότητα, στην ενδιάμεση και στην όψιμη φάση, κατά τις οποίες εμφανίζεται ανάπτυξη ίνωσης [197]. Βασικό χαρακτηριστικό του πρώιμου ARDS θεωρείται ότι είναι η αυξημένη διαβατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης σε υγρά και πρωτεΐνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρωτεϊνικού υγρού στο διάμεσο και κυψελιδικό χώρο. Αντιθέτως, στο όψιμο ARDS, αυξάνει η κυψελοειδής



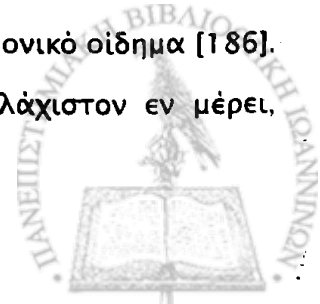
εικόνα του πνευμονικού παρεγχύματος, παρατηρείται αντίδραση ίνωσης και το πνευμονικό οίδημα καθίσταται λιγότερο σημαντικό. Επομένως, η μείωση² των επιπέδων των πρωτεϊνών και η αύξηση της αναλογίας αλβουμίνης/ολική πρωτεΐνη που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή είναι συμβατά με την προηγούμενη υπόθεση. Στο ενδιάμεσο ARDS, θα πρέπει να συμμετέχουν και οι δύο διαδικασίες, αλλά με διαφορετικό βαθμό.

Η επαναπορρόφηση του κυψελιδικού υγρού θα μπορούσε να είναι ένας επιπλέον λόγος για την αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στις κυψελίδες. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στις κυψελίδες αυξάνεται ανάλογα με την απομάκρυνση του υγρού όγκου από τον κυψελιδικό χώρο [615]. Η επαναπορρόφηση του υγρού από τις κυψελίδες είναι δείκτης λειτουργικότητας των επιθηλιακών κυττάρων τύπου II. Οι μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών στο BAL ασθενών με ARDS συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών οι οποίοι ανιχνεύουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών στο πρώιμο σε σύγκριση με το όψιμο ARDS [616].

ΕΠΙΠΕΔΑ PAF ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ PAF-ACH

Τα αυξημένα επίπεδα PAF που ανιχνεύθηκαν στο BAL των ασθενών με ARDS, μπορεί να συσχετίζονται με μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία που αναφέρεται σε αυξημένα επίπεδα PAF στο BAL ασθενών με ARDS [265]. Ο PAF δεν είναι πιθανό να προέρχεται από απομακρυσμένους ιστούς, διότι στο πλάσμα υπάρχουν υψηλά επίπεδα ενεργότητας PAF-AcH, η οποία υδρολύει τον PAF τάχιστα [454]. Ο PAF ενοχοποιείται στην ανάπτυξη του πνευμονικού οιδήματος λόγω της ιδιότητάς του να προκαλεί διαρροή των μικροαγγείων [262], να ενεργοποιεί τη βιοσύνθεση άλλων ισχυρών φλεγμονωδών μεσολαβητών [238] και να προκαλεί φλεβική αγγειοσύσπαση αυξάνοντας την πίεση των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων [617].

Η PAF-AcH παίζει βασικό ρόλο στη δυνατότητα του PAF να κυκλοφορεί ή να λειτουργεί ως τοπικό αυτακοειδές [426]. Η PAF-AcH βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα στο BAL των ασθενών με ARDS, αλλά δεν συσχετίστηκε αντίστροφα με τα επίπεδα του PAF, όπως παρατηρήθηκε στους ασθενείς με υδροστατικό πνευμονικό οίδημα [186]. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι η PAF-AcH, τουλάχιστον εν μέρει,



προέρχεται από το πλάσμα και διαπερνά την τριχοειδοκυψελιδική μεμβράνη λόγω αυξημένης διαβατότητας.

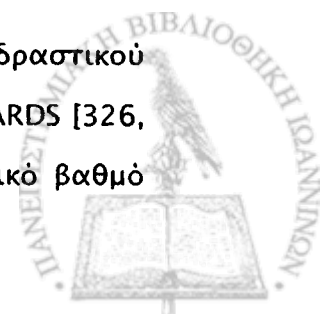
Τα επίπεδα του PAF βρέθηκαν υψηλότερα στο πρώιμο από ότι στο όψιμο ARDS. Αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με εντονότερη φλεγμονώδη αντίδραση στο πρώιμο σε σύγκριση με το όψιμο ARDS. Η ανίχνευση του PAF στο όψιμο ARDS, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα, δείχνει ότι θα μπορούσε ο PAF να συμμετέχει στις χρόνιες φλεγμονώδεις διαδικασίες καθώς και στις διαδικασίες ίνωσης. PAF, τουλάχιστον εν μέρει, προέρχεται από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, τα ποσοστά των οποίων επίσης παρουσίασαν παράλληλη μεταβολή στο BAL κατά την πορεία του ARDS στη μελέτη αυτή.

ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα υψηλότερα επίπεδα ουδετερόφιλων και PAF που ανιχνεύθηκαν σε αυτή τη μελέτη, υποδεικνύουν ότι η σοβαρότητα της φλεγμονής είναι πολύ πιο έντονη στους ασθενείς με πρώιμο ARDS. Ωστόσο, η συσσώρευση μακροφάγων στο όψιμο ARDS είναι σημαντική για τις διαδικασίες επιδιόρθωσης και ίνωσης. Οι ερμηνείες αυτές συμφωνούν με τις παρατηρήσεις ότι τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην έναρξη και εξάπλωση της πνευμονικής βλάβης [618, 619], και ο αριθμός καθώς και η ενεργοποίηση των μακροφάγων είναι σημαντικοί παράγοντες στον καθορισμό της ισορροπίας μεταξύ της φλεγμονής, της επιδιόρθωσης του ιστού και της ίνωσης στο ARDS [611]. Τα ποσοστά των ουδετερόφιλων και μακροφάγων που μετρήθηκαν στα δείγματα BAL σε αυτή τη μελέτη, ενισχύουν τα ευρήματα άλλων ερευνητών [611, 612]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των ηωσινόφιλων και λεμφοκυττάρων στο όψιμο ARDS. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν στο BAL ασθενών με διάμεση πνευμονική ίνωση [620]. Έτσι, μια συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των ηωσινόφιλων και λεμφοκυττάρων και της διαδικασίας ίνωσης στο όψιμο ARDS δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί.

ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Υπάρχουν δισταγμένες απόψεις για τη σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ενδιάμεσο και όψιμο ARDS [326, 325]. Οι διαφορές αυτές είναι πιθανό να αντανακλούν έναν διαφορετικό βαθμό



βλάβης των κυττάρων τύπου II, ένα διαφορετικό πειραματικό πρωτόκολλο, ή διαφορετική εκπλυνόμενη περιοχή του πνεύμονα.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα στη μελέτη αυτή ήταν η αύξηση των ολικών φωσφολιπιδίων στην πρώιμη φάση του ARDS. Παραμένει όμως προς διευκρίνιση το αν αυτό προκαλείται από αυξημένη παραγωγή ή έκκριση ή από ανεπάρκεια στην επαναπρόσληψη των φωσφολιπιδίων από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα μια ποσότητα των φωσφολιπιδίων να προέρχεται από κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες. Είναι γνωστό ότι ο υπεραερισμός ενισχύει την παραγωγή φωσφολιπιδίων διαμέσου ενός μηχανισμού με μεσολάβηση της ακετυλοχολίνης ή β-αδρενεργικού υποδοχέα [160, 161, 621]. Έτσι, είναι πιθανό η έναρξη του μηχανικού αερισμού να αυξάνει τη βιοσύνθεση ή την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα πριν συμβεί μια σοβαρή βλάβη των κυττάρων τύπου II. Αυτό σχετίζεται με μια μείωση στην παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ίσως επίσης, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, ο PAF να αυξάνει την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα [622].

Μεταβολές στα είδη των φωσφολιπιδίων

Οι ποιοτικές μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα ήταν παρόμοιες σε όλες τις φάσεις της νόσου. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν επίσης στο BAL ασθενών με υδροστατικό πνευμονικό οίδημα [186].

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων είναι το υλικό το οποίο επικαλύπτει τις κυψελίδες των πνευμόνων και μειώνει την επιφανειακή τάση προστατεύοντας έτσι τις κυψελίδες από τη σύγκλιση κατά το τέλος της εκπνοής. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη φαγοκύτωση, την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση και τη μετανάστευση των κυψελιδικών μακροφάγων και μειώνει τη διαρροή υγρών από το διάμεσο στον κυψελιδικό χώρο [25, 7]. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα είδη των φωσφολιπιδίων στη μελέτη αυτή, θα μπορούσαν να επηρεάσουν άμεσα τη βιοφυσική δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [623]. Η μείωση των επιπέδων της PC και PG θα μπορούσε να αποδωθεί σε δυσλειτουργία των κυττάρων τύπου II, τα οποία είναι η κύρια πηγή αυτών των φωσφολιπιδίων.



PC

Η φωσφατιδυλοχολίνη βρέθηκε μειωμένη σε όλα τα στάδια του ARDS σε σύγκριση την ομάδα ελέγχου. Το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης στο πρώιμο ARDS διατηρήθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα 3 και 6 ημέρες μετά. Στους επιζώντες, παρατηρήθηκε μια σχετική αύξηση του ποσοστού της PC από το πρώιμο στο ενδιάμεσο και στο όψιμο ARDS, σε αντίθεση με αυτό που βρέθηκε σε αυτούς που δεν επέζησαν. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν τα ευρήματα άλλων ερευνητών [325].

Η PC είναι το κύριο φωσφολιπίδιο το οποίο ευθύνεται για τη μείωση της επιφανειακής τάσης στην επιφάνεια των κυψελίδων (βλ. Εισαγωγή, σελ. 5, 12). Η μείωση του ποσοστού αυτής φαίνεται να επιδρά αρνητικά στις μηχανικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η σημαντικός ρόλος αυτής ενισχύεται και από το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής, όπου η βελτίωση της υγείας των ασθενών συσχετίστηκε με την αύξηση των επιπέδων της PC που ανιχνεύεται στο BAL.

Λυσο-PC

Μικρά ποσοστά λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης ανιχνεύθηκαν στο BAL ασθενών στο όψιμο στάδιο του ARDS. Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη δεν ανιχνεύθηκε ούτε στο πρώιμο αλλά ούτε και στο ενδιάμεσο στάδιο της νόσου. Η λυσο-PC, η οποία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την επιφανειακή τάση (βλ. Εισαγωγή, σελ. 72), παράγεται από τη δράση της PLase A₂ στα φωσφολιπίδια.

Τα προϊόντα που απελευθερώνονται από την υδρολυτική δράση της PLase A₂ έχουν σοβαρή επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η προσθήκη λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης στον επιφανειοδραστικό παράγοντα απουσία PLase A₂, προκαλεί μεγάλη αύξηση στην επιφανειακή τάση του μίγματός. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι τα λιπίδια (όπως η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη) του οιδήματος που συγκεντρώνεται στον κυψελιδικό χώρο, αναστέλλουν τη δράση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι αυτός ο τύπος της αναστολής είναι πολύ σημαντικός διότι τα ανασταλτικά συστατικά παράγονται συνεχώς, όπως συμβαίνει σε μια πνευμονική βλάβη που εξελίσσεται [339]. Επίσης, η χορήγηση λυσο-PC έχει σημαντική επίδραση στη λειτουργία του



πνεύμονα νεογνών. Απενεργοποιεί τον επιφανειοδραστικό παράγοντα και επιφέρει αύξηση της διαβατότητας στο τριχοειδοκυψελιδικό μεσοδιάστημα.

PG

Το ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης επί των ολικών φωσφολιπιδίων μειώθηκε στους ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το μειωμένο ποσοστό της φωσφατιδυλογλυκερόλης στο πρώιμο ARDS φάνηκε να διατηρείται στα ίδια επίπεδα στο ενδιάμεσο καθώς και στο όψιμο στάδιο.

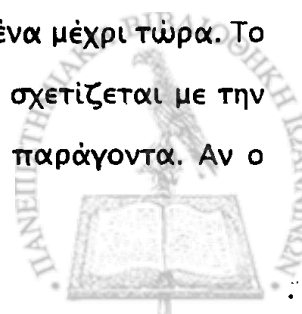
Το γεγονός ότι η PG είναι σχεδόν ανύπαρκτη σε έκπλυμα πνευμόνων βρεφών με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η PG παίζει σημαντικό συμπληρωματικό ρόλο στην ωριμότητα των πνευμόνων. Επίσης, η απουσία της αποτελεί δείκτη πρόβλεψης της ανωριμότητας των πνευμόνων εμβρύων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι στον επιφανειοδραστικό παράγοντα νεογέννητων κουνελιών η PG εμφανίζεται μειωμένη τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση με ακόλουθη μείωση του ποσοστού της PI [20]. Όμως παρόλο το μικρό ποσοστό της PG στη γέννηση, δεν εμφανίζεται αναπνευστική δυσχέρεια. Αυτό σημαίνει ότι η PG δεν είναι αποκλειστικά απαραίτητη στην ικανότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα να μειώνει την επιφανειακή τάση.

Ωστόσο, η PG πιθανώς παίζει προστατευτικό ρόλο στη φλεγμονή δρώντας ως φυσικός αναστολέας του PAF [33] καθώς και άλλων μεσολαβητών όπως θρομβίνης και ADP.

Sph, PE, PS,

Το ποσοστό της σφίγγομυελίνης και της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης βρέθηκε αυξημένο σε όλα τα στάδια του ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στο ενδιάμεσο και όψιμο στάδιο, οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το ποσοστό της φωσφατιδυλοσερίνης αυξήθηκε επίσης σε όλα τα στάδια της νόσου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό.

Για το ρόλο της σφίγγομυελίνης δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα μέχρι τώρα. Το μόνο γνωστό είναι ότι η ωριμότητα των πνευμόνων στα νεογνά σχετίζεται με την αναλογία της περιεκτικότητας PC/Sph στον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Αν ο



λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος του 2, μπορεί πριν από τη γέννηση να αποκλεισθεί η ανάπτυξη του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας στο νεογνό [17, 18]. Πιθανώς η αύξηση των επιπέδων της Sph στον επιφανειοδραστικό παράγοντα να σχετίζεται επίσης με τη δημιουργία της αναπνευστικής δυσχέρειας στους ενήλικες.

PI

Αναφορικά με την φωσφατιδυλινοσιτόλη, το ποσοστό αυτής παρουσίασε αύξηση σε όλα τα στάδια της νόσου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και παρέμεινε αυξημένο στην ενδιάμεση και στην όψιμη φάση του συνδρόμου. Έχει αναφερθεί ότι υψηλό ποσοστό PI αντί για PG περιέχεται στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων ανώριμων θηλαστικών [19, 22]. Επίσης, η χαμηλή αναλογία PG/PI είναι ένδειξη μη ωρίμανσης. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι οι επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα δεν μεταβάλλονται παρά την αύξηση της PI και τη μείωση της PG.

Συμπερασματικά, οι μεταβολές που παρουσιάστηκαν στα επίπεδα των φωσφολιπιδίων στο BAL των ασθενών με ARDS πιθανώς αντανακλούν σε διαταραχή των διαδικασιών στο μεταβολισμό, στην έκκριση, στη μεταφορά ή στην ανακύκλωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Ποικίλοι παράγοντες φαίνεται να συμμετέχουν στην καταστροφή της ομοιοστασίας του επιφανειοδραστικού παράγοντα, με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική λειτουργία του και τη δημιουργία οιδήματος στον κυψελιδικό χώρο.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ BAL

Οι διαφορικές φυγοκεντρήσεις του BAL πραγματοποιήθηκαν για την απομόνωση των διαφορετικών μορφών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τα μεγάλα συσσωματώματα, τα οποία λήφθηκαν στο ίζημα των 30000 x g, αντιστοιχεί σε μορφές πολυστοιβαδωτών σωματίων και σωληνώδους μυελίνης. Τα μικρά συσσωματώματα, τα οποία περιέχουν τα ελαφρά κυστίδια φωσφολιπιδίων, ανακτώνται στο ίζημα των 100000 x g. Θεωρητικά, τα μεγάλα συσσωματώματα μπορούν να προκαλέσουν μείωση της επιφανειακής τάσης σε πολύ χαμηλές τιμές, ενώ τα μικρά συσσωματώματα δεν επιδεικνύουν καλή επιφανειοδραστική ικανότητα [328]. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν μειωμένα ποσοστά πρωτεϊνών και



φωσφολιπιδίων στο ίζημα των 30000 x g στους ασθενείς με ARDS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει λειτουργική ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα αυτών των ασθενών.

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A₂ (PLase A₂)

Η διερεύνηση των ενεργοτήτων PLase A₂ στο BAL μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη φύση της τοπικής βλάβης στους πνεύμονες, όπου μπορεί να συνυπάρχουν διάφορες μορφές του ενζύμου, με προτίμηση στην υδρόλυση φωσφατιδυλοχολίνης με μεγάλου μήκους λιπαρό οξύ στη θέση sn-2, ή τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ή ακόμα και οξειδωμένες φωσφατιδυλοχολίνες. Είναι γνωστό ότι οι φωσφολιπάσες μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα [624, 339]. Σε ειδικές καταστάσεις όπως υποξυγοναιμία, οίδημα, τοπικές συνθήκες του pH ή συγκέντρωση των Ca²⁺, μπορεί να επηρεαστεί όχι μόνο η έκκριση PLase A₂ από τα κύτταρα αλλά και η ενζυμική της ενεργότητα. Σε μερικές περιπτώσεις όπως η πνευμονική εμβολή [482] και ARDS [186] ανιχνεύθηκε λυσο-PC, η οποία είναι το προϊόν υδρόλυσης της PC από τη PLase A₂. Οι απορρυπαντικές ιδιότητες αυτού του φωσφολιπιδίου μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεση και διαίωνιση των διαταραχών [625].

Η παρουσία ενεργότητας PLase A₂ στο BAL συσχετίστηκε στη μελέτη αυτή με το ARDS. Η μορφή του ενζύμου που ανιχνεύεται πιθανώς είναι η εκκρινόμενη, αφού το BAL είναι ένα υλικό από το οποίο έχουν απομακρυνθεί τα κύτταρα που ανακτώνται από την έκπλυση του πνεύμονα. Είναι επίσης πιθανό, να προέρχεται από κατεστραμμένα κύτταρα, γεγονός το οποίο συμβάλλει επίσης αρνητικά στην καλή λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Η ανίχνευση ενεργότητας PLase A₂ στο ARDS συμφωνεί με τα ευρήματα και άλλων ερευνητών, όπου ο ρόλος του ενζύμου αυτού στο ARDS θεμελιώνεται όλο και περισσότερο (βλ. Εισαγωγή, Φωσφολιπάση A₂ και ARDS, σελ 73 και PLase A₂ και πνεύμονες, σελ. 99). Ωστόσο, σε μία μόνο μελέτη ανιχνεύθηκαν ενεργότητες sPLase A₂ σε BAL ασθενών με ARDS και τα επίπεδα αυτών συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης [362]. Για τη μέτρηση της ενεργότητας στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα PC και PE με αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2.

Προηγούμενες μελέτες είχαν αποτύχει να βρουν ενεργότητα PLase A₂ στο BAL [626, 627]. Τα αποτελέσματα αυτά αποδόθηκαν, εκ των υστέρων από τους Kim et al [362], στη χαμηλότερη ενεργότητα της sPLase A₂ σε υποστρώματα με μικρότερου μήκους λιπαρή αλυσίδα από το αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2.

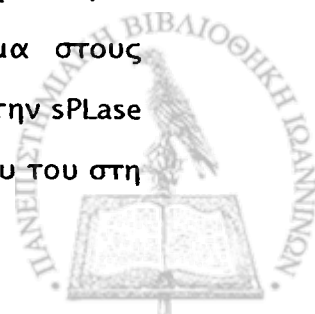
Τα δικά μας αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη ενεργοτήτων sPLase A₂ ανεξάρτητης και εξαρτώμενης από το Ca²⁺ στο BAL ασθενών με ARDS για πρώτη φορά στο υπόστρωμα της C₁₂-NBD-PC. Το φθορίζον αυτό φωσφολιπίδιο φαίνεται να είναι υπόστρωμα ανάλογο της διπαλμιτυλο-PC, το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί και στην παρόμοια πολικότητα των μορίων, όπως φαίνεται στην TLC (βλ. αποτελέσματα, σελ. 206). Το C₁₂-NBD-FA μετατοπίστηκε στο ίδιο περίπου R_f με το παλμιτικό οξύ, καθώς και η C₁₂-NBD-PC με την DPPC. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι το C₆-NBD-FA είναι πιο πολικό μόριο από το C₁₂-NBD-FA.

Το γεγονός ότι τα επίπεδα της sPLase A₂ εξαρτώμενης από Ca²⁺ που ανιχνεύθηκαν στη μελέτη αυτή, είναι διπλάσια σχεδόν από αυτά της sPLase A₂ ανεξάρτητης από Ca²⁺ υποδηλώνει τη συμμετοχή διαφόρων μορφών του ενζύμου στο ARDS.

Ο μηχανισμός πρόκλησης της βλάβης από την sPLase A₂ φαίνεται ότι είναι πολλαπλός και αλυσιδωτός. Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τις sPLases A₂ αυξάνει όχι μόνο την επιφανειακή τάση στη μεσόφαση αέρα-υγρού (βλ. Εισαγωγή, Επιφανειοδραστικός παράγοντας και ARDS, σελ. 66) αλλά οδηγεί και στην παραγωγή της κυτταροτοξικής λυσο-PC η οποία δημιουργεί βλάβη στην τριχοειδοκυψελιδική μεμβράνη (βλ. Εισαγωγή, σελ. 72). Επίσης τα 1-αλκυλο-λυσο-φωσφολιπίδια που παράγονται, μπορεί να ακετυλιωθούν ακολούθως στη θέση sn-2 και να σχηματίσουν PAF, ή ανάλογα μόρια που προκαλούν συσώρευση των αιμοπεταλίων και συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις διαδικασίες καθώς και στη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος [617].

Επιπλέον, το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από τη δράση της PLase A₂ σε φωσφολιπίδια εστεροποιημένα με αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2, μπορεί να μεταβολιστεί σε φλεγμονώδη εικοσανοειδή (βλ. Εισαγωγή, σελ. 82, και Σχήμα 18)

Χορήγηση sPLase A₂ διαμέσου των αεραγωγών προκαλεί οίδημα στους πνεύμονες, ενώ η καταστροφή του επιφανειοδραστικού παράγοντα από την sPLase A₂ έχει επίσης ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του ανασταλτικού ρόλου του στη



σύνθεση της sPLase A₂ με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ενζύμου στις κυψελίδες (βλ. σελ. 69) [326, 350, 351].

Κατανομή ενεργότητας PLase A₂

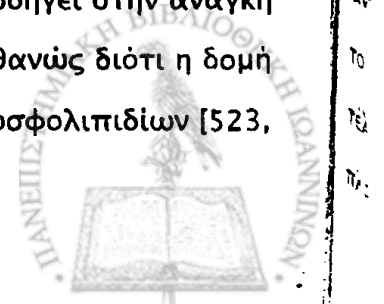
Το 26.4 % της συνολικής ενεργότητας της PLase A₂ του BAL ανιχνεύθηκε στο ίζημα των 30000 g, όπου ανακτάται ο επιφανειοδραστικός παράγοντας με καλές επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Στο ίζημα των 100000 g παρουσιάστηκε το 4.7 % και στο υπερκείμενο των 100000 g το 68.9 % της ενεργότητας. Παρατηρήθηκε ότι αυτή η κατανομή ήταν ανάλογη με την κατανομή των φωσφολιπιδίων στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL των ασθενών με ARDS.

3) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΟ BAL ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ARDS

Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς των πειραμάτων (θετική ανίχνευση των IgG στην ανοσοαποτύπωση, καθώς και απομόνωσή τους με χρωματογραφία στήλης συγγένειας πρωτεΐνης G), δείχνουν καθαρά την ύπαρξη ανοσοφαιρινών G στο BAL. Από ότι είναι γνωστό μέχρι τώρα, η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων στο BAL ασθενών με ARDS δεν έχει αναφερθεί.

ELISA

Μετά την ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών G στο BAL των ασθενών με ARDS, προσπαθήσαμε στη συνέχεια να διερευνήσουμε την εξειδίκευση αυτών. Η δοκιμή δέσμευσης του BAL με τη μέθοδο της ELISA με διάφορα λιπίδια, είχε ως αποτέλεσμα τη δέσμευση του BAL με ανιοντικά φωσφολιπίδια και κυρίως PS, PG και PA. Η δέσμευση με το φωσφατιδικό οξύ είναι λίγο δύσκολο να ερμηνευτεί για το λόγο ότι το φωσφατιδικό οξύ είναι κοινή πρόδρομος ένωση στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων (βλ. Εισαγωγή, Στάδια βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης, σελ. 25). Το γεγονός ότι το BAL δεσμεύεται επιπλέον με PS ή PG ή PI οδηγεί στην ανάγκη ερμηνείας αυτού του φαινομένου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει πιθανώς διότι η δομή και το φορτίο του PA είναι κοινό τμήμα όλων των ανιοντικών φωσφολιπιδίων [523, 603].



Καμία δέσμευση δεν παρατηρήθηκε με τη σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, καθώς και με τα φωσφολιπίδια PC και PE. Αυτό συμφωνεί με τα γενικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά των αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων από τη βιβλιογραφία (βλ. Εισαγωγή, σελ. 127).

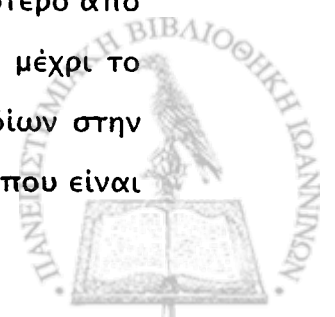
Τα αντισώματα λοιπόν που ανιχνεύονται στο BAL κατευθύνονται κατά των ανιοντικών φωσφολιπιδίων. Δεν είναι εύκολο όμως να διακριθεί αν τα αντισώματα αυτά προέρχονται από την κυκλοφορία και βρίσκονται στο BAL λόγω διαρροής τους στις κυψελίδες από τον ορρό διαμέσου του τριχοειδοκυψελιδικού μεσοδιαστήματος, ή παράγονται τοπικά από τα πνευμονοκύτταρα. Είναι επίσης πιθανό να παράγονται τοπικά, ως μια αντίδραση άμυνας στην καταστροφή των λιπιδίων και κυττάρικών μεμβρανών που παρατηρείται στο ARDS.

ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΩΝ IgG

Ελέγχθηκε η δέσμευση των καθαρισμένων IgG από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G για δέσμευση με διάφορα λιπίδια, με τη μέθοδο της ELISA. Η αντίδραση αυτών ήταν ανάλογη με το BAL, τουλάχιστον σε ότι αφορά στη δέσμευση με το φωσφατιδικό οξύ. Αυτό υποδεικνύει ότι μερικά τουλάχιστον αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα που υπάρχουν στο BAL ανήκουν στην κατηγορία των IgG. Συμπεραίνεται επίσης, ότι αυτά τα aPL δεν χρειάζονται την παρουσία συμπαραγόντα, όπως η β₂-γλυκοπρωτεΐνη I, για να δεσμευτούν με τα φωσφολιπίδια.

ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ BAL ΣΕ ΑΥΞΗΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ PA

Η απόκριση της δέσμευσης του BAL σε αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφατιδικού οξέος ήταν δοσο-εξαρτώμενη και σχεδόν ανάλογη της συγκέντρωσης του PA. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα αντισώματα αυτά έχουν ισχυρή εξειδίκευση για τα αρνητικά φορτισμένα PLs. Πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι οι τιμές της συγκέντρωσης των λιπιδίων που επωάστηκαν στην πλάκα αντιπροσωπεύουν την πραγματική συγκέντρωση. Έχει δειχθεί ότι περισσότερο από το 95 % των λιπιδίων που τοποθετήθηκαν στην πλάκα παραμένει εκεί μέχρι το τέλος της δοκιμής [596]. Ωστόσο, αυτή η τιμή συγκέντρωσης των λιπιδίων στην πλάκα μπορεί να διαφέρει από την πραγματική ποσότητα των λιπιδίων που είναι



διαθέσιμη για δέσμευση με τα αντισώματα, λόγω του τρόπου εναπόθεσης αυτών στην πλάκα [596]. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι πιθανό να σχηματίζονται στοιβάδες λιπιδίων και να εναποτίθενται η μια πάνω από την άλλη με συνέπεια την επικάλυψη κάποιας ποσότητας αυτών και την αδυναμία των αντισωμάτων να τα αναγνωρίσουν.

Συμπερασματικά, αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών G ανιχνεύθηκαν στο BAL μηχανικά αεριζόμενων ασθενών με ARDS ή πνευμονική μόλυνση σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς καρδιοπνευμονική πάθηση. Υψηλά επίπεδα αντιφωσφολιπιδικών αυτο-αντισωμάτων αναγνωρίστηκαν αποκλειστικά στο BAL ασθενών με ARDS. Τα αντισώματα αυτά κατευθύνονταν κατά ανιονικών φωσφολιπιδίων και αντέδρασαν κυρίως με PA, PS και PI. Οι καθαρισμένες IgG από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G είχαν παρόμοια συμπεριφορά στη δέσμευση με τα φωσφολιπίδια με το BAL, όταν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ELISA.

4) ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (APLAS) ΚΑΙ ARDS

Οι ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS) έχουν ευαισθησία στην ανάπτυξη εκτεταμένης αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης, γεγονός το οποίο σχετίζεται με την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στην κυκλοφορία. Ο μηχανισμός της δράσης των αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η επικρατούσα θεωρία είναι ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα παρεμβαίνουν στις διαδικασίες θρόμβωσης-θρομβόλυσης και στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα aPL δεσμεύουν αντιγόνα τα οποία αποτελούνται από φωσφολιπίδια ή από συμπλέγματα πρωτεΐνης/φωσφολιπιδίων, οδηγώντας σε απώλεια της αιμοστατικής ισορροπίας. Υπάρχουν αρκετά ευρήματα που εξηγούν το δυναμικό μηχανισμό δράσης των aPL στη θρόμβωση. Αυτά περιλαμβάνουν αύξηση της παραγωγής θρομβοξανίου A₂ από τα αιμοπετάλια [628], μείωση της παραγωγής της προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [629], αύξηση της ενεργότητας του παράγοντα των ιστών [630], μείωση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S και της ενεργότητας της αντιθρομβίνης III, μείωση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) καθώς και της

έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και μείωση της εμφύτευσης τροφοβλάστη του πλακούντα [629, 631].

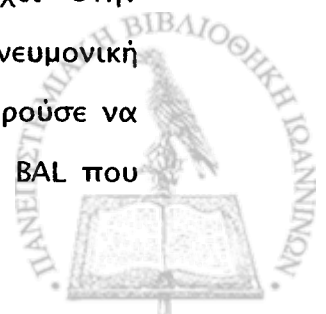
Έχουν αναφερθεί 6 περιπτώσεις ARDS που σχετίζονται με το APLAS. Ο μηχανισμός καθώς και ο παράγοντας κινδύνου του ARDS στο APLAS δεν είναι σαφής. Αυτοψία των ασθενών που δεν επέζησαν αποκάλυψε θρόμβωση των μικρών αγγείων, αιμορραγία στο μεσοδιάστημα και στον ενδο-κυψελιδικό χώρο χωρίς στοιχείο αγγειίτιδας [567, 562].

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η θρόμβωση πνευμονικού αγγείου παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ARDS. Η μικροεμβολή της πνευμονικής αρτηρίας μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο πνευμονικό παρέγχυμα, περιλαμβάνοντας αυξημένη διαβατότητα των αγγείων, ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και φλεγμονή στον πνευμονικό ιστό, που εκφράζονται με αύξηση του PAF και των ουδετερόφιλων [482]. Επιπλέον, η θρόμβωση της πνευμονικής φλέβας αυξάνει την υδροστατική πίεση στα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία. Έτσι, η αύξηση της διαβατότητας των πνευμονικών μικροαγγείων, η αύξηση της υδροστατικής πίεσης καθώς και η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να ευθύνονται για τη δημιουργία του πνευμονικού οιδήματος.

ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε ποσοτική και ποιοτική ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο BAL καθώς και μια αύξηση των φλεγμονωδών κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρείται επίσης στο BAL ασθενών με ARDS χωρίς διαπιστωμένο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (βλ. παραπάνω).

Στην περίπτωση του APLAS, το καταστροφικό γεγονός που οδήγησε στο ARDS δεν είναι κατανοητό. Όπως και σε άλλες περιπτώσεις [562], η περίπτωση του ασθενούς παρουσίαζε υψηλό πυρετό αλλά τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα δεν έδειξαν λοίμωξη. Η ταχεία απόκριση στη χορήγηση στεροειδών οδηγεί στην υπόθεση ότι ανοσολογικός μηχανισμός θα μπορούσε να συμμετέχει στην παθογένεση του ARDS κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του APLAS. Η πνευμονική αρτηριακή και φλεβική μικροεμβολή ή η κυψελιδική αιμορραγία θα μπορούσε να είναι το αίτιο για την εμφάνιση του ARDS. Ωστόσο, το γεγονός ότι το BAL που



ανακτήθηκε από τον κυψελιδικό χώρο δεν είχε αίμα, δεν υποστηρίζει αυτή την υπόθεση.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ aPL ΣΤΟ BAL

Ένα ενδιαφέρον εύρημα στη μελέτη αυτή ήταν η παρουσία των ανοσοσφαιρινών G στο BAL. Αυτές οι IgG ήταν αυτοαντισώματα που κατευθύνονταν κατά ανιοντικών φωσφολιπιδίων [603]. Η απόκριση του BAL καθώς και του ορρού με τη μέθοδο της ELISA ήταν υψηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις λιπιδίων. Αυτό ενισχύει το συμπέρασμα ότι αυτά τα αυτοαντισώματα ήταν ειδικά. Επιπλέον στοιχεία που να υποστηρίζουν την ύπαρξη και εξειδίκευση των IgG αυτό-αντισωμάτων του BAL κατά των φωσφολιπιδίων προέκυψαν επίσης από το γεγονός ότι οι καθαρισμένες IgG έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με το BAL όταν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ELISA.

Από ότι είναι γνωστό μέχρι τώρα, η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αυτοαντισωμάτων στο BAL ασθενών με APLAS και ARDS δεν έχει αναφερθεί. Στην περίπτωση του APLAS τα αυτοαντισώματα μπορεί να κατευθύνονταν κατά των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα ή κατά των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων ή και τα δύο.

Μερικά aPL απαιτούν την παρουσία συμπαράγοντα, όπως η β_2 -γλυκοπρωτεΐνη I (β_2 -GPI) για να δεσμευτούν με τα φωσφολιπίδια, ενώ άλλα όχι [523]. Από τα αποτελέσματά μας, φάνηκε ότι η καθαρισμένες IgG από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G, δεν χρειάστηκαν κανένα άλλο συστατικό για να αντιδράσουν με τα φωσφολιπίδια.

Είναι δύσκολο να καθοριστεί αν η παρουσία των IgG αυτο-αντισωμάτων στο BAL προέρχεται από τοπική παραγωγή ή από διαρροή των πρωτεϊνών από τον ορρό του αίματος. Η διαφορετική απόκριση της δέσμευσης των aPL με τα φωσφολιπίδια στο BAL και στον ορρό υποστηρίζει την υπόθεση της τοπικής παραγωγής αυτών των αντισωμάτων. Αντισώματα τα οποία κατευθύνονται κατά των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα καθώς και τα ανοσοσύμπλοκα θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα και φλεγμονώδη αντίδραση.



5) ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G

Τα κλάσματα των IgG δειγμάτων ανθρώπινου ορού και BAL τα οποία καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης αSpG-Fc περιείχαν, εκτός από ανοσοσφαιρίνες G, ίχνη φωσφολιπιδίων καθώς και σημαντικές ποσότητες χοληστερόλης, όπως διαπιστώθηκε με την ανάλυση φασματομετρίας μάζας. Τα φάσματα μάζας δειγμάτων και πρότυπης χοληστερόλης που λήφθηκαν από το απομονωμένο λιπίδιο, έδειξαν ομοιότητες μεταξύ τους. Τα θραύσματα μάζας της πρότυπης χοληστερόλης που ανιχνεύονται σε m/z 105, 113, 119, 134, 147, 213, 231, 275, 301, 326, 354, 368, 386 καθώς και οι αναλογίες των εντάσεων μεταξύ τους συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [605, 632, 633]. Η χοληστερόλη δεν αποτελούσε το αντιγονικό συστατικό των IgG που δεσμεύτηκαν με την πρωτεΐνη αSpG-Fc, όπως αποδείχθηκε με τη σειρά των πειραμάτων με τη μέθοδο της ELISA.

Παράλληλα, η χοληστερόλη καθώς και μερικά φωσφολιπίδια δεσμεύτηκαν στο υλικό της στήλης όταν διαλύματα BSA με μίγματα προτύπων λιπιδίων διαπέρασαν τη στήλη. Στα εκλούσματα αυτών των διαλυμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH δεν ανιχνεύθηκε αλβουμίνη με ανάλυση SDS-PAGE.

Τα λιπίδια αυτά και κυρίως η χοληστερόλη

- πιθανώς συγκρατούνται άμεσα από τη σεφαρόζη-πρωτεΐνη αSpG-Fc ή
- έμμεσα, μέσω μη ανιχνεύσιμων ποσοτήτων BSA, με τη σεφαρόζη-πρωτεΐνη αSpG-Fc.

Είναι λιγότερο πιθανό να συμβαίνει η δεύτερη υπόθεση, αφού η δέσμευση της αλβουμίνης με το ανασυνδυασμένο μόριο της αSpG-Fc έχει διερευνηθεί και δεν παρατηρήθηκε δέσμευση μεταξύ των δύο μορίων [580, 581, 584, 586]. Το ανασυνδυασμένο πρωτεϊνικό μόριο αSpG-Fc δεν εμφάνιζε καμία αντίδραση με την αλβουμίνη, ενώ ταυτόχρονα δεν απώλεσε καμία από τις ιδιότητες δέσμευσης με την Fc περιοχή των IgG. Η δέσμευση της αSpG-Fc με τις IgG δεν επηρεάστηκε ακόμα και παρουσία περίσσειας ανθρώπινης αλβουμίνης [587].

Ωστόσο, οι μέθοδοι ελέγχου δέσμευσης των δύο πρωτεϊνικών μορίων που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές ήταν κυρίως:



in vitro πειράματα δέσμευσης με χρήση πρωτεΐνης αSpG-Fc και αλβουμίνης ιχνηθετημένη με ¹²⁵I και ακόλουθη μέτρηση της ραδενέργειας σε western blot [581, 587], ή σε δοκιμές ELISA [586],

in vitro πειράματα δέσμευσης με χρήση πρωτεΐνης αSpG-Fc ιχνηθετημένη με ¹²⁵I και αλβουμίνης συζευγμένης με σφαιρίδια πολυακρυλαμίδιου [580] ή επιστρωμένη σε πλάκα ELISA [584] και ακόλουθη μέτρηση της ραδιενέργειας.

Έτσι λοιπόν, ενδεχόμενη δέσμευση της αλβουμίνης με την αSpG-Fc πιθανόν ήταν πολύ ασθενής και όχι ανιχνεύσιμη λόγω της ευαισθησίας των μεθόδων που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές. Επίσης, δέσμευση μικρών ποσοτήτων αλβουμίνης από την αSpG-Fc θα είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση όλων των ειδών λιπιδίων στο έκλουσμα αφού η αλβουμίνη είναι φορέας όλων των λιπιδίων.

Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας στη μελέτη αυτή έδειξαν ότι, εκτός από τη χοληστερόλη, κατακρατήθηκαν τριγλυκερίδια και τα πολικά λιπίδια PC, PE, PG, PS. Δεν ανιχνεύθηκαν άλλα είδη λιπιδίων στην ανάλυση του λιπιδικού εκχυλίσματος με HPTLC. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την υπόθεση άμεσης δέσμευσης των λιπιδίων με την αSpG-Fc.

Το γεγονός ότι η χοληστερόλη εμφανίζει πιο έντονη ζώνη στην HPTLC σε σύγκριση με τα άλλα λιπίδια που κατακρατούνται από το υλικό της στήλης, μπορεί να οφείλεται στην κατακράτηση μεγαλύτερων ποσοτήτων αυτής σε σύγκριση με τα άλλα λιπίδια ή στην ευαισθησία της μεθόδου εμφάνισης της πλάκας. Η χοληστερόλη έχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα και ένταση χρώματος με τη μέθοδο εμφάνισης με φωσφορικό οξύ σε σύγκριση με τα άλλα φωσφολιπίδια, ενώ οι PC, PE, PS, PI εμφανίζουν την ίδια ένταση χρώματος μεταξύ τους σύμφωνα με τους Macala et al [601]. Η χοληστερόλη εμφανίζει διπλάσια περίπου ένταση χρώματος σε σύγκριση με τα PC, PE, PS, PI. Η χημική δομή του μορίου της χοληστερόλης πιθανώς είναι υπεύθυνη για την εντονότερη σήμανσή της στους ατμούς ιωδίου ή μετά την οξειδωσή της από το φωσφορικό οξύ.

Αν δεχθούμε λοιπόν ότι, η πρωτεΐνη αSpG-Fc δεν δεσμεύει αλβουμίνη, τότε μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η άμεση δέσμευση με τα λιπίδια που ανιχνεύθηκαν στο έκλουσμα. Πιθανώς η αSpG-Fc να διαθέτει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της αλβουμίνης αναφορικά με τη δεσμευτική ικανότητα έναντι των λιπιδίων.



Παρατηρήθηκαν αυξημένες ποσότητες χοληστερόλης στο έκλουσμα όταν διαλύματα BSA με αυξημένες συγκεντρώσεις λιπιδίων είχαν τρέξει από τη στήλη. Τα διαλύματα αυτά είχαν όλα την ίδια συγκέντρωση BSA. Εάν η πρωτεΐνη αSpG-Fc δέσμευσε μικρή ποσότητα αλβουμίνης τότε η ποσότητα αυτή θα ήταν η ίδια που θα συγκρατούνταν κάθε φορά από το 1 ml του διαλύματος της σεφαρόζης-πρωτεΐνης αSpG-Fc. Αν όμως αυτή η ποσότητα της αλβουμίνης ήταν κορεσμένη σε λιπίδια δεν θα ανιχνεύονταν αυξημένες ποσότητες λιπιδίων στο έκλουσμα αλλά σταθερές ποσότητες.

Συμπερασματικά, το εύρημα αυτής της μελέτης ήταν η παρουσία μικρών ποσοτήτων λιπιδίων με κυρίαρχη τη χοληστερόλη στο κλάσμα των IgG που καθαρίζονται από τα βιολογικά υγρά με τη μέθοδο της χρωματογραφίας στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης αSpG-Fc. Είτε τα λιπίδια συγκρατούνται άμεσα είτε έμμεσα από την πρωτεΐνη αSpG-Fc με τη δέσμευση πολύ μικρών ποσοτήτων αλβουμίνης, το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν εξίσου σημαντικό.

Το εύρημα αυτό ήταν σημαντικό αφού δεν είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέχρι τώρα κάποια μελέτη για την αλληλεπίδραση των λιπιδίων με την αSpG-Fc. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και όλες υποστηρίζουν ότι η αλβουμίνη δεν δεσμεύεται από την πρωτεΐνη αSpG-Fc. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής ίσως αποτελέσουν το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της αSpG-Fc με λιπίδια.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χρήση των C₆-NBD-PC και C₁₂-NBD-PC ως υποστρωμάτων για τη διερεύνηση των ενεργοτήτων PLase A₂ και PAF-AcH στο BAL. Βρέθηκε ότι η C₆-NBD-PC απουσία Ca²⁺ υδρολύεται μόνο από την PAF-AcH του ορρού και όχι από την παγκρεατική PLase A₂. Η C₁₂-NBD-PC παρουσία Ca²⁺ υδρολύθηκε μόνο από την παγκρεατική PLase A₂. Με δεδομένες αυτές τις ιδιότητες, ήταν δυνατός ο διαφορικός προσδιορισμός των ενεργοτήτων PLase A₂ και PAF-AcH σε διαφορετικά δείγματα ή και στο ίδιο δείγμα. Η παρούσα φθορισμομετρική μέθοδος είναι αναπαραγώγιμη και ακριβής, όπως επιβεβαιώθηκε από τον καθαρισμό των προϊόντων και εκτιμήθηκε μετά από τη σύγκριση με ραδιομετρικές μεθόδους και επίδραση ειδικών αναστολέων. Το κόστος αυτής είναι εξαιρετικά χαμηλό, είναι εύκολη για άμεση και συνεχή παρακολούθηση και δεν παρουσιάζει τους κινδύνους της ραδιενέργειας. Μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο διαφόρων ενεργοτήτων PLase A₂ σε δείγματα όπως το BAL ή ο ορρός, τα οποία περιέχουν ενεργότητες για μεγάλο και μικρό μήκος λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2 των μορίων PCs.

Βήματα πριν την εφαρμογή της μεθόδου

- Λήψη φασμάτων διέγερσης και εκπομπής των διαλυμάτων των NBD-λιπιδίων για τον έλεγχο απόκρισης του οργάνου
- Λήψη φασμάτων διέγερσης και εκπομπής των διαλυμάτων των NBD-λιπιδίων παρουσία συστατικών των υπό ανάλυση δειγμάτων για τον έλεγχο απόκρισης του οργάνου σε αυτές τις συνθήκες
- Προσδιορισμός των γραμμικών περιοχών μεταβολής έντασης φθορισμού συναρτήσει των συγκεντρώσεων των NBD-λιπιδίων
- Έλεγχος απόκρισης της μεθόδου παρουσία εσωτερικών προτύπων



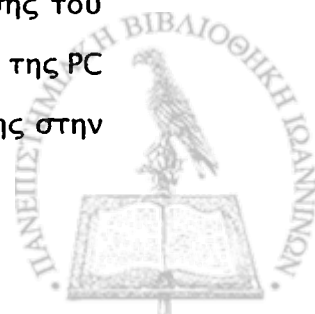
Περιορισμοί της μεθόδου

- ❖ Μέγιστος όγκος δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τελικό όγκο 1 ml μίγματος αντίδρασης: 100 μl.
- ❖ Η ολική πρωτεΐνη του BAL ή του ορρού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε μέτρηση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 500 μg / ml μίγματος αντίδρασης με τη χρήση της C₁₂-NBD-PC, και τα 300 μg / ml μίγματος αντίδρασης με τη χρήση της C₆-NBD-PC ως υποστρωμάτων.
- ❖ Σε τιμές pH χαμηλότερες του 5.5 απαιτείται η χρήση εσωτερικού προτύπου C₁₂-NBD-FA για τον υπολογισμό της ενεργότητας της PLase A₂.
- ❖ Καταγράφεται η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω μείωσης της ευαισθησίας της μεθόδου στους 37 °C.
- ❖ Για τον υπολογισμό της ενεργότητας δεν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μεταβολή της έντασης του φθορισμού που παρατηρείται στα πρώτα 30 min μετά την προσθήκη του υπό ανάλυση δείγματος, αλλά πρέπει πρώτα να σταθεροποιηθεί το υπόβαθρο φθορισμού.

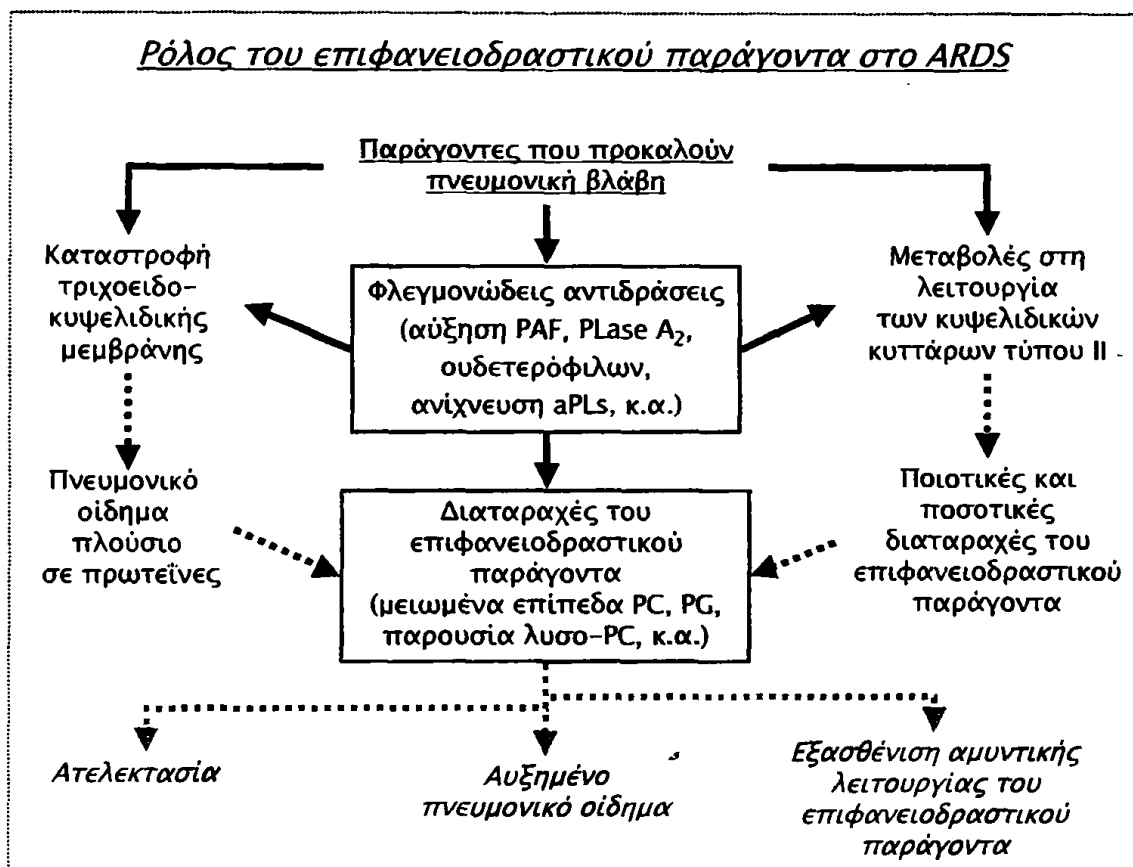
ARDS

Τα κύρια ευρήματα της μελέτης διαφόρων παραμέτρων στο BAL ασθενών με ARDS, είναι τα εξής: βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών, φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο PAF και η PLase A₂, και των ουδετερόφιλων. Παρατηρήθηκε ποιοτική και ποσοστική ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα γεγονός που σχετίζεται με την αύξηση της επιφανειακής τάσης στην επιφάνεια των κυψελίδων και ακόλουθη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος (Σχήμα 105).

Η εξέλιξη από την πρώιμη στην ενδιάμεση και όψιμη φάση του ARDS στους ασθενείς συνοδεύτηκε από μείωση των πρωτεϊνών, του PAF και των ουδετερόφιλων υποδεικνύοντας μια υποχώρηση της οξείας φλεγμονής, και από μια σχετική αύξηση στον αριθμό των μακροφάγων υποδεικνύοντας την έναρξη της επιδιόρθωσης του τραυματισμένου ιστού με τη διαδικασία της ίνωσης. Η μείωση των επιπέδων της PC κατ'ά διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης στην επιβίωση των ασθενών με ARDS.



Παρατηρήθηκε επίσης η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων που κατευθύνονται κατά των φωσφολιπιδίων στο BAL των ασθενών. Αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν επίσης στο ARDS το οποίο προήλθε από πρωτεύον αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα αντισώματα πιθανώς είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας για την παθογένεση του ARDS.



Σχήμα 105. Γεγονότα που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ARDS.

ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ G

Το εύρημα αυτής της μελέτης ήταν η παρουσία μικρών ποσοτήτων λιπιδίων με κυρίαρχη τη χοληστερόλη στο κλάσμα των IgG που καθαρίζονται από τα βιολογικά υγρά με τη μέθοδο της χρωματογραφίας στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης αSpG-Fc. Είτε τα λιπίδια συγκρατούνται άμεσα είτε έμμεσα από την πρωτεΐνη αSpG-Fc με τη δέσμευση πολύ μικρών ποσοτήτων αλβουμίνης, το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν εξίσου σημαντικό, αφού δεν είχε αναφερθεί μέχρι τώρα κάποια μελέτη για την αλληλεπίδραση των λιπιδίων με την αSpG-Fc. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και όλες υποστηρίζουν ότι η αλβουμίνη δεν δεσμεύεται από την πρωτεΐνη αSpG-Fc.

RESUME

Dans le cadre de ce travail, nous avons, dans un premier temps, développé une méthode fluorimétrique permettant de doser sélectivement les activités phospholipase A_2 et PAF-acétylhydrolase dans des fluides biologiques. L'activité phospholipase A_2 était déterminée avec du C_{12} -NBD-PC, par l'augmentation de la fluorescence due à la formation de C_{12} -NBC-acide gras en présence de Ca^{2+} . L'activité PAF-acétylhydrolase était déterminée avec du C_6 -NBD-PC en suivant la formation de C_6 -NBD-acide gras en l'absence de Ca^{2+} . Les courbes standard avec les deux types de NBD-acide gras avaient la même pente et étaient linéaires jusqu'à 4.5 nmoles/ml de milieu réactionnel à pH 7.4.

