



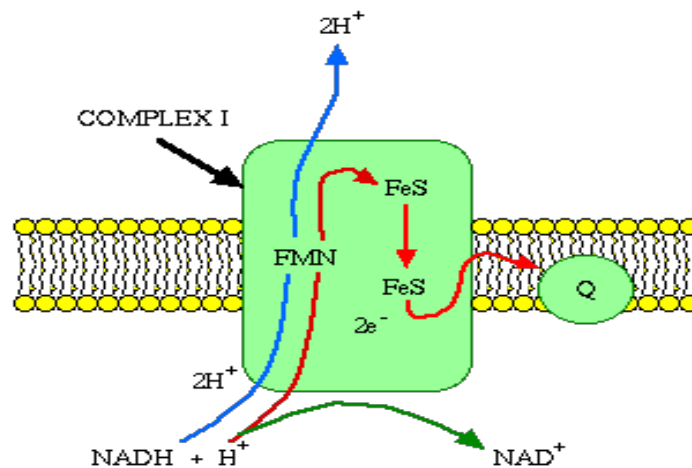
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ

ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q (ΣΥΜΠΛΟΚΟ I) ΣΕ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ



Πτυχιακή εργασία
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ζίφα Αιμιλία

ΠΟΖΑΝΤΖΗ ΑΓΛΑΙΑ

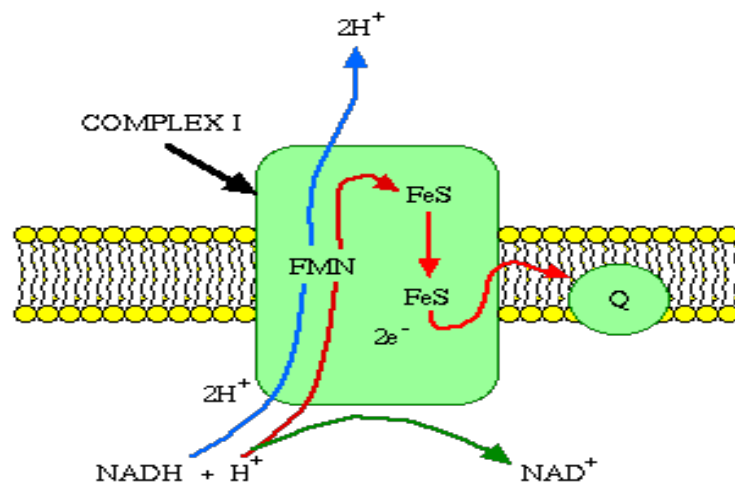
Λάρισα, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

**MEASUREMENT OF THE ACTIVITY OF ENZYME COMPLEX I OF THE
RESPIRATORY CHAIN IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS**



**Undergraduate thesis
Supervisor: Zifa Aimilia**

POZANTZI AGLAIA

Larissa, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ	Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία δεν θα είχε υλοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη της επιβλέπουσας καθηγήτριας, κυρίας Ζίφα Αιμιλίας, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις συνεπιβλέπουσες της εργασίας! Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία για τη βοήθεια και τις συμβουλές της. Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Δανιήλ Ζωή, για τη συνεργασία και την παροχή των δειγμάτων που χρειαστήκαμε.

Θα ήθελα, ακόμα, να εκφράσω ευχαριστίες στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, ιδιαίτερα στους μεταπτυχιακούς φοιτητές και τους υποψήφιους διδάκτορες, που ήταν πρόθυμοι να στηρίξουν την προσπάθειά μας, αλλά και να μας βοηθήσουν να εξοικειωθούμε με το εργαστηριακό περιβάλλον.

Τέλος, ευχαριστώ τον Μούικη Ανδρέα και τη Ρότσι Κωνσταντίνα για τη συνεργασία μας σε αυτή την απαιτητική προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Μιτοχόνδρια	8
1.2 Αναπνευστική Αλυσίδα Μεταφοράς Ηλεκτρονίων	10
1.3 Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q	13
1.4 Σαρκοείδωση	14
1.5 Σκοπός	21
2. ΜΕΘΟΔΟΙ / ΥΛΙΚΑ	22
2.1 Απομόνωση Λεμφοκυττάρων	22
2.2 Επεξεργασία Δείγματος	25
2.3 Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου	26
2.4 Πρωτόκολλο Μέτρησης Δραστικότητας Οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH – Q	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1 Κινητικότητα Οξείδωσης του NADH	35
3.2 Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα της Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους NADH – Q	41
3.3 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας με Αποτελέσματα Προηγούμενων Ερευνών	42
3.4 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας Ατόμων με Σαρκοείδωση και Ατόμων Control	43
4. ΣΥΜΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι υψίστης σημασίας για τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αφού τα προμηθεύουν με την απαιτούμενη για την επιβίωσή τους ενέργεια. Λόγω του μηχανισμού αντιγραφής των μιτοχονδρίων, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες, το μιτοχονδριακό DNA (*mt-DNA*) είναι επιρρεπές σε μεταλλάξεις, επιφέροντας μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες. Αναζητώντας την αιτιολογία χρόνιων ασθενειών των πνευμόνων, ολοένα και περισσότερες έρευνες καταλήγουν σε μεταλλάξεις του *mt-DNA*. Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια άγνωστης, προς το παρόν, αιτιολογίας, η οποία σε ποσοστό 90% προσβάλλει τους πνεύμονες. Σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντικός αριθμός μεταλλάξεων σε *mt-tRNA* γονίδια ασθενών με σαρκοείδωση, καθώς και ένδειξη μειωμένης ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του μιτοχονδριακού ενζύμου Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους *NADH-Q* (Σύμπλοκο I), σε σχέση με υγιή άτομα. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε περαιτέρω η ενζυμική δραστηριότητα της Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους *NADH-Q* ασθενών με σαρκοείδωση. Το πείραμα βασίστηκε σε περιφερικό αίμα ασθενών, από το οποίο απομονώθηκαν τα λεμφοκύτταρα, ως πηγή μιτοχονδρίων. Η ενζυμική δραστηριότητα μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά. Η σύνδεση της σαρκοείδωσης με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και συγκεκριμένα με βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί να θέσει τα θεμέλια για την αποσαφήνιση της αιτιολογίας της και, μελλοντικά, για την ανάπτυξη πιο στοχευμένης θεραπείας.

ABSTRACT

Mitochondria are of great importance for the survival of eukaryotic cells as they provide them with energy. The mechanism of mitochondrial DNA (mt-DNA) replication, combined with environmental factors, causes mitochondria to be prone to mutations, leading to mitochondrial dysfunctions. An increasing number of experiments, investigating the etiology behind chronic lung diseases, lean towards mt-DNA mutations. Sarcoidosis is a multisystemic disease of unknown etiology, which attacks lungs 90% of the times. A previous research conducted in the Genetics, Evolutionary and Comparative Biology laboratory detected a statistically significant number of mutations on sarcoidosis patients mt-tRNA genes. Furthermore, it was indicated that the enzyme activity of the mitochondrial enzyme NADH-Q Oxidoreductase (Complex I) is lower in sarcoidosis patients compared to the control samples. The purpose of this thesis is to study further the NADH-Q Oxidoreductase enzymatic activity of sarcoidosis patients. The experiment was carried out using mitochondria-rich lymphocytes, isolated from sarcoidosis patients peripheral blood samples. The enzyme activity was measured spectrophotometrically. A possible relation between sarcoidosis and mitochondrial dysfunction, particularly electron transport chain dysfunction, could lay the foundation for the clarification of the diseases' etiology as well as for the development of a more advanced treatment.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μιτοχόνδρια

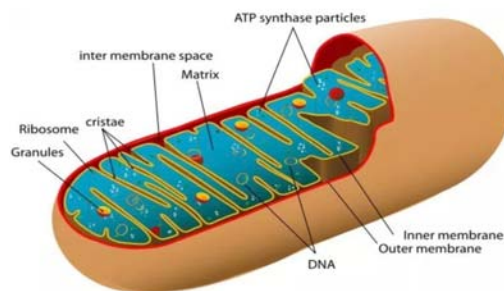
Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και ικανοποιούν τις ενεργειακές και μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου μέσα στο οποίο βρίσκονται (*Sedlackova and Korolchuk, 2018*). Ετυμολογικά, η λέξη *μιτοχόνδριο* προέρχεται από τις αρχαιοελληνικές λέξεις *μίτος* (νήμα, κλωστή) και *χόνδρος* (με τη σημασία της λέξης *κόκκος*) (*Online Etymology Dictionary*).

Προέλευση και γενετικό υλικό

Πιστεύεται ότι τα μιτοχόνδρια προέρχονται από βακτήρια, τα οποία κατά τη διάρκεια της εξέλιξης συμβιωτικών οργανισμών εξελίχθηκαν σε απαραίτητα συστατικά των ευκαρυωτικών κυττάρων (*Karlson, Doenecke, Koolman 1960*). Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και έχουν το δικό τους DNA. Το μιτοχονδριακό DNA έχει συνήθως κυκλική μορφή και το μέγεθός του διαφέρει πολύ ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στον άνθρωπο, το μιτοχονδριακό DNA (*mt-DNA*) αποτελείται από 16.569 kb και κωδικοποιεί για 13 πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και τα μικρά και μεγάλα ριβοσωμικά RNA (*rRNA*) και αρκετά tRNA. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια περιέχουν πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA (*Berg, Tymoczko, Stryer, 2012*). Το μιτοχονδριακό DNA του οργανισμού προέρχεται σχεδόν εξ ολοκλήρου από τα μητρικά μιτοχόνδρια, δεδομένου ότι κατά τη γονιμοποίηση ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου εισδύει στο ωάριο και πολύ λίγο από το κυτταρόπλασμα. Μεταλλάξεις, ως εκ τούτου, του μιτοχονδριακού DNA κληρονομούνται σχεδόν πάντα από την μητέρα (*Karlson, Doenecke, Koolman 1960*).

Δομή

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει 5 με 2000 μιτοχόνδρια. Γενικά, το σχήμα τους ποικίλλει. Συνήθως, έχουν σφαιρικό ή κυλινδρικό σχήμα. Τα απλά κυλινδρικά μιτοχόνδρια συνήθως έχουν διάμετρο τουλάχιστον 0.2 μm και μήκος 20 μm (*Perkins and Frey, 2000*). Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μια μεγάλων διαστάσεων εσωτερική μεμβράνη με της πτυχώσεις. Οι πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφίες (*cristae*). Έτσι, δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: (1) ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και (2) η μήτρα (μιτοχονδριακή θεμέλια ουσία, *matrix*) η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (*Εικόνα 1*). Η μιτοχονδριακή μήτρα είναι ο χώρος όπου συντελούνται οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Αντιθέτως, η οξειδωτική φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη. Αυτή η αύξηση της επιφάνειας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία προκύπτει λόγω των ακρολοφιών, δημιουργεί πολύ περισσότερες θέσεις για την οξειδωτική φωσφορυλίωση από ό,τι θα συνέβαινε σε μια απλή μεμβράνη χωρίς πτυχώσεις. Ο άνθρωπος έχει συνολικά 14.000 m² εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όσο περίπου τρία γήπεδα ποδοσφαίρου! (*Berg, Tymoczko, Stryer, 2012*)



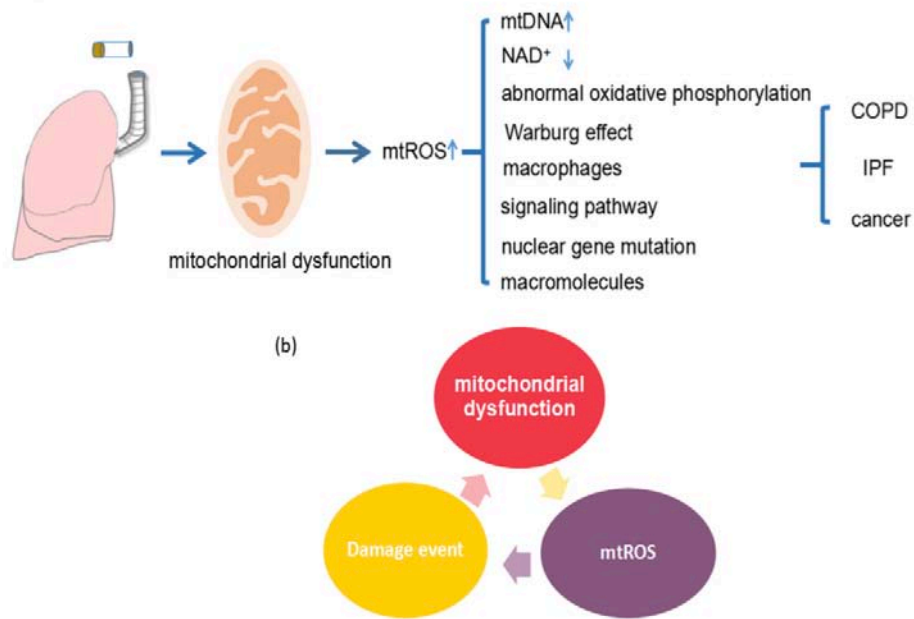
Εικόνα 1: Η δομή ενός μιτοχονδρίου

Λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες με σημαντικότερη την μετατροπή της ενέργειας σε ATP (Guo, R., et al., 2017). Είναι η έδρα της κυτταρικής αναπνοής, όπου πραγματοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής του ATP. Θεωρούνται τα “εργοστάσια παραγωγής ενέργειας” του κυττάρου, σε αυτά εντοπίζονται οι σημαντικές οξειδωτικές διεργασίες του μεταβολισμού (κύκλος κιτρικού οξέος, οξείδωση λιπαρών οξέων, που ως προμηθευτές NADH, συνδέονται με εξαιρετικό τρόπο με την οξείδωση του NADH μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (Karlson, Doenecke, Koolman 1960). Η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ATP διαφέρει τόσο μεταξύ οργανισμών όσο και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών ιστών. Για παράδειγμα, τα μιτοχόνδρια στην καρδιά καταναλώνουν 50 φορές περισσότερο οξυγόνο από τα μιτοχόνδρια στο ήπαρ, αφού η συνεχής άντληση αίματος απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια στο ήπαρ, αντίστοιχα, έχουν αναπτύξει έναν ενζυμικό μηχανισμό αποτοξικοποίησης της αμμωνίας, τον οποίον δεν διαθέτουν αυτά της καρδιάς (Perkins and Frey, 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμα και μέσα σε ένα κύτταρο μπορεί να υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μιτοχονδρίων που αυτό περιέχει (Duchen, 2004). Η παρουσία παραπάνω του ενός τύπου μιτοχονδρίων σε ένα άτομο ονομάζεται *ετεροπλασμία* (Melton, 2004).

Μιτοχόνδρια και Μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (*mt-DNA*) είναι υπεύθυνες για πλήθος ασθενειών, καθώς και για τη γήρανση. Λόγω της ετεροπλασμίας, τα άτομα με μεταλλάξεις στο mt-DNA έχουν σε κάθε ιστό μια μείξη αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων. Αυτή η άνιση κατανομή μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων έχει σαν αποτέλεσμα ένα φαινόμενο μωσαϊκού, δηλαδή κατά τόπους δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, κάνοντας αυτές τις ασθένειες ιδιαίτερα πολύπλοκες (Park and Larsson, 2011). Περισσότερες από 100 μεταλλάξεις στο mtDNA, συμπεριλαμβανομένων ελλείψεις, διπλασιασμούς και σημειακές μεταλλάξεις σε mt-tRNA γονίδια, έχουν συσχετισθεί με ασθένειες, όπως MELAS (*Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes*), Complex I deficiency, Alzheimer, Parkinson (Orth and Schapira, 2001). Η γήρανση σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, αυξημένο οξειδωτικό stress και μοριακές αλλαγές στον οργανισμό (όπως μεταλλάξεις στο mt-DNA). Οι τρεις αυτοί παράγοντες, συνιστούν έναν φαύλο κύκλο που μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες των πνευμόνων, όπως COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*), IPF (*Idiopathic Pulmonary Fibrosis*) και καρκίνο, Εικόνα 2 (Fang et al., 2019).



