

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή επιστημών υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική εργασία

*Η προστατευτική δράση της μελατονίνης  
στα μιτοχόνδρια κατά τη σήψη*

**Τρακάλα Μαριάννα**

Λάρισα, 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4640/1

Ημερ. Εισ.: 3-11-2005

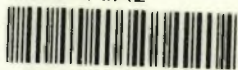
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2005

ΤΡΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087866

*Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου Φυσιολογίας του τμήματος ιατρικής του πανεπιστημίου της Γρανάδας για το πνεύμα συνεργασίας και ενδιαφέροντος που έδειξαν. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Marcos Ruiz Lozano για τη σημαντική του βοήθεια στη διεξαγωγή των πειραμάτων, τον Angel Carazo και Pepita –Josefa Leon για τη βοήθεια στη σχεδίαση των πειραμάτων, καθώς επίσης τον Luis Carlos Garcia Lopez και την Ana-Belen Hitos prados. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το διευθύνοντα του εργαστηρίου Dario Acuna-Castroviejo που δέχτηκε να κάνω τη διπλωματική εργασία μου στο εργαστήριο του. Θεωρώ πολύ σημαντική τη βοήθεια από τον καθηγητή μου, Ματθιόπουλο Κώστα και την Ευδοξία Κακάνη για τη συμπαράσταση τους καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου καθώς για τη βοήθεια και τη καθοδήγηση για τη συγγραφή της πτυχιακής.

# *Περιεχόμενα*

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	<u>8</u>
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	<u>10</u>
<u>1.- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ</u>	<u>11</u>
1.1.-ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ.	11
1.2.- Η ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΚΑΙ Η ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ	11
1.3.- ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ	16
<u>2.- ΣΗΨΗ (SEPSIS)</u>	<u>19</u>
2.1.- ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	19
2.2.- Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗΝ ΜΟΛΥΝΣΗ	21
2.2.1.- ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ:	21
2.2.2.-ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΗΣ:	22
2.3.- ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗ ΣΗΨΗ	24
2.3.1.-iNOS, NO. ΚΑΙ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΗΨΗ:	24
2.3.2ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ:	25
<u>3.- ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ</u>	<u>27</u>
3.1.- ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗΣ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ	27
3.2.-Η ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗΣ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.	29
3.2.1.- ΆΜΕΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ:	29
3.2.3.-ΈΜΜΕΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ:	29
3.2.4-ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ:	30
3.3.-ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΗΨΗΣ	30
<u>4.- ΣΤΟΧΟΙ</u>	<u>31</u>
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	<u>32</u>

<u>1.-ΖΩΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ</u>	<u>33</u>
1.1.- ΖΩΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	33
1.2.- ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	33
<u>2.-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ</u>	<u>33</u>
<u>3.-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (BN-PAGE)</u>	<u>34</u>
3.1.-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	34
3.2.-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	35
3.3.-ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ COOMASIE BLUE R	35
<u>4.ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)</u>	<u>35</u>
4.1.-ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	36
4.2.-ΗΛΕΚΤΡΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (ELECTROBLOTTING)	36
4.3.-ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ (IMMUNODETECTION)	36
<u>5. ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ- ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΧΡΩΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (HISTOCHEMICAL STAINING)</u>	<u>37</u>
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	<u>39</u>

<u>1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (BN-PAGE)</u>	<u>40</u>
---	-----------

<u>2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ</u>	<u>40</u>
--	-----------

<u>3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ</u>	<u>42</u>
--	-----------

<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	<u>44</u>
-----------------	-----------

<u>1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗΣ ΣΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΗΨΗ</u>	<u>45</u>
--	-----------

1.1.- ΣΥΜΠΛΟΚΟ I ΚΑΙ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ	45
---------------------------------	----

1.2.- ΣΥΜΠΛΟΚΟ II ΚΑΙ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ	46
----------------------------------	----

1.3.- ΣΥΜΠΛΟΚΟ III ΚΑΙ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ	46
-----------------------------------	----

1.4.- ΣΥΜΠΛΟΚΟ IV ΚΑΙ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ	46
----------------------------------	----

1.5.- ΣΥΜΠΛΟΚΟ V ΚΑΙ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ	47
---------------------------------	----

<u>1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	<u>50</u>
------------------------	-----------



# *Περίληψη*

Η σήψη είναι από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου νοσηλευόμενων ασθενών παγκόσμια, αφού συχνά προκαλεί τον θάνατο του 30 έως 70% των σοβαρά προσβεβλημένων ασθενών παρά τις νέες εξελιγμένες θεραπείες και τα ισχυρά αντιβιοτικά. Ως σήψη χαρακτηρίζεται η κατάσταση του οργανισμού κατά την ανεξέλεγκτη ανοσολογική απόκριση αυτού σε σοβαρή μικροβιακή μόλυνση. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της σήψης είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η πρόκληση οξειδωτικού στρες. Αυτό οδηγεί τελικά στην αναστολή των ενζυμικών συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και σε βιοενεργητική πτώση με αποτέλεσμα τη γενικότερη δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου και του κυττάρου, που μπορεί να καταλήξει ακόμη και σε βλάβη οργάνων.

Μέχρι τώρα πολλές μελέτες έχουν υποστηρίξει το ρόλο της μελατονίνης στην διατήρηση της ομοιοστασίας του μιτοχονδρίου. Η μελατονίνη ή Ν-ακέτυλομεθόξυτρυπταμίνη είναι μία ινδολαμίνη που συντίθεται κυρίως στον αδένα της επίφυσης αλλά και σε διάφορους άλλους ιστούς από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Είναι γνωστή για την εμπλοκή της στη φυσιολογία των κερκάρδιων κύκλων

Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η μελατονίνη μπορεί να αναστείλει σημαντικά το οξειδωτικό στρες στην καρδιά και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια μέσω επαγωγής των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της αποτύπωσης κατά Western και της ενζυμικής χρωμομετρικής αντίδρασης στα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας στην καρδιά ποντικών κατά τη σήψη.

# *Εισαγωγή*

## **1.- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

### **1.1.-Προέλευση και δομή.**

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια τα οποία ταυτοποιήθηκαν και απομονώθηκαν τη δεκαετία 1950-1960 και τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιάσει ειδικό ενδιαφέρον εξαιτίας της εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια καθώς και της εμπλοκής τους στην απόπτωση, το λεγόμενο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Scheffler, 2001).

Από την ανακάλυψη των μιτοχονδρίων έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις για την προέλευσή τους, ωστόσο η πιο αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα είναι αυτή της ενδοσυμβίωσης (Margulis, 1981). Η θεωρία εξηγεί ότι ένα αρχέγονο αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο, χωρίς μιτοχόνδρια, εξελίχθηκε τυχαία και ευνοήθηκε όταν η ατμόσφαιρα εμπλουτίστηκε σε οξυγόνο καθώς δημιούργησε μια σχέση συμβίωσης με ένα πρωτεοβακτήριο που εγκλωβίστηκε στο εσωτερικό του κυττάρου με μηχανισμό ενδοκύτωσης. Η συμβιωτική σχέση σταθεροποιήθηκε με την εξάλειψη επαναλαμβανόμενων γονιδίων και την μεταφορά γονιδίων από το βακτήριο στο πυρήνα του κυττάρου.

Τα μιτοχόνδρια έχουν σχήμα ωοειδές με τυπικές διαστάσεις 2 μm σε μήκος και 0,5 μm σε διάμετρο. Επίσης έχουν δυο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μία εσωτερική. Η εσωτερική αναδιπλώνεται σε μία σειρά εσωτερικών ραχών και τελικά δημιουργούνται οι πτυχώσεις. Έτσι, οι δυο μεμβράνες ορίζουν δυο διαμερίσματα: τον διαμεμβρανικό χώρο μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και την μήτρα, ο χώρος ο οποίος περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή σε όλα τα μικρά μόρια και ιόντα, γιατί περιέχει πολλά μόρια πορίνης, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης με μεγάλους πόρους. Σε αντίθεση, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπεραστή σε όλα τα ιόντα και τα πολικά μόρια και για αυτό υπάρχουν ειδικοί μεταφορείς πρωτεϊνικής φύσης για να μεταφέρουν το ADP και τα λιπαρά οξέα με μακριά αλυσίδα, μία πολύ σημαντική λειτουργία αφού η οξείδωση των λιπαρών οξέων και οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος λαμβάνουν χώρα στη μήτρα. Μια άλλη από τις σημαντικότερες λειτουργίες που επιτελούν τα μιτοχόνδρια είναι η αναπνοή των κυττάρων καθώς περιέχουν το αναπνευστικό συγκρότημα με την οξειδωτική φωσφορυλίωση να λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη.

### **1.2.- Η αναπνευστική αλυσίδα και η οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Σε αερόβιες συνθήκες η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι υπεύθυνη για το 90-95% της παραγωγής του ATP από το κύτταρο (Skulachev, 1999). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της

μεταφοράς ηλεκτρονίων (οξειδωση) από τα NADH και FADH<sub>2</sub> στο μοριακό οξυγόνο με τη βοήθεια των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα NADH και FADH<sub>2</sub>, ενώσεις που παράγονται κατά τις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs, είναι δυο πολύ έντονα αναγωγικές ουσίες γιατί το κάθε ένα περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με πολύ υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας περιέχουν διάφορους φορείς ηλεκτρονίων, όπως τα κυτοχρώματα και η σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων με αυτούς τους φορείς προς το μοριακό οξυγόνο, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα. Μία πρωτονιοκινητική δύναμη δημιουργείται από τη βαθμίδωση του pH και του διαμεμβρανικού ηλεκτρικού δυναμικού. Το ATP συντίθεται όταν τα πρωτόνια εισρέουν πίσω στη μιτοχονδριακή μήτρα μέσω ενός ενζυμικού συμπλόκου που αποτελεί και το 5<sup>ο</sup> στη σειρά των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων (complex V) της συνθάσης του ATP.

Η αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων αποτελείται από πέντε ενζυμικά σύμπλοκα και από δυο κινητούς φορείς ηλεκτρονίων την ουβικινόνη (συνένζυμο Q) και το κυτόχρωμα c (Saraste, 1999):

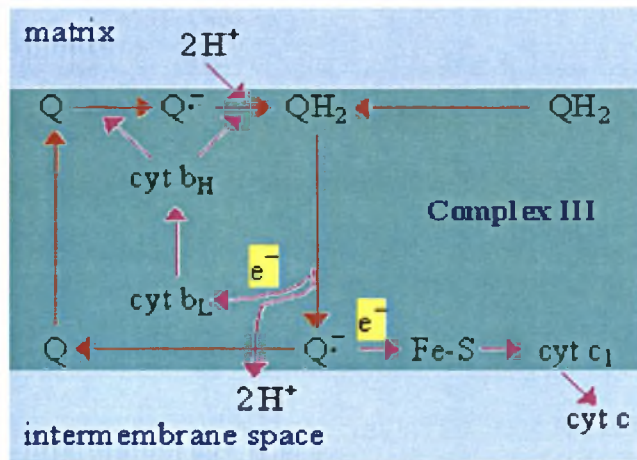
- **Ενζυμικό σύμπλοκο I** (NADH-αναγωγή του συνενζύμου Q ή αφυδρογονάση του NADH): μέσω αυτού εισέρχονται τα ηλεκτρόνια του NADH στην αναπνευστική αλυσίδα. Είναι το μεγαλύτερο σύμπλοκο ανάμεσα στα πέντε αφού το μέγεθός του υπολογίζεται περίπου σε 980 kDa. Στα θηλαστικά έχει βρεθεί ότι αποτελείται από 42 ή 43 υπομονάδες (25 πολυπεπτιδικές αλυσίδες από τις οποίες 7 κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό). Επίσης το σύμπλοκο I έχει ως προσθετική ομάδα το φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN), περιλαμβάνει 7 σύμπλοκα Fe-S που αλλιώς ονομάζονται και πρωτεΐνες με μη αιμικό σίδηρο. Ο ρόλος των συμπλόκων αυτών είναι να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ανηγμένο πλέον FMNH<sub>2</sub> στην ουβικινόνη η οποία θα αναχθεί τελικά σε ουβικινόλη (Walter, 1995; Saraste, 1999). Το σύμπλοκο I αποτελεί το πρώτο σημείο άντλησης πρωτονίων.
- **Ενζυμικό σύμπλοκο II** (Ηλεκτρικο-αναγωγή του συνενζύμου Q): Πρόκειται για μια πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου μέρος της οποίας αποτελεί και η ηλεκτρική αφυδρογονάση, ένα ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος το οποίο οξειδώνει το ηλεκτρικό σε φουμαρικό και παράγει ένα μόριο FADH<sub>2</sub>. Το FADH<sub>2</sub> μετά τον σχηματισμό του δεν εγκαταλείπει το σύμπλοκο, αλλά τα ηλεκτρόνια του μεταφέρονται στα σύμπλοκα Fe-S και μετά στην ουβικινόνη. Στο σύμπλοκο II δεν έχουμε άντληση πρωτονίων απλά τροφοδοτεί την αναπνευστική αλυσίδα με ηλεκτρόνια (Saraste, 1999). Το ενζυμικό σύμπλοκο II περιέχει τέσσερα

πολυπεπίδια, έχει μέγεθος περίπου 130 kDa και είναι το μόνο από τα σύμπλοκα που δεν περιέχει υπομονάδες που να κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό. Δομικά θα μπορούσε να χωριστεί σε δύο τμήματα: ένα ενδομεμβρανικό, που όπως αναφέραμε αποτελεί την ηλεκτρική αφυδρογονάση, και ένα μεμβρανικό που διατηρεί το σύμπλοκο αγκυροβολημένο στην μεμβράνη. Η ηλεκτρική αφυδρογονάση αποτελείται από δυο υπομονάδες: μία υπομονάδα φλαβοπρωτεΐνης 70 kDa, που περιλαμβάνει τις θέσεις σύνδεσης του ηλεκτρικού και το μόνιμα συνδεδεμένο FAD, και μία υπομονάδα 30 kDa που περιλαμβάνει τρία σύμπλοκα Fe-S. Το τμήμα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης ενώνεται με το ενδομεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης μέσω δυο πολυπεπτιδίων 13 και 15 kDa που περιέχουν μία ομάδα αίμης, το κυτόχρωμα b558. Αυτά τα δύο πολυπεπίδια είναι απαραίτητα για την σύνδεση με την ουβικινόνη (Ackreil et al. 1992; Saraste, 1999).

