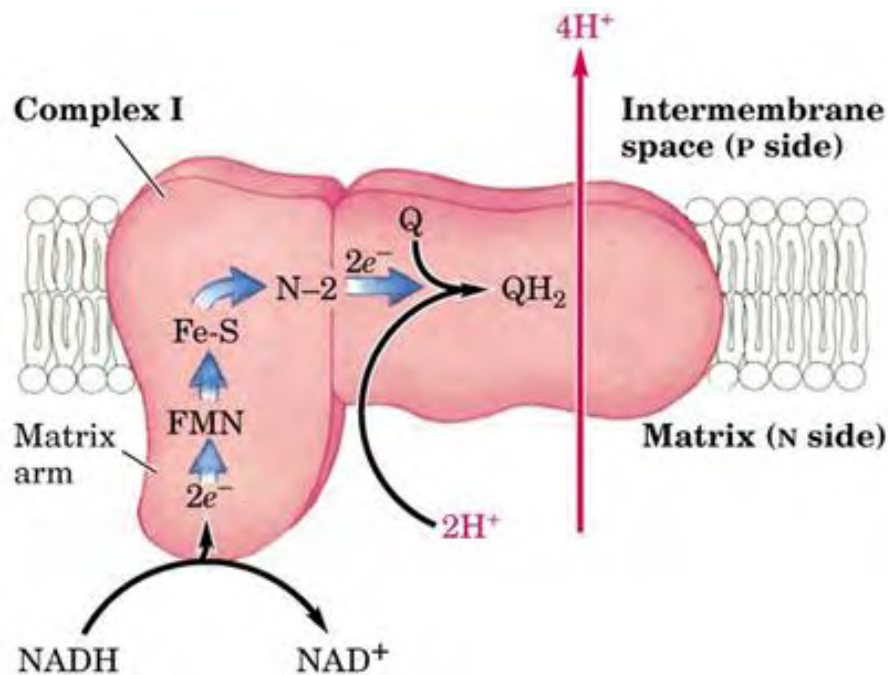


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ  
ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q (ΣΥΜΠΛΟΚΟ I) ΣΕ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ  
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

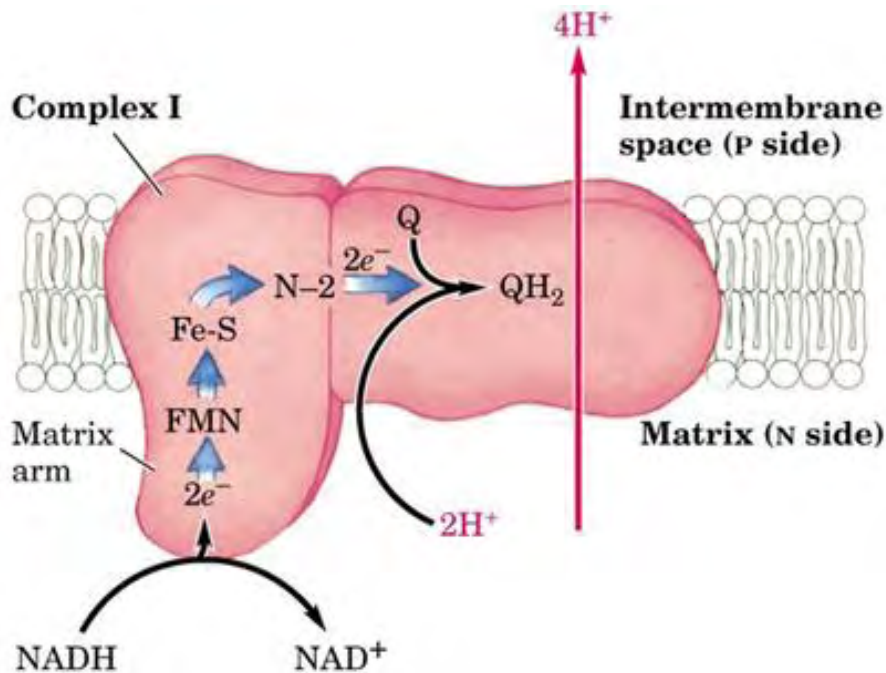


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ

Νικολέτα Ζωή Φουρτούνη του Γρηγορίου

**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**

**Nikoleta Zoi Gregory Fourtouni**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας ,  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας,  
Τμήματος Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία δεν θα είχε υλοποιηθεί χωρίς την βοήθεια και την υποστήριξη της επιβλέπουσας καθηγήτριας, κυρίας Ζίφα Αιμιλίας, την οποία και ευχαριστώ θερμά.

Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις συνεπιβλέπουσες της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Σαραφίδου Θεολογία, η οποία όποτε χρειάστηκα την παραμικρή βοήθεια ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει να βρω την λύση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Δανιήλ Ζωή, με την οποία συνεργάστηκα πάρα πολύ καλά, καθώς ήταν η υπεύθυνη για την παροχή των προς ανάλυση δειγμάτων.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο εργαστήριο Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, ιδιαίτερα στους μεταπτυχιακούς φοιτητές και τους υποψήφιους διδάκτορες, που ήταν πάντα πρόθυμοι να στηρίξουν την προσπάθεια που έκανα, αλλά και να με βοηθήσουν να εξοικειωθώ με το περιβάλλον του εργαστηρίου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την Βογιατζή Ευαγγελία, με την οποία συνεργάστηκα, ώστε να περατωθεί αυτή η απαιτητική πτυχιακή εργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	
1.1 .Μιτοχόνδρια.....	8
1.2. Αναπνευστική αλυσίδα.....	10
1.3. Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q.....	13
1.4. Δυσλειτουργία Αναπνευστικής Αλυσίδας Και Επιπτώσεις παραγωγής ROS.....	14
1.5. Σαρκορίδωση.....	15
1.6. Σκοπός.....	21
2. ΜΕΘΟΔΟΙ / ΥΛΙΚΑ.....	
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.....	
3.1 Κινητικότητα Οξείδωσης NADH.....	34
3.2 Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα της Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους NADH-Q.....	39
3.3 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας με Αποτελέσματα Προηγούμενων Ερευνών.....	40
3.4 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας Ατόμων με Σαρκοείδωση και Ατόμων Control.....	41
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας των κυττάρων, για τον λόγο αυτό η σημασία τους είναι μεγάλη για την επιβίωση αυτών. Το μιτοχονδριακό DNA σε γενικές γραμμές είναι επιρρεπές σε μεταλλάξεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικών παραγόντων, αλλά και μειωμένης επιδιορθωτικής δράσης ενζύμων κατά την αντιγραφή του. Μελέτες οι οποίες σχετίζονται με διάφορα νοσήματα των πνευμόνων έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA), παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνισή τους. Μια εξ αυτών είναι η σαρκοείδωση, η οποία είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια με άγνωστη προς το παρόν αιτιολογία. Το κύριο όργανο, το οποίο προσβάλλεται είναι οι πνεύμονες. Στόχος της παρούσας έρευνας, αποτέλεσε η μελέτη της Ειδικής Ενζυμικής Δραστικότητας του Ενζύμου Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q, ασθενών με σαρκοείδωση. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (ως πηγή μιτοχονδρίων), από ασθενείς με σαρκοείδωση, αλλά και από υγιή άτομα. Εν συνεχεία, αφού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης και επεξεργασίας των λεμφοκυττάρων, μετρήθηκε η ενζυμική δραστικότητα, του προς μελέτη, ενζύμου φασματοφωτομετρικά.

## **ABSTRACT**

Mitochondria are the energy-producing factories of cells, which is why they are so important for their survival. Mitochondrial DNA is generally prone to mutations, which are the result of environmental factors, but also reduced enzyme repair action when copied. Studies related to various lung diseases have shown that mutations in mitochondrial DNA (mt-DNA) contribute in some way in their appearance. One of them is sarcoidosis, which is a polysystemic disease with unknown, up to now, etiology. The main organ affected is the lungs. The aim of this research was to study the Specific Enzymatic Activity of NADH-coenzyme Q oxidoreductase, in patients with sarcoidosis. The research was performed on peripheral blood lymphocytes (as a source of mitochondria), by patients with sarcoidosis, but also by healthy individuals. Subsequently, after the lymphocyte isolation and treatment protocol was followed, the enzymatic activity of the enzyme to be studied was measured spectrophotometrically.

## 1. Εισαγωγή

- 1.1. Μιτοχόνδρια
- 1.2. Αναπνευστική αλυσίδα
- 1.3. Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q
- 1.4. Δυσλειτουργία αναπνευστικής αλυσίδας και Επιπτώσεις παραγωγής ROS
- 1.5. Σαρκοείδωση
- 1.6. Σκοπός

### 1.1 Μιτοχόνδρια

#### Γενικά

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια, τα οποία αποτελούνται από διπλή μεμβράνη και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας και συνεπώς για την κάλυψη των ενεργειακών και μεταβολικών απαιτήσεων του κυττάρου (Manczak et al., 2018).

#### Προέλευση

Έχει επικρατήσει η θεωρία 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). Η παραπάνω θεωρία δικαιολογεί και τον ημιαυτόνομο χαρακτήρα τους. Περιέχουν το δικό τους DNA (mtDNA), το οποίο συνήθως έχει κυκλική μορφή και το μέγεθός του ποικίλει στα διάφορα είδη. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA αποτελείται από 16.569 kb και κωδικοποιεί για 13 πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και αρκετά rRNA και tRNA (Manczak et al., 2018). Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ημιαυτόνομα, καθώς περιέχουν αρκετές πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια που υπάρχουν στο πυρηνικό DNA. Το μιτοχονδριακό DNA κατά βάση είναι μητρικής προέλευσης, καθώς κατά την γονιμοποίηση, μόνο ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου εισδύει στο ωάριο, ενώ το μαστίγιο, το οποίο αποτελείται από πληθώρα μιτοχονδρίων παραμένει εκτός.

#### Δομή

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων του κάθε κυττάρου εξαρτάται σημαντικά από τις ενεργειακές ανάγκες του ίδιου του κυττάρου, για παράδειγμα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς, έχουν μεγαλύτερο ποσοστό μιτοχονδρίων σε σχέση με άλλα κύτταρα, των οποίων οι ενεργειακές απαιτήσεις είναι μικρότερες. Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική. Η εξωτερική τους μεμβράνη είναι λεία, έχει κυλινδρικό σχήμα. Περιέχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τις πορίνες (=σηματίζουν υδρόφιλους διαύλους σε σχήμα βαρελιού) που επιτρέπουν την διέλευση ακόμα και μεγάλων μορίων (Grevel & Becker, 2019). Αντίθετα ορισμένα μόνο μόρια μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται **διαμεμβρανικό διάστημα** ή **μεσομεμβρανικός χώρος** του μιτοχονδρίου. Ο χώρος αυτός είναι γεμάτος με υγρό, που χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών



(Yasmine et al, 2020). Στη μιτοχονδριακή μήτρα συντελούνται οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης αυξάνεται σημαντικά χάρη στις πτυχώσεις που διαθέτει, έτσι δημιουργούνται πολύ περισσότερες θέσεις για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, από ότι θα συνέβαινε σε μια μεμβράνη χωρίς πτυχώσεις (Lupták M and Hroudová J, 2019)

### Λειτουργία

Γενικά τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες με σημαντικότερη τη μετατροπή της ενέργειας σε ATP. Μεταβολίζουν βιολογικά μακρομόρια τα οποία προσλαμβάνουν οι οργανισμοί από τις τροφές τους. Έτσι, τα μιτοχόνδρια διασπών υδατάνθρακες και λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Πιο αναλυτικά, μετά τη γλυκόλυση παράγεται ένα μόριο πυροσταφυλικού, το οποίο εισάγεται στα μιτοχόνδρια, ενώ παράλληλα παράγονται μικρές ποσότητες ATP και NADH (Wilson DF, 2017). Εκεί το πυροσταφυλικό μετατρέπεται ενζυμικά σε ακετυλοσυνένζυμο Α (ακέτυλοCo-A) και έτσι ξεκινάει μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η μεταφορά ηλεκτρονίων (Sajjani K. et al., 2017). Η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ATP τόσο μεταξύ οργανισμών όσο και μεταξύ διαφορετικών κυττάρων διαφέρει. Για παράδειγμα τα μιτοχόνδρια του ήπατος καταναλώνουν 50 φορές λιγότερο οξυγόνο από τα μιτοχόνδρια της καρδιάς, αφού η συνεχής ροή αίματος απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας. Συχνά, μέσα σε ένα κύτταρο υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μιτοχονδρίων που αυτό περιέχει. Ετεροπλασμία είναι το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται ετερογένεια στην κατανομή του μιτοχονδριακού DNA.

### Μιτοχονδριακές μεταλλάξεις

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι πιο ευάλωτο σε μεταλλάξεις συγκριτικά με το πυρηνικό DNA, γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί από το ότι είναι απλοειδές, επομένως οποιαδήποτε μετάλλαξη εκφράζεται, καθώς επίσης δεν διαθέτει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA είναι υπεύθυνες για πληθώρα ασθενειών όπως chronic progressive external ophthalmoplegia [(PEO)], mitochondrial myopathy, encephalopathy , lactic acidosis and stroke-like episodes [(MELAS)] κ.α.

## 1.2 Αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

### Κυτταρική Αναπνοή

Κυτταρική αναπνοή χαρακτηρίζεται η καταβολική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα και κατά την οποία πολύπλοκα οργανικά μόρια όπως υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες, οξειδώνονται προκειμένου να απελευθερώσουν ενέργεια, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για άλλες κυτταρικές διαδικασίες. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού κατά τον κύκλο του Krebs, η ροή αυτών μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και η σύνθεση ATP, που τελικά παράγεται, αποτελούν στο σύνολό τους κυτταρική αναπνοή (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Ανάλογα με την παρουσία ή όχι οξυγόνου, η κυτταρική αναπνοή μπορεί να είναι αερόβια ή αναερόβια αντίστοιχα. Η αερόβια κυτταρική αναπνοή απαρτίζεται από τρία στάδια.

