



## **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πτυχιακή εργασία για το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Μέτρηση Ειδικής Δραστικότητας (U/g) Οξειδοαναγωγάσης του Ζεύγους  
NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε Λεμφοκύτταρα Ασθενών με Πνευμονική Ίνωση**

**Ονοματεπώνυμο: Βογιατζή Ευαγγελία**

**Πατρώνυμο: Ευστράτιος**



**Λάρισα, 2020**



## **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πτυχιακή εργασία για το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Assessment of NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) activity  
in lymphocytes of patients with pulmonary fibrosis**

**Όνοματεπώνυμο: Βογιατζή Ευαγγελία**

**Πατρώνυμο: Ευστράτιος**



**Λάρισα, 2020**

**Μέτρηση Ειδικής Δραστηκότητας (U/g) Οξειδωαναγωγάσης του Ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε Λεμφοκύτταρα Ασθενών με Πνευμονική Ίνωση**

**Assessment of NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) activity in lymphocytes of patients with pulmonary fibrosis**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Επίκουρος καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ	Αναπληρώτρια καθηγήτρια Πνευμονολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 στην Λάρισα. Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε κάτω από την επίβλεψη της κυρίας Αιμιλίας Ζίφα, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα για την ανάθεση του θέματος, τον χρόνο που αφιέρωσε, την συνεχή συμπαράσταση και την συνεχή της βοήθεια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ζωή Δανιήλ για την συνεργασία της και την βοήθεια της στην παρούσα εργασία, καθώς και την κυρία Σαραφίδου που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην συνάδελφο μου Ζωή Φουρτούνη για άψογη συνεργασία και την υποστήριξή της στο πλαίσιο της διπλωματικής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....</b>	<b>9</b>
Προέλευση μιτοχονδρίων.....	9
Δομή μιτοχονδρίων.....	9-10
Λειτουργία μιτοχονδρίων.....	10
Μιτοχόνδρια και μεταλλάξεις.....	10-11
<b>1.2 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΉ ΑΛΥΣΙΔΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ .....</b>	<b>11</b>
Κυτταρική αναπνοή.....	11-12
Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	12-13
Οξειδωτικό στρές και παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS).....	13-14
<b>1.3 ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΖΕΥΓΟΥΣ NADH-Q.....</b>	<b>14</b>
Δομή της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q.....	14
Λειτουργία του Συμπλόκου I.....	14
<b>1.4 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....</b>	<b>15</b>
Συμπτώματα.....	15
Διάγνωση.....	15-16
Αιτιολογία.....	16
Παθοφυσιολογία.....	16-18
Μηχανισμός παθογένεση.....	18-19
Θεραπεία.....	19
Μιτοχόνδρια και πνευμονική ίνωση.....	19-20
<b>1.5 ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>21</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>23-25</b>
<b>2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ.....</b>	<b>26-28</b>
<b>2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....</b>	<b>29-32</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>33-37</b>
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>37</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>37-38</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο με τη μορφή ATP. Πολλές πνευμονικές ασθένειες οφείλονται σε ανεπαρκή λειτουργία των μιτοχονδρίων είτε λόγω συσσώρευσης ROS, είτε εξαιτίας πρόκλησης μεταλλάξεων που συμβαίνουν σε γονίδια μιτοχονδριακού DNA. Η πνευμονική ίνωση είναι μία νόσος που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη μετάπτωση επιθηλίου σε μεσέγχυμα. Αυτό οδηγεί σε εμφάνιση δομής «κηρήθρας». Το πνευμονικό οξειδωτικό στρες και η ανεπαρκής λειτουργία των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας οδηγούν σε αυξημένες ποσότητες ROS που ενισχύουν τα συμπτώματα της φλεγμονής στην πνευμονική ίνωση. Στην συγκεκριμένη έρευνα μελετήσαμε την ενζυμική δραστικότητα της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε λεμφοκύτταρα ατόμων που πάσχουν από την ασθένεια καθώς και σε υγιή άτομα. Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας στο Σύμπλοκο I, έγινε με προσδιορισμό της οξειδωσης του NADH από το Σύμπλοκο I, αντίδραση η οποία αναστέλλεται από τη ροτενόνη. Η ενζυμική δραστικότητα, του προς μελέτη ενζύμου μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά.

## **ABSTRACT**

Mitochondria are semi-autonomous organelles with main role, the production of energy in the cell in the form of ATP. Many pneumococcal diseases are caused by insufficient mitochondrial functions such as accumulation of ROS or mutations in mitochondrial genes. Pulmonary fibrosis is a disease characterized by an abnormal transition of the epithelium to the mesenchyme. That leads to an appearance of a "honeycomb" structure. Pulmonary oxidative stress and insufficient function of respiratory chain complexes lead to increased amounts of ROS that amplify the symptoms of inflammation in pulmonary fibrosis. In this study we tested the enzymatic activity of respiratory complex I in lymphocytes of patients with the disease as well as in healthy individuals. The determination of the enzymatic activity in Complex I was determined by the oxidation of NADH by Complex I, a reaction which is inhibited by rotenone. The enzymatic activity of the enzyme in our study, was measured spectrophotometrically.



## 1.1 Μιτοχόνδρια

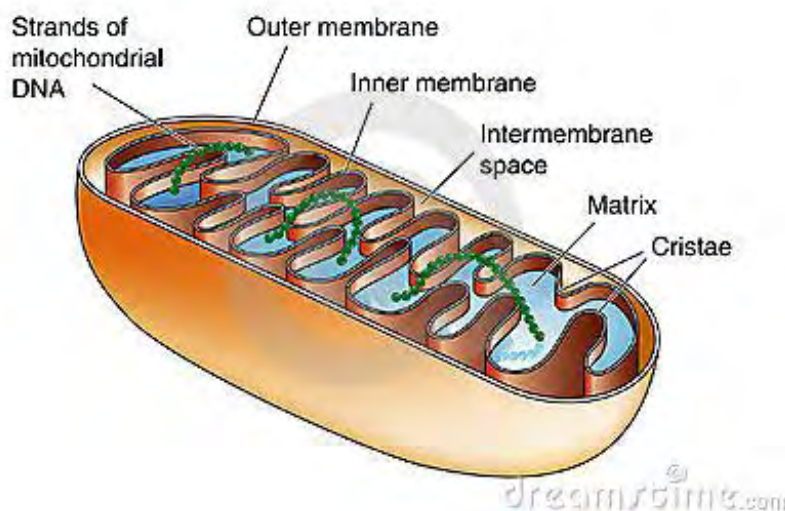
Το μιτοχόνδριο είναι κυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Μιτοχόνδρια απαντούν μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποκαλούνται συχνά «εργοστάσια του κυττάρου», επειδή τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) (Tilokani et al., 2018)

### *Προέλευση και γενετικό υλικό μιτοχονδρίων*

Σχετικά με την προέλευση των μιτοχονδρίων, υποστηρίζεται ότι προέρχονται από προκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς, οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα που έκαναν ζύμωση, συμβιώνοντας με αυτά (Martinet al., 2015). Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό, το οποίο υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Το DNA τους είναι κυκλικό και διαθέτει έναν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια. Κωδικοποιεί όμως, μόνο ένα μικρό υποσύνολο των πρωτεϊνών που χρειάζεται το μιτοχόνδριο καθώς πολλές απαραίτητες για το μιτοχόνδριο πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Τα μιτοχονδριακά γονίδια κατηγοριοποιούνται σε 3 τάξεις: rRNA γονίδια, tRNA γονίδια και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες («πρωτεϊνικά γονίδια»). Τα γονίδια για συγκεκριμένα συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) πρέπει να διατηρούνται στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα για να επιτρέπεται η ταχεία ρύθμιση των γονιδιακών εκφράσεων των συστατικών του ETC (Roger et al., 2017). Το μιτοχονδριακό DNA κάθε οργανισμού είναι μητρικής προέλευσης και για τον λόγο αυτό μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA της μητέρας κληρονομούνται πάντα από τους απογόνους (Kramer and Bressan, 2017)

### *Δομή*

Τα μιτοχόνδρια έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μια μεγάλων διαστάσεων εσωτερική μεμβράνη με πτυχώσεις που ονομάζονται ακρολοφίες (Lee and Min, 2018). Αποτέλεσμα της ύπαρξης αυτών των δύο μεμβρανών είναι ο διαχωρισμός του μιτοχονδρίου σε δύο διακριτά διαμερίσματα. **1)** Ο διαμεμβρανικός χώρος που πληρούται με υγρό το οποίο χρησιμεύει στην επικοινωνία των δύο μεμβρανών. **2)** Τη μήτρα, που είναι ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Πορίνες εντοπίζονται στην λεία εξωτερική μεμβράνη, πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην μεταφορά μεγαλομοριακών ουσιών. Αντίθετα μόνο ορισμένες ουσίες μπορούν να διαπεράσουν την εσωτερική μεμβράνη. Η εσωτερική μεμβράνη φέρει οξυσώματα τα οποία αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία συμμετέχουν στην κυτταρική αναπνοή και την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Tilokani et al., 2018)



**Εικόνα 1.** Δομή του μιτοχονδρίου (<https://mde.biologia.gr/ferma/page/3/>)

### *Λειτουργία*

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση (Tilokani et al., 2018). Επειδή δίνουν 30 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης σε αντίθεση με τα 2 μόρια ATP που παράγονται από τη γλυκόλυση, τα μιτοχόνδρια είναι βασικά σε όλους τους ανώτερους οργανισμούς για τη διατήρηση της ζωής. Για την σύνθεση ATP όμως είναι απαραίτητο το  $Ca^{2+}$  αποτελώντας ρυθμιστή της διαδικασίας, άρα τα μιτοχόνδρια λειτουργούν και ως αποθήκες ασβεστίου (Tarasova et al., 2012). Η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ATP διαφέρει τόσο μεταξύ οργανισμών όσο και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών ιστών. Κατά συνέπεια, παραπάνω μιτοχόνδρια εμφανίζονται κυρίως σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και οξυγόνο όπως μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.

### *Μιτοχόνδρια και μεταλλάξεις*

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες είναι γενετικές διαταραχές που υπάρχουν στο μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA) ή στο πυρηνικό DNA που κωδικοποιεί τα μιτοχονδριακά συστατικά (Alston et al., 2016). Μικρά προβλήματα με οποιοδήποτε από τα πολυάριθμα ένζυμα που χρησιμοποιούνται από τα μιτοχόνδρια μπορεί να είναι ολέθρια για το κύτταρο και με τη σειρά του για τον οργανισμό. Επειδή σε κάθε κυτταρικό τύπο υπάρχει ετερογένεια μιτοχονδρίων, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται ετεροπλάσμια τα άτομα με μεταλλάξεις στο mt-DNA έχουν σε κάθε ιστόμια μίξη αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων. Μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό DNA μπορεί να αλλάξει πρωτεΐνες που ρυθμίζουν (με αύξηση ή μείωση) την παραγωγή μιας άλλης συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια ή στο κυτταρόπλασμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ελαφριά, εάν υπάρχουν, εμφανή συμπτώματα. Εξάλλου, κάποιες

καταστροφικές μεταλλάξεις του mt-DNA είναι εύκολο να διαγνωστούν λόγω της εκτεταμένης βλάβης σε μυϊκούς και νευρικούς ιστούς (μεταξύ άλλων ιστών υψηλής ενέργειας και εξαρτώμενων από τον μεταβολισμό) επειδή υπάρχουν στη μητέρα και σε όλους τους απογόνους. Μεταλλάξεις του mt-DNA συμπεριλαμβανομένων ελλείψεων, απαιοφές, διπλασιασμούς και σημειακές μεταλλάξεις σε mt-DNA γονίδια, έχουν συσχετισθεί με κοινώς γνωστές διαταραχές όπως οφθαλμοπληγία (PEO) και διαταραχές της πρώιμης παιδικής ηλικίας, όπως το σύνδρομο Alpers-Huttenlocher (AHS), τα ηπατοεγκεφαλικά σύνδρομα, καθώς και διάφορες πνευμονικές ασθένειες όπως ΧΑΠ, άσθμα και πνευμονική ίνωση (Young and Copeland, 2016). Τέλος οι μεταλλάξεις του mt-DNA είναι αποτέλεσμα τριών παραγόντων: του οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής γήρανσης καθώς και διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων.