Εικόνα 2: Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε συνδυασμό με το οξειδωτικό *stress* και μοριακές αλλαγές στον οργανισμό οδηγούν σε χρόνιες ασθένειες των πνευμόνων (Fang *et al.*, 2019)

1.2 Αναπνευστική Αλυσίδα Μεταφοράς Ηλεκτρονίων

Κυτταρική Αναπνοή

Η παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού μεταφοράς στον κύκλο του Krebs, ο ροή τους μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και η σύνθεση ATP, που προκύπτει τελικά, ονομάζονται στο σύνολό τους *κυτταρική αναπνοή* (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012). Συγκεκριμένα, η αερόβια κυτταρική αναπνοή αποτελείται από τρία μέρη (Ahmad, 2019):

1. Γλυκόλυση: Η γλυκόζη μεταβολίζεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού με ταυτόχρονη παραγωγή ATP και NADH. Το πυροσταφυλικό οξειδώνεται σε ακετύλο-συνένζυμο A (*acetyl Co-A*), NADH και CO₂.
2. Κύκλος του Krebs/Κύκλος του Κιτρικού Οξέος: Πρόκειται για μια αλυσίδα χημικών αντιδράσεων στην οποία αξιοποιείται το ακετύλο-συνένζυμο A, από τη γλυκόλυση. Ο Κύκλος του Krebs καταλήγει στην παραγωγή CO₂, NADH, FADH₂ και ATP.
3. Οξειδωτική Φωσφορυλίωση: Το NADH και FADH₂ αξιοποιούνται για την παραγωγή ATP και νερού.

Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

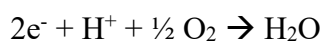
Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH₂ χρησιμοποιούνται για την αναγωγή μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η εξώεργη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από το NADH και το FADH₂ πραγματοποιείται μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που λαμβάνουν χώρα σε ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (*Electric Transport Chain, ETC*) (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Ροή των Ηλεκτρονίων στην Αναπνευστική Αλυσίδα

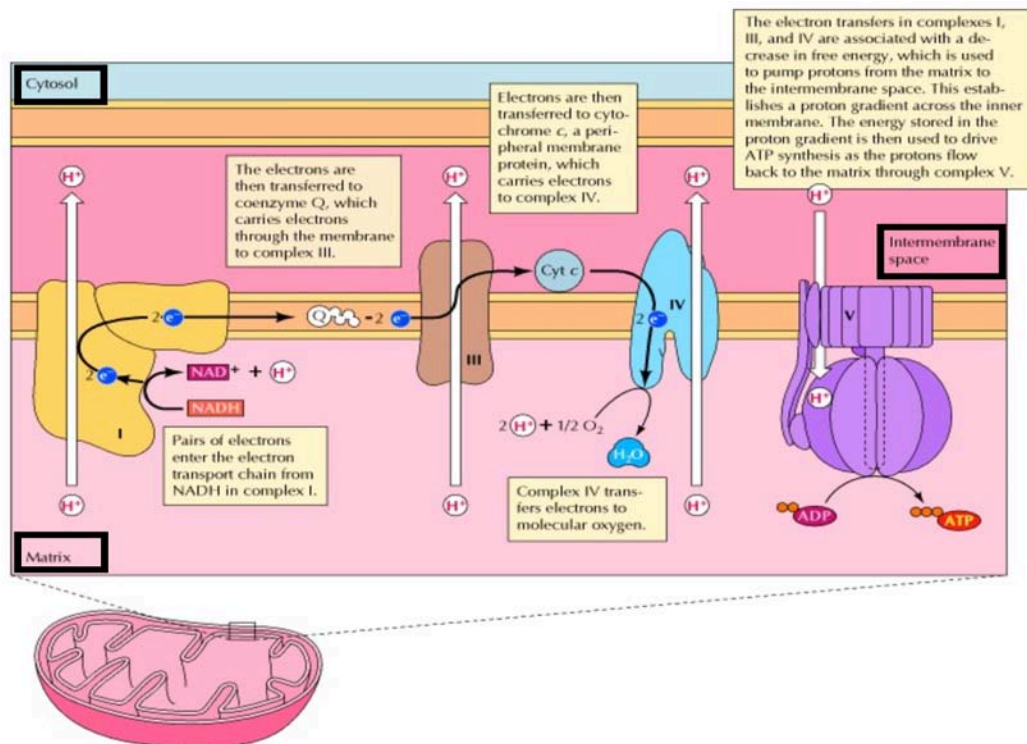
Στην αναπνευστική αλυσίδα τα ηλεκτρόνια περνάνε μέσα από μια αλυσίδα πρωτεϊνικών συμπλόκων. Κατά τη διαδικασία αυτή, μειώνεται το επίπεδο ενέργειάς τους και απελευθερώνεται ενέργεια. Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται για την έξοδο H^+ , που προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξείδωσης του NADH, από την μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι, δημιουργείται διαβάθμιση πρωτονίων, δηλαδή ο διαμεμβρανικός χώρος είναι αρνητικά φορτισμένος και η μήτρα είναι αρνητικά φορτισμένη. Αυτή η διαβάθμιση χρησιμοποιείται από την *ATP synthase*, για να σχηματίσει ATP από ADP.

Η ροή των ηλεκτρονίων καταλύεται από τα παρακάτω τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και ένα συνένζυμο, (*Ahmad, 2019*):

1. Σύμπλοκο I, γνωστό και ως Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q. Είναι υπεύθυνο για την οξείδωση του $NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^-$. Τα δύο ηλεκτρόνια που προκύπτουν μεταφέρονται στο συνένζυμο Q.
2. Σύμπλοκο II, γνωστό και ως Αναγωγή του Ζεύγους ηλεκτρικού-Q. Αντίστοιχα με το σύμπλοκο I, το σύμπλοκο II είναι υπεύθυνο για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το $FADH_2$ στο συνένζυμο Q.
3. Συνένζυμο Q, γνωστό και ως Ουβικινόνη. Είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III.
4. Σύμπλοκο III, γνωστό και ως Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους Q – Κυτόχρωμα c. Δέχεται ηλεκτρόνια από το συνένζυμο Q και τα προωθεί στο σύμπλοκο IV και παράλληλα μεταφέρει H^+ από τη μήτρα των μιτοχονδρίων στην διαμεμβρανική περιοχή.
5. Σύμπλοκο IV, γνωστό και ως Οξειδάση του Κυτοχρώματος c. Είναι ο τελευταίος μεταφορέας ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στον τελικό τους δέκτη, το O_2 . Το O_2 , τελικά, ανάγεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



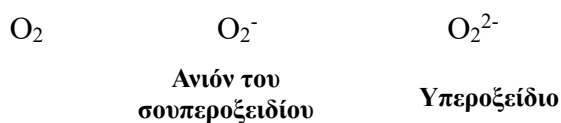
Η παραπάνω διαδικασία φαίνεται στην *Εικόνα 3*.



Εικόνα 3: Η πορεία της ροής των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Cooper, 2000).

Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικό Stress

Το μοριακό οξυγόνο είναι ένας ιδανικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, γιατί η υψηλή χημική του συγγένεια για ηλεκτρόνια του προσδίδει μία θερμοδυναμικώς μεγάλη κινητήρια δύναμη. Η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων σε αυτό, δηλαδή η αναγωγή του, οδηγεί σε ασφαλή προϊόντα και συγκεκριμένα σε δύο μόρια ύδατος. Ωστόσο, η μερική αναγωγή του μπορεί να οδηγήσει σε επικίνδυνες ενώσεις. Ιδιαίτερα, η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O_2 σχηματίζει το ανιόν του σουπεροξειδίου, ενώ η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων οδηγεί σε υπεροξείδιο.



Οι δύο αυτές ενώσεις μπορούν να αποβούν πολύ βλαβερές για τη λειτουργία του κυττάρου. Η στρατηγική για την ασφαλή αναγωγή του O_2 είναι σαφής: ο καταλύτης δεν απελευθερώνει μερικώς ανηγμένα προϊόντα. Μολονότι η οξειδάση του κυτοχρώματος c και άλλες πρωτεΐνες που ανάγουν O_2 είναι αξιοσημείωτα επιτυχημένες στο να μην απελευθερώνουν τα ενδιάμεσα των αντιδράσεων τις οποίες καταλύουν, σχηματίζονται αναπόφευκτα μικρές ποσότητες ανιόντος του σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το σουπεροξείδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, καθώς και άλλες ενώσεις που είναι δυνατόν να προκύψουν από αυτές, όπως OH^\cdot , ονομάζονται συλλογικά δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας έχει εξελιχθεί, για την προστασία του οργανισμού από τις βλαβερές επιπτώσεις των ROS. Έτσι, διατηρείται σε ισορροπία η παραγωγή τους. Μερικές φορές, ωστόσο, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται οδηγώντας σε οξειδωτικό stress (*oxidative stress*). Γενικά, ως οξειδωτικό stress ορίζεται η αλλαγή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, υπέρ των πρώτων και η οποία οδηγεί σε πιθανές βλάβες. Η διατάραξη της ισορροπίας μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε αυξημένης παραγωγής ROS ή δυσλειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (*Burton and Jauniaux, 2011*). Το οξειδωτικό stress έχει θεωρηθεί ότι ενέχεται στη διεργασία της γήρανσης, καθώς και σε αυξανόμενο κατάλογο νοσημάτων όπως εμφύσημα, νόσο του Parkinson κ.α. (*Berg, Tymoczko, Stryer, 2012*).

1.3 Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH – Q / Σύμπλοκο I

Δομή

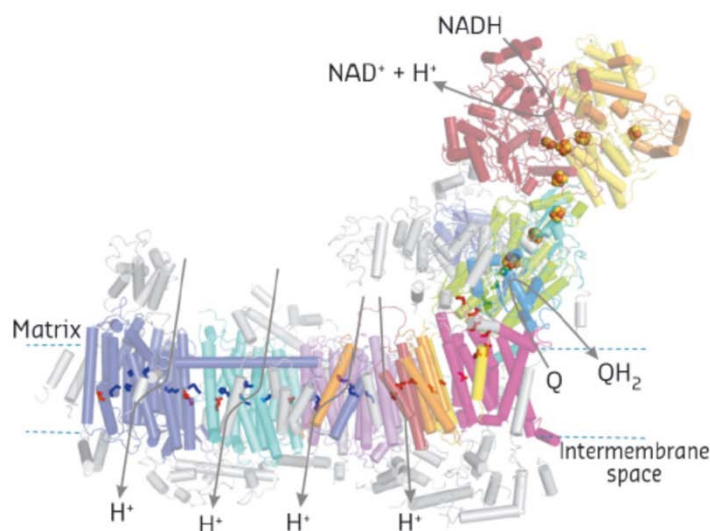
Το Σύμπλοκο I είναι το μεγαλύτερο από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αποτελείται από τουλάχιστον 40 διαφορετικά πολυπεπτίδια πολυπεπτίδια με συνολική μάζα περίπου 900 KDa. Έχει 7 υπομονάδες, που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA (*mtDNA*) και 38 υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA (*Carroll et al., 2006*). Βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και ένα τμήμα του εξέρχει μέσα στη μήτρα (*matrix*) όπου παίρνει το σχήμα του γράμματος L. Αυτός ο σχηματισμός αποτελείται από έναν περιφερικό, υδρόφιλο βραχίονα και έναν υδρόφοβο, μεμβρανικό βραχίονα που βρίσκεται κάθετα στον πρώτο βραχίονα (*Mimaki et al., 2012*). Η δομή του ενζύμου φαίνεται στην *Εικόνα 4*.

Λειτουργία

Ο περιφερικός βραχίονας περιέχει τον συμπάραγοντα FMN (φλαβινομονονουκλεοτίδιο) και διάφορα συμπλέγματα σιδήρου-θείου, που παρέχουν ένα διχαλωτό μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q (ουβικινόνη) (*Verkhovskaya et al., 2008*). Η οξείδωση του NADH ξεκινά με τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και δύο πρωτονίων από το NADH και το H⁺ στο FMN, το οποίο περιέχει ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B₁₂) ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μία υπομονάδα του.



Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται, ένα κάθε φορά, στο συνένζυμο Q, μέσω μιας ακολουθίας κέντρων FeS, 2Fe₂S και 4Fe₄S. Κατά αυτό τον τρόπο το FMN είναι ο αποδέκτης δύο ηλεκτρονίων από το NADH και δότης ενός ηλεκτρονίου στα κέντρα FeS. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στη σταθερότητα της ημικινοειδούς μορφής του FMN. Το συνένζυμο Q είναι αποδέκτης ενός ή δύο ηλεκτρονίων, γιατί σχηματίζει μια σταθερή ημικινόνη. Πέραν του υδρόφιλου δακτυλίου, το συνένζυμο Q έχει μία μεγάλη υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα. Αυτή αποτελείται από 10 μονάδες ισοπρενίου και είναι βυθισμένη στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης. Το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) και η ουβικινόλη διαχέονται ελεύθερα στη μεμβράνη και μπορούν να διακινούν ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα I και II στο σύμπλοκο III. Κατά τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I, τέσσερα πρωτόνια αντλούνται από την περιοχή της μήτρας και περνάνε στη διαμεμβρανική περιοχή. Η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια των οξειδωτικών αντιδράσεων συντηρείται από αυτή την μεταφορά πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης (*Devlin, 2006*).



Εικόνα 4: Η δομή του Συμπλόκου I

1.4 Σαρκοείδωση

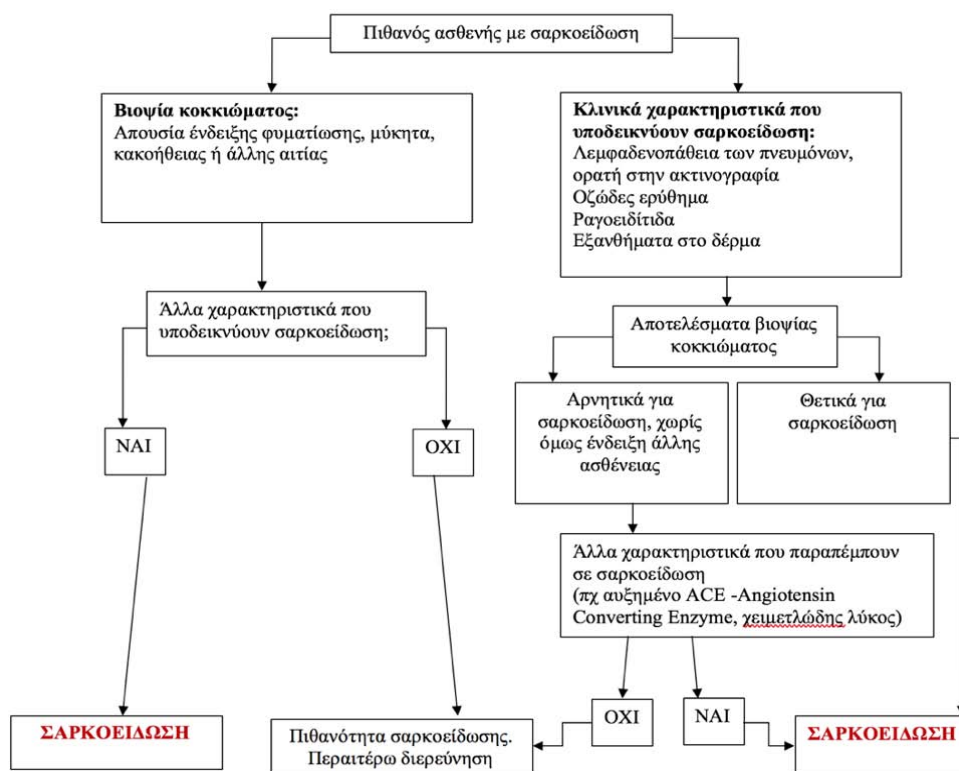
Η σαρκοείδωση είναι μια συστηματική φλεγμονώδης ασθένεια και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό κοκκιωμάτων, που αποτελούνται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (*Hu et al., 2016*). Έρευνες υποστηρίζουν ότι η σαρκοείδωση προκαλείται από έναν συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και παραγόντων που αφορούν την ανοσολογική απόκριση του ασθενούς (*Chen and Moller, 2015*).

