



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μέτρηση δραστηρότητας του ενζύμου  
complex I της αναπνευστικής  
αλυσίδας σε ασθενείς με  
σαρκοείδωση και σε άτομα control**

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

Πατεράκη Ελένη

Λάρισα 2016

## **Τριμελής Επιτροπή**

**Ζίφα Αιμιλία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας  
(Νευροβιολογίας), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
ΠΘ.

**Ψαρρά Άννα Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ.

**Δανιήλ Ζωή**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Αιμιλία Ζίφα (Επίκουρου Καθηγήτριας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας) και της κ. Άννας-Μαρίας Ψαρρά (Επίκουρου Καθηγήτριας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας), τις οποίες θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος, για το ενδιαφέρον τους καθώς και για την πολύτιμή βοήθειά τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωή Δανιήλ (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.) για τη συμβολή της στην παρούσα εργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Παναγιωτίδου καθώς και τον προπτυχιακό φοιτητή Ευγένιο Μπουζέτο για τη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα.

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
<i>A.1 Σαρκοείδωση .....</i>	<i>7</i>
<i>A.2 Παθοφυσιολογία .....</i>	<i>16</i>
<i>A.3 Απομόνωση εμπλουτισμένου εκχυλίσματος μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα .....</i>	<i>17</i>
<i>A.4 Συμμετοχή αντιαποπτωτικών μηχανισμών στη διατήρηση της φλεγμονής .....</i>	<i>20</i>
<i>A.5 Πιθανή εμπλοκή της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων στην σαρκοείδωση .....</i>	<i>21</i>
<i>A.6 Στόχος και δομή της εργασίας .....</i>	<i>23</i>
B. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	24
<i>B.1 Απομόνωση Μονοπύρηνων Κυττάρων Από Περιφερικό Αίμα .....</i>	<i>24</i>
<i>B.2 Προετοιμασία δειγμάτων .....</i>	<i>26</i>
<i>B.3 Προσδιορισμός Ενζυμικής Δραστικότητας Του Συμπλόκου I Βάσει Των Μεταβολών Απορρόφησης Του NADH .....</i>	<i>29</i>
<i>B.4 Προσδιορισμός Ολικής Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης Κατά BRADFORD .....</i>	<i>31</i>
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	33
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	41
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	43

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η σαρκοείδωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή η οποία προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα με μεγαλύτερη συχνότητα τους πνεύμονες. Το σύμπλοκο I είναι το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και αποτελεί προϊόν 7 μιτοχονδριακών (ND1-6, ND4L) και 38 πυρηνικών γονιδίων. Έχει πιθανολογηθεί στην βιβλιογραφία ότι η μείωση της δραστηριότητας του παραπάνω συμπλόκου αποτελεί την συχνότερη αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών. Τεκμηρίωση της μείωσης της δραστηριότητας του παραπάνω συμπλόκου σε άτομα με την νόσο, θα ενίσχυε την άποψη ότι η σαρκοείδωση είναι μιτοχονδριακό νόσημα.

Η πτυχιακή εργασία στοχεύει στην μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση και σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Το αίμα ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση καθώς και το αίμα υγιών ατόμων που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις παρελήφθη από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Η εκτίμηση της δραστηριότητας της οξειδοαναγωγής του συμπλόκου I επιτεύχθηκε με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της οξείδωσης του NADH από το σύμπλοκο I, αντίδραση η οποία αναστέλλεται από ροτενόνη. Παρόλο που η έρευνά βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, από τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν προκύπτει ισχυρή ένδειξη μειωμένης δραστηριότητας του συμπλόκου I σε ασθενείς με σαρκοείδωση σε σύγκριση με την δραστηριότητα του ίδιου συμπλόκου σε υγιή άτομα. Απαιτείται όμως περαιτέρω μελέτη για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την συσχέτιση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I με την ασθένεια.

## **ABSTRACT**

Sarcoidosis is an autoimmune disorder which causes non-necrotizing granulomas to one or more human organs, more commonly the lungs. The complex I, the first of the five complexes of the respiratory chain, is a product of seven mitochondrial (ND1-6, ND4L) and 38 nuclear genes. It has been speculated in the literature that the reduction of the activity of the abovementioned complex constitutes the most frequent cause of mitochondrial diseases. Documentation of reduced activity of the above complex in individuals with the disease will strengthen the view that sarcoidosis is a mitochondrial disease.

This Thesis aims to measure the enzymic activity of complex I of the respiratory chain in lymphocytes from peripheral blood of individuals suffering from sarcoidosis and in lymphocytes from peripheral blood of healthy individuals. The blood of people suffering from sarcoidosis and the blood of healthy people used in the conducted measurements was taken from the University Hospital of Larissa.

Assessment of the activity of the oxidoreductase of the complex I was accomplished via spectrophotometric determination of NADH oxidation in complex I, a reaction inhibited by rotenone. Although the research in this Thesis is at an early stage, the results collected show strong evidence of reduced activity of complex I in patients with sarcoidosis compared with the activity of the same complex in healthy people. Further research is needed to lead us to safer conclusions about the correlation of the enzymic activity of complex I with the disease.

## **A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A.1 Σαρκοείδωση**

Η παρούσα μελέτη αφορά στην ασθένεια της **Σαρκοείδωσης**.

#### **Σαρκοείδωση**

Η σαρκοείδωση είναι μια συστηματική κοκκιωματώδης φλεγμονώδης νόσος, η οποία μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε ιστό και όργανο . Η κλινική πορεία και η κατανομή των αλλοιώσεων ποικίλλουν πάρα πολύ. Η ασθένεια είναι πιο συχνή στις γυναίκες από ότι στους άνδρες.

Η χαρακτηριστική αλλοίωση στους ιστούς της σαρκοείδωσης είναι το μη τυροειδοποιούμενο κοκκίωμα. Αυτό το κοκκίωμα αποτελείται από επιθηλιοειδή κύτταρα και από ποικίλο αριθμό γιγαντοκυττάρων τύπου Langhans ή ξένων σωμάτων. Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των περιπτώσεων τα κοκκίωματα αυτά παρουσιάζουν δύο ιδιαίτερα ιστολογικά στοιχεία : 1) τα σωματία Schaumann, που αποτελούνται από συγκεντρικές εναποθέσεις πρωτεϊνών και αλάτων ασβεστίου και 2) τα αστεροειδή σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά βρίσκονται μέσα στα γιγαντοκύτταρα. Οι δύο αυτοί σχηματισμοί δεν είναι παθογνωμονικοί για τη σαρκοείδωση, διότι απαντώνται και σε άλλες μη τυροειδοποιούμενες κοκκιωματώδεις διαταραχές.

Αν και η σαρκοείδωση είναι γενικά νόσος άγνωστης αιτιολογίας, θεωρείται αποτέλεσμα έκθεσης γενετικά προδιατεθειμένων επιρρεπών ξενιστών σε ένα αντιγόνο . Οι απόψεις που εμπλέκουν τους λοιμώδεις και άλλους εξωγενείς παράγοντες του περιβάλλοντος στην αιτιοπαθογένεση της σαρκοείδωσης βασίζονται στην παρατήρηση ότι η σαρκοείδωση απαντάται πιο συχνά σε ορισμένες εποχές του έτους και περιοχές του πλανήτη και σε ειδικές κατηγορίες εργαζομένων. Στην Ελλάδα ποσοστό 70% των περιπτώσεων εκδηλώνεται κατά τους εαρινούς μήνες Μάρτιο-Μάιο, στην Ισπανία το 50% στο διάστημα των μηνών Απρίλιο-Ιούνιο, ενώ στην

Ιαπωνία το μεγαλύτερο ποσοστό των διαγνώσεων των ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση γίνεται το διάστημα Ιουνίου -Ιουλίου.