## 1.2 Αναπνευστική Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων - Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

### *Κυτταρική Αναπνοή*

Κυτταρική αναπνοή χαρακτηρίζεται η καταβολική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα, κατά την οποία πολύπλοκα οργανικά μόρια, κατά σειρά φθίνουσας προτίμησης υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες, οξειδώνονται προκειμένου ν' απελευθερώσουν ενέργεια, η οποία είναι απαραίτητη σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες. Η κυτταρική αναπνοή, είναι ένα από τα τελευταία στάδια του μεταβολισμού των πολυκύτταρων οργανισμών. Ο όρος κυτταρική αναπνοή περιλαμβάνει τόσο τις αερόβιες όσο και τις αναερόβιες διεργασίες. Από τα πρώτα χρόνια, ο όρος χρησιμοποιήθηκε ευρύτατως συνώνυμο της αερόβιας αναπνοής, λόγω της σχέσης που έχει η διεργασία αυτή με την αναπνοή του οργανισμού και την εισπνοή οξυγόνου. Έτσι, όταν χρησιμοποιούμε τον όρο κυτταρική αναπνοή συνήθως αναφερόμαστε στην αερόβια διεργασία (Alston, Rocha et al., 2016).

Η όλη διαδικασία μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά ως εξής:

### **Οργανικές ενώσεις + Οξυγόνο → Διοξείδιο του άνθρακα + Νερό + Ενέργεια**

Η αερόβια κυτταρική αναπνοή περιλαμβάνει 3 στάδια. Από τεχνική άποψη, η κυτταρική αναπνοή περιλαμβάνει μόνο τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Όμως, άτυπα προστίθεται στα στάδια της κυτταρικής αναπνοής η γλυκόλυση, επειδή τα περισσότερα κύτταρα με αναπνοή που αντλούν ενέργεια από το μόριο της γλυκόζης χρησιμοποιούν τη διαδικασία της γλυκόλυσης για να παράξουν τις πρώτες ύλες που χρειάζονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Wilson, 2017).

#### *1<sup>ο</sup> στάδιο: Γλυκόλυση*

Η γλυκόλυση διενεργείται στο κυτταρόπλασμα και ξεκινά τη διεργασία της αποικοδόμησης διασπώντας τη γλυκόζη σε δύο μόρια μιας ένωσης που ονομάζεται πυροσταφυλικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP και καθώς και NADH. Το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-συνένζυμο Α (Acetyl Co-A), NADH και CO<sub>2</sub>.

#### *2<sup>ο</sup> στάδιο: Κύκλος κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs*

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος λαμβάνει χώρα στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων των ευκαρυωτικών κυττάρων (ή στο κυτταρόπλασμα, στην περίπτωση των προκαρυωτών) και ολοκληρώνει τη διάσπαση της γλυκόζης με το να οξειδώνει τα παράγωγα του πυροσταφυλικού προς διοξείδιο του άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα το ακέτυλο-συνένζυμο Α συνδέεται με ένα μόριο οξαλοξικού οξέος με στόχο τον σχηματισμό ενός μορίου κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ οξειδώνεται για την παραγωγή μορίων ATP. Τελικά προϊόντα είναι 2 μόρια CO<sub>2</sub> και ένα μόριο 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 ηλεκτρόνιά τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

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

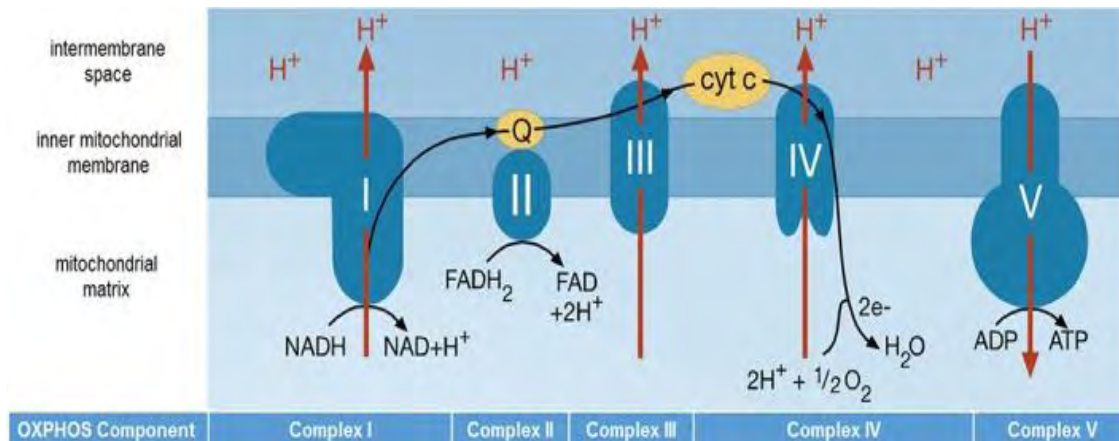
Τα ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH<sub>2</sub>, αντιδρούν με το οξυγόνο για την παραγωγή νερού και ATP.

### *Οξειδωτική Φωσφορυλίωση*

Πρόκειται για συγκεκριμένη βιοχημική διαδικασία των αερόβιων οργανισμών που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου κατά την αερόβια αναπνοή, όπου και σχηματίζονται μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανα φωσφορικά χάρη στην ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την οξείδωση των τροφών. Η αναγωγή του O<sub>2</sub> από το NADH και το FADH<sub>2</sub> είναι μία εξώθερμη διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που λαμβάνουν χώρα σε ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electric Transport Chain, ETC) (Alston et al., 2016). Έπειτα το O<sub>2</sub> ανάγεται σε H<sub>2</sub>O. Πρακτικά ένα ισχυρό αναγωγικό όπως είναι το NADH είναι σε θέση να δώσει e<sup>-</sup> και έχει αρνητικό δυναμικό αναγωγής, ενώ ένα ισχυρό οξειδωτικό αντιδραστήριο όπως το O<sub>2</sub> είναι έτοιμο να δεχθεί e<sup>-</sup> και να έχει θετικό δυναμικό αναγωγής.

Η ροή των ηλεκτρονίων καταλύεται από 4 ένζυμα (Σύμπλοκα) και με τη βοήθεια δύο φορέων, της ουβικινόνης(Q) και του κυτοχρώματος C (CytC) (Ahmad et al., 2020).

1. Οξειδοαναγωγή NADH-Q (Σύμπλοκο I): Οξειδώνει το NADH σύμφωνα με την αντίδραση  $NADH \rightarrow NAD^+ + 2e^- + H^+$ . Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν μεταφέρονται στην ουβικινόνη.
2. Αναγωγή ηλεκτρικού-Q (Σύμπλοκο II): ηλεκτρόνια από το FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται επίσης στην ουβικινόνη.
3. Ουβικινόνη (Συνένζυμο Q): Μεταφέρει e<sup>-</sup> στο Σύμπλοκο III.
4. Οξειδοαναγωγή Q-CytC (Σύμπλοκο III): Τα ηλεκτρόνια από την ουβικινόνη μεταφέρονται στο Σύμπλοκο III και από εκεί μεταφέρονται στο Σύμπλοκο IV.
5. Οξειδάση CytC (Σύμπλοκο IV): ανάγει το O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O σύμφωνα με την αντίδραση  $2e^- + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$



**Εικόνα 2.** Σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας (Alston et al., 2016).

### Οξειδωτικό στρες και παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS)

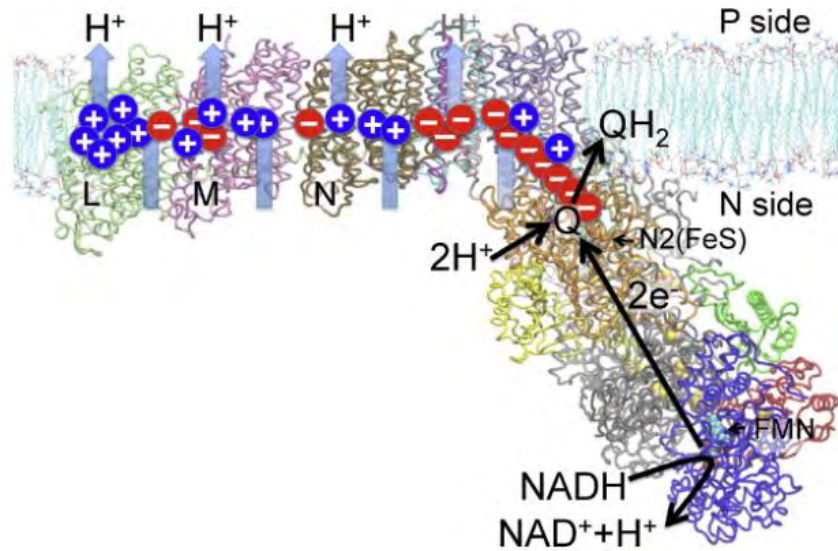
Εάν η μετατροπή του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O δεν είναι πλήρης και είναι μερική τότε, τυπικά παράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) όπως O<sub>2</sub><sup>•-</sup> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας (Janikiewicz et al., 2018). Οι ROS ανάλογα με την συγκέντρωσή τους μπορεί να έχουν διπλή δράση. Φυσιολογικά, οι μιτοχονδριακές ROS (mtROS) λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και έχουν πολλαπλή δράση σε πολλά σημεία του κυτταρικού κύκλου, όπως απενεργοποίηση φωσφατασών, ενεργοποίηση κινάσων καθώς και διευκόλυνση της δράσης παραγόντων όπως ο HIF-1α και η p53. Σε χαμηλά επίπεδα οι mtROS διεγείρουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου επιδρώντας στην μακροζωία και δρώντας προστατευτικά σε περίπτωση τραυματισμού. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις όμως προκαλούν καταστροφή του DNA, κυτταρική βλάβη και απόπτωση (Daniel et al. 2018). Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προκαλείται από ROS γιατί όταν η συγκέντρωσή τους αυξάνεται στα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) καθίσταται ελαττωματικό και οδηγεί σε απώλεια δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητάς της (Liu and Chen, 2017). Ο όρος «οξειδωτικό στρες» περιλαμβάνει όλες τις μοριακές, κυτταρικές και ιστικές ανωμαλίες που προκύπτουν από την υπερβολική παραγωγή ROS και / ή την μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα. Η ανισορροπία οξειδωτικών παραγόντων έχει βρεθεί ότι προκαλεί πολλές πνευμονικές νόσους συμπεριλαμβανομένου του άσθματος, της ΧΑΠ, της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης κ.α. Δεδομένου ότι ο πνεύμονας είναι το όργανο που εκτίθεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O<sub>2</sub>, η παραγωγή μιτοχονδριακών δραστικών ριζών οξυγόνου (mtROS) μπορεί να είναι ιδιαίτερα σχετική με τη βιολογία των πνευμόνων. Ο πνεύμονας περιέχει πάνω από 40 διαφορετικούς τύπους κυττάρων, καθένας εκ των οποίων περιέχει διαφορετική συγκέντρωση μιτοχονδρίων.

