

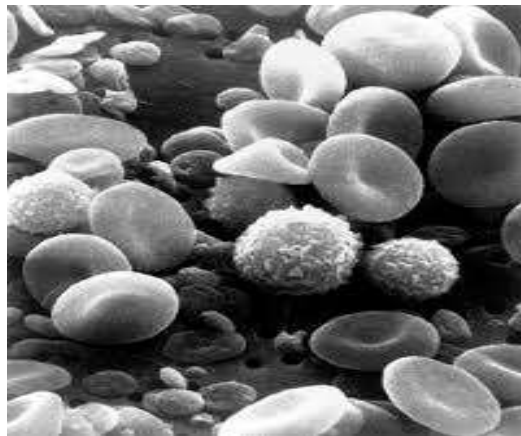


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Προπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ  
ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΟΥ ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q  
(ΣΥΜΠΛΟΚΟ Ι) ΣΕ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ  
ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΣΕ ΑΤΟΜΑ CONTROL

Measurement of the activity of enzyme complex I of the  
respiratory chain in patients with sarkoidosis and control group  
of people



**Λάρισα 2016**

**ΑΝΤΩΝΙΑ ΑΡΕΑΛΗ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιολογίας- Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΨΑΡΡΑ ANNA- ΜΑΡΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ	Αναπληρώτρια καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι επιβλέπουσες καθηγήτριες ήταν η κ. Αιμιλία Ζίφα (Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και η κ. Άννα-Μαρία Ψάρρα (Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) στις οποίες και θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την βοήθεια τους, το ενδιαφέρον τους αλλά και το χρόνο που διέθεσαν για τη διεκπεραίωσή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Δανιήλ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Ιατρικής Π.Θ.) για συνεργασία και τη βοήθειά της στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον προπτυχιακό φοιτητή Ευγένιο Μπουζέτο καθώς και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Παναγιωτίδου για τη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για τη στήριξή τους και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
2. ABSTRACT.....	6
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
3.1 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	7
3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	10
3.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	13
3.4 ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	16
3.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	17
3.6 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΚΑΙ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	18
3.7 ΣΤΟΧΟΣ.....	20
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	22
4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	23
4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	24
4.4 ΑΠΟΜΩΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	26
4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΟΥ NADH.....	30
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο λαμβάνει χώρα στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, τα οποία είναι ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια. Τα τελευταία χρόνια διερευνάται ο ρόλος των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σε φλεγμονώδεις διαταραχές των πνευμόνων, δεδομένου ότι έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών t-RNA γονιδίων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η πνευμονική ίνωση, το άσθμα και η σαρκοείδωση. Η σαρκοείδωση αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή στην οποία δημιουργούνται μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα με μεγαλύτερη συχνότητα στους πνεύμονες. Η ύπαρξη μεταλλάξεων στα mt-tRNAs μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας με πιθανό αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής mt-ROS που με τη σειρά τους συμβάλλουν στον σχηματισμό των κοκκίων και στην επαγωγή της φλεγμονής που παρατηρούνται στην σαρκοείδωση. Στην εργασία μας αυτή επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση δυσλειτουργίας των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων με την εμφάνιση της νόσου. Για το σκοπό αυτό έγινε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση και συγκρίθηκε με αυτήν υγιών ατόμων. Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του Συμπλόκου I, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού της οξείδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I. Η αντίδραση αυτή αναστέλλεται από τη ροτενόνη.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τη μελέτη μας, η οποία βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο, είναι πως υπάρχει ένδειξη μειωμένης λειτουργικότητας του Συμπλόκου I σε ασθενείς με σαρκοείδωση σε σύγκριση με αυτήν των υγιών ατόμων.

## **2. ABSTRACT**

Energy production in cells takes place at the respiratory chain in mitochondria, which are semi-autonomous cellular organelles. During the last years, the role of mitochondrial dysfunctions in inflammatory disorders of the lungs is under investigation, given the fact that mutations in mitochondrial t-RNA genes have been observed in various pathological situations such as fibrosis, asthma and sarcoidosis. Sarcoidosis is a autoimmunity disorder in which granulomas are formed in one or more organs with a predilection for the lungs. Mutations in mt-tRNAs can cause dysfunction of respiratory chain complexes with a probable result of increased production of mt-ROS which on their turn, contribute to granuloma formation and induction of inflammation that are observed in sarcoidosis. In this study, we tried to examine the possible connection between the dysfunction of the enzymes of the respiratory chain in mitochondria with the presence of the disease. Complex I is the first of the four complexes of mitochondrial respiratory chain and its deficiency is probably the most common enzyme defect among the group of OXPHOS disorders. For this purpose, the enzyme activity of NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) was calculated in lymphocytes from peripheral blood of patients and was compared with that from healthy people. To evaluate the activity of Complex I Oxidoreductase, a spectrophotometric assay measuring NADH oxidation by Complex I was used. This chemical reaction is suspended from rotenone.

Conclusion in our study, that is still in a basic stage, is that there is an indication of reduced activity of Complex I in patients with sarcoidosis compared to that in healthy people.

### 3.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 3.1 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Η σαρκοείδωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, στην οποία δημιουργούνται μικροσκοπικές συσσωρεύσεις κυττάρων σε διάφορα όργανα του σώματος, που ονομάζονται κοκκιώματα, επειδή μοιάζουν με κόκκους άμμου ή ζάχαρης. Η αιτιολογία της νόσου είναι μέχρι στιγμής άγνωστη. Η σαρκοείδωση χαρακτηρίζεται ως πολυσυστηματική νόσος η οποία συνήθως εκδηλώνεται σε ενήλικες νεαρής ή μέσης ηλικίας. Επίσης, μπορεί να προσβάλλει σχεδόν κάθε όργανο του σώματος, αλλά συνηθέστερες είναι οι βλάβες σε: πνεύμονες, αδένες του μεσοθωρακίου, λεμφαδένες, σπλήνα και στο δέρμα ποσοστό (>90%) (πίνακας1).

Τα όργανα που εμπλέκονται κυρίως στη σαρκοείδωση είναι οι πνεύμονες, τα μάτια και το δέρμα, δηλαδή εκείνα που έρχονται σε συχνότερη επαφή με το περιβάλλον. Ακόμη, η πνευμονική σαρκοείδωση προσβάλλει τόσο τους λεμφαδένες των πυλών, όσο και του μεσοθωρακίου. Η αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια είναι το συχνότερο ακτινολογικό εύρημα στα παιδιά και παρατηρείται σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις.



Εικ.1

Ιστολογικά, ο διάμεσος πνευμονικός ιστός παρουσιάζει σαφώς οριοθετημένα ρευστοποιά κοκκιώματα, τα οποία ακολουθούν εκλεκτικά τις βρογχαγγειακές δέσμες. Η κοκκιοματώδης φλεγμονή συχνά συνοδεύεται από άτυπες μονοπυρηνικές κυτταρικές διηθήσεις. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η προσβολή του παρεγχύματος μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη ίνωση.

Πίνακας 1: Συχνότητα προσβολής των διάφορων οργάνων από Σαρκοείδωση

<u>Συχνότητες προσβολής</u> <u>των διαφόρων οργάνων από σαρκοείδωση</u>	<u>Ποσοστό</u>
Παραπυλαία λεμφαδενοπάθεια	74%
Προσβολή των πνευμόνων	46%
Λεμφαδενοπάθεια	28%
Προσβολή οφθαλμών	27%
Βλάβες του δέρματος	23%
Προσβολή ήπατος ή και σπληνός	10%
Προσβολή παρωτίδας	6%
Προσβολή ΚΝΣ	5%
Προσβολή οστών	4%

Τα συμπτώματα της νόσου διαφέρουν ανάλογα με τα όργανα που προσβάλλονται σε κάθε περίπτωση (πίνακας 2). Κάποιες φορές τα συμπτώματα της σαρκοείδωσης εμφανίζονται σταδιακά και διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και άλλες φορές μπορεί να εμφανιστούν ραγδαία και να εξαφανιστούν πολύ γρήγορα. Τα πιο κοινά συμπτώματα που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μπορεί ένας άνθρωπος να πάσχει από σαρκοείδωση είναι τα παρακάτω:

- Κόπωση
- Υψηλός πυρετός
- Απώλεια βάρους
- Πρησμένοι λεμφαδένες



**Πίνακας 2.** Συμπτώματα στα όργανα ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισης.

ΟΡΓΑΝΑ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
Πνεύμονες	Δύσπνοια, βήχας, πόνος στο στήθος, πνευμονική υπέρταση
Δέρμα	οζώδες ερύθημα, ο ερυθηματώδης λύκος, τα υποδόρια οζίδια (περίπου το 25% των περιπτώσεων)
Ήπαρ	Ηπατομεγαλία, ίκτερος
Καρδιά	Αρρυθμίες, μυοκαρδιοπάθεια
Οφθαλμοί	Ερυθρότητα, πόνος, μείωση όρασης, γλαύκωμα
Κ.Ν.Σ	Βλάβη κρανιακών νευρων, άσηπτη μηνιγγίτιδα/εγκεφαλίτιδα, περιφερική νευροπάθεια
Αιμοποιητικό σύστημα	Λεμφοπενία, αυξημένη γ-σφαιρίνη



Η σταδιοποίηση της νόσου κατέχει κομβικό ρόλο στη διάγνωση της σαρκοείδωσης. Τα ακτινολογικά ευρήματα επιτρέπουν τη σταδιοποίηση της νόσου:

Στάδιο 0: Φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος (5-10% των ατόμων με σαρκοείδωση)

Στάδιο 1: αμφοτερόπλευρη διόγκωση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου (50% των ασθενών)

Στάδιο 2: αμφοτερόπλευρη διόγκωση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου και παρουσία πνευμονικών διηθημάτων (25%)

Στάδιο 3: παρουσία πνευμονικών διηθημάτων χωρίς λεμφαδενοπάθεια (15%)

Στάδιο 4: πνευμονική ίνωση (5%)

### **3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

Η συχνότητα της σαρκοείδωσης διαφέρει ανάλογα με τις μελέτες που υπάρχουν και κυμαίνεται ευρέως μεταξύ 0,03 έως 640 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού. Σε γενικές γραμμές η πρόγνωση της νόσου είναι καλή.

Ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπων που έχουν προσβληθεί δεν θα εμφανίσουν ποτέ κλινικά συμπτώματα και από αυτούς που θα εμφανίσουν συμπτώματα, στο 30% η νόσος θα υποχωρήσει αυτόματα. Σε ένα ποσοστό 10-30% των ασθενών η νόσος παρουσιάζει μια χρόνια πορεία και μερικές φορές είναι υπεύθυνη για ανάπτυξη σημαντικής βλάβης στην λειτουργία των πνευμόνων.

Έχει αναφερθεί ότι η θνησιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 1-6%.

Διάφοροι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου. **ΛΟΙΜΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.** Η σαρκοείδωση συνδέεται με ορισμένες λοιμώξεις, αν και η συσχέτιση αυτή δεν έχει αποδειχθεί. Το σαρκοειδικό κοκκίωμα είναι πιθανώς αποτέλεσμα μιας στερεότυπης, χρόνιας απορρυθμισμένης ανοσιακής απάντησης σε έναν ή περισσότερους περιβαλλοντικούς (πιθανώς λοιμώδεις) παράγοντες σε επιρρεπείς ξενιστές.

**ΕΠΟΧΗ.** Η διάγνωση του συνδρόμου *Lofgren* ποικίλλει ανάλογα με την εποχή (*Badrinas F et al, 1989*). Στην Ελλάδα, την Ισπανία και την Ιαπωνία, οι περισσότερες περιπτώσεις σαρκοείδωσης έχουν αναφερθεί την άνοιξη και τις αρχές του Καλοκαιριού (*Badrinas F et al, 1989; Panayias S et al, 1991*).