Τα όργανα, που προσβάλλονται πιο συχνά στη σαρκοείδωση, είναι τα παρακάτω:

**A. Λεμφαδένες.** Προσβάλλονται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Οποιαδήποτε λεμφαδενική ομάδα του σώματος είναι δυνατό να προσβληθεί. Η τυπικότερη όμως και συνηθέστερη είναι η λεμφαδενοπάθεια των πυλών του πνεύμονα, του μεσοθωρακίου και των τραχηλικών λεμφαδένων. Σε πρώιμες περιπτώσεις οι λεμφαδένες είναι μαλακοί. Σε προχωρημένες και χρόνιες περιπτώσεις παρουσιάζουν ινώδη σκλήρυνση.

**B. Πνεύμονες.** Αποτελούν επίσης μια από τις πιο συνήθεις εντοπίσεις της νόσου. Συχνά δεν υπάρχουν μακροσκοπικά ορατές αλλοιώσεις. Όσον αφορά στους ιστούς των πνευμόνων, ανευρίσκονται κοκκιώματα τα οποία κατανέμονται διάχυτα συχνά και στους δύο πνεύμονες. Τα κοκκιώματα συχνότερα ανευρίσκονται σε περιοχές κοντά σε βρόγχους, αγγεία και λεμφαγγεία. Πολλές φορές συρρέουν και σχηματίζουν μακροσκοπικά ορατά οζίδια. Τέλος, τα κοκκιώματα παρουσιάζουν την τάση να ινοποιούνται και να προκαλούν διάμεση ίνωση του πνεύμονα.

**Γ. Σπλήνας και Ήπαρ.** Ο σπλήνας προσβάλλεται στο 75% των περιπτώσεων ενώ στο ήπαρ κάπως συχνότερα. Η διόγκωση των οργάνων αυτών μπορεί να είναι σημαντική. Πολλές φορές όμως, το μέγεθος τους είναι κανονικό χωρίς ιδιαίτερες μακροσκοπικές αλλοιώσεις. Ιστολογικά τα κοκκιώματα ανευρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το παρέγχυμα των οργάνων χωρίς ιδιαίτερη τοπογραφική προτίμηση.

**Δ. Μυελός των οστών.** Προσβάλλεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20%. Ακτινολογικές αλλοιώσεις παρουσιάζουν κλασσικά οι φάλαγγες των χεριών και των ποδιών. Παρατηρούνται αλλοιώσεις του οστού με διεύρυνση του



αυλού και εναποθέσεις νέου οστού περιφερικά. Ιστολογικά παρατηρούνται άφθονα κοκκιώματα στη μυελική κοιλότητα.

**Ε. Δερματικές αλλοιώσεις.** Απαντώνται στο 50% περίπου των περιπτώσεων. Ιστολογικά χαρακτηρίζονται από κατάληψη του χορίου από μη τυροειδοποιούμενα κοκκιώματα. Μερικές φορές υπάρχουν βαθύτερες οζοειδείς αλλοιώσεις στον υποδόρειο ιστό, που χαρακτηρίζουν το οζώδες ερύθημα.

**ΣΤ. Οφθαλμοί και σιελογόνοι αδένες.** Με τη χαρακτηριστική κοκκιωματώδη διήθηση των δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων.

**Ζ. Καρδιά :** Η προσβολή του μυός της καρδιάς από τη σαρκοείδωση, είναι μεν σπάνια, αλλά υπαρκτή και πολλές φορές δυσδιάγνωστη.

**Η. Νευρικό σύστημα :** Η μονόπλευρη πάρεση του προσωπικού νεύρου, είναι η πιο συνηθισμένη (49%) εκδήλωση της προσβολής του νευρικού συστήματος από τη σαρκοείδωση. Ο μηχανισμός είναι αδιευκρίνιστος και δεν οφείλεται στη διόγκωση της παρωτίδας. Δεύτερη σε σειρά συχνότητας έρχεται η προσβολή του οπτικού νεύρου στο 5% των ασθενών με νευροσαρκοείδωση. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται απώλεια οπτικών πεδίων, οπτική νευρίτιδα, ατροφία του νεύρου, θάμβος οράσεως, τύφλωση. Είσης στην νευροσαρκοείδωση μπορεί να παρατηρηθεί οίδημα οπτικής θηλής σαν αποτέλεσμα της αύξησης της ενδοκρανιακής πίεσεως λόγω παρεμπόδισης της κυκλοφορίας του εγκεφαλονωτιαίου υγρού . από χρόνια μηνιγγίτιδα ή μεγάλο κοκκίωμα. Στην τελευταία περίπτωση υπάρχει θεαματική βελτίωση μετά από τη χορήγηση κορτικοειδών. Επιπλέον, κρίσεις επιληψίας όλων των τύπων έχουν παρατηρηθεί στο 5% - 22% των ασθενών με νευροσαρκοείδωση. Στην περίπτωση αυτή τα κορτικοειδή δεν δρουν, αλλά έχει αναφερθεί περίπτωση κρίσεων λόγω σαρκοειδικής μηνιγγίτιδας, στην οποία δεν έδρασαν μεν τα κορτικοειδή αλλά επετεύχθη βελτίωση με χαμηλές δόσεις ολοκρανιακής ακτινοβολίας.

**Θ. Ενδοκρινείς αδένες :** Τα αυτοάνοσα νοσήματα και η σαρκοείδωση φαίνεται να σχετίζονται. Ειδικότερα, φαίνεται να έχει διαπιστωθεί εδώ και χρόνια συσχέτιση της σαρκοείδωσης με τα αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς. Έχει παρατηρηθεί συνύπαρξη της νόσου του Graves και αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας με τη σαρκοείδωση. Το ποσοστό των πασχόντων από σαρκοείδωση, τα οποία παρουσιάζουν παράλληλα και ενδοκρινοπάθεια αυτοάνοσου τύπου, φαίνεται να πλησιάζει το 20%.

**Ι. Μαστός - Όργανα αναπαραγωγής :** Στο μαστό των γυναικών με σαρκοείδωση το συνηθέστερο είναι να υπάρχει ένα μονήρες κοκκίωμα το οποίο παραμένει τοπικά για μεγάλο διάστημα. Το ενδομήτριο μπορεί να προσβληθεί, ειδικά αν έχει προηγηθεί χειρουργική επέμβαση. Οι ωοθήκες προσβάλλονται σπάνια. Κατά την εγκυμοσύνη η υπάρχουσα σαρκοείδωση μπορεί να υποχωρήσει, πιθανόν λόγω των παραγόμενων στεροειδών ορμονών. Μετά το πέρας της εγκυμοσύνης είναι δυνατόν να εμφανισθεί εκ νέου.

Στους άνδρες οι όρχεις μπορούν να προσβληθούν. Η επιδυμίδα προσβάλλεται σπάνια, ενώ προσβολή του προστάτη έχει αναφερθεί ακόμα πιο σπάνια.