### 1.3 Οξειδοαναγωγή NADH-Q / Σύμπλοκο I

#### Δομή του ζεύγους NADH-Q

Το Σύμπλοκο I, είναι από τα μεγαλύτερα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας με μοριακό βάρος 1 MDa. Διαθέτει χαρακτηριστικό σχήμα που ομοιάζει με αυτό του γράμματος L. Αυτός ο σχηματισμός αποτελείται από έναν περιφερικό, υδρόφιλο

βραχίονα και έναν υδρόφοβο, μεμβρανικό βραχίονα που βρίσκεται κάθετα στον πρώτοβραχίονα. Διαθέτει 45 υπομονάδες, 7 από τις οποίες κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA και οι υπόλοιπες 38, από πυρηνικό DNA. Μπορεί και εναλλάσσεται μεταξύ δύο διαμορφώσεων, μίας ενεργής A και μίας ανενεργής D (Wirthetal., 2016).



**Εικόνα 3.** Δομή του Συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Hummer et al., 2016)

### Λειτουργία του Συμπλόκου I

Το Σύμπλοκο I διαθέτει προσθετικές ομάδες στις οποίες ανήκει ο συμπαραγόντας FMN (φλαβινομονονουκλεοτίδιο) καθώς και οι ομάδες σιδήρου-θείου (Fe-S). Τα ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού του NADH εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της οξειδωαναγωγής του ζεύγους NADH-Q. Το NADH προσδένεται και μεταφέρει 2e<sup>-</sup> στην FMN . Η FMN μετατρέπεται σε FMNH<sub>2</sub>. Στην συνέχεια τα εμεταφέρονται στα σύμπλοκα Fe-S, την δεύτερη προσθετική ομάδα του Συμπλόκου I. Μέσω του Fe-S μεταφέρονται στο συνένζυμο Q. Αυτό οδηγεί σε άντληση 4 πρωτονίων από τη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η αποδοχή e<sup>-</sup> από την Q οδηγεί σε πρόσληψη και 2 πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα ώστε η Q τελικά να αναχθεί σε QH<sub>2</sub> (ουβικινόλη) (Lenaz et al., 2016).





## 1.4 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση

Τι είναι Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ);

<b>I</b>	<b>Idiopathic</b> Ιδιοπαθής	Of unknown cause Από Άγνωστη αιτία
<b>P</b>	<b>Pulmonary</b> Πνευμονική	Refers to the lungs Αναφέρεται στους πνεύμονες
<b>F</b>	<b>Fibrosis</b> Ίνωση	Formation of scar tissue Δημιουργία ουλώδους ιστού

Η Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (IPF) είναι μία χρόνια, πολυπαραγοντική, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη και τελικά θανατηφόρος πνευμονική νόσος αγνώστου αιτιολογίας, με διάμεση επιβίωση που εκτιμάται στα 3-5 έτη μετά τη διάγνωση. Οι επιπτώσεις της νόσου αυξάνονται με την πάροδο της ηλικίας. Ο εκτιμώμενος επιπολασμός της νόσου είναι 4-18 περιστατικά ανά 100.000. Η νόσος είναι σπάνια σε άτομα κάτω των 50 ετών, ενώ είναι συχνότερη στους άρρενες (Sgalla et al., 2015). Αρχικά υπήρχε η ιδέα ότι επρόκειτο για μία φλεγμονώδη νόσο, τα τελευταία χρόνια όμως έχει φανεί πως πρόκειται καθαρά για μία ασθένεια η οποία, υποκινείται από τραυματισμό στο επιθήλιο. Ο υγιής ιστός αντικαθίσταται από αλλοιωμένη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και καταστρέφεται η κυψελιδική αρχιτεκτονική, γεγονός που οδηγεί σε διαταραγμένη ανταλλαγή αερίων και, τελικά, αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο.

### Συμπτώματα ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

Η νόσος στα αρχικά της στάδια είναι ασυμπτωματική. Με την πάροδο του χρόνου όμως, εμφανίζονται συμπτώματα που είναι μη ειδικά. Οι περισσότεροι ασθενείς αρχικά παρουσιάζουν δύσπνοια στην κόπωση και μη παραγωγικό βήχα. (Richeldi et al., 2017). Η δύσπνοια, που είναι το κυρίαρχο σύμπτωμα της IPF, προοδευτικά επιδεινώνεται. Άλλα συμπτώματα που μπορεί να συνοδεύουν την κλινική εικόνα της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι η απώλεια βάρους, ο πυρετός, (Godfrey, 2019), το εμφύσημα, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, οι αρθραλγίες/μυαλγίες κ.α. (Nakamura and Suda, 2016). Η μέση διάρκεια των συμπτωμάτων μέχρι την διάγνωση της νόσου είναι 1-2 έτη. Ωστόσο, αυτά τα συμπτώματα επιδεινώνονται από την μεγάλη ηλικία, την κακή φυσική κατάσταση ή ακόμα και από υποκείμενα νοσήματα όπως πνευμονικό εμφύσημα ή καρδιαγγειακές νόσους. Επομένως η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση είναι δύσκολη (Lamaw et al., 2011).

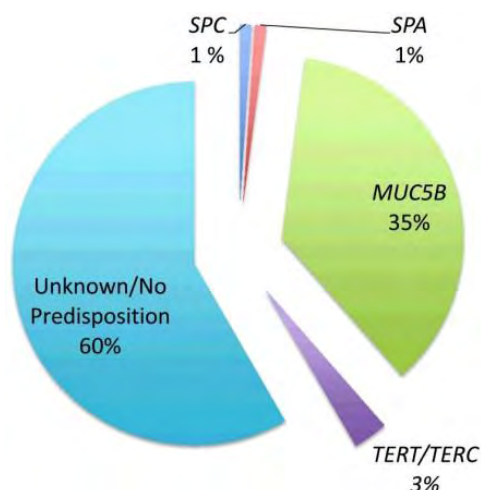
### Διάγνωση ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

Για να γίνει η διάγνωση της νόσου και να αποκλειστεί κάποια άλλη νόσος ή αλληλεπικαλυπτόμενες παθήσεις απαιτούνται εξετάσεις που περιλαμβάνουν: μελέτη κλινικών χαρακτηριστικών, ακτινογραφία θώρακος και, πιθανώς ιστοπαθολογική εξέταση πνεύμονα (Flaherty et al., 2004). Η IPF είναι μία νόσος με υψηλή θνησιμότητα. Η θνησιμότητα βασίζεται σε κλινικές, ακτινολογικές και βιολογικές παραμέτρους (Well et al., 2003). Πρόσφατα έχει προταθεί η χρήση ενός δείκτη για την πρόβλεψη της θνησιμότητας στην IPF. Το όνομα του δείκτη είναι GAP και βασίζεται στο φύλο [G],

στην ηλικία [A] και στις δύο μεταβλητές φυσιολογίας του πνεύμονα [P]. Αυτό το μοντέλο έχει δείξει καλές επιδόσεις στην πρόβλεψη της θνησιμότητας ενώ ταξινομεί τους ασθενείς στα 3 στάδια της νόσου με διακριτό κίνδυνο θνησιμότητας μεγαλύτερο από 1-3 χρόνια (Ley et al., 2012).

#### Αιτιολογία ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου παραμένει ακόμη αινιγματική. Παρά τις συνεχείς έρευνες, τόσο η αρχική αιτία όσο και οι λόγοι που οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου παραμένουν άγνωστοι. Οποσδήποτε κάποιοι παράγοντες κινδύνου συνδεδεμένοι με την IPF είναι η καπνιστική συνήθεια, οι λοιμώξεις, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η χρόνια εισπνοή μολυσματικών παραγόντων και η λήψη φαρμάκων. Παράλληλα, περίπου 2–5% των ασθενών με IPF μπορεί να εμφανίζουν οικογενή IPF (προσβολή 2 ή περισσότερων ατόμων της ίδιας βιολογικής οικογένειας). Η οικογενής IPF που εκδηλώνεται σε νεαρότερες ηλικίες, είναι πιο επιθετική και υπάρχει συσχέτιση με τα γονίδια surfactant protein C, human telomerase reverse transcriptase (hTERT), human telomerase RNA (hTR)(Plantier et al., 2017).



**Εικόνα 4.** Εκτιμώμενες συχνότητες γενετικών μεταλλάξεων που προδιαθέτουν IPF.

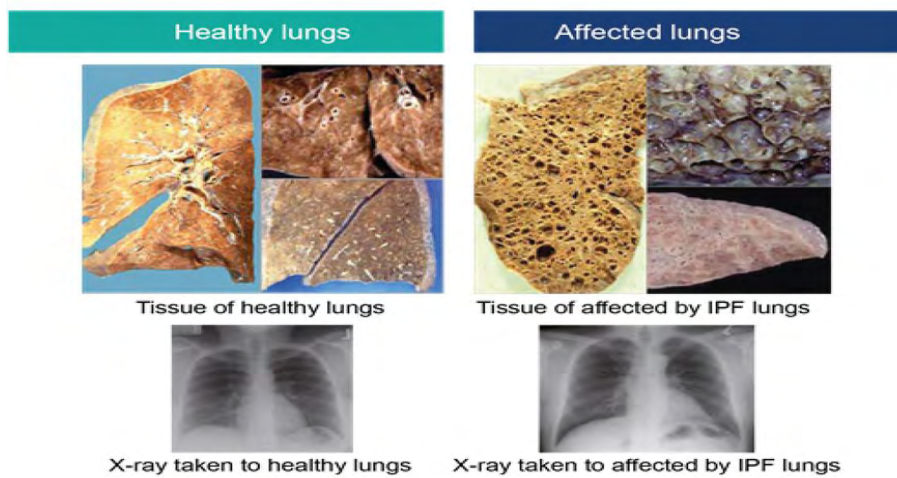
Αυτό το διάγραμμα πίτας απεικονίζει τον εκτιμώμενο επιπολασμό των μεταλλάξεων στην επιφανειοδραστική πρωτεΐνηC (SPC), την επιφανειοδραστική πρωτεΐνη A (SPA), τη βλεννίνη 5B (MUC5B) και την τελομεράση (TERT,TERC) που προδιαθέτουν τους ασθενείς να αναπτύξουν IPF (Wolters et al., 2015).

