

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

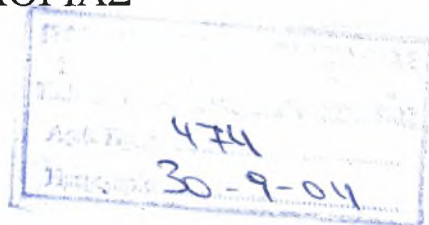
«Αλληλεπιδράσεις μονοκυττάρων-λαμίνης:Σύνδεση μετά από
φωσφορυλίωση ή οξειδωση. Διαφορές μεταξύ φυσιολογικών
ατόμων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II»

Ελένη Α. Κωστίδου

Διπλωματική εργασία

Παν. Έτος: 2003-2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



«Αλληλεπιδράσεις μονοκυττάρων-λαμινίνης:Σύνδεση μετά από φωσφορυλίωση ή οξειδωση. Διαφορές μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II»

Ελένη Α. Κωστίδου

Διπλωματική εργασία

Παν. Έτος: 2003-2004



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

Αριθ. Εισ.: 3973/1

Ημερ. Εισ.: 09-11-2004

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΩΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075123

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κολιάκος Γεώργιος-Αναπληρωτής καθηγητής-Επιβλέπων
Κουρέτας Δημήτριος- Αναπληρωτής καθηγητής
Σταθόπουλος Κωνσταντίνος- Αναπληρωτής καθηγητής

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο βιολογικής
χημείας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ -----	4
ABSTRACT -----	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ -----	6
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ -----	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ -----	8
1.ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΟΥΣΙΑ-ΒΑΣΙΚΕΣ MEMBRANES -----	8
2.ΛΑΜΙΝΙΝΕΣ -----	10
α)ΓΕΝΙΚΑ-----	10
β)ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ-----	10
γ)ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ-----	13
δ)ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ-----	13
3.ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ -----	14
α)ΓΕΝΙΚΑ-----	14
β)ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΛΑΜΙΝΙΝΗ-----	15
γ)ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ- ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ-ΔΙΑΒΗΤΗΣ-----	16
4.ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ -----	18
α)ΓΕΝΙΚΑ- ΤΥΠΟΙ-----	18
β)ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ IDDM ΚΑΙ NIDM-----	18
γ)ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ-----	19
δ)ΔΙΑΒΗΤΗΣ- ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS-----	20
5.ΕΚΤΟΠΡΩΤΕΙΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ -----	21
α)ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ- ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ-----	21
β)ΕΚΤΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ-----	23
γ)ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΑΤΡ-----	24
δ)ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΑΠΟ ΕΚΤΟΚΙΝΑΣΕΣ-----	25
ε)ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ-----	26
6.ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ -----	27
α)ΓΕΝΙΚΑ-----	27

β)ΘΞΕΙΔΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ-----	28
γ)ΘΞΕΙΔΩΣΗ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ-----	30
δ)ΘΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΑΠΟ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ-----	30
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-----	31
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>-----	32
ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΙΧΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ-----	32
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΟ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ-----	33
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΣΕΡΙΝΗ, ΜΕ SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ -----	34
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ -----	37
ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΘΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ-----	38
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΘΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ -----	39
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-----	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-----	40
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΣΕΡΙΝΗ-----	40
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ -----	41
ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΘΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ-----	47
ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΘΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ -----	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-----	53
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-----	58
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>-----	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μονοκύτταρα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης, μιας πάθησης που προσβάλλει συχνά τα αγγεία ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων με τη λαμινίνη, την κύρια πρωτεΐνη σύνδεσης των κυττάρων στις βασικές μεμβράνες των αγγειακών ενδοθηλίων. Τα μονοκύτταρα προέρχονται είτε από υγιείς εθελοντές είτε από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Επειδή προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι τα μονοκύτταρα φωσφορυλιώνουν τη λαμινίνη και ότι αυτή η φωσφορυλίωση επηρεάζει την σύνδεσή μονοκυττάρων - λαμινίνης έγιναν και πειράματα σύνδεσης κάτω από συνθήκες φωσφορυλίωσης.

Τα μονοκύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη παρουσίαζαν αυξημένη ικανότητα σύνδεσης στη λαμινίνη σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από φυσιολογικά άτομα. Η παρουσία του ATP αύξανε την ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων φυσιολογικών ατόμων στη λαμινίνη, ενώ ο αναστολέας της φωσφορυλίωσης K252b εμπόδιζε αυτό το αποτέλεσμα.. Αντίθετα, η παρουσία του ATP δεν επηρέαζε την προσκόλληση στη λαμινίνη των μονοκυττάρων των ατόμων που έπασχαν από διαβήτη. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σύνδεση των φυσιολογικών μονοκυττάρων στη λαμινίνη σχετίζεται και με τη φωσφορυλίωση του μορίου αυτού. Αντίθετα στο διαβήτη δε φαίνεται να υπάρχει σχέση ανάμεσα στις δύο αυτές λειτουργίες.

Στη συνέχεια της μελέτης δείξαμε ότι τα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τη λαμινίνη. Εξετάσθηκε η σύνδεση των μονοκυττάρων φυσιολογικών ατόμων και διαβητικών ασθενών σε οξειδωμένη λαμινίνη και συγκρίθηκε με τη σύνδεση των ίδιων κυττάρων στο μη οξειδωμένο μόριο. Η σύνδεση μονοκυττάρων – οξειδωμένης λαμινίνης μελετήθηκε και παρουσία ATP καθώς και του αναστολέα K252b. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι, όπως παρατηρήθηκε και με την μη οξειδωμένη λαμινίνη, έτσι και στην περίπτωση του οξειδωμένου μορίου τα μονοκύτταρα των ασθενών με διαβήτη παρουσίαζαν αυξημένη σύνδεση στη λαμινίνη σε σχέση με τα φυσιολογικά μονοκύτταρα.. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων συνδέονται λιγότερο στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με την μη οξειδωμένη λαμινίνη. Αντίθετα τα μονοκύτταρα των ασθενών με διαβήτη συνδέονται εξ ίσου και στις δύο μορφές. Τέλος, βρέθηκε ότι τόσο στα μονοκύτταρα των φυσιολογικών ατόμων, όσο και σ' αυτά των ασθενών, η παρουσία του ATP δεν επηρέαζε την προσκόλλησή τους στο οξειδωμένο μόριο της λαμινίνης.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι πιθανόν η οξειδωμένη λαμινίνη αναγνωρίζεται από διαφορετικούς υποδοχείς σύνδεσης από ότι το φυσιολογικό μόριο. Φαίνεται ότι τα μονοκύτταρα των ασθενών με διαβήτη φέρουν στην επιφάνειά τους περισσότερους υποδοχείς ειδικούς για οξειδωμένη λαμινίνη. Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται να αναγνωρίζουν την οξειδωμένη λαμινίνη ανεξάρτητα από την παρουσία του ATP.

ABSTRACT

Monocytes play a central role in the development of atheromatosis, that usually attacks the vessels of patients with diabetes mellitus. In the present study the attachment of monocytes to laminin, the main cell binding protein of basement membranes, has been examined. Monocytes were prepared from blood samples taken either from healthy volunteers or from patients with diabetes mellitus. Previous studies, had shown that monocytes phosphorylate laminin and this phosphorylation influences the attachment of monocytes to laminin, therefore cell attachment experiments were performed under phosphorylation conditions as well.

Monocytes derived from patients with diabetes mellitus, showed an increased attachment to laminin, as compared to those derived from controls. The presence of ATP increased attachment rate of control monocytes to laminin, whereas the inhibitor K252b counteracted this result. On the contrary, the presence of ATP did not affect the attachment of monocytes derived from diabetic patients to laminin. These findings indicate that the attachment of normal monocytes to laminin is associated with the phosphorylation of that molecule. On the contrary, in diabetes mellitus no association between these functions is evident.

A second series of experiments indicated that control monocytes can oxidize laminin. Therefore oxidized laminin attachment of control and diabetic patients monocytes has been examined and directly compared with the non-oxidized molecule monocytes attachment. These experiments were also performed in the presence of either ATP or and ATP plus the inhibitor K252b. The results indicated that, similarly to the non oxidized laminin, diabetic patients monocytes attached more to laminin as compared to normal monocytes. Furthermore, normal monocytes attached less to the oxidized as compared to the non-oxidized molecule. In contrast, monocytes derived from diabetic patients did attach equally to both laminin forms. In the case of oxidized monocyte attachment was not influenced by the presence of ATP neither in controls nor in diabetics.

The results indicate that oxidized and normal laminin are recognized by different receptors. Probably monocytes from diabetic patients on their surface more oxidized laminin specific receptors. These receptors seem to attach to oxidized laminin on an ATP independent manner.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας εξαιτίας της ιδιαίτερης δομής και των χαρακτηριστικών που έχουν.

Οι λαμινίνες, μαζί με τις φιμπρονεκτίνες, είναι οι πλέον μελετημένες γλυκοπρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας και έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας τρισδιάστατων δικτύων, τα οποία παρέχουν στον ιστό τα φυσιολογικά του χαρακτηριστικά (Ekblom et al., 2003).

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετήσουμε την ικανότητα προσκόλλησης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη τόσο σε φυσιολογικά άτομα, όσο και σε διαβητικούς, καθώς και το πώς αυτή μπορεί να επηρεαστεί από διαδικασίες όπως η οξειδωση και η φωσφορυλίωση.

Αυτή η σειρά πειραμάτων αποτελεί συμβολή στην ερευνητική προσπάθεια που ξεκίνησε στο εργαστήριο βιολογικής χημείας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, το 1991. Εξετάσαμε κατ' αρχήν την προσκόλληση μονοκυττάρων που προέρχονταν από φυσιολογικά άτομα στη λαμινίνη σε σχέση με τη φωσφορυλίωση και την οξειδωση του μορίου αυτού. Τέλος, στη μελέτη συμπεριλάβαμε και δείγματα μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων με διαβήτη τύπου ΙΙ σε μια προσπάθεια διερεύνησης σχέσης μεταξύ επιπλοκών και οξειδωσης ή εξωκυττάριας φωσφορυλίωσης της λαμινίνης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Και πρώτα τον αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής κ. Γ. Κολιάκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο βιολογικής χημείας. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις συμβουλές του και την αμέριστη υποστήριξή του όλον αυτό τον καιρό. Μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω σ' ένα άρτια οργανωμένο εργαστήριο, ήταν πάντα δίπλα μου σε ότι και αν χρειαζόμουν και με την καθοδήγησή του με έκανε να αγαπήσω ακόμα περισσότερο την έρευνα. Τον ευχαριστώ επίσης για τη διόρθωση της παρούσας εργασίας και τη συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής μου, τον κ. Δ. Κουρέτα και τον κ. Κ. Σταθόπουλο, καθηγητές του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη και διόρθωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στους κυρίους Α. Τσάπα, λέκτορα παθολογίας και Κ. Παλέτα, αναπληρωτή καθηγητή παθολογίας της Β παθολογικής κλινικής του Ιπποκράτειου νοσοκομείου Θεσσαλονίκης οι οποίοι μας παρείχαν τα δείγματα του αίματος καθώς και τις απαραίτητες πληροφορίες. Η συνεργασία τους και η συνεισφορά τους ήταν πολύτιμες κατά πραγματοποίηση της εργασίας αυτής. Επίσης ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια ιστολογίας κ. Κ. Κουζή-Κολιάκου, για την πραγματοποίηση του πειράματος ανίχνευσης της καζεϊνικής κινάσης τύπου ΙΙ στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, και όλα τα σχετικά στοιχεία που μου διέθεσε.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου βιολογικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη φίλη και συμφοιτήτριά μου Κωνσταντίνα Τοπουρίδου για την πρότασή της να πραγματοποιήσω κι εγώ όπως και εκείνη την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο βιολογικής χημείας, καθώς και τον Ευθύμιο Χριστοφορίδη για την πολύτιμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων κάθε φορά που τη χρειαζόμουν.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΟΡΩΝ

ABAP	2,2' (2-μεθυλπροπιοναμιδίνη)	διυδροχλωρίδιο,	97%
	(2,2' methylpropionamide-		
		dihydrochloride,	
			97%
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosin triphosphate)		
BSA	λευκωματίνη ορού βοδιού (bovine serum albumin)		
cpm	κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute)		
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide)		
DNPH	Δινιτροφαινόλη		
ECM	εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix)		
EDTA	αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetracetic acid)		
EGF	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermic growth factor)		
EHS σάρκωμα	Engelberth-Holms-Swarm σάρκωμα		
FCS	ορός εμβρύου μόσχου (fetal calf serum)		
HEPES	'N- 2-υδροξυ-αιθυλ πιπεραζινο-'N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ (N-2-hidroxy-ethyl piperazine- 'N- 2-ethanesulfonic acid)		
HRP	υπεροξειδάση από ραπανάκι (Horseradish peroxidase)		
IDDM	ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (insulin-dependent diabetes mellitus)		
LDL	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low density lipoprotein)		
NIDM	μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (non- insulin-dependent diabetes mellitus)		
PBS	ουδέτερο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate-buffered saline)		
PKA	πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A)		

PKC	πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C)
ROS	ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)
rpm	στροφές ανά λεπτό (rounds per minute)
SDS	δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (sodium dodecyl-sulfate)
TBS	ρυθμιστικό διάλυμα Tris (tris-buffered saline)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

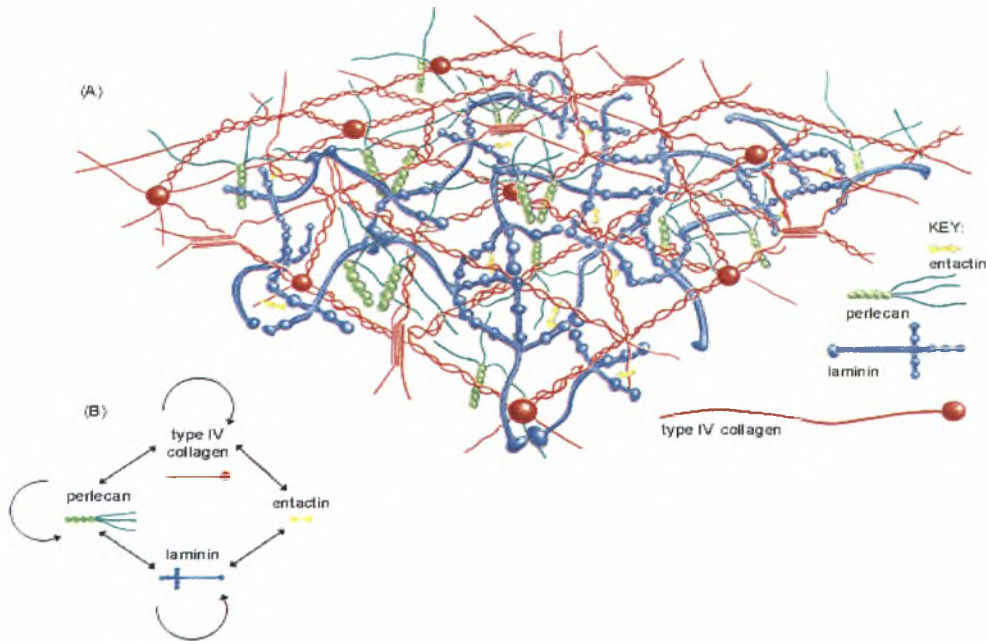
1. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΟΥΣΙΑ- ΒΑΣΙΚΕΣ MEMBRANES

Τα κύτταρα των ιστών, συνδέονται μεταξύ τους και συνιστούν ένα οργανωμένο λειτουργικό σύνολο. Τα περισσότερα κύτταρα εκκρίνουν βιομόρια, που συνήθως παραμένουν στη γειτονία της πλασματικής μεμβράνης, σχηματίζοντας την εξωκυττάρια ουσία (*extracellular matrix-ECM*). Με τον όρο εξωκυττάρια ουσία αναφερόμαστε σε ένα σύστημα αλληλοσυμπλεκόμενων μακρομορίων, που παρεμβάλλονται μεταξύ κυττάρων και ιστών και επηρεάζουν τη συμπεριφορά τους (Bruijn et al., 1988). Η εξωκυττάρια ουσία, αλληλεπιδρά με τις γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια της κυτταρικής επιφάνειας και συμβάλλει σημαντικά στην επιβίωση και λειτουργικότητα των κυττάρων και ιστών. Η εξωκυττάρια ουσία περιέχει: α) ινώδεις πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους διακρίνονται σε δομικές (ελαστίνη, κολλαγόνο) και σε πρωτεΐνες προσκόλλησης (λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη), και β) γλυκοζαμινογλυκάνες, είτε ελεύθερες είτε συνδεδεμένες με πρωτεΐνες - πρωτεογλυκάνες (Lohr et al., 1991). Σε ορισμένους ιστούς, όπως στα οστά και τους τένοντες, το εξωκυττάριο στρώμα είναι άφθονο και εξαιρετικά σημαντικό από μηχανική άποψη. Αντίθετα, σε ιστούς όπως στους μύες και την επιδερμίδα, είναι λιγιστό και το μηχανικό φορτίο το αναλαμβάνουν τα κύτταρα μέσω του κυτταροσκελετού. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κάθε τύπος ιστού χαρακτηρίζεται από έναν μοναδικό συνδυασμό βιομορίων της ECM. Παράλληλα, είναι χαρακτηριστικό πως η εξωκυττάρια ουσία έχει την ικανότητα να ανακυκλώνεται.

Οι διάφοροι τύποι εξωκυττάριας ουσίας βρίσκονται στον χαλαρό συνδετικό ιστό, στους τένοντες, τα οστά, τους χόνδρους και τις βασικές μεμβράνες. Όσον αφορά τις τελευταίες, πρόκειται για λεπτές στιβάδες εξωκυττάριας ουσίας με ιδιαίτερη σύσταση και λειτουργία. Είναι εξωκυττάρια σχηματισμοί πάχους 50-200 nm και αποτελούνται από ένα δίκτυο κολλαγόνου, γλυκοπρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών. Βασικές μεμβράνες διαθέτουν όλα τα σπονδυλωτά, αλλά και τα ασπόνδυλα, με μοναδική εξαίρεση τους σπόγγους. Συνήθως, υπόκεινται του επιθηλίου των διαφόρων

συστημάτων (πεπτικό, αναπνευστικό, ουροποιητικό), αλλά συχνά περιβάλλουν ολόκληρο τον ιστό (Kefalides et al., 1979). Σε ορισμένες περιπτώσεις οι βασικές μεμβράνες διαχωρίζουν τα κύτταρα από τον ιστό που τα περιβάλλει (επιθήλιο, νεφροί).

Μορφολογικά η βασική μεμβράνη διαιρείται στις τρεις ακόλουθες στιβάδες: τη διαυγή (*lamina lucida*), την πυκνή (*lamina densa*) και σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει και μια ακόμη με ίνες κολλαγόνου (*lamina fibroreticularis*) (Kefalides et al., 1979). Τα κύρια συστατικά των βασικών μεμβρανών είναι τα μακρομόρια της εξωκυττάριας ουσίας, όπως το κολλαγόνο τύπου IV (σε τριμερή μορφή που διακόπτεται από μη ελικοειδείς περιοχές), η λαμινίνη, η εντακτίνη και περλεκάνη (*eik 1.1*) (Charonis & Tsilibary 1990, Yurchenco & Schittny, 1990). Η παραπάνω σύσταση προσδίδει στην όλη δομή συγκεκριμένη λειτουργικότητα. Έτσι, οι βασικές μεμβράνες συμβάλλουν στη διαμερισματοποίηση των αναπτυσσόμενων οργάνων, στη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ παρεμποδίζουν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω συστατικών με τα κύτταρα είναι καθοριστικές για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και διαφοροποίησης (Sorokin et al., 2001). Παράλληλα, οι βασικές μεμβράνες λειτουργούν και ως εκλεκτικά φίλτρα διήθησης, ενώ επηρεάζουν και το φαινότυπο παρακείμενων κυττάρων. Παράλληλα, μελετάται και η συμβολή τους σε διεργασίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η προσκόλληση των κυττάρων και η επούλωση των τραυμάτων.



Εικόνα 1.1: Σύσταση των βασικών μεμβρανών.

Αν και η ακριβής σύσταση των βασικών μεμβρανών δεν είναι ίδια σε όλους τους ιστούς, το βασικό μοντέλο είναι κοινό. Έτσι, η δομή τους είναι αποτέλεσμα απευθείας συνδέσεων ανάμεσα στην περλεκάνη, τη λαμινίνη, την εντακτίνη και το κολλαγόνο τύπου IV (Yurchenco & Schittny, 1991).

Τα τελευταία χρόνια οι βασικές μεμβράνες και τα συστατικά τους αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας, δεδομένων των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Είναι γεγονός ότι μεγάλη ώθηση στην έρευνα της βιοχημείας των βασικών

μεμβρανών έδωσε η ανακάλυψη του σαρκώματος EHS (Engelberth-Holm-Swarm). Πρόκειται για όγκο που είναι μεταμοσχεύσιμος υποδόρια σε μύες και παράγει μεγάλη ποσότητα βασικής μεμβράνης (Orkin et al., 1977).

2. ΛΑΜΙΝΙΝΕΣ

α) Γενικά

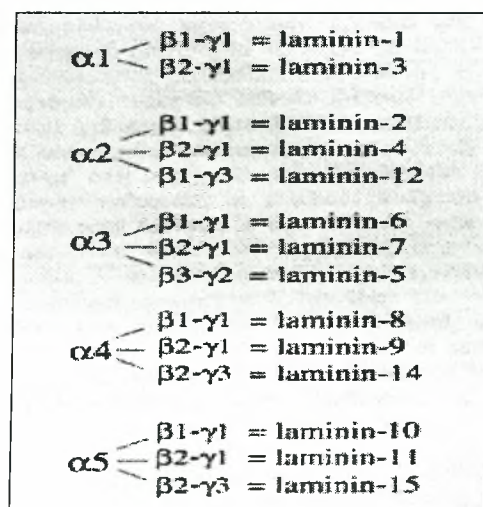
Οι λαμινίνες, μαζί με τις φιμπρονεκτίνες, αποτελούν τις πιο μελετημένες, μετά τα κολλαγόνα, οικογένειες γλυκοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Η πρώτη περιγραφή τους, επιτεύχθηκε μετά από απομόνωση από τον όγκο EHS των ποντικών (Timpl et al., 1979) και καλλιέργειες κυττάρων τερατοκαρκινώματος, (Chung et al., 1979). Η πρώτη λαμινίνη, που απομονώθηκε από τον Timpl από υλικό του όγκου EHS ονομάζεται *λαμινίνη-1* (Timpl et al., 1979, Dziadek & Timpl, 1985).

Γενικά, οι λαμινίνες είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που αποτελούν συστατικά των βασικών μεμβρανών και εμπλέκονται σε γεγονότα αλληλεπίδρασης μεταξύ παρεγχύματος και συνδετικού ιστού. Αποτελούν τις πιο πρώιμες πρωτεΐνες προσκόλλησης, που εμφανίζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Είναι χαρακτηριστικό ότι ανιχνεύτηκαν κατά το στάδιο των 2-κυττάρων στα έμβρυα ποντικού.

β) Δομή και ισομορφές

Η λαμινίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους ($M_r=450,000-900,000$). Συνθέτεται από 3 αλυσίδες, τις α , β και γ , που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (Ekblom & Timpl, 1996). Οι λαμινίνες έχουν είτε σχήμα σταυρού είτε σχήμα T (ταφ). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πέντε α , τρεις β και τρεις γ αλυσίδες που με διαφορετικούς συνδυασμούς δίνουν 15 ισομορφές λαμινίνης (Ponce et al., 2002, Kariya & Miyazaki, 2004). Καθεμιά από τις τρεις αλυσίδες κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο και μετάλλαξη αυτών μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση σοβαρών ασθενειών (De Arcangelis et al., 2001). Η *λαμινίνη-1* είναι της μορφής, $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (εικ. 2.1) και περιέχει μια βαριά αλυσίδα ($M_B=400$ kDa) και δύο ελαφριές την $\beta 1$ και τη $\gamma 1$ ($M_B=230$ και 220 kDa αντίστοιχα). Είναι χαρακτηριστικό ότι κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα περιέχει τουλάχιστον 1500 αμινοξέα.

Θα πρέπει να αναφερθεί πως ο αριθμός των ισομορφών στα θηλαστικά είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο στη *Drosophila* ή τον *C. elegans* (Ekblom et al., 2003).



Εικ. 2. 1: Οι 15 διαφορετικές ισομορφές λαμινίνης που απαντώνται στα θηλαστικά και οι αντίστοιχοι συνδυασμοί των α , β και γ αλυσίδων (Ekblom et al.,2003)

Από τις πέντε α αλυσίδες που βρέθηκαν, οι $\alpha 1$, $\alpha 2$ και $\alpha 5$ είναι μακριές, σε αντίθεση με τις $\alpha 3$ και $\alpha 4$ που είναι πιο κοντές. Παρατηρείται μεγάλη ποικιλία στο αμινοτελικό τους άκρο, αλλά ένα κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η παρουσία στην καρβοξυτελική περιοχή όλων των αλυσίδων, μιας σφαιρικής περιοχής, του τομέα G - G-domain (Colognato & Yurchenco, 2000). Όσον αφορά τις τρεις β αλυσίδες, οι $\beta 1$ και $\beta 2$ εμφανίζουν ομολογία σε ποσοστό 50%, ενώ η $\beta 3$, 36%. Την πιο ευρεία εξάπλωση την έχει η αλυσίδα $\beta 1$ που εντοπίζεται στους περισσότερους ιστούς. Ευρεία ιστική εξάπλωση έχει και η αλυσίδα $\gamma 1$, σε αντίθεση με τις άλλες δύο, την $\gamma 3$ και $\gamma 2$.