Συμπτώματα

Η σαρκοείδωση είναι πολυσυστηματική ασθένεια. Τα συμπτώματά της είναι αντίστοιχα των προσβαλλόμενων οργάνων. Το ήπαρ, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι σιελογόνοι αδένες, η καρδιά, το νευρικό σύστημα, οι μύες, τα οστά και άλλα όργανα μπορεί επίσης να προσβληθούν (*Statement on Sarcoidosis, 1999*). Κοκκιώματα παρατηρούνται στους πνεύμονες, τους λεμφαδένες τα μάτια, το δέρμα, την καρδιά, αλλά και σε άλλα όργανα (*Mochizuki, Kubo, Honda, 2011*). Τα συμπτώματα, αλλά και οι επιπλοκές της ασθένειας, εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους πνεύμονες. Χαρακτηριστικά, παρατηρείται ‘σφύριγμα’ (wheezing) και άπνοια, ενώ είναι συχνές επιπλοκές όπως ίνωση των πνευμόνων και αρτηριακή υπέρταση (*Hu et al., 2016*). Ακόμα, έχουν σημειωθεί: θολή όραση, πόνος και πρήξιμο στις αρθρώσεις, ψηλαφητοί λεμφαδένες (*Rizwan et al., 2019*).

Διάγνωση

Η διάγνωση της ασθένειας απαιτεί συνδυασμό πληροφοριών, που βασίζονται στην κλινική εικόνα του ασθενούς, σε ακτινολογικές εξετάσεις (φλουороαγγειογραφία) και ιστολογικές εξετάσεις (*Rosen, 2007*). Απαιτείται αποκλεισμός άλλων κοκκιωματωδών νοσημάτων, καθώς και η παρουσία τοπικής κοκκιωματώδους αντίδρασης (*Statement on Sarcoidosis, 1999*). Στην *Εικόνα 5* παρουσιάζεται η διαγνωστική προσέγγιση της σαρκοείδωσης.



Εικόνα 5: Η διαγνωστική προσέγγιση της σαρκοείδωσης (Baughman, Lower, du Bois, 2003).

Επιδημιολογία

Η σαρκοείδωση εμφανίζεται με συχνότητα 16,5/100.000, στις γυναίκες και 19/100.000 σε άνδρες, στον γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, οπότε οι παρατηρούμενες συχνότητες μπορεί να είναι διαφορετικές από τις πραγματικές. Επιπλέον, οι παρατηρούμενες συχνότητες εμφάνισης σαρκοείδωσης διαφέρουν ανά εθνικότητες (Nunes et al., 2007). Στον Πίνακα 1 φαίνονται ενδεικτικά οι αριθμοί περιστατικών σαρκοείδωσης σε κάποιες χώρες.

Περιοχές	Περιστατικά σαρκοείδωσης/100.000 άτομα το χρόνο	Επιπολασμός /100.000 άτομα το χρόνο	Ηλικία εμφάνισης	Ποσοστό γυναικών
Σουηδία	11,5	160	A: 45 Γ: 55	45%
Αμερική	Αφροαμερικάνοι: 17,8 Λευκοί: 8,1 Hispanics: 4,3 Ασιάτες: 3,2	Αφροαμερικάνοι: 17,8 Λευκοί: 8,1 Hispanics: 4,3 Ασιάτες: 3,2	NR	NR
Ιταλία	NR	49	A: 47 Γ: 54	58
Γουαδελούπη	2,3	21	NR	59
Γαλλία	4,9	30	NR	55
Ταϊβάν	NR	2,17	A: 42 Γ: 51	63

Πίνακας 1: Στοιχεία εμφάνισης σαρκοείδωσης, για τα έτη 2015-2017 (Arkema and Cozier, 2018).

Έχουν σημειωθεί και περιστατικά παιδιών που πάσχουν από σαρκοείδωση (παιδική σαρκοείδωση), ωστόσο είναι σπάνιο φαινόμενο. Οι συνηθέστερες ηλικίες είναι μεταξύ 13-15 ετών (*Shetty and Gedalia, 2008*).

Αιτιολογία

Η σαρκοείδωση είναι γνωστή εδώ και περισσότερα από 100 χρόνια, ενώ η επιστημονική κοινότητα καταβάλει μεγάλη προσπάθεια για τη διερεύνησή της, παρόλα αυτά παραμένει μια αινιγματική ασθένεια, άγνωστης αιτιολογίας (*Grutters, 2017*).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

(γονότυπος)

+

ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΥΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Έχουν αναγνωριστεί μολυσματικοί παράγοντες που πιθανόν να συνδέονται με την εμφάνιση σαρκοείδωσης. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο εάν, τελικά, η σαρκοείδωση είναι αποτέλεσμα ενεργά πολλαπλασιαζόμενων μολυσματικών μικροβίων (*Hu et al., 2016*).

Γενικότερα, πολλές είναι οι έρευνες που βάζουν στο επίκεντρο των περιβαλλοντικών παραγόντων τη μόλυνση από *Mycobacterium* (*Chen and Moller, 2015*). Με τη χρήση της μεθόδου PCR ανιχνεύθηκε DNA και RNA μυκοβακτηρίων σε σαρκοειδικό ιστό. Συγκεκριμένα, σε 26% σαρκοειδικών ιστών ανιχνεύθηκε νουκλεϊκό οξύ μυκοβακτηρίων, συχνότητα 10- με 20- φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα control (*Gupta et al., 2007*).

Παθοφυσιολογία

Το χαρακτηριστικό παθολογικό γνώρισμα μιας περίπτωσης σαρκοείδωσης είναι τα κοκκιώματα, που σχηματίζονται από τη συσσώρευση μακροφάγων, ενεργοποιημένων μονοκυττάρων, T- και B- λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών και άλλων κυττάρων. Τέτοιου τύπου συσσώρευση κυττάρων παρατηρείται και σε άλλες ασθένειες, μολύνσεις και κακοήθεις όγκους. Τα κοκκιώματα θεωρείται ότι είναι μια παθολογική απόκριση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο, με στόχο αυτό να παγιδευτεί μέσα τους και να απομονωθεί. Σχηματίζεται, δηλαδή, ένας φυσικός φραγμός που προστατεύει τους γειτονικούς ιστούς από το αντιγόνο (*Chen and Moller, 2015*). Συγκεκριμένα, τα μη-νεκρωτικά, αυτά, κοκκιώματα συνίστανται από μακροφάγα, μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα,

λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα και ινοβλάστες. Βασικό ρόλο στην εμφάνιση σαρκοείδωσης παίζουν τα T-λεμφοκύτταρα, αφού επάγουν ανοσολογική απόκριση και αντιστρέφουν την αναλογία CD4/CD8 (Celada et al., 2018). Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της σαρκοείδωσης.

Παθολογικά χαρακτηριστικά της Σαρκοείδωσης	
<i>Ιστολογικά Χαρακτηριστικά</i>	<i>Ανοσολογικά Χαρακτηριστικά</i>
<p>Διακριτά, μη-νεκρωτικά κοκκιώματα, από τη συσσώρευση: επιθηλιοειδών μακροφάγων (τροποποιημένα μακροφάγα, που μοιάζουν με επιθηλιακά κύτταρα), ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, T- και B- λεμφοκύτταρα, μεγάλου μεγέθους πολυπύρρηνα κύτταρα και ινοβλάστες</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Έντονη δραστηριότητα τοπικής ανοσίας που σχετίζεται με τα Th1 λεμφοκύτταρα (<i>T-helper 1</i>) -Κυτταοκίνες: IFNγ (<i>Interferon-gamma</i>), ιντερλευκίνη-12, ιντερλευκίνη-18. - Χημειοκίνες: CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL5
	<ul style="list-style-type: none"> • Αυξημένη έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών -TNF (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) - Ιντερλευκίνη-17 - Ιντελευκίνη-6 - Ιντερλευκίνη-1
	<ul style="list-style-type: none"> • Αλλαγές σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος -TLR-2 (<i>Toll-Like Receptor 2</i>) -NOD-1 (<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1</i>) - RAGE (<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Μη-φυσιολογικές αποκρίσεις -Μειωμένη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων

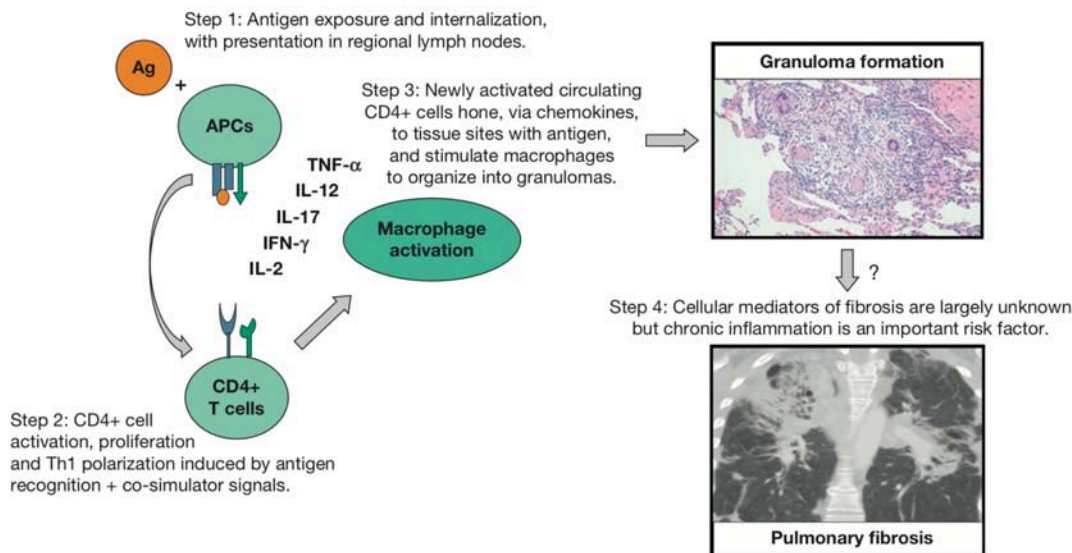
Πίνακας 2: Τα συχνότερα ιστολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά της σαρκοείδωσης (Chen and Moller, 2015).

Μηχανισμός Παθογένεσης

Ουσιαστικά, ο μηχανισμός παθογένεσης της σαρκοείδωσης, στηρίζεται στην έναρξη ανοσολογικής απόκρισης που προκαλεί ένα άγνωστης προέλευσης αντιγόνο. Περιλαμβάνει την ενεργοποίηση CD4+ T-λεμφοκυττάρων, επαγόμενη από το αντιγόνο, ακολουθεί παραγωγή κυτταροκινών με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων στους πνεύμονες. Έτσι, έχουμε τοπική αύξηση και δράση μακροφάγων και, τελικά, σχηματισμό των κοκκιωμάτων (Patterson and Chen, 2017).

Τα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα ενδοκυτταρώνουν το εκάστοτε μόριο, που γίνεται αντιληπτό ως αντιγόνο, και το παρουσιάζουν μέσω του συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας II (*MHC II, Major Histocompatibility Complex II*). Ταυτόχρονα, CD4+ βοηθητικά λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με το *MHC II*, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνες (*IL-17, IL-6, IL-1*) και *Tumor Necrosis Factor (TNF)*. Αυτές, παίζουν ενεργό ρόλο στην επαγωγή της

ανοσολογικής απόκρισης, ενεργοποιώντας επιπλέον μακροφάγα, T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και B- λεμφοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα `απελευθερώνουν χημειοκίνες, όπως CXCL10, IL-12, IL-18 με αποτέλεσμα να προσελκύουν επιπλέον λεμφοκύτταρα. Έτσι, επιτυγχάνεται τελικά μια οξεία ανοσοποιητική αντίδραση με συνέπεια το αντιγόνο γύρω από το οποίο έχει σχηματιστεί κοκκίωμα να εξουδετερώνεται. Απελευθερώνεται από τα κύτταρα του κοκκιώματος ο αυξητικός παράγοντας TGF- β , που επάγει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Τελικά, το αντιγόνο αποσυντίθεται τελείως. Στην *Εικόνα 6* απεικονίζονται τα σημεία-κλειδιά για την παθογένεση τη σαρκοειδωσης.



Εικόνα 6: Τα σημεία-κλειδιά για την παθογένεση της σαρκοειδωσης. Αρχικά, το αντιγόνο παρουσιάζεται στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC, *Antigen Presenting Cells*). Έτσι, δημιουργείται ένα προ-φλεγμονώδες περιβάλλον (κυτταροκίνες και άλλοι παράγοντες). Ενεργοποιούνται στους λεμφαδένες CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Αυτά φέρουν υποδοχείς ικανούς να αναγνωρίσουν το αντιγόνο (*TcR*, *T-cell Receptors*). Η αναγνώρισή του επάγει πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση των CD4+. Σε επόμενο στάδιο, τα CD4+ μεταναστεύουν στους πνεύμονες, επάγοντας την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (*interferon gamma*, *IFN γ*) και την συσσωμάτωση των μακροφάγων σε κοκκιώματα. Συχνά, αναπτύσσεται ίνωση του ιστού, ως απόκριση στην φλεγμονή (*Patterson and Chen, 2017*).

Θεραπεία

Γενικά, στη σαρκοειδωση η θεραπεία στοχεύει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, όπως άπνοια, τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και την αποτροπή της καταστροφής των οργάνων, που έχουν προσβληθεί. Η πρώτη επιλογή, όσον αφορά τη θεραπεία είναι τα γλυκοκορτικοειδή. Πολλοί ασθενείς χρειάζονται τη θεραπεία για χρόνια. Συχνά, η χρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε νοσηρές καταστάσεις. Έτσι, διερευνώνται κάποιες εναλλακτικές επιλογές. Αυτές περιλαμβάνουν αντι-μεταβολίτες, όπως μεθοτρεξάτη, αζαθειοπρίνη, λεφλουνομίδη, μυκοφαινολικό οξύ, αλλά και βιολογικούς παράγοντες όπως *infliximab* και *rituximab* (*Bauhgman and Lower, 2015*).

Κορτικοειδή: Τα συστηματικά χορηγούμενα κορτικοειδή είναι η βάση της θεραπείας των συμπτωματικών παιδιών με σοβαρή πολυσυστηματική νόσο (*Nathan et al., 2019*).

Η οφθαλμική προσβολή ανταποκρίνεται συνήθως στα τοπικά ή συστηματικά κορτικοειδή. Στην πνευμονική σαρκοειδωση, τα εισπνεόμενα κορτικοειδή μπορεί να επαρκούν για θεραπεία

συντήρησης (*Kiper et al., 2001*). Τα γλυκοκορτικοειδή είναι αναστολείς της φλεγμονώδους αντίδρασης, έτσι. Αποτελούν τη βασική θεραπεία κατά του άσθματος. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν αρκετά μόρια που εμπλέκονται στη φλεγμονή, όπως κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην άμεση πρόσδεσή τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, που βρίσκεται στον υποκινητή περιοχών γονιδίων (*van der Velden, 1998*).