#### Παθοφυσιολογία ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

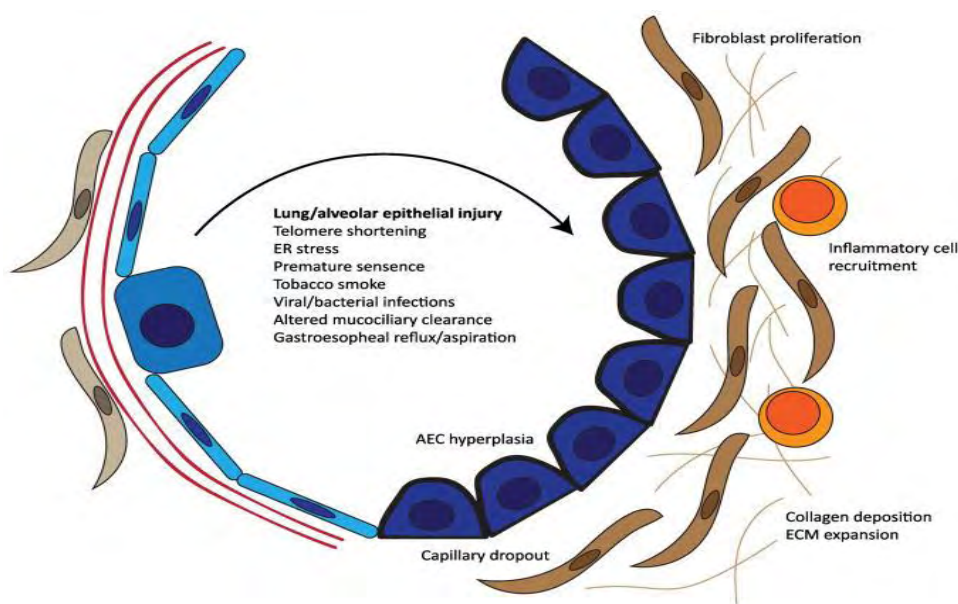
Στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση συμβαίνει μία διαδικασία γνωστή ως μετάπτωση επιθηλίου. Η μετάπτωση επιθηλίου είναι μία διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την μεταξύ τους επαφή καθώς και την πολικότητα τους με δραματικές συνέπειες στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Συμβαίνει κυρίως ως απόκριση σε τραυματισμό (Salton et al., 2019). Μία ποικιλία γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκαλούν τραυματισμό στο κυψελιδικό επιθήλιο του πνεύμονα. Μετά τον τραυματισμό, ενεργοποιούνται προγράμματα για την αποκατάσταση του τραυματισμού που στρατολογούν ινοβλάστες και φλεγμονώδη κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το υπερενεργοποιημένο επιθήλιο που υπέστη βλάβη, παράγει



μεσολαβητές μετανάστευσης ινοβλαστών και συμβάλει στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίησή τους σε ενεργούς μυοϊνοβλάστες. Αυτοί με τη σειρά τους εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και κολλαγόνου, που αναδιαμορφώνουν τη δομή των πνευμόνων μειώνοντας την ελαστικότητά τους και σχηματίζοντας μία δομή όμοια με κηρύθρα (Sgalla et al., 2018). Λόγω τραυματισμού του πνευμονικού επιθηλίου, ενεργοποιούνται παράλληλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για την ενεργοποίηση φλεγμονώδους αντίδρασης. Μακροφάγα, παράγουν αμέσως κυτοκίνες που ενισχύουν την φλεγμονώδη απόκριση αρχικά και αργότερα προσπαθούν να αποκαταστήσουν τη βλάβη, στρατολογώντας ινοβλάστες, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Όταν η βλάβη επιμένει, στρατολογούνται ακόμα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. (Sgalla et al., 2018). Έτσι λοιπόν παρατηρείται ανώμαλη επιδιόρθωση του κυψελιδικού επιθηλίου και αποδιοργανώνεται η διαδικασία αναγέννησης λειτουργικών κυψελίδων (Hewlett et al., 2018).



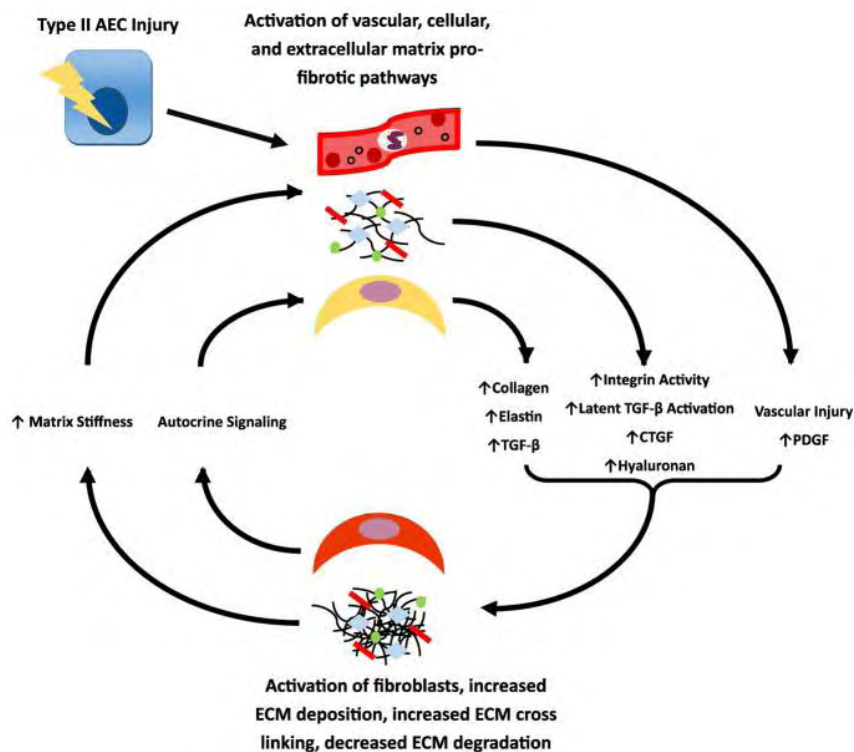
**Εικόνα 5.** Ιστολογική σύγκριση υγιών πνευμόνων και πνευμόνων με IPF.



**Εικόνα 6.** Παθογένεση ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Hewlett, Krospski, Blackwell et al., 2018).

### *Μηχανισμός παθογένεσης ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης*

Μετά τον τραυματισμό του επιθηλίου, μία ποικιλία σηματοδοτικών μορίων πρέπει να βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση με σκοπό την επιδιόρθωση του τραύματος. Το τραυματισμένο επιθήλιο και τα προσληφθέντα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνουν μία ποικιλία διαμεσολαβητών συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα TGF-β, του αυξητικού παράγοντα συνδετικού ιστού CTGF και άλλων ρυθμιστών επιθηλιακής επιδιόρθωσης που προάγουν την πρόσληψη ινοβλαστών και τη διαφοροποίησή τους σε ενεργοποιημένους μυοϊνοβλάστες που εκκρίνουν με τη σειρά τους εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Μηχανοαισθητικοί μηχανισμοί των ινοβλαστών προάγουν συνεχώς τη διαφοροποίηση του σε μυοϊνοβλάστες, ενισχύοντας το φαινόμενο της ίνωσης. Πιο συγκεκριμένα ο TGF-β συμμετέχει στην επούλωση του τραύματος καταστέλλοντας τη φλεγμονή στους πνεύμονες και προωθώντας την ομοιοστάση τους. Ο ενεργοποιημένος TGF-β, απελευθερώνεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και προωθεί τα επιθηλιακά κύτταρα να υποστούν μια φαινοτυπική αλλαγή που χαρακτηρίζεται από την υιοθέτηση μεσεγγυματικών κυττάρων. Ο CTGF εκκρίνεται υπό διέγερση του TGF-β. Συντίθεται σε χαμηλά επίπεδα στον υγιή πνεύμονα ενώ τα επίπεδά του είναι αυξημένα σε πνεύμονα με ίνωση και ενεργοποιεί μία MAP κίνηση που επάγει τη μετανάστευση ινοβλαστών καθώς και την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Όταν η βλάβη επιμένει, στρατολογούνται ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα (Hewlett et al., 2018). Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα παράγουν PDGF, CCL2 και τον παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF), που είναι επίσης γνωστός και ως παράγοντας διέγερσης αποικίας 1 (CSF1) (Sgalla et al., 2018). Ο ρόλος των λεμφοκυττάρων είναι η παραγωγή λεμφοκυτταρικών κυτοκινών, με άμεσες επιδράσεις στην δραστηριότητα ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Τα Th-1, Th-2 και Th-17 (T-ρυθμιστικά κύτταρα) έχουν συνδεθεί με παθογένεση IPF. Το υποσύνολο Th1 παράγει IL-1α (ιντερλευκίνη-1α), TNF-α, PDGF αλλά οι αποκρίσεις Th2 και Th17 φαίνεται να είναι πιο σημαντικές στην παθογένεση IPF. Τα κύτταρα Th-2 ενεργοποιούν την ιντερλευκίνη IL-4. Αυτή η ιντερλευκίνη επάγει αυξημένα επίπεδα IL-5, IL-13 και TGF-β, στρατολογώντας ιστιοκύτταρα, ηωσινόφιλα και μεσεγγυματικά κύτταρα γεγονός που υποδηλώνει ενεργοποίηση ινοβλαστών. (Sgalla et al., 2018).



**Εικόνα 7.** Αλληλεπιδράσεις επιθηλιακών και μεσεγγυματικών κυττάρων με επακόλουθη ενεργοποίηση ινοβλαστών (Hewlett et al., 2018).

### Θεραπεία ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης

Όπως γίνεται με πολλές χρόνιες διαταραχές, η διαχείριση των ασθενών με πνευμονική ίνωση επικεντρώνεται στη βελτίωση των συμπτωμάτων, τη διατήρηση της πνευμονικής λειτουργίας και την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης. Η μόνη μέχρι πρότινος θεραπευτική προσέγγιση που αύξανε την επιβίωση ήταν η μεταμόσχευση πνεύμονα. Δυστυχώς, οι θεραπείες που αποσκοπούν στην καταστολή του αντανακλαστικού βήχα έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Υπάρχουν φάρμακα που δρουν για την καταστολή του βήχα (δεξτρομεθορφάνη, γκαμπαπεντίνη, αμιτριπυλίνη και οπιοειδή) ενώ άλλα δρουν σε αεραγωγούς για τη μείωση της φλεγμονής, της συστολής των λείων μυών και της έκκρισης βλέννας (β-αγωνιστές, ανταγωνιστές λευκοτριενίων, αντιβιοτικά μακρολίδης) (Vigeland et al., 2017).