Ο συνδυασμός των διαφορετικών ισομορφών των παραπάνω αλυσίδων έδωσε γένεση σε 15 διαφορετικούς τύπους λαμινίνης, αλλά οι ερευνητές πιστεύουν ότι στο μέλλον θα περιγραφούν και άλλες ισομορφές. Τα περισσότερα στοιχεία που είναι γνωστά αφορούν κυρίως τις λαμινίνες 1-7.(πιν.2.2)

Πίνακας 2.2: Παλιά ονομασία και εντοπισμός των μορίων λαμινίνης 1-7 (Burgeson et al., 1994, Timpl, 1996)

<i>Ισομορφή</i>	<i>Παλιά ονομασία</i>	<i>Εντοπισμός</i>
Λαμινίνη 1	Κλασσική λαμινίνη	Στους περισσότερους ιστούς
Λαμινίνη 2	Μεροσίνη	Καρδιά, πλακούντας, μύες
Λαμινίνη 3	S-λαμινίνη	Νεφρός, νευρομυϊκή σύναψη
Λαμινίνη 4	S-μεροσίνη	Τροφοβλάστης
Λαμινίνη 5	Καλινίνη/νισεΐνη	Επιδερμικά αγκυροβολητικά ινίδια
Λαμινίνη 6	K-λαμινίνη	Επιδερμικά αγκυροβολητικά ινίδια
Λαμινίνη 7	KS-λαμινίνη	Ένωση επιδερμίδας-δερμίδας

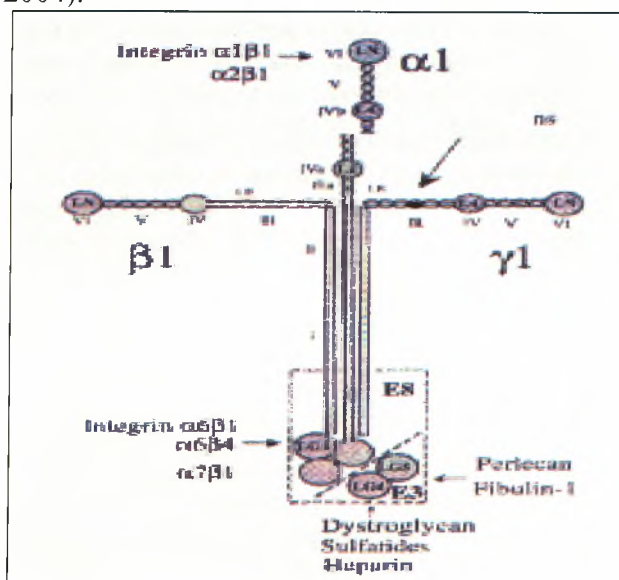
Όπως αναφέρεται στον παραπάνω πίνακα, η *λαμινίνη-1* απαντάται στους περισσότερους ιστούς, αλλά κάποιες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι αυτή η ισομορφή της λαμινίνης δεν εντοπίζεται στο μυελό των οστών και στο τοίχωμα των περισσότερων αγγείων (Falk et al., 1999). Αντίθετα, εκεί συναντώνται οι ισομορφές 8 και 10 που είναι της μορφής $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ και $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ αντίστοιχα (Ekblom et al.,2003). Το κοινό αυτών των ισομορφών με τη *λαμινίνη-1* είναι ότι έχουν ίδιες β και γ αλυσίδες. ($\beta 1$, $\gamma 1$).

Οι λειτουργίες που επιτελούν οι λαμινίνες είναι απόρροια της χαρακτηριστικής τους δομής. Σχετικά με την εύρεση των δομικών χαρακτηριστικών των μορίων λαμινίνης, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στη *λαμινίνη-1*, η βασική δομή της οποίας υπάρχει σε όλες τις λαμινίνες με ορισμένες τροποποιήσεις.

Όπως παρατηρούμε και στην *εικόνα 2.1* η *λαμινίνη-1* περιλαμβάνει τρεις κοντούς βραχίονες, ο ένας 48nm και οι άλλοι δύο από 34 nm, που συνδέονται με έναν

μακρύ βραχίονα μήκους 77 nm (Bruch et al., 1989, Engel et al., 1981). Έπειτα από ανάλυση ακολουθίας προσδιορίστηκαν οι διάφορες περιοχές της. Χαρακτηριστικό των α αλυσίδων είναι η παρουσία στο καρβοξυτελικό άκρο πέντε LG (laminin globular) διαμορφώσεων. Αν και οι τρεις αλυσίδες έχουν πολλές κοινές περιοχές, οι LG του αμινοτελικού άκρου εντοπίζονται μόνο στην α αλυσίδα (Ekblom et al., 2003). Οι περιοχές I και II, περιέχουν έναν τριπλό σπείραμα α έλικας που σχηματίζει την μακριά περιοχή που ομοιάζει με ραβδί (rod-like). Ομοιοπολικές συνδέσεις μεταξύ των τριών αλυσίδων πραγματοποιούνται στην περιοχή I, ενώ μεταξύ μόνο των β και γ στην περιοχή II (Tunggal et al., 2000). Οι περιοχές III και V έχουν πρωτοταγή αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνη και γλυκίνη και μάλιστα συμβατή με διαμόρφωση πλούσια σε έλικες που σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις 60 αμινοξέων, με ομολογία προς τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) (Timpl & Brown, 1994).

Οι περιοχές πρόσδεσης των ιντεγκρινών $\alpha 1\beta 1$ και $\alpha 2\beta 1$ εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο της $\alpha 1$ αλυσίδας. Στο σχήμα 2.1 παρατηρούνται και κάποιες περιοχές E3 και E8 που αποτελούν υποστρώματα για την προσκόλληση κυττάρων. Έτσι, στην E8 υπάρχουν οι περιοχές σύνδεσης με τις ιντεγκρίνες $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ και $\alpha 7\beta 1$, ενώ στην E3 περιοχές σύνδεσης με περλεκάνες, ηπαρίνη κ.τ.λ. Όσον αφορά την περιοχή σύνδεσης της ηπαρίνης, θα πρέπει να αναφερθεί πως είναι κοινή για όλους τους τύπους α αλυσίδων της λαμινίνης, με εξαίρεση την $\alpha 4$ όπου διαφέρει (Yamashita et al., 2004).



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του μορίου της λαμινίνης-1 στην οποία διακρίνονται οι λειτουργικές περιοχές της (Ekblom et al., 2003).

Οι διάφορες περιοχές της λαμινίνης μελετήθηκαν πρωταρχικά μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης.

μεμβρανών και της εξωκυττάριας ουσίας, ενώ μερικές από αυτές μεσολαβούν επίσης στη διακυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία (Krissansen, 2001). Αποτελούνται από δύο υπομονάδες α και β, το εξωκυτταρικό τμήμα των οποίων δεσμεύει διάφορες πρωτεΐνες προσκόλλησης και το κυτταροπλασματικό ενώνεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Το εναλλακτικό μάτισμα των mRNA των δύο υπομονάδων έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη 24 ετεροδιμερών υποδοχέων ιντεγκρίνης για σύνδεση με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας.

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τουλάχιστον εννέα ιντεγκρίνες που συνδέονται στη λαμινίνη, οι α1β1, α2β1, α3β1, α6β1, α6β4, α7β1, α9ββ1, ανβ3 και ανβ8 (Sonnenberg et al., 1990, Sonnenberg et al., 1991). Από τις παραπάνω, η α6β1 είναι η πιο μελετημένη, εξαιτίας του σημαντικού βιολογικού ρόλου και της ευρείας κατανομής της.

Πέρα από τις ιντεγκρίνες υπάρχουν και μη ιντεγκρινικοί υποδοχείς της λαμινίνης. Παραδείγματος χάριν, οι συνδεκάνες που αποτελούν βοηθητικούς υποδοχείς, ο υποδοχέας 67 KDa που σχετίζεται με τη μετάσταση και συνδέεται στο πεπτίδιο YIGSR της α1 αλυσίδας και μια 90 KDa που εκφράζεται σε κύτταρα του μελανώματος και δεσμεύεται στην β1 αλυσίδα και συγκεκριμένα στο πεπτίδιο F9 (Koliakos et al., 1991). Επίσης, η ασπαρτακτάμη των σκελετικών μυών για το κλάσμα E3 (Hall et al., 1988) και τέλος, την αδυστρογλυκάνη που ενώνει τη λαμινίνη με τα ινίδια των μυϊκών κυττάρων.

3. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

α. Γενικά

Τα έμμορφα συστατικά του αίματος διακρίνονται σε ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα. Τα λευκοκύτταρα διακρίνονται σε κοκκώδη και άκοκκα. Τα κοκκώδη είναι τα ουδετερόφιλα, τα εωσινόφιλα και τα βασεόφιλα, ενώ τα άκοκκα τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκαν τα μονοκύτταρα του αίματος και κατά κύριο λόγο η ικανότητα πρόσδεσής τους στη λαμινίνη.

Το μονοκύτταρο αποτελεί το μεγαλύτερο κύτταρο του αίματος με διάμετρο 10-18μm. Από πλευράς μορφολογίας, το κύτταρο αυτό εμφανίζει ευμεγέθη πυρήνα, άφθονο κυτταρόπλασμα, μέσα στο οποίο υπάρχουν πολλά ένζυμα, όπως φωσφατάσες, υπεροξειδάσες, εστεράσες και αζουρόφιλα κοκκία (εμφανίζονται σαν σκόνη). Τα οργανίδια του είναι καλά αναπτυγμένα και για το λόγο αυτό το μονοκύτταρο εκδηλώνει σημαντική δραστηριότητα.

Από πλευράς προέλευσης, τα μονοκύτταρα προέρχονται κυρίως από τον μυελό των οστών (ίσως και από το ήπαρ και τους λεμφαδένες) και συγκεκριμένα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών. Ένας μεγάλος αριθμός μονοκυττάρων εξέρχεται από το αίμα προς τους ιστούς, και αποτελεί τα μακροφάγα των ιστών.

Οι λειτουργίες των μονοκυττάρων, τόσο αυτών που βρίσκονται στο αίμα όσο και αυτών που βρίσκονται στους ιστούς, οφείλονται στα άφθονα λυσοζυμικά ένζυμα που περιέχουν. Στις λειτουργίες αυτές περιλαμβάνονται η αντιμικροβιακή δράση, δηλαδή η φαγοκυττάρωση, η οποία είναι 5 με 10 φορές εντονότερη αυτής των ουδετεροφίλων, αλλά λιγότερο ειδική. Συγκεκριμένα, σε μια λοίμωξη, μετά από μια αρχική αύξηση του αριθμού των ουδετεροφίλων, αυξάνει ο αριθμός των μονοκυττάρων στα οποία αντικαθιστούν τα ουδετερόφιλα. Επίσης, τα μονοκύτταρα μετέχουν σε ορισμένες φάσεις της ανοσολογικής αντίδρασης.

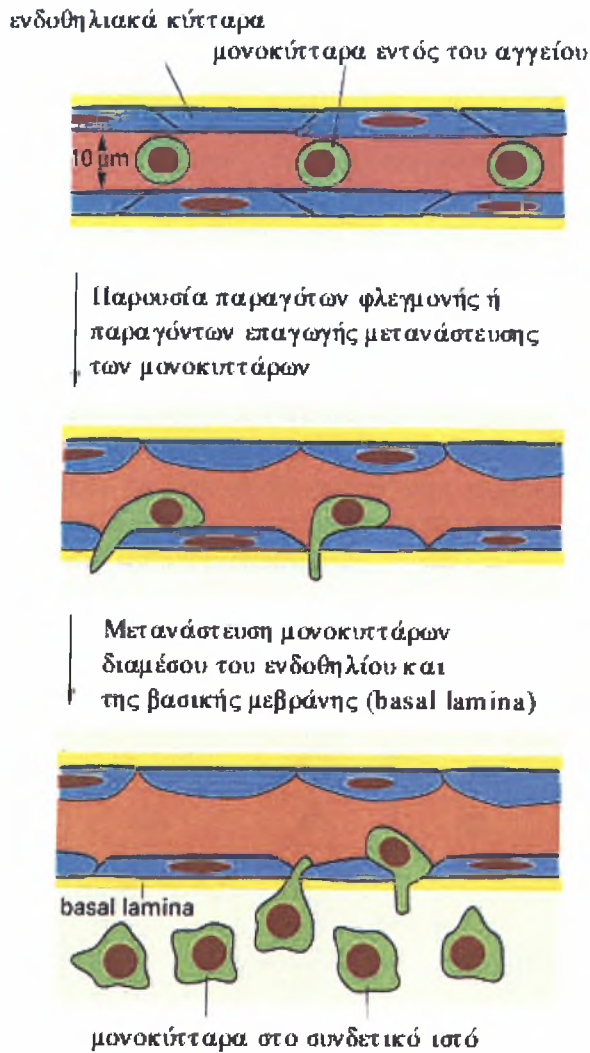
Η φαγοκυτταρική ικανότητα επιτυγχάνεται μέσω της μετατροπής τους σε μακροφάγα των ιστών που φαγοκυττάρωνουν και αποικοδομούν τους ξένους,

εισβολείς μικροοργανισμούς. Παράλληλα περιέχουν ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη διάλυση ιστικών υπολειμμάτων μετά από χρόνιες φλεγμονές ενώ εκκρίνουν και πλήθος ουσιών που μετέχουν σε διαδικασίες όπως η επαγωγή της κυτταρικής αύξησης, ή και του κυτταρικού θανάτου.

Τα μονοκύτταρα παραμένουν στην κυκλοφορία για μικρό χρονικό διάστημα, και συγκεκριμένα για 3 μέρες. Τέλος, η τυπική συγκέντρωσή τους στο αίμα του ανθρώπου είναι 4×10^8 κύτταρα/λίτρο.

β. Μονοκύτταρα και λαμινίνη

Τα μονοκύτταρα εμφανίζουν έντονη κινητικότητα, στοιχείο που τα καθιστά ικανά να αλληλεπιδρούν με πλήθος άλλων κυττάρων καθώς και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα κυττάρων με τα οποία αλληλεπιδρούν τα μονοκύτταρα, ενώ η λαμινίνη και η φιβρονεκτίνη αντίστοιχα παραδείγματα συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix). Η προσκόλληση με τα τελευταία γίνεται κυρίως μέσω ιντεγκρινών, αλλά μετέχουν και άλλα είδη υποδοχέων. Αποτέλεσμα της προσκόλλησης είναι η επαγωγή μιας σειράς διαδικασιών που περιλαμβάνουν τη μετανάστευση, την κυτταροτοξικότητα, την παραγωγή πλήθους παραγόντων φλεγμονής κ.α. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλληλεπίδρασης μονοκυττάρων με τα συστατικά της ECM είναι κατά τη μετανάστευση των πρώτων σε περιοχή μόλυνσης. Η μεταφορά είναι αποτέλεσμα γεγονότων δέσμησης-αποδέσμησης μεταξύ μονοκυττάρων και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (εικ.3.1) (Owen et al., 1992).



Εικόνα 3.1: Διαδικασία μετανάστευσης των μονοκυττάρων

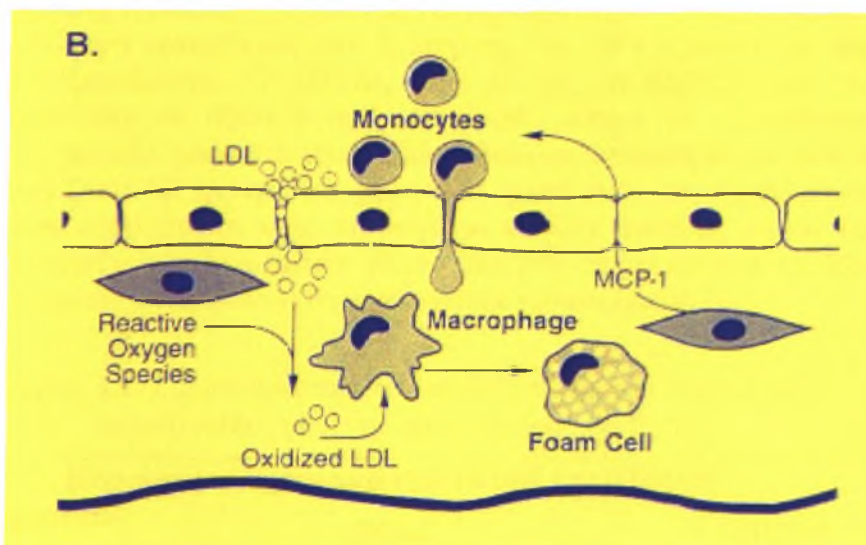
γ. Μονοκύτταρα- αθηρωμάτωση- διαβήτης

Αθηρογένεση ή αθηρωμάτωση είναι η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζεται η αθηρωματική πλάκα που μπορεί να οδηγήσει στην αθηροσκλήρωση και τελικά στη σκλήρυνση του τοιχώματος των αρτηριών. Πρόκειται για μια φλεγμονώδη νόσο που χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον έσω χιτώνα των αρτηριών μέσω συσσώρευσης λιπιδίων, ινώδους ιστού και συστατικών του αίματος (Badimon, 2001). Οι διαφορετικοί τύποι αθηρωμάτωσης ποικίλουν ανάλογα με την ποσότητα της ολικής χοληστερόλης και τον φραγμό στη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών LDL. Η υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδιακών φραγμών παρατηρήθηκε κατά την ισχαιμία, και σχετίζεται με τον αριθμό των LDL υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων (Pawlicki et al., 2003).

Τα μονοκύτταρα φαίνεται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόκληση της αθηρωμάτωσης, μιας πάθησης που εμφανίζεται συχνά σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (Blaha et al., 2004). Συγκεκριμένα, αφού συνδεθούν με το αγγειακό ενδοθήλιο, περνούν ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο. (εικ.3.2). Έναυσμα για αυτή τους τη μετακίνηση αποτελούν ειδικοί επιφανειακοί παράγοντες που εμφανίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν υπάρχει τοπικά κάποια δυσλειτουργία (φλεγμονή, τραύμα κλπ). Εκεί συναντούν τις

χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDLs), που αποτελούν μέσο μεταφοράς της χοληστερόλης και τις οξειδώνουν. Η οξείδωση περιλαμβάνει υπεροξείδωση των μη κορεσμένων λιπαρών οξέων, υδροξυλίωση της χοληστερόλης και οξείδωση των καταλοίπων των αμινοξέων της αποπρωτεΐνης. Στον υποενδοθηλιακό χώρο τα μονοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν τις οξειδωμένες LDL και στη συνέχεια μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα στη συνέχεια συναθροίζονται και δίνουν το έναυσμα για την πρόκληση της αθηρωμάτωσης, καθώς αλληλεπιδρώντας με τους ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και άλλα μονοκύτταρα επάγεται μεγάλη συνάθροιση χοληστερόλης η οποία περιβάλλεται από συνδετικό ιστό και έτσι σχηματίζεται η αθηρωματική πλάκα (Takahashi et al., 2002). Μάλιστα, το κέντρο της αθηρωματικής πλάκας που σχηματίζεται είναι νεκρωτικό και αποτελείται από άμορφα, νεκρωτικά λιπιδιακά συστατικά, που μοιάζουν με κόλλα, καθώς και από κρυστάλλους χοληστερόλης (Takahashi et al., 2002).

Με βάση λοιπόν τα όσα προαναφέρθηκαν, συμπεραίνουμε πως οι ιδιότητες της κυτταρικής προσκόλλησης και μετανάστευσης των μονοκυττάρων σχετίζονται άμεσα με την έναρξη της αθηρωμάτωσης.



Εικόνα 3.2: Ο ρόλος των μονοκυττάρων στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι τα μονοκύτταρα αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου και κυρίως της υδροξυλικής ρίζας, του υπεροξειδίου του οξυγόνου, του υπεροξειδικού ανιόντος και της υπερχλωρικής ρίζας. Την ικανότητα αυτή την έχουν και άλλα κύτταρα του αίματος, όπως τα εωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα.

Έπειτα από μια φλεγμονώδη διαδικασία, πραγματοποιείται ξαφνική απελευθέρωση μονοκυττάρων, αλλά και εωσινοφίλων, μακροφάγων και ουδετεροφίλων, στην κυκλοφορία, προκειμένου να φτάσουν στο σημείο που απαντάται το παθογόνο αίτιο. Το λευκοκύτταρο που έχει δεχτεί κάποιο ερέθισμα, αυξάνει γρήγορα και έντονα την κατανάλωση οξυγόνου, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

4.ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

α .Γενικά- Τύποι

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια συνήθη πάθηση που προσβάλλει περίπου το 1-2% του πληθυσμού στον δυτικό κόσμο. Οι περισσότερες περιπτώσεις σακχαρώδη διαβήτη είναι πρωτοπαθείς, δηλαδή δε σχετίζονται με άλλες καταστάσεις. Χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης με επακόλουθη ανεπάρκεια στις μεταβολικές δράσεις της. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η διαρκής υπεργλυκαιμία. Διακρίνονται δύο ξεχωριστοί τύποι, ο τύπος I-ινσουλινοεξαρτώμενος (IDDM, *insulin-dependent diabetes mellitus*) και ο τύπος II- μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης (NIDM, *non insulin-dependent diabetes mellitus*).

β. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των IDDM και NIDM

Στον τύπο I (ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης), παρατηρείται καταστροφή των β-κυττάρων των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος και ουσιαστικά ουδεμία έκκριση ινσουλίνης. Στον τύπο II, (μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης), είτε είναι ανεπαρκής η έκκριση ινσουλίνης για να αποφευχθεί η υπεργλυκαιμία, είτε παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας στη δράση της. Το 20% περίπου των ασθενών είναι ινσουλινοεξαρτώμενοι. Ο IDDM, που αλλιώς ονομάζεται και νεανικός διαβήτης, εμφανίζεται σε οξεία μορφή σε νεαρά άτομα με συμπτώματα που εξελίσσονται σε περίοδο ημερών ή λίγων εβδομάδων, σε αντίθεση με τον NIDM, που τείνει να εμφανίζεται σε πιο χρόνια μορφή σε μεσήλικες και ηλικιωμένους, με συμπτώματα που εξελίσσονται κατά τη διάρκεια πολλών συνήθως μηνών (Garber, 2004). Γενικά μεταξύ των δύο αυτών τύπων διαβήτη υπάρχουν πολλές διαφορές, κάποιες από τις οποίες αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. (πιν. 4.1)

Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά του ινσουλινοεξαρτώμενου και μη ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη

Κύρια χαρακτηριστικά των IDDM και NIDDM		
Χαρακτηριστικά	IDDM	NIDDM
Τυπική ηλικία έναρξης	Παιδιά, νέοι ενήλικες	Μεσήλικες, ηλικιωμένοι
Έναρξη	Οξεία	Βαθμιαία
Ιδιοσυστασία	Αδύνατοι	Συχνά παχύσαρκοι
Απώλεια βάρους	Συνήθης	Ασυνήθης
Τάση για κέτωση	Συνήθως	Όχι συνήθως
Συγκέντρωση ινσουλίνης πλάσματος	Χαμηλή ή απύουσα	Συχνά φυσιολογική, μπορεί να είναι όμως και ανεβασμένη
Ιστορικό οικογενειακού διαβήτη*	Ασύνηθες	Σύνηθες
Συσχέτιση με HLA αντιγόνα ιστοσυμβατότητας*	DR3, DR4	καμία

*Ο IDDM είναι οικογενής σε μικρή συχνότητα, όμως παρατηρείται συσχέτισή του με μερικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA, τα οποία είναι γενετικά καθορισμένα και

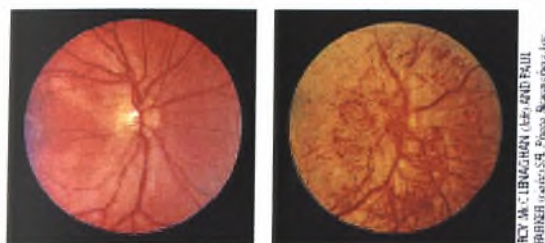
σχετίζονται με πλήθος αυτοάνοσων ασθενειών. Πιθανότατα λοιπόν και ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης να αποτελεί μια αυτοάνοση ασθένεια.

γ. Κλινικές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη

Παρά την εντατική έρευνα και τα σημαντικά βήματα που έχουν γίνει στη διαδικασία ελέγχου του μεταβολισμού της γλυκόζης, οι διαβητικοί ασθενείς παρουσιάζουν μεγάλες πιθανότητες εμφάνισης μιας σειράς κλινικών επιπλοκών που μπορούν, αν δεν αντιμετωπιστούν εγκαίρως, να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Οι επιπλοκές αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις μικροαγγειακές και τις μακροαγγειακές. Στις μικροαγγειακές πάσχουν τα μικρά, ενώ στις μακροαγγειακές τα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία (ADA-American Diabetes Association, 2003 g). Κάθε μία από τις παραπάνω κατηγορίες περιλαμβάνει συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις (πιν. 4.2) (Bowes, 2003).

