



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**
Διευθυντής - Καθηγητής: Σ.Η. Κωνσταντόπουλος

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΜΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ
ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΜΙΑΝΤΟ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΡΧΙΜΑΝΔΡΙΤΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



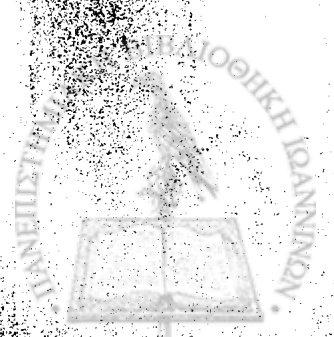
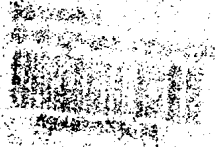
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336987



Αρ. εισ.:.....(11042).....2063..





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**
Διευθυντής - Καθηγητής: Σ.Η. Κωνσταντόπουλος

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΜΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ
ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΜΙΑΝΤΟ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΡΧΙΜΑΝΔΡΙΤΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης της κ. Αρχιμανδρίτη Δήμητρας: 23-10-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 524^α/27-1-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δαλαβάγκα Παναγιώτα –Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας – Εμβρυολογίας

Κούκκου Άννα –Ειρήνη Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 5-2-2004

«Βιοχημική μελέτη προϊόντων κυττάρων του πνεύμονα σε άτομα με μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο »

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 610^α/19-6-2007

Αγνάντη Νίκη	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντόπουλος Σταύρος	Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δαλαβάγκα Παναγιώτα- Άννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας – Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαραλαμπίδης Σταύρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική- Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκκου Άννα- Ειρήνη	Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 26-6-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, πως η έκθεση στον αμιάντο προκαλεί πνευμονική ίνωση, κακοήθες μεσοθηλώματα του υπεζωκότα και υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις. Οι μελέτες αναφέρονται κυρίως στην επαγγελματική έκθεση στον αμιάντο, δηλαδή σε πληθυσμούς που έχουν εκτεθεί σε αμιάντο λόγω της εργασίας τους κατά την εξόρυξη και την επεξεργασία του.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε πληθυσμός στην περιοχή του Μετσόβου, που έχει εκτεθεί σε αμιάντο όχι επαγγελματικά, αλλά επειδή χρησιμοποιούσε αμιαντούχο υλικό για οικιακή χρήση.

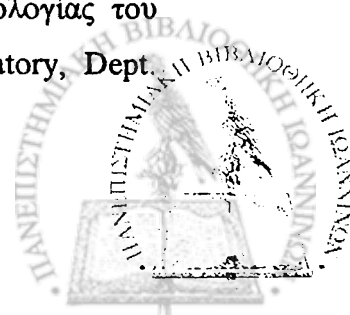
Τα άτομα αυτά έχει δείχθει από προηγούμενες εργασίες της ομάδας μελέτης του «πνεύμονα Μετσόβου», της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ότι αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην εισπνοή ινών αμιάντου. Σε ποσοστό 40% ο πληθυσμός αυτός εμφανίζει στην απλή ακτινογραφία θώρακος αποτιτανώσεις του υπεζωκότα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Τα υπόλοιπα μέλη του πληθυσμού δεν εμφανίζουν καμμία παρέκκλιση από τις φυσιολογικές εικόνες.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η περαιτέρω διερεύνηση του διαφορετικού αυτού τρόπου αντίδρασης του πνεύμονα στην εισπνοή ινών αμιάντου.

Η προσπάθεια αυτή πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ατόμων από την περιοχή του Μετσόβου.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης αλλά και άλλες μεθόδους της προτεομικής και είχε ως αποτέλεσμα την διαπίστωση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών. Οι διαφορές αυτές πιστοποιήθηκαν με φασματογραφία μάζας και οι πρωτεϊνικές κηλίδες που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν συγκρινόμενες με τις πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων -η οποία είναι διαθέσιμη στο διαδίκτυο- που σχηματίζουν τον χάρτη του BAL.

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από την ερευνητική υποτροφία της Πνευμονολογίας από την Glaxo Smith Kline και εκπονήθηκε στην Πνευμονολογική Κλινική και το εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου της Σιέννα της Ιταλίας (Functional Proteomics Laboratory, Dept. Molecular Biology, University of Siena, Italy).



Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την συμβολή τους στη περάτωση της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Σταύρο Κωνσταντόπουλο, Καθηγητή της Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής, που με προέτρεψε να ασχοληθώ με αυτά τα σπάνια δείγματα και μου προσέφερε τη δυνατότητα ανάληψης πρωτοβουλιών.

Η ολοκλήρωση της Διατριβής αυτής θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συνεχή επίβλεψη και τη συμπαράσταση των μελών της συμβουλευτικής επιτροπής, της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Γιωτάννας Δαλαβάγκα και της Επικούρου Καθηγήτριας Άννας Κούκκου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Luca Bini και τον Dr Riccardo Cianti, για την βοήθεια, τις συμβουλές και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, επιτρέποντάς μου να χειριστώ τον εξοπλισμό του εργαστηρίου τους. Με έκαναν μέλος της ομάδας τους και συμμετοχο σε κάθε δραστηριότητα του εργαστηρίου τους.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου της Βιοχημείας του τμήματος Χημείας. Συνεργαστήκαμε άψογα και διευκόλυναν την εργασία μου, παρέχοντάς μου τον εξοπλισμό και την συμπαράστασή τους.

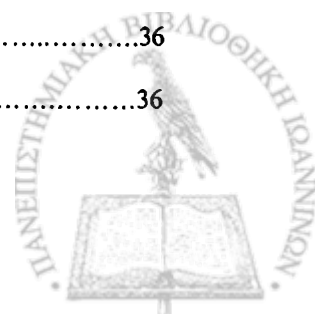
Ευχαριστώ όλους τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση. Και ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τον Πέτρο που υποστήριξαν τις επιλογές μου με κάθε μέσο που διέθεταν και με έμαθαν να μην παραιτούμαι στα δύσκολα.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 ΠΝΕΥΜΩΝ ΜΕΤΣΟΒΟΥ	3
1.2 ΑΜΙΑΝΤΟΣ	5
1.3 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΑΙΚΗ ΕΚΠΛΥΣΗ (BRONCHOALVEOLAR LAVAGE / BAL).....	7
1.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ BAL.....	8
1.4 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ.....	9
1.4.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ.....	12
1.4.2 ΟΡΓΑΝΑ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ.....	16
1.4.3 ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ : ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	19
1.4.4 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ.....	22
1.4.5 DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS (DIGE).....	23
1.5 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΤΟΥ BAL.....	26
1.6 ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΧΑΡΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ ΤΟΥ BAL	29
2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΥΛΙΚΑ –ΜΕΘΟΔΟΙ).....	33
2.1.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	35
2.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΓΡΟ.....	35
2.1.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΛΙΚΟΥ.....	36
2.1.4 ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΟΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ (H&E).....	36



2.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	37
2.2.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ BRADFORD	38
2.2.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ LOWRY	39
2.3	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΙΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ (2-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS / 2-DE). ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ.....	40
2.3.1	ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ-ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΗ PROTEAN® Pi xi Cell Assembly Guide.....	40
2.3.2	ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ- ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΑΠΙΩΝ (strips).....	41
2.4	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΙΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ. ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ SDS –PAGE (Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου).....	43
2.4.1	ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΦΟΛΙΤΩΝ.....	43
2.4.2	ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΤΑΠΙΕΣ.....	44
2.5	ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	45
2.5.1	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ.	45
2.5.2	ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΗΚΤΕΣ.....	46
2.5.3	ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΕΣ ΠΗΚΤΕΣ, ΣΥΜΒΑΤΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ (Mass-Spectrometry).....	47
2.6	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΚΤΕΙΘΕΙΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	48
2.7	ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΑΣ.....	49
2.7.1	ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΗΛΙΔΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΠΕΨΗ ΜΕ ΤΡΥΨΙΝΗ.....	49
2.8	DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS (DIGE).....	50
2.8.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ.....	50
2.8.2	ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ -ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ.....	51



2.8.3	ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ: SDS –PAGE.....	51
2.8.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ.....	52
2.9	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ CLUSTERING.....	53
3.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΒΑΛ ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΕΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ.....	57
3.2	ΠΡΟΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	61
3.2.1	ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ.....	64
3.2.2	ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ pH ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ.....	66
3.2.3	ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ.....	70
3.3	HIERARCHICAL CLUSTERING.....	80
3.4	ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ.....	83
3.5	ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΗΛΙΔΩΝ.....	91
3.6	ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	94
3.7	ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ DIGE.....	97
4	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	99
5	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	119
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
7.	SUMMARY	



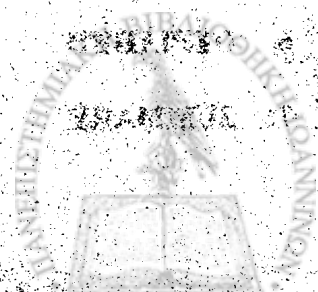
Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Second block of faint, illegible text, appearing as several lines of a document.

Third block of faint, illegible text, continuing the document's content.

Fourth block of faint, illegible text, showing more lines of the document.

Fifth block of faint, illegible text, possibly a concluding paragraph or signature area.



1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1.1 ΠΝΕΥΜΩΝ ΜΕΤΣΟΒΟΥ

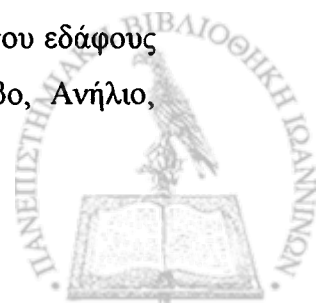
Σε μεγάλο αριθμό των κατοίκων τεσσάρων χωριών της περιοχής Μετσόβου (Μέτσοβο, Ανήλιο, Μηλιά και Βοτονόσι), βρέθηκε από την ερευνητική ομάδα της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με επικεφαλής τον Καθηγητή Σ.Κωνσταντόπουλο, ότι η περιβαλλοντική έκθεση σε αμιαντιούχο υλικό ασπρίσματος είχε προκαλέσει υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις και κακοήθη μεσοθηλιώματα (Σαραντζής, 1988, Constantopoulos et al., 1985).

Αρχικά με τη συλλογή των πρώτων ακτινογραφιών έγινε αντιληπτό ότι αποτιτανώσεις, εμφανίζονται αποκλειστικά σε άτομα από τα τέσσερα χωριά της περιοχής Μετσόβου και μάλιστα σε ηλικίες άνω των 30 ετών. Σχεδόν ο ένας στους δύο από τους κατοίκους που ελέχθηκαν εμφάνιζε αποτιτανώσεις του υπεζωκότα. Αποτιτανώσεις υπήρχαν και στα δύο φύλα, ενώ η συχνότητα και το μέγεθος τους αυξανόταν σταθερά με την ηλικία (Constantopoulos et al., 1985)

Έτσι από τα πρώτα στάδια της μελέτης μετά την ανάλυση των ακτινολογικών ευρημάτων και την διαπίστωση ότι το φαινόμενο είναι ενδημικό, φάνηκε η πιθανότητα για την περιβαλλοντική έκθεση των κατοίκων σε αμίαντο.

Άλλωστε ο συνδυασμός των αποτιτανώσεων και των μεσοθηλιωμάτων στον ίδιο πληθυσμό ήταν που οδήγησε στη σκέψη για πιθανή έκθεση σε αμίαντο. Όπως οι αποτιτανώσεις έτσι και η συχνότητα μεσοθηλιώματος σε κατοίκους της περιοχής ήταν πολύ υψηλή (300 φορές μεγαλύτερη συχνότητα από την προβλεπόμενη στον γενικό πληθυσμό). Η συχνότητα αυτή μπορεί να συγκριθεί μόνο με αυτή που παρατηρείται σε άτομα με επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο.

Αφού λοιπόν αποτιτανώσεις και μεσοθηλιώματα είναι όλες εκδηλώσεις έκθεσης σε αμίαντο, ήταν φυσικό να διερευνηθεί στη συνέχεια εάν το φαινόμενο σχετίζεται με εισπνοή ινών αμιάντου. Σε όλα τα ιστικά δείγματα που ελήφθησαν με διαβρογκικές βιοψίες, η εργαστηριακή ανάλυση έδειξε ίνες τρεμολίτη και μάλιστα σε μεγάλη πυκνότητα (Constantopoulos, 1985). Μετά την διαπίστωση ότι οι αποτιτανώσεις πλέον σχετίζονται με εισπνοή ινών τρεμολίτη άρχισε η αναζήτηση της πηγής των ινών στο περιβάλλον. Έτσι η έρευνα για υλικά που είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν οδήγησε σε ένα ορυκτό που οι κάτοικοι το ονομάζουν «λούτο» (άσπρος πηλός). Η εξόρυξη του υλικού αυτού γινόταν από επιφανειακά στρώματα του εδάφους κοντά στο χωριό Μηλιά και πουλιόνταν στα άλλα 3 χωριά. Μέτσοβο, Ανήλιο, Βοτονόσι.



Το λούτο αναλύθηκε εργαστηριακά και βρέθηκε ότι αποτελείται από ίνες τρεμολίτη. Φαίνεται πια ότι είναι ο υπεύθυνος παράγοντας της ενδημικής αμιάντωσης στην περιοχή Μετσόβου (Langer et al,).

Στην περιοχή Μετσόβου διαδραματίστηκε και βρίσκεται σε εξέλιξη, ένα πείραμα επί των ανθρώπων, εισπνοής μιας μόνο ποικιλίας ινών αμιάντου τρεμολίτη (τύπου C).

356

J. O. WAGNER ET AL.

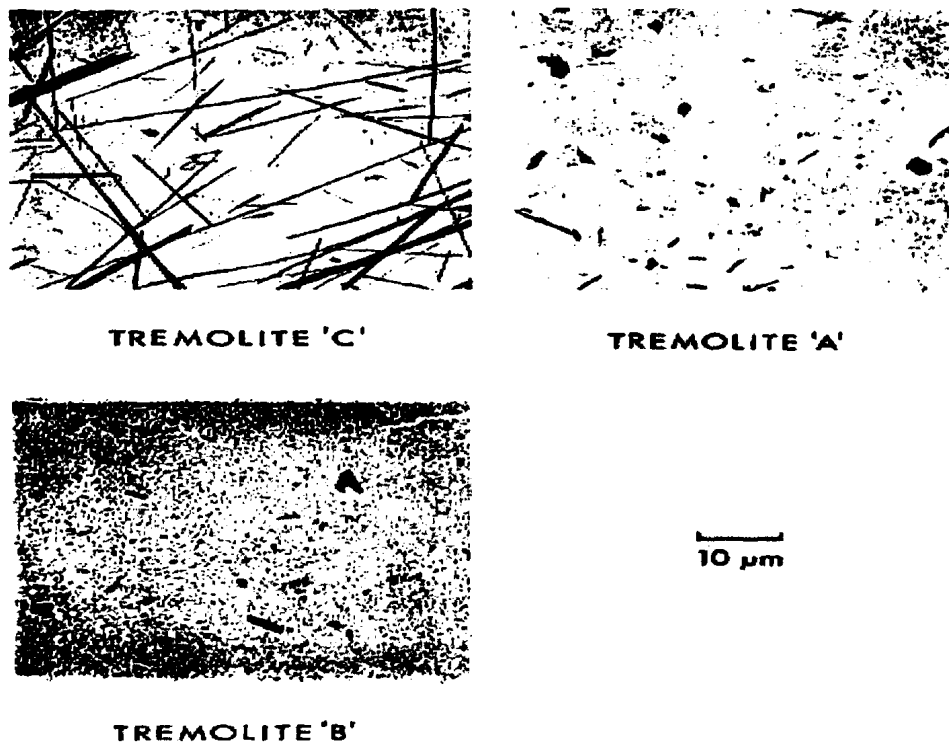


FIG. 4.—Electron micrographs of the 3 samples of Tremolite.

Rats receiving SEA chrysotile served as positive controls in this experiment.

Samples B and C were injected into groups of 48 Sprague-Dawley rats; a group of 32 animals receiving UICC crocidolite served as positive controls.

Rats were 8-10 weeks old when injected and were allowed to live out their lives.

In vitro toxicity

Esophage release from mouse peritoneal macrophages.—Mouse peritoneal macrophages were obtained from 22-27g Swiss TO mice (Tuck and Son Ltd, Battlebridge, Essex) by peritoneal lavage using 3-5 ml Medium 199 containing 5 i.u. heparin, 100 i.u. benzyl-

Εικ 1.1: Στη εικόνα περιγράφονται οι διαφορετικοί τύποι του αμιάντου. Ο τύπος του αμιάντου ενρέθηκε στα υπό εξέταση δείγματα των Μετσοβιτών ανήκει στον τύπο C (Wagner et al 1982).



1.2 AMIANTOS

Αμίαντος (asbestos) είναι ο γενικός όρος για μια κατηγορία ορυκτών πυριτικής φύσης, που διαφέρουν στην στοιχειομετρική τους σύνθεση, αλλά έχουν παραπλήσιες ιδιότητες και αποτελούνται από ίνες διαφόρων μεγεθών. Με βάση τα ορυκτολογικά τους χαρακτηριστικά, διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τους σερπεντίνες και τους αμοφοβόλιτες (Craighead JE et al., 1982,4). Όλοι οι τύποι αμιάντου είναι ένυδρα πυριτικά άλατα.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, με την αύξηση της χρήσης του αμιάντου, εμφανίζονται οι πρώτες ιατρικές ανακοινώσεις για τις βλαπτικές του επιδράσεις. Το 1920 είναι πλέον γνωστό ότι προκαλεί πνευμονική ίνωση .

Το 1960 γίνεται αντιληπτό ότι μικρή χρονικά έκθεση σε αμίαντο, μπορεί να προκαλέσει ύστερα από χρόνια, κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (Wagner et., 1960). Το 1967 αναγνωρίζεται η σχέση του με τον καρκίνο των βρόγχων (Selikoff et al., 1967).

Ο υπεζωκότας είναι ορογόνος χιτώνας, που περιβάλλει τον πνεύμονα. Αποτελείται από δύο πέταλα, περίτονο (τοιχωματικό, parietal) και σπλαχνικό (visceral), τα οποία ενώνονται στην περιοχή της πύλης του πνεύμονα. Τα δύο πέταλα επενδύονται από μεσοθηλιακά κύτταρα τα οποίων ο υποκείμενος συνδετικός ιστός σχηματίζει λεπτή στιβάδα, που περιέχει κολλαγόνες και ελαστικές ίνες (Selikoff et al., 1968).

Υπεζωκοτική πλάκα (pleural plaque) είναι βλάβη που οφείλεται στην έκθεση σε αμίαντο. Αποτελεί περιγεγραμμένη περιοχή συνδετικού ιστού, πλούσια σε κολλαγόνο, που εντοπίζεται στο περίτονο πέταλο του υπεζωκότα. Συχνά λόγω της εναπόθεσης ασβεστίου είναι εύκολα ορατή στην απλή ακτινογραφία σαν αποτιάνωση (Hirsch, 1975).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση έκθεσης σε αμίαντο και εμφάνισης υπεζωκοτικών πλακών. Είναι γενικά αποδεκτό ότι μεσολαβεί μεγάλο χρονικό διάστημα από την αρχή της έκθεσης μέχρι την εμφάνιση των πλακών. Τουλάχιστον 15-20 χρόνια είναι απαραίτητα (Anderson, 1978)



Σε ποίο τμήμα του αναπνευστικού συστήματος θα εγκατασταθούν οι ίνες του αμιάντου εξαρτάται από το σχήμα και τις διαστάσεις τους. Τελικά οι μεγάλες ίνες θα εναποτεθούν στο ανώτερο αναπνευστικό, ενώ οι μικρότερες θα φθάσουν στους τελικούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες όπου ανιχνεύονται ίνες μήκους $<5\mu$ και διαμέτρου $<0,5\mu$ (Craighead et al., 1982).

Οι ίνες χρυσοσίλη, επειδή έχουν σγουρή διαμόρφωση, εμφανίζουν αεροδυναμικά μεγάλη διάμετρο διατομής και παγιδεύονται σε μεγάλους βρόγχους. Αντίθετα οι ίνες των αμιφβολιτών με διαμόρφωση δόρατος, αεροδυναμικά συμπεριφέρονται σαν «ακόντια» με διάμετρο συχνά $<0,5\mu$ και για αυτό φθάνουν εύκολα στο πνευμονικό παρέγχυμα (Becklake, 1976).

Ο παθογενετικός μηχανισμός δράσης των ινών αμιάντου δεν είναι σαφής σίγουρα όμως ενοχοποιείται και η άμεση τοξική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη και σε ενδοκυττάρια οργανίδια. Ένας από τους τρόπους που οι ίνες αμιάντου προκαλούν ιστική βλάβη είναι μέσω παραγωγής τοξικών ριζών οξυγόνου. Η ικανότητα του αμιάντου να ευοδώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμιάντου συσχετίζονται με την κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνο δράση του και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την προσρόφηση, στην επιφάνειά του, βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες (Folini G, et al 2006).



1.3 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΕΚΠΛΥΣΗ / BAL

(BRONCHOALVEOLAR LAVAGE)

Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση, είναι μια τεχνική ελάχιστα παρεμβατική, σχετικώς εύκολη για τον έμπειρο εξετάζοντα με καλή επαναληψιμότητα, καλά ανεκτή από τον εξεταζόμενο, χωρίς αξιόλογες παρενέργειες. Εκτελείται κατά την διάρκεια βρογχοσκοπήσεως με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο το οποίο ενσφηνώνεται συνήθως σε έναν υπομηγματικό βρόγχο του μέσου λοβού, εκτός εάν υπάρχει ένδειξη για κάποια άλλη συγκεκριμένη περιοχή. Δια του αυλού βιοψίας εγχέεται βραδέως μικρή ποσότητα φυσιολογικού ορού ο οποίος στην συνέχεια επαναροφάται. Το υγρό που έχει επαναροφηθεί περιέχει κύτταρα, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και ηλεκτρολύτες από την επιφάνεια των κυψελίδων.

Η μελέτη των μεταβολών των συστατικών του υγρού, έχει αποκαλύψει την εμπλοκή ορισμένων εξ αυτών σε παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς ασθενειών του πνεύμονα (Semenzano 1989).

Το 90-95% των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος σε φυσιολογικές καταστάσεις (το σύνολο των κυττάρων είναι περίπου 150.000 κύτταρα/ml εκπλύματος), αποτελείται από μακροφάγα. Η δεύτερη σε ποσοστιαία αναλογία ομάδα κυττάρων, 5-10%, είναι η ομάδα των λεμφοκυττάρων ενώ τα πολυμορφοπύρρηνα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα) εμφανίζονται σε πολύ μικρά ποσοστά. Ανάλογα με τις ασθένειες, αυτές οι αναλογίες των κυττάρων διαφοροποιούνται σημαντικά.

Οι πρωτεΐνες που έχουν μετρηθεί στην υγρά φάση του εκπλύματος υγρών ατόμων, αντιστοιχούν σε 15 mg σε όγκο περίπου 150ml εκπλύματος. Αυτές οι πρωτεΐνες στο μεγαλύτερο ποσοστό τους προέρχονται από το αίμα. Σε μικρότερο ποσοστό παράγονται από τα κύτταρα του πνεύμονα ενώ κατά την διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, παράγονται και από τα φλεγμονώδη κύτταρα που συρρέουν στην περιοχή. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύουμε σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι η αλβουμίνη, που αποτελεί το 30-35% των συνολικών πρωτεϊνών και οι ανοσοσφαιρίνες, οι IgG που αποτελούν το 15% και οι IgA που αποτελούν το 5% του συνόλου των πρωτεϊνών. Άλλες πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σταθερά είναι παράγοντες του συμπληρώματος (C4, C3, C6), ανοσοσυμπλέγματα, τρανσφερίνη, α-1 αντιθρυψίνη, και πολλά ένζυμα και άλλα προϊόντα των κυψελιδικών μακροφάγων.



1.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

Στον φυσιολογικό πνεύμονα τα κύτταρα της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης αποτελούνται κυρίως, από μακροφάγα σε ποσοστό >90%, λεμφοκύτταρα σε ποσοστό 5-10% και σπάνια ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα.

Με την χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, τα λεμφοκύτταρα χρωματίζονται ιώδη. Είναι μικρά κύτταρα με σφαιρικό πυρήνα πυκνοχρωματικό, που καταλαμβάνει όλη την έκταση του κυττάρου και λίγο κυτταρόπλασμα που κατανέμεται ως δακτύλιος γύρω από τον πυρήνα.

Τα μακροφάγα είναι μεγάλα κύτταρα. Ο πυρήνας είναι συνήθως στη περιφέρεια και είναι νεφροειδής. Όταν ο πυρήνας είναι σφαιρικός φέρει εντομή. Ενίοτε τα μακροφάγα έχουν δυο πυρήνες. Η χρωματίνη του πυρήνα είναι λιγότερο συμπυκνωμένη και εξαιρετικά λεπτής κατανομής γι' αυτό οι πυρήνες των μακροφάγων είναι πιο ανοιχτόχρωμοι απ' ότι αυτοί των λεμφοκυττάρων. Το κυτταρόπλασμα των μακροφάγων είναι κοκκιώδες, η επιφάνεια τους είναι ανώμαλη.

Υπάρχει περίπτωση στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, να ανιχνεύονται μικρά μακροφάγα στο μέγεθος των λεμφοκυττάρων οπότε το σχήμα του πυρήνα είναι διαγνωστικό.



1.4 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

Είναι τεράστια τα βήματα που έχουν γίνει με στόχο να κωδικοποιηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που αποτελούν την βάση των πιο σημαντικών λειτουργιών των εμβίων όντων. Αρκεί να σκεφτούμε ότι περισσότεροι από 200 διαφορετικοί οργανισμοί, έχουν αλληλουχηθεί πλήρως σε επίπεδο γονιδιώματος .

Το 2001 ολοκληρώθηκε η πλήρης αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος (International Human Genome Sequencing Consortium 2001: Venter et al 2001).

Αυτή η έρευνα αποτελεί ένα πολύ μεγάλο επίτευγμα. Παρ' όλα αυτά δεν είναι σε θέση να μας δώσει μια ολοκληρωμένη και αποτελεσματική πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Σε γενικές γραμμές η αποτύπωση του γονιδιώματος, δεν μπορεί να μας δώσει όλες τις πληροφορίες για την τελική μορφολογία και την λειτουργία των κυττάρων, των ιστών και κατά συνέπεια του οργανισμού.

Έτσι πριν καν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα για το ανθρώπινο γονιδίωμα, ένα καινούριο αντικείμενο έρευνας εμφανίστηκε για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών που πήρε την ονομασία πρωτεομική. Εάν η δεκαετία του 90 χαρακτηρίστηκε ως δεκαετία του γονιδιώματος , η πρώτη δεκαετία του αυτού του αιώνα χαρακτηρίστηκε ως δεκαετία της πρωτεομικής. (Anderson et al 2001)

Ο όρος πρωτεομική περιλαμβάνει την μελέτη όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται από ένα γονιδίωμα μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ταυτοχρόνως περιγράφει και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Κύριος σκοπός είναι να κωδικοποιηθούν οι μηχανισμοί ελέγχου της γενετικής έκφρασης. (Anderson and Anderson 1998)

Πρέπει να θεωρήσουμε ότι ο κόσμος των πρωτεϊνών είναι πιο σύνθετος από εκείνον των νουκλεϊνικών οξέων. Αυτό συμβαίνει επειδή η γνώση απλώς και μόνο της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, δεν επαρκεί για να καθορίσει τις λειτουργικές ιδιότητές τους και την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλα στοιχεία.

Ένα συγκεκριμένο κύτταρο, κάποιου ιστού, σε μια συγκεκριμένη στιγμή της ανάπτυξης του οργανισμού στον οποίο ανήκει, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζει όλες τις πρωτεΐνες, του γενετικού υλικού. Συνεπώς η σχέση της πρωτεομικής και το γονιδιώματος δεν είναι γραμμική. (Cahill et al 2001)

Αυτή η πολυπλοκότητα οφείλεται, κυρίως στο γεγονός ότι, το αλφάβητο για την περίπτωση των πρωτεϊνών είναι πιο μεγάλο από εκείνο των νουκλεϊνικών οξέων, (4 νουκλεοτίδια για το DNA, 20 αμινοξέα για τις πρωτεΐνες). Επίσης τα πολυπεπτίδια που μεταφράζονται από τα πρωτογενή μεταγραφήματα του m-RNA, υφίστανται



ποικίλες τροποποιήσεις μέχρι να πάρουν την τελική τους μορφή (Stryer Biochemistry, 1988)

Η μεγάλη διαφορά μεταξύ του χάρτη του γονιδίου μιας πρωτεΐνης και ενός αντίστροφα μεταγραφόμενου m-RNA της ίδιας πρωτεΐνης, είναι ότι το γονιδιακό DNA περιέχει μη κωδικεύουσες περιοχές μεταξύ των κωδικευουσών περιοχών. Αυτές οι τροποποιήσεις συμβαίνουν επειδή το πρωτογενές μεταγράφημα, αποτελείται από κωδικεύουσες περιοχές (exons) και από μη μεταγραφόμενες ενδιάμεσες περιοχές (introns, ιντρόνια) που πρέπει να απομακρυνθούν από το m-RNA. Στην συνέχεια οι κωδικεύουσες περιοχές συνδέονται με ένα ένζυμο διάσπασης και επανασύνδεσης (μάτισμα) και αυτές οι περιοχές αποτελούν πιά το ώριμο m-RNA.

Πολλά εξόνια κωδικεύουν διακριτά δομικά και λειτουργικά τμήματα πρωτεϊνών. Η ανάμειξη των εξονίων είναι ένας γρήγορος και αποτελεσματικός τρόπος με τον οποίον το DNA μπορεί να διασπαστεί και να επανασυνδεθεί χωρίς να υπάρχουν βλαβερές επιδράσεις στις κωδικεύουσες περιοχές. Αντίθετα, η ανταλλαγή αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών εξονίων συνήθως καταλήγει σε απώλεια της λειτουργίας.

Τα ιντρόνια από την άλλη, είναι μεγάλες παρεμβαλλόμενες μη κωδικεύουσες περιοχές του DNA όπου αυτό μπορεί να διασπαστεί και να επανασυνδεθεί χωρίς να υπάρχουν βλαβερές επιδράσεις στις κωδικεύουσες πρωτεΐνες.

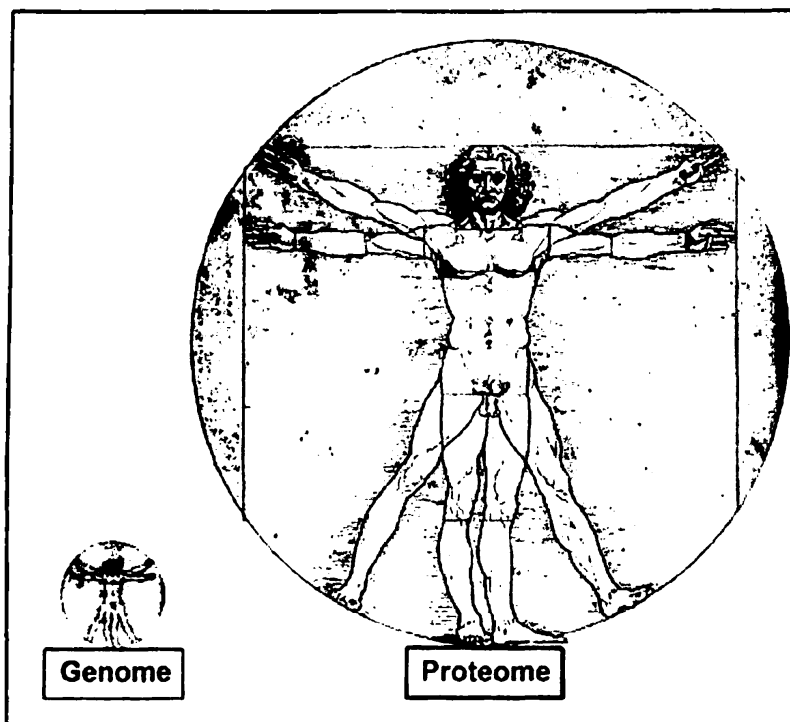
Η εναλλακτική διάσπαση και επανασύνδεση (alternative splicing) είναι ένας τρόπος δημιουργίας μιας ποικιλίας πρωτεϊνών οι οποίες, είναι τροποποιήσεις ενός βασικού μοτίβου ανάλογα με το πρόγραμμα της ανάπτυξης ενός κυττάρου. Οι πρωτεΐνες μπορούν να τροποποιηθούν και μετά την σύνθεση τους. Οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν την δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών και επιτυγχάνονται με την προσθήκη στην αρχική ένωση, ομάδων σακχάρων, φωσφορικών ή θειϊκών ομάδων, μεθυλίων και λιπιδίων. Για παράδειγμα, μερικά αμινοξέα όπως η σερίνη, η τυροσίνη, η θρεονίνη μπορούν να φωσφορυλιωθούν, μερικά σάκχαρα όπως η N-ακετυλγλυκοσαμίνη μπορούν να ενωθούν με την υδροξυλική ομάδα της θρεονίνης ή της σερίνης ή με την αμινομάδα της ασπαραγίνης σχηματίζονται τις γλυκοπρωτεΐνες. Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης, συχνά εξαρτάται από αυτές τις τελικές τροποποιήσεις (Gooley A and Packer N σελίδα 66-67 Hochstrasser Eds).

Για παράδειγμα, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μετάδοση του σήματος και άλλοι μηχανισμοί ανάπτυξης των ευκαρυωτικών οργανισμών εξαρτώνται από τους

κύκλους φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών (Williams e Hochstrasser 1997).

Η μελέτη αυτών των πρωτεϊνών, με τις μεθόδους τις πρωτεομικής μπορεί να μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την μεταγραφή, τις τροποποιήσεις και την λειτουργία τους. Έχει ήδη δημιουργηθεί ένα πρόγραμμα του Ανθρώπινου Προτεόματος (<http://www.hupo.org>) που περιλαμβάνει το σύνολο των γνώσεων για τις διαφοροποιήσεις και την καταγραφή των πρωτεϊνών (Hanash 2004).

Wattiez R., Falmagne P. *Journal of Chromatography B*, (2005), 815,169–178



Εικ 1.2 Η περιοχή που περικλείεται στον κύκλο, παριστάνει τον άνθρωπο Vitruviano του Leonardo Da Vinci και παριστάνει την έκταση του γονιδιώματος (αριστερά) και του πρωτεόματος (δεξιά).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι περίπου 26.000-31.000 (Baltimore D., 2001), ενώ ο συνολικός αριθμός των ανθρώπινων πρωτεϊνών, που περιλαμβάνουν τις μεταφραστικές τροποποιήσεις με εναλλακτικό μάτισμα είναι περίπου ένα εκατομύριο (Godovac-Zimmermann J and Brown LR. 2001)

Οι κλασσικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ακόμα στην καθημερινή πράξη για την ανάλυση των πρωτεϊνών ενός δείγματος είναι το test Elisa ή το Western Blot που είναι σε θέση να ταυτοποιήσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Οι εξελίξεις στον χώρο της βιολογικής χημείας, συνετέλεσαν στην βελτίωση της τεχνολογίας, που είχε ως αποτέλεσμα τον ευρείας κλίμακας χαρακτηρισμό των ανθρώπινων πρωτεϊνών. Η μελέτη του προτεόματος, δίνει την ευκαιρία σε νέες υποθέσεις και καινούριες ανακαλύψεις. (Hirsch J et al 2004)

Οι πληροφορίες που απορρέουν από τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης μπορούν να διαφωτίσουν διάφορους τομείς όπως η μεταγωγή σήματος (Sackic et al 1999), η ογκογένεση (Oslerward et al 1999), η ανάλυση της δράσης των φαρμάκων (Steiner and Anderson 2000), η τοξικότητα (Kanitz 1999).

Σήμερα η πρωτεομική προσέγγιση βρίσκει εφαρμογές στο κλινικό πεδίο αποτελώντας μέσο διάγνωσης και πρόγνωσης. Βρίσκει ακόμη εφαρμογές και στην βιομηχανία φαρμάκων αναλύοντας την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα καινούριων φαρμάκων. Και βέβαια στην διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών και αιτίων ποικίλων νοσημάτων.

1.4.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

Η μεγάλη συνεισφορά στην μελέτη των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε με την χρήση της ηλεκτροφόρησης διπλής διάστασης (2-D, 2 Dimentional Electrophoresis) και του φασματογράφου μάζας (Ezzell 2002). Τα συστήματα της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν για να αναλύσουν ένα μίγμα πρωτεϊνών, άρχισαν να αναπτύσσονται από τον Tiselius από το 1930.

Η πρώτη ιδέα για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες σε δυο διαστάσεις, αφ' ενός με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και αφ' ετέρου με βάση το μοριακό βάρος, είχε προταθεί από τους Smithies and Poulik το 1956.

Την δεκαετία του 1960 η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) είχε εισαχθεί σαν ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης από τους Dale και Latner (1969) και Marko και

Stegemann (1970). Αργότερα η χρησιμοποίηση του SDS (Sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο), από τους Martini and Gould (1971) και Barrett and Gould (1973) αποτέλεσε την βασική μέθοδο για την δεύτερη διάσταση της ηλεκτροφόρησης. Οι ίδιες μέθοδοι αναπτύχθηκαν καλύτερα από τους Klose (1975) και Scheele (1975). Η αρχή λειτουργίας της ηλεκτροφόρησης διπλής διάστασης (2-DE) βασίζεται αρχικά στην ισοηλεκτρική εστίαση, που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Στην συνέχεια ακολουθεί δεύτερη ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS οπότε οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση με το μοριακό βάρος τους.

Οι παράμετροι αυτού του διαχωρισμού, επιτρέπουν να αποτυπωθούν πρωτεΐνες που διαφέρουν ακόμη και κατά ένα ηλεκτρικό φορτίο. Το εξαιρετικά σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι επομένως η μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός μείγματος και η επαναληψιμότητά της. Χιλιάδες πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση μικρές διαφορές στο φορτίο τους.

Μία άλλη μέθοδος διαχωρισμού είναι η χρωματογραφία. Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια από τις κυριότερες μεθόδους διαχωρισμού πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων μορίων που βρίσκονται σε μορφή διαλύματος και έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την στερεά φάση της στήλης που χρησιμοποιείται κατά την ανάλυση. Επιτυγχάνεται δηλαδή ειδική δέσμευση των πρωτεϊνών με το υλικό της στήλης.

Η ανάλυση στην υγρή χρωματογραφία γίνεται σε μια στήλη, που περιέχει σφαιρίδια, σε πυκνή διάταξη. Το μίγμα των πρωτεϊνών τοποθετείται στην κορυφή του γυάλινου κυλίνδρου, που περιέχει τα σφαιρίδια. Η φύση των σφαιριδίων της στήλης καθορίζει τον διαχωρισμό και συσχετίζεται με τις διαφορές στην μάζα, στο φορτίο και στην συγγένεια πρόσδεσης των πρωτεϊνών του μίγματος.

Οι μικρότερες πρωτεΐνες διατρέχουν την στήλη πιο αργά από τις μεγαλύτερες. Έτσι συλλέγονται σε διαφορετικά κλάσματα διαδοχικά, από το πυθμένα της στήλης.

Καταγράφονται τρεις τύποι υγρής χρωματογραφίας

A) Gel filtration chromatography (Χρωματογραφία διήθησης επί πήγματος): Το δείγμα μπαίνει στη κορυφή στήλης, που αποτελείται από πορώδεις κόκκους φτιαγμένους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατήσει πολύ νερό όπως η δεξτράνη, η αγαρόζη (υδατάνθρακες) το πολυακρυλαμίδιο. Τα ονόματα Sephadex, Sepharose και Biogel είναι κλασσικές εμπορικές ονομασίες αυτών των υλικών, που έχουν τυπική διάμετρο 100μm (0.1mm). Μερικά μόρια περνούν από αυτούς τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα δεν μπορούν να περάσουν. Αποτέλεσμα είναι



ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδατικό περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων (Stryer, Biochemistry, 1988/2). Τα μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα γιατί βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. Η σειρά εμφάνισης των μορίων από τη στήλη αυτή είναι αντίθετη απ' ό,τι στην ηλεκτροφόρηση όπου ένα συνεχές πολυμερές, παρεμποδίζει τη μετακίνηση των μεγάλων μορίων. Με τη χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή μπορούν να διαχωριστούν μεγαλύτερες πρωτεΐνες απ' ό,τι με τη ηλεκτροφόρηση, αλλά το τίμημα είναι ο μικρότερος βαθμός καθαρότητας στη χρωματογραφία πηκτής.