1<sup>ο</sup> στάδιο: *Γλυκόλυση:*

Είναι μια μεταβολική πορεία κατά την οποία ένα μόριο γλυκόζης καταβόλιζεται προς δύο μόρια πυροσταφυλικού με την ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP καθώς και NADH. Το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-συνένζυμο A (Acetyl Co-A), NADH και CO<sub>2</sub>. (αερόβια αναπνοή)

2<sup>ο</sup> στάδιο: *Κύκλος του Krebs ή Κύκλος του Κιτρικού Οξέος:*

Κατά το στάδιο αυτό το ακέτυλο-συνένζυμο A συνδέεται με ένα μόριο οξαλοξικού οξέος με στόχο τον σχηματισμό ενός μορίου κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ οξειδώνεται και η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό μορίων υψηλής ενέργειας. Τα τελικά προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι 2 μόρια CO<sub>2</sub> και οξαλοξικό οξύ, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου σε έναν νέο κύκλο αντίδρασης. Σε αρκετά βήματα, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το υπόστρωμα σε άλλα μόρια, όπως το NADH και το FADH<sub>2</sub>. Στη συνέχεια αυτά τα δύο μόρια μεταφέρουν τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση. (Karishma Sajnani et al, 2017)

3<sup>ο</sup> στάδιο: *Οξειδωτική Φωσφορυλίωση:*

Τα ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH<sub>2</sub>, αντιδρούν με το οξυγόνο για την παραγωγή νερού και ATP.

## Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

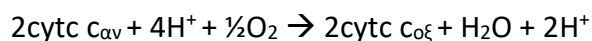
Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από το NADH και το FADH<sub>2</sub> είναι μια εξώεργη διαδικασία και πραγματοποιείται μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που λαμβάνουν χώρα σε ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστόν ως αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electric Transport Chain, ETC) (David F. Wilson, 2017)

## Ροή των Ηλεκτρονίων στην Αναπνευστική Αλυσίδα

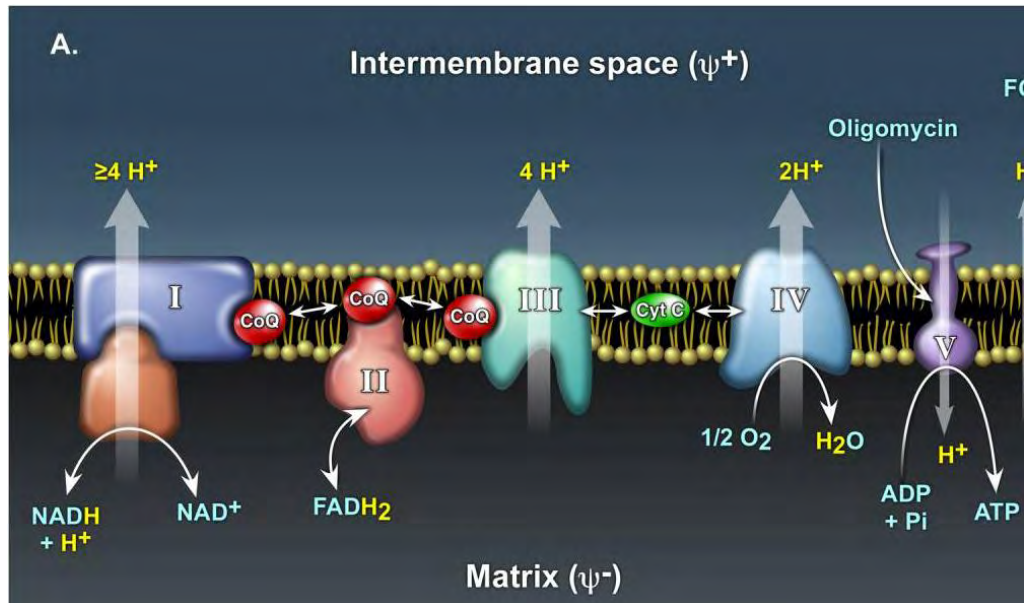
Τα ηλεκτρόνια ρέουν από το NADH και το FADH<sub>2</sub> δια μέσου πρωτεϊνικών συμπλόκων ανάγοντας τελικά το οξυγόνο σε νερό. Τρία από τα σύμπλοκα αντλούν πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Έτσι δημιουργείται διαβάθμιση πρωτονίων, δηλαδή ο διαμεμβρανικός χώρος είναι θετικά φορτισμένος και η μιτοχονδριακή μήτρα αρνητικά φορτισμένη. Αυτή η διαβάθμιση χρησιμοποιείται από την ATP synthase, για να σχηματιστεί ATP από ADP.

Η ροή των ηλεκτρονίων πραγματοποιείται από τα παρακάτω τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και ένα συνένζυμο. (Kasumov EA et al, 2014):

1. Σύμπλοκο I, γνωστό και ως *NADH-Αναγωγάση του συνενζύμου Q* ή *οξειδοαναγωγάση του Ζεύγους NADH-Q*. Τα ηλεκτρόνια του NADH εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω του συμπλόκου I, το οποίο αποτελείται από μια προσθετική ομάδα φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FMN) και μία ομάδα συμπλόκων σιδήρου-θείου που παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Το NADH μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια στο FMN οπότε προκύπτει η ανηγμένη μορφή FMNH<sub>2</sub>. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το FMNH<sub>2</sub> στα σύμπλοκα σιδήρου-θείου, και τελικά στο συνένζυμο Q.
2. Σύμπλοκο II, γνωστό και ως *αναγωγάση του ζεύγους ηλεκτρικού-Q*. Είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το FADH<sub>2</sub> στο συνένζυμο Q.
3. Συνένζυμο Q, γνωστό και ως ουβικινόνη. Είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III (Bongard et al., 2012)
4. Σύμπλοκο III, γνωστό και ως *οξειδοαναγωγάση του ζεύγους Q-Κυτόχρωμα c*. Μεταφέρει ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο VI με παράλληλη μεταφορά πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στη διαμεμβρανική περιοχή.
5. Σύμπλοκο VI, γνωστό και ως *κυτοχρωμική οξειδάση ή οξειδάση του κυτοχρώματος c*. Μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στον τελικό δέκτη τους, δηλαδή το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>). Το O<sub>2</sub> τελικά, ανάγεται σύμφωνα με την αντίδραση:



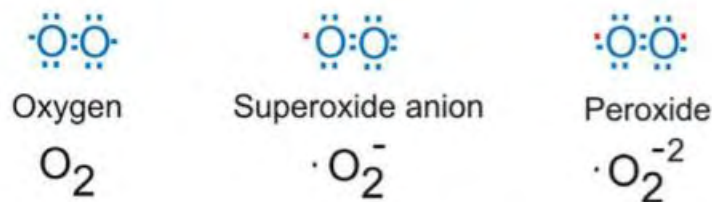
Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 1:** Οξειδωτική Φωσφορυλίωση και Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Yuanbin Liu & David R Schubert, 2009).

### Οξειδωτικό Stress και παραγωγή ελεύθερων ριζών

Φυσιολογικά το μοριακό οξυγόνο ανάγεται με τη μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων σε αυτό. Αποτέλεσμα αυτής της αναγωγής είναι η παραγωγή ασφαλών προϊόντων, δηλαδή δύο μόρια νερού. Αυτή η αναγωγή όταν πραγματοποιείται μερικώς με τη μεταφορά, ενός ή δύο ηλεκτρονίων, προκύπτουν επικίνδυνες ενώσεις, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο αντίστοιχα.



Οι ενώσεις αυτές μπορούν να αποβούν ιδιαίτερα βλαβερές για τη φυσιολογία του κυττάρου. Βέβαια παρότι, η οξειδάση του κυτοχρώματος c και άλλες πρωτεΐνες είναι αρκετά αποτελεσματικές στο να μην απελευθερώνουν τα ενδιάμεσα αυτά μόρια, αναπόφευκτα παράγονται σε μικρές ποσότητες. Τα ενδιάμεσα αυτά μόρια, καθώς και τα προϊόντα της αντίδρασης αυτών με άλλα μόρια, όπως το  $OH\cdot$ , ονομάζονται συνολικά δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, χρειάζονται για την ομαλή λειτουργία διάφορων διαδικασιών, όπως η απόπτωση, η μορφολογική ανάπτυξη του εμβρύου κ.α. Επίσης, οι δραστικές αυτές μορφές διεγείρουν αυξητικούς παράγοντες ζώντων κυττάρων και εξαλείφουν μη λειτουργικές πρωτεΐνες μέσω οξειδωσης, παίζοντας έτσι πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία πολλών οργανιδίων (Zuo et al., 2015). Στα κύτταρα τα μιτοχόνδρια είναι το πιο σημαντικό εργοστάσιο

παραγωγής ROS. Η υπερπαραγωγή ROS ευθύνεται για τη διατάραξη της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας του σώματος, καθώς και για την καταστροφή κυττάρων από διάφορους ιστούς και ιδιαίτερα από τον ιστό του πνεύμονα (Chuang et al., 2014).

Οι ROS είναι υψηλής ενεργότητας οξειδωτικά, που προκαλούν καταστροφές σε κυτταρικές δομές και διάφορες πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα και είναι υπεύθυνα για το κυτταρικό θάνατο μέσω πληθώρας μονοπατιών (Richter et al., 2015).

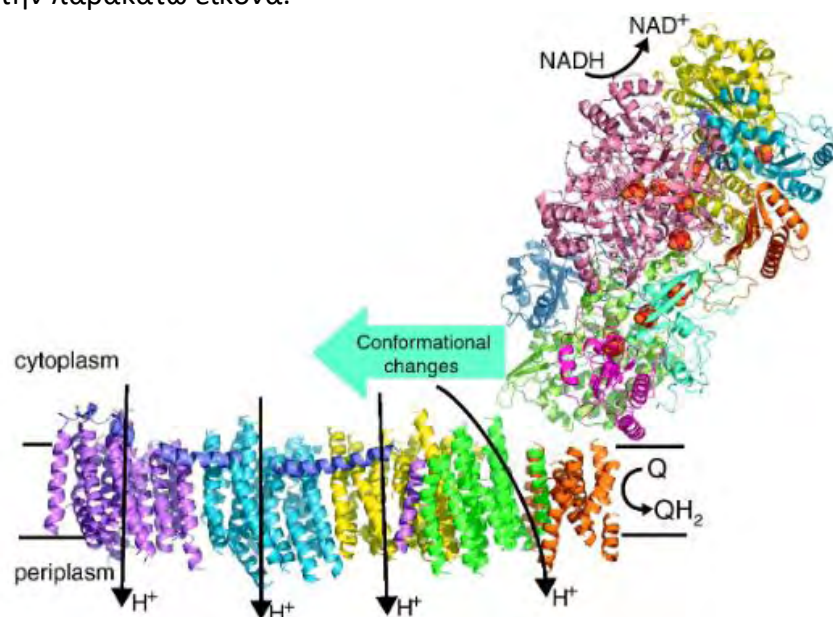
Η αντιοξειδωτική άμυνα έχει αναπτυχθεί για την προστασία του οργανισμού από τις βλαβερές επιπτώσεις των ROS, μέσω της διατήρησης της ισορροπίας της παραγωγής και του καταβολισμού τους. Όταν η ισορροπία αυτή διαταράσσεται τότε προκαλείται το λεγόμενο οξειδωτικό stress (oxidative stress). Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν (Burton and Jauniaux, 2011).

Γενικά, το οξειδωτικό stress κατηγορείται για αρκετές διεργασίες, όπως η γήρανση καθώς και διάφορα νοσήματα, όπως το Parkinson κ.α.

### 1.3 Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q/Σύμπλοκο I

#### Δομή

Το σύμπλοκο I αποτελείται από πολλά διαφορετικά πολυπεπτίδια και έχει χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει με το γράμμα L. Έχει 7 υπομονάδες που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA και 37 υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA (Caroll et al., 2006). Το μεγαλύτερο τμήμα του βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ ένα τμήμα του εξέρχει μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα. Η δομή του ενζύμου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 2: Η δομή του συμπλόκου I (Efremov and Sazanov, 2011)

## Λειτουργία

Όπως προαναφέρθηκε, το σύμπλοκο I αποτελείται από τον συμπαραγόνα FMN (φλαβινομονονουκλεοτίδιο) και διάφορα συμπλέγματα σιδήρου-θείου. Μέσω αυτών, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στο συνένζυμο Q (ουβικινόνη). Η οξειδωση του NADH ξεκινάει με την πρόσδεσή του σε μια υπομονάδα 51 kDa του συμπλόκου I και τη σταδιακή μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και δύο πρωτονίων από αυτό και το H<sup>+</sup> στο FMN, το οποίο μετατρέπεται σε FMNH<sub>2</sub>.

Τα ηλεκτρόνια αυτά στη συνέχεια με τη βοήθεια των συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου, μεταφέρονται στο συνένζυμο Q. Έτσι το FMN είναι αποδέκτης δύο ηλεκτρονίων από το NADH και δότης ενός ηλεκτρονίου στα κέντρα σιδήρου-θείου. Το συνένζυμο Q γνωστό και ως ουβικινόνη, όταν ανάγεται με την προσθήκη ενός ή δύο ηλεκτρονίων μετατρέπεται σε ουβικινόλη (QH<sub>2</sub>). Τόσο η ουβικινόνη όσο και η ουβικινόλη μπορούν και διαχέονται ελεύθερα στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα I και II στο σύμπλοκο III. Η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I ισοδυναμεί με μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα, η οποία αποκτά αρνητικό φορτίο, στον διαμεμβρανικό χώρο, ο οποίος φορτίζεται θετικά. Αυτή η πρωτονιοδιεγερτική δύναμη είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της ATP-συνθάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας (Hirst J, 2013).