- **Ενζυμικό σύμπλοκο III** (Κυτοχρωμική αναγωγή ή ουβικίνιλο-αναγωγή του κυτοχρώματος c): έχει μέγεθος 250 kDa και αποτελείται από 11 πολυπεπίδια. Το ενεργό σύμπλοκο είναι διμερές και παρουσιάζει μοριακή μάζα 500 kDa. Ο ρόλος του είναι να μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ουβικινόλη στο κυτόχρωμα c και ταυτόχρονα να αντλεί πρωτόνια δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Η κυτοχρωμική αναγωγή περιέχει δυο τύπους κυτοχρωμάτων, το b και το c<sub>1</sub>, και μία πρωτεΐνη Fe-S. Η ουβικινόλη, σαν ένα λιποδιαλυτό μόριο που είναι, μπορεί να μετακινείται ελεύθερα στη μεμβράνη όπου και τελικά μεταφέρει ένα από τα δυο ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας στο σύμπλοκο Fe-S της αναγωγής. Αυτό το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται διαδοχικά στο κυτόχρωμα c<sub>1</sub> και το κυτόχρωμα c το οποίο και το απομακρύνει από το σύμπλοκο. Αυτή η μονοηλεκτρονική μεταφορά μετατρέπει την ουβικινόλη (QH<sub>2</sub>) σε ημικινόνη (QH<sup>•</sup>). Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητη η μεσολάβηση του δευτέρου κυτοχρώματος του συμπλόκου. Το κυτόχρωμα b έχει δύο ομάδες αίμης (b<sub>L</sub>-b<sub>H</sub>) οι οποίες είναι πανομοιότυπες αλλά έχουν διαφορετική χημική συγγένεια γιατί βρίσκονται σε διαφορετικό πολυπεπτιδικό περιβάλλον. Έτσι, η ημικινόνη μεταφέρει το ηλεκτρόνιο της στη b<sub>L</sub> η οποία ανάγει τη b<sub>H</sub> και αυτή με την σειρά της ανάγει την ημικινόνη σε ουβικινόλη που μπορεί ξανά πλέον να προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο. Αυτός ο μηχανισμός ανακύκλωσης που επιτρέπει σε ένα φορέα δύο ηλεκτρονίων (ουβικινόλη) να αλληλεπιδράσει με ένα φορέα ενός ηλεκτρονίου (Fe-S) είναι γνωστός με τον όρο



κύκλος του συνεχζύμου Q (Trumpower, 1990; Stryer Βιοχημεία I 3<sup>η</sup> έκδοση) (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Σχήμα του κύκλου του συνεχζύμου Q

- **Ενζυμικό σύμπλοκο IV** (Κυτοχρωμική οξειδάση ή COX): Καταλύει τη μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο μοριακό οξυγόνο. Το υπόστρωμα του συμπλόκου το κυτόχρωμα c είναι μία αιμοπρωτεΐνη διαλυτή στο νερό που προσφέρει ηλεκτρόνια στην κυταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (ο όρος κυταροπλασματικός χρησιμοποιείται γιατί η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή και επιτρέπει στους περισσότερους μεταβολίτες να περνούν μέσα από αυτήν, έτσι η μία πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης είναι προσιτή στα περισσότερα μόρια του κυτταροπλάσματος). Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο ενεργό κέντρο του συμπλόκου το οποίο έχει δύο ομάδες αίμης ( $\alpha$  και  $\alpha_3$ ) και δυο ιόντα χαλκού ( $\text{Cu}_A$  και  $\text{Cu}_B$ ) τα οποία χρησιμοποιούνται για να ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε δυο μόρια νερού, σε ένα κύκλο που περιλαμβάνει πολλά ενδιάμεσα στάδια (Saraste, 1999). Τα πρωτόνια που χρειάζονται για αυτήν την αντίδραση παρέχονται από την μιτοχονδριακή μήτρα. Έτσι, για κάθε ηλεκτρόνιο που διασχίζει την μεμβράνη ένα πρωτόνιο αντλείται προς τον διαμεμβρανικό χώρο (Saraste, 1999). Δομικά η κυτοχρωμική οξειδάση αποτελείται από 13 υπομονάδες, από τις οποίες οι τρεις μεγαλύτερες (I, II, και III) αποτελούν το χώρο όπου λαμβάνουν μέρος οι αντιδράσεις και η άντληση των πρωτονίων. Είναι οι μόνες που κωδικοποιούνται από το mtDNA αφού οι υπόλοιπες δέκα κωδικοποιούνται από το γενωμικό DNA. Συνολικά η μοριακή μάζα του

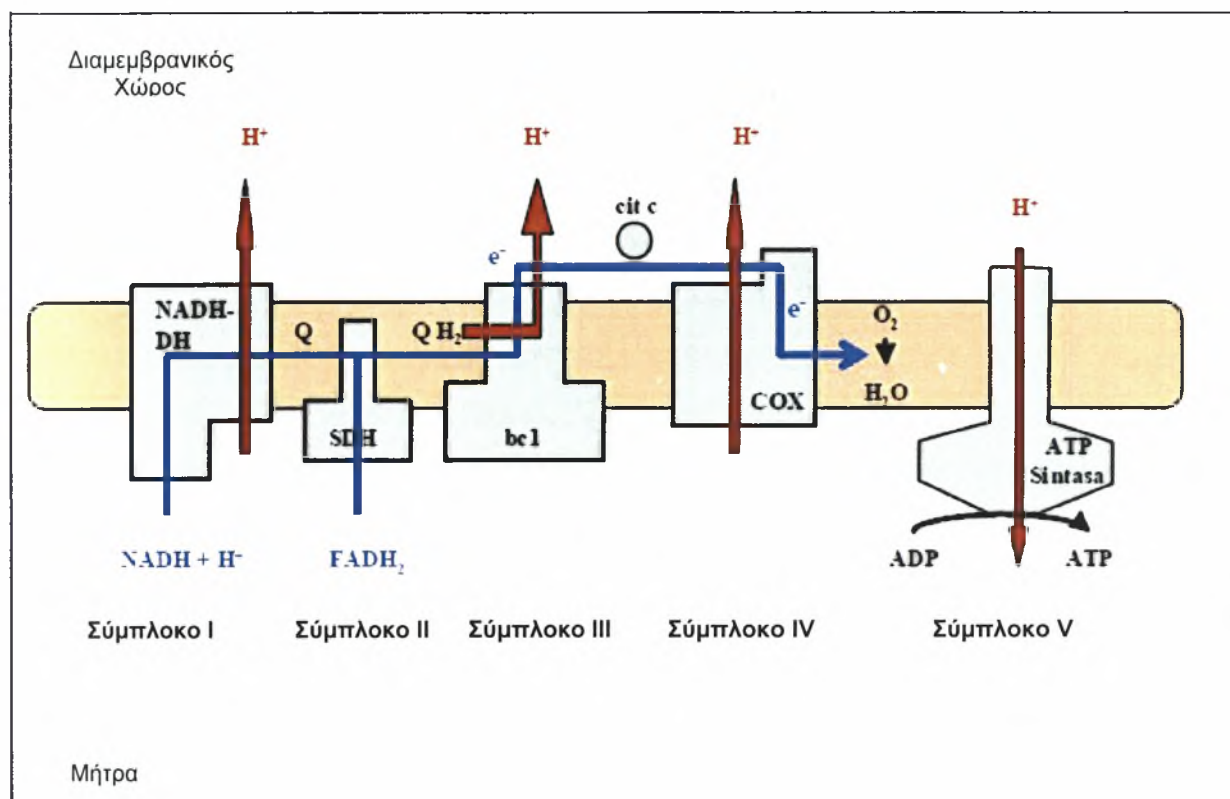
συμπλόκου είναι ίση με 200 kDa. Η τρισδιάστατη δομή της COX (Tsukihara et al. 1995; Iwatta et al. 1995) επέτρεψε να προσδιοριστούν τα βασικά χαρακτηριστικά της και να τοπολογηθούν ακριβώς τα μέρη σύνδεσης των μετάλλων. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων σε αυτό το σύμπλοκο ξεκινά με την σύνδεση του κυτοχρώματος c στην υπομονάδα II, στο εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης. Αυτή η υπομονάδα περιέχει ένα κέντρο χαλκού (CuA). Τα ηλεκτρόνια περνούν από το κυτόχρωμα c στο CuA, στη συνέχεια στην αίμη α και από εκεί στο σύμπλοκο αίμη-χαλκού  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> και τελικά στο οξυγόνο. Το σύμπλοκο  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> βρίσκεται συνδεδεμένο στην υπομονάδα I μέσω έξι ιστιδινών. Η υπομονάδα III δεν περιέχει αναγωγικό κέντρο και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση του συμπλόκου IV (Saraste, 1999).

- **Ενζυμικό σύμπλοκο V** (Συνθάση του ATP ή  $F_0F_1$ -ATP<sub>αση</sub>): Είναι ένα ένζυμο λειτουργικά αντιστρεπτό μιας και μπορεί να συνθέτει ATP από ADP και Pi χρησιμοποιώντας την βαθμίδωση πρωτονίων, αλλά μπορεί επίσης να υδρολύει το ATP για να αντλεί πρωτόνια αντίθετα στη ηλεκτροχημική βαθμίδωση. Το σύμπλοκο αποτελείται από 16 υπομονάδες (δύο κωδικοποιούνται από το mtDNA) και έχει μοριακή μάζα περίπου 600kDa. Το σύμπλοκο σχηματίζεται από δύο τμήματα, το  $F_0$  και το  $F_1$ , τα οποία είναι ενωμένα με ένα τμήμα που ονομάζεται μίσχος και περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες. Μια από αυτές καθιστά το σύμπλοκο ευαίσθητο στην ολιγομυκίνη, ένα αντιβιοτικό που εμποδίζει τη σύνθεση του ATP, παρεμποδίζοντας τη χρήση βαθμίδωσης πρωτονίων. Το τμήμα  $F_0$  είναι μία υδρόφοβη περιοχή και διασχίζει την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αποτελεί το κανάλι των πρωτονίων αυτού του συμπλόκου αποτελούμενο από τεσσάρων ειδών πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Το τμήμα  $F_1$ , που εισχωρεί στον χώρο της μήτρας, είναι το καταλυτικό τμήμα του ενζύμου και αποτελείται από πέντε διαφορετικές υπομονάδες α,β,γ,δ και ε σε στοιχειομετρία 3:3:1:1:1. Οι υπομονάδες α και β είναι ομόλογες, και στις δύο προσδέονται ATP και ADP, αλλά μόνο οι αλυσίδες β έχουν καταλυτική δράση. Έτσι, υπάρχουν τρία ενεργά σημεία στο καταλυτικό τμήμα, όσες είναι και οι αλυσίδες β, και σύμφωνα με τον «μηχανισμό αλλαγής της συγγένειας σύνδεσης», που πρότεινε ο Paul Boyer (1993, 1997) κάθε αλυσίδα β περνά από έναν κύκλο τριών καταστάσεων (ανοιχτή, χαλαρή και τεταμένη, που αντιστοιχούν σε κατάσταση χαμηλής χημικής συγγένειας για τα υποστρώματα και άρα άδεια, κατάσταση σύνδεσης με ADP και Pi και κατάσταση σύνδεσης με το ATP αντίστοιχα). Σε μία δεδομένη στιγμή οι τρεις αλυσίδες βρίσκονται σε διαφορετική κατάσταση. Επίσης ο



Boyer έδειξε ότι ο ρόλος της πρωτονιακής βαθμίβωσης δεν ήταν να σχηματίσει ATP αλλά να το ελευθερώσει από το ένζυμο (Boyer, 1993, Boyer, 1997).

Όλα τα ένζυμικά σύμπλοκα που περιγράφηκαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα τρία σημεία άντλησης πρωτονίων υποδεικνύονται με τα κόκκινα βέλη με φορά προς τα πάνω ενώ το κόκκινο βέλος με φορά προς τα κάτω υποδεικνύει την επιστροφή των πρωτονίων στη μήτρα με σύγχρονη παραγωγή ATP.

### 1.3.- Παραγωγή ελεύθερων ριζών και οι επιδράσεις στην λειτουργία των μιτοχονδρίων

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ένα χημικό είδος που περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και συνεπώς διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε κάποιο τροχιακό της. Αυτή η ιδιότητα τις καθιστά ιδιαίτερα δραστικές ώστε τελικά να αντιδράσουν και να συμπληρώσουν το κενό τροχιακό. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις η αντίδραση αυτή γίνεται εις βάρος της ουσίας που αντιδρά με την ελεύθερη ρίζα εφόσον μεταπίπτει σε μια πιο ασταθή ηλεκτρονιακή κατάσταση και τελικά μετατρέπεται σε μια πιο δραστική μορφή η οποία πολλές φορές οδηγεί σε αλυσίδα αντιδράσεων (Proctor, 1989) και μπορεί να προκαλέσει βιολογική ζημιά. Το μέγεθος της ζημιάς

εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: από την τοπική συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών, από την ικανότητα διάχυσης και το χρόνο ημιζωής, από τη λιποδιαλυτότητα που εμφανίζει στο περιβάλλον που βρίσκεται, από το βαθμό δραστηριότητας της ρίζας και από τους μηχανισμούς ενίσχυσης ή εξουδετέρωσης στο περιβάλλον της οξειδωτική δράσης (Reiter, 1998).

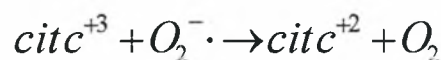
Ωστόσο υπάρχουν δυο ομάδες ελευθέρων ριζών οι οποίες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον τρόπο που σχηματίζονται και το πώς σχετίζονται με την λειτουργία των μιτοχονδρίων. Αυτές είναι η ομάδα ελευθέρων ριζών του οξυγόνου (ROS) και η ομάδα ελευθέρων ριζών του αζώτου (RNS).

Το μεγαλύτερο μέρος του απαιτούμενου οξυγόνου από τα ζωικά κύτταρα ανάγεται σε νερό μέσω της κυτοχρωμικής οξειδάσης, του ενζυμικού συμπλόκου IV του μιτοχονδρίου. Αυτό, όπως αναφέρθηκε, απαιτεί την προσθήκη τεσσάρων ηλεκτρονίων σε κάθε μόριο οξυγόνου. Γενικά η αναγωγή του οξυγόνου οδηγεί σε ασφαλή προϊόντα, όμως μπορεί να συμβεί και μερική αναγωγή του οξυγόνου και να σχηματιστούν τελικά επικίνδυνες ενώσεις, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) το οποίο αν πρωτονιωθεί δίνει μια ελεύθερη ρίζα την υδροϋπεροξυλόριζα ( $HO_2^{\cdot}$ ) η οποία αντιδρά αυθόρμητα με ένα άλλο ανιόν του υπεροξειδίου για να σχηματίσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Barja, 1999). Ο σχηματισμός αυτών των μορίων στα μιτοχόνδρια έχει προκαλέσει πολλές έρευνες τα τελευταία χρόνια. Γνωρίζουμε ότι το δυναμικό αναγωγής του οξυγόνου σε ανιόν του υπεροξειδίου είναι από  $-0.16\text{ V}$  (Wood, 1987). Στα μιτοχόνδρια η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων περιέχει αρκετά αναγωγικά κέντρα με ένα δυναμικό αναγωγής που ποικίλει από  $-0.32\text{V}$  του NADPH μέχρι  $+0.39\text{V}$  του κυτοχρώματος  $a_3$  του συμπλόκου IV και δεδομένου ότι το ενδομιτοχονδριακό περιβάλλον είναι ιδιαίτερα αναγωγικό, φαίνεται ξεκάθαρο ότι διάφορα συστατικά (όπως φλαβοπρωτεΐνες, κέντρα Fe-S) είναι θερμοδυναμικά ικανά να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο. Επίσης, πολλά από τα στάδια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων περιέχουν αντιδράσεις με ένα μόνο ηλεκτρόνιο που ευνοούν την μονοηλεκτρονιακή αναγωγή του οξυγόνου (Tupens, 2003). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η διατήρηση της πρωτονιοκινητικής δύναμης. Εάν είναι υπερβολικά υψηλή μπορούν να «ξεφύγουν» ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III οδηγώντας στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου, και αν είναι υπερβολικά χαμηλή μειώνονται τα επίπεδα ATP και τότε το NADPH περνά στην οξειδωμένη κατάσταση (Nicholls & Budd, 2000).

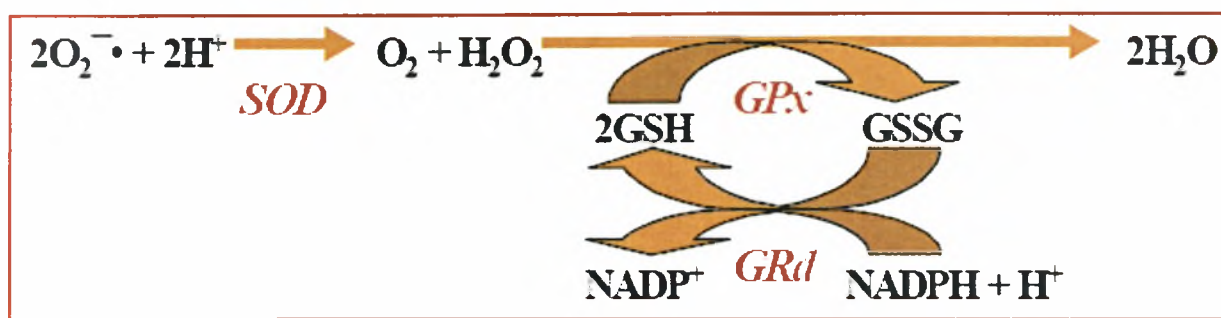
Από την άλλη πλευρά είναι οι ελεύθερες ρίζες του αζώτου (RNS), όπως το  $NO^{\cdot}$ . Το προϊόν της αντίδρασης του  $NO^{\cdot}$  με το ανιόν του υπεροξειδίου είναι τα υπεροξειδία του αζώτου ( $ONOO^-$ ), τα οποία μαζί με τις ελεύθερες ρίζες του αζώτου έχουν υψηλή οξειδωτική ισχύ και είναι πάρα πολύ τοξικά. Η επίδραση του  $NO^{\cdot}$  στα μιτοχόνδρια, και ιδιαίτερα στην αναπνοή μελετάται από τη δεκαετία του 1990. Το  $NO^{\cdot}$  ανταγωνίζεται το οξυγόνο για την πρόσδεση στο

σύμπλοκο IV στο κέντρο κυτοχρώματος- χαλκού az. (Fe+2)-CuB (Cu+) στην ανηγμένη του μορφή. Γι' αυτό το NO· είναι αναστολέας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Brown, 1999; Brown, 2001). Αυτή η αναστολή είναι αντιστρεπτή και έχουν προταθεί δυο διαφορετικές αντιδράσεις που οδηγούν σ' αυτή (Brookes et al. 2002). Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ιστοί είναι οξυγονωμένοι σε μία συγκέντρωση 20μM O<sub>2</sub>. Σε μία αναλογία [O<sub>2</sub>]/[NO·] ανάμεσα σε 500 και 1000 έχει υπολογιστεί ότι αναστέλλεται το σύμπλοκο IV από 16 μέχρι 26% (Bóveris et al. 2000). Εκτός από την αναστολή του συμπλόκου IV σε φυσιολογικές συνθήκες, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NO·, έχουν παρατηρηθεί συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις (Acuña-Castroviejo et al. 2001; Acuña-Castroviejo et al. 2002), κατά τις οποίες το NO· συνδέεται στο b και c<sub>1</sub> της κυτοχρωμικής αναγωγάσης και προκαλεί παρόμοια αποτελέσματα με την αντιμυκίνη, ενώ σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να αντιδράσει με την ουβικινόλη σχηματίζοντας ημικινόνη (Cadenas et al 2000). Αυτή η αναστολή της μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό O<sub>2</sub><sup>-</sup> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Poderoso et al.1996; Poderoso et al.1998). Όπως προαναφέρθηκε το NO· αντιδρά με το ανιόν υπεροξειδίου σχηματίζοντας υπεροξειδία του αζώτου. Τα ONOO<sup>-</sup> αναστέλλουν αντιστρεπτά όλα τα ενζυμικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, περιλαμβανομένου και της ATP συνθάσης, με μηχανισμούς όχι γνωστούς σε λεπτομέρειες (Brown, 1999; Brown, 2001). Συμπερασματικά λοιπόν, όλες αυτές οι δραστικές χημικές ενώσεις δρουν στα μιτοχόνδρια προκαλώντας ζημιά στις πρωτεΐνες, στο mtDNA οξειδώνοντας τα λίπη και προκαλώντας τελικά δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στη μιτόπτωση και απόπτωση (Tuitgens, 2003).