B) Ion-exchange chromatography (Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής): Ο πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση τα αρνητικά φορτία τους, με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH 7 είναι θετικό, αυτή συνήθως θα δεσμευτεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεν θα δεσμευτεί σ' αυτή τη στήλη. Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκπλυθεί (άρα να απελευθερωθεί και συλλεγεί) με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εμφανιστούν πρώτες, ακολουθούμενες από αυτές με υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων. Άλλοι παράγοντες εκτός του φορτίου, όπως η συγγένεια προς τα μέσα στήριξης μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών σε στήλες ιοντοανταλλαγής. Αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (ανιονικές πρωτεΐνες) μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία με χρήση θετικά φορτισμένης διαιθυλοαμινοαιθυλοκυτταρίνης (DEAE-κυτταρίνη). Αντίθετα, θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες (κατιονικές πρωτεΐνες) μπορούν να διαχωριστούν σε αρνητικά φορτισμένη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CM-κυτταρίνη).

Γ) Antibody –affinity chromatography (Χρωματογραφία συγγένειας): Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται γενικά για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών. Αυτή η τεχνική εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Γενικά, η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην απομόνωση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μια ομάδα X, ως εξής: (1) ομοιοπολική δέσμευση του X ή παραγώγου του σε στήλη, (2) προσθήκη του μείγματος της πρωτεΐνης στη στήλη, που στη

συνέχεια ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν και (3) έκπλυση της πρωτεΐνης που επιλέγεται με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X.

Όλες αυτές οι μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα διαχωρισμού που έχει ως βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, όπως το φορτίο, το μέγεθος, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και το ισοηλεκτρικό σημείο τους. Το πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι ευνοείται ο διαχωρισμός ακόμη και μικρών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης (Neverova I et al., 2005). Ακόμα, ο διαχωρισμός των μεμβρανικών πρωτεϊνών που είναι συνήθως λιγότερο διαλυτές, είναι καλύτερος και τα δεδομένα για επεξεργασία είναι περισσότερα.

Παρ'όλα αυτά η ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης, προτιμάται γιατί προσφέρει μια μεγάλη πιθανότητα να ταυτοποιηθούν και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, γεγονός που συντελεί στην κατανόηση της λειτουργίας, της δομής τους και της συμμετοχής τους στους μοριακούς μηχανισμούς.



1.4.2 ΟΡΓΑΝΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

Όπως έχουμε αναφέρει, η δυναμική της έκφρασης μίας πρωτεΐνης και των τροποποιήσεων της, αποτελεί την ουσία της πρωτεομικής. Είναι μια διαδικασία δύσκολη και επίπονη.

Η αλληλουχία του γονιδιώματος και η ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών, μπορούν να πραγματοποιηθούν με ένα τρόπο αυτοματοποιημένο που έχει μεγάλη επαναληψιμότητα.

Η πρωτεομική ανάλυση είναι πολύ πιο πολύπλοκη, διότι δεν υπάρχει μια μέθοδος ανάλογη ως προς την μεθοδολογία της ενίσχυσης όπως η μέθοδος της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), που αποτελεί μια τεχνική ενίσχυσης ενός τμήματος DNA, για να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες είναι εκφρασμένες σε μικρότερο βαθμό. Μια άλλη πλευρά της δυσκολίας είναι τα πολλαπλά στάδια της ανάλυσης, (πρώτη διάσταση, δεύτερη διάσταση, χρώση και τέλος ανάλυση των δεδομένων), τα οποία δεν γίνονται με αυτοματοποιημένο τρόπο.

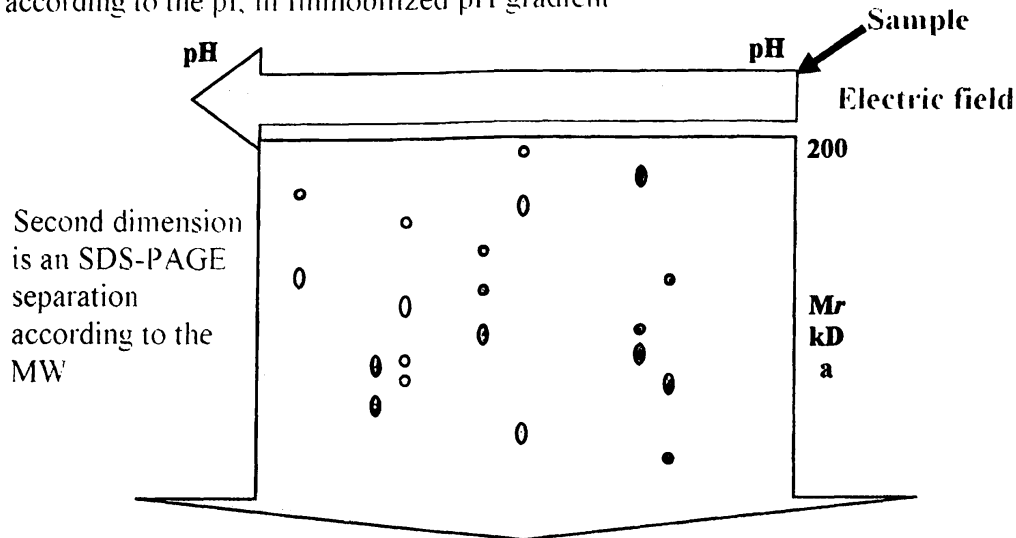
Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης της διπλής διάστασης είναι η μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μιας πληθώρας πρωτεϊνών. Είναι η μέθοδος με την οποία μπορούμε να ανιχνεύσουμε ποσοτικές ή ποιοτικές διαφορές μεταξύ μιγμάτων πρωτεϊνών και να παρακολουθήσουμε τους μηχανισμούς που συμμετέχουν σε καταστάσεις φυσιολογικές ή παθολογικές ή κάτω υπό την επίδραση φαρμάκων.

Στην ηλεκτροφόρηση της διπλής διάστασης η πρώτη διάσταση διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο, σε μια βαθμίδωση του pH, ενώ η δεύτερη διάσταση διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους βάρος. Στα ηλεκτροφορήματα ή στους πρωτεϊνικούς χάρτες που είναι αποτέλεσμα χρωματισμού με νιτρικό άργυρο (Oakley et al 1980, Hochstrasser et al 1998) τα πολυπεπτίδια διαχωρίζονται και μπορούν να αναπαρασταθούν σε καρτεσιανούς άξονες: το ισοηλεκτρικό σημείο στον άξονα των τετμημένων και το μοριακό βάρος στο άξονα των τεταγμένων.

Κάθε κηλίδα αντιστοιχεί σε μια πρωτεΐνη, που έχει διαχωριστεί σύμφωνα με τις φυσικοχημικές της ιδιότητες δηλαδή το μοριακό βάρος και το φορτίο.



First dimension is a denaturing Isoelectric Focusing separation according to the pI, in Immobilized pH gradient



Εικ 1. 3 Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης διπλής διάστασης. Αρχικά οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στην δεύτερη διάσταση με βάση το μοριακό τους βάρος.

Οι πηκτές που έχουν διαστάσεις 18 cm x 20 cm μπορούν να διαχωρίσουν μέχρι 4000 πρωτεΐνες. Βέβαια υπάρχουν και άλλες διαστάσεις πηκτών, με ποικίλες διαβαθμίσεις pH, ανάλογα με τις πρωτεΐνες που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Η χρώση του τελικού προϊόντος γίνεται με νιτρικό άργυρο (Oakley et al 1980), μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος χρώσης, περίπου 100 φορές πιο ευαίσθητη από την χρώση με Coomassie Blue.

Οι πηκτές της διπλής διάστασης, που έχουν χρωματιστεί, μετατρέπονται σε ψηφιακές εικόνες με την βοήθεια συσκευής οπτικής απορρόφησης. Στην συνέχεια γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω ειδικών λογισμικών. Υπάρχουν πολλές δυσκολίες στη επεξεργασία των αποτελεσμάτων, που οφείλονται κυρίως σε προβλήματα της ασυμφωνίας των εικόνων, λόγω της διαφοράς των διαστάσεων, της διακριτικής ικανότητας, της διαστρέβλωσης και παρεμβολής των πηκτών.

Οι ψηφιακές εικόνες που λαμβάνονται τελικώς, αναλύονται με ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας που βασίζεται σε βάση δεδομένων από ένα πλήθος ηλεκτροφορημάτων που αποτελούν συστήματα αναφοράς.

-MELANIE (Medical Electrophoresis Analysis Interactive Export System, <http://www.exspasy.ch/melanie>) (Appel et al 1997a, Appel et al 1997b),

-PDQuest® (<http://www.proteomeworks.bio-rad.com/index.htm>) (Righetti et al .2004) - Phoretix 2D (http://www.phoretix.com/products/2d_products.htm) (Mahon and Dupree 2001)

Οι κηλίδες που παριστάνονται στο ηλεκτροφόρημα , μπορούν να υπολογιστούν ποσοτικά και ποιοτικά .

Η ποσοτική εκτίμηση , πραγματοποιείται με βάση τον σχετικό όγκο της κηλίδας , που υπολογίζεται σε σχέση με τον όγκο του συνόλου των κηλίδων της πηκτής.

Η ποιοτική εκτίμηση επιτυγχάνεται συγκρίνοντας τις κηλίδες με την μέθοδο της παράλληλης τοποθέτησης των πηκτών . Με τον τρόπο αυτόν μπορούμε να πραγματοποιήσουμε μια συγκριτική ανάλυση, μετρώντας τα επίπεδα και τους μηχανισμούς έκφρασης της πρωτεΐνης, σχετικά με τις εκτιμώμενες βιολογικές συνθήκες που επικρατούν.



1.4.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ : ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Όταν η ανάλυση των πηκτών έχει ολοκληρωθεί και για να συνεχιστεί η λειτουργική ανάλυση, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν οι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως διαφορές ποιοτικές ή ποσοτικές (Shevcheko et al 1996). Η πρόοδος που πραγματοποιήθηκε στην φασματοφωτομετρία μάζας, αποτέλεσε στοιχείο βασικό για την ανάπτυξη της πρωτεομικής.

Πριν από το ερχομό του φασματογράφου μάζας, ESI-MS (Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry), MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) και QTOF (Quadruple Time of Flight), ο χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης γινόταν με την μέθοδο της αποδόμησης κατά Edman (Edman and Begg 1967). Με αυτή την τεχνική είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν μικρές ποσότητες πρωτεΐνης ή πρωτεΐνες που έχουν κατελιημένο N-τελικό άκρο.

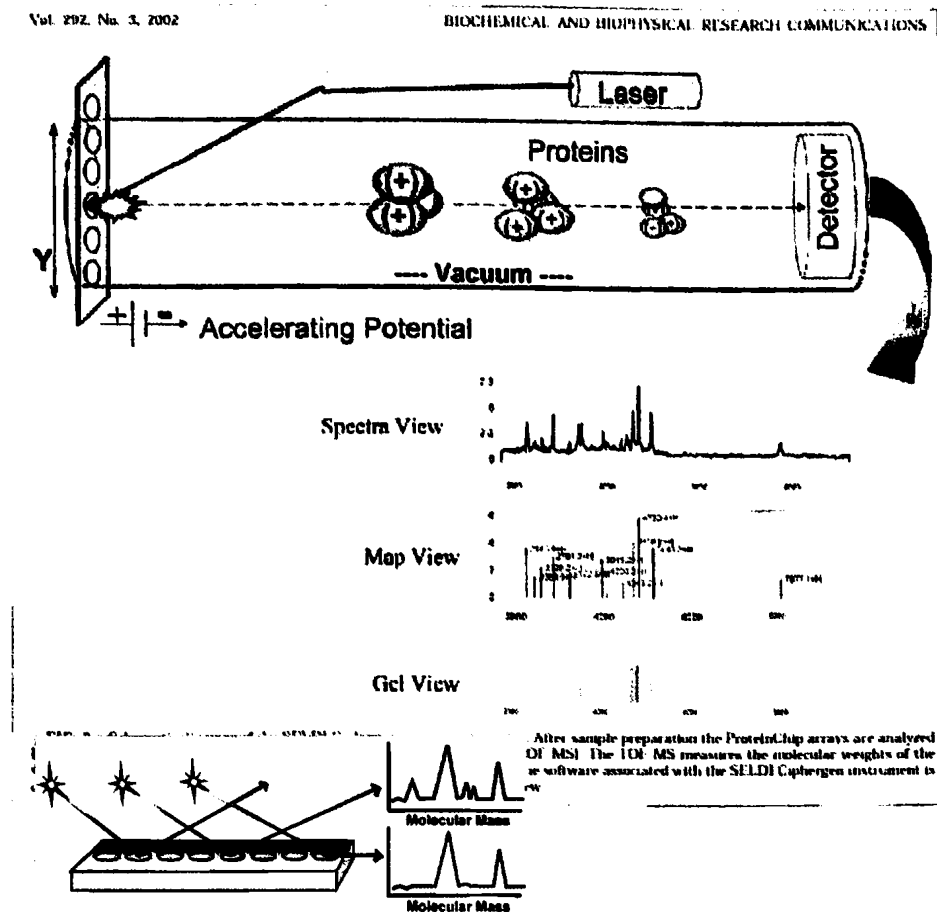
Οι καινούριες τεχνικές έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές του C-τελικού και N-τελικού άκρου.

Η ανάλυση στην φασματοσκοπία μάζας με τη μέθοδο MALDI-TOF ξεκινάει με πέψη με τρυψίνη. Από αυτή την πέψη δημιουργούνται πεπτίδια μοριακού βάρους περίπου 1000-2000.

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση, είναι η ανάλυση κλάσματος ενός πεπτιδίου με τον φασματογράφο μάζας MALDI. Με αυτή την τεχνική τα πεπτίδια τοποθετούνται σε έναν στόχο (target), για να συνδεθούν με αρωματικά μόρια που αποτελούν την μήτρα (matrice). Ο στόχος εισάγεται σε ένα θάλαμο υπό κενό και δέχεται την επίδραση ακτινοβολίας (laser). Η ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό του στόχου και της μήτρας. Τα ιόντα αυτά, αποδεσμεύονται από την μήτρα και επιταχύνονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Κατά την έξοδο τους όλα τα ιόντα αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια αλλά διαφορετική ταχύτητα λόγω σχέσης φορτίου/μάζας. Τα ιόντα εισάγονται σε ένα ειδικό θάλαμο (είναι ένας σωλήνας υπό κενό) μέχρι να φτάσουν στον ανιχνευτή σε διαφορετικό χρόνο το κάθε ιόν. Ο χρόνος που είναι απαραίτητος μέχρι τον ανιχνευτή εξαρτάται από την μάζα των πεπτιδίων, καθώς όλα τα πεπτίδια είναι φορτισμένα θετικά. Τα πιο μικρά ιόντα φθάνουν γρηγορότερα σε σχέση με ιόντα πιο μεγάλου μεγέθους (Εικ 1.4). Στην συνέχεια η μάζα των πεπτιδίων που



υπολογίστηκε από το φάσμα MALDI συγκρίνεται με την βάση δεδομένων (Yates 1998).



Εικ 1.4 Οι πρωτεΐνες ή το μίγμα των πρωτεϊνών ιονίζονται από τον παλμό του laser, που απορροφάται από τον στόχο (target). Με τη δράση του ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια επιταχύνονται προς τον ανιχνευτή (ditector).

Αυτή η ομάδα των πεπτιδίων που έχουν υπολογιστεί πειραματικά *in vitro* και αποκαλείται peptide mass fingerprint (PMF), συγκρίνεται με μια ομάδα πεπτιδίων που έχουν υποστεί πέψη θεωρητικά, δηλαδή *in silico* και αποτελούν την βάση πληροφοριών των πρωτεϊνών.

Στο διαδίκτυο πολλές είναι οι βάσεις πληροφοριών και οι αλγόριθμοι οι εδικοί για χρήση όπως: (http://prowl.rockefeller.edu/profoud_bin/WebProFoud.exe), PeptIdent (<http://www.expasy.ch/tools>), και Mascot (<http://www.matrixscience.com>)

Ο σκοπός είναι η σύγκριση με τη βάση δεδομένων που αποτελείται από τα πεπτίδια, βάσει των οποίων μπορούν να συγκριθούν (matching) τα υπό εξέταση πεπτίδια. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται και peptide mass mapping.

Εάν η ταυτοποίηση με το MALDI δεν μας δίνει αποτελέσματα, τότε χρησιμοποιούμε το tandem mass spectrometry (MS/MS). Η μέθοδος αυτή μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνικών θραυσμάτων. Η ανάλυση στηρίζεται στον ιονισμό σε υψηλά βολτ ενός μίγματος από πεπτίδια που βρίσκονται στην υγρή φάση σε μια παγίδα ιόντων (Ion trap). Τα πεπτίδια αυτά περνώντας μέσα από ένα τριχοειδές περνάνε στην αέρια φάση. Το ζητούμενο δηλαδή είναι τα πεπτίδια να παίρνουν την μορφή spray, σταγονιδίων που είναι φορτισμένα και βρίσκονται στην αέρια φάση. Στη συνέχεια όλα τα σταγονίδια συλλέγονται σε μια συσκευή φιλτραρίσματος, όπου επιλέγεται το επιθυμητό ιόν για ανάλυση. Ο κατατεμαχισμός των πεπτιδίων του ιόντος επιτυγχάνεται με την σύγκρουση των επιλεγμένων πεπτιδίων με αδρανή αέρια όπως το αργόν ή το ήλιον. Τα θραύσματα που προκύπτουν από τη σύγκρουση κατατάσσονται ανάλογα με την σχέση μάζας/φορτίου. Με τον τρόπο μπορούν να διαχωριστούν πρωτεΐνες που διαφέρουν ακόμη και κατά ένα αμινοξύ. Η μέθοδος αυτή είναι ικανή να διαχωρίσει ακόμη και πρωτεΐνες που έχουν υποστεί τροποποιήσεις. Επίσης και σ' αυτό το στάδιο τα ιόντα προσδιορίζονται από τις βάσεις δεδομένων, αλλά η διαφορά είναι ότι οι βάσεις δεδομένων είναι πολύ ειδικές και η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης είναι πιο ειδική.



Εικ 1. 5 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών (Peptide Mass Fingerprinting) χρησιμοποιώντας το ETTAN MALDI-TOF Pro MS

1.4.4 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ

Η εκρηκτική αύξηση των βιολογικών πληροφοριών που είναι διαθέσιμες, από διάφορα πεδία , χημικό, βιολογικό, ιατρικό, έδωσε ώθηση στην δημιουργία του τομέα της βιοπληροφορικής. Ο τομέας αυτός περιλαμβάνει την μελέτη του DNA και όλων των πρωτεϊνών, με σκοπό την στατιστική τους περιγραφή.

Τα στατιστικά μοντέλα, που απορρέουν από τα δεδομένα των πειραματικών αποτελεσμάτων στους διάφορους τομείς (μοριακής βιολογίας, βιοχημείας), έχουν σκοπό την οργάνωση όλων των γνώσεων και των δεδομένων για το γονιδίωμα και το προτέομα. Η οργάνωση αυτή γίνεται σε τράπεζες δεδομένων στο διαδίκτυο όπου ο κάθε ενδιαφερόμενος , μπορεί να έχει πρόσβαση.

Για την πρωτεομική υπάρχει ο διακομιστής ExPasy: (Expert Protein Analysis System), (<http://www.expasy.org/>), που δημιουργήθηκε από το Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Αυτή η βάση δεδομένων περιλαμβάνει όλες τις πληροφορίες , σχετικά με την αλληλουχία, την δομή, την προέλευση και την λειτουργία των πρωτεϊνών. Μια άλλη βάση δεδομένων, η Swiss-Prot, περιλαμβάνει πληροφορίες για την βιβλιογραφία, για την ταξινόμηση, για τις τροποποιήσεις.

Η NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>), είναι μια βάση δεδομένων καταγραφής αμινοκαρβοξυλικών αλληλουχιών.

Η MEDLINE (Index Medicus Online) παρέχει πληροφορίες της βιοιατρικής, προερχόμενες από όλα τα μεγάλα περιοδικά της ιατρικής.

Μέσω αυτών των βάσεων, οι χρήστες μπορούν να αντλήσουν πληροφορίες, που θα συντελέσουν στην προώθηση της έρευνας.

Σύμφωνα με στοιχεία βιοπληροφορικής αναλύθηκαν τα δείγματά μας με την μέθοδο της δειγματοληψίας κατά συστάδες.



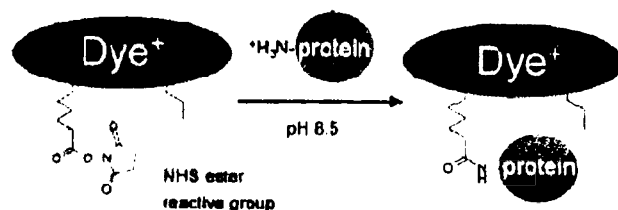
1.4.5 DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS (DIGE)

Η μεθοδολογία της ηλεκτροφορήσης της διπλής διάστασης, επιτρέπει την σύγκριση των λαμβανομένων εικόνων, αφού πρώτα οι εικόνες αλληλοκαλυφθούν, έτσι ώστε να επιτευχθεί σύμπτωση των κηλίδων. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η παραμόρφωση των εικόνων. (Tonge, 2001)

Η τεχνολογία DIGE, που πρώτος την εισήγαγε ο Ünlü το 1997 αποτελεί μια πρωτοποριακή μέθοδο με επαναληψιμότητα και αξιοπιστία όσον αφορά στην ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών (Alban 2003).

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται, στην χρήση φθορίζουσών ουσιών για την σήμανση των δειγμάτων. Οι φθορίζουσες ουσίες, Cy2, Cy3 και Cy5, είναι δομικά παρόμοιες αλλά έχουν διαφορετικό φάσμα απορρόφησης (Tonge 2001) και συνδέονται με τέτοιο τρόπο με τις πρωτεΐνες ώστε να μην αλληλεπιδρούν με το φορτίο ή το μοριακό βάρος τους.

Οι χρωστικές έχουν μία εξωτερική ενεργό NHS (N-hydroxysuccinimidyl) ομάδα, που μπορεί να υποστεί αντίδραση πυρηνόφιλης αντικατάστασης της αμινικής ομάδας με την λυσίνη των πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται (Shaw 2003). Οι λυσίνες είναι αμινοξέα που παρουσιάζουν θετικό φορτίο σε περιβάλλον ουδέτερο ή όξινο. Οι χρωστικές δεν επηρεάζουν το φορτίο της πρωτεΐνης, το μοριακό τους βάρος είναι περίπου 500 και δεν επιδρούν με το μοριακό βάρος των υπό εξέταση πρωτεϊνών. (Εικ 1.6).

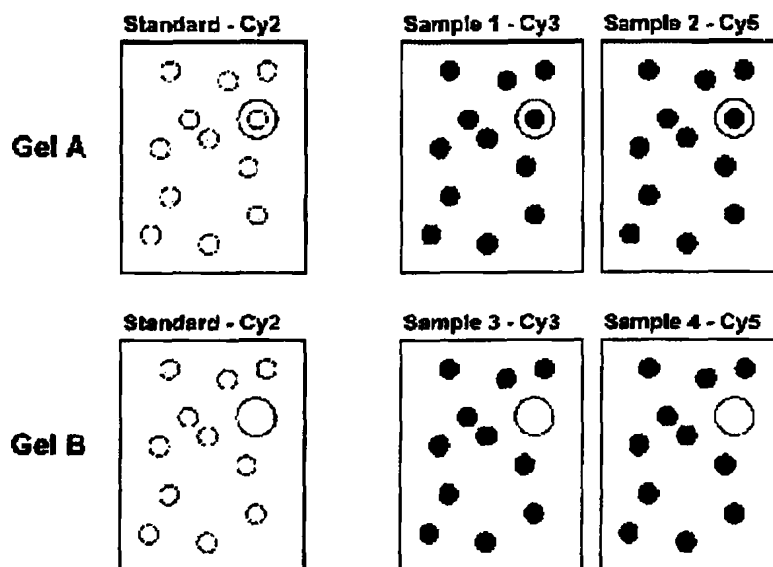


Εικ1. 6

Συνήθως η ελάχιστη σήμανση (minimal labeling), η οποία είναι και η επιθυμητή, πραγματοποιείται όταν η σεσημασμένη με χρωστική πρωτεΐνη αποτελεί το 3% της ολικής πρωτεΐνης. Αυτό εξασφαλίζει ότι κάθε πρωτεΐνη συνδέεται με ένα μόνο μόριο της χρωστικής (Knowles 2003), έτσι ώστε να μην αλλάξει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι: ι) ότι η χρησιμοποίηση των χρωστικών βελτιώνει την γραμμικότητα, ιι) ότι προσφέρει ακρίβεια στην μέτρηση των ποσοτικών διαφορών των κηλίδων και τέλος ιιι) ότι είναι δυνατό να ανιχνευτούν πρωτεΐνες σε πολύ μικρή ποσότητα, μέχρι και 125pg . Άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι με τις συνηθισμένες μεθόδους (μονιμοποίηση, αποχρωματισμός) πολλές πρωτεΐνες με χαμηλό μοριακό βάρος χάνονται (Chakravarti 2004).

Η καινοτομία αυτής της μεθόδου είναι η εισαγωγή ενός εσωτερικού δείγματος (Εικ 1.7), που αποτελείται από το σύνολο των δειγμάτων σε ίσα μέρη (Van den Berg and Arkens 2004). Το πλεονέκτημα του εσωτερικού δείγματος είναι μεγαλύτερη ακρίβεια στην στατιστική ανάλυση, στην ποσοτική μέτρηση των κηλίδων και στην εξακρίβωση του εάν πρόκειται για βιολογικές ή για πειραματικές διαφορές .

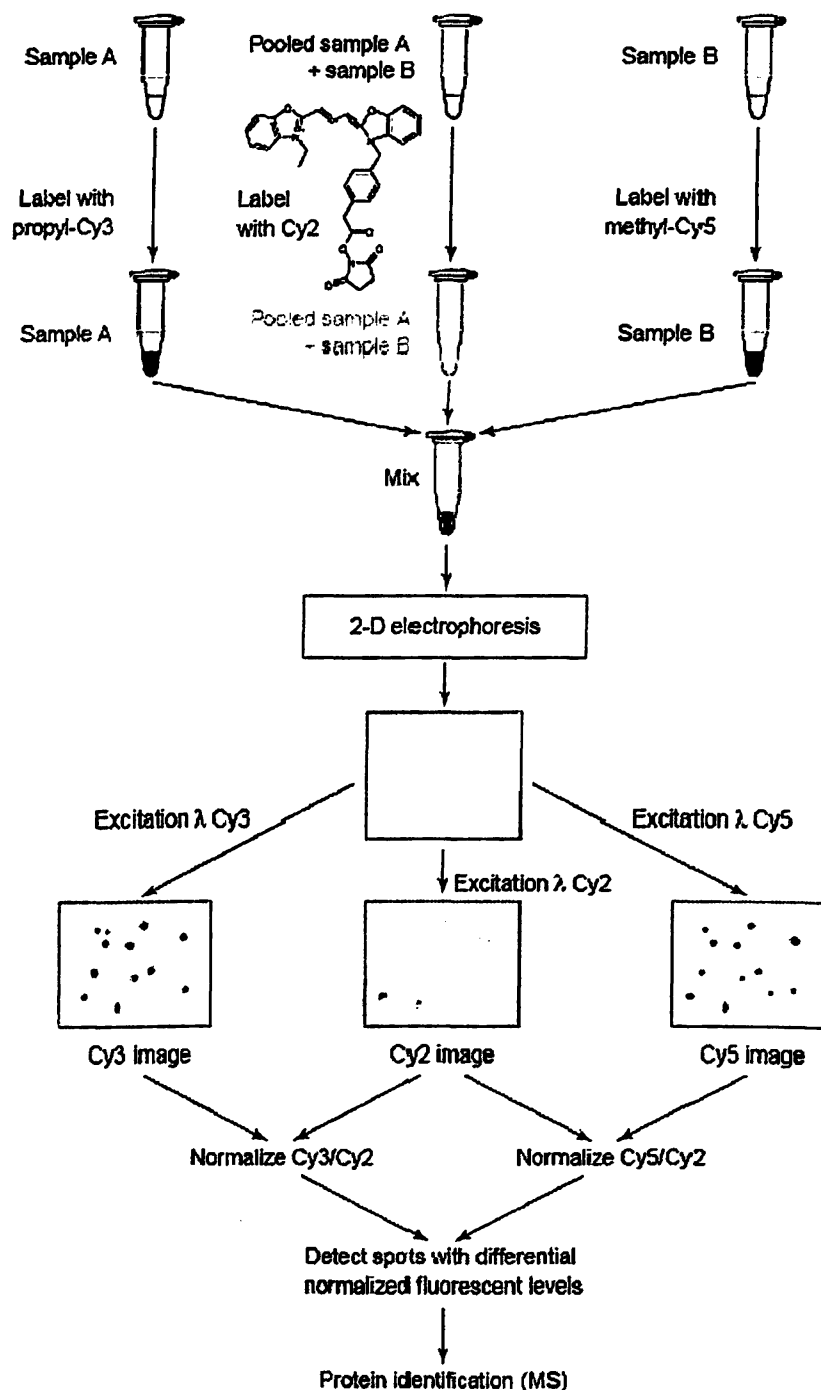


Εικ 1.7 Παράδειγμα του πλεονεκτήματος του εσωτερικού δείγματος : η σημειωμένη κηλίδα δεν υπάρχει στα δείγματα 3 και 4 άρα δεν αποτελεί μια βιολογική αλλαγή και το διαπιστώνουμε επειδή λείπει και από το εσωτερικό δείγμα (standard) της αντίστοιχης πηκτής.



Η τεχνολογία DIGE επιτρέπει την ευκολία στην στατιστική ανάλυση, αφού μειώνει τα αντίγραφα των πηκτών και ακόμα μειώνει τα πειραματικά σφάλματα, που προέρχονται από την ηλεκτροφόρηση, τις παραμορφώσεις των πηκτών αλλά του ίδιου του χειριστή του προγράμματος. Οι ψηφιακές εικόνες λαμβάνονται μέσω του ειδικού οργάνου Typhoon και οι εικόνες επεξεργάζονται με το ειδικό λογισμικό πρόγραμμα Decyder.

Εικ 1.8 Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης DIGE.



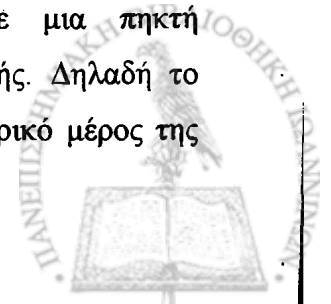
1.5 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΤΟΥ BAL

Αρχικά η πρωτεομική του BAL ξεκίνησε το 1979 από τον Bell, που πραγματοποίησε την πρώτη ηλεκτροφόρηση, δειγμάτων καπνιστών και μη καπνιστών, δημιουργώντας έτσι την πρώτη βάση δεδομένων για το συγκεκριμένο βιολογικό υγρό. Η χρήση του αντιορρού που ήταν ειδική για τα συστατικά του φυσιολογικού πλάσματος και η σύγκριση με τον χάρτη της 2D-PAGE για το πλάσμα, αποκάλυψε ότι πολλές πρωτεΐνες του BAL αποτελούν πρωτεΐνες του πλάσματος. Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων με κυριότερες την αύξηση στα επίπεδα IgG, C4, C3 και την μείωση των επιπέδων της α 1-γλυκοπρωτεΐνη που παρατηρήθηκαν στους καπνιστές.

Αργότερα η ομάδα του Lenz (1990, 1996) συνέκρινε τα BAL ασθενών με ιδιοπαθή διάμεση ίνωση, με σαρκοείδωση καθώς και ατόμων που είχαν εκτεθεί σε αμίαντο, με BAL φυσιολογικών ατόμων.

Οι εξελίξεις στον τομέα της ταυτοποίησης της αλληλουχίας, της αντίδρασης κατά Edman και του φασματογράφου μάζας που συνέβησαν κατά την δεκαετία του 1990 συνετέλεσαν στην δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για την ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων του BAL. Ο απώτερος σκοπός ήταν η αναγνώριση βιολογικών δεικτών, ενδεικτικών των μοριακών διαδικασιών που χαρακτηρίζουν τις ασθένειες του πνεύμονα.

Η πιο σημαντική τεχνική πρόοδος, στον διαχωρισμό των πρωτεϊνικών καταλοίπων είναι η αλλαγές στην ισοηλεκτρική εστίαση. Αρχικά, η χρησιμοποίηση των αμφολυτών αποτελούσε καθοριστικό παράγοντα στην ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών που στη συνέχεια με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου, διαχωρίζονται με βάση το μοριακό βάρος τους, αλλά παρουσίαζε σημαντικούς περιορισμούς, (αποκλίσεις στην εστίαση, ασυνέχεια στην βαθμίδωση των πηκτών, δυσκολία αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων κ.ά). Με την χρησιμοποίηση των immobilized Gels (IPGs) που εισάχθησαν το 1983 από τον Westermieier R, οι περιορισμοί αυτοί ξεπεράστηκαν, καθώς η βαθμίδωση του pH σταθεροποιήθηκε ενσωματώνοντας βασικές και όξινες ρυθμιστικές ομάδες σε μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που απετέλεσε το εσωτερικό μέρος της πηκτής. Δηλαδή το τμήμα της πηκτής στο οποίο θα φορτωθεί το δείγμα, ενώ το εξωτερικό μέρος της



πηκτής αποτελεί μια μεμβράνη πλαστικού που αποτελεί το προστατευτικό μέρος της πηκτής. Το 1990 ο Lenz βελτίωσε ακόμα περισσότερο την μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης.

Υπάρχουν όμως και βασικά ποιοτικά προβλήματα του υλικού του BAL αυτού καθ' αυτού, που επηρεάζουν την ποιότητα της ανάλυσής του με Ηλεκτροφόρηση Δύο Διαστάσεων. Αυτά τα προβλήματα είναι κυρίως, η χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών του BAL και η μεγάλη συγκέντρωση των αλάτων που προέρχονται από το ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου που χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία λήψης του.

Την λύση των προβλημάτων έδωσαν διάφορες μέθοδοι απομάκρυνσης των αλάτων και καθαρισμού των πρωτεϊνών όπως: διαπίδηση (Lenz 1993), καταβύθιση με trichoroacetic acid (TCA) (Wattiez 2000), χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Sabounchi-Schutt 2001), φυγοκεντρική διήθηση (Lenz 1990) και λυοφιλοποίηση (Lenz 1993).

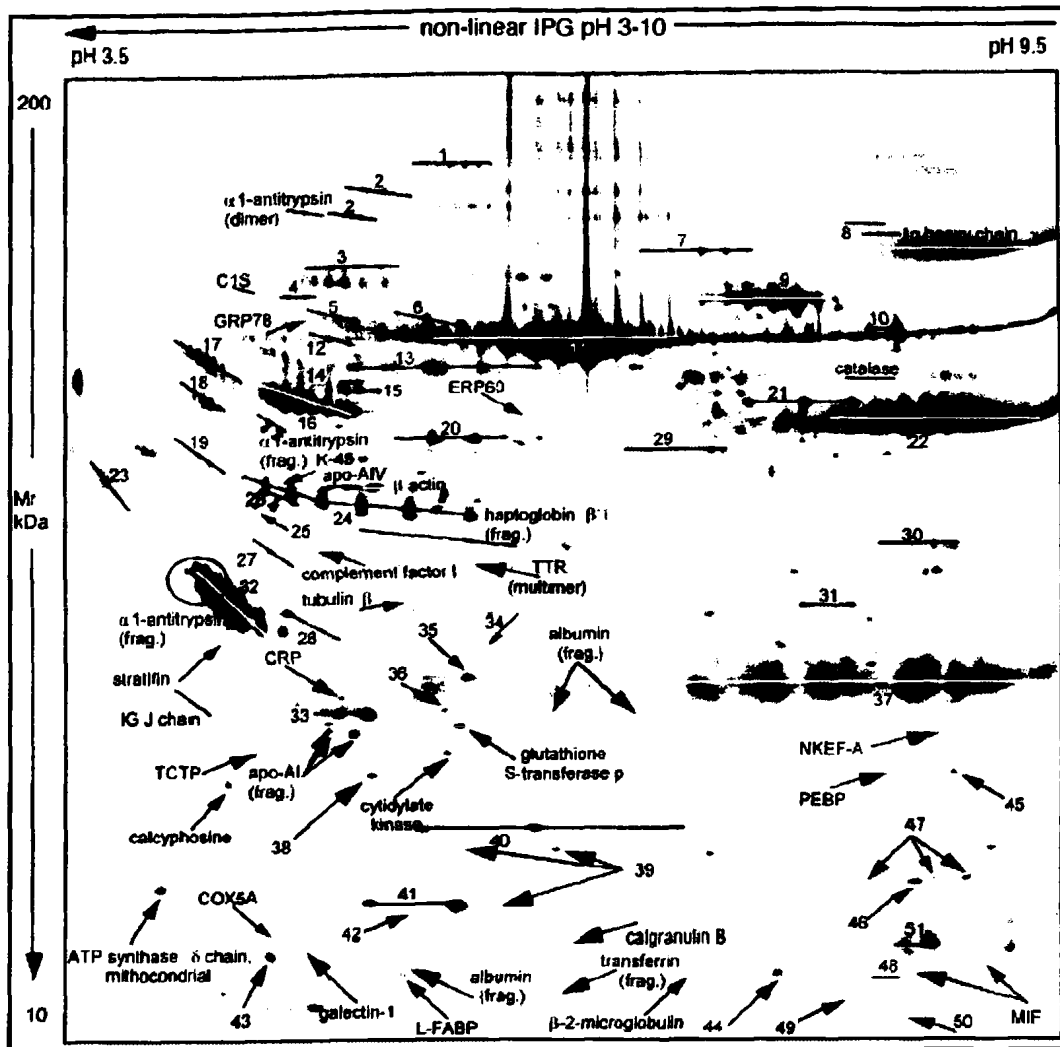
Ένα άλλο πρόβλημα που τέθηκε ήταν η ταυτοποίηση σπανίων πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους, που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν γιατί καλύπτονται από πρωτεΐνες που εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες στην ίδια περιοχή, όπως η αλβουμίνη (50%), τρανσφερίνη(5-6%), α-1-αντιτρυσίνη (3-5%) και ανοσοσφαιρίνη A και G (έχουν σύνολο 30%). Η χρησιμοποίηση διαφόρων στηλών όπως Affigel-Blue για την δέσμευση της αλβουμίνης, έδωσε όχι και τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού και άλλες πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους 40 kDa είχαν απομακρυνθεί, παράλληλα με την απομάκρυνση της αλβουμίνης.

Βελτιώσεις που έγιναν στην διακριτική ικανότητα της 2-DE του BAL επετεύχθησαν κατ' αρχήν, με την χρησιμοποίηση πιο μεγάλων πηκτών (μήκους 18 cm και 24 cm). Με τον τρόπο αυτόν η βαθμίδωση της συγκέντρωσης δεν είναι γραμμική και προσφέρει μεγαλύτερη διαχωριστικότητα στο εύρος pH 4 με 7 όπου εντοπίζονται και οι πιο πολλές πρωτεΐνες με σημαντική βιολογική δράση. Πολλές βελτιώσεις έγιναν επίσης, και στην δεύτερη διάσταση με την χρησιμοποίηση πολύ λεπτού ακρυλαμιδίου, οπότε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε πολύ σαφέστερος.

Και βεβαίως, τα οπτικά αποτελέσματα της 2-DE βελτιώνονται συνεχώς με παρεμβάσεις στον τρόπο προετοιμασίας του δείγματος. Τέλος εκτός από την διασφάλιση όσον δυνατόν μεγαλύτερης ευαισθησίας στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, σημαντικό ρόλο παίζει και η τελική μέθοδος ταυτοποίησης. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την χρώση νιτρικού αργύρου, την φασματομετρία μάζας και την μέθοδο των πεπτιδικών αποτυπωμάτων (peptide fingerprinting).



Η εικόνα 1.9 αποτελεί ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεομικής ανάλυσης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενούς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, που έγινε από την ομάδα του Bini (Magi B. et al 2002).



Εικ1. 9 2-D ηλεκτροφορητική εικόνα του BAL από ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μη γραμμική immobiline βαθμίδωση 3-10 και με 9-16% SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες που έχουν ταυτοποιηθεί.

1.6 ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΧΑΡΤΗ 2-D ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΟΥ BAL

Τρείς είναι οι κύριες ερευνητικές ομάδες, η ομάδα των Lindahl et al, των Wattiez et al, των Sabouchi-Schutt et al, που δημοσίευσαν την ταυτοποίηση του χάρτη του BAL. Το 1995 οι Lindahl et al., δημοσίευσαν τον χάρτη με 1000 πρωτεϊνικές κηλίδες σε συνθήκες pH 4 έως 7 (Lindahl et al 1995). Χρησιμοποίησαν την τεχνική του Western blotting και σε σύγκριση με τον χάρτη του πλάσματος ταυτοποίησαν 25 διαφορετικές πρωτεΐνες.