### 1.4 Δυσλειτουργία αναπνευστικής αλυσίδας και Επιπτώσεις παραγωγής ROS

Η μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της αναπνευστικής αλυσίδας, δεν καταλήγει αποκλειστικά στην δημιουργία μορίων νερού, αλλά κάποιο ποσοστό αυτών (περίπου 1-2%), μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας, απευθείας στο μοριακό οξυγόνο. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η κύρια περιοχή διαρροής ηλεκτρονίων είναι το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση), που οξειδώνει το οξυγόνο για να δημιουργήσει ανιόν υπεροξειδίου. Η ρίζα ανιονικού υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με NO, για να σχηματίσει το εξαιρετικά δραστικό μόριο υπεροξυνιτρώδους (ONOO<sup>-</sup>).

Όταν η συγκέντρωση ROS αυξάνει στα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθίσταται ελαττωματικό και οδηγεί σε απώλεια δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης και αύξηση διαπερατότητας μεμβράνης. Παράλληλα, συχνή είναι η παρατήρηση ανοσολογικής απόκρισης, η οποία συνδέεται με το μιτοχονδριακό DNA, καθώς τα θραύσματα του μιτοχονδριακού DNA, τα οποία σε μεγάλο βαθμό προκύπτουν από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, είναι υπεύθυνα για την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Τα θραύσματα αυτά αναγνωρίζονται ως ανοσογόνα σωματίδια, τα οποία στρατολογούν διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα κ.α. στην περιοχή,

για να προκαλέσουν φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις (Liu and Chen J.,2017).

Απορρύθμιση πολλών από τους παραπάνω μηχανισμούς που ελέγχουν την μιτοχονδριακή λειτουργία έχουν εντοπιστεί, πρόσφατα, σε επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα σε πνεύμονες ασθενών με πνευμονικά νοσήματα. Αυτή η δυσλειτουργία συμβάλλει στην αδυναμία προσαρμογής στο κυτταρικό στρες, οδηγώντας σε ευαισθησία στον τραυματισμό και εξέλιξη των συμπτωμάτων, των νοσημάτων αυτών (Daniel C. Zank et al. 2018).

## 1.5 Σαρκοείδωση

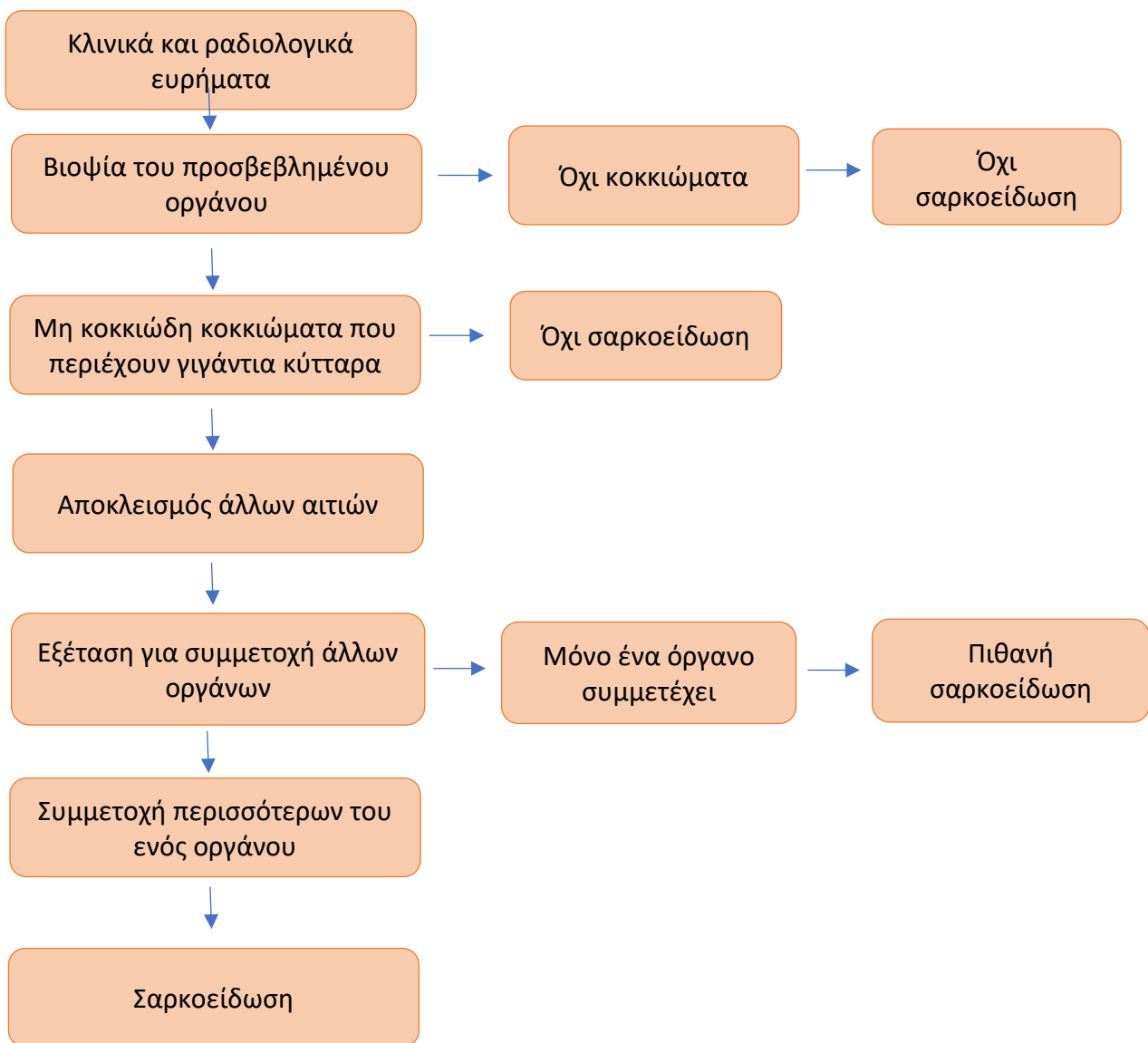
Η σαρκοείδωση κοκκιωματώδης ασθένεια, άγνωστης αιτιολογίας, η οποία εμφανίζεται σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ασθένεια τυπικά προσβάλλει κυρίως τους πνεύμονες, όμως είναι πολυσυστηματική, καθώς επηρεάζονται το ήπαρ, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι σιελογόνοι αδένες, η καρδιά, το νευρικό σύστημα, οι μύες, τα οστά και άλλα όργανα. Χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό κοκκιωμάτων, που αποτελούνται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Spagnolo P. et al., 2018).

### *Συμπτώματα-Κλινικά χαρακτηριστικά*

Ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ασθενών με σαρκοείδωση, εμφανίζουν φλεγμονή στους πνεύμονες. Τουλάχιστον το 5% των ασθενών εμφανίζουν αρτηριακή υπέρταση (Bargagli & Prasse, 2018). Χαρακτηριστικά παρατηρείται 'σφύριγμα' (wheezing) και άπνοια, καθώς και σοβαρότερες επιπλοκές όπως ίνωση των πνευμόνων. Συμπτώματα όπως, θολή όραση πρήξιμο στις αρθρώσεις, διογκωμένοι λεμφαδένες κ.α., είναι συχνά σε ασθενείς με σαρκοείδωση (Rizwan et al., 2019).

### *Διάγνωση*

Η διάγνωση της ασθένειας απαιτεί πληροφορίες που βασίζονται τόσο στην κλινική εικόνα του ασθενούς, όσο και σε ακτινολογικές εξετάσεις αλλά και σε ιστολογικές αναλύσεις. Υπάρχουν διάφορα νοσήματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από ύπαρξη κοκκιωμάτων. Συνεπώς, πρώτου βγει η τελική διάγνωση της σαρκοείδωσης, πρώτα πρέπει να αποκλειστεί η ύπαρξη κάποιου άλλου κοκκιωματώδους νοσήματος (Rosen, 2007). Παράλληλα, υπάρχουν διάφοροι βιοδείκτες όπως το ACE ( Angiotensin converting enzyme) και ο υποδοχέας sIL-2 (soluble interleukin-2 receptor), οι οποίοι όμως δεν είναι ειδικοί για την ασθένεια και για τον λόγο αυτό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνοι τους για τον καθορισμό της διάγνωσης (Prasse, 2016).

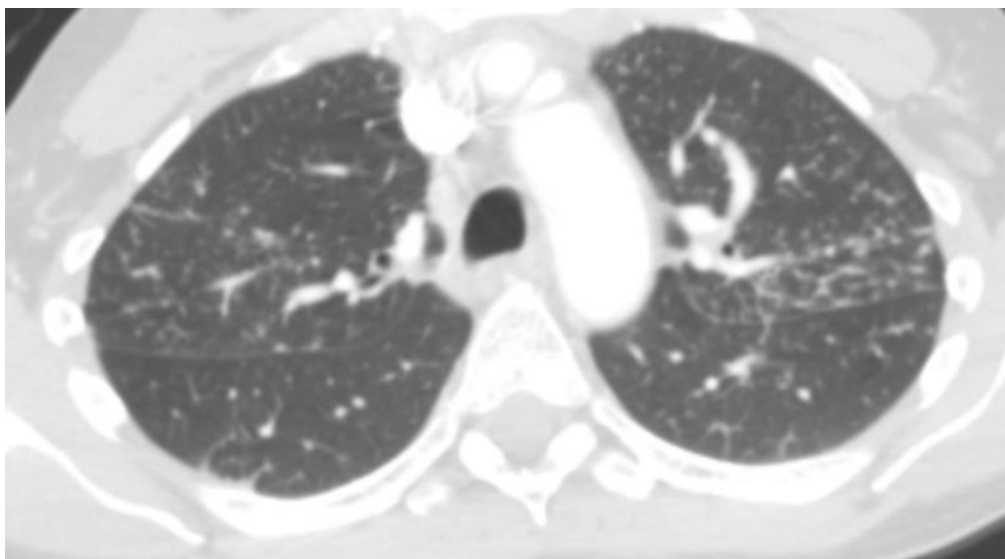


Η σαρκοείδωση ταξινομείται σε τέσσερα στάδια, ανάλογα με την εικόνα που προκύπτει από την ακτινογραφία θώρακος. Μερικά από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω.





**Εικόνα 3.** Ακτινογραφία θώρακος. Άνδρας, 31 ετών, σαρκοείδωση σταδίου I. Υποδεικνύει διμερείς πυλαία λεμφαδενοπάθεια, χωρίς ενδείξεις για εμπλοκή του παρεγχύματος του πνεύμονα. (Jay H. Ryu and Eric L. Matteson, 2019).



**Εικόνα 4.** Αξονική τομογραφία θώρακος. Γυναίκα, 53 ετών, σαρκοείδωση σταδίου III. Υποδεικνύει πολυάριθμα μικρά πνευμονικά οζίδια που κυριαρχούν στον ανώτερο λοβό και στην περιλεμφική κατανομή. (Jay H. Ryu and Eric L. Matteson, 2019).

### Επιδημιολογία

Κατά το διάστημα από το 1946 έως και το 2013 η συχνότητα εμφάνισης της σαρκοείδωσης σε ενήλικες ήταν περίπου 10 ανά 100.000 άτομα. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι ελαφρώς αυξημένη στις γυναίκες (10,5/100.000) συγκριτικά με την αντίστοιχη συχνότητα που έχει σημειωθεί για τους άνδρες (9,4/100.000). Η μέση ηλικία διάγνωσης της ασθένειας σημειώθηκε στα 48,3 έτη για τις γυναίκες και στα 42,3 έτη για τους άνδρες (Ungprasert P. et al., 2017). Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, οπότε οι παρατηρούμενες συχνότητες μπορεί να είναι διαφορετικές από τις πραγματικές. Επιπλέον, οι παρατηρούμενες συχνότητες εμφάνισης σαρκοείδωσης διαφέρουν ανά εθνικότητα (Nunes et al., 2007). Σε παιδιά, λίγα είναι τα περιστατικά με σαρκοείδωση, που έχουν σημειωθεί. Οι πιο συνηθισμένες ηλικίες είναι μεταξύ 13-15 ετών.

### Αιτιολογία

Η αιτιολογία της σαρκοείδωσης παραμένει άγνωστη μέχρι και σήμερα. Είναι μια συστημική νόσος, η οποία επηρεάζει, όπως ήδη έχει αναφερθεί, πληθώρα οργάνων, αυτός είναι και ο λόγος που χαρακτηρίζεται για την πολύπλοκη παθογένεσή της. Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου παίζει τόσο η γενετική προδιάθεση, όσο και η έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς και ως επί το πλείστον μολυσματικούς παράγοντες. Αναφορικά με την γενετική προδιάθεση, έχουν αναγνωρισθεί 21 μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν tRNAs, 4 από αυτές εμφανίστηκαν αποκλειστικά σε ασθενείς με σαρκοείδωση:

- T10034C σε tRNAGly
- G5773A στο tRNACys
- A5843G σε tRNATyr
- G15928A στο tRNAThr (Daniil Z. Et al., 2018)

Περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να είναι μυκοβακτήρια, μέταλλα, το διοξείδιο του πυριτίου κ.α. Εκτός από εξωγενείς παράγοντες, έχουν σημειωθεί και ενδογενή μόρια, τα οποία έχουν κατηγορηθεί για την εμφάνιση της ασθένειας, όπως το Α αμυλοειδές ορού και η βιμεντίνη (Beijer et al., 2017).