La phospholipase A_2 pancréatique porcine a montré une préférence pour le C_{12} -NBD-PC en présence de Ca^{2+} , tandis qu'en absence de Ca^{2+} , la PAF-acétylhydrolase sérique a hydrolysé uniquement le C_6 -NBD-PC.

Cette méthode est très sensible, reproductible et précise, et peut être utilisée pour le dosage sélectif des activités phospholipase A_2 et PAF-acétylhydrolase.

Plus particulièrement, elle a été utilisée pour mesurer ces activités enzymatiques dans le liquide bronchoalvéolaire (BAL) de patients atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS).

Par ailleurs, nous avons effectué des études biochimiques et immunochimiques sur le BAL de patients atteints de ARDS. Des niveaux élevés de PAF, de phospholipase A_2 et de protéines ont été détectés chez les patients par rapport aux contrôles. En ce qui concerne les lipides, le contenu phospholipidique était globalement diminué ; une importante diminution du pourcentage de PC et de PG ainsi qu'une augmentation de phosphatidylethanolamine, de phosphatidylsérine, de phosphatidylinositol et de sphingolipides ont été observées par rapport aux contrôles.

Parallèlement, nous avons recherché dans le BAL des patients atteints de ARDS, la présence d'auto-anticorps (IgG) et plus particulièrement ceux dirigés contre des lipides. Une forte réponse a été observée surtout contre l'acide phosphatidique, la phosphatidylsérine et le phosphatidylglycérol. Aucune réaction significative n'a été observée pour les autres lipides testés. Ces résultats étaient reproductibles avec des IgG purifiées, donc en l'absence de tout co-facteur éventuel.



Pendant la purification des IgG par chromatographie d'affinité, une observation originale a été effectuée : les IgG sont co-purifiées avec un composé identifié comme étant du cholestérol. Cette observation a été vérifiée avec des IgG de différentes origines.

Les modifications observées dans le BAL des patients pourraient jouer un rôle significatif dans la pathologie et l'évolution du ARDS.



Δημοσιευμένες εργασίες της Υποψήφιας Διδάκτορος

σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

1. Nakos G, Kitsioulis EI, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1504-10.
2. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Medicine* 1998; 24(4):296-303.
3. Kitsioulis EI, Nakos G, Lekka ME. Differential determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase in biological fluids using fluorescent substrates. *J Lipid Res* 1999; 40(12): 2346-2356.

έχουν υποβληθεί προς δημοσίευση οι εξής εργασίες:

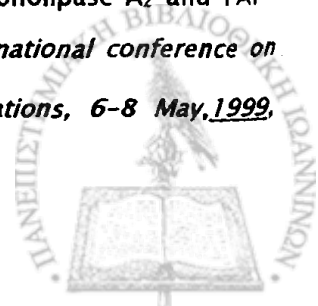
1. Maneta-Peyret L, Kitsioulis EI, Lekka ME, Nakos G, Cassagne C. Auto-antibodies to lipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome.
2. Nakos G, Kitsioulis EI, Maneta-Peyret L, Cassagne C, Tsiamis E, Lekka ME. The characteristics of bronchoalveolar lavage from patient with antiphospholipid syndrome who developed ARDS.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

1. Tsangaris H, Kitsioulis EI, Nathanail C, Lekka ME, Nakos G. "The effect of ventilator-associated pneumonia on protein and phospholipids from BAL". *Oral presentation in XVIII world congress on diseases of the chest of the American Society of Chest Disease, San Francisco, 27-31 Oct., Chest* 1996; 110: 555.
2. Νάκος Γ, Κητσιούλη ΕΙ, Πνευματικός Ι, Φραγκίδης Κ, Λέκκα ΜΕ. "Μεταβολές στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα κατά την πρώιμη, ενδιάμεση και όψιμη φάση του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας". Προφορική παρουσίαση στο 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, 7-10 Οκτωβρίου 1997, Αθήνα, Βιβλίο Πρακτικών σ. 6 (12).
3. Tsangaris H, Kitsioulis EI, Koulouras V, Nakos G, Lekka ME. "BAL alterations in pulmonary embolism". *Oral presentation in 10th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, Paris-France 7-10 Sept, Intensive Care Medicine* 1997; 23 (S1) S33.



4. **Kitsiouli EI, Nakos G, Lekka ME.** "Fluorimetric detection of phospholipase A₂ (PLase A₂) in human bronchoalveolar lavage (BAL)". *Poster presentation in the 38th International Conference on the Biochemistry of Lipids (ICBL), 16-19 September 1997, Assisi, Italy, Chemistry and Physics of Lipids 1997; 88:149 (abstract section).*
5. **Kitsiouli EI, Nakos G, Lekka ME.** "Application of a fluorimetric assay for phospholipase A₂ in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid". *Poster presentation in the 5th Meeting of the Balkan Clinical Laboratory Federation (BJCL), 9-12 October 1997, Ioannina, Greece, Balcan Journal of Clinical Laboratory 1997; 4:68.*
6. **Nakos G, Lachana A, Karassavoglou A, Nathanail C, Kitsiouli EI, Malamou-Mitsi VD.** "Immunoparalysis in critically ill patients and the effect of interferon-gamma on the level of HLA-DR expression". *5th International conference on prevention of infection, Nice 1998, ICU/AMR 02.*
7. **Kitsiouli EI, Nakos G, Lekka ME.** "Differential Determination of PAF-Acetylhydrolase and phospholipase A₂ activities in BAL". *Oral presentation in the 6th International Conference on BAL, 24-27 June 1998, Corfu, Greece. Abstract book p. 39.*
8. **Kitsiouli EI, Maneta-Peyret L, Cassagne C, Nakos G, Lekka ME.** "Anti-lipid auto-antibodies in acute respiratory distress syndrome". *Poster presentation in the 39th International Conference on the Biochemistry of Lipids (ICBL), 23-26 September 1998, Davos, Switzerland, Chemistry and Physics of lipids, 1998;94:176 (abstract section).*
9. **Κητσιούλη ΕΙ, Νάκος Γ, Λέκκα ΜΕ.** "C₆- και C₁₂-NBD-φωσφατιδυλοχολίνη ως υποστρώματα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό φωσφολιπάσης A₂ και PAF-ακετυλυδρολάσης σε βιολογικά υγρά: πλεονεκτήματα και περιορισμοί". *Προφορική παρουσίαση στο 50^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας που διοργάνωσε η Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EBBE), 15-16 Ιανουαρίου 1999, Αθήνα.*
10. **Tsangaris H, Kitsiouli EI, Nathanail C, Konstanti E, Galani V, Lekka ME, Nakos G.** "The effect of mechanical ventilation on the biochemical parameters of BAL in sheeps". *Poster presentation in the International Conference of the American Thoracic Society, 23-28 April 1999, San Diego California, Am Rev Respir Critic Care Dis. 1999;159:A478.*
11. **Kitsiouli EI, Nakos G, Lekka ME.** "Fluorimetric determination of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase: Effect of albumin". *Oral presentation in the 1st International conference on Lipases and Lipids: structure, function and biotechnological applications, 6-8 May, 1999, Santorini, Greece, Abstract Book p. 59.*



12. Kitsioulis EI, Maneta-Peyret L, Cassagne C, Lekka ME, Nakos G. "Auto-antibodies in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury". *Poster presentation in the 3rd State of the Art Interdisciplinary Review Course, 21-23 May, 1999, Athens, Greece. Proceedings and Abstracts P. 547.*
13. Kitsioulis EI, Nakos G, Lekka ME. "PAF-acetylhydrolase activity in bronchoalveolar lavage fluid: fluorimetric detection and specific inhibitors". *Poster presentation in the 1st International Conference on Phospholipase A₂, 26-29 May, 1999, Berlin, Germany. Abstract Book P.34.*
14. Kitsioulis EI, Karasavoglou A, Lachana CA, Malamou-Mitsi VD, Nakos G, Lekka ME. "Local increase of PAF and phospholipases in bronchoalveolar lavage fluid after inhalation of interferon". *Poster presentation in the 40th International Conference on the Biochemistry of Lipids (ICBL), 14-17 September 1999, Dijon, France, Chemistry and Physics of Lipids 1999; 101(2):193 (abstract section).*
15. Τσαγκάρης Η, Κητσιούλη ΕΙ, Λαχανά Α, Καράγιωργα Γ, Λέκκα Μ, Νάκος Γ. Η μεταβολή των βιοχημικών παραμέτρων στην Πνευμονία των μηχανικά αεριζόμενων ασθενών (VAP). *Προφορική παρουσίαση στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, 7-10 Οκτωβρίου, Αθήνα.*
16. Τσαγκάρης Η, Κητσιούλη ΕΙ, Κωσταδήμα Ε, Λιοκάτης Α, Λέκκα Μ, Νάκος Γ. Η επίδραση της ατελεκτασίας στις βιοχημικές παραμέτρους του BAL σε μηχανικά αεριζόμενους ασθενείς. *Προφορική παρουσίαση στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, 7-10 Οκτωβρίου, Αθήνα.*
17. Kitsioulis EI, Karasavoglou A, Lachana CA, Malamou-Mitsi VD, Nakos G, Lekka ME. "Local increase of PAF and phospholipases in bronchoalveolar lavage fluid after inhalation of interferon". *Oral presentation in the 51st meeting of the Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 9-11 December 1999, Athens, Newsletter 1999; 46:43-47.*
18. Κητσιούλη ΕΙ, Maneta-Peyret L, Cassagne C, Νάκος Γ, Λέκκα Μ. "Κατακράτηση λιπιδίων από στήλη σεφαρόζης-πρωτεΐνης G. Ανακοίνωση στο 51^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας που διοργάνωσε η Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EBBE), 9-11 December 1999, Αθήνα.



ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πνευμονικό παρέγχυμα, δομή των κυψελίδων []. 1
- Εικόνα 2. Ηλεκτρονική μικρογραφία ενός πνευμονικού τριχοειδούς αγγείου στο κυψελιδικό τοίχωμα. Το βέλος δείχνει την πορεία διάχυσης του κυψελιδικού αέρα στο εσωτερικό ενός ερυθροκυττάρου, διαπερνώντας το στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα (δεν φαίνεται), το κυψελιδικό επιθήλιο (EP), το διάμεσο χώρο ή μεσοδιάστημα (IN), το ενδοθήλιο του τριχοειδούς (EN) και το πλάσμα. Φαίνονται επίσης, τμήματα κυττάρων που λέγονται ινοβλάστες (FB), η βασική μεμβράνη (BM) και ο πυρήνας ενός ενδοθηλιακού κυττάρου []. 2
- Εικόνα 3. Πολυστοιβαδωτά σωμάτια (φωτογραφία από μικροσκόπιο) [1]. 11
- Εικόνα 4. Έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην επιφάνεια των κυψελίδων από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. 1) Πνευμονοκύτταρα τύπου II 2) Πνευμονοκύτταρα τύπου I 3) Το στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα 4) Κυψελιδικό τριχοειδές αγγείο 5) Ερυθροκύτταρα [1]. 32
- Εικόνα 5. Δομή της παγκρεατικής PLase A₂ βός. Φαίνονται 7 δισουλφιδικοί δεσμοί, η καταλυτική δυάδα D99-H48 και το αμινοξύ Υ73 []. 84
- Εικόνα 6. Διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) και ιχνηθετημένη με φλουορεσκεΐνη-PLase A₂. Στην εικόνα φαίνεται η προσρόφηση του σημασμένου ενζύμου στην επιφάνεια της DPPC. Το ένζυμο ενσωματώνεται κατά προτίμηση στη μεσόφαση. Η ένταση του λευκού χρώματος δείχνει την ποσότητα του προσροφημένου ενζύμου []. 89
- Εικόνα 7. Υποθετικό τριδιάστατο μοντέλο της PAF-AcH του πλάσματος και της ισομορφής II []. 93
- Εικόνα 8. Αναπαράσταση της τεταρτοταγούς δομής της α-υπομονάδας του συμπλέγματος PAF-AcH Ib [446]. 94
- Εικόνα 9. Περιοχή της πρωτεΐνης G που δεσμεύει την αλβουμίνη []. 137
- Εικόνα 10. Ορθογώνιες όψεις της αSPG-Fc. Φαίνεται η δευτεροταγής διαμόρφωση του μορίου και το αμινοξύ θρυπτοφάνη-48 στο κέντρο. 138
- Εικόνα 11. Μετατοπίσεις λιπιδίων σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού, (65:35:7, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel. (ΣΕ = σημείο εκκίνησης, ΜΔ = μέτωπο διαλύτη). 206
- Εικόνα 12. Μετατοπίσεις των NBD-λιπιδίων και του παλμιτικού οξέος σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου-μεθανόλης-οξικού οξέος, (95:5:1, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel. (ΣΕ = σημείο εκκίνησης, ΜΔ = μέτωπο διαλύτη). 207
- Εικόνα 14. Εικόνα από TLC. Ανάπτυξη σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:35:7, v/v). Η φωτογραφία λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (Image Analyser) σε φωτισμό UV και η επεξεργασία της εικόνας έγινε με λογισμικό Photo-Paint 7, Corel. 243
- Εικόνα 15. Α. Ανάλυση SDS-PAGE διαφορετικών δειγμάτων BAL (15 μg πρωτεΐνη). 271
- Εικόνα 16. TLC δείγματος BAL ασθενούς με APLAS και δείγματος ελέγχου (ΔΕ) σε σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (65:35:7, v/v). (ΜΔ = μέτωπο διαλύτη, ΣΕ = σημείο εκκίνησης, Π = πρότυπα λιπίδια). 284
- Εικόνα 17. Αποτελέσματα από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (Α, Β) και ανοσοαποτύπωση (Γ, Δ) των πρωτεϊνών του BAL ασθενούς με APLAS (Β και Δ) και δείγματος ελέγχου (Α και Γ). . 285

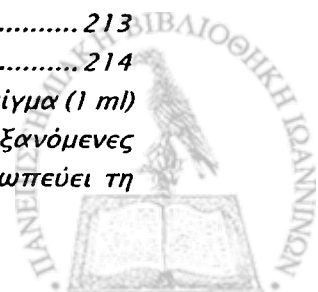
- Εικόνα 18.** 12% SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών των IgG κλασμάτων 3 δειγμάτων ανθρώπινων ορρών. (Χρησιμοποιήθηκε σειρά πρότυπων μοριακών βαρών 205 / 116 / 97 / 84 / 66 / 55 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14.2 / 6.5 kDa)..... 292
- Εικόνα 19.** HPTLC λιπιδίων κλασμάτων IgG από δείγματα BAL (1,2,3) και ανθρώπινων ορρών (1,2,3,4,5). (Χολ=χοληστερόλη, ΣΕ=σημείο εκκίνησης, ΜΔ=μέτωπο διαλύτη). Η ανάπτυξη έγινε σε σύστημα διαλυτών εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). (Χολ. = πρότυπη χοληστερόλη)..... 293
- Εικόνα 20.** HPTLC λιπιδίων σε σύστημα εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). Το λιπιδικό εκχύλισμα του εκλούσματος με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης της στήλης σεφαρόζης-πρωτεΐνης G αναπτύχθηκε στην πλάκα. Διάλυμα BSA με χοληστερόλη και διάλυμα BSA με μίγμα προτύπων λιπιδίων είχαν περάσει αρχικά από τη στήλη. (Χολ., χοληστερόλη; MAG, μονογλυκερίδιο; TAG, τριγλυκερίδιο). 295
- Εικόνα 21.** HPTLC λιπιδίων των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού είχαν περάσει από αυτή διαλύματα BSA-μίγμα προτύπων λιπιδίων και BSA-χοληστερόλης. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών οξικού μεθυλεστέρα: n-προπανόλης: CHCl₃: MeOH: KCl 0.25 % σε αναλογία (12.5:12.5:14:5:3.5, v/v)..... 296
- Εικόνα 22.** SDS-PAGE του εκλούσματος της στήλης σεφαρόζης-πρωτεΐνης G με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης pH 2.7. Ορρός, διάλυμα BSA με πρότυπη χοληστερόλη και διάλυμα μίγματος προτύπων λιπιδίων με BSA είχαν περαστεί αρχικά από τη στήλη. (Χρησιμοποιήθηκε σειρά πρότυπων μοριακών βαρών 205 / 116 / 97 / 84 / 66 / 55 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14.2 / 6.5 kDa)..... 297



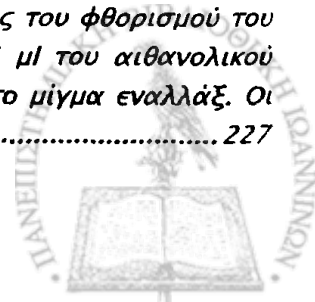
ΕΥΦΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.** Είδη λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και οι δράσεις των φωσφολιπασών. 8
- Σχήμα 2.** Βιοσύνθεση, οργάνωση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. ΕΔ, ενδοπλασματικό δίκτυο; ΠΣ, πολυστοιβαδωτά σωματίδια; ΣΜ, σωληνώδης μυελίνη []. 10
- Σχήμα 3.** Δομή της υδρόφιλης πρωτεΐνης SP-A []. 13
- Σχήμα 4.** Πιθανή δομή ενός διμερούς της SP-B σε ένα φωσφολιπιδικό περιβάλλον []. 15
- Σχήμα 5.** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της SP-C και των φωσφολιπιδίων. Α) Φυσική SP-C σε φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Β) Φυσική SP-C σε οργανικούς διαλύτες. Γ) Διπαλμιτυλο-SP-C σε φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Δ) Διπαλμιτυλο-SP-C σε οργανικούς διαλύτες [58]. 16
- Σχήμα 6.** Δομή της υδρόφιλης πρωτεΐνης SP-D [34]. 17
- Σχήμα 7.** Στάδια σύνθεσης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) και φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) [6]. 26
- Σχήμα 8.** Τα ουδετερόφιλα στην ανάπτυξη του ARDS. (1) Ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται στα πνευμονικά τριχοειδή αγγεία και προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. (2) Ένας μικρός πληθυσμός ουδετερόφιλων μεταναστεύουν στο διάμεσο χώρο. (3) Ένας μικρός πληθυσμός ουδετερόφιλων μεταναστεύουν στον κυψελιδικό χώρο. (4) τα ουδετερόφιλα προκαλούν βλάβη στο ενδοθήλιο δημιουργώντας κύστες και νέκρωση. (5) Περιοχές του ενδοθηλίου αποκολλώνται από τη βασική μεμβράνη. (6) Στον κυψελιδικό χώρο, τα ουδετερόφιλα αποκολλούν και προκαλούν βλάβη σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου I. (7) Σε σοβαρή βλάβη, τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II καταστρέφονται []. 45
- Σχήμα 9.** Χημικός τύπος του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF). 49
- Σχήμα 10.** Μεταγωγή σήματος και τα στάδια δημιουργίας των λιπιδικών μεσολαβητών. 52
- Σχήμα 11.** Σειρά γεγονότων που ακολουθούν τη δέσμευση του PAF με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων. 55
- Σχήμα 12.** Επίδραση εξωκυτταρικού Ca^{2+} 55
- Σχήμα 13.** Η σηματοδότηση από τον PAF προκαλεί ενεργοποίηση ουδετερόφιλων. Ο PAF που εμφανίζεται στη μεμβράνη των φλεγμονωδών ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί σήμα στα ουδετερόφιλα τα οποία προσκολλούνται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου της P-σελεκτίνης. Το σήμα αυτό, που μεσολαβείται από τον υποδοχέα του PAF, ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα για αυξημένη έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων τους και παραγωγή ριζών οξυγόνου μεταξύ άλλων φλεγμονωδών αντιδράσεων. Υπό φυσιολογική ρύθμιση, αυτή η πολλαπλή προσκόλληση και σηματοδότηση συνεισφέρει στην άμυνα. Όμοια μοριακά γεγονότα, όταν δεν είναι ελεγχόμενα και ρυθμιζόμενα, μπορούν να προκαλέσουν οξεία πνευμονική βλάβη καθώς και διάφορα άλλα φλεγμονώδη σύνδρομα βλάβης των ιστών []. 58
- Σχήμα 14.** Επίδραση της PLase A₂ στις επιφανειοδραστικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα [339]. 69
- Σχήμα 15.** Επίδραση PLase A₂ στην ευαισθησία της αναστολής του επιφανειοδραστικού παράγοντα από την αλβουμίνη [339]. 70
- Σχήμα 16.** Α) Επιφανειοδραστικός παράγοντας σε φυσιολογικό πνεύμονα. Β) Μεταβολές του επιφανειοδραστικού παράγοντα στο ARDS. Η ενεργοποίηση των κυψελιδικών μακροφάγων από λιποπολυσακχαριτή προκαλεί παραγωγή της sPLase A₂-II. Συσσωρευση sPLase A₂-II στον κυψελιδικό χώρο οδηγεί στην υδρόλυση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και στην απαρχή ενός φαύλου κύκλου []. 71
- Σχήμα 17.** Αντιδράσεις που καταλύουν οι φωσφολιπάσες A₁, A₂, C και D. 81

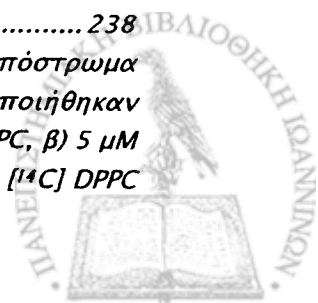
Σχήμα 18. Συμμετοχή της PLase A ₂ στη δημιουργία των εικοσανοειδών και στην πορεία ανάπλασης του PAF.....	82
Σχήμα 19. Δράση της PAF-AcH στον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF).....	92
Σχήμα 20. Μόρια με π ηλεκτρόνια σε διάφορες καταστάσεις spin.	108
Σχήμα 21. Σχηματικό ενεργειακό διάγραμμα που παριστάνει τις μεταβολές που συμβαίνουν στην απορρόφηση, στο φθορισμό και φωσφορισμό. Τα βέλη δείχνουν την ακτινοβολία φωτονίων, ενώ τα διακεκομμένα βέλη παριστάνουν την αποδιέγερση διαμέσου συγκρούσεων). (υ = δονητικά επίπεδα, S ₀ = απλή βασική κατάσταση, S ₁ = απλή πρώτη διηυερμένη κατάσταση, T ₁ = τριπλή πρώτη διηυερμένη κατάσταση).....	109
Σχήμα 23. Διάθλαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. (δ.δ. = δέσμη διέγερσης, δ.α. = δέσμη ανάκλασης, δ.ε. = δέσμη εκπομπής, θ' = γωνία ανάκλασης).....	119
Σχήμα 25. Σκέδαση φωτός σε σωματίδιο μεγάλων διαστάσεων.....	120
Σχήμα 27. Συνθετικό φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το πυρένιο.....	121
Σχήμα 28. Συνθετικό φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το βινυλο-ναφθαλένιο στη θέση 1 του μορίου.....	122
Σχήμα 29. Φωσφολιπιδικό υπόστρωμα με φθορίζουσα ομάδα το παριναρικό οξύ.....	122
Σχήμα 30. C ₆ -NBD-φωσφατιδυλοχολίνη.....	123
Σχήμα 31. Αντίδραση υδρόλυσης της C ₆ - ή C ₁₂ -NBD-PC από PLase A ₂ . (Με το ερυθρό και κυανό χρώμα φαίνονται τα μόρια που φθορίζουν).	124
Σχήμα 32. Διάγραμμα ροής: στάδια των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL.....	141
Σχήμα 33. Διάγραμμα προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	142
Σχήμα 34. Προσδιορισμός αλβουμίνης με τη μέθοδο της βρωμοκρεσόλης.....	144
Σχήμα 35. Αντίδραση υδρόλυσης της διπαλμιτυλο-φωσφατιδυλοχολίνης από το ένζυμο PLase A ₂	153
Σχήμα 36. Διάγραμμα ροής του ραδιομετρικού προσδιορισμού ενεργότητας PAF-AcH στο BAL.....	161
Σχήμα 37. Διάγραμμα ροής της εκχύλισης λιπιδίων του BAL.....	166
Σχήμα 38. Διάγραμμα ροής του προσδιορισμού φωσφόρου.....	170
Σχήμα 39. Σχηματικό διάγραμμα του βιολογικού προσδιορισμού του PAF σε BAL, με συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....	177
Σχήμα 40. Σταδιακή αναπαράσταση της ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA.....	183
Σχήμα 41. Φάσμα διέγερσης (πάνω) και φάσμα εκπομπής (κάτω) του μίγματος των 4 φθορίζόντων λιπιδίων (2.5 μM C ₆ -NBD-PC, 0.5 μM C ₆ -NBD-FA, 2.5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 0.5 μM C ₁₂ -NBD-FA) σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, παρουσία Ca ²⁺ ή EDTA. Οι κορυφές β αντιστοιχούν στο σήμα που λαμβάνεται στην έξοδο όταν τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής συμπίπτουν (σκέδαση Rayleigh).....	210
Σχήμα 42. Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του μίγματος των 4 φθορίζόντων λιπιδίων (2.5 μM C ₆ -NBD-PC, 0.5 μM C ₆ -NBD-FA, 2.5 μM C ₁₂ -NBD-PC, 0.5 μM C ₁₂ -NBD-FA) σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία Ca ²⁺ ή EDTA. Τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής καθενός λιπιδίου χωριστά είναι όμοια με αυτά σε ότι αφορά στα μέγιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής. Το σχήμα αυτό προήλθε από τη συνένωση των δύο προηγούμενων σχημάτων και αφαιρέθηκαν οι κορυφές β που οφείλονταν στη σκέδαση Rayleigh.....	211
Σχήμα 43. Φάσματα εκπομπής των C ₁₂ - ή C ₆ -NBD-PCs παρουσία C ₁₂ - ή C ₆ -NBD-FAs αντίστοιχα, BAL ή BSA.....	212
Σχήμα 44. Φάσματα εκπομπής των C ₁₂ - ή C ₆ -NBD-FAs παρουσία BAL ή BSA.....	213
Σχήμα 45. Φάσματα εκπομπής φθορισμού σε διάφορες πειραματικές συνθήκες.....	214
Σχήμα 46. Κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC) των C ₆ -NBD-PC στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε 10 mM Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7.4, 2 mM Ca ²⁺ και αυξανόμενες συγκεντρώσεις C ₆ -NBD-PC ή C ₁₂ -NBD-PC αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη	