### **Αιτιολογία και παθογένεια της νόσου**

**Η αιτιολογία της νόσου είναι ουσιαστικά άγνωστη.** Σαν πιθανά αίτια έχουν προταθεί τα δύο παρακάτω : 1) Τα μυκοβάκτηρια της Φυματίωσης ή τα άτυπα μυκοβακτήρια και τα παράγωγά τους. Αναφέρεται ότι υπολείμματα μυκολικού οξέος έχουν ανιχνευθεί σε σαρκοειδικές αλλοιώσεις. 2) Μη βακτηριακοί παράγοντες, όπως η γύρη των πεύκων, ρητίνες και ο πηλός, όταν μασώνται ή εισπνέονται. Επισημαίνεται ότι στην γύρη των πεύκων υπάρχουν κηροειδή, που μοιάζουν με τα κηροειδή των μυκοβακτηριδίων. Για όλα τα παραπάνω πιθανά αίτια υπάρχουν ενδείξεις, όχι όμως και αποδείξεις.

## **Κλινικές Εκδηλώσεις**

Η σαρκοείδωση μπορεί να είναι νόσος χωρίς συμπτώματα και να αποκαλυφθεί τυχαία μετά από ακτινογραφία θώρακα ως πυλαία λεμφαδενοπάθεια και ελαφρά διηθητική νόσος του πνευμονικού παρεγχύματος.

**-Γενικά συμπτώματα** : πυρετός, αίσθημα κοπώσεως, απώλεια βάρους, ανορεξία.

**-Πνεύμονας** : Ο πνεύμονας είναι το συχνότερα προσβαλλόμενο όργανο (στο 90% περιπτώσεων). Τα άτομα που έχουν την νόσο θα έχουν παθολογική ακτινογραφία θώρακα κάποια στιγμή στην πορεία της νόσου. Η προσβολή μπορεί να εμφανισθεί ως λεμφαδενοπάθεια, κυψελίτιδα, διάμεση πνευμονίτιδα, βήχας, δύσπνοια, υπεζωκοτική νόσος και σπανίως αιμόπτυση. Μπορεί επίσης να προσβληθούν οι αεραγωγοί και να προκληθεί αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

**Προσβολή πνευμονικού παρεγχύματος.** Χαρακτηρίζεται από μικρές, ακανόνιστες διάμεσες διηθήσεις, ατελεκτασία και πλευριτικές συλλογές. Είναι λιγότερο συχνή στα παιδιά παρά στους ενήλικες, όπου παρατηρείται στο 25% των περιπτώσεων. Οι άνω λοβοί προσβάλλονται συχνότερα από τους κάτω.

Ιστολογικά, ο διάμεσος πνευμονικός ιστός παρουσιάζει σαφώς οριοθετημένα ρευστοποιά κοκκιώματα, τα οποία ακολουθούν εκλεκτικά τις βρογχαγγειακές δέσμες. Η κοκκιωματώδης φλεγμονή συχνά συνοδεύεται από άτυπες μονοπυρηνικές κυτταρικές διηθήσεις. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η προσβολή του παρεγχύματος μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη ίνωση και εικόνα «μελικηρύθρας». Οι κυστικές αλλοιώσεις μπορεί να εποικισθούν από ασπέργιλλους, οδηγώντας σε ενδοκοιλιακά ασπεργιλλώματα. Κοκκιωματώδης προσβολή των αναπνευστικών οδών (ενδοβρογχική σαρκοείδωση) είναι συχνή και μπορεί να οδηγήσει σε βρογχική στένωση.

**Προσβολή ανώτερων αναπνευστικών οδών** (ρινικός βλεννογόνος, ρινικά οστά ή λάρυγγας).

-**Λεμφαδένες** : μπορεί να είναι διογκωμένοι τόσο οι περιφερικοί όσο και οι ενδοθωρακικοί λεμφαδένες. Στα παιδιά είναι η συχνότερη αρχική κλινική εκδήλωση της σαρκοειδωσης. Το 40% - 70% περίπου των παιδιών με σαρκοειδωση έχουν ψηλαφητούς περιφερικούς λεμφαδένες. Οι λεμφαδένες είναι συνήθως σκληροί, ευκίνητοι και ανώδυνοι, δεν εξελκώνονται και δεν σχηματίζουν παροχετευτικά συρίγγια. Προσβάλλονται συνήθως οι αυχενικοί, μασχαλιαίοι, επιτροχίλιοι και βουβωνικοί λεμφαδένες. Στον αυχένα, οι λεμφαδένες του οπίσθιου τριγώνου προσβάλλονται συχνότερα από του προσθίου τριγώνου. Επίσης συχνά προσβάλλονται και οι οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες

-**Δέρμα** : Το 25% των ασθενών θα έχουν προσβολή του δέρματος. Οι πιθανές βλάβες περιλαμβάνουν οζώδες ερύθημα, πλάκες, κηλιδοβλατιδώδη εξανθήματα, υποδερματικά οζίδια και χειμετλοειδή λύκο. Δερματικές αλλοιώσεις παρουσιάζει το 30% περίπου των παιδιών με σαρκοειδωση. Οι δερματικές αλλοιώσεις είναι κηλιδοβλατιδώδεις, φυσαλιδώδεις, βλατιδώδεις ή οζώδεις. Αλλοτε παρατηρούνται υπο- ή υπερ- μελαγχρωστικές αλλοιώσεις, έλκη και υποδόριοι όγκοι. Τα παιδιά με σοβαρή σαρκοειδική αρθροπάθεια μπορεί να εμφανίσουν ιχθυοσιόμορφες δερματικές αλλοιώσεις.

Σπάνια, τα παιδιά με σαρκοειδωση, στην ενεργό φάση της νόσου, παρουσιάζουν διήθηση παλαιών ουλών ή τατουάζ από σαρκοειδικό κοκκιωματώδη ιστό, ώστε οι υπάρχουσες ατροφικές ουλές αποκτούν εικόνα χηλοειδούς («*scar sarcoidosis*). Μπορεί ακόμα να εμφανίσουν υποδόρια οζίδια σε περιοχές επανειλημμένων ενδομυϊκών ενέσεων, τα οποία ιστολογικά χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες περιοχές ρευστοποιού νέκρωσης, περιβαλλόμενες από σαρκοειδικά κοκκιώματα και υφίενται αυτομάτως.

Οι ενήλικες κυρίως και, λιγότερο συχνά, τα παιδιά παρουσιάζουν 2 χαρακτηριστικές δερματικές σαρκοειδικές αλλοιώσεις : *urvus pernio* και *οζώδες ερύθημα*.

-**Ήπαρ** : Παρατηρείται θετική βιοψία σε 60% έως 90% των ασθενών με σαρκοείδωση. Σπανίως όμως τα ευρήματα έχουν κλινική αξία. Το ήπαρ προσβάλλεται στο 20% περίπου των ασθενών με σαρκοείδωση σε κάποια φάση της διαδρομής της νόσου.

Ηπατομεγαλία παρουσιάζει το 10% περίπου των ασθενών με σαρκοείδωση. Συνοδεύεται γενικά από σπληνομεγαλία και παθολογικές δοκιμασίες της ηπατικής λειτουργίας. Έως 40% των ασθενών με ηπατική σαρκοείδωση παρουσιάζει μικρή αύξηση της ολικής χολερυθρίνης, της αλκαλικής φωσφατάσης και της SGPT του ορού. Σπάνια, οι ασθενείς με σαρκοείδωση αναπτύσσουν *χρόνια* χολόσταση, πυλαία υπέρταση και κίρρωση.