Μεθοτρεξάτη: Στους ενήλικες και τα παιδιά με σαρκοείδωση μη αποκρινόμενη ή εμπλεκόμενη με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες στα κορτικοειδή, είναι αποτελεσματική, ασφαλής, μειώνει τα επίπεδα της TKE (*Ταχύτητα Καθίζησης Αίματος*) και της ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) και βοηθά στη μείωση της δόσης των κορτικοειδών (*Isshiki and et al., 2013*). Πρόκειται για έναν αντιπολλαπλασιαστικό παράγοντα, ανάλογο του φυλλικού οξέος. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει ένζυμα, βασικά για τη βιοσύνθεση πουρινών και πυριμιδινών, αναστέλλοντας έτσι και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων (*Chan and Cronstein, 2013*).

Σαρκοείδωση και μιτοχόνδρια

Οξείες και χρόνιες ασθένειες των πνευμόνων συνδέονται συχνά με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress, αφού στους ασθενείς παρατηρείται δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (*van der Vliet et al., 2018*). Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σημαντικά σε ασθένειες των πνευμόνων, που σχετίζονται με την παραγωγή ROS, όπως η ίνωση των πνευμόνων. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια ενδοθηλιακών κυττάρων τριχοειδών αγγείων από τους πνεύμονες και τους βρόγχους ασθενών με σαρκοείδωση (*Πίνακας 3*) (*Mochizuki, Kubo, Honda, 2011*). Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA μπορούν να επιφέρουν μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, όπως βλάβη της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επιπροσθέτως, μεταλλαγμένο mt-DNA μπορεί να οδηγήσει σε μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με την καταστροφή του (*Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP)*), προκαλώντας φλεγμονώδη και ανοσολογικές αποκρίσεις (*Liu and Chen, 2017*). Η σαρκοείδωση θα μπορούσε να οφείλεται σε ένα παθολογικό μονοπάτι που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα με τη μη φυσιολογική παραγωγή ROS. Αλληλούχιση 22 mt-tRNA γονιδίων και γειτονικών τους έφερε στην επιφάνεια 45 μεταλλάξεις σε 69/85 ασθενείς με σαρκοείδωση. Από αυτές, 25/45 εκφράζονταν μόνο στα άτομα με σαρκοείδωση, ενώ 17/45 εκφράζονταν κυρίως στα άτομα με σαρκοείδωση σε σχέση με τα άτομα control. Συγκεκριμένα, ασθενείς με σαρκοείδωση φάνηκε να φέρουν μεταλλάξεις σε mt-tRNA γονίδια (*Daniil et al., 2018*):

G15928A tRNA^{Thr}

G5773A tRNA^{Cys}

A5843G tRNA^{Tyr}

A12308G tRNA^{Leu(CUN)}

Παραλλαγές στο μιτοχονδριακό G15928A tRNA^{Thr} γονίδιο έχει βρεθεί σε άτομα με πολλαπλή σκλήρυνση (*Andalib et. al, 2019*). Όσον αφορά το γονίδιο A12308G tRNA^{Leu(CUN)} έχουν βρεθεί σε ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου (*Mohammed et. al, 2015*). Ακόμα, οι μεταλλάξεις των γονιδίων G15928A tRNA^{Thr} και A12308G tRNA^{Leu(CUN)} ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς άσθματος σε σχέση με τα άτομα control (*Daniil et al., 2018*).

	Ασθενείς με Σαρκοείδωση	Υγιή Άτομα (%)
	ποσοστό % εμφάνισης του χαρακτηριστικού στις ομάδες ατόμων	
Αυξημένος αριθμός μιτοχονδρίων	100%	27%
Αυξημένο μέγεθος μιτοχονδρίων	100%	9%
Ακανόνιστο σχήμα μιτοχονδρίων	100%	50%
Διόγκωση μιτοχονδρίων	31%	0
Απουσία αναδιπλώσεων	Μερική: 100%	Μερική: 100%
	Ολική: 69%	Ολική: 31%
Απουσία διπλής μεμβράνης	Μερική: 100%	Μερική: 100%
	Ολική: 28%	Ολική: 18%

Πίνακας 3: Μορφολογικές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχόνδρια από ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών αγγείων από πνεύμονες και βρόγχους ασθενών σε σύγκριση με υγιή άτομα (Mochizuki, Kubo, Honda, 2011).

1.5 Σκοπός

1. Το οξειδωτικό *stress* είναι υπεύθυνο για αρκετές ασθένειες και πιθανόν να οφείλεται σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, όπως βλάβη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (*Liu and Chen, 2017*)
2. Ασθένειες των πνευμόνων συνδέονται συχνά με οξειδωτικό *stress* (*van der Vliet et al., 2018*)
3. Η σαρκοείδωση είναι μια ασθένεια, στην οποία προσβάλλονται σε μεγαλύτερο ποσοστό οι πνεύμονες (*Hu et al., 2016*).
4. Έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις σε mt-DNA ασθενών με σαρκοείδωση (*Daniil et al., 2018*)

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα, επιλέξαμε να μελετήσουμε την αναπνευστική αλυσίδα ασθενών με σαρκοείδωση, ξεκινώντας από το Σύμπλοκο I – Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. Το πείραμα αυτό επικεντρώθηκε στη μέτρηση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου αυτού, ώστε αυτή να συγκριθεί με τις τιμές δραστηριότητας ατόμων control. Απώτερος σκοπός, είναι η διαλεύκανση πιθανής προέλευσης της σαρκοείδωσης από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα περιλαμβάνει τα εξής τέσσερα στάδια (*de Wit et. al, 2006*):

Απομόνωση Λεμφοκυττάρων

Επεξεργασία Δείγματος

Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου

Πρωτόκολλο Μέτρησης Δραστικότητας Οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH-Q

2.1 Απομόνωση Λεμφοκυττάρων

Το πρώτο στάδιο του πειράματος είναι η απομόνωση των λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ασθενών με σαρκοείδωση. Το περιφερικό αίμα είναι το πλέον κατάλληλο για την απομόνωση λεμφοκυττάρων, καθώς συλλέγεται εύκολα και σχετικά ανώδυνα, δεδομένου ότι οι ασθενείς είναι μεγάλης ηλικίας. Η μέτρηση δραστικότητας του μιτοχονδριακού ενζύμου Σύμπλοκο I, έγινε σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα, καθώς εμφανίζουν αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα.

Από κάθε ασθενή συλλέχθηκαν 20ml αίματος με σύριγγα, η οποία περιείχε αντιπηκτικό παράγοντα και συγκεκριμένα ηπαρίνη. Η λήψη του αίματος έγινε από εξειδικευμένο ιατρικό ή/ και νοσηλευτικό προσωπικό. Η απομόνωση και αποθήκευση των λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε εντός δύο ωρών, από την συλλογή του αίματος.

Υλικά:

- δείγμα περιφερικού αίματος
- ηπαρινισμένη σύριγγα
- αντιδραστήριο Ficoll-Paque Plus (Sigma-Aldrich) (*Εικόνα 7*)
- ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- SHE-PIM / ice-cold buffer
- σωλήνες falcon των 15ml και των 50ml
- Eppendorf του 1.5ml
- πιπέτα Pasteur
- φυγόκεντρος

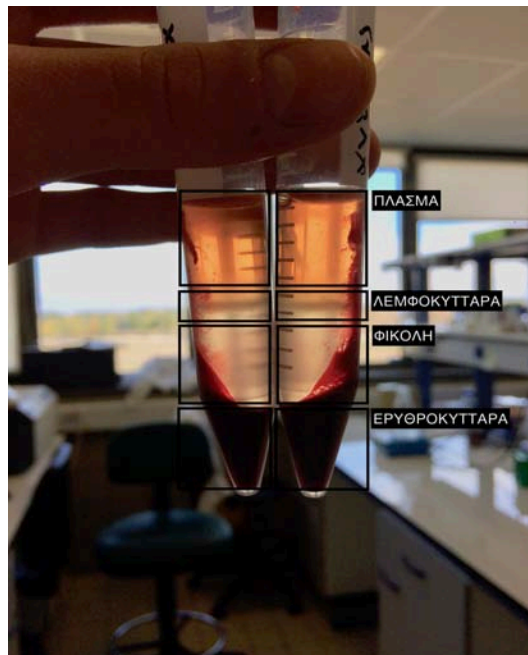


Εικόνα 7: Φικόλη, όπως λαμβάνεται με την σύριγγα

Αρχή της μεθόδου

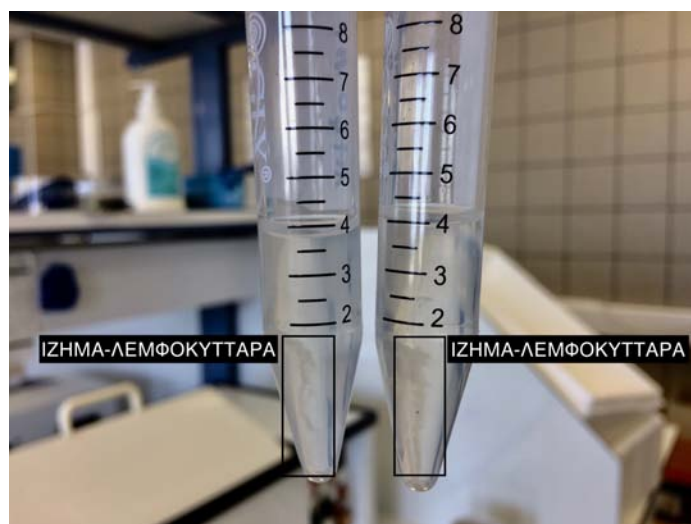
Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε ως διαχωριστικό μέσο η φικόλη και συγκεκριμένα το αντιδραστήριο Ficoll-Paque Plus της εταιρείας Sigma-Aldrich (*Εικόνα 7*). Η φικόλη έχει μικρότερη πυκνότητα από αυτή των ερυθροκυττάρων και μεγαλύτερη από αυτή των λεμφοκυττάρων. Ύστερα από φυγοκέντρωση, η φικόλη διαχωρίζει τα ερυθροκύτταρα από τα μονοκύτταρα. Δηλαδή, μετά τη φυγοκέντρωση του αίματος μαζί με φικόλη, προκύπτουν τέσσερις διακριτές στρώσεις (*Εικόνα 8*) οι οποίες, από πάνω προς τα κάτω, είναι οι εξής:

1. πλάσμα
2. λεμφοκύτταρα
3. φικόλη
4. ερυθροκύτταρα



Εικόνα 8: Οι τέσσερις στρώσεις που προκύπτουν μετά τη φυγοκέντριση του αίματος με φικόλη

Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντριση, με PBS, για την πλύση των κυττάρων, αφού η φικόλη είναι τοξική για αυτά. Τα λεμφοκύτταρα καθιζάνουν, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 9*. Τέλος, τα λεμφοκύτταρα που έχουν απομονωθεί αποθηκεύονται με SHE-PIM ice-cold buffer στους -80°C.



Εικόνα 9: Το ίζημα που προέκυψε μετά τη δεύτερη φυγοκέντριση αποτελείται από τα λεμφοκύτταρα που έχουμε απομονώσει.

Προετοιμασία των διαλυμάτων

Τα διαλύματα που χρειάστηκε να παρασκευαστούν για το στάδιο απομόνωσης των λεμφοκυττάρων ήταν PBS 10X και SHE-PIM ice cold buffer, σύμφωνα με τον Πίνακα 4 και Πίνακα 5, αντίστοιχα.

Με βάση την τελική συγκέντρωση, το μοριακό βάρος και χρησιμοποιώντας τον νόμο αραιώσης, υπολογίστηκε η ποσότητα, σε gr, κάθε αντιδραστηρίου που απαιτείται για την παρασκευή 100 ml PBS 10X και 100 ml SHE-PIM / ice-cold buffer.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Ποσότητα (gr)
Na ₂ HPO ₄	1M	14,196
KH ₂ PO ₄	20 mM	0,272
NaCl	1,37 M	8,006
KCl	20 mM	0,149
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ		100 ml

Πίνακας 4: Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις και ποσότητες για την παρασκευή PBS 10X.

Αντιδραστήριο	Stock	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα για SHE-PIM
Sucrose	0.085 gr/ml	0,24 M	8,5 gr
HEPES, pH 7.4	0.1M	10 mM	10 ml
EDTA	0.5M	1 mM	0,2 ml
Πρωτεϊνικοί αναστολείς (PIM)	υπάρχουν σε ταμπλέτες	αναλογία 2 ταμπλέτες ανά 50 ml SHE-PIM	4 ταμπλέτες
ddH ₂ O	-	-	89,2 ml
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ			100 ml

Πίνακας 5: Τα συστατικά και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την παρασκευή του SHE-PIM/ ice-cold buffer.

Πειραματική διαδικασία

Όσον αφορά το ακριβές πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, ήταν το εξής:

- Απόχυση, με σύριγγα, 10ml Ficoll-Paque Plus σε σωλήνα falcon των 50ml
- Απαλή απόχυση των 20ml αίματος πάνω από τη φικόλη, απευθείας μέσα από την σύριγγα. Αυτό το βήμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς δεν πρέπει το αίμα να αναμιχθεί με την φικόλη.

Αντιθέτως, πρέπει αρχικά να αποχυθούν σταγόνες του αίματος, ώστε να σχηματιστεί μια πρώτη στρώση που να ακουμπά στη φικόλη και όχι να αναμιγνύεται με αυτήν. Στη συνέχεια προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα αίματος.

- Φυγοκέντρηση σε 1800 rpm, 20°C, για 20 min
- Απομάκρυνση της πρώτης στρώσης με πιπέτα Pasteur
- Συλλογή της δεύτερης στρώσης, δηλαδή των λεμφοκυττάρων, με πιπέτα Pasteur και μεταφορά της σε νέο σωλήνα falcon των 15ml. Συνήθως, πρόκειται για 1-2ml.
- Προσθήκη τριπλάσιου όγκου PBS 1X στον νέο σωλήνα
- Φυγοκέντρηση 2.500 rpm, 20°C, για 5 min
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά με πιπέτα Pasteur. Εάν το ίζημα δεν είναι πλήρως στερεάς μορφής, χρειάζεται να αφήσουμε 1ml υπερκείμενου
- Προσθήκη, στον σωλήνα falcon με το ίζημα, SHE-PIM ice cold buffer 7ml. Το συνολικό περιεχόμενο του falcon αναδεύεται πιπέτα, ώστε το ίζημα να διαλυτοποιηθεί πλήρως.
- Το περιεχόμενο του falcon (ίζημα, που πλέον έχει διαλυθεί σε SHE-PIM ice cold buffer) μοιράζεται σε Eppendorf του 1.5ml, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C. Συνήθως, από κάθε δείγμα αίματος προκύπτουν 6 Eppendorf με απομονωμένα λεμφοκύτταρα.

2.2 Επεξεργασία Δείγματος

Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση δραστηριότητας του Συμπλόκου I και ειδικότερα το τέταρτο στάδιο του πειράματος, είναι απαραίτητο οι μεμβράνες των λεμφοκυττάρων να γίνουν διαπερατές. Συγκεκριμένα, χρειάζεται το Σύμπλοκο I και κατ' επέκταση τα μιτοχόνδρια των απομονωμένων λεμφοκυττάρων να είναι διαθέσιμα, ώστε να έρθουν σε επαφή με τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη μέθοδο ψύξης – απόψυξης.



Εικόνα 10: Υδατόλουτρο

Υλικά

- Υδατόλουτρο (Εικόνα 10)
- Καταψύκτης (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Καταψύκτης

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους απότομης αλλαγής της θερμοκρασίας των δειγμάτων, από πολύ θερμό σε πολύ ψυχρό περιβάλλον. Στο πρωτόκολλο αυτό τα δείγματα μεταφέρονταν εναλλάξ από τους -80°C στους 37°C . Στους -80°C σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου, οι οποίοι υγροποιούνται πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα τη διατάραξη της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης.