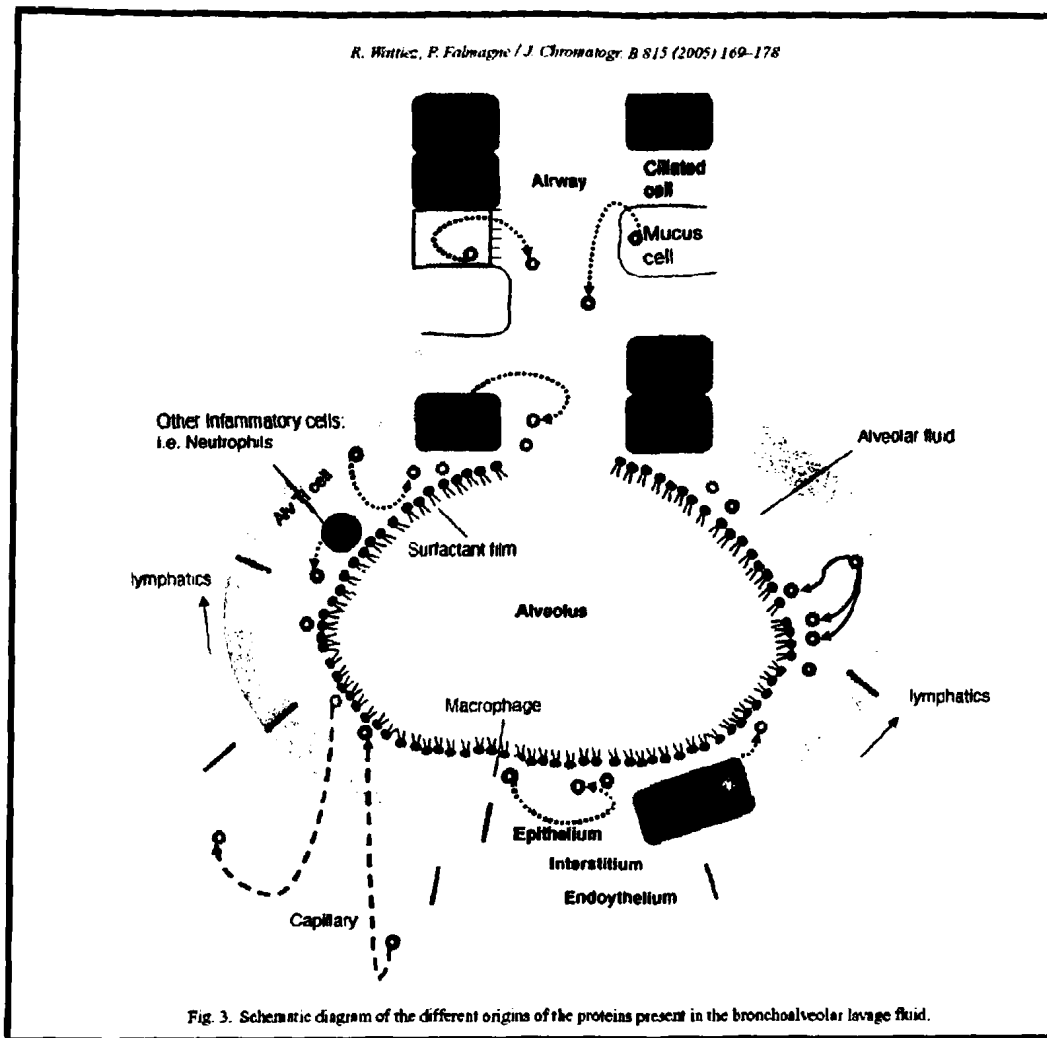
Αργότερα με την τεχνική της N-terminal αλληλούχισης κατά Edman και αποδόμησης (Lindahl et al 1995) αποκαλύφθηκαν κι άλλες σημαντικές πρωτεΐνες.

Το 1999 χαρακτηρίστηκαν συστηματικά όλες οι πρωτεΐνες του BAL και η βασική στρατηγική ήταν να εξεταστούν δείγματα προερχόμενα από ομάδες ασθενών με διαφορετικές παθήσεις (Wattiez et al 1999). Η ομάδα των Sabouchi-Schutt et al (2001,2003), ταυτοποίησαν 12 επί πλέον πρωτεΐνες με pH 4.5-5.2 που απομονώθηκαν από BAL φυσιολογικού ατόμου.

Σήμερα περισσότερες από 900 κηλίδες (πρωτεΐνες, υπομονάδες πρωτεϊνών, πρωτεϊνικά θραύσματα) είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο από την ηλεκτρονική διεύθυνση SWISS-2D PAGE (<http://w3.umh.ac.be/biochim/proteomic.htm>) (Wattiez et al 2000).

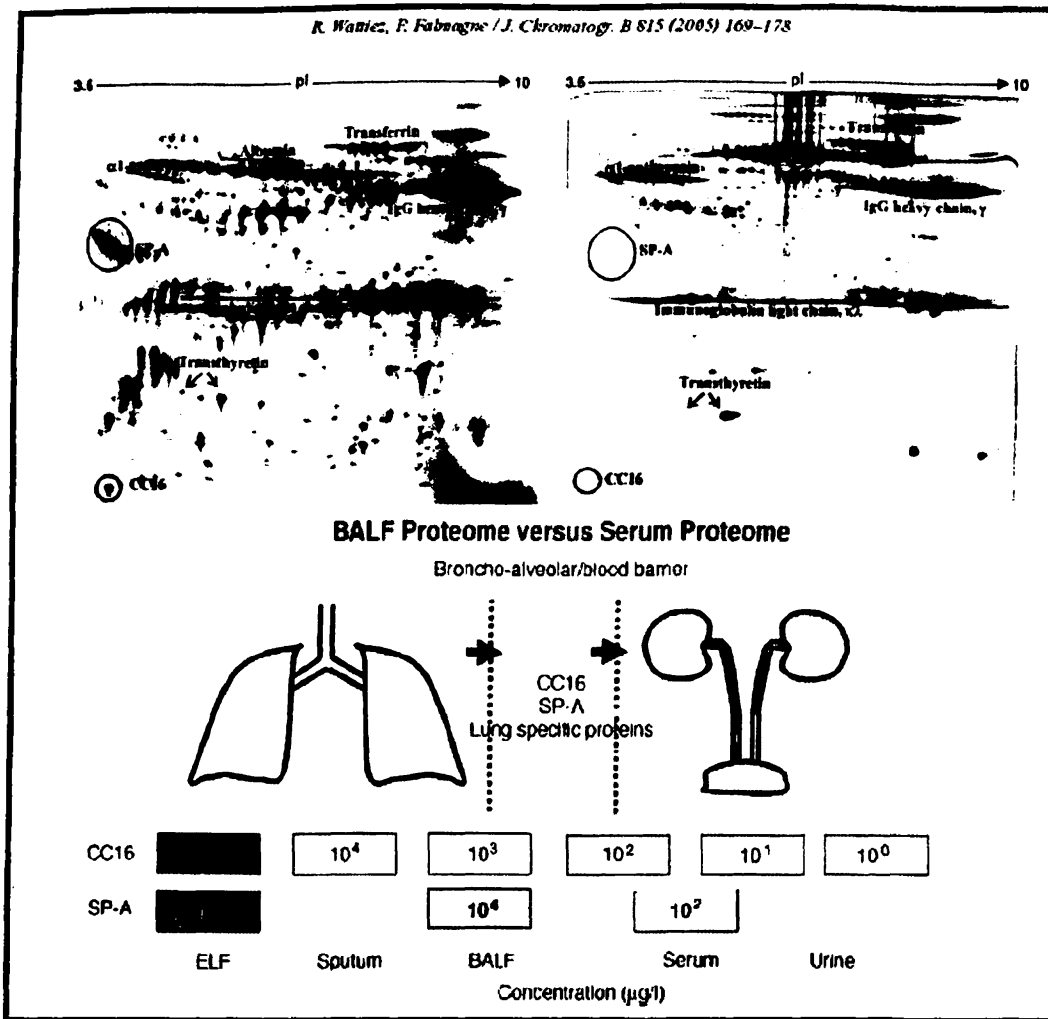
Από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν οι περισσότερες προέρχονται, μέσω παθητικής μεταφοράς, από το πλάσμα. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών αυτών αυξάνουν σε φλεγμονώδεις διεργασίες, λόγω της αυξημένης διαπερατότητας των τριχοειδών (εικόνα 1.10).





Εικ 1.10 Η προέλευση των πρωτεϊνών του BAL. Οι περισσότερες προέρχονται από το πλάσμα, ενώ κάποιες παράγονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων του πνεύμονα.

Μερικές από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες που παράγονται στους πνεύμονες είναι η α-1 αντιθρυψίνη, η α-2 μακροσφαιρίνη, η απολιπρωτεΐνη A1, η β-2 μικροσφαιρίνη, οι παράγοντες του συμπληρώματος 3 και 4 και η τρανφερίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές πιθανότατα δρουν προστατευτικά για τον πνεύμονα στην περίπτωση εισβολής μικροοργανισμών, οξειδωτικών βλαβών και δράσης προτεασών που απελευθερώνονται κατά την διάρκεια λοιμώξεων. Αποτελεί πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση το ότι σε ορισμένες καταστάσεις κάποιες τοπικώς παραγόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύονται μόνο στο BAL και όχι στο πλάσμα όπως η APO A1, ανοσοσφαιρίνες, οι παράγοντες του συμπλήρωμα 3 και 4, η SP-A, η CC16.(εικόνα 1.11).



Εικ 1. 11 Σύγκριση πρωτεόματος του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και του ορού
 Ορισμένες πρωτεΐνες παρουσιάζονται σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο BAL σε σύγκριση με τον ορό, ενδεικτικό τοπικής παραγωγής στους αεραγωγούς όπως APO A1, Igs, παράγοντες συμπληρώματος 3 και 4, SP-A, CC16.
 Ενδεχομένως οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί δείκτες σε διάφορες παθήσεις του αναπνευστικού (*lung specific biomarker*).

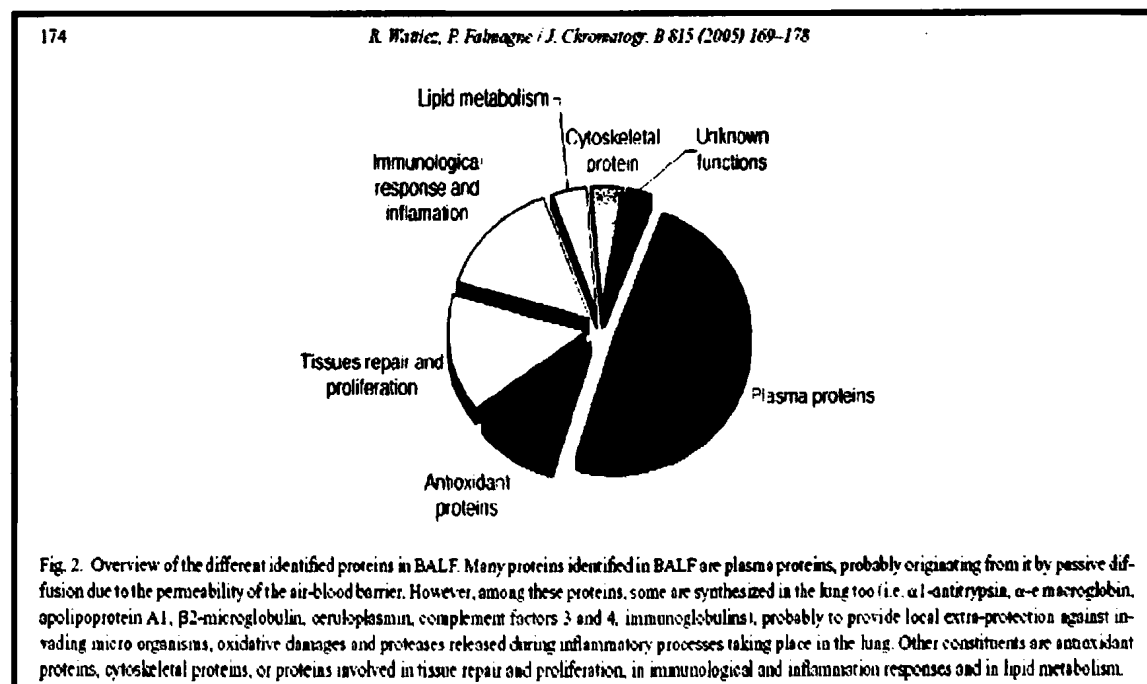


Κάποιες λειτουργικές ομάδες πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν περιλαμβάνουν περίπου 93 πρωτεΐνες. Είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο λιπιδικό μεταβολισμό (FABP-E, FABP-A), στην ανοσολογική και φλεγμονώδη απόκριση (HSP70, IgBF, MHC class II αντιγόνο DRB3), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επιδιόρθωση του ιστού (cathepsin D, calcyclin).

Ακόμα είναι δυνατόν να εντοπιστούν και κάποιες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες, η παρουσία των οποίων είναι αποτέλεσμα κυτταρικής καταστροφής.

Στην 2-D Ηλεκτροφόρηση του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος οφείλεται η ταυτοποίηση ορισμένων πρωτεϊνών, που η λειτουργία τους ήταν εντελώς άγνωστη. Για παράδειγμα η υπεροξυαναγωγάση (peroxiredoxin), απεδείχθη ότι αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα ο οποίος εκφράζεται ευρέως στους ανθρώπινους ιστούς και ανιχνεύθηκε κατ'αρχήν στον πνεύμονα (Noel-Georgis et al., 2002).

Κάθε άγνωστη πρωτεΐνη ταυτοποιείται, ανάλογα με τον ρόλο της και την εμπλοκή της σε διάφορες λειτουργίες και μοριακά μονοπάτια της λειτουργίας του αναπνευστικού συστήματος. Η μελέτη των πρωτεϊνικών αυτών μορίων και των μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται, αναμένεται να υποδείξει κάποια από αυτά που θα μπορούσαν ίσως να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες συγκεκριμένων ασθενειών. (εικόνα 1.12).



Εικ 1.12 Το BAL περιέχει πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, που αντανακλά την μεγάλη διαφοροποίηση στην προέλευση και λειτουργία των πρωτεϊνών.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

I) 4 Μετσοβίτες με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις

II) 4 Μετσοβίτες χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις

III) Ομάδα ελέγχου αποτελούμενη από 3 υγιείς, μη καπνιστές χωρίς καμία έκθεση σε αμίαντο.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από Μετσοβίτες που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο. Ήταν όλοι μη καπνιστές και δεν έπασχαν από λοιμώξεις ή άλλα νοσήματα του αναπνευστικού. Η ομάδα ελέγχου περιλαμβάνει άτομα που δεν νοσούν από καμία ασθένεια του αναπνευστικού συστήματος, δεν είναι καπνιστές και βεβαίως δεν είχαν εκτεθεί σε αμίαντο.

Λόγω της δυσκολίας επιλογής των ατόμων, που είχαν υποβληθεί σε διαγνωστική βρογχοκυψελιδική έκπλυση για ποικίλους λόγους, και που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια, ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός (4 Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, 4 χωρίς αποτιτανώσεις και 3 άτομα από την ομάδα ελέγχου). Ο αριθμός αυτός, θεωρείται όμως ικανοποιητικός για πρωτεομική ανάλυση.

2.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΓΡΟ

Το υλικό της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης παραλαμβάνεται από την Πνευμονολογική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μετά έγγραφη συγκατάθεση των εξεταζομένων, γίνεται πλήρης βρογχοσκόπηση.

Το εύκαμπτο βρογχοσκόπιο ενσφηνώνεται συνήθως σε έναν υπομηματικό βρόγχο του μέσου, εκτός εάν υπάρχει ένδειξη για κάποια άλλη συγκεκριμένη περιοχή. Μέσω του αυλού αναρροφήσεως, γίνεται έγχυση 100ml φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 37ο. Η έγχυση γίνεται αργά με σύριγγα που εφαρμόζεται στον αυλό αναρροφήσεως του βρογχοσκοπίου, σε κλάσματα των 20ml και ακολουθεί αναρρόφηση, αμέσως μετά την έγχυση του κάθε κλάσματος με την ίδια σύριγγα και με τον ίδιο ρυθμό. Το υγρό που αναρροφάται συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου των 50ml με κωνικό πυθμένα και βιδωτό πώμα.

Το κλάσμα των πρώτων 20ml φυλάσσεται χωριστά καθ' όσον θεωρείται ότι περιέχει στοιχεία αντιπροσωπευτικά κυρίως των αεραγωγών. Όλα τα δείγματα φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την μεταφορά τους στον χώρο επεξεργασίας τους.



2.1.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΤΗΣ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

- 1) Φυγοκέντρωση στις 1200rpm (στροφές ανά λεπτό) για 20 min για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης από το κυτταρικό ίζημα.
- 2) Η υγρή φάση της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης φυλάσσεται στους -80°C
- 3) Τα κύτταρα πλένονται με 80ml με θρεπτικό υλικό RPMI, φυγοκεντρώνονται για 15 min και τέλος τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml RPMI.
- 4) Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυττόμετρο και έλεγχος της βιωσιμότητας με κυανούν του τρυπανίου (trypan blue) αραιωμένο 1:10 σε PBS.

Η κατάλληλη συγκέντρωση για την επίστρωση των αντικειμενοφόρων πλακών είναι $2,5 \times 10^6$. Έτσι ανάλογα με την αριθμό των κυττάρων του ιζήματος που μετρήθηκαν, προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα RPMI για να επιτύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων που θα επιστρωθεί στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Στην συνέχεια 10μl του διαλύματος των κυττάρων επιστρώνονται στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν και διατηρούνται στους -30°C .

2.1.4 ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΟΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ

- 1) Τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε 10% φορμαλδεύδη για 2 min
- 2) Πλύση με απεσταγμένο νερό ,δύο φορές.
- 3) Χρώση με αιματοξυλίνη 50% , για 15 sec.
- 4) Πλύση με νερό της βρύσης για 3 min.
- 5) Ακολουθεί αφυδάτωση με 80% αιθανόλη για 1 min
- 6) Χρώση με διάλυμα 1% ηωσίνης (10X -αραίωση με 80% διαλύματος αιθανόλη) για 2,5 min
- 7) Αφυδάτωση με διάλυμα αιθανόλης 95% για 1min (δισ)
- 8) Αφυδάτωση σε διάλυμα απόλυτης αιθανόλης
- 9) Οι πλάκες εμβαπτίζονται σε ξυλόλη
- 10) Οι πλάκες καλύπτονται με μονιμοποιητικό υλικό και καλυπτρίδες. Όταν οι πλάκες στεγνώσουν παρατηρούνται σε μικροσκόπιο.



2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετρήθηκε αρχικά η ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων. Η μέτρηση της πρωτεΐνης των δειγμάτων είναι απαραίτητη για την πορεία των πειραμάτων. Κάθε φορά αναλύεται συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης ανάλογα με το πρωτόκολλο της μεθόδου, διότι η ακρίβεια της ποσότητας και η απαλλαγή των δειγμάτων από τα άλατα συντελούν στον σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2.1

Πίνακας 2.1

Στον πίνακα 2.1 καταγράφεται ο αριθμός των δειγμάτων και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

	Αριθμός Δείγματος	Ομάδα	Συγκέντρωση πρωτεΐνης
1	131	Pc+	13.7μg/μl
2	470	Pc+	12.7μg/μl
3	307	Pc+	9.91μg/μl
4	322	Pc+	7.35μg/μl
5	306	Pc-	6.36μg/μl
6	443	Pc-	7.36μg/μl
7	347	Pc-	3.05μg/μl
8	516	Ομάδα ελέγχου	7.6μg/μl
9	519	Ομάδα ελέγχου	6.76μg/μl
10	520	Ομάδα ελέγχου	13.02μg/μl

Κατόπιν στα δείγματα της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης, έγινε απομάκρυνση των αλάτων με την μέθοδο της διαπήδησης μέσω των μεμβρανών (Medicel-dialysis tubing -size 6) σε δις-απεσταγμένο H₂O. Τα δείγματα υποβάλλονται σε διαπήδηση έναντι του δις-απεσταγμένου H₂O επί 24h με συχνές αλλαγές. Στην συνέχεια τα



δείγματα λυοφιλοποιούνται (SAVANT ModelVG-5). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο 2-DIGE (Difference Gel Electrophoresis).

Στα λυοφιλοποιημένα δείγματα που προορίζονται για την ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης έγινε προσθήκη διαλύματος REID. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από ουρία 8M, CHAPS 4%(w/v) ($C_{32}H_{58}N_2O_7SxH_2O$), και DTE 1%(w/v) ($C_4H_{10}O_2S_2$). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 37°C, για να διαλυθεί η ουρία. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα για την 2-DIGE (Difference Gel Electrophoresis) αποτελείται από ουρία 8M, CHAPS 4%(w/v), Tris 25m M. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 37°C, για να διαλυτοποιηθεί η ουρία και ρυθμίζεται το pH στο 8.8 με διάλυμα HCl 1M. Ακολουθεί η επαναφορά στην υγρά μορφή των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων και η προετοιμασία των διαλυμάτων για την καμπύλη αναφοράς.

2.2.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ BRADFORD (1976)

Για την μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων, ελήφθη ποσότητα 1-5 μ l διαλύματος πρωτεΐνης και έγινε συμπλήρωση μέχρι τον τελικό όγκο με δις απεσταγμένο H_2O και διάλυμα REID και για τις δυο περιπτώσεις ηλεκτροφόρησης. Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε σε φωτόμετρο και με μήκος κύματος OD:595nm

Πίνακας 2.2 Στον πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο Bradford για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων.

Συγκέντρωση πρωτεΐνης (μ g)	BSA(αλβουμίνη) 2,2mg/ml (μ l)	ddH ₂ O (μ l)	Δ /μα REID (μ l)
0	0	80	20
12.5	5.7	74.3	20
25	11.4	68.6	20
50	22.7	57.3	20
75	34.1	45.9	20
100	45.5	16.3	20



2.2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ LOWRY

Τα δείγματα επωάζονται με NaOH σε αναλογία 1:1 μέχρι τελικού όγκου 1ml για περίπου 1h. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα NaOH 0.5N. Κατόπιν γίνεται η προσθήκη του 5ml διαλύματος 3 που περιέχει διάλυμα 1:διάλυμα 2 σε αναλογία 50:1 (δ/μα 1: 12% (w/v) Na₂CO₃ σε δις απεσταγμένο νερό, δ/μα: 2: 0.5(w/v) CuSO₄.5H₂O και 1% κιτρικού νατρίου). Η επώαση διαρκεί 10min. Το διάλυμα 4 αποτελείται από Folin C σε αναλογία 1:1 με δις απεσταγμένο νερό. Η επώαση διαρκεί 30 min με συχνές αναδεύσεις. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων έγινε στα 720nm.

Πίνακας 2.3 Στο πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο Lowry για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωση των δειγμάτων.

	T (ml)	50μgr (ml)	100μgr (ml)	150μgr (ml)	200 μgr (ml)
BSA	0	0.250	0.500	0.750	1
NaOH 1N	1	0.750	0.500	0.250	-
Δ/μα 3	3	3	3	3	3
Δ/μα 4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5



2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ / ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ

2.3.1 ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΗ PROTEAN® II xi Cell Assembly Guide.

Οι πηκτές της πρώτης διάστασης όπου γίνεται η ισοηλεκτρική εστίαση γίνεται με την βοήθεια αμφολυτών στους ειδικούς γυάλινους σωλήνες. Οι πηκτές έχουν μήκος 13 cm και περιέχουν 11gr ουρία 9.2M τελική συγκέντρωση, 3 ml ακρυλαμίδιο 4.5%T, αμφολύτες 0.2ml 5-7 και 0.8 ml 3-10 ευρέως φάσματος, 1ml απορρυπαντικό (0.3gr CHAPS, 100μl Nonident P-40, 900μl ddH₂O). Συμπληρώνονται με δις απεσταγμένο H₂O μέχρι τα 20ml.

Στο παραπάνω διάλυμα γίνεται η απαέρωση του διαλύματος για να βοηθηθεί ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου. Προστίθενται 20μl TEMED 40μl APS 10%w/v όπου συντελείται ο πολυμερισμός των πηκτών.

Στα υπό εξέταση δείγματα, όταν προστεθούν στον γυάλινο σωλήνα, προστίθεται ποσότητα ίση με 10μl διάλυμα iso-Urea solution E (που αποτελείται από 0.1gr DTT, 0.4gr CHAPS, 5.4gr ουρία, 500μl αμφολύτες 3-10και 6 ml dd H₂O).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο κάτω δοχείο της συσκευής είναι 10 mM H₃PO₄ (1.8ml συμπυκνωμένου οξέος σε 2.6lt) και στο άνω δοχείο της συσκευής, βασικό διάλυμα 40 mM NaOH. Στα ρυθμιστικά διαλύματα γίνεται η απαέρωση τους με σκοπό την αποφυγή των φυσαλίδων που ενδεχομένως δημιουργούν πρόβλημα στη εισαγωγή των δειγμάτων στην πηκτική . Το πρόγραμμα που έτρεξαν οι πηκτές είναι 2 h στα 500V, 2h στα 500V, 16h στα 800V.



2.3.2 ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ.

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΑΙΝΙΩΝ

(strips)

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιήθηκε όπως την περιέγραψε ο Götg (1988) και ο Bjellqvist (1993). Οι ταινίες (strips) που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από έτοιμες πηκτές ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου που πολυμερίστηκαν με immobiline (που συμβάλλουν στη βαθμίδωση του pH) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Τα χαρακτηριστικά των strips που χρησιμοποιήθηκαν είναι 18cm x 0.5cm x 1.5mm, η βαθμίδωση του PH 3 έως 10 ήταν συνεχής μη γραμμική με μια ενίσχυση στην περιοχή από 5 έως 7 (εκεί εστιάζονται οι περισσότερες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον).

Για τις αναλυτικές 2-DE, η ενυδάτωση των ταινιών πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με την τοποθέτηση των δειγμάτων που είχαν συγκέντρωση 60μg πρωτεΐνης. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος ενυδάτωσης ήταν 350μl (ουρία 8M, CHAPS 4%(w/v) DTE 1%(w/v), αμφολύτες ευρέως φάσματος με PH 3-10, 0.2 % (w/v) και 0.005% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης).

Κάθε δείγμα, τοποθετείται στην ειδική θέση της συσκευής. Η πηκτή τοποθετείται σε επαφή με το δείγμα. Τέλος η πηκτή καλύπτεται με καλυπτικό DryStrip Cover Fluid (Amersham Biosciences), για να αποφευχθεί η κρυσταλλοποίηση της ουρίας. Τοποθετούνται κατόπιν στα ηλεκτρόδια, μικρά κομμάτια χαρτιού εμβαπτισμένα σε δις-απεσταγμένο H₂O, για να συγκεντρωθούν εκεί τα άλατα που περιέχονται στα δείγματα και όχι στα ηλεκτρόδια. Τα χαρτάκια ανανεώνονται κάθε 6h.

Η ηλεκτροφόρηση ακολουθεί το εξής πρόγραμμα: στους 16⁰C 0V επί 1h για την ενυδάτωση των ταινιών, 30V για 8 h, 200V για 1 h, από 30V σε 350V για 3 h, από 3500V σε 8000V για 30min, αύξηση σε 8000V για όσο χρόνο χρειάζεται μέχρι οι ταινίες να έχουν το σύνολο των 8000V h αθροιστικά. Το πρόγραμμα καθορίζεται ανάλογα με το μήκος των ταινιών και προτείνεται από την εταιρεία που κατασκευάστηκε (Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences).

Για τις παρασκευαστική 2-DE που έγινε για την φασματοσκοπία της μάζας, η ενυδάτωση της πηκτής έγινε επί 12ωρον με διάλυμα ενυδάτωσης και αποδιάταξης



που αποτελείται από: ουρία 8M, CHAPS 4%(w/v), DTE 1%(w/v), αμφολύτες ευρέως φάσματος PH 3-10, 0.2 % (w/v) και 0.005% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης.

Η πηκτή τοποθετήθηκε στις ειδικές θήκες της συσκευής. Η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης των δειγμάτων ήταν 1mg/l. Στο κάτω μέρος των ηλεκτοδίων τοποθετήθηκαν, βρεγμένα χαρτάκια με δις-απεσταγμένο H₂O που αλλάζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι πηκτές καλύφθηκαν με καλυπτικό DryStrip Cover Fluid (Amersham Biosciences).

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε για τις παρασκευαστικές πηκτές ήταν το εξής: στους 30V επί 30min, 200V επί 2 h, 500V επί 2 h, από 500V σε 3500V επί 30min, 3500V επί 5 h, από 3500V σε 5000V επί 30min, 5000V επί 4 h, 5000V σε 8000V επί 30min, 8000V μέχρις ότου τα συνολικά Volt να είναι 95000Vh (Bianchi et al 2005). Οι αναλυτικές και παρασκευαστικές ηλεκτροφορήσεις δυτλής διάστασης πραγματοποιήθηκαν με συσκευή Ettan™ IPGphor™ (Amersham Biosciences).



2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΙΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ / ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ SDS –PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

2.4.1 ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΜΦΟΛΙΤΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης των πηκτών που προορίζονται για την συσκευή των πηκτών με τους αμφολύτες περιγράφεται από τον πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4 Σύσταση των πηκτών για την ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης.

	Separating GEL (Διάλυμα διαχωρισμού) (0.375M Tris, pH:8.8	Stacking Gel (Διάλυμα επιστοιβαξης) (0.125M Tris, pH:6.8
Monomer Concentrations (%T 2.67% C)	12%	4.0%
Acrylamide/bis(30%T,2.67% C Stock)	40 ml	1.3ml
Distilated water	33.5ml	6.1ml
1.5M Tris-HCL, p H 8.8	25ml	
0.5M Tris-HCL, p H 6.8		2.5ml
10% (w/v) SDS	1ml	100μl
10% APS	500μl	50μl
TEMED	50 μl	10μl
Total monomer	100ml	10ml

Οι πηκτές αυτές αποτελούνται από την πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel) και τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η ποσότητες που αναφέρονται στον πίνακα 3 ισχύει για 2 μεγάλες πηκτές. Οι πηκτές της πρώτης διάστασης εξισορροπούνται με διάλυμα 40ml 0.5M Tris-HCL, p H: 8.8, 80ml 10% SDS, 8ml 0.05% μπλέ της βρομοφαινόλης, 150 ml dd H₂O.



Μετά την εξισορρόπηση των πηκτών της πρώτης διάστασης, αυτές τοποθετούνται στην κορυφή της δεύτερης διάστασης με προσοχή για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.

Πάνω από τις πηκτές, τοποθετείται πηκτή αгарόζης που αποτελείται από 0.10 gr αгарόζη, 2.5 ml 0.5M Tris-HCL, pH 6.8 και 7.5 ml dd H₂O.

Οι συσκευές της πρώτης και της δεύτερης διάστασης είναι της εταιρείας BIORAD.

Οι πηκτές της δεύτερης διάστασης έτρεξαν σε 200 V, σε θερμοκρασία 10°C, για τόσο χρόνο ώστε το μέτωπο (χρωματισμένο με μπλέ της βρομοφαινόλης) να φθάσει στο κάτω άκρο της πηκτής.

2.4.2 ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΤΑΙΝΙΕΣ (STRIPS)

Η μέθοδος εκτελέστηκε όπως περιγράφηκε από τον Laemmli (1970) και τροποποιήθηκε από τον Hochstrasser (1988a, 1988b). Οι πηκτές της δεύτερης διάστασης έγιναν στην συσκευή πολλαπλού πολυμερισμού, χρησιμοποιώντας γραμμική βαθμίδωση του ακρυλαμιδίου 9-16% T και 2.6% C του ακρυλαμιδίου – PDA (PiperazinDiAcrylamide)(C₁₀H₁₄N₂O₂), 0.375 M Tris-HCL PH 8.8, 5 mM sodium tiosulfate (Na₂S₂O₃), 0.05% TEMED (v/v), 0,1% APS (w/v).

Οι πηκτές κατασκευάστηκαν σε διαστάσεις 18cm x 20cm x 1.5mm και με προδιαγραφές κατάλληλες ώστε να διαχωριστούν πρωτεΐνες μοριακού βάρους μεταξύ 10000 και 200000.

Μετά από την ισοηλεκτρική εστίαση, οι πηκτές της πρώτης διάστασης εξισορροπούνται με διάλυμα που περιέχει 6M SDS 2% (w/v), γλυκερόλη 30%(w/v), DTE 2%(w/v) και ίχνη από μπλέ της βρομοφαινόλης σε Tris-HCl 0.05M pH 6.8. Το διάλυμα το χωρίζουμε σε ίσα μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκε DTE με σκοπό την αναγωγή για 5min και στο άλλο μέρος προστέθηκε ιοδοακεταμίδιο με σκοπό την αλκυλίωση 2.5%(w/v).

Μετά την εξισορρόπηση οι πηκτές (ταινίες), τοποθετήθηκαν σε οριζόντια, ευθύγραμμη θέση, πάνω από τις πηκτές της δεύτερης διάστασης μαζί με διάλυμα αгарόζης και γλυκίνης, που βοηθάει να παραμείνει στην θέση της η πηκτή της πρώτης διάστασης.

Σε κάθε πηκτή εφαρμόζεται ρεύμα εντάσεως 40mA / πηκτή σε θερμοκρασία 10°C.



Από την σύγκριση των δύο μεθόδων της πρώτης διάστασης (πηκτές που περιέχουν αμφολύτες και πηκτές του εμπορίου), η δεύτερη μέθοδος, προσδίδει μια μεγαλύτερη ακρίβεια στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η επαναληψιμότητα αλλά και η επικράτηση των ίδιων συνθηκών στα πειράματα. Σε αντίθεση, στην πρώτη μέθοδο (πηκτές που περιέχουν αμφολύτες) η επαναληψιμότητα δεν είναι εφικτή διότι οι πηκτές πολυμερίζονται κάθε φορά πριν την έναρξη των πειραμάτων. Αυτό σημαίνει ότι οι συνθήκες, δεν είναι πάντα οι ίδιες, γιατί επεισέρχεται πολλές φορές ο ανθρώπινος παράγοντας που στατιστικώς αυξάνει τη πιθανότητα λάθους ή έλλειψης ακριβείας των πειραμάτων.

2.5 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

2.5.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ.

- μονιμοποίηση των πρωτεϊνών με διάλυμα 50% μεθανόλης και 50% οξικό οξύ για 20min.
- μια έκπλυση 10min με διάλυμα 50% μεθανόλης.
- μια έκπλυση 120 min με δις-απεσταγμένο H_2O .
- μια έκπλυση 1h με διάλυμα 0.02% $Na_2S_2O_3$.
- μια έκπλυση για αναγωγή για 30min με διάλυμα 5μg/ml DTT(dithiothreitol).
- μια έκπλυση για τη χρώση για 20min με διάλυμα 0.1% $AgNO_3$.
- 2 εκπλύσεις με δις-απεσταγμένο H_2O .
- εμφάνιση με διάλυμα 0.04% φορμαλδεύδης και 2% Na_2CO_3 .
- η αντίδραση σταματάει με διάλυμα οξικού οξέος 5% για 20min.



2.5.2 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΗΚΤΕΣ

Μετά το τέλος της δεύτερης διάστασης, οι πηκτές τοποθετούνται επί 5 min σε δις-απεσταγμένο H_2O για να εκπλυθεί η περίσσεια από το διάλυμα των ηλεκτροδίων.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν σύμφωνα με τους Oakley et al (1980) και Hochstrasser et al (1988b) είναι τα εξής:

-έκπλυση επί 1 ώρα, με διάλυμα εθανόλης 40%(v/v) και οξικού οξέος 10% (v/v) σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-έκπλυση επί 3 h, με διάλυμα μονιμοποίησης που αποτελείται από 5%(v/v) αιθανόλη και οξικό οξύ 5%(v/v) σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-έκπλυση 10 min με δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-εκπλύση 30 min με διάλυμα 2%(w/v) γλυταλδεύδης, οξικό νάτριο 0.5 M σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία 4°C.

-3 έκπλυσεις δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία 4°C.

-2 εκπλύσεις 30 min τη καθεμία, με διάλυμα που περιέχει NDS 0.05%(w/v) σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία 4°C.

- 4 εκπλύσεις 15 min με δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία 4°C.

-1 έκπλυση με διάλυμα 0.8%(w/v) $AgNO_3$, 0.02N NaOH, 0.33%(v/v) αμμωνίας σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-4 εκπλύσεις για 4 min με δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-μια έκπλυση περίπου 12 min με διάλυμα εμφάνισης που περιέχει 0.005%(w/v) κιτρικού οξέος και 0.037%(w/v) φορμαλδεύδης σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-η αντίδραση ανάπτυξης διακόπτεται για 10 min με διάλυμα διακοπής της αντίδρασης που περιέχει οξικό οξύ 5%(v/v) σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κατόπιν οι πηκτές τοποθετούνται σε δις-απεσταγμένο H_2O σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να ακολουθηθεί διαδικασία της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας.



2.5.3 ΧΡΩΣΗ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΕΣ ΠΗΚΤΕΣ, ΣΥΜΒΑΤΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ (Mass-Spectrometry)

Οι παρασκευαστικές πηκτές που πραγματοποιήθηκαν για την φασματοσκοπία μάζας χρωματίζονται με νιτρικό άργυρο. Η χρώση αυτή είναι διαφορετική από εκείνη των αναλυτικών πηκτών γιατί είναι πιο ήπια. Σκοπός της χρώσης είναι να χρωματίσει τις κηλίδες για να εντοπιστούν, ώστε να καταστεί δυνατόν να κοπούν εν συνεχεία από την πηκτή και να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της αλληλουχίας τους με τον φασματογράφο μάζας. Η ήπια χρώση θα συντελέσει στον εύκολο αποχρωματισμό των κηλίδων. Η χρώση γίνεται με ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με τον Sinha (2001), με μερικές τροποποιήσεις:

-1 έκπλυση για 1h με διάλυμα μονιμοποίησης που αποτελείται από εθανόλη 30%(v/v) και οξικό οξύ 10%(v/v).

-1 έκπλυση για 3h με διάλυμα μονιμοποίησης που αποτελείται από εθανόλη 5%(v/v) και οξικό οξύ 5%(v/v).

-1 έκπλυση για 45 min για ευαισθητοποίηση των πρωτεϊνών, που περιέχει 0.333%(w/v) NDS ($C_2H_6Na_2O_6S_2$), 0.5M οξικό κάλιο (CH_3COOH) και 30% (v/v) αιθανόλη.

-6 έκπλύσεις 10 min με δις- απεσταγμένο H_2O .

-1 έκπλυση 2h με διάλυμα που περιέχει 0.2%(v/v) νιτρικό άργυρο.

-1 έκπλυση 15 min με δις- απεσταγμένο H_2O .

-η εμφάνιση πραγματοποιείται σε 45 min, με διάλυμα που αποτελείται από 3% άνυδρο ανθρακικό κάλιο, 0.01%(v/v) φορμαλδεύδη και 0.00125%(w/v) $Na_2S_2O_3$.

-η αντίδραση της εμφάνισης σταματά με διάλυμα που περιέχει 0.4%(w/v) Tris και 5% οξικό οξύ(v/v), επί 30 min.

Οι πηκτές μεταφέρονται σε δις-απεσταγμένο H_2O , για να ακολουθήσει η μέτρησης της οπτικής πυκνότητας.



2.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΚΤΕΙΘΕΙΣΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι εικόνες των πηκτών που περιέχουν τις κηλίδες χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο και μέσω της οπτικής απορρόφησης, έγινε η απεικόνιση της εικόνας (ψηφιακές εικόνες), με την χρήση του Computing Densitometer 300 S, (400 x 5000 pixels, 12bits/pixel), (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Οι εικόνες μεταφέρθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Melanie 4 (GeneBio, Geneva, Swizerland).

Η ρύθμιση των γραφικών της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται με την μετακίνηση των πρωτεϊνών του δείγματος προς ανάλυση (60μgr) σε σχέση με ορρό του αίματος (40μgr) ως εσωτερικό standard, βάσει των τιμών του ισοηλεκτρικού σημείου, PI, και του μοριακού βάρους, MB, που έχουν υπολογιστεί και αντιστοιχηθεί με τις κηλίδες του ορού του αίματος. Οι κηλίδες αυτές αποτελούν ένα χάρτη αναφοράς στη ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης για τα βιολογικά υγρά και ειδικότερα για το BAL, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή (παράγραφος 1.6). Ο χάρτης αυτός είναι συνδεδεμένος on line με τον διακομιστή της προτεομικής ιστοσελίδας Exrasy, που περιέχει τιμές ισοηλεκτρικού σημείου PI και του μοριακού βάρους MB για την κάθε κηλίδα. Σύμφωνα με το γραφικό της υπό εξέταση πηκτής ρυθμίζονται και οι υπόλοιπες πηκτές.

Ανάλογη διαδικασία ακολουθήθηκε και με τα γραφικά των παρασκευαστικών πηκτών που έχουν συγκριθεί μέσω προγράμματος Melanie 4 με τα αντίστοιχα των αναλυτικών πηκτών της ίδιας κατηγορίας. Οι κηλίδες που θεωρήθηκαν σημαντικές ως ποσοτικές ή ποιοτικές διαφορές, αναλύθηκαν περαιτέρω με τον φασματογράφο μάζας.