Απέναντι στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών τα μιτοχόνδρια έχουν αναπτύξει δικά τους αντιοξειδωτικά συστήματα. Ένα τέτοιο σύστημα είναι η οξείδωση σε οξυγόνου από το διαλυτό κυτόχρωμα c στο διαμεμβρανικό χώρο σύμφωνα με την αντίδραση:



Το ανιόν του υπεροξειδίου μπορεί επίσης να εκκαθαριστεί από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ένα ένζυμο που βρίσκεται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς και το οποίο καταλύει τη μετατροπή δύο τέτοιων ριζών σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (Εικ.3). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου με τη σειρά του μπορεί να εκκαθαριστεί είτε μέσω της καταλάσης, μιας αιμοπρωτεΐνης, σε νερό και μοριακό οξυγόνο είτε μέσω υπεροξειδασών (π.χ υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), που είναι επίσης αιμοένζυμα και ανάγουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό μέσω ενός αναγωγικού μέσου (Εικ.3) (Skulachev, 1999).



Εικόνα 3. Αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα: SOD και γλουταθειόνη.

SOD: Δισμουτάση του υπεροξειδίου

GPx: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GRd: Γλουτοθειονική αναγωγή

Τέλος, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που υποστηρίζουν ότι η μελατονίνη, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο από το οξειδωτικό στρες στα μιτοχόνδρια (Acuña-Castroviejo et al 2001; Acuña-Castroviejo et al. 2002; León et al, 2004).

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της σήψης είναι η υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα μιτοχόνδρια είναι μια σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών, κυρίως ROS και RNS, και όταν επικρατούν τα προοξειδωτικά ή οι ελεύθερες ρίζες έναντι των αντιοξειδωτικών συστημάτων τότε προκαλείται βλάβη σε συγκεκριμένα στοιχεία του μιτοχονδρίου, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, βιοενεργητική πτώση μέχρι και στην πιο ακραία περίπτωση, κυτταρικός θάνατος.

## 2.- ΣΗΨΗ (SEPSIS)

### 2.1.- Προσδιορισμός και σημασία στην υγεία

Ως σήψη χαρακτηρίζεται η κατάσταση του οργανισμού κατά την ανεξέλεγκτη ανοσολογική απάντηση αυτού σε σοβαρή μικροβιακή μόλυνση (Glauser 2000). Κατά την ανοσολογική απάντηση χρησιμοποιούνται ουδετερόφιλα, μακροφάγα και κύτταρα NK τα οποία δρουν κατευθείαν ενάντια των παθογόνων μικροοργανισμών και των συστατικών τους

καταστρέφοντάς τα, χωρίς όμως την μεσολάβηση της προσαρμοσμένης πλέον ανοσολογικής αντίδρασης, προκαλώντας έτσι σοβαρή βλάβη και στον οργανισμό του ξενιστή.

Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της σηπτικής κλινικής κατάστασης αποφασίστηκε να τεθούν διαφορετικοί όροι για τα διάφορα στάδια της σήψης ανάλογα με την σοβαρότητα της κατάστασης και τα κλινικά χαρακτηριστικά (Πιν. 1)

*Πίνακας 1. Προσδιορισμός των κλινικών χαρακτηριστικών της σήψης.*

Σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης SIRS (Systemic inflammatory response syndrome)	Θερμοκρασία: $>38^{\circ}\text{C}$ ή $<36^{\circ}\text{C}$ Καρδιακός ρυθμός: $> 90$ παλμοί/λεπτό Αναπν. Ρυθμός: $> 20$ αναπνοές/λεπτό Λευκοκύτταρα: $>12 \times 10^9/\text{L}$ ή $< 4 \times 10^9/\text{L}$
Σήψη (sepsis)	Δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά για SIRS
Έντονη σήψη (Severe sepsis)	Σήψη συνοδευόμενη από δυσλειτουργία οργάνων, άπνοια ή υπόταση και πολλές φορές λακτική οξέωση, ολιγουρία και έντονη αλλαγή στην διανοητική κατάσταση
Σηπτικό σοκ (Septic shock)	Σήψη συνοδευόμενη με υπόταση που δεν ανταποκρίνεται στην χορήγηση αλατούχου υγρού, δυσκολία στην αναπνοή, λακτική οξέωση, ολιγουρία και έντονη αλλαγή στην διανοητική κατάσταση
Πολλαπλή δυσλειτουργία συστημάτων οργάνων MODS (Multiple organ system failure)	Επηρεασμένη λειτουργία οργάνων σε βαθμό που η ομοιόσταση δεν μπορεί να διατηρηθεί πλέον χωρίς φαρμακευτική επέμβαση

Η σήψη είναι από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου νοσηλευόμενων ασθενών παγκόσμια. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής μόνο, κάθε χρόνο προσβάλλονται περίπου 700.000 άνθρωποι από τους οποίους περίπου 210.000 πεθαίνουν (Angus & Wax 2001). Από επιδημιολογικές μελέτες που έχουν γίνει σε διάφορες χώρες έχει βρεθεί ότι κάθε χρόνο αυξάνονται τα περιστατικά σήψης και ότι η θνησιμότητα μειώνεται λόγω των εξελιγμένων θεραπειών, αλλά το καθαρό αποτέλεσμα της θνησιμότητας παρουσιάζει τελικά αύξηση στον αριθμό των θανάτων προκαλούμενο από σήψη (Palencia, 2004). Παρά τις νέες θεραπείες και τα πιο ισχυρά αντιβιοτικά η σήψη είναι συχνά θανατηφόρα, σκοτώνοντας από το 30 έως το 70% των σοβαρά προσβεβλημένων ασθενών (Wheeler & Bernard 1999) και μειώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής αυτών που τελικά επιζούν (Perl et al. 1995, Heyland et al. 2000). Ένα άλλο ζήτημα με μεγάλη σημασία είναι και το οικονομικό κόστος για την μεταχείριση αυτών των ασθενών. Μία πρόσφατη έρευνα σε 16.000



ασθενείς, από τους οποίους 81,2% ήταν 65 χρονών και πάνω, έδειξε ότι έγιναν έξοδα ανερχόμενα σε 44.600 \$ κατά την αρχική παραμονή του ασθενούς στο νοσοκομείο, 78.500 \$ το χρόνο και 118.000\$ κατά την διάρκεια 5 χρόνων (Weicker et al.,2003). Το παγκόσμιο κόστος θα μπορούσε να ανέρχεται γύρω στα 16,7 δισεκατομμύρια δολάρια σύμφωνα με το σύστημα υγείας της Αμερικής (Angus et al., 2001). Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν την μεγάλη σημασία που έχει η σήψη για το οποιοδήποτε ανεπτυγμένο κράτος και την ανάγκη για περισσότερη γνώση και κατανόηση της ασθένειας με σκοπό την εξέλιξη στην αντιμετώπιση και θεραπεία της και έτσι και στην μείωση του κόστους.

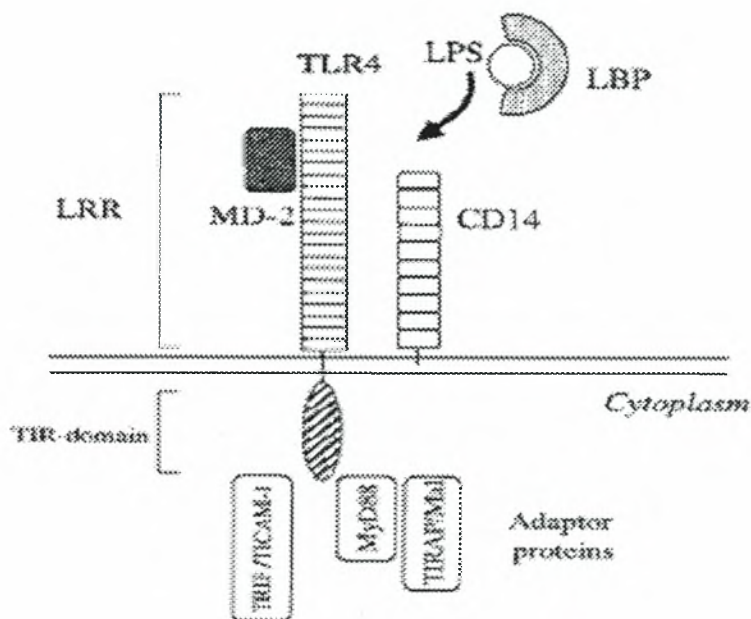
## **2.2.- Ο μηχανισμός της ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια στην μόλυνση**

### *2.2.1.- Αναγνώριση των μικροβιακών συστατικών:*

Τα συστατικά των μικροοργανισμών που αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα είναι γνωστά με τον όρο PAMPs ( Pathogen-associated molecular patterns) και περιλαμβάνουν λιποπολυσακαρίτες -ενδοτοξίνες- των gram αρνητικών βακτηρίων, εξωτοξίνες, πεπτιδογλυκάνες, λιποτειχοϊκά οξέα των gram θετικών και πολλά άλλα συστατικά βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασίτων (Das, 2000; Cohen, 2002). Αυτά τα συστατικά μέσω ενεργοποίησης αντιδράσεων, τελικά ενεργοποιούν την έκκριση από τον ξενιστή, ενδογενών μεσολαβητών οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς τον οργανισμό του. Όταν εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες τα αποτελέσματα είναι πολύ ευεργετικά όπως η καταπολέμηση των μικροοργανισμών ή η ρύθμιση της ανοσοποιητικής απόκρισης. Όταν η απόκριση είναι ανεξέλεγκτη οδηγεί σε επιβλαβή αποτελέσματα για τον οργανισμό μέχρι και τον τραυματισμό οργάνων στόχων των μεσολαβητών.

Ένας αριθμός μορίων μπορεί να ξεκινήσει το μονοπάτι που οδηγεί στο σηπτικό σοκ ωστόσο, η μόλυνση από gram αρνητικά βακτήρια είναι η πιο συνήθης αιτία σηπτικού σοκ και το πιο καλά περιγραμμένο μονοπάτι που οδηγεί σε σήψη. Έτσι, μετά από μόλυνση με gram αρνητικά βακτήρια οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων αρχικά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος, γνωστές ως LPS binding proteins, και οι οποίες θα μεταφέρουν μονομερή τμήματα των LPS από το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων σε μία γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης των μονοκυττάρων, μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων γνωστή ως CD14, η οποία αποτελεί σημαντικό στοιχείο του συμπλόκου του υποδοχέα των LPS, (Εικ.4). Εκτός από την μεμβρανική πρωτεΐνη CD14 υπάρχει και η διαλυτή με την ίδια λειτουργία και οι δυο φαίνεται να έχουν την ικανότητα να διακρίνουν τα διαφορετικά

βακτηριακά συστατικά και να μεταδώσουν τα μηνύματά τους στους διαφορετικούς TLRs (Toll like receptor), οι οποίοι αποτελούν ένα άλλο σημαντικό στοιχείο των υποδοχών των LPS.



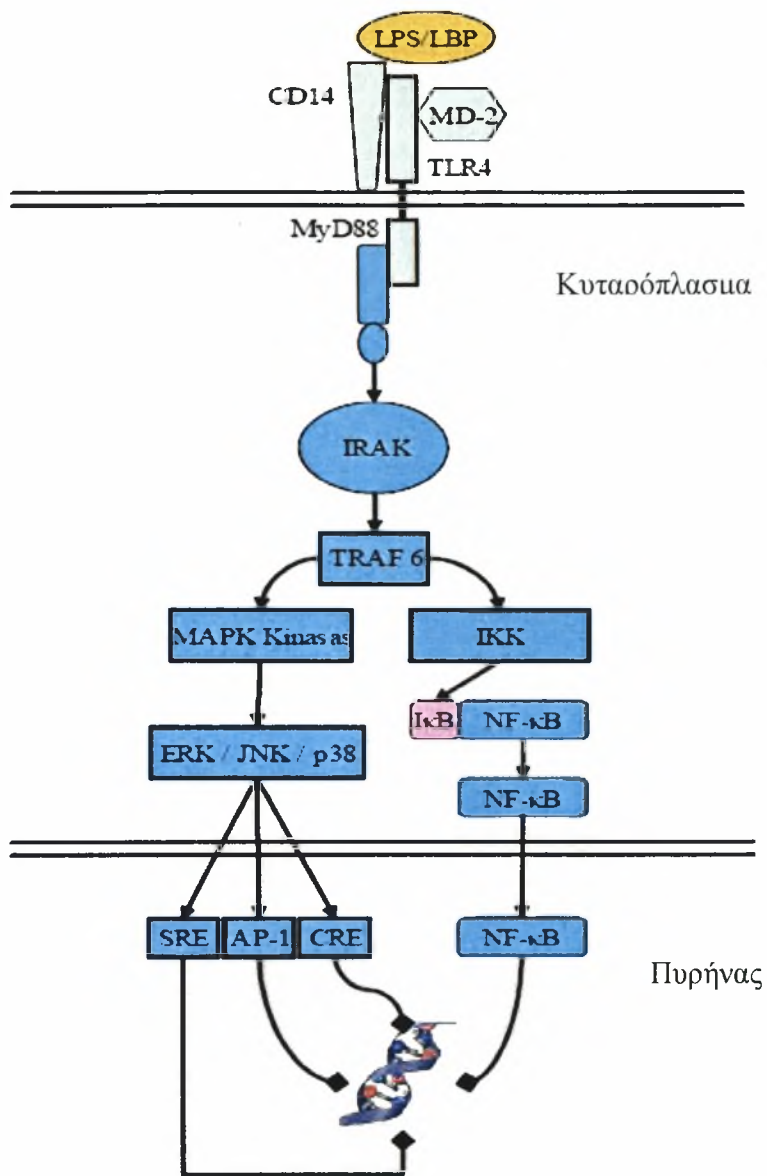
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου του υποδοχέα των LPS στα μακροφάγα αποτελούμενο από τρεις πρωτεΐνες: CD14, TLR4 και MD-2 (Από Fujihara et al., 2003).

Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί τουλάχιστον 13 τύποι TLRs (Beutler, 2004). Το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα TLR4 είναι πολύ σημαντικό αφού σε αυτό το τμήμα οφείλεται η έναρξη της μεταγωγής σήματος μετά την αναγνώριση του LPS (Fujihara et al., 2003).

Το τρίτο συστατικό του υποδοχέα ή πρωτεΐνη MD-2 (myeloid differentiation protein-2) είναι μία μικρή πρωτεΐνη συνδεδεμένη στο εξωκυτταρικό τμήμα του TLR4 και η λειτουργία της έχει να κάνει με την κυτταρική εντόπιση του TLR4. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι η MD-2 παίζει ρόλο στην αναγνώριση των LPS (Fujihara et al., 2003).