Σαρκοειδικά κοκκιώματα παρατηρούνται στο 50-80% των περιπτώσεων και είναι το κύριο χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα της ηπατικής σαρκοείδωσης. Αναπτύσσονται συχνά στα πυλαία διαστήματα και συνοδεύονται από χρόνια φλεγμονή των πυλαίων διαστημάτων, ίνωση, ακόμα και κίρρωση. Η προσβολή του ήπατος ιστολογικά χαρακτηρίζεται από χολόσταση, εστιακές νεκροφλεγμονώδεις αλλοιώσεις, αγγειακή προσβολή και διάχυτη ίνωση.

Θεραπεία δεν χρειάζεται σε ασθενείς με ασυμπτωματική προσβολή του ήπατος ή μικρή αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Προϋπάρχουσα ήπια τρανσαμινασαιμία δεν φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ηπατοτοξικότητας από την μεθοτρεξάτη. Αντίθετα, η μεθοτρεξάτη μπορεί να φυσιολογικοποιήσει τις διαταραχές των ηπατικών ενζύμων και να χρησιμοποιηθεί με αποτελεσματικότητα κάτω από προσεκτική παρακολούθηση.

-**Νεφρά** : μπορεί να εκδηλωθεί παρεγχυματική νόσος ή πιο συχνά δευτεροπαθής νεφρολιθίαση, λόγω διαταραχών του μεταβολισμού του ασβεστίου.

-**Νευρικό σύστημα** : μπορεί να προσβληθεί το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και τα περιφερικά νεύρα. Η σαρκοείδωση χαρακτηρίζεται από πληθώρα

νευρολογικών εκδηλώσεων. Νευρολογικές εκδηλώσεις παρουσιάζει το 5% 13% των ενηλίκων με συστηματική σαρκοείδωση, συχνά ακόμα και εάν δεν έχει συμπτώματα από άλλα όργανα, αν και το ποσοστό αυτό είναι πιθανώς μικρότερο από το πραγματικό.

Στα παιδιά, λίγα είναι γνωστά για την προσβολή του νευρικού συστήματος στη σαρκοείδωση (*νευροσαρκοείδωση*), λόγω της σπανιότητας του νοσήματος στην ηλικία αυτή. Σε μία μελέτη παιδιών με σαρκοειδική αρθροπάθεια, το 30% είχαν προσβολή του ΚΝΣ.

Στους ενήλικες, προσβάλλονται συνήθως τα περιφερικά νεύρα και ο εγκέφαλος. Σε μία ανασκόπηση, το 50% των ενηλίκων με νευροσαρκοείδωση παρουσιάστηκαν με παράλυση κρανιακών νεύρων, 30% με κεφαλαλγίες και 10% με σπασμούς, δυσλειτουργία της υπόφυσης, διαταραχές της αισθητικότητας και νευροψυχολογικές και παρεγκεφαλιδικές διαταραχές.

Στα παιδιά, η νευροσαρκοείδωση παρουσιάζεται, συχνότερα από τους ενήλικες, με σπασμούς και χωροκατακτητικές εξεργασίες, και λιγότερο συχνά με παράλυση κρανιακών νεύρων.

Τα παιδιά προεφηβικής ηλικίας παρουσιάζονται συχνότερα με σπασμούς, ενώ τα κρανιακά νεύρα προσβάλλονται συνήθως μετά την εφηβεία. Από τα κρανιακά νεύρα προσβάλλεται συχνότερα το VII, αλλά μπορεί να προσβληθεί και το οπτικό, ακουστικό, πνευμονογαστρικό και γλωσσοφαρυγγικό νεύρο. Οι χωροκατακτητικές εξεργασίες είναι πολύ συχνότερες στον τελεγκέφαλο, παρά στον οπίσθιο βόθρο, και μπορεί να είναι κλινικά ασυμπτωματικές.

-**Καρδιά** : μπορεί να προσβληθεί το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας ή το σύστημα αγωγής, προκαλώντας διαταραχές του ρυθμού ή/και της συσταλτότητας.

## **Επιπλοκές**

Με τη φυσική εξέταση και τη μελέτη του ιστορικού του ασθενούς επιχειρείται ο αποκλεισμός εκδηλώσεως άλλων διάμεσων πνευμονοπαθειών που θα χειροτέρευαν την κατάσταση του ασθενούς.

## **Θεραπεία**

Πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν αυτόματη ύφεση, οπότε η λήψη απόφασης για το αν και πότε είναι απαραίτητη η θεραπεία είναι δύσκολη και αμφισβητήσιμη. Η βαθμιαία προσβολή των πνευμόνων καθώς και η οφθαλμική και καρδιακή νόσος είναι σαφείς ενδείξεις για την έναρξη θεραπείας. Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση και το σπινθηρογράφημα με γάλλιο μπορεί να βοηθήσουν στην αναγνώριση των ασθενών με υψηλό κίνδυνο προοδευτικής εξελίξεως στο τελικό στάδιο πνευμονικής νόσου, χωρίς όμως να υπάρχει γενική αποδοχή στο θέμα αυτό. Τα κορτικοστεροειδή είναι το κύριο φάρμακο αντιμετώπισης της νόσου. Σε ασθενείς με προοδευτική εξέλιξη της νόσου στην περίπτωση αποτυχίας των στεροειδών, μπορεί να είναι χρήσιμα τα κυτταροτοξικά φάρμακα.

## **Χειρουργική και μη-φαρμακευτική θεραπεία**

Πολύ σπάνια, η σαρκοείδωση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ουλές στους πνεύμονες. Αν αυτό συμβεί, μία από τις επιλογές για θεραπεία είναι η μεταμόσχευση πνευμόνων. Μεταμόσχευση καρδιάς έχει χρησιμοποιηθεί επίσης σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις, κατά τις οποίες η σαρκοείδωση επηρέασε σοβαρά το συγκεκριμένο όργανο. Περιστασιακά, τα άτομα με σαρκοείδωση που επηρέασε την καρδιά τους μπορεί να χρειαστούν βηματοδότη για την βοήθεια στον έλεγχο του ρυθμού της καρδιάς.

## **Διάγνωση**

Για τη ακριβή και σίγουρη διάγνωση της ασθένειας πρέπει να συνυπάρχουν κλινικά και καρδιολογικά ευρήματα τα οποία να υποστηρίζονται από ιστολογική εξέταση (βιοψία) που να αποδεικνύει την ύπαρξη νεκρωτικών κοκκιωμάτων επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων. Κοκκιώματα εξ αιτίας άλλων γνωστών αιτιών και τοπικές σαρκοειδικές αντιδράσεις πρέπει να αποκλείονται από τις ιστολογικές εξετάσεις.

Συχνά παρατηρούνται κάποια συγκεκριμένα ανοσολογικά χαρακτηριστικά όπως η καταστολή της όψιμης αντίδρασης υπερευαισθησίας και μια αυξημένη ανοσοαπόκριση των Τ βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (Th1) στα σημεία που εκδηλώνεται η νόσος. Μπορεί επίσης να ανιχνευθούν υπερενεργότητα των Β κυττάρων και αύξηση των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων.