2.7 ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΑΣ

2.7.1 ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΗΛΙΔΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΠΕΨΗ ΜΕ ΘΡΥΨΙΝΗ

Οι κηλίδες που αναγνωρίζονται ως σημαντικές ποιοτικές ή ποσοτικές διαφορές, ύστερα από την ανάλυση των εικόνων με το πρόγραμμα Melanie 4, κόβονται από τις πηκτές, αποχρωματίζονται από τον νιτρικό άργυρο και αφυδατώνονται. Στις κηλίδες προστίθεται στην συνέχεια διάλυμα με τριψίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται (Gharahdaghi et al, 1999) :

-αποχρωματισμός : μια πλύση με διάλυμα 15m M $K_3Fe(CN)_6$ (potassium Hexacyanoferrate III) και 50m M $Na_2S_2O_3$ (tiosulfate sodium) μέχρι πλήρους αποχρωματισμού.

-5 πλύσεις με δις- απεσταγμένο H_2O για να σταματήσει η αντίδραση της οξείδωσης

-μια πλύση για 20 min με δις- απεσταγμένο H_2O με $(NH_4)_2CO_3$ (Ammonium bicarbonate).

-5 πλύσεις με δις- απεσταγμένο H_2O .

-αφυδάτωση των κηλίδων 2 φορές με ακετονιτρίλιο 100% [$(CH_3)CN$].

-αφαίρεση του ακετονιτρίλιου και στέγνωμα των κηλίδων

-πέψη : το βήμα αυτό διαρκεί 30 min και πραγματοποιήθηκε σε πάγο. Έγινε η προσθήκη διαλύματος 5m M (Ammonium bicarbonate) $(NH_4)_2CO_3$ και γίνεται επώαση overnight στους $37^{\circ}C$ με διάλυμα 12.5ng/μl θρυψίνης (Sigma Aldrich). Σκοπός του διαλύματος της θρυψίνης είναι να κόψει το ένζυμο σε θέσεις λυσίνης έτσι ώστε να δημιουργηθούν μικρά πεπτίδια.

Τα προϊόντα πέψης της θρυψίνης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το φασματογράφο μάζας Ettan MALDI-Tof (Amersham Biosciences). Η έρευνα έγινε στην τράπεζα δεδομένων (Swiss-Prot, NCBItr) και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι Maskot (<http://www.matrixscience.com>) .



2.8 DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS (DIGE)

2.8.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ

Αρχικά προετοιμάζεται το standard δείγμα, που αποτελείται από 24 δείγματα του BAL που έχουν το καθένα συγκέντρωση πρωτεΐνης 30 μg . Στην συνέχεια γίνεται ανάμειξη όλων των δειγμάτων, συνολικά 720 μg πρωτεΐνης, και προστίθενται οι φθορίζουσες ουσίες σε κατάλληλη ποσότητα.

Οι φθορίζουσες ουσίες είναι ουσίες στερεές που έχουν διαλυθεί σε διμεθυλφορμαμίδιο (DiMetilFormamide, DMF). Η ποιότητα του DMF είναι πολύ σημαντική γιατί το DMF έχει την ιδιότητα να αποδομείται και να δημιουργεί αμίνες. Οι αμίνες αντιδρούν με τις εξωτερικές ομάδες NHS των χρωστικών και τις καθιστούν ανενεργές.

Η προετοιμασία των χρωστικών έχει ως εξής:

Προστέθηκαν 25 μl DMF σε κάθε φθορίζουσα ουσία και φυγοκεντρήθηκαν για 30sec σε 9000g. Η περιεκτικότητα για κάθε φθορίζουσα ουσία είναι 1mM. Η Cy2 είναι μπλέ, η Cy3 είναι πράσινη και η Cy5 είναι κόκκινη. Αυτές οι διαδικασίες γίνονται σε σκοτεινό θάλαμο διότι οι χρωστικές είναι ευαίσθητες στο φως και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν.

Η σήμανση επιτυγχάνεται με την χρήση ενός διαλύματος εργασίας (working solution), που περιέχει τον αρχικό όγκο του διαλύματος και 1.5 φορά τον αρχικό όγκο του διαλύματος σε DMF. Το working solution πρέπει να έχει συγκέντρωση 400 pmol/ μl . Με 1 μl working solution σημαίνονται 50 μg από την πρωτεΐνη. Η σήμανση επιτυγχάνθηκε με 14.4 μl Cy2 στο standard δείγμα, 1.2 μl Cy3 στα 12 δείγματα και 1.2 μl Cy5 στα 12 δείγματα.

Η αντίδραση της χρώσεως διήρκεσε 30min και πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό θάλαμο καθώς οι χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη λυσίνης (1 μl) διαλύματος 10 m M για 10 min στο σκοτάδι και σε πάγο. Οι φθορίζουσες ουσίες κατά την διάρκεια της σήμανσης ενώνονται με την λυσίνη της πρωτεΐνης. Μια ικανοποιητική σήμανση πραγματοποιείται όταν το 3% των καταλοίπων των αμινοξέων είναι συνδεδεμένα με τις φθορίζουσες ουσίες. Τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C μέχρι την τελική ανάλυση.



2.8.2 ΠΡΩΤΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ : ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιήθηκε όπως την περιέγραψε ο Götg (1988) και ο Bjellqvist (1993). Οι ταινίες (strips) που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από έτοιμες πηκτές ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου που πολυμερίστηκαν με immobiline (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

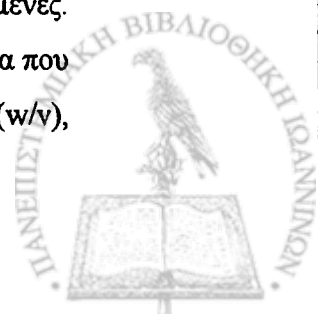
Τα χαρακτηριστικά των strips που χρησιμοποιήθηκαν είναι 24cm x 3mm x 0.5mm, η βαθμίδωση του PH 3 έως 10 ήταν συνεχής όχι γραμμική με μια ενίσχυση στην περιοχή από 5 έως 7 (εκεί εστιάζονται οι περισσότερες πρωτεΐνες που παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον).

Τα δείγματα ήταν 12 και περιελάμβαναν ίση ποσότητα πρωτεΐνης σημασμένη με τις τρεις διαφορετικές χρωστικές. Δηλαδή, ποσότητα 20μl σεσημασμένου δείγματος με Cy3, 20μl σεσημασμένου δείγματος με Cy5 και 20μl σεσημασμένου δείγματος με Cy2. Σε αυτά τα δείγματα προστέθηκαν 60 μl διαλύματος ενυδάτωσης (ουρία, CHAPS, DTE). Στην συνέχεια έγινε η προσθήκη 3 μl αμφολυτών σε 327 μl διαλύματος ενυδάτωσης και μερικά ίχνη από κυανού της βρωμοφαινόλης. Η διαδικασία είναι η ίδια όπως περιγράφηκε 2.3.1. Το πρόγραμμα που έτρεξαν οι πηκτές ήταν σύμφωνα με την παράγραφο 2.3.1.

Κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η συσκευή καλύπτεται με ειδικό κάλυμα, ώστε να αποφευχθεί αποδόμιση των χρωστικών από το φώς.

2.8.3 ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ : SDS -PAGE

Η διαδικασία είναι όμοια με εκείνη της παραγράφου 2.3.2, Οι πηκτές της δεύτερης διάστασης έγιναν στην συσκευή πολλαπλού πολυμερισμού, χρησιμοποιώντας γραμμική βαθμίδωση του ακρυλαμιδίου 9-16%T και 2.6% C του ακρυλαμιδίου - PDA (PiperazinDiAcrylamide), 0.375 M Tris-HCL PH 8.8, 5 Mm (Na₂S₂O₃), 0.05% TEMED (v/v), 0,1% APS (w/v). Η διαφορά είναι στην συσκευή της δεύτερης διάστασης που είναι η Ettan-Dalt II. Η συσκευή αυτή χωρίζεται σε δύο δεξαμενές την άνοδο και την κάθοδο. Στην κάτω δεξαμενή, άνοδος, το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν :TRIS 0.6% (w/v), SDS 0.1%(w/v), γλυκίνη 2.88%(w/v),



Sodium azide 0.02%(w/v). Στην πάνω δεξαμενή, κάθοδος, το ρυθμικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν TRIS 0.6% (w/v), SDS 0.1%(w/v), γλυκίνη 2.88%(w/v).

Η δεύτερη διάσταση πραγματοποιήθηκε στους 16°C , με 200W για 12 πηκτές στο σκοτάδι.

2.8.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ

Μετά την δεύτερη διάσταση, οι πηκτές τοποθετήθηκαν στο ειδικό όργανο μέτρησης Typhoon, που έχει την ικανότητα να δημιουργεί ψηφιακές εικόνες με βάση τα δείγματα που έχουν σημειωθεί με φθορίζουσες ουσίες. Το Typhoon έχει 3 laser με διαφορετικά μήκη κύματος το καθένα :

- laser κόκκινο (με λ στα 633nm) Cy5
- laser πράσινο (με λ στα 532nm) Cy3
- laser μπλέ (με λ στα 457nm και 488nm) Cy2

Τα δείγματα που έχουν δεχθεί ακτινοβολία με laser, εκπέμπουν φως ανάλογα με το είδος της φθορίζουσας ουσίας που περιέχεται στα δείγματα. Το φως εκπομπής συλλέγεται από ένα οπτικό σύστημα, μέσω φίλτρου το οποίο επιτρέπει την διέλευση των ακτίνων λ που διεγείρονται ανάλογα με τον τύπο της φθορίζουσας ουσίας. Μέσω του φίλτρου, οι ακτίνες φθάνουν στον ανιχνευτή, όπου η φωτεινή πληροφορία μετατρέπεται σε ηλεκτρική, δηλαδή ψηφιακή πληροφορία. Η οπτική απορρόφηση κάθε πηκτής μετριέται 3 φορές, μία φορά για κάθε laser διαφορετικού μήκους κύματος, δημιουργώντας για κάθε πηκτή 3 εικόνες που επικαλύπτονται τέλεια, μία για κάθε φθορίζουσα ουσία.



2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ CLUSTERING (ΚΑΤΑ ΣΥΣΤΑΔΕΣ)

Η συλλογή του βιολογικού υγρού το οποίο αναλύθηκε, έγινε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και το Νοσοκομείο Χατζηκώστα Ιωαννίνων. Τα δείγματα ελήφθησαν με την συγκατάθεση των εξετασθέντων. Το κύριο χαρακτηριστικό των ελεγχθέντων ατόμων ήταν η έκθεση στον αμίαντο. Η ανίχνευση των σωματίων αμιάντου έγινε με την λεπτομερή μορφολογική εξέταση του BAL στο μικροσκόπιο.

Τα δείγματα του βιολογικού υλικού, συλλέχθηκαν από ειδικά κατηρητισμένο προσωπικό και μέχρι την ανάλυση των πρωτεϊνών το υλικό συντηρήθηκε στους -80°C .

Έγινε αυστηρή επιλογή των περιστατικών ώστε τα άτομα που περιελήφθησαν στην μελέτη να είναι μη καπνιστές και να είναι ελεύθεροι νόσου. Έτσι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν αναγκαστικά πολύ μικρός. Για το λόγο αυτό, ως στατιστική μέθοδος ανάλυσης των δειγμάτων επιλέχθηκε αυτή της κατά συστάδες δειγματοληψίας (cluster sampling). Με τη μέθοδο αυτή χωρίζουμε τον πληθυσμό των δειγμάτων σε ομάδες, τις οποίες καλούμε συστάδες (clusters) και στη συνέχεια γίνεται επιλογή ενός τυχαίου δείγματος συστάδων. Συλλέγοντας το βιολογικό υλικό κατ' αυτό τον τρόπο, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το δείγμα μας είναι αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού.

Ο διαχωρισμός του πληθυσμού σε ομάδες-συστάδες φαίνεται να μοιάζει με τη μέθοδο της στρωματοποιημένης δειγματοληψίας όπου πάλι ο πληθυσμός χωρίζεται σε ομάδες-στρώματα. Υπάρχει, όμως μια σημαντική διαφορά. Στην στρωματοποιημένη δειγματοληψία έχουμε δει ότι για την βέλτιστη κατασκευή των στρωμάτων, πρέπει τα στρώματα να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενή ως προς τα στοιχεία (μονάδες) που περιέχουν και να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο ανομοιογενή μεταξύ τους (να διαφέρουν το ένα από το άλλο) ως προς το χαρακτηριστικό που μας ενδιαφέρει. Αντίθετα, στην κατά συστάδες δειγματοληψία ο χωρισμός γίνεται σε όσο το δυνατόν πιο ομοιογενείς συστάδες που απαρτίζονται από όσο το δυνατόν πιο ανομοιογενή στοιχεία.

Η κατά συστάδες δειγματοληψία είναι μία αποτελεσματική πρακτική ανάλυσης, κατά την οποία, λαμβάνονται περισσότερες πληροφορίες για κάποια παράμετρο του πληθυσμού με το ελάχιστο δυνατό κόστος

Το κυριότερο ερώτημα που προκύπτει στην κατά συστάδες δειγματοληψία είναι τι είναι προτιμότερο, ο χωρισμός του πληθυσμού σε πολλές συστάδες με λίγα στοιχεία



ή σε λίγες συστάδες με πολλά στοιχεία. Η απάντηση εξαρτάται από το είδος του πληθυσμού. Αν τα στοιχεία κάθε συστάδας είναι σχετικά όμοια μεταξύ τους είναι καλύτερα να έχουμε πολλές συστάδες με λίγα στοιχεία. Αντίθετα αν τα στοιχεία έχουν διαφορές μεταξύ τους είναι καλύτερα να έχουμε λίγες συστάδες με πολλά στοιχεία. Στη μελέτη μας, όπως προαναφέρθηκε, ο αριθμός των πρωτεϊνών είναι μικρός και διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Κρίθηκε συνεπώς προτιμότερη η χρήση της δεύτερης μεθόδου (λίγες συστάδες με πολλά στοιχεία). Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει, παρόλο που ο αριθμός των στοιχείων είναι μικρός, να επιτύχουμε εκτιμήσεις των παραμέτρων που μας ενδιαφέρουν, πιο κοντά στην πραγματική τιμή. Και αυτό γιατί οι εκτιμήσεις δεν επηρεάζονται σημαντικά από το εύρος της διασποράς, καθιστώντας στο μέγιστο βαθμό πιο ακριβή και συνεπώς πιο αξιόπιστη, τη σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών των συστάδων. (Χαράλαμπος Χ.Δαμιανού, Μεθοδολογία δειγματοληψίας Τεχνικές & Εφαρμογές. Εκδόσεις «Αίθρα» Σελίδα 209-210, 2002).



3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΗΩΣΙΝΗΣ

Η μορφολογική ανάλυση των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, έδωσε τις ακόλουθες εικόνες:

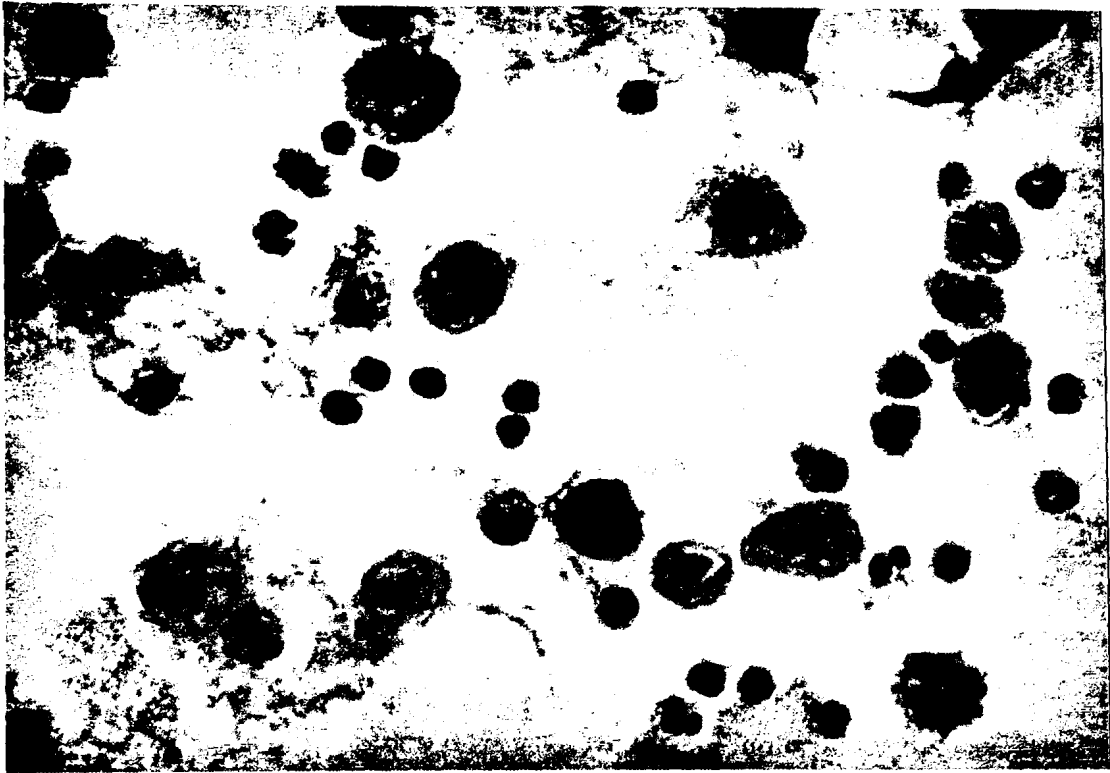
α) Στους μάρτυρες τα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, αποτελούνται κυρίως, από μακροφάγα σε ποσοστό >90%, λίγα λεμφοκύτταρα σε ποσοστό 5-10% (εικ. 3.1.1) και σπάνια ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα, εικόνα που παρατηρείται σε υγιή άτομα.

β) Στους Μετσοβίτες με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις παρατηρείται αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων (14-32%) (εικ. 3.1.2).

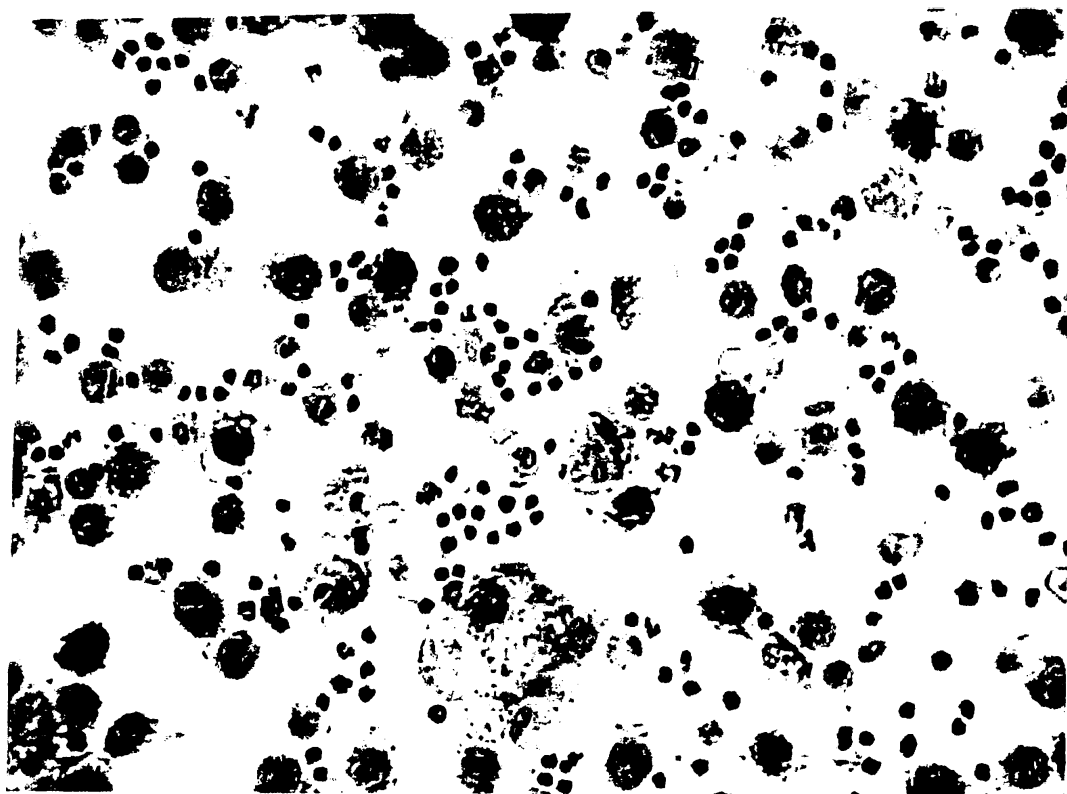
γ) Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των Μετσοβιτών χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις το ποσοστό των λευκοκυττάρων είναι φυσιολογικό.

Σωματία αμιάντου ανιχνεύονται και στις δύο ομάδες Μετσοβιτών, σε μεγάλες ποσότητες σε όλους τους εξετασθέντες (εικ.3.1.3).





Εικ 3.1.1: Χρώση αιματοξολίνης-ηωσίνης φυσιολογικού BAL.



Εικ 3.1.2: Χρώση αιματοξυλίνης -ηωσίνης σε κύτταρα από Μετσοβίτες με υπεζωκοτικές αποπιτανώσεις και έντονη λεμφοκυτταρική κοψελιδίτιδα.



Εικ 3.1.3: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε Μετσοβίτη που έχει εκτεθεί σε αμίαντο. Το σωματίο αμιάντου έχει σχήμα επιμήκες με άκρα αποστρογγλωμένα. Παρατηρούνται τα μακροφάγα που προσπαθούν να φαγοκυτταρώσουν και να αδρανοποιήσουν την ίνα (βέλη).

3.2 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά από την σύγκριση των κηλίδων (matching) μέσω του προγράμματος Melanie 4 προέκυψαν 200 ποσοτικές και 5 ποιοτικές διαφορές. Οι κηλίδες που στάλθηκαν για περαιτέρω ανάλυση στο φασματογράφο μάζας ήταν 145. Ο αριθμός είναι μικρότερος διότι, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στις παρασκευαστικές πηκτές (όπως έχει αναφερθεί στο ειδικό μέρος, παράγραφος 2.3.2), είναι δύσκολος, επειδή η ποσότητα της υπό ανάλυση πρωτεΐνης είναι αρκετά μεγάλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δυσκολία διαχωρισμού των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια πολλές διαφορές δεν ανιχνεύονται στη παρασκευαστική πηκτή. Οι κηλίδες στάλθηκαν στον φασματογράφο μάζας όπου και ταυτοποιήθηκαν οι 60 (Πίνακας 3.3, σελ.62). Ο μειωμένος αριθμός οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένες κηλίδες είναι πολύ μικρής μάζας που δεν επαρκεί για την ταυτοποίησή τους. Οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική ποσοτική ή ποιοτική διαφορά είναι 13 (11 ποσοτικές διαφορές και 2 ποιοτικές) (Πίνακας 3.1 και 3.2, σελ. 61 και 62).

Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν στην έκφρασή τους σημαντικές διαφορές είναι οι εξής:

- 1) Μία πρωτεΐνη, η Abhydrolase domain (AB14B) παρατηρείται σε αυξημένα επίπεδα στη ομάδα Pc(-) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, Pc(+) και control.
- 2) Τρεις πρωτεΐνες, η PROTEIN S100-A9, η Alpha-1-antitrypsin, η Ig gamma-2 chain, παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στη ομάδα control σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες Pc(+) και Pc(-).
- 3) Τέσσερις πρωτεΐνες η Haptoglobin, η Heat shock protein beta-1, η Ig gamma-2 chain, η Alpha-1-antitrypsin, παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στη ομάδα control σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, Pc(+) και Pc(-).
- 4) Πέντε πρωτεΐνες, η Acid ceramidase, η Serotransferin, η GlutathioneS-transferaseP, η CALCYPHOSIN, η Actin cytoplasmatic 1, παρατηρούνται σε πολύ υψηλά επίπεδα στη ομάδα Pc(-) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, Pc(+) και control.



Οι 60 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, κατετάγησαν σε έξι ομάδες (clusters) πρωτεϊνών με παρόμοια κινητική (πίνακας 3.1).

α) Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει 5 πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στα ίδια επίπεδα μεταξύ των ατόμων με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+) και των μαρτύρων, ενώ τα επίπεδά τους είναι χαμηλότερα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-).

β) Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει 3 πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-).

γ) Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει 6 στοιχεία χωρίς σαφή κινητικότητα μεταξύ των δειγμάτων και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα.

δ) Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει 10 στοιχεία, πρωτεΐνες, που ανιχνεύονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους Μετσοβίτες (Pc+ και Pc-), ενώ τα επίπεδά τους είναι χαμηλότερα στους μάρτυρες

ε) Η πέμπτη ομάδα περιλαμβάνει 8 στοιχεία που ανιχνεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-) και στους μάρτυρες, σε σχέση με τα άτομα με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+).

στ) Η έκτη ομάδα περιλαμβάνει 28 στοιχεία που ανιχνεύονται σε υψηλότερα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-), σε σχέση με τα άτομα με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+) και τους μάρτυρες.

Τα δείγματα που περιέχονται στον πίνακα (2.1.1 κεφ. 22, σελ. 35) είναι εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση της διπλής διάστασης. Οι ψηφιακές εικόνες των πηκτών είναι εκείνες που αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Melanie 4. Η πηκτή 157 ανήκει στην ομάδα ελέγχου, η πηκτή 165 ανήκει στην ομάδα με αποτιτανώσεις ενώ 164 ανήκει στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις. Οι πηκτές αυτές αποτέλεσαν τις βασικές πηκτές ανάλυσης, διότι η αντιστοίχιση (matcing) των κηλίδων πραγματοποιήθηκε σε αυτές τις πηκτές. Με την αντιστοίχιση επιτυγχάνεται η σωστή μέτρηση του όγκων των κηλίδων όλων των πηκτών. Έτσι για μια κηλίδα αντιστοιχούν οι όγκοι από όλες τις πηκτές και από τις τρεις κατηγορίες (πίνακας 3.5 σελ.71). Οι ποσοτικές διαφορές προκύπτουν από τις διαφορές των όγκων των κηλίδων της πηκτής (διαφορά τουλάχιστον 2,5 μεγεθών). Οι ποιοτικές διαφορές μεταξύ των πηκτών προκύπτουν από την ύπαρξη μιας επιπλέον κηλίδας σε μια κατηγορία, σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες. Αυτή η κατηγορία των διαφορών, αποτελεί μια ένδειξη που πρέπει να επιβεβαιωθεί από ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων για να στοιχειοθετήσει μία ποιοτική διαφορά.



Στη συνέχεια οι διαφορές αυτές, που αντιστοιχούν σε κηλίδες, απομονώθηκαν από μια παρασκευαστική πηκτή που περιέχει ποσότητα πρωτεΐνης 1mg/g για κάθε μια κατηγορία δειγμάτων. Ο ρόλος της παρασκευαστικής πηκτής έγκειται στο να αποκοπούν από την πηκτή οι κηλίδες που επιλέγονται, και να αναλυθούν στον φασματογράφο μάζας. Οι διαφορές δεν είναι πάντα εφικτό να βρεθούν στην παρασκευαστική πηκτή, επειδή η μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης εμποδίζει σε αρκετές περιπτώσεις τον καλό διαχωρισμό τους.

Στις εικόνες 3.4.1 (σελ.80), 3.4.2 (σελ.81), 3.4.3 (σελ.82), απεικονίζονται οι πηκτές (για τη ομάδα ελέγχου, την ομάδα με αποτιτανώσεις, και την ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις αντίστοιχα) με τις διαφορές που περιγράφονται στον πίνακα 3.3 . Ο πίνακας 3.3 αποτελείται από τα clusters που έχουν διαφορετικά χρώματα ανάλογα με τις κατηγορίες. Στις πηκτές αναπαριστώνται οι διαφορές και στις τρεις κατηγορίες με χρώματα. Τα νούμερα και οι κύκλοι που υπάρχουν και στις εικόνες ανήκουν στα διαφορετικά clusters που αναπαρίστανται με διαφορετικά χρώματα.



3.2.1 ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΙΠΛΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ

Στους κάτωθι πίνακες περιέχονται πρωτεΐνες που πληρούν τις προϋποθέσεις του t-test (στατιστικά σημαντικές διαφορές εφ' όσον $p < 0.05$). Στη πρώτη στήλη περιέχεται ο αριθμός του cluster δηλαδή ανάλογα με την ομάδα την οποία ανήκουν οι πρωτεΐνες (παράγραφος 3.4) και στη στήλη **κατηγορία** περιγράφεται η ποσοτική αύξηση ή μείωση των πρωτεϊνών στις υπό εξέταση κατηγορίες.

Πίνακας 3.1

Ο πίνακας 3.1 περιέχει πληροφορίες για το όνομα της πρωτεΐνης, για την κατηγορία στην οποία ανήκει και τέλος για αποτέλεσμα για t-test. Στον πίνακα 3.1 περιέχονται μόνο οι πρωτεΐνες με $p < 0.05$. Όπου Pc(-) Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, Pc(+) Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, και control, ομάδα ελέγχου.

Αρίθμηση πρωτεΐνης στο cluster	Όνομα πρωτεΐνης	Κατηγορία	p
40	Abhydrolase domain(AB14B)	Pc(-)>Pc(+),control	0.006
49	PROTEIN S100-A9	Control<Pc(-),Pc(+)	0.001
54	Alpha-1-antitrypsin	Control<Pc(-),Pc(+)	0.014
57	Ig gamma-2 chain	Control<Pc(-),Pc(+)	0.004
59	Haptoglobin	Pc(-)<Pc(+),control	0,009
58	Heat shock protein beta-1	Pc(-)<Pc(+),control	0.031
52	Ig gamma-2 chain	Pc(-)<Pc(+),control	0.007
53	Alpha-1-antitrypsin	Pc(-)<Pc(+),control	0.007
34	Acid ceramidase	Pc(-)>Pc(+),control	0.044
39	Serotransferin	Pc(-)>Pc(+),control	0,017
38	GlutathioneS-transferaseP	Pc(-)>Pc(+),control	0,045
60	CALCYPHOSIN	Pc(-)>Pc(+),control	-
42	Actin cytoplasmatic I	Pc(-)>Pc(+),control	-



Πίνακας 3.2

Ο πίνακας 3.2 περιέχει πληροφορίες για το όνομα της πρωτεΐνης , και για την ποσοτική σχέση των κατηγοριών στην οποία ανήκουν. (Πιο αναλυτικές πληροφορίες περιέχονται στον πίνακα 3.5).

Αρίθμηση/cluster	Όνομα πρωτεΐνης	Pc(+)	Pc(-)	control
40	Abhydrolase domain(AB14B)	+	+++	++
49	PROTEIN S100-A9	+++	++	+
54	Alpha-1-antitrypsin	+++	++	+
57	Ig gamma-2 chain	++	++	+
59	Haptoglobin	+++	++	+
58	Heat shock protein beta-1	+++	++	+
52	Ig gamma-2 chain	++	+	+
53	Alpha-1-antitrypsin	++	+++	+
34	Acid ceramidase	+	+++	+
39	Serotransferin	++	+++	+
38	GlutathioneS-transferaseP	+	+++	+
60	CALCYPHOSIN	-	+	-
42	Actin cytoplasmatic 1	-	+	-



3.2.2 ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Στον πίνακα αυτό περιέχονται πληροφορίες όπως: ο κωδικός πρόσβασης στο Swiss-Prot. Με τον κωδικό αυτό μπορούμε να βρούμε πληροφορίες για το όνομα της πρωτεΐνης, την αλληλουχία της, την τοποθεσία της, το είδος του οργανισμού ή του ιστού που την συναντούμε και τη βιβλιογραφία επάνω στην δομή της. Στην δεύτερη στήλη καταγράφεται το όνομα της πρωτεΐνης και στην τρίτη και τέταρτη στήλη οι θεωρητικές και πειραματικές τιμές των πρωτεϊνών. Οι θεωρητικές τιμές είναι καταγεγραμμένες στην τράπεζα πληροφοριών Swiss-Prot. Οι πειραματικές τιμές προκύπτουν από την ανάλυση από το ίδιο το πρόγραμμα MELANIE 4. Οι αποκλίσεις στις τιμές, για παράδειγμα στο μοριακό βάρος (MB), οφείλονται σε θραύσματα της πρωτεΐνης. Για το ισοηλεκτρικό σημείο οι αποκλίσεις οφείλονται στα πειραματικά σφάλματα και στο γεγονός ότι οι ψηφιακές εικόνες δεν είναι πάντα ίδιες όπως οι θεωρητικές. Είναι σημειωμένες οι πρωτεΐνες που έχουν περάσει από το t-test.



Πίνακας 3.3

Στον πίνακα 3.3 περιέχονται πληροφορίες για τον αριθμό της κάθε πρωτεΐνης στο Swiss-PROT, το όνομα της πρωτεΐνης, τις θεωρητικές και πειραματικές τιμές (του pH και του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης) και τις τιμές του t-test.

cluster	Αριθμός Swiss-PROT	Όνομα πρωτεΐνης	Θεωρητικό PI/MB	Πειραματικό PI/MB	t-test
1					
13	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.51/31834	0,282/0,350
22	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.39/53781	0,062/0,309
4	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.36/37453	0,015
32	P68871	Hemoglobin sub BETA	6.81/15971	6.82/11369	0,207/0,794
36	P69905	Hemoglobin sub ALPHA	8.73/15174	8.13/11127	0,427/0,893
cluster 2a					
27.	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.21/27283	0,008
40	Q96IU4	Abhydrolase domain(AB14B)	5.94/22446	5.88/31834	0,006/0,344
56	P09467	Fructose-1,6-bisphosphate 1	6.60/37059	6.53/39286	0,113
Cluster 2b					
1	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.44/39950	0,018
24	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.50/36178	0,022
8	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.89/22670	0,379/0,164
3	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.80/36274	0,08/0,205
30	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.53/36073	0,214/0,264



29	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.17/49936	0,107/0,002
Cluster 3a					
12	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.15/11068	0,002
21	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.37/41720	0,953/
55	P29508	Serpin B3	6.35/44594	6.28/42112	0,342/0,641
37	P32119	Peroxiredoxin-2	5.67/21918	5.51/22049	0,528/0,389
35	P04745	Salivary alpha amylase	6.47/58415	6.28/53491	0,078
50	P06702	PROTEIN S100-A9	5.71/13291	5.71/12292	0,397
51	P29508	Serpin B3	6.35/44594	6.42/41555	0,333/0,593
57	P01859	Ig gamma-2 chain	6.97/23800	7.35/22644	0,004/0,565
49	P06702	PROTEIN S100-A9	5.71/13291	5.78/12166	0,001/0,833
54	P01009	Alpha-1-antitrypsin	5.37/46878	4.93/36950	0,014/0,499
Cluster 3b					
7	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.58/34588	0,45/0,682
14	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.54/52607	0,269
9	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	4.93/50977	0,368
59	P00738	Haptoglobin	6.13/45861	5.13/41665	0,009/0,349
58	P04792	Heat shock protein beta-1	5.98/22826	5.67/26566	0,03/0,175
52	P01859	Ig gamma-2 chain	7.66/36489	6.50/54226	0,007
2	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.61/50707	0,02/0,04
53	P01009	Alpha-1-antitrypsin	5.37/46878	4.87/38058	0,007
Cluster 4					
26	P02768	SERUM	5.92/71317	6.41/34946	0,52/0,378



		ALBUMIN			
23	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.39/53781	0,458/0,581
28	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.36/37453	0,001
20	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.36/20056	0,191
19	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.24/33619	0,346/0,684
5	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.60/24462	0,002
11	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.42/30586	0,02/0,166
25	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	6.32/50178	0,111
31	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.23/22354	0,426/0,093
18	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.47/21083	0,23
6	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.05/15369	0,288/0,279
10	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.15/26558	0,258/0,288
17	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.31/25997	0,119/0,259
15	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.36/36685	0,275
16	P02768	SERUM ALBUMIN	5.92/71317	5.38/32004	0,377
44	P06702	PROTEIN S100- A9	5.71/13291	5.50/11933	0,134/0,437
41	P19961	Alpha-amylase2B	6.64/58300	5.76/39549	0,05/0,143
34	Q13510	Acid ceramidase	7.52/45077	5.47/9713	0,044/0,004
46	P02787	Serotransferin	6.81/79280	6.17/41224	0,371
47	P02647	Apolipoprotein A- I	5.56/30759	5.26/24491	0,489/0,426
48	P68871	Hemoglobin sub BETA	6.81/15971	6.70/21231	0,315/0,107/0,211
33	P07339	Cathepsin D	6.10/45037	5.59/30268	0,279/0,084



42	P60709	Actin cytoplasmatic 1	5.29/42052	5.02/15310	
43	P08263	GlutathioneS-transferase A1	8.92/25541	5.34/11578	0,07
45	P00915	Carbonic anhydrase 1	6.63/28778	6.71/20692	0,119/0,246
39	P02787	Serotransferin	6.81/79280	7.20/16182	0,017
38	P09211	GlutathioneS-transferaseP	5.44/23438	5.24/13192	0,364/0,045
60	Q13938	CALCYPHOSIN	4.74/21068	4.462/1924	

3.2.3 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΑΣ

Στο πίνακα παρατίθενται πληροφορίες που προκύπτουν από τον φασματογράφο μάζας. Οι πληροφορίες σχετίζονται με το αριθμό των πεπτιδίων που ταυτοποιούνται μέσω σύγκρισης με τη βάση δεδομένων (matching) (Εισαγωγή παράγραφος 1.4.4). Τα υπόλοιπα στοιχεία, Sequence Coverage % (αποτελεί το ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας της πρωτεΐνης) και το Score αποτελούν σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση της κηλίδας. Πολύ χαμηλό σκορ έχει ως συνέπεια την εξέταση της κηλίδας με την μέθοδο MS-MS για περαιτέρω ανάλυση των πεπτιδίων (Εισαγωγή παράγραφος 1.4.3).



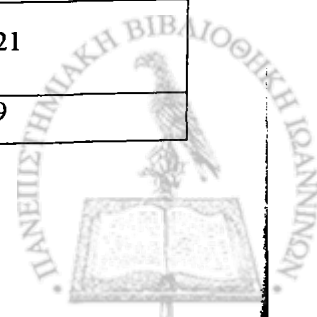
Πίνακας 3.4

Στον πίνακα 3.4 περιγράφεται το όνομα της πρωτεΐνης, οι πληροφορίες όπως Peptides Matches που περιγράφει τον αριθμό των πεπτιδίων που ταυτοποιείται, Sequence Coverage % το ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας και το Score αποτελούν στοιχεία απαραίτητα στοιχεία για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.

cluster 1	Όνομα πρωτεΐνης	Peptides Matches	Sequence Coverage %	Score
13	SERUM ALBUMIN	13	21	132
22	SERUM ALBUMIN	10	16	105
4	SERUM ALBUMIN	7	13	102
32	Hemoglobin sub BETA	6	54	109
36	Hemoglobin sub ALPHA	5	48	56
cluster 2a				
27	SERUM ALBUMIN	7	14	64
40	Abhydrolase domain(AB14B)	6	39	90
56	Fructose-1,6-bisphosphate 1	5	22	70
Cluster 2b				
1	SERUM ALBUMIN	16	32	198
24	SERUM ALBUMIN	7	15	87
8	SERUM ALBUMIN	5	8	61
3	SERUM ALBUMIN	8	15	93
30	SERUM ALBUMIN	8	16	123
29	SERUM ALBUMIN	10	18	132
Cluster 3a				
12	SERUM ALBUMIN	6	9	54
21	SERUM ALBUMIN	9	18	86
55	Serpin B3	7	20	87
37	Peroxiredoxin-2	7	27	116
35	Salivary alpha amylase	8	23	99



50	PROTEIN S100-A9	10	74	158
51	Serpin B3	7	20	87
57	Ig gamma-2 chain	6	35	80
49	PROTEIN S100-A9	10	77	106
54	Alpha-1-antitrypsin	6	13	91
Cluster 3b				
7	SERUM ALBUMIN	7	11	66
14	SERUM ALBUMIN	15	32	197
9	SERUM ALBUMIN	6	13	86
59	Haptoglobin	12	27	106
58	Heat shock protein beta-1	6	33	63
52	Ig gamma-2 chain	5	21	61
2	SERUM ALBUMIN	13	22	178
53	Alpha-1-antitrypsin	7	17	95
Cluster 4				
26	SERUM ALBUMIN	8	12	90
23	SERUM ALBUMIN	8	14	68
28	SERUM ALBUMIN	7	13	91
20	SERUM ALBUMIN	14	24	151
19	SERUM ALBUMIN	6	9	76
5	SERUM ALBUMIN	8	16	94
11	SERUM ALBUMIN	11	17	116
25	SERUM ALBUMIN	15	27	171
31	SERUM ALBUMIN	7	10	80
18	SERUM ALBUMIN	7	13	102
6	SERUM ALBUMIN	6	9	76
10	SERUM ALBUMIN	11	19	141
17	SERUM ALBUMIN	10	16	92
15	SERUM ALBUMIN	5	10	62
16	SERUM ALBUMIN	6	13	78
44	PROTEIN S100-A9	10	74	91
41	Alpha-amylase2B	10	25	100
34	Acid ceramidase	8	22	102
46	Serotransferin	7	12	68
47	Apolipoprotein A-I	8	26	101
48	Hemoglobin sub BETA	8	63	121
33	Cathepsin D	5	10	69



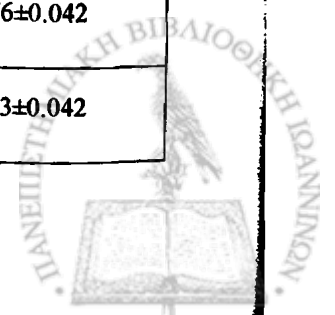
42	Actin cytoplasmatic 1	7	20	62
43	GlutathioneS- transferase A1	5	25	57
45	Carbonic anhydrase 1	7	37	101
39	Serotransferin	3	6	43
38	GlutathioneS- transferaseP	5	40	63
60	CALCYPHOSIN	9	43	129



Πίνακας 3.5

Στο πίνακα 3.5 περιγράφονται το όνομα της κάθε πρωτεΐνης, όλες οι τιμές των όγκων των κηλίδων των τριών υπό εξέταση κατηγοριών: Pc(-), Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, Pc(+), Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις και control, ομάδα ελέγχου.