- μέση τιμή τριών μετρήσεων. Η απόκλιση των μετρήσεων από τη μέση τιμή ήταν μικρότερη από $\pm 10\%$ 216
- Σχήμα 47.** Επίδραση ιόντων στο φθορισμό των NBD-φωσφατιδυλοχολινών. Έγινε προσθήκη 10 μl αιθανολικού διαλύματος C_6- ή C_{12} -NBD-PC σε 990 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl pH 7.4 παρουσία ή απουσία 10 mM σε EDTA ή 2 mM Ca^{2+} ή 100 mM KCl ή 100 mM KCl/2 mM Ca^{2+} . Ακολούθησε ανάδευση και καταγραφή της έντασης εκπομπής φθορισμού στα 535 nm. Οι τιμές της έντασης φθορισμού αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Η απόκλιση των μετρήσεων από τη μέση τιμή ήταν μικρότερη από $\pm 10\%$ 217
- Σχήμα 48.** Επίδραση θερμοκρασίας στο φθορισμό των NBD-λιπιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 5 μM NBD-PC και 0.3 μM NBD-FA σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4. 218
- Σχήμα 49.** Επίδραση υπερήχων στο φθορισμό των NBD-PCs στους 25°C. 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA ή 2 mM Ca^{2+} , 5 μM C_6- ή C_{12} -NBD-PC τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. 219
- Σχήμα 51.** Επίδραση pH, ιόντων Ca^{2+} και EDTA στο φθορισμό των NBD-PCs συγκέντρωσης 5 μM . Οι τιμές της έντασης φθορισμού αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών μετρήσεων $\pm SD$ 219
- Σχήμα 52.** Επίδραση pH στο φθορισμό της C_6 -NBD-PC παρουσία BAL στους 25 °C: 1 ml τελικού όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος περιείχε 5 μM C_6 -NBD-PC και 40 μg πρωτεΐνης του BAL. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 3.5 έως 5.5; Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 5.5 έως 7.0 και ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl για την περιοχή του pH από 7.0 έως 9.0 αντίστοιχα. Οι μετρήσεις της έντασης φθορισμού λήφθηκαν πριν την έναρξη της αντίδρασης και αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Ο βασικός φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις. 220
- Σχήμα 53.** Επίδραση pH στο φθορισμό των NBD-FAs στους 25 °C: το μίγμα επώασης περιείχε 5 μM NBD-PC. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 3.5 έως 5.5. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε για την περιοχή του pH από 5.5 έως 7.0 και ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl για την περιοχή του pH από 7.0 έως 9.0 αντίστοιχα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών μετρήσεων. Ο βασικός φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις. 221
- Σχήμα 54.** Επίδραση συγκέντρωσης BSA στο φθορισμό της C_{12} -NBD-PC στους 25 °C. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 2 mM Ca^{2+} ή 10 mM EDTA, 5 μM C_{12} -NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA. Έγινε άμεση παρακολούθηση της αύξησης του φθορισμού του μίγματος. Ο βασικός φθορισμός των NBD-PC πριν την προσθήκη της BSA αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις. 222
- Σχήμα 55.** Επίδραση συγκέντρωσης BSA στο φθορισμό της C_{12} -NBD-PC και C_6 -NBD-PC στους 25 °C. Το μίγμα περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca^{2+} ή 10 mM EDTA, 5 μM NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την τιμή της έντασης φθορισμού που καταγράφηκε με συνεχή διέγερση του μίγματος, μετά την αποκατάσταση του πλατώ (40 min) (βλ. Σχήμα 54). 223
- Σχήμα 56.** Πρότυπες καμπύλες των NBD-FAs παρουσία BAL καθώς και παρουσία των δύο υποστρωμάτων στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca^{2+} ή 10 mM EDTA, 5 μM C_6 -NBD-PC, 5 μM C_{12} -NBD-PC και 100 μl BAL (500 μg πρωτεΐνης). Μετά τη σταθεροποίηση της αρχικής αύξησης του φθορισμού του υποστρώματος λόγω των πρωτεϊνών του BAL (χρόνος μηδέν), 5 μl του αιθανολικού διαλύματος των 0.1 mM C_6 -NBD-FA ή C_{12} -NBD-FA προστέθηκε στο μίγμα εναλλάξ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. 227



- Σχήμα 61.** Επίδραση συγκέντρωσης πρωτεΐνης του BAL στο φθορισμό των NBD-PCs στους 25 °C. Το μίγμα (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ ή 10 mM EDTA, 5 μM NBD-PC και αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης του BAL. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την τιμή της έντασης φθορισμού που καταγράφηκε στην άμεση παρακολούθηση μετά τη σταθεροποίηση της αρχικής αύξησης του φθορισμού και πριν την παρακολούθηση της αντίδρασης..... 229
- Σχήμα 62.** Ενεργότητα PLase A₂ του BAL στους 25 °C. Α) Συνεχής παρακολούθηση του φθορισμού (στα 535 nm) του μίγματος της αντίδρασης με συνεχή διέγερση στα 475 nm και Β) μέτρηση του φθορισμού του προϊόντος της αντίδρασης το οποίο είχε απομονωθεί και διαχωριστεί με ανάλυση TLC, σε διάφορες χρονικές στιγμές. Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺, 5 μM C₆-NBD-PC και 100 μl BAL ως πηγή του ενζύμου..... 230
- Σχήμα 63.** Ενεργότητα παγκρεατικής PLase A₂ παρουσία BAL στους 25 °C: Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺, 5 μM C₆-NBD-PC, BAL και αυξανόμενες συγκεντρώσεις παγκρεατικής PLase A₂. Το BAL που χρησιμοποιήθηκε δεν εμφάνιζε ενεργότητα PLase A₂. Ο φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις..... 232
- Σχήμα 64.** Πρότυπες καμπύλες των NBD-FAs στους 25 °C. Το μίγμα επώασης (1 ml) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM Ca²⁺ ή 10 mM EDTA, 5 μM C₆-NBD-PC (ή C₁₂-NBD-PC) καθώς και αυξανόμενες ποσότητες C₆-NBD-FA (ή C₁₂-NBD-FA), αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριών μετρήσεων. Ο φθορισμός της NBD-PC αφαιρέθηκε από όλες τις μετρήσεις. 232
- Σχήμα 66.** Εξειδίκευση υποστρώματος για την παγκρεατική PLase A₂..... 234
- Σχήμα 67.** Εξειδίκευση υποστρώματος για την PAF-AcH του ανθρώπινου ορρού..... 235
- Σχήμα 68.** Εξειδίκευση υποστρώματος για την ενεργότητα φωσφολιπάσης A₂ του BAL για μικρές λιπαρές αλυσίδες στη θέση sn-2. Για τη μέτρηση των ενεργοτήτων εφαρμόστηκε ο ραδιομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της PAF-AcH (υπόστρωμα [³H]PAF) και ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός PLase A₂ για μικρές λιπαρές αλυσίδες (υπόστρωμα C₆-NBD-PC) απουσία Ca²⁺. Οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C)..... 236
- Σχήμα 69.** Επίδραση αναστολέων στην ενεργότητα της PLase A₂. Η παγκρεατική PLase A₂ επώαστηκε με τα διαλύματα των αναστολέων για 15 min στους 25 °C. Ακολούθησε προσθήκη αυτής στο υδατικό διάλυμα της C₁₂-NBD-PC παρουσία Ca²⁺ και καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του μίγματος συναρτήσει του χρόνου. Η ενζυμική ενεργότητα υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης μεταβολής του φθορισμού. Η μεταβολή της έντασης του φθορισμού στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων και η απόκλιση ήταν μικρότερη του ±5 %..... 237
- Σχήμα 70.** Επίδραση αναστολέων στην υδρολυτική δράση της PAF-AcH του BAL στο φθορίζων υπόστρωμα C₆-NBD-PC. Το BAL επώαστηκε με τα διαλύματα των αναστολέων για 15 min στους 25 °C. Ακολούθησε προσθήκη αυτού στο υδατικό διάλυμα του υποστρώματος και καταγράφηκε η μεταβολή της έντασης του φθορισμού του μίγματος συναρτήσει του χρόνου. Η ενεργότητα PAF-AcH υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης μεταβολής του φθορισμού. Η μεταβολή της έντασης του φθορισμού στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων και η απόκλιση των τιμών από το μέσο όρο ήταν μικρότερη του ±15 %..... 238
- Σχήμα 71.** Ραδιομετρικός προσδιορισμός ενεργότητας παγκρεατικής PLase A₂ στο υπόστρωμα της [¹⁴C] DPPC παρουσία φθορίζοντων υποστρωμάτων, στους 25 °C. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις υποστρωμάτων: α) 5 μM DPPC και 100000 cpm [¹⁴C] DPPC, β) 5 μM DPPC, 100000 cpm [¹⁴C] DPPC και 5 μM C₆-NBD-PC, γ) 5 μM DPPC, 100000 cpm [¹⁴C] DPPC



και 5 μM $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο μετρήσεων.	239
Σχήμα 72. Ταυτόχρονος προσδιορισμός παγκρεατικής PLase A_2 και PAF-AcH ανθρώπινου ορρού Το μίγμα επώασης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4, 2 μg παγκρεατικής PLase A_2 και 100 μl ορρού, αραιωμένου 1:50. Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 5 μM $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$, και παρακολούθηθηκε αμέσως η μεταβολή της έντασης του φθορισμού με συνεχή διέγερση. Η δέσμευση των Ca^{2+} πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 10 % EDTA pH 7.4 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 30 mM. Μετά την απενεργοποίηση της PLase A_2 , προστέθηκαν 5 μM $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$ και καταγράφηκε ακολούθως η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει η PAF-AcH.....	240
Σχήμα 73. Ταυτόχρονος προσδιορισμός PLase A_2 και PAF-AcH του BAL. Το μίγμα επώασης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, 2 mM Ca^{2+} , pH 7.4, 100 μl BAL. Η εκκίνηση της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 5 μM $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$, και παρακολούθηθηκε αμέσως η μεταβολή της έντασης του φθορισμού με συνεχή διέγερση. Στο σημείο αυτό ο όγκος του διαλύματος ήταν 1 ml. Η μεταβολή του φθορισμού που καταγράφεται στα πρώτα 30 min δεν λαμβάνεται υπόψη. Η δέσμευση των Ca^{2+} πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 10 % EDTA pH 7.4 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 30 mM. Μετά την απενεργοποίηση της PLase A_2 , προστέθηκαν 5 μM $\text{C}_6\text{-NBD-PC}$ και καταγράφηκε ακολούθως η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει η PAF-AcH του BAL.	242
Σχήμα 74. Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.	248
Σχήμα 75. Εκατοστιαία ποσοστά της αλβουμίνης επί των ολικών πρωτεϊνών στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.....	250
Σχήμα 76. Επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με πρώιμο, ενδιάμεσο και όψιμο ARDS καθώς και της ομάδας ελέγχου.	251
Σχήμα 77. Ποσοστά επιμέρους φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.....	253
Σχήμα 78. Μεταβολές στα ποσοστά της φωσφατιδυλοχολίνης που ανιχνεύεται στο BAL των ασθενών κατά την πορεία εξέλιξης του ARDS σε σχέση με την τελική έκβαση των ασθενών. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.01$) μεταξύ αυτών που επέζησαν και αυτών που δεν επέζησαν στην όψιμη φάση του συνδρόμου.	256
Σχήμα 79. Επίπεδα PAF και PAF-AcH στο BAL ασθενών με ARDS (πρώιμο, ενδιάμεσο, όψιμο στάδιο) και της ομάδας ελέγχου.	257
Σχήμα 80. Μέση τιμή ενεργότητας PLase A_2 στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου (A), και ενεργότητα PLase A_2 του BAL κάθε ασθενούς χωριστά (B). Ο υπολογισμός της ενεργότητας έγινε με τη μέτρηση της αύξησης της έντασης του φθορισμού διαλύματος $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ μετά από την προσθήκη BAL. Η μεταβολή του φθορισμού που καταγράφηκε στα πρώτα 30 min δεν λήφθηκε υπόψη. Έγινε παρακολούθηση της αντίδρασης για 2-3 ώρες περίπου.....	259
Σχήμα 81. Κατανομή της ολικής ενεργότητας PLase A_2 στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL ασθενών με ARDS. Χρησιμοποιήθηκε η φθορισμομετρική μέθοδος ανίχνευσης PLase A_2 με τη χρήση της $\text{C}_{12}\text{-NBD-PC}$ ως υπόστρωμα σε θερμοκρασία 25 °C.....	260
Σχήμα 82. Ολικός αριθμός κυττάρων στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου. ...	261
Σχήμα 83. Ποσοστά επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών στο BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου.....	262
Σχήμα 84. Κατανομή ολικών φωσφολιπιδίων στο ARDS.....	265
Σχήμα 85. Κατανομή πρωτεϊνών στα κλάσματα των διαφορικών φυγοκεντρήσεων του BAL.....	267

- Σχήμα 86. Έκλουσμα πρωτεϊνών δείγματος BAL ασθενούς με ARDS από στήλη πρωτεΐνης G-σεφαρόζης. Το (α) είναι το έκλουσμα με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που δεν συγκρατήθηκαν από τη στήλη. Το (β) είναι το έκλουσμα με το ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης και αντιστοιχεί στο κλάσμα των IgG πρωτεϊνών που συγκρατήθηκαν από τη στήλη..... 272
- Σχήμα 87. Εξειδίκευση των αντισωμάτων του BAL. Δέσμευση των BAL με διάφορα λιπίδια που προεπωάστηκαν στην πλάκα ELISA (5 μg/κελί)..... 274
- Σχήμα 88. Αποτελέσματα της ELISA. Δέσμευση αντισωμάτων των BAL ασθενών με ARDS και της ομάδας ελέγχου με το φωσφατιδικό οξύ (5 μg/κελί). 274
- Σχήμα 89. ELISA με φωσφατιδικό οξύ. Απόκριση των BAL ασθενών με ARDS και η μέση απόκριση της ομάδας ελέγχου. 275
- Σχήμα 91. ELISA με BAL (A) και με καθαρισμένες IgG από BAL με χρωματογραφία συγγένειας (B) σε διάφορα λιπίδια. 277
- Σχήμα 92. ELISA με BAL (αραιωμένο 1/4) ασθενούς με ARDS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φωσφατιδικού οξέος. 278
- Σχήμα 93. Είδη κυττάρων στο BAL ασθενούς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο ο οποίος ανέπτυξε ARDS. 280
- Σχήμα 94. Επίπεδα ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου..... 281
- Σχήμα 95. Επίπεδα ολικών φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενών με APLAS και της ομάδας ελέγχου. 282
- Σχήμα 96. Ποσοτική κατανομή των ειδών των φωσφολιπιδίων στο BAL ασθενούς με APLAS και της ομάδας ελέγχου..... 283
- Σχήμα 97. Κατανομή πρωτεϊνών του δείγματος BAL του ασθενούς με APLAS που εκλούστηκαν από τη στήλη συγγένειας πρωτεΐνης G. (α = υπόλοιπες πρωτεΐνες, β = IgG πρωτεΐνες). 286
- Σχήμα 98. Δέσμευση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων του BAL με διάφορα λιπίδια. 287
- Σχήμα 99. Δέσμευση των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων του ορού με διάφορα λιπίδια. 288
- Σχήμα 100. Διάγραμμα ροής καθαρισμού, έκλουσης και συλλογής των IgG με χρωματογραφία στήλης συγγένειας σεφαρόζης-πρωτεΐνης G καθώς και την ανάλυση των λιπιδίων που περιέχονται σε αυτό..... 291
- Σχήμα 101. Έλεγχος δέσμευσης δειγμάτων BAL και ορών με χοληστερόλη, με την τεχνική της ELISA (επίστρωση 20 μg χοληστερόλης ανά κελί)..... 294
- Σχήμα 102. Rf χοληστερόλης μετά από ανάλυση HPTLC λιπιδίων των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού προηγουμένως είχαν περάσει διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίων. (Γραμμή 1=10 μg κάθε λιπιδίου, 2=50 μg, 3=200 μg). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης οξικού μεθυλεστέρα: n-προπανόλης: CHCl₃: MeOH: KCl 0.25% σε αναλογία (12.5:12.5:14:5:3.5, v/v). Η εμφάνιση των πλακών έγινε σε ατμούς ιωδίου. Η φωτογραφία της πλάκας λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (image analyser, Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV. Η επεξεργασία της εικόνας έγινε αρχικά με χρήση λογισμικού Photo-paint 7, Corel. Η γραφική απεικόνιση της πυκνότητας των κηλίδων έγινε με λογισμικό Scion Image, NIH. 298
- Σχήμα 103. Rf χοληστερόλης μετά από ανάλυση HPTLC των κλασμάτων που εκλούστηκαν από τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα της γλυκίνης αφού προηγουμένως είχαν περάσει διαλύματα BSA με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίων. (Γραμμή 1=10 μg κάθε λιπιδίου, 2=50 μg, 3=200 μg). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης εξανίου:αιθέρα:οξικού οξέος (70:30:2, v/v). Η εμφάνιση των πλακών έγινε σε ατμούς ιωδίου. Η φωτογραφία της πλάκας λήφθηκε με ασπρόμαυρη κάμερα (image analyser,



Vilber Lourmat) σε φωτισμό UV. Η επεξεργασία της εικόνας έγινε αρχικά με χρήση λογισμικού Photo-paint 7, Corel. Η γραφική απεικόνιση της πυκνότητας των κηλίδων έγινε με λογισμικό Scion Image, NIH..... 299

Σχήμα 104. Θραύσματα μάζας του μορίου της χοληστερόλης..... 301

Σχήμα 105. Γεγονότα που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ARDS..... 334



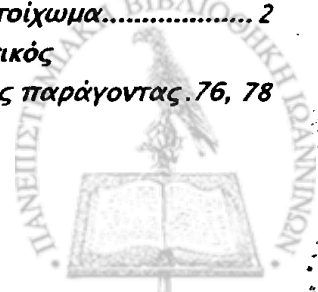
A
A
PA
PA
PA
A
S
SP
SP
SP

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΟΡΩΝ

3	SP-D..... 17, 23
3-(3-ακεταμιδο-1-βενζυλο-2-αιθυλινοδολυλο-5-οξύ) προπανο-θειικό οξύ..... 97	T
4	TNF-α..... 60
4-[2-αμινοαιθυλ]βενζυλο-σουλφονυλο φθορίδιο..... 98	A
A	αζετιδινόνη..... 98
ARDS..... 37	αιμοπετάλια..... 44
C	ακετυλοσαλικυλικό οξύ..... 59
C ₆ -NBD-φωσφατιδυλοχολίνη..... 123	ανάκλαση..... 118
D	Αναστολείς..... 96
DPPC..... 9, 12	αννεξίνες..... 97
E	αντανάκλαση..... 118
ELISA..... 134	αντιθρομβωτικό του λύκου..... 127
Ενεργοποίηση μεσόφασης..... 88	αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα..... 127, 131, 134
K	Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APLAS).. 130
Κυψελιδικό επιθήλιο..... 3	απλή κατάσταση..... 107, 110
L	Απορρόφηση..... 117
LY311727..... 97	αραχιδονικό οξύ..... 48, 50
N	αραχιδονυλο τριφθορομεθυλο κετόνη..... 97
NBD..... 124, 126	αυτακοειδή..... 48
NBD-λιπίδια..... 123	B
P	β ₂ -γλυκοπρωτεΐνη..... 129
PAF..... 48, 49, 54, 56, 57	βασική μεμβράνη..... 2
PAF-AcH..... 90	βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα..... 33
PAF-AcH του πλάσματος..... 92	βρωμοενολολακτόνη..... 97
PAF-like lipids..... 48, 96	Γ
p-βρωμο-φαινακυλο-βρωμίδιο..... 96	γλουταθειόνη..... 63
S	γλυκερόλη..... 23
SP-A..... 13, 21, 22, 23	γλυκοκορτικοειδή..... 30
SP-B..... 14	Δ
SP-C..... 16	διάθλαση..... 118
	διάμεσο πνευμονικό οίδημα..... 43
	διάμεσος χώρος..... 2
	διασυστηματικό πέρασμα..... 110, 117
	Διαφορικές φυγοκεντρήσεις..... 140
	διεπιφάνεια αέρα-υγρού..... 11
	διίδρωση..... 5
	δισσπροπυλο-φθορο-φωσφορικό οξύ... 98
	διπαλμιτυλο-PC..... 9
	δονητική επαναφορά..... 106
	Δυαδικό φωσφολιπιδικό μοντέλο..... 89



Ε		
εικοσανοειδή	48	
Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A ₂	83	
ενδοθήλιο του τριχοειδούς	2	
Ενδοκυττάρια φωσφολιπάσες A ₂	87	
ενδοτοξίνες.....	22, 47	
επιφανειοδραστικός παράγοντας.....	7	
επιφανειακή τάση	4, 19	
επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες	10	
Επιφανειοδραστικό υλικό.....	5	
Επιφανειοδραστικός παράγοντας.....	5, 66, 323	
Εσωτερική μετατροπή	117	
Η		
Ηωσινόφιλα.....	47	
Θ		
θερμική επαναφορά	110	
θρομβοξάνια.....	58	
θρομβοξάνιο A ₂	48	
Ι		
ινοβλάστες	44	
ιντερλευκίνη-1.....	60	
ιντερλευκίνη-8.....	60	
Κ		
καταστάσεις <i>spin</i>	108	
Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A ₂	84	
Κυτταροκίνες.....	60	
κυψελίδες	2	
Κυψελιδικά τριχοειδή αγγεία.....	3	
κυψελιδικό επιθήλιο.....	43	
Κυψελιδικό τριχοειδές	32	
Λ		
λεμφοκύτταρα	44	
λευκοτριένια.....	48, 59	
Λιπιδικοί μεσολαβητές	48, 58	
λιποκορτίνες	97	
λιποπολυσακχαρίτες.....	22, 47	
Μ		
μακροφάγα.....	44, 46	
μανοαλίδιο	96	
μεθυλο αραχιδονυλο φθοροφωσφονικό...97		
μεσοδιάστημα.....	2	
μεσόφαση	89	
Μηχανισμός απελευθέρωσης προϊόντος 90		
μικύλλιο	88	
Μοντέλο αναγνώρισης μεσόφασης.....	89	
Μοντέλο υποστρώματος.....	90	
Ο		
ογκονεκρωτικός παράγοντας α.....	60	
οξεία αναπνευστική βλάβη.....	41	
οξεία πνευμονική βλάβη.....	37	
ουδετερόφιλα.....	44, 45	
Π		
Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	48	
παράγοντας πνευμονοκυτταρικού ινοβλάστη.....	30	
πνευμονοκύτταρα τύπου I.....	3, 32, 43,	
πνευμονοκύτταρα τύπου II.....	3, 32, 43	
Πνεύμονες.....	1	
πνευμονικό οίδημα.....	37, 42	
πολυστοιβαδωτά σωματίδια.....	10, 11, 34	
προσταγλανδίνες.....	48, 58	
προστακυκλίνη	48	
Πρωτεΐνη C	135	
πρωτεϊνοκινάση C	53	
Σ		
Σβέση φθορισμού.....	116, 117, 306, 311	
σκέδαση Raman.....	120	
σκέδαση Rayleigh	120	
Σκέδαση φωτός.....	119	
σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων.....	37	
σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών.....	37	
Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας	37	
Συνθετικός επιφανειοδραστικός παράγοντας	76, 79	
σωληνώδης μυελίνη.....	10, 11, 33	
Τ		
τριπλή κατάσταση.....	107, 110	
Τριχοειδοκυψελιδικό τοίχωμα.....	2	
Τροποποιημένος φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας.....	76, 78	



Φ
φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου..... 114
φαινυλο-μεθυλο σουλφονυλο-φθορίδιο. 98
φάσμα διέγερσης φθορισμού..... 113
φάσμα εκπομπής φθορισμού 109, 113
φασματοφθορισμόμετρα 112, 115
φθορισμόμετρα..... 112
φθορισμός 107, 111, 117
φυσικός επιφανειοδραστικός παράγοντας
..... 76, 77
φωσφατιδυλινοσιτόλη..... 9

φωσφατιδυλογλυκερόλη..... 9
φωσφατιδυλοχολίνη 9
φωσφολιπάση C 52
φωσφολιπάση A₂ 50, 73, 81, 322
φωσφολιπίδια..... 66
φωσφορισμός 107, 110
φωταύγεια 106
φωτοαποσύνθεση 117

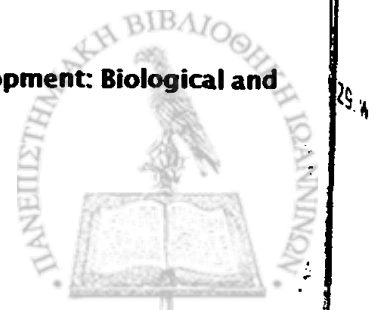
X

χημειοταξία 44, 58



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Morgenroth K. **Surfattante polmonaire.** 1989, Walter de Gruyter, Berlin.
2. **Functional Histology. A text and colour atlas.** Churchill Livingstone (Edinburg London and New York) 1979.
3. Weibel ER. **Respir Physiol** 1970; 11:54.
4. West JB. **Respiratory Physiology. The essentials.** 2nd Edition. The Williams & Wilkins Company 1979; 1-11.
5. Von Neergaard K. **Neue Auffassungen uber einen Grumbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in der Alveolen.** *Zges exp Med* 1929; 66:373.
6. Batenburg JJ. **Surfactant Therapy for Lung Disease.** B. Robertson, H.W. Taeusch, (eds.), Marcel Dekker Inc., NY 1995.
7. Van Golde LMG., Batenburg JJ, Robertson B. **The pulmonary surfactant system: Biochemical aspects and functional significance.** *Physiol Rev* 1988; 68:374-455.
8. Hamm H, Kroegel C, Hohlfeld J. **Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders.** *Respir Med* 1996; 90:251-270.
9. Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP. **The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects.** *Lung* 1997; 175:1-39.
10. Clements JA. **Function of the alveolar lining.** *Am Rev Respir Dis* 1977; 115 [Suppl]:67-71.
11. Goerke J, Clements JA. **Alveolar surface tension and lung surfactant.** *In: Handbook of Physiology. The Respiratory System. Mechanics of Breathing.* Bethesda: Am Physiol Soc, 1986; Sect. 3, Vol. III, Part 1:247-261.
12. Pattle RE. **Surface lining of lung alveoli.** *Physiol Rev* 1965; 45:48-79.
13. King RJ, Clements JA. **Surface active materials from dog lung II. Composition and physiological correlations.** *Am J Physiol* 1972; 223:715-726.
14. Sanders RL. **The composition of pulmonary surfactant.** *In: Lung Development: Biological and Clinical Perspectives.* Farrell PM, ed.
15. King RJ. **Pulmonary surfactant.** *J Appl Physiol* 1982; 53:1-8.