### Μιτοχόνδρια και ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση

Οξείες και χρόνιες ασθένειες των πνευμόνων συνδέονται συχνά με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress, αφού στους ασθενείς παρατηρείται δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Οι πνεύμονες αποτελούν το κύριο όργανο του οργανισμού που έρχεται σε άμεση επαφή με το οξυγόνο και λόγω μεγάλης επιφάνειας αλλά και λόγω του ότι επιτελούν την σημαντικότερη διεργασία για την επιβίωση, που είναι η αναπνοή. Κατά συνέπεια αποτελούν όργανο στόχο καταστάσεων οξειδωτικού στρες. Εκτός από το οξυγόνο, οι πνεύμονες μπορεί να υφίστανται οξειδωτικό στρες και από άλλες πηγές όπως περιβαλλοντικές τοξίνες, καπνός, επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο, ακτινοβολία και φάρμακα, όπως για παράδειγμα η μπλεομυκίνη. Η μη εξουδετέρωση δραστικών ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα για το κύτταρο και κατά συνέπεια για τον πνεύμονα (Cheresh et al., 2014). Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σημαντικά σε ασθένειες των πνευμόνων, που σχετίζονται με την παραγωγή ROS, όπως η ίνωση των πνευμόνων. Η βιογένεση των

μιτοχονδρίων για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο ελέγχεται από τα μόρια: PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ή PGC-1 $\alpha$ ) και PGC-1 $\beta$  σε συνδυασμό με την έκφραση των πυρηνικών αναπνευστικών παραγόντων (NRF). Το μόριο PGC-1 $\alpha$  συνδέεται ισχυρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες επάγοντας μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Σε ήπιο οξειδωτικό stress από ROS, τα μιτοχόνδρια καθίστανται επιμήκη και συντίκονται με ταυτόχρονη ανταλλαγή mtDNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων μεταξύ κατεστραμμένων και υγιών μιτοχονδρίων. Τα επιμήκη μιτοχόνδρια στην συνέχεια καταστρέφονται με μιτοφαγία που αποτελεί μορφή κυτταρικής αυτοφαγίας δηλαδή ένας επιλεκτικός τρόπος απομάκρυνσης και καταστροφής των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων, τα οποία ταυτόχρονα υποκαθίστανται μέσω μιας άλλης διαδικασίας, της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Η μιτοφαγία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κυστιδίων διπλής μεμβράνης (αυτοφαγώσωματα) τα οποία συντήκονται στη συνέχεια με λυσοσώματα (Tsubouchi et al., 2018). Η μιτοφαγία μεσολαβείται από την PTEN-induced kinase 1 (PINK1) που στρατολογεί την PARK2, μια E3-λιγάση ουβικιτίνης. Η PINK1 είναι μια μιτοχονδριακή κινάση σερίνης / θρεονίνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο PINK1. Προστατεύει τα κύτταρα από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από το ήπιο στρες. Σε άτομα με πνευμονική ίνωση όπου το stress είναι πιο έντονο, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατά συνέπεια η ανεπάρκεια της PINK1 και της PARK2, προκαλεί χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα των συμπλόκων I και IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), μεταβολές στο μεταβολισμό του mtDNA και ανεπαρκή αυτοφαγία οδηγώντας σε απόπτωση κυψελιδικών κυττάρων και επαγωγή του TGF- $\beta$ . Τόσο η ανεπαρκής μιτοφαγία που προκαλείται από τη μείωση της PINK1 όσο και της PARK2 μπορούν να προκαλέσουν διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών. Ωστόσο, σε σύγκριση με το PINK1, η PARK2 μπορεί να έχει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των ινοβλαστών. Η ανεπαρκής μιτοφαγία που προκαλείται από ανεπάρκεια PARK2 προκαλεί παραγωγή mtROS και κατά συνέπεια ίνωση πνευμόνων (Tsubouchi et al., 2018).

## 1.5 Στόχος:

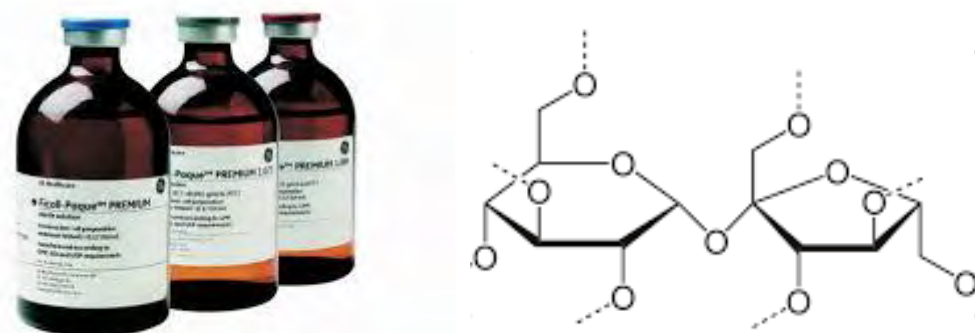
1. Το οξειδωτικό stress είναι υπεύθυνο για αρκετές ασθένειες και πιθανόν να οφείλεται σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, όπως βλάβη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Liu and Chen, 2017).
2. Ασθένειες των πνευμόνων συνδέονται συχνά με οξειδωτικό stress (Janikiewicz et al., 2018).
3. Η πνευμονική ίνωση είναι μια ασθένεια, στην οποία προσβάλλονται οι πνεύμονες άρρνες (Sgalla et al., 2015).
4. Έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις σε mt-DNA και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση (Wolters et al., 2015).

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

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Απομόνωση λεμφοκυττάρων

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα (άμορφο συστατικό), μέσα στο οποίο εναιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Το λεμφοκύτταρο αποτελεί είδος λευκού αιμοσφαιρίου το οποίο απαντά στον οργανισμό σε ποσοστό 20 - 40%. Για την απομόνωση των μονοπύρηνων αυτών κυττάρων από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φυγοκέντρησης πυκνότητας με το αντιδραστήριο φικόλη.



**Εικόνα 8.** Αντιδραστήριο φικόλης και χημικός τύπος της

Η μέθοδος αυτή ουσιαστικά βασίζεται στη διαβάθμιση των κυττάρων που πραγματοποιείται με υγρό μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων. Το υγρό διαχωρισμού έχει ειδικό βάρος αντίστοιχο με το ειδικό βάρος των λεμφοκυττάρων. Η φικόλη επιτρέπει τη δίοδο σε ερυθροκύτταρα του αίματος αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα διότι έχει μικρότερη πυκνότητα από αυτή των ερυθροκυττάρων και μεγαλύτερη από αυτή των λεμφοκυττάρων. Με το μέσο αυτό και μετά από φυγοκέντρηση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του δείγματος αίματος σε 4 διακριτές στιβάδες:

- 1) Ορός (ανώτερη στιβάδα)
- 2) Λευκά αιμοσφαίρια (στιβάδα ενδιαφέροντος – άσπρη/γκρι)
- 3) Φικόλη
- 4) Ερυθροκύτταρα



**Εικόνα 9.** Στιβάδες αίματος μετά από φυγοκέντρηση

#### Υλικά:

- Περιφερικό αίμα ασθενούς με ίνωση παρουσία αντιπηκτικού παράγοντα (σε ηπαρινισμένη σύριγγα)
- Φικόλη – Ficoll – Paque PLUS ( Amersham Biosciences 6x100ml – stable for 3 years stored at 4-25 °C , protected from light)
- PBS 10x
- PBS 1x
- Tris-HCl 1M pH=7,6
- Falcons 50ml και 15ml
- Φυγόκεντρος
- Πιπέτα Pasteur
- Πουάρ

#### Πείραμα:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα stock που χρειάζονται για την διεξαγωγή του πειράματος. Στα διαλύματα αυτά περιλαμβάνεται το PBS 10x, Tris-HCl 1M pH= 7,6 , SHE-PIM τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες.

Για το PBS 10x 100ml:

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Μάζα σε gr αντιδραστηρίου
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1M	14,196
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20mM	0,2721
NaCl	1.37M	8,0062
KCl	20mM	0,1491

Υπολογισμοί για το PBS stock:

$$C = m / Mr \Rightarrow m = C * Mr$$

Άρα τα gr :

$$Na_2HPO_4 \text{ 1M } 100ml \text{ m} = 14,196 \text{ gr}$$

$$KH_2PO_4 \text{ 20mM } 100ml \text{ m} = 0,2721$$

$$NaCl \text{ με αραιώση από stock } 0,5M \text{ 100ml. Άρα } 68,5ml$$

KCl 20mM 100mlm=0,1491

Για το Tris-HCl 500ml:

m=60,55

Στην συνέχεια έγινε ρύθμιση με πυκνό HCl στο 7,6

Για το SHE-PIM 10ml:

Αντιδραστήριο	Stock	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα για SHE-PIM
Sucrose	0.85 gr/ml	0,24 M	8,5gr
HEPES pH=7,4	0,1M	10 mM	10ml
EDTA	0,5M	1mM	0,2ml
<u>Πρωτεϊνικοί αναστολείς (ταμπλέτες)</u>	Υπάρχουν σε ταμπλέτες	2 ταμπλέτες ανά 50mlSHE-PIM	4 ταμπλέτες

- Παρασκευή διαλυμάτων και στην συνέχεια παραλαβή από το νοσοκομείο το δείγμα ασθενούς που είχε παρθεί με ηπαρινισμένη σύριγγα από ειδικό του νοσοκομείου.
- Με σύριγγα τοποθετούνται 10ml φικόλης σε falcon των 50ml
- Προσθήκη αργά αργά του δείγματος ώστε να σχηματιστεί στρώση φικόλη και από πάνω η στρώση του αίματος χωρίς αυτά να αναμιγνύονται
- Φυγοκέντρηση 1800rpm , 20°C , 20min
- Απομόνωση με το πουάρ της πάνω στρώσης
- Συλλογή της επόμενης στρώσης, δηλαδή των λεμφοκυττάρων με πουάρ και τοποθέτηση σε falconτων 15ml , συλλογή περίπου 1-2mlστρώσης
- Προσθήκη τριπλάσιου όγκου PBS 1x
- Φυγοκέντρηση 2500rpm,20°C, 5min
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου με πουάρ και προσοχή να μην απομακρύνουμε τυχόν κύτταρα
- Στο falcon με το ίζημα των λεμφοκυττάρων βάζουμε τριπλάσιο όγκο SHE-PIM (Περίπου 8mlSHE-PIM)
- Στην συνέχεια μοιράζουμε το περιεχόμενο του σε μικρά tubes των 1,5ml και τα βάζουμε όλα σε ένα μεγάλο falconκαι τα αποθηκεύουμε στους -80°C

## 2.2 Επεξεργασία Δείγματος

Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I είναι απαραίτητο οι μεμβράνες των λεμφοκυττάρων να σπάσουν και να γίνουν διαπερατές. Συγκεκριμένα, χρειάζεται το Σύμπλοκο I και κατ' επέκταση τα μιτοχόνδρια των απομονωμένων λεμφοκυττάρων να είναι διαθέσιμα, ώστε να έρθουν σε επαφή με τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν κύκλοι ψύξης- απόψυξης.



Υλικά:

- Υδατόλουτρο
- Καταψύκτης -80°C



**Εικόνα 10.** Υδατόλουτρο

Αρχή της μεθόδου:

Αφορά ουσιαστικά διαδοχικούς κύκλους ψύξης απόψυξης, δηλαδή αλλαγή της θερμοκρασίας των δειγμάτων από το πολύ θερμό στο πολύ ψυχρό και ανάποδα. Στο πρωτόκολλο αυτό τα δείγματα μετακινούνται εναλλάξ από τους -80°C που είναι αρχικά αποθηκευμένα στους 37°C και πάλι πίσω. Όλη η διαδικασία περιλαμβάνει συνολικά 3 κύκλους ψύξης απόψυξης. Στους -80°C δημιουργούνται κρύσταλλοι οι οποίοι με την μεταφορά τους στους 37°C ουσιαστικά υγροποιούνται και με αυτόν τον τρόπο ουσιαστικά διακόπτεται η συνοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Πρόκειται για μία ήπια μέθοδο η οποία ουσιαστικά δεν προκαλεί μετουσίωση και αποδιάταξη πρωτεϊνών στο εξεταζόμενο δείγμα.

Πειραματική διαδικασία:

- Για έναν κύκλο ψύξης απόψυξης τα Eppendorfπου περιέχουν απομονωμένα λεμφοκύτταρα αφήνονται αρχικά στους -80°C για 20min
- Στην συνέχεια αφήνονται στο υδατόλουτρο στους 37°C για άλλα 20min.
- Πραγματοποιούνται συνολικά 3 κύκλοι ψύξης-απόψυξης

### **2.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού περιεχομένου**

Το εκχύλισμα λεμφοκυττάρων που λήφθηκε περιέχει πλήθος πρωτεϊνών. Για να είναι λοιπόν αξιόπιστα τα αποτελέσματα είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί και να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα πρωτεϊνών που υπάρχει σε κάθε δείγμα εκχυλίσματος λεμφοκυττάρων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση είναι η μέθοδος Bradford.