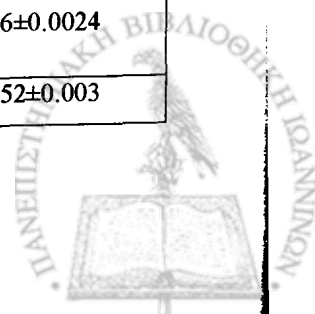
cluster 1	Όνομα πρωτεΐνης	Ποσοτικοποίηση Pc+	Ποσοτικοποίηση Pc-	Ποσοτικοποίηση control
13	SERUM ALBUMIN	0.039±0.030	0.020±0.011	0.054±0.0584
22	SERUM ALBUMIN	0.028±0.014	0.019±0.007	0.0460±0.031
4	SERUM ALBUMIN	0.037±0.02	0.007±0.007	0.051±0.022
32	Hemoglobin sub BETA	0.284±0.194	0.183±0.089	0.4522±0.5347
36	Hemoglobin sub ALPHA	0.6076±0.800	0.1660±0.238	0.711±1.04
cluster 2a				
27	SERUM ALBUMIN	0.030±0.017	0.092±0.023	0.082±0.011
40	Abhydrolase domain(AB14B)	0.007±0.002	0.016±0.004	0.014±0.008
56	Fructose-1,6-bisphosphate 1	0.0115±0.005	0.0307±0.019	0.023±0.01
Cluster 2b				
1	SERUM ALBUMIN	0.064±0.030	0.1735±0.06	0.219±0.033
24	SERUM ALBUMIN	0.014±0.007	0.054±0.024	0.067±0.0154
8	SERUM ALBUMIN	0.007±0.008	0.034±0.034	0.055±0.026
3	SERUM ALBUMIN	0.047±0.022	0.059±0.023	0.1259±0.057
30	SERUM ALBUMIN	0.024±0.008	0.037±0.024	0.076±0.042
29	SERUM ALBUMIN	0.025±0.027	0.025±0.009	0.083±0.042



Cluster 3a				
12	SERUM ALBUMIN	0.018±0.020	0.018±0.013	0.0086±0.0067
21	SERUM ALBUMIN	0.018±0.020	0.018±0.013	0.0065±0.0024
55	Serpin B3	0.050±0.045	0.049±0.050	0.023±0.011
37	Peroxiredoxin-2	0.095±0.131	0.098±0.146	0.033±0.023
35	Salivary alpha amylase	0.074±0.067	0.0674±0.022	0.022±0.008
50	PROTEIN S100-A9	0.036±0.020	0.041±0.033	0.014±0.005
51	Serpin B3	0.058±0.057	0.050±0.053	0.0219±0.0011
49	PROTEIN S100-A9	0.064±0.073	0.054±0.032	0.010±0.004
54	Alpha-1-antitrypsin	0.019±0.008	0.0136±0.016	0.005±0.02
57	Ig gamma-2 chain	0.059±0.035	0.048±0.039	0.025±0.004
Cluster 3b				
	SERUM ALBUMIN	0.0353±0.0258	0.0143±0.0093	0.0175±0.0003
	SERUM ALBUMIN	0.166±0.184	0.088±0.055	0.035±0.008
	SERUM ALBUMIN	0.088±0.0581	0.023±0.019	0.007±0.004
59	Haptoglobin	0.240±0.1	0.132±0.084	0.070±0.030
58	Heat shock protein beta-1	0.092±0.075	0.051±0.027	0.023±0.015
57	Ig gamma-2 chain	0.115±0.075	0.03±0.015	0.026±0.016
2	SERUM ALBUMIN	0.117±0.058	0.021±0.018	0.033±0.007
53	Alpha-1-antitrypsin	0.031±0.008	0.0136±0.0097	0.006±0.004
Cluster 4				
26	SERUM ALBUMIN	0.0102±0.006	0.0170±0.012	0.0062±0.003
23	SERUM ALBUMIN	0.034±0.029	0.072±0.061	0.030±0.029
28	SERUM ALBUMIN	0.011±0.001	0.029±0.006	0.0137±0.007



20	SERUM ALBUMIN	0.033±0.051	0.091±0.048	0.034±0.007
19	SERUM ALBUMIN	0.0144±0.010	0.040±0.050	0.012±0.013
5	SERUM ALBUMIN	0.0127±0.01	0.051±0.005	0.015±0.006
11	SERUM ALBUMIN	0.018±0.012	0.090±0.042	0.041±0.013
25	SERUM ALBUMIN	0.009±0.008	0.053±0.046	0.0217±0.008
31	SERUM ALBUMIN	0.055±0.034	0.113±0.131	0.027±0.023
18	SERUM ALBUMIN	0.007±0.003	0.016±0.014	0.004±0.0011
6	SERUM ALBUMIN	0.044±0.050	0.113±0.01	0.0175±0.0003
10	SERUM ALBUMIN	0.018±0.011	0.038±0.026	0.014±0.006
17	SERUM ALBUMIN	0.016±0.003	0.044±0.030	0.017±0.009
15	SERUM ALBUMIN	0.007±0.008	0.035±0.047	0.0078±0.0037
16	SERUM ALBUMIN	0.007±0.003	0.037±0.033	0.004±0.0011
44	PROTEIN S100- A9	0.028±0.017	0.040±0.021	0.0122±0.007
41	Alpha-amylase2B	0.014±0.009	0.048±0.026	0.025±0.013
34	Acid ceramidase	0.047±0.028	0.160±0.032	0.055±0.026
46	Serotransferin	0.0073±0.005	0.015±0.013	0.004±0.002
47	Apolipoprotein A- I	0.055±0.034	0.113±0.131	0.027±0.023
48	Hemoglobin sub BETA	0.011±0.004	0.024±0.018	0.0066±0.0031
33	Cathepsin D	0.050±0.052	0.118±0.015	0.019±0.013
42	Actin cytoplasmatic 1	0.00	0.030±0.022	0.00
43	GlutathioneS- transferase A1	0.007±0.005	0.030±0.021	0.006±0.0024
45	Carbonic	0.011±0.008	0.041±0.032	0.0052±0.003



	anhydrase 1			
39	Serotransferin	0.011±0.088	0.046±0.018	0.005±0.005
38	GlutathioneS-transferaseP	0.002±0.001	0.072±0.027	0.009±0.004
60	CALCYPHOSIN	0.00	0.0531±0.04	0.00

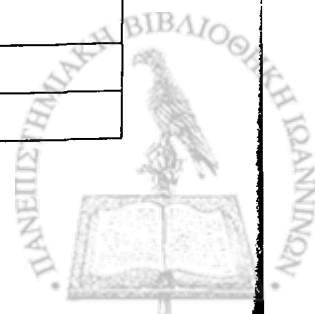
Πίνακας 3.6

Στο πίνακα 3.6 περιγράφονται το όνομα της κάθε πρωτεΐνης, και η ποσοτική σχέση όπως προκύπτει και από το πίνακα 3.5 των τριών υπό εξέταση κατηγοριών: Pc(-) Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, Pc(+) Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις και control, ομάδα ελέγχου.

cluster 1	Όνομα πρωτεΐνης	Ποσοτικοποίηση Pc+	Ποσοτικοποίηση Pc-	Ποσοτικοποίηση control
13	SERUM ALBUMIN	++	+	+++
22	SERUM ALBUMIN	+	+	++
4	SERUM ALBUMIN	++	+	+++
32	Hemoglobin sub BETA	++	+	+++
36	Hemoglobin sub ALPHA	++	+	++
cluster 2a				
27	SERUM ALBUMIN	+	++	++
40	Abhydrolase domain(AB14B)	+	+++	++
56	Fructose-1,6-bisphosphate 1	+	+++	++



Cluster 2b				
1	SERUM ALBUMIN	+	+++	++
24	SERUM ALBUMIN	+	++	+++
8	SERUM ALBUMIN	+	++	+++
3	SERUM ALBUMIN	+	+	+++
30	SERUM ALBUMIN	+	+	++
29	SERUM ALBUMIN	+	+	++
Cluster 3a				
12	SERUM ALBUMIN	+	+	++
21	SERUM ALBUMIN	+	+	++
55	Serpin B3	++	++	+
37	Peroxiredoxin-2	++	++	+
35	Salivary alpha amylase	++	+++	+
50	PROTEIN S100-A9	++	+++	+
51	Serpin B3	++	++	+
49	PROTEIN S100-A9	+++	++	+
54	Alpha-1-antitrypsin	+++	++	+
57	Ig gamma-2 chain	++	++	+
Cluster 3b				
7	SERUM ALBUMIN	++	+	+
14	SERUM ALBUMIN	+++	++	+
9	SERUM ALBUMIN	+++	++	+
59	Haptoglobin	+++	++	+
58	Heat shock protein beta-1	+++	++	+
52	Ig gamma-2 chain	++	+	+
2	SERUM ALBUMIN	++	+	+
53	Alpha-1-antitrypsin	++	+++	+
Cluster 4				
26	SERUM ALBUMIN	++	+++	+
23	SERUM ALBUMIN	+	++	+
28	SERUM ALBUMIN	+	++	+
20	SERUM ALBUMIN	+	++	+
19	SERUM ALBUMIN	+	++	+
5	SERUM ALBUMIN	+	++	+
11	SERUM ALBUMIN	+	+++	++



25	SERUM ALBUMIN	+	+++	++
31	SERUM ALBUMIN	++	+++	+
18	SERUM ALBUMIN	+	++	+
6	SERUM ALBUMIN	++	+++	+
10	SERUM ALBUMIN	+	++	+
17	SERUM ALBUMIN	+	++	+
15	SERUM ALBUMIN	+	++	+
16	SERUM ALBUMIN	++	+++	+
44	PROTEIN S100-A9	++	+++	+
41	Alpha-amylase2B	+	+++	++
34	Acid ceramidase	+	+++	+
46	Serotransferin	++	+++	+
47	Apolipoprotein A-I	++	+++	+
48	Hemoglobin sub BETA	++	+++	+
33	Cathepsin D	++	+++	+
42	Actin cytoplasmatic 1	-	+	-
43	GlutathioneS-transferase A1	+	++	+
45	Carbonic anhydrase 1	++	+++	+
39	Serotransferin	++	+++	+
38	GlutathioneS-transferaseP	+	+++	+
60 .	CALCYPHOSIN	-	+	-



3.3 HIERARCHICAL CLUSTERING

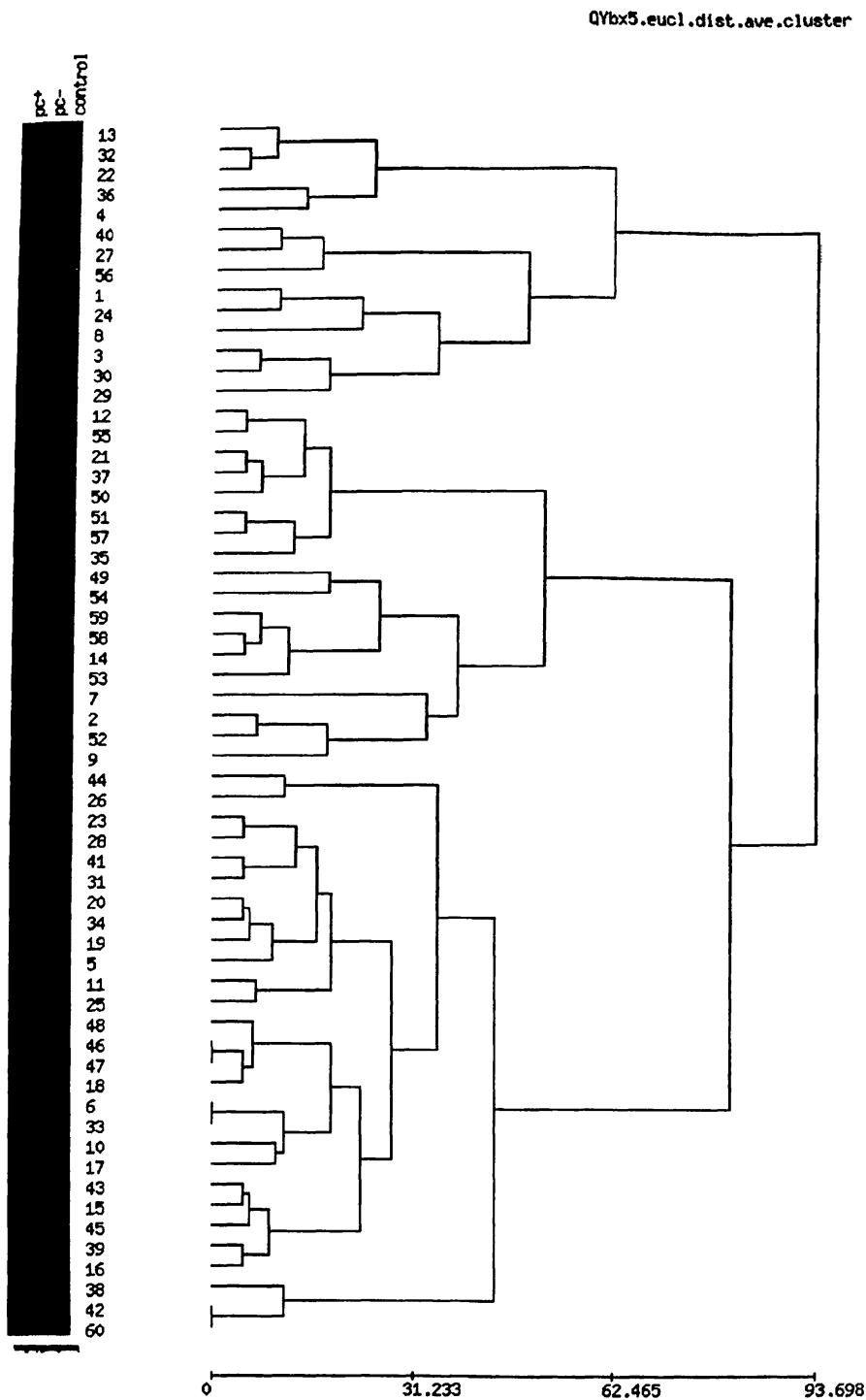
Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από το φασματογράφο μάζας, χωρίστηκαν σε συστάδες (clusters), με το ειδικό πρόγραμμα EPCLUST. Το πρόγραμμα αυτό δημιουργήθηκε από το European Bioinformatic Institute (EBI, UK) (Brazma A, Vilo J., 2000) και η διεύθυνση στο διαδίκτυο είναι <http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST> tool set Expression Profiler. Τα αποτελέσματα από το cluster κατατάσσονται με το Hierarchical clustering (κατά συστάδες δειγματοληψία) που εκφράζει την γραμμική σχέση μεταξύ των όγκων των κηλίδων.

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η ακόλουθη: μέσω της ηλεκτρονικής διεύθυνσης εισάγεται ο μέσος όρος των όγκων (από το σύνολο των πηκτών) που αντιστοιχούν σε κάθε μια κηλίδα που αποτελεί διαφορά (ποσοτική) και ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία της με το φασματογράφο μάζας. Στη συνέχεια γίνεται η επιλογή του τύπου της ομαδοποίησης (μέσω της ηλεκτρονικής διεύθυνσης). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το Hierarchical clustering (Euclidian distance and average linkage). Έτσι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε κατηγορίες προέκυψε από την ανάγκη να ομαδοποιηθούν οι πρωτεΐνες ανάλογα με τη ομοιότητα ή διαφορά που παρουσιάζουν οι ομάδες μεταξύ τους, δηλαδή αν αυξάνονται ή μειώνονται (όγκος) ανά ομάδες με απώτερο σκοπό να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για την συμπεριφορά τους. Για παράδειγμα στο 1^ο cluster παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες της κατηγορίας με αποτιτανώσεις και της ομάδας ελέγχου βρίσκονται περίπου στα ίδια επίπεδα, σε αντίθεση με την ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις που βρίσκονται σε πιο χαμηλά επίπεδα. Στο 4^ο cluster παρατηρείται μια αύξηση των πρωτεϊνών στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις σε σχέση με τις άλλες δυο ομάδες.

Συμπερασματικά η ομαδοποίηση συντελεί στην κατανόηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στις υπό μελέτη ομάδες. Πιο συγκεκριμένα στην αναζήτηση της επίδρασης των ινών αμιάντου στις δυο κατηγορίες που αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο, σε σύγκριση με τα μη εκτεθέντα άτομα.

Από το δενδρόγραμμα που ακολουθεί έχουν διαχωριστεί 6 clusters. Δηλαδή τα clusters που αποτελούν το δενδρόγραμμα, περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που είναι διαφορετικές μεταξύ τους αλλά ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά ως προς την αύξηση ή την μείωση του όγκου και συνεπώς της έκφρασης της πρωτεΐνης

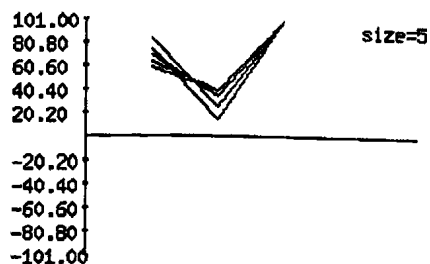




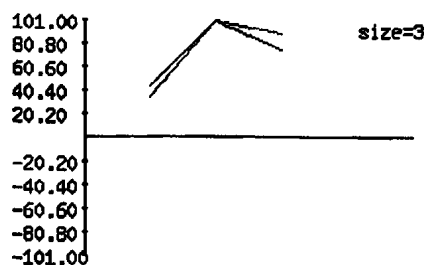
Εικόνα 3.3.1: Στο δενδρόγραμμα περιέχεται το σύνολο των πρωτεϊνών

(οι αριθμοί αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες). Η πρώτη στήλη ανήκει στους Pc(-), η δεύτερη στήλη ανήκει στους Pc(+) και η τρίτη στήλη ανήκει στους controls. Με βάση το δενδρόγραμμα ορίζονται τα clusters. Ο στόχος είναι η ομαδοποίηση ανόμοιων στοιχείων, ως προς το κοινό γνώρισμα της μεταβολής τους με τον ίδιο τρόπο, μεταξύ των ελεγχόμενων ομάδων δειγμάτων.

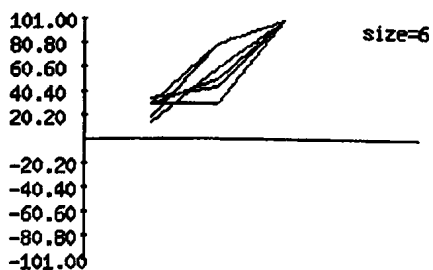
CLUSTER 1



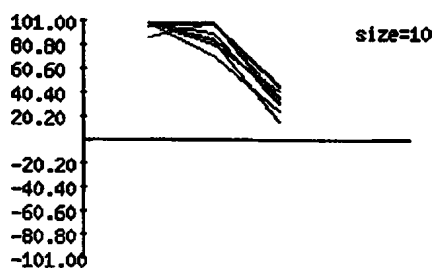
CLUSTER 2a



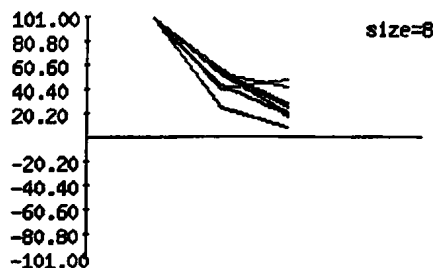
CLUSTER 2b



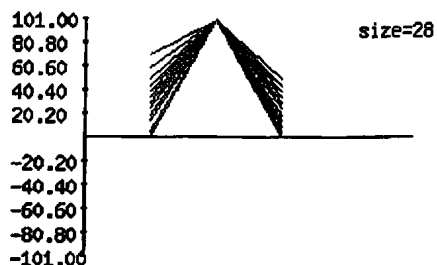
CLUSTER 3a



CLUSTER 3b



CLUSTER 4



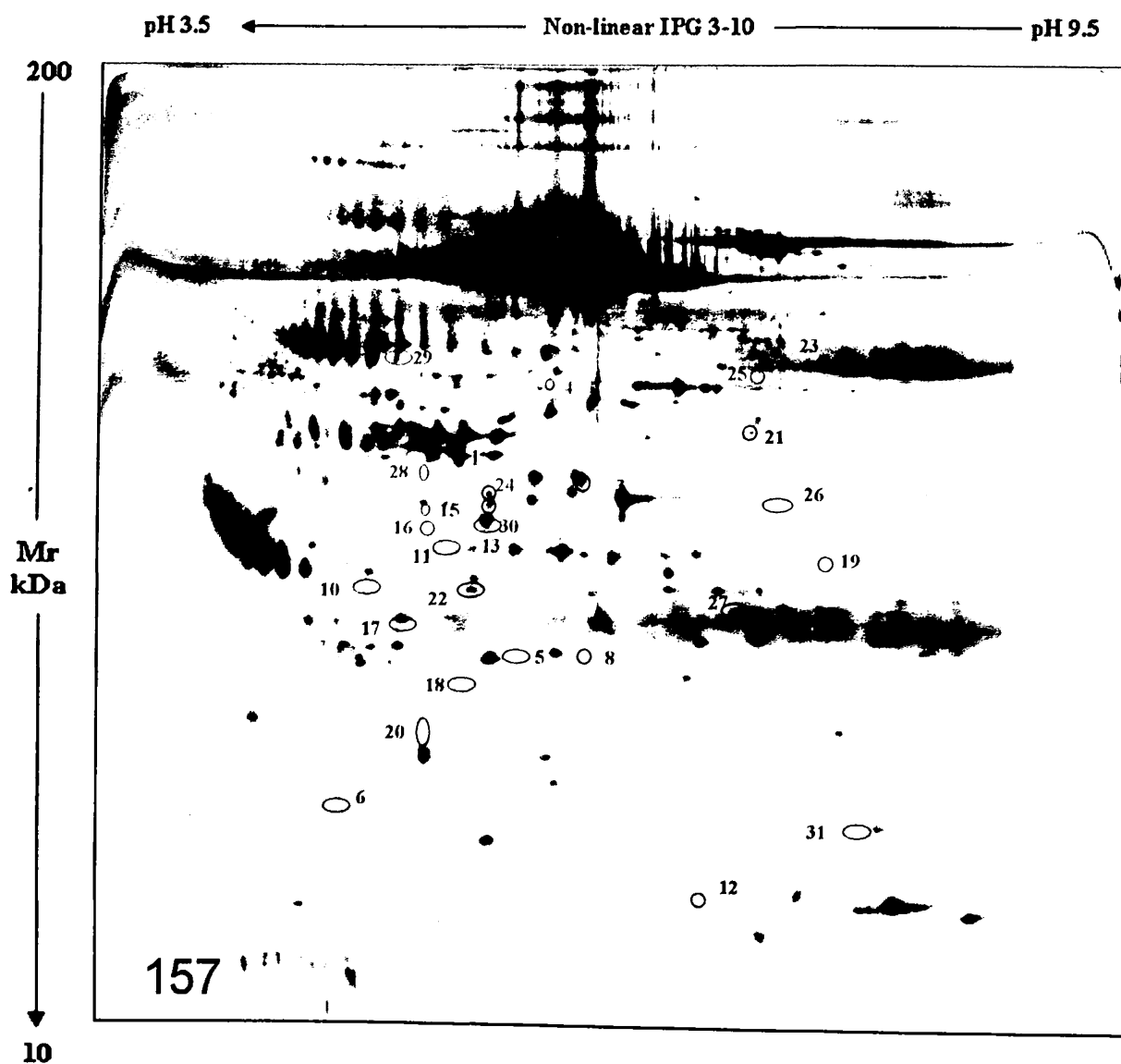
Εικόνα 3.3.2: Τα 6 clusters, στα οποία κατατάσσονται οι πρωτεΐνες ανάλογα με την μεταβολή τους (αύξηση ή μείωση) μεταξύ των τριών ομάδων.



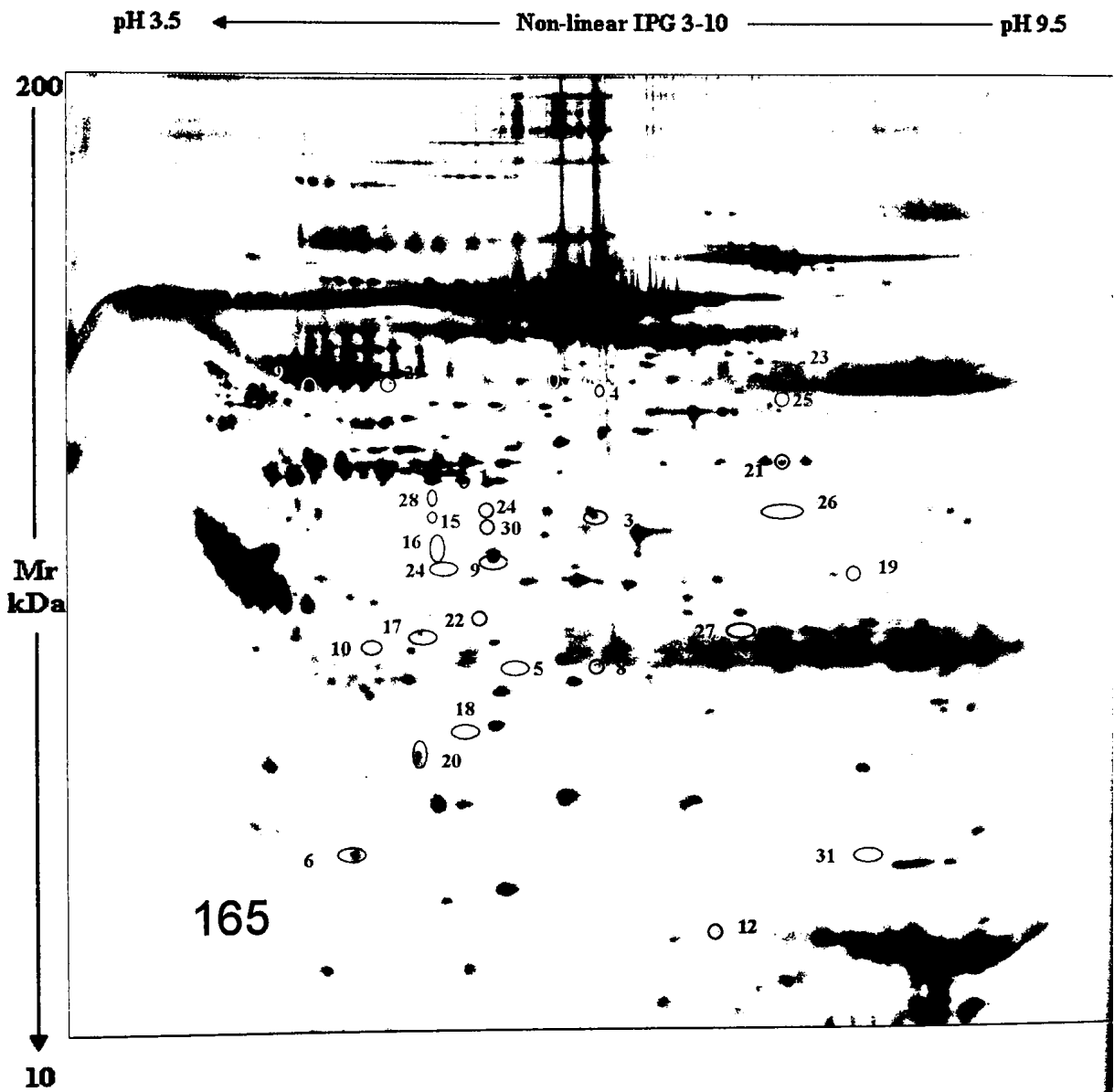
3.4 ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Στις εικόνες 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3, εμφανίζεται η θραυσματοποίηση της αλβουμίνης στα δείγματα υπό εξέταση. Με κύκλους εμφανίζονται οι διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των δειγμάτων :

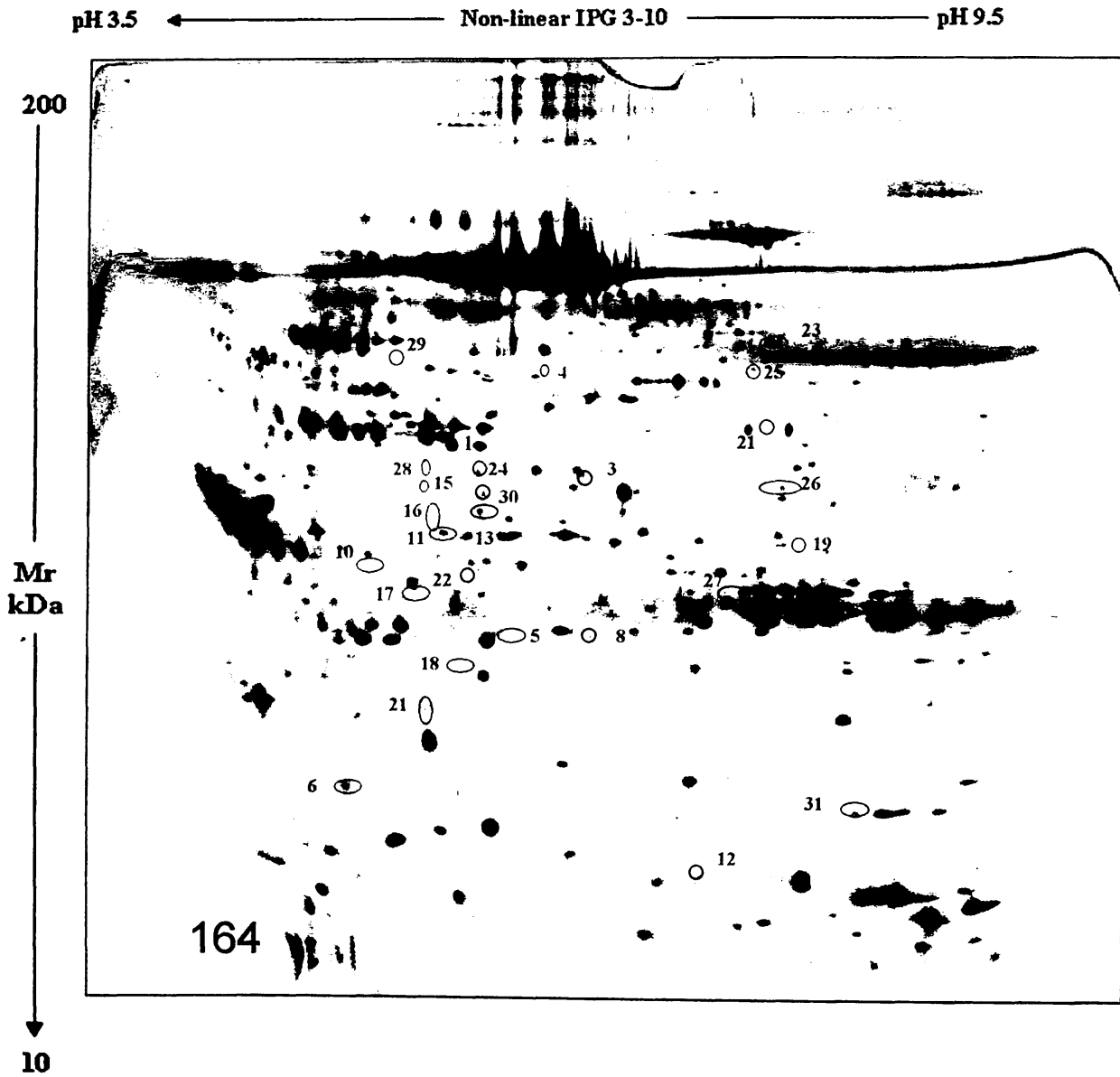
Εικ 3.4.1. Ομάδα ελέγχου



Εικ 3.4.2. Με αποτιτανώσεις

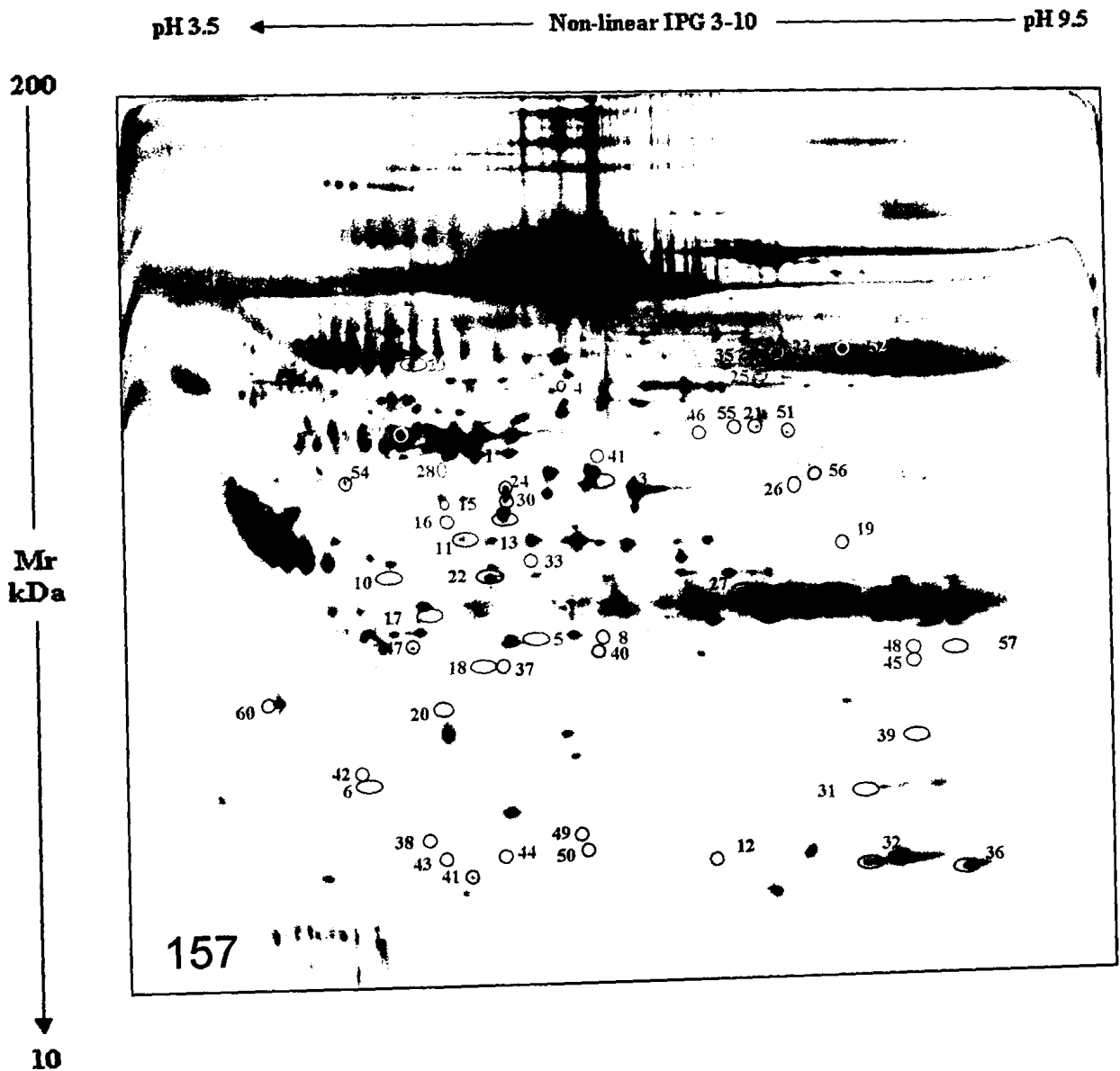


Εικ 3.4.3 Χωρίς αποτιτανώσεις

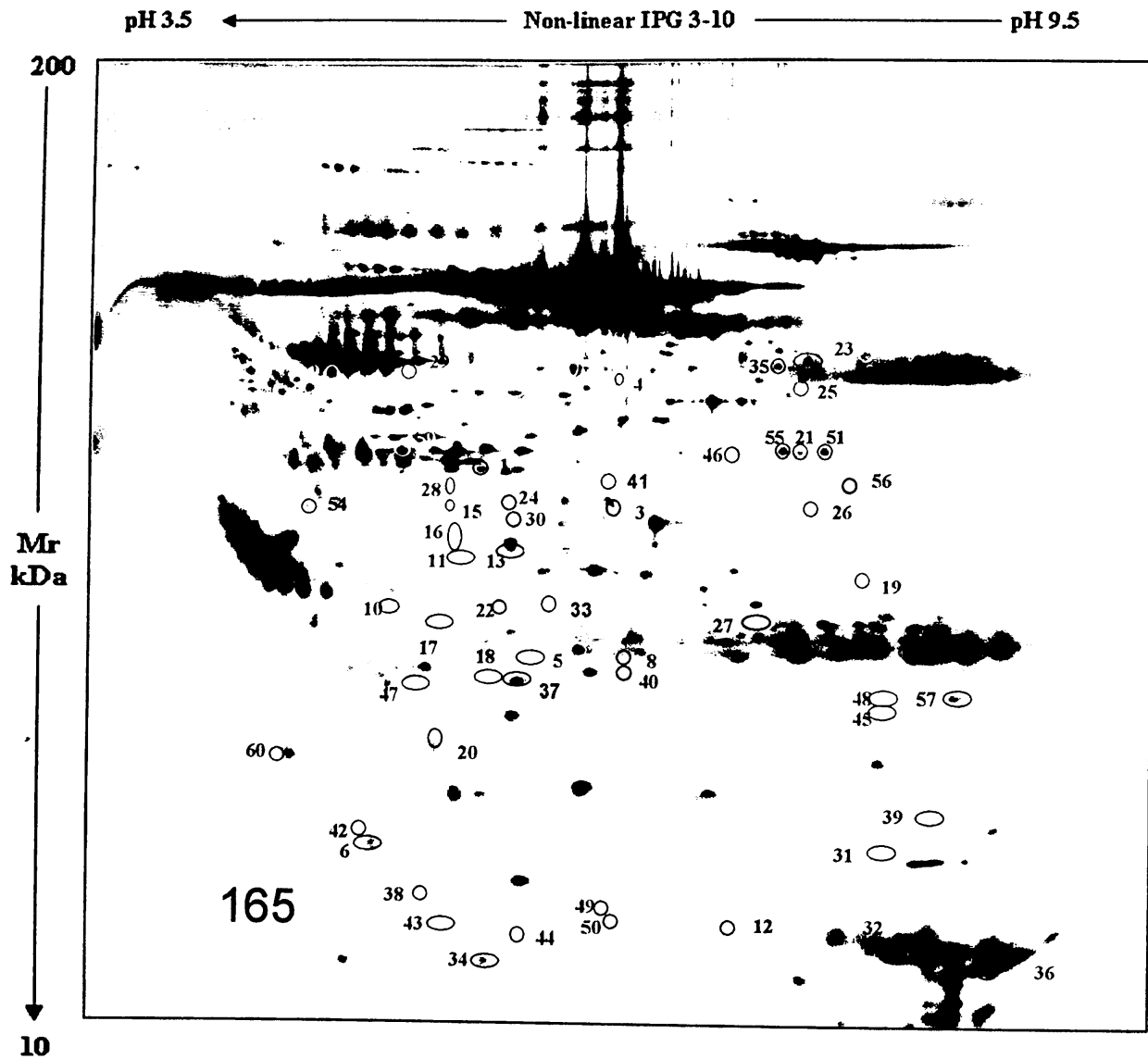


Στις εικόνες 3.4.4, 3.4.5, 3.4.6 απεικονίζονται σε κύκλους οι διαφορές που επισημαίνονται στον πίνακα των όγκων (πίνακας 3.5)