**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.** Η έκθεση σε μέταλλα (ζιρκόνιο, αλουμίνιο, βηρύλλιο) και οργανικά (σκόνη πεύκου, γύρη) ή ανόργανα (άργιλλος, χόμα, ταλκ) υλικά ενοχοποιείται για την γένεση της σαρκοείδωσης. Η έκθεση σε σκόνες μετάλλων ή οργανικά αντιγόνα μπορεί να προκαλέσει νόσο ιστολογικά και κλινικά πανομοιότυπη με την σαρκοείδωση (*Redline S, 1986; De Vuyst P et al, 1987; Skelton HG III et al, 1993; Newman LS, 1995*).

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ.** Στο 5-19% περίπου των περιπτώσεων η σαρκοείδωση έχει οικογενή επίπτωση (*Newman LS et al, 1997*), ένδειξη ότι η γενετική προδιάθεση, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, παρουσίαση και διαδρομή της σαρκοείδωσης. Η υπόθεση ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σαρκοείδωσης βασίζεται

στις φυλετικές /εθνικές διαφορές που παρουσιάζουν οι πάσχοντες από σαρκοείδωση και στο γεγονός ότι η σαρκοείδωση έχει οικογενή επίπτωση (*Rybicki BA et al, 2001*).

- **Φυλή/εθνικότητα.** Οι Ιρλανδοί μετανάστες στο Λονδίνο είναι 3 φορές πιθανότερο να αναπτύξουν σαρκοείδωση από τους ιθαγενείς Λονδρέζους (*James DG, 1992*).
- Οι ιθαγενείς της *Μαρτινίκας* που ζουν στη Γαλλία παρουσιάζουν 8πλάσια επίπτωση σαρκοείδωσης από τους αυτόχθονες Γάλλους (*Rybicki BA et al, 1997*).
- Η επίπτωση της σαρκοείδωσης στους *Αφρο-Αμερικανούς* είναι 4-17 φορές μεγαλύτερη από τους *Καυκάσιους* (*Ricker W and Clark M, 1949; Rybicki BA et al, 1997*). Οι *Μαύροι* είναι πιθανότερο να εμφανίσουν άλλες, εκτός του οζώδους ερυθήματος, δερματικές αλλοιώσεις, όπως και προσβολή των οφθαλμών, του ήπατος, του μυελού των οστών και των εξωθωρακικών λεμφαδένων (*Hunninghake GW et al, 1991; Baughman RP et al, 2001*).
- **Οικογενής επίπτωση.** Η σαρκοείδωση παρατηρείται σε περισσότερα του ενός μέλη οικογενειών («οικογενής σαρκοείδωση») (*Scadding JG et al, 1973; Rybicki BA et al, 2001*). Οι 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> βαθμού συγγενείς ασθενών με σαρκοείδωση έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σαρκοείδωσης, συγκριτικά με τους συγγενείς μαρτύρων (*Baughman RP et al, 2001; Rybicki BA et al, 2001*). Στις οικογενείς περιπτώσεις, οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι προσβάλλονται συχνότερα από τους διζυγώτες (*Scadding JG et al, 1973*).
- **Επιρρεπή γονίδια.** Η γενετική επιρρέπεια για την ανάπτυξη της σαρκοείδωσης φαίνεται ότι περιλαμβάνει πολλά γονίδια, κάθε ένα από τα οποία συμβάλλει στον κίνδυνο αυτό σε μικρό έως μέτριο βαθμό.
- Οι έρευνες έχουν εντοπίσει γενετικούς παράγοντες κινδύνου (επιρρεπή γονίδια), όπως και γονίδια τροποποιητικά της νόσου συνδεόμενα με ειδικούς σαρκοειδικούς φαινότυπους, όπως η αυτο-ϋφιέμενη σαρκοείδωση σταδίου I και η χρόνια προοδευτική σαρκοείδωση. Πάντως, η συσχέτιση της σαρκοείδωσης με όλα σχεδόν τα γονίδια που έχουν μελετηθεί δεν έχει επιβεβαιωθεί (*Iannuzzi MC et al, 2002*).
- Η οικογενής σαρκοείδωση συνδέεται ισχυρά με μία περιοχή του ΜHC τάξης II στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (*Schurmann M et al, 2000*).

- Ορισμένοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί εμπλέκονται στην επιρρέπεια για την ανάπτυξη και τον φαινοτυπικό προσδιορισμό της σαρκοείδωσης (*Rybicki BA et al, 1998*). Οι πολυμορφισμοί αυτοί περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία καθορίζουν την παρουσίαση του αντιγόνου, όπως π. χ. τα γονίδια του HLA για το MHC, κυτταροκίνες (όπως ο TNF-α) και ορισμένες χημειοκίνες (*Baughman RP et al, 2003*).
- Στους Λευκούς και τους Μαύρους, η σαρκοείδωση συνδέεται με το αλληλίο HLA-DRB1\* 1101 (*Rossmann MD et al, 2003*). Ένα ιδιαίτερο υπόλειμμα αμινοξέων [HLA-DR B1-F(47)] συνδέεται ισχυρότερα με την σαρκοείδωση, ιδιαίτερα στους Λευκούς. Σε αντίθεση με την χρόνια νόσο από βηρύλλιο ένα μη-E (69) αλληλίο στην περιοχή του HLA-DPB1 (HLA-DP B1\* 0101) συμβάλλει στο μεγαλύτερο μέρος του κινδύνου για την ανάπτυξη της σαρκοείδωσης. Τα αλληλία των HLA τάξης II μπορεί να είναι δείκτες διαφορετικών φαινότυπων της σαρκοείδωσης, όπως το DRB1\*0401, για την οφθαλμική νόσο σε Λευκούς, το DRB3, για τον μυελό των οστών, στους Μαύρους και το DPB1\*0101, για την υπερασβεστιαϊμία, στους Λευκούς (*Rossmann MD et al, 2003*).
- Σε μία μελέτη των αλληλίων HLA-DQB1 σε 225 οικογένειες Αφρο-Αμερικανών με ένα τουλάχιστον απόγονο με σαρκοείδωση, παρατηρήθηκαν μείζονες διαφορές στις διαδοχές αμινοξέων κωδικοποιημένων από τα αλληλία \*0201 και \*0602 (*Iannuzzi MC et al, 2003*). Οι διαφορές αυτές μπορεί να ερμηνεύσουν τις διαφορικές δράσεις των αλληλίων αυτών στην επιρρέπεια για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της σαρκοείδωσης στους Αφρο-Αμερικανούς.
- Το αλληλίο DQB1\*0201 σχετίζεται με το σύνδρομο *Löfgren* και οι φορείς του αλληλίου αυτού έχουν μικρότερο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου (*Sato H et al, 2002*).
- Ο TNF-α, η λεμφοτοξίνη-α και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου HLA-DRB1 ή ενός γειτονικού γονιδίου μπορεί να συμβάλλουν στην επιρρέπεια για την ανάπτυξη της σαρκοείδωσης και συνδέονται (άμεσα ή μέσω σύνδεσης με άγνωστη αιτιολογική περιοχή) με το σύνδρομο *Löfgren* (*Mrazek F et al, 2005*).
- Τα HLA-B8 και -DR3 σχετίζονται με οξεία σαρκοείδωση (*Mehra NK and Bonvornkitti S, 1988*). Στους Ιάπωνες με σαρκοείδωση, το αλληλίο TNFB\*1 είναι δείκτης παρατεταμένης κλινικής διαδρομής (*Yamaguchi E et al, 2001*).

- Στους σαρκοειδικούς ασθενείς, το HLA-DR2 είναι δείκτης τόσο επιρρέειας όσο και πτωχής πρόγνωσης, και οι DR2-θετικοί ασθενείς μπορεί να ωφεληθούν ιδιαίτερα από στενή παρακολούθηση και πρόιμη θεραπεία. Αντίθετα, οι DR3-θετικοί ασθενείς έχουν πολύ μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας σαρκοειδωσης (*Rutherford RM et al, 2004*).
- Σε 1<sup>ου</sup> βαθμού συγγενείς με σαρκοειδωση, η νόσος συνδέεται με τα HLA DQB1\*0603, DQB1\*0604 και DPB1\*0201 (θετικό Glu 69) (*Schurmann M et al, 1998*).

### **3.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

Η σαρκοειδική φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μη νεκρωτικά κοκκιώματα. Το σαρκοειδικό κοκκίωμα αποτελεί συμπαγή μάζα κυττάρων τα οποία το απομονώνουν από αλλότρια αντιγόνα ή και τυπικά μικρόβια, ενώ ταυτόχρονα αποφεύγεται η φλεγμονή και προστατεύονται οι γύρω ιστοί. Ο πυρήνας του κοκκιώματος αποτελείται από επιθηλιοειδή κύτταρα και μερικά πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, περιβαλλόμενα από μία εξωτερική στεφάνη από ολιγοκλωνικά T-λεμφοκύτταρα. Τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα προέρχονται από μακροφάγα τα οποία υπό τη χρόνια διέγερση λεμφοκινών, διαφοροποιούνται προς επιθηλιοειδή κύτταρα, αποκτούν εκκριτική βακτηριοκτόνο ικανότητα αλλά έχουν απώλεια μέρους της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας και σχηματίζουν τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα ( ). Στα ώριμα κοκκιώματα το σύμπλεγμα των κυττάρων ενθυλακώνεται από ινοβλάστες και κολλαγόνο και είναι δυνατό, σε ορισμένες περιπτώσεις, να ακολουθήσει σκλήρυνση που μεταβάλλει τη δομή και τη λειτουργία του προσβεβλημένου οργάνου. Η κοκκιωματώδης εξεργασία φαίνεται ότι αρχίζει με την παρουσίαση ενός άγνωστου αντιγόνου στα αδιαφοροποίητα T-λεμφοκύτταρα, κατόπιν συλλογής του από τα δενδριτικά κύτταρα, μέσω των γονιδίων MHC τάξης II. Στη συνέχεια τα T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στο σημείο της φλεγμονής. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη δημιουργία των κυτταρικών αυτών αθροίσεων περιλαμβάνουν :

1. *Ενεργό μετανάστευση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων του αίματος κάτω από την επίδραση δυνητικών χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοκίνες και αντίστοιχοι υποδοχείς, MIP-1, MCP-1, RANTES, IL-2, IL18) (Standiford TJ et al, 1993; Car BD et al, 1994; Girgis RE et al, 1995; Iida K et al, 1997; Ziegenhagen MW et al, 1998; Kodama N et al, 1998; Shigehara K et al, 2001; Ziegenhagen MW and Muller-Quernheim J, 2003) και*

2. *Πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων (επαγόμενο με την IL-2)(Pinkston P et al, 1983; Hunninghake GW et al, 1983; Semenzato G et al, 1984; Muller-Quernheim J et al, 1989) και πιθανώς των μακροφάγων (Agostini C et al, 1985), in situ.*

Στη συνέχεια τα CD4+ T κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και αρχίζει ο σχηματισμός και η σύντηξη των κοκκιωμάτων. Τα ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα, στη σαρκοείδωση διαφοροποιούνται σε βοηθητικά T- κύτταρα τύπου 1 (Th1) και Th17 αποκτώντας την δυνατότητα παραγωγής χημειοκινών, όπως οι IL1, IL6, IL12, IL18, IL23 καθώς και του TGF- β, της INF-γ και του TNF-α από τα μακροφάγα και τα DCs.