Η πορεία της νόσου μπορεί να συσχετίζεται με τον τύπο της έναρξης της. Μια οξεία έναρξη με οζώδες ερύθημα ή ασυμπτωματική πυλαία λεμφαδενοπάθεια, συνήθως σηματοδοτεί μια πορεία αυτοπεριοριζόμενη. Αντίθετα, μια ύπουλη έναρξη, ειδικά όταν συνοδεύεται από πολλαπλές εξωπνευμονικές βλάβες, μπορεί να ακολουθείται από ταχεία, προοδευτική ίνωση των πνευμόνων και άλλων οργάνων.

## **A.2 Παθοφυσιολογία**

Η ανάπτυξη και η συσσώρευση μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, αποτελούν τη βασική ανωμαλία στην σαρκοείδωση. Παρ' όλο που η αιτία εμφάνισης των κοκκιωμάτων παραμένει μη γνωστή όπως προαναφέρθηκε, ο φυσιολογικός ρόλος της δημιουργίας τους είναι ο περιορισμός των παθογόνων, η μη δημιουργία της φλεγμονής και η προστασία του γύρω ιστού.

Τα κοκκιώματα είναι συμπαγείς, κεντρικά οργανωμένες συγκεντρώσεις μακροφάγων και επιθηλιοειδών κυττάρων, οι οποίες περικυκλώνονται από



λεμφοκύτταρα. Τα μακροφάγα, υπό χρόνια διέγερση κυτοκινών διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή κύτταρα, κερδίζοντας εκκριτική βακτηριοκτόνο δράση ενώ χάνουν ένα μέρος της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας και σχηματίζουν γιγαντιαία πολυπύρρηνα κύτταρα. Σε πιο ώριμα κοκκιώματα, κολλαγόνο και ινοβλάστες ενθυλακώνουν το σύμπλεγμα των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθεί σκλήρυνση, μεταβάλλοντας την αρχιτεκτονική δομή και τη λειτουργία των οργάνων.

Η ειδική ανοσολογική απόκριση στη σαρκοείδωση ξεκινάει με τη συλλογή του αντιγόνου από τα δενδριτικά κύτταρα και την παρουσίασή του στα αδιαφοροποίητα T κύτταρα. Ακολουθεί η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων καθώς και η μετανάστευσή τους στο σημείο της φλεγμονής. Πρωτεύον χαρακτηριστικό της σαρκοείδωσης είναι η παρουσία των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, για την έναρξη του σχηματισμού και της σύντηξης των κοκκιωμάτων. Τα ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> διαφοροποιούνται σε βοηθητικά T κύτταρα τύπου 1 και βοηθητικά T κύτταρα τύπου 17, ευνοώντας την παραγωγή κυτοκινών όπως IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 του TGF-β, της INF-γ και του TNF-α από τα μακροφάγα και τα DCs.

### **A.3 Απομόνωση εμπλουτισμένου εκχυλίσματος μιτοχονδρίων από λεμφοκύτταρα**

Το ίζημα των λεμφοκυττάρων το οποίο συλλέχθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλης (2.1) υφίσταται είτε ολική λύση (2.3) είτε συνεχίζεται η επεξεργασία για την απομόνωση εμπλουτισμένου εκχυλίσματος μιτοχονδρίων. Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, ένα με τη χρήση διγτιονίνης (DG) και ένα χωρίς. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις τα μιτοχόνδρια απομονώνονται μέσω διαφορικής φυγοκέντρησης ωστόσο η DG βοηθάει στην διαπερατοποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, έτσι το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για φωτομέτρηση.

## **i. Απουσία διγτονίνης:**

### **Υλικά**

Πίνακας 2: Διάλυμα ομογενοποίησης

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

\*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

### **Διαδικασία:**

- I. Προσθήκη 100μl διαλύματος ομογενοποίησης στο δείγμα.
- II. Ομογενοποίηση των κυττάρων σε γυάλινο ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν. Πραγματοποιούνται 10 upsanddownsX με 30sec αναμονή ενδιάμεσα. Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιείται σε πάγο.
- III. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ομογενοποιημένου σε 1000g για 10min στους 4°C
- IV. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και επαναφυγοκεντρούμε σε 12000rpm για 20min στους 4°C
- V. Αφαιρούμε υπερκείμενο.
- VI. Έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος ομογενοποίησης.
- VII. Φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 20min στους 4°C.
- VIII. Αφαίρεση υπερκειμένου.
- IX. Τοποθέτηση και διατήρηση των δειγμάτων στους -80°C.

## ii. Παρουσία διγτονίνης:

### Υλικά

Πίνακας 3: Διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων

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

\*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

### Διαδικασία:

- I. Αρχικά τα κύτταρα διαλύονται στο διάλυμα απομόνωσης σε συγκέντρωση 5mg/ml.
- II. Ακολουθεί προσθήκη διγτονίνης σε τελική συγκέντρωση 0,1mgr/ml.
- III. Στη συνέχεια προσθήκη τριαιθανολαμίνης (TEA) σε τελική συγκέντρωση 10mM.
- IV. Επώαση σε πάγο για 10λεπτά.
- V. Ομογενοποίηση: 15 upanddowns σε 500rpm σε πάγο.
- VI. Φυγοκέντρηση σε 1000g για 10 λεπτά στους 4°C.
- VII. Συλλογή υπερκλειμένου και επανάληψη βημάτων 1-6 στο ίζημα.
- VIII. Ανάμιξη των δύο υπερκλειμένων και φυγοκέντρηση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C.
- IX. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε διάλυμα απομόνωσης και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C.

#### **A.4 Συμμετοχή αντιαποπτωτικών μηχανισμών στη διατήρηση της φλεγμονής**

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή αλλιώς η απόπτωση είναι σημαντικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης των οργανισμών. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια αναπτυξιακά ελεγχόμενη διαδοχή γεγονότων που προϋποθέτει ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων. Απορρύθμιση της απόπτωσης, οδηγεί σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως αυτοάνοσων διαταραχών και νεοπλασιών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η συσσώρευση κυτοκινών από τα εμπλεκόμενα στην ανοσολογική απόκριση κύτταρα, παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των κοκκιωμάτων. Μία λεπτή ισορροπία μεταξύ της απόπτωσης και της επιβίωσης των κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή, διατηρεί την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Θεωρείται πως η κοκκιωματώδης φλεγμονή μπορεί να ανασταλεί είτε μέσω της απομάκρυνσης των κυτοκινών είτε μέσω της επαγωγής της απόπτωσης (TagayaY.etal.1996; Bulfone-PausS.etal.1997). Συνεπώς, η ανοχή στην απόπτωση είναι πολύ πιθανό να συμβάλλει στην παθογένεση της σαρκοείδωσης.

Έχει παρατηρηθεί αντιαποπτωτική δράση σε λεμφοκύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) αλλά και σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με σαρκοείδωση (StridhH.etal.2002; StridhH.etal.2001). Τα T-λεμφοκύτταρα της γύρω περιοχής των κοκκιωμάτων φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα παραγωγής BCL-2 (MermigkisC.etal.2006).. Η υπερέκφραση της BCL-2 δείχνει να προστατεύει τα λευκά αιμοσφαίρια από την απόπτωση, όταν αρχίζουν να αποσύρονται αυξητικοί παράγοντες όπως η IL-2.