Πρόκειται για μια ήπια μέθοδο, που δεν προκαλεί μετουσίωση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών στο εξεταζόμενο δείγμα, σε αντίθεση με την μέθοδο sonication.

Πειραματική διαδικασία

- Για έναν κύκλο ψύξης-απόψυξης τα Eppendorf που περιέχουν απομονωμένα λεμφοκύτταρα αφήνονται αρχικά στους -80°C για 20 min
- Στη συνέχεια, αφήνονται στο υδατόλουτρο, *Εικόνα*, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37°C , για 20 min
- Πραγματοποιούνται, συνολικά, τρεις κύκλοι

2.3 Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου

Το εκχύλισμα πλούσιο σε λεμφοκύτταρα, που λήφθηκε μετά το πρώτο στάδιο, περιέχει πλήθος πρωτεϊνών. Έτσι, πριν τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας, απαιτείται ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα. Αυτό έγινε με τη μέθοδο Bradford.

Υλικά:

- αντιδραστήριο Bradford (Bradford Assay Kit της εταιρείας ThermoFisher Scientific)
- απλή κυψελίδα
- Tris-HCl, 10mM
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- διάλυμα SHE-PIM / ice-cold buffer
- Eppendorf του 1,5 ml
- φασματοφωτόμετρο (595 nm)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Bradford είναι μια σύντομη και αξιόπιστη φασματοσκοπική μέθοδος, που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η ολική συγκέντρωση ενός διαλύματος σε πρωτεΐνες. Βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα, από καφέ σε μπλε, όταν υπάρχουν πρωτεϊνικά μόρια στο διάλυμα, καθώς προσδένεται σε αυτά.

Αρχικά, κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς. Χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα βόειας αλβουμίνης (BSA, Bovine Serum Albumin) γνωστών και διαφορετικών μεταξύ τους συγκεντρώσεων. Σε κυψελίδες αναμιγνύεται σταθερός όγκος πρότυπου διαλύματος BSA, ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 10 λεπτά και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595nm. Από την τιμή απορρόφησης που θα δώσει κάθε πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης BSA, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη

αναφοράς. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα άγνωστης συγκέντρωσης δείγματα. Τελικά, με βάση την καμπύλη αναφοράς, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων προς μελέτη. Είναι σημαντικό τα δείγματα να είναι σε διπλές ή τριπλές για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Προετοιμασία διαλυμάτων

Για το πρωτόκολλο της μεθόδου Bradford χρειάστηκε να παρασκευάσουμε διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM καθώς και διάλυμα BSA γνωστής συγκέντρωσης.

Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM

Ως stock υπήρχε διάλυμα Tris-HCl pH 7.6 και συγκέντρωσης 1M. Με την εφαρμογή του νόμου αραιώσης, προκύπτει ότι χρειάζεται να διαλυθεί 1μL του διαλύματος stock σε 99 ml νερού, ώστε να προκύψει Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM και τελικού όγκου 100 ml.

Διάλυμα BSA

Η BSA που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν στη μορφή κρυστάλλων. Επιλέξαμε να φτιάξουμε διάλυμα stock τελικής συγκέντρωσης BSA 1 mg/ml και όγκου 10 ml. Έτσι, διαλύσαμε 10g BSA σε 10 ml νερού. Το διάλυμα stock της BSA διατηρείται σε σωλήνα falcon των 15 ml σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, ανάλογα με την ποσότητα σε μg που χρειαζόμασταν από την BSA, χρησιμοποιούσαμε τα αντίστοιχα μL του διαλύματος stock.

Πειραματική διαδικασία

Πρότυπη Καμπύλη

m_{BSA}	0 μg	1 μg	5 μg	10 μg	15 μg	20 μg
V_{Tris} 10mM	20 μL	19 μL	18 μL	10 μL	5 μL	0 μL
V_{Bradford} 1X	980 μL	980 μL	980 μL	980 μL	980 μL	980 μL
A_{595nm}	0	0,049	0,148	0,255	0,408	0,534

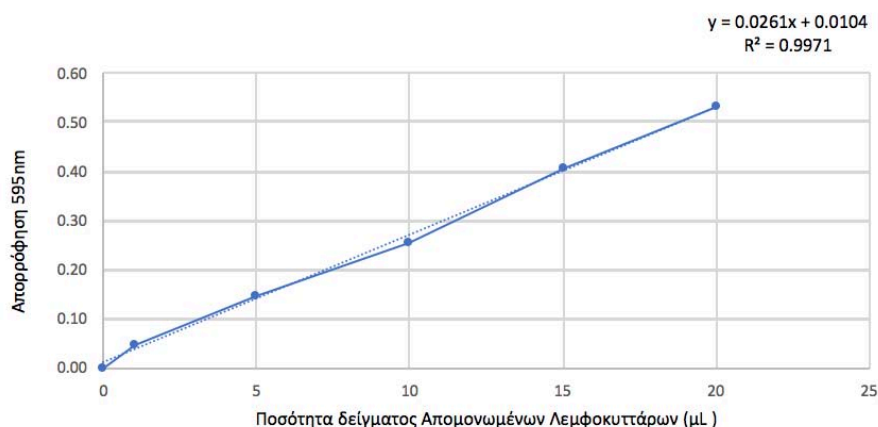
Πίνακας 6: Τα δεδομένα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης Bradford και οι τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν

- Αριθμούμε δύο εξάδες από σωληνάκια Eppendorf του 1.5 ml από το 1 μέχρι το 6. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, είναι σημαντικό τα δείγματα να είναι σε διπλές, ώστε να είναι πιο αξιόπιστα τα αποτελέσματα. Για να κατασκευάσουμε την πρότυπη καμπύλη, που φαίνεται στο *Διάγραμμα 1* χρησιμοποιήσαμε τον μέσο όρο των τιμών που λήφθηκαν
- Σε καθένα από τα έξι προσθέτουμε συγκεκριμένη και διαφορετική ποσότητα διαλύματος BSA. Το σωληνάκι 1 αποτελεί το τυφλό, έτσι δεν περιέχει BSA. Στα

σωληνάκια 2 έως 6 προστίθενται 1, 5, 10, 15 και 20 μL διαλύματος BSA, αντίστοιχα

- Ακολουθεί προσθήκη Tris 10mM στα Eppendorf
- Τέλος, προστίθεται το αντιδραστήριο Bradford
- Τα σωληνάκια Eppendorf επωάζονται στο σκοτάδι για 10 min
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων, σε μήκος κύματος 595nm

Πρότυπη Καμπύλη Bradford



Διάγραμμα 1: Η πρότυπη καμπύλη Bradford

Εφαρμογή της μεθόδου Bradford στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα

Αντιδραστήριο	Τυφλό	[1]	[2]	[3]	[4]
Δείγμα	0 μL	1 μL	2 μL	5 μL	10 μL
SHE-PIM ice-cold buffer	20 μL	19 μL	18 μL	15 μL	10 μL
Bradford 1X	980 μL	980 μL	980 μL	980 μL	980 μL

Πίνακας 7: Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητες για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού περιεχομένου στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα

- Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα συντηρούνταν σε σωληνάκια Eppendorf του 1.5 ml στους -80°C . Έτσι, το πρώτο βήμα ήταν να τα ξεπαγώσουμε, βάζοντάς τα στο υδατόλουτρο στους 37°C .
- Παρασκευάζουμε το τυφλό. Σε σωληνάκι Eppendorf του 1.5 ml προσθέτουμε 980 μL αντιδραστήριο Bradford και 20 μL SHE-PIM ice-cold buffer.
- Αριθμούμε 5 σωληνάκια Eppendorf του 1.5 ml. Σε αυτά προσθέτουμε 1, 2, 5 και 10 μL από το δείγμα απομονωμένων λεμφοκυττάρων, αντίστοιχα.
- Προσθέτουμε τον αντίστοιχο όγκο SHE-PIM.
- Τέλος, προσθέτουμε το αντιδραστήριο Bradford.
- Τα σωληνάκια Eppendorf επωάζονται για 10 min στο σκοτάδι.

- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595nm.
- Με μαθηματικούς υπολογισμούς, βρίσκουμε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε δείγματος.
- Υπολογίζουμε πόσα μL από κάθε δείγμα θα χρειαστούμε, ώστε να έχουμε 70 μg πρωτεΐνης.

Μαθηματικοί υπολογισμοί για:

1. Υπολογισμό πρωτεϊνικού περιεχομένου
2. Υπολογισμό μL δείγματος που περιέχουν 70 μg πρωτεΐνης

Παράδειγμα

Το δείγμα Σ1 έδωσε τις εξής τιμές στο Bradford:

	[1]	[2]	[3]	[4]
$A_{595\text{nm}}$	0,064	0,147	0,154	0,319

1. Θα λύσουμε ως προς x την εξίσωση της γραμμής τάσης της πρότυπης καμπύλης Bradford, θέτοντας ως f(x) την τιμή απορρόφησης της μέτρησης [4], δηλαδή για 10 μL απομονωμένων λεμφοκυττάρων:

$$f(x) = 0,0261 \cdot x + 0,0104$$

$$0,319 = 0,0261 \cdot x + 0,0104$$

$$0,0261 \cdot x = 0,3086$$

$$x = 11,82$$

Δηλαδή:

Σε 10 μL των απομονωμένων λεμφοκυττάρων του Σ1 υπήρχαν 11,82 μg πρωτεΐνης.

2. Θα εφαρμόσουμε απλή μέθοδο των τριών.

$$\begin{array}{ccc} \text{Σε } 10 \mu\text{L} \text{ δείγματος υπάρχουν } 11,82\mu\text{g} \text{ πρωτεΐνη} & & x = 59,22 \mu\text{L} \\ x = ? & 70 \mu\text{g} & \end{array}$$

2.4 Πρωτόκολλο Μέτρησης Δραστικότητας Οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q

Η ενζυμική δραστικότητα του συμπλόκου I θα μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση της συγκέντρωσης του NADH, καθώς αυτό οξειδώνεται: $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$, σε μήκος κύματος 340nm.

Υλικά:

- απομονωμένα λεμφοκύτταρα ασθενών, αφού έχουν υποστεί τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης και αφού έχει υπολογιστεί η ποσότητά τους, σε μL στην οποία περιέχονται 70 μg πρωτεΐνης
- K_2HPO_4 pH 7.4 υδατικό stock 0,1 M
- BSA υδατικό stock 0,2%
- MgCl_2 υδατικό stock 0,5 M
- KCN υδατικό stock 1M φρέσκο κάθε φορά
- αντιμυκίνη-α, stock 3 mM
- NADH υδατικό stock 5,7 mM φρέσκο κάθε φορά
- ροτενόνη stock σε DMSO 0,36 mM
- CoQ1 stock σε DMSO 2 mM
- DMSO
- κυψελίδα χαλαζία
- φασματοφωτόμετρο με UV φως (340 nm)
- σωλήνας falcon των 15 mL
- Eppendorf του 1,5 mL
- πιπέτες Pasteur

• Pre-mix

Αρχή της μεθόδου

Το τέταρτο στάδιο του πειράματος βασίζεται σε δύο δεδομένα:

1. Το Σύμπλοκο I οξειδώνει NADH σε NAD^+
2. Η ροτενόνη αναστέλλει το Σύμπλοκο I.

Το Σύμπλοκο I είναι γνωστό και ως Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. Φυσιολογικά, δηλαδή, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH (δότης) στο συνένζυμο Q10 (δέκτης). Το NADH οξειδώνεται σε NAD^+ . Μπορούμε να παρατηρήσουμε αυτή την αντίδραση φασματοφωτομερικά. Συγκεκριμένα, το NADH απορροφά σε μήκος κύματος 340 nm, σε αντίθεση με το NAD^+ . Έτσι, ο ρυθμός με τον οποίο η απορρόφηση μειώνεται, στα 340 nm, αντιπροσωπεύει και τη μείωση του NADH με τον χρόνο και κατ' επέκταση τον ρυθμό με τον οποίο το NADH οξειδώνεται.

Χρησιμοποιώντας τον τύπο [1] μπορούμε να υπολογίσουμε την ενζυμική δραστηριότητα κάθε δείγματος:

$$E \text{ (m/U)} = \frac{\Delta a \times Vt}{t \times \epsilon \times b} \quad \text{mol/ min} \quad [1]$$

Δa : Διαφορά στην τιμή της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα t

Vt : τελικός όγκος αντίδρασης (mL)

t: χρόνος (min)

ϵ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ($6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

b: μήκος της οπτικής διαδρομής (cm)

Στη συνέχεια, με τη χρήση του τύπου [2] μπορούμε να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα (Specific Activity, S.A) του Συμπλόκου I.

$$\text{Ειδική Δραστηριότητα} = \frac{\text{Ενζυμική ενεργότητα}}{70 \text{ mg πρωτεΐνης}} \quad \text{nmol/min/mg} \quad [2]$$

Ακολουθώντας τα παραπάνω βήματα, υπολογίζεται η ειδική δραστηριότητα του συνόλου των ενζύμων που οξειδώνουν NADH σε NAD⁺, συμπεριλαμβανομένου του Συμπλόκου I. Στο συγκεκριμένο πείραμα, στοχεύουμε στον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας αποκλειστικά του Συμπλόκου I. Έτσι, το πρωτόκολλο χρειάζεται ένα επιπλέον βήμα που θα το καθιστά εξειδικευμένο ως προς το Σύμπλοκο I.

Η ροτενόνη είναι μία ισοφλαβόνη, που αναστέλλει τη λειτουργία του Συμπλόκου I. Έτσι, προκύπτει ότι για ένα δείγμα απομονωμένων λεμφοκυττάρων, η διαφορά:

$$\text{Ειδική Δραστηριότητα (Rot}^-) - \text{Ειδική Δραστηριότητα (Rot}^+)$$

αντιστοιχεί στην Ειδική Δραστηριότητα συγκεκριμένα του Συμπλόκου I.

Στα δείγματα που δεν περιέχουν ροτενόνη (Rot⁻), αυτή αντικαθίσταται από ίσο όγκο DMSO. Να σημειωθεί ότι το CoQ1 είναι ανάλογο του ενδογενούς CoQ₁₀, το οποίο δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εξωγενής δέκτης ηλεκτρονίων, λόγω της υψηλής του υδροφοβικότητας.

Προετοιμασία διαλυμάτων

Σε κάθε δείγμα θα πραγματοποιήσουμε δύο μετρήσεις: μια παρουσία και μια απουσία ροτενόνης. Έτσι, σε κάθε ένα δείγμα στο οποίο θα μελετηθεί η ενζυμική δραστηριότητα, θα πραγματοποιηθούν δύο μετρήσεις. Επίσης, να σημειωθεί ότι ο τελικός όγκος της αντίδρασης θα είναι 1 mL.

Αρχικά, απαιτείται η παρασκευή μιας σειράς διαλυμάτων stock. Οι συγκεντρώσεις τους, οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε αντιδραστήριο, αλλά και ο τελικός όγκος φαίνονται στον Πίνακα 8. Για τον υπολογισμό τους χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι [3] και [4]:

$$C = \frac{n}{V} \quad [3]$$

$$n = \frac{m}{Mr} \quad [4]$$

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση stock	Ποσότητα αντιδραστηρίου	Όγκος stock
K ₂ HPO ₄ pH 7.4	0,1M	K ₂ HPO ₄ 1M -> 80,2 mL KH ₂ PO ₄ 1M -> 19,8 mL	100 mL
BSA	0,2%	0,2 gr	10 mL
MgCl ₂	0,5 M	4,76 gr	100 mL
KCN	1 M	0,065 gr	1 mL
αντιμυκίνη-α	3 mM	0,0164 gr	10 m
NADH	5.7 mM	0,002 gr	1 mL
Ροτενόνη / DMSO	0.36 mM	0,002 gr	10 mL
CoQ1	2 mM	0,002 gr	4 mL

Πίνακας 8: Παρασκευή διαλυμάτων stock.