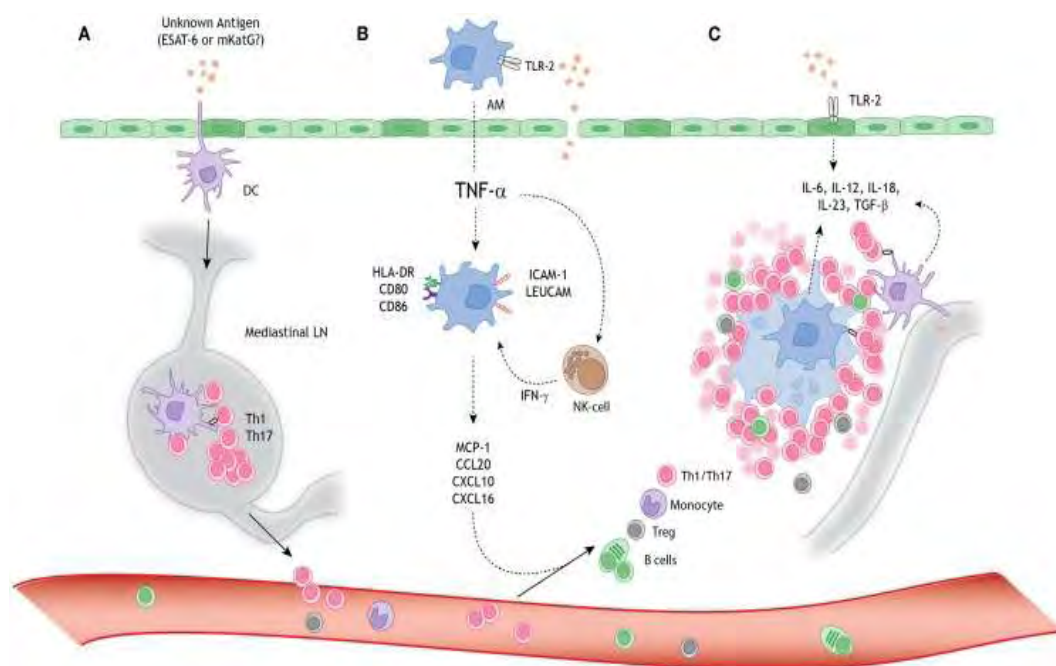
Άλλοι μεσολαβητές οι οποίοι μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση της σαρκοείδωσης είναι η IL-15 (Agostini C et al, 1996; Muro S et al, 2001), ο GM-CSF (Itoh A et al, 1993; Itoh A et al, 1998) και η οστεοποντίνη (O' Regan AW et al, 1999; Maeda K et al, 2001).

Η εξέλιξη σε χρόνια σαρκοείδωση συνδέεται με τον TNF-α, την IL-8 και το ACE, ενώ οι ιντερλευκίνες 10, 12, και 18 φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην ύφεση της νόσου. Παρότι έχουν αποκαλυφθεί αρκετά σημεία των ανοσοπαθολογικών γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, τα οποία συνδέονται με την οξειδοαναγωγική ανισορροπία που παρατηρείται στη σαρκοείδωση (MaY.etal.2007; Muller-QuernheimJ.etal.1998), οι μηχανισμοί που οδηγούν στην επίμονη άθροιση των φλεγμονωδών κυττάρων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Ακόμα, δεν έχει προσδιορισθεί κατά πόσον η μειωμένη κυτταρική απόπτωση εμπλέκεται στην παθογένεση της σαρκοείδωσης (Rutherford RM et al, 2001). Ωστόσο, το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται από τις φλεγμονώδεις μεταβολές που προκαλούνται από τη συσσώρευση των χημειοκινών, επηρεάζει τις οξειδοαναγωγικές οδούς, την έκφραση γονιδίων και την κυτταρική επιβίωση.(BaughmanR.P.etal.1998; HaddadJ.J.etal.2002; BarnesP.J.etal.2005).

Οι έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, έχουν αποκαλύψει αρκετά σημεία των ανοσοπαθολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της

οργάνωσης των μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, καθώς και τη διασύνδεσή τους με την οξειδοαναγωγική διαταραχή που συμβαίνει στη σαρκοειδωση.

Η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες, των αντιαποπτωτικών μηχανισμών για τη διατήρηση της φλεγμονής και της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και βρίσκεται σε εξέλιξη.



1 Πηγή: **Caroline E. Broos** et al. Granuloma Formation in Pulmonary Sarcoidosis. *Front Immunol.* 2013; 4: 437.

## Εικόνα 2: Σχηματικό μοντέλο δημιουργίας κοκκιωμάτων στην πνευμονική σαρκοειδωση

Ένα άγνωστο αντιγόνο ενεργοποιεί ταυτόχρονα:

A) διάμεσα δενδριτικά κύτταρα (DCs)

B) κυψελιδικά μακροφάγα (AMs)

Γ) κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (AEC-II) (σκούροπράσινο).

**A** Τα διάμεσα δενδριτικά κύτταρα συλλέγουν το αντιγόνο και μεταναστεύουν προς τους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου (LNs) όπου οδηγούν στη διαφοροποίηση και την κλωνική έκπτυξη των βοηθητικών Th1 και Th17 κυττάρων.

**B** Τα κυψελιδικά μακροφάγα (AMs) παράγουν TNF-α προωθώντας τη θετική ρύθμιση της ενεργοποίησης (HLA-DR και CD80/86) προσκόλλησης (LeuCAM) μορίων. Τα μακροφάγα παράγουν προσδέτες χημειοκινών (MCP-1, CCL20, CXCL10, και CXCL16) υπό την διέγερση τόσο του TNF-α όσο και της INF-γ που παράγεται από τα NK κύτταρα, προσελκύοντας έτσι Th1/17 κύτταρα, μονοκύτταρα, T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και B κύτταρα.

**C** Η παρουσία των Th1 και Th17 κυττάρων ευνοεί την παραγωγή κυτοκινών, όπως IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 και του TGF-β από τα μακροφάγα, τα DCs και τα AEC-II. Επιπλέον η διέγερση που προκαλείται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προκαλεί τη συνεχή στρατολόγηση κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής που οδηγεί στο σχηματισμό των κοκκιωμάτων.

### **3.4 ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ**

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια ενεργή διαδικασία, η οποία συνήθως εξελίσσεται σε μια χαρακτηριστική σειρά μεταβολών που είναι γνωστή ως απόπτωση και είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανισμών. Η διαδοχή γεγονότων είναι αναπτυξιακά ελεγχόμενη και προϋποθέτει ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Σε περίπτωση απορρύθμισης της απόπτωσης έχουμε την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι οι νεοπλασίες και οι αυτοάνοσες διαταραχές.

Στα συμμετέχοντα στην ανοσολογική απόκριση κύτταρα υπάρχει συσσώρευση κυτοκινών, που έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των κοκκιωμάτων. Η ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος διατηρείται από την ισορροπία μεταξύ της απόπτωσης και της επιβίωσης των κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή. Με την απομάκρυνση των κυτοκινών ή κατόπιν επαγωγής της απόπτωσης η κοκκιωματώδης φλεγμονή μπορεί να ανασταλεί (Tagaya Y. et al. 1996; Bulfone-Paus S. et al. 1997).

Έχει παρατηρηθεί αντιαποπτωτική δράση σε λεμφοκύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) αλλά και σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με σαρκοείδωση (Stridh H. et al. 2002; Stridh H. et al. 2001). Σε T-λεμφοκύτταρα της περιοχής γύρω από τα κοκκιώματα έχουν μετρηθεί αυξημένα επίπεδα παραγωγής BCL-2 (Mermigkis C. et al. 2006), που δείχνει να προστατεύει τα λεμφοκύτταρα, από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Θεωρείται πως στην κυτταρική επιβίωση συμβάλλει σημαντικά και ο κυκλινοεξαρτώμενος αναστολέας κινασών p21<sup>waf1</sup>. Σε *in vitro* ενεργοποίηση μακροφάγων μέσω INF- $\gamma$  παρατηρείται καταστολή της απόπτωσης (Xaus J. et al. 1999; Xaus J. et al. 2001), που μεσολαβείται από τον p21. Ο p21 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε πνευμονική σαρκοείδωση, ενισχύοντας την υπόθεση ότι με την παρουσία του μπορεί να εξηγηθεί η απουσία απόπτωσης στα κοκκιώματα και η διατήρηση της φλεγμονής (Xaus J. et al. 2003).



### **3.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

Άτομα, μόρια ή στοιχεία που φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (HalliwellB.etal.1990). Πρόκειται για ασταθείς δραστικές ενώσεις που εμφανίζουν ισχυρή τάση να ζευγαρώσουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους, γεγονός που τις καθιστά ικανές να συμμετέχουν σε πολλές αλυσιδωτές αντιδράσεις που στα βιολογικά συστήματα μπορεί να προκαλέσουν τοξικές βλάβες, όπως υπεροξειδωση λιπιδίων μεμβρανικών κυττάρων ή θραύσεις κλώνων σε DNA (HalliwellB.etal.1999). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα παρουσιάζουν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να τις αδρανοποιεί, με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών παραγόντων και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν, καλείται οξειδωτικό στρες.

Ο πνεύμονας αποτελεί ένα εξαιρετο στόχο για το οξειδωτικό στρες, σε σχέση με άλλα όργανα, λόγω της άμεσης έκθεσης του στις υψηλές πιέσεις οξυγόνου. Η μερική πίεση του οξυγόνου στις κυψελίδες είναι πολύ υψηλότερη συγκριτικά με άλλα ζωικά όργανα όπως καρδιά, ήπαρ και εγκέφαλος. Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του πνεύμονα είναι η μεγάλη επιφάνεια του, περίπου 70 m στον ενήλικα. Λόγω της άμεσης έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα, τα κύτταρα του πνεύμονα υφίστανται οξειδωτικό stress από ερεθίσματα του περιβάλλοντος όπως ο καπνός του τσιγάρου, το όζον, το διοξείδιο του αζώτου και του θείου.

Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην παθογένεια πολλών διάμεσων πνευμονοπαθειών όπως η πνευμονική ίνωση και η σαρκοείδωση υποστηρίζεται σε πολλές μελέτες. Αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες έχουν βρεθεί στον ορό και σε κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με σαρκοείδωση (KoutsokeraA.etal.2009; CassatellaMA.etal.1989). Επιπλέον, τα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών διαθέτουν αυξημένη ικανότητα μεταβολισμού του οξυγόνου και παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου και ανιόντων υπεροξειδίου.

Οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στη φλεγμονή με πολλούς τρόπους, ένας εκ των οποίων είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (RahmanI.etal.2002). Ο NF-κB παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σε κυψελιδικά μακροφάγα (CulverDA.etal.2004) και σε μονοκύτταρα του αίματος ασθενών με

σαρκοείδωση (DrentM.etal.2001), επάγοντας την παραγωγή κυτοκινών όπως την IL-8 (RahmanI.etal.2002). Επίσης, ο NF-κB προωθεί τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ενισχύοντας τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (BootsAW.etal.2011). Επιπλέον, οι ROS αυξάνουν την έκκριση του αυξητικού παράγοντα TGF-β και μεσολαβούν στην επαγωγή του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI-I προωθώντας έτσι την ίνωση (BellocqA.etal.1999 ; LiuRM.etal.2008). Ακόμη, η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα που οδηγεί στο σχηματισμό των κοκκιωμάτων φαίνεται να σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (IvanisevicJ.etal.2012).

Στον πνευμονικό ιστό παρατηρείται αύξηση αντιοξειδωτικών παραγόντων σαν απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Σε συστηματικό επίπεδο, μπορεί να υπάρχει μείωση είτε λόγω της αυξημένης κατανάλωσής τους είτε λόγω συσσώρευσής τους στον πνεύμονα. Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης (SOD) έχει βρεθεί σε χαμηλά επίπεδα στον ορό και στα ερυθροκύτταρα ασθενών με σαρκοείδωση (IvanisevicJ.etal.2012). Επίσης, σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα νοσούντων ατόμων, έχουν βρεθεί και άλλοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες όπως η βιταμίνη C και η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH).