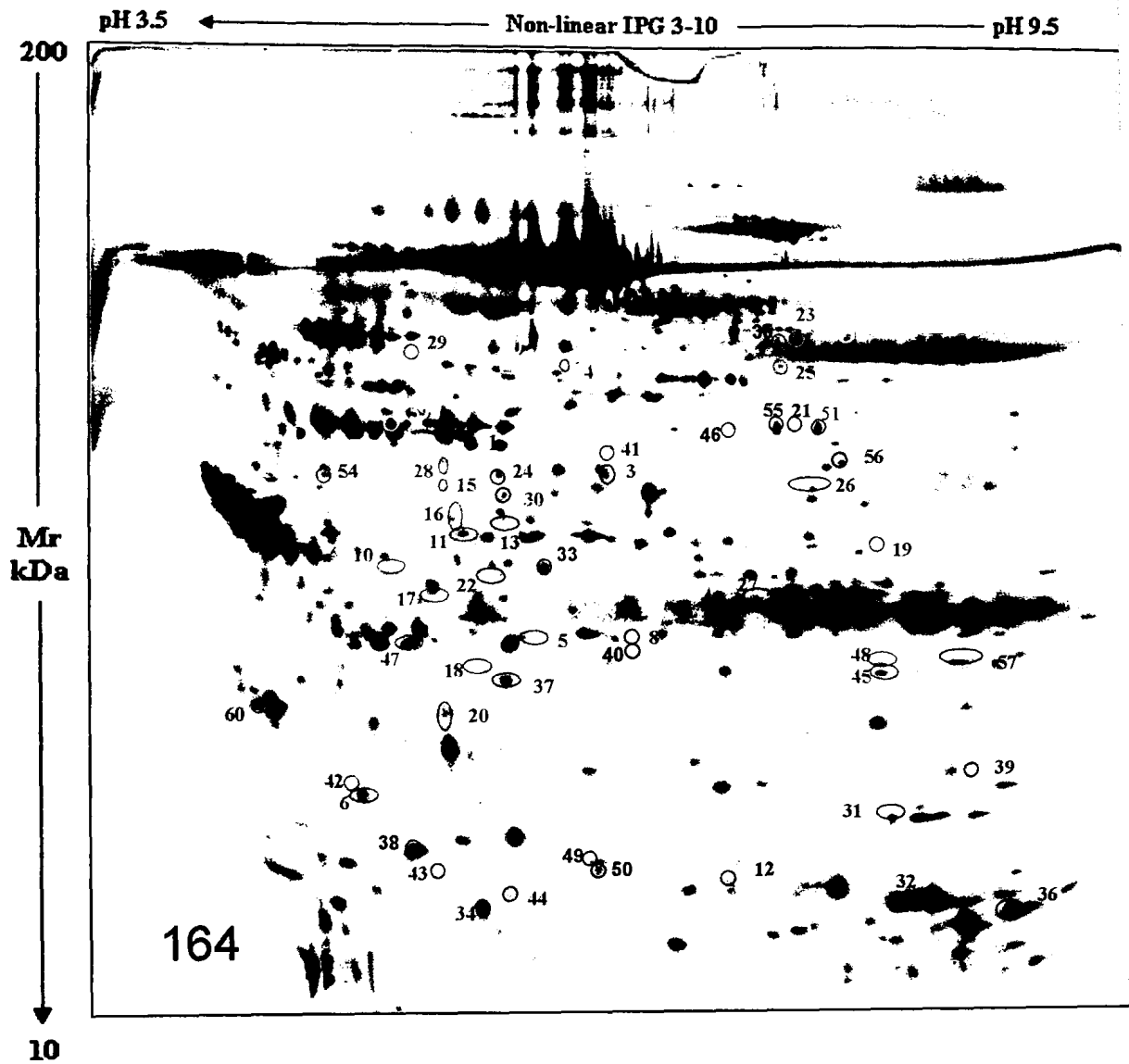
Εικ 3.4.4 Ομάδα ελέγχου



Εικ 3.4.5 Με αποτιτανώσεις

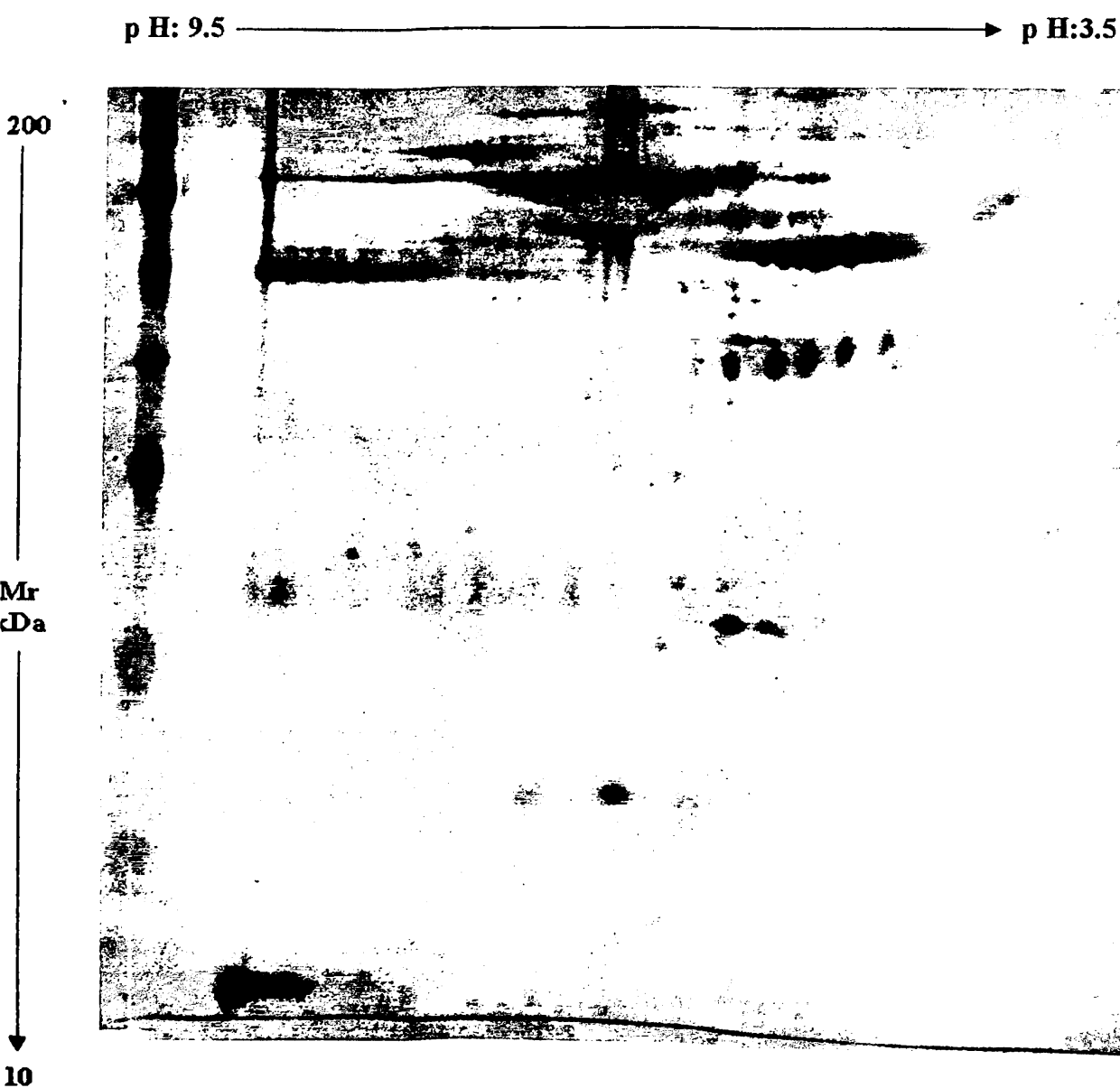


Εικ 3.4.6 Χωρίς αποτιτανώσεις



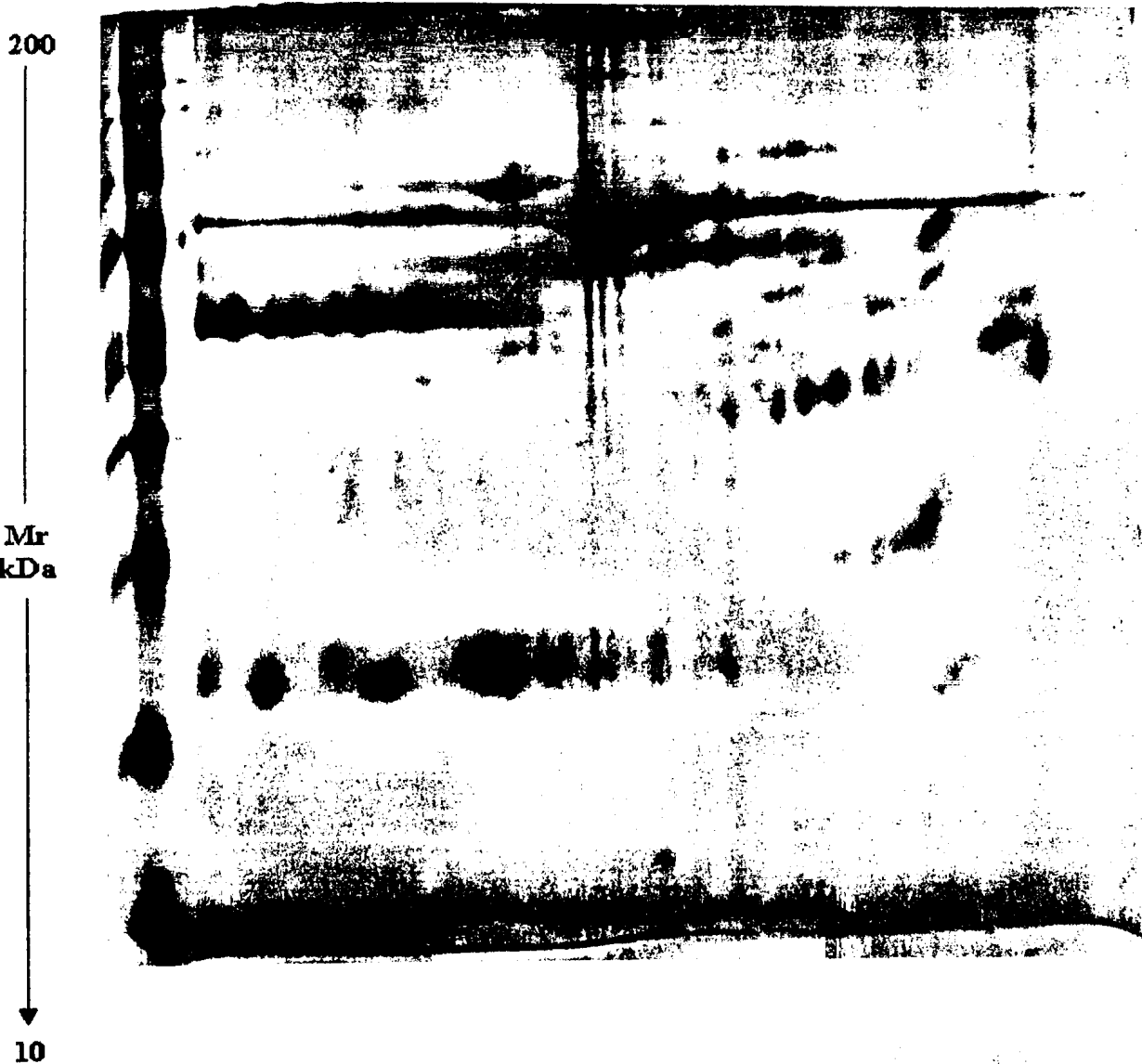
Οι εικόνες 3.4.7, 3.4.8 περιγράφουν τις πηκτές που προήλθαν από την ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης με τη μέθοδο των πηκτών που πολυμερίζονται με τη βοήθεια των αμφολυτών, όπως έγιναν αρχικώς στο δικό μας εργαστήριο. Όπως διαπιστώνουμε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών δεν είναι πολύ καλός όπως αυτός των πηκτών του εμπορίου. Αυτό συμβαίνει γιατί οι πηκτές με τους αμφολύτες δεν έχουν επαναληψιμότητα και ακρίβεια όπως οι πηκτές του εμπορίου.

Εικ 3.4.7



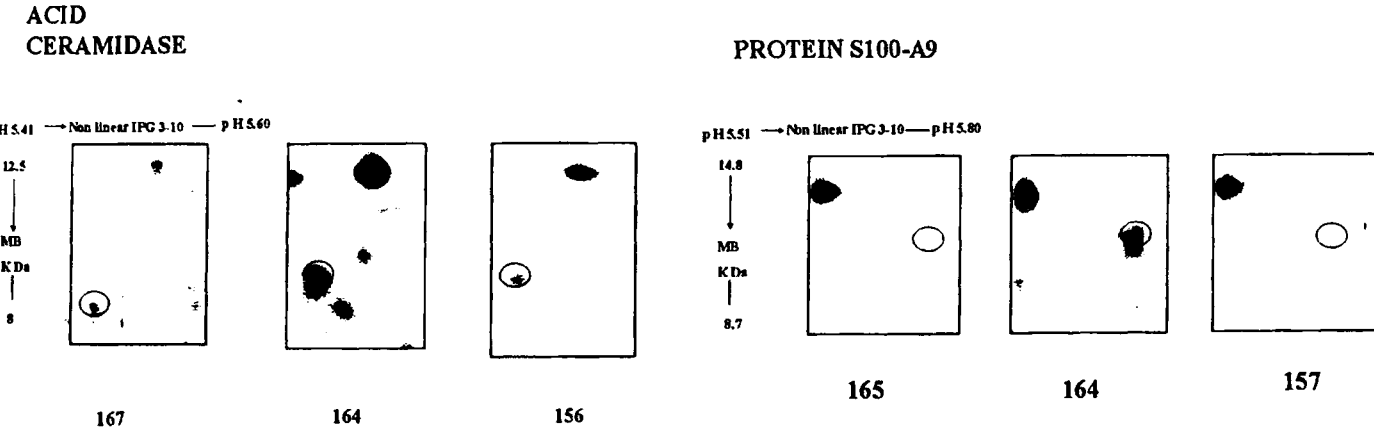
Εικ 3.4.8

pH: 9.5 → pH: 3.5



3.5 ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΤΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΗΛΙΔΩΝ

Ακολουθεί η μεγέθυνση των περιοχών που περιέχουν τις κηλίδες που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες που αναφέρονται στο πίνακα 3.6.



SPOT	Pc+ V%	Pc- V%	Control V%
P88/231	0.044	0.188	0.042

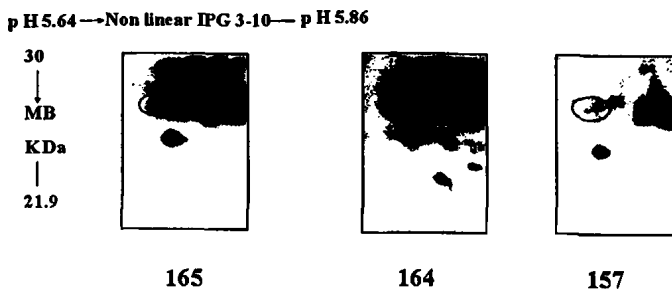
SPOT	Pc+ V%	Pc- V%	Control V%
P32/26	0.015	0.060	0.009

Εικ 3.5.1: Εικ 3.5.2:

Οι κηλίδες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες *acid ceramidase* (εικόνα αριστερά) και *S100-A9* (εικόνα δεξιά) περιλαμβάνει τις περιοχές του pH: 5.4-5.60 και 5.51-5.80 αντίστοιχα. Στο πίνακα αναφέρονται οι τιμές του όγκου των κηλίδων ενδεικτικά στις τρεις πηκτές που ανήκουν στις υπό σύγκριση κατηγορίες. Η πρώτη πηκτική ανήκει στη ομάδα με αποτιτανώσεις, η δεύτερη πηκτική ανήκει στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις και η τρίτη πηκτική ανήκει στην ομάδα ελέγχου και στις δυο εικόνες.

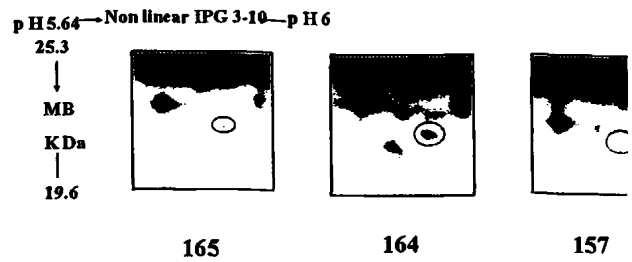


HEAT SHOCK PROTEIN BETA



SPOT	Pc+ V%	Pc- V%	Control V%
PQ73/P227	0.192	0.080	0.0184

α/β hydrolase domain

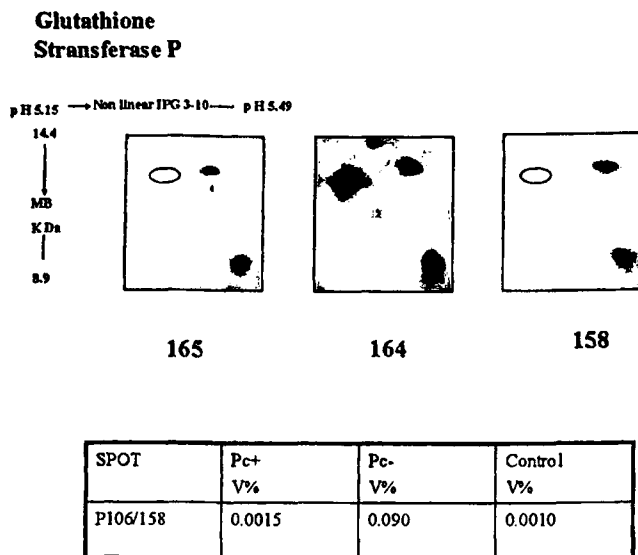


SPOT	Pc+ V%	Pc- V%	Control V%
109/PQ2	0.0051	0.183	0.0180

Εικ 3.5.3: Εικ 3.5.4:

Οι κηλίδες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες *heat shock protein beta* (εικόνα αριστερά) και *α/β hydrolase domain* (εικόνα δεξιά) περιλαμβάνει τις περιοχές του p H: 5.64-5.86 και 5.64-6.0 αντίστοιχα. Στο πίνακα αναφέρονται οι τιμές του όγκου των κηλίδων ενδεικτικά στις τρεις πηκτές που ανήκουν στις υπό σύγκριση κατηγορίες. Η πρώτη πηκτή ανήκει στη ομάδα με αποτιτανώσεις, η δεύτερη πηκτή ανήκει στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις και η τρίτη πηκτή ανήκει στην ομάδα ελέγχου και στις δυο εικόνες.



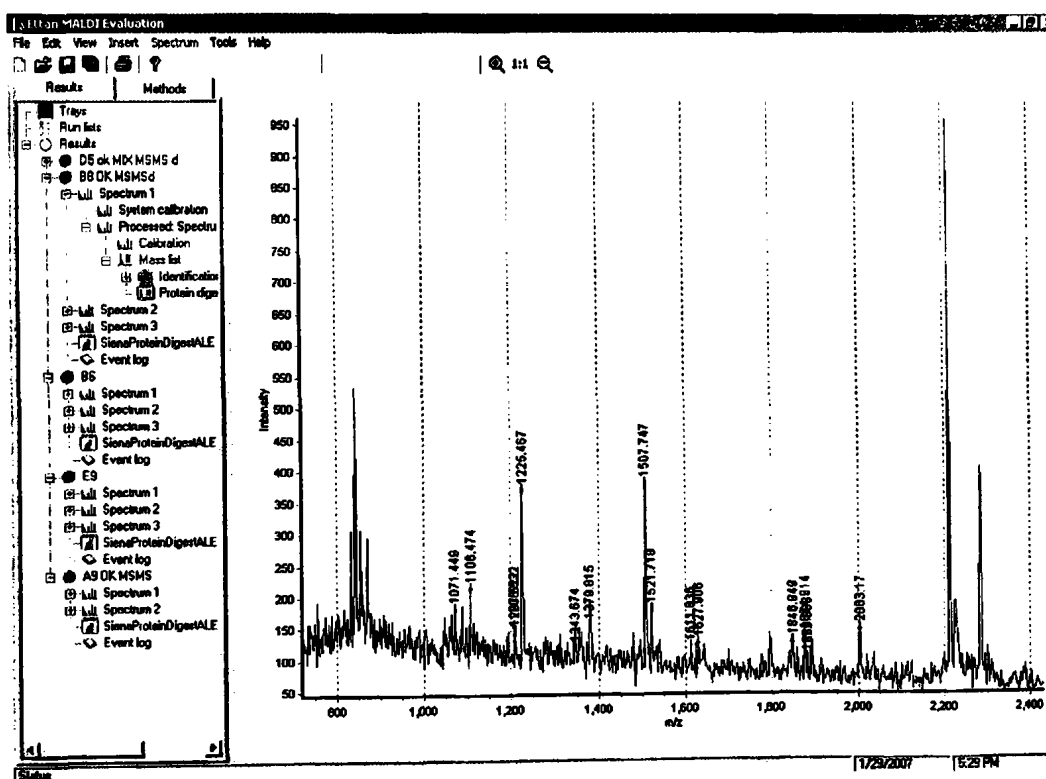


Εικ 3.5.5: Η κηλίδα αντιστοιχεί στη πρωτεΐνη και *glutathione S transferase P* περιλαμβάνει την περιοχή του pH: 5.15-5.49. Στο πίνακα αναφέρονται οι τιμές του όγκου των κηλίδων ενδεικτικά στις τρεις πηκτές που ανήκουν στις υπό σύγκριση κατηγορίες. Η πρώτη πηκτική ανήκει στη ομάδα με αποτιτανώσεις, η δεύτερη πηκτική ανήκει στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις και η τρίτη πηκτική ανήκει στην ομάδα ελέγχου.

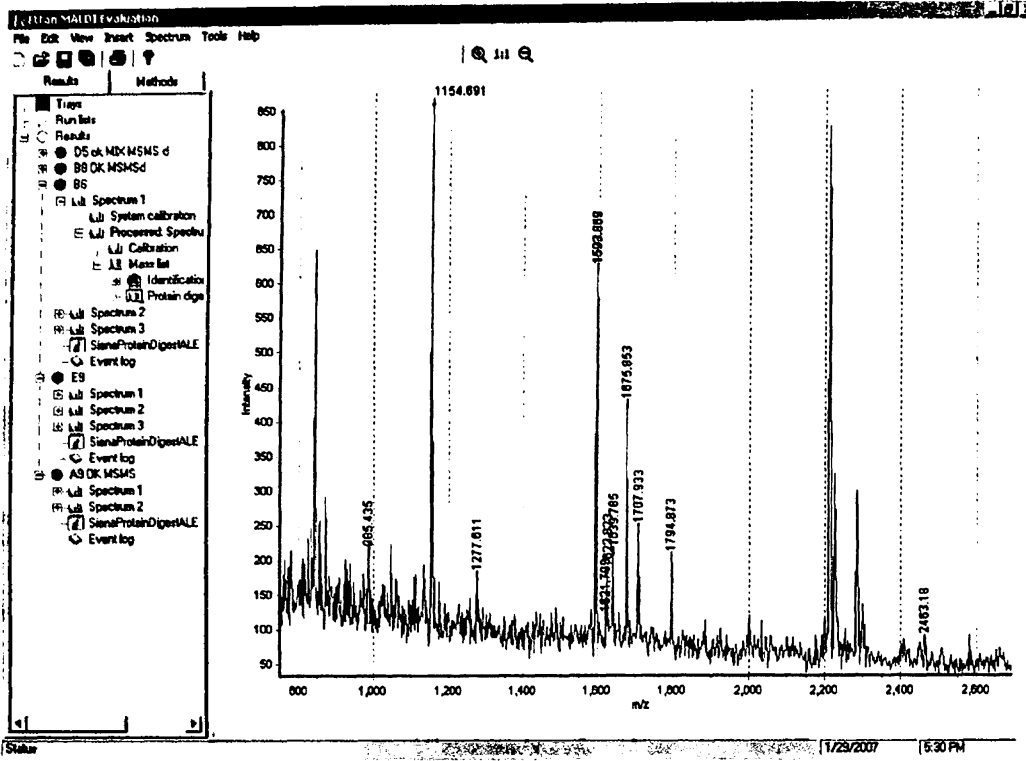
3.6 ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Περιγράφονται τα φάσματα των πρωτεϊνών με την φασματομετρία μάζας MALDI-TOF. Τα φάσματα θα συγκριθούν με εκείνα της βάσης δεδομένων (Εισαγωγή 1.3) όπως Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Από τη σύγκριση των φασμάτων θα προκύψει η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.

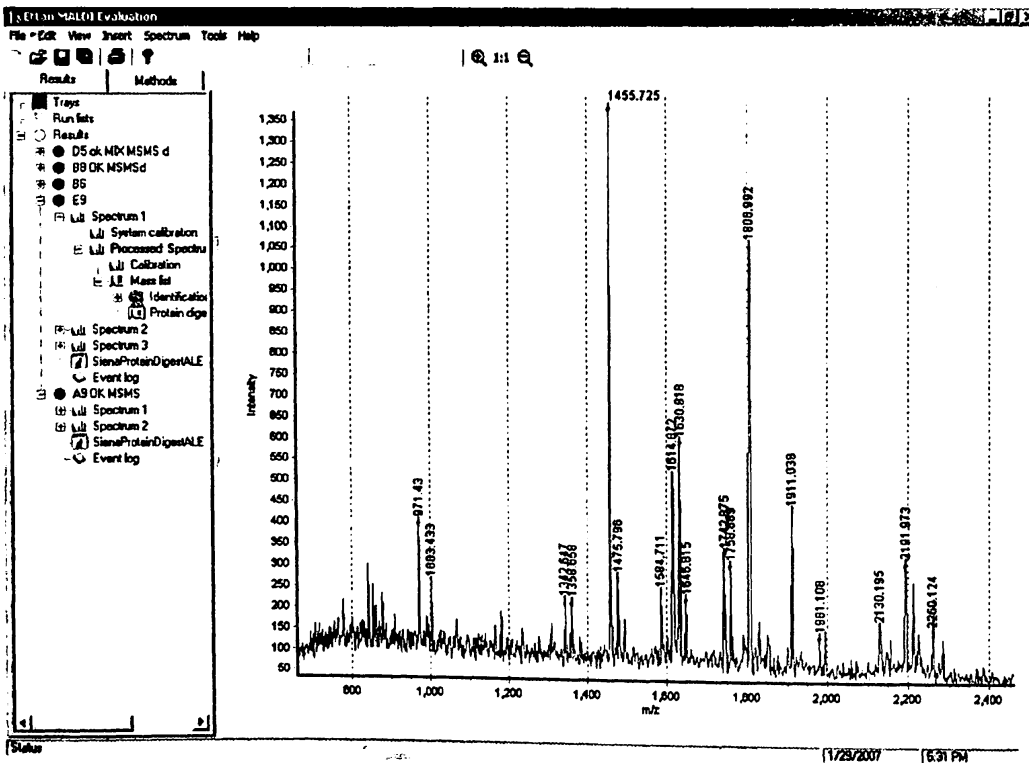
- Acid ceramidase



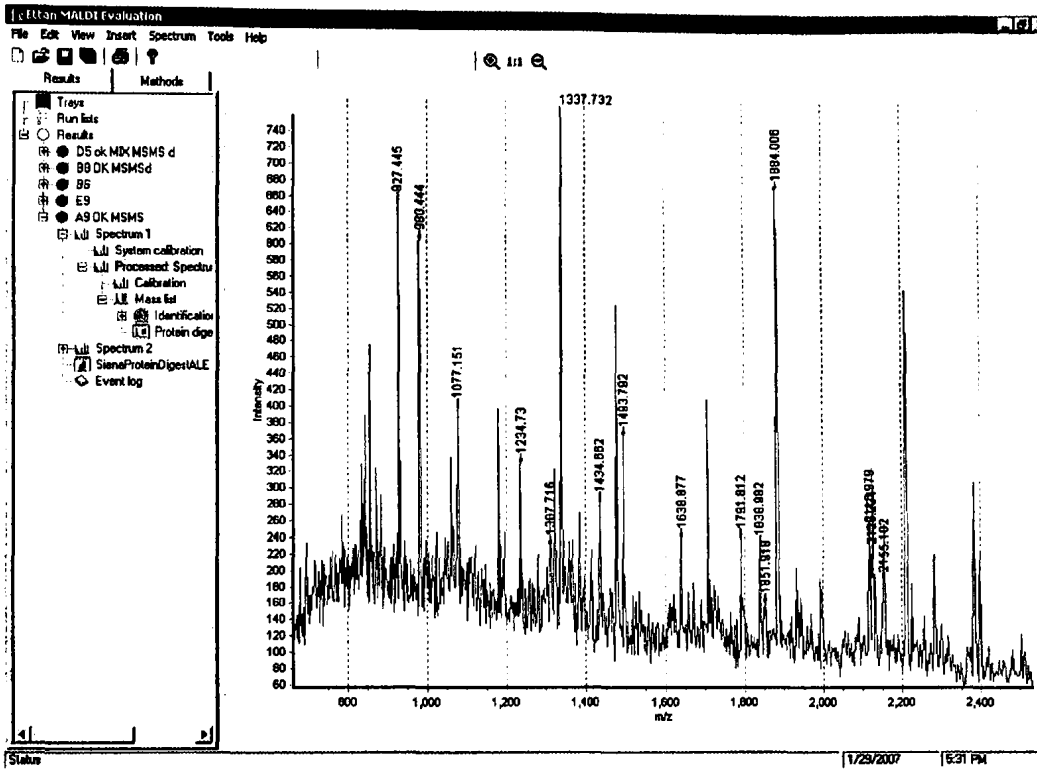
• Abhydrolase domain



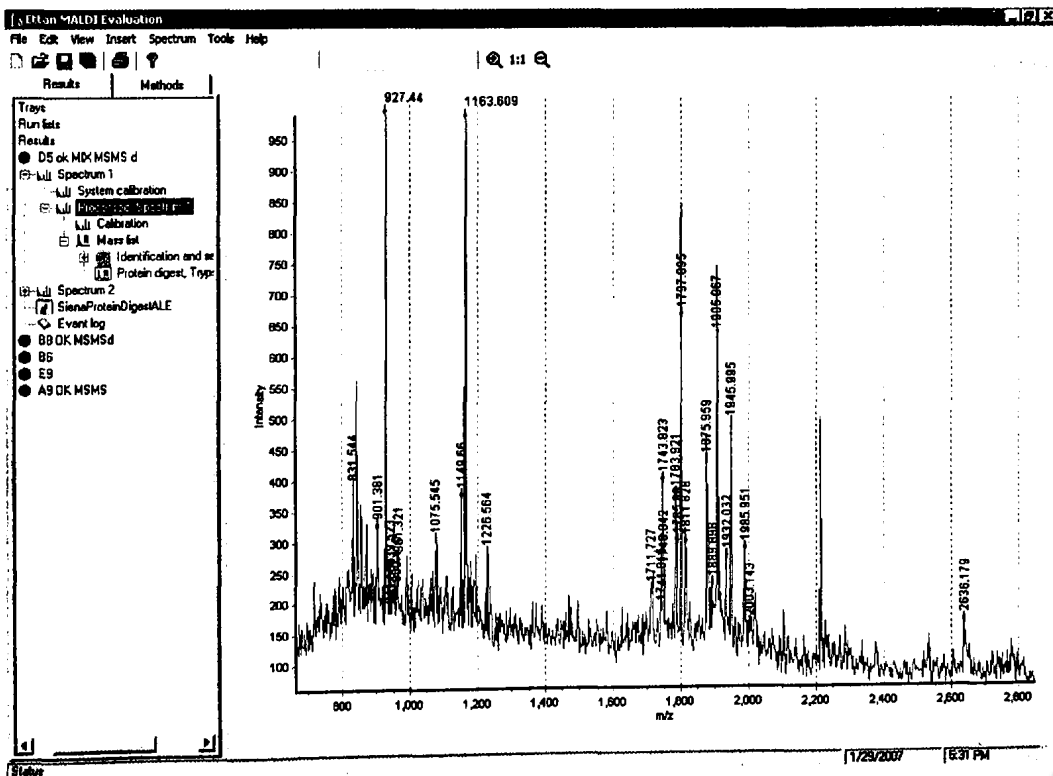
• Protein S100-A9



• Glutathione S-transferase P



• Heat-shock 27

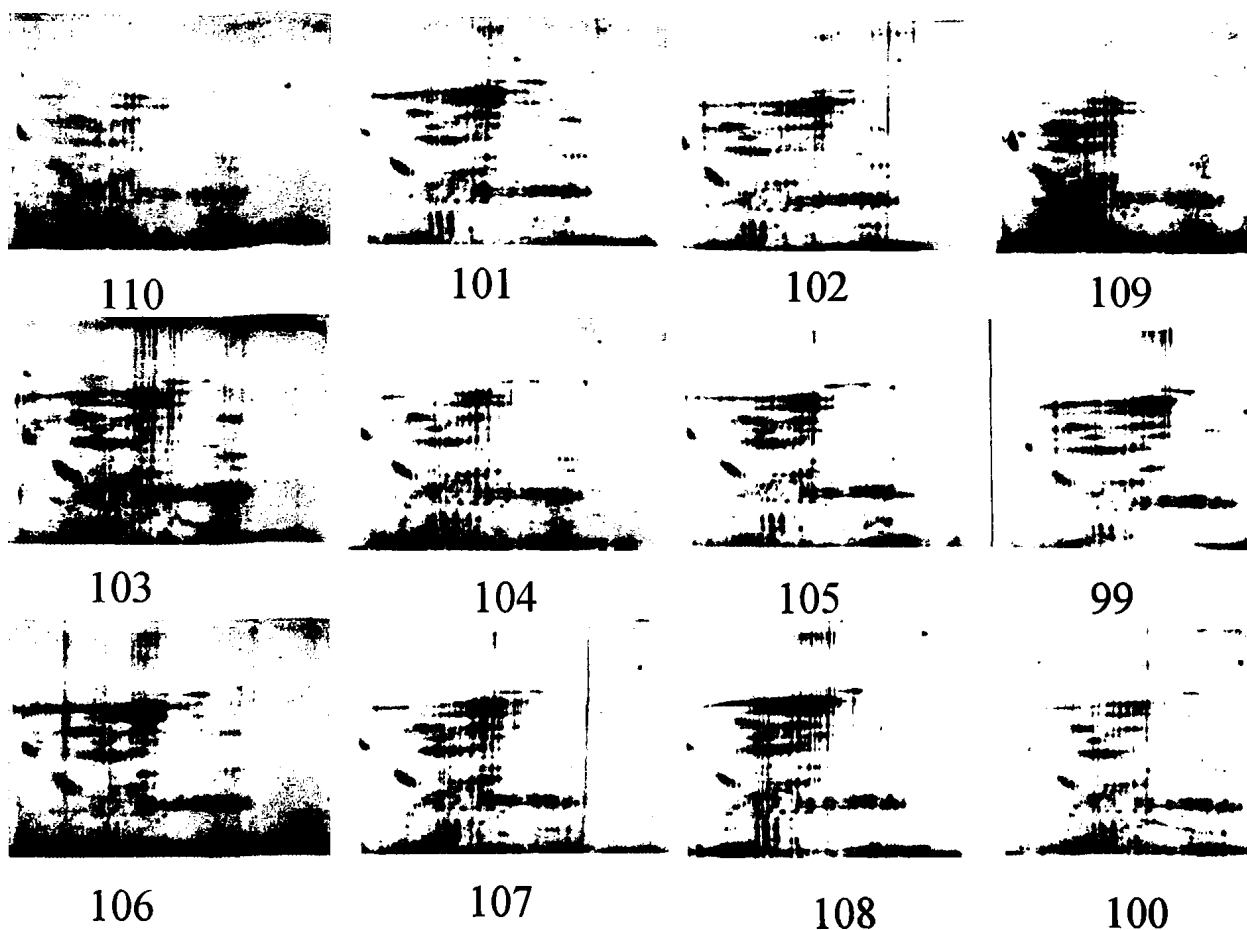


3.7 ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ DIGE:

Πίνακας 3.7: Στο πίνακα αναφέρονται όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, με τους δυνατούς συνδυασμούς που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Οι Cy3, Cy5 και Cy2 είναι οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν με τις αναλογίες που περιγράφηκαν (Ειδικό μέρος 2.9.1). Στη πρώτη στήλη που υπάρχουν δυο νούμερα, το πρώτο αντιστοιχεί στην αρίθμηση των δειγμάτων και το δεύτερο νούμερο αντιστοιχεί στις πηκτές της δεύτερης διάστασης. Το νούμερο της δεύτερης διάστασης το τοποθετούμε στο δεξιό κάτω μέρος των τζαμιών και ενσωματώνεται με την πηκτή, με το πέρας του πολυμερισμού. Τα αποτελέσματα δεν έδωσαν μια σαφή εικόνα, οπότε δεν μπορούμε να βγάλουμε σαφή αποτελέσματα.

ΝΟΥΜΕΡΟ GEL	Cy3	Cy5	Cy2
1/106	306(Pc-)	322(Pc+)	standard
2/109	123(Pc-)	307(Pc+)	standard
3/110	516(Control)	333(Pc+)	standard
4/108	320(MPc-)	443(Pc+)	standard
5/107	446(M Pc+)	451(MPc-)	standard
6/99	470(Pc+)	329(Pc-)	standard
7/102	519(Control)	335(Pc-)	standard
8/104	160(MPc-)	520(Control)	standard
9/105	347(Pc-)	131(Pc+)	standard
10/103	318(Pc+)	155(MPc-)	standard
11/101	484(Pc+)	328(Pc-)	standard
12/100		487(Pc+)	standard





Εικ 3.7 Οι εικόνες αποτελούν το σύνολο των ψηφιακών εικόνων των πηκτών της ηλεκτροφόρησης με τη μέθοδο της DIGE.

Τα αποτελέσματα της DIGE, δεν εκρίθησαν ικανοποιητικά και δεν χρησιμοποιήθηκαν τελικώς, διότι ένα από τα δείγματα είχε αποδομηθεί (για λόγους άσχετους με την πειραματική διαδικασία), με συνέπεια να αλλοιωθεί το τελικό αποτέλεσμα.

4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Η παρούσα εργασία εντάσσεται στην μελέτη των επιπτώσεων της περιβαλλοντικής, μη επαγγελματικής έκθεσης σε αμιάντο, στους κατοίκους της περιοχής του Μετσόβου. Οι άνθρωποι αυτοί, χρησιμοποιούσαν εξωρυσσόμενο στην περιοχή αμιαντιούχο υλικό για το άσπρισμα των σπιτιών τους μέχρι την δεκαετία 1940-1950, οπότε άρχισε η σταδιακή αντικατάσταση από άλλα πιο εύχρηστα υλικά (Constantopoulos S.H.et al 1985).

Κατά την διάρκεια επεξεργασίας του υλικού, παρατηρείται απελευθέρωση στο περιβάλλον τεραστίου αριθμού ινών αμιάντου (Constantopoulos S.H.et al 1987/a). Μέσω της αναπνευστικής οδού, οι ίνες αυτές εγκαθίστανται στον πνεύμονα. Η κύρια έκφραση της απάντησης του πνεύμονα των ατόμων αυτών στην εισπνοή ινών αμιάντου, ήταν οι υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις, η εντυπωσιακή παρουσία των οποίων, στην απλή ακτινογραφία αποτέλεσε την αιτία διερεύνησης τους. Οι μελέτες της ομάδας της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής, απεκάλυψαν την ύπαρξη αποτιτανωμένων αλλοιώσεων του υπεζωκότα στην απλή ακτινογραφία θώρακα σε ποσοστό 47% του πληθυσμού που είχε χρησιμοποιήσει το αμιαντούχο υλικό (Constantopoulos et al 1985).

Αυτό όμως που έστρεψε την σκέψη προς τη πιθανότητα έκθεσης σε αμιάντο ήταν η εμφάνιση μεσοθηλιωμάτων. Ο επιπολασμός του κακοήθους μεσοθηλιώματος στις πρώτες μελέτες (Constantopoulos SH et al 1987/b), ανευρέθει 300 φορές υψηλότερος από ότι στο γενικό πληθυσμό, γεγονός που οφείλεται στην έκθεση στον αμιάντο.

Διαβρογχικές βιοψίες που διενεργήθηκαν σε άτομα με υπεζωκοτικές αλλοιώσεις αποκάλυψαν ίνες αμιάντου στο πνευμονικό παρέγχυμα, όμοιες με εκείνες που αναγνωρίστηκαν κατά την μεταλλειολογική ανάλυση του αμιαντούχου επιχρίσματος (Langer et al 1987).

Στην επόμενη φάση της μελέτης, η βρογχοκυψελιδική έκπλυση αποκάλυψε λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Όταν συσχετίστηκαν όλα τα στοιχεία, καθορίστηκαν τελικά οι δυο ομάδες. Η μια χαρακτηρίστηκε από υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις στην απλή ακτινογραφία θώρακα και λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα στη βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Η άλλη ομάδα δεν εμφάνιζε υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις αλλά ούτε λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Η ομάδα αυτή, περιελάμβανε όμως και την πλειοψηφία των μεσοθηλιωμάτων που διεγνώσθησαν (Constantopoulos SH, 1992). Η μορφολογική ανάλυση των κυττάρων του BAL στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει αυτά τα



παλαιότερα ευρήματα, αφού μόνο η ομάδα με αποτιτανώσεις έχει αυξημένο ποσοστό λεμφοκυττάρων.

Η λεμφοκυτταρική αυτή κυψελιδίτιδα φαίνεται ότι προκαλείται από την αντίδραση στην εισπνοή ινών αμιάντου, κυρίως από τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία στην προσπάθεια τους να φαγοκυτταρώσουν τις ίνες αμιάντου ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς του πνεύμονα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση T βοηθητικών λεμφοκυττάρων αλλά και φυσικών κυττάρων (NK cells).