Οι τελικοί όγκοι που θα χρησιμοποιηθούν από κάθε διάλυμα stock καθορίζονται από την τελική συγκέντρωσή τους που χρειάζεται να υπάρχει στο διάλυμα για την φωτομέτρηση. Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα pre-mix, από τα:

- K₂HPO₄
- BSA
- MgCl₂
- KCN
- αντιμυκίνη-α

Τα υπόλοιπα διαλύματα προστίθενται στη συνέχεια. Στον Πίνακα 9 φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις που χρειάζονται από κάθε διάλυμα και οι όγκοι που λαμβάνουμε απ' το καθένα, ώστε να τις επιτύχουμε.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
K ₂ HPO ₄ pH 7.4	20 mM	200 µL
BSA	0.2%	100 µL
MgCl ₂	4 mM	8 µL
KCN	1.7 mM	1,7 µL
αντιμυκίνη-α	3 µM	1 µL
NADH	200 µM	35,1 µL
ροτενόνη	15 µM	7,5 µL
CoQ1	100 µM	50 µL
Δείγμα + νερό	-	100 µL
Νερό	-	536,7 µL

Πίνακας 9: Οι τελικές συγκεντρώσεις και οι όγκοι που απαιτούνται από κάθε διάλυμα stock και ο όγκος δείγματος και νερού.

Πειραματική διαδικασία

- Αρχικά, είναι απαραίτητο να υπολογίσουμε πόσα µL από κάθε δείγμα περιέχουν 70 µg πρωτεΐνης, όπως υποδεικνύεται στο τρίτο στάδιο (2.3)
- Σε σωλήνα Falcon των 15 mL παρασκευάζεται το pre-mix με ανάμιξη των όγκων που φαίνονται στον Πίνακα 8. Γνωρίζοντας τον όγκο κάθε διαλύματος stock που χρειαζόμαστε και γνωρίζοντας ότι ο τελικός όγκος αντίδρασης θα είναι 1 mL προκύπτει ότι στο pre-mix θα προσθέσουμε 536,7 mL νερό. Ανάλογα με τον αριθμό των μετρήσεων που θα πραγματοποιηθούν, παρασκευάζεται ανάλογος όγκος pre-mix (1 δείγμα -> 2 μετρήσεις, μια Rot⁺ και μια Rot⁻)
- Για κάθε δείγμα απομονωμένων λεμφοκυττάρων από έναν ασθενή, χρησιμοποιούμε 2 Eppendorf. Προσθέτουμε 807,4 µL pre-mix στο καθένα
- Προσθέτουμε την ποσότητα δείγματος που απαιτείται και αντίστοιχη ποσότητα νερού, ώστε ο όγκος του δείγματος και του νερού να είναι 100 µL. Συνεχίζοντας το παράδειγμα του τρίτου σταδίου, εάν ο όγκος του δείγματος υπολογιζόταν 59,22 µL, θα προσθέταμε και 40,78 µL νερού
- Προσθέτουμε 7,5 µL ροτενόνης στο ένα Eppendorf και 7,5 µL DMSO στο άλλο.

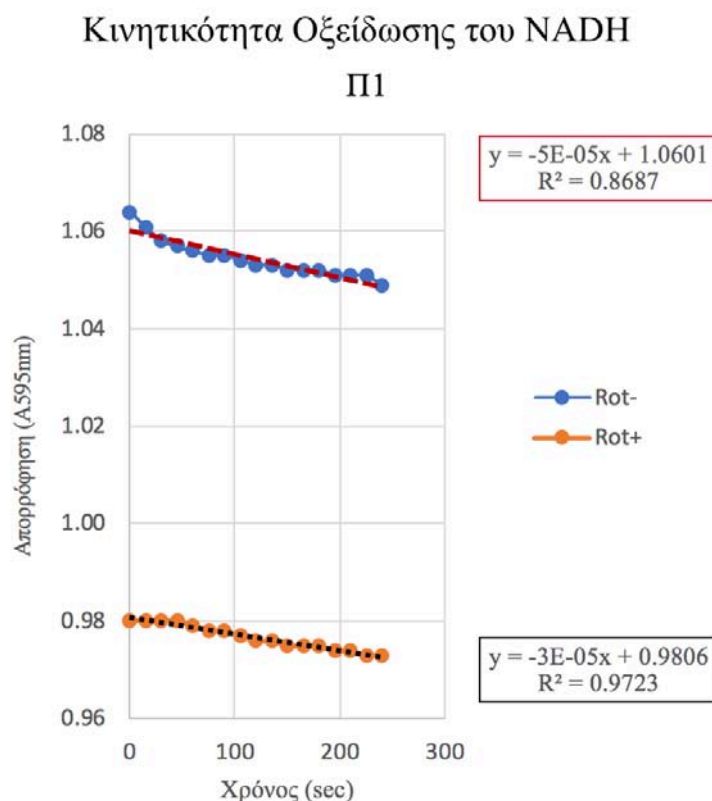
- Προσθέτουμε 35,1 μL NADH σε κάθε Eppendorf
- Αφήνουμε τα Eppendorf στο υδατόλουτρο στους 37° C για 1', ώστε να προσομοιωθεί το φυσιολογικό περιβάλλον λειτουργίας του ενζύμου.
- Ρυθμίζουμε το φωτόμετρο σε μήκος κύματος 340nm και ενεργοποιούμε την λειτουργία της λάμπας UV
- Προσθέτουμε 50 μL CoQ1 σε ένα από τα δύο Eppendorf
- Αναδεύουμε με την πιπέτα
- Τοποθετούμε το περιεχόμενο του Eppendorf σε κυψελίδα χαλαζία
- Μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα και τοποθετούμε την κυψελίδα μέσα σε αυτό
- Ξεκινάμε να λαμβάνουμε μετρήσεις απορρόφησης ξεκινώντας από την χρονική στιγμή 0 και κάθε 15'', για 5 λεπτά
- Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία για το δεύτερο Eppendorf
- Με τη χρήση των τύπων [1] και [2] υπολογίζουμε την ειδική ενζυμική δραστητικότητα Συμπλόκου I, για κάθε δείγμα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

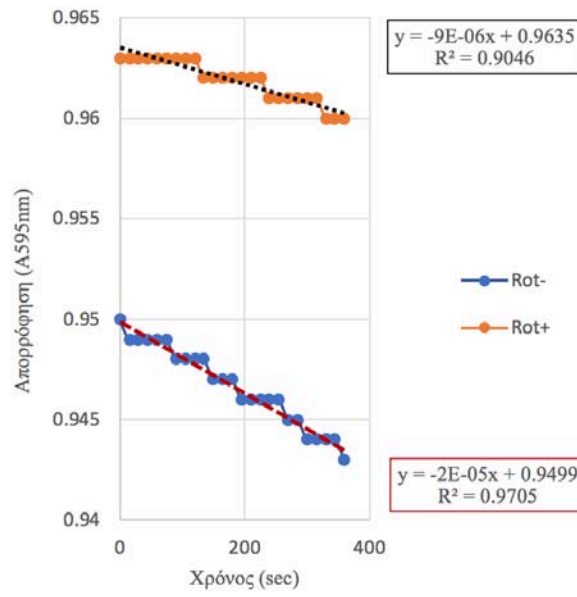
Αφού πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των λεμοκυττάρων (στάδιο 1), η επεξεργασία των δειγμάτων (στάδιο 2) και η ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου (στάδιο 3) ακολούθησε η μέτρηση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I. Σχεδιάστηκαν διαγράμματα που απεικονίζουν την κινητική οξείδωσης του NADH, για το χρονικό διάστημα στο οποίο λαμβάναμε τιμές απορρόφησης. Στη συνέχεια, με βάση τους τύπους [1] και [2] υπολογίστηκαν η ενζυμική δραστηριότητα των Rot^+ και των Rot^- μετρήσεων και, τελικά, η ειδική δραστηριότητα του Συμπλόκου I. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα.

3.1 Κινητικότητα Οξείδωσης του NADH

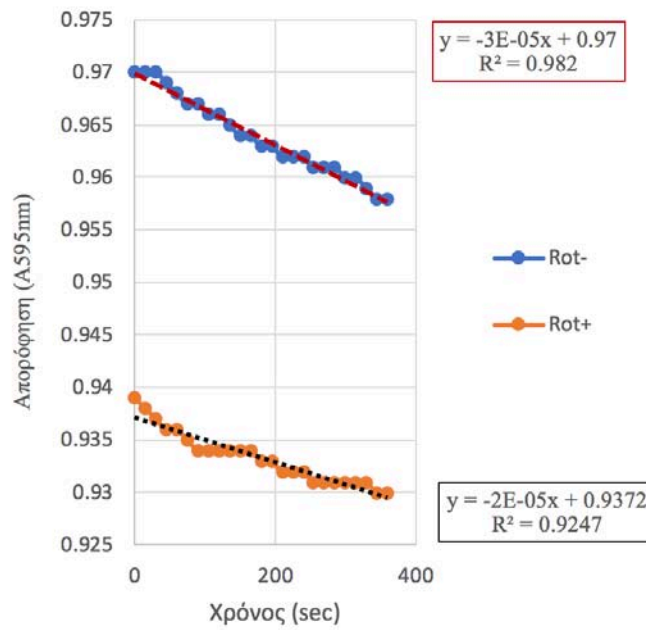
Από την μέτρηση των τιμών απορρόφησης σε κάθε δείγμα, με και χωρίς ροτενόνη, σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα με την Κινητική Οξείδωσης του NADH. Αυτά φαίνονται παρακάτω.



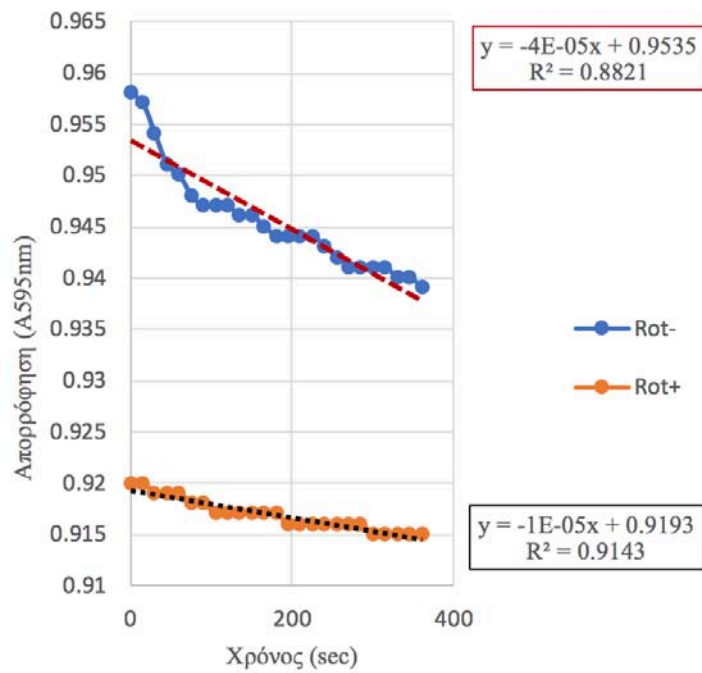
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π2



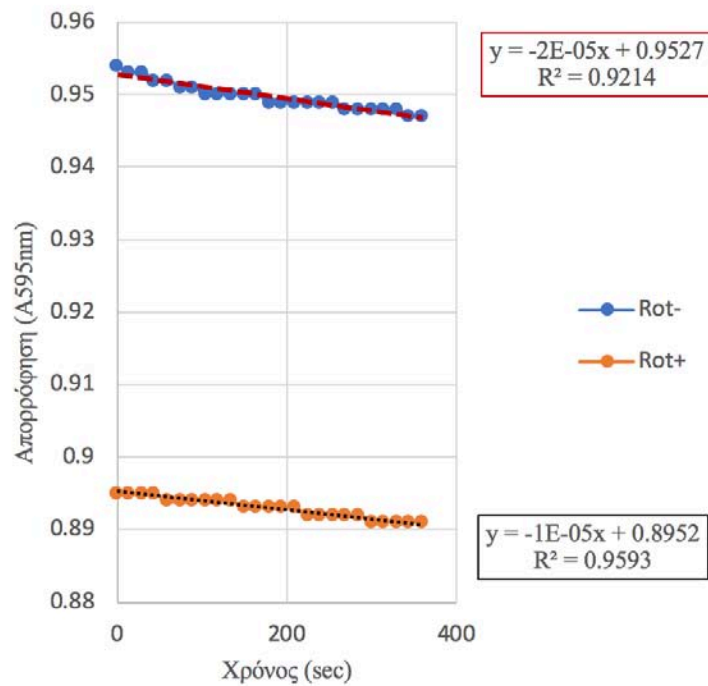
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π3



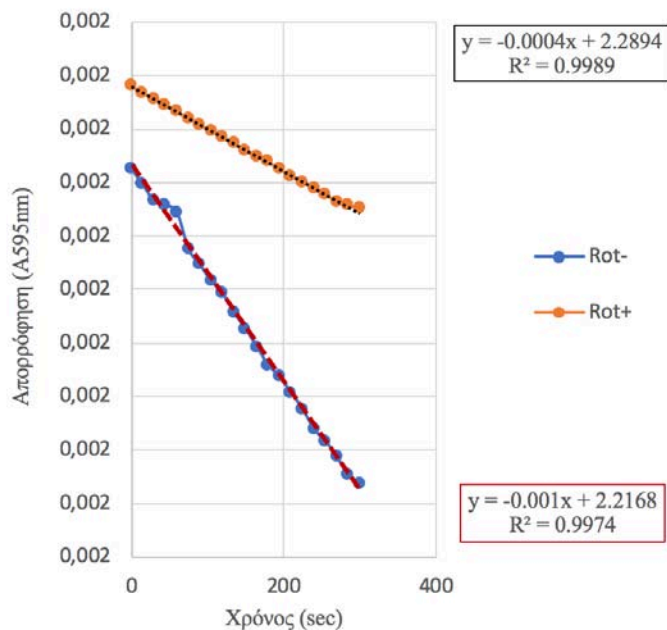
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π4



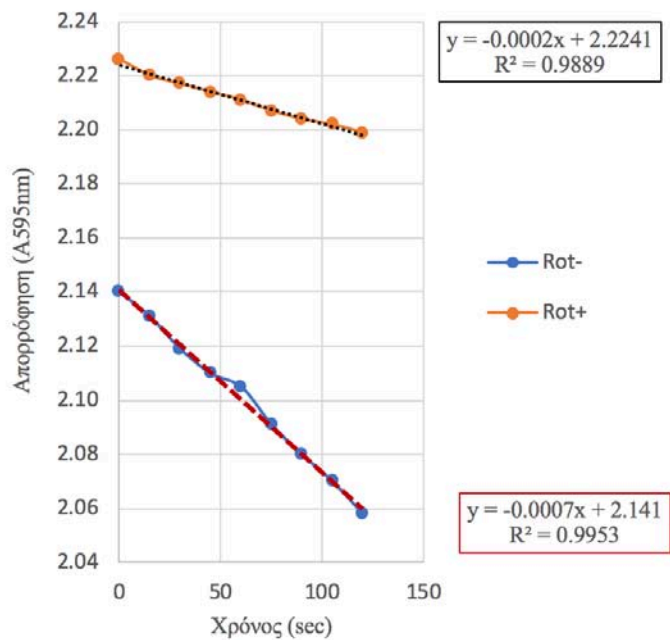
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π5