Στην κυτταρική επιβίωση φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά και ο κυκλινοεξαρτώμενος αναστολέας κινασών p21waf1. Συγκεκριμένα, *in vitro*

ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω INF- $\gamma$  οδηγεί σε καταστολή της απόπτωσης (XausJ.etal.1999; XausJ.etal.2001). Αυτή η αντιαποπτωτική δράση μεσολαβείται από τον p21. Ο παράγοντας p21 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε πνευμονικό σαρκοείδωμα, ενισχύοντας την υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα κοκκιώματα και την διατήρηση της φλεγμονής(XausJ.etal.2003) .

### **A.5 Πιθανή εμπλοκή της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων στην σαρκοείδωση**

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σε φλεγμονώδεις πνευμονολογικές διαταραχές όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και το άσθμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες και η ανοχή στην απόπτωση στη σαρκοείδωση, δύο καταστάσεις οι οποίες συνδέονται άμεσα με τα μιτοχόνδρια.

Κύριος ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Είναι πλέον γνωστό πως η απόπτωση είναι μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, καθώς είναι μία πολύ καλά ρυθμισμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια όπως την ενεργοποίηση ενζύμων που ονομάζονται κασπάσες, την ενζυμική υδρόλυση μακρομορίων, την συμπύκνωση χρωματίνης και τον σχηματισμό του αποπτωτικού σωματίου (KassG.etal.1996; RichterC.etal.1996; HuY.etal.1999).

Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική πηγή οξειδωτικών ριζών γιατί σε αυτά βρίσκεται η αλυσίδα των αναπνευστικών ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στην πραγματικότητα η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στη δημιουργία του

μορίου του νερού ενώ μικρά αλλά σημαντικά ποσά των ηλεκτρονίων (1% - 2%) μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατευθειάν στο μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδία του υδρογόνου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία έρευνα στην οποία παρατηρήθηκε σε άτομα που φέρουν τη νόσο της σαρκοείδωσης αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και σε γονίδια παρακείμενων περιοχών (Peletidou S. et al. 2014). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: 1) τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση των μιτοχονδρίων και 2) τις μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν τις 13 ενζυμικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (Zeviani M. et al. 2004; Wong L J. et al. 2007). Οι πιο πολλές μεταλλάξεις στα tRNA και rRNA γονίδια προκαλούν βλάβες στην πρωτεϊνική σύνθεση, επιφέροντας αρνητικές συνέπειες στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν αρνητική ρύθμιση στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε μακροφάγα από BAL ασθενών με σαρκοείδωση (Kjellin H. et al. 2016). Συνεπώς, δυσλειτουργία των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης θα μπορούσε να επιφέρει αυξημένα επίπεδα ROS και πιθανή μείωση στην παραγωγή ATP συμβάλλοντας έτσι θετικά στην επιβίωση των κοκκιωμάτων και στην διατήρηση / επιδείνωση της σαρκοείδωσης. Οι πιο πάνω παρατηρήσεις καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο νέας μελέτης.

## **A.6 Στόχος και δομή της εργασίας**

Η πτυχιακή εργασία στοχεύει στην μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου complex I της αναπνευστικής αλυσίδας σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα ατόμων που πάσχουν από σαρκοείδωση και σε λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων (control group). Το complex I (σύμπλοκο I) είναι το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας και αποτελεί προϊόν 7 μιτοχονδριακών (ND1-6, ND4L) και 38 πυρηνικών γονιδίων (Carroll.etal.2006). Η μείωση της δραστηριότητας του παραπάνω συμπλόκου αποτελεί πιθανόν την συχνότερη αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών (JanssenRJ.etal.2006; DistelmaierF.etal.2009). Τεκμηρίωση της μείωσης της δραστηριότητας του παραπάνω συμπλόκου, θα ενίσχυε την άποψη ότι η σαρκοείδωση είναι μιτοχονδριακό νόσημα.

Η συνέχεια της πτυχιακής εργασίας δομείται ως εξής: στην ενότητα Β περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι της πειραματικής μελέτης, στην ενότητα Γ παρατίθενται και αναλύονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης, τέλος η ενότητα Δ περιλαμβάνει συζήτηση των αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα της εργασίας.

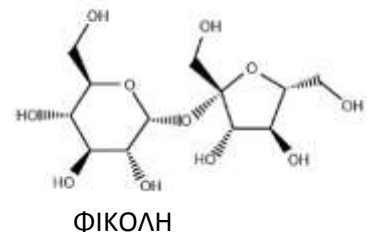
## **B. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Η ενότητα αυτή περιλαμβάνει την περιγραφή των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και των μεθόδων που ακολουθήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Ειδικότερα, στην παράγραφο B.1 περιγράφονται τα υλικά και η μέθοδος για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα. Στην παράγραφο B.2 περιγράφεται η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων των λεμφοκυττάρων. Η παράγραφος B.3 περιγράφει την διαδικασία του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού της δραστηριότητας του συμπλόκου I βάσει των μεταβολών απορρόφησης του NADH. Τέλος, στην παράγραφο B.4 περιγράφεται η διαδικασία προσδιορισμού της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατά Bradford στα δείγματα καθώς και σε τυφλό δείγμα.

### **B.1 Απομόνωση Μονοπύρηνων Κυττάρων Από Περιφερικό Αίμα**

Για την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φυγοκέντρησης πυκνότητας με το αντιδραστήριο φικόλη.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην διαβάθμιση των κυττάρων η οποία πραγματοποιείται με υγρό μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων. Το υγρό αυτό έχει ειδικό βάρος αντίστοιχο με το ειδικό βάρος των λευκών αιμοσφαιρίων. Με το μέσο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του αίματος σε τρεις στιβάδες:





- A. Πλάσμα (ανώτερη στοιβάδα)
- B. Λευκά αιμοσφαίρια (μεσαία στοιβάδα)
- Γ. Ερυθρά αιμοσφαίρια (κατώτερη στοιβάδα)

### **Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν**

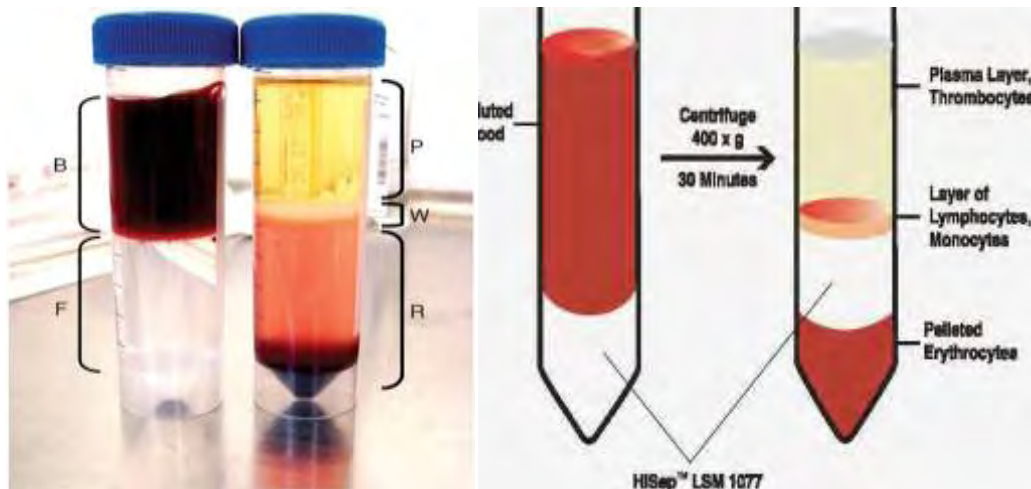
- I. Αίμα φλεβών των ασθενών
- II. Φιαλίδια γενικής αίματος τα οποία περιέχουν EDTA
- III. Φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl
- IV. Μέσο διαχωρισμού λεμφοκυττάρων: φικόλη
- V. Διάλυμα έκπλυσης PBS 1x (PhosphateBufferSaline)