#### 2.2.2.-Ανοσολογική απόκριση και σήματα ενίσχυσής της:

Μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τα PAMPs, η πρωτεΐνη προσαρμογέας (adaptor protein) MyD88 (myeloid differentiation factor 88) ενεργοποιείται και τελικά ενεργοποιεί την πρωτεΐνη προσαρμογέα TRAF6 (TNF receptor-activated factor 6). Η πρωτεΐνη TRAF6 θα ενεργοποιήσει μέσω ενός μονοπατιού τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Takeuchi et al., 2001; Fujihara et al., 2003), και μέσω του μονοπατιού των MAPKs (mitogen-activated protein kinase) θα ενεργοποιήσει μεταγραφικούς παράγοντες όπως AP-1 (activator protein-1) CRE (cAMP responsive element), SRE (serum response element) (Guha et al., 2001) (Εικ. 5).

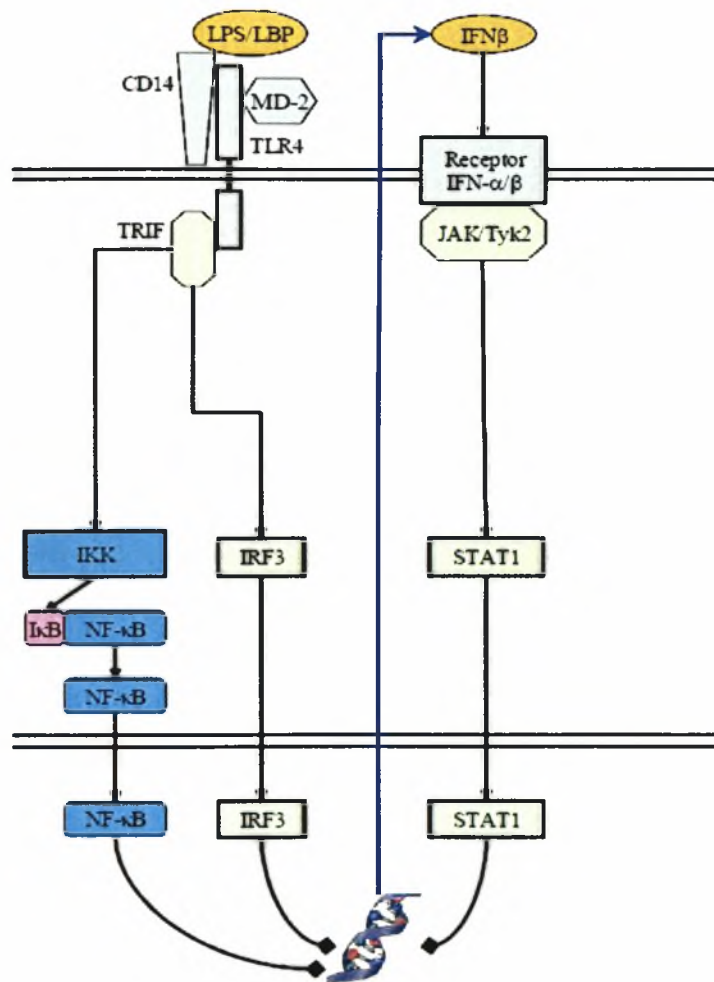


Εικόνα 5. Τα ενδοκυτταρικά σήματα από την ενεργοποίηση του παράγοντα MyD88 σε απάντηση των LPS στα μακροφάγα.

Μέχρι τώρα, για την ενεργοποίηση των μονοπατιών που έχουν περιγραφεί απαιτούνταν η ενεργοποίηση της MyD88. Όμως, τα τελευταία χρόνια βρέθηκαν και άλλα μονοπάτια ανεξάρτητα από αυτήν (Fujihara et al., 2003). Έτσι, μετά την ενεργοποίηση του TLR4 ενεργοποιείται ο παράγοντας TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β) που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB και του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 (IFN regulatory factor 3). Όταν ο IRF3 επάγει την έκφραση των γονιδίων για το INF-β και αυτό συντεθεί τότε ο INF-β βγαίνει έξω από το κύτταρο και ενεργοποιεί τον κυτταρικό υποδοχέα του. Στη συνέχεια, μέσω της ενεργοποίησης των JAK κινασών ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας STAT1



(signal transducer and activator of transcription) ο οποίος διμερίζεται πηγαίνει στον πυρήνα και προκαλεί την μεταγραφή μεσολαβητών της φλεγμονής, κυρίως κυτοκινών όπως TNF-α (tumor necrosis factor α), Ιντερλευκίνη 1-β (IL-1β), IL-6, IL-10, ιντερφερόνη γ (IFN-γ), TGF-β (transforming growth factor β, αιμοπεταλιακός παράγοντας ενεργοποίησης PAF (Platelet activating factor), το στοιχείο C5a του συμπληρώματος, καθώς επάγεται και ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Bathia et al., 2004) (Εικ.6). Επίσης, ο παράγοντας STAT παίζει σημαντικό ρόλο και στην επαγωγή της iNOS (inducible-nitric oxide synthase), της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (Yamamoto et al., 2003; Fujihara et al., 2003).



Εικόνα 6. Τα ενδοκυτταρικά σήματα σε απάντηση των LPS στα μακροφάγα ανεξάρτητα του MyD88.

### 2.3.- Παθογένεση στη σήψη

#### 2.3.1.- iNOS, NO, και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων κατά τη σήψη:

Στις κλωνοποιημένες αλληλουχίες της iNOS σε διάφορα είδη (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993; Lin et al., 1996; Chu et al., 1998; Zhang et al., 1998; Wang et al., 2001) έχουν βρεθεί ομόλογες αλληλουχίες με σημεία πρόσδεσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων, όπως

NF-κB, AP-1, CRE, IRF, SER. Έτσι, εκτός από την επαγωγή της iNOS από τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-1 η iNOS επάγεται και από τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά την σήψη (Titheradge MA, 1999, Kleinert et al., 2004). Την επαγωγή της iNOS συνεπάγεται και αύξηση στην σύνθεση NO<sup>•</sup>, το οποίο έχει δυο ωφέλιμα αποτελέσματα στην φλεγμονή: αντιμικροβιακό/βακτηριοκτόνο και αγγειοδιασταλτικό ώστε να φτάνουν περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο της μόλυνσης. Ωστόσο, στη σήψη όπου υπάρχει μία γενικευμένη μόλυνση, η επαγωγή της iNOS συμβαίνει σε διάφορους τύπους κυττάρων: ενδοθηλιακά, μυϊκά, καρδιακά, ηπατικά, παγκρεατικά και πνευμονικά (Titheradge et al., 1999). Αυτή η μεγάλη παραγωγή NO<sup>•</sup> στα διάφορα όργανα οδηγεί σε βλάβη στο αγγειακό σύστημα προκαλώντας αγγειοδιαστολή, αιμοδυναμικά αποτελέσματα σε διάφορους ιστούς και σημαντική δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων που μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε βλάβη κάποιου οργάνου και στη χειρότερη των περιπτώσεων σε MODS (πολυοργανική βλάβη) (Vicent et al., 2000). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που παρουσιάζουν την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων κατά την σήψη, λόγω της αναστολής των ενζυμικών συμπλόκων (Gellerich et al., 2002; Brealey et al., 2004; Nin et al., 2004) καθώς και μία σημαντική μείωση των επιπέδων ATP (Brealey et al., 2004).

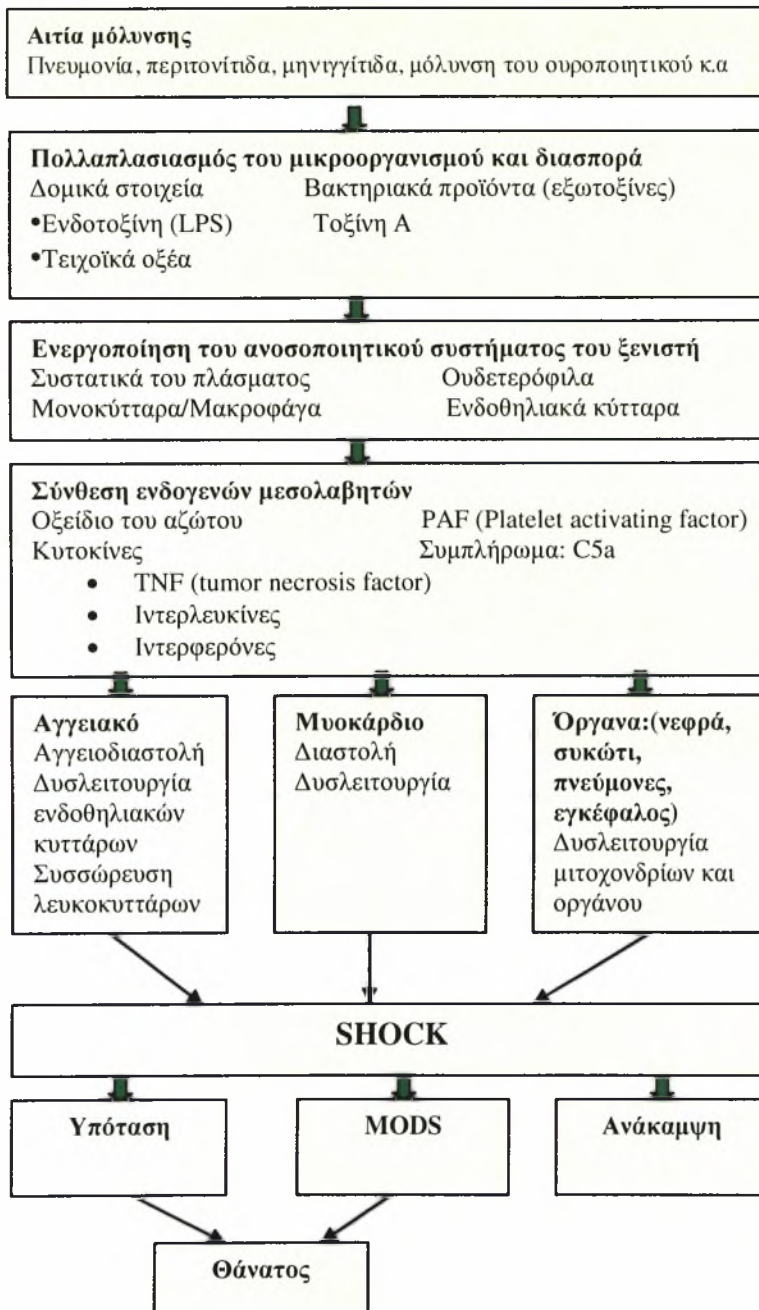
### 2.3.2Κυτοκίνες:

Οι κυτοκίνες είναι πολυπεπίδια 15- 30 kDa και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση. Ωστόσο, όταν εκκριθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούν σοβαρή βλάβη. Ο παράγοντας TNF-α, δρώντας συνεργιστικά με την ιντερλευκίνη-1, προκαλεί αγγειοδιαστολή και υπολειτουργία των κυττάρων του μυοκαρδίου λόγω της επίδρασης στην συστολή του καρδιακού μυός προκαλώντας έτσι το καρδιαγγειακό παθολογικό προφίλ του σηπτικού σοκ σε μοντέλα ζώων. Ωστόσο, πολλές φορές το παθολογικό προφίλ του ασθενούς έχει και γενετική βάση. Έχει βρεθεί ότι άτομα με το αλληλόμορφο TNF2, για μια περιοχή του υποκινητή του TNF-α, έχουν υψηλότερο ρίσκο ανάπτυξης σηπτικού σοκ και όταν το σοκ έχει εκδηλωθεί έχουν λιγότερες πιθανότητες επιβίωσης. Προφανώς η ύπαρξη αυτού του υποκινητή προκαλεί μεγαλύτερη σύνθεση TNF-α και έτσι μεγαλύτερη τοξικότητα. Μία άλλη δράση του TNF είναι η επαγωγή της έκφρασης υποδοχέων προσκόλλησης (σελεκτίνες) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η επαγωγή των ουδετερόφιλων κυττάρων να εκφράσουν προσδέτες για αυτούς τους υποδοχείς. Έτσι, τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν στο σημείο της μόλυνσης και προσκολλούνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλώντας τραυματισμό του ιστού (Cecil textbook of medicine).

Κατά την σήψη υπάρχει ισχυρό οξειδωτικό στρες στην προσπάθεια του οργανισμού να αντιμετωπίσει τη βακτηριακή μόλυνση. Επίσης αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο από το οξειδωτικό

στρες στα μιτοχόνδρια (Acuña-Castroviejo et al 2001; Acuña-Castroviejo et al. 2002; León et al, 2004). Έτσι λοιπόν, υπάρχει βάση να πιστεύεται ότι η μελατονίνη μπορεί να έχει κάποιο αποτέλεσμα στην αντιμετώπιση της σήψης.

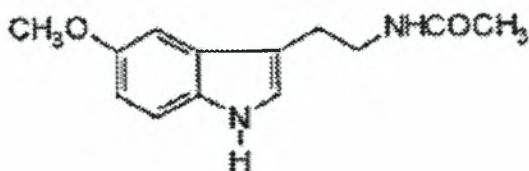
Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται περιληπτικά τα στοιχεία που αναφέρθηκαν σχετικά με την παθογένεση της σήψης.



Εικόνα 7. Τα στάδια της παθογένεσης της σήψης.

### 3.- ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗ

Η μελατονίνη ή N-ακέτυλ-5-μεθόξυ-τροπταμίνη (Εικ. 8) είναι μία ινδολαμίνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους McCord και Allen το 1917 και απομονώθηκε από τον Lerner και τους συνεργάτες του το 1958 από εκχυλίσματα του αδένου της επίφυσης. Συμπεριφέρεται ως κρυσταλλική οργανική ένωση, έχει σημείο τήξης 116-118°C, είναι λίγο διαλυτή στο νερό και πολύ διαλυτή στην αιθανόλη (Szmuskowicz & Heinzelman, 1960).



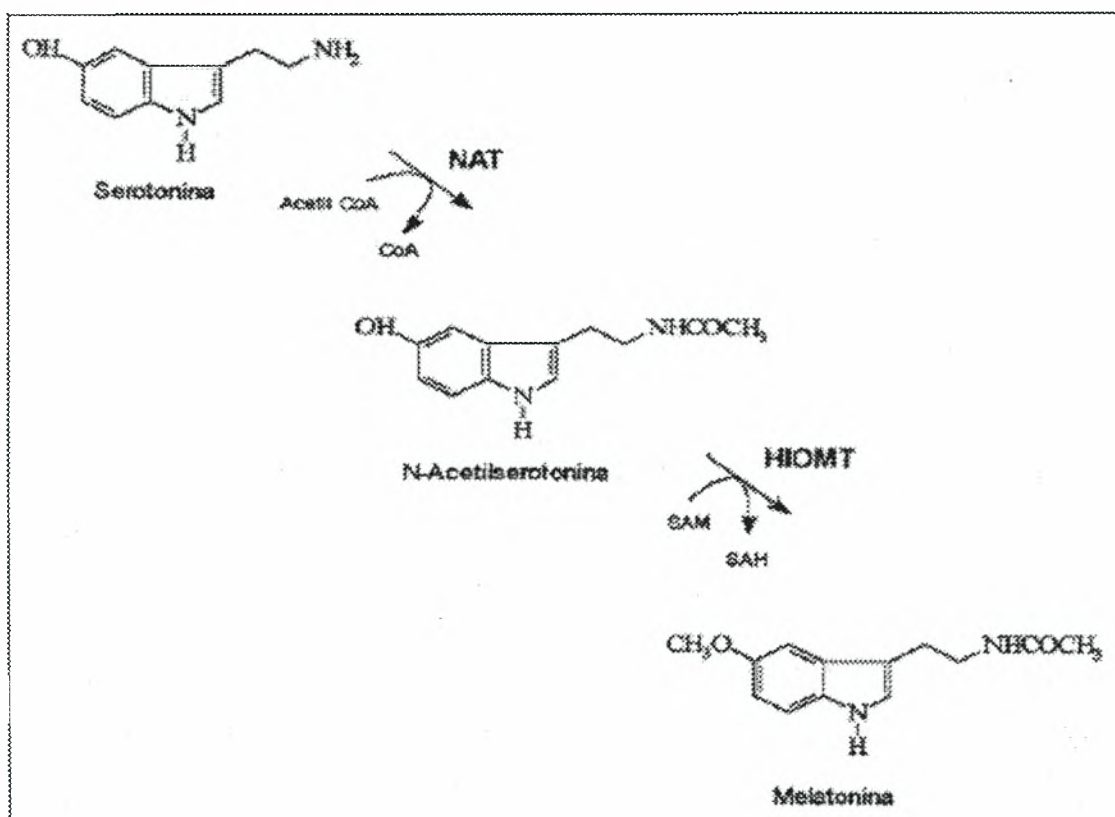
Εικόνα 8. Χημική δομή της μελατονίνης.