Οι δύο αυτές ομάδες ερευνήθηκαν περαιτέρω με ανάλυση της υγρής φάσεως του BAL, προς διερεύνηση τυχόν διαφορών στην πρωτεϊνική τους εικόνα. Όντως υπήρχαν διαφορές αφού ανιχνεύθηκαν δύο επιπλέον πρωτεΐνες στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις (Galani V. et al 2002). Αν και αυτό ενίσχυσε την άποψη "προστασίας από νεοπλασία" όταν υπήρχαν αποτιτανώσεις, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε δεν επέτρεψε την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων.

Γι αυτό επιχειρήθηκε με την παρούσα εργασία μία πιο εμπειριστατωμένη ανάλυση των πρωτεϊνών του BAL των ατόμων αυτών με πολύ πιο σύγχρομες μεθόδους.

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από τις δυο αυτές κατηγορίες Μετσοβιτών με αποτιτανώσεις και χωρίς αποτιτανώσεις. Δεν παρουσίαζαν κανένα νόσημα του αναπνευστικού ή άλλου συστήματος και δεν ήταν καπνιστές, χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα της έρευνας.

Ομάδα ελέγχου απετέλεσαν άτομα που δεν έχουν εκτεθεί στον αμιάντο δεν παρουσίαζαν κανένα νόσημα του αναπνευστικού ή άλλου συστήματος και δεν ήταν καπνιστές.

Στην παρούσα εργασία μελετάται ο διαφορετικός τρόπος αντίδρασης των δύο ομάδων Μετσοβιτών, με βάση την ανάλυση των πρωτεϊνών της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης. Η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την χρήση της ηλεκτροφόρησης διπλής διάστασης, την ανάλυση των κηλίδων με βάση το πρόγραμμα Melanie 4, τον φασματογράφο μάζας και την στατιστική επεξεργασία με τη χρήση του διαδικτύου μέσω της διεύθυνσης EPCLUST (European Bioinformatics Institute). Η ομαδοποίηση σε clusters περιλαμβάνει την ομαδοποίηση ανομοίων στοιχείων, ως προς το κοινό τους γνώρισμα, δηλαδή τη μεταβολή τους με παρόμοιο τρόπο, μεταξύ των ελεγχόμενων ομάδων δειγμάτων.

Δημιουργήθηκαν έτσι έξι ομάδες με κοινή κινητική των πρωτεϊνών που ανέδειξε η ανάλυση των δειγμάτων (πίνακας 3.5, σελ. 71).



α) Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει 5 πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στα ίδια επίπεδα μεταξύ των ατόμων με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+) και των μαρτύρων, ενώ τα επίπεδά τους είναι χαμηλότερα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-).

β) Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει 3 πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-).

γ) Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει 6 στοιχεία χωρίς σαφή κινητικότητα μεταξύ των δειγμάτων και ως εκ τούτου δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα.

δ) Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει 10 στοιχεία, πρωτεΐνες, που ανιχνεύονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους Μετσοβίτες (Pc+ και Pc-), ενώ τα επίπεδά τους είναι χαμηλότερα στους μάρτυρες

ε) Η πέμπτη ομάδα περιλαμβάνει 8 στοιχεία που ανιχνεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-) και στους μάρτυρες, σε σχέση με τα άτομα με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+).

στ) Η έκτη ομάδα περιλαμβάνει 28 στοιχεία που ανιχνεύονται σε υψηλότερα επίπεδα στα άτομα χωρίς υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc-), σε σχέση με τα άτομα με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (Pc+) και τους μάρτυρες.

Το σύνολο των πρωτεϊνών των ομάδων, αναλύθηκε περαιτέρω με t-test και επελέγησαν οι πρωτεΐνες εκείνες στις οποίες, οι διαφορές που αντιστοιχούν στα επίπεδα που ανιχνεύτηκαν, είναι στατιστικά σημαντικές.

Πέραν αυτών των ποσοτικών διαφορών σημειώθηκαν και δύο πιθανές ποιοτικές διαφορές. Στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις ανιχνεύονται δύο πρωτεϊνικές κηλίδες που δεν εμφανίζονται στις δύο άλλες ομάδες:

ι) η καλσιφοσίνη (calcyphosin) και

ιι) η κυτταροπλασματική ακτίνη 1 (actin cytoplasmatic 1).

Βέβαια για να χαρακτηριστεί μία διαφορά στην έκφραση των πρωτεϊνών ποιοτική, πρέπει να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση το λιγότερο που συμβαίνει είναι μια πολύ μεγάλη διαφορά στην ποσοτική έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

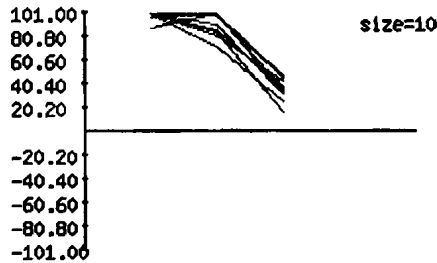
Όπως φαίνεται στον συγκεντρωτικό πίνακα 3.1 (σελ.61), **παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών :**

I) μεταξύ των Μετσοβιτών και των μαρτύρων και

II) μεταξύ των δύο ομάδων των Μετσοβιτών



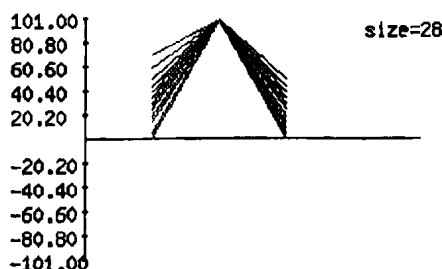
Αυτό που φαίνεται από την πρώτη ανάγνωση του πίνακα είναι ότι οι Μετσοβίτες ως σύνολο παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από τους μάρτυρες. (Cluster 3a, εικόνα 3.3.2, σελ.79).



Από το cluster 3a, παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στις ομάδες Pc(-), (2^ο σημείο) και Pc(+), (1^ο σημείο), βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με εκείνες των μαρτύρων (3^ο σημείο).

Η πρωτεΐνες που εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα και στις δύο ομάδες Μετσοβιτών, εμπίπτουν στην κατηγορία των παραγόντων που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διεργασίες, τόσο στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress (peroxiredoxin, albumin) όσο και στην αντιμετώπιση της καταστροφής του ιστού από τις ενεργοποιούμενες πρωτεάσες (serpin B3, α1-antitrypsin, salivary α-amylase) ενώ εκφράζεται σταθερά η πρωτεΐνη S100-A9, μία πρωτεΐνη οξείας φάσεως ενδεικτική ενεργού φλεγμονής.

Αν παρατηρήσουμε την έκφραση των πρωτεϊνών της ομάδας των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις βλέπουμε ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σε υψηλότερα επίπεδα μόνο στην ομάδα αυτήν, είναι πρωτεΐνες με πιο πολύπλοκη δράση στις φλεγμονώδεις διεργασίες, όχι απολύτως ξεκαθαρισμένη, που συχνά εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου, σε παθογενετικούς μηχανισμούς σημαντικών νοσημάτων, σε αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη νεοπλασιών (Acid Ceramidase, Glutathione-S-Transferase A1 & P, Calcyphosine, actin cytoplasmatic 1, cathepsin D).(cluster 4 , Αποτελέσματα παρ 3.3)



Από το cluster 4, παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στις ομάδες Pc(-), (2^ο σημείο), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με εκείνες των ομάδων των Pc(+), (1^ο σημείο), και των μαρτύρων, (3^ο σημείο).



Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την αρχική διαπίστωση ότι οι περισσότερες νεοπλασίες εντάσσονται στην ομάδα των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις, η οποία είχε χαρακτηριστεί ως ομάδα με ελλιπή προστασία έναντι της δράσης των ινών αμιάντου. (Constantopoulos SH., et al 1985).

Πιο συγκεκριμένα

1) Οι διαφορές στην έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ Μετσοβιτών και μαρτύρων.

α) Στα δείγματα που εξετάστηκαν παρατηρήθηκαν πολλά θραύσματα αλβουμίνης σε όλες τις ομάδες και φαίνεται ότι τα ανιχνεύσιμα επίπεδα ήταν σταθερά υψηλότερα στους Μετσοβίτες σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η αλβουμίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (MB 69000) με 585 κατάλοιπα αμινοξέων , που βρίσκεται στο ανθρώπινο πλάσμα σε συγκεντρώσεις περίπου 40mg/ml, εκπροσωπώντας περίπου το 40% της ολικής πρωτεΐνης του ορού. Σε παρόμοια αναλογία, αν και σε πολύ μικρότερη ποσότητα η αλβουμίνη ανιχνεύεται σε όλα τα βιολογικά υγρά. . Στη ώριμη της μορφή, πρόκειται για μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη χωρίς μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στις πλευρικές ομάδες των κατάλοιπων της (Peters ,T.,Jr et al.,1996).

Σύμφωνα με αναλύσεις σε μοριακό και φυλογενετικό επίπεδο αντιστοίχων ομολόγων αλληλουχιών DNA, πιστεύεται ότι η αλβουμίνη προέκυψε εξελικτικά με τριπλασιασμό του γονιδίου κάποιας αρχέγονης πρωτεΐνης 190 αμινοξέων (Peters, T.,Jr et al.,1996).

Η κύρια λειτουργία της περιλαμβάνει την ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης και τη μεταφορά ευρέως φάσματος ουσιών, συμπεριλαμβανόμενων λιπαρών οξέων και μερικών φαρμάκων (Marx G, Chevion M 1985).

Η αλβουμίνη συμβάλλει στη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης του πλάσματος, προστατεύει τον οργανισμό με την σύνδεση της με τοξικά μόρια και κυρίως συνδέεται με διάφορους μεταβολίτες, τους οποίους μεταφέρει. Στην αλβουμίνη είναι δυνατόν να προσδένονται ανιονικά, ουδέτερα και κατιονικά μόρια. Ορισμένα από αυτά είναι λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, στεροειδείς ορμόνες, αιμοσφαιρίνη, χολερυθρίνη, χολικά άλατα, ιόντα χαλκού, μαγνησίου, ασβεστίου και κατιονικά φάρμακα.

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι έχει και ενζυματική (Watanabe, H et al 2000) (Kragh-Hansen,U et al.2002) καθώς και αποπτωτική δράση (Zoellner, H., et al 1996, Jones, et al.,2003).

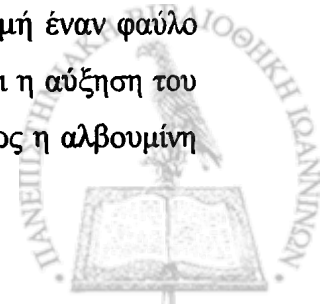


Στην δομή της συμμετέχουν πολλά μόρια κυστεΐνης που συνολικά δημιουργούν 17 δισουλφιδικούς δεσμούς και έχουν μια ελεύθερη θέσηθειόλης στη κυστεΐνη 34 .

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες , το ένα τρίτο της αλβουμίνης του πλάσματος σχηματίζει δισουλφίδια με τη γλουταθειόνη (GSH). Οι υπόλοιπες σουλφυδρυλομάδες εντοπίζονται στο κατάλοιπο της Cys-34 της αλβουμίνης. Αποτελεί τη κύρια εξωκυττάρια πηγή των ενεργών ελευθέρωνθειολών. (Cantin M.A et al 2000)

Η ανθρώπινη αλβουμίνη εκτός των άλλων έχει ειδικές θέσεις πρόσδεσης για ιόντα χαλκού. Είναι γνωστό ότι τα ιόντα μετάπτωσης των μετάλλων, όπως του χαλκού Cu(II) ή του σιδήρου Fe(III), είναι πολύ σημαντικά για την επιτάχυνση της αντίδρασης των ελευθέρων ριζών όπως για παράδειγμα η δημιουργία $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical), από το υπεροξείδιο. Μια από τις πιο σημαντικές αντιοξειδωτικές λειτουργίες των βιολογικών υγρών είναι αυτή που περιλαμβάνει την διατήρηση των μεταλλοϊόντων σε ασφαλείς μορφές. Έχει αποδειχθεί ότι η αλβουμίνη, παρεμποδίζει την δημιουργία ελευθέρων ριζών υδρογόνου, ($\cdot\text{OH}$), από συστήματα που περιέχουν ιόντα Cu και H_2O_2 . Τα ιόντα Cu προσδένονται στην αλβουμίνη και μερικά από αυτά, καθίστανται λιγότερο ικανά να αντιδράσουν. Όσες, παρά ταύτα ελεύθερες ρίζες παραχθούν μέσα στην μάζα της αλβουμίνης, καθλώνονται στο μόριο της αλβουμίνης και δεν απελευθερώνονται στο βιολογικό υγρό. Το μόριο της αλβουμίνης συνήθως αποδομείται κατά την διάρκεια αυτής της διεργασίας. Όμως καθώς η συνολική ποσότητα αλβουμίνης στο πλάσμα είναι μεγάλη, και η αντικατάσταση της γρήγορη, δεν φαίνεται να δημιουργεί αυτή η ζημιά σημαντικό πρόβλημα ιδίως όταν συγκριθεί με το μέγεθος της βλάβης άλλων πιο σημαντικών μορίων, που αποφεύγεται με αυτόν τον τρόπο.

Γενικώς δεν αποκλείεται η μικρότερη ποσότητα της αλβουμίνης στο υγρό της βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης, να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητα προστασίας από οξειδωτικούς παράγοντες (Halliwell B,1988), που όμως υπό φυσιολογικές συνθήκες και με φυσιολογική λειτουργία των αμυντικών μηχανισμών του πνεύμονα, αυτή να είναι απολύτως επαρκής. Τα πράγματα αλλάζουν σε καταστάσεις ανάγκης. Τότε, εφ' όσον η έκθεση σε βλαπτικούς παράγοντες είναι μεγάλη , ακολουθεί τροποποίηση της λειτουργίας του ενδοθηλίου και τελικώς αύξηση της διαπερατότητάς του, με επακόλουθη την εξαγγείωση πλάσματος, παράλληλα με την εξαγγείωση και ενεργοποίηση ουδετερόφιλων τα οποία παράγουν H_2O_2 και HOCL, στην προσπάθεια ελέγχου του βλαπτικού παράγοντα, δημιουργώντας όμως την ίδια στιγμή έναν φαύλο κύκλο. Το θετικό από την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, είναι η αύξηση του εξωκυτταρικού υγρού που περιέχει αυξημένη ποσότητα πρωτεϊνών όπως η αλβουμίνη



και η τρανφερίνη με ρόλο προστατευτικό για τον ιστό σε τέτοιες καταστάσεις. Αυξημένη παρουσία αλβουμίνης αλλά και τρανφερίνης στην φλεγμώδη περιοχή μπορεί να συντελέσει στην πρόληψη της καταστροφής από τα τοξικά προϊόντα της οξειδωτικής και στον έλεγχο των ουδετερόφιλων (Halliwell B, 1988).

Η αυξημένη ποσότητα θραυσμάτων αλβουμίνης που ανιχνεύονται στους Μεσοβίτες είναι συνεπώς ενδεικτική αυξημένης δραστηριότητας στην περιοχή και μία ακόμα ένδειξη μίας συνεχούς υποκλινικής φλεγμονώδους διεργασίας που προκαλείται από τις ίνες αμιάντου στον κυψελιδικό χώρο και στο πνευμονικό παρέγχυμα.

Πέραν της γενικής εμμέσου δράσης της ως αντιοξειδωτικού παράγοντα στον εξωκυττάριο χώρο, η αλβουμίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην προστασία του πνεύμονα Ένας από τους τρόπους που οι ίνες αμιάντου προκαλούν ιστική βλάβη είναι μέσω παραγωγής τοξικών ριζών οξυγόνου (Kamp D.W. et al, 1992). Η ικανότητα του αμιάντου να ευοδώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες (Lund LG, 1991). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμιάντου συσχετίζονται με την κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνο δράση του και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την προσρόφηση, στην επιφάνειά του, βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες (Kane A.B., 1996). Η αλβουμίνη φαίνεται ότι προσκολλάται στην επιφάνεια των ινών και πιθανότατα συμβάλλει στην προσπάθεια αδρανοποίησής τους. Έτσι προσφέρει πολύτιμη βοήθεια στα κυψελιδικά αλλά και ιστικά μακροφάγα, αφήνοντας τελικώς στον κυψελιδικό χώρο θραύσματα ως ίχνη της προσπάθειας αυτής που καταλήγει σε αποδόμηση της αλβουμίνης (Falini G et al 2006). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τις παρατηρήσεις αυτές. Ίνες ανιχνεύονται σε όλα τα δείγματα ασχέτως του χρόνου που έχει παρέλθει από την διακοπή της χρήσεως του αμιαντούχου υλικού (Constantopoulos SH, 1992). Η παρουσία τους πυροδοτεί συνεχώς την παραγωγή ελευθέρων ριζών, ROS (Reactive Oxygen Species), και η αλβουμίνη επιστρατεύεται προκειμένου να μετριασθεί η ιστική βλάβη.

β) Μία άλλη ομάδα πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό αντιοξειδωτικό ρόλο είναι η **ομάδα των υπεροξυαναγωγασών (peroxiredoxins)**. Αν και η αύξησή τους δεν είναι στατιστικά σημαντική, η παρουσία τους είναι ενδεικτική ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Οι υπεροξυαναγωγασες αποδομούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που παράγεται κατά τις οξειδωτικές διεργασίες τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες (μεταβολισμός) όσο και σε συνθήκες οξειδωτικού stress οποιασδήποτε αιτίας (Lehtonen S, et al 2005, Chae HZ, et al 1993, Chae HZ, 1994, Kang SW 1998).



Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι αποτελούν συγχρόνως και το υπόστρωμα της αντίδρασης καθώς ανάγοντας το H_2O_2 , οι ίδιες οξειδώνονται. (Karihtala P et al, 2003)

Φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπίδραση και με άλλους παράγοντες που περιέχουν θειόλες και ιδιαίτερος με την γλουταθειόνη (Manevich Y et al, 2004).

Έχει περιγραφεί αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε νεοπλασίες, (Kang SW et al 1998, Kinnula et al, 2002, Lehtonen S et al, 2004)

Πιθανότατα ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός καθώς δρουν ως ρυθμιστικά διαλύματα απορροφώντας τρόπον τινά τις συνέπειες μίας έντονης οξειδωτικής διεργασίας. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι προστατεύονται άλλα μόρια ενώ δεν αποκλείεται να συμμετέχουν στην ρύθμιση μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με κυτταρική βλάβη και απόπτωση (Lehtonen S, et al 2005).

Η παρουσία τους σε αυξημένα επίπεδα στους Μετσοβίτες είναι ενδεικτική μίας κατάστασης μονίμου οξειδωτικού stress στις κυψελίδες των ατόμων αυτών, που πυροδοτείται από την παρουσία των ινών αμιάντου. Έτσι ενεργοποιούνται οι ουσίες αυτές προκειμένου να προστατεύσουν το πνευμονικό παρέγχυμα από τις συνέπειες της ιστικής αντίδρασης στον αμιάντο.

γ) Η HSP β1, (Heat Shock Protein β1/ Hsp27), ανήκει στην **οικογένεια των πρωτεϊνών οξείας φάσεως**. Εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και είναι μία φωσφοπρωτεΐνη. Η Hsp27 είναι μια από τις πρωτεΐνες, των οποίων η έκφραση προστατεύει το κύτταρο έναντι του οξειδωτικού στρες.

Πιθανόν η προστασία που προσφέρει, επιτυγχάνεται από την δράση της ως συνοδός πρωτεΐνη (chaperon) και από την ικανότητά της να κρατά την γλουταθειόνη στην αναχθείσα μορφή της. Η Hsp27 προστατεύει επίσης έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων τα οποία σχετίζονται με τη αδρανοποίηση των ROS και συνεπώς προστατεύει σημαντικά κυτταρικά μόρια από αποδόμηση συνεπεία οξειδωτικού stress (Sakamoto H et al, 2002).

Φαίνεται ότι υπεισέρχεται στην ρύθμιση των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, (Rogalla et al ,1999, Mehlen et al, 1996, Bruey et al, 2000, Garrido et al, 1997), ενώ έχει δειχθεί ότι εμποδίζει επίσης την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα προστασία του κυττάρου έναντι της απόπτωσης (Bruey et al, 2000, Garrido et al, 1999).



Η έκφρασή της HSP27 έχει συσχετισθεί με αυξημένη προστασία των κυττάρων έναντι της απόπτωσης συνεπεία ποικίλων παραγόντων (Charette et al, 2000).

Στην παρούσα μελέτη η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης αυτής στο σύνολο των εκτεθέντων στον αμιάντο σε σχέση με τους μάρτυρες, ενισχύει την υπόθεση της χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής του πνεύμονα στα άτομα αυτά και της ενεργοποίησης προστατευτικών μηχανισμών.

δ) Άλλη μία πρωτεΐνη σχετιζόμενη με φλεγμονή είναι η πρωτεΐνη **S100-A9**, η οποία επίσης ανιχνεύεται σε αυξημένα επίπεδα στον πληθυσμό των εκτεθέντων στον αμιάντο ατόμων.

Η S100 πρωτεΐνες αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών που δεσμεύουν ασβέστιο (Foell D et al, 2004, Dorin JR et al, 1987, Hofmann MA et al, 1999, Srikrishna G et al, 2001).

Το ενδοκυττάριο ασβέστιο αποτελεί μόριο με καθοριστικό ρόλο στις σημαντικότερες λειτουργίες του κυττάρου από την επαγωγή των νευρικών ερεθισμάτων και την μεταγωγή σήματος μέχρι την κυτταρική μετανάστευση και τον κυτταρικό θάνατο (Styer, Biochemistry 1988). Οι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο θεωρούνται μόρια κλειδιά στην μετάδοση των σημάτων των εξαρτωμένων από ασβέστιο. Η οικογένεια των πρωτεϊνών S100, περιλαμβάνουν την S100 A8 (calgranulin A), την S100 A9 (calgranulin B) και την S100 A12 (calgranulin A). Η S100 A8 και η S100 A9 είναι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που ανευρίσκονται κατά κύριον λόγο στα φαγοκύτταρα, εκκρίνονται ενεργητικά και δρουν ως φλεγμονώδεις παράγοντες (Hofmann MA et al, 1999, Srikrishna G et al, 2001).

Έχει περιγραφεί υπερέκφρασή τους σε περιοχές φλεγμονής ενώ φαίνεται ότι αυτή η υπερέκφραση, συσχετίζεται και με υποτροπές φλεγμονωδών νοσημάτων (Odic K et al 1987, Zwaldo G et al 1988, Sander J et al 1984, Frosch M et al, 2004, Goebeler M et al, 1994).

Αν και ο ρόλος τους στην φλεγμονή δεν έχει αποσαφηνισθεί, η παρουσία τους επισημαίνει την φλεγμονή αυτή, ασχέτως αιτίου και ασχέτως βαρύτητας.

Η αυξημένη τους έκφραση στον πληθυσμό μελέτης ενισχύει την υπόθεση της παρουσίας ενεργού μεν, υποκλινικής όμως φλεγμονής.

ε) Η **SERPIN B3** ή αλλιώς **SCCA1** (Squamous Cell Carcinoma Antigen 1), όπως και το **SCCA2** (Squamous Cell Carcinoma Antigen 2 / **SERPIN B4**), ανήκουν στην οικογένεια της σερπίνης (Serpine, Serin Protease Inhibitors), (Sakata Y, et al 2004, Schick C et al, 1997).



Οι σερπίνες αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών με κύριο ρόλο την αναστολή της δράσης των πρωτεασών, δηλαδή πρωτεολυτικών ενζύμων όπως η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η ελαστάση που καταλύουν την αποδόμηση σημαντικών λειτουργικών και δομικών πρωτεϊνών. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν και η αντι-θρομβίνη και η αντι-θρυψίνη. Εκφράζονται σε πολλούς ιστούς μεταξύ των οποίων και το επιθήλιο των αεραγωγών.

Ο ρόλος των δύο αυτών σερπινών, B3 και B4, δεν είναι ξεκαθαρισμένος όμως φαίνεται ότι συμμετέχουν στον έλεγχο της φλεγμονής, αναστέλοντας λυσοσωματικές κυστεϊνικές πρωτεάσες όπως οι καθεψίνες K, L και S (cathepsin K, L, S), αλλά και μία κατιονική ουδέτερη σερινική πρωτεάση την καθεψίνη G (cathepsin G), που συντίθεται από ουδετερόφιλα και μαστοκύτταρα (Schick C et al 1997, 1998).

Έχει περιγραφεί αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών *in vitro* σε κύτταρα βρογχικού επιθηλίου και κερατινοκύτταρα υπό την επίδραση δύο, τύπου Th₂, κυτταροκινών της IL-4 και της IL-13 (Yuyama N et al 2002).

Έχει επίσης παρατηρηθεί αναστολή της δράσης των κυστεϊνικών πρωτεασών Der p1 Der f1, αντιγόνα των ακάρεων *Dermatophagoides pteronyssimus* και *Dermatophagoides farinae* αντιστοίχως, από την σερπίνη B4 (Sakata Y et al 2004).

Δεν αποκλείεται τα δύο αυτά μόρια, SERPIN B3 και SERPIN B4, να προστατεύουν τον ιστό αναστέλλοντας την δράση τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών πρωτεασών, μικροβίων και παρασίτων, συμμετέχοντας στην άμυνα του οργανισμού.

Με τον ίδιο μηχανισμό οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν συμβάλλουν στην προστασία του πνευμονικού παρεγχύματος από την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων που ενεργοποιούνται αμέσως ή εμμέσως από τις ίνες του αμιάντου. Είναι γνωστό ότι η πρώτη απόπειρα του οργανισμού να αδρανοποιήσει τις ίνες γίνεται από τα μακροφάγα, που στην προσπάθειά τους να φαγοκυτταρώσουν τις ίνες (πολύ μακριές και ανθεκτικές για την κλάση τους), καταστρέφονται. Η νέκρωση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των λυσοσωματικών τους ενζύμων στον εξωκυττάριο και κυψελιδικό χώρο με πολύ σοβαρές επιπτώσεις στο παρακείμενο πνευμονικό παρέγχυμα (Burke B., Lewis C. The Macrophage, 2002).

Ακόμα μέλη της οικογένειας αυτών των πρωτεϊνών, ρυθμίζουν την δράση πρωτεασών που έχουν σχέση με την μετανάστευση των κυττάρων, την διαφοροποίηση και την απόπτωση. Δράσεις που φαίνεται ότι ενεργοποιούνται στην περίπτωση των εκτεθέντων σε αμιάντο (Gariboldi M. et al., 2003).



Στην μελέτη μας, η ενισχυμένη παρουσία των πρωτεϊνών αυτών στον πνεύμονα ενισχύει την άποψη για μία υποκλινική φλεγμονώδη διεργασία στους πνεύμονες των ατόμων που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο. Η φλεγμονή αυτή στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υποδηλώνεται με κλινικό τρόπο και δεν δημιουργεί ανιχνεύσιμη ιστική βλάβη ή λειτουργική διαταραχή του οργάνου.

Π) Διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων Μετσοβιτών, (PC+) και (PC-)

Η ανάλυση των δειγμάτων από τα άτομα χωρίς αποτιτανώσεις, (PC-), έδωσε μία διαφορετική εικόνα που τα ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους Μετσοβίτες, (PC+), και την ομάδα των μαρτύρων. Στα δείγματα αυτά εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα η τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η όξινη κεραμιδάση, η καθεψίνη D, η καλσιφοσίνη και η κυτταροπλασματική ακτίνη. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (άμεσα ή έμμεσα) και κατά συνέπεια και της ανάπτυξης νεοπλασίας.

α) Η S μεταγωγή της γλουταθειόνης (GST Glutathione S-transferase P)

Η γλουταθειόνη (GSH), είναι ένα τριπεπίδιο που περιέχει μια σουλφυδρυλομάδα και είναι παρόν σε υψηλά επίπεδα στα ζωικά κύτταρα. Ο ρόλος της είναι να προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη (Hayes JD). Αποτελεί το κυριότερο οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα που βρίσκεται στα πιο πολλά κύτταρα (To-Figueras J et al 1999). Μεταπίπτει, συνεχώς από αναχθείσα θειολο-μορφή (GSH), σε μια οξειδωμένη μορφή (GSSG) στην οποία δυο τριπεπίδια, συνδέονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Το GSSG ανάγεται προς το GSH από τη αναγωγή του γλουταθείου, μια φλαβοπρωτεΐνη που χρησιμοποιεί το NADPH ως πηγή ηλεκτρονίων (Stryer L. Biochemistry, 1998)

Η S μεταγωγάσες της γλουταθειόνης (GST, Glutathione S-transferase), αποτελούν μία ομάδα ενζύμων που καταλύουν την σύνδεση της αναχθείσας γλουταθειόνης με προϊόντα οξείδωσης καθώς και με τοξικά για το DNA ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα. Αποτελούν δηλαδή σημαντικότετους παράγοντες στην αδρανοποίηση πληθώρας τοξικών παραγόντων ενδογενών και εξωγενών (Ketter B et al 1992). Τα διάφορα ισόενζυμα της ομάδας (α, μ, π, και θ), (Mannervick B et al 1992), έχουν διαφορετική κατανομή και έκφραση μεταξύ των ιστών και εμφανίζουν πολυμορφισμό στο επίπεδο των γονιδίων που πιθανόν έχει σημαντικές επιπτώσεις στην αντιμετώπιση



μεταλλαξιγόνων στοιχείων με συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασιών (Stücker I et al 2001).

Αυξημένη επίπτωση μεσοθηλιώματος έχει παρατηρηθεί στην Φιλανδία σε άτομα με επαγγελματική έκθεση στον αμιάντο που εμφάνιζαν διαγραφή του γονιδίου GSTM1 (London S J , et al 1995, Hirvonen A et al 1996).

Το ισοένζυμο π, GSTP1, εκφράζεται στα περισσότερα επιθήλια και στο αναπνευστικό επιθήλιο. Υπερέκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε πολλές κακοήθεις νεοπλασίες και πιθανόν να συμμετέχει στους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής σε ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. (To-Figueras J et al 1999).

Εμμέσως η GST, μέσω της γλουταθειόνης συμμετέχει στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και απόπτωσης. Η αύξηση της ενδοκυττάριας GSH φαίνεται ότι αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό που αποτρέπει την απόπτωση. Στον μηχανισμό αυτόν συμμετέχει και η αλβουμίνη που ρυθμίζει την ομοίωση της ενδοκυττάριας GSH (Cantin A et al 2000).

β) Η όξινη κεραμιδάση (AC, Acid Ceramidase)

Ένα άλλο ένζυμο που ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα στην ομάδα των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις είναι η όξινη κεραμιδάση (AC, Acid Ceramidase). Είναι λυσοσωματικό ένζυμο που αποδομεί το κεραμίδιο (Ceramide) σε σφινγοσίνη και λιπαρό οξύ (AC3). Μία διαταραχή της δραστηριότητας του ενζύμου οδηγεί στην συγγενή νόσο του Faber, (Faber S. et al 1957), λιποκοκκιωμάτωση Faber, μία νόσο που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση κεραμιδίου στα λυσοσώματα και μοιραία απόληξη (θησαυρίσωση) (Sugita M. et al 1972).

Το κεραμίδιο έχει περιγραφεί ως σημαντικός παράγοντας στην ρύθμιση της απόπτωσης μέσω TNF και φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικότατο μόριο στο μονοπάτι της απόπτωσης που δεν εξαρτάται από τις κασπάσες (Pettus BJ, et al 2002, Kolesnick RN, et al 1998, Kolesnick R et al 2002). Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ σημαντικός και αποτελεί την εναλλακτική οδό εφόσον ο κλασσικός μηχανισμός απόπτωσης για κάποιον λόγο δεν λειτουργεί.

Αύξηση των επιπέδων της κεραμιδάσης συνεπάγεται αποδόμηση του κεραμιδίου με αποτέλεσμα ελάττωση του ρυθμού απόπτωσης (Park J, et al 2006).

Η αυξημένη έκφραση του ενζύμου έχει συσχετισθεί με νεοπλασίες (Payne SG, et al 1999, Strelow A, et al 2004,) , καθώς και με την νόσο Alzheimer (Huang Y, et al 2004).



γ) Η Καθεψίνη D (cathepsin D)

Η Καθεψίνη D είναι μία λυσοσωματική πρωτεΐνάση. Αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας καθώς υπερέκφρασή της και υπερέκκρισή της έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνο του μαστού (Rochefort et al, 1987). Ακόμα η υπερέκφρασή της έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο μεταστάσεων και κακή πρόγνωση των ασθενών αυτών (Rochefort et al 1992, Foekens et al 1999, Westley and May 1999). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ευοδώνει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων (Vignon et al 1986, Liaudet et al 1995) και αυξάνει την μεταστατική τους ικανότητα (Liaudet et al 1994). Έχει δειχθεί ότι οι δράσεις αυτές της καθεψίνης D είναι ανεξάρτητες από την πρωτεολυτική της δραστηριότητα (Gliondu et al 2001) και φαίνεται ότι ευοδώνει και την αγγειογένεση σε όγκους με παρακρινικό μηχανισμό (Berchem et al 2002). Πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Liaudet-Coopman (Laurent-Matha et al 2005), έδειξε ότι η καθεψίνη D ευοδώνει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων όχι μόνον δρώντας πάνω στα επιθηλιακά κύτταρα του αρχικού όγκου αλλά και στους ινοβλάστες του χορίου (στρώματος), οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και αυξημένη ικανότητα μετακίνησης και διείσδυσης στην εξωκυττάρια ουσία. Φαίνεται ότι η υπερέκκριση της καθεψίνης D από τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζει την ομοίωσταση του μικροπεριβάλλοντός τους, δημιουργώντας συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους.

Αν και η αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι στατιστικά σημαντική θεωρούμε ότι η δράση της είναι πιθανότατα καθοριστική και ενδεχομένως παρεκκλίσεις των τιμών της να είναι ενδεικτικές ενεργοποίησης μηχανισμών καρκινογένεσης.

Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα στα άτομα χωρίς αποτιτανώσεις και πιθανότα η δράση τους με τις μεταβολές που επιφέρει στο μικροπεριβάλλον του πνευμονικού παρεγχύματος, συσχετίζεται με την αυξημένη επίπτωση νεοπλασιών στην ομάδα αυτή.

Τέλος στην ομάδα αυτή, των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις ανιχνεύονται δύο πρωτεϊνικές κηλίδες των οποίων η έκφραση φαίνεται μηδενική στις άλλες δύο ομάδες. Η καλσιφοσίνη (calcyphosin) και η κυτταροπλασματική ακτίνη 1 (actin cytoplasmatic 1).



δ) Η καλσιφοσίνη (calcyphosin) είναι πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει το ασβέστιο αποτελεί τον ενδοκυττάριο, δεύτερο, μεταβιβαστή, για πολλές οδούς μεταγωγής σήματος. Ο λόγος που κάνει το ασβέστιο τόσο αποτελεσματικό μεταγωγέα είναι η πολλή χαμηλή του ενδοκυττάρια συγκέντρωση. Η συγκέντρωσή του, μπορεί να αυξηθεί κατακόρυφα, με ενεργοποίηση των αντλιών ασβεστίου ως αποτέλεσμα κατάληψης κάποιου μεμβρανικού υποδοχέα, ή μεταβολής του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης. Ο δεύτερος λόγος που το ασβέστιο είναι απολύτως κατάλληλο για δεύτερος μεταγωγέας σήματος είναι η ικανότητά του να συνδέεται σταθερά με πρωτεΐνες. Δηλαδή, ως απάντηση κάποιου πρώτου σήματος που φτάνει στο κύτταρο για μία συγκεκριμένη δράση, αυξάνεται το ενδοκυττάριο ασβέστιο και συνδέεται με την κατάλληλη, κατά περίπτωση, πρωτεΐνη. Η συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η μεταβολή της δομής της πρωτεΐνης στον χώρο, προς μία μορφή με υψηλή χημική συγγένεια με την πρωτεΐνη στόχο, για την συγκεκριμένη ενέργεια. (Stryer L. Biochemistry, part IV, Molecular physiology p887).

Η καλσιφοσίνη είναι μία EF-hand πρωτεΐνη, (Stryer L. Biochemistry, part IV, Molecular physiology p887), η οποία συνδεόμενη με ασβέστιο μεταβάλλει την δομή της. Η πιο καλά μελετημένη EF-hand πρωτεΐνη είναι η καλμοδουλίνη η οποία ενεργοποιούμενη με την σύνδεσή της με ασβέστιο, συνδέεται με πληθώρα ενζύμων στόχων, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες I, II, IV, η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και η καλσινευρίνη. Πρωτεΐνες-στόχοι που συμμετέχουν σε πλήθος βιολογικών διεργασιών οι οποίες εμπλέκονται στους μηχανισμούς μεταγραφής (transcriptional mechanisms) (Nemoto Y, et al 1993, Chin D, et al 2000, Crabtree GR., 2001, Soderling TR, et al 2001).

Η καλσιφοσίνη είναι πιθανόν να συμμετέχει στους μηχανισμούς της μεταγραφής σήματος που απαιτούν την συνεργασία δύο διαφορετικών οδών μεταγραφής: της εξαρτωμένης από το κυκλικό AMP και της εξαρτωμένης από την φωσφατιδυλινοσιτόλη (IP3) (Nemoto Y. et al, 1993). Αναγνωρίστηκε αρχικά σε θυρεοειδικά κύτταρα του σκύλου ως δείκτης διαφοροποίησης αλλά και υπόστρωμα για την δράση της εξαρτωμένης από κυκλικό AMP πρωτεϊνικής κινάσης (Lefort A, et al 1990). Στον άνθρωπο έχει δείχθει ότι εκφράζεται σε όλους τους ιστούς εκτός από προστάτη, σπλήνα και λεπτό έντερο, ενώ το επίπεδο έκφρασης είναι υψηλότερο στον πνεύμονα, το κόλον, τους όρχεις και τον εγκέφαλο (Wang S, et al 2002)

Η καλσιφοσίνη είναι μία διατηρημένη πρωτεΐνη (ανιχνεύεται και σε μαλάκια) που φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σημάτων σημαντικών για την



διαφοροποίηση και επιβίωση των κυττάρων. Εμφανίζει μεγάλη 'ομολογία' με την σεντρίνη η οποία είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Η σεντρίνη ανιχνεύτηκε αρχικά στην πράσινη άλγη *Chlamydomonas reinhardtii* (Huang Y et al 1988, Salisbury JL, et al 1988), όπου παίζει σημαντικό ρόλο στην σωστή διάταξη των βλεφαρίδων κατά την κυτταρική διαίρεση και τον ακριβή διπλασιασμό του σώματος του μικροοργανισμού (Taillon BE, et al 1992). Η σεντρίνη 2 έχει ανιχνευθεί στον πυρήνα και έχει δείχθει ότι συμμετέχει στον μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (Araki M, et al 2001). Φαίνεται ότι η καλσιφοσίνη ανήκει σε μία ομάδα αρχαίων, καλά διατηρημένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με λειτουργίες κυτταρικής κίνησης και διαίρεσης, εμπλεκόμενες στην κυτταρική επιβίωση.

ε) Η **κυτταροπλασματική ακτίνη 1 (actin cytoplasmatic 1)**, είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Το δίκτυο που σχηματίζεται από την ακτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η κίνηση, η διαίρεση, η μετακίνηση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφανείας, η σταθερή προσκόληση των κυττάρων και η επικοινωνία μεταξύ κυττάρων. Έχουν καταγραφεί μεταβολές στην έκφραση της πρωτεΐνης αυτής κατά την διάρκεια μορφολογικών μεταβολών των κυττάρων, αλλά και σε καταστάσεις κακοήθους εξαλλαγής τους (Shapland C, et al 1993, Button E, et al 1995).

Η έντονη παρουσία των δύο αυτών πρωτεϊνών, της καλσιφοσίνης και της κυτταροπλασματικής ακτίνης, στην ομάδα των Μετσοβιτών χωρίς αποτιτανώσεις, δεν αποκλείεται να σχετίζεται με μηχανισμούς που ευοδώνουν την κυτταρική διαίρεση και ενδεχομένως δημιουργούν συνθήκες ευνοϊκές και για κακοήθη εξαλλαγή κάποιων κυτταρικών ομάδων. Η δράση τους συνδιαζόμενη με την δράση και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης της κεραμιδάσης και της καθεψίνης D, πιθανόν να δημιουργούν, σε αυτά τα άτομα, ι) συνθήκες αυξημένης τοξικότητας του αμιάντου λόγω ελαττωματικής αδρανοποίησης και ιι) επιμήκυνσης της διάρκειας ζωής κυττάρων που έχουν «τραυματιστεί» από την δράση του αμιάντου, αλλά και συνθήκες ευνοϊκές για την επιβίωση και πολλαπλασιασμό μεταλλαγμένων κυττάρων. Τέτοιου είδους δράσεις είναι δυνατόν να οδηγήσουν τελικώς στην ανάπτυξη νεοπλασίας.