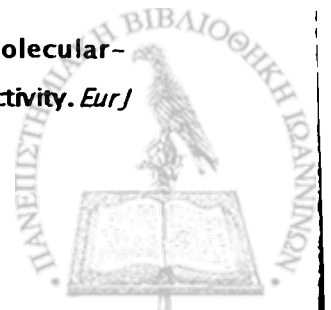
16. Rooney SA. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1985; *131*:439-460.
17. Kulovich MV, Hallman M, Gluck L. The lung profile. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979; *135*:57-63.
18. Kulovich MV, Gluck L. The lung profile. II. Complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979; *135*:64-70.
19. Batenburg JJ, Hallman M. Developmental biochemistry of alveoli. In: *Pulmonary Physiology: Fetus, Newborn, Child and Adolescent*. Scarpelli EM, ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990:106-139.
20. Hallman M, Gluck L. Formation of acidic phospholipids in rabbit lung during perinatal development. *Pediatr Res* 1980; *14*:1250-1259.
21. Hallman M, Kulovich M, Kirkpatrick E, Sugarman RG, Gluck L. Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: indices of lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1976; *125*:613-617.
22. Batenburg JJ. Surfactant phospholipids: Synthesis and storage. *Am J Physiol* 1992; *262*:L367-L385.
23. Cockshutt AM, Possmayer F. Metabolism of surfactant lipids and proteins in the developing lung. In: *Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice*. Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam: Elsevier, 1992:339-377.
24. Batenburg JJ. In *Surfactant Therapy for Lung Disease*. Robertson B, Taeusch HW, (eds.), Marcel Dekker Inc. 1995, NY.
25. Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J*, 1994; *7*:372-391.
26. Hawgood S. Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol* 1989; *257*:L13-L22.
27. Possmayer F. The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev. Respir Dis* 1990; *142*:749-752.
28. Weaver TA, Whitsett JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* 1991; *273*:249-264.
29. Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987; *135*:426-444.



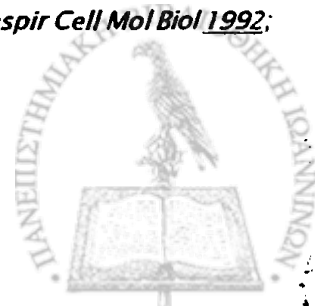
30. Keough KMW. **Physical chemistry of pulmonary surfactant in the terminal air spaces.** In: **Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice.** Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam: Elsevier, 1992:109-164.
31. Beppu OS, Clements JA, Goerke J. **Phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant has normal properties.** *J Appl Physiol* 1983; 55:496-502.
32. Hallman M, Enhorning G, Possmayer F. **Composition and surface activity of normal and phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant.** *Pediatr Res* 1985; 19:286-292.
33. Lekka ME, Tokumura A, Tsuji H, Hanahan DJ. **Isolation of a phospholipid inhibitor of platelet activating factor-induced activity from perfused rat liver: Identification as phosphatidylglycerol.** *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 380-384.
34. Van Iwaarden, Van Golde. **Pulmonary surfactant and lung defense.** In *Surfactant Therapy for Lung Disease.* Robertson B, Taeusch HW, (eds.), Marcel Dekker Inc. 1995, NY.
35. Voss T, Eistetter H, Schafer K, Engel J. **Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36: Structural homology with the complement factor Clq.** *J Mol Biol* 1988; 201:219-227.
36. Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, Hawgood S, Clements JA. **Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A.** *Am J Physiol* 1989; 257:L421-L429.
37. Broers JL, Jensen SM, Travis WD, Pass H, Whitsett JA, Singh G, Katyal SL, Gazdar AF, Minna JD, Linnoila RI. **Expression of surfactant associated protein-A and Clara cell 10 kilodalton mRNA in neoplastic and non-neoplastic human lung tissue as detected by in situ hybridization.** *Lab Invest* 1992; 337:337-346.
38. Hawgood S. **The hydrophilic surfactant protein SP-A: Molecular biology, structure and function.** In: **Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice.** Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam: Elsevier, 1992:33-54.
39. Kuroki Y, Akino T. **Pulmonary surfactant protein A [SP-A] specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine.** *J Biol Chem* 1991; 266:3068-3073.
40. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. **Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant.** *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:75-81.



41. Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ. **Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice.** *J Histochem Cytochem* 1991; **39**:1331-1336.
42. Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. **Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:1010-1014.
43. Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA. **Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells.** *J Appl Physiol* 1987; **63**:692-698.
44. Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. **Surfactant apoprotein Mr = 26000-36000 enhances uptake of liposomes by type II cells.** *J Biol Chem* 1987; **262**:2888-2894.
45. 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.
46. Haagsman HP, Casals C, De Haas CGM, et al. **Endocytosis of surfactant protein A (SP-A) and lipids by type II cells studied by laser flow cytometry.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**:A145.
47. Whitsett JA, Baatz JE. **Hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C: Molecular biology, structure and function.** *In: Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice.* Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam: Elsevier, 1992:55-75.
48. Johansson J, Curstedt T, Jornvall H. **Surfactant protein-B-disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities.** *Biochemistry* 1991; **30**:6917-6921.
49. Phelps DS, Floros J. **Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization.** *Am Rev Respir Dis* 1988; **137**:939-942.
50. Robertson B, Kobayashi T, Ganzuka M, Grossman G, Li WZ, Suzuki Y. **Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B.** *Pediatr Res* 1991; **30**:239-243.
51. Grossman G, Suzuki Y, Robertson B, Kobayashi T, Berggren P, Li WZ, Song GW, Sun B. **Pathophysiology of neonatal lung injury induced by a monoclonal antibody to surfactant protein B.** *J Appl Physiol* 1997; **82**:2003-2010.
52. Curstedt T, Jornvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P. **Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant-Characterization and biophysical activity.** *Eur J Biochem* 1987; **168**:255-262.



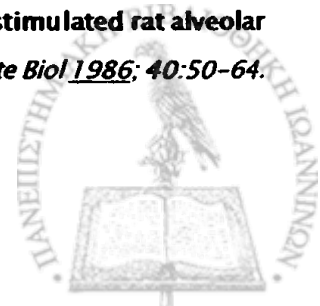
53. Hawgood S, Benson BJ, Schilling J, Damm D, Clements JA, White RT. **Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP18 and evidence for cooperation between SP18 and SP28-36 in surfactant lipid adsorption.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:66-70.
54. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, Van Golde LMG, Demel RA. **Interaction of lipid vesicles with monomolecular layers containing lung surfactant proteins SP-B or SP-C.** *Biochemistry* 1991; **30**:8276-8281.
55. Revak SD, Merritt TA, Degryse E, Stefani L, Courtney M., Hallman M, Cochrane CG. **Use of human low molecular weight apoprotein in the reconstitution of surfactant biologic activity.** *J Clin Invest* 1988; **81**:826-833.
56. Yu SH, Possmayer F. **Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures.** *Biochim Biophys Acta* 1990; **1046**:233-241.
57. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Van Eijk M, Van Golde LMG, Haagsman HP. **Lipid mixing is mediated by the hydrophobic surfactant protein SP-B but not by SP-C.** *Biochim Biophys Acta* 1992; **1110**:45-50.
58. Johansson J, Curstedt T. **Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components.** *Eur J Biochem* 1997; **244**:675-693.
59. Baatz JE, Elledge B, Whitsett JA. **Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers.** *Biochemistry* 1990; **29**:6714-6720.
60. Schurch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt AM. **Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant.** *Am J Physiol* 1992; **263**:L210-L218.
61. Beers MF, Fisher AB. **Surfactant protein-C-A review of its unique properties and metabolism.** *Am J Physiol* 1992; **263**:L151-L160.
62. Glasser SW, Korthagen TR, Wert SE, Bruno MD, McWilliams KM, Vorbroker DK, Whitsett JA. **Genetic element from human surfactant protein SP-C gene confers bronchiolar-alveolar cell specificity in transgenic mice.** *Am J Physiol* 1991; **261**:L349-L356.
63. Wohlford-Lenane CL, Durham PL, Snyder JM. **Localization of surfactant-associated protein C (SP-C) mRNA in fetal rabbit lung tissue by in situ hybridization.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; **6**:225-234.



64. Kalina M, Mason RJ, Shannon JM. Surfactant protein-C is expressed in alveolar type-II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; **6**:594-600.
65. Persson A, Rust K, Chang D, et al. CP4: A pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins. *Biochemistry* 1988; **27**:8576-8584.
66. Lu JH, Wiedemann H, Holmskov U, Thiel S, Timpl R, Reid KB. Structural similarity between lung surfactant protein-D and conglutinin-2 distinct, C-type lectins containing collagen-like sequences. *Eur J Biochem* 1993; **215**:793-799.
67. Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y, Ogasawara Y, van Golde LM, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of surfactant protein-D (SP-D) in type-II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**:1589-1597.
68. Crouch E, Rust K, Persson A, Mariencheck W, Moxley M, Longmore W. Primary translation products of pulmonary surfactant protein-D. *Am J Physiol* 1991; **260**:L247-L253.
69. Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974; **54**:678-811.
70. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 1955; **175**:1125-1126.
71. Lloyd TC Jr., Wright GW. Pulmonary vascular transmural gradient. *J Appl Physiol* 1960; **15**:241-245.
72. Hida W, Hildebrandt J. Alveolar surface tension, lung inflation and hydration affect interstitial pressure [Px(f)]. *J Appl Physiol* 1984; **57**:262-270.
73. Stahlman M, LeQuire VS, Young WC, et al. Pathophysiology of respiratory distress in newborn lambs. *Am J Dis Child* 1964; **108**:375-393.
74. DeSa DJ. Pulmonary fluid content in infants with respiratory distress. *J Pathol* 1969; **97**:469-479.
75. Bland RD, Carlton DP, Scheerer RG, Cummings JJ, Chapman DL. Lung fluid balance in lambs before and after premature birth. *J Clin Invest* 1989; **84**:568-576.
76. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; **2**:319-323.
77. Bredenberg C, Paskanik A, Nieman G. High surface tension pulmonary edema. *J Surg Res* 1983; **34**:515-523.



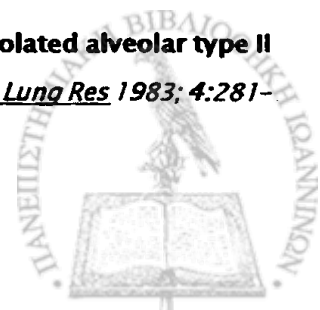
78. Nieman GF, Bredenberg CE. **High surface tension pulmonary edema induced by detergent aerosol.** *J Appl Physiol* 1985; **58**:129-136.
79. Bredenberg CE, Nieman GF, Paskanik AM, Hart AKE. **Microvascular membrane permeability in high surface tension pulmonary edema.** *J Appl Physiol* 1986; **60**:253-259.
80. Nieman G, Hakim T, Bredenberg C. **Effect of increased alveolar surface tension on segmental pulmonary vascular resistanse.** *J Appl Physiol* 1988; **64**:154-161.
81. Beck KC, Lai-Fook SJ. **Alveolar liquid pressure in excised edematous dog lung with increased static recoil.** *J Appl Physiol* 1983; **55**:1277-1283.
82. Fike CD, Lai-Fook SJ, Bland RD. **Alveolar liquid pressures in newborn and adult rabbit lungs.** *J Appl Physiol* 1988; **64**:1629-1635.
83. Rai JU. **Alveolar liquid pressure measured by micropuncture in isolated lungs of mature and immature fetal rabbits.** *J Clin Invest* 1987; **79**:1579-1588.
84. Jefferies AL, Coates G, O'Brodovich H. **Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease.** *N Eng J Med* 1984; **311**:1075-80.
85. Nieman G, Ritter-Hrncirik C, Grossman Z, Witanowski L, Clark W Jr, Bredenberg C. **High alveolar surface tension increases clearance of technetium99m diethylenetriamine-pentaacetic acid.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; **100**:129-133.
86. Green GM, Kass EH. **The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung.** *J Exp Med* 1964; **119**:167-175.
87. Hocking WG, Golde DW. **The pulmonary alveolar macrophage.** *N Eng J Med* 1979; **301**:580-587.
88. Sibille Y, Reynolds HY. **Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **141**:471-501.
89. Juers JA, Rogers RM, McCurdy JB, Cook WW. **Enhancement of bacterial capacity of alveolar macrophages by human alveolar lining material.** *J Clin Invest* 1976; **58**:271-275.
90. O'Neill S, Lesperance E, Klass DJ. **Rat lung lavage surfactant enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages.** *Am Rev Respir Dis* 1984; **130**:225-230.
91. Webb DSA, Jeska EL. **Enhanced luminol-dependent chemiluminescence of stimulated rat alveolar macrophages by pretreatment with alveolar lining material.** *J Leukocyte Biol* 1986; **40**:50-64.



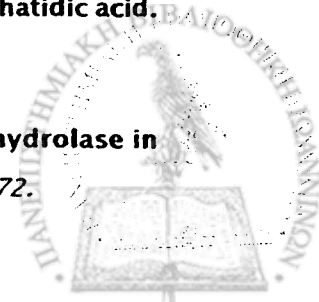
92. Coonrod DJ, Jarells MC, Yoneda K. **Effect of rat surfactant lipids on complement and Fc receptors of macrophages.** *Infect Immun* 1986; **54**:371-378.
93. Van Iwaarden JF. **Surfactant and the pulmonary defense system.** *In: Pulmonary surfactant. From Molecular Biology to Clinical Practice.* Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, eds. Amsterdam: Elsevier, 1992:215-227.
94. Drickamer K, Dordal MS, Reynolds L. **Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein.** *J Biol Chem* 1986; **261**:6878-6887.
95. Fisher AB, Dodia C, Chander A, Beers MF, Bates SR. **Inhibition of Trimeresurus flavoviridis phospholipase A₂ by lung surfactant protein A (SP-A).** *Biochim Biophys Acta* 1994; **1211**:256-262.
96. Brigham KL, Meyrick B. **Endotoxin and lung injury.** *Am Rev Respir Dis* 1986; **133**:913-927.
97. Burrell R. **Immunomodulation by bacterial endotoxin.** *Crit Rev Microbiol* 1990; **17**:189-208.
98. 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.
99. Weaver TA, Whitsett JA. **Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins.** *Biochem J* 1991; **273**:249-264.
100. Van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, van Golde, van Strijp JA. **Binding of surfactant protein A to the lipid moiety of bacterial lipopolysaccharides.** *Biochem J* 1994; **303**:407-411.
101. Haagsman HP, Elfering RH, van Buel BLM, Voorhout WF. **The lung lectin surfactant protein A aggregates phospholipid vesicles via a novel mechanism.** *Biochem J* 1991; **275**:273-276.
102. Van Iwaarden JF, van Strijp JAG, Visser H, Haagsman HP, Verhoef J, van Golde LM. **Binding of surfactant protein A to Herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A.** *J Biol Chem* 1992; **267**:25039-25043.
103. Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JAG, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Golde LM, van Iwaarden JF. **Interactions of surfactant protein A with influenza viruses: Binding and neutralization.** *J Infect Dis* 1995; **171**(2):335-341.



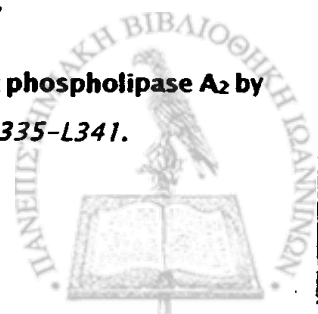
104. Phelps DS, Rose RM. **Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related pneumonia.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**:1072-1075.
105. Wright JR, Youmans DC. **Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage.** *Am J Physiol* 1993; **264**:L338-L344.
106. Van Iwaarden JF, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM. **Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; **2**:91-98.
107. Van Iwaarden JF, Shimizu H, van Golde PH, Voelker DR, van Golde LM. **Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages.** *Biochem J* 1992; **286**:5-8.
108. Katsura H, Kawada H, Konno K. **Rat surfactant apoprotein A (SP-A) exhibits antioxidant effects on alveolar macrophages.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **9**:520-525.
109. Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, Wright JR. **Human pulmonary surfactant protein A [SP-A], a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1- mediated phagocytosis.** *J Biol Chem* 1989; **264**:13923-13928.
110. Batenburg JJ, Longmore WJ, Van Golde LMG. **The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture.** *Biochim Biophys Acta* 1978; **529**:160-170.
111. Mims LC, Zee P. **Utilization of glycerol by the newborn mammalian lung.** *Biol. Neonate* 1971; **18**:356-362.
112. Farrell PM, Bourbon JR. **Fetal lung surfactant lipid synthesis from glycogen during organ culture.** *Biochim Biophys Acta* 1986; **878**:159-167.
113. Maniscalco WM, Stremmel W, Heeney-Campbell M. **Uptake of palmitic acid by rabbit alveolar type II cells.** *Am J Physiol* 1990; **259**:L206-L212.
114. Chander A, Reichert J, Fisher AB. **Degradation of dipalmitoyl phosphatidylcholine by isolated rat granular pneumocytes and reutilization for surfactant synthesis.** *J Clin Invest* 1987; **79**:1133-1138.
115. Geppert EF, Elstein KH. **Short-term regulation of fatty acid synthesis in isolated alveolar type II cells from adult rat lung: effects of free fatty acids and hormones.** *Exp Lung Res* 1983; **4**:281-291.



116. Maniscalco WM, Finkelstein JN, Parkhurst AB. De novo fatty acid synthesis by freshly isolated alveolar type II epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1983; *751*:462-469.
117. Yeh YY. Substrate utilization for phosphatidylcholine synthesis by type II pneumocytes of neonatal rats. *Pediatr Res* 1991; *30*:55-61.
118. Rooney SA. Fatty acid biosynthesis in developing fetal lung. *Am J Physiol* 1989; *257*:L195-L201.
119. Patterson CE, Davis KS, Rhoades RA. Regulation of fetal lung disaturated phosphatidylcholine synthesis by de novo palmitate supply. *Biochim Biophys Acta* 1988; *958*:60-69.
120. Jobe A, Bcegami 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.
121. Batenburg JJ, Whitsett JA. Levels of mRNAs coding for lipogenic enzymes in rat lung upon fasting and refeeding and during perinatal development. *Biochim Biophys Acta* 1989; *1006*:329-334.
122. Zeisel SH. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Ann Rev Nutr* 1981; *1*:95-121.
123. Fisher AB, Chander A, Dodia C, Reichester J, Kleinzeller A. Choline transport by lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; *1*:455-462.
124. Hallman M, Bry K, Hoppu K, Lappi M, Pohjavuori M. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1992; *326*:1233-1239.
125. Bleasdale JE, Maberry MC., Quirk JG. Myo-inositol homeostasis in foetal rabbit lung. *Biochem J* 1982; *206*:43-52.
126. Hallman M, Slivka S, Wozniak P, Sills J. Perinatal development of myoinositol uptake into lung cells: Surfactant phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in the rabbit. *Pediatr Res* 1986; *20*:179-185.
127. Mason RJ, Nellenbogen J. Synthesis of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by freshly isolated rat alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; *794*:392-402.
128. Den Breejen JN, Batenburg JJ, Van Golde LMG. 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.
129. Walton PA, Possmayer F. The role of Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphohydrolase in pulmonary glycerolipid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1984; *796*:364-372.



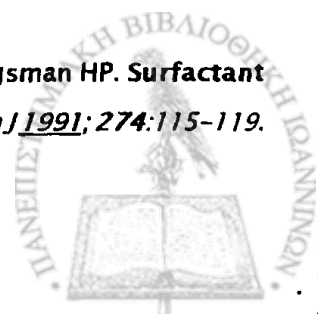
130. Haagsman HP, Schuurmans EAJM, Batenburg JJ, Van Golde LMG. **Synthesis of phosphatidylcholine in ozone-exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung. Is glycerolphosphate acyltransferase a rate-limiting enzyme?** *Exp Lung Res* 1988; **14**:1-17.
131. Feldman DA, Rounsifer ME, Chatles L, Weinhold PA. **CTP: Phosphocholine cytidyltransferase in rat lung: Relationship between cytosolic and membrane forms.** *Biochim Biophys Acta* 1990; **1045**:49-57.
132. Weinhold PA, Rounsifer ME, Williams SE, Brubaker PG, Feldman DA. **CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase in rat lung. The effect of free fatty acids on the translocation of activity between microsomes and cytosol.** *J Biol Chem* 1984; **259**:10315-10321.
133. Weinhold PA, Rounsifer ME, Charles L, Feldman DA. **Characterization of cytosolic forms of CTP:choline-phosphate cytidyltransferase in lung, isolated alveolar type II cells, A549 cell and Hep G2 cells.** *Biochim Biophys Acta* 1989; **1006**:299-310.
134. Batenburg JJ, Longmore WJ, Klazinga W, Van Golde LMG. **Lysolecithin acyltransferase and lysolecithin: lysolecithin acyltransferase in adult rat lung alveolar type II epithelial cells.** *Biochim Biophys Acta* 1979; **573**:136-144.
135. Post M, Schuurmans EAJM, Batenburg JJ, Van Golde LMG. **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.
136. Fisher AB, Dodia C, Chander A, Jain MA. **A competitive inhibitor of phospholipase A₂ decreases surfactant phosphatidylcholine degradation by the rat lung.** *Biochem J* 1992; **288**:407-411.
137. Chander A, Fisher AB, Strauss JF. **Role of an acidic compartment in synthesis of disaturated phosphatidylcholine by rat granular pneumocytes.** *Biochem J* 1982; **208**:651-658.
138. Nijseen JG, Roosenboom CFP, van den Bosh H. **Identification of a calcium-independent phospholipase A₂ in rat lung cytosol and differentiation from acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether).** *Biochim Biophys Acta* 1986; **876**:611-618.
139. Fisher AB, Dodia C. **Role of acidic Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in synthesis of lung dipalmitoyl phosphatidylcholine.** *Am J Physiol* 1997; **272**:L238-L243.
140. Fisher AB, Dodia C, Chander A. **Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A₂ by surfactant protein A.** *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)* 1994; **267**:L335-L341.



141. Fisher AB, Dodia C. Role of phospholipase A₂ enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes. *J Lipid Res* 1996; **37**:1057-1064.
142. Batenburg JJ, Klazinga W, Van Golde LMG. Regulation and location of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in type II cells isolated from fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1985; **833**:17-24.
143. Bleasdale JE, Tyler NE, Snyder JM. Subcellular sites of synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in type II pneumocytes. *Lung* 1985; **163**:345-359.
144. Hass MA, Longmore WJ. Regulation of lung surfactant cholesterol metabolism by serum lipoproteins. *Lipids* 1980; **15**:401-406.
145. Post M, Batenburg JJ, Schuurmans EAJM, Van Golde LMG. The rate-limiting step in the biosynthesis of phosphatidylcholine by alveolar type II cells from adult rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1982; **712**:390-394.
146. Post M, Batenburg JJ, Van Golde LMG, Smith BT. The rate-limiting reaction in phosphatidylcholine synthesis by alveolar type II cells isolated from fetal lung. *Biochim Biophys Acta* 1984; **795**:558-563.
147. Post M, Batenburg JJ, Smith BT, Van Golde LMG. Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; **795**:552-557.
148. Post M, Van Golde LMG. Metabolic and developmental aspects of the pulmonary surfactant system. *Biochim Biophys Acta* 1988; **947**:249-286.
149. Vance DE, Pelech SL. Enzyme translocation in the regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 1984; **9**:17-20.
150. Burkhardt R, Von Wichert P, Batenburg JJ, Van Golde LMG. Fatty acids stimulate phosphatidylcholine synthesis and CTP:choline-phosphate cytidyltransferase in type II pneumocytes isolated from adult rat lung. *Biochem J* 1988; **254**:495-500.
151. Zimmermann LJ, Hogan M, Carlson KS, Smith BT, Post M. Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Am J Physiol* 1993; **264**:L575-L580.
152. Post M. Maternal administration of dexamethasone stimulates choline-phosphate cytidyltransferase in fetal type II cells. *Biochem J* 1987; **241**:291-296.



153. Gonzales LW, Ertsey R, Ballard PL, Froch D, Goerke J, Gonzales J. **Glucocorticoid stimulation of fatty acid synthesis in explants of human fetal lung.** *Biochim Biophys Acta* 1990; **1042**:1-12.
154. Fraslon C, Batenburg JJ. **Pre-translational regulation of lipid synthesizing enzymes and surfactant proteins in fetal rat lung in explant culture.** *FEBS Lett* 1993; **325**:285-290.
155. Batenburg JJ, Den Breejen JN, Geelen, MJH, et al. **Phosphatidylcholine synthesis in type II cells and regulation of the fatty acid supply.** *Prog Respir Res* 1990; **25**:96-103.
156. Rooney SA, Smart DA, Weinhold PA, Feldman DA. **Dexamethasone increases the activity but not the amount of choline-phosphate cytidyltransferase in fetal rat lung.** *Biochim Biophys Acta* 1990; **1044**:385-389.
157. Xu Z-X, Smart DA, Rooney SA. **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.
158. Bleasdale JE, Tyler NE, Busch FN, Quirk JG. **The influence of myo-inositol on phosphatidylglycerol synthesis by rat type II pneumonocytes.** *Biochem J* 1983; **212**:811-818.
159. Bleasdale JE, Thakur NR, Rader GR, Tesan M. **Cytidine monophosphate-dependent synthesis of phosphatidylglycerol in permeabilized type II pneumonocytes.** *Biochem J* 1985; **232**:539-545.
160. Chander A, Fisher AB. **Regulation of lung surfactant secretion.** *Am J Physiol* 1990; **258**:L241-L253.
161. Wright JR, Dobbs LG. **Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance.** *Annu Rev Physiol* 1991; **53**:395-414.
162. Suwabe A, Mason RJ, Smith D, Firestone JA, Browning MD, Velker DR. **Pulmonary surfactant secretion is regulated by the physical state of extracellular phosphatidylcholine.** *J Biol Chem* 1992; **267**:19884-19890.
163. Ikegami M, Lewis JF, Tabor B, Rider ED, Jobe AH. **Surfactant protein-A metabolism in preterm ventilated lambs.** *Am J Physiol* 1992; **262**:L765-L772.
164. Rooney SA, Gobran LI, Umstead TM, Phelps DS. **Secretion of surfactant protein A from rat type II pneumocytes.** *Am J Physiol* 1993; **265**:L586-L590.
165. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Van Eijk M, Van Buel BL, Van Golde LM, Haagsman HP. **Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung.** *Biochem J* 1991; **274**:115-119.



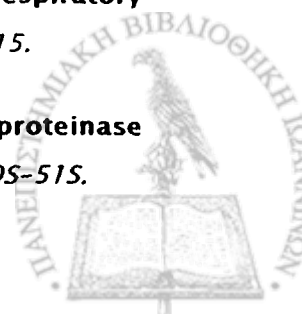
166. Liu L. Regulation of lung surfactant secretion by phospholipase A₂. *J Cel Biochemistry* 1999; 72:103-110.
167. Wright JR. Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *Am J Physiol* 1990; 259:L1-L12.
168. Veldhuizen RAW, Inchley K, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Degradation of surfactant-associated protein-B (SP-B) during *in vitro* conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 1993; 295:141-147.
169. Rider ED, Ikegami M, Jobe AH. Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *Am J Physiol* 1992; 263:L201-L209.
170. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:5566-5570.
171. Ryan RM, Morris RE, Rice W, Ciraolo G, Whitsett JA. Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:429-440.
172. Young SL, Wright JR, Clements JA. Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. *J Appl Physiol* 1989; 66:1336-1342.
173. Breslin JS, Weaver TE. Binding, uptake, and localization of surfactant protein-B in isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1992; 262:L699-L707.
174. Bates SR, Fisher AB. Degradation of surfactant protein-B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993; 265:L448-L455.
175. Bates SR, Beers MF, Fisher AB. Binding and uptake of surfactant protein-B by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1992; 263:L333-L341.
176. Pinto RA, Wright JR, Lesikar D, Benson BJ, Clements JA. Uptake of pulmonary surfactant protein-C into adult rat lung lamellar bodies. *J Appl Physiol* 1993; 74:1005-1011.
177. Funkhouser JD, Read RJ. Phospholipid transfer proteins from lung, properties and possible physiological functions. *Chem Phys Lipids* 1985; 38:17-27.
178. Lumb RH. Phospholipid transfer proteins in mammalian lung. *Am J Physiol* 1989; 257:L190-L194.
179. Tsao FHC. Purification and characterization of two rabbit lung Ca²⁺-dependent phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045:29-39.