Αν και αρχικά η μελατονίνη ήταν γνωστή για την εμπλοκή της στην αναπαραγωγή και στην φυσιολογία των κερκιδίων κύκλων, μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι εκτός από τις δράσεις της ως ορμόνη, έχει και σημαντική δράση στην ενδοκυττάρια φυσιολογία. Έτσι, βρέθηκε ότι η μελατονίνη έχει την ικανότητα να απαλλάσσει τον οργανισμό από ελεύθερες ρίζες (Tan et al., 1993). Στη συνέχεια βρέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πυρηνικοί υποδοχείς για τη μελατονίνη σε περιφερειακά όργανα (Acuña-Castroviejo et al., 1993, Acuña-Castroviejo et al., 1994, Becker-André et al., 1994, Hirose et al., 1994) και κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Becker-André et al., 1994, Carlberg et al., 1994, Giguere et al., 1994). Επίσης δείχθηκε ότι η μελατονίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Benítez-King & Antón-Ray, 1996) και η καλμοδουλίνη (Huerto-Delgadillo et al., 1994, Pozo et al., 1994, León et al., 2000) ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις ενδοκυττάρια λειτουργίες του ασβεστίου. Τελευταία, πολλές μελέτες έχουν δείξει το ρόλο της μελατονίνης στην διατήρηση της ομοιόστασης του μιτοχονδρίου (Martín et al., 2000 Martín et al., 2002, Acuña-Castroviejo et al., 2001 Acuña-Castroviejo et al., 2002, León et al., 2004, León et al., 2005).

#### 3.1.- Σύνθεση της μελατονίνης στα θηλαστικά

Η μελατονίνη είναι μια ένωση υψηλά διατηρημένη από εξελικτικής άποψης, αφού βρίσκεται σε διάφορους τύπους οργανισμών: βακτήρια, μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, μικροάλγη, φυτά, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Στα θηλαστικά το πρώτο σημείο όπου ανακαλύφθηκε η σύνθεση της μελατονίνης ήταν στον αδένου της επίφυσης (ή αλλιώς κωνάριο) ο

ο οποίος περιέχει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για την σύνθεση της μελατονίνης από τη σεροτονίνη (Axelrod & Wissbach, 1960). Η ενεργότητα της μελατονίνης επηρεάζεται από τους κύκλους φωσ-σκοτάδι (Quay, 1964). Έτσι, η σύνθεση της μελατονίνης λειτουργεί ως ένα μήνυμα κατά την διάρκεια του σκοταδιού και είναι υπεύθυνη για την συγκέντρωση της ινδολαμίνης στο πλάσμα (Reiter, 1991, Eppen et al., 2003). Στην επίφυση η μελατονίνη συντίθεται από τρυπτοφάνη που εισέρχεται στα κύτταρα του αδένου μέσω ενεργής μεταφοράς ενάντια στην βαθμίδωση συγκέντρωσης (Sudden, 1979). Η τρυπτοφάνη πρώτα χρησιμοποιείται για την σύνθεση της 5-υδροξυτρυπταμίνης ή σεροτονίνης από τα ένζυμα υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και απόκαρβοξυλάση της 5-υδροξυτρυπτοφάνης. Στη συνέχεια, η σεροτονίνη μετατρέπεται σε N-ακετυλοσεροτονίνη από την N-ακετυλοτρανσφεράση (NAT) που είναι και το περιοριστικό ένζυμο στη σύνθεση της μελατονίνης. Τελικά η N-ακετυλοσεροτονίνη μεθυλιώνεται από την υδροξυινδόλ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (HIOMT) και παράγεται μελατονίνη (Εικ. 9)



Εικόνα 9. Σύνθεση της μελατονίνης από την σεροτονίνη στον pineal αδένου. NAT: N-ακετυλοτρανσφεράση, HIOMT: υδροξυινδόλ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση, SAM: S-αδενόσυλμεθειονίνη, SAH: S-αδενόσυλ-κυστείνη

Εκτός από την σύνθεση στην επίφυση η μελατονίνη συντίθεται επίσης σε διάφορους ιστούς όπως ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του ματιού, η βλέννα του εντέρου, το αναπνευστικό επιθήλιο,



η παρεγκεφαλίδα, το συκώτι, τα νεφρά, ο θυρεοειδής, το πάγκρεας, ο πλακούντας και το ενδομήτριο, καθώς επίσης και σε κύτταρα όπως NK, και ενδοθηλιακά (Kvetnoy I, 2002).

### **3.2.-Η προστατευτική δράση της μελατονίνης στα μιτοχόνδρια.**

Η μελατονίνη είναι ένα μόριο πολύ λιπόφιλο και μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αρκετή ευκολία. Γι' αυτό εντοπίζεται πολλές φορές σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, περιλαμβανομένων και των μιτοχονδρίων όπου μπορεί να συσσωρευτεί και να φτάσει σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. (Acuña-Castroviejo et al., 2002, Acuña-Castroviejo et al., 2003, León et al., 2004).

#### **3.2.1.- Άμεση αντιοξειδωτική δράση:**

Η μελατονίνη και ορισμένα από τα παράγωγά της έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με ορισμένες πολύ δραστικές ενώσεις ειδικού ενδιαφέροντος για τα μιτοχόνδρια. Η πρώτη περίπτωση που δείχθηκε η δράση αυτή της μελατονίνης ήταν η εξουδετέρωση της ρίζας του υδροξυλίου ( $\text{HO}\cdot$ ) (Tan et al., 1993). Για κάθε μόριο μελατονίνης εξουδετερώνονται δύο μόρια  $\text{HO}\cdot$  σχηματίζοντας κυκλική 3-υδρόξυμελατονίνη η οποία απεκκρίνεται στα ούρα (Tan et al. 1998, Tan et al., 2002). Επίσης η μελατονίνη έχει την ιδιότητα να αντιδρά και με το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζοντας  $\text{N}_1$ -ακέτυλο- $\text{N}_2$ -φόρμυλο-5-μεθόξυκινουραμίνη (AFMK) (Tan et al., 2000). Αυτό έχει επαληθευθεί και από μελέτες *in vivo* (Reiter et al., 2003). Τόσο η 3-υδρόξυμελατονίνη όσο και η AFMK φαίνεται επίσης να έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τοξικές ενώσεις (Acuña-Castroviejo et al., 2001, Reiter et al., 2003, León et al., 2004). Μερικοί ερευνητές μάλιστα υποστηρίζουν ότι η μελατονίνη μπορεί να εξουδετερώσει και το ανιόν του υπεροξειδίου (Marshall et al., 1996, Zang et al., 1998) αν και κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί ακόμη να συμβαίνει *in vivo*.

Η μελατονίνη μπορεί επίσης να εκκαθαρίσει ρίζες υπεροξειδίου και να μειώσει αποτελεσματικά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες εμποδίζοντας την οξείδωση των λιπιδίων (Reiter et al., 2003).

Επιπλέον, εκτός από τις ρίζες οξυγόνου η μελατονίνη μπορεί να εκκαθαρίσει και ρίζες αζώτου, αντιδρώντας με  $\text{NO}\cdot$  καθώς και με υπεροξειδία του αζώτου ( $\text{ONOO}^-$ ).

#### **3.2.3.- Έμμεση αντιοξειδωτική δράση:**

Εκτός από την εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών, η μελατονίνη επάγει την έκφραση και την ενεργότητα άλλων αντιοξειδωτικών συστημάτων μειώνοντας με έμμεσο τρόπο το οξειδωτικό στρες (Kotler et al., 1998; Antolin et al., 2002; Mayo et al., 2002).

Κατ' αρχήν η μελατονίνη ενεργοποιεί τον κύκλο της γλουταθειόνης, αυξάνοντας την ενεργότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης

(GRd), ρυθμίζοντας έτσι την ισορροπία οξειδωμένης/αναγμένης γλουταθειόνης (GSSG)/(GSH) (Pablos et al., 1998, Martín et al., 2000). Επίσης αυξάνει τη παραγωγή της GSH μέσω επαγωγής της συνθάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, ένα ένζυμο κλειδί στο μονοπάτι σύνθεσης της γλουταθειόνης (Urata et al., 1999) και μέσω επαγωγής της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), η οποία σχηματίζει NADPH που είναι απαραίτητο για την GRd (Pierrefiche & Laborit, 1995).

Στον κατάλογο των αντιοξειδωτικών ενζύμων που επάγει η μελατονίνη έρχονται να προστεθούν η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση, ενώ υποστηρίζεται ότι εκδηλώνει επίσης συνεργιστική δράση με τις βιταμίνες E και C (Reiter et al., 2003).

Η μελατονίνη είτε μέσω άμεσης ή έμμεσης δράσης έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και κατάλληλες ιδιότητες για να δρα στα μιτοχόνδρια, προστατεύοντας το mtDNA, τις λιπιδικές μεμβράνες και τις πρωτεΐνες από το οξειδωτικό στρές.

### *3.2.4-Επίδραση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων:*

Η δράση της μελατονίνης δεν περιορίζεται μόνο στον ρόλο της ως αντιοξειδωτικό αλλά επίσης επιδρά στα ένζυμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και την παραγωγή του ATP. Από πειραματικά μοντέλα ποντικών που βρίσκονταν σε κατάσταση οξειδωτικού στρές βρέθηκε ότι η μελατονίνη ήταν ικανή να αναιρέσει μερικώς την αναστολή των ενζυμικών συμπλόκων I και IV στα μιτοχόνδρια από ήπαρ και πνεύμονες. (Escames et al., 2003)

Για την δράση που έχει παρουσιάσει η μελατονίνη στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης. Για παράδειγμα εξαιτίας του υψηλού αναγωγικού δυναμικού της μελατονίνης (0.94 V) (Tan et al., 2000), κάποιοι ερευνητές πρότειναν ως μηχανισμό δράσης ότι η μελατονίνη προσφέρει και δέχεται ηλεκτρόνια από τα ένζυμα της αλυσίδας μεταφοράς μιτοχονδρίων γεγονός που αυξάνει την ηλεκτρονιακή ροή (Martín et al., 2002). Ένας άλλος μηχανισμός δράσης που έχει προταθεί είναι η επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (υπομονάδες I, II, III του ενζυμικού συμπλόκου IV) που κωδικοποιούνται από το mtDNA.

### *3.3.-Μελατονίνη και φυσιοπαθολογία της σήψης*

Σύμφωνα με την φυσιοπαθολογία της σήψης και τις γνωστές ως τώρα δράσεις της μελατονίνης φαίνεται ότι η χορήγησή της θα μπορούσε πιθανότατα να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της κατάστασης σήψης. Ο Crespo και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η χορήγηση μελατονίνης σε αρουραίους με σήψη επαγομένη από LPS ανέστειλε την έκφραση της iNOS σε σχέση δοσοεξαρτώμενη και τελικά οι αρουραίοι ανέκαμψαν από το στάδιο της πολλαπλής δυσλειτουργίας οργάνων (MODS) της σήψης (Crespo et al. 1999)

Το 2001 έγινε η πρώτη μελέτη χορήγησης μελατονίνης σε ανθρώπους. Σε παιδιά που γεννιούνται με σήψη χορηγήθηκε μελατονίνη (δύο δόσεις των 10mg/kg σωματικού βάρους με διάστημα ανάμεσα στις δόσεις μια ώρα) από το στόμα 12 ώρες μετά την διάγνωση για τη σήψη. Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα σε μοντέλα ζώων η μελατονίνη μείωσε το οξειδωτικό στρες που προκαλεί η σήψη, κάτι που μετρήθηκε μέσω των τιμών των οξειδωμένων λιπιδίων στο αίμα. Επιπλέον, η χορήγηση μελατονίνης βελτίωσε και αιματολογικούς παράγοντες όπως ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων. Το πιο σημαντικό από μία κλινική άποψη είναι ότι οι 10 ασθενείς που τους χορηγήθηκε μελατονίνη επέζησαν όλοι, ενώ από τους 10 που δεν τους χορηγήθηκε 3 δεν επιβίωσαν (Gitto et al. 2001).

#### **4.- ΣΤΟΧΟΙ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η υπόθεση κατά το πόσο η μελατονίνη μπορεί να αναστείλει σημαντικά το οξειδωτικό στρες στην καρδιά σε κατάσταση σήψης και ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια μέσω επαγωγής των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Για το σκοπό αυτό επιδιώξαμε :

1. Να διαχωρίσουμε τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων μέσω ηλεκτροφόρησης και να τα ταυτοποιήσουμε μέσω ειδικών αντισωμάτων για κάθε ένα από αυτά.
2. Να προσδιορίσουμε τη διαφορά στην ποσότητα κάθε ενός από τα σύμπλοκα με αποτύπωση Western, σε ποντίκια σήψης με μελατονίνη και χωρίς μελατονίνη.
3. Να συγκρίνουμε την ενεργότητα των ενζυμικών συμπλόκων με ενζυμική χρωμομετρική αντίδραση σε ποντίκια σήψης με μελατονίνη και χωρίς μελατονίνη.



# *Υλικά και Μέθοδοι*

## **1.-ΖΩΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ, ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ**

### **1.1.- Ζώα και πειραματικές ομάδες**

Για τη μελέτη χρησιμοποιείται η σειρά C57BL/6 (wild type) κανονικών ποντικών. Τα ποντίκια αναπαράγονται στο ζωοτροφείο του Πανεπιστημίου της Γρανάδας κάτω από στείρες συνθήκες, σε ένα φωτοπεριοδικό περιβάλλον (κύκλος φωτός-σκοταδιού κάθε 12 ώρες) και θερμοκρασία ( $22 \pm 1$  °C) με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα ποντίκια που χρησιμοποιούνται έχουν ηλικία μεταξύ 12 και 14 εβδομάδων και βάρος μεταξύ 25 και 30 gr. Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες:

- Ομάδα σήψης
- Ομάδα σήψης με χορήγηση μελατονίνης.

### **1.2.- Χειρουργική διαδικασία και φαρμακευτική μεταχείριση**

Η σήψη προκαλείται με διάτρηση του παχύ εντέρου (Wichterman et al., 1980). Τα ποντίκια ακινητοποιούνται με αναισθησία μέσω εκτενσίνης ενδοπεριτονικά σε συγκέντρωση 0,1 mg ανά κιλό σωματικού βάρους (kg), και ανοίγονται στην περιοχή της κοιλιακής κοιλότητας με μέτρια λαπαροτομία. Εντοπίζεται και ελευθερώνεται το τυφλό, που είναι το πρώτο τμήμα του παχύ εντέρου, και με εφαρμοζόμενη πίεση με τα δάκτυλα οδηγούνται τα κόπρανα από την περιοχή του ορθού, το τελευταίο τμήμα του παχύ εντέρου, προς το τυφλό. Κατόπιν δένεται η περιοχή του εντέρου ακριβώς κάτω από το τυφλό και γίνεται διάτρηση με βελόνα. Στη συνέχεια το έντερο τοποθετείται στην κοιλιακή κοιλότητα και η πληγή κλείνεται με συρραφή.

Η μελατονίνη εφαρμόζεται σε τέσσερις δόσεις των 30 mg/kg ανά κιλό σωματικού βάρους: 30 λεπτά πριν την πρόκληση της σήψης (ενδοπεριτονικά), 30 λεπτά, 4 ώρες και 8 ώρες μετά την εγχείρηση (υποδόρια). Τόσο η ομάδα των ποντικών της σήψης όσο και η ομάδα της σήψης με την χορήγηση μελατονίνης θανατώνονται μετά από 24 ώρες της επαγωγής της.