Δεν είναι λίγες οι έρευνες, οι οποίες βάζουν στο επίκεντρο των περιβαλλοντικών παραγόντων την μόλυνση από *Mycobacterium*. Με PCR ανιχνεύθηκε DNA, RNA μυκοβακτηρίων σε σαρκοείδικο ιστό. (Gupta et al., 2007).

### Παθοφυσιολογία

Βασικό παθολογικό γνώρισμα της σαρκοείδωσης είναι τα κοκκιώματα, τα οποία σχηματίζονται από την συσσώρευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως μακροφάγα, ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, T- και B- λεμφοκύτταρα. Τα κοκκιώματα σχηματίζονται ως απόκριση στην ύπαρξη κάποιου αντιγόνου, με στόχο την απομόνωσή του, ώστε να προστατευτούν γειτονικοί ιστοί. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα κοκκιώματα απαρτίζονται από μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, ινοβλάστες και λεμφοκύτταρα. Σημαντικότερα

όλων στην εμφάνιση της νόσου είναι τα T- λεμφοκύτταρα, τα οποία επάγουν την ανοσολογική απόκριση (Sakthivel & Bruder, 2017).

#### *Μηχανισμός παθογένεσης-Μηχανισμός σχηματισμού κοκκιωμάτων*

Ο μηχανισμός παθογένεσης της σαρκοείδωσης, στηρίζεται στην έναρξη ανοσολογικής απόκρισης που προκαλεί κάποιο αντιγόνο. Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με self-limited σαρκοείδωση τα ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tregs) έχουν θεμελιώδη σημασία για την εξέλιξη της νόσου, καθώς καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, παράγοντας αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (IL-10). Αντίθετα, ασθενείς με χρόνια ενεργή σαρκοείδωση (chronically active sarcoidosis), έχουν χαμηλότερα επίπεδα Tregs σε σαρκοειδικό ιστό, ενώ τα επίπεδά τους είναι υψηλότερα στο περιφερικό σύστημα, γεγονός που είναι παράδοξο. Επίσης, τα ρυθμιστικά T-κύτταρα, των ασθενών αυτών εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα, όσον αφορά την καταστολή της προφλεγμονώδους αντίδρασης (Van Le & Elliott D. Crouser, 2018).

Στην πραγματικότητα, το αντιγόνο ενεργοποιεί CD4+ T-λεμφοκύτταρα, ακολουθεί παραγωγή κυτταροκινών με αποτέλεσμα την συσσώρευση T-λεμφοκυττάρων στο αντίστοιχο όργανο και κυρίως στους πνεύμονες. Έτσι ενεργοποιούνται τοπικά τα μακροφάγα και τελικά σχηματίζονται τα κοκκίωματα (Patterson & Chen, 2017).

Συνεπώς, τα κυψελιδικά μακροφάγα του πνεύμονα, ενδοκυτταρώνουν το αντιγόνο, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν χημειοκίνες (CXCL10, IL-12, IL-18), οι οποίες προάγουν την διαφοροποίηση των CD4+ T βοηθητικών κυττάρων (TH1). Τα διαφοροποιημένα TH1 λεμφοκύτταρα ενισχύουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις με την έκκριση υψηλών επιπέδων κυτταροκινών IFN- $\gamma$  και IL-2, έτσι ενισχύεται ακόμα περισσότερο η ανοσολογική απόκριση, ενεργοποιούνται όλο και περισσότερα μακροφάγα, T- και B- λεμφοκύτταρα. Έτσι, προκύπτει μία οξεία ανοσοποιητική αντίδραση με αποτέλεσμα το αντιγόνο, γύρω από το οποίο έχει σχηματιστεί το κοκκίωμα να εξουδετερώνεται. Επίσης, από τα κύτταρα του κοκκιώματος απελευθερώνεται και ο αυξητικός παράγοντας TGF- $\beta$ , που επάγει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Sakthivel & Bruder, 2017).

#### *Θεραπεία*

Δεν υπάρχει θεραπεία για την ίδια τη σαρκοείδωση, η φαρμακευτική αγωγή βοηθάει κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων και στην προστασία των προσβεβλημένων οργάνων, από καταστροφή. Τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στοχεύουν τον TNF $\alpha$ , ο οποίος έχει καίρια σημασία για την έναρξη και την διαιώνιση της κοκκιωματώδους απόκρισης και άρα της επιδείνωσης του ασθενούς (Valeyre et al., 2014).

Η πιο συνηθισμένη θεραπεία είναι η συστηματική χορήγηση κορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι αναστολείς της φλεγμονώδους αντίδρασης, καθώς παράλληλα αποτελούν και τη βασική θεραπεία έναντι του άσθματος. Μέσω της πρόσδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοριδίων, που εντοπίζεται στον υποκινητή

γονιδίων, αναστέλλουν κυτταροκίνες και χημειοκίνες, περιορίζοντας έτσι τη φλεγμονή.

Αν και τα κορτικοστεροειδή είναι το αρχικό φάρμακο επιλογής για σχεδόν όλες τις μορφές σαρκοείδωσης, χρησιμοποιούνται συνήθως οι εναλλακτικοί παράγοντες. Η απόφαση χρήσης αυτών των παραγόντων επηρεάζεται από τη διάρκεια της προηγούμενης χρήσης κορτικοστεροειδών, τη δόση κορτικοστεροειδών που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της νόσου και την τάση για ίνωση. Τέτοιοι παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν οι αντιμεταβολίτες: μεθοτρεξάτη (MTX), η αζαθειοπρίνη (AZA) κ.α. Αυτοί χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αυτοάνοσων διαταραχών (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα).

Πιο συγκεκριμένα, η μεθοτρεξάτη είναι το πιο ευρέως μελετημένο κυτταροτοξικό φάρμακο για την πνευμονική σαρκοείδωση. Επίσης, είναι αποτελεσματική και για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου, που προσβάλλουν το δέρμα, τους οφθαλμούς, το νευρικό και το σκελετικό σύστημα. Η παράλληλη χορήγηση κορτικοειδών και μεθοτρεξάτης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητας των κορτικοειδών και συνεπώς τη μείωση της δόσης τους. Εκτός των άλλων η μεθοτρεξάτη είναι και αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας, ο οποίος αναστέλλει την βιοσύνθεση πουρινών και πυριμιδινών, οδηγώντας έτσι σε μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων (Korsten P. et al., 2013).

#### *Μιτοχόνδρια και μοριακοί μηχανισμοί σαρκοείδωσης*

Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου εξαιτίας δυσλειτουργίας στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, οδηγεί σε βλάβη των ιστών και αναπνευστικές διαταραχές όπως η πνευμονική ίνωση και η σαρκοείδωση. Ο μηχανισμός παθογένεσης της σαρκοείδωσης, στηρίζεται στην έναρξη ανοσολογικής απόκρισης που προκαλεί κάποιο αντιγόνο, όπως έχει προαναφερθεί. Το ρόλο του αντιγόνου δεν είναι απαραίτητο να τον έχει κάποιο εξωγενές στοιχείο, συχνά όπως έχει προαναφερθεί μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγόνα, θραύσματα μιτοχονδριακού DNA, τα οποία είναι αποτέλεσμα της υπερπαραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες συχνά προκαλούν θραύσεις σε κλώνους DNA. Αυτές οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν εκτός αυτού και πολλές τοξικές βλάβες, όπως υπεροξειδωση λιπιδικών μεμβρανών κυττάρων (Halliwell B. Et al. 1999).

Ο πνεύμονας αποτελεί ένα εξαιρετικό στόχο για το οξειδωτικό στρες, σε σχέση με άλλα όργανα, καθώς εκτίθεται άμεσα σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, μέσω της ανταλλαγής αερίων (οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα) που επιτελείται στις πνευμονικές κυψελίδες. Η ύπαρξη αυτών των κυψελιδών, αυξάνει την επιφάνεια του πνεύμονα, προσεγγίζοντας μέχρι και τα 70 μέτρα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, έχουν ως αποτέλεσμα τα κύτταρα του πνεύμονα να υφίστανται έντονο οξειδωτικό στρες, από διάφορα ερεθίσματα, όπως το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση κ.α. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου στον ορό αλλά και σε μακροφάγα εντοπιζόμενα στους πνεύμονες ασθενών με σαρκοείδωση (Koutsokera A. Et al.,

2009). Εκτός αυτού τα μακροφάγα ασθενών με σαρκοείδωση, μεταβολίζουν το οξυγόνο και διαθέτουν αυξημένη ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών. Αυτές, συμβάλλουν στην φλεγμονή με ποικίλους τρόπους:

1. Ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε κυψελιδικά μακροφάγα και σε μονοκύτταρα του αίματος ασθενών με σαρκοείδωση. Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας επάγει την παραγωγή της IL-8, η οποία με την σειρά της επάγει την μετανάστευση και την αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων, τα οποία είναι τα πρώτα κύτταρα που κάνουν την εμφάνισή τους κατά την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (Culver DA. Et al., 2004).
2. Αύξηση της έκφρασης του TGF-β, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τον σχηματισμό IgA αντισωμάτων, τα οποία συνδέονται προσωρινώς με επιθηλιακά κύτταρα κατά την διάρκεια της έκκρισης. Συνήθως το IgA συναντάται ως διμερές, όμως η μονομερής μορφή του, η οποία απαντάται στο αίμα, βοηθά τα ηωσινόφιλα να ασκήσουν τις αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες τους και επάγει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Sakthivel and Bruder, 2017).
3. Επαγωγή του αναστολέα του πλασμινογόνου, ο οποίος εμποδίζει την μετατροπή πλασμινογόνου σε πλασμίνη, η οποία φυσιολογικά εμποδίζει την εμφάνιση ίνωσης (Liu R. Et al., 2008).
4. Επαγωγή μετανάστευσης των μονοκυττάρων του αίματος στον συνδετικό ιστό του πνεύμονα, γεγονός που συνεπάγεται τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα, ενισχύοντας έτσι την φλεγμονή (Ivanisevic J. Et al., 2012).

## 1.6 Σκοπός

Δεδομένα από προηγούμενες έρευνες:

- I. Η υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) οδηγεί σε διατάραξη της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισοροπίας του σώματος, δηλαδή σε οξειδωτικό stress. (Zuo et al., 2015).
- II. Ασθένειες των πνευμόνων συνδέονται συχνά με οξειδωτικό stress (Chuang et al., 2014).
- III. Ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ασθενών με σαρκοείδωση, εμφανίζουν φλεγμονή στους πνεύμονες (Bargagli & Prasse, 2018).
- IV. Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακό DNA, ρυθμίζουν ασθένειες που οφείλονται σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (Hayashi et al., 2016).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, αποτελεί η μελέτη της αναπνευστικής αλυσίδας σε ασθενείς με σαρκοείδωση, ξεκινώντας από το σύμπλοκο- Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. Αυτό θα πραγματοποιηθεί με την με την μέτρηση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου αυτού και την σύγκριση αυτής με την αντίστοιχη τιμή δραστηριότητας ατόμων control. Επομένως, τελικά θα μπορούν να διεξαχθούν κάποια συμπεράσματα, σχετικά με την σημασία της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην εμφάνιση σαρκοείδωσης.

## 2.Υλικά και μέθοδοι

Το πείραμα περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

- 1° Απομόνωση Λεμφοκυττάρων
- 2° Επεξεργασία Δείγματος
- 3° Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου
- 4° Πρωτόκολλο Μέτρησης Δραστικότητας Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους NADH-Q

### 2.1 Απομόνωση Λεμφοκυττάρων

Η απομόνωση λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων και ατόμων με σαρκοείδωση. Το περιφερικό αίμα είναι κατάλληλο για την διαδικασία αυτή, καθώς συλλέγεται εύκολα και ανώδυνα. Η μέτρηση της δραστικότητας του μιτοχονδριακού ενζύμου Σύμπλοκο I, έγινε σε λεμφοκύτταρα, καθώς αυτά παρουσιάζουν αυξημένη μιτοχονδριακή δραστικότητα.

Η ποσότητα αίματος, που συλλέχθηκε με ηπαρινισμένη σύριγγα, από κάθε άτομο ήταν 20ml. Η λήψη του αίματος έγινε από εξειδικευμένο ιατρικό ή νοσηλευτικό προσωπικό. Η όλη διαδικασία της απομόνωσης και αποθήκευσης των λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε εντός δύο ωρών από την στιγμή της συλλογής του αίματος.