Πίνακας 4.2: Αγγειακές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη

Μικροαγγειακές επιπλοκές	Μακροαγγειακές επιπλοκές
Αμφιβληστροπάθεια	Στεφανιαία νόσος
Νεφροπάθεια	Νόσος των περιφερειακών αγγείων
Νευροπάθεια	Ισχαιμία
	Δερματικά προβλήματα
	Στοματικά προβλήματα



τη διάρκεια του διαβήτη.

Η διαβητική αμφιβληστροπάθεια εμφανίζεται σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με διαβήτη τύπου I και στο 60% των ασθενών με διαβήτη τύπου II. Η πρώτη ένδειξη εμφάνισης της ασθένειας είναι η απώλεια όρασης (ADA, 2003 c). Επίσης, η εμφάνιση της παραπάνω επιπλοκή σχετίζεται με

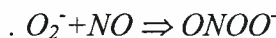
Κλινική ένδειξη διαβητικής νεφροπάθειας είναι η μικροαλβουμιουρία, που χαρακτηρίζεται από την ανεύρεση μικρών αλλά όμως όχι φυσιολογικών συγκεντρώσεων αλβουμίνης στα ούρα (ADA, 2003, b). Η μικροαλβουμιουρία αποτελεί δείκτη δυσλειτουργίας των βασικών μεμβρανών και για το λόγο αυτό συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακό επεισόδιο. Όσον αφορά τη διαβητική νευροπάθεια, είναι κοινή σε ασθενείς με προβλήματα στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης, υψηλά επίπεδα λιπιδίων και υψηλή πίεση αίματος. Στην περίπτωση της στεφανιαίας νόσου, υπάρχει πλήθος παραγόντων που συμβάλλουν σ' αυτή. Διαρκής έκθεση σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τέλος, στην περίπτωση της νόσου των περιφερειακών αγγείων, αναπτύσσεται αθηρωμάτωση στις αρτηρίες των χεριών και των ποδιών (Gibbons, 1998). Για την καθυστέρηση της εμφάνισης των κλινικών επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη μπορεί γίνεται προσπάθεια διατήρησης κατά το δυνατόν της γλυκόζης και των λιπιδίων σε φυσιολογικά επίπεδα και μείωση της πίεσης του αίματος (Bowes, 2003).

δ. Διαβήτης, αθηρωμάτωση και οξειδωτικό stress

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, οι ασθενείς με διαβήτη παρουσιάζουν από 2 έως 4 φορές συχνότερα αθηροσκλήρωση σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Παράλληλα, οι αγγειακές επιπλοκές αποτελούν το κύριο αίτιο θανάτου των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Οι μηχανισμοί που συνδέουν την ανάπτυξη των επιπλοκών αυτών με το διαβήτη είναι οι ακόλουθοι: η ενδοκυττάρια υπεργλυκαιμία που επάγει αυξημένη ενεργότητα της μεταβολικής οδού των πολυολών και μεταβολές στην ενεργότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (King & Brownlee, 1996), η μη ενζυμική γλυκοσυλίωση πρωτεϊνών (King & Brownlee, 1996) και το οξειδωτικό stress (MacDonald-Wicks et al., 2004). Παραπάνω παραθέσαμε κάποιες πληροφορίες για το ρόλο του οξειδωτικού stress στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά σ' αυτή τη διαδικασία.

Τα τελευταία 20 χρόνια αποδείχτηκε πως το φυσιολογικό επιθήλιο ρυθμίζει τη ροή του αίματος, εμποδίζει την προσκόλληση και εισβολή φλεγμονωδών κυττάρων και καταστέλλει το σχηματισμό θρόμβου (Ross, 1999). Οι παραπάνω λειτουργίες του ενδοθηλίου διαμεσολαβούνται από το νιτρικό οξύ (NO) και εξασθενούν κατά την αθηρωμάτωση. Σε ασθενείς με διαβήτη παρατηρείται μείωση του βιοδιαθέσιμου NO, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει αύξηση του αριθμού των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (οξειδωτικό stress) (Suwaidi et al., 2000, Woods et al., 2003).

Το ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) αντιδρά με το NO ως εξής:

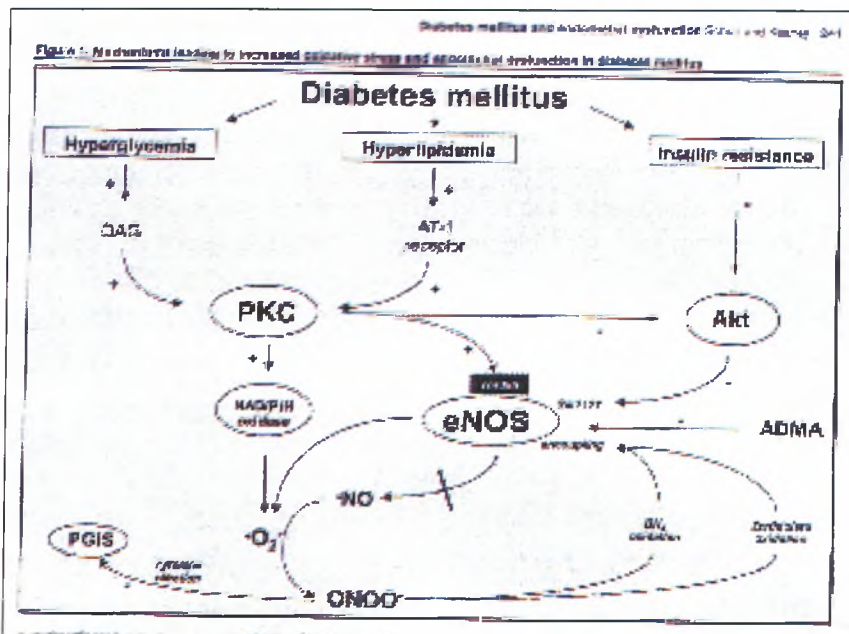


Πηγή των παραπάνω ανιόντων είναι οι NADPH οξειδάσες, τα μιτοχόνδρια και η συνθάση του ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος (eNOS) (Hink et al., 2001).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το οξειδωτικό stress διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. Η αυξημένη παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-), από πηγή όπως η NADPH οξειδάσες, επάγει πιο εκτεταμένη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, μέσω σύνθεσης του περοξυνιτρίτη ($ONOO^-$). Για παράδειγμα, ο περοξυνιτρίτης επάγει την αποσύνδεση της ενδοθηλιακής νιτρικής συνθάσης και τη νιτροποίηση της τυροσίνης της συνθάσης των προσταγλανδινών (PGIS). (εικ. 4.2)

Η υπεργλυκαιμία, χαρακτηριστικό του σακχαρώδους διαβήτη, εμποδίζει την ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής νιτρικής συνθάσης (eNOS) μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης της σερίνης της στη θέση 1177 που μεσολαβείται από την κινάση Akt και επαγωγής της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης στη θέση 495, που σχετίζεται με την απενεργοποίηση της eNOS. Αυτό επιτυγχάνεται με ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C μέσω διακυλογλυκερόλης (DAG). Είναι χαρακτηριστικό ότι και η υπερλιπιδαιμία επάγει την ενεργοποίηση της PKC, με ανεξάρτητο όμως μηχανισμό. (εικ. 4.2). Τελικό αποτέλεσμα είναι η εκτεταμένη παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-) που αλληλεπιδρά με το νιτρικό οξύ και δίνει ONOO⁻.

Παράλληλα, η ανθεκτικότητα σε ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης Akt, με συνέπεια την περιορισμένη φωσφορυλίωση της ενδοθηλιακής νιτρικής συνθάσης στη σερίνη 1177. Τέλος, συνάθροιση του αναστολέα της eNOS, ασύμμετρη διμεθυλ-L-αργινίνη (ADMA), πιθανότατα να μειώνει σημαντικά την παραγωγή νιτρικού οξέος.



Εικόνα 4. 2: Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυξημένο οξειδωτικό stress και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου κατά το σακχαρώδη διαβήτη (Schutz&Keaney, 2003).

Η εμπλοκή των μονοκυττάρων στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας καθώς και οι τυχόν αλλαγές της λειτουργίας τους λόγω της υπεργλυκαιμίας που παρατηρείται στον διαβήτη, αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας.

5. ΕΚΤΟ-ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΣΗ

α. Φωσφορυλίωση- αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών

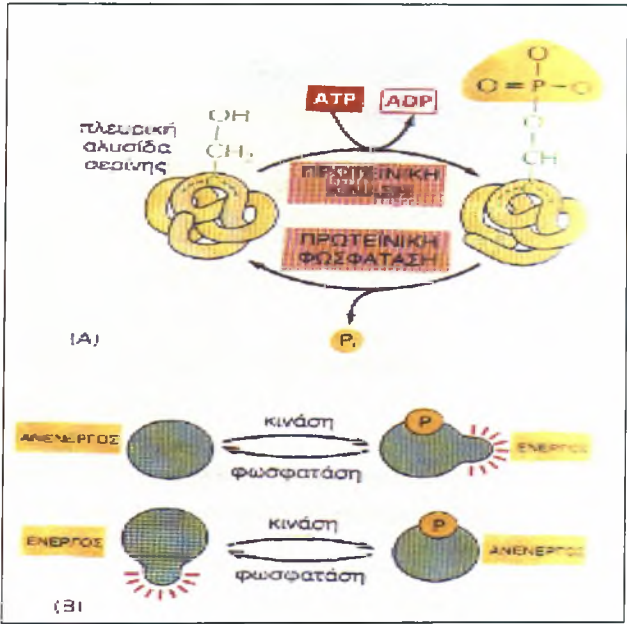
Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP προς τα υδροξύλια των υπολειμμάτων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνών (Kinzel et al., 2003). Πρόκειται για έναν αντιστρεπτό μηχανισμό, δεδομένου ότι υπάρχει και μια κατηγορία ενζύμων που αποφωσφορυλιώνουν τις φωσφοπρωτεΐνες, οι φωσφατάσες.

Αυτός ο αντιστρεπτός μηχανισμός φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών ελέγχει τη λειτουργία πολλών διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, περίπου το 1/3 των 10.000 πρωτεϊνών ενός κοινού κυττάρου θηλαστικού πιστεύεται ότι είναι φωσφορυλιωμένο. Η προσθήκη και η αφαίρεση φωσφορικών ομάδων από τα ειδικά ένζυμα συχνά συμβαίνει ως απάντηση σε σήματα που προδιαγράφουν κάποια μεταβολή στην κατάσταση του κυττάρου. Για παράδειγμα, η σειρά των γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διαίρεση ενός ευκαρυωτικού κυττάρου προγραμματίζεται χρονικά με αυτό το μηχανισμό. Επίσης, πολλά από τα σήματα που παράγονται από ορμόνες και νευροδιαβιβαστές μεταφέρονται από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα με μια ακολουθία αντιδράσεων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Μάλιστα, η δραστηριότητα των κινασών αποτελεί σε ορισμένες περιπτώσεις στόχο των δευτέρων αγγελιοφόρων που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου έπειτα από σύνδεση π. χ ορμονών με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους.

Τα κύτταρα περιέχουν εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες, που καθεμιά είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή μιας ομάδας αυτών. Παράλληλα, υπάρχει και πλήθος πρωτεϊνικών φωσφατασών που είτε είναι πολύ ειδικές και αφαιρούν τη φωσφορική ομάδα από μια πρωτεΐνη ή από ποικιλία αυτών. Επομένως, η κατάσταση φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης σε δεδομένη χρονική στιγμή και η δραστηριότητά της, εξαρτάται από την ενεργότητα των κινασών και φωσφατασών που επιδρούν σ' αυτή. Γενικά, ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης χρησιμοποιείται από τα κύτταρα προκειμένου να αντιληφθούν το εξωτερικό περιβάλλον και να αποκριθούν σε αυτό με τον κατάλληλο τρόπο.

Είναι σήμερα γενικά αποδεκτό ότι η φωσφορυλίωση/ αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πλήθους διεργασιών, όπως στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Kinzel et al., 2003, Krebs & Beavo, 1979).



Εικόνα 5.1: Μηχανισμός φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών

β. Εκτοπρωτεϊνικές κινάσες

Η κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος ρυθμίζονται από εξωκυττάρια διαδικασίες σηματοδότησης που περιλαμβάνουν τη δράση πλήθους ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης. Αν και η κυρίως έρευνα επικεντρώθηκε στην κατανόηση του ρόλου των ενδοκυττάρια πρωτεϊνικών κινασών, τα τελευταία χρόνια αποδείχτηκε και η παρουσία δράσης εκτοπρωτεϊνικών κινασών στην επιφάνεια πολλών κυτταρικών τύπων. Πρόκειται για πρωτεϊνικές κινάσες που η ενεργός τους περιοχή προσανατολίζεται προς το εξωτερικό του κυττάρου, και είτε εξαρτώνται από το cAMP, είτε είναι ανεξάρτητες από τα διάφορα κυκλικά νουκλεοτίδια. (Kubler&Kinzel, 2003). Δεδομένου ότι η κυτταρική επιφάνεια εμπλέκεται άμεσα σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάρια ουσίας, η δράση των κινασών αυτών στην επιφάνεια της μεμβράνης, παρέχει έναν καινοτόμο ρυθμιστικό μηχανισμό για τα κύτταρα, ώστε να επικοινωνήσουν και να αλληλεπιδράσουν με το περιβάλλον τους.

Συνοψίζοντας λοιπόν, αυτές οι κινάσες, που δρουν εξωκυτταρικά και παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, ονομάζονται εκτοκινάσες ή εκτοπρωτεϊνικές κινάσες. Μεταξύ των υποστρωμάτων τους συγκαταλέγονται αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής ή και συστατικά της εξωκυττάρια ουσίας (Kubler&Kinzel, 2003).

Οι εκτοκινάσες έχουν αναγνωριστεί σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, ενώ στους περισσότερους από αυτούς έχουν χαρακτηριστεί. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη δράση των εκτοπρωτεϊνικών κινασών που εντοπίζονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων. Τόσο αυτές, όσο και οι αντίστοιχες άλλων κυττάρων του αίματος αλλά και του ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν μελετηθεί και μερικώς χαρακτηριστεί. (πιν.5.1)

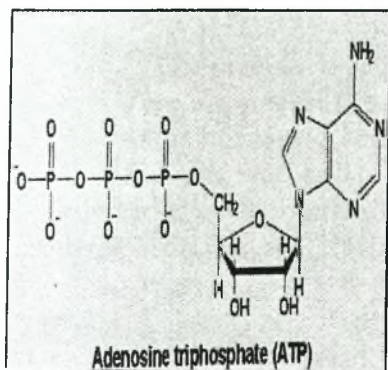
Πίνακας 5.1: Παραδείγματα εκτοκινασών που απαντώνται στην επιφάνεια κυττάρων του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Κυτταρικός τύπος	Χαρακτηριστικά εκτοκινάσης	Βιβλιογραφία
Μονοκύτταρα	c-AMP ανεξάρτητη*	<i>Geberhiwot & Skoglund, 1997</i>
Ουδετερόφιλα	c-AMP ανεξάρτητη, ευαίσθητη στην ηπαρίνη	<i>Skubitz & Goueti, 1991</i>
Αιμοπετάλια	c-AMP εξαρτώμενη, TPA-ανεξάρτητη PKC	<i>Hatmi et al., 1996</i>
Μακροφάγα	c-AMP ανεξάρτητη	<i>Amano et al., 1984</i>
T-λεμφοκύτταρα	Καζεϊνική κινάση τύπου II	<i>Redegeld et al., 1997</i>
Πολυμορφοπύρρηνα λεμφοκύτταρα	c-AMP ανεξάρτητη	<i>Emes & Crawford, 1982</i>

* Όπως θα δούμε και παρακάτω, σήμερα υπάρχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα είδη των κινασών που απαντώνται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων.

Οι εκτοκινάσες μετέχουν σε πλήθος διεργασιών, όπως στην κυτταρική ανάπτυξη, στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

κυττάρων. Ένα ερώτημα που προέκυψε σχετικά με αυτές, ήταν το πώς μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη. Τα τελευταία χρόνια έγιναν προσπάθειες από πολλούς ερευνητές να διερευνηθεί ο τρόπος μεταφοράς και προτάθηκαν αρκετοί μηχανισμοί. Το πιο πιθανό όμως, είναι να γίνεται με τη βοήθεια μορίων που εξυπηρετούν σαν μεταφορείς, όπως οι πολυαμίνες και οι πρωτεΐνες του θερμικού πλήγματος (*heat shock proteins*) (Heufelder et al., 1992).



γ. Εξωκυττάριο ATP

Το ATP (εικ.5.2, αριστερά) είναι ένα ενεργειακά πλούσιο μόριο που αποτελείται από μια αδενίνη, μια ριβόζη και τρεις φωσφορικές ομάδες. Θα πρέπει να αναφερθεί, πως η παρουσία του ATP στον εξωκυττάριο χώρο είναι απαραίτητη για τη δράση των εκτοπρωτεϊνικών κινασών.

Σύμφωνα με πλήθος δημοσιεύσεων, το εξωκυττάριο ATP μετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες στα ζώα αλλά και στα φυτά. Έτσι, στα φυτά έχει ανασταλτικές επιδράσεις στην κατανομή της αυξίνης (Tang et al., 2003). Είναι όμως γεγονός ότι ο ρόλος του στα ζώα είναι καλύτερα μελετημένος. Εμπλέκεται σε διαδικασίες του νευρικού, καρδιαγγειακού και ανοσολογικού συστήματος. Βρέθηκε ότι εμποδίζει την απόπτωση και επάγει την κυτταρική βιωσιμότητα στη μυελώδη προγενετική σειρά κυττάρων μέσω επαγωγής παραγωγής της ιντερλευκίνης-4 (Palaga et al., 2004). Επίσης, μελέτη σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού έδειξε ότι το εξωκυττάριο ATP μετέχει στην κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Gonzalez et al., 1989). Καθοριστικός είναι ο ρόλος του στην επαγωγή αγωγιμότητας στην πλασματική μεμβράνη των μακροφάγων (Tang et al., 2003), στη μυϊκή συστολή, τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και την κυτταρική ανάπτυξη. (Redegeld et al., 1999). Παράλληλα, δρώντας μέσω των πουρινεργικών P2 υποδοχέων, το εξωκυττάριο ATP οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (Michoud&, συν, 2003). Τέλος, δρα και στον υποδοχέα VR1 (capsaicin), ένα κανάλι ιόντων που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής των χημικών και φυσικών ερεθισμάτων που παράγονται κατά τη διάρκεια του πόνου. Συγκεκριμένα, το ATP ενεργοποιεί τους παραπάνω υποδοχείς, με πιθανό αποτέλεσμα την πρόκληση πόνου και την υπεραλγησία (Tomimaga et al., 2001).

Ο πιο συχνός μηχανισμός παραγωγής εξωκυτταρίου ATP λαμβάνει χώρα μετά από κυτταρικό τραυματισμό. Ακολουθεί αυτόλυση του κυττάρου, έκκριση και έξοδος του ATP μέσω μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης, όπως ο PGPI (Tang et al., 2003). Εκτός της κυτταρικής λύσης απελευθέρωση ATP μπορεί να συμβεί και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Αιμοπετάλια και κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων απελευθερώνουν το ATP που έχουν αποθηκευμένο σε εκκριτικά κυστίδια, τα οποία στο οπτικό μικροσκόπιο εμφανίζονται με την μορφή κοκκίων, αφού δεχθούν κάποιο κατάλληλο ερέθισμα. Επίσης, τα ισχαιμικά μυοκύτταρα, οι νευρικές απολήξεις και τα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν σημαντικές πηγές παραγωγής εξωκυτταρίου ATP (Vassort et al., 2001). Πιθανή υποτονική διέγερση έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση αποθηκευμένου ATP μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής ιόντων χλωρίου (Mitchell et al., 1998). Παράλληλα, βρέθηκε ότι και τα ερυθροκύτταρα, οι λείες και οι γραμμωτές μυϊκές ίνες μπορούν να εκκρίνουν ATP. Τέλος, ATP απελευθερώνεται και από

καρκινικά κύτταρα (Tominaga et al., 2001). Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω, η εξωκυττάρια συγκέντρωση του ATP μπορεί να αυξηθεί από πλήθος διεργασιών.

Τελειώνοντας θα πρέπει να αναφερθεί πως το εξωκυττάρια ATP παραμένει στην κυκλοφορία για μικρό χρονικό διάστημα καθώς αποικοδομείται ταχύτατα από εκτονουκλεοτιδάσες. Σε ορισμένους όμως ιστούς, συμπεριλαμβανομένης και της καρδιάς, υδρολύεται από ένζυμα τύπου E, όπως οι εκτο-ATPάσες και εκτο-ATP διφωσφοϋδρολάσες (Vassort et al., 2001).

δ. Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας από εκτοκινάσες

Η εξωκυττάρια φωσφορυλίωση λόγω του εντοπισμού της είναι δυνατό να παρέχει στον οργανισμό ένα μηχανισμό διαμέσου του οποίου μπορεί να μεταβάλλει πλήθος τοπικών μορφογενετικών παραγόντων.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, πολλές από τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας μπορούν να φωσφορυλιωθούν (Imada et al., 1988, Revert et al., 1995, Koliakos et al., 2001). Η φμπρονεκτίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη με παρόμοιες ιδιότητες με τη λαμινίνη, βρέθηκε ότι αποτελεί υπόστρωμα φωσφορυλίωσης από μια πρωτεϊνική κινάση που είναι συνδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι πριν εκκριθεί από τα κύτταρα μπορεί να φωσφορυλιωθεί και ενδοκυτταρικά και μάλιστα σε διαφορετικά σημεία από αυτά που φωσφορυλιώνεται εξωκυτταρικά (Imada et al., 1988).

Το 1993 προτάθηκε ένας εξωκυττάριας ρόλος για την πρωτεϊνική κινάση A από τους Shaltiel et al.. Έτσι, μετά από φυσιολογική διέγερση των αιμοπεταλίων, η PKC απελευθερώνεται μαζί με τα συν-υποστρώματά της ATP και Mg^{2+} και φωσφορυλιώνει την βιτρονεκτίνη (Shaltiel et al., 1993). Η βιτρονεκτίνη φωσφορυλιώνεται και από μια καζεϊνική κινάση τύπου II. Η ουροκινάση και ο υποδοχέας της, που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων των λείων αγγειακών μυών με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, είναι λειτουργικά συνδεδεμένοι με την παραπάνω κινάση. Έτσι, αν ανασταλεί η φωσφορυλίωση, εμποδίζεται η σύνδεση των κυττάρων με τη βιτρονεκτίνη (Stepanova et al., 2002).

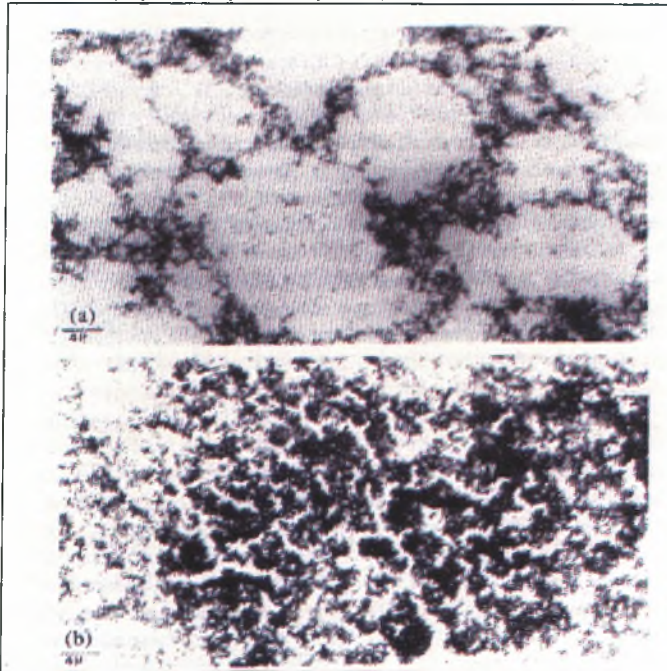
Επιπρόσθετα, κάποιες άλλες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο τύπου IV (Revert et al., 1995) και η οστεοποντίνη μπορούν να φωσφορυλιωθούν από εκτοκινάσες. Πιο συγκεκριμένα, το κολλαγόνο τύπου IV, που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί κύριο συστατικό των βασικών μεμβρανών, φωσφορυλιώνεται *in vitro* από μια πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Το σημείο φωσφορυλίωσης εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της α3 αλυσίδας του μορίου, που ονομάζεται αντιγόνο του συνδρόμου Goodpasture. Πιθανότατα το παραπάνω αντιγόνο να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σύνδρομο Goodpasture, μια αυτοάνοση νόσο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της α3 καρβοξυτελικής περιοχής (Revert et al., 1995)

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η μετα-μεταφραστική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Βρέθηκε μάλιστα πως επηρεάζει και πλήθος διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει η ECM, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

ε. Φωσφορυλίωση της λαμινίνης.