Συνοψίζοντας

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος επιβεβαιώνει την ύπαρξη φλεγμονής στον πνεύμονα όλων των εκτεθέντων στο αμιαντούχο υλικό,



ασχέτως υπεζωκοτικών αλλοιώσεων, αφού πρωτεΐνες ενδεικτικές φλεγμονωδών διεργασιών ανιχνεύονται σε όλα τα δείγματα.

Η μέχρι τώρα ανάλυση είχε αποκαλύψει στοιχεία ενδεικτικά φλεγμονής, σε επίπεδο μορφολογικής ανάλυσης των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, στα άτομα με αποτιτανώσεις, χωρίς καμία κλινική διαταραχή. Η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει την ύπαρξη χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής σε επίπεδο πρωτεϊνών (αυξημένα επίπεδα αλβουμίνης, σερπινών, πρωτεϊνών οξείας φάσεως) και αποκαλύπτει ότι αυτή επεκτείνεται και στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις.

Επι πλέον, η ομάδα αυτή (χωρίς αποτιτανώσεις), εμφανίζει αυξημένη έκφραση πλήθους πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.

ι) Η αύξηση της **κεραμιδάσης** εμποδίζει την απόπτωση συνεπώς ευοδώνει την παράταση ζωής των κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνοντας τις πιθανότητες κυττάρων με μεταλλάξεις λόγω δράσεως του αμιάντου, να παραμείνουν και να πολλαπλασιασθούν.

ιι) Η **τρανσφεράση της γλουταθειόνης** εμπλέκεται στην αδρανοποίηση τοξικών και καρκινογόνων παραγόντων και αυξημένη έκφρασή της συσχετίζεται με εμφάνιση νεοπλασιών.

ιιι) Υπερέκφρασή της **καθεψίνης** έχει συσχετισθεί με καρκίνο του μαστού και αυξημένο κίνδυνο μεταστάσεων, πιθανότατα μέσω παρακρινικής δράσης στους ινοβλάστες του στρώματος, των οποίων ευοδώνει τον πολλαπλασιασμό και την ικανότητα μετακίνησης και διείσδυσης στην εξωκυττάρια ουσία

ιiv) Η **καλσιφοσίνη** πιθανόν να συμμετέχει στους μηχανισμούς της μεταγραφής σήματος και φαίνεται ότι ανήκει σε μία ομάδα αρχαίων, καλά διατηρημένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με λειτουργίες κυτταρικής κίνησης και διαίρεσης, εμπλεκόμενες στην κυτταρική επιβίωση.

v) Στο ίδιο μοτίβο κινείται και η **κυτταροπλασματική ακτίνη 1** (actin cytoplasmatic 1), που είναι πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Το δίκτυο που σχηματίζεται από την ακτίνη παίζει καθοριστικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η κίνηση, η διαίρεση, η μετακίνηση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφανείας, η σταθερή προσκόλληση των κυττάρων και η επικοινωνία μεταξύ κυττάρων, ενώ έχουν καταγραφεί μεταβολές στην έκφρασή της κατά την διάρκεια μορφολογικών μεταβολών των κυττάρων, αλλά και σε καταστάσεις κακοήθους εξαλλαγής τους.



Η παρουσία των δύο τελευταίων (καλσιφοσίνη, κυτταροπλασματική ακτίνη) μόνο στα άτομα χωρίς αποτιτανώσεις, θεωρούμε ότι αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα. Οι πρωτεΐνες αυτών των οικογενειών είναι πρωτεΐνες με δράση σε βασικές λειτουργίες των κυττάρων όπως η κίνηση, η διαίρεση και η διαφοροποίηση. Ενδεχομένως υπερέκφρασή τους σημαίνει ενεργοποίηση μηχανισμών που οδηγούν σε κακοήθη εξαλλαγή

Με την μελέτη αυτή, φαίνεται πλέον καθαρά ότι,

α) σε όλους τους εκτεθέντες σε αμιάντο ανιχνεύονται πρωτεΐνες που υποδεικνύουν την ύπαρξη χρόνιας, ήπιας φλεγμονής.

β) στα άτομα χωρίς αποτιτανώσεις του υπεζωκότα, υποδεικνύεται ένας διαφορετικός τρόπος αντιμετώπισης των ινών του αμιάντου, ο οποίος αν και "φαίνεται" πιο αποτελεσματικός (δεν ανιχνεύονται αντιδράσεις ούτε από τον υπεζωκότα ούτε από τις κυψελίδες), ίσως ενεργοποιεί μηχανισμούς που καθιστούν τα άτομα αυτά πιο ευαίσθητα στην ανάπτυξη νεοπλασιών.



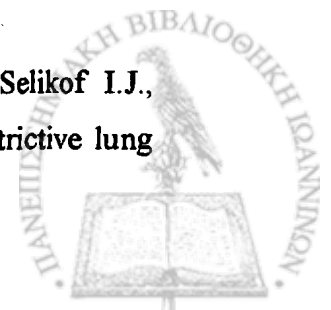
5. ΑΝΑΦΟΡΕΣ



- Alban A., David O. S., Bjorkesten L., Andersson C., Sloge E., Lewis S., Currie I., (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* .,3, 36-44.
- Anderson Leigh N., and Anderson Norman G., (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* .,19, 1853-1861.
- Anderson N.G., Matheson A., Anderson N.L. (2001). Back to the future: the human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology. *Proteomics* .,1,1,3-12.
- Anderson N.L and Anderson N.G., (1998) Proteome and Proteomics: new technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861.
- Appel R.D., Vargas J.R., Palagi P.M., Walther D., Hochstrasser D.F. MelanieII- a third generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: II. Algorithms. (1997b)*Electrophoresis*., 18,2735-2748.
- Appel R.D., Palagi P.M., Walther D., Vargas J.R., Sanchez J.C., Ravier F., Pasquali C., Hochstrasser DF .,(1997a). MelanieII- a third generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis* .,18,2724-2734.
- Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugasawa K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F., (2001) . Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem*., 276,22,18665-72.
- Baltimore D., (2001). Our genome unveiled. *Nature*., 409, 814-816.
- Becklake M.R., (1976).Asbestos-related diseases of the lung and other organs: Their epidemiology and implications for clinical practice. State of art., *Am.Re.Resp.Dis.*, 114,187.
- Berchem, G.J., M. Glondu, M. Gleizes, J.P. Brouillet, F. Vignon, M. Garcia, and E. Liaudet-Coopman. 2002. Cathepsin-D affects multiple steps of tumor progression: Proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene*. 21:5951-5955
- Bianchi L., Canton C., Bini L., Orlandi R., Menard S., Armini A., Cattaneo M., Pallini V., Bernardi LR.,Biunno I.,(2005).Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction. *Proteomics*., 5,2433-42.



- Brasma A, Vilo J, (2000) Gene expression data analysis. *FEBS Lett.*, **480**(1), 17-24
- Bruey J.M., Paul C., Fromentin A., Hilpert S., Arrigo AP., Solary E, Garrido C., (2000) Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo *Oncogene.*, **19**, **42**, 4855-63
- Bjellqvist B., Pasquali C., Ravier F., Sanchez JC., Hochstrasser DF., (1993). A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis.*, **14**, 1357-1365.
- Burke B., Lewis C., eds. *The Macrophage* (2002) Ch.1 The biology of the macrophage; p29, pp 49-57. Oxford University Press.
- Cantin A., Paquette B., Richter M., Larivée. (2000). Albumin-mediated Regulation of Cellular Glutathione and Nuclear Factor Kappa B Activation. *Am J Respir Crit Care Med* , **162**, 1539-1546.
- Cantin A., Paquette B., Richter M and Larivee P., (2000). Albumin-mediated Regulation of Cellular Glutathione and Nuclear Factor Kappa B Activation . *Am J Respir Crit Care Med.*, Vol **162**. pp 1539-1546.
- Cahill D. J., Nordhoff E., O'Brien J., Klose J., Eickhoff H., Lehrach H. (2001). Bridging genomics and proteomics. In: *Proteomics, from protein sequence to function.*, κεφ 1, 1-22.
- Chae HZ., Kim IH., Kim K., and Rhee SG., (1993). Clonic, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, **268**, 16815-16821.
- Chae HZ., Uhm TB., and Rhee SG., (1994) .Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc .Natl Acad Sci USA* ., **91**, 7022-7026.
- Chakravarti D.N., Gallagher S and Chakravarti B., (2004). Difference Gel Electrophoresis: application in quantitative proteomics research. *Current Proteomics.* **1**, 261-271.
- Charette SJ., Lavoie JN., Lambert H., Landry J. (2000) Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.*, **20**, **20**, 7602-12.
- Chin D., Means AR., (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.*, **10**, **8**, 322-8.
- Constantopoulos SH, Goudevenos J.A, Saratzis NA, Langer A.E., Selikof I.J., Moutsopoulos H.M. (1985) Metsovo Lung: pleural calcifications & restrictive lung



function in NW Greece; environmental exposure to mineral fiber as etiology. *Environmental Research* **38**(2), 319-331.

Constantopoulos SH, Saratzis NA, Kontogiannis D, Karantanas A, Goudevenos JA, Katsiotis P.,(1987/a). Tremolite whitewashing and pleural calcifications. *Chest.*, **92**,4,709-12.

Constantopoulos SH, Malamou-Mitsi V.D, Goudevenos J.A.,Papathanasiou M.P.,Pavlidis N.A.,Papadimitriou C.S.,(1987/b).High incidence of Malignant Pleural Mesothelioma in Neighbouring Villages of Northwestern Greece. *Respiration.*, **51**,266.

Constantopoulos SH, Dalavanga YA, Sakellariou K, Goudevenos JA, Kotoulas OB. (1992). Lymphocytic alveolitis and pleural calcifications in nonoccupational asbestos exposure. *Am Rev Respir Dis.* **146**:1565-1570

Crabtree GR., (2001) Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem.*,**276**,4,2313-6.

Craighead J.E., Mossman B.T(1982). The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *N Engl.J.Med* .,**306**,1446.

Craighead JE., Abraham JL., Churg A., Green FH., Kleinerman J., Pratt PC., Seemayer TA., Vallyathan V., Weill H.,(1982). The pathology of asbestos-associated diseases of the lungs and pleural cavities: diagnostic criteria and proposed grading schema. Report of the Pneumoconiosis Committee of the College of American Pathologists and the National Institute for Occupational Safety and Health. *Arch Pathol Lab Med.***106**,**11**,544-96.

Crawford E., Khuder S .,Durham S., Frampton M., Utell M., Thilly Weaver D., Ferencak W., Jennings C., Hammersey J., Olson D., Willey J.(2000).*Cancer Research.*, **60**,**15**,1609-1618.

Δαμιανός X.,(2002) Μεθοδολογία δειγματοληψίας Τεχνικές & Εφαρμογές. Εκδόσεις «Αίθρα» Σελίδα 209-210.

Dale G., Latner AL. (1969). Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. *Clin. Chim. Acta.* **24**,61-8.

Dorin JR., Novak M., Hill RE., Brock DJ., Secher DS., van Henyningen V.A.,(1987). Clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene.*Nature.*,**326**,614-7.



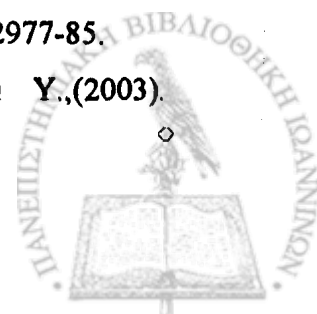
- Duncan MW., Harris R., Williams KL., Humphery-Smith I.,(1995). Progress with geneproductmapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. **16**,1090-4.
- Edman P., Begg G.,(1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**,80-91.
- Ezzell C. (2002). Proteins rule. *Sci Am*, **286**,4,40-7.
- Faber S., Cohen J., UzmanL.L. (1957) Lipogranulomatosis: a new lipo-glyco-protein "Storage" disease *J. Mt Sinai Hosp. N.Y.* **24**,816-837.
- Falini G., Foresti E., Lesci I., Lunelli B., Sabatino P., Roveri N.(2006) Interaction of Bovine Serum Albumin with Chrysotile:Spectroscopic and Morphological Studies.*Chem Eur J* ,**12**.1268-1974.
- Foekens, J.A., M.P. Look, J. Bolt-de Vries, M.E. Meijer-van Gelder, W.L.J. van Putten, and J.G.M. Klijn. 1999. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br. J. Cancer*. **79**,300–307.
- Foell D.,Frosch M.,Sörg C., Roth J.,(2004).Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammataion.*Clin Chimica Acta* ,**344**,37-51.
- Folini G., Foresti E., Lesci I., Lunelli B., Sabatino P and Roveri N., (2006). Interaction of Bovine Serum Albumin with Chrysotile: Spectoscopic and Morphological Studies. *Chemistry a European Journal Chem. Eur.*, **12**,1968-1974.
- Frosch M., Vogl T., Waldherr R., Sorg C.,Sunderkotter C.,Roth J.,(2004). Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis.*J Leukoc Biol*, **75**, 198-206.
- Galani V., Constantopoulos S.H., Manda-Stachouli C., Frangou-Lazaridis M., Mavridis A., Vassiliou M., Dalavanga Y. (2002) Additional proteins in bronchoalveolar lavage fluid of Metsovites environmentally exposed to asbestos. More evidence of "protection" against neoplasia. *Chest* **121**, 273-278.
- Garcia, M., D. Derocq, P. Pujol, and H. Rochefort. (1990). Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene*. **5**,1809–1814
- Gariboldi M., Peissel B., Fabbri A., Saran A., Zaffaroni D., Falvella F.S., Spinola M., Tanuma J., Pazzaglia S., Mancuso MT., Maurichi A., Bartoli C., Cataltepe S., Silverman GA., Pilotti S., Hayashizaki Y., Okazaki Y., Dragani TA.(2003). SCCA2-like serpins mediate genetic predisposition to skin tumors.*Cancer Res.*,**63**,8,1871-5.



- Garrido C., Ottavi P., Fromentin A., Hammann A., Arrigo AP., Chauffert B., Mehlen P., (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res.*, **57**,13,2661-7.
- Garrido C., Bruey JM., Fromentin A., Hammann A., Arrigo AP., Solary E.,(1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.*, **14**,2061-70.
- Gharahdaghi F., Weinberg CR., Meagher DA., Imai BS., Mische SM. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.*, **20**,601-605.
- Glondou, M., P. Coopman, V. Laurent-Matha, M. Garcia, H. Rochefort, and E. Liaudet-Coopman. 2001. A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene*. **20**,6920–6929.
- Goebeler M., Roth J., Burwinkel F., Vollmer E., Sörg C.,(1994).Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection. *Transplantation.*, **58**, 1875-83.
- Gooley A and Packer N., *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics* σελίδα 66-67 Hochstrasser (Eds).
- Görg A., Postel W., Günther S., (1988)The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* ,**9**,531-546.
- Halliwell B., (1988) Albumin an important extracellular antioxidant. *Biochemical Pharmacology.*, Vol 37, No 4 569-571 .
- Hanash S., (2004). Building a foundation for the human proteome: the role of the Human Proteome Organization. *J. Proteome Res.*, **3**,2,197-9.
- Hayes JD.,Pulford DJ., (1995). The glutathione S-Transferase superfamily:regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **30**,445-600.
- Hirsch A., (1975) Pulmonary immune cells in health and disease:Dentric cells and Langerhan's cells. *Eur.Respir.J.* **6**,1213-1220.
- Hirsch J. , Hansen K.C., Burlingame A. L., Matthayl M.A. (2004)Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, **287**, L1–L23.



- Hirvonen A., Saarikoski S., Linnainmaa K., Koskinen K., Husgafvel-Pursiainen K., Mattson K., Vainio H., Glutathione S-Transferase and N-Acetyltransferase Genotypes and Asbestos-Associated Pulmonary Disorders. *Journal of the National Cancer Institute*, 8,24,1853-1856.
- Hochstrasser DF., Harrington MG., Hochstrasser AC., Miller MJ., Merrill CR. (1988a) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173,424-435.
- Hochstrasser DF., Patchornik A., Merrill CR., (1988b) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silverstaining. *Anal. Biochem.*, 173,412-23.
- Hofman JR., Drury S., Fu C., Qu W., Taguchi A., Lu Y., (1999). Rage mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97, 889-901.
- Huang Y., Tanimukai H., Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong CX. (2004). Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Eur J Neurosci.*, 12,3489-97.
- Jones D.T., Gabeshaguru K., Anderson R.J., Jackson T.R., Bruckdorfer K.R., Low S.Y., Palmqvist L., Prentice H.G., Hoffbrand A.V., Mehta A.B., Wickremasinghe R.G., (2003) Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil –and radiation-induced apoptosis, *Blood.*, 101,3174-80.
- Kamp D.W. et al. (1992) The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 293-315.
- Kang SW., Chae HZ., Seo MS., Kim K., Baines IC., and Rhee SG., (1998) . Mammalian peroxiredoxins isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- alpha. *J Biol Chem* 273,6297-6302.
- Kane A.B. Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis (1996) pp.11-34 IARC Scientific Publ. No. 140. Lyon, France.
- Kanitz MH., Witzmann FA., Zhu H., Fultz CD., Skaggs S., Moorman WJ., Savage RE Jr., (1999) Alterations in rabbit kidney protein expression following lead exposure as analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.*, 20,2977-85.
- Karihtala P., Mantyniemi A., Kang SW., Kinnula VL., Soini Y., (2003). Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 9,9,3418-24.



- Ketter B., Harris JM., Talaska G., Meyer D J., Pemble S E., Taylor J B., Lang NP and Kadlur F.,(1992). The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect.*, **98**,87-94.
- Klose J., (1975).Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.*,**26**,231-43.
- Knowles M. R., Cervino S., Skynner H. P., Hunt S. P., de Felipe C., Salim K., Meneses-Lorente G., McAllister G., Guest P.C., (2003). Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics.*, **3**, 1162-1171.
- Kwang-J and Aspar M.(2003) Protein transport across the lung epithelial barrier.*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, **284**,247-259.
- Kolesnick RN, Kronke M(1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol.*, **60**,643-65.
- Kolesnick R(2002).The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway.*J Clin Invest.*,110,1,3-8.
- Kragh-Hansen U.,Chuagh V.T.,Otagini M.(2002) Practical aspects and enzymatic properties of human serum albumin.*Biol.Pharm.Bull.*,**25**,695-704.
- Laemmli UK ,(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* ,**227**,680-685.
- Langer AM, Nolan RP, Constantopoulos SH, Moutsopoulos HM. (1987) Association of Metsovo lung and pleural mesothelioma with exposure to tremolite-containing white wash. *Lancet*,**1**,965-7.
- Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prebois C. et al (2005) Catalytically inactive cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J.Cell Biol.* 168(3): 489-499
- Lenz A., Meyer B., Costabel U., Maier K. (1993). Bronchoalveolar lavage fluid proteins in human lung disease: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* ,**14**, 242.
- Lenz AG., Costabel U., Maier KL., (1996). Oxizide BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J.*, **9** ,2,307-312.
- Lenz A., Meyer B., Weber H.,Maier K., (1990) .Electrophoresis., **11**,510.
- Lenz A. , Meyer B.,Constabel U., Maier K.,(1993).Bronchoalveolar lavage fluid proteins in human lung disease :Analysis by two-dimentional electrophoresis. *Electrophoresis* ,**14** ,242-244.



- Li CM., Park JH., Simonaro CM., He X., Gordon RE., Friedman AH., Ehleiter D., Paris F., Manova K., Hepbildikler S., Fuks Z., Sandhoff K., Kolesnick R., Schuchman EH.,(2002). Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics* .,79,2,218-24.
- Lindahl M., Ekström T., Sörensen., Tagesson C.,(1996).Two dimensional protein patterns of bronchoalveolar lavage fluid from non-smokers, smokers, and subjects exposed to asbestos. *Thorax* .,51,1028-1035.
- Liaudet, E., D. Derocq, H. Rochefort, and M. Garcia. 1995. Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. *Cell Growth Differ.* 6,1045–1052.
- Liaudet, E., M. Garcia, and H. Rochefort. 1994. Cathepsin D maturation and its stimulatory effect on metastasis are prevented by addition of KDEL retention signal. *Oncogene*. 9,1145–1154.
- Lefort A., Passage E., Libert F., Szpizer J., Vassart G., and Mattei MG(1990).Localization of human caldesmon gene(CAPS) to the p13.3 region of chromosome 19 in situ hybridization. *Cytogenet . Cell.Genet.*,54, 154-155.
- London S., (1996) Polymorphism of glutathione S-transferase m1 and lung cancer risk among African-Americans and caucasians in Los Angeles country , California . J . *Natl.Cancer Ins(Bethesda)*., 87,1246-1253.
- Lund LG and Aust AE. (1991) Mobilisation of iron from crocidolite asbestos by certain chelators result in enhanced crocidolite-dependent oxygen consumption. *Arch.Biochem.Biophys.*,287,91-96
- Macko V., Stegemann H,(1969). Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* ,350,917-9.
- Mahon P., Dupree P.,(2001). Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis*., 22,207-2085.
- Magi B., Bini L., Perari M.G., Fossi A., Sanchez J.C., Hochstrasser D., Paesano S., Raggiaschi R., Santucci A., Pallini V., Rottoli P. (2002). Bronchoalveolar lavage fluid protein composition in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a two-dimensional electrophoretic study. *Electrophoresis*. 23 ,19,3434-3444.



- Magi B., Bini L., Marzocchi B., Liberatori S., Raggiaschi R., Pallini V. (1999). Immunoaffinity identification of 2DE separated proteins. In *Methods in Molecular Biology* (Ed. A. J. Link), **112**,431-443.
- Martini OH, Gould HJ,(1971). Enumeration of rabbit reticulocyte ribosomal proteins. *J. Mol. Biol.*,**62**,403-5.
- Marx G and Mordechai., (1985)Site –specific modification of albumin by free radicals *Chevon Biochem J.*, **236**, 397-400).
- Manevich Y., Feinstein SI and Fisher AB (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin require glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc Natl Acad Sci USA .*,**101**,3780-3785.
- Mannervick B., Awasti YC., Board PG., Hayes JD., Di Ilio C., Ketterer B., Listowski I., Morgenstern R., Pearson W. R., Pickett C.B, Sato K.,Widenstern R and Wolf CR(1992).Nomenclature for human glytathione transferases *Biochem J.*,**282**, 305-308.
- Mehlen P., Kretz-Remy C., Preville X., Arrigo A.P. (1996) Human hsp27, *Drosophila hsp27* and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.*EMBO J.*,**15**,**11**,2695-706.
- Nemoto Y. et al, (1993), R2D5 antigen: A calcium-binding phosphoprotein predominantly expressed in olfactory receptor neurons. *J.Biol.Chem.* **123**: 963-976.
- Neverova I., Van Eyk J.E. (2005). Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* ,**815**,**1-2**,51-63.
- Nowak R.,(1995). Bacterial genome sequence bagged. *Science .*,**269**,468-470
- Noël-Georis I., Bernard A., Falmage P., Wattiez R.(2002).Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins. *Journal of Chromatography B.*,**771**,221-236
- Ostergaard M., Wolf H., Orntoft T.F., Celis J.E.(1999). Psoriasin (S100A7): a putativeurinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis.*, **20**,349-54.
- Oakley BR., Kirsch DR., Morris NR. (1980).A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.*,**105**,361-363.
- Oakley BR., Kirsch DR., Morris NR., (1980).A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.*, **105**,361-363.



- Ostergaard M., Wolf H., Orntoft TF., Celis JE.,(1999). Psoriasin (S100A7): a putative urinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis.*, **20**,349-54.
- Odic K., Cerletti N., Bruggen J., Clerc RG., Tarcsay L.,Zwadlo G ., et al(1987). Two calcium proteins in filtrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.*, **330**, 80-2.
- Padmanabhan B.,Kuzuhara T.,Adachi N.,(2004) The Crystal Structure of CCG1/TAF_{II} 250-interacting Factor B(CIB). *The Journal Of Biological Chemistry.*,**279**,10,9615-9624.
- Park J.H., Schuchman E.H., (2006). Acid ceramidase and human disease. *Biochim Biophys Acta.* **1758**,12,2133-8.
- Payne S.G., Brindley D.N., Guilbert L.J., (1999) Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts.*J Cell Physiol.*,**180**,2,263-70.
- Peters ,T.,Jr(1996) All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications .,Academic Press, Inc.,Orlando, FL.
- Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A., (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives.*Biochim Biophys Acta.*,**1585**,2-3,114-25.
- Qi Y., Chiu JF., Wang L., Kwong DL., He QY., (2005) Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics.*, **5**,11,2960-71.
- Righetti P.G .,Campostrini N., Pascali J., Hamdan M., Aster H.,(2004). Quantitative proteomics: a review of different methodologies. *Eur. J. Mass Spectrom.*,**10**,335-38.
- Rocheftort, H. (1992). Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur. J. Cancer.* **28A**,1780–1783.
- Rocheftort, H., F. Capony, M. Garcia, V. Cavallès, G. Freiss, M. Chambon, M. Morisset, and F. Vignon. (1987). Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis *J. Cell. Biochem.* **35**,17–29.
- Sabounchi-Schutt F.,Astrom J.,Eklund A., Grunewald J., Bjellqvist B., (2001). *Electrophoresis.*, **22** ,1851
- Sakata Y,Arima K, Takeshita K, Takai T, Aoki S,Ogava H, Sugihara H, Fujimoto K,Izuhara K(2004).Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **324**,1340-1345.



- Sakamoto H., Mashima T., Yamamoto K., Tsuruo T., (2002). Modulation of Heat-shock Protein 27(Hsp27) Anti-apoptotic Activity by Methylglyoxal Modification. *The Journal of Biological Chemistry* .,277,48,29,45770-45775.
- Sakellariou K., V. Malamou-Mitsi, A. Haritou, Ch. Koumpaniou, C.Stachouli, I.D. Dimoliatis, S.H.Constantopoulos. (1996) Malignant pleural mesothelioma from non-occupational asbestos exposure in Metsovo (North West Greece); slow end of an epidemic.,*European Respiratory Journal*. 9, 1206-1210.
- Salisbury J.L., Baron A.T, Sanders M.A., (1988) The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *J Cell Biol.*,107,2,635-41.
- Sander J., Fagerhol MK., Bakken JS., Dale I.,(1984). Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology , number of leucocytes in blood , blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest.*, 44,357-62.
- Σαραντζής Ν., Μελέτη των υπεζωκοτικών αποτιτανώσεων της περιοχής του Μετσόβου. Διδακτορική διατριβή (1988) σελ.82-85. Παθολογικός τομέας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Shaw J., Rowlinson R., Nickson J., Stone T., Sweet A., Williams K., Tonge R., (2003). Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* .,3, 1181-1195.
- Scheele GA.,(1975)Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Charaterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.*,250,5375-85.
- Smithies O., Poulik MD., (1956). Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature* .,177,1033.
- Scheele GA.,(1975).Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Charaterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.*,250,5375-85.
- Swinbanks D.,(1995). Government backs proteome proposal. *Nature*.,378,653.
- Schick C. Kamachi A.J. Bartuski S. Cataltepe N.M.,Schechter P.A.,Pemberton G.A., (1997). Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin- like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol.Chem.*, 272,1849-1855.



- Schick C., Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*. 37,15,5258-66.
- Schmidt M., Brugger E., Heinrich J. (1987). Proteolytic activities in bronchoalveolar lavage fluid of interstitial lung diseases: correlation to stage and prognosis. *Respiration*, 52, 2, 115-121.
- Selikoff I.J., Hammond E.C., Churg J. (1968). Asbestos exposure, smoking and neoplasia. *JAMA*, 204, 106.
- Selikoff I.J., Bader R.A., Bader ME., Churg J., Hammond E.C., (1967). Asbestosis and neoplasia Editorial *Am.j*.
- Semenzato G., Cipriani A., Marcer G. (1989) in: Romagnani S., Moretta L. *Immunologia e immunopatologia*. USES ed scientifica Fi., 580-602.
- Shapland C., Hsuan J.J., Totty NF., Lawson D., (1993). Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol.*, 121, 5, 1065-73.
- Shevchenko A., Jensen ON., Podtelejnikov AV., Sagliocco F., Wilm M, Vorm O., Mortensen P., Shevchenko A., Boucherie H., Mann M (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4440-5.
- Smithies O, Poulik MD. (1956) Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature*, 177, 1033.
- Sinha P., Poland J., Schnolzer M., Rabilloud T., (2001). A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 1, 835-840.
- Soskic V., Gorlach M., Poznanovic S., Boehmer FD., Godovac-Zimmermann J., (1999). Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Biochemistry*, 38, 1757-64.
- Soderling TR., Chang B., Brickey D., (2001). Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.*, 276, 6, 3719-22.



- Srikrishna G., Panneerselvam K., Westphal V., Abraham V., Varki A., Freeze HH., (2001). Two calcium-proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J Immunol* ., **166**, 4678-901.
- Steiner S., Anderson NL., (2000) Pharmaceutical proteomics. *Ann N Y Acad Sci.*, **919**, 48-51.
- Strelow A., Bernardo K., Adam-Klages S., Linke T., Sandhoff K., Kronke M., Adam D. (2000) Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J Exp Med.*, **192**, 5, 01-12.
- Styer L, *Biochemistry*, (1988) 3rd edition. Freeman W.H and Company New York
- Stücker I., Boffeta P., Antilla S., Benhamou S., Hirvonen A., London S., Taioli E. (2001) Lack of Interaction between Asbestos Exposure and Glutathione S-Transferase M1 and T1 Genotypes in Lung Carcinogenesis. *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention.*, **10**, 1253-1258.
- Sugita M., Dulaney J.T., Moser H.W. (1972) Ceramidase deficiency in Faber's disease (lipogranulomatosis). *Science* **178**, 1100-1102.
- Taillon BE., Adler SA., Suhan JP., Jarvik JW., (1992).
Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol.*, **119**, 6, 1613-24.
- To-Figueras J., Gené, Gómez-Catalán., J, Piqué, Borrigo N., (1999) Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene and lung cancer risk. *Cancer Causes and Control* ., **10**, 65-70.
- Tonge R., Shaw J., Middleton B., Rowlinson R., Rayner S., Young J., Pognan F., Hawkins E., Currie I., Davison M., (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics.*, **1**, 377-396.
- Ünlü M., Morgan ME., Minden J. S., (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.*, **8**, **11**, 2071-2077.



- Van den Bergh G., and Arckens L., (2004). Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Current Opinion in Biotechnology* ,**15**, 38-43.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW.,(2001).The sequence of the human genome.*Science*.,**291**,5507,1304-51.
- Vignon, F., F. Capony, M. Chambon, G. Freiss, M. Garcia, and H. Rochefort. 1986. Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology*. **118**,1537–1545.
- Wagner J.C.,Sleggs C.A., Marchand P.,(1960).Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in MW CAPE province.*Brit J.Indust Med.*,**17**,260.
- Wagner J.C., Chamberlain M., Brown R.C. et al. Biological effects of tremolite. (1982) *Br.J Cancer* **45**,352-360.
- Wang S.,Chen J.,Zhang Z.,Huang Q., Gu S.,Ying K.,Mao Y.,(2002).Cloning Characterization and Expression of Calcyphosine 2, a Novel Human Gene Encoding an EF-Hand Ca²⁺- Binding Protein.*Biochemical and Biophysical Research Communications*., **291**,414-420.
- Watanabe H.,Tanase, S.,Nakajou K.,Maruyama T.,Kragh-Hansen .,Otagini, M.(2000) Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.*,**349**,813-9.
- Wattiez R., Hermans C., Bernard A., Lesur O., Falmagne P.,(1999). Human bronchoalveolar lavage fluid: two-dimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins. . *Electrophoresis*., **20**,7,1634-1645.
- Wattiez R., Hermans C., Cruyt C., Bernard A., Falmagne P.(2000). Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis*,**21**, 2703–2712.
- Wattiez R., Falmagne P. (2005). Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*,**815**,1-2,169-78.
- Westley, B.R., and F.E.D. May. 1999. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br. J. Cancer*. **79**,189–190.
- Williams K.L., Hochstrasser D.F. (1997) in: Wilkins M.R., Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D.F. (Eds.). *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin, 1-12.



- Yates JR 3rd (1998),. Database searching using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. ,19,893-900.
- Yuyama N.,Davies DE.,Akaiwa M.,Matsui K.,Hamasaki Y.,Suminami Y.,Yoshida NL.,Maeda M.,Pandit A.,Lordan JL.,Kamogawa Y.,Arima K.,Nagumo F.,Sugimachi M.,Berger A.,Richards I.,Roberds SL.,Yamashita T.,Kishi F.,Kato H.,Arai K.,Ohshima K.,Tadano J.,Hamasaki N.,Miyatake S.,Sugita Y.,Holgate ST.,Izuhara K.,(2002). Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine*.,19, 6,287-96.
- Zoellner H.,Hofler M.,Beckman R.,Hufnagl P.,Vanyek E.,Bielek E.,Wojta J.,Fabry A.,Lockie S.,Binder B.R(1996) Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *J.Cell.Sci.*,109,2571-80.
- Zwadlo G., Bruggen J., Gerhards G.,Schlegel R., Sorg C.,(1988).Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol*, 72,510-5.



6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΜΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΜΙΑΝΤΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ
ΑΡΧΙΜΑΝΔΡΙΤΗ ΔΗΜΗΤΡΑΣ

Είναι γνωστό ότι η έκθεση στον αμιάντο προκαλεί πνευμονική ίνωση, κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα και υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις. Οι μελέτες αναφέρονται κυρίως στην επαγγελματική έκθεση στον αμιάντο, δηλαδή σε πληθυσμούς που έχουν εκτεθεί σε αμιάντο λόγω της εργασίας τους κατά την εξόρυξη και την επεξεργασία του.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε πληθυσμός στην περιοχή του Μετσόβου, που έχει εκτεθεί σε αμιάντο όχι επαγγελματικά, αλλά επειδή χρησιμοποιούσε αμιαντούχο υλικό για οικιακή χρήση.

Τα άτομα αυτά έχει δείχθει από προηγούμενες εργασίες της ομάδας μελέτης του «πνεύμονα Μετσόβου», της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ότι αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην εισπνοή ινών αμιάντου. Σε ποσοστό 40% ο πληθυσμός αυτός εμφανίζει στην απλή ακτινογραφία θώρακος αποτιτανώσεις του υπεζωκότα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Τα υπόλοιπα μέλη του πληθυσμού δεν εμφανίζουν καμία παρέκκλιση από τις φυσιολογικές εικόνες.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η περαιτέρω διερεύνηση του διαφορετικού αυτού τρόπου αντίδρασης του πνεύμονα στην εισπνοή ινών αμιάντου.

Η προσπάθεια αυτή πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ατόμων από την περιοχή του Μετσόβου.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης αλλά και άλλες μεθόδους της πρωτεομικής και είχε ως αποτέλεσμα την διαπίστωση κάποιων ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών. Οι διαφορές αυτές πιστοποιήθηκαν με



φασματογραφία μάζας και οι πρωτεϊνικές κηλίδες που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν συγκρινόμενες με τις πρωτεΐνες της βάσης δεδομένων που είναι διαθέσιμη στο διαδίκτυο και σχηματίζουν τον χάρτη του BAL.

Στο πνευμονικό παρέγχυμα των Μετσοβιτών δεν παρατηρούνται παρεγχυματικές φλεγμονώδεις αλλοιώσεις ούτε στην απλή α/α θώρακος ούτε στην βιοψία ιστού, ενώ η αναπνευστική τους λειτουργία βρίσκεται εντός φυσιολογικών ορίων ανεξαρτησίας παρουσίας ή μη υπεζωκοτικών αλλοιώσεων. Φαίνεται ότι οι αμυντικοί αντιφλεγμονώδεις μηχανισμοί επαρκούν για τον έλεγχο της ιστικής βλάβης από τις ίνες αμιάντου τουλάχιστον σε πρώτο επίπεδο και κυρίως για την ομάδα των ατόμων με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις. Εδώ η μόνη ένδειξη ενεργού φλεγμονής μέχρι τώρα ήταν η ύπαρξη αυξημένου ποσοστού λεμφοκυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό τους έκπλυμα.

Η πρώτη προσπάθεια ανάλυσης των πρωτεϊνών του εκπλύματος ξεκίνησε αρχικά με απλή ηλεκτροφόρηση, SDS-PAGE. Η προσπάθεια συνεχίστηκε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων με τη χρήση αμφολυτών, στην οποία όμως η διακριτική ικανότητα ήταν περιορισμένη αποτυπώνοντας μικρό αριθμό πρωτεϊνών. Τα ευρήματα πάντως, υπεδείκνυαν μικρές, μη ειδικές διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση των δύο ομάδων. Για τους λόγους αυτούς έγινε λεπτομερέστερη ανάλυση των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος των ατόμων αυτών.

Η συνεργασία με το εξειδικευμένο εργαστήριο πρωτεομικής του πανεπιστημίου της Σιέννα προσέφερε μεγάλη τεχνική υποστήριξη με την εξαιρετικά προηγμένη τεχνολογία και τεχνογνωσία του.

Η πρωτεομική ανάλυση των πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος επιβεβαιώνει την ύπαρξη φλεγμονής στον πνεύμονα όλων των εκτεθέντων στο αμιαντούχο υλικό, ασχέτως υπεζωκοτικών αλλοιώσεων ή κυψελιδίτιδας, που εξ άλλου δεν παρατηρούνται σε όλα τα άτομα. Πρωτεΐνες ενδεικτικές φλεγμονωδών διεργασιών ανιχνεύονται σε όλους τους Μετσοβίτες και των δύο ομάδων.

Επι πλέον, η ομάδα με τις λιγότερες ενδείξεις ενεργοποίησης (χωρίς αποτιτανώσεις και κυψελιδίτιδα), εμφανίζει αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Η αύξηση της κεραμιδάσης εμποδίζει την απόπτωση συνεπώς ευοδώνει την παράταση ζωής των κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνοντας τις πιθανότητες κυττάρων με μεταλλάξεις λόγω δράσεως του αμιάντου, να παραμείνουν και να πολλαπλασιασθούν.



Με την μελέτη αυτή, φαίνεται πλέον καθαρά ότι, σε όλους τους εκτεθέντες σε αμίαντο ανιχνεύονται πρωτεΐνες που υποδεικνύουν την ύπαρξη χρόνιας, ήπιας, ενεργού φλεγμονής.

Στα άτομα χωρίς αποπιτανώσεις του υπεζωκότα (και χωρίς κυψελιδίτιδα), η μελέτη αυτή υποδεικνύει έναν διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης των ινών του αμιάντου, ο οποίος αν και "φαίνεται" πιο αποτελεσματικός (δεν ανιχνεύονται αντιδράσεις ούτε από τον υπεζωκότα ούτε από τις κυψελίδες), ίσως ενεργοποιεί μηχανισμούς που καθιστούν τα άτομα αυτά πιο ευαίσθητα στην ανάπτυξη νεοπλασιών.



7. SUMMARY

ANALYSIS OF PROTEINS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID OF METSOVITES ENVIROMENTALLY EXPOSED TO TREMOLITE ASBESTOS

**DOCTORATE THESIS BY
ARCHIMANDRITI DIMITRA**

We have previously reported that inhabitants of Metsovo, NW Greece (population 5000), have been exposed to tremolite asbestos from a tremolite containing whitewash. As a result they had manifested a very high incidence of malignant pleural mesothelioma (MPM), and very frequent pleural calcifications (PCs). Interestingly, those with PCs are less prone to develop MPM. They also had lymphocytic alveolitis (BAL lymphocytes >10%), and some differences in the BAL fluid protein profile, compared with those without PCs.

In the present study we analyzed the BAL protein profile of these two groups of Metsovites (with and without PCs) in order to further investigate the differences between them, which might reflect different ways of reaction to the fibre, and different susceptibility to mesothelioma.

We performed proteomic analysis combining 2-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry, in order to define the quantitative and quanlitative differences



between the two groups of Mesotheliomas (with and without pleural calcifications) and between Mesotheliomas and normal individuals.

Image analysis of 2-DE protein profiles revealed the presence of quantitative and qualitative variations. Some of these proteins have been identified by mass spectrometry.

The study revealed variations in the protein expression between Mesotheliomas and controls and between the two groups of Mesotheliomas, those with and those without pleural calcifications.

a) The proteome analysis of the BAL fluid of individuals non occupationally exposed to asbestos, revealed increased (compared to controls) expression of several proteins indicative of an ever going inflammation in the lung parenchyma (albumin, serpins, Heat Shock proteins, stress proteins). Proteome analysis proved that asbestos fibres as long as they are present, (and that is forever), trigger the tissue to react, resulting in an subclinical, ongoing inflammation.

b) The proteome analysis strengthened also the hypothesis of two different types of reaction to the asbestos fibre, revealing a different protein profile in the individuals who lack any evidence of activation (no alveolitis, no calcifications). The overexpressed proteins in that group (glutathione-S Transferase, acid ceramidase, calphosin, actin cytoplasmatic), are related more profoundly to regulatory mechanisms of the cell cycle, cell differentiation and survival, but also with detoxification of agents involved in carcinogenesis. And that is in accordance with the fact that most of the mesothelioma cases belong to that “quiet” group.



... (the) ... and ...

... (the) ... and ...

... (the) ... and ...

... (the) ... and ...

... (the) ... and ...

... (the) ... and ...