### **3.6 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ**

Η μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων συνίσταται σε μια ακολουθία συζευγμένων αντιδράσεων οξειδοαναγωγής. Στις αντιδράσεις αυτές έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων από κατάλληλο δότη (αναγωγικός παράγοντας) σε ένα κατάλληλο δέκτη (οξειδωτικός παράγοντας). Σε κάποιες από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων, όπως π.χ. στο σύμπλεγμα I της αναπνευστικής αλυσίδας όπου έχουμε μεταφορά δυο ηλεκτρονίων και δυο πρωτονίων από το NADH στο FMN (Φλαβινομονονουκλεοτίδιο).

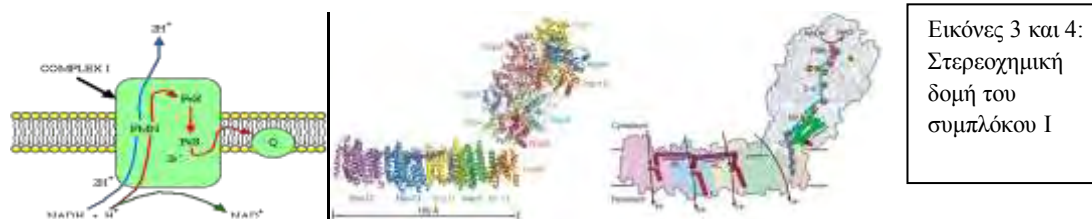
Η παραγωγή ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Η διαδικασία της απόπτωσης απαιτεί ενέργεια, καθώς είναι πολύ καλά ρυθμισμένη και περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια όπως την ενεργοποίηση κασπασών, την ενζυμική υδρόλυση μακρομορίων, τη

συμπύκνωση χρωματίνης και το σχηματισμό του αποπτωτικού σωματίου (KassG.etal.1996; RichterC.etal.1996; HuY.etal.1999). Στα μιτοχόνδρια γίνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση καθιστώντας τα σημαντική πηγή οξειδωτικών ριζών. Η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στη δημιουργία μορίων νερού και μικρά αλλά σημαντικά ποσά των ηλεκτρονίων (1-2%) μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ROS.

Σε πραγματοποιηθείσα έρευνα του εργαστηρίου μας παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και σε γονίδια παρακείμενων περιοχών σε άτομα που φέρουν τη νόσο (PeletidouS.etal.2014). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, α) μεταλλάξεις που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση στα μιτοχόνδρια και β) μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν για 13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (ZevianiM.etal.2004; WongLJ.etal.2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις στα tRNA και rRNA γονίδια επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση και οδηγούν σε αρνητικές συνέπειες για τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας.

Έχει διαπιστωθεί αρνητική ρύθμιση στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μακροφάγων από BAL ασθενών με σαρκοείδωση (KjellinH.etal.2016). Τυχόν δυσλειτουργία των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης θα μπορούσε να επιφέρει αυξημένα επίπεδα ROS και μείωση στην παραγωγή ATP ενισχύοντας την επιβίωση των κοκκιωμάτων και τη διατήρηση/επιδείνωση της σαρκοείδωσης. Οι παραπάνω παρατηρήσεις καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο μελέτης.

Το σύμπλοκο NADH-Q (complex 1) είναι το πρώτο από τα 4 σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και μέσω αυτού πραγματοποιείται η εισαγωγή των ηλεκτρονίων. Η μελέτη λοιπόν της λειτουργικότητάς του σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι σημαντική.



### 3.7 ΣΤΟΧΟΣ

Σκοπός της έρευνας είναι η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας με την εμφάνιση της σαρκοείδωσης. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I).

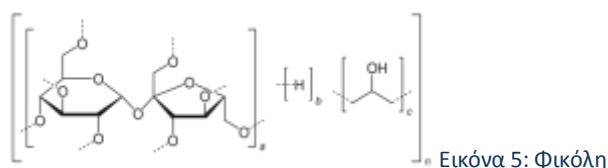
Το Σύμπλοκο I είναι το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και αποτελεί προϊόν 7 μιτοχονδριακών (ND1-6, ND4L) και 38 πυρηνικών γονιδίων (Carroll.etal.2006).

Κύριοι άξονες της εργασίας:

- Εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε κύτταρα περιφερικού αίματος με φασματοφωτομετρία.
- Σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I ανάμεσα σε κύτταρα υγιών ατόμων και σε άτομα με σαρκοείδωση.

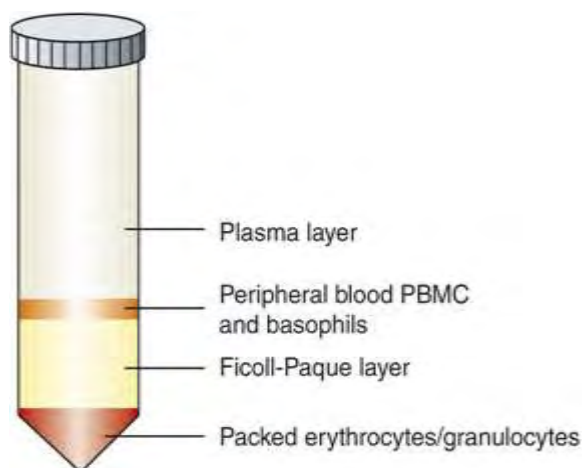
### 4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην ικανότητα διαχωρισμού των κυττάρων του αίματος με τη χρήση φικόλης.



Πιο συγκεκριμένα, η διαβάθμιση των κυττάρων γίνεται με υγρό μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων. Το υγρό αυτό έχει ειδικό βάρος αντίστοιχο με το ειδικό βάρος των λεμφοκυττάρων και με το μέσο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του αίματος σε τρεις στιβάδες:

- ❖ Ορός του αίματος ( ανώτερη στιβάδα)
- ❖ Λευκά αιμοσφαίρια ( μεσαία στιβάδα)
- ❖ Ερυθροκύτταρα ( κατώτερη στιβάδα)



Εικόνα 6: Στιβάδες του αίματος μετά τη φυγοκέντρηση

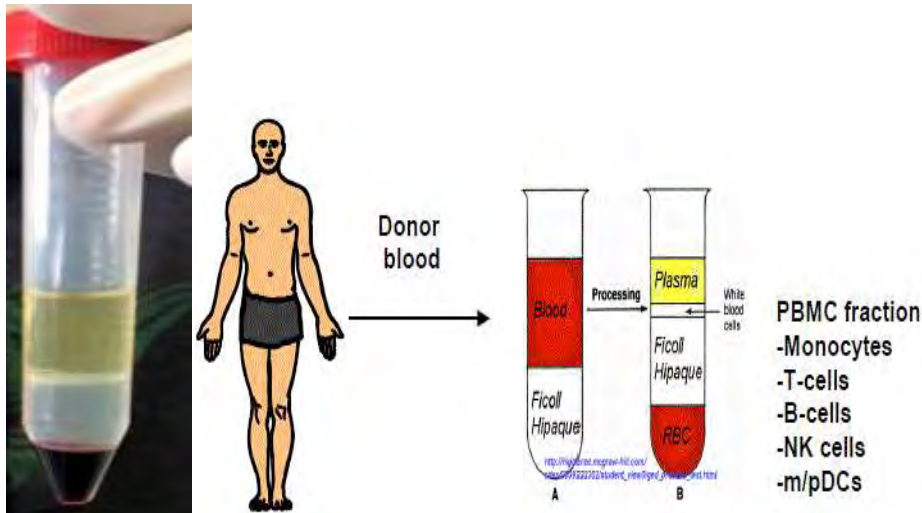
#### ❖ Υλικά

- Φλεβικό αίμα ασθενή
- Φιαλίδια γενικής αίματος που περιέχουν EDTA
- Φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl
- Μέσο διαχωρισμού λεμφοκυττάρων φικόλη
- Διάλυμα έκπλυσης PBS 1x (PhosphateBufferSaline)

#### Πειραματική Διαδικασία

- Αρχικά, γίνεται λήψη αίματος (20 ml) ασθενών με σαρκοείδωση και υγιών ατόμων.
- Το αίμα τοποθετείται ,στη συνέχεια, σε φιαλίδια γενικής αίματος με EDTA.
- Το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάριο των 50ml και αραιώνεται σε ίσο όγκο ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl.
- Χρησιμοποιούμε δύο νέα σωληνάρια των 50ml στα οποία τοποθετούνται 15 ml φικόλης στο καθένα και στη συνέχεια μοιράζουμε ισόποσα το αραιωμένο αίμα (20ml αραιωμένου αίματος προστίθενται με αργό ρυθμό πάνω στην επιφάνεια της φικόλης, υπό γωνία).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά χωρίς φρένο στις 1800 στροφές ανά λεπτό (1800rpm) και στους 4°C.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στήλης της φικόλης και της στήλης του πλάσματος. Η φικόλη έχοντας ειδική πυκνότητα μεταξύ των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων

- αφενός και των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων αφετέρου έχει διαχωρίσει τις δύο στοιβάδες κι επομένως γίνεται δυνατή η λήψη των PBMCs.
- Στη συνέχεια γίνεται συλλογή της στοιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων και μεταφορά της σε νέο σωληνάριο, στο οποίο προστίθεται 40mlPBS.
  - Ακολουθεί άλλη μία φυγοκέντρηση για 10 λεπτά με φρένο στις 1600 στροφές και στους 4°C. Συλλέγεται το ίζημα.



#### 4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

##### **Υλικά**

Αρχικά, το αίμα που λαμβάνουμε το αραιώνουμε σε ένα διάλυμα Balanced σε αναλογία 1:1

##### **BALANCED**

##### **SOLUTION A (ΓΙΑ 20 mL)**

<b>Anhydrous-D-glycose</b>	<b>0,02 gr</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> (0,5 M)</b>	2 μl
<b>MgCl<sub>2</sub> (0,5 M)</b>	39,2 μl
<b>KCL (0,5 M)</b>	216 μl
<b>Tris (0,9 M)</b>	2,9 mL

Βάζουμε 10 ml από το solution A

### **SOLUTION B**

<b>NaCl</b>	<b>25,2 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>64,8 ml</b>

Βάζουμε 90 ml από το solution B

Δηλαδή το balanced το φτιάχνουμε με αναλογία 1:9 και στη συνέχεια αραιώνουμε το αίμα στο balanced. Το αίμα μπορεί να αραιωθεί επίσης και σε PBS διάλυμα.

### **4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η είσοδος του NADH στο διαμεμβρανικό χώρο είναι καθοριστική για τη μέτρηση του Συμπλόκου 1.

Η λύση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης (heat shock).

#### **Υλικά**

-Ισότονο διάλυμα

-Αντί για το mitoB που χρησιμοποιούμε στα μιτοχόνδρια όταν πρόκειται για λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούμε το SHE-PIM.

<b>SHE-PIM (ICE-COLD BUFFER)</b>
<b>250 mM sucrose</b>
<b>10 Mm HEPES pH=7,4</b>
<b>1 Mm EDTA (SHE)</b>
<b>Πρωτεΐνη αναστολέας (PIM) αναλογία 2:50</b>

Για να βρούμε πόσους αναστολείς θα προσθέσουμε θα πρέπει αφού βρούμε την ποσότητα του SHE-PIM που θα βάλουμε να κάνουμε τον υπολογισμό.

#### **Παράδειγμα**

Εάν πάρουμε από το SHE-PIM 200 μl τότε θα έχουμε

Εφόσον ξέρουμε ότι οι αναστολείς μπαίνουν σε αναλογία 2:50 έχουμε

$$2:50=0,04$$

Άρα σε 1 μl έχουμε 0,04 αναστολείς

Σε 200 μl έχουμε x αναστολείς

$0,04 \times 200 / 1 = 8$  μl αναστολέων θα πρέπει να προσθέσουμε.