Υλικά:

- Αντιδραστήριο Bradford (εταιρίας ThermoFisherScientific)
- Κυψελίδα απλή
- Φασματοφωτόμετρο (595nm)
- Eppendorf 1,5ml

- BSA (Bovine Serum Albumin)
- SHE-PIM/ ice cold buffer

Αρχή της μεθόδου:

Είναι μια γρήγορη και ακριβής φασματοσκοπική αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Η αντίδραση εξαρτάται από τη σύνθεση αμινοξέων των μετρημένων πρωτεϊνών. Η ανάλυση Bradford, μια χρωματομετρική ανάλυση πρωτεΐνης, βασίζεται στη μεταβολή της απορρόφησης της χρώσης Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρώση Coomassie Brilliant Blue G-250 υπάρχει σε τρεις μορφές: ανιονικό (μπλε), ουδέτερο (πράσινο) και κατιονικό (κόκκινο). Υπό όξινες συνθήκες, η κόκκινη μορφή της βαφής μετατρέπεται σε μπλε μορφή, δεσμεύοντας την πρωτεΐνη που μελετάται κάθε φορά. Εάν δεν υπάρχει πρωτεΐνη για σύνδεση, τότε το διάλυμα θα παραμείνει καφέ. Η χρώση σχηματίζει ένα ισχυρό, μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με την καρβοξυλομάδα της πρωτεΐνης με δυνάμεις van der Waals και αλληλεπιδρά με την αμινομάδα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση σε κάθε δείγμα πρέπει πρώτα να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα δηλαδή γνωστής συγκέντρωσης. Το διάλυμα αυτό είναι διάλυμα βόειας αλβουμίνης (BSA). Στην κυψελίδα τοποθετείται κάθε φορά σταθερός όγκος διαλύματος BSA, ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστήριο Bradford. Εν συνεχεία ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 10min. Στην συνέχεια ακολουθεί η φωτομέτρηση στα 595nm. Αυτό επαναλαμβάνεται για πολλά διαφορετικής συγκέντρωσης πρότυπα διαλύματα. Από τις συγκεντρώσεις αυτών των διαλυμάτων και τις απορροφήσεις που δίνουν κατά την φωτομέτρηση κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία αυτή και για τα δείγματα μας. Με την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάσαμε και τις τιμές των απορροφήσεων των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων υπολογίζεται η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος. Τα πρότυπα διαλύματα μελετήθηκαν σε διπλές για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία και μικρότερο πειραματικό σφάλμα.

### **Κατασκευή πρότυπης καμπύλης**

Αρχικά δημιουργήθηκαν τα απαραίτητα διαλύματα για τη διαδικασία αυτή δηλαδή Tris-HCl 10mM και όγκου 100ml και διαλυμάτων BSA γνωστής συγκέντρωσης.

Για το Tris-HCl:

Ως stock είχαμε διάλυμα Tris-HCl pH=7,6 και συγκέντρωσης 1M. Χρησιμοποιώντας τον νόμο αραιώσης προκύπτει ότι πρέπει να διαλυθούν 1ml stock σε 99ml απιονισμένου νερού.

Για το διάλυμα BSA:

Η BSA που χρησιμοποιήθηκε ήταν κρυσταλοποιημένη. Το διάλυμα stock που κατασκευάστηκε ήταν 1mg/ml και τελικού όγκου 10ml. Άρα διαλύθηκαν 10mg BSA σε 10ml απιονισμένου νερού.

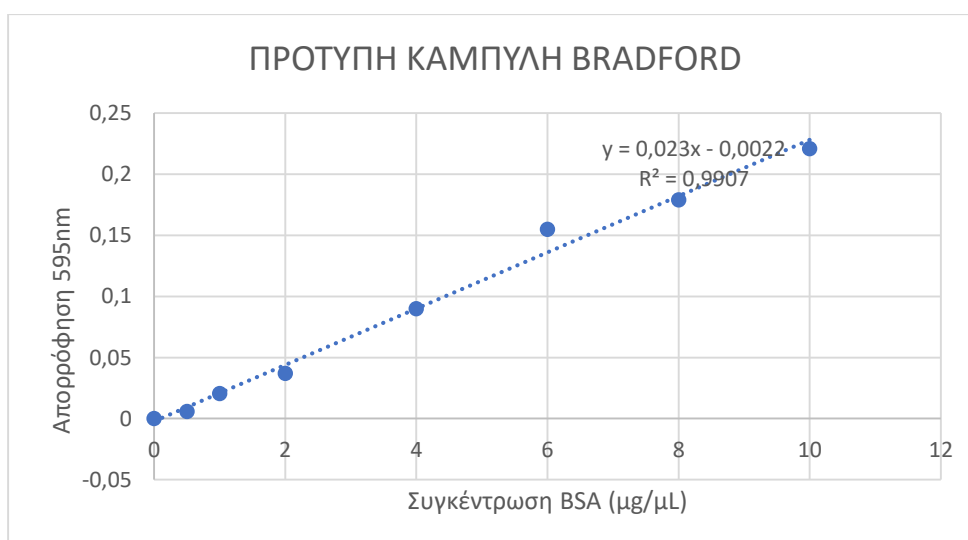
## Πειραματική διαδικασία:

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης:

BSA 1mg/ml	VTris (μL)	VBradford(μL)	M.O Abs <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

- Αρίθμηση δύο οχτάδων εppendorfs από το 1-8 και από το 1'-8'
- Σε καθένα τοποθετούμε ποσότητα BSA όπως ορίζει ο πίνακας. Τα εppendorfs 1 και 1' δεν περιέχουν BSA και αποτελούν τα τυφλά.
- Αντίστοιχα τοποθετούμε και το Tris-HCl όπως ορίζει ο πίνακας
- Ακολουθεί επώαση των εppendorfs για 10min στο σκοτάδι
- Φωτομέτρηση στα 595nm

Από τα παραπάνω προκύπτει η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



## Εφαρμογή μεθόδου Bradford στα απομονωμένα λεμφοκύτταρα:

Αντιδραστήριο	Τυφλό	<1>
Δείγμα	0 μL	10 μL
SHE-PIM	20 μL	10 μL
Bradford	980 μL	980 μL

- Παρασκευή τυφλού σύμφωνα με τον από πάνω πίνακα σε ένα tube
- Σε ένα άλλο tube τοποθετούμε ποσότητα δείγματος και προετοιμάζουμε το δείγμα κατά αντιστοιχία με πάνω

- Μηδενισμός του φωτόμετρου με το τυφλό
- φωτομέτρηση στα 595nm των δειγμάτων και καταγραφή απορροφήσεων
- βάζοντας στην εξίσωση όπου  $F(x)$  την τιμή της απορρόφησης βρίσκουμε το  $x$  δηλαδή την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του κάθε δείγματος
- Υπολογίζουμε από κάθε δείγμα πόσα  $\mu\text{L}$  θα χρειαστούμε από αυτό, ώστε να έχουμε 70 $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης. Για παράδειγμα:  
Έστω ότι ένα δείγμα μας έδωσε τιμή απορρόφησης 0,212 στα 595nm. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης είναι η  $F(x)=0,023x-0,0022$ . Βάζοντας όπου  $F(x)=0,212$  προκύπτει  $x=9,31\mu\text{g}$

Άρα σε 10 $\mu\text{L}$  λεμφοκυττάρων  $\rightarrow$  9,31 $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης  
 Πόσα  $\mu\text{L}$  ???  $\rightarrow$  70 $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης

Με την απλή μέθοδο των τριών προκύπτει ότι απαιτούνται 9,31 $w=700$   
 $\Rightarrow w=75,18\mu\text{L}$  δείγματος

## 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 βασίζεται στην παρακολούθηση της μείωσης της συγκέντρωσης του NADH, καθώς αυτό οξειδώνεται τόσο από το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας όσο και από άλλα ένζυμα που το χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα. Το NADH απορροφά στα 340nm σε φωτόμετρο με λάμπα UV.

### Υλικά:

- Απομονωμένα λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν υποστεί τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης σε ποσότητα ανάλογη με αυτή που είχαμε υπολογίσει παραπάνω σε  $\mu\text{L}$ , όπου περιέχονται 70mg πρωτεΐνης.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH=7,4 υδατικό stock 0,2%
- $\text{MgCl}_2$  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 0,36mM
- $\text{CoQ}_1$  stock σε DMSO 2mM
- DMSO
- Κυπελίδα χαλαζία
- Φασματοφωτόμετρο με UVφως 340nm
- Falcon 15ml
- Eppendorf 1,5 ml
- Πιπέτες Pasteur



### Αρχή της μεθόδου:

Το τέταρτο στάδιο του πειράματος βασίζεται σε δύο δεδομένα :

1. Το Σύμπλοκο I οξειδώνει NADH σε  $\text{NAD}^+$
2. Η ροτενόνη αναστέλλει στο Σύμπλοκο I

Το Σύμπλοκο I είναι γνωστό και ως Οξειδωαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. Φυσιολογικά δηλαδή, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH (δότης) στο συνένζυμο Q<sub>10</sub> (δέκτης). Το NADH οξειδώνεται σε NAD<sup>+</sup>. Μπορούμε να παρατηρήσουμε αυτή την αντίδραση φασματοφωτομετρικά. Πιο συγκεκριμένα το NADH απορροφά σε μήκος κύματος 340nm, σε αντίθεση με το NAD<sup>+</sup>. Έτσι, ο ρυθμός με τον οποίο η απορρόφηση μειώνεται στα 340nm αντιπροσωπεύει και τη μείωση του NADH με τον χρόνο και κατ' επέκταση τον ρυθμό με τον οποίο το NADH οξειδώνεται.

Χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο μπορούμε να υπολογίσουμε την ενζυμική δραστηριότητα κάθε δείγματος.

$$E(m/U) = \frac{\Delta a \times V_t}{t \times \epsilon \times b}$$

**mol/min**

Δα: Διαφορά στην τιμή της απορρόφησης σε χρονικό διάστημα t

V<sub>t</sub>: Τελικός όγκος αντίδρασης (mL)

t: χρόνος (min)

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

b: μήκος της οπτικής διαδρομής (cm)

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

$$\text{Ειδική δραστηριότητα} = \frac{\text{Ενζυμική ενεργότητα}}{70 \mu\text{g πρωτεΐνης}}$$

**nmol/min/μg**

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 πρωτόκολλο 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:

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

Από την παραπάνω σχέση είναι εφικτός ο υπολογισμός της Ειδικής Δραστηριότητας του Συμπλόκου I. Στα δείγματα που δεν περιέχουν ροτενόνη, η ποσότητα της αντικαθίσταται από DMSO. Το CoQ1 είναι ανάλογο του ενδογενούς CoQ10, και

χρησιμοποιείται ως εξωγενής δείκτης 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 παρακάτω τύποι:

$$C=n/V \quad \text{και} \quad n=m/Mr$$

Αντιδραστήριο	Συγκεντρώσεις Stock	Ποσότητα Αντιδραστηρίου	Όγκος Stock
$K_2HPO_4$ pH 7,4	0.1 M	$K_2HPO_4$ 1M→80,2 mL $KH_2HPO_4$ →19,8 mL	100 mL
BSA	2%	0,2 gr	10mL
$MgCl_2$	0,5 M	4,76 gr	100 mL
KCN	1 M	0,065 gr	1 mL
Αντιμυκίνη-α	3 mM	0,0164 gr	10 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

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

- $K_2HPO_4$  pH=7,4
- BSA
- $MgCl_2$
- KCN
- Αντιμυκίνη-α

Στον παρακάτω πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε διαλύματος και οι όγκοι που λαμβάνονται από το καθένα.