Παλιότερα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο βιολογικής χημείας έδειξαν ότι η λαμινίνη-1 αποτελεί υπόστρωμα για τη δράση της ΡΚΑ, και η φωσφορυλίωσή της από αυτή μεταβάλλει κάποιες από τις ιδιότητές της (Koliakos et al., 2000). Η κινάση ΡΚΑ μεταφέρει φωσφορικές ομάδες από το ΑΤΡ στις διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της λαμινίνης, και συγκεκριμένα σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. (Cohen, 1988). Σύμφωνα με τη γνωστή ακολουθία (Sasaki et al., 1988), η α αλυσίδα της λαμινίνης-1 μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την ΡΚΑ στις αλληλουχίες **RRS** (329-331), **RKIRS** (1832-1836) και **RKGVS** (2430-2434). Τέλος, βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση της λαμινίνης από την ΡΚΑ μπορεί να επάγει τη σύνδεσή της στην ηπαρίνη, αλλά και να εμποδίσει τον πολυμερισμό της (Koliakos et al., 2000).

Σε μια πιο πρόσφατη δημοσίευση (Koliakos et al., 2001), αναφέρεται πως η λαμινίνη-1 μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα και για την ΡΚC. Αν και η παραπάνω κινάση δεν είναι γνωστή για την εξωκυττάρια δράση της, κάποιες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι θα μπορούσε να φωσφορυλιώσει εξωκυττάρια πρωτεΐνες σε περιπτώσεις καταστροφής των κυττάρων ή ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Naik et al., 1991). Η διαδικασία περιλαμβάνει φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης που βρίσκονται στην α αλυσίδα. Και σ' αυτή την περίπτωση, η φωσφορυλίωση που μεσολαβείται από την ΡΚC οδηγεί σε αλλαγές στις ιδιότητες της λαμινίνης με τρόπο που θα μπορούσαν να επηρεαστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας. Για παράδειγμα αυξάνεται η ικανότητά της να συνδέεται στην ηπαρίνη αλλά και σε διάφορα είδη κυττάρων (Koliakos et al., 2001).



Εικόνα 5.4: α) φωσφορυλιωμένη λαμινίνη, β) μη φωσφορυλιωμένη λαμινίνη, εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Koliakos et al., 2000).

Τέλος, βρέθηκε πρόσφατα, πως η λαμινίνη μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα φωσφορυλίωσης και για τις εκτοκινάσες που απαντώνται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων (Trachana et al., 2004). Οι κινάσες αυτές χαρακτηρίστηκαν παλιότερα και βρέθηκε ότι είναι τρεις. Μια πρωτεϊνική κινάση Α, μια πρωτεϊνική κινάση C και τέλος, μια καζεϊνική κινάση τύπου II. (Geberhiwot et al., 1995). Στο εργαστήριο

εμβρυολογίας-ιστολογίας του τμήματος ιατρικής του ΑΠΘ έγινε μάλιστα ανίχνευση της καζεϊνικής κινάσης II των μονοκυττάρων (εικ.5.5)



Εικόνα 5.5: Φωτογραφία από μικροσκόπιο φωτός.

Στην εικόνα μπορούμε να διακρίνουμε τα μονοκύτταρα και γύρω γύρω, στην επιφάνειά τους τις εκτοκινάσες τύπου καζεϊνικής κινάσης II που διαθέτουν. (Trachana et al., 2004).

6. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

α. Γενικά

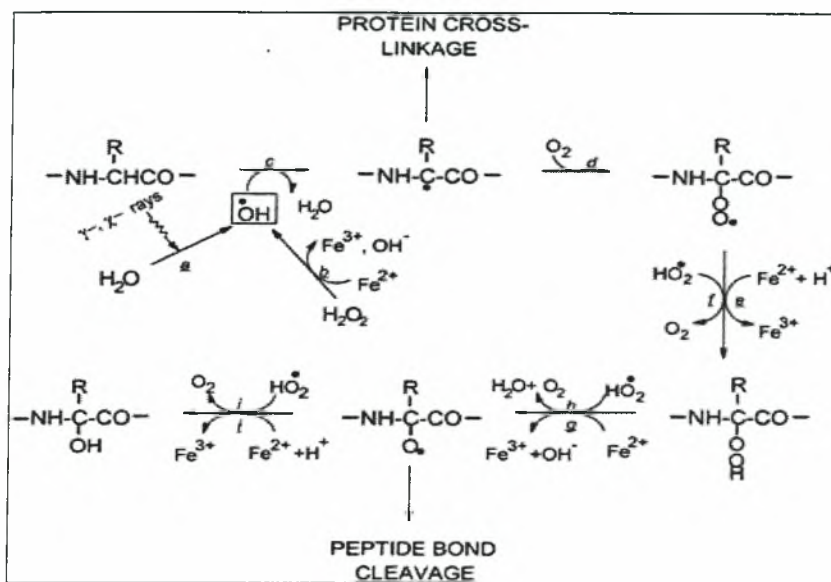
Επειδή όπως αναφέρθηκε πιο πάνω στον σακχαρώδη διαβήτη έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν με την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών στον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, θεωρήσαμε πιθανό και η οξειδωση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσία να παίζει κάποιο ρόλο στα φαινόμενα αυτά.

Η οξειδωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου, ROS (*reactive oxygen species*). Η οικογένεια των ROS περιλαμβάνει έναν αριθμό ελεύθερων ριζών (OH , O_2 , R , ROO^{\cdot} , NO^{\cdot}), παράγωγα του οξυγόνου ($ROOH$, $HOCL$, $ONOO$, H_2O_2) και κάποια λιπιδιακά ή υδαταθρακικά καρβονυλικά συστατικά, όπως οι κετοαμίνες και τα δεοξυσόνια. Οι πρώτες μελέτες έγιναν από τους Swallow, Garrison, Scheussler και Schilling, οι οποίοι έκαναν χαρακτηρισμό των προϊόντων που σχηματίζονται όταν οι πρωτεΐνες εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία κάτω από συνθήκες όπου είναι διαθέσιμα το OH , το O_2 ή μείγμα αυτών (Swallow, 1960, Garrison, 1987, Garrison, 1962, Scheussler & Schilling, 1984).

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικ.6.1), η οξειδωση της ραχοκοκαλιάς ενός πολυπεπτιδίου ξεκινά με αφαίρεση, OH -εξαρτώμενη, ενός ατόμου H του αμινοξικού καταλοίπου και έτσι σχηματίζεται μια ρίζα με άτομο άνθρακα στο κέντρο. (*αντιδρ. c*). Το OH που απαιτείται για αυτή την αντίδραση αποκτάται είτε από ραδιόλυση του νερού, είτε από διάσπαση H_2O_2 καταλυόμενη από μέταλλα (αντίδραση Fenton). (*αντιδρ. a, b*). Η ρίζα που έχει σχηματιστεί αντιδρά με το οξυγόνο και προκύπτει ένα ενδιάμεσο προϊόν, μια ρίζα αλκυλπεροξυλίου (*αντιδρ. f*), που δίνει μια ρίζα αλκοξυλίου (*αντιδρ. h*). Το προϊόν της τελευταίας αντίδρασης μπορεί να μετατραπεί σε παράγωγο υδροξυλιωμένης πρωτεΐνης. (*αντιδρ. j*). Πολλά από τα στάδια που μεσολαβούνται από HO^{\cdot}_2 μπορούν να καταλυθούν και από Fe^{2+} (*αντιδρ. e*,

g, i) ή Cu^+ . Τα αλκυλ, αλκυλπεροξυλ και αλκοξυλικά ενδιάμεσα μπορούν να αντιδράσουν με άλλα κατάλοιπα αμινοξέων στο ίδιο ή διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια προκειμένου να αναγεννηθούν οι ρίζες με το άτομο άνθρακα στο κέντρο που θα προάγουν και όλες τις υπόλοιπες αντιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω. Απουσία οξυγόνου, όταν δε μπορεί να λάβει χώρα η αντίδραση d, η ρίζα με το κεντρικό άτομο άνθρακα μπορεί να αντιδράσει με μια παρόμοια ρίζα της αυτής ή γειτονικής πρωτεϊνικής αλυσού και να δημιουργηθούν έτσι διάφορα νέα μη φυσιολογικά παράγωγα μόρια (Berlett et al., 1997).

Είναι χαρακτηριστικό ότι όλα τα κατάλοιπα αμινοξέων είναι ευαίσθητα στην οξείδωση μέσω OH^\bullet . Πιο συγκεκριμένα, η κυστεΐνη και η μεθειονίνη εμφανίζουν ευαισθησία σε όλους σχεδόν τους τύπους των ROS. Έπειτα από την οξείδωσή τους, η μεθειονίνη δίνει σουλφοξείδιο μεθειονίνης και η κυστεΐνη δισουλφίδια (Levine et al., 1996).



Εικόνα 6.1: Μηχανισμός οξείδωσης πρωτεϊνών (Berlett et al., 1997).

Αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών υπάρχουν σε ζώα και κυτταρικές καλλιέργειες που έχουν εκτεθεί σε παράγοντες πρόκλησης οξειδωτικού stress. Έτσι, έκθεσή τους σε καταστάσεις υπεροξίας, ισχαιμίας, έλλειψης μαγνησίου, καπνίσματος, ιονίζουσας ακτινοβολίας, ενεργοποίησης ουδετεροφίλων και τοξικότητας οδηγεί σε υψηλά επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών. Θα πρέπει να αναφερθεί πως αυτά τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με πλήθος ασθενειών, όπως ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, η αθηροσκλήρωση και η νόσος του Parkinson.

Γενικά, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα οξειδωμένης πρωτεΐνης αντανakλούν μια ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό παραγωγής και αποικοδόμησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Τέλος, σύμφωνα με κάποιες δημοσιεύσεις, το επίπεδο οξειδωτικής βλάβης καθορίζεται και από το γενετικό υπόβαθρο του κυττάρου, το οποίο όμως μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία (Yu et al., 1997).

β. Οξείδωση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας.

Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας κατά τη διάρκεια της ζωής τους εκτίθενται στην επίδραση ελεύθερων ριζών. Τα πλέον ευπρόσβλητα αμινοξέα τους στις ROS είναι η τρυπτοφάνη, (Olszowski et al., 2003), η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη. Στα *in vitro* συστήματα οι οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες φαίνεται

να αναγνωρίζονται επιλεκτικά και να αποικοδομούνται από πρωτεάσες, η δράση των οποίων όμως εμποδίζεται πολλές φορές από τους διαμοριακούς ομοιοπολικούς δεσμούς σταυροσύνδεσης (cross-linking) που έχουν εν τω μεταξύ δημιουργηθεί. Η υδροφοβικότητα της επιφάνειας αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την αναγνώρισή τους από διάφορες πρωτεάσες και ιδιαίτερα από το πρωτεόσωμα (Stolzing et al., 2002).

Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας αποτελούν τα τελευταία χρόνια αντικείμενο εντατικής έρευνας καθώς εμφανίζουν αλλαγές στα χαρακτηριστικά τους σε σχέση με τις μη οξειδωμένες μορφές τους, αλλά και γιατί εμπλέκονται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων.

Οι Mattana et al., βρήκαν το 1997 ότι η οξείδωση της εξωκυττάριας ουσίας είναι δυνατό να μεταβάλλει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις ιντεγκρίνες και την αλληλουχία RGD (αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ) στα μεσαγγειακά κύτταρα. (*mesangial cells*). Μάλιστα τα παραπάνω κύτταρα εμφάνιζαν μειωμένη προσκόλληση στην οξειδωμένη ECM και δεν είχαν τη χαρακτηριστική ατρακτοειδή (*sprindleshaped*) μορφολογία τους. Στα ίδια κύτταρα βρέθηκε πως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) που παράγεται από την οξειδάση της γλυκόζης, μπορεί να αυξήσει το mRNA μορίων της εξωκυττάριας ουσίας μέσω σύνθεσης του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα TGF-beta (La Cruz et al., 2001).

Γενικά, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν κυτταρικά συστατικά και πιθανότατα να μετέχουν σε πλήθος ασθενειών, όπως στη φλεγμονώδη αρθρίτιδα (Hadjigogos, 2003). Έτσι, οι ρίζες υδροξυλίου αποικοδομούν τις πρωτεογλυκάνες, και το υποχλωρικό οξύ (HOCl) τεμάχια κολλαγόνου τύπου II, μέσω οξείδωσής τους. (Olszowski et al., 2003). Παράλληλα, το H_2O_2 , που είναι διάχυτο, παρεμποδίζει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών στο χόνδρο. Επιπρόσθετα, το HOCl επάγει την καταστροφή του χόνδρου μέσω απενεργοποίησης των TIMPs, παραγόντων δηλαδή που αναστέλλουν τις κολλαγενάσες και τις ζελατινάσες, αλλά χάνουν αυτή την ιδιότητά τους μετά την επίδραση της HOCl ρίζας. Μια ακόμη συνέπεια της υποχλωρικής ρίζας είναι η ενεργοποίηση επιπρόσθετων κολλαγενασών και ζελετιναςών. Το υποχλωρικό οξύ σε συνδυασμό με το ONOO⁻ αντιδρούν με το ασκορβικό που συμμετέχει στη λειτουργία του χόνδρου. Συνολικά, οι ROS συμβάλλουν μέσω της οξείδωσης στην καταστροφή συστατικών, αλλά και δρώντας ως αγγελιοφόροι (*messengers*) που ενεργοποιούν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόκληση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Hadjigogos, 2003).

Κάποιες άλλες μελέτες, (Margiloff et al., 1998), συνδέουν την οξείδωση της ECM με την πρόκληση ασθενειών στο νεφρικό σπείραμα. Συγκεκριμένα, η οξείδωση της εξωκυττάριας ουσίας από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αυξάνει την προσκόλληση των μακροφάγων, που αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην πρόκληση τραυματισμού του νεφρικού σπειράματος, μέσω έκκρισης κάποιων προϊόντων τους, και κυρίως της συνθάσης του νιτρικού οξέος. Αυξημένη σύνθεση του παραπάνω ένζυμου παρατηρείται και σε μεσαγγειακά κύτταρα αρουραίου που αναπτύσσονται σε οξειδωμένη ECM (Trachtman et al., 1999).

γ. Οξείδωση λαμινίνης

Παρ' όλο που η λαμινίνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης των βασικών μεμβρανών, η επίδραση της οξείδωσης στη λειτουργία της δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Συνήθως εξετάζεται ως συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας και δε μελετάται ξεχωριστά. Το 1997, οι Riedle και Kerjaschki μελέτησαν τις επιδράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) σε εκχυλίσματα βασικής μεμβράνης που προέρχονταν από το σάρκωμα EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*), τα οποία περιείχαν και λαμινίνη-1. Οι παρατηρήσεις αφορούσαν τις αλλαγές κυρίως στο σύμπλοκο λαμινίνης/ εντακτίνης. Έτσι, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ROS βρέθηκε επιλεκτική απελευθέρωση μορφολογικά άθικτου συμπλόκου λαμινίνης/ εντακτίνης, εντούτοις όμως δε μπορούσε να επανασχηματιστεί, ενώ εμφάνιζε και οξειδωτική καταστροφή στα κατάλοιπα τρυπτοφάνης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ROS, το παραπάνω σύμπλοκο αποσχηματιζόταν σταδιακά και τελικά κατέληγε να αποικοδομηθεί.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το αν η οξείδωση της λαμινίνης μπορεί να επηρεάσει την προσκόλλησή των μονοκυττάρων σ' αυτή. Εξετάσαμε μονοκύτταρα που προέρχονταν από υγιή και από διαβητικά άτομα. Αν όντως κάτι τέτοιο ισχύει είναι πολύ σημαντικό καθώς τίθενται οι βάσεις για τη μελέτη των αλλαγών στις ιδιότητες της λαμινίνης έπειτα από οξείδωση και όχι κατ' ανάγκη για τη συμμετοχή της σε κάποια ασθένεια.

δ. Οξείδωση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας από κύτταρα του αίματος

Και στην περίπτωση αυτή οι βιβλιογραφικές αναφορές δεν είναι πολλές. Σε μια πρόσφατη ερευνητική προσπάθεια, (Ahmed et al., 2003), βρέθηκε ότι τα μονοκύτταρα μπορούν να οξειδώσουν την εξωκυττάρια ουσία (ECM) και ότι η οξείδωση μπορεί να ρυθμιστεί από δεξαμεθαζόνη, σύμπλοκα IgG και τον λιποπολυσακχαρίτη του μικροβιακού τοιχώματος LPS. Η δεξαμεθαζόνη φαίνεται να περιορίζει τη μεσολαβούμενη από τα μονοκύτταρα οξείδωση της ECM. Καλύτερη κατανόηση του παραπάνω μηχανισμού θα επιτρέψει πιθανόν μελέτες με στόχο να περιοριστεί η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών της ECM από τα μονοκύτταρα σε μολυσματικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις.

Αυτός ο τομέας είναι ιδιαίτερα σημαντικός δεδομένου ότι πολλά σύνδρομα που σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή του πνευμονικού παρεγχύματος χαρακτηρίζονται από συνάθροιση ουδετεροφίλων στο πνευμονικό παρέγχυμα. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να επάγουν τη βλάβη της εξωκυττάριας ουσίας του πνευμονικού παρεγχύματος μέσω των προϊόντων τους στα οποία περιλαμβάνονται πρωτεάσες αλλά και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, με αποτέλεσμα την δημιουργία είτε πνευμονικής ίνωσης είτε πνευμονικού εμφυσήματος. Οι Palmgren et al. το 1992, μελέτησαν την ικανότητα των ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων να διαλυτοποιούν την κυψελιδική εξωκυττάρια ουσία. Βρέθηκε λοιπόν, ότι ναι μεν έχουν την ικανότητα να την οξειδώνουν, αλλά οι μεταλλοπρωτεάσες και πρωτεάσες σερίνης που παράγουν δε μπορούν να διαλυτοποιήσουν την κυψελιδική ECM.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναλυτικά περιγράφεται στο εισαγωγικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, οι λαμινίνες αποτελούν κύρια συστατικά των βασικών μεμβρανών, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε φυσιολογικές διεργασίες (εμβρυογένεση, ιστική διαφοροποίηση), αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις (διαβήτης, καρκίνος, αθηρωμάτωση). Μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά των βασικών μεμβρανών, οι λαμινίνες φυλάσσουν πληροφορία που μεταφέρεται στα παρακείμενα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων.

Παράλληλα, η φωσφορυλίωση και οξειδωση των πρωτεϊνών αποτελούν δύο τύπους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που μετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιβεβαιώθηκε κατ' αρχήν η δυνατότητα φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από κινάσες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων (Trachana et al., 2004). Έναυσμα για τις μελέτες αυτές ήταν ο εξωκυττάριος εντοπισμός τόσο της λαμινίνης, όσο και των κινάσων (εκτοκινάσες). Στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταβολή προσκόλλησης της λαμινίνης στα μονοκύτταρα έπειτα από φωσφορυλίωσή της. Επικεντρωθήκαμε στα μονοκύτταρα, δεδομένου ότι η προσκόλλησή τους στις βασικές μεμβράνες σηματοδοτεί την έναρξη πλήθους διαδικασιών. Άλλωστε, όπως περιγράφηκε και παραπάνω τα μονοκύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόκληση της αθηρωμάτωσης και συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας παρατηρείται μετακίνησή τους προς την υπενδοθηλιακή στοιβάδα (βασική μεμβράνη) των αγγείων.

Δεδομένου λοιπόν ότι η αθηρωμάτωση αποτελεί συχνά εμφανιζόμενη επιπλοκή σε άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας και ασθενείς που έπασχαν από διαβήτη τύπου II. Επιχειρήσαμε να δείξουμε τυχόν μεταβολές στην ικανότητα προσκόλλησης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη και στη φωσφορυλιωμένη λαμινίνη και να εξετάσουμε εάν οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με συγκεκριμένες κλινικές επιπλοκές του διαβήτη.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε αρχικά η δυνατότητα οξειδωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα. Στη συνέχεια αφού οξειδώσαμε τη λαμινίνη με ABAP, μια ουσία που παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), αναζητήθηκαν τυχόν διαφορές στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στην τροποποιημένη πρωτεΐνη. Τέλος, μελετήσαμε αντίστοιχες διαφορές σε οξειδωμένη λαμινίνη που φωσφορυλιωνόταν από τα μονοκύτταρα.

Δεδομένου ότι σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη παρατηρείται αύξηση του αριθμού των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (οξειδωτικό stress), χρησιμοποιήθηκαν και σ' αυτή την περίπτωση μονοκύτταρα που προέρχονταν από ασθενείς με διαβήτη τύπου II. Με τον τρόπο αυτό εξετάσαμε το κατά πόσο η εκτεταμένη παρουσία ROS στον οργανισμό μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα προσκόλλησης των μονοκυττάρων στην λαμινίνη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγμα εθελοντών που συμμετείχαν στη μελέτη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μονοκύτταρα υγιών ατόμων και μονοκύτταρα ατόμων που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που προέρχονταν από 17 υγιείς εθελοντές και 18 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, που νοσηλεύονταν στην β παθολογική κλινική του Ιπποκράτειου νοσοκομείου Θεσσαλονίκης.

Πίνακας 7.1.1: Παρουσίαση των υγιών ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη

Αριθμός ατόμου	Φύλο	Ηλικία	Φαρμακευτική αγωγή για πιθανή ασθένεια
M1	A	48	-
M2	Θ	21	-
M3	A	29	-
M4	Θ	42	-
M5	Θ	47	Λήψη σκευασμάτων σιδήρου κατά τη διάρκεια έμμηνου ρύσεως
M6	Θ	23	-
M7	Θ	29	Σιδηροπενική αναιμία
M8	A	26	-
M9	A	49	-
M10	Θ	22	-
M11	Θ	21	Σιδηροπενική αναιμία
M12	A	48	-
M13	Θ	22	-
M14	A	47	-
M15	Θ	26	-
M16	A	28	-
M17	Θ	21	-

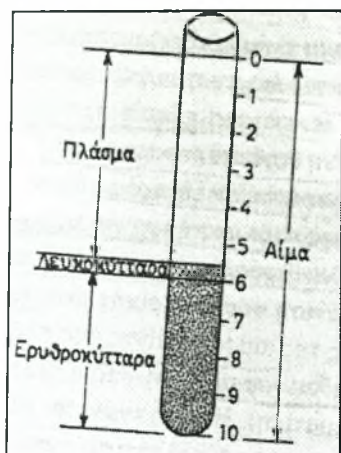
Πίνακας 7.1.2: Παρουσίαση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη που συμμετείχαν στη μελέτη

Αριθμός ατόμου	Φύλο	Ηλικία	Τύπος διαβήτη	Διάρκεια διαβήτη	Χορήγηση ινσουλίνης	Κλινικές επιπλοκές	BMI
Δ1	Θ	68	2	*	-	Χωρίς επιπλοκές	*
Δ2	Θ	73	2	9 έτη	-	Χωρίς επιπλοκές	25.4
Δ3	Θ	52	2	10 έτη	-	Χωρίς επιπλοκές	27.5
Δ4	Θ	56	2	*	-	Χωρίς επιπλοκές	*
Δ5	A	63	2	7 έτη	-	Μακροαγγειοπάθεια	27.5
Δ6	A	44	2	*	-	Χωρίς επιπλοκές	*
Δ7	Θ	65	2	*	-	Χωρίς επιπλοκές	*
Δ8	A	73	2	32 έτη	18 έτη	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ9	Θ	52	2	20 έτη	12 έτη	Μακροαγγειοπάθεια	24.3
Δ10	A	50	2	12 έτη	2 έτη	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ11	Θ	77	2	10 έτη	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ12	Θ	74	2	20 έτη	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ13	Θ	77	2	20 έτη	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ14	Θ	75	2	*	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ15	A	68	2	*	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ16	A	69	2	*	-	Μακροαγγειοπάθεια	*
Δ17	A	65	2	*	-	Μακρο και μικροαγγειοπάθεια	*
Δ18	Θ	87	2	20 έτη	7 έτη	Μακρο και μικροαγγειοπάθεια	*

*μη γνωστά στοιχεία του ιστορικού των ασθενών

Απομόνωση μονοκυττάρων από δείγμα ολικού αίματος και σήμανσή τους με ραδιενεργό μεθειονίνη

Τα μονοκύτταρα λαμβάνονταν από το περιφερικό αίμα με απομόνωση από τα λευκά αιμοσφαίρια. Μετά την αιμοληψία, 20 ml ολικού αίματος τοποθετούνταν σε πλαστικό κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα περιεκτικότητας 50ml (falcon) στο οποίο είχε προστεθεί 1ml διαλύματος 0,2 M αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος (EDTA) ως αντιπηκτικό. Ακολουθούσε ελαφριά ανάδευση και προσθήκη 20 ml θρεπτικού υλικού (RPMI 1640 στο οποίο είχε προστεθεί 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1% 1M N-2-υδροξυ-αιθυλπεραζινο-N'-2-αιθανοσουλφονικού οξέος (HEPES) και 10% ορός εμβρύου μόσχου (FCS). Στη συνέχεια τοποθετούσαμε από 6 ml Percol σε δύο πλαστικούς κωνικούς δοκιμαστικούς σωλήνες περιεκτικότητας 50ml. Σε κάθε ένα από τους σωλήνες αυτούς προσθέταμε 20 ml από το περιεχόμενο του πρώτου σωλήνα με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αναμιχθεί το αίμα με το Percol.