### Διαδικασία

Αρχικά, τα λεμφοκύτταρα διαλύονται σε ισότονο διάλυμα και στη συνέχεια υφίστανται τρία heat shock (freeze/thaw). Τα shock γίνονται με εναλλαγές θερμοκρασίας από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

## 4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford βοηθά στον προσδιορισμό της εκτίμησης της ολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie να αλλάζει το μήκος κύματος όπου παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης Bradford είναι απαραίτητη σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκέντρωσης.

Διαδικασία:

- Σε όγκο 20 μl από κάθε πρότυπο δείγμα (συγκέντρωσης 0-20 mg/ml) προστίθενται 980 μl αντιδραστηρίου Bradford 1×
- Ανάδευση δειγμάτων (όγκου 1 ml)
- Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
- Μετά την επώαση ακολουθεί ανάδευση και φασματοφωτομετρία των δειγμάτων (σε  $\lambda = 595\text{nm}$ )

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις BSA για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης Bradford.

BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1× (μl)	BSA (μg)	BSA (μg/ml)
0	20	980	0	0
2.5	17.5	980	2.5	2.5
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20



Πίνακας 4: Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

<b>μgr BSA</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>A595nm</b>	0	0,092	0,148	0,277	0,421	0,510

Για τη μέτρηση Bradford υπολογίζουμε την ποσότητα του αντιδραστηρίου ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα μετρήσουμε.

### Παράδειγμα

Εάν θέλουμε να μετρήσουμε 2 δείγματα (ένα τυφλό και ένα φυσιολογικό) θα έχουμε Το Bradford είναι 5x και θα πρέπει να το αραιώσουμε σε H<sub>2</sub>O. Άρα για να βρούμε πόσο Bradford πρέπει να βάλουμε έχουμε τα εξής:

$$C1V1=C2V2 \rightarrow 5V1=1 \cdot 2 \rightarrow V1=0,4 \text{ ml}$$

Άρα θα πρέπει να προσθέσουμε 400 μl Bradford και επομένως θα έχουμε

$$2000 \mu\text{l} - 400 \mu\text{l} = 1.600 \mu\text{l H}_2\text{O}$$

Από το δείγμα προσθέτουμε 980 μl και στη συνέχεια προσθέτουμε από το 1x Bradford που κατασκευάσαμε.

	ΤΥΦΛΟ	ΔΕΙΓΜΑ
SHE-PIM	20 μl	19 μl
ΔΕΙΓΜΑ	0 μl	1 μl
BRADFORD	980 μl	980 μl

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με τη μέθοδο αυτή υπολογίζουμε την ολική c της πρωτεΐνης του δείγματος για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε την ποσότητα του δείγματος που θα χρησιμοποιήσουμε για τις μετρήσεις.

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης γίνεται από την εξίσωση:

$$y=0,0255x+0,0178$$

όπου y η μέτρηση που πήραμε από τη Bradford

#### **4.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**

Το ίζημα των λεμφοκυττάρων που συλλέχθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλης μπορεί:

- a) είτε να υποβληθεί σε ολική λύση
- b) να συνεχιστεί η επεξεργασία για την απομόνωση εμπλουτισμένου εκχυλίσματος μιτοχονδρίων.

Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα,

1. Με τη χρήση διγιτονίνης (DG)
2. Χωρίς διγιτονίνη.

Και στις δύο περιπτώσεις τα μιτοχόνδρια απομονώνονται μέσω διαφορικής φυγοκέντρησης. Η DG βοηθάει στην διαπερατοποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και έτσι μπορεί να γίνει φωτομέτρηση του δείγματος κατευθείαν.

##### **➤ Απουσία διγιτονίνης**

Στον παρακάτω πίνακα βλέπουμε τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του διαλύματος ομογενοποίησης.

Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
1M Tris-HCl pH 7.4	10μl/ 10mM
Sucrose	0,085gr/0,25M
0,5MEDTA	2μl/1mM
dd H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

##### **Διαδικασία**

- Προσθήκη 100μl διαλύματος ομογενοποίησης στο δείγμα.

-Ομογενοποίηση των κυττάρων σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν. Κατά την ομογενοποίηση με την συγκεκριμένη συσκευή σπάνε μηχανικά οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και αρκετές από τις πυρηνικές.

Πραγματοποιούνται 10 upsanddownsX με 30secαναμονή ενδιάμεσα. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιείται σε πάγο.

-Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση ομογενοποιημένου σε 1000g για 10min στους 4°C.

-Γίνεται συλλογή υπερκείμενου και επαναφυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C.

-Ακολουθεί αφαίρεση υπερκείμενου

-Έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος ομογενοποίησης

-Ακολουθεί ακόμα μία φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C

-Αφαίρεση υπερκείμενου

-Τέλος τα δείγματα τοποθετούνται και διατηρούνται -80°C

➤ Παρουσία διγτονίνης

Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
1M Tris-HCl pH 7.4	10μl/ 10mM
Sucrose	0,25mM
0,5M EDTA	2μl/1mM
dd H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

### **Διαδικασία**

-Αρχικά τα κύτταρα διαλύονται στο διάλυμα απομόνωσης σε συγκέντρωση 5mg/ml

-Ακολουθεί προσθήκη διγτονίνης σε τελική συγκέντρωση 0,1mgr/ml

-Στη συνέχεια προστίθεται τριαιθανολαμίνη (TEA) σε τελική συγκέντρωση 10mM

- Τα δείγματα επωάζονται σε πάγο για 10λεπτά
- Έπειτα κάνουμε ομογενοποίηση: 15 upanddowns σε 500rpm σε πάγο
- Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση σε 1000g για 10 λεπτά στους 4°C
- Το υπερκείμενο συλλέγεται και ακολουθεί επανάληψη βημάτων 1-6 στο ίζημα
- Τα δύο υπερκείμενα αναμιγνύονται και γίνεται φυγοκέντρηση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα απομόνωσης και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η δυνατότητα του NADH να εισέλθει στο διαμεμβρανικό χώρο είναι αυτή που βοηθάει στον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

Μπορεί λοιπόν να γίνει αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των κυττάρων με τους εξής τρόπους:

- Μηχανική λύση
- Πάγωμα ξεπάγωμα (freeze/thaw) σε ομογενοποίημα κυττάρων ή σε απομονωμένα μιτοχόνδρια.

### Λύση με τη μέθοδο ψύξη/απόψυξη

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M HEPES pH 7.4	100μl/ 10mM
Sucrose	0,085gr/0,25M
0,5M EDTA	2μl/1mM
dd H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

Πίνακας 5:Ισότονο διάλυμα

-Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

### Διαδικασία

-Αρχικά τα λεμφοκύτταρα διαλύονται σε ισότονο διάλυμα.

-Ακολουθούν 3 κύκλοι Ψύξης/Απόψυξης (freeze/thaw) με εναλλαγές στη θερμοκρασία από τους -80°C στους 37°C.

### **Λύση με υπερήχους**

Η συσκευή που χρησιμοποιείται για τη λύση των λεμφοκυττάρων με υπερήχους αποτελείται από δύο κύριες μονάδες : α) τη συσκευή που παράγει τους υπερηχητικούς και β) ένα μεταδότη που μεταφέρει τα υπερήχους στο διάλυμα των κυττάρων.

Τα κύτταρα λύνονται από την ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων και δέχονται και τη δόνηση του μεταδότη, την οποία έχει προκαλέσει η ενέργεια των κυμάτων. Αυτή η δόνηση βοηθά στο σπάσιμο των κυττάρων.

Αντιδραστήρια/συγκεντρώσεις
-----------------------------

20mM TRIS-HCl pH 7.5
----------------------

0,5% TritonX-100
------------------

250mM NaCl
------------

3mM EDTA
----------

Πίνακας 6: Διάλυμα λύσης

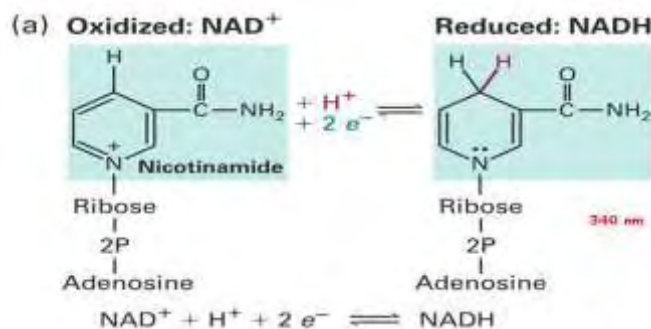
-Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

### **Διαδικασία**

Η λύση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια υπερήχων. Ο δείκτης “amplitude” ρυθμίζεται στην τιμή 40 και ο δείκτης “cycle” ρυθμίζεται στην τιμή 0.1, 10sec λειτουργία 30 sec ηρεμία X3.

#### 4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΑΠΟΡΡΟΦΙΣΗΣ ΤΟΥ NADH.

Γνωρίζουμε ότι το NADH απορροφά σε  $\lambda_{max}$  340 nm, ενώ η οξειδωμένη μορφή NAD<sup>+</sup> δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος.



Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας της ενζυμικής αντίδρασης, μετρώντας είτε την αύξηση είτε τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, όπου το NADH οξειδώνεται.

Στην αντίδραση οξείδωσης του NADH παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα 340 nm. Η κατανάλωση NADH σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος της ενζυμικής ενεργότητας της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-συνενζύμου Q και άρα τόσο η ανωτέρω αντίδραση, όσο και η αντίδραση οποιασδήποτε άλλης αφυδρογονάσης όπου συμμετέχουν τα ανωτέρω συνένζυμα, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς καταγράφεται η μείωση (NADH → NAD<sup>+</sup>) ή αύξηση (NAD<sup>+</sup> → NADH) της οπτικής απορροφήσεως της αντιδράσεως στα 340 nm.

Για την παρασκευή του NADH αραιώνουμε το στοκ του NADH, δηλαδή έχουμε:

$$C1V1=C2V2 \rightarrow 100 \text{ Mm } V1= 10 \text{ mM } 1\mu\text{l}$$

$$V1= 100 \mu\text{l}$$

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.8	250 $\mu$ l/25mM
70gr/L BSA	35,7 $\mu$ l/4%
0,5M MgCl <sub>2</sub>	50 $\mu$ l/25mM
1M KCN	1,7 $\mu$ l/1,7mM
1mM A-a	3,5 $\mu$ l/3,7 $\mu$ M
dd H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

## Πίνακας 7:Μίγμα της αντίδρασης (premix)

-Στον τελικό όγκο λαμβάνονται υπόψη ο όγκος του δείγματος και του NADH που θα προστεθούν με την έναρξη της αντίδρασης

-Το KCN πρέπει να παρασκευάζεται εκ νέου κάθε μέρα.

Για να γίνουν οι μετρήσεις βάζουμε σε ένα erpendorf βάζουμε τα εξής:

-premix

-δείγμα

-νερό

-DMSO ή ροτενόνη

Το premix παρασκευάζεται κάθε φορά ανάλογα με τις μετρήσεις που θέλουμε να κάνουμε , δηλαδή για παράδειγμα εάν θέλουμε να κάνουμε 10 μετρήσεις το premix θα το φτιάξουμε (10x). Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον τύπο της αραιώσης για κάθε αντιδραστήριο ( $C1V1=C2V2$ ).

### Διαδικασία:

-Προσθέτουμε το premix το H<sub>2</sub>O

-Προσθέτουμε 1μl DMSO

-Προσθέτουμε 90μM NADH και 70μg από το δείγμα στο διάλυμα φωτομέτρησης.