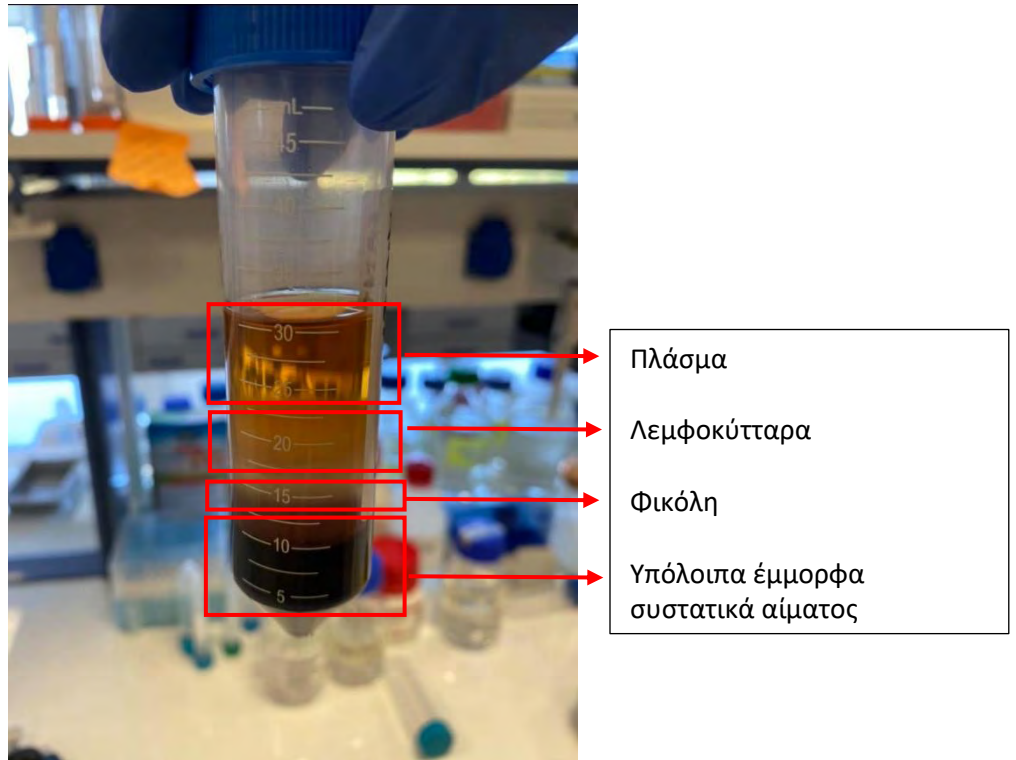
Υλικά:

- Δείγμα περιφερικού αίματος
- Ηπαρινισμένη σύριγγα
- Αντιδραστήριο Ficoll-Paque Plus (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- SHE-PIM/ ice-cold buffer
- Σωλήνες falcon των 15ml και των 50ml
- Eppendorf του 1,5ml
- Πιπέτα Pasteur
- Φυγόκεντρος

#### *Αρχή της μεθόδου*

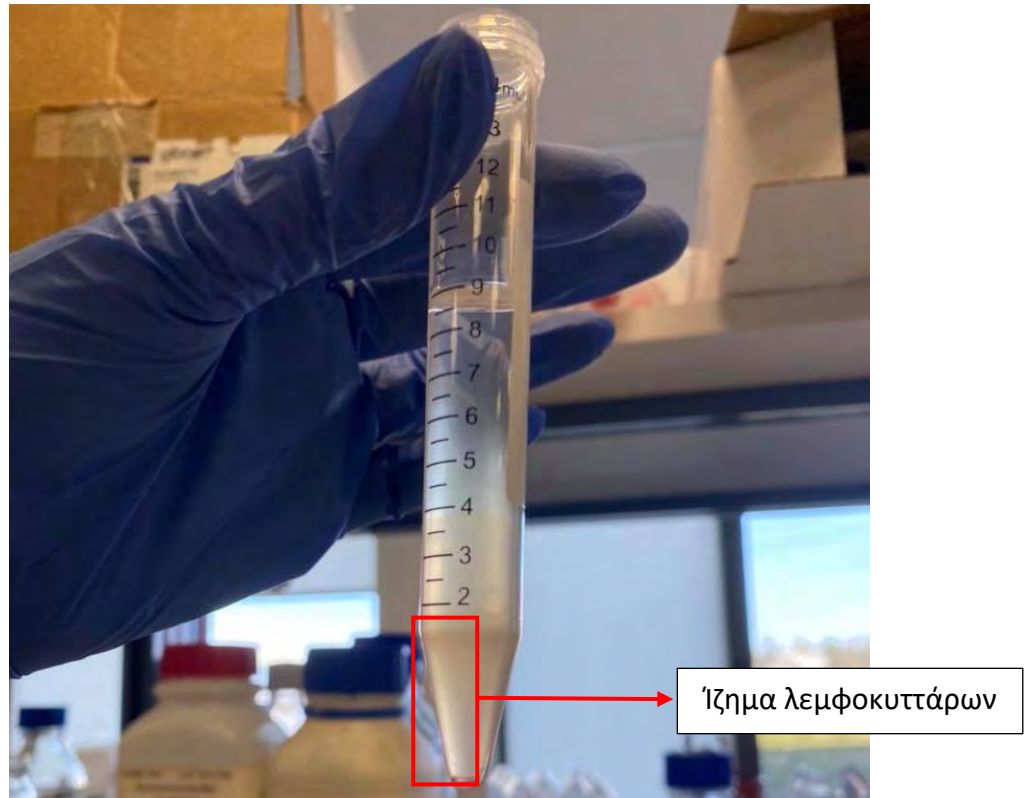
Για την αρχική απομόνωση χρησιμοποιήθηκε ως διαχωριστικό μέσο η φικόλη (αντιδραστήριο Ficoll-Paque Plus της εταιρείας Sigma-Aldrich), καθώς η πυκνότητά της είναι μικρότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων, αλλά μεγαλύτερη από εκείνη των λεμφοκυττάρων. Μετά, λοιπόν, από φυγοκέντρωση, η φικόλη διαχωρίζει τα ερυθροκύτταρα από τα λεμφοκύτταρα. Ύστερα από φυγοκέντρωση, στον σωλήνα falcon των 50ml προκύπτουν 4 διακριτές στρώσεις (εικόνα 6), οι από πάνω προς τα κάτω είναι οι εξής:

1. Πλάσμα
2. Λεμφοκύτταρα
3. Φικόλη
4. Ερυθροκύτταρα



Εικόνα 6: Τέσσερις στρώσεις που προκύπτουν μετά από τη φυγοκέντριση του αίματος

Εν συνεχεία, μετά την απομάκρυνση των λεμφοκυττάρων με πουάρ και την τοποθέτησή τους σε σωλήνα falcon των 15ml, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντριση με PBS, για τον καθαρισμό των λεμφοκυττάρων από την φικόλη, καθώς αυτή είναι τοξική για αυτά. Τα λεμφοκύτταρα ανάλογα με την κλίση της φυγοκέντρου είτε καθιζάνουν στον πυθμένα του σωλήνα, είτε εντοπίζονται ως ίζημα στα πλάγια τοιχώματα αυτού (εικόνα 7). Τα λεμφοκύτταρα που έχουν απομονωθεί αποθηκεύονται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , με SHE-PIM/ ice-cold buffer, το οποίο λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό.



Εικόνα 7: 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 αυτό, της απομόνωσης των λεμφοκυττάρων ήταν το PBS 10X και το SHE-PIM ice cold buffer, σύμφωνα με τον πίνακα 1 και 2 αντίστοιχα.

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Ποσότητα(gr)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M	14,196
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	0,272
NaCl	1,37 M	8,0062
KCl	20 mM	0,149
Τελικός όγκος		100 ml

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για PBS 10X

Από το PBS 10X παρασκευάστηκε διάλυμα PBS 1X, δηλαδή 25 ml από το διάλυμα PBS 10X αναμίχθηκαν με 225 ml dH<sub>2</sub>O.



Αντιδραστήριο	Stock	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα για SHE-PIM
Sucrose	0,085 gr/ml	0.24 M	8.5 gr
HEPES, pH=7,4	0.1 M	10mM	10 ml
EDTA	0.5 M	1 mM	0.2 ml
Πρωτεϊνικοί αναστολείς (PIM)	Ταμπλέτες	2 ταμπλέτες/ 50 ml SHE-PIM	4 ταμπλέτες
ddH <sub>2</sub> O	-	-	89,2 ml
Τελικός όγκος			100ml

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την Παρασκευή του SHE-PIM/ice-cold buffer.

### Πειραματική Διαδικασία

Ακριβές πρωτόκολλο:

1. Απόχυση, με σύριγγα, 10ml Ficoll-Paque Plus σε σωλήνα falcon των 50 ml
2. Απαλή απόχυση των 20 ml αίματος πάνω από την φικόλη, απευθείας μέσα από την σύριγγα. Αυτό το βήμα πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς η φικόλη δεν πρέπει να αναμιχθεί με το αίμα. Δηλαδή η φικόλη θα πρέπει να σχηματίσει μία στρώση που ακουμπά στο αίμα και όχι να αναμιγνύεται με αυτό.
3. Φυγοκέντρηση σε 1800 rpm, 20 °C για 20 λεπτά
4. Απομάκρυνση της πρώτης στρώσης (πλάσματος) με πιπέτα Pasteur
5. Συλλογή της δεύτερης στρώσης, δηλαδή των λεμφοκυττάρων, με πιπέτα Pasteur και μεταφορά της σε νέο σωλήνα falcon των 15 ml. Τα λεμφοκύτταρα συνήθως καταλαμβάνουν όγκο 1-3 ml
6. Προσθήκη τριπλάσιου όγκου PBS 1X στον παραπάνω σωλήνα με τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα.
7. Φυγοκέντρηση σε 2500 rpm, 20 °C για 5 λεπτά
8. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με πιπέτα Pasteur. Συνήθως το ίζημα δεν είναι πλήρως στερεάς μορφής, για τον λόγο αυτό περίπου 1 ml υπερκείμενου διατηρείται.
9. Προσθήκη στον σωλήνα με το ίζημα, 7 ml SHE-PIM ice cold buffer. Ανάδευση με την βοήθεια πιπέτας, ώστε να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
10. Το περιεχόμενο του σωλήνα μοιράζεται σε Eppendorf των 1,5 ml, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C. Δηλαδή, από κάθε δείγμα αίματος προκύπτουν περίπου 5-6 Eppendorf με λεμφοκύτταρα.

## 2.2 Επεξεργασία δείγματος

Οι μεμβράνες των λεμφοκυττάρων πρέπει να γίνουν διαπερατές, ώστε να μπορέσει να μετρηθεί η ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόλου I της αναπνευστικής αλυσίδας (4<sup>ο</sup> στάδιο πειράματος). Πιο συγκεκριμένα, πρέπει τα μιτοχόνδρια και κατ'επέκταση το Σύμπλοκο I των απομονωμένων λεμφοκυττάρων, να είναι διαθέσιμα, ώστε να έρθουν σε επαφή με τα διάφορα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων ήταν αυτή της ψύξης (-80 °C) - απόψυξης (37 °C). Πρόκειται για μια ήπια μέθοδο, η οποία δεν προκαλεί μετουσίωση

και αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα εξεταζόμενα δείγματα, σε αντίθεση με άλλες πιο έντονες μεθόδους όπως η μέθοδος sonication.

#### *Αρχή της μεθόδου*

Ουσιαστικά, η συγκεκριμένη μέθοδος λύσης των κυττάρων βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους απότομης εναλλαγής από το πολύ θερμό (37°C) στο πολύ ψυχρό (-80°C). Στους -80°C σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου, η γρήγορη υγροποίηση των οποίων έχει ως αποτέλεσμα της διατάραξη της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης.

#### *Πειραματική Διαδικασία*

1. Σε κάθε κύκλο ψύξης απόψυξης τα Eppendorf με τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα αφήνονται αρχικά στους -80°C για 20 min.
2. Στην συνέχεια αφήνονται στο υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37 °C για 20 min.
3. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται, συνολικά, 3 φορές.

### **2.3 Ποσοτικοποίηση Πρωτεϊνικού Περιεχομένου**

Το εκχύλισμα των λεμφοκυττάρων που λήφθηκε μετά το πρώτο στάδιο, περιέχει πλήθος πρωτεϊνών. Για να είναι, λοιπόν, τα αποτελέσματα του υπολογισμού της μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας αξιόπιστα, είναι απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών είναι η Bradford.

#### *Υλικά:*

- Αντιδραστήριο Bradford (Bradford Assay Kit της εταιρίας ThermoFisher Scientific)
- Απλή κυψελίδα
- Tris-HCl, 10 mM
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Διάλυμα SHE-PIM/ ice-cold buffer
- Eppendorf 1.5 ml
- Φασματοφωτόμετρο (595 nm)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος Bradford είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η ολική συγκέντρωση ενός διαλύματος σε πρωτεΐνες. Ουσιαστικά, βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, από καφέ σε μπλε, όταν υπάρχουν πρωτεϊνικά μόρια στο διάλυμα, καθώς προσδένεται σε αυτά.

Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, πρέπει αρχικά να κατασκευαστεί μια πρότυπη καμπύλη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα βόειας αλβουμίνης (BSA), γνωστών και διαφορετικών μεταξύ τους συγκεντρώσεων. Στην κυψελίδα αναμειγνύεται σταθερός όγκος πρότυπου διαλύματος BSA, ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστηρίου Bradford. Εν συνεχεία, ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 10 min και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595 nm. Από την τιμή απορρόφησης που θα δώσει κάθε πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης BSA, κατασκευάζεται η πρότυπη κομπύλη αναφοράς. Η ίδια, ακριβώς, διαδικασία πραγματοποιείται και για

τα άγνωστης συγκέντρωσης δείγματα. Τελικά, με την χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς και την τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης των προς μελέτη δειγμάτων. Τα δείγματα είναι σε διπλές, ώστε τα αποτελέσματα να έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία.

#### Προετοιμασία διαλυμάτων

Για την πραγματοποίηση του ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford, ήταν απαραίτητη η παρασκευή διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM, καθώς και διαλύματος BSA γνωστής συγκέντρωσης.

##### 1. Tris-HCl συγκέντρωσης 10 mM

Ως stock υπήρχε διάλυμα Tris-HCl pH 7,6 συγκέντρωσης 1M. Με την χρήση του νόμου της αραιώσης, προκύπτει ότι χρειάζεται να διαλυθεί 1ml του διαλύματος stock σε 99 ml dH<sub>2</sub>O, ώστε να προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 mM και τελικού όγκου 100 ml.

##### 2. Διάλυμα BSA

Η BSA που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, υπήρχε με την μορφή κρυστάλλων. Το διάλυμα stock που κατασκευάστηκε ήταν συγκέντρωσης 1 mg/ml και τελικού όγκου 10 ml, για τον λόγο αυτό διαλύθηκαν 10 mg BSA σε 10 ml dH<sub>2</sub>O.