## **2.-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ**

Μετά την θανάτωση των ζώων αφαιρείται η καρδιά και πλένεται σε κρύο ισοτονικό διάλυμα. Ακολουθεί μια γρήγορη εμβάπτιση αυτής για 30 δευτερόλεπτα σε διάλυμα πρωτεΐνάσης K (1 mg/ml διαλύματος A: Μανιτόλη: 250 mM, EGTA: 0,5 mM, HEPES: 5 mM, BSA: 0,1 %, pH 7,4), και πλένεται αμέσως τρεις φορές σε διάλυμα A. Ακολουθεί τεμαχισμός

του ιστού σε μικρά κομμάτια και ομογενοποίηση αυτού σε διάλυμα A (10ml/gr ιστού) με τη χρήση ομογενοποιητή τεφλόν (Stuart Scientific, μοντέλο: SS2) στα 800 rpm. Στη συνέχεια το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 1000 rcf για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο της νέας φυγοκέντρησης μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρείται στα 10.300 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα της φυγοκέντρησης αναδιαλύεται σε 500μl διαλύματος A, τοποθετείται σε σωλήνες με βαθμίδωση περκόλης (Percoll) και φυγοκεντρείται σε 95.000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Η βαθμίδωση περκόλης παρασκευάζεται ως εξής: Σε ειδικούς σωλήνες υπερφυγοκέντρησης τοποθετούνται 1,4 ml διαλύματος B (μανιτόλη: 225 mM, EGTA: 1 mM, HEPES: 25 mM και BSA: 0,1%, pH 7,4) και 0,6 ml περκόλης. Το τμήμα με πυκνότητα ανάμεσα σε 1,052 και 1,075 g/ml αντιστοιχεί στο τμήμα που περιέχει τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια φαίνονται ως μια υπόλευκη ζώνη ανάμεσα στην περκόλη (κάτω τμήμα) και στο διάλυμα B (άνω τμήμα). Η ζώνη συλλέγεται με τη βοήθεια πιπέτας, πλένεται με 1ml διαλύματος A για να απομακρυνθούν υπολείμματα περκόλης και φυγοκεντρείται στα 10.300 g για 10 λεπτά. Η πλύση επαναλαμβάνεται δύο φορές και το ίζημα μετά την τελευταία φυγοκέντρηση φυλάσσεται στους -80°C. Η όλη διαδικασία γίνεται στους 0-4°C.

### ***3.-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ BLUE NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (BN-PAGE)***

Η BN-PAGE είναι μία μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών κυρίως από μιτοχόνδρια σε λειτουργική μορφή. Αφού τα δείγματα παρασκευαστούν προστίθεται σε αυτά χρωστική coomassie η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη και προσδένεται σε αυτά. Τα σύμπλοκα διαχωρίζονται με βάση την ποσότητα της χρωστικής που έχουν προσδέσει η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους τους.

#### ***3.1.-Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση***

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο των Schagger H. και Gebhard J. με μικρές τροποποιήσεις (Schagger H. & Gebhard J., 1991). 1 mg μιτοχονδρίων σε ίζημα, αναδιαλύονται σε 80 μl διαλύματος 0,75 M aminocaproic acid και 50mM Bis-Tris (pH 7,4) που περιέχονται επίσης και αναστολείς πρωτεασών: 1mM PMSF, 1μg/ml λεπεπτίνη και 1μg/ml πεπστατίνη και προστίθεται 15 μl 10% dodecyl-β-D-maltoside. Επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 30.000 g για

30 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών φωτομετρικά με τη μέθοδο Bradford (Bradford MM.,1976). Στο υπερκείμενο διάλυμα (100μl) προστίθεται 2,5 μl χρωστικής coomasie blue (5% coomasie blue G σε 0,5M aminocaproic acid).

### **3.2.-Ηλεκτροφόρηση**

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το σύστημα ηλεκτροφόρησης Phast-System semi-dry (Amersham Pharmacia Biotech). Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση είναι 4-15% συνεχής διαβάθμισης πολυακρυλαμιδίου κατάλληλη για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών από 150-1000kDa (Phastgel gradient 4-15%). Η ποσότητα της πρωτεΐνης που φορτώνεται σε κάθε πηγαδάκι δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 10 μg. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώνονται 5μl από το εκχύλισμα μιτοχονδρίων που έχουμε ετοιμάσει μαζί με την χρωστική coomasie. Από τη στιγμή που θα ετοιμαστεί το εκχύλισμα των μιτοχονδρίων δεν πρέπει να παραμείνει πάνω από 1 ώρα στον πάγο μέχρι την στιγμή της ηλεκτροφόρησης. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης προγραμματίζονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε τρία στάδια:

1. εφαρμογή τάσης 400V και ρεύμα 10mA στους 4°C για 2 λεπτά
2. εφαρμογή τάσης 400V και ρεύμα 1mA στους 4°C για 5 λεπτά
3. εφαρμογή τάσης 400V και ρεύμα 10mA στους 4°C για 40 λεπτά

Μετά την ηλεκτροφόρηση, επειδή συνήθως η χρώση με coomasie εξασθενεί πρέπει να γίνει επιπλέον χρώση της πηκτής.

### **3.3.-Χρώση της πηκτής με coomasie blue R**

Η διαδικασία χρώσης περιλαμβάνει 4 στάδια, ένα χρώσης και τρία αποχρωματισμού. Η πηκτή εμβαπτίζεται και ανακινείται ήπια σε διάλυμα χρώσης για 8 λεπτά στους 50°C, και στη συνέχεια σε διάλυμα αποχρωματισμού για 5 λεπτά στους 50°C. Το διάλυμα αποχρωματισμού ανανεώνεται και σε αυτό παραμένει άλλα 8 λεπτά, επίσης στους 50°C. Για ακόμη μία φορά ανανεώνεται το διάλυμα αποχρωματισμού θερμοκρασίας 50°C, και παραμένει σε αυτό 10 λεπτά. Η σύσταση του διαλύματος χρώσης είναι: 0,1% coomasie blue R, 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ. Το διάλυμα πριν τη χρήση πρέπει να διηθηθεί. Η σύσταση του διαλύματος αποχρωματισμού είναι: 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ.

## **4.ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western blot)**

Με την αποτύπωση κατά western μπορούμε να πιστοποιήσουμε την ύπαρξη ζωνών που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επίσης η

πρόσδεση του αντισώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου και έτσι η ζώνη που δίνει η ανοσοαποτύπωση είναι τόσο πιο έντονη όσο περισσότερη ποσότητα συμπλόκου υπάρχει. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να κάνουμε σύγκριση της ποσότητας των ενζυμικών συμπλόκων ανάμεσα στις δυο ομάδες δειγμάτων, από ποντίκια με επαγόμενη σήψη και από ποντίκια με επαγόμενη σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη.

#### **4.1.-Αποδιάταξη των πρωτεϊνών**

Πριν τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη οι πρωτεΐνες πρέπει να αποδιαταχθούν για να διευκολυνθεί η σύνδεση του αντισώματος με αυτές. Έτσι, μετά την ηλεκτροφόρηση και χωρίς να γίνει επιπλέον χρώση με coomassie η πηκτή εμβαπτίζεται σε αποδιατακτικό διάλυμα και ανακινείται για 30 λεπτά. Το διάλυμα περιέχει SDS 2%, διθειοθρεϊτόλη (DTT) 50 mM και Tris-HCl 50mM (pH 6,8).

Μετά την αποδιάταξη η πηκτή εξισορροπείται για 30 λεπτά σε διάλυμα ίδιας σύστασης με το διάλυμα της μεταφοράς κατά την ηλεκτροαποτύπωση. Το διάλυμα περιέχει 25mM Tris, 192mM γλυκίνη και 20% μεθανόλη (pH 8.4).

#### **4.2.-Ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Electroblotting)**

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από τη πηκτή σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη χρησιμοποιείται η συσκευή Phast-system. Μετά από την εξισορρόπηση στο διάλυμα μεταφοράς τοποθετείται πάνω στην μεμβράνη η οποία και αυτή πρώτα εξισορροπείται για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς. Εκατέρωθεν της μεμβράνης και της πηκτής τοποθετούνται 4 χαρτιά whatman εμβαπτισμένα και αυτά στο διάλυμα μεταφοράς. Τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια στο σύστημα με την άνοδο να είναι από την πλευρά της μεμβράνης και την κάθοδο από την πλευρά της πηκτής. Οι συνθήκες μεταφοράς είναι τάση 10V, 50mA για 45 λεπτά. Η μεταφορά στη μεμβράνη έχει ολοκληρωθεί εφόσον έχει μεταφερθεί όλο το μπλέ χρώμα από την πηκτή στην μεμβράνη.

#### **4.3.-Ανοσοανίχνευση των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (immunodetection)**

Η μεμβράνη πρέπει να επωαστεί τουλάχιστον για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 5% γάλακτος σε διάλυμα φωσφορικών PBS [1.4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 140mM NaCl, 2,7mM KCl (pH 7.4)] αν και προτείνεται η επώαση όλη τη νύχτα στους 4°C. Με αυτήν την επώαση αποφεύγεται η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος πάνω στην μεμβράνη.

Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης τρεις φορές για 5 λεπτά σε διάλυμα PBS που περιέχει 0,05% Tween-20.

Τώρα μπορεί πλέον η μεμβράνη να επωαστεί με το πρώτο αντίσωμα. Εμείς χρησιμοποιούμε τέσσερα ειδικά αντισώματα για μία υπομονάδα για τα τέσσερα από τα πέντε διαφορετικά ενζυμικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Για την NADH-αναγωγή του συνενζύμου Q χρησιμοποιείται αντίσωμα IgG<sub>1</sub> παραγόμενο σε ποντίκι ειδικό για την 39kDa υπομονάδα του συμπλόκου I. Για την ηλεκτρικο-αναγωγή του συνενζύμου Q χρησιμοποιείται αντίσωμα IgG<sub>1</sub> παραγόμενο σε ποντίκι ειδικό για την 70 kDa υπομονάδα του συμπλόκου II. Για την κυτοχρωμική αναγωγή χρησιμοποιείται αντίσωμα IgG<sub>2b</sub> παραγόμενο σε ποντίκι ειδικό για την πρωτεΐνη Fe-S του συμπλόκου III. Για την κυτοχρωμική οξειδάση χρησιμοποιείται αντίσωμα IgG<sub>2a</sub> παραγόμενο σε ποντίκι ειδικό για την υπομονάδα I του συμπλόκου IV. Τέλος για την συνθάση του ATP χρησιμοποιείται αντίσωμα IgG<sub>1</sub> παραγόμενο σε ποντίκι ειδικό για την β υπομονάδα του συμπλόκου V. Η μεμβράνη κόβεται σε 5 τμήματα όπου και κάθε ένα αντιστοιχεί και σε μία διαδρομή της πηκτής. Κάθε τμήμα της μεμβράνης επώαζεται για 2 ώρες με διαφορετικό αντίσωμα σε διάλυμα 1% γάλα/PBS. Οι συγκεντρώσεις επώασης κάθε αντισώματος ήταν οι εξής:

αντίσωμα για το σύμπλοκο I: 0.5μg/ml, αντίσωμα για το σύμπλοκο II: 0.1μg/ml, αντίσωμα για το σύμπλοκο III: 0.5μg/ml, αντίσωμα για το σύμπλοκο IV: 0.5μg/ml, αντίσωμα για το σύμπλοκο V: 0.2μg/ml.

Μετά τη δίωρη επώαση η μεμβράνη πλένεται τρεις φορές για 5 λεπτά σε διάλυμα PBS που περιέχει 0.05% Tween-20. Οι μεμβράνες όλες μαζί επωάζονται με αντίσωμα αντι-ποντικού μη ειδικό, παραγόμενο σε αίγα για μία ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση. Μετά την επώαση οι μεμβράνες πλένονται τρεις φορές για 5 λεπτά σε διάλυμα PBS που περιέχει 0.05% Tween-20. Αφού οι μεμβράνες τοποθετηθούν σε μία διαφάνεια προστίθεται υπεροξείδιο του υδρογόνου και τοποθετούνται στην συσκευή Kodak 2000GR για να ανιχνευθεί το σήμα που παράγεται κατά την αντίδραση του δευτέρου αντισώματος με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

## **5. ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ- ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΧΡΩΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (Histochemical staining)**

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την ενζυμική χρωμομετρική αντίδραση ενός ενζύμου μέσω της οποίας μπορεί να εκτιμηθεί η ενεργότητα του. Αφού το συγκεκριμένο ένζυμο διαχωριστεί με



ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, για να έχει την ενεργότητά του, επωάζεται η διαδρομή της πηκτής με τα ειδικά υποστρώματα για το ένζυμο αυτό. Η ένταση του χρώματος που θα δώσει η συγκεκριμένη ζώνη του ενζύμου μπορεί να μετρηθεί με πυκνομετρία. Με αυτή την τεχνική οι διαφορές στην ένταση των μπαντών από τις δυο ομάδες δειγμάτων που έχουμε συγκρίνονται και μας δίνουν μια εκτίμηση για τις διαφορές στις ενεργότητες των συμπλόκων.

Οι αντιδράσεις καταλυτικής χρώσης γίνεται αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση. Κάθε διαδρομή της πηκτής χωρίζεται από τις υπόλοιπες και κάθε μία επωάζεται με διαφορετικά υποστρώματα, αυτά που χρησιμοποιεί κάθε ένα από τα ενζυμικά σύμπλοκα. Τα υποστρώματα και οι συνθήκες επώασης για το κάθε ένα από τα σύμπλοκα είναι οι εξής:

- Σύμπλοκο I: 1mM Tris-HCl pH 7,4, 0.1 mg/ml NADH, 2,5 mg/ml NBT (nitrobluetetrazolium). Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η μέγιστη χρώση του συμπλόκου εμφανίζεται μετά από μισή ώρα επώασης.
- Σύμπλοκο II: 1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4, 5mM EDTA, 10mM KCN, 0,2mM phenazine methosulfate, 84mM succinate, 6mg/ml NBT. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου κατά προτίμηση σε σκοτάδι και η μέγιστη χρώση εμφανίζεται μετά από 1 ώρα
- Σύμπλοκο IV: 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4, 0,5mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 75mg/ml σουκρόζη, 2μg/ml καταλάση, 1mg/ml κυτόχρωμα c ανηγμένο. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι και η μέγιστη χρώση εμφανίζεται μετά από περίπου 5 ώρες.
- Σύμπλοκο V: 35mM Tris-HCl, pH 7.8, 270mM γλυκίνη, 14mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,2%  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 8mM ATP. Η επώαση γίνεται όλη τη νύχτα στο σκοτάδι.

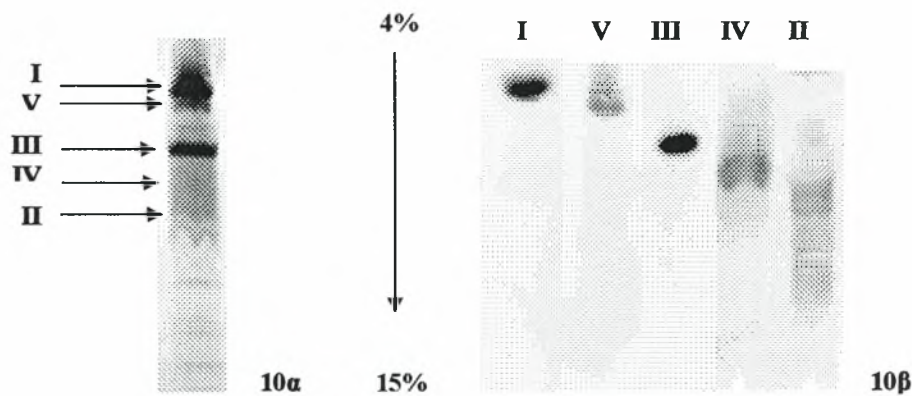
Εφόσον η εμφάνιση χρώματος βασίζεται στον σχηματισμό ιζήματος πάνω στο ενζυμικό σύμπλοκο δεν πρέπει να υπάρχει ανάδευση κατά την επώαση. Μετά την εμφάνιση χρώματος για να διατηρηθεί το χρώμα πρέπει να γίνει σταθεροποίηση με εμβάπτιση των τμημάτων της πηκτής σε διάλυμα 50% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος, ενώ για την φύλαξη των τμημάτων της πηκτής διατηρούνται σε 10% οξικό οξύ. Αυτό ισχύει για τα σύμπλοκα I, II, IV γιατί για το σύμπλοκο V το ίζημα σχηματίζεται και διατηρείται για λίγο χρονικό διάστημα.

# *Αποτελέσματα*



## 1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (BN-PAGE)

Με την ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες διαχωρίσαμε τα πέντε ενζυμικά σύμπλοκα και προσδιορίσαμε κάθε ένα από αυτά με ανοσοαποτύπωση (εικ. 10). Τα σύμπλοκα διαχωρίστηκαν με βάση το μέγεθος και όπως περιμέναμε πιο γρήγορα έτρεξε το σύμπλοκο II που έχει μοριακή μάζα 130 kDa. Ακολουθεί κατά σειρά μεγέθους το σύμπλοκο IV με μοριακή μάζα 200 kDa. Περίπου στην μέση της πηκτής εμφανίζεται το σύμπλοκο III. Το σύμπλοκο III έχει την ιδιαιτερότητα ότι ενώ μία μονάδα συμπλόκου έχει μέγεθος 250 kDa το λειτουργικό σύμπλοκο έχει μέγεθος 500 kDa αφού είναι ένα διμερές δυο μονάδων του συμπλόκου. Χωρίς να μπορούμε να προσδιορίσουμε με βεβαιότητα αν στην ηλεκτροφόρηση τρέχει ως διμερές ή μονομερές το πιο πιθανό είναι να είναι 500 kDa γιατί στην συγκεκριμένη περιοχή της πηκτής που εμφανίζεται και η ζώνη από την ανοσοαποτύπωση μάλλον αντιστοιχεί σε πάνω από 400 kDa. Το σύμπλοκο V είναι το αμέσως επόμενο σε μέγεθος με μοριακή μάζα 600 kDa και η ζώνη που αντιστοιχεί σε αυτό εμφανίζεται ακριβώς από κάτω από τη ζώνη του συμπλόκου I. Το σύμπλοκο I είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος με μοριακή μάζα 980 kDa και σε αυτό αντιστοιχεί η ζώνη που εμφανίζεται πρώτη, ψηλά στην αρχή της διαδρομής.