180. Chevalier G, Collet AJ. *In vivo* incorporation of choline-³H, leucine-³H and galactose-³H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec* 1972; **174**:289-310.
181. Jobe A, Ikegami M, Sarton-Miller I, Jones S, Yu G. Characterization of phospholipids and localization of some phospholipid synthetic and subcellular marker enzymes in subcellular fractions from rabbit lung. *Biochim Biophys Acta* 1981; **666**:47-57.
182. Magoon MW, Wright JR, Baritussio A, Williams MC, Goerke J, Benson BJ, Hamilton RL, Clements JA. Subfractionation of lung surfactant-Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 1983; **750**:18-31.
183. Voorhout TE, Weaver TE, Haagsman P, Geuze HJ, Van Golde LM. Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. *Microsc Res Techn* 1993; **26**:366-373.
184. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European consensus conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcome, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **149**:818-824.
185. Ναθαναήλ Χ. Τσαγκάρης Η. Συστήματα αξιολόγησης βαρύτητας της νόσου. Στη Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας. ARDS. Εκδ. Νάκος Γ., Ιωάννινα 1998; **3**:102.
186. Nakos G, Pneumatikos J, Tsangaris H, Tellis K, Lekka ME. Protein and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pulmonary edema. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; **155**:945-951.
187. Λαχανά Α. Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας: ταξινόμηση και παθογένεση. Στη Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας. ARDS. Εκδ. Νάκος Γ., Ιωάννινα 1998; **3**:11-19.
188. Hill JD, Ratliff JL, Parrott JCW, Lamy M, Fallat RJ, Koeniger E, Yaeger EM, Whitmer G. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976; **71**:64-71.
189. Taylor AE, Garr KA. Estimation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membranes. *Am J Physiol* 1970; **218**:1133-1140.
190. Schneeberger EE, Karnovsky MJ. Substructure of intercellular junctions in freeze-fractured alveolar-capillary membranes of mouse. *lung.Circ Res* 1976; **38**:404-414.



191. Anderson RR, Holliday RL, Driedger AA, Lefcoe M, Reid B, Sibbald WJ. **Documentation of capillary permeability in the adult respiratory distress syndrome accompanying human sepsis.** *Am Rev Respir Dis* 1979; **119**:869-877.
192. Fein A, Wiener-Kronish JP, Niederman M, Matthay MA. **Pathophysiology of the adult respiratory distress syndrome. What have we learned from human studies?** *Crit Care Clin* 1986; **2**:429-453.
193. Holter JF, Weiland JE, Pacht ER, Gadek JE, Davis WB. **Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium.** *J Clin Invest* 1986; **78**:1513-1522.
194. Calandrino FS Jr, Anderson DJ, Mintun MA, Schuster DP. **Pulmonary vascular permeability during the adult respiratory distress syndrome: A positron emission tomographic study.** *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**:421-428.
195. Cirino G. **Multiple controls in inflammation.** *Biochem Pharmacol* 1998; **55**:105-111.
196. Martin WJ, Gadek JE, Hunninghake GW, Crystal RG. **Oxidant injury of lung parenchymal cells.** *J Clin Invest* 1981; **68**:1277-1288.
197. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. **Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenic significance.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**:1187-1205.
198. Pilewski JM, Albelda SM. **Adhesion molecules in the lung. An overview.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**:S31-S37.
199. Tomaszewski JJ. **Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome.** *Clin Chest Med* 1990; **11**:593-619.
200. Pison U, Brand M, Joka T, Obertacke U, Bruch J. **Distribution and function of alveolar cells in multiply injured patients with trauma-induced ARDS.** *Intensive Care Med* 1988; **14**:602-609.
201. Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE. **Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance.** *Am Rev Respir Dis* 1986; **133**:218-225.
202. Bachofen M, Weibel ER. **Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia.** *Am Rev Respir Dis* 1977; **116**:589-615.
203. Fowler AA, Walchak S, Giclas PC, Henson PH, Hyers TM. **Characterization of antiproteinase activity in the adult respiratory distress syndrome.** *Chest (Suppl)* 1982; **81**:50S-51S.



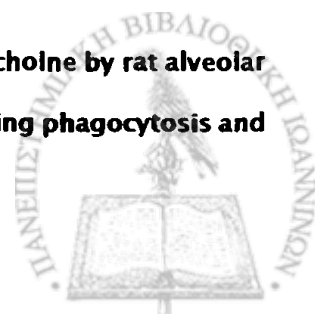
204. Ward PA, Till GO, Kunkel R, Beauchamp C. Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J Clin Invest* 1983; 72:789-801.
205. Johnson KJ, Fantone JC III, Kaplan J, Ward PA. *In vivo* damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1981; 67:983-993.
206. Zimmerman GA, Renzetti AD, Hill HR. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:290-300.
207. Hallgren R, Borg T, Venge P, Modig J. Signs of neutrophil and eosinophil activation in adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1984; 12:14-18.
208. Rinaldo JE, Borovetz H. Deterioration of oxygenation and abnormal lung microvascular permeability during resolution of leukopenia in patients with diffuse lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:579-583.
209. Simon RH, Ward PA. Adult respiratory distress syndrome. Inflammation: Basic principles and clinical correlates. *Second Edition. Edited by Gallin JI, Goldstein, Snyderman R. Raven Press, Ltd., New York* 1992; 999-1016.
210. Braude S, Apperley J, Krausz T, Goldman JM, Royston D. Adult respiratory distress syndrome after allogenic bone-marrow transplantation: evidence for a neutrophil-independent mechanism. *Lancet* 1985; 1:1239-1242.
211. Laufe MD, Simon RH, Flint A, Keller JB. Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am J Med* 1986; 80:1022-1026.
212. Maunder RJ, Hackman RC, Riff E, Albert RK, Springmeyer SC. Occurrence of the adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:313-315.
213. Brigham KL, Bowers RE, Haynes L. Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* 1979; 45:292-297.
214. Heflin C, Brigham KL. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 1981; 68:1253-1260.
215. Harlan JM, Killen PD, Harker LA, Striker GE. Neutrophil-mediated endothelial injury *in vivo*. *J Clin Invest* 1981; 68:1394-1403.
216. Ayars GH, Altman LC, Rosen H, Doyle T. The injurious effect of neutrophils on pneumonocytes *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:964-973.



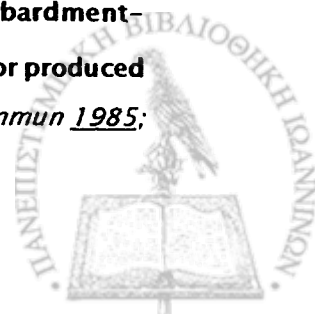
217. Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeth NF. **Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells.** *J Clin Invest* 1981; **68**:714-721.
218. Varani J, Fligiel SEG, Till GO, Kunkel RG, Ryan US, Ward PA. **Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils: possible involvement of hydroxyl radical.** *Lab Invest* 1985; **53**:656-663.
219. Simon RH, DeHart PD, Todd RF III. **Neutrophil-induced injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells.** *J Clin Invest* 1986; **78**:1375-1386.
220. McGowan SE, Stone PJ, Snider GL, Franzblau C. **Alveolar macrophage modulation of proteolysis by neutrophil elastase in extracellular matrix.** *Am Rev Respir Dis* 1984; **130**:734-739.
221. Hallgren R, Samuelsson T, Venge P, Modig J. **Eosinophil activation in the lung is related to lung damage in adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1987; **135**:639-642.
222. Davis WB, Fells GA, Sun XT, Gadek JE, Venet A, Crystal RG. **Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix.** *J Clin Invest* 1984; **74**:269-278.
223. Parson PE, Worthen GS, Moore EE, Tate RM, Henson PM. **The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1989; **140**:294-301.
224. Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holzman H, Kimbel P, Weinbaum G. **Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome.** *N Eng J Med* 1981; **304**:192-196.
225. Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ, Bechard DE, Centor RM, Ebster RO. **The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk.** *Am Rev Respir Dis* 1987; **136**:1225-12331.
226. Duchateau J, Haas M, Schreyen H, Radoux L, Sprangers I, Noel FX, Braun M, Lamy M. **Complement activation in patients at risk of developing the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1984; **130**:1058-1064.
227. Tate RM, Repine JE. **Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1983; **128**:552-559.
228. Rinaldo JE, Christman JW. **Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome.** *Clin Chest Med* 1990; **11**:621-632.



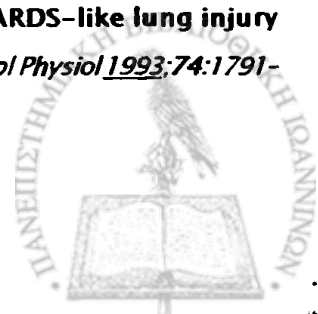
229. Pinckard RN, Ludwig JC, McManus LM. **Platelet-Activating Factors. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.** Edited by Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R. Raven Press, Ltd., New York 1988.
230. Benveniste J, Pretolani M. PAF acether (platelet-activating factor): Its role in inflammation. *Adv Inflam Res.* 1986; 10:7-19.
231. McManus LM. Pathobiology of platelet-activating factor. *Pathol Immunopathol Res.* 1986; 5:104-117.
232. Barbaro JF, Zvaifler NJ. Antigen induced histamine release from platelets of rabbits, producing homologous PCA-antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122:1245-1247.
233. Benveniste J, Le Quedic JP, Polonsky J, Tence M. Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature* 1977; 269:170-171.
234. Benveniste J, Le Quedic JP, Kamoun P. Aggregation of human platelets by platelet-activating factor. *Lancet* 1975; 1:344-345.
235. Demopoulos KA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine as an active component. (A new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979; 254:9355-9358.
236. Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boulet C, Polonsky J. Semi-synthese et structure propose du facteur activant les plaquettes (PAF): PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. *C R Acad Sci Paris (series D).* 1979; 289:1017-1021.
237. Hanahan DJ. Platelet-activating factor: A biologically active phosphoglyceride. *Ann. Rev. Biochem* 1986; 55:483-509.
238. Voelkel NF, Stenmark KR, Reeves JT, Mathias MM, Murphy RC. Nonimmunologic production of leukotrienes induced by platelet-activating factor. *Science* 1982; 218:286-288.
239. Smith CS, Parker L, Shearer WT. Cytokines regulation by platelet-activating factor in a human B cell lines. *J Immunol* 1994; 153:3997-4005.
240. Snyder F. Biochemistry of platelet-activating factor: A unique class of biologically active phospholipids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 190:125-135.
241. Albert DH, Snyder F. Biosynthesis of 1-O-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J Biol Chem* 1983; 258:97-102.



242. Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE, Farr RS. **Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor.** *J Immunol* 1986; **136**:3441-3446.
243. Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. **Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase.** *J Biol Chem* 1991; **266**:16667-16673.
244. Wykle RL, Olson SC, O'Flaherty JT. **Biochemical pathways of platelet-activating factor synthesis and breakdown.** *Adv Inflam Res* 1986; **11**:71-81.
245. Lee TC, Malone B, Snyder FA. **New de novo pathway for the formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor. Biochemical characterization of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-P: acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen.** *J Biol Chem* 1986; **261**:5373-5377.
246. Lee TC, Malone B, Snyder F. **Formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols via the de novo biosynthetic pathway for platelet activating factor. Characterization of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphate phosphohydrolase in rat spleens.** *J Biol Chem* 1988; **263**:1755-176.
247. Snyder F, Lee TC. **1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphate phosphatase.** *Methods Enzymol* 1992; **209**:230-234.
248. Renooij W, Snyder R. **Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotranferase in various rat tissues.** *Biochim Biophys Acta* 1981; **663**:545-556.
249. Woodard DS, Lee TC, Snyder F. **The final step in the de novo biosynthesis of platelet activating factor. Properties of a unique CDP-choline: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol choline-phosphotransferase in microsomes from the renal inner medulla of rats.** *J Biol Chem* 1987; **262**:2520-2527.
250. Tellis K, Tsoukatos D, Lekka ME. **Isolation, chemical characterization and subcellular distribution of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol in Tetrahymena pyriformis cells.** *J Biochem* 1996; **119**:23-827.
251. Weintraub ST, Ludwig JC, Mott GE, McManus LM, Lear C, Pinckard RN. **Fast atom bombardment-mass spectrometric identification of molecular species of platelet-activating factor produced by stimulaed human polymorphonuclear leukocytes.** *Biochim Biophys Res Commun* 1985; **129**:868-876.



252. Chilton FH, Ellis JM, Olson SC, Wykle RL. **1-O-Alkyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. A common source of platelet-activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes.** *J Biol Chem* 1984; **259**:12014-12019.
253. Stryer L. **Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης** 1995.
254. Oda M, Satouchi K, Yasounaga K, Saito K. **Production of platelet-activating factor by washed rabbit platelets.** *J Lipid Res* 1985; **26**: 1294-1299.
255. Chignaro M, Le Quedic JP, Vargaftig BB, Benveniste J. **Platelet-activating factor secretion from platelets: effect of aggregating agents.** *Br J Haematol* 1980; **46**:455-464.
256. Chignaro M, Le Quedic JP, Tense M, Vargaftig BB, Benveniste J. **The role of platelet-activating factor in platelet aggregation.** *Nature* 1979; **279**:799-800.
257. McManus LM, Fitzpatrick FA, Hanahan DJ, Pinckard RN. **Thromboxane B₂ release following acetyl glyceryl ether phosphorylocholine (AGEPC) infusion in the rabbit.** *Immunopharmacology* 1983; **5**:197-207.
258. McManus LM, Hanahan DJ, Pinckard RN. **Human platelet stimulation by acetyl glyceryl ether phosphorylocholine (AGEPC).** *J Clin Invest* 1981; **67**:903-906.
259. Vargaftig B, Chignaro M, Benveniste J. **Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation.** *Biochem Pharm* 1981; **30**:263-271.
260. McManus LM, Pinckard RN. **Kinetics of acetyl glyceryl ether phosphorylocholine (AGEPC)-induced acute lung injury in the rabbit.** *Am J Pathol* 1985; **121**:55-68.
261. Antonopoulou S, Demopoulos CA, Argyropoulos D, Baltas G, Kotsifaki H, Diamanti-Kipiotti A. **Identification of a new endogenous platelet-activating factor-like molecule in gingival crevicular fluid.** *Biochem J* 1998; **330**:791-794.
262. Evans, T.W., K.F. Chung, D.F. Rogers, and P.J. Barnes. **Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanism.** *J Appl Physiol* 1987; **63**: 479-84.
263. Henson PM, Barnes PJ, Banks-Schlegel SP. **Platelet-activation factor: Role in pulmonary injury and dysfunction and blood abnormalities.** *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**:726-731.
264. Rabinovici R, Bugelski PJ, Esser KM, Hillegass LM, Vernick J, Feuerstein G. **ARDS-like lung injury produced by endotoxin in platelet-activating factor-primat rats.** *J Appl Physiol* 1993; **74**:1791-1802.



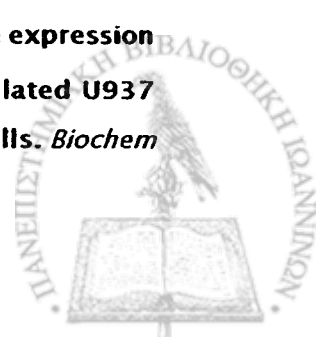
265. Matsumoto K, Taki F, Kondoh Y, Taniguchi H, Takagi K. **Platelet activating factor in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; **19**:509-515.
266. Hill ME, Bird IN, Daniels RH, Elmore MA, Finnen MJ. **Endothelial cell-associated platelet activating factor primes neutrophils for enhanced superoxide production and arachidonic acid release during adhesion to but not transmigration across IL-1b-treated endothelial monolayers.** *J Immunol (USA)* 1994; **153**:3673-3683.
267. Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T. **Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice.** *J Clin Invest* 1999; **104**:1071-1076.
268. Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman. **Two of the usual suspects, platelet-activating factor and its receptor, implicated in acute lung injury.** *J Clin Invest* 1999; **104**:1019-1020.
269. Deby-Dupont G, Braun M, Lamy M, Deby C, Pincemail J, Faymonville ME, Damas P, Bodson L, Lecart MP, Goutier R. **Thromboxane and prostacyclin release in adult respiratory distress syndrome.** *Intensive Care Med* 1987; **13**:167-174.
270. Chauncey JB, Peters-Golden M, Simon RH. **Arachidonic acid metabolism by rat alveolar epithelial cells.** *Lab Invest* 1988; **58**:133-140.
271. Chauncey JB, Simon RH, Peters-Golden M. **Rat alveolar macrophages synthesize leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid from alveolar epithelial cell-derived arachidonic acid.** *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**:928-935.
272. Demling RJ, Smith M, Gunther R, Flynn JT, Gee MH. **Pulmonary injury and prostaglandin production during endotoxemia in conscious sheep.** *Am J Physiol* 1981; **240**:H348-H353.
273. Frolich JC, Ogletree M, Peskar BA, Brigham KL. **Pulmonary hypertension correlated to pulmonary thromboxane synthesis.** *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980; **7**:745-750.
274. Begley CJ, Ogletree JL, Meyrick BO, Brigham KL. **Modification of pulmonary responses to endotoxemia in awake sheep by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents.** *Am Rev Respir Dis* 1984; **130**:1140-1146.
275. Heffner JE, Sahn SA. **Salicylate-induced pulmonary edema.** *Ann Intern Med* 1981; **95**:405-409.
276. Gadaleta D, Davis JM. **Pulmonary failure and the production of leukotriens.** *J Am Coll Surg* 1994; **178**:309-319.



277. Stephenson AH, Lonigro AJ, Hyers TM, Webster RO, Fowler AA. **Increased concentrations of leukotrienes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS or at risk for ARDS.** *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**:714-719.
278. Olson NC, Dobrowsky RT, Fleisher LN. **Hydroxyeicosatetraenoic acids are increased in bronchoalveolar lavage fluid of endotoxemic pigs.** *Prostaglandins* 1987; **34**:493-503.
279. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3d, Zentella A, Albert JD. **Shock and tissue injury induced by recombinant cachectin.** *Science* 1986; **234**:470-474.
280. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. **Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:8667-8671.
281. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. **Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.** *J Immunol* 1986; **136**:4220-4225.
282. Varani J, Bendelow MJ, Sealey DE, Kunkel SL, Gannon DE, Ryan US, Ward PA. **Tumor necrosis factor enhances susceptibility of vascular endothelial cells to neutrophil-mediated killing.** *Lab Invest* 1988; **59**:292-295.
283. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. **Cachectin/tumour necrosis factor.** *Lancet* 1989; **1**:1122-1126.
284. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF. **Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **141**:94-97.
285. Roten R, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Tagan MC, Perret CI. **Plasma levels of tumor necrosis factor in the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**:590-592.
286. Millar AB, Foley NM, Singer M, Johnson NM, Meager A, Rook GAW. **Tumor necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome.** *Lancet* 1989; **2**:712-714.
287. Tran Van Hieu J, Misset B, Lebagry F, Carlet J, Bernaudin JF. **Expression of tumor necrosis factor-alpha gene in alveolar macrophages from patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**:1585-1589.



288. Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. **Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Exp Lung Res* 1989; 15:881-894.
289. Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW, Campbell GD. **Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1686-1692.
290. Parsons PE, Fowler AA, Hyers TM, Henson PM. **Chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:490-493.
291. Cohen AB, MacArthur C, Idell S, Maunder R, Martin T, Dinarello CA, Griffith D, McLarty J. **A peptide from alveolar macrophages that releases neutrophil enzymes into the lungs in patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:1151-1158.
292. Miller EJ, Cohen AB, Maunder R, Martin T. **Neutrophil activating factor concentration is increased in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from some patients with adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:A95.
293. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C. **Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups.** *Lancet* 1993; 341:643-647.
294. Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, Griffith D, Maunder RJ, Martin TR, Weiner-Kronish JP, Sticherling M, Christophers E, Matthay MA. **Elevated levels of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with ARDS and are associated with increased mortality.** *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:427-432.
295. Headley AS, Tolley E, Meduri U. **Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome.** *Chest* 1997; 111:1306-1321.
296. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, Del Castillo J. **Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor- β inhibit acute inflammation.** *Am J Pathol* 1991; 138:1097-1101.
297. Kuroda A, Sugiyama E, Taki H, Mino T, Kobayashi M. **Interleukin-4 inhibits the gene expression and biosynthesis of cytosolic phospholipase A₂ in lipopolysaccharide stimulated U937 macrophage cell line and freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells.** *Biochem Biophys Res Com* 1997; 230:40-43.



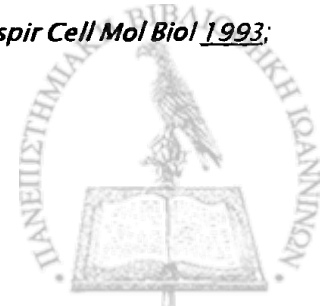
298. Lo CJ, Fu M, Cryer HG. **Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome.** *J Surg Res* 1998; **79**(2):179-84.
299. Mulligan MS, Jones ML, Vaporciyan AA, Howard MC, Ward PA. **Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury.** *J Immunol* 1993; **151**:5666-5674.
300. Armstrong L, Millar AB. **Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome.** *Thorax* 1997; **52**(5):442-446.
301. De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennet B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. **Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production and cytotoxic function of human monocytes.** *J Immunol* 1993; **151**:6370-6381.
302. Jorens PG, De Jongh R, Bossaert LL, De Backer W, Herman AG, Pollet H, Bosmans E, Taupin JL, Moreau JF. **High levels of leukaemia inhibitory factor in ARDS.** *Cytokine* 1996; **8**:873-876.
303. Heffner JE, Repine JE. **Pulmonary strategies of antioxidant defense.** *Am Rev Respir Dis* 1989; **140**:531-554.
304. Cochrane CG, Spragg R, Revak SD. **Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid.** *J Clin Invest*, 1993; **71**:754-761.
305. Pacht ER, Timernan AP, Iykens MG, Merola AJ. **Deficiency of alveolar fluid, glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome.** *Chest* 1991; **100**:1397-1403.
306. Runnell F, Pacht ER. **Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of, patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**:1174-1178.
307. Ishii Y, Partridge CA, Del Vecchio PJ, Malik AB. **Tumor necrosis factor- α -mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H₂O.** *J Clin Invest* 1992; **89**:794-802.
308. Warner BB, Rurhans MS, Clark JC, Wispe JR. **Tumor necrosis factor- α increases Mn-SOD expression: Protection against oxidant injury.** *Am J Physiol* 1991; **260**:L296-L301.
309. Leff JA, Parsons PE, Day CE et al. **Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis.** *Lancet* 1993; **341**:777-780.
310. Connelly KG, Moss M, Parsons PE, Moore EE, Moore FA, Giclas PC, Seligman PA, Repine JE. **Serum ferritin as a predictor of the adult respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**:21-25;



311. Connelly KG, Repine JE. **Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome.** *Annu Rev Med* 1997; **48**:429-445.
312. Woessner JF Jr. **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.** *FASEB J* 1991; **5**:2145-2154.
313. Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM. **Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome (ARDS).** *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **154**:346-52.
314. Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG. **Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages, by interleukin-4.** *J Clin Invest* 1992; **90**:382-388.
315. Lotz M, Guerne PA. **Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA).** *J Biol Chem* 1991; **266**:2017-2020.
316. Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG. **Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages.** *J Immunol* 1991; **146**:2724-2729.
317. Shapiro SD, Campbell FJ, Kobayashi DK, Welgus HG. **Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon- γ .** *J Clin Invest* 1990; **86**:1204-1210.
318. Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H. **The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **150**:S123-S130.
319. Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL. **Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome.** *Lancet* 1999; **353**:1232-1237.
320. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkins ND. **Characteristics of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock.** *Am Rev Respir Dis* 1977; **115**:531-536.
321. Petty TL, Silvers GW, Paul GW, Stanford RE. **Abnormalities in lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrome.** *Chest* 1979; **75**:571-574.



322. Günther A, Schmidt R, Feustel A, Meier U, Pucker C, Ermert M, Seeger W. **Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in large surfactant aggregates.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**:244-251.
323. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. **Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity and plasma myoinositol.** *J Clin Invest* 1982; **70**:673-683.
324. Pison U, Gono E, Joka T, Obertacke U. **Phospholipid lung profile in adult respiratory distress syndrome—Evidence for surfactant abnormality.** *Prog Clin Biol Res* 1987; **236A**:517-523.
325. Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhofer H, Schmit-Neuerburg KP. **Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma.** *Am Rev Respir Dis* 1989; **140**:1033-1039.
326. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3d, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. **Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome.** *J Clin Invest* 1991; **88**:1976-1981.
327. Reynolds HY. **Bronchoalveolar lavage.** *Am Rev Respir Dis* 1987; **135**:250-263.
328. Veldhuizen RAW, McCaig LA, Akino T, Lewis JF. **Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**:1867-1871.
329. Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN. **Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids.** *Chem Phys Lipids* 1985; **38**:267-298.
330. Holm BA, Notter RH. **Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity.** *J Appl Physiol* 1987; **63**:1434-1442.
331. Seeger W, Stohr G, Wolf HR, Neuhofer H. **Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer.** *J Appl Physiol* 1985; **58**:326-338.
332. Fuchimukai T, Futjiwara T, Takahashi A, Enhorning G. **Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins.** *J Appl Physiol* 1987; **62**:429-437.
333. Seeger W, Elssner A, Gunther A, Kramer HJ, Kalinowski HO. **Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **9**:149-A126.



334. Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F. **Pulmonary surfactant associated protein A enhances the surface activity of lipid extracts surfactant and reverses inhibition by bloodproteins *in vitro*.** *Biochemistry* 1990; **29**:8424-8429.
335. Venkitaraman AR, Baatz JE, Whitsett JA, Hall SB, Notter RH. **Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins.** *Chem Phys Lipids* 1991; **57**:49-57.
336. Ryan SF, Ghassibi Y, Liao Df. **Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant *in vivo*.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **4**:33-41.
337. Seeger W, Lepper H, Wolf HR, Neuhof H. **Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid *in vitro*.** *Biochim Biophys Acta* 1985; **835**:58-67.
338. Oosting RS, Van Iwaarden JF, Van Bree L, Verhoef J, Van Golde LM, Haagsman HP. **Exposure of surfactant protein A to ozone *in vitro* and *in vivo* impairs its interaction with alveolar cells.** *Am J Physiol* 1992; **262**:L63-L68.
339. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G. **Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases.** *J Appl Physiol* 1991; **71**:317-321.
340. Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S. **Host defence capacities of pulmonary surfactant: Evidence for non-surfactant functions of the surfactant system.** *Eur J Clin Invest* 1994; **24**:586-599.
341. Kremlev SG, Phelps DS. **Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production.** *Am J Physiol* 1994; **267**:L712-L719.
342. Passi RB, Possmayer F. **Surfactant metabolism in acute pancreatitis.** *Prog Respir Res* 1981; **15**:136-140.
343. Vadas P. **Evated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in Gram negative septic shock.** *J Lab Clin Med* 1984; **104**:873-881.
344. Vadas P, Pruzanski W. **Biology of disease: role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease.** *Lab Invest* 1986; **55**:391-399.
345. Bejar R, Curbelo V, Davis C, Gluck L. **Premature labor. II. Bacterial sources of phospholipase.** *Obstet Gynecol* 1981; **57**:479-482.