Μετά από 30 λεπτά φυγοκέντρησης στις 1500 στροφές (rpm) (χωρίς χρήση του φρένου κατά την επιβράδυνση), συλλέγονταν με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur της υπόλευκης στοιβάδας των μονοπύρηνων/ λεμφοκυττάρων, που βρισκόταν μεταξύ του Percol και του πλάσματος. Τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα ήταν στο ίζημα. (βλέπε εικόνα)

Ακολουθούσε μεταφορά της στοιβάδας σε πλαστικούς κωνικούς δοκιμαστικούς σωλήνες περιεκτικότητας 15ml στους οποίους προσθέτονταν ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνταν 3 πλύσεις καθεμιά από τις οποίες περιλάμβανε φυγοκέντρηση για

10 λεπτά στις 1500 στροφές, απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 5 ml θρεπτικού υλικού και επαναίωρηση των κυττάρων. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση όλα τα κύτταρα μεταφέρονταν σε ένα σωλήνα, ενώ μετά και την τρίτη πλύση γίνονταν επιμελημένη ανάδευση με παλινδρομικές αναρροφήσεις και αποχύσεις με αυτόματο σιφόνιο για την αποφυγή παρουσίας συσσωματωμάτων.

Τελικά τα κύτταρα, στα οποία τελικώς προσθέτονταν 5 ml θρεπτικού, μεταφέρονταν σε φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας των 75 εκατοστών όπου προσθέτονταν και άλλα 15 ml θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια ακολουθούσε επώαση για μια ώρα σε κλίβανο των 37°C με σκοπό να προσκολληθούν τα μονοκύτταρα στην επιφάνεια της φιάλης. Έπειτα απομακρύνονταν τα μη προσκολλημένα και νεκρά κύτταρα και ακολουθούσαν 2 πλύσεις με 10 ml θρεπτικού υλικού. Μετά από προσθήκη άλλων 10 ml θρεπτικού και 10μl διαλύματος ραδιοσημασμένης με ³⁵S μεθειονίνης (2μCi) τα κύτταρα επώαζονταν για 24 ώρες (*overnight*), στον κλίβανο των 37°C.

Την επόμενη ημέρα γίνονταν 2 πλύσεις με 5 ml την κάθε φορά θρεπτικό υλικό. Τελικά προσθέταμε στη φιάλη 5 ml θρεπτικού υλικού και κατόπιν τα μονοκύτταρα αποκολλούνταν από το πλαστικό με τη βοήθεια ενός πλαστικού αποκολλητή (cell scraper). Η αποκόλληση των μονοκυττάρων επιβεβαιώνονταν με παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων που απομονώνονταν υπολογίζονταν μετά από μέτρηση σε πλάκα αιμοκυττομέτρου (Neubauer).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί και όλη η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις των κυττάρων.

Επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα με αντιφωσφοσερίνη, με ανοσοανίχνευση και SDS ηλεκτροφόρηση

Για την τεχνική της ανοσοανίχνευσης, τα μονοκύτταρα απομονώνονταν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χωρίς όμως στο τέλος να προστίθεται διάλυμα ραδιοσημασμένης με ³⁵S μεθειονίνης (2μCi) και η επώαση γίνονταν μόνο για δύο ώρες. Τα μονοκύτταρα, μετά την αποκόλληση από τη φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας και την καταμέτρησή τους τοποθετούνταν σε πλαστικό κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα (falcon), και στη συνέχεια, γίνονταν 3 πλύσεις με 5 ml

θρεπτικού υλικού (RPMI, χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FCS), αλλά με 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin και 1% 1M Ν-2-υδροξυ-αιθυλπτεραζινο-Ν'-2-αιθανοσουλφονικού οξέος (HEPES)). Η κάθε πλύση περιλάμβανε φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές (χωρίς χρήση του φρένου κατά την επιβράδυνση) για 10 λεπτά. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση γίνονταν επιμελημένη ανάδευση με παλινδρομικές αναροφήσεις και αποχύσεις με αυτόματο σιφώνιο για την αποφυγή παρουσίας συσσωματωμάτων.

Στη συνέχεια γίνονταν παρασκευή των ακόλουθων δειγμάτων:

Πίνακας 7.3: Δείγματα μονοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοανίχνευση.

Δείγματα	Περιεχόμενο*
1	Λαμινίνη, μονοκύτταρα, ATP
2	Λαμινίνη, μονοκύτταρα, ATP, K252 b
3	Λαμινίνη, μονοκύτταρα, ATP, ηπαρίνη
4	Λαμινίνη, μονοκύτταρα (κατεργασμένα με τρυψίνη), ATP
5	Λαμινίνη, μονοκύτταρα
6	μονοκύτταρα, ATP

*Στα δείγματα προσθέταμε εναιώρημα μονοκυττάρων, που περιείχε 30.000 μονοκύτταρα, και κατά περίπτωση 20 μl υδατικού διαλύματος 45 μg/ml λαμινίνης, 10 μl υδατικού διαλύματος μη ραδιενεργού 5μM ATP, 10 μl διαλύματος σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) 3,6 μg/ml του αναστολέα των εκτοκινάσων K252b (Calbiochem), 10 μl υδατικού διαλύματος 50 μg/ml ηπαρίνης. Η επίδραση τρυψίνης έγινε με διάλυμα 0.25% w/v τρυψίνη σε PBS. Τέλος, όλα τα δείγματα μονοκυττάρων περιείχαν από 10 μl των εξής διαλυμάτων α) 200 μM Na₂MoO₄, β) 200μM Na₃VO₄ και γ) 1mM MnCl₂.

Στη συνέχεια γίνονταν προετοιμασία μεμβράνης πολυβινυλοδιφθοριδίου (PVDF) (NEN Life science products), για να προστεθούν τα παραπάνω δείγματα. Συγκεκριμένα, κόβαμε τη μεμβράνη σε κατάλληλο σχήμα και σχεδιάζαμε με μολύβι έξι κύκλους, όσος και ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιούσαμε. Έπειτα η μεμβράνη τοποθετούνταν για 15' σε 100% μεθανόλη και κατόπιν σε απιονισμένο νερό για 2 λεπτά. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, γίνονταν επώασή της σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος (blocking buffer), που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) (pH=7.6), 0.1% Tween-20 και 5% λευκωματίνη ορού βοός (BSA), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η καθεμιά με 15 ml διαλύματος που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) (pH=7.6) και 0.1% Tween-20 (TBS/T). Έπειτα γίνονταν επώαση της μεμβράνης σε TBS/T το οποίο περιείχε 5% BSA, 0,1 μg/ml του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει τα υπολείμματα φωσφοσερίνης (αντιφωσφοσερίνη, Calbiochem 1C8), στους 4⁰ C και για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα γίνονταν 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η καθεμιά με 15 ml διαλύματος TBS/T κάθε φορά. Στη συνέχεια γίνονταν επώαση της μεμβράνης με το ίδιο διάλυμα (TBS/T το οποίο περιείχε 5% BSA) που περιείχε το συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) δεύτερο αντίσωμα (goat anti-mouse peroxidase) (Calbiochem) αραιωμένο 1/1000. Η επώαση γίνονταν υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθούσαν πάλι 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών, με 15 ml διαλύματος TBS/T κάθε φορά

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας περιλάμβανε την ανίχνευση σήματος από την αντίδραση της περοξειδάσης, με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Συγκεκριμένα η μεμβράνη επωάζονταν με το διάλυμα λουμινόλης (LumiGLO) και υπεροξειδίου (peroxide) σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου (Amersham). Γίνονταν επώαση διάρκειας ενός λεπτού και κατόπιν απομακρύνονταν η περίσσεια του παραπάνω διαλύματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετούνταν σε διαφανές αδιάβροχο πλαστικό φύλλο (Saran Wrap). Τελικώς, ανιχνευόταν η εκπομπή φωτός από την αντίδραση με έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ για περίπου 10 sec. Μετά την εμφάνιση του φιλμ παρατηρούσαμε την φωτογραφική αποτύπωση στα δείγματα όπου ανιχνευόταν φωσφορυλιωμένη λαμινίνη.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η φωσφορυλίωση της λαμινίνης από τις εκτοκινάσες που απαντώνται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, πραγματοποιήθηκε και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με SDS (SDS-PAGE) σύμφωνα με το σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων κατά Laemmli (Laemmli et al., 1979). Η πηκτή επιστοίβασης είχε πυκνότητα 4% και η πηκτή διαχωρισμού 7,5%. Οι δείκτες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν (Cell Signaling), ήταν οι ακόλουθοι: MBP-β γαλακτοσιδάση (M.B=175KDa), MBP-παραμυοσίνη (M.B=83KDa), γλουταμινική δεϋδρογονάση (M.B=62KDa), αλδολάση (M.B=47.5KDa), τριοξοφωσφορική ισομεράση (M.B=32.5KDa), β-λακτοσφαιρίνη Α (M.B=25KDa), λυσοζύμη (M.B=16.5KDa) και απροτινίνη (M.B=6.5KDa).

Η απομόνωση των μονοκυττάρων γίνονταν με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν ήταν τα ακόλουθα:

Πίνακας 7.4: Δείγματα μονοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην SDS ηλεκτροφόρηση

Δείγματα	Περιεχόμενο*
1	Λαμινίνη
2	Λαμινίνη, μονοκύτταρα +ATP

* Τα δείγματα περιείχαν από 10 μl διαλυμάτων 200 μM Na₂MoO₄, 200 μM Na₃VO₄ και 1mM MnCl₂. Επίσης περιείχαν 20 μl 45 μg/ml υδατικού διαλύματος λαμινίνης και κατά περίπτωση εναιώρημα μονοκυττάρων, που περιείχε 30.000 μονοκύτταρα, και 10 μl 5μM υδατικού διαλύματος μη ραδιενεργού ATP. Ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος ρυθμιζόταν στο 1ml με προσθήκη RPMI.

Μετά την παρασκευή τους, τα δείγματα επωάζονταν για 30 λεπτά σε κλίβανο των 37°C και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε πάγο για 15 λεπτά, προκειμένου να διακοπεί η διαδικασία της φωσφορυλίωσης. Έπειτα γίνονταν φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό. Πριν τη διαδικασία της SDS ηλεκτροφόρησης, παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο και συμπυκνώνονταν με λυοφιλοποίηση μέχρι ξηρού. Τα δείγματα αναδιαλύονταν σε 80 μl νερού. Από αυτά λαμβάνονταν 20 μl και αναμιγνύονταν με 20 μl διαλύματος που περιείχε 0,5 M ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα Tris (pH=6.8), 20% SDS, 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 75% γλυκερόλη και μερκαπτοαιθανόλη (loading buffer). Ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Hoeffer στα 15mA μέχρις ότου η οδηγός χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης άγγιζε το κάτω άκρο της πηκτής (περίπου 2 ώρες).

Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris 192 mM γλυκίνη pH=8.8, το οποίο περιείχε 10% μεθανόλη και 0,01% SDS, (transfer buffer) για 15 λεπτά. Η προετοιμασία της μεμβράνης περιλάμβανε πλύση της με μεθανόλη για 15 ", στη συνέχεια με απεσταγμένο νερό για 2 λεπτά και τέλος, με transfer buffer για άλλα 5 λεπτά. Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη η μεμβράνη τοποθετούνταν προσεκτικά στην επιφάνεια της πηκτής. Χρησιμοποιούνταν επίσης τεμάχια διηθητικού χαρτιού (Whatmann, πάχους 3 mm), μεταξύ των οποίων τοποθετούνταν η πηκτή και η μεμβράνη. Το όλο σύστημα τοποθετούνταν μεταξύ των ηλεκτροδίων με την μεμβράνη προς την πλευρά θετικού πόλου. Έπειτα, επιτελούνταν ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών, από την πηκτή σε μεμβράνη πολυβινυλοδιφθοριδίου στα 152 mA, σε θερμοκρασία 4⁰ C, για 24 ώρες (Western blotting). Την επόμενη μέρα η μεμβράνη επωάζονταν με 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) (pH=7.6) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Τα επόμενα στάδια, από την προσθήκη του πρώτου αντισώματος μέχρι και την ανίχνευση σήματος από την αντίδραση «αντιγόνου-αντισώματος» μέσω χημειοφωταύγειας είναι ίδια με αυτά της ανοσοανίχνευσης και περιγράφονται αναλυτικά παραπάνω.

Προσκόλληση σημασμένων με μεθειονίνη μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης

Για την εκτίμηση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης ακολουθήσαμε την παρακάτω μέθοδο.

Αρχικά γίνονταν επίστρωση πινακίων πολυεστερνίου 96 υποδοχών (πλάκα Elisa) με 50μl 45 μg/ml υδατικού διαλύματος λαμινίνης σε κάθε υποδοχή, και αφήνονταν για 24 ώρες (overnight) να στεγνώσει. Στη συνέχεια προσθέταμε σε κάθε υποδοχή 200μl εναιωρήματος μονοκυττάρων που περιείχε 80.000 κύτταρα. Το εναιώρημα των κυττάρων (θρεπτικό υλικό RPMI 1640,10% FCS), περιείχε τους απαραίτητους παράγοντες για τη δράση των εκτοκινασών, δηλαδή τους αναστολείς των φωσφατασών (200 μM Na₂MoO₄, 200μM Na₃VO₄) καθώς και ιόντα Mn²⁺ (1mM). Για να παρασκευασθεί αυτό το διάλυμα, προσθέτονταν στον πλαστικό κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα με τα μονοκύτταρα (falcon) , 100 μl από καθένα από τα παραπάνω διαλύματα (200 μM Na₂MoO₄, 200μM Na₃VO₄ και 1mM Mn²⁺).

Στη συνέχεια στις υποδοχές της πλάκας (ανά τέσσερις), τοποθετούνταν τα εξής: η πρώτη υποδοχή περιείχε μόνο εναιώρημα μονοκυττάρων, στη δεύτερη εκτός από τα μονοκύτταρα προσθέτονταν και 5μl 5μM ATP, στην τρίτη εκτός από τα μονοκύτταρα και το ATP προσθέτονταν και 8μl 3,6 μg/ml του αναστολέα των εκτοκινασών K252b (Calbiochem) και τέλος, το τέταρτο πηγαδάκι περιείχε μόνο αναστολέα, μαζί με τα μονοκύτταρα, απουσία ATP .

Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονταν για 30 λεπτά σε κλίβανο των 37⁰C. Έπειτα πραγματοποιούνταν πλύσεις με στείρο ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) 3 φορές, χρησιμοποιώντας 100 μl κάθε φορά προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί στη λαμινίνη. Στο επόμενο στάδιο γίνονταν προσθήκη 50 μl διαλύματος λύσης των κυττάρων (lysis buffer), το οποίο πριν τη χρήση του θερμαινόταν για μισή ώρα στους 60⁰C. Μετά από 3-4 λεπτά, γίνονταν επιμελημένη ανάδευση του περιεχομένου των υποδοχών (wells) με παλινδρομικές αναρροφήσεις. Τα δείγματα μεταφέρονταν σε σωληνάρια μέτρησης του μετρητή β ακτινοβολίας (β-counter) που περιείχαν 3 ml υγρού σπινθηρισμού (700 ml τολουένιο,

300 ml Triton X-100, 4 gr PPO, 0,1 gr PPOP) και μετρούνταν η ραδιενέργεια του κάθε δείγματος στον β -counter.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δείγματα μονοκυττάρων από φυσιολογικά άτομα (M1-M10) αλλά και από ασθενείς που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη ($\Delta 1$ - $\Delta 7$ και $\Delta 8$ - $\Delta 18$).

Ανοσοανίχνευση οξειδωμένης λαμινίνης

Η μέθοδος απομόνωσης των μονοκυττάρων που χρησιμοποιούνταν περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (SDS-ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα). Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνονταν με τον ακόλουθο τρόπο. Σε 3 κωνικά πλαστικά φιαλίδια (erppendorf) τοποθετούνταν τα εξής: στο πρώτο, εναιώρημα μονοκυττάρων, που περιείχε 30.000 μονοκύτταρα σε θρεπτικό υλικό (RPMI απουσία FCS), και 100μl 45μg/ml υδατικού διαλύματος λαμινίνης. Στο δεύτερο 100μl λαμινίνης και 100 μl 1 nM υδατικού διαλύματος 2,2' (2-μεθυλπροπιοναμίδης) διυδροχλωρίδιου (ABAP). Τέλος, στον τελευταίο σωλήνα τοποθετούνταν εναιώρημα μονοκυττάρων, 100μl λαμινίνης και 5μl 5μM υδατικού διαλύματος μη ραδιενεργού ATP. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαζονταν για 10 λεπτά στους 37⁰C και κατόπιν φυγοκεντρούνταν για 2 λεπτά στις 10.000 στροφές (rpm).

Παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο των πιο πάνω δειγμάτων και σ αυτό προσθέτονταν 5μl 12% w/v SDS. Στο επόμενο στάδιο προσθέτονταν 10μl διαλύματος DNPH/TFA (20 mM DNPH σε 10% v/v TFA), γίνονταν ανάδευση σε αναδευτήρα (vortex) και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με ανακίνηση (shaker). Η αντίδραση σταματούσε με την προσθήκη 7,5 μl διαλύματος εξουδετέρωσης που περιείχε 2M διάλυμα Tris Base και 1% γλυκερόλη. Παράλληλα, σε κάποια δείγματα δεν προσθέταμε SDS και DNPH/TFA, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Όλα τα στάδια της ανοσοανίχνευσης, από την προετοιμασία της μεμβράνης μέχρι και την ανίχνευση σήματος μέσω χημειοφωταύγειας, έγιναν όπως περιγράφεται στην ενότητα «επιβεβαίωση της φωσφορυλίωσης της λαμινίνης». Βέβαια, στην ανοσοανίχνευση οξειδωμένης λαμινίνης χρησιμοποιούνταν διαφορετικό πρώτο αντίσωμα, που ήταν η αντι-δινιτροφαινόλη (anti-DNP)(Calbiochem), ενώ το δεύτερο αντίσωμα ήταν το ίδιο με αυτό της μεθόδου ανοσοανίχνευσης για επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα. Τέλος, διαφορετική ήταν και η σύσταση του διαλύματος blocking buffer που χρησιμοποιούνταν για την επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα (περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS) (pH=6.8), 0,1% Tween-20 και 5% άπαχο γάλα σε σκόνη)

Προσκόλληση σημασμένων με μεθειονίνη μονοκυττάρων σε υπόστρωμα οξειδωμένης λαμινίνης και μέτρηση της ραδιενέργειας

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με αυτή που αναφέρεται παραπάνω (προσκόλληση μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης), με τη μόνη διαφορά ότι το υπόστρωμα ήταν η οξειδωμένη λαμινίνη.

Έτσι, χρησιμοποιούνταν πινάκια πολυεστερενίου 96 υποδοχών (πλάκα elisa) και στο καθένα από αυτά επιστρώνονταν 50 μ l 45 μ g/ml υδατικού διαλύματος λαμινίνης και 50 μ l 1 nM υδατικού διαλύματος 2,2' (2-μεθυλπροπιοναμιδίνη) διυδροχλωριδίου (ABAP), μιας ουσίας που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οξειδώνει τις πρωτεΐνες, και αφηνόταν για 24 ώρες (overnight) να στεγνώσει. Τα υπόλοιπα στάδια είναι κοινά με την προαναφερθείσα μέθοδο.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με δείγματα μονοκυττάρων από φυσιολογικά άτομα (M11-M17) και από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (Δ 14- Δ 18)

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

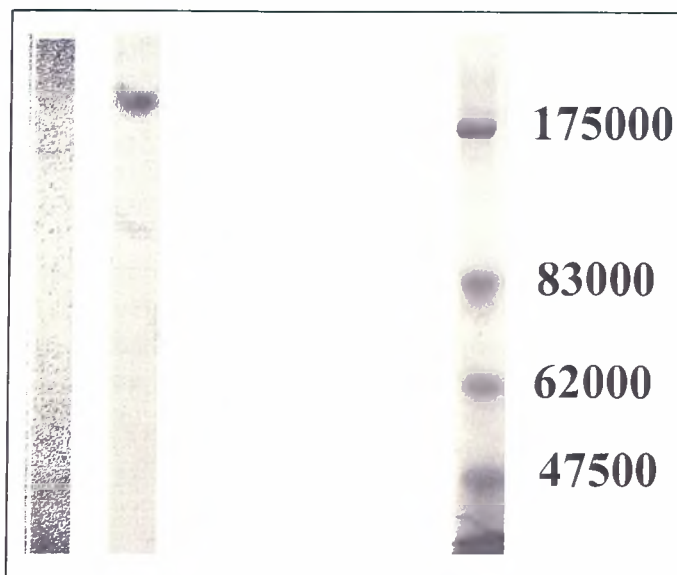
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πακέτο Graphpad Instat. Η επεξεργασία τους έγινε με εφαρμογή Student-t test, unpaired ή paired ανά περίπτωση, με όριο σημαντικότητας την τιμή $p=0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα

Με το πείραμα αυτό επιχειρήσαμε να δείξουμε ότι οι εκτοκινάσες των μονοκυττάρων είναι δυνατό να φωσφορυλιώσουν τη λαμινίνη. Η λαμινίνη επώαστηκε με μονοκύτταρα σε μια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Μετά από ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων, πήραμε την παρακάτω εικόνα (εικ. 7.1)

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντι-φωσφοσερίνη, η οποία έχει την ιδιότητα να προσκολλάται σε φωσφορυλιωμένα υπολείμματα σερίνης. Έγινε χρήση του παραπάνω αντισώματος γιατί από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι οι κινάσες των μονοκυττάρων φωσφορυλιώνουν τη λαμινίνη σε υπολείμματα σερίνης.



Εικόνα 7.1: Ανίχνευση φωσφορυλιωμένης λαμινίνης με μονοκλωνικό αντίσωμα αντιφωσφοσερίνη.

1. Δείγμα λαμινίνης όπου δεν προστέθηκαν μονοκύτταρα (control).
2. Ανοσοανίχνευση φωσφορυλιωμένης λαμινίνης.
3. Δείκτες μοριακών βαρών.

Όπως φαίνεται και παραπάνω, στην περίπτωση που η λαμινίνη επώαστηκε με μονοκύτταρα, η αντιφωσφοσερίνη ανίχνευσε μία ζώνη που υπολογίζεται περίπου στα 200 KDa και αντιστοιχεί στη β ή /και γ αλυσίδα της λαμινίνης. Η α αλυσίδα, που έχει M.B 400 KDa, δε φαίνεται στην παρούσα ανάλυση.

Προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τις κινάσες των μονοκυττάρων πραγματοποιήθηκε και η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης (dot blot). Χρησιμοποιήθηκαν όπως και προηγουμένως, δείγματα με λαμινίνη, μονοκύτταρα και ATP. Σε ένα από τα δείγματα τα μονοκύτταρα επώαστηκαν με μικρή συγκέντρωση τρυψίνης έτσι ώστε να επιτευχθεί η πέψη μόνο των εξωκυττάρων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών τμημάτων που εκτείνονται έξω από

την πλασματική μεμβράνη. Σε ένα άλλο δείγμα προστέθηκε ο γνωστός από τη βιβλιογραφία αναστολέας των εκτοπρωτεϊνικών κινασών K252b (Calbiochem). Παράλληλα, σε ένα τρίτο δείγμα προστέθηκε ηπαρίνη που είναι γνωστός αναστολέας της καζεϊνικής κινάσης τύπου II (Hathaway et al., 1980) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (Aoyagi et al., 2003). Μετά την ανοσοανίχνευση λάβαμε την πιο κάτω εικόνα (εικ.8.1). Και στην περίπτωση αυτή το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντιφωσφοσερίνη.



Εικόνα 8.1: Ανοσοανίχνευση για την επιβεβαίωση φωσφορυλίωσης της λαμινίνης από τις εκτοκινάσες μονοκυττάρων παρουσία και αναστολέων.

1. Δείγμα λαμινίνης με μονοκύτταρα και ATP
2. Δείγμα λαμινίνης με μονοκύτταρα και ATP παρουσία του αναστολέα K252b
3. Δείγμα λαμινίνης με μονοκύτταρα και ATP παρουσία ηπαρίνης
4. Δείγμα λαμινίνης με μονοκύτταρα κατεργασμένα με τρυψίνη και ATP
5. Δείγμα λαμινίνης με μονοκύτταρα απουσία ATP
6. Δείγμα μονοκυττάρων παρουσία ATP αλλά χωρίς λαμινίνη.

Τα αποτελέσματα από την ανοσοανίχνευση επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα της ηλεκτροφόρησης. Ανίχνευση φωσφορυλιωμένων καταλοίπων σερίνης παρατηρείται μόνο στο πρώτο δείγμα, όπου λαμβάνουμε έντονο σήμα. Το σήμα που παίρνουμε από τα δείγματα 2, 3 και 4 είναι αχνό, ενώ αντίθετα στα 5 και 6, όπου έχουμε απουσία ATP και λαμινίνης αντίστοιχα, δεν παρατηρείται σήμα.