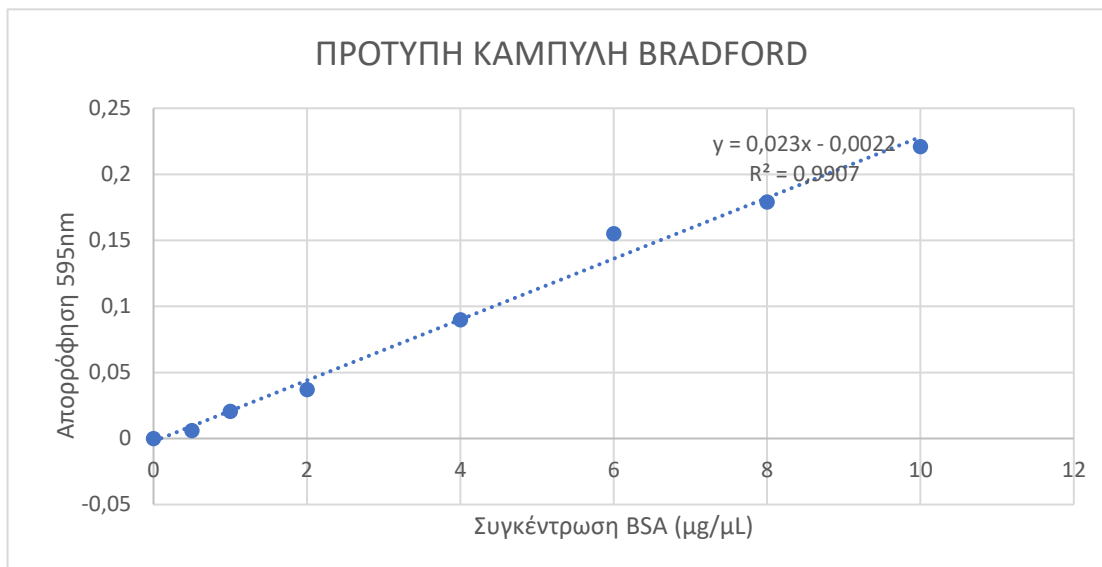
#### Πειραματική διαδικασία

##### Πρότυπη καμπύλη

BSA(1mg/ml)	VTris (μL)	VBradford (μL)	M.O. A <sub>595nm</sub>
0	20	980	0
0.5	19.5	980	0.006
1	19	980	0.205
2	18	980	0.037
4	16	980	0.09
6	14	980	0.155
8	12	980	0.179
10	10	980	0.221

Πίνακας 3: Δεδομένα για κατασκευή πρότυπης καμπύλης Bradford και οι μέσοι όροι των τιμών των απορροφήσεων που λήφθηκαν.

- Αριθμούμε δυο οχτάδες από σωληνάκια Eppendorf του 1,5 ml από το 1 έως το 8 και από το 1' έως το 8'.
- Σε καθένα από τα 8 προσθέτουμε συγκεκριμένη και διαφορετική ποσότητα διαλύματος BSA. Τα σωληνάκια 1 και 1' αποτελούν τα τυφλά, για τον λόγο αυτό δεν περιέχουν BSA.
- Στα σωληνάκια 2 έως 8 και 2' έως 8', προστίθενται 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL διαλύματος BSA, αντίστοιχα.
- Προσθήκη Tris-HCl 10mM στα Eppendorf
- Τέλος προστίθεται το αντιδραστήριο Bradford
- Επώαση των σωληνακίων Eppendorf στο σκοτάδι για 10 min
- Φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 595 nm



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford

### Εφαρμογή της μεθόδου Bradford στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα

Αντιδραστήριο	Τυφλό	[1]
Δείγμα	0 μL	10 μL
SHE-PIM Ice-cold buffer	20 μL	10 μL
Bradford 1X	980 μL	980 μL

Πίνακας 4: Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητες για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα

- Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα, τα οποία συντηρούνται σε σωληνάκια των 1,5 mL στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ώστε να ξεπαγώσουν
- Αρχικά, παρασκευάζεται το τυφλό σε σωληνάκι του 1,5 mL, καθώς προσθέτουμε 20 μL SHE-PIM ice-cold buffer και 980μL αντιδραστήριο Bradford.
- Μέσα σε άλλο σωληνάκι του 1,5 mL, για κάθε δείγμα, προσθέτουμε 10 μL SHE-PIM ice-cold buffer, 10 μL από το αντίστοιχο δείγμα και 980 μL αντιδραστήριο Bradford
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm
- Χρησιμοποιώντας την εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη και με μαθηματικούς υπολογισμούς, βρίσκουμε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε δείγματος
- Υπολογίζουμε πόσα μL από κάθε δείγμα θα χρειαστούμε, ώστε να έχουμε 70 μg πρωτεΐνης.

### Παράδειγμα:

Το δείγμα Σ1 έδωσε τιμή απορρόφησης στα 595 nm 0,178.

Χρησιμοποιώντας, την εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη  $F(x)=0,023x-0,0022$  και βάζοντας όπου  $f(x)$  την τιμή της απορρόφησης, υπολογίζουμε την τιμή του  $x$ , όπου  $x$  αντιστοιχεί στα  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης σε 10  $\mu\text{L}$  απομονωμένων λεμφοκυττάρων.

Έτσι,

$$F(x)=0,023x-0,0022 \Leftrightarrow$$

$$0,178=0,023x-0,0022 \Leftrightarrow$$

$$x=(0,178+0,0022)/0,023 \Leftrightarrow$$

$$x=7,83 \mu\text{g}$$

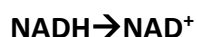
Άρα,

**Σε 10  $\mu\text{L}$  απομονωμένων λεμφοκυττάρων του Σ1 υπήρχαν 7,83  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης**

Με εφαρμογή της απλής μεθόδου των τριών υπολογίζουμε ότι 70  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης υπάρχουν σε **89,39  $\mu\text{L}$**  απομονωμένων λεμφοκυττάρων του Σ1.

## **2.4 Πρωτόκολλο Μέτρησης Δραστικότητας Οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q**

Η ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά και πιο συγκεκριμένα η μέθοδος βασίστηκε στην παρακολούθηση της μείωσης της συγκέντρωσης του NADH, καθώς αυτό οξειδώνεται τόσο από το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας, όσο και από άλλα ένζυμα, τα οποία το χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα. Το NADH απορροφά στα 340 nm σε λάμπα UV.



### Υλικά:

- Απομονωμένα λεμφοκύτταρα ασθενών, τα οποία έχουν υποστεί λύση με την μέθοδο ψύξης-απόψυξης, που περιγράφηκε προηγουμένως, σε κατάλληλη ποσότητα σε  $\mu\text{L}$ , στην οποία περιέχονται 70  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4 υδατικό stock 0.1M
- BSA υδατικό stock 2%
- $\text{MgCl}_2$  υδατικό stock 0,5M
- KCN υδατικό stock 1M φρέσκο κάθε φορά
- Αντιμυκίνη-α, stock 3mM
- NADH υδατικό stock 5,7mM 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 1,5 mL

- Eppendorf του 1,5 mL
- Πιπέτες Pasteur

#### Αρχή της μεθόδου

Το τέταρτο στάδιο του πειράματος βασίζεται σε δύο δεδομένα:

1. Το Σύμπλοκο I οξειδώνει το NADH σε NAD<sup>+</sup>
2. Η ροτενόνη αναστέλλει το Σύμπλοκο I

Το Σύμπλοκο I γνωστό και ως οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH στο συνένζυμο Q10, οξειδώνοντας έτσι το NADH σε NAD<sup>+</sup>. Το NADH σε αντίθεση με το NAD<sup>+</sup>, απορροφά στα 340nm. Έτσι, ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η απορρόφηση αντιπροσωπεύει και την μείωση του NADH με τον χρόνο και κατ'επέκταση τον ρυθμό με τον οποίο το NADH οξειδώνεται. Με την χρήση του τύπου [1] μπορούμε να υπολογίσουμε την **ενζυμική δραστηριότητα** κάθε δείγματος:

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

Όπου :

- $\Delta a \rightarrow$  Διαφορά στην τιμή της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα  $t$
- $Vt \rightarrow$  Τελικός όγκος της αντίδρασης (mL)
- $t \rightarrow$  χρόνος (min)
- $\epsilon \rightarrow$  Συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ( $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )
- $b \rightarrow$  Μήκος της οπτικής διαδρομής (cm)

Εν συνεχεία, με την χρήση του τύπου [2] μπορούμε να υπολογίσουμε την **ειδική δραστηριότητα (Specific Activity, SA)** του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

$$\text{Ειδική δραστηριότητα} = \text{Ενζυμική ενεργότητα} / 70 \times 10^{-3} \text{ mg πρωτεΐνης nmol/min*mg [2]}$$

Με την χρήση των παραπάνω τύπων είναι δυνατός ο υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας του συνόλου των ενζύμων που οξειδώνουν το NADH, συμπεριλαμβανομένου και του Συμπλόκου I. Ωστόσο, το πείραμα αυτό στοχεύει στον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας αποκλειστικά του Συμπλόκου I. Για τον λόγο αυτό χρειάζεται να προστεθεί ένα επιπλέον βήμα στο πρωτόκολλο, το οποίο το εξειδικεύει ως προς το Σύμπλοκο I.

Πιο συγκεκριμένα, η τροποποίηση του πρωτοκόλλο περιλαμβάνει την προσθήκη της ροτενόνης, η οποία είναι μια ισοφλαβόνη, που αναστέλλει την λειτουργία του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι για κάθε δείγμα απομονωμένων λεμφοκυττάρων προκύπτει η εξής διαφορά:

### Ειδική Δραστικότητα (Rot<sup>-</sup>) - Ειδική Δραστικότητα (Rot<sup>+</sup>)

Από την παραπάνω σχέση είναι εφικτός ο υπολογισμός της Ειδικής Δραστικότητας του Συμπλόκου I. Στα δείγματα που δεν περιέχουν ροτενόνη, η ποσότητα της αντικαθίσταται από DMSO. Το CoQ1 είναι ανάλογο του ενδογενούς CoQ<sub>10</sub>, και χρησιμοποιείται ως εξωγενής δεκτης ηλεκτρονίων, λόγω της υψηλής υδροφοβικότητάς του.

#### Προετοιμασία διαλυμάτων:

Για κάθε δείγμα, θα πραγματοποιηθούν δύο μετρήσεις, μία παρουσία ροτενόνης και μία απουσία αυτής. Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης θα είναι 1 mL. Για να πραγματοποιηθεί το τελικό στάδιο του πειράματος απαιτείται η προετοιμασία μια σειρά διαλυμάτων stock. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5), απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αυτών, καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε αντιδραστήριο, αλλά και ο τελικός όγκος. Για τον υπολογισμό των παραπάνω δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι [3] και [4].

$$C=n/V [3] \quad \text{και} \quad n=m/Mr [4]$$

Αντιδραστήριο	Συγκεντρώσεις Stock	Ποσότητα Αντιδραστηρίου	Όγκος Stock
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4	0.1 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M → 80,2 mL KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> → 19,8 mL	100 mL
BSA	2%	0,2 gr	10 mL
MgCl <sub>2</sub>	0,5 M	4,76 gr	100 ml
KCN	1 M	0,065 gr	1 mL
Αντιμυκίνη-α	3 mM	0,0164 gr	10 mL
NADH	5,7 mM	0,004 gr	1 mL
Ροτενόνη/DMSO	0,36 mM	0,0014 gr	10 mL
CoQ1	2 mM	0,002 gr	4 mL

Πίνακας 5: Παρασκευή διαλυμάτων Stock

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα pre-mix, το οποίο αποτελείται από τα:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
BSA
MgCl <sub>2</sub>
KCN
Αντιμυκίνη-α

Τα υπόλοιπα διαλύματα που αναγράφονται στον πίνακα 5, προστίθενται στην συνέχεια. Στον πίνακα 6 που ακολουθεί φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε διαλύματος και οι όγκοι που λαμβάνονται από το καθένα.

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Τελική Συγκέντρωση</b>	<b>Ποσότητα από διάλυμα Stock</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4	20 mM	200 μL
BSA	0,2%	100 μL
MgCl <sub>2</sub>	4 mM	8 μL
KCN	1,7 mM	1,7 μL
Αντιμυκίνη-α	3 μM	1 μL
NADH	200 μM	35,1 μL
Ροτενόνη/DMSO	15 μM	7,5 μL
CoQ1	100 μM	50 μL
Δείγμα + νερό	-	100 μL
Νερό	-	496,7 μL

Πίνακας 6: Τελικές συγκεντρώσεις και οι όγκοι που απαιτούνται από κάθε διάλυμα stock και ο όγκος δείγματος και νερού.