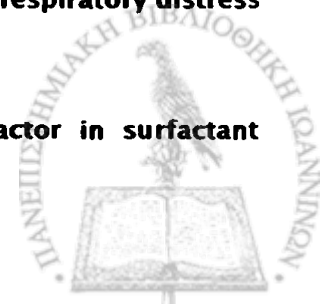


346. Hite RD, Seeds MC, Jacinto RB, Balasubramanian R, Waite M, Bass D. **Hydrolysis of surfactant-associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipase A₂**. *Am J Physiol* 1998; *275*:L740-L747.
347. Lema G, Enhorning G. **Surface properties after a PLA₂ simulated hydrolysis of pulmonary surfactant's main component, DPPC**. *Biochim Biophys Acta* 1997; *1345*:86-92.
348. Touqui L, Arbibe L. **A role for phospholipase A₂ in ARDS pathogenesis**. *Mol Med Today* 1999; *5*:244-249.
349. Arbibe L, Vial D, RosinskiChupin I, Havet N, Huerre M, Vargaftig BB, Touqui L. **Endotoxin induces expression of type II phospholipase A₂ in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF- α in lipopolydacharide-induced type II phospholipase A₂ synthesis**. *J Immunol* 1997; *159*:391-400.
350. Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, Longacre S, Vargaftig BB, Berezliat G, Voelker DR, Wolf C, Touqui L. **Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A₂ and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A₂ protein interaction**. *J Clin Invest* 1998; *102*:1152-1160.
351. Inoue S, Kogaki H, Ikera K, Samejima Y, Omori-Satoh T. **Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins**. *J Biol Chem* 1991; *266*:1001-1007.
352. Pison U, Tam EK, Caughet GH, Hawgood S. **Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase**. *Biochem Biophys Acta* 1989; *835*:58-67.
353. Fornasier M, Puccini P, Razzetti R, Acerbi D, Bongrani S, Ventura P. **Evaluation of potentially injurious effects of exogenous surfactant lysophospholipids on the alveolar epithelium and pulmonary mechanics**. *Biol Neonate* 1997; *71*:337-344.
354. Grossmann G, Tashiro K, Kobayashi T, Suzuki Y, Matsumoto Y, Waseda Y, Akino T, Curstedt T, Robertson B. **Experimental neonatal respiratory failure induced by lysophosphatidylcholine: effect of surfactant treatment**. *J Appl Physiol* 1999; *86*:633-640.
355. Edelson JD, Vadas P, Villar J, Mullen JBM, Pruzanski W. **Acute lung injury by phospholipase A₂. Structural and functional changes**. *Am Rev Respir Dis* 1991; *143*:1102-1109.
356. Von Wichert P, Temmesfeld M, Meyer W. **Influence of sepsis shock upon phosphatidylcholine remodeling mechanism in rat lung**. *Biochim Biophys Acta* 1981; *664*:487-497.

357. Romaschin AD, DeMajo WC, Winton T, D'Costa M, Chang G, Rubin B, Gamliel Z, Walker PM, **Systemic phospholipase A₂ and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multiple-organ failure.** *Clin Biochem* 1992; 25:55-60.
358. Liu LY, Sun B, Tian Y, Lu BZ, Wang J. **Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A₂ in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion.** *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:878-881.
359. Anderson B, Moore EE, Banerjee A. **Phospholipase A₂ regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure.** *J Surg Res* 1994; 56:199-205.
360. Sorensen J, Kald B, Tagesson C, Lindahl M. **Platelet activating factor and phospholipase A₂ in patients with septic shock and trauma.** *Intensive Care Med* 1994; 20:555-561.
361. Nyman KM, Waldermar U, Forsstrom J, Buchler M, Beger H, Nevalainen TJ. **Serum phospholipase A₂ in patients with multiple organ failure.** *J Surg Res* 1996; 60:7-14.
362. Kim DK, Fukuda T, Thompson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV. **Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome.** *Am J Physiol* 1995; 269:L109-L118.
363. Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Ueno M, Chikazawa Y, Ono T, Hori Y, Matsukawa A, Yoshinaga M, Obara H. **Crucial role of group IIA phospholipase A(2) in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1292-1302.
364. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, Kariman K, Higgins S, Bradley R, Metz CA. **High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome.** *N Eng J Med* 1987; 317:1565-1570.
365. Bone RC, Slotman G, Maunder R, Silverman H, Hyers TM, Kerstein MD, Ursprung JJ. **Randomised double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with adult respiratory distress syndrome.** *Chest* 1989; 96:114-119.
366. Bernard GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA, Swindell BB, Wright PE, Watts FL, Vrbancac JJ. **Prostacyclin and thromboxane A₂ formation is increased in human sepsis syndrome. Effect of cyclooxygenase inhibition.** *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1095-1101.
367. Luce JM. **Introduction of new technology into critical care practice: a history of IA-1A human monoclonal antibody against endotoxin.** *Crit Care Med* 1993; 21:1233-1241.



368. Fisher CJ Jr, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA. **Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1994; 22:12-21.**
369. Wasserman MA, Welton AF, Renzetti I M. **Synergism exhibited by LTD4 and PAF receptor antagonists in decreasing antigen-induced airway microvascular leakage. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res (USA)* 1995; 23:271-273.**
370. Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL. **Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1993; 21:318-327.**
371. Fujiwara T, Chida S, Watabe YJ, Macta H, Morita T, Abe T. **Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980; 1:55-59.**
372. Enhorning G, Shennan A, Possmayer F, Dunn M, Chen CP, Milligan J. **Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1985; 76:145-153.**
373. Kresch MJ, Lin WH, Thrall RS. **Surfactant replacement treatment. *Thorax* 1996; 51:1137-1154.**
374. Oetomo SB, Reijngoud DJ, Ennema JJ, Okken A, Wildevuur CRH. **Surfactant replacement therapy in surfactant deficient rabbits: early effects on lung function and biochemical aspects. *Lung* 1988; 166:65-73.**
375. Walmrath D, Gunther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. **Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:57-62.**
376. Gommers D, Eijking EP, So KL, van't Veen A, Lachmann B. **Bronchoalveolar lavage with a diluted surfactant suspension prior to surfactant instillation improves the effectiveness of surfactant therapy in experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Intensive Care Med* 1998; 24(5):494-500.**
377. Robertson B. **Surfactant inactivation and surfactant therapy in acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53:64-9.**
378. Moya FR, Hoffman DR, Zhao B, Johnston JM. **Platelet-activating factor in surfactant preparations. *Lancet* 1993; 341:858-860.**



379. Kobayashi T, Kataoka H, Ueda T, Murakami S, Takada Y, Kokubo M. **Effects of surfactant supplement and end-expiratory pressure in lung-lavaged rabbits.** *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984; **57**:995-1001.
380. Berggren P, Lachman B, Curstedt T, Grossman G, Robertson B. **Gas exchange and lung morphology after surfactant replacement in experimental adult respiratory distress syndrome induced by repeated lung lavage.** *Acta Anaesth Scand* 1986; **30**:321-328.
381. Eijking EP, van Daal GJ, Tenbrinck R, Luijendijk A, Sluiter JF, Hannappel E, Lachmann B. **Effect of surfactant replacement on Pneumocystis carinii pneumonia in rats.** *Intensive Care Med* 1991; **17**:475-478.
382. Eijking EP van Daal GJ, Tenbrinck R Sluiter JF Hannappel E, Lachmann B. **Improvement of pulmonary gas exchange after surfactant replacement in rats with pneumocystis carinii pneumonia.** *Adv Exp Med Biol* 1992; **316**:293-8.
383. Engstrom PC, Holm BA, Matalon S. **Surfactant replacement attenuates the increase in alveolar permeability in hyperoxia.** *J Appl Physiol* 1989; **67**:688-93.
384. Ennema JJ, Kobayashi T, Robertson B, Curstedt T. **Inactivation of exogenous surfactant in experimental respiratory failure induced by hyperoxia.** *Acta Anaesth Scand* 1988; **32**:665-671.
385. Robertson B. **Surfactant inactivation and surfactant replacement in experimental models of ARDS.** *Acta Anaesth Scand* 1991; **35**(Suppl 95):22-8.
386. Lamm WJE, Albett RK. **Surfactant replacement improves lung recoil in rabbit lung after acid aspiration.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **142**:1279-83.
387. Staudinger T, Bankier A, Strohmaier W, Weiss K, Locker GJ, Knapp S, Roggla M, Laczika K, Frass M. **Exogenous surfactant therapy in a patient with adult respiratory distress syndrome after near drowning.** *Resuscitation* 1997; **35**(2):179-82.
388. Baudouin SV. **Surfactant medication for acute respiratory distress syndrome.** *Thorax* 1997; **52** (Suppl 3): S9-S15.
389. Cochrane CG, Revak SD. **Protein-phospholipid interactions in pulmonary surfactant.** *Chest* 1994; **195** (Suppl 3):575-625.
390. Demling RH. **The role of mediators in human ARDS.** *J Crit Care* 1989; **3**:56-72.
391. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. **Effect of a protective-**



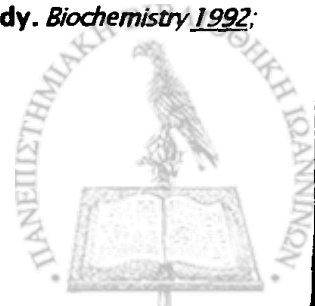
- ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; **338**:347-354.
392. Gijon MA, Leslie CC. Phospholipases A₂. *Sem Cell Dev Biol* 1997; **8**:297-303.
393. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; **269**:13057-13060.
394. Balsinde J, Balboa MA, Inset PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**:175-189.
395. Dennis EA. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**:1-2.
396. Yuan C, Tsai M-G. Pancreatic phospholipase A₂: new views on old issues. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1441**:215-222.
397. Tischfield JA. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J Biol Chem* 1997; **272**:17247-17250.
398. Buckland AG, Kinkaid AR, Wilton DC. Cardiolipin hydrolysis by human phospholipases A₂. The multiple enzymatic activities of human cytosolic phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1390**:65-72.
399. Balsinde J, Shinohara H, Lefkowitz LJ, Johnson CA, Balboa MA, Dennis EA. Group V phospholipase A₂-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* 1999; **274**:25967-25970.
400. Shinohara H, Balboa MA, Johnson CA, Balsinde J, Dennis EA. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D₁ macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1999; **274**:12263-12268.
401. Serano SMT, Rechl AP, Mentele R, Auerswald EA, Santoro ML, Sampaio CAM, Camargo ACM, Assakura MT. A novel phospholipase A₂ from the venom of the snake Bothrops jararaca: Purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch Biochem Biophys* 1999; **367**:26-32.
402. Pickard RT, Chiou XG, Strifler BA, DeFelippis MR, Hyslop PA, Tebbe AL, Yee YK, Reynolds LJ, Dennis EA, Kramer RM, Sharp JD. Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1996; **271**:19225-19231.



403. McNicol A, Shibou TS. **Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in activated platelets.** *Thromb Res* 1998; *92*:19-26.
404. Leslie CC. **Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂.** *J Biol Chem* 1997; *272*:16709-16712.
405. Mosior M, Six DA, Dennis EA. **Group IV cytosolic phospholipase A₂; binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity.** *J Biol Chem* 1998; *273*:2184-2191.
406. Bonverte JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A. **Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂.** *Nature* 1997; *390*:622-625.
407. Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki J, Shimitzu T. **Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition.** *Nature* 1997; *390*:618-621.
408. Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XI, Knopf JL, Lin LL. **A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂-γ, that is prenylated and contains homology to cPLA₂.** *J Biol Chem* 1998; *273*:21926-21932.
409. Song C, Chang XJ, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. **Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂-β.** *J Biol Chem* 1999; *274*:17063-17067.
410. Tang J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J, Jones SS. **A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs.** *J Biol Chem* 1997; *272*:8567-8575.
411. Wolf MJ, Gross RW. **Expression, purification, and kinetic characterization of a recombinant 80-kDa intracellular calcium-independent phospholipase A₂.** *J Biol Chem* 1996; *271*:30879-30885.
412. Balboa MA, Balsinde J, Jones SS, Dennis EA. **Identity between Ca²⁺-independent phospholipase A₂ enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells.** *J Biol Chem* 1997; *272*:8576-8580.
413. Lio, Y.-C., and E. A. Dennis. **Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺ independent phospholipase A₂.** *Biochim Biophys Acta* 1998; *1392*: 320-332.



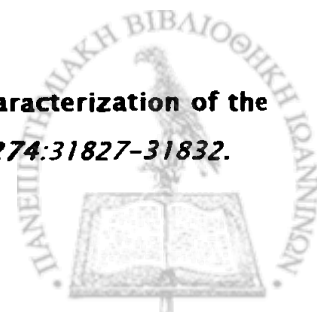
414. Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA. **Ca²⁺- independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D₁ cells. isolation and characterization.** *J Biol Chem* 1994; **269**:9227-9233.
415. Balsinde J, Dennis EA. **Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂.** *J Biol Chem* 1997; **272**:16069-16072.
416. Balsinde J, Dennis ED. **Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D₁ macrophages.** *J Biol Chem* 1996; **271**:6758-6765.
417. Gelb MH, Jain MK, Hanel AM, Berg OG. **Intefacial enzymology of glycerolipid hydrolases: Lessons from secreted phospholipases A₂.** *Annu Rev Biochem* 1995; **64**:653-688.
418. Carman GM, Deems RA, Dennis EA. **Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics.** *J Biol Chem* 1995; **270**:18711-18714.
419. Roberts MF. **Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface.** *FASEB J* 1996; **10**:1159-1172.
420. Dahmen-Levinson U, Möhwald BH. **Specific adsorption of PLA₂ at monolayers.** *The solid films* 1998; **327-329**:616-620.
421. Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB. **Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue.** *Science* 1990; **250**:1541-1546.
422. Lister MD, Deems RA, Watanabe Y, Ulevitch RJ, Dennis EA. **Kinetic analysis of the Ca²⁺-dependent, membrane-bound, macrophage phospholipase A₂ and the effects of arachidonic acid.** *J Biol Chem* 1988; **263**: 7506-7513.
423. Kuipers OP, Vincent M, Brochon J-C, Verheij HM, de Haas GH, Gallay J. **Insight into the conformational dynamics of specific regions of porcine pancreatic phospholipase A₂ from a time-resolved fluorescence study of a genetically inserted single tryptophan residue.** *Biochemistry* 1992; **30**:8771-8785.
424. Peters AR, Dekker N, van den Berg L, Boelens R, Kaptein R, Slotboom AJ, De Haas GH. **Conformational changes in phospholipase A₂ upon binding to micellar interfaces in the absence and presence of competitive inhibitors. A 1H and 15N NMR study.** *Biochemistry* 1992; **31**:10024-10030.



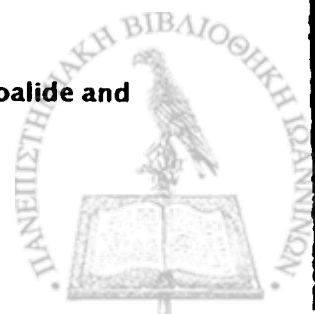
425. Kilby PM, Primrose WU, Roberts GCK. **Changes in the structure of bovine phospholipase A₂ upon micelle binding.** *Biochemistry* 1995; 305:935-944.
426. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre T. **Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase. Purification and Properties.** *J Biol Chem* 1987; 262:4223-4230.
427. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA et al. **Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase.** *Nature* 1995; 374:549-553.
428. Tselepis AD, Lekka ML, Tsoukatos DA. **PAF-acetylhydrolase activity in Tetrahymena pyriformis cells.** *FEBS Letters* 1991; 288:147-150.
429. Hattori K, Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. **Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol.** *J Biol Chem* 1995; 270:22308-22313.
430. Farr RS, Cox CP, Wardlow ML, Jorgensen R. **Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF).** *Clin Immunol Immunopathol* 1980; 15:318-330.
431. Blank ML, Lee TC, Fitzgerald V, Snyder F. **A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid).** *J Biol Chem* 1981; 256:175-178.
432. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. **Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases.** *Biochim Biophys Acta* 1996; 11; 1301(3):161-173.
433. Karpouza AP, Vakirtzi-Lemonias C. **The platelet activating factor acetylhydrolase of mouse platelets.** *Biochim Biophys Acta* 1997; 1323:12-22.
434. Tjoelker LW, Eberhardt C, Wilder C, Dietsch G, Trong HL, Cousens LS, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. **Functional and structural features of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase.** In: **Platelet-activating factor and related lipid mediators 2. Roles in health and disease.** Edited by Nigam et al., Plenum Press New York, 1996.
435. Stafforini DM, Tjoelker LW. **Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase.** *Methods Mol Biol* 1999; 109:49-58.



436. Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW. **Plasma platelet factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A₂ with a catalytic triad.** *J Biol Chem* 1995; **270**:25481-25487.
437. Stafforini DM, McIntyre T, Carter ME, Prescott SM. **Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase association with lipoprotein and role in the degradation of platelet activating factor.** *J Biol Chem* 1987; **62**:4215-4222.
438. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SPA, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. **Molecular basis of the interaction between plasma platelet activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein.** *J Biol Chem* 1999; **274**:7018-1024.
439. Derewenda ZS, Ho YS. **PAF-acetylhydrolases.** *Biochim Biophys Acta* 1999; **1441**:229-236.
440. Min JH, Jain MK, Wilder C, Paul L, Apitz-Castro R, Aspleaf DC, Gelb MH. **Membrane bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase.** *Biochemistry* 1999; **38**:12935-12942.
441. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. **PAF acetylhydrolase in human tissues and blood cells.** *Lipids* 1991; **26**:979-985.
442. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. **Platelet-activating factor acetylhydrolase.** *J Biol Chem* 1997; **272**:17895-17898.
443. Stafforini DM, Rollins EN, Prescott SM, McIntyre TM. **The platelet-activating factor acetylhydrolase from human erythrocytes. Purification and properties.** *J Biol Chem* 1993; **268**:3857-3865.
444. Hattori M, Arai H, Inoue K. **Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase.** *J Biol Chem* 1993; **268**:18748-18753.
445. Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. **The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase.** *J Biol Chem* 1994; **269**:23150-23155.
446. Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS. **Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer.** *Nature* 1997; **385**:89-93.
447. Manyá H, Aoki J, Kato H, Ishii J, Hino S, Arai H, Inoue K. **Biochemical characterization of the brain platelet-activating factor acetylhydroase.** *J Biol Chem* 1999; **274**:31827-31832.



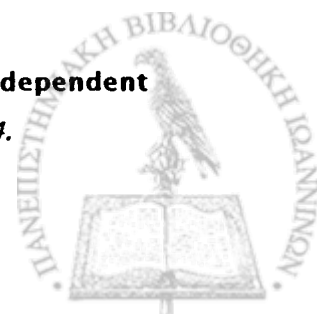
448. Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K. **cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase. Homology with plasma PAF acetylhydrolase.** *J Biol Chem* 1996; **271**:33032-33038.
449. Matsuzawa A, Hattori K, Aoki J, Arai H, Inoue K. **Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II.** *J Biol Chem* 1997; **272**: 32315-32320.
450. Tokumura A. **A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions.** *Prog Lipid Res* 1995; **34**(2):151-184.
451. Murphy RC. **Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products.** In: **Platelet-activating factor and related lipid mediators 2. Roles in health and disease.** Edited by Nigam et al., Plenum Press New York, 1996.
452. Lehr HA, Seemüller J, Hüber C, Menger MD, Messmer K. **Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction *in vivo* involves the receptor for platelet-activating factor.** *Arterioscler Thromb* 1993; **13**(7):1013-1018.
453. Stremmler KE, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. **An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma.** *J Biol Chem* 1989; **264**:5331-5334.
454. Stremmler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. **Human plasma PAF-acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates.** *J Biol Chem* 1991; **266**:11095-11103.
455. Prescott SM, Patel KDA, Smiley PL, Stafforini DM, Lorant DE, Zimmerman GA, McIntyre TM. **Potential roles for oxidized phospholipids in inflammation and atherogenesis.** In: **Atherosclerosis Reviews, Vol 25.** Edited by Weber PC and Leaf A. Raven Press, Ltd., New York, 1993.
456. Mustonen P, Lehtonen JYA, Kinnunen PKJ. **Binding of quinacrine to acidic phospholipids and pancreatic phospholipase A₂. Effects on the catalytic activity of the enzyme.** *Biochemistry* 1998; **37**:12051-12057.
457. Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N. **Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role.** *Biochem Pharmacol* 1994; **48**:1-10.
458. Reynolds LJ, Mihelich ED, Dennis EA. **Inhibition of venom phospholipases A₂ by manoalide and manoanalogue.** *J Biol Chem* 1991; **266**:16512-16517.



459. Roberts MF, Deems RA, Mincey TC, Dennis EA. **Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ (naja naja naja): a case of half-site reactivity.** *J Biol Chem* 1977; **252**:2405-2411.
460. Plesniak LA, Boegeman SC, Segelke BW, Dennis EA. **Interaction of phospholipase A₂ with thioether amide containing phospholipid analogues.** *Biochemistry* 1993; **32**:5009-5016.
461. Yo L, Dennis EA. **Effect of polar head groups on the interactions of phospholipase A₂ with phosphonate transition-state analogues.** *Biochemistry* 1993; **32**:10185-10192.
462. Dillard RD, Bach NJ, Draheim SE, Berry DR, Carlson DG, Chirgadze NY, Clawson DK, Hartley LW, Johnson LM, Jones ND, McKinney ER, Mihelich ED, Olkowski JL, Schevitz RW, Smith AC, Snyder DW, Sommers CD, Wery JP. **Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A₂. 1. Indole-3-acetamides.** *J Medicinal Chem* 1996; **39**:5119-5136.
463. Ghomashchi F, Loo R, Balsinde J, Bartoli F, Aritz-Castro R, Clark JD, Dennis EA, Gelb MH. **Trifluoromethyl ketones and methyl fluorophosphonates as inhibitors of group IV and VI phospholipases A₂: structure-function studies with vesicle, micelle, and membrane assays.** *Biochim Biophys Acta* 1999; **1420**:45-56.
464. Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. **Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders.** *Brain Res Bulletin* 1999; **49**:139-153.
465. Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA. **Inhibition of macrophage Ca²⁺ -independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones.** *J Biol Chem* 1995; **270**:445-450.
466. Balsinde J, Dennis EA. **Bromoenol lactones inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D₁ macrophages.** *J Biol Chem* 1996; **271**: 31937-31941.
467. Buckland AG, Wilton DC. **Inhibition of human cytosolic phospholipase A₂ by human annexin V.** *Biochem J* 1998; **329**:369-372.
468. Hidi R, Vial D, Havet N, Berger A, Vargaftig BB, Touqui L. **Inhibition by pulmonary surfactant curosurf of secretory phospholipase A₂ expression in guinea-pig alveolar macrophages.** *Biochem Pharmacol* 1997; **54**:1055-1058.



469. Berger A, Havet N, Vial D, Arbibe L, Dumarey C, Watson ML, Touqui L. **Dioleoylphosphatidylglycerol inhibits the expression of type II phospholipase A₂ in macrophages.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**:613-618.
470. Blank ML, Lee T, Fitzgerald V, Snyder F. **A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid).** *J Biol Chem* 1981; **256**:175-178.
471. Dentan C, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. **Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase.** *Biochim Biophys Acta* 1996; **1299**:353-357.
472. Deigner HP, Kinscherf R, Claus R, Fyrnys B, Blencowe C, Hermetter A. **Novel reversible, irreversible and fluorescent inhibitors of platelet-activating factor acetylhydrolase as mechanistic probes.** *Atherosclerosis* 1999; **144**:79-90.
473. Macphee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DMB. **Lipoprotein-associated phospholipase A₂ platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of novel inhibitor.** *Biochem J* 1999; **338**:479-487.
474. Enhorning G, Shumen B, Keicher L, Sokolowski J, Holm BA. **Phospholipases introduced into the hypophase affect the surfactant film outlining a bubble.** *Am J Physiol* 1992; **73**:941-945.
475. Samet JM, Maden MC, Fonteh AN. **Characterization of a secretory phospholipase A₂ in human bronchoalveolar lavage fluid.** *Exp Lung Res* 1996; **22**:299-315.
476. Sorensen J, Kald B, Tagesson C, Lindahl M. **Platelet-activating factor and phospholipase A₂ in patients with septic shock and trauma.** *Int Care Med* 1994; **20**:553-561.
477. Sane AC, Mendenhall T, Bass DA. **Secretory phospholipase A₂ activity is elevated in bronchoalveolar lavage fluid after ovalbumin sensitization of guinea pigs.** *J Leukoc Biol* 1996; **60**:703-709.
478. Bowton DL, Seeds MC, Fasano MB, Goldsmith B, Bass DA. **Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**:421-425.
479. Akiba S, Dodia C, Chen X, Fisher AB. **Characterization of acidic Ca²⁺-independent phospholipase A₂ of bovine lung.** *Comp Biochem Physiol B* 1998; **120**:393-404.



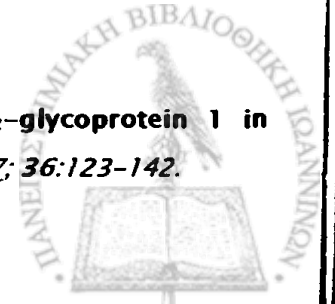
480. Kleuser B, Meister A, Sternfeld L, Gercken G. **Measurement of phospholipase A₂ and 1-alkylglycerophosphocholine acetyltransferase activities in stimulated alveolar macrophages by HPLC analysis of NBD-labeled ether lipids.** *Chem Phys Lipids* 1996; **79**:29-37.
481. Triggiani M, De Marino V, Sofia M, Faraone S, Ambrosio G, Carratu L, Marone G. **Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage.** *Am J Resp Crit Care Med* 1997; **156**:94-100.
482. Nakos G, Kitsioulis EI, Lekka ME. **Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism.** *Am J Resp Crit Care Med* 1998; **155**:1504-1510.
483. Stafforini DM, Numao T, Tsodikov A, Vaitkus D, Fukuda T, Watanabe N, Fueki N, McIntyre TM, Zimmerman GY, Makino S, Prescott SM. **Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma.** *J Clin Invest* 1999; **103**:989-997.
484. Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ. **Increased phospholipid breakdown in schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* 1997; **54**:487-494.
485. Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. **Differential alteration of phospholipase A₂ activities in brain of patients with schizophrenia.** *Brain Res* 1999; **821**:407-413.
486. Reynolds LJ, Washburn WN, Deems RA, Dennis EA. **Assay strategies and methods for phospholipases.** *Meth Enzymol* 1991; **197**:3-23.
487. Dole VP. *J Clin Invest* 1956; **35**:150.
488. Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. **Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A₂.** *Anal Biochem* 1999; **269**:278-288.
489. Schulman SG. **Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications:Part 1.** *John Wiley & Sons Inc., NY* 1985; vol 77.
490. Bashford CL. **An introduction to spectrophotometry and fluorescence spectrometry in Spectrophotometry & spectrofluorimetry, a practical approach.** Ed., Harris DA, Bashford CL. IRL Press Ltd, Oxford, England, p. 1-22; 1987.
491. Lumb MD. **Organic Luminescence, in Luminescence spectroscopy.** *Academic Press Inc. (London) Ltd.* p. 93-148; 1978.
492. Rendell D. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy. Analytical chemistry by open learning.** Ed., Mowthorpe D. *John Wiley & Sons, London*, 1987.