Προσκόλληση σημασμένων με μεθειονίνη μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης

Εφόσον αποδείχτηκε ότι η λαμινίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις εκτοπρωτεϊνικές κινάσες που απαντώνται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, το ερώτημα που προέκυψε στη συνέχεια ήταν αν η φωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάσει κάποιες από τις ιδιότητές της. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο βιολογικής χημείας, έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της λαμινίνης από τις κινάσες A και C, μπορεί να επηρεάσει λειτουργικές ιδιότητες της λαμινίνης, όπως το σχηματισμό δικτύου και τη σύνδεση στην ηπαρίνη (Koliakos et al., 2000, Koliakos et al., 2001).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη σε σχέση με την φωσφορυλίωση του μορίου αυτού από τα ίδια κύτταρα. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με σκοπό να βρεθούν οι τυχόν διαφορές προσκόλλησης των μονοκυττάρων σε φωσφορυλιωμένη και μη λαμινίνη σε 10 φυσιολογικά άτομα. Αφού λάβαμε τον αριθμό κρούσεων των μονοκυττάρων στη λαμινίνη (β-counter), υπολογίσαμε τους μέσους όρους κρούσεων καθώς και τους συντελεστές αποκλίσεων.(πιν.8.1) Παράλληλα, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, επί του συνόλου των τιμών, με την ανάλυση paired

Student t-test, που έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο φωσφορυλιωμένο δείγμα και το μάρτυρα, καθώς και ανάμεσα στο φωσφορυλιωμένο δείγμα και σε αυτά με αναστολέα. (τιμές $p < 0.05$). (πιν.9.1).

Πίνακας 8.1: Μέσος όρος και συντελεστής απόκλισης κρούσεων δειγμάτων μονοκυττάρων φυσιολογικών ατόμων στη λαμινίνη.

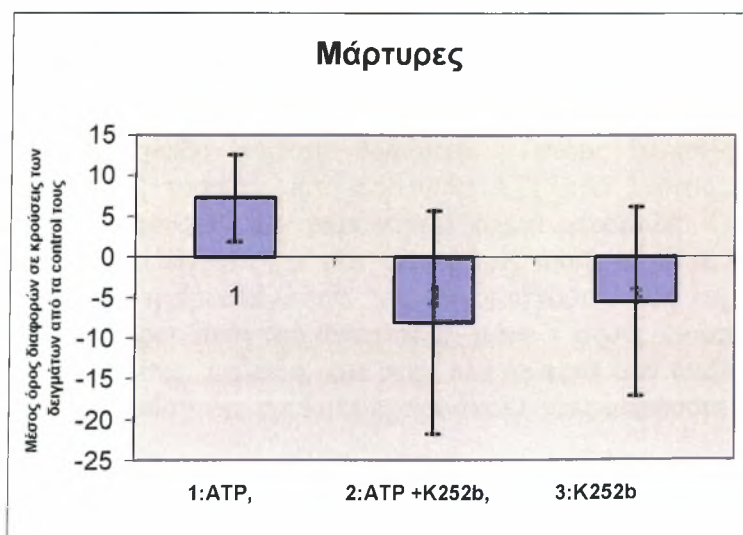
Δείγματα	Μονοκύτταρα	Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα +ATP+K252b	Μονοκύτταρα +K252b
Μέσος όρος	41,758	49,028	36,793	37,353
SD	18,845	18,797	17,918	19,612

Πίνακας 9.1: Επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p) των διαφορών μεταξύ των διαφόρων ζευγών δειγμάτων (paired Student-t test).

Ζεύγη δειγμάτων	Μονοκύτταρα/ Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα +ATP/ Μονοκύτταρα +ATP+K252b	Μονοκύτταρα +ATP+K252b/ Μονοκύτταρα+ K252b	Μονοκύτταρα +ATP/ Μονοκύτταρα+ K252b
Τιμή p (paired t test)	0,002	0,130	0,6681	0,0034

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη παρουσία ATP, ενώ στις περισσότερες (9 στις 10 που μελετήθηκαν), παρατηρήσαμε μείωση με την προσθήκη του αναστολέα των εκτοκινάσων, K252b.

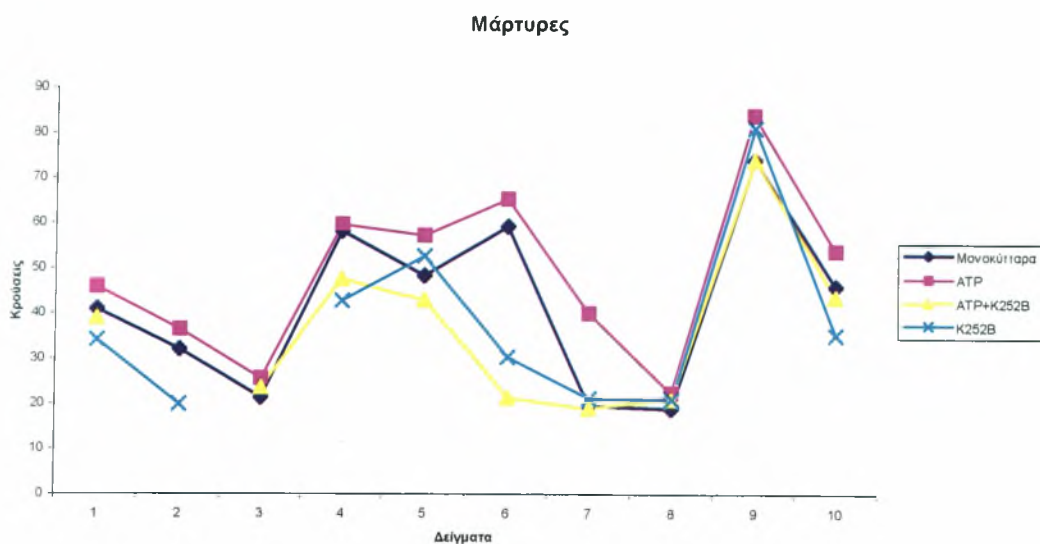
Στη συνέχεια, υπολογίσαμε τις διαφορές σε κρούσεις των διαφόρων δειγμάτων από το δείγμα που περιείχε μόνο μονοκύτταρα (control), βρήκαμε τους νέους μέσους όρους και συντελεστές απόκλισης και κατασκευάσαμε το ακόλουθο γράφημα (εικ.9.1), όπου οι διαφορές κρούσεων παρουσία και απουσία ATP είναι πιο εμφανείς.



Εικόνα 9.1: Διαφορές στην προσκόλληση των μονοκυττάρων παρουσία ATP η /και αναστολέα σε σχέση με τα δείγματα control (μόνο με μονοκύτταρα και λαμινίνη).

1. Δείγματα μονοκυττάρων με λαμινίνη παρουσία ATP
2. Παρουσία ATP και αναστολέα K252b
3. Παρουσία K252b

Οι διαφορές κρούσεων των μονοκυττάρων παρουσία και απουσία ATP ή αναστολέα φαίνονται και στο ακόλουθο συγκριτικό διάγραμμα. (εικ.9.2).



Εικόνα 9.2: Διαφορές κρούσεων των διαφόρων δειγμάτων μονοκυττάρων

Μπλε γραμμή: Κρούσεις μονοκυττάρων στη λαμινίνη σε δείγματα 10 φυσιολογικών ατόμων

Ροζ γραμμή: Κρούσεις παρουσία ATP

Κίτρινη γραμμή: Κρούσεις παρουσία ATP και K252b

Γαλάζια γραμμή: Κρούσεις παρουσία K252b στα μονοκύτταρα

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος και σε 7 δείγματα μονοκυττάρων ασθενών που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Θα πρέπει να αναφερθεί πως οι 6 από τους 7 ασθενείς δεν εμφάνιζαν καμιά κλινική επιπλοκή ως συνέπεια του σακχαρώδους διαβήτη.

Με γνωστό τον αριθμό κρούσεων, υπολογίστηκαν η μέση τιμή και ο συντελεστής απόκλισης (πιν.8.2) ενώ έγινε και πάλι στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με paired Student-t test. (πιν.9.2). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στους διαβητικούς, δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φωσφορυλιωμένων και μη δειγμάτων. (τιμές $p > 0.05$). Φαίνεται λοιπόν, πως η παρουσία του ATP δεν επηρεάζει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Μάλιστα, 5 στους 10 ασθενείς εμφάνιζαν μείωση στην κυτταρική προσκόλληση παρουσία ATP ενώ 1 στους 10 παρουσίαζε μικρή αύξηση και 1 στους 10 δεν παρουσίαζε καμιά μεταβολή. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα αντίστοιχα των μαρτύρων, όπου σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη παρουσία ATP. Παράλληλα, με προσθήκη του αναστολέα, μόνο 1 στους 10 ασθενείς εμφάνιζε αύξηση της προσκόλλησης. Δηλαδή, και στην πλειοψηφία των διαβητικών, 9 στους 10, παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης παρουσία του K252b.

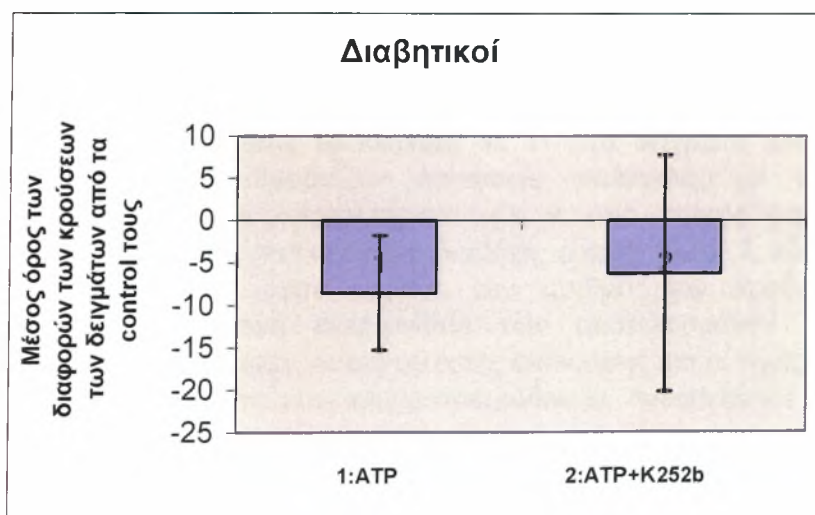
Πίνακας 8.2: Μέσος όρος και συντελεστής απόκλισης κρούσεων δειγμάτων μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων στη λαμινίνη.

Δείγματα	Μονοκύτταρα	Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα +ATP+K252b
Μέσος όρος	66,166	60,571	58,714
SD	22,131	21,392	22,655

Πίνακας 9.2: Επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p) των διαφορών μεταξύ των διαφορών ζευγών δειγμάτων (paired Student t test).

Ζεύγη δειγμάτων	Μονοκύτταρα/ Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα +ATP/ Μονοκύτταρα +ATP+K252b	Μονοκύτταρα / Μονοκύτταρα+ ATP +K252b
Τιμή p (paired t test)	0,0979	0,7695	0,3305

Στη συνέχεια, υπολογίσαμε και πάλι τις διαφορές σε κρούσεις των διαφόρων δειγμάτων από το δείγμα που περιείχε μόνο μονοκύτταρα (control), βρήκαμε τους νέους μέσους όρους και συντελεστές απόκλισης και κατασκευάσαμε το ακόλουθο γράφημα (εικ.9.3).

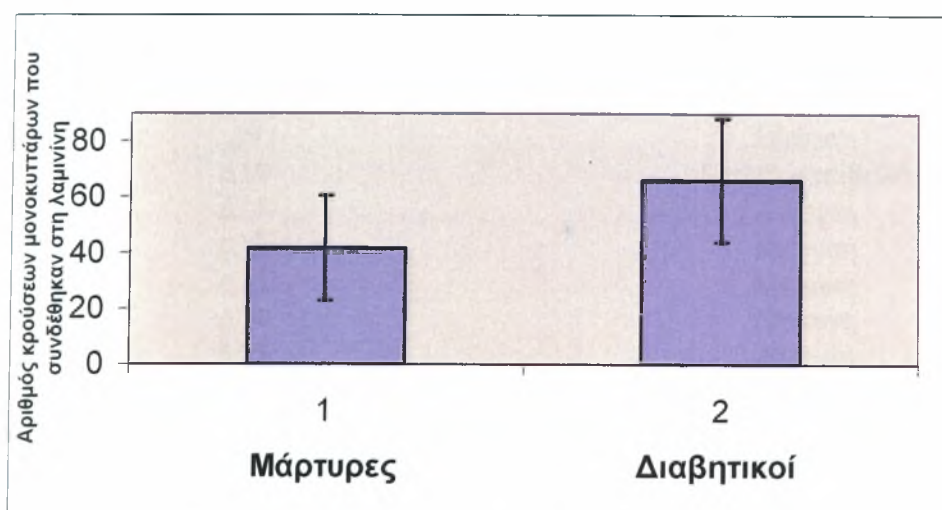


Εικόνα 9.3: Διαφορές στην προσκόλληση των μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων παρουσία ATP η/ και αναστολέα σε σχέση με τα δείγματα control, που περιέχουν μονοκύτταρα και λαμινίνη.

1. Δείγματα μονοκυττάρων με λαμινίνη παρουσία ATP

2. Παρουσία ATP και αναστολέα K252b

Τέλος, θελήσαμε να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη. Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με unpaired Student-t test αυτή τη φορά, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, καθώς η τιμή του p ήταν 0,0337 (μικρότερη της τιμής 0.05). Πιο συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα των διαβητικών προσκολλώνται σε μεγαλύτερο βαθμό στη λαμινίνη ($66,166 \pm 22,131$) σε σχέση με αυτά των μαρτύρων. ($41,758 \pm 18,845$). Οι διαφορές στην κυτταρική προσκόλληση φαίνονται και στο ακόλουθο γράφημα (εικ. 9.4).



Εικόνα 9.4: Διαφορές στην κυτταρική προσκόλληση στη λαμινίνη μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

1. Μονοκύτταρα μαρτύρων
2. Μονοκύτταρα διαβητικών

Το γράφημα κατασκευάστηκε με βάση τους μέσους όρους κρούσεων των μονοκυττάρων στη λαμινίνη και τους συντελεστές απόκλισης.

Στη συνέχεια επαναλάβαμε το πείραμα σε 11 νέα δείγματα ασθενών που έπασχαν από διαβήτη και εμφάνιζαν αγγειακές επιπλοκές, με σκοπό να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι 9 από αυτούς παρουσίαζαν μακροαγγειοπάθεια ως κλινική επιπλοκή του διαβήτη, ενώ οι άλλοι 2, τόσο μακρο-όσο και μικροαγγειοπάθεια. Αφού λάβαμε τον αριθμό των κρούσεων των μονοκυττάρων, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπως και παραπάνω. Ο μέσος όρος κρούσεων, οι συντελεστές απόκλισης και οι τιμές των p που προέκυψαν από τα paired T test που πραγματοποιήθηκαν, αναφέρονται παρακάτω (πιν.9.3, 9.4). Η μοναδική παράμετρος που άλλαξε στην επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας ήταν η μεγαλύτερη ενεργότητα της μεθειονίνης που χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση των μονοκυττάρων, με αποτέλεσμα να λαμβάνουμε μεγαλύτερο αριθμό κρούσεων.

4 στους 11 ασθενείς παρουσίαζαν μικρή αύξηση στην κυτταρική προσκόλληση στη λαμινίνη παρουσία ATP, 6 στους 11 μείωση, ενώ 1 στους 10 δεν παρουσίαζε κάποια μεταβολή. Παρατηρούμε λοιπόν ότι η προσκόλληση των μονοκυττάρων διαβητικών με αγγειοπάθεια δε διαφοροποιείται πολύ από την αντίστοιχη αυτών χωρίς κλινικές επιπλοκές. (πιν. 7.2)

Πίνακας 7.2: Μεταβολή στην κυτταρική προσκόλληση στη λαμινίνη παρουσία ATP μονοκυττάρων ασθενών που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη.

Αριθμός ασθενούς	Μεταβολή στην κυτταρική προσκόλληση παρουσία ATP
Δ1	Μείωση
Δ2	Μείωση
Δ3	Αύξηση
Δ4	Μείωση
Δ5	Μείωση
Δ6	Καμιά μεταβολή
Δ7	Μείωση
Δ8	Αύξηση
Δ9	Μείωση
Δ10	Καμιά μεταβολή
Δ11	Αύξηση
Δ12	Μείωση
Δ13	Μείωση
Δ14	Μείωση
Δ15	Αύξηση
Δ16	Μείωση
Δ17	Αύξηση
Δ18	Μείωση

Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των διαβητικών με μακροαγγειοπάθεια με *paired Student-t test* που έδειξε για ακόμη μια φορά ότι δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου (control) και αυτών που περιείχαν ATP. Βρέθηκε όμως, ότι παρουσία του αναστολέα των εκτοκινασών, K252b, παρατηρούνταν μειωμένος αριθμός κρούσεων. Μάλιστα το *Student-t test* που πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τα δείγματα control με αυτά που περιείχαν αναστολέα έδινε ιδιαίτερα χαμηλή τιμή *p* (0.001), γεγονός που μαρτυρά τη σημαντική διαφορά που υπήρχε μεταξύ τους.

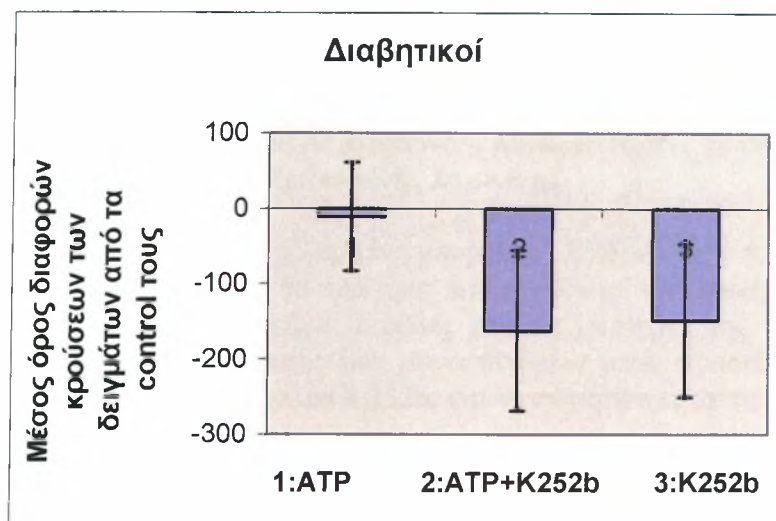
Πίνακας 9.3: Μέσος όρος και συντελεστής απόκλισης κρούσεων δειγμάτων μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων στη λαμινίνη.

Δείγματα	Μονοκύτταρα	Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα +ATP+K252b	Μονοκύτταρα+ K252b
Μέσος όρος	453,8	443	291,7	305,4
SD	246,34	215,34	155,20	159,74

Πίνακας 9.4: Επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p) των διαφορών μεταξύ των διαφορών ζευγών δειγμάτων (paired Student t test).

Ζεύγη δειγμάτων	Μονοκύτταρα/ Μονοκύτταρα +ATP	Μονοκύτταρα / Μονοκύτταρα +ATP+K252b	Μονοκύτταρα +ATP+K252b/ Μονοκύτταρα+K252b
Τιμή p (paired t test)	0,6474	0,001	0,2955

Στη συνέχεια, εργαζόμενοι με τον ίδιο τρόπο όπως και προηγουμένως, (εύρεση των διαφορών κρούσεων των δειγμάτων μονοκυττάρων από τα control τους, υπολογισμός μέσω τιμών και συντελεστών απόκλισης), κατασκευάστηκε το ακόλουθο γράφημα (εικ. 9.4). Και σ' αυτή την περίπτωση, η παρουσία του ATP φαίνεται να μην επηρεάζει το βαθμό προσκόλλησης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη, με αποτέλεσμα να επιβεβαιώνονται τα όσα βρέθηκαν παραπάνω, έπειτα από την επεξεργασία των πρώτων 7 δειγμάτων μονοκυττάρων από ασθενείς με διαβήτη.

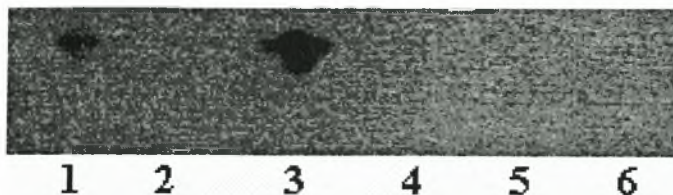


Εικόνα 9.5: Διαφορές στην προσκόλληση μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων με αγγειοπάθεια παρουσία ATP η /και αναστολέα σε σχέση με τα δείγματα control, που περιέχουν μονοκύτταρα και λαμινίνη.

Ανοσοανίχνευση οξειδωμένης λαμινίνης

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η δυνατότητα των μονοκυττάρων να οξειδώνουν τη λαμινίνη. Για το λόγο αυτό η λαμινίνη επωάστηκε με μονοκύτταρα όπως αναφέρεται αναλυτικά στο μέρος «**υλικά και μέθοδοι**». Στα δείγματα προστέθηκε και δινιτροφαινόλη (DNPH), μια ουσία που έχει την ικανότητα να συνδέεται σε οξειδωμένες πρωτεΐνες. Η ουσία αυτή αποτελεί το «αντιγόνο» που

συνδέεται το πρώτο αντίσωμα, το anti-DNP. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο πείραμα συμπεριλάβαμε και αρνητικούς μάρτυρες, στους οποίους δεν είχε προστεθεί δινιτροφαινόλη. Η εικόνα που λάβαμε είναι η ακόλουθη:(εικ. 10.1)



Εικόνα 10.1: Ανοσοανίχνευση οξειδωμένης λαμινίνης

- 1: Λαμινίνη και μονοκύτταρα
- 2:Αρνητικός μάρτυρας με λαμινίνη και μονοκύτταρα απουσία DNP
- 3:Παρουσία ABAP
- 4:Αρνητικός μάρτυρας με ABAP απουσία DNP
- 5:Λαμινίνη με μονοκύτταρα και ATP
- 6:Αρνητικός μάρτυρας με λαμινίνη, μονοκύτταρα και ATP, απουσία DNP

Όπως φαίνεται και παραπάνω, σήμα για οξειδωμένη πρωτεΐνη λαμβάνουμε στο δείγμα 1 που περιέχει μονοκύτταρα, λαμινίνη και δινιτροφαινόλη. Φαίνεται λοιπόν ότι τα μονοκύτταρα οξειδώνουν τη λαμινίνη. Το σήμα όμως που παίρνουμε δεν είναι το ίδιο έντονο με αυτό του δείγματος 3 που περιέχει ABAP (θετικός μάρτυρας). Η παραπάνω ουσία έχει την ικανότητα να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου, και μάλιστα αυξανομένης της θερμοκρασίας, η παραγωγή είναι πιο εκτεταμένη. Παράλληλα, όπως ήταν αναμενόμενο, δε λάβαμε σήμα από δείγματα στα οποία απουσίαζε η δινιτροφαινόλη και χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες οξείδωσης. Τέλος, παρατηρούμε ότι παρουσία ATP η λαμινίνη δεν οξειδώνεται.

Προσκόλληση σημασμένων με μεθειονίνη μονοκυττάρων σε υπόστρωμα οξειδωμένης λαμινίνης

Εφόσον αποδείχτηκε ότι η λαμινίνη μπορεί να οξειδωθεί από τα μονοκύτταρα, αλλά και το οξειδωτικό ABAP, το ερώτημα που προέκυψε στη συνέχεια ήταν αν η οξείδωση αυτή μπορεί να επηρεάσει κάποιες από τις ιδιότητές της. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε την ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων στην οξειδωμένη λαμινίνη, παρουσία ATP η / και του αναστολέα K252b, και τη συγκρίναμε με το μη οξειδωμένο μόριο.

Τόσο η πειραματική διαδικασία, όσο και ο τρόπος επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ήταν παρόμοιοι με τους αντίστοιχους που πραγματοποιήθηκαν κατά τη μελέτη προσκόλλησης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη. Η μόνη διαφορά ήταν ότι η λαμινίνη πριν την επίστρωσή της σε πινάκια πολυεστερνίου (πλάκες elisa) οξειδωνόταν από 2,2' (2-μεθυλπροπιοναμιδίνη) διυδροχλωρίδιο (ABAP). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μονοκύτταρα που προέρχονταν από 7 φυσιολογικά άτομα και 5 ασθενείς που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Τέλος, προκειμένου να γίνουν οι σχετικές συγκρίσεις μεταξύ των δύο μορφών λαμινίνης (οξειδωμένη και μη), σε ότι αφορά την ικανότητα σύνδεσής των μονοκυττάρων σ αυτές, συμπεριλάβαμε και δείγματα μη οξειδωμένης λαμινίνης .

Οι μέσοι όροι των κρούσεων καθώς και οι συντελεστές απόκλισης παρουσιάζονται πιο κάτω σε πίνακα (πιν.10.1) Η στατιστική σημαντικότητα (ρ) των διαφορών μεταξύ των ομάδων, υπολογίστηκε με Student-t test (paired), και έδειξε ότι τα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων συνδέονται λιγότερο στην οξειδωμένη

λαμινίνη σε σύγκριση με την μη οξειδωμένη ($p=0,007$). Η προσθήκη ATP αυξάνει την ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων που προέρχονται από φυσιολογικά άτομα στη λαμινίνη ($p=0,002$) αλλά όχι στην οξειδωμένη λαμινίνη (0,9572). Τέλος βρέθηκε πως παρουσία του αναστολέα K252b μειωνόταν η σύνδεση των μονοκυττάρων και στην οξειδωμένη λαμινίνη. ($p=0,0435$). (πιν.10.2).