### **Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας**

- a) Στην αρχή λαμβάνονται 20ml αίμα ασθενών με σαρκοείδωση ή φυσιολογικών ατόμων και τοποθετούνται σε φιαλίδια γενικής αίματος τα οποία περιέχουν EDTA.
- b) Στην συνέχεια, το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάριο των 50ml και αραιώνεται σε ίσο όγκο ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl.
- c) Σε δύο νέα σωληνάρια των 50ml τοποθετούνται 15 ml φικόλης στο καθένα, στα οποία μοιράζεται ισόποσα το αραιωμένο αίμα (20ml αραιωμένου αίματος προστίθενται με αργό ρυθμό πάνω στην επιφάνεια της φικόλης, υπό γωνία).
- d) Έπειτα, τα σωληνάρια των 50ml φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά χωρίς φρένο στις 1800 στροφές ανά λεπτό (1800rpm) και στους 4°C.
- e) Μετά τη φυγοκέντρηση, η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στήλης της φικόλης και της στήλης του ορού. Η φικόλη έχοντας ειδική πυκνότητα η οποία βρίσκεται μεταξύ αυτής των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων αφενός και αυτής των ερυθρών αιμοσφαιρίων και κοκκιοκυττάρων αφετέρου,

έχει διαχωρίσει τις δύο στοιβάδες κι επομένως γίνεται δυνατή η λήψη των λευκών αιμοσφαιρίων.

- f) Η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, στο οποίο προστίθενται 40ml PBS.
- g) Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά με φρένο στις 1600 στροφές και στους 4°C. Στο τέλος της παραλαμβάνεται το ίζημα.



**Εικόνα 1** : Επιστοίβαση ολικού αίματος σε φικόλη (αριστερά) και εικόνα του ίδιου σωληναρίου έπειτα από φυγοκέντρηση (δεξιά). PBMCs: περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα (PeripheralBloodMononuclearCells).

## **B.2 Προετοιμασία δειγμάτων**

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

### **BALANCED SOLUTION A (ΓΙΑ 20 mL)**

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

Βάζουμε 10 ml από το solution A.

### **SOLUTION B**

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

Βάζουμε 90 ml από το solution B.

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

Η ακριβής μέτρηση της δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας εξαρτάται από την πρόσβαση του NADH στον διαμεμβρανικό χώρο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη μέθοδο ψύξη / απόψυξη (freeze/thaw) σε ομογενοποίηση κυττάρων και η μηχανική λύση.

### **Λύση με τη μέθοδο ψύξη/απόψυξη**

#### **Υλικά**

Παρασκευάζεται ισότονο διάλυμα με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά.

### Πίνακας 1 : Ισότονο διάλυμα

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

\*Στην ποσότητα του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών.

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

Για τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούμε mitoB ενώ για τα λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούμε το SHE-PIM.

### **Διαδικασία**

Τα λεμφοκύτταρα διαλύονται σε ισότονο διάλυμα και υφίστανται τρεις κύκλους (και κάποιες φορές τέσσερις) ψύξης/απόψυξης (freeze/thaw) με εναλλαγή της θερμοκρασίας από τους -80°C στους +37°C.

## Λύση με υπέρηχους

Η συσκευή η οποία χρησιμοποιείται για τη λύση των λεμφοκυττάρων με υπερήχους αποτελείται από δύο κύριες μονάδες : 1) τη συσκευή που παράγει τους υπερήχους και 2) ένα μεταδότη που μεταφέρει τα υπερήχους στο διάλυμα των κυττάρων.

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

Αντιδραστήρια/συγκεντρώσεις
20mM TRIS-HCl pH 7.5
0,5% TritonX-100
250mM NaCl
3mM EDTA

-Διάλυμα λύσης

-Στην ποσότητα του διαλύματος η οποία θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

## Διαδικασία

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

## **B.3 Προσδιορισμός Ενζυμικής Δραστικότητας Του Συμπλόκου I Βάσει Των Μεταβολών Απορρόφησης Του NADH**

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός αποτελεί την πιο εύχρηστη, γρήγορη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του συμπλόκου I.

Η πιο συμβατική μέθοδος είναι η καταγραφή της μείωσης της απορρόφησης του NADH στα 340nm. Το NADH απορροφά σε  $\lambda_{max} = 340 \text{ nm}$ , ενώ η οξειδωμένη μορφή  $\text{NAD}^+$  δεν απορροφά καθόλου σε αυτό το μήκος κύματος. Έτσι μπορεί κανείς να παρακολουθήσει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης, μετρώντας την αύξηση ή τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, όπου το NADH υφίσταται οξείδωση.

Στην αντίδραση οξείδωσης του NADH παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα 340 nm. Η κατανάλωση NADH είναι άμεσα σχετιζόμενη με το μέγεθος της ενζυμικής ενεργότητας της οξειδοαναγωγάσης του ζεύγους NADH - συνενζύμου Q. Επομένως, τόσο η ανωτέρω αντίδραση όσο και η αντίδραση οποιασδήποτε άλλης αφυδρογονάσης στην οποία μετέχουν τα πιο πάνω συνένζυμα, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί καθώς καταγράφεται η μείωση ( $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ ) ή η αύξηση ( $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ ) της οπτικής απορρόφησης της αντιδράσεως στα 340 nm.

### Υλικά

Πίνακας 2 : Μίγμα της αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
0,1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.8	250 $\mu\text{l}$ /25mM
70gr/L BSA	35,7 $\mu\text{l}$ /4%
0,5M $\text{MgCl}_2$	50 $\mu\text{l}$ /25mM
1M KCN	1,7 $\mu\text{l}$ /1,7mM
1mM A-a	3,5 $\mu\text{l}$ /3,7 $\mu\text{M}$
dd $\text{H}_2\text{O}$	Μέχρι τελικό όγκο 1ml

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

## **Διαδικασία**

- Στο διάλυμα φωτομέτρησης προστίθενται 90μM NADH και 70μg από το δείγμα
- Το διάλυμα επώαζεται για 1 λεπτό στους 37°C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 60μM συνενζύμουQ<sub>1</sub> στο διάλυμα
- Καταγράφεται η κατανάλωση του NADH φωτομετρικά στα 340nm για 3-4 min (μέτρηση ανά 15 sec).

Η αντίδραση επαναλαμβάνεται με την προσθήκη 15μM της ροτενόνης στο μίγμα πριν την επώαση. Έτσι μπορεί να διαχωριστεί η δράση του συμπλόκου I από την δράση που οφείλεται σε άλλες NADH αφυδρογονάσες.