-Γίνεται επώαση του διαλύματος για 1 λεπτό στους 37°C (στο υδατόλουτρο).

-Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 60μM συνενζύμουQ<sub>1</sub> στο διάλυμα

-Καταγράφεται η κατανάλωση του NADH φωτομετρικά στα 340nm για 3-4 min (μέτρηση ανά 15 λεπτά).

Γίνεται επανάληψη της αντίδρασης με την προσθήκη 15μM ροτενόνης στο μίγμα πριν την επώαση για να διαχωριστεί η δράση του συμπλόκου I από άλλες NADH αφυδρογονάσες. Κατά τη μέτρηση με ροτενόνη δηλαδή προσθέτουμε αντί για 1 μl DMSO 1 μl ροτενόνης.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή έγινε μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου 1 της αναπνευστικής αλυσίδας σε λεμφοκύτταρα ατόμων που πάσχουν από Σαρκοείδωση και σε άτομα control, δηλαδή υγιή. Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη παρακολουθούνται στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ.). Για τη μελέτη αυτή πήραμε δείγμα από 10 ασθενείς και 10 φυσιολογικά άτομα.

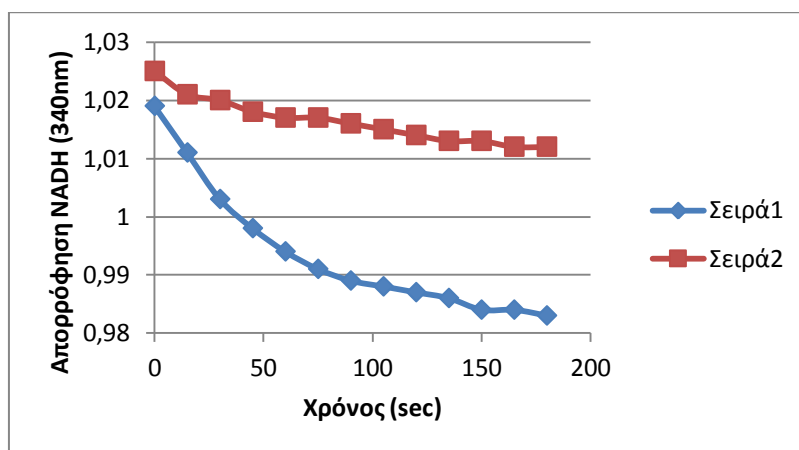
Για αυτή τη μελέτη έγιναν πολλές δοκιμές σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, καθώς αυτά παρουσιάζουν αυξημένη μιτοχondριακή δραστηριότητα. Οι μελέτες έγιναν σε ολικό ομογενοποίημα κυττάρων.

Οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου φωτομέτρησης που βασίζεται στις μεταβολές της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά από τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης.

-Η συγκέντρωση του NADH ήταν 90μM.

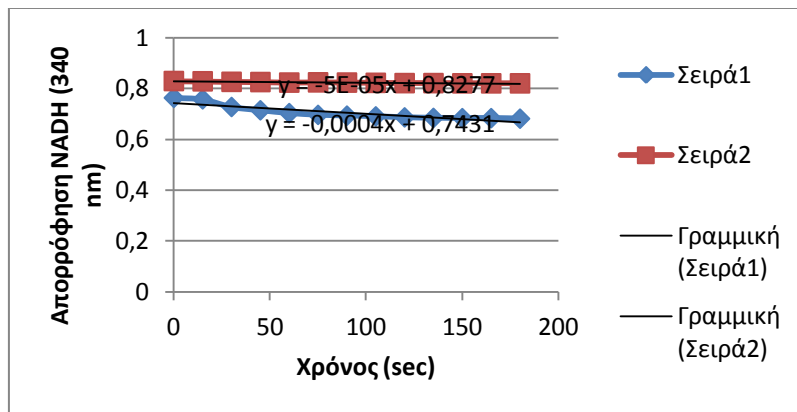
-Στα διαγράμματα παρουσιάζονται δύο καμπύλες μία χωρίς και μία με ροτενόνη (15μM). Η ροτενόνη επωάστηκε με το δείγμα στους 37<sup>0</sup>C για 1 min.

**Διάγραμμα 1:** Δείγμα 57 (50 ετών, γυναίκα, σαρκοείδωση)

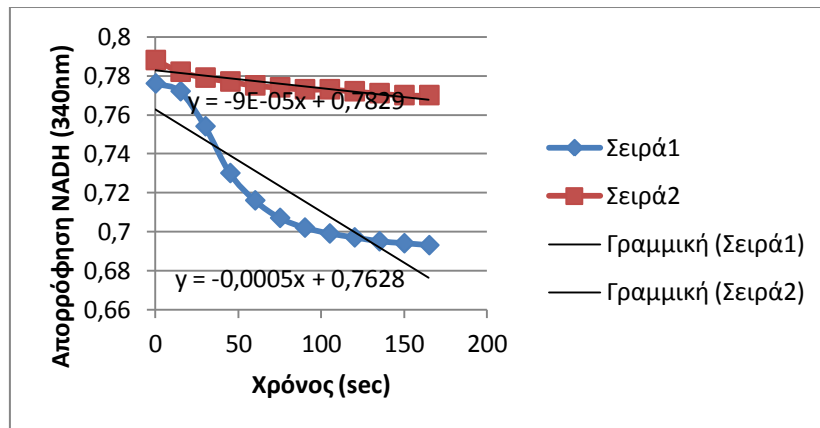




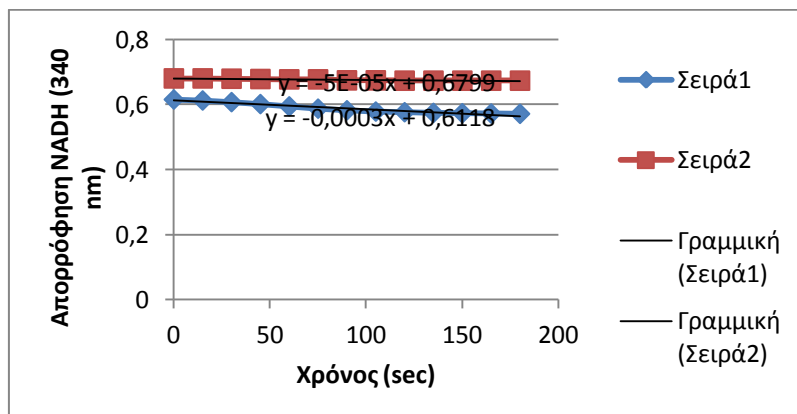
**Διάγραμμα 2:** Δείγμα 66 ( 54 ετών, γυναίκα, υγιής)



**Διάγραμμα 3 :** Δείγμα 71 (70 ετών, άνδρας, υγιής)



**Διάγραμμα 4 :** Δείγμα 74 ( 58 ετών, άνδρας, σαρκοειδωση)



**Διαγράμματα 1 και 3 : Μεταβολή της απορρόφησης του NADH σε συνάρτηση με το χρόνο σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (70μgρδείγματος) σε ασθενή με Σαρκοείδωση:** Η κόκκινη καμπύλη αναφέρεται στη μέτρηση με ροτενόνη και η μπλέ καμπύλη στη μέτρηση χωρίς ροτενόνη. Βλέπουμε ότι η μείωση στην απορρόφηση του NADH είναι πολύ μεγαλύτερη όταν δεν υπάρχει ροτενόνη σε σύγκριση με τη μέτρηση κατά την οποία προσθέτουμε και ροτενόνη.

**Διαγράμματα 2 και 4 : Μεταβολή της απορρόφησης του NADH σε συνάρτηση με το χρόνο σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (70μgρδείγματος) σε υγιές άτομο (control):** Όπως και το διάγραμμα 1 , η κόκκινη καμπύλη αναφέρεται στη μέτρηση με ροτενόνη και η μπλέ καμπύλη στη μέτρηση χωρίς ροτενόνη. Επίσης βλέπουμε ότι όπως και στο άτομο με Σαρκοείδωση έτσι και στο άτομο control η μείωση στην απορρόφηση του NADH είναι πολύ μεγαλύτερη όταν δεν υπάρχει ροτενόνη σε σύγκριση με τη μέτρηση κατά την οποία προσθέτουμε και ροτενόνη.

- ❖ Η διαφορά της απορρόφησης του NADH πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης ισούται με την ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου 1.
- ❖ Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I έγινε με βάση το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ρυθμού οξείδωσης του NADH σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος.
- ❖ Για τη διαπερατοποίηση των κυττάρων προτιμήθηκε η μέθοδος ψύξη/απόψυξη

### **ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**

$$E(\text{mU/mL}) = (\Delta A \times 10^6 \times V_t) / (t \times e \times b \times V_s)$$

Όπου

$\Delta A$ : μεταβολή στην απορρόφηση του δείγματος σε μια ορισμένη χρονική περίοδο  $t$  (min)

$e$ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ( $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )

$b$ : το μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

$V_t$ : ο ολικός όγκος του μίγματος υψ αντίδρασης (mL)

$V_s$ : ο όγκος του δείγματος (mL) $10^3$ : συντελεστής μετατροπής των moles σε μmoles

### Παράδειγμα 1

- $\Delta A$  (κομμάτι που αντιστοιχεί στη γραμμικότητα στην καμπύλη)

Άρα

$$0,785 - 0,681 = 0,104$$

-Για το χρόνο έχουμε

$$150 - 30 = 120 \text{ sec}$$

$$120/60 = 2 \text{ min}$$

-Για το  $\epsilon$   $6.22 \times 10^3$

Για το  $b$  έχουμε 1 cm (ανάλογα την κυψελίδα)

Έστω ότι  $\Delta A = 0,017$

Έχουμε:  $(0,017 \times 10^6 \times 1) / (2 \times 6.22 \times 10^3 \times 1 \times 1) \rightarrow 17.000/12.440 = 1,366 \text{ } \mu\text{mol/min}$   
(= Units)

Εμείς θέλουμε να μετρήσουμε σε mUnits  $\rightarrow$  Άρα κάνουμε επί 1000

### Παράδειγμα 2

$$0,017 \times 1 / 2 \times 6220 = 17.000 \times 10^{-6} / 12.440 = 1,36 \times 10^{-6} \text{ mmol/min}$$

Επειδή  $\mu\text{mol/min}$  (= Units) θα κάνουμε επί  $10^3$

Άρα έχουμε  $1,36 \times 10^{-3} \text{ units}$

Θέλουμε  $\mu\text{u/mg}$   $\rightarrow$  άρα 1,36  $\mu\text{u}$

Βάζουμε για τις μετρήσεις 70  $\mu\text{g}$   $\rightarrow 70 \times 10^{-3} = 0,07 \text{ mg}$

Άρα έχουμε  $1,36/0,07 = 19,42$  (ενζυμική δραστηριότητα  $\mu\text{u/mg}$ )

-Αντίστοιχα βρίσκουμε κ τα  $\mu\text{u}$  χωρίς ροτενόνη πχ 50  $\mu\text{u/mg}$