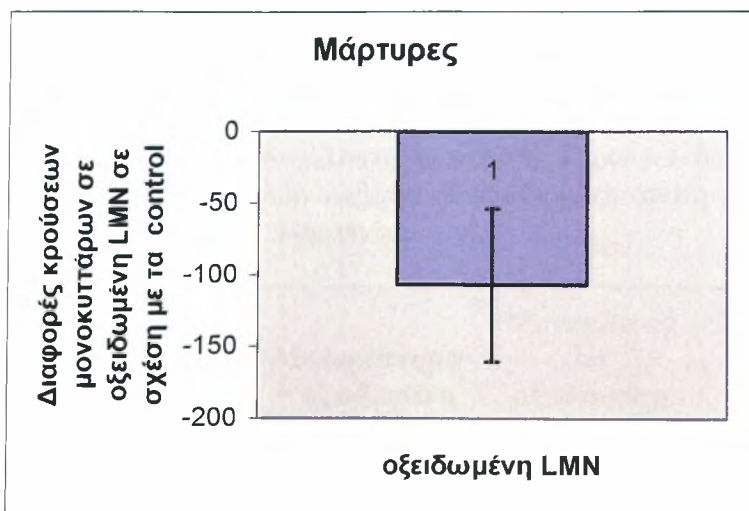
Πίνακας 10.1: Μέσος όρος και συντελεστής απόκλισης κρούσεων δειγμάτων μονοκυττάρων φυσιολογικών ατόμων, σε οξειδωμένη και μη οξειδωμένη λαμινίνη.

Δείγματα	Μονοκύτταρα+LMN	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP+K252b	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP+K252b
Μέσος όρος	501,33	396,66	402,5	240,28	204
SD	175,06	205,99	158,17	104,78	87,25

Πίνακας 10.2 : Επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p) των διαφορών μεταξύ των διαφόρων ζευγών δειγμάτων (paired Student t test).

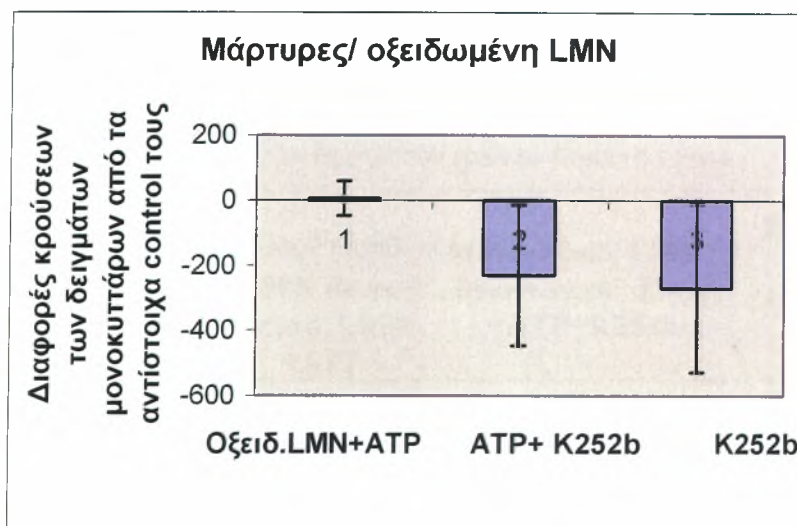
Ζεύγη δειγμάτων	Μον.+LMN/Μον.+οξειδ. LMN	Μον.+οξειδ. LMN /Μον.+οξειδ. LMN+ATP	Μον.+οξειδ. LMN /Μον.+οξειδ. LMN+ATP+K252b	Μονοκύτταρα+ATP/Μονοκύτταρα+K252b
Τιμή p (paired t test)	0,007	0,9572	0,0435	0,0089

Όλες οι διαφορές σύνδεσης των μονοκυττάρων στις διάφορες μορφές λαμινίνης φαίνονται και στα ακόλουθα γραφήματα.(εικ.10.2, 10.3).



Εικόνα 10.2 Μείωση σύνδεσης των μονοκυττάρων σε οξειδωμένη λαμινίνη.

Το γράφημα κατασκευάστηκε με βάση τις διαφορές κρούσεων των μονοκυττάρων σε οξειδωμένη λαμινίνη σε σχέση με τις αντίστοιχες σε μη τροποποιημένη πρωτεΐνη.



Εικόνα 10.3: Διαφορές στη σύνδεση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη παρουσία ATP και/ η αναστολέα K252b σε σχέση με τη σύνδεση τους απουσία ATP και αναστολέα.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα η παρουσία ATP δεν επηρεάζει την προσκόλληση των κυτταρικών προσκόλληση στη λαμινίνη, ενώ αντίθετα ο αναστολέας την μειώνει.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η ίδια πειραματική διαδικασία και σε 5 άτομα που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα των ασθενών συνδέονται περισσότερο τόσο στη λαμινίνη ($p=0,0402$), όσο και στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μονοκύτταρα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μονοκύτταρα των μαρτύρων συνδέονται λιγότερο στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με τη μη οξειδωμένη. ($p=0,007$). Αντίθετα, η διαφορά αυτή δεν παρατηρήθηκε όταν εξετάζαμε μονοκύτταρα που προέρχονταν από ασθενείς με διαβήτη. ($p=0,6209$). Παράλληλα, στους διαβητικούς ασθενείς η σύνδεση στη λαμινίνη δεν επηρεάζονταν από την παρουσία ATP, ανεξάρτητα από την κατάσταση οξείδωσης της πρωτεΐνης. Τέλος, στη περίπτωση

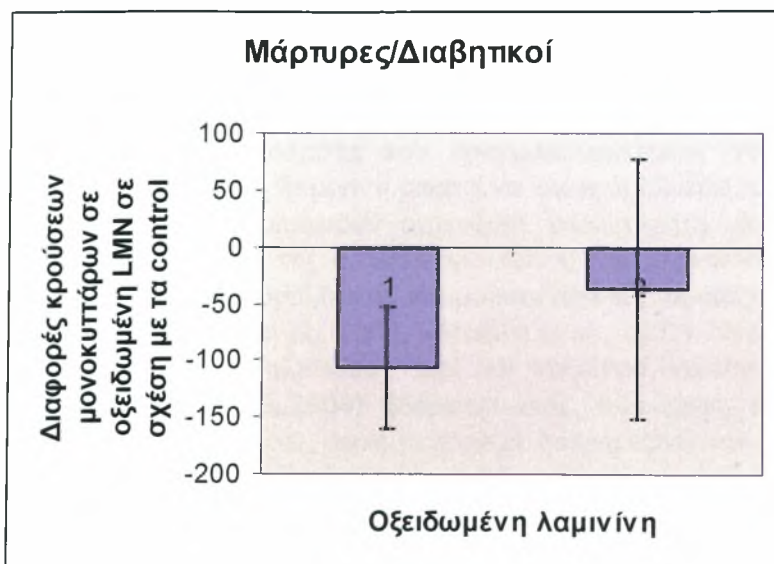
αυτή φαίνεται ο αναστολέας να μην επηρεάζει σημαντικά το βαθμό προσκόλλησης. ($p=0,0512$).

Πίνακας 10.1: Μέσος όρος και συντελεστής απόκλισης κρούσεων δειγμάτων μονοκύτταρων ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, σε οξειδωμένη και μη οξειδωμένη λαμινίνη.

Δείγματα διαβητικών	Μονοκύτταρα+LMN	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP+K252b	Μονοκύτταρα+οξειδωμένη LMN+ATP+K252b
Μέσος όρος	588,6	551,2	546,6	374,6	404,2
SD	291,43	248,76	273,89	187,91	180,14

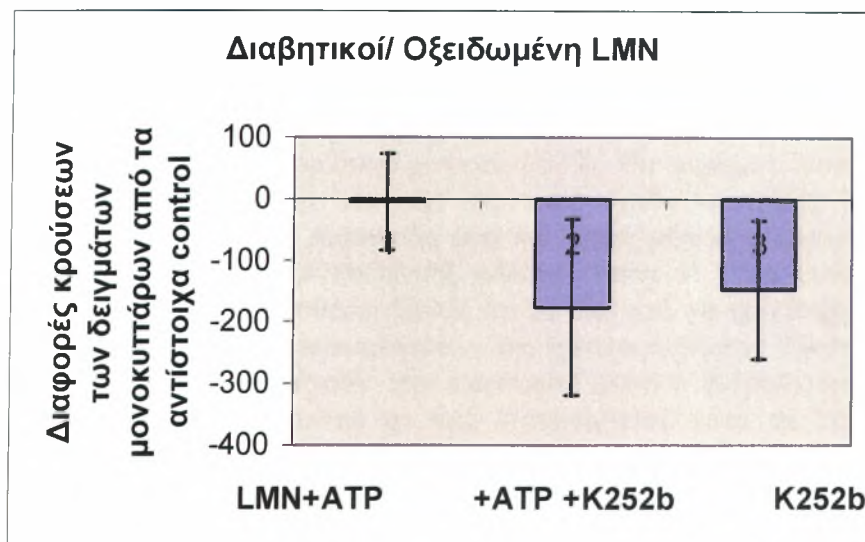
Πίνακας 10.2 : Επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p) των διαφορών μεταξύ των διαφόρων ζευγών δειγμάτων (paired Student t test).

Ζεύγη δειγμάτων	Μον.+LMN/Μον.+οξειδ. LMN	Μον.+ οξειδ. LMN /Μον.+οξειδ. LMN +ATP	Μον.+ οξειδ. LMN /Μον.+ οξειδ. LMN +ATP+K252b	Μονοκύτταρα +ATP/Μονοκύτταρα +K252b
Τιμή p (paired t test)	0,6209	0,9019	0,0512	0,1361



Εικόνα 10.4: Σύνδεση μονοκυττάρων μαρτύρων και ασθενών με διαβήτη σε οξειδωμένη λαμινίνη σε σχέση με την αντίστοιχη σε μη τροποποιημένη πρωτεΐνη.

Το γράφημα κατασκευάστηκε υπολογίζοντας τις διαφορές των κρούσεων των μονοκυττάρων στην οξειδωμένη λαμινίνη από τις κρούσεις τους σε μη οξειδωμένη λαμινίνη. Από την εικόνα φαίνεται πως σε αντίθεση με τους μάρτυρες, οι διαφορές σύνδεσης των μονοκυττάρων σε οξειδωμένη και μη λαμινίνη στους διαβητικούς, δεν είναι σημαντικές.



Εικόνα 10.5: Μεταβολές στην προσκόλληση των μονοκυττάρων διαβητικών ατόμων σε λαμινίνη παρουσία ATP και/ ή αναστολέα των εκτο-κινασών, K252b.

Από την παραπάνω εικόνα γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία του ATP δεν επηρεάζει τη διαδικασία σύνδεσης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη. Παρατηρείται μια μικρή πτώση των κρούσεων παρουσία του αναστολέα, αλλά όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παλιότερα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο βιολογικής χημείας έδειξαν ότι η λαμινίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες PKA και PKC, που φωσφορυλιώνουν αμινοξικά υπολείμματα σερίνης (ή και θρεονίνης), σε περιοχές κυρίως της α , αλλά και των β και γ αλυσίδων (Τραχανά, 2003). Οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης του μορίου από τις παραπάνω κινάσες δεν είναι ακόμη γνωστές (Koliakos et al., 2000, Koliakos et al., 2001). Νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι η λαμινίνη φωσφορυλιώνεται από την καζεϊνική κινάση τύπου II των μονοκυττάρων (Trachana et al., 2004). Μάλιστα στις τελευταίες αυτές μελέτες διαπιστώθηκε ότι η φωσφορυλίωση αυτή επηρεάζει διαφορετικά την προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη ανάλογα εάν αυτά προέρχονταν από φυσιολογικούς μάρτυρες ή ασθενείς με διαβήτη (Trachana et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε περαιτέρω την προσκόλληση των μονοκυττάρων φυσιολογικών και διαβητικών ασθενών σε σχέση με τη φωσφορυλίωση της λαμινίνης. Στα πλαίσια αυτά επιβεβαιώθηκε κατ' αρχήν με τη χρήση ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος η ικανότητα των μονοκυττάρων του αίματος να φωσφορυλιώνουν τη λαμινίνη-1. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν επίσης ότι υπεύθυνο ένζυμο ήταν η καζεϊνική κινάση II. Όπως και στις προηγούμενες μελέτες η ακριβής θέση όμως της φωσφορυλίωσης της λαμινίνης δεν είναι ακόμα γνωστή και πρέπει να διερευνηθεί.

Είναι γνωστό ότι στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, απαντώνται τρεις τουλάχιστον τύποι κινασών, η PKA, η PKC και μια καζεϊνική κινάση τύπου II (Geberhiwot et al., 1995). Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω από προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι και οι τρεις αυτές κινάσες φωσφορυλιώνουν τη λαμινίνη και πιθανόν σε διαφορετικά σημεία του μορίου (Τραχανά, 2003). Θα περίμενε λοιπόν κανείς η λαμινίνη να φωσφορυλιώνεται και από τις τρεις αυτές πρωτεϊκές κινάσες. Τα αποτελέσματα όμως τόσο της παρούσης όσο και προηγούμενων εργασιών έδειξαν φωσφορυλίωση μόνο από την καζεϊνική κινάση τύπου II. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν εάν υποθέσει κανείς ότι τα δύο από τα τρία ένζυμα δεν ήταν ενεργά κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της φωσφορυλίωσης. Είναι γνωστό ότι και η PKA και η PKC απαιτούν την παρουσία μορίων ενεργοποιητών για να δράσουν. Δεν είναι όμως γνωστό το πώς διατάσσονται αυτά τα ένζυμα στην πλασματική μεμβράνη και εάν οι θέσεις σύνδεσης των μορίων ενεργοποιητών βρίσκονται έξω ή μέσα στο κύτταρο. Επίσης δεν αποκλείεται τα ένζυμα αυτά να ενεργοποιούνται με άγνωστους ενδοκυττάριους ή εξωκυττάριους μηχανισμούς η ακόμη να βρίσκονται και σε κατάσταση αναστολής η οποία να αίρεται κάτω από ορισμένες και μόνο συνθήκες. Οι μηχανισμοί αυτοί εφ' όσον ισχύουν θα έδιναν στο κύτταρο μία ευελιξία αλληλεπίδρασης με μόρια του περιβάλλοντος του ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονταν κατά τη διάρκεια της μελέτης διέφεραν από τις αντίστοιχες *in vivo* συνθήκες. Παραδείγματος χάριν φυσιολογικά στην εξωκυττάρια ουσία υπάρχουν αυξημένα ποσά γλυκοζαμινογλυκανών κυρίως του τύπου της θειικής ηπαράνης. Είναι όμως γνωστό ότι η ηπαρίνη, αναστέλλει τόσο την καζεϊνική κινάση II όσο και την PKC. Θα αναμέναμε λοιπόν, η θειική ηπαράνη, ένα μόριο που μοιάζει με την ηπαρίνη, να αναστέλλει τις πιο πάνω κινάσες. Εντούτοις, έχει βρεθεί ότι η θειική ηπαράνη είναι 40 φορές λιγότερο ενεργή από την ηπαρίνη όσον αφορά την ικανότητά της να

αναστέλλει την καζεϊνική κινάση II. Επίσης, άλλοι όξινοι μουκοπολυσακχαρίτες έχουν μικρή επίδραση στην ενζυμική ενεργότητά της (Hathaway et al., 1980). Δεν είναι γνωστό εάν κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για την πρωτεϊνική κινάση C. Επιπλέον, οι αλυσίδες της θειϊκής ηπαράνης εμφανίζουν ετερογένεια, ως αποτέλεσμα της προσθήκης σε αυτή θειϊκών ομάδων από γειτονικά κύτταρα (Nakato&Kimata, 2002). Όμως παραμένει άγνωστο μέχρι σήμερα, αν αυτή η δυνατότητα μεταβολής της δομής των μορίων θειϊκής ηπαράνης μπορεί να αποτελέσει ένα μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητας της καζεϊνικής εκτοκινάσης II ή ακόμη και της εκτοPKC.

Η λαμινίνη-1 αποτέλεσε σε πολλές περιπτώσεις αντικείμενο έρευνας προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονοκυττάρων και λαμινίνης. Εντούτοις, η λαμινίνη-1, δεν εντοπίζεται στο μυελό των οστών και στο τοίχωμα των περισσότερων αγγείων (Frieser et al., 1997). Αντίθετα, εκεί απαντώνται κυρίως οι ισομορφές 8 και 10, που έχουν κοινές β και γ αλυσίδες με τη λαμινίνη-1. Επομένως, πιθανότατα η καζεϊνική κινάση II των μονοκυττάρων να ειδικεύεται στη φωσφορυλίωση των β1 και γ1 αλυσίδων λαμινίνης που απαντώνται στα αγγειακά τοιχώματα. Δεν γνωρίζουμε αν η PKC και η PKA μπορούν να φωσφορυλιώνουν τις αλυσίδες α4 και 5 των ισομορφών της λαμινίνης 8 και 10.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, έδειξαν ότι παρουσία ATP, τα μονοκύτταρα συνδέονται περισσότερο στη λαμινίνη. Αυτό είναι σύμφωνο και με προηγούμενες παρατηρήσεις (Τραχανά 2003). Ως γνωστό, τα μονοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, στα πλαίσια επιτέλεσης συγκεκριμένων λειτουργιών. Αντιστρεπτή προσκόλληση στην ECM επάγει τη μετανάστευση των μονοκυττάρων από το αγγειακό σύστημα στις διάφορες περιοχές μόλυνσης ή σε άλλες προκειμένου να μετατραπούν σε μακροφάγα (Owen et al., 1992). Πιθανότατα λοιπόν αυτός ο αντιστρεπτός μηχανισμός προσκόλλησης να εξαρτάται άμεσα από τον αντιστρεπτό μηχανισμό της φωσφορυλίωσης (φωσφορυλίωση ↔ αποφωσφορυλίωση).

Δεν αποκλείεται η διαδικασία της φωσφορυλίωσης να τροποποιεί όχι μόνο τη δομή της λαμινίνης αλλά και των ιντεγκρινικών υποδοχέων και έτσι να επάγεται η μεγαλύτερη σύνδεση στη λαμινίνη φωσφορυλιωμένη ή όχι.. Άλλα ερευνητικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η εξωκυττάρια φωσφορυλίωση προωθεί την κυτταρική προσκόλληση. Βρέθηκε λοιπόν ότι κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, που λαμβάνει χώρα λίγο πριν τη μετανάστευσή τους προς τους ιστούς και καθώς είναι συνδεδεμένα στο αγγειακό τοίχωμα, αυξάνεται η δράση των εκτοκινάσων που απαντώνται την επιφάνειά τους, και κυρίως της καζεϊνικής κινάσης II. (Geberhiwot et al., 1995). Επίσης, κατά τη διάρκεια φλεγμονής, τόσο τα κύτταρα του ενδοθηλίου, όσο και τα T- βοηθοί και T- κυτταροτοξικά, απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες ATP που είναι απαραίτητο για τη δράση των εκτοκινάσων (Chiang et al., 1988).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, κατά τη φλεγμονή, όπου τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα μεταναστεύουν στον προσβεβλημένο ιστό, συνδέονται στη λαμινίνη της εξωκυττάριας ουσίας προκειμένου να εκδηλώσουν τη δράση τους. Στη φάση αυτή, όπου η σύνδεση στη λαμινίνη είναι ιδιαίτερα σημαντική, παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα των εκτοκινάσων, που φαίνεται πως συμβάλλουν στην πιο εκτεταμένη σύνδεση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη, στην περίπτωση των φυσιολογικών ατόμων, πιθανότατα αλλάζοντας τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματά της παρούσης εργασίας έδειξαν ότι τα φυσιολογικά μονοκύτταρα προσκολλώνται περισσότερο στη λαμινίνη παρουσία ATP και ότι ο αναστολέας των πρωτεϊνικών κινάσων K252β εμποδίζει αυτή τη δράση. Παρ' όλα αυτά όμως, η προσθήκη του ίδιου αναστολέα είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της

προσκόλλησης των κυττάρων στη λαμινίνη ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ATP. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αναστολέας K252b είναι σχετικά ογκώδες μόριο και πιθανόν να επηρεάζει αφ' εαυτού διάφορες λειτουργίες των μονοκυττάρων ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωση.

Θα μπορούσε όμως να υποστηριχθεί ότι η αυξημένη προσκόλληση των κυττάρων στη λαμινίνη παρουσία ATP μπορεί να μην οφείλεται στη φωσφορυλίωση της λαμινίνης αλλά στη δράση του ATP πιθανόν μέσω αδενυλικών υποδοχέων.

Για να αποκλεισθεί η πιθανότητα αυτή έχουν σχεδιασθεί για το άμεσο μέλλον πειράματα προσκόλλησης των μονοκυττάρων σε λαμινίνη παρουσία ATP και ειδικών αναστολέων της καζεϊνικής κινάσης II. Επίσης θα γίνουν πειράματα προσκόλλησης μονοκυττάρων σε λαμινίνη που θα έχει φωσφορυλιωθεί εκ των προτέρων με καζεϊνική κινάση II του εμπορίου.

Η μελέτη μας όμως δεν περιορίστηκε μόνο στα φυσιολογικά άτομα. Πολλές αναφορές εμπλέκουν την ικανότητα προσκόλλησης και μετανάστευσης των μονοκυττάρων με το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (Blaaha et al., 2004, Takahashi et al., 2002). Μάλιστα, δεδομένου ότι η αθηρωμάτωση αποτελεί συχνή κλινική επιπλοκή που εμφανίζεται σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, (Schulz et al., 2003), στην έρευνά μας συμπεριλάβαμε και διαβητικούς.

Επαναλαμβάνοντας λοιπόν την ίδια πειραματική διαδικασία, αυτή τη φορά σε διαβητικούς, με ή χωρίς αγγειοπάθεια, τα αποτελέσματα που λάβαμε, συγκρινόμενα με αυτά των μαρτύρων, ήταν διαφορετικά.. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη σύνδεση των μονοκυττάρων των ασθενών αυτών στη λαμινίνη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα και μάλιστα η σύνδεση αυτή ήταν ανεξάρτητη από τη φωσφορυλίωσή της. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ότι αφορά την προσκόλληση των κυττάρων στη λαμινίνη μεταξύ των ασθενών που παρουσίαζαν μακροαγγειοπάθεια και αυτών που παρουσίαζαν μικροαγγειοπάθεια. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν εάν υποθέσει κανείς ότι στον διαβήτη ενεργοποιούνται διαφορετικοί μηχανισμοί σύνδεσης των μονοκυττάρων στη λαμινίνη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Οι μηχανισμοί αυτοί που είναι ανεξάρτητοι από την παρουσία του ATP και οδηγούν σε μεγαλύτερη συγγένεια των μονοκυττάρων με τη λαμινίνη. Στους μηχανισμούς αυτούς μπορεί να περιλαμβάνονται διαφορετικά μόρια σύνδεσης (ιντεγκρίνες). Είναι γνωστό ότι το είδος των κυτταρικών ιντεγκρινών σε νεφρικά κύτταρα μπορεί να μεταβάλλεται στον διαβήτη και στην υπεργλυκαιμία (Chen et al. 2000, Karamessinis et al. 2002). Πρόσφατα οι Bouma et al. (2004) ανακοίνωσαν ότι τα μονοκύτταρα των διαβητικών ασθενών συνδέονται περισσότερο στη φμπρονεκτίνη και εκφράζουν υψηλότερα ποσά των ιντεγκρινών CD11b και CD18.

Οι αλλαγές στη δομή και λειτουργία των ιντεγκρινικών υποδοχέων που απαντώνται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων μπορεί να σχετίζονται με την σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα μονοκύτταρα διαπερνούν τα ενδοθηλιακά και εισέρχονται στον υποενδοθηλιακό χώρο. Εκεί υπάρχουν και μεγάλες ποσότητες λαμινίνης. Στον διαβήτη, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα μονοκύτταρα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με την παραπάνω πρωτεΐνη και έτσι πιθανόν να παραμένουν στον υποενδοθηλιακό χώρο, προκαλώντας την φαγοκυττάρωση των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών και τη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων (αθηρωμάτωση). Άλλωστε πολλές μελέτες που αφορούν στην παθογένεια πλήθους ασθενειών (συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη), στρέφονται προς αυτή την κατεύθυνση (Horwitz, 1997). Τα αποτελέσματά μας επίσης δείχνουν ότι οι εκτοκινάσες των μονοκυττάρων μπορεί να είναι λιγότερο ενεργές στον διαβήτη.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας μελετήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς, η οξειδωση της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα και οι συνέπειες της στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ίδιο μόριο. Στην πειραματική διαδικασία της ανοσοανίχνευσης που πραγματοποιήσαμε, βρέθηκε ότι τα μονοκύτταρα μπορούν να οξειδώσουν τη λαμινίνη. Βέβαια το σήμα που λάβαμε δεν ήταν ιδιαίτερα έντονο και αυτό ίσως να μαρτυρά την μικρή αλλά υπαρκτή παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μονοκύτταρα. Άλλωστε είναι γνωστό ότι τα μονοκύτταρα όπως και άλλα φαγοκύτταρα του οργανισμού παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κυρίως ως ανταπόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής (Ahmed et al., 2003). Σημαντικό εύρημα από την ήταν και η απουσία σήματος οξειδωσης από τα μονοκύτταρα παρουσία του ATP. Φαίνεται λοιπόν ότι το ATP πιθανόν μέσω αδενοσινικών υποδοχέων εμποδίζει τα μονοκύτταρα να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Μια άλλη εξήγηση θα ήταν ότι η φωσφορυλίωση της παραπάνω πρωτεΐνης να ανέστειλε την οξειδωσή της. Επίσης δεν αποκλείεται και κάποια εμπλοκή των εκτοκινασών σ' αυτή τη διαδικασία. Είναι απαραίτητο να γίνει περαιτέρω μελέτη για να διευκρινισθούν οι πιο πάνω μηχανισμοί. Ακόμη μένει να εξετασθεί εάν και τα μονοκύτταρα των διαβητικών οξειδώνουν τη λαμινίνη και πως επιδρά το ATP στην περίπτωση αυτή.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν τα φυσιολογικά μονοκύτταρα συνδέονται λιγότερο στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με την μη οξειδωμένη μορφή της. Η προσθήκη ATP δεν επηρέαζε την προσκόλληση των μονοκυττάρων στην οξειδωμένη λαμινίνη.