#### *Πειραματική Διαδικασία*

- Το πρώτο βήμα πριν από την έναρξη του πειράματος είναι ο υπολογισμός του όγκου σε μL, που απαιτείται από κάθε δείγμα, ώστε να περιέχονται σε αυτή την ποσότητα 70 μg πρωτεΐνης.
- Στην συνέχεια, σε σωλήνα falcon των 15 mL παρασκευάζεται το pre-mix με ανάμιξη των όγκων που φαίνονται στον πίνακα 6. Επειδή ο τελικός όγκος του κάθε διαλύματος θέλουμε να είναι 1 mL και δεδομένου του ότι ο όγκος όλων των αντιδραστηρίων μαζί με την ποσότητα του δείγματος είναι 503,3 δειχνει ο πίνακας προκύπτει ότι πρέπει να προστεθούν 496,7 μL νερό. Ανάλογα με τον αριθμό των μετρήσεων που θα πραγματοποιηθούν, παρασκευάζεται και ανάλογος όγκος pre-mix. Δηλαδή για κάθε δείγμα απαιτούνται δύο μετρήσεις, μια παρουσία ροτενόνης και μία απουσία αυτής. Οπότε, ανάλογος θα είναι και ο όγκος του pre-mix που θα παρασκευαστεί.
- Για κάθε δείγμα απομονωμένων λεμφοκυττάρων, χρησιμοποιούμε δύο Eppendorf (Rot<sup>+</sup>, Rot<sup>-</sup>). Στο κάθε σωληνάκι προσθέτουμε 310,7 μL pre-mix.
- Αφού προσθέσουμε την ποσότητα του pre-mix, προσθέτουμε τα 496,7 μL νερό και την αντίστοιχη ποσότητα δείγματος και νερού, η οποία αθροιστικά



θα πρέπει να ισούται με 100  $\mu\text{L}$ . Για παράδειγμα, εάν σε ένα δείγμα έχει υπολογιστεί ότι απαιτείται ποσότητα 45  $\mu\text{L}$ , θα πρέπει να συμπληρωθούν άλλα 65  $\mu\text{L}$  νερού επιπλέον της ποσότητας των 496,7  $\mu\text{L}$  που έχουν ήδη προστεθεί.

- Εν συνεχεία, προσθέτουμε την ποσότητα της ροτενόνης ( $\text{Rot}^+$ ) και του DMSO ( $\text{Rot}^-$ ) αντίστοιχα, η οποία ισούται με 7,5  $\mu\text{L}$ .
- Τέλος προσθέτουμε σε όλα τα σωληνάκια 35,1  $\mu\text{L}$  NADH.
- Αφήνουμε τα Erpendorf στο υδατόλουτρο στους 37 °C για 1 λεπτό, ώστε να γίνει η προσομοίωση του φυσιολογικού περιβάλλοντος του ενζύμου.
- Ρυθμίζουμε το φωτόμετρο στα 340 nm και ενεργοποιούμε την λάμπα UV, καθώς επίσης μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα.
- Αφού τοποθετήσουμε το περιεχόμενο κάθε σωληνακίου στην κυψελίδα χαλαζία, προσθέτουμε 50  $\mu\text{L}$  CoQ1, αναδεύουμε με την πιπέτα.
- Τοποθετούμε την κυψελίδα με το δείγμα και το συνένζυμο στο φωτόμετρο και ξεκινάμε να λαμβάνουμε μετρήσεις απορρόφησης ξεκινώντας από την χρονική στιγμή 0 και κάθε 15 δευτερόλεπτα, για 5 λεπτά.
- Με την χρήση των τύπων [1] και [2] υπολογίζουμε την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I, για κάθε δείγμα.

### 3. Αποτελέσματα

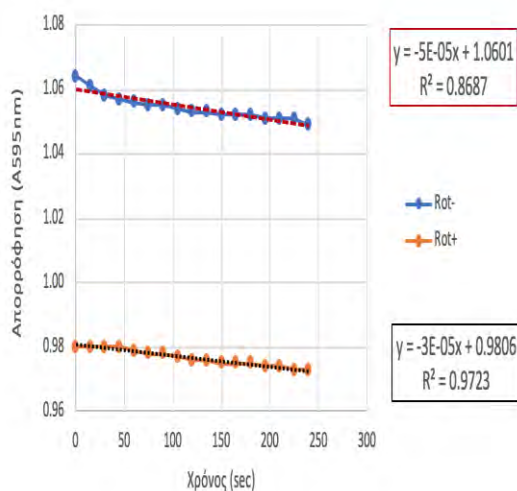
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την κινητική της οξείδωσης του NADH, για το χρονικό διάστημα των 5 λεπτών κατά το οποίο λαμβάναμε απορροφήσεις ανά 15". Εν συνεχεία, με την χρήση των τύπων [1] και [2] που αναγράφονται παραπάνω υπολογίζεται η ενζυμική δραστικότητα των Rot<sup>+</sup> και των Rot<sup>-</sup> μετρήσεων και τελικά η ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα.

#### 3.1 Κινητικότητα Οξείδωσης του NADH

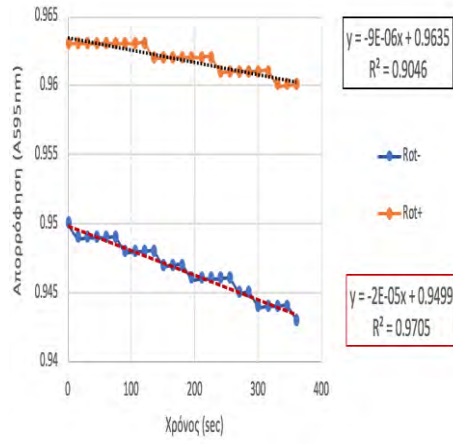
Διαγράμματα με την κινητική οξείδωσης του NADH:

Κινητικότητα Οξείδωσης του NADH

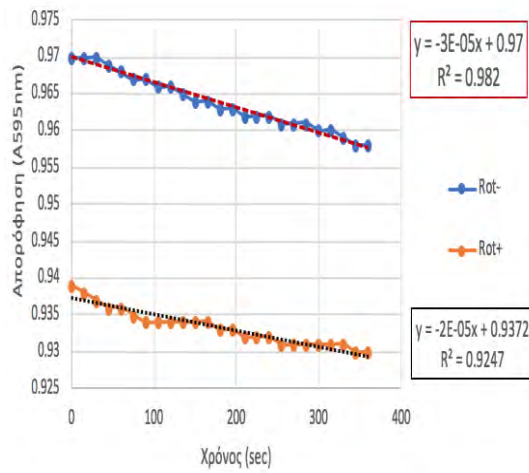
ΠΙ



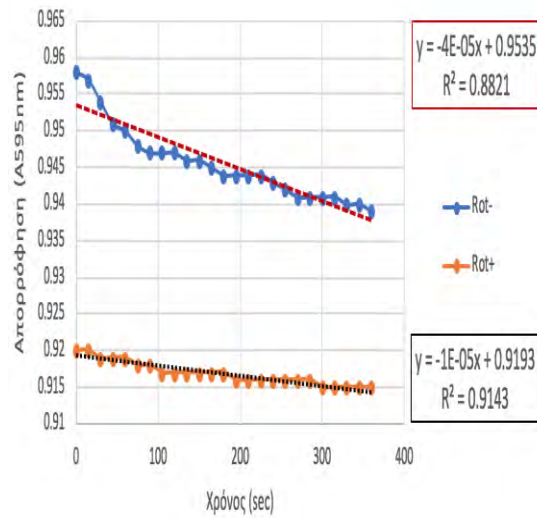
## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π2



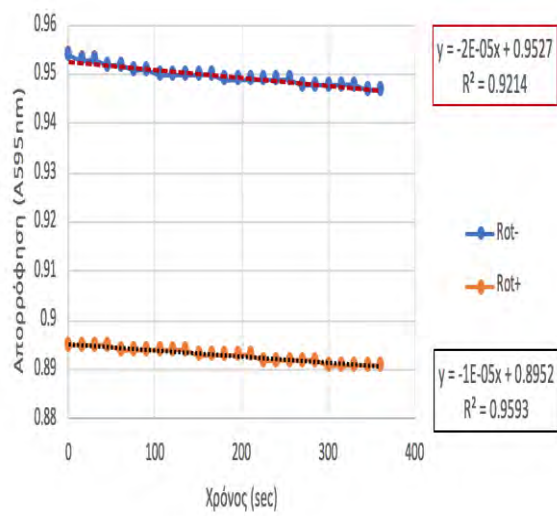
## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π3



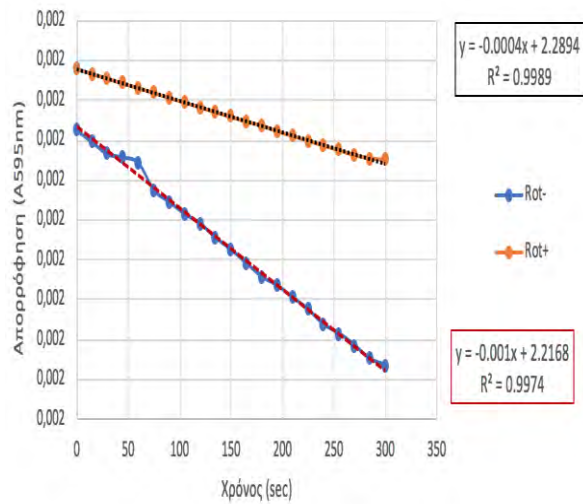
## Κινητική Οξειδωσης του NADH Π4



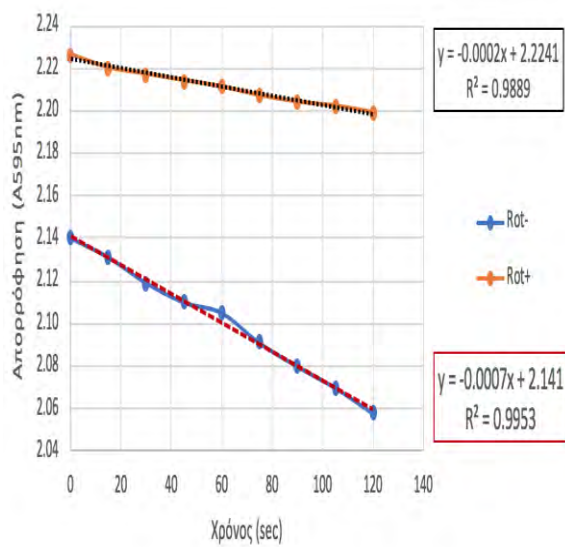
## Κινητική Οξειδωσης του NADH Π5



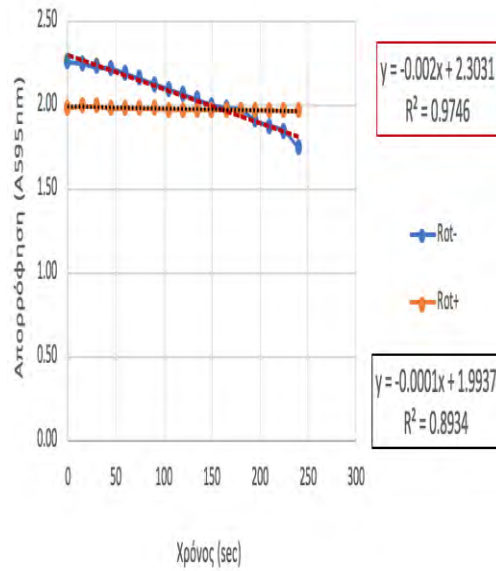
## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π6



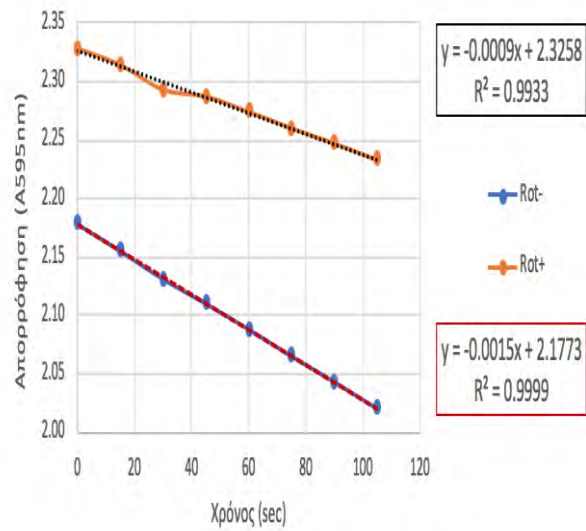
## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π7



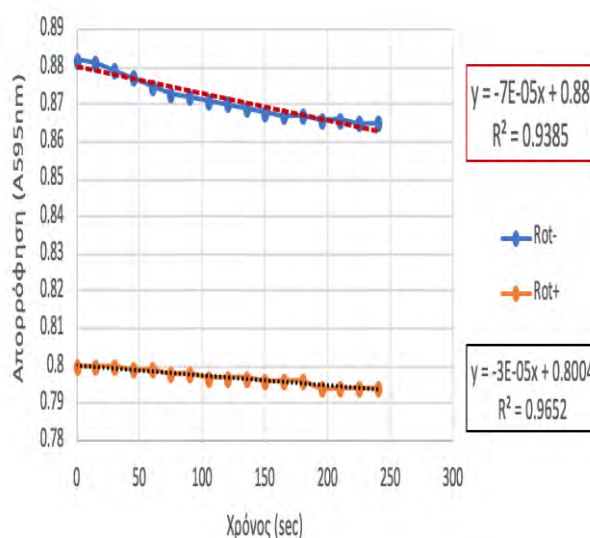
## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π8



## Κινητική Οξείδωσης του NADH Π9



## Κινητική Οξειδωσης του NADH Π10



### 3.2 Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα της Οξειδοαναγωγής του Ζεύγους NADH-Q

Με την χρήση των τύπων [1] και [2] και με τα δεδομένα που λάβαμε από την φωτομέτρηση, υπολογίσαμε την ενζυμική δραστικότητα του δείγματος παρουσία και απουσία ροτενόνης και τελικά την ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Specific Activity (Rot <sup>-</sup> )	Specific Activity (Rot <sup>+</sup> )	Total Specific Activity of Complex I
nmol/min*mg πρωτεΐνης					
Π1	Θ	64	8,5	4	4,5
Π2	Α	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
<b>M.O.</b>			<b>57,13</b>	<b>23,65</b>	<b>33,48</b>

**Πίνακας 7:** Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα του Συμπλόκου I σε δείγματα ατόμων με σαρκείδωση.

### 3.3 Σύγκριση των Τιμών Δραστικότητας με Αποτελέσματα Προηγούμενων Ερευνών

Το εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας διεξήγαγε στο παρελθόν πείραμα μέτρησης ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας σε ασθενείς με σαρκείδωση αλλά και σε υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Δείγμα	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
<b>ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ</b>	<b>25,4</b>

**Πίνακας 8:** Τιμές ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I ασθενών με σαρκοείδωση, από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου.