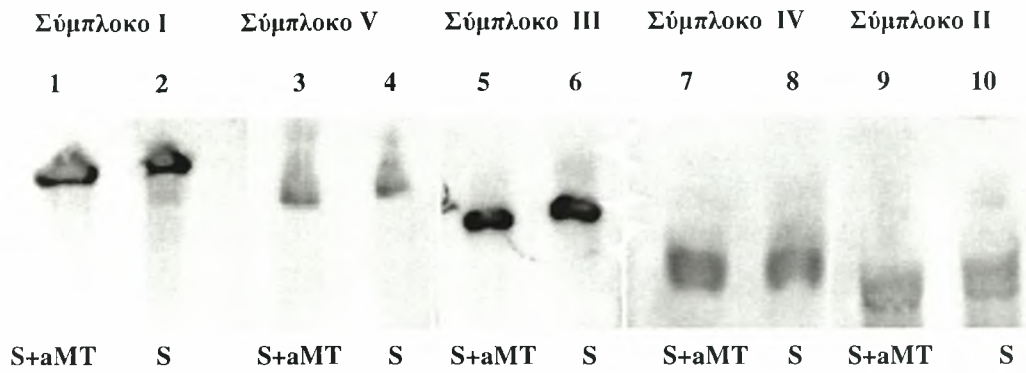


Εικόνα 10. Τα 5 ενζυμικά σύμπλοκα διαχωρισμένα σε πηκτή ακρυλαμιδίου 4-15%(10α). Η ταυτότητα των συμπλόκων προσδιορίστηκε με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για το κάθε ένα από αυτά (10β).

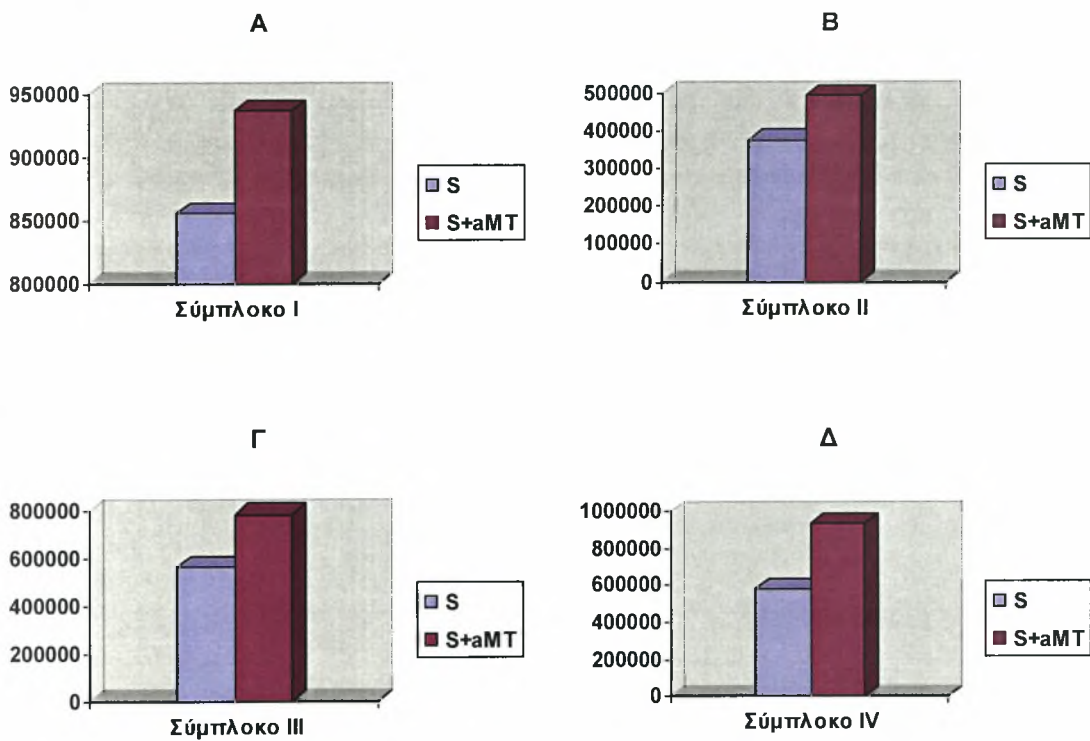
## 2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

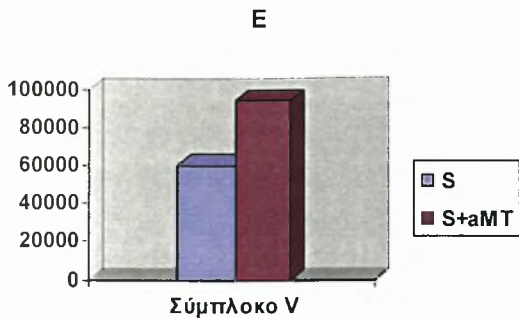
Με αποτύπωση κατά Western και πυκνομετρία των ζωνών συγκρίναμε τις ποσότητες των πέντε ενζυμικών συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη και στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη. Όπως φαίνεται στις εικόνες 11 και 12 η ποσότητα των συμπλόκων ήταν περισσότερη στα ποντίκια που χορηγήθηκε μελατονίνη. Συγκεκριμένα η μεγαλύτερη διαφορά στις ποσότητες παρατηρήθηκε στο ενζυμικό σύμπλοκο IV με 60% περισσότερη ποσότητα στα ποντίκια με μελατονίνη. Ακολουθεί το σύμπλοκο V με περισσότερη ποσότητα κατά 56%. Το σύμπλοκο III είχε διαφορά 39%, το σύμπλοκο II 31% και το σύμπλοκο I 10% με τη μικρότερη διαφορά στην ποσότητα. Οι ζώνες της ανοσοαποτύπωσης μετρήθηκαν με πυκνομετρία και η σύγκριση έγινε με το πρόγραμμα επεξεργασίας ζωνών της συσκευής Kodak. Οι τιμές για την

ένταση των ζωνών είναι ο μέσος όρος των τιμών από την επανάληψη του ίδιου πειράματος δύο φορές.



Εικόνα 11. Συγκρίνονται οι ζώνες των συμπλόκων από την αποτύπωση κατά Western ανάμεσα στα δείγματα από κατάσταση σήψης (S) και σε κατάσταση σήψης που χορηγήθηκε μελατονίνη (S+aMT)



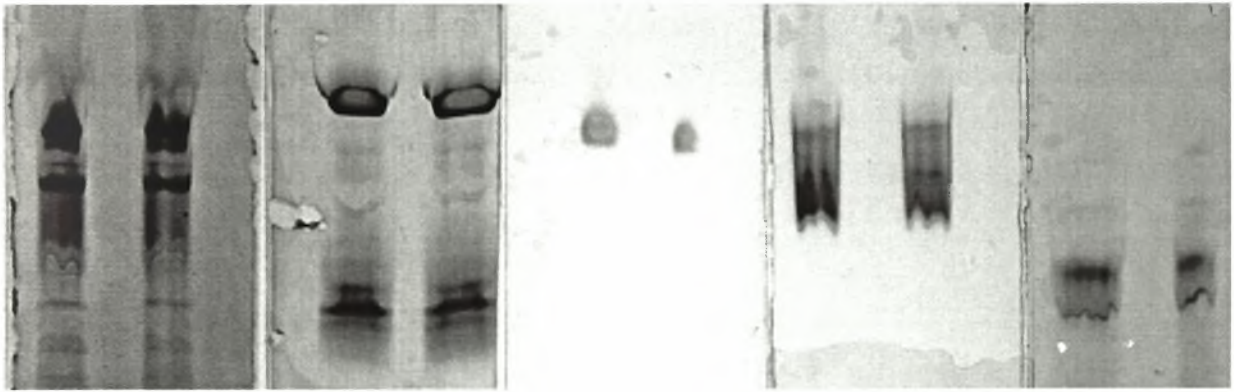


Εικόνα 12. (Α) Η διαφορά στην ποσότητα του συμπλόκου I (10%) σε κατάσταση σήψης (S) και σε κατάσταση με μελατονίνη). (Β) Η διαφορά της ποσότητας του συμπλόκου II (31%). (Γ) Η διαφορά της ποσότητας του συμπλόκου III (39%). (Δ) Η διαφορά της ποσότητας του συμπλόκου IV (60%). (Ε) Η διαφορά της ποσότητας του συμπλόκου V (56%).

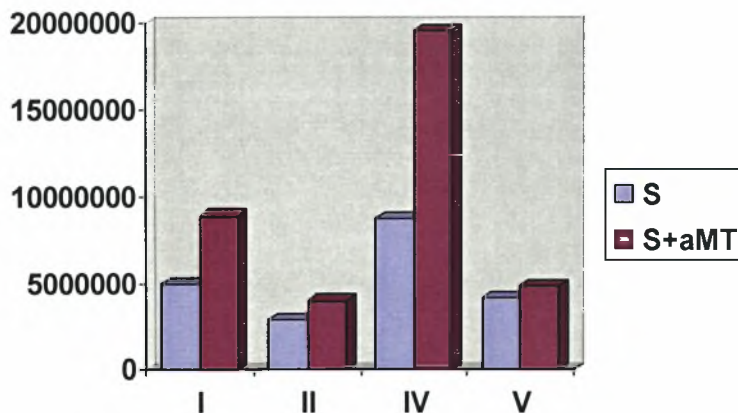
### 3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Με ιστοχημική χρώση (Histochemical staining) ή αλλιώς όπως ονομάζεται με ενζυμική χρωμομετρική αντίδραση προσδιορίζεται η ενεργότητα των συμπλόκων. Γίνεται χρώση των συμπλόκων και η ένταση των ζωνών υποδηλώνει την ενεργότητα των ενζύμων. Με πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών γίνεται σύγκριση της ενεργότητας των ενζύμων ανάμεσα στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη και στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη. Σε όλα τα ενζυμικά σύμπλοκα βρέθηκε μεγαλύτερη ενεργότητα στα ποντίκια που τους είχε χορηγηθεί μελατονίνη (Εικ. 13, 14). Η μεγαλύτερη διαφορά στην ενεργότητα παρουσίασε το σύμπλοκο IV. Τα ένζυμα από τα ποντίκια που τους χορηγήθηκε μελατονίνη είχαν 123% περισσότερη ενεργότητα από τα ποντίκια σε κατάσταση σήψης. Ακολουθεί το σύμπλοκο I με διαφορά στην ενεργότητα 79%. Το σύμπλοκο II είχε διαφορά 37% και τέλος το σύμπλοκο V είχε διαφορά 20%. Για το σύμπλοκο III δεν μπορέσαμε να μετρήσουμε την ενεργότητα με αυτόν τον τρόπο λόγω ότι στην βιβλιογραφία δεν αναφέρεται να έχει γίνει κάτι τέτοιο και οι προσπάθειές μας δεν οδηγούσαν σε επαναλήψιμο αποτέλεσμα. Για να εξασφαλίσουμε ότι οι διαφορές στις ενεργότητες δεν οφείλονται σε διαφορές στην αρχική συγκέντρωση δείγματος που φορτώθηκε επιλέγονται τυχαία δυο διαδρομές της ηλεκτροφόρησης όπου η μία αντιστοιχεί σε δείγμα από ποντίκια με σήψη και η άλλη σε δείγμα από ποντίκια με σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη και γίνεται χρώση με coomassie (Εικ. 13, διαδρομές 1,2). Κατόπιν με πυκνομετρεία των ζωνών που δεν αντιστοιχούν σε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας γίνεται φανερό ότι οι ζώνες ανάμεσα στα δύο δείγματα είναι στατιστικά ίδιες και άρα οι διαφορές στις ενεργότητες των συμπλόκων δεν οφείλονται σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

Χρώση coomasie		Σύμπλοκο I		Σύμπλοκο V		Σύμπλοκο IV		Σύμπλοκο II	
S+aMT	S	S+aMT	S	S+aMT	S	S+aMT	S	S+aMT	S
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



**Εικόνα 13.** Σύγκριση των ζωνών της ενζυμικής χρωμομετρικής αντίδρασης στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη και στα μιτοχόνδρια από ποντίκια με σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη (διαδρομές 3-10). Διαδρομές 1 και 2 χρώση με coomasie. Διαδρομή 3: σύμπλοκο I σήψη+μελατονίνη. Διαδρομή 4: σύμπλοκο I σήψη. Διαδρομή 5: σύμπλοκο V σήψη+μελατονίνη. Διαδρομή 6: σύμπλοκο V σήψη. Διαδρομή 7: σύμπλοκο IV σήψη+μελατονίνη. Διαδρομή 8: σύμπλοκο IV σήψη. Διαδρομή 9: σύμπλοκο II σήψη+μελατονίνη. Διαδρομή 10: σύμπλοκο II σήψη. Η σύγκριση των ζωνών έγινε με πυκνομετρία. Η χρώση με coomasie και η πυκνομετρία των ζωνών εκτός των συμπλόκων έδειξε ότι οι ζώνες είχαν την ίδια τιμή και άρα πρόκειται για ίδια αρχική συγκέντρωση δείγματος που φορτώθηκε.



**Εικόνα 14.** Η σύγκριση των ζωνών με πυκνομετρία, που αντιστοιχεί σε ενεργότητα ενζύμου, ανάμεσα στα σύμπλοκα από ποντίκια με σήψη (S) και από ποντίκια με σήψη που τους χορηγήθηκε μελατονίνη (S+aMT)

# Συζήτηση



# **1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗΣ ΣΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΗΨΗ**

Στη παρούσα εργασία για πρώτη φορά μελετήθηκε η επίδραση της μελατονίνης κατά την κατάσταση σήψης στα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας στην καρδιά. Μέχρι τώρα ήταν γνωστή η αναστολή των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας κατά την σήψη στο ήπαρ και τους πνεύμονες καθώς και η επίδραση της μελατονίνης στα σύμπλοκα I και IV οσον αφορά την επανάκτηση μέρους της ενεργότητάς τους (Escames et al., 2003). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ξεκάθαρα την επίδραση της μελατονίνης στην βελτίωση της ενεργότητας των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, φαίνεται ότι η επίδραση αυτή δεν εξαρτάται απλά και μόνο από την αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης αλλά περιλαμβάνεται και κάποια σχέση αλληλεπίδρασης με τα ένζυμα.

Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν οι διαφορές στην ποσότητα και στην ενεργότητα των πέντε μιτοχονδριακών συμπλόκων κατά τη σήψη, χωρίς και με χορήγηση μελατονίνης.

## **1.1.- Σύμπλοκο I και μελατονίνη**

Το σύμπλοκο I παρουσίασε μια από τις μεγαλύτερες αυξήσεις στην ενεργότητα (79%) μετά από χορήγηση μελατονίνης. Αντίθετα η αύξηση της ποσότητας του συμπλόκου μετά τη χορήγηση της μελατονίνης ήταν σχετικά μικρή (10%). Αυτό μας οδηγεί στη σκέψη ότι η αύξηση της ενεργότητας κατά την χορήγηση μελατονίνης δεν οφείλεται σε αύξηση της ποσότητας του ενζύμου ή τουλάχιστον ακόμη και αν επάγεται η έκφρασή του ή για κάποιο λόγο αυξάνεται η ποσότητά του κατά ένα μικρό ποσοστό, η ενεργότητα επάγεται και εξαιτίας κάποιας άλλης αλληλεπίδρασης με την μελατονίνη. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει η μελατονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και σύμφωνα με την ιδιαίτερα λιπόφιλη φύση της μπορεί να διαπερνά τις λιπιδικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων και να φτάνει σε σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις στο εσωτερικό αυτών. Αυτό της επιτρέπει να προφυλάσσει τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας από τη δράση ελευθέρων ριζών και τοξικών ουσιών προφυλάσσοντας έτσι και την λειτουργία των ενζύμων. Ένας από τους λόγους της αυξημένης ενεργότητας είναι και αυτός. Ωστόσο δεν πρέπει να είναι ο μόνος και ιδιαίτερα από τη στιγμή που γνωρίζουμε από άλλες μελέτες, ότι άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C και η E και μάλιστα σε δόσεις  $10^5$ - $10^6$  φορές μεγαλύτερες από την μελατονίνη δεν μπόρεσαν να μεταβάλλουν τις ενεργότητες των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (Martin et al. 2000). Αυτό μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η μελατονίνη, με το υψηλό δυναμικό αναγωγής (0.94 V), μπορεί να αλληλεπιδρά με τα ένζυμα της

αναπνευστικής αλυσίδας, να προσφέρει και να δέχεται ηλεκτρόνια βελτιώνοντας έτσι την ροή των ηλεκτρονίων. Κάτι τέτοιο υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι το σύμπλοκο I είναι το σημείο εισαγωγής των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και ότι αυτή η διαφορά μεταξύ ποσότητας και ενεργότητας υπάρχει μόνο στο σύμπλοκο I.