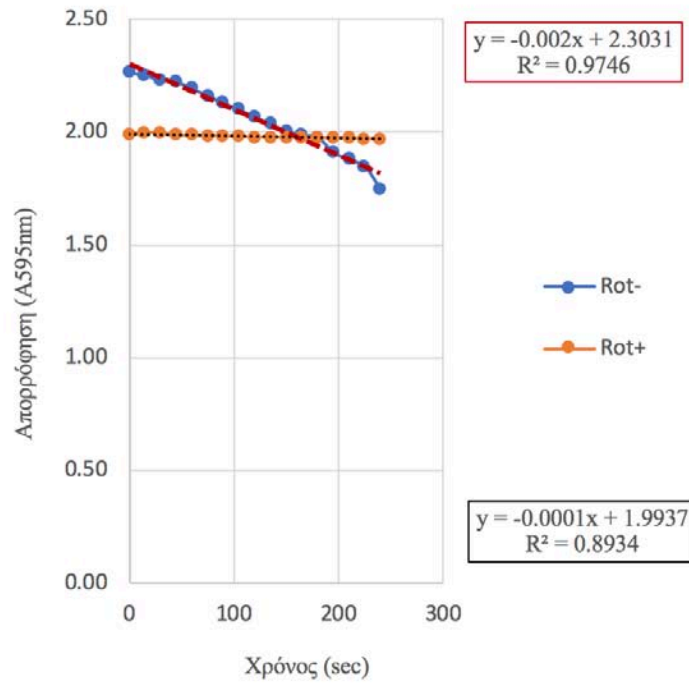
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π6



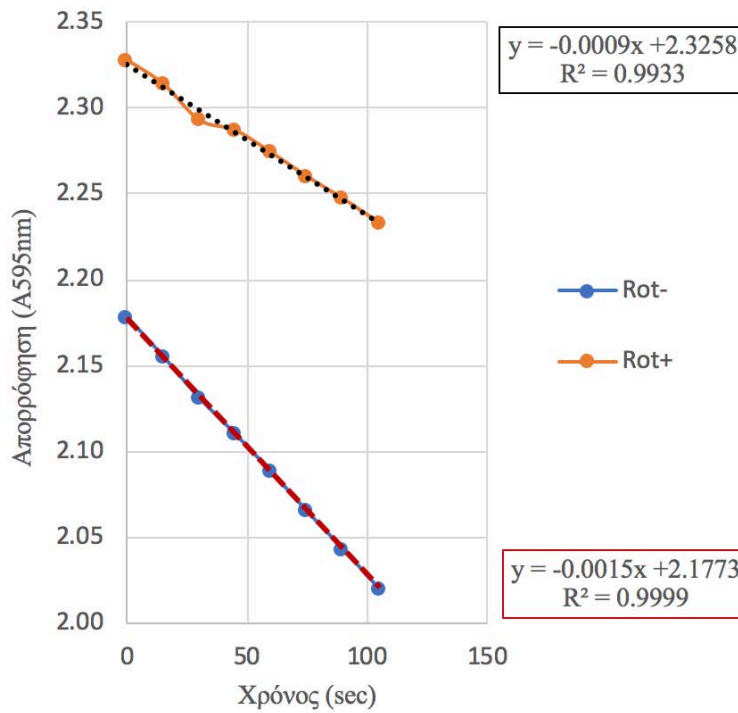
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π7



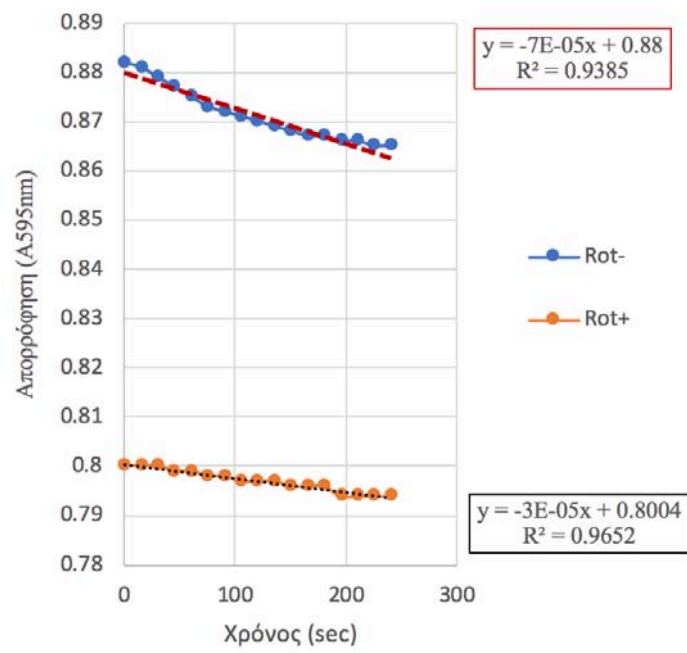
Κινητική Οξείδωσης του NADH Π8



Κινητική Οξείδωσης του NADH Π9



Κινητική Οξείδωσης του NADH Π10



3.2 Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα της Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους NADH – Q

Με τα δεδομένα που λάβαμε από τη φωτομέτρηση και με τη χρήση των τύπων [1] και [2] υπολογίσαμε την ενζυμική δραστικότητα κάθε δείγματος, παρουσία και απουσία ροτενόνης και τελικά την ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

ΔΕΙΓΜΑ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	Specific Activity (Rot-)	Specific Activity (Rot+)	Total Specific Activity of Complex I
			nmol / min / mg πρωτεΐνης		
Π1	Θ	64	8,5	4	4,5
Π2	A	61	2,5	1,1	1,4
Π3	Θ	55	4,5	3,4	1,1
Π4	Θ	54	7,1	1,8	5,3
Π5	Θ	69	2,5	1,4	1,1
Π6	Θ	47	135,4	52,2	83,2
Π7	A	>60	94,1	31	63,1
Π8	Θ	69	98	9,7	88,3
Π9	Θ	56	209	128,5	80,5
Π10	Θ	79	9,7	3,4	6,3
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			57,13	23,65	33,48

Πίνακας 10: Ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I σε δείγματα ατόμων με σαρκοείδωση

3.3 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας με Αποτελέσματα Προηγούμενων Ερευνών

Το εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας διεξήγαγε στο παρελθόν πείραμα μέτρησης της ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I ασθενών με σαρκοείδωση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 11.

ΔΕΙΓΜΑ	Total S.A of Complex I
	nmol / min / mg πρωτεΐνης
Δ1	19
Δ2	28
Δ3	25,5
Δ4	34,3
Δ5	19,8
Δ6	32,7
Δ7	34,3
Δ8	29
Δ9	7
Δ10	27
Δ11	32
Δ12	28,4
Δ13	26,9
Δ14	24
Δ15	4
Δ16	9
Δ17	18
Δ18	17,3
Δ19	26,9
Δ20	25,6
Δ21	26,9
Δ22	34,7
Δ23	38
Δ24	33,3
Δ25	27
Δ26	32
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	25,4

Πίνακας 11: Τιμές ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I ασθενών με σαρκοείδωση, από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου.

Στον Πίνακα 12 φαίνεται ο μέσος όρος των τιμών ειδικής ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, καθώς και ο μέσος όρος τιμών από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου.

ΜΕΛΕΤΗ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΖΝΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
2019	33,48
Αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων	25,4

Πίνακας 12: Σύγκριση του μέσου όρου των τιμών δραστηριότητας από την παρούσα έρευνα και από προηγούμενα πειράματα.

3.4 Σύγκριση των Τιμών Δραστηριότητας Ατόμων με Σαρκοείδωση και Ατόμων Control

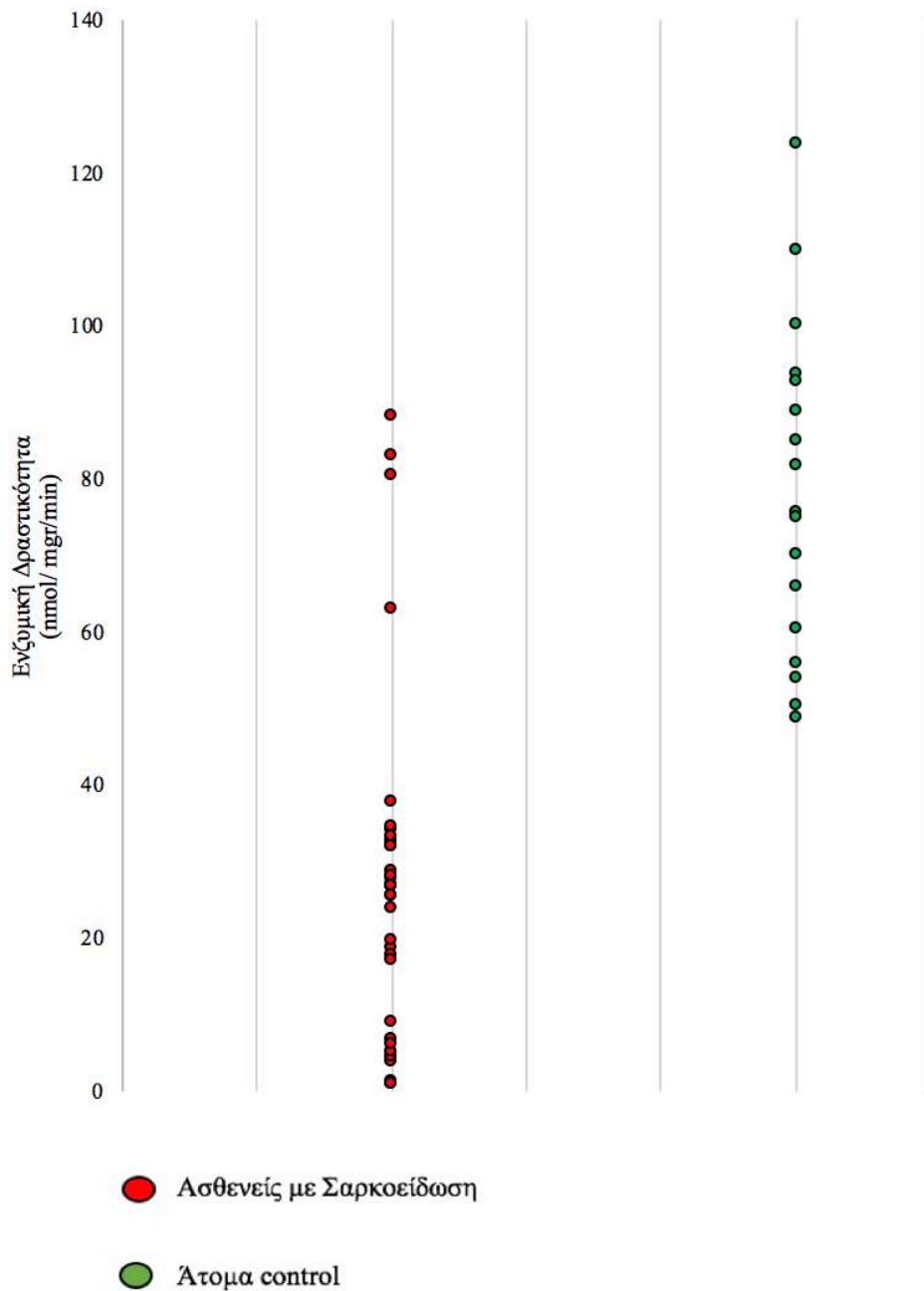
Στον Πίνακα 13 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I από δείγματα αίματος ατόμων control.

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	Total S.A of Complex I nmol / min / mg πρωτεΐνης
C1	27	60,5
C2	25	75,9
C3	22	70,15
C4	25	48,95
C5	28	54
C6	23	100,29
C7	25	94
C8	25	56
C9	60	75
C10	54	124
C11	57	85
C12	30	66
C13	28	82
C14	64	89
C15	51	110
C16	22	93
C17	22	50,53
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ		78,48

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μέτρησης δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε δείγματα control.

Οι τιμές ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I των ασθενών με σαρκοείδωση συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές των ατόμων control (Διάγραμμα 2).

Σύγκριση Τιμών Δραστηριότητας του Συμπλόκου I



Διάγραμμα 2: Σύγκριση των τιμών ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I μεταξύ ασθενών με σαρκοείδωση και ατόμων control.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων. Μέχρι και σήμερα παραμένει άγνωστης αιτιολογίας. Το πείραμα διεξήχθη σε μιτοχόνδρια από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά, μετρώντας την οξείδωση του $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$, παρουσία και απουσία ροτενόνης. Η ροτενόνη είναι μια ισοφλαβόνη, που αναστέλλει τη λειτουργία του Συμπλόκου I. Έτσι, η διαφορά των τιμών που λαμβάνεται απουσία μείον παρουσία ροτενόνης αντιστοιχεί στην ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I. Ο σκοπός της εργασίας είναι να εξεταστεί η υπόθεση μιτοχονδριακής προέλευσης της σαρκοείδωσης.

Οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I που βρέθηκαν, συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές υγιών ατόμων. Πράγματι, οι περισσότερες τιμές ασθενών με σαρκοείδωση (μέσος όρος τιμών: 33,48) ήταν σημαντικά μικρότερες από τις τιμές control (μέσος όρος τιμών: 78,48).

Οι τιμές συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου και επαληθεύτηκε η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I. Η βιβλιογραφία όσον αφορά την ειδική δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου τόσο για υγιή άτομα όσο και για άτομα που πάσχουν από κάποια ασθένεια είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα περιστατικό σαρκοείδωσης, στο οποίο είχε καταγραφεί μειωμένη δραστηριότητα του Συμπλόκου I και γενικότερη δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (*Reichman et al., 1994*) ενισχύοντας την υπόθεση ότι η αιτιολογία της σαρκοείδωσης θα μπορούσε να εντοπίζεται σε μιτοχονδριακή βλάβη, συγκεκριμένα του Συμπλόκου I.

Οι ασθενείς Π1, Π2, Π3, Π4, Π5 και Π10 εμφάνισαν ιδιαίτερα μικρή τιμή ενζυμικής δραστηριότητας, συγκεκριμένα μεταξύ 1,1-6,3 nmol/min/mgr. Έχει παρατηρηθεί ότι με την γήρανση ενός ατόμου επέρχεται και μείωση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων (*Petersen et al., 2003*). Μάλιστα, έχει σημειωθεί συσσώρευση μεταλλάξεων της αναπνευστικής αλυσίδας, που σχετίζονται με τη γήρανση (*Sandu and Kaur, 2003*, ενώ δυσλειτουργία της συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες (*Adams and Turnbull, 1996*). Παράλληλα, η δυσλειτουργία του Συμπλόκου I είναι αυτή που απαντάται συχνότερα σε περιπτώσεις μιτοχονδριακής βλάβης (*Rodenburg, 2011*). Συνεπώς, τα αποτελέσματα των παραπάνω ασθενών θα μπορούσαν να οφείλονται σε συνδυασμό παραγόντων, οδηγούν το Σύμπλοκο I σε μεγαλύτερη δυσλειτουργία.

Ο μηχανισμός παθογένεσης της σαρκοείδωσης βασίζεται στην ενεργοποίηση ανοσολογικής

απόκρισης του οργανισμού εναντίον ενός άγνωστου αντιγόνου, ωστόσο η προέλευση του αντιγόνου παραμένει άγνωστη (Patterson and Chen, 2017). Έρευνες υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις, αλλά και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Weinberg, Sena, Chandel, 2015). Τμήματα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία μετά από ένδειξη μόλυνσης του οργανισμού. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται mt-DNA DAMPs (*mitochondrial-DNA Damage-Associated Molecular Pattern*) (Kuck et al., 2015). Μιτοχονδριακό DNA, το οποίο ενδοκυτταρικά κωδικοποιεί για ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας, μπορεί να απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και να λειτουργεί ως προ-φλεγμονώδης απόκριση, δρώντας ως mt-DNA DAMP (Grazioli and Pugin, 2018). Συγκεκριμένα, όταν mt-DNA DAMPs εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, τον εξωκυττάριο χώρο ή την συστηματική κυκλοφορία, μπορούν να επάγουν προ-φλεγμονώδεις και type I- interferon αποκρίσεις (Cruz and Kang, 2017). Έχει αναχνηθεί ότι mt-DAMPs είναι σημαντικοί μεσολαβητές ανοσολογικών αποκρίσεων και εμπλέκονται σε διάφορες καταστάσεις, όπως αυτοάνοσες ασθένειες. Γενικότερα, επικρατεί η άποψη ότι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες προκαλούν άσκοπες και με μεγάλη διάρκεια φλεγμονώδεις αποκρίσεις, γεγονός που οδηγεί σε χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως πνευμονική ίνωση, COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) (Dela Cruz and Kang, 2018). Το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας είναι υπεύθυνο για μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων ROS (Hirst, King, Pryde, 2008). Μεγάλο ποσοστό χρόνιων ασθενειών των πνευμόνων οφείλεται σε οξειδωτικό stress (van der Vliet et al., 2018). Δεδομένων των μεταλλάξεων που βρέθηκαν σε μιτοχονδριακό DNA ασθενών με σαρκοείδωση (Daniil et al., 2018) και με βάση τις αυξανόμενες έρευνες που θέλουν τα μιτοχόνδρια σημαντικούς διαμεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης (Grazioli and Pugin, 2018), ενισχύεται η υπόθεση μιτοχονδριακής προέλευσης της σαρκοείδωσης.