<b>ΜΕΛΕΤΗ</b>	<b>ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ</b>
2020	33,48
Αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών	25,4

**Πίνακας 9:** Σύγκριση του μέσου όρου των τιμών δραστηριότητας από την παρούσα έρευνα και από προηγούμενα πειράματα.

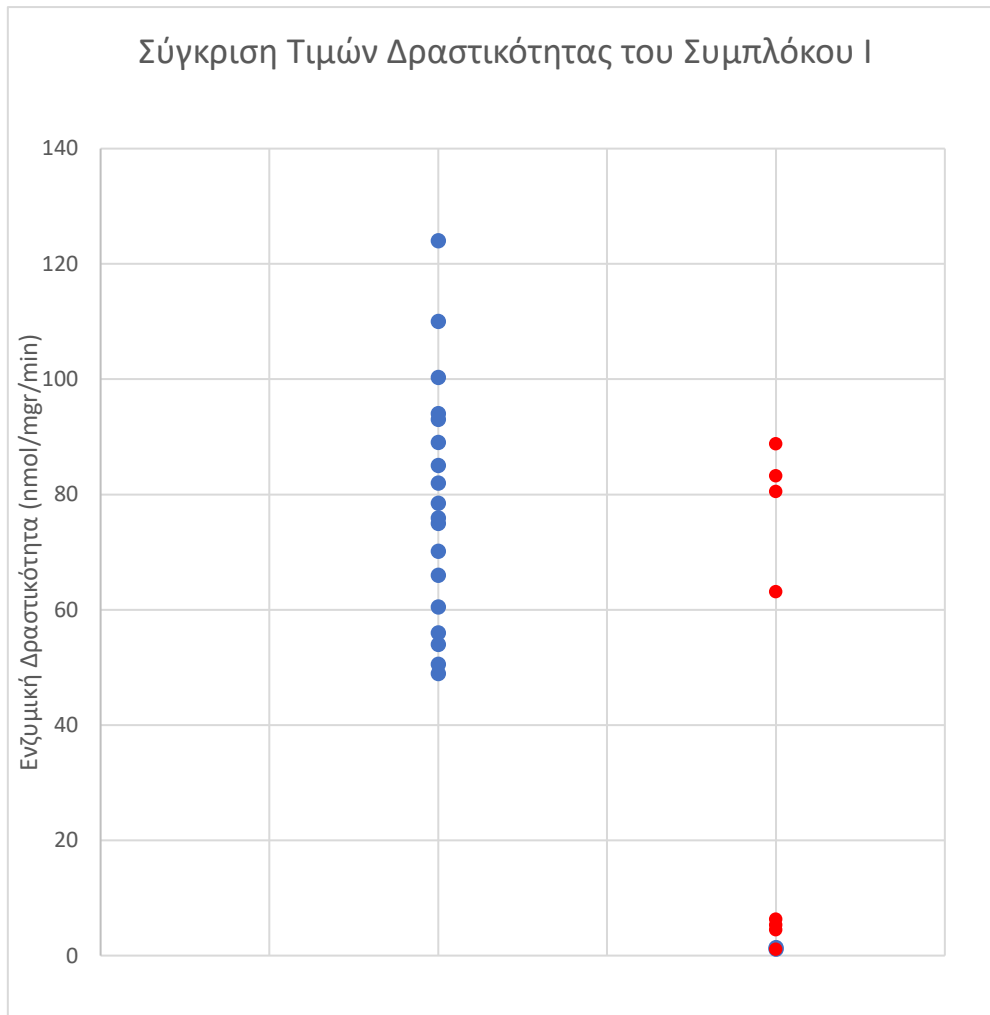
### **3.4 Σύγκριση των Τιμών Δραστηριότητας Ατόμων με Σαρκοείδωση και Ατόμων Control**

Στον πίνακα 10 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I από δείγματα αίματος control.

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>	<b>Total S.A. of Complex I (nmol/min/mg πρωτεΐνη)</b>
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
<b>ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ</b>		<b>78,48</b>

**Πίνακας 10:** Τιμές ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου υγιών ατόμων, από προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου.



**Διάγραμμα 2:** Σύγκριση των τιμών της ειδικής ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας μεταξύ ασθενών με σαρκοείδωση και υγιών ατόμων. Τα δεδομένα του γραφήματος προέρχονται και από την τωρινή, αλλά και από προηγούμενες έρευνες.

<b>Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα (nmol/min*mg)</b>	<b>Control</b>	<b>Σαρκοείδωση</b>
<b>Μ.Ο.</b>	<b>78,48</b>	<b>33,48</b>
<b>Τυπική Απόκλιση</b>	<b>78,48 ± 20,9</b>	<b>33,48 ± 37,53</b>

**Πίνακας 11:** Μ.Ο. και τυπικές αποκλίσεις των τιμών της Ειδικής Ενζυμικής Δραστικότητας ατόμων Control και ατόμων με σαρκοείδωση.

#### 4. Συμπεράσματα / Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία στόχος ήταν η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου Οξειδοαναγωγή του Ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων. Η αιτιολογία της συγκεκριμένης ασθένειας δεν είναι πλήρως καθορισμένη, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις και από προηγούμενες έρευνες, οι οποίες υποστηρίζουν την υπόθεση, ότι πρόκειται για μια ασθένεια μιτοχονδριακής προέλευσης.

Το όλο πείραμα διεξήχθη σε μιτοχόνδρια, τα οποία απομονώθηκαν με λύση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών.

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά, μετρώντας την οξείδωση του NADH σε NAD<sup>+</sup>, παρουσία και απουσία ροτενόνης. Η ροτενόνη είναι μια ισοφλαβόνη, η οποία αναστέλλει την δράση του Συμπλόκου I. Έτσι, η διαφορά των τιμών που λαμβάνεται απουσία μείον παρουσία ροτενόνης, αντιστοιχεί στην ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I.

Οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I των ατόμων με σαρκοείδωση, συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές υγιών ατόμων. Εκ πρώτης όψεως πράγματι, ο μέσος όρος των τιμών της Ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας ατόμων με σαρκοείδωση (33,48 nmol/min/mg) είναι μειωμένη έναντι του μέσου όρου των Ειδικών ενζυμικών δραστηριοτήτων υγιών ατόμων (78,48 nmol/min/mg).

Συνεπώς, σαν ένα πρώτο συμπέρασμα θα μπορούσαμε να πούμε σίγουρα ότι τα άτομα με σαρκοείδωση εμφανίζουν μια σημαντική μείωση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα.

Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς Π1, Π2, Π3, Π4, Π5 και Π10, εμφάνισαν πολύ μικρή τιμή ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας (4,5, 1,4, 1,1, 5,3, 1,1, 6,3 nmol/min/mgr αντίστοιχα). Ο μέσος όρος ηλικίας των ατόμων αυτών είναι περίπου τα 63 έτη. Πρόκειται, λοιπόν για άτομα σχετικά μεγάλης ηλικίας. Έχει φανεί ότι η γήρανση ενός ατόμου επέρχεται και μείωση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων του (Petersen et al., 2003). Έχουν σημειωθεί, παράλληλα, μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, οι οποίες σχετίζονται με την γήρανση και με διάφορες ασθένειες (Daniel C. Zank et al. 2018).

Επομένως, η μειωμένη ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας των παραπάνω ασθενών θα μπορούσε να οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων.

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται σημαντικοί διαμεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η σαρκοείδωση είναι μια ασθένεια μιτοχονδριακής προέλευσης. Αυτό συμβαίνει καθώς:

- i. Τμήματα μιτοχονδριακού γονιδιώματος, τα οποία ονομάζονται mt-DNA DAMPs, απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία μετά από ένδειξη μόλυνσης. Αυτά όταν εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, στον εξωκυττάριο

χώρο ή γενικά στην συστηματική κυκλοφορία προάγουν προ-φλεγμονώση απόκριση (Koutsokera A. Et al., 2009).

- ii. Η δυσλειτουργία του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, σχετίζεται με το πιο μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων ROS (Culver DA. Et al., 2004).
- iii. Μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο μιτοχονδριακό DNA ατόμων με σαρκοείδωση (Daniil Z. et al., 2018).

Οι συνήθεις θεραπείες για τις μιτοχονδριακές ασθένειες σχετίζονται κυρίως με την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων τους. Βέβαια, τα τελευταία χρόνια, καθώς κατανοείται ο μηχανισμός τους όλο και περισσότερο, παρατηρείται μια βελτίωση στον τομέα αυτό, καθώς, πλέον οι θεραπείες τείνουν να είναι πιο στοχευμένες. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την συγκεκριμένη, αλλά και από προηγούμενες εργασίες καταστούν φανερό το γεγονός ότι υπάρχει ιδιαίτερα αυξημένη περίπτωση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, πίσω από την παθολογία της σαρκοείδωσης. Πιο συγκεκριμένα, το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας σε άτομα με σαρκοείδωση υπολειτουργεί, συγκριτικά με το αντίστοιχο ένζυμο σε υγιή άτομα, όπως προκύπτει από τις τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I που λήφθηκαν.

Κλείνοντας, σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η μιτοχονδριακή προέλευση της σαρκοείδωσης, χρειάζεται περισσότερα στοιχεία, για να υποστηριχθεί. Σε επόμενες έρευνες, θα μπορούσαν να ελεγχθούν τα επίπεδα του οξειδωτικού stress, προσδιορίζοντας τον αριθμό των ROS, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, αλλά και η εμπλοκή του Συμπλόκου I στην παθογένεια της νόσου.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Audi SH., Bongard RB., et al., Yan K., et al., Depleted energy charge and increased pulmonary endothelial permeability induced by mitochondrial complex I inhibition are mitigated by coenzyme Q1 in the isolated perfused rat lung, . *Free Radic Biol Med*, 1455-1463 (2013).

AntonySmith R., Gopalan V., Sajani K.et al., Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis, *Biochimie*, 164-172 (2017).

Antje Prasse, The Diagnosis, Differential Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis, *Dtsch Arztebl Int*, 565-574 (2016).

Antoniou K., Daniil Z., Koutsiou OS., Grammatikopoulos A., Peletidou S. Gkika H., Malli F., Vasarm;idi E., Mamuris Z., Gourgoulialis K., Zifa E. , Detection of mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA) gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis, *Mitochondrion*, 43-52 (2018),

Baumgardt S., Bongard RD., Gonzalez FJ., et al., Coenzyme Q1 as a probe for mitochondrial complex I activity in the intact perfused hyperoxia-exposed wild-type and Nqo1-null mouse lung, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302(9): L949–L958 (2012).

Becker T and Grevel A , Porins as helpers in mitochondrial protein translocation, *Biol Chem*, 699-708 (2019).

Beijer E., Moller DR., Veltkamp M., Etiology and Immunopathogenesis of Sarcoidosis: Novel Insights, *Semin Respir Crit Care Med*, 404-416 (2017).

Bruder D. and Sakthivel P., Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis, *Current Opinion in Hematology*, 24(1), 59–65 (2017).

Crapo JD and Freeman BA, Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab Invest*, 412-426 (1982).

Crowson CS., Matteson EL., Ungprasert P., Epidemiology and Clinical Characteristics of Sarcoidosis: An Update from a Population-Based Cohort Study from Olmsted County, Minnesota, *Reumatismo*, 16-22 (2017).

Crouser ED. And Le V., Potential Immunotherapies for Sarcoidosis (2018), doi: 10.1080/14712598.2018.1427727.

Devlin, Thomas M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley, 6<sup>th</sup> edition (2006).

Elena Bargagli and Antje Prasse, Sarcoidosis: a review for the internist (2018).

Hemachandra P, Kandimalla R, Manczak M, Yin X, Mitochondrial division inhibitor 1 reduces dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission activity, *Hum Mol Genet*, 177-199 (2019).

Hirst J. and Kussmaul L., The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria, *Proc Natl Acad Sci USA*, 7607-7612 (2006).

Hroudová J. and Ľupták M., Important role of mitochondria and the effect of mood stabilizers on mitochondrial function., *Physiol Res*, S3-S15 (2019).

Hayashi JI., Kaorilshikawa H., et al., Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging, *Genetics & Development*, 63-67 (2016).

Kasumov EA., Kasumov RE., Kasumov IV, A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective (2014).

Korsten P., Mirsaeidi M, and Sweissa NJ., Nonsteroidal therapy of sarcoidosis, *Curr Opin Pulm Med*, 516-523 (2013).

Lerman A., Ozay EM., Et al., Rotenone Treatment Reveals a Role for Electron Transport Complex I in the Subcellular Localization of Key Transcriptional Regulators During T Helper Cell Differentiation (2018) doi: 10.3389/fimmu.2018.01284.

Liu, Michael T., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in lung disease, *Journal of Translation Medicine*, 15:207 (2017).

Liu Y. and Schubert DR., The specificity of neuroprotection by antioxidants (2009).

Murphy MP, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J.*, 1-13 (2019).

Matteson EL., Ryu JH., Ungprasert P., Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis, *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*, 358-375 (2019).

Patterson K., Chen, Edward S., The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implication for Treatment, *Recent Advances in Chest Medicine*, 1432-1442 (2018).

Roque W, Cuevas-Mora K, Romero F, Mitochondrial Quality Control in Age-Related Pulmonary Fibrosis, *Int J Mol Sci* 21:643 (2020).

Vanhouwaert R., Wang X., et al., Surveillance and transportation of mitochondria in neurons, 87-93 (2019).

Wilson DF, Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism, J Physiol, 7023-7038 (2017).

Wilson DF., Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism (2017).

Yasmine J.Liu et al., Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease, 111-220 (2020).