-Άρα για την ειδική ενζυμική δραστηριότητα κανουμε

$$50 - 19,42 = 30,58$$

Αυτή είναι η δραστηριότητα του complex 1

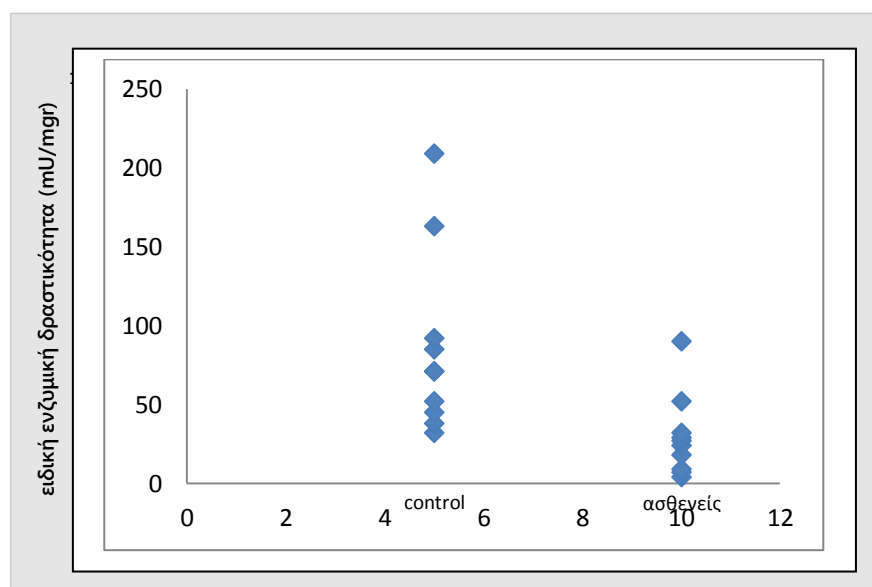
## Πίνακας 8: Ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I

A: δείγματα από ασθενείς

E: δείγματα από υγιή άτομα (ελέγχου)

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΧΩΡΙΣ ΡΟΤΕΝΟΝΗ (mUnits)	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕ ΡΟΤΕΝΟΝΗ (mUnits)	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ I
A55	58	29	29
A56	69	62	7
A57	28	1	27
A58			
A59			
E60	64	26	38
E61	56	24	32
A62	36	4	32
A63	59	7	52
A64	107	17	90
E65	62	10	52
E66	80	9	71
E67	237	28	209
E68	89	4	85
E69	190	27	163
E70	77	32	45
E71	88	17	71
E72	156	64	92
A73	30	6	24
A74	39	35	4
A75	30	21	9
A76	23	5	18

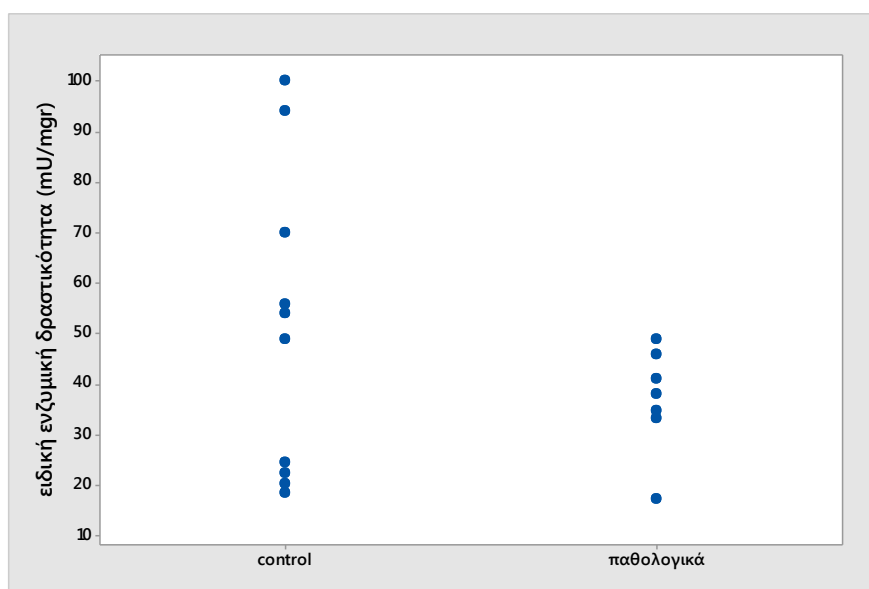
**Διάγραμμα 5:** Σύγκριση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I ανάμεσα σε μία ομάδα ελέγχου ( $N_1=10$ ) και μία ομάδα κλινικών δειγμάτων ( $N_2=10$ ) οι μέσες τιμές ήταν αντίστοιχα  $\mu_1=85,8$  ( $SD=50,76$ ) και  $\mu_2=29,2$  ( $SD=24,33$ ). Η τιμή του t test (p): 0,01418. Είναι στατιστικά σημαντικό ( $< 0,05$ )



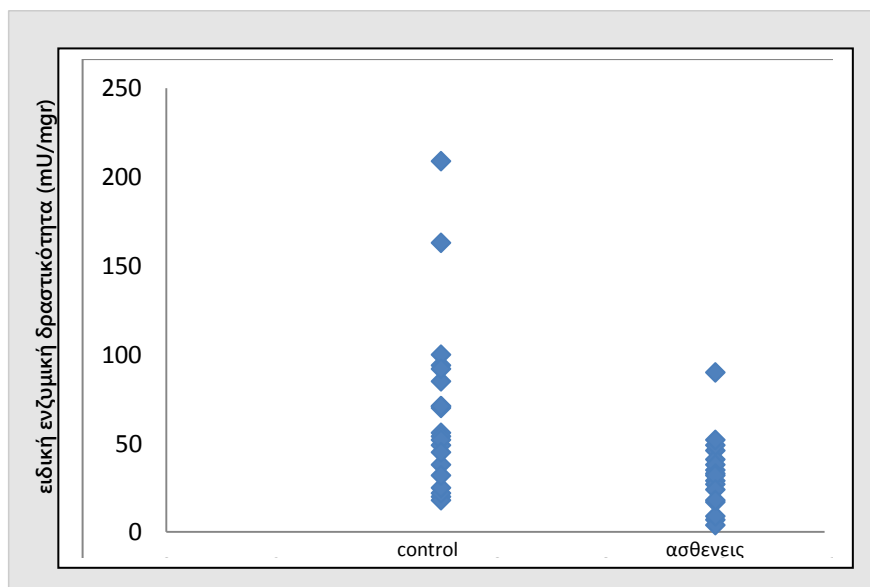
**Πίνακας 9: Προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας.**

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΧΩΡΙΣ ΡΟΤΕΝΟΝΗ	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕ ΡΟΤΕΝΟΝΗ	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι
C1	30	9,6	20,4
C2	28,14	9,7	18,4
C3	38	15,57	22,43
C4	60	4	56
Δ5	87	33	54
Δ6	188	94,2	94
C7	55,22	30,6	24,62
C8	140,8	91,85	48,95
C9	160	59,71	100,29
C10	143	71,85	70,15
Π1	54	36,7	17,3
Π2	114,8	68,8	46
Π3	121,26	80	41,26
Π4	128,6	79,5	49,1
Π5	73,7	39	34,7
Π6	82	44	38
Π7	86,2	52,8	33,35

Διάγραμμα 6: Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας.



Διάγραμμα 7: Συνολική αποτύπωση προηγούμενων ερευνών και τρέχουσα.



Στους παρακάτω πίνακες επισυνάπτονται τα στοιχεία των ατόμων που πήραν μέρος στο πείραμά μας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ
Δ57	20 ml	50	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ
Δ58	15 ml	56	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ
Δ59	10 ml	53	ΑΝΔΡΑΣ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ
60	20 ml	87	ΓΥΝΑΙΚΑ	Control
61	20 ml	60	ΓΥΝΑΙΚΑ	control

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
62	57	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	20 ml
63	55	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	20 ml
64	60	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	20 ml

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ	ΠΟΣΟΣΤΗΤΑ
65	60	ΑΝΔΡΑΣ	CONTROL	20 ml
66	54	ΓΥΝΑΙΚΑ	CONTROL	20 ml
67	57	ΑΝΔΡΑΣ	CONTROL	20 ml
68	67	ΑΝΔΡΑΣ	CONTROL	20 ml

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
69	55	ΓΥΝΑΙΚΑ	CONTROL	20 ml
70	77	ΓΥΝΑΙΚΑ	CONTROL	20 ml
71	70	ΑΝΔΡΑΣ	CONTROL	20 ml
72	68	ΑΝΔΡΑΣ	CONTROL	20 ml

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
73	53	ΑΝΔΡΑΣ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ	10 ml
74	58	ΑΝΔΡΑΣ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	10 ml

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΠΑΘΗΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
75	69	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	20 ml
76	80	ΓΥΝΑΙΚΑ	ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ	20 ml

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σαρκοείδωση αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μη τυροειδοποιημένων κοκκιωμάτων σε ένα ή περισσότερα όργανα με μεγαλύτερη συχνότητα τους πνεύμονες. Σημαντικός αριθμός μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί από πολλούς ερευνητές, υποστηρίζει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της νόσου, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις της συμβολής του οξειδωτικού στρες στον σχηματισμό των κοκκιωμάτων . Στα μιτοχόνδρια παράγονται μεγάλες ποσότητες ROS ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων αποτελεί το σημείο παραγωγής του μεγαλύτερου ποσοστού ROS στο κύτταρο. Επιπρόσθετα, στη δημιουργία των κοκκιωμάτων φαίνεται να συμμετέχουν και αντιαποπτωτικοί μηχανισμοί. Η διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια και υπόκειται σε πολύ καλή ρύθμιση. Τυχόν δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας θα μπορούσε να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή ATP και να ενισχύσει την αντιαποπτωτική δράση και επιβίωση των κοκκιωμάτων της σαρκοείδωσης. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο μελέτης, όσον αφορά τη συμμετοχή τους στην εμφάνιση της νόσου.

Η έλλειψη της δραστηριότητας του Συμπλόκου I, του πρώτου από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, αποτελεί πιθανόν την συχνότερη αιτία των μιτοχονδριακών ασθενειών, ενώ έχει παρατηρηθεί αντίστροφη σχέση μεταξύ της λειτουργικότητάς του και της παραγωγής προϊόντων υπεροξειδίου (JanssenRJ.etal.2006;VercaatS.etal.2007).

Σε αυτήν την εργασία προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση σε σύγκριση με τη δραστηριότητά του σε υγιή άτομα. Κατ' αρχήν διερευνήσαμε την ύπαρξη κατάλληλου πρωτοκόλλου για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας.



Το σημείο εισόδου για τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα είναι το Σύμπλοκο I. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω της οξειδωσης του NADH και της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο με βάσει τον προσδιορισμό της οξειδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I. Ο προσδιορισμός έγινε μετρώντας φασματομετρικά την απορρόφηση στα 340nm. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη ροτενόνης, η οποία αναστέλλει τη δράση του Συμπλόκου I, προκειμένου να εκτιμηθεί η ειδικότητά της αντίδρασης. Δοκιμή της συγκεκριμένης τεχνικής έγινε σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ατόμων με σαρκοείδωση και υγιών ατόμων. Από τους παραπάνω τύπους κυττάρων χρησιμοποιήθηκε τόσο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα όσο και εμπλουτισμένο εκχύλισμα μιτοχονδρίων.

Κατά την εκτέλεση του πειράματος διαπιστώθηκαν τα εξής:

- πριν από κάθε μέτρηση ήταν απαραίτητη η ανακίνηση του premix ώστε να αποφευχθεί η ιζηματοποίηση του KCN.
- διαπιστώθηκε ότι η ιδανική συγκέντρωση του MgCl<sub>2</sub> ήταν τα 25mM.

Η λύση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης. Η λύση με υπέρηχους, αν και είναι πιο αποτελεσματική μέθοδος διαπερατοποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης αυξάνοντας την ευαισθησία του Συμπλόκου I στη ροτενόνη, είναι πιθανό να επηρεάζει την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων (LongJ.etal.2009) γι' αυτό και δεν επιλέχτηκε. Μελέτες έχουν δείξει πως η DQ στην ανηγμένη της μορφή μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στη δράση του Συμπλόκου I (BenitP.etal.2008) και για αυτό το λόγο εφαρμόστηκε πρωτόκολλο στο οποίο ως ανάλογο ουβικινόνης χρησιμοποιείται το συνένζυμο Q1 (CoQ1). Ωστόσο, η επιλογή του συνενζύμου φαίνεται να επηρεάζει την ανασταλτική δράση της ροτενόνης καθώς μελέτες υποδεικνύουν την αυξημένη δράση της παρουσία DQ σε σύγκριση με το συνένζυμο Q1 (70% vs 60% αντίστοιχα) (FatoR.etal.2009).