Η συσχέτιση μιας βλάβης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με τη σαρκοείδωση θέτει τα θεμέλια για την βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού παθογένεσης, που κρύβεται πίσω από την ανεξήγητη ανοσολογική απόκριση με την οποία ξεκινά η σαρκοείδωση. Επίσης, οδηγεί στην κατάταξή της στις ασθένειες που οφείλονται σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η συνήθεις θεραπείες για μιτοχονδριακές ασθένειες έχουν υποστηρικτικό ρόλο και στοχεύουν στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας των ασθενειών έχει βοηθήσει στην ανάπτυξη πιο στοχευμένων θεραπειών (Hirano, Emmanuele, Quinzii, 2018).

Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια, η οποία προσβάλλει αρκετά διαφορετικά όργανα και εμφανίζει ποικιλία συμπτωμάτων (Statement on Sarcoidosis, 1999). Επιπροσθέτως, η λειτουργία των μιτοχονδρίων φαίνεται να επηρεάζεται από τη γήρανση του ατόμου. Αυτό καθιστά δύσκολο το να προσδιοριστεί ένας μοναδικός παράγοντας, στην συγκεκριμένη εργασία η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία του Συμπλόκου I, ως αιτιολογία της

ασθένειας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ιδιαίτερα αυξημένη περίπτωση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, πίσω από την παθολογία της σαρκοείδωσης. Συγκεκριμένα, το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας φαίνεται να υπολειτουργεί στους ασθενείς σαρκοείδωσης σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, όπως υποδεικνύουν οι τιμές ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας που λήφθηκαν. Ακόμα, ενισχύουν την υπάρχουσα βιβλιογραφία με τιμές ειδικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I.

Ωστόσο, η υπόθεση περί μιτοχονδριακής προέλευσης της σαρκοείδωσης χρειάζεται περισσότερα στοιχεία, που να την υποστηρίζουν. Σε επόμενο βήμα, θα μπορούσαν να ελεγχθούν τα επίπεδα οξειδωτικού *stress* σε άτομα με σαρκοείδωση, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, αλλά και η εμπλοκή του Συμπλόκου I στην παθογένεια της ασθένειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, PL., Turnbull, DM., Disorders of the Electron Transport Chain, *J Inherit Metab Dis.* 19 (4): 463-469; (1996). PMID: 8884570

Ahmad M, Kahwaji CI. Biochemistry, Electron Transport Chain. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>

Andalib, S., et al., Mitochondrial DNA G15927A and G15928A variations in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* Jan; 27:9-12; (2019). DOI: 10.1016/j.msard.2018.09.004.

Arkema, EV., Cozier, YC., Epidemiology of sarcoidosis: current findings and future directions. *Ther Adv Chronic Dis.* 9(11):227–240; (2018). DOI:10.1177/2040622318790197

Barrientos, A., Fontanesi, F., Díaz, F., Evaluation of the Mitochondrial UNIT 19.3 Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System Using Polarography and Spectrophotometric Enzyme Assays. *Current protocols in human genetics*; (2010). DOI:10.1002/0471142905.hg1904s63

Baughman, RP., Lower, EE., du Bois, RM., Sarcoidosis, *Lancet.* Mar 29;361(9363):1111-8; (2003). DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12888-7

Baughman, RP., Lower, EE., Treatment of Sarcoidosis, *Clin Rev Allergy Immunol.* mochiAug;49(1):79-92; (2015). DOI: 10.1007/s12016-015-8492-9.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biochemistry; (2012)

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*; (1976). 72, 248–254

Burton, G. J., Jauniaux, E., Oxidative stress. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*; (2011). 25(3), 287–299. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

Caroll, J., Fearnley, IM., Skehel, JM., Shannon, RJ., Hirst, J., Walker, JE., Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem.* Oct 27;281(43):32724-7; (2006). DOI: 10.1074/jbc.M607135200

Celada LJ, Kropski JA, Herazo-Maya JD, et al., PD-1 up-regulation on CD4⁺ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF-β1 production. *Sci Transl Med.* 10(460); 2018. DOI:10.1126/scitranslmed.aar8356

Chan, ES., Cronstein, BN., Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis.* 71 Suppl 1:S5-8; (2013). PMID: 24219035

Chen, ES., Moller, DR., Etiologies of Sarcoidosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* Aug; 49(1):6-18; (2015). DOI: 10.1007/s12016-015-8481-z

Christophe Wirth, Ulrich Brandt, Carola Hunte, Volker Zickermann, Structure and function of mitochondrial complex I. *BBA – Bioenergetics*; (2016). DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.02.013

Cooper, Geoffrey M., *The Cell: A Molecular Approach*. *Sinauer Associates*; (2000). 2nd Edition, ISBN-10: 0-87893-106-6

Dela Cruz CS, Kang MJ. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion*. 41:37–44; (2018). DOI:10.1016/j.mito.2017.12.001

Devlin, Thomas M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. *Wiley*; 6th edition; (2006). ASIN: B00L9 FINZY

De Wit, L.E.A., et al., A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes. *Journal of Immunological Methods*; (2007). DOI: 10.1016/j.jim.2007.07.009

Duchen, M. R., Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, 25; (2004). 365–451. DOI: 10.1016/j.mam.2004.03.001

Emily Zifa, Stamatina Giannouli, Paschalis Theotokis, Costas Stamatis, Zissis Mamuris & Constantinos Stathopoulos, Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations. *RNA Biology*; (2007). 4:1, 38-66, DOI: 10.4161/rna.4.1.4548

Fang, T., Wang, M., Xiao, H., Wei, X., Mitochondrial dysfunction and chronic lung disease. *Cell Biology and Toxicology*; (2019). DOI: 10.1007/s10565-019-09473-9

Fiedorczuk, K., Sazanov, L. A., Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends in Cell Biology*; (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.006>

Gascan, H., et al., Membranes of activated CD4⁺ T cells expressing T cell receptor (TcR) alpha beta or TcR gamma delta induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4, *Eur J Immunol*. May; 22(5):1133-41; (1992). DOI: 10.1002/eji.1830220505

Grazioli S, Pugin J. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:832; (2018) DOI:10.3389/fimmu.2018.00832

Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281, 1309 – 1312; (1998). DOI: 10.1126/science.281.5381.1309

Grutters, Jan C., Sarcoidosis: Evolving Concepts. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 38(4):391-392; (2017). DOI:10.1055/s-0037-1604191

Guo R, et al., Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical Journal*; (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.12.001>

Gupta D, Agarwal R, Aggarwal AN, Jindal SK, Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: a meta-analysis. *Eur Respir J*. 30(3):508–516; (2007). DOI: 10.1183/09031936.00002607

Heinz, Sabrina, et al., Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone

in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Scientific Reports*. Volume 7, Article number: 45465; (2017). DOI: 10.1038/srep45465

Henze K., Martin W., Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. 426 (6963): 127–128; (2003). DOI:10.1038/426127a

Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem.*;62(3):467–481; (2018). DOI:10.1042/EBC20170114

Hirst, J., King, MS., Pryde, KR., The production of reactive oxygen species by complex I, *Biochem Soc Trans*. Oct;36(Pt 5):976-80; (2008). DOI: 10.1042/BST0360976.

Hsiao, C. P., C. Hoppel, Analyzing mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells. *Analytical Biochemistry*; (2018). DOI: 10.1016/j.ab.2018.03.003

Hu, Yijie, Yibrehu, Betel, Zabini, Diana, Kuebler, Wolfgang M., Animal Models of Sarcoidosis, *Cell and Tissue Research*. 367(3):651-661; (2017). DOI: 10.1007/s00441-016-2526-3

Isshiki, T., et al., Usefulness of Low-Dose Methotrexate Monotherapy for Treating Sarcoidosis, *Intern Med*. 52 (24): 2727-32; (2013). DOI: 10.2169/internalmedicine.52.0976

Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. p. 372-375; (1960)

Kindt, J.T., Goldsby, A.R., Osborne, A.B., Immunology, *W.H. Freeman and Company*. Sixth Edition, 410-417; (2007)

Kiper, N., Anadol, D., Ozçelik, U., Göçmen, A., Inhaled Corticosteroids for Maintenance Treatment in Childhood Pulmonary Sarcoidosis, *Acta Paediatr*. 90(8):953-6; (2001). PMID: 11529550

Kruger, N.J., The Bradford Method for Protein Quantitation, *The Protein Protocols Handbook*; (2009). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4

Kuck, JL., et al., Mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns mediate a feed-forward cycle of bacteria-induced vascular injury in perfused rat lungs, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 15;308(10): L1078-85; (2015). doi: 10.1152/ajplung.00015.2015.

Lin, T. Michael, et al., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*; (2006). DOI:10.1038/nature05292

Liu, X., Chen, Z., The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung disease, *Journal of Translational Medicine*. 15: 207; (2017). DOI: 10.1186/s12967-017-1306-5

Lucia Sedlackova, Viktor I. Korolchuk, Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. *Bbamcr*; (2018). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.12.012

Melton, T., Mitochondrial DNA Heteroplasmy. *Forensic Sci Rev*. 16(1):1-20; (2004). PMID:

26256810

Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, DR., Ryan, MT., Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease, *BBA – Bioenergetics*. 1817: 851 - 862; (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.08.010

Mochizuki, I., Kubo, K., Honda, T., Relationship between mitochondria and the development of specific lipid droplets in capillary endothelial cells of the respiratory tract in patients with sarcoidosis, *Mitochondrion*. 11: 601-606; (2011). DOI: 10.1016/j.mito.2011.03.009

Mohammed F, Rezaee Khorasany AR, Mosaieby E, Houshmand M. Mitochondrial A12308G alteration in tRNA (Leu(CUN)) in colorectal cancer samples. *Diagn Pathol*. 10:115; (2015). DOI:10.1186/s13000-015-0337-6

Müller-Quernheim, J., Prasse, A., Zissel, G., Pathogenesis of Sarcoidosis. *La Presse Médicale*. 41 (6), 275-287; (2012). DOI: 10.1016/j.lpm.2012.03.018

Nathan, N., et al., Paediatric Sarcoidosis, *Paediatr Respir Rev*. Feb;29:53-59; (2019). DOI: 10.1016/j.prrv.2018.05.003

Nunes, H., Bouvry. D., Soler, P., Valeyre, D., Sarcoidosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2:46; (2007). DOI:10.1186/1750-1172-2-46

Orth, M., Schapira, AH., Mitochondria and Degenerative Disorders, *Am J Med Genet*. 106(1):27-36; (2001). DOI: 10.1002/ajmg.1425

Patterson, K., Chen, Edward S., The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment, *Recent Advances in Chest Medicine*, 153(6), 1432-1442; (2018). DOI: 10.1016/j.chest.2017.11.030

Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*.193(5):809–818; (2011). DOI:10.1083/jcb.201010024

Perkins, G. A., Frey, T. G., Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy, *Micron*. 31, 97–111; (2000). PMID: 10568232

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*. 300:1140–1142; (2003). DOI: 10.1126/science.1082889

Reichmann, H., et al., Sarcoidmyopathy and mitochondrial respiratory chain defects: clinicopathological, biochemical and molecular biological analyses, *Neuromuscul Disord*. Jul; 5(4): 277-283; (1996). PMID: 7580239

Rizwan, S., Bokhari, A., Zulfikar, H., Mansur, A., Sarcoidosis. *StatPearls Publishing*; (2019). PMID: 28613460

Rodenburg, R.J. Biochemical Diagnosis of Mitochondrial Disorders, *J Inherit Metab Dis*.

34(2):283-292; (2011). DOI: 10.1007/s10545-010-9081-y

Rosen, Y., Pathology of Sarcoidosis, *Respiratory and Critical Care Medicine*. 28:36–52; (2007). DOI: 10.1055/s-2007-970332

Salah, S., Abad, S., Monnet, D., Brézin, A. P., Sarcoidosis, *Journal Français D'Ophthalmologie*. 41(10): e451-e467; (2018). DOI: 10.1016/j.jfo.2018.10.002

Sandhu SK, Kaur G. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology*. 4:19–29; (2003). PMID: 12652186

Sharma, Lokendra K., et al., Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases, *Current Medicinal Chemistry*. Volume 16, Number 10, p. 1266-1277; (2009). DOI: <https://doi.org/10.2174/092986709787846578>

Shetty, AK., Gedalia, A. Childhood sarcoidosis: A rare but fascinating disorder. *Pediatr Rheumatol Online J*. 6:16; (2008). DOI:10.1186/1546-0096-6-16

Spinazzi, M., et al., Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells, *Nature Protocols*; (2012). DOI:10.1038/nprot.2012.058

Statement on Sarcoidosis, *Am J Respir Crit Care Med*. Aug;160(2):736-55; (1999). DOI: 10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99

Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*. 61(5):654–666; (2016) DOI:10.1016/j.molcel.2016.01.028

Sverrild A, Backer V, Kyvik KO, et al., Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study, *Thorax*. 63:894-896; (2008). DOI: 10.1136/thx.2007.094060

Ungprasert, P., Crowson, C. and Matteson, E., Epidemiology and clinical characteristics of sarcoidosis: an update from a population-based cohort study from Olmsted County, Minnesota” in *Reumatismo*. 69(1), pp. 16-22; (2017). DOI: 10.4081/reumatismo.2017.965.

Van der Velden, V H. “Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma.” *Mediators of inflammation*. vol. 7,4:229-37; (1998). DOI:10.1080/09629359890910

Van der Vliet, A., Janssen-Heininger, YMW., Anathy, V., Oxidative stress in chronic lung disease: From mitochondrial dysfunction to dysregulated redox signaling, *Mol Aspects Med*. 63:59-69; (2018). DOI: 10.1016/j.mam.2018.08.001

Van Gundy, Karl, Sharma P., Om, Pathogenesis of Sarcoidosis, in *West J Med*. 147(2): 168–174; (1987). PMID: 3310401

Verkhovskaya, ML, Belevich. N, Euro L, Wikström M, Verkhovsky MI, Real-time electron

transfer in respiratory complex I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 11;105(10):3763-7; (2008). DOI: 10.1073/pnas.0711249105.

Wallace, DC., Chalkia, D., Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Nov 1;5(11); (2013). DOI: 10.1101/cshperspect.a021220.

Weinberg, SE., Sena, LA., Chandel, NS., Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*. 42:406–417; (2015). DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.

Zoe Daniil, Ourania S. Kotsiou, Alexandros Grammatikopoulos, Sotiria Peletidou, Helen Gkika, Foteini Malli, Katerina Antoniou, Eirini Vasarmidi, Zissis Mamuris, Konstantinos Gourgoulialis, Emily Zifa, Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Mitochondrion*; (2018). DOI: 10.1016/j.mito.2018.10.004