Μπορεί να υποθέσει κανείς ότι κάποιοι ιντεγκρινικοί υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια των μονοκυττάρων έχουν μικρή ικανότητα αναγνώρισης της οξειδωμένης λαμινίνης, ενώ κάποιοι άλλοι, που αποτελούν μειοψηφία στα φυσιολογικά μονοκύτταρα, αναγνωρίζουν κυρίως την οξειδωμένη λαμινίνη. Η φωσφορυλίωση ή η όποια άλλη δράση του ATP φαίνεται να επηρεάζει κυρίως τους υποδοχείς σύνδεσης με την μη οξειδωμένη λαμινίνη και όχι αυτούς που συνδέονται με την οξειδωμένη λαμινίνη. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να εξηγήσει και την αυξημένη σύνδεση των φυσιολογικών μονοκυττάρων στην λαμινίνη παρουσία ATP.

Στα μονοκύτταρα των ασθενών με διαβήτη είναι πιθανόν η σύνδεση στη λαμινίνη να γίνεται κυρίως με τους υποδοχείς που αναγνωρίζουν την οξειδωμένη πρωτεΐνη, οι οποίοι δεν επηρεάζονται από το ATP. Πράγματι τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι τα μονοκύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη συνδέονται κατά πολύ περισσότερο με την οξειδωμένη λαμινίνη από ότι τα φυσιολογικά και αυτή η σύνδεση δεν επηρεάζεται από την παρουσία ATP. Μάλιστα η ικανότητα σύνδεσης στη λαμινίνη των μονοκυττάρων που προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη δεν επηρεάζεται από την οξειδωση της λαμινίνης, δεδομένου ότι τα μονοκύτταρα των διαβητικών συνδέονται εξ ίσου καλά τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην μη οξειδωμένη λαμινίνη. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν εάν υποθέσει κανείς ότι η πλειοψηφία των υποδοχέων των διαβητικών κυττάρων αναγνωρίζει εξίσου καλά και την οξειδωμένη και την μη οξειδωμένη μορφή. Θα μπορούσε κανείς επίσης να υποθέσει ότι τα μονοκύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τη λαμινίνη σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα φυσιολογικά κύτταρα και παράλληλα φέρουν κατά πλειοψηφία υποδοχείς που αναγνωρίζουν και συνδέονται κυρίως με την οξειδωμένη μορφή.

Δεν είναι ακόμη γνωστό ποιοι ακριβώς υποδοχείς των μονοκυττάρων αναγνωρίζουν την οξειδωμένη μορφή. Οι Huseman et al. (2001) ανέφεραν ότι οι υποδοχείς CD11b και CD 18 σχετίζονται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά τη σύνδεση των μονοκυττάρων με οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες. Σημειώνεται ότι οι ίδιοι

αυτοί υποδοχείς βρέθηκαν αυξημένοι σε μονοκύτταρα που προέρχονταν από ασθενείς με διαβήτη (Bouma et al. 2004). Δεν είναι όμως γνωστό εάν οι ίδιοι ή κάποιοι άλλοι υποδοχείς σχετίζονται με τη σύνδεση των μονοκυττάρων στην οξειδωμένη λαμίνη.

Στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ συνεχίζεται η έρευνα για να διευκρινισθούν οι πιο πάνω μηχανισμοί με απώτερο στόχο τη δυνατότητα πρότασης προληπτικών ή και θεραπευτικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα μονοκύτταρα έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν τη λαμινίνη μέσω της εκτοκινάσης καζεϊνική κινάση II που διαθέτουν στην επιφάνειά τους.
- Τα μονοκύτταρα των διαβητικών προσκολλώνται περισσότερο στη λαμινίνη συγκριτικά με τα μονοκύτταρα των φυσιολογικών ατόμων.
- Στα φυσιολογικά άτομα, παρουσία ATP αυξάνεται ο αριθμός των μονοκυττάρων που προσκολλώνται στη λαμινίνη, ενώ στους διαβητικούς δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση.
- Η αυξημένη προσκόλληση των μονοκυττάρων στη λαμινίνη σε διαβητικούς δεν αποδίδεται στη φωσφορυλίωση.
- Τα μονοκύτταρα έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τη λαμινίνη.
- Τα μονοκύτταρα των διαβητικών συνδέονται περισσότερο στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μονοκύτταρα.
- Τα μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων συνδέονται λιγότερο στην οξειδωμένη λαμινίνη σε σύγκριση με την μη οξειδωμένη.
- Η σύνδεση των μονοκυττάρων των διαβητικών στη λαμινίνη δεν επηρεάζεται από την κατάσταση οξείδωσής της.
- Η προσθήκη ATP δεν επηρεάζει την ικανότητα σύνδεσης των μονοκυττάρων στην οξειδωμένη λαμινίνη, τόσο στα φυσιολογικά άτομα, όσο και στους ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmed S., Adamidis A., Jan LC., Gibbons N. and Mattana J.(2003). Dexamethasone attenuates oxidation of extracellular matrix proteins by human monocytes. *Exp Mol Pathol.*, **75(2)**, 137-143
- Amano F., Kitagawa T. and Akamatsu Y.(1984). Protein kinase activity on the cell surface of a macrophage-like cell line, J774.1 cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **803**, 163-173
- American Diabetes Association.(2003b).Diabetic nephropathy. *Diabetes care*,**26**, 94-98
- American Diabetes Association.(2003c).Diabetic retinopathy. *Diabetes care*,**26**,99-102
- American Diabetes Association.(2003g).Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes care*,**26**,33-50
- Aoyagi K., Kuzure Y., Shahrzad S., Hirayama A., Nagase S. and Ueda A. (2003). Inhibition by heparin of protein kinase C activation and hydroxyl radical generation in puromycin aminonucleoside treated isolated rat hepatocytes. *Mol.Cell,Biochem.*,**244 (1-2)**, 3-9
- Badimon L. (2001). New challenges in the etiopathogenesis of atherothrombosis. *Cerebrovascular Diseases*, **11**, 80-84
- Berlett B. and Stadtman E. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 20313-20316
- Blaha M., Krejsek J., Blaha V., Andrys C., Vokurkova D., Maly J., Blazek M. and Skorepova M. (2004). Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol.Res.*, **53**, 273-278
- Bouma G., Lam-Tse W., Wierenga-Wolf A., Drexhage H.and Versnel M.(2004). Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin.,*Diabetes*,**53(8)**,1979-1986
- BowesS.(2003).Managing diabetes complications.www.nursingceu.com
- Bruch M., Landwehr R and Engel J.(1989). Dissection of laminin by cathepsin G into its long-arm and short-arm structures and localization of regions involved in calcium dependent stabilization and self-association. *Eur.J.Biochem*, **185**, 271-279
- Bruijn J.A, Hagendoorn P.C, Hoedemaeker P.J and Fleuren G.J.(1988).The extracellular matrix in pathology.*J.Lab.Clin.Med.*,**111(2)**, 140-149
- Burgeson R., Chiquet M., Deutzmann R., Eklom P., Engel J., Kleinmann H., Martin G., Meneguzzi G., Paulsson M., Sanes J., Timpl R., Tryggvason K. and Yurchenco P. (1994). A new nomenclature for laminins. *Matrix Biol.*,**5**, 209-211
- Charonis A.and Tsilibary E. (1990). Assembly of basement membrane proteins in Adair, W.S and Mecham, R.P. (eds):*Organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular Matrix*. Academic Press, Inc.,San Diego,85-117

- Chen H., Chen C., Guh J., Shin S and Lai Y. (2000). Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes., *Life Sci.*, **67(19)**, 2345-2353
- Chiang T., Wojcikiewicz R., Kang A. and Fain J. (1988). Phosphorylation of the outer surface of platelets enhances the effects of collagen on aggregation, ATP release, calcium translocation and phosphoinositide hydrolysis. *Thromb.Res*, **50** , 719-731
- Chung A., Jaffe R.M, Freeman I., Vergnes J., Braginski J. and Carlin B.(1979).Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell*, **16**, 277-287
- Cohen P., (1988). Protein phosphorylation and hormone action. *Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, **234**, 387-394
- Colognato H. and Yurchenco P.(2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *De.Dyn*, **218**, 213-234
- De Arcangelis A., Lefebvre O. and Machine- Neuville A.(2001). Over expression of laminin a1-chain in colon cancer induces an increased tumor growth.*Int.J.Cancer*,**94**, 44-53
- De Arcangelis A., Neuville P., Boukamel R., Lefebvre O., Kediger M. and Simon-Assmann P. (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J.Cell.Biol.*, **133**, 291-299
- DeHahn K., Gonzales M., Hopkinson S., Chandel N., Brunelle J.and Jones J. (2004). The a4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. *Experimental Cell Research*, **294**, 281-289
- Dziadek M. And Timpl R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells.*Dev.Biol.*, **111**, 372-382
- Ekblom P. and Timpl R. (1996). Cell to cell contact and extracellular matrix. A multifaceted approach emerging. *Curr.Opin.Cell.Biol.*, **8**, 599-601
- Ekblom P., Lonai P., and Talts J.(2003). Expression and biological role of laminin-1.*Matrix Biology*, **22**, 35-47
- Emes C. and Crawford N. (1982). Ecto-protein kinase activity in rabbit peritoneal polymorphonuclear leucocytes. *Biochim.Biophys.Acta.*, **717**, 98-104
- Engel J., Hunter I., Schulthess T, Beck K., Dixon T. and Parry D. (1991). Assembly of laminin isoforms by triple- and double-stranded coiled-coil structures. *Biochem.Soc.Trans.*, **19**, 839-843
- Falk J., Salmivitra K., Durbeej M., Larsson E., Ekblom M., Vestweber D and Ekblom P. (1996). Integrin alpha 6B beta 1 is involved in kidney tubulogenesis in vitro.*J.Cell.Sci.*, **109(Pt12)**, 2801-2810
- Frieser M., Nockel H., Paulsch F., Roder C., Hahn A. and Deutzmann R.(1997).Cloning of the mouse alpha 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur. J. Biochem.*,**246**, 727-735
- Garber A.J (2004).Type II diabetes mellitus. *Med.Clin.North.Am*,**88(4)**, XV-XVI

- Garrison W.M., Jayko M.E. and Bennett W. (1962). *Radiat. Res.*, **16**, 487-502
- Garrison W.M.(1987). *Chem. Rev.*, **87**, 381-398
- Geberhiwot T. and Skoglund G. (1995). Ectoprotein kinase activities on non-differentiated and differentiated U-937 cells. *Cell Signal*, **7**, 423-429
- Geberhiwot T. and Skoglund G. (1997). Cell surface and serum protein phosphorylation by U-937 cell ectoprotein kinases. *Biochem.Mol.Biol.Int*, **41**, 269-278
- Gibbons G.W.(1988). Peripheral vascular disease. In H.E.Lebovitz(Ed), Therapy for diabetes mellitus.(3rd edition.)Alexandria,VA:American Diabetes Association, 290-302
- Hadjigogos K. (2003). The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med.*, **45(1)**., 7-13
- Hall E., Frazer K, Hann B. and Reichardt L. (1988). Isolation and characterization of a laminin-binding protein from rat and chick muscle.*J.Cell.Biol.*, **107**, 687-697
- Harris M. (2001). Classification, diagnostic criteria and screening for diabetes . Diabetes in America (2nd edition), chapter **2**, 15-32
- Hathaway G., Lubben T., and Traugh J. (1980). Inhibition of casein kinase II by heparin.*J.Biol.Chem.*, **255**, 8038-8041
- Hatmi M., Gavaret J., Elalamy I., Vargaftig B. and Jacquemin C.(1996). Evidence for cAMP –dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV.(CD36).*J.Biol.Chem.*, **271**, 24776-24780
- Heufelder A., Wenzel B. and Bahn R. (1992). Cell surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retroocular fibroblasts from patients with Graves's ophthalmopathy. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **74**, 732-736
- Hink U., Li H. and Mollnau H. (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*, **88**, E14-122
- Horwitz A.F (1997).Integrins and health. *Sci.Am*, **276**, 68-75
- Husemann J., Obstfeld A., Febbraio M., Kodama T. and Silverstein S.(2001). CD11b/CD18 mediates production of reactive oxygen species by mouse and human macrophages adherent to matrixes containing oxidized LDL., *Arterioscler ThrombVasc Biol.*, **21 (8)**, 1301-1305
- Iglesias-De La Cruz C., Ruiz-Torres P., Alcami J., Diez-Marques L., Ortega-Velazquez R., Chen S., Rodriguez-Puyol M., Ziyadeh FN and Rodriguez-Puyol D. (2001). Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells. *Kidney Int.*, **59(1)**, 87-95
- Imada S., Sugiyama Y. and Imada M. (1988). Fibronectin phosphorylation by ecto-protein kinase. *Exp.Cell.Res.*, **179**, 554-564
- Karamessinis P., Tzinia A., Kitsiou P., Stetler-Stevenson W., Michael A., Fan W., Zhou B., Margaritis L. and Tsilibary E. (2002). Proximal tubular epithelial cell integrins respond to high glucose by altered cell-matrix interactions and differentially regulate matrixin expression., *Lab Invest*, **82(8)**, 1081-1093

- Kariya Y. and Miyazaki K.(2004). The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Experimental Cell Research*, **297**, 508-520.
- Kefalides N., Alper R and Clark C. (1979). Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int.Rev.Cytol.*, **61**, 167-228
- King G. and Brownlee M. (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology& Metabolism Clinics of North America*, **25 (2)**, 255-270
- Koliakos G., Tsilibary E. and Charonis A. (1991). A melanoma cell surface laminin binding protein with apparent Mr: 90,000. *Connect.Tissue.Res.*, **26**, 167-180
- Koliakos G., Kouzi-Koliakou K., Triantos A., Trachana V., Kavoukopoulos E., Gaitatzi M., Dimitriadou A. (2000). Laminin-1 phosphorylation by protein kinase A: Effect on self assembly and heparin binding. *Journal of biochemistry and molecular biology.*, **5**, 370-378
- Koliakos G., Trachana V., Gaitatzi M. and Dimitriadou A. (2001). Phosphorylation of laminin-1 by protein kinase C. *Mol. Cells*, **11**, 179-185
- Krebs E. and Beavo J. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu.Rev.Biochem.*, **48**, 923-959
- Krissansen G.W, (2001). Integrins: signaling and disease. *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group
- Kubler D. and Kinzel V. (2002). Cell surface protein kinases and extracellular phosphorylation. *Biochem.J.*, **360**, 579-587
- Kuchenbauer F., Theodoropoulou M., Hopfner U., Stalla U., Renner C., Low M., Arzt E., Stalla G. and Paez-Pereda M. (2003). *Molecular and Cellular Endocrinology*, **207**, 13-20
- Laemmli U., Amos L and Klug A.(1976). Correlation between structural transformation and cleavage of the major head protein of T4 bacteriophage. *Cell*, **7**, 191-203
- Levine R.L., Mosono L., Berlett B.S. and Stadtman E.R.(1966). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **93**, 15036-15040
- Lohr M. and Strobel P.(1991). Molecular biology and pathology of the extracellular matrix. *Med.Klin.(Munich)*, **86(4)**, 225-227
- Luna B. and Feinglos M. (2001). Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *American Family Physician*, **63**, 1747-1756
- Mattana J., Margiloff L and Singhal PC. (1997). Metal-catalyzed oxidation of extracellular matrix proteins disrupts integrin-mediated adhesion of mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **233(1)**, 50-55
- Mattana J., Margiloff L., Chaplia L., Chow A. and Singhal PC. (1998). Metal-catalyzed oxidation of extracellular matrix increases macrophage nitric oxide generation. *Kidney Int.*, **54(5)**, 1581-1592
- Mattana J., Margiloff L. and Chaplia L. (1999). Oxidation of extracellular matrix modulates susceptibility to degradation by the mesangial matrix metalloproteinase-2. *Free Radic Biol. Med.* **27**, 315-321

- Mattana J., Kochlatyi S. and Gibbons N. (2002). Metal-catalyzed oxidation of extracellular matrix proteins promotes human mesangial cell apoptosis and is associated with enhanced expression of Bax and caspase activation *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292**, 652-658
- MacDonald-Wicks L., Gibson L., Godfrey D., Green J., Horan B., Monger K., Wischer R and Garg M. (2004). Oxidised LDL in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Asia Pac. J. Clin. Nutr*, **13**, 65-71
- Miranti C. and Brugge J. (2002). Sensing the environment: perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.*, **4**, 83-89
- Mitchell C., Carre D., McGlenn A., Stone R. and Civan M. (1998). A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 7174-7178
- Naik U.P., Kornecki E. and Ehrlich Y.H.. (1991). Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ecto-protein kinase/phosphatase system. *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 256-264
- Nakato H. and Kimata K. (2002). Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1573**, 312-318
- Olszowski S., Mak P., Olszowska E and Marcinkiewicz J. (2003). Collagen type II modification by hypochlorite. *Acta Biochim Pol*, **50(2)**, 471-479.
- Olszowski S., Olszowska E, Kusior D., Piwowarczyk M. and Stelmaszynska T. (2003). Hypochlorite action on plasma fibronectin promotes its extended conformation in complexes with antibodies. *J Protein Chem*, **22(5)**, 449-456
- Orkin R., Gehron P., McGoodwin E., Martin G., Valentine T. and Swarm R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med*, **145**, 204-220
- Owen C., Campbell E. and Stockley R. (1992). Monocyte adherence to fibronectin: role of CD11/CD18 integrins and relationship to other monocyte functions. *J. Leukoc. Biol.*, **51**, 400-408
- Palaga T, Kataoka T. and Nagai K. (2004). Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin-4 in a myeloid progenitor cell line. *International Immunopharmacology*, **4**, 953-961
- Palmgren MS, De Shazo RD., Carter RM., Zimny ML. And Shah SV. (1992). Mechanisms of neutrophil damage to human alveolar extracellular matrix: the role of serine and metalloproteases. *J. Allergy Clin Immunol.*, **89(4)**, 905-915
- Paulsson M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27 (1-2)**, 93-127
- Pawlicki L., Kajdos L., Pokoca K., Blaszczyk J., Kowalski J. and Kedziora J. (2003). Receptor expression for LDL on peripheral blood monocytes in various clinical types of atheromatosis. *Military Medical Academy. Lodz, Poland* (Poster)

- Phillips M., Cataneo R.N, Cheema T. and Greenberg J.(2004). Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clinika Chimica Acta*, **344**, 189-194
- Ponce L. and Kleinman H. (2003). Identification of redundant angiogenic sites in laminin $\alpha 1$ and $\gamma 1$ chains. *Experimental Cell Research*, **285**, 189-195
- Redegeld F., Smith P, Apasov S. and Sitkovsky M. (1997). Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases: implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. *Biochim.Biophys.Acta.*,**1328**, 151-165
- Redegeld F., Caldwell C.and Sitkovsky M. (1999). Ectoprotein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?*Trends Pharmacol.Sci.*, **20**, 453-459
- Revert F., Penades J. R., Plana M., Bernal D., Johansson C., Itarte E., Cervera J., Weislander J., Quinones S. and Saus J.(1995). Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13254-13261
- Riedle B. and Kerjaschki D. (1997). Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol*, **151(1)**, 215-231
- Rosen P., Nawroth P., King G., Moller W., Tritschler H., and Packer L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progresion of diabetes and its complications. *Diabetes Metab.Res.Rev.*, **17**, 189-212
- Ross R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl.J. Med.*, **340**, 115-126
- Sasaki M., Kleinmann H.K., Huber H., Deutzmann R. and Yamada Y., .(1988). Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16536-16544
- Savoka M., Miller C. and Quandt S.(2004)Profiles of people with type 2 diabetes mellitus :the extremes of glycemic control. *Social Science& Medicine.*, **58**, 2655-2666
- Schuessler H. and Schilling K.(1984).*Int.J.Radiat. Biol*,**45**, 267-281
- Schulz E. and Keaney J.(2003). Diabetes mellitus and endothelial dysfunction: a central role for oxidative stress. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, **10**, 237-244
- Shaltiel S., Schwartz I., Korrc-Grodzicki B.and Kreizman T. (1993). Evidence for an extra-cellular function for protein kinase A. *Mol. Cell Bioch.*, **127/128**, 283-291
- Skubitz K and Goueli S.(1991). Basic fibroblast growth factor is a substrate for phosphorylation by human neutrophil ecto-protein kinase activity.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **174**, 49-55
- Skubitz K., Ducker T. and Goueli S.(1992). CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine-containing protein bearing a carcinoembryonic antigen cross- reacting antigen on the surface of human neutrophils. *J.Immunol.*, **148**, 852-860

- Sonnenberg A., Modderman P. and Hogervorst F. (1988). Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature.*, **336**, 487-489
- Sonnenberg A., Linders C., Modderman P., Damsky C., Aumailley M. and Timpl R. (1990). Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1,E3,E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8. *J.Cell.Biol.*, **110**, 2145-2155
- Sonnenberg A., Gehlsen K., Aumailley M. and Timpl R. (1991). Isolation of alpha 6 beta 1 integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. *Exp.Cell.Res.*, **197**, 234-244
- Sorokin L., Sixt M., Hallman R., Wendler O, Scharfetter-Kochanek k. (2001). Cell-matrix interactions in endothelial cell differentiation and function, with emphasis on inflammatory processes. *J.Biol.Chem.*,**276**, 18878-18887
- Stolzing A., Wengner A. and Grune T. (2002). Degradation of oxidized extracellular proteins by microglia. *Archives of biochemistry and biophysics*, **400**, 171-179
- Suwaidi JA, Hamasaki S. and Higano ST. (2000). Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, **101**, 848-954
- Swallow A.J.(1960) Radiation chemistry of organic compounds, Pergamon Press, New York, 211-224
- Tang W., Brady S., Sun Y., Muday G. and Roux S. (2003). Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. *Plant Physiol*, **131**, 147-154
- Takahashi K., Takeya M. and Sakashita N. (2002). Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*, **35**, 179-203
- Timpl R., Rohde H., Robey P., Rennard S., Foidart J. and Martin G. (1979). Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J.Biol.Chem.*, **254**, 9933-9937
- Timpl R. and Brown J.C.(1994). The laminins. *Matrix Biol.*,**14**, 275-281
- Tominaga M., Wada M. and Masu M.(2002). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*,**27**, 732-738
- Τραχανά (2003). Μελέτη του βιολογικού ρόλου της φωσφορυλίωσης της λαμινίνης. Διδακτορική διατριβή, εργαστήριο βιολογικής χημείας, τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ.
- Trachana V., Christophorides E., Kouzi-Koliakos K. and Koliakos G. (2004). Laminin-1 is phosphorylated by ecto-protein kinases of monocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. In Press
- Trachtman H., Futterweit S., Koss E., Bogart M. and Mermelstein A. (1999). Growth of rat mesangial cells on oxidized extracellular matrix

increases inducible nitric oxide synthase activity. *Int. J. Mol. Med.*, **3(3)**, 323-327

- Tungal P., Smyth N., Paulsson M. and Ott M.C. (2000). Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc. Res. Tech.*, **51**, 214-227.
- Unknown, (2001). The extracellular matrix. Introductory Cell Biology. <http://www.uoguelph.ca/botany/courses/BIOL2210/ECM.htm>.
- Vassort G. (2001). Adenosine 5- Triphosphate: a P2- Purinergic Agonist in the Myocardium. *Physiol. Rev.*; **81**, 767-806
- Woods A., Linton S. and Davies M. (2003). Detection of HOCL-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques. *Biochem.J.*, **370**, 729-735
- Yamashita H., Beck K. and Kitagawa Y. (2004). Heparin binds to the laminin a4 chain LG4 domain at a site different from that found for other laminins. *J.Mol.Biol.*, **335**, 1145-1149
- Yu C.E., Wijsman E.M., Nakuna J., Miki T., Piussan C., Matthews S., Fu Y.H, Mulligan J., Martin G.M., and Schellenberg G.D.(1997). *Am J.Hum Geuet*, **60**, 330-341
- Yurchenco P.D and Schittny J.C. (1990a). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.*, **4**, 1577-1590