Η εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, γίνεται μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του NADH στα 340nm (JanssenAJ.etal.2007). Στην αρχή η δοκιμή έγινε σε εμπλουτισμένο εκχύλισμα μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα κατόπιν παρασκευής και διαπερατοποίησης με τη χρήση DG. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κατανάλωση του NADH πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης, ενώ αντίθετα η ροτενόνη φάνηκε να αναστέλλει κατά ένα

σημαντικό ποσοστό τη λειτουργία του συμπλόκου I σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και υγιών ατόμων (control). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένοι από τους ασθενείς, οι οποίοι συμμετείχαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας κατά την οποία παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά t-RNA γονίδια αλλά και σε γονίδια παρακείμενων περιοχών σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Στους ασθενείς αυτούς είχαν ανιχνευθεί μεταλλάξεις στα mt-tRNA (ThrG15928A, ArgT10463C, Leu(CUN) A12308G) οι οποίες έχουν αναφερθεί σε ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer, καρδιαγγειακές παθήσεις και στην αύξηση κινδύνου εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου (Grasbon-FrodIEM.etal.1999; LiuY.etal.2016; PulkesT.etal.2000). Εκτός από τις μεταλλάξεις στα mt-tRNA, ένας από τους ασθενείς έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο nd2 (ND2 T5495G). Το ND2είναι ένα από τα 7 μιτοχονδριακά γονίδια του Συμπλόκου I. Μεταλλάξεις του mt-ND2 έχουν προταθεί για τη συμμετοχή τους στην ενίσχυση της κυτταρικής αύξησης και στη δυνατότητα επέκτασης (ZhankC.etal.2012).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά των μετρήσεών μας, υπάρχει ένα πλεονέκτημα της λειτουργικότητας του Συμπλόκου I στα υγιή άτομα σε σύγκριση με τα άτομα που πάσχουν από σαρκοείδωση. Είναι όμως απαραίτητο να πραγματοποιηθούν αναλύσεις μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, όσον αφορά τη συσχέτιση της ενζυμικής ενεργότητας του Συμπλόκου I και του ρόλου των μιτοχονδρίων με την εκδήλωση της νόσου, που πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agostini C, Adami F, Semenzato G. New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:71.
- Bardinas F, Morera J, Fite E, Plasencia A. Seasonal clustering of sarcoidosis. *Lancet* 1989; 2: 455–56.
- Barnes P.J, Adcock I.M, K. Ito Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases *Eur Respir J*, 25 (2005), pp. 552–563
- Baughman R.P, Lower E.E, G. Pierson, S. Strohofer Spontaneous hydrogen peroxide release from alveolar macrophages of patients with active sarcoidosis: comparison with cigarette smokers *J Lab Clin Med*, 111 (1988), pp. 399–404
- Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361:1111.
- Belloq A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Fouqueray B, Philippe C et al (1999) Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(1):128–136
- Bénit P, Slama A, Rustin P. Decylubiquinol impedes mitochondrial respiratory chain complex I activity. *Mol Cell Biochem*. 2008 Jul;314(1-2):45-50.
- Boots AW, Drent M, Swennen EL, Moonen HJ, Bast A, Haenen GR (2009) Antioxidant status associated with inflammation in sarcoidosis: a potential role for antioxidants. *Respir Med* 103(3):364–372
- Boots AW, Drent M, de Boer VC, Bast A, Haenen GR (2011) Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. *Clin Nutr* 30(4):506–512, Epub 2011/02/18
- Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006;25:4647-4662.
- Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, et al. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature Med* 1997; 3:1124–8.
- Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Bovine complex I is a complex of forty-five different subunits. *J Biol Chem* 2006;281:32724-27.

- Casatella MA, Berton G, Agostini C, Zambelo R, Trentin I, Cipriani A, Semenzato G. Generation of superoxide anion by alveolar macrophages in sarcoidosis. Evidence for the activation of the oxygen metabolism in patients with high-intensity alveolitis. *Immunology* 1989; 66:451-458
- Culver DA, Barna BP, Raychaudhuri B, Bonfield TL, Abraham S, Malur A et al (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1):1-5
- Distelmaier F, Koopman WJ, vandenHeuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PH, et al Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 2009;132:833-42.
- Facco M, Cabrelle A, Teramo A, Olivieri V, Gnoato M, Teolato S, et al. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* (2011) 66(2):144
- Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1787(5):384-92.
- **Facco M, Cabrelle A, Teramo A, et al. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax* 2011; 66:144.**
- **Fischer A, Schmid B, Ellinghaus D, et al. A novel sarcoidosis risk locus for Europeans on chromosome 11q13.1. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:877.**
- Gasparre G., Porcelli A.M., Bonora E., Pennisi L.F., Toller M., Iommarini L., Ghelli A., Moretti M., Betts C.M., Martinelli G.N., et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007;104:9001-9006.
- Grunewald J. Genetics of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:434.
- Haddad J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology *Respir Res*, 3 (2002), p. 26

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 1999: 246-350.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Parker L, Glazer AN, eds. Methods in Enzymology. San Diego: Academic Press Inc., 1990; 186: 1-85.
- Hofmann S, Fischer A, Nothnagel M, et al. Genome-wide association analysis reveals 12q13.3-q14.1 as new risk locus for sarcoidosis. *Eur Respir J* 2013; 41:888.
- Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 2000; 100:352-8.
- Hosoda Y, Hiraga Y, Odaka M, et al. A cooperative study of sarcoidosis in Asia and Africa: analytic epidemiology. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278: 355–67.
- Hu Y , Benedict MA, Ding L & Nunez G. 1999 ; Role of cytochrome *c* and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 18: 3586–3595.
- Ivanisevic J, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Videnovic-Ivanov J et al (2012) Dyslipidemia and oxidative stress in sarcoidosis patients. *Clin Biochem* 45(9):677–682, Epub 2012/03/28
- Janssen AJ, Trijbels FJ, Sengers RC, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Wintjes LT, Stoltenborg-HogenkampBJ, RodenburgRJ. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem*. 2007 Apr;53(4):729-34.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA Mitochondrial complex I: structure, function and pathology *J Inher Metab Dis*. 2006 Aug;29(4):499-515
- Kass GEN, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S & Chow SC. 1996; Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem. J*. 318: 749–752.
- Kjellin H, Silva E, Branca R, Eklund A, Jakobsson PJ, Grunewald J, Wheelock ÅM.

Alterations in the membrane-associated proteome fraction of alveolar macrophages in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2016 Mar 29;33(1):17-28

- Koutsokera A<sup>1</sup>, Papaioannou AI, Malli F, Kiropoulos TS, Katsabeki A, Kerenidi T, Gourgoulialis KI, Daniil ZD. Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Dec; 22(6):603-7.
- Kriegova E, Fillerova R, Tomankova T, Hutyrova B, Mrazek F, Tichy T, et al. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* (2011) 38(5):1136–4410
- Liu RM (2008) Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10(2):303–319
- Lockstone HE, Sanderson S, Kulakova N, et al. Gene set analysis of lung samples provides insight into pathogenesis of progressive, fibrotic pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:1367
- Iannuzzi MC. Advances in the genetics of sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:457
- Ma Y, Gal A, M.N. Koss The pathology of pulmonary sarcoidosis: update *Semin Diagn Pathol*, 24 (2007), pp. 150–161
- Markart P, Luboinski T, Korfei M, Schmidt R, Wygrecka M, Mahavadi P et al (2009) Alveolar oxidative stress is associated with elevated levels of non-enzymatic low-molecular-weight antioxidants in patients with different forms of chronic fibrosing interstitial lung diseases. *Antioxid Redox Signal* 11(2):227–240
- Mermigkis C, Polychronopoulos V, Mermigkis D, Tsakanika K, Heretis M, Karagianidis N, Bouros D, Overexpression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage lymphocytes and macrophages in sarcoidosis. *Respiration.* 2006;73(2):221-6.
- Moller DR, Chen ES. What causes sarcoidosis? *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8:429.
- Muller-Quernheim J. Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application *Eur Respir J*, 12 (1998), pp. 716–738

- Müller-Quernheim J, Schürmann M, Hofmann S, et al. Genetics of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 2008; 29:391.
- Oswald-Richter KA, Richmond BW, Braun NA, et al. Reversal of global CD4+ subset dysfunction is associated with spontaneous clinical resolution of pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 2013; 190:5446
- Panayreas S, Theodorakopoulos P, Bouras A, Constantopoulos S. Seasonal occurrence of sarcoidosis in Greece. *Lancet* 1991; 338:510–11.
- Peletidou S, Zifa E, Grammatikopoulos A, Malli F, Bardaka F, Gourgoulianis K, Mamuris Z, Daniil Z. ‘Mitochondrial tRNA gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and sarcoidosis’; *European Respiratory Journal* (2014)
- Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet*. 2000 Dec 16;356(9247):2068-9.
- **Pabst S, Karpushova A, Diaz-Lacava A, et al. VEGF gene haplotypes are associated with sarcoidosis. *Chest* 2010; 137:156.**
- Rahman I (2002) Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol* 64(5–6):935–942.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A & Franceschi C. 1996; Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*. 378: 107–110.
- Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, et al. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2085.
- Rybicki BA, Kirkey KL, Major M, et al. Familial risk ratio of sarcoidosis in African-American sibs and parents. *Am J Epidemiol* 2001; 153:188
- Rossman MD, Thompson B, Frederick M, et al. HLA-DRB1\*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet* 2003; 73:720.
- Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, et al. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J Immunol* (2001) 166(1):642–9

- Stridh H, Planck A, Gigliotti D, Eklund A, Grunewald J Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis *Thorax*. 2002 Oct;57(10):897-901.
- Stridh H<sup>1</sup>, Cotgreave I, Müller M, Orrenius S, Gigliotti D Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes *Chem Res Toxicol*. 2001 Jul; 14(7):791-8
- **Semenzato G, Chilosi M, Ossi E, et al. Bronchoalveolar lavage and lung histology. Comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cells in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:400.**
- **Sverrild A, Backer V, Kyvik KO, et al. Heredity in sarcoidosis: a registry-based twin study. *Thorax* 2008; 63:894.**
- Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, et al. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathway who's expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4: 329–36.
- Thomas KW, Hunninghake. Sarcoidosis. *JAMA*. 2003 Jun 25;289(24):3300-3
- Valdivieso AG, Clazure M, Marín MC, Taminelli GL, Massip Copiz MM, Sánchez F, Schulman G, Teiber ML, Santa-Coloma TA The mitochondrial complex I activity is reduced in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS One*. 2012; 7(11):e48059.
- Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005; 37:357
- Vercaart S, KoopmanWJ, van Emst-de Vries SE, Nijtmans LG, Smeitink JA, Willems PH (2007) Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency *Biochim Biophys Acta* 2007 Mar;1772(3):373-81
- Wong, L.J., 2007. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein coding genes. *Muscle Nerve* 36, 279–293.



- Xaus J, Cardó M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J, Celada A Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):103-13.
- Xaus J, Comalada M, Cardó M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27 (Kip1) and p21(Waf1) *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2124-33
- Xaus J, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mañá J, Celada A High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):295-301
- Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; 127:2153:72.
- Zhang C, Huang VH, Simon M, Sharma LK, Fan W, Haas R, Wallace DC, Bai Y, Huang T. Heteroplasmic mutations of the mitochondrial genome cause paradoxical effects on mitochondrial functions. *FASEB J*. 2012 Dec;26(12):4914-24.
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z & Stathopoulos C Mitochondrial tRNA Mutations: Clinical and Functional Perturbations (2007) *RNA Biology*, 4:1, 38-66