### **1.2.- Σύμπλοκο II και μελατονίνη**

Στο σύμπλοκο II παρατηρήθηκε μία αύξηση στην ποσότητα του ενζύμου κατά 31% και η αύξηση στην ενεργότητα ήταν επίσης 37%. Αυτό μας οδηγεί να σκεφτούμε ότι η αύξηση στην ενεργότητα του συμπλόκου από την μελατονίνη οφείλεται στην αύξηση από την ποσότητα. Η ποσότητα μπορεί να αυξάνεται λόγω επαγωγής της σύνθεσης του ενζύμου και λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης της μελατονίνης το οποίο είναι και το πιο πιθανό γιατί για την πρώτη υπόθεση δεν υπάρχει κανένα στοιχείο που να την υποστηρίζει όπως σε άλλα σύμπλοκα. Εκτός αυτού οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες του συμπλόκου II δεν κωδικοποιούνται από το mtDNA όπου εντοπίζεται ιδιαίτερα η δράση της μελατονίνης. Το σύμπλοκο II και το σύμπλοκο I προσφέρουν και τα δύο ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ωστόσο μόνο στο σύμπλοκο I συμβαίνει άντληση πρωτονίων καθιστώντας το πιο σημαντικό για την βιοενεργητική κατάσταση των μιτοχονδρίων και ιδιαίτερα στην κατάσταση της σήψης όπου επηρεάζεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων σε μεγάλο βαθμό. Σίγουρα όμως ακόμη και η μικρή αύξηση στην ποσότητα του συμπλόκου II συμβάλει στην καλύτερη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και άρα των μιτοχονδρίων.

### **1.3.- Σύμπλοκο III και μελατονίνη**

Για το σύμπλοκο III παρατηρήσαμε αύξηση κατά 39% στην ποσότητα ωστόσο δεν έχουμε στοιχεία για την ενεργότητα του συμπλόκου. Η ενεργότητα του συμπλόκου θα μπορούσε να μετρηθεί φωτομετρικά επιάζοντας εκχύλισμα μιτοχονδρίων με τα υποστρώματα του συμπλόκου III και χρησιμοποιώντας ως δέκτη ηλεκτρονίων χρωμοφόρες ενώσεις (Btusque et al. 2002). Ωστόσο το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η αντίδραση μπορεί να είναι κατά ένα μέρος μη ειδική αφού στο εκχύλισμα των μιτοχονδρίων υπάρχει πληθώρα ενζύμων που μπορεί να χρησιμοποιεί κατά ένα ποσοστό και τα υποστρώματα του συμπλόκου III. Αυτό αποφεύγεται με την ιστοχημική χρώση αφού μετράται η ένταση της ζώνης στην οποία αναμένεται το σύμπλοκο. Για παράδειγμα αυτό συνέβη κατά τον προσδιορισμό της ενεργότητας του συμπλόκου I. Η αντίδραση με τα υποστρώματα, που ένα από αυτά ήταν και NADH, έδωσε και άλλες ζώνες πολύ μικρότερου μοριακού βάρους από το σύμπλοκο I. Σύμφωνα και με την βιβλιογραφία (Sabar et al. 2003) πρόκειται για άλλες NADHάσες που υπάρχουν. Αν ο προσδιορισμός είχε γίνει φωτομετρικά πιθανότατα θα μετρούνταν και η δράση των NADHασών.

### **1.4.- Σύμπλοκο IV και μελατονίνη**



Στο σύμπλοκο IV παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη επαγωγή της ενεργότητας από την μελατονίνη (123%) καθώς επίσης και η μεγαλύτερη αύξηση της ποσότητας από τα ένζυμικά σύμπλοκα (60%). Προφανώς η επαγωγή της ενεργότητας του ενζύμου οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό και στην αύξηση της ποσότητας του ενζύμου. Μέχρι τώρα χωρίς να υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να το αποδεικνύουν, έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός δράσης η επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες I, II και III του συμπλόκου IV και κωδικοποιούνται από το mtDNA (Escames et al., προσωπική επικοινωνία). Αυτό μπορεί να προσδιοριστεί με ποσοτική RT-PCR για τα τρία mRNAs που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες. Παρόλα αυτά σίγουρα ένα μέρος της αυξημένης ενεργότητας οφείλεται και στην ικανότητα της μελατονίνης να αντιδρά με το μονοξείδιο του αζώτου. Το NO<sup>•</sup>, ως αναστολέας της κυτοχρωμικής οξειδάσης, ανταγωνίζεται το οξυγόνο για την πρόσδεση στο σύμπλοκο IV στο κέντρο κυτοχρώματος.

### **1.5.- Σύμπλοκο V και μελατονίνη**

Το σύμπλοκο V είχε την μικρότερη αύξηση ενεργότητας από τα σύμπλοκα (20%) παρόλο που η αύξηση της ποσότητας ήταν αρκετά μεγαλύτερη (56%) στο δείγμα από ποντίκια που τους χορηγήθηκε μελατονίνη. Όσο αφορά την ενεργότητα, η μελατονίνη δεν τη μεταβάλλει πολύ. Αυτό ίσως να μην οφείλεται στο ότι η μελατονίνη δεν αλληλεπιδρά αλλά ίσως γιατί η βλάβη στο σύμπλοκο V να επέρχεται στην τελευταία φάση της σήψης. Πρόσφατα, σε μία μελέτη που έγινε στα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατά την διάρκεια παρασιτικής μόλυνσης (Vyatkina et al. 2004) βρέθηκε ότι το σύμπλοκο V σε αντίθεση με τα σύμπλοκα I-IV επηρεάζεται κατά την τελευταία φάση. Έτσι καθώς τα ποντίκια θανατώνονται μόνο μετά από 24 ώρες της επαγωγής της σήψης ίσως ακόμη να μην έχει επηρεαστεί πολύ το σύμπλοκο V. Αυτό το σύμπλοκο παίζει σπουδαίο ρόλο στην βιονεργητική του κυττάρου αφού είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ενέργειας του κυττάρου, του ATP. Είναι λογικό λοιπόν να περιμένουμε να είναι από τα τελευταία στοιχεία του μιτοχονδρίου που επηρεάζονται. Κάτι επίσης που συνηγορεί με αυτό είναι το γεγονός ότι το σύμπλοκο V σε αντίθεση με τα σύμπλοκα από I-IV δεν έχει οξειδωαναγωγικό κέντρο (Fe-S). Τα οξειδωαναγωγικά κέντρα πιθανότατα να είναι τα σημεία-στόχοι της βλάβης εξαιτίας του NO<sup>•</sup> (Pearce et al., 2001). Αυτό συνεπάγεται ότι το NO<sup>•</sup> που παράγεται από τη iNOS και υπάρχει σε πολύ μεγάλα ποσοστά κατά την σήψη δεν επηρεάζει το σύμπλοκο V. Γι αυτό η μελατονίνη που έχει την ιδιότητα να προσδένει το NO<sup>•</sup> δεν επηρεάζει τόσο την ενεργότητα του συμπλόκου αφού μάλλον η βλάβη που προκαλείται σε αυτό δεν μεσολαβείται από το NO<sup>•</sup>. Όσον αναφορά την ποσότητα του συμπλόκου είναι σίγουρο ότι δεν ταιριάζει με την τόσο μικρή αύξηση στην ενεργότητα. Πιθανότατα να επάγεται η έκφραση της β αλυσίδας που ανιχνεύεται από το αντίσωμα αλλά επειδή όλο αυτό γίνεται κάτω από συνθήκες

εξαιρετικά μεγάλων επιπέδων οξειδωτικού στρες να συντίθενται μονάδες συμπλόκου β που τελικά να μην έχουν την λειτουργικότητα που θα έπρεπε.

Συμπερασματικά φαίνεται η μελατονίνη να έχει και μια διαφορετική μορφή αλληλεπίδρασης με κάθε ένα από τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, κάτι που φαίνεται στα διαφορετικά αποτελέσματα ενεργότητας και ποσότητας των συμπλόκων από την επίδραση της μελατονίνης.

Μελλοντικά η έρευνα θα μπορούσε να στοχεύσει στον προσδιορισμό μόνο της απευθείας αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με τη μελατονίνη, μέσω επώασης των μιτοχονδρίων *in vitro*. Αν δηλαδή η επώαση με μελατονίνη γίνει, αφού πρώτα τα μιτοχόνδρια έχουν απομονωθεί, τότε δεν θα παρατηρήσουμε αύξηση στην ενεργότητα των ενζυμικών συμπλόκων εξαιτίας της αντιοξειδωτικής δράσης της μελατονίνης, όπως για παράδειγμα η δέσμευση κάποιων ελευθέρων ριζών. Ακόμη με αυτό τον τρόπο θα αποφύγουμε να μετρήσουμε την επαγωγή της ενεργότητας των ενζύμων που οφείλεται στην επίδραση της μελατονίνης σε άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, που και αυτοί με την σειρά τους συμβάλουν σε μια καλύτερη κατάσταση των μιτοχονδρίων και άρα των ενζύμων τους επίσης.

Ένας επιπλέον στόχος θα ήταν να διερευνήσουμε περισσότερο την φυσιοπαθολογία της σήψης, αλλά και να προσδιορίσουμε στο κατά πόσο οφείλεται η βλάβη των μιτοχονδριακών συμπλόκων στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου. Αυτό θα μας το επέτρεπε η διεξαγωγή πειραμάτων προσδιορισμού ποσότητας και ενεργότητας των συμπλόκων με ποντίκια knockout για την iNOS, καθώς και βιοχημικές δοκιμές με τις οποίες θα εκτιμούνταν άλλα αντιοξειδωτικά συστήματα του κυττάρου όπως ο προσδιορισμός της ολικής, οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης. Ακόμη και ο προσδιορισμός των ελευθέρων ριζών θα ήταν πιθανός με χρωματογραφία. Όλα αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να διαλευκάνουν περισσότερο τα διάφορα στάδια της σήψης, πολλά από τα οποία παραμένουν ακόμη αδιευκρίνιστα.

Ωστόσο, κάτι που θα πρέπει πάντα να έχουμε υπόψη είναι τα ρίσκα που λαμβάνουμε κατά την εξωγενή χορήγηση ουσιών. Για την μελατονίνη δεν γνωρίζουμε ακόμη επακριβώς τον μηχανισμό δράσης και πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί από την στιγμή που παρουσιάζει ορμονική δράση και φαίνεται να δρα στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων.

# *Βιβλιογραφία*

## 1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ackrell BAC, Johnson MK, Ginsalus RP, Cechini G (1992). Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase. In: *Biochemistry of Flavoenzymes*. Muller F, ed. Boca Ratón, FL: CRC Press. 229.

Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ (1993). Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82: 253.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 12 (2): 100.

Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2001). Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30: 65.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2002). Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Topics Med. Chem.* 2: 133.

Angus DC, Linde-Zwirbe WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky, MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit. care Med.* 29: 1303.

Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio Mde L, Herrera F, Martin V, Rodriguez C (2002). Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943 (2): 163.

Axerold J, Wissbach H (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science* 131: 1312.

Barja G (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomemb.* 31: 347.

Bathia M, Mochhala S (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202: 145.

Becker-André M, Wiesenberg I, Scharren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269: 28531.

Benítez-King G, Antón-Tay F (1996). In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290: 191.

Beutler B (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257.

Biochemistry I, Stryer, 3<sup>η</sup> Έκδοση.

Bóveris, A., Costa, L.E., Poderoso, J.J., and Cadenas, E. (2000). Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899: 121.

Boyer PD (1993). The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 215.

Boyer PD (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7;72:248-54

Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R491

Brookes PS, Levonen A-L, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 755.

Brown, GC (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 351.

Brown, GC (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1504: 46.

Brusque AM, Rosa RB, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CAJ, Silva CG, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem. Int.* 40: 593.

Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Bóveris A (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic. Res.* 33: 747.

Cecil textbook of medicine. Goldman, Ausiello. 22<sup>nd</sup> Έκδοση (Saunders)

Chu SC, Marks Konczalick J, Wu HP, Banks TC, Moss J (1998). Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 871.

Cohen J (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885.

Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D (1999). Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 13: 1537.

Das UN (2000). Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit. care* 4: 290.

Erren TC, Reiter RJ, Piekarski C (2003). Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* 90 (11): 485.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo, D (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 17: 932.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003). Molecular mechanism of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 100: 171.

Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhof, C, Redl H, Werdan K, Zierz S (2002). Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci. Rep.* 22: 99.

Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I (2001). Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr. Res.* 50: 756.



- Guha M, Mackman N (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signalling* 13: 85.
- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM (1994). ROR $\gamma$ . The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1976.
- Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17:55.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376: 660.
- Kavetnoy I (2002). Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol. Lett.* 1: 92
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 255.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A (1998). Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24 (2): 83.
- León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol.* 58: 967.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan D-X, Reiter RJ (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75: 765.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38 (1): 1.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Lin AW, Chang CC, McCormick, CC (1996). Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 271: 11911.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene- two upstream regions mediate induction by interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9730.
- Margulis L (1981). Symbiosis in cell evolution. *Freeman, San Francisco.*
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B (1996). Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 307.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14: 1677.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D (2002). Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain in liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 348.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene



expression. *Cell Mol. Life Sci.* 59 (10): 1706-1713.

McCord CP, Allen FB (1917), Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 13: 207.

Nicholls DG, Budd SL (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80: 315.

Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, Peluffó G, Trostchansky A, Bathány C, Radi R, Rubbo H, Hurtado FJ (2004). Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med.* In press.

Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int. Lett.* 18: 49.

Palencia E (2004). Curso sepsis grave. *Revista electrónica de medicina intensiva* 4: 1.

Pierrefiche G, Laborit H (1995). Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 30: 213.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöper F, Bóveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89.

Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schöper F, Cadenas E, Bóveris A (1998). Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by isolated beating rat heart. *Am. J. Physiol.* 274: C112.

Proctor PH (1989) Free radicals and human disease. *CRC handbook of free radicals and antioxidant* 1: 209.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55: PL455.

Quay WB (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 710.

Reiter RJ (1991). Pineal melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: C153.

Reiter RJ (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 56: 359.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, León J, Czarnocki Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50: 1129.

Sabar Mohammed, Dominique Gagliardi, Janneke Balk & Christopher J. Leaver (2003). ORFB is a subunit of F1FO-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO reports* 4 381-386 (2003)

Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488.

Schagger H, Gebhard J (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199: 223-231.

Scheffler IE (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1: 3.

- Skulachev VP (1999). Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* 20: 139.
- Suden D (1979). Circadian changes in rat pineal tryptophan content: lack correlation with serum tryptophan. *J. Neurochem.* 33: 811.
- Szmuskowicz AW, Heinzelman RV (1960). Synthesis of N-acetilmethoxytryptamine. *J. Org. Chem.* 25: 287. Takeuchi O, Akira S (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1: 625.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepard AM (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 614.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BL, Limson J, Weintraub ST, Qi W (2000). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 1177.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002). Chemical and physical properties and potential mechanism: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topics Med. Chem.* 2: 181.
- Titheradge MA (1999). Nitric oxide in septic shock. *Biochem. Biophys. Acta* 1411: 437.
- Trumpower BL (1990). The proton motive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 265: 11409-11412.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Ohta S, Kagawa Y (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269: 1069.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552.2: 335.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Ueda T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999). Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 838.
- Vicent, J-L, Zhang H, Szabo H, Preiser J-C (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 1781.
- Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N (2004). Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim. Biophys. Acta* 1689: 162.
- Walker, JE (1995). Determination of the structures of respiratory chain enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1271: 221.
- Wang T, Ward M, Grabowski P, Secombes CJ (2001). Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* 358: 747.
- Weicker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus, DC, Ester G (2003). Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 31: 2316.

Wood PM (1987). The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trends Biochem. Sci* 12: 250.

Xie QW, Whisnant R, Nathan C (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon  $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177: 1779.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sujiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signalling pathway. *Science* 301: 640.

Zhang H, Chen X, Teng X, Snead C, Catravas JC (1998). Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1873.