493. Schulman SG. **Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications:Part 3.** *John Wiley & Sons Inc., NY 1993; vol 77.*
494. Olsen ED. **Fluorescence and phosphorescence in Modern optical methods of analysis.** *McGraw-Hill Inc., New York, 1975;*
495. Radvanyi F, Jordan L, Russo-Marie F, Bon C. **A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin.** *Anal Biochem 1989; 177:103-109.*
496. Hendrickson HS. **Phospholipase A₂ assays with fluorophore-labeled lipid substrates.** *Meth Enzymol 1991; 197:90-94.*
497. Wolf C, Sagaert L, Bereziat G. **A sensitive assay of phospholipase using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin.** *Biochem Biophys Res Commun 1981; 99:275-283.*
498. Wittenauer LA, Shirai K, Jackson RL, Johnson D. **Hydrolysis of a fluorescent phospholipid substrate by phospholipase A₂ and lipoprotein lipase.** *Biochem Biophys Res Commun 1984; 118:894-901.*
499. Moreau RA. **An evaluation of NBD-phospholipids as substrates for the measurement of phospholipase and lipase activities.** *Lipids 1989; 24:691-699.*
500. Blanchard SG, Harris CO Parks DJ. **A fluorescence-based assay for human type II phospholipase A₂.** *Anal Biochem 1994; 222:435-440.*
501. Steinbrecher UP Pritchard PH. **Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase.** *J Lipid Res 1989; 30:305-315.*
502. Meyuhas D, Yedgar S, Rotenberg M, Reisfeld N, Lichtenberg D. **The use of C₆-NBD-PC for assaying phospholipase A₂-activity: scope and limitations.** *Biochim Biophys Acta 1992; 1124:223-232.*
503. Nickols JW, Pagano RE. **Kinetics of soluble lipid monomer diffusion between vesicles.** *Biochemistry 1981; 20:2783-2789.*
504. Thomas MJ, Pang K, Chen Q, Lyles D, Hantgan R, Waite M. **Lipid exchange between mixed micelles of phospholipid and triton X-100.** *Biochim Biophys Acta 1999; 1417:144-156.*
505. Li Q-T, Kam WK. **Steady-state fluorescence quenching for detecting acyl chain interdigitation in phosphatidylcholine vesicles.** *J Biochem Biophys Methods 1997; 35:11-22.*



506. Pagano RE, Sleight RG. **Defining lipid transport pathways in animal cells.** *Science* 1985; *229*:1051-1057.
507. Merino CG, Romanelli B, Pietrasanta LI, Barrantes FJ. **Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBD-phosphatidylcholine and rhodamine-phosphatidylethanolamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*.** *Biochemistry* 1995; *34*:4846-4855.
508. Huijbregts RPH, Kroon AIPM, Kruijff B. **Rapid transmembrane movement of C₆-NBD-labeled phospholipids across the inner membrane of *Escherichia coli*.** *Biochim Biophys Acta* 1996; *1280*:41-50.
509. Martin OC, Pagano RE. **Normal- and reverse-phase HPLC separations of fluorescent (NBD) lipids.** *Anal Biochem* 1986; *159*:101-108.
510. Kachel K, Asuncion-Punzalan E, London E. **The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes.** *Biochim Biophys Acta* 1998; *1374*:63-76.
511. Wang Q, Cui D, Lin Q. **Fluorescence studies on the interaction of a synthetic signal peptide and its analog with liposomes.** *Biochim Biophys Acta* 1997; *1324*:69-75.
512. Tang D, Borchman D, Harris N, Pierangeli S. **Lipid interactions with human antiphospholipid antibody, β_2 -glycoprotein 1, and normal human IgG using the fluorescent probes NBD-PE and DPH.** *Biochim Biophys Acta* 1998; *1372*:45-54.
513. Wassermann VA, Neisser A, Bruck C. **Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis.** *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1906; *19*:745-746.
514. Pangbom MD. **A new serologically active phospholipid from beef heart.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; *48*:484-486.
515. Conley CL, Hartmann, RC. **A haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1952; *31*:621-623.
516. Bowie EJ, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. **Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus despite circulating anti-coagulants.** *J Lab Clin Med* 1963; *62*:416-430.
517. Feinstein DI, Rapaport SI. **Acquired inhibitors of blood coagulation.** *Prog Hemost Thromb* 1972; *1*:75-95.
518. Chamley LW. **Antiphospholipid antibodies or not? The role of β_2 -glycoprotein 1 in autoantibody-mediated pregnancy loss.** *J Reproduct Immunol* 1997; *36*:123-142.



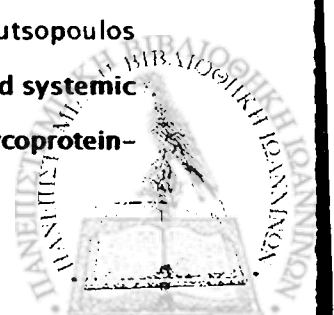
519. Hams EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. **Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis.** *Lancet* 1983; *2*:1211-1214.
520. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle R, Harris EN. **Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardisation and quantitation of results.** *Clin Exp Immunol* 1985; *62*:738-745.
521. Hughes GRV. **The antiphospholipid syndrome: ten years on.** *Lancet* 1993; *342*:341-344.
522. Khamashta MA, Asherson RA. **Hughes syndrome — Antiphospholipid antibodies move closer to thrombosis in 1994.** *Br J Rheumatol* 1995; *34*:493-494.
523. Maneta-Peyret L, Previsani C, Sultan Y, Beziau JH, Cassagne C. **Autoantibodies against all the phospholipids: a comparative systematic study with systemic lupus erythematosus and healthy sera.** *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; *29*:39-43.
524. Jones JV, Eastwood BJ, Jones E, James H, Mansour M. **Antiphospholipid antibodies in a healthy population : methods for estimating the distribution.** *J Rheumatol* 1995; *22*:55-61.
525. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. **Immunology and clinical importance of anticardiolipin antibodies.** *Adv Immunol* 1991; *49*:193-280.
526. Bevers E, Comfurius P, van Rijn J, Hemker C, Zwaal R. **Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets.** *Eur J Biochem* 1982; *122*:429-436.
527. Branch D, Rote N, Dostal D, Scott J. **Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine.** *Clin Immunol Immunopathol* 1987; *42*:63-75.
528. Rote MS, Dostal-Johnson D, Branch WD. **Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss: correlation between the activated partial thromboplastin time and antibodies against phosphatidylserine and cardiolipin.** *Am J Obstet Gynecol* 1990; *163*:575-584.
529. Pierangeli S, Goldsmith G, Kmic S, Hams N. **Differences in functional activity of anticardiolipin antibodies from patients with syphilis and those with antiphospholipid syndrome.** *Infect Immun* 1994; *62*:4081-4084.
530. Harris EN, Pierangeli S. **Anticardiolipin antibodies: specificity and function.** *Lupus* 1994; *3*:217-222.



531. Barka N, Reagan K, Agopian M, Peter JB. Frequency of anticardiolipin and antiphosphatidylserine antibodies in patients with suspected antiphospholipid syndrome (Abstract). *Clin Chem* 1995; **41**:5-73.
532. Galli M, Comfurius P, Maasen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda Vriesman PJ, Zwall RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein co-factor. *Lancet* 1990; **336**:1544-1547.
533. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis S. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:4120-4124.
534. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; **336**:177-178.
535. Simmaritano LB, Gharavi AE, Lockshin MD. Antiphospholipid antibody syndrome: Immunologic and clinical aspects. *Arthritis Rheum* 1990; **20**:81-96.
536. Day HM, Thiagarajan P, Ahn C, Reveille JD, Tinker KF, Arnett FC. Autoantibodies to β_2 -glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid antibody syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody test. *J Rheumatol* 1998; **25**:667-674.
537. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GRV. β_2 -glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; **37**:1453-1461.
538. Schousboe I. β_2 -glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985; **66**:1086-1091.
539. Roubey RAS. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" antibodies. *Blood* 1994; **84**:2854-2867.
540. Tincani A, Balestrieri Spatols M, Cinquini Meroni PL, Roubey RAS. Anticardiolipin and anti- β_2 -glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of the antiphospholipid antibody syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; **16**:396-402.
541. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Elkon KB. Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with β_2 -glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992; **90**:1105-1109.



542. Levine JS, Subang R, Koh JS, Rauch J. **Induction of anti- β_2 -glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes.** *J Autoimmunity* 1998; **11**:413-424.
543. Allegri F, Balestieri G, Cattaneo R, Martinelli M Tincani A, Barcellini W, Del Papa N, Meroni PL, Falco M, Luan FL. **The plasma cofactor and anticardiolipin antibodies.** *Clin Exp Rheumatol* 1990; **8**:613-614.
544. Loizou S, Casabon JK, Walport MJ, Tait D, So AK. **Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1997; **40**:103-108.
545. Matsuura E, Igarashi M, Yasuda T, Koike T, Triplet DA. **Anticardiolipin antibodies recognise β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface.** *J Exp Med* 1994; **179**:457-462.
546. Tincani A, Spatola L, Prati E, Allegri F, Ferremi P, Cattaneo R, Meroni P, Balestrieri G. **The anti-beta 2-glycoprotein I activity in human antiphospholipid syndrome sera is due to monoreactive low affinity autoantibodies directed to epitopes located on native Beta 2 Glycoprotein I and preserved during species' evolution.** *J Immunol* 1996; **157**:5732-5738.
547. Cabral AR, Cabiedes J, Alarcon-SE-Govia D. **Antibodies to phospholipid-free β_2 -glycoprotein I in patients with primary antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol* 1995; **22**:1894-1898.
548. Harris EN, Gharavi AE, Hedge U, Derue G, Morgan SH, Englert H, Chan JKH, Asherson RA, Hughes GRV. **Anticardiolipin antibodies in autoimmune thrombocytopenia purpura.** *Br J Haematol* 1985; **59**:231-234.
549. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcon-Segovia D. **Hidden anti-phospholipid antibodies in normal human sera circulate as immune complexes whose antigen can be removed by heat, acid, hypermolar buffers or phospholipase treatments.** *Eur J Immunol* 1998; **28**:2108-2114.
550. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, Tolosa C, Franz J, Selva A, Ingeimo M. **Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients.** *Am J Med* 1994; **96**:3-9.
551. Vlachoyiannopoulos PG, Beigbeder G, Dueymes M, Youinou P, Hunt JE, Krilis SA, Moutsopoulos HM. **Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: their correlation with anticardiolipin antibodies and beta 2 glycoprotein-I plasma levels.** *Autoimmunity* 1993; **16**:245-249.



552. Love PE, Santoro SA. **Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and non-SLE disorders: prevalence and clinical significance.** *Ann Intern Med* 1990; *112*:682-698.
553. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. **Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis.** *Ann Intern Med* 1992; *117*:997-1002.
554. Khamashta MA, Hughes GRV. **Phospholipid autoantibodies-cardiolipin.** *Autoantibodies. Ed. Peter JB, Shoenfeld Y, 1996*; 624-629.
555. Galli M, Beguin S, Lindout T, Hemker CH. **Inhibition of phospholipid and platelet-dependent prothrombinase activity in the plasmas of patients with lupus anticoagulant.** *Br J Haematol* 1989; *72*:549-555.
556. Lockshin MD. **Antiphospholipid antibody syndromes.** *Rheum Dis Clin North Am* 1994; *20*:45-49.
557. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. **Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity.** *Ann Rheum Dis* 1987; *46*:1-6.
558. Loizou S, Mackworth-Young CG, Cofmer C, Walport MJ. **Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipid of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and with syphilis.** *Clin Exp Immunol* 1990; *80*: 71-176.
559. Barka NE. **Phospholipid autoantibodies-phosphatidylserine.** *Autoantibodies. Ed. Peter JB, Shoenfeld Y, 1996*; 630-634.
560. Branch D, Rote N, Dostai D, Scott J. **Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine.** *Clin Immunol Immunopathol* 1987; *42*:63-75.
561. Blank M, Tincani A, Shoenfeld Y. **Induction of experimental antiphospholipid syndrome in naive mice with purified IgG antiphosphatidylserine antibodies.** *J Rheumatol* 1994; *21*:100-104.
562. Asherson RA, Cervera R. **Antiphospholipid antibodies and the lung.** *J Rheumatol* 1995; *22*:62-66.
563. Asherson RA. **The catastrophic antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol* 1992; *19*:508-512.
564. Ghosh S, Walters HD, Joist JH, Osborn TG, Moore TL. **Adult respiratory distress syndrome associated with antiphospholipid antibody syndrome.** *J Rheumatol* 1993; *20*:1406-1408.
565. Argento A, Dibenedetto RJ. **ARDS and adrenal insufficiency associated with the antiphospholipid antibodies syndrome.** *Chest* 1998; *113*:1136-38.

566. Adonopoulos AP. **Adult respiratory distress syndrome: An unrecognized premortem event in systemic lupus erythematosus.** *Br J Rheumatol* 1991; **30**:346-348.
567. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Font J, Lie JT, Burcoglu A, Lim K, Munoz-Rodriguez FJ, Levy RA, Bout F, Rossert J, Ingelmo M. **Catastrophic antiphospholipid syndrome: Clinical and Laboratory features of 50 patients.** *Medicine (Baltimore)* 1998; **77**: (3) 195-207.
568. Kerr JE, Poe R, Kramer Z. **Antiphospholipid antibody syndrome presenting as a refractory noninflammatory pulmonary vasculopathy.** *Chest* 1997; **112**:1707-1710.
569. Schorer AE, Duane PG, Woods VL, Niewoenher DE. **Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A₂ activity.** *J Lab Clin Med* 1992; **120**:67-77.
570. Pierro E, Cirino G, Rosaria Bucci M, Lazzarin N, Andreani CL, Mancuso S, Labnzone A, Navara P. **Antiphospholipid antibodies inhibit prostaglandin release by decidual cells of early pregnancy: possible involvement of extracellular secretory phospholipase A₂.** *Fertil Steril* 1999; **71**:342-346.
571. Kandiah DA, Krillis SA. **Heterogeneity of lupus anticoagulant (LA) antibodies: LA activity in dilute russell's viper venom time and dilute kaolin clotting time detect different populations of antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome.** *Thromb Haemost* 1998; **80**:250-257.
572. Forsgren A, Sjöquist J. **Protein A from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin.** *J Immunol* 1966; **97**:822-827.
573. Kronvall G. **A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G.** *J Immunol* 1973; **111**:1401-1406.
574. Björck L, Kronvall G. **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.** *J Immunol* 1984; **133**:969-974.
575. Peng Z, Simons ER, Becker AB. **Differential binding properties of protein A and protein G for dog immunoglobulins.** *J Immunol Methods* 1991; **145**:255-258.
576. Sheoran AS, Holmes MA. **Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb and IgG(T) using their differential binding characteristics for staphylococcal protein A and streptococcal protein G.** *Vet Immunol Immunopathol* 1996; **55**:33-43.
577. Ackerström B, Brodin T, Reis KJ, Björck L. **Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies.** *J Immunol* 1985; **135**:2589-2592.



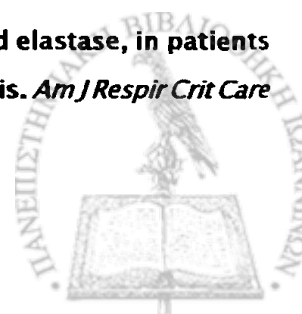
578. Ackerström B, Björck L. **A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties.** *J Biol Chem* 1986; *261*:10240-10247.
579. Derrick JP, Wigley DB, Lian LY, Sutcliffe MJ, Yang JC, Dawson PD, Roberts GCK. **Structure and mechanism of streptococcal protein G.** *Biochem Soc Trans* 1993; *21*:333S.
580. Ackerström B, Nielsen E, Björck L. **Definition of IgG- and albumin binding regions of streptococcal protein G.** *J Biol Chem* 1987; *262*:13388-13391.
581. Sjöbring U, Björck L, Kastern W. **Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties.** *J Biol Chem* 1991; *266*:399-405.
582. Kraulis PJ, Jonasson P, Nygren P, Uhlen M, Jendeberg L, Nilsson B, Kördel J. **The serum albumin-binding domain of streptococcal protein G is a three-helical bundle: a heteronuclear NMR study.** *FEBS Letters* 1996; *378*:190-194.
583. Erntell M, Myhre EB, Sjöbring U, Björck L. **Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG.** *Mol Immunol* 1988; *25*:121-126.
584. Falkenberg C, Björck L, Ackerström B. **Localization of the binding site for streptococcal protein G on human serum albumin. Identification of a 5.5-kilodalton protein G binding albumin fragment.** *Biochemistry* 1992; *313*:1452-1457.
585. Fahnestock SR. **Cloned streptococcal protein G genes.** *Trends Biotechnol* 1987; *5*:79- .
586. Goward CR, Murphy JP, Atkinson T, Barstow DA. **Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G.** *Biochem J* 1990; *267*:171-177.
587. Faulmann EL, Otten RA, Barrett DJ, Boyle MDP. **Immunological applications of type III Fc binding proteins. Comparison of different sources of protein G.** *J Immunol Methods* 1989; *123*:269-281.
588. Lancet D, Isenman D, Sjødahl S, Sjöquist J, Pecht I. **Interactions between staphylococcal protein A and immunoglobulin domains.** *Biochem Biophys Res Commun* 1978; *85*:608-614.
589. Walker K, Bottomley SP, Popplewell AG, Sutton BJ, Gore MG. **Equilibrium and pre-equilibrium fluorescence spectroscopic studies of the binding of a single-immunoglobulin-binding domain derived from protein G to the Fc fragment from human IgG₁.** *Biochem J* 1995; *310*:177-184.
590. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951; *193*:265-275.



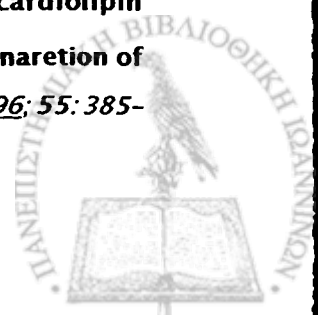
591. Dumas BT, Biggs HG. **Determination of serum albumin.** In Cooper GA, editor. **Standard methods of Clinical Chemistry.** 1972; Academic Press, NY. 175.
592. Batzli S, Korn ED. **Single bilayer liposomes prepared without sonication.** *Biochim Biophys Acta* 1973; **298**:1015-1019.
593. Bligh EG, Dyer WJ. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**:911-917.
594. Bartlett G. **Phosphorus assay in column chromatography.** *J Biol Chem* 1959; **234**:466-468.
595. Bossant MJ, Ninio E, Delautier D, Benveniste J. **Bioassay of paf-acether by rabbit platelet aggregation.** *Methods Enzymol* 1990; **187**:125-130.
596. Maneta-Peyret L, Bessoule JJ, Geffard M, Cassagne C. **Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine.** *J Immunol Methods* 1988; **108**:123-127.
597. Wallevik K, Jensenius JC. **A simple and reliable method for the drying of polyacrylamide slab gels.** *J Biochem Biophys Methods* 1982; **6**:17-21.
598. Maneta-Peyret L, Sturbois-Balcerzak B, Cassagne C, Moreau P. **Antibodies to long-chain acyl-CoAs. A new tool for lipid biochemistry.** *Biochim Biophys Acta* 1998; **1389**:50-56.
599. Heape AM, Juguelin H, Boiron F, Cassagne C. **Improved one-dimensional thin-layer chromatographic technique for polar lipids.** *J Chromatogr* 1985; **322**:391-395.
600. Juguelin H, Heape A, Boiron F, Cassagne C. **A quantitative developmental study of neutral lipids during myelinogenesis in the peripheral nervous system of normal and trembler mice.** *Dev Brain Res* 1986; **25**:249-252.
601. Macala LJ, Yu RK, Ando S. **Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry.** *J Lipid Res* 1983; **24**:1243-1250.
602. Murray JF, Matthay MA, Luce J. **An expanded definition of adult respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1988; **138**:720-724.
603. Maneta-Peyret L, Biron C, Previsiani C, Moreau P, Bezia JH, Cassagne C. **Demonstration that anti-phospholipid auto-antibodies react with both anionic and zwitterionic phospholipids.** *Immunol. Lett* 1993; **35**:141-146.
604. Hamming MC, Foster NG. **Interpretation of mass spectra compounds.** Academic Press Inc., New York; 1972.



605. Careri M, Ferretti D, Manini P, Musci M. **Evaluation of particle beam high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of cholesterol oxides.** *J Chromatogr* 1998; *794*:253-262.
606. Perez MD, Puyol P, Ena JM, Calvo M. **Comparison of the ability to bind lipids of beta-lactoglobulin and serum albumin of milk from ruminant and non-ruminant species.** *J Dairy Res* 1993; *60*:55-63.
607. Morrisett JD, Pownali HJ, Gotto AM. **Bovine serum albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids.** *J Biol Chem* 1975; *250*:2487-2494.
608. Demant EJ, Sehested M. **Recognition of anthracycline binding domains in bovine serum albumin and design of a free fatty acid sensor protein.** *Biochim Biophys Acta* 1993; *1156*:151-60.
609. Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP, Reed RG. **Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin.** *Proc Acad Sci USA* 1991; *88*:2051-2054.
610. Balciunas A, Fless GM, Scanu AM, Copeland RA. **Interactions of a fluorescently labeled peptide with kringle domains in proteins.** *J Protein Chem* 1993; *12*:39-43.
611. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. **Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996; *154*:602-611.
612. Steinberg KR, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. **Evolution of bronchoalveolar cells populations in adult respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994; *150*:113-122.
613. Von Wichert P, Joseph K, Muller B, Frank WM. **Bronchoalveolar lavage. Quantification of intraalveolar fluid.** *Am J Respir Crit Care Med* 1993; *147*:148-152.
614. Marcy TW, Merrill WW, Rancin JA, Reynolds HV. **Limitations of using urea to quantify epithelial fluid recovered by bronchoalveolar lavage.** *Am J Respir Crit Care Med* 1987; *135*:1276-1280.
615. Matthay MA, Berthiaume Y, Staub NC. **Long-term clearance of liquid and protein of unanesthetized sheep.** *J Appl Physiol* 1985; *59*:928-934.
616. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau G, Dayer JM. **High bronchoalveolar level of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1992; *145*:1016-1022.



617. Sakai A, Chang S, Voelkel NP. **Importance of vasoconstriction in lipid mediator-induced pulmonary edema.** *J Appl Physiol* 1989; **66**:2667-2674.
618. Windsor ACJ, Walsh CJ, Mullen PG, Cook DJ, Fisher BJ, Blocher CR, Lee-per-Woodford SK, Sugerman HJ, Fowler AA. **Tumor necrosis factor-a blockade prevents neutrophil CD 18 receptor upregulation and attenuates acute lung injury in porcine sepsis without inhibition of neutrophil oxygen radical generation.** *J Clin Invest* 1993; **91**: 1459-1468.
619. Harada A, Sekido N, Akasoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushina K. **Essential involvement of interleukin-8 in acute inflammation.** *J Leukoc Biol* 1994; **56**: 559-564.
620. Haslam PL, Turton CWG, Lukoszek A, Salsbury AJ, Dewar A, Collins JV, Turner-Warwick M. **Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in crypto-genic fibrosing alveolitis and their relation to therapy.** *Thorax* 1980; **35**:328-339.
621. Oyarzun MJ, Clements JA. **Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators and prostaglan-dins in the rabbit.** *Am J Respir Crit Care Med* 1978; **117**:879-891.
622. Frankel RA, Narahara H, Eguchi H, Toyoshima K, Johnston JM. **Metabolism of hexadecanol by rat type II pneumocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **196**:885-891.
623. Kikkawa Y, Smith F. **Cellular and biochemical aspects of pulmonary surfactant in health and disease.** *Lab Invest* 1983; **49**:122-139.
624. Duncan JE, Hatch GM, Belik J. **Susceptibility of exogenous surfactant to phospholipase A₂ degradation.** *Can J Physiol Pharmacol* 1996; **74**:957-963.
625. Niewoehner DE, Rice K, Sinha AA, Wangenstein D. **Injurious effects of lysophosphatidylcholine on barrier properties of alveolar epithelium.** *J Appl Physiol* 1987; **63**:1979-1986.
626. Zhou W, McColum MO, Levine BA, Olson MS. **Role of platelet-activating factor in pancreatitis-associated acute lung injury in the rat.** *Am J Pathol* 1992; **140**:971-979.
627. Casals C, Herrera L, Miguel E, Garcia-Barreno P, Municio A. **Comparison between intra- and extracellular surfactant in respiratory distress induced by oleic acid.** *Biochim Biophys Acta* 1989; **1003**:201-203.
628. Leung S, Ziboh VA, Moller Blair DJ, Pobbins DL. **Isolation and purification of anticardiolipin antibody from plasma of a patient with antiphospholipid syndrome: induced generation of platelet thromboxane A₂ synthesis.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; **55**: 385-393.



629. Carreras LO., Vermylen JG. **Lupus anticoagulant and thrombosis—possible role of inhibition of prostacyclin formation.** *Thromb Haemost* 1982; **48**: 38-40.
630. Taylor FB Jr, He HE., Chang AC, Box J, Ferrell G Lee D, Lockhart M, Peer G, Esmon CT. **Infusion of phospholipids vesicles amplifies the local response to TNF and anti-protein C into a consumptive response.** *Thromb Haemost* 1996; **75**: 578-584.
631. Triplett DA, **Antiphospholipid antibodies: Proposed mechanisms of action.** *Am J Reprod Immunol* 1992; **28**:211-215.
632. Zipser B, Bradford JJ, Hollingsworth RI. **Cholesterol and its derivatives, are the principal steroids isolated from the leech species *Hirudo medicinalis*.** *Comp Biochem Physiol* 1998; **120**:269-282.
633. Madonna A, Voorhees KJ, Hadfield TL, Hilyard EJ. **Investigation of cell culture media infected with viruses by pyrolysis mass spectrometry: implications for bioaerosol detection.** *J Am Soc Mass Spectrom* 1999; **10**:502-511.