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα
$K_2HPO_4$ pH 7,4	20 mM	200 $\mu$ L
BSA	0,2%	100 $\mu$ L
$MgCl_2$	4 mM	8 $\mu$ L
KCN	1,7 mM	1,7 $\mu$ L
Αντιμυκίνη-α	3 $\mu$ M	1 $\mu$ L
NADH	200 $\mu$ M	35,1 $\mu$ L
Ροτενόνη/DMSO	15 $\mu$ M	7,5 $\mu$ L

CoQ1	100μM	50 μL
Δείγμα + νερά	-	100 μL
Νερό	-	496,7 μL

#### 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 τελευταίο πίνακα. 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 463,3 μL, προκύπτει ότι πρέπει να προστεθούν 536,7 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+, Rot-). Στο κάθε σωληνάκι προσθέτουμε 310,7 μL pre-mix.
- Αφού προσθέσουμε την ποσότητα του pre-mix, προσθέτουμε τα 536,7 μL νερό και την αντίστοιχη ποσότητα δείγματος και νερού, η οποία αθροιστικά θα πρέπει να ισούται με 100 μL. Για παράδειγμα, εάν σε ένα δείγμα έχει υπολογιστεί ότι απαιτείται ποσότητα 45 μL, θα πρέπει να συμπληρωθούν άλλα 65 μL νερού επιπλέον της ποσότητας των 536,7 μL που έχουν ήδη προστεθεί.
- Εν συνεχεία, προσθέτουμε την ποσότητα της ροτενόνης (Rot+) και του DMSO (Rot-) αντίστοιχα, η οποία ισούται με 7,5 μL.
- Τέλος προσθέτουμε σε όλα τα σωληνάκια 35,1 μL NADH.
- Αφήνουμε τα Eppendorf 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 μL 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 κατάλληλων τύπων υπολογίζουμε την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I, για κάθε δείγμα.

### 3. Αποτελέσματα

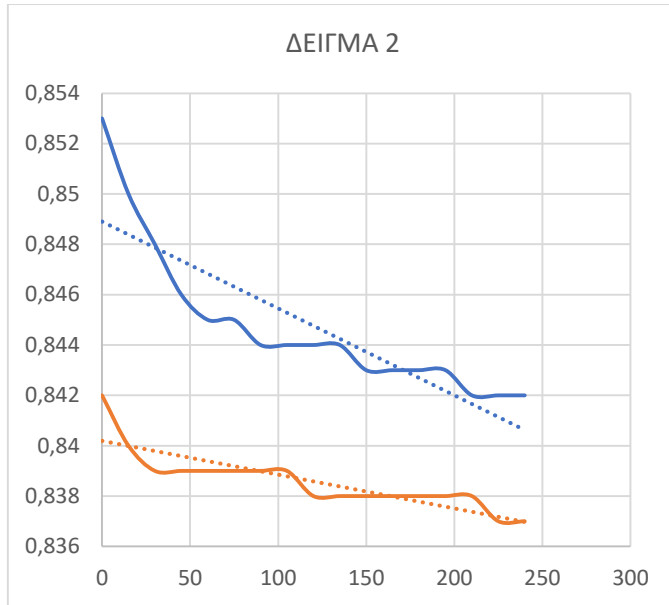
Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος σε Z ασθενείς που πάσχουν από πνευμονική ίνωση (IPF). Οι ασθενείς που παρακολουθούνται στην Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ)

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I επιλέχθηκε το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ρυθμού οξειδωσης του NADH στα 340nm σε ολικό ομογενοποιημένο περιφερειακού αίματος με 70μg πρωτεΐνης μετά από τρεις κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η συγκέντρωση του NADH ήταν στα 90μM. Ημέτρηση έγινε 2 φορές για κάθε δείγμα με και χωρίς την παρουσία ροτενόνης. Η διαφορά της απορρόφησης του NADH με και χωρίς ροτενόνη αντικατοπτρίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I.

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία
1	Άνδρας	>60
2	Άνδρας	>60
3	Άνδρας	71
4	Άνδρας	80
5	Άνδρας	73
6	Άνδρας	>60
7	Άνδρας	>60
8	Άνδρας	>60
9	Άνδρας	>60
10	Άνδρας	>60
11	Γυναίκα	74
12	Άνδρας	>60
13	Άνδρας	>60
14	Άνδρας	>60
15	Άνδρας	>60
16	Άνδρας	>60
17	Άνδρας	>60
18	Γυναίκα	>60
19	Γυναίκα	73

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις NADH σε ένα δείγμα ασθενούς με πνευμονική ίνωση κατά τη διάρκεια πέντε λεπτών ανά 15 δευτερόλεπτα. Με **μπλε** απεικονίζεται η μεταβολή απορρόφησης απουσία ροτενόνης, ενώ με **πορτοκαλί** παρουσία ροτενόνης με τη σειρά όπως αναγράφονται στον πίνακα από πάνω. Ομοίως έγινε και για τα δείγματα των υπόλοιπων ασθενών.





### Υπολογισμός ενζυμικής δραστηριότητας:

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιούμε τον τύπο:

$$\text{Ειδική δραστηριότητα} = \frac{\text{Ενζυμική ενεργότητα}}{70 \mu\text{g πρωτεΐνης}} \text{ nmol/min/}\mu\text{g}$$

Και στην συνέχεια:

### Ειδική Δραστηριότητα (Rot-) - Ειδική Δραστηριότητα (Rot+)

Για παράδειγμα για το Δx ισχύει:

**ΓιαRot-:**

$$\Delta A = 0,004 \rightarrow E = (0,004) / (5 \times 6,22 \times 10^3 \times 1) = 0,128 \times 10^{-6} = 0,128 \times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{M/min} = 0,128 \times 10^{-9} \text{ mU}$$

$$SA_1 = E/\text{mg πρωτεΐνης} = 0,128 \times 10^{-9} / (70 \times 10^{-3}) = 1,8 \text{ nmol} / (\text{min} \times \text{mg})$$

**ΓιαRot+:**

$$\Delta A = 0,003 \rightarrow E = (0,003) / (5 \times 6,22 \times 10^3 \times 1) = 0,096 \times 10^{-6} = 0,096 \times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{M/min} = 0,096 \times 10^{-9} \text{ mU}$$

$$SA_2 = E/\text{mg πρωτεΐνης} = 0,096 \times 10^{-9} / (70 \times 10^{-3}) = 1,3 \text{ nmol} / (\text{min} \times \text{mg})$$

$$\text{totalSA} = SA_1 - SA_2 = 0,5 \text{ nmol} / (\text{min} \times \text{mg})$$

Ομοίως έγιναν οι υπολογισμοί και για τα υπόλοιπα δείγματα, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT-	ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ROT+	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
1	9,2	3,4	5,8

2	6,31	2,87	3,44
3	12,6	7,72	5,87
4	14,6	12,4	2,2
5	8,72	7,574	1,146
6	24,02	18,87	5,15
7	38,674	25,574	13,1
8	5,74	3,4	2,34
9	10,15	9,15	1
10	28,43	20,17	8,26
11	7,17	5,3	2,87
12	15,6	12,02	3,58
13	4,02	2,87	1,15
14	8,664	4,53	4,134
15	5,74	3,4	2,34
16	10,65	9,23	1,42
17	28,43	20,17	8,26
18	7,17	5,3	2,87
19	15,6	12,02	3,58
<b>M.O</b>	<b>13,76</b>	<b>9,82</b>	<b>4,13</b>

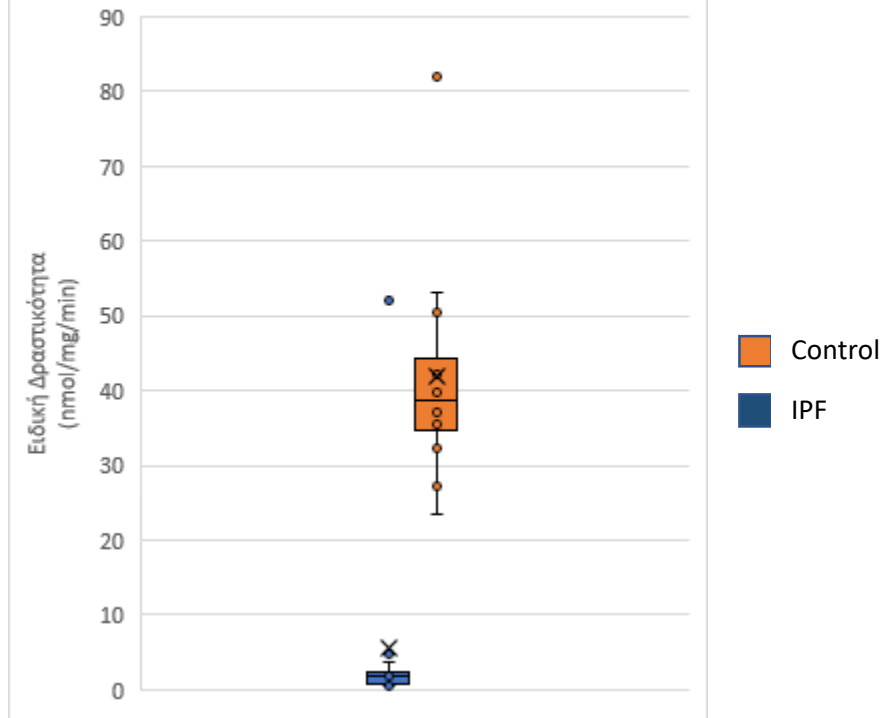
**Αποτελέσματα από προηγούμενες έρευνες σε δείγματα ασθενών:**

Δείγμα	Ειδική Δραστικότητα Rot <sup>-</sup>	Ειδική Δραστικότητα Rot <sup>+</sup>	Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα
1	9,2	3,4	5,8
2	6,31	2,87	3,44
3	4,6	1,72	2,87
8	5,74	3,4	2,34
11	5,17	2,3	2,87
<b>M.O</b>	<b>6,2</b>	<b>2,74</b>	<b>3,46</b>

**Αποτελέσματα από προηγούμενες έρευνες σε δείγματα υγιών ατόμων (control):**

Δείγμα (Control)	Ειδική Δραστικότητα Rot <sup>-</sup>	Ειδική Δραστικότητα Rot <sup>+</sup>	Ειδική Ενζυμική Δραστικότητα
1	40,14	4,57	35,57
2	85,42	3,42	82
3	42,4	4,57	37,83
4	29,1	5,71	23,39
5	35,71	3,44	32,27
6	57,14	4	53,14
7	48,57	6,28	42,29
8	53,97	3,44	50,53
9	49	9,18	39,82
10	50	13	37
11	37,9	10,6	27,3
12	122,05	81,52	40,53
<b>M.O</b>	<b>54,28</b>	<b>12,48</b>	<b>41,81</b>

### Σύγκριση Τιμών Δραστικότητας του Συμπλόκου I



#### 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μετρήθηκε η ειδική ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (Σύμπλοκο I) σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση. Η πνευμονική ίνωση είναι μία αυτοάνοση πολυσυστηματική νόσος που προκαλεί εμφάνιση δομής «κηρήθρας» στο πνευμονικό επιθήλιο που έως και σήμερα παραμένει αγνώστου αιτιολογίας (Sgalla et al., 2018). Το πείραμα διεξήχθη σε μιτοχόνδρια από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά, μετρώντας την οξειδωση του NADH σε NAD<sup>+</sup>, παρουσία και απουσία ροτενόνης. Η ροτενόνη είναι μια ισοφλαβόνη, που αναστέλλει τη λειτουργία του Συμπλόκου I. Έτσι, η διαφορά των τιμών **Rot<sup>-</sup> - Rot<sup>+</sup>** αντιστοιχεί στην ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν να εξεταστεί η υπόθεση μιτοχονδριακής προέλευσης της πνευμονική ίνωσης.

Οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστικότητας του Συμπλόκου I που βρέθηκαν, συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές υγιών ατόμων (control). Πράγματι, οι περισσότερες τιμές ενζυμικής δραστικότητας ασθενών με πνευμονική ίνωση ( $M.O_{ασθενών}=4,13$  nmol/min/mg) ήταν μικρότερες από τις τιμές control ( $M.O_{control}=41,81$  nmol/min/mg). Οι τιμές συγκρίθηκαν με τιμές προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου που αφορούσε την ίδια νόσο και επαληθεύτηκε η μειωμένη ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I. Επομένως σαν πρώτο συμπέρασμα θα μπορούσαμε να πούμε ότι άτομα με πνευμονική ίνωση εμφανίζουν μειωμένη δραστικότητα του Συμπλόκου I σε σχέση με υγιή άτομα. Έχει βρεθεί ότι το Σύμπλοκο I είναι η κύρια περιοχή διαρροής ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, προκαλώντας μειωμένη δραστικότητα του εν λόγω Συμπλόκου που οδηγεί στην οξειδωση του οξυγόνου σε ανιόν υπεροξειδίου. Το ανιόν υπεροξειδίου αντιδρά με μονοξειδίο του αζώτου προς σχηματισμό δραστικών ριζών υπεροξυνιτρώδους (Liu and Chen J., 2017). Οι δραστικές αυτές ρίζες οξυγόνου (ROS) αντιδρούν τόσο με μόρια DNA, RNA όσο και με πρωτεΐνες του κυττάρου προκαλώντας μη αναστρέψιμη βλάβη που οδηγεί σε απόπτωση και άρα στην ασυνέχεια επιθηλίου των κυψελίδων, που παρατηρείται στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Cheresh et al., 2014). Σε χαμηλές ROS υπάρχει ένας επιλεκτικός τρόπος απομάκρυνσης και καταστροφής των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων, τα οποία ταυτόχρονα αντικαθίστανται μέσω μιας άλλης διαδικασίας, της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Η PTEN-induced kinase 1 (PINK1) αποτελεί το κύριο μόριο στην μιτοφαγία των μιτοχονδρίων. Σε άτομα με πνευμονική ίνωση όπου το stress είναι πιο έντονο, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατά συνέπεια η ανεπάρκεια της PINK1 προκαλεί χαμηλή ενζυμική δραστικότητα των συμπλόκων I και IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και ανεπαρκή μιτοφαγία οδηγώντας σε απόπτωση κυψελιδικών κυττάρων που είναι χαρακτηριστικό κλινικό σημείο της νόσου (Tsubouchi et al., 2018).

Στους ασθενείς Δ5,9,13,15 φάνηκε πολύ μικρή τιμή ενζυμικής δραστικότητας, συγκεκριμένα μεταξύ 1,0-1,42 nmol/min/mgr ενώ παράλληλα ο μέσος όρος ηλικίας αυτών των ατόμων είναι τα 66 έτη. Βάσει διάφορων ερευνών έχει δείχθει ότι η γήρανση προκαλεί μειωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Young and Copeland, 2016). Ακόμη μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια (Woltersetal., 2015) καθώς και έκθεση σε χημικούς παράγοντες έχει φανεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση πνευμονικών ασθενειών εκ των οποίων και η ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Plantieretal., 2017). Επομένως η μειωμένη ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου

I στους παραπάνω ασθενείς με πνευμονική ίνωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου παραγόντων (γήρανση, μεταλλάξεις και περιβαλλοντικοί παράγοντες).

Η διαχείριση των ασθενών με πνευμονική ίνωση επικεντρώνεται στη βελτίωση των συμπτωμάτων, τη διατήρηση της πνευμονικής λειτουργίας και την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης. Ένας τρόπος θεραπείας που έδειξε ότι αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης ήταν η μεταμόσχευση πνεύμονα. Εναλλακτικά γίνεται χρήση φαρμάκων τα οποία ελαττώνουν τον βήχα (Vigeland et al., 2017).

Εν κατακλείδι φαίνεται πως πίσω από την παθολογία της πνευμονικής ίνωσης κύρια αιτία αποτελεί η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Το Σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας σε άτομα με πνευμονική ίνωση υπολειτουργεί συγκριτικά με αυτό των υγιών ατόμων. Αυτό φαίνεται από τις τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας του Συμπλόκου I που λήφθηκαν από ασθενείς και από υγιή άτομα (control).

Τέλος όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι σύνολο πολλών παραγόντων. Επομένως είναι απαραίτητα και άλλα τεκμηριωμένα στοιχεία για την πλήρη κατανόηση της αιτιολογίας της νόσου. Σε επόμενες έρευνες θα μπορούσαν να ελεγχτούν και άλλοι παράγοντες όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός των δραστικών ριζών οξυγόνου.

## Βιβλιογραφία

- Aburto M., Herráez I., Iturbe D., Romero AG., Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Differential Diagnosis, *Medical Sciences*, 6:73 (2018)
- Ahmad M., Wolberg A. and Kahwaji Cl., Biochemistry, Electron Transport Chain, *National Library of Medicine*(2014)
- Alston L., Rocha MC., Lax NZ., Turnbull DM and Taylor TW., The genetics and pathology of mitochondrial disease, *Journal of Pathology*, 241: 236–250 (2017)
- ChereshP., Kim SJ.,Tulasiram S., Kamp DW., Oxidative Stress and Pulmonary Fibrosis”, *BiochimicaBiophysica Acta*. 1832(7): 1028–1040 (2013)
- Cottin V., Hirani NA., Hotchkin DL., Presentation, diagnosis and clinical course of the spectrum of progressivefibrosing interstitial lung diseases, *Eur Respir Rev*, 27: 1806, (2018)
- Dormandy TL., Free-radical reaction in biological systems, *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, vol. 62 (1962)
- Guiot J., Moermans C., Henket M., CorhayJL.,Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Lung* ,195:273–280 (2017)
- GurczynskiSJ., Moore BT, IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,1040-0605/18 (2018)
- Hambly N. Shimbori C., Kolb M., Molecular classification of idiopathic pulmonary fibrosis: Personalized medicine, genetics and biomarkers, *Asian Pacific Society of Respiriology*, 1010–1022 (2015)
- Hewlett JC., Kropski JA. and Blackwell TS, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epithelial-mesenchymalinteractions and emerging therapeutic targets, *Journal Matrix Biology*, 112–127 (2018)
- Hogan BLM, Barkauskas CA., Chapman HA., Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function, *Cell Stem Cell*,15(2): 123–138 (2014)
- Huang H., Peng X., Nakajima J., Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan, *BioScience Trends*,7(4):172-177 (2013)
- Janikiewicz J., Szymański J. ,Malinska D.,Cazes A., Dinh-Xuan AT., Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics, *Cell Death and Disease* , 9:332 (2018)

- Kaur A, Mathai SK. Schwartz AD, Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment, *Frontiers in Medicine*, Volume 4 article 154, (2017)
- Knudsen L., Ochs M., The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components, *Histochemistry and Cell Biology*, 150:661–676 (2018)
- Kramer P. and Bressan P., Our (Mother's) Mitochondria and Our Mind, *Perspectives on Psychological Science*, Vol. 13, 88–100 (2018)
- Laurent Plantier, Physiology of the lung in idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur Respir Rev*, 27: 170062 (2018)
- Ley B., Brown KK., Collard HR, Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis, *Journal of American Physiological Society*, 1040-0605/14, (2014)
- Liu X., Chen Z., The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases, *Journal of Translational Medicine*, 15:207 (2017)
- Martin WF., Garg S. and Zimorski V., Endosymbiotic theories for eukaryote origin, *The royal society*, 370: 20140 (2015)
- Mathai KS., Schwartz DA, Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment, *Frontiers in medicine*, volume 4, article 124 (2017)
- Mora AL, Rojas M., Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 127, Number 2 (2017)
- Nakamura Y., Suda T., Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Clinical Manifestations, *Clinical Medicine insights: Circulatory, respiratory and pulmonary Medicine* (2015)
- Pajares M., Cuadrado A., Engedal N., Jirsova Z., The Role of Free Radicals in Autophagy Regulation: Implications for Ageing", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2017)
- Rangarajan S., Bernard K., Thennickal VJ., Mitochondrial Dysfunction in Pulmonary Fibrosis, *Annals ATS*, Volume 14 Supplement 5 (2017)
- Richeldi L., Collard HR., Jones MG., Idiopathic pulmonary fibrosis, *Lancet* 389: 1941–52 (2017).
- Roger AJ, Mun SA., Kamikawa R., The Origin and Diversification of Mitochondria, *Current Biology*, 1177–1192, November 6, (2017)
- Salton F., Volpe MC. and Confalonieri M., Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Journal Medicina*, 55-83 (2019)
- Sgalla G., Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management, *Respiratory Research* (2018)
- Sgalla G., Biff A., Richeldi L., Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history, *Asian Pacific Society of Respiratory*, 427–482 (2016)
- Tarasov A., Griffiths EG., Rutter GA., Regulation of ATP production by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>, *Cell Calcium*, 28-35 (2012)

- Thomeer M., Grutters GC., Wuyts WA., Willems S., Demedts MG., Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis, *Respiratory Research*, (2010)
- Tilokani L., Nagashima S., Paupe J., Prudent J, Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms, *Essays in Biochemistry*, 62 341–360 (2018)
- (Tsubouchi K., Araya J. and Kuwano K., PINK1-PARK2-mediated mitophagy in COPD and IPF pathogenesis, *Inflammation and Regeneration* (2018)
- Vigeland CL., Hughes AG., Horton MR., “Etiology and treatment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis”, *Respiratory of Medicine*, 98-104 (2017)
- Vliet D., Oxidative Stress in chronic lung disease: from mitochondrial dysfunction to dysregulated redox signaling”, *Molecular Aspects of Medicine*, 63: 59–69 (2018)
- Wolters PJ., Collard HR., Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Annual Review of Pathology*, 9: 157–179 (2014)
- Zank DC., Bueno M., Mora AL., Rojas M., Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aging, Mitochondrial Dysfunction, and Cellular Bioenergetics, *Frontiers in Medicine*, vol. 5 , article 1 (2018)
- Zhang JM., Cytokines, Inflammation and Pain”, *International Anesthesiological Clinic*, 45(2): 27–37 (2007)