## **B.4 Προσδιορισμός Ολικής Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης Κατά BRADFORD**

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie που αλλάζει το μήκος κύματος στο οποίο παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση όταν το δείγμα αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20μl από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα, συγκέντρωσης 0-20mg/ml προστίθενται 980μl αντιδραστηρίου Bradford 1x. Στην συνέχεια τα διαλύματα που προκύπτουν, όγκου 1ml, αναδεύονται και αφήνονται για επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά το πέρας των 30 λεπτών τα διαλύματα αναδεύονται καλά και φασματοφωτομετρούνται σε μήκος κύματος  $\lambda = 595\text{nm}$ . Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

**Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις BSA για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.**

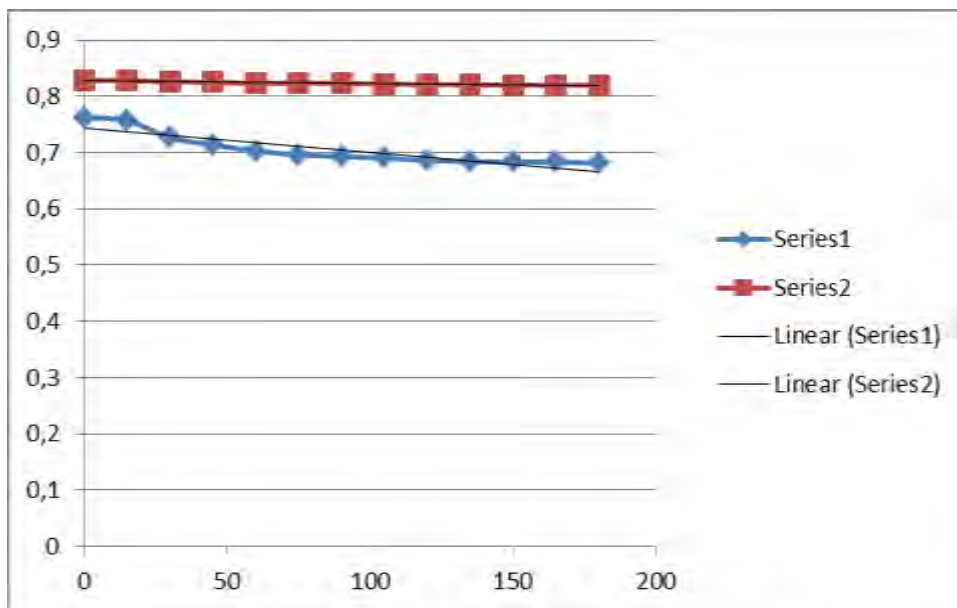
BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1× (μl)	BSA (μg)	BSA (μg/ml)
0	20	980	0	0
2.5	17.5	980	2.5	2.5
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

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



## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

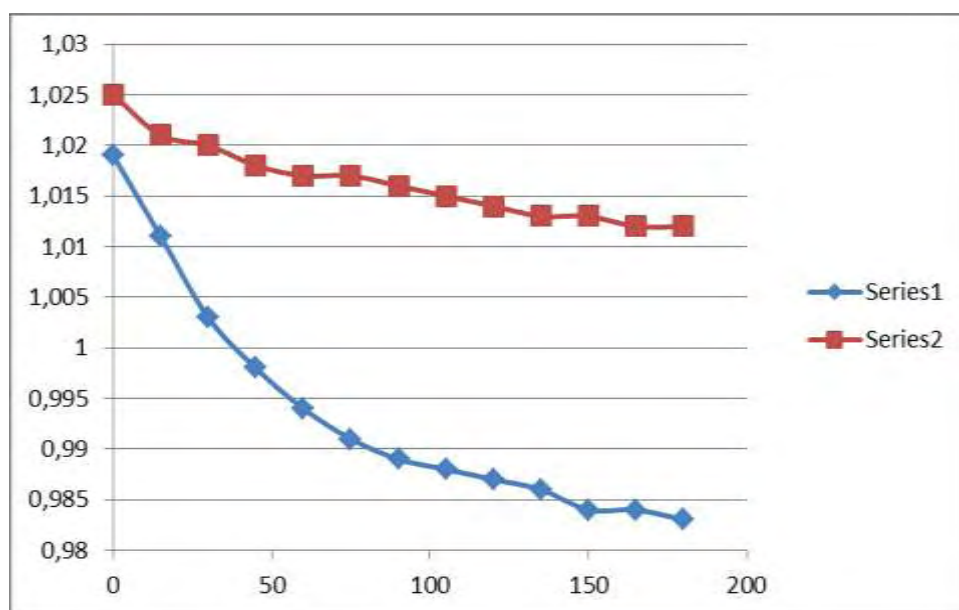
Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος 5 ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και 5 υγιών ατόμων (control). Οι ασθενείς οι οποίοι συμμετείχαν στην μελέτη παρακολουθούνται στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Π.Γ.Ν.Λ.).



### **Διάγραμμα 1: Κινητική της απορρόφησης του NADH σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων (70μgr δείγματος) υγιούς ατόμου**

Η μέτρηση έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης με βάση την απορρόφηση του NADH στα 340nm. Η συγκέντρωση του NADH ήταν 90μM. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται δύο καμπύλες μία χωρίς (μπλε) και μία με ροτενόνη (κόκκινη) (15μM). Η ροτενόνη επώαστηκε με το δείγμα στους 37°C για 1 min. Στον κατακόρυφο άξονα παρουσιάζονται τα

αποτελέσματα της απορρόφησης του NADH σε nm, ενώ στον οριζόντιο άξονα έχουμε τον χρόνο σε sec. Από τα αποτελέσματα δεν παρατηρούμε διαφορά στην απορρόφηση του NADH σαν συνάρτηση του χρόνου. Παρατηρούμε επίσης ότι η προσθήκη της ροτενόνης οδηγεί σε μικρή αύξηση της απορρόφησης του NADH.



**Διάγραμμα 2 : Μεταβολή της απορρόφησης του NADH σε συνάρτηση με το χρόνο σε ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (70μgr δείγματος) ατόμου με σαρκοείδωση**

Η μέτρηση έγινε με το πρωτόκολλο φωτομέτρησης με βάση την απορρόφηση του NADH στα 340nm μετά από τρεις κύκλους ψύξης/απόψυξης. Η συγκέντρωση του NADH ήταν 90μM. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται δύο καμπύλες μία χωρίς (μπλε) και μία με ροτενόνη (κόκκινη) (15μM). Η ροτενόνη επώαστηκε με το δείγμα στους 37°C για 1 min. Η διαφορά της απορρόφησης του NADH πριν και μετά την προσθήκη ροτενόνης αντικατοπτρίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου I.

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου I επιλέχθηκε το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού του ρυθμού οξειδωσης του NADH σε ολικό ομογενοποίημα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Για τη διαπερατοποίηση των κυττάρων προτιμήθηκε η μέθοδος ψύξης/απόψυξης.

### **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ**

Από τη μεταβολή της απορρόφησης ( $\Delta A$ ) του NADH μπορεί να υπολογιστεί η ενζυμική ενεργότητα (E) με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$E(\text{mU}) = (\Delta A \times V_t) / (t \times \epsilon \times b)$$

Όπου,

$\Delta A$  : η μεταβολή στην απορρόφηση του NADH του δείγματος σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο  $t$  (min),

$\epsilon$  : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του NADH ίσος με  $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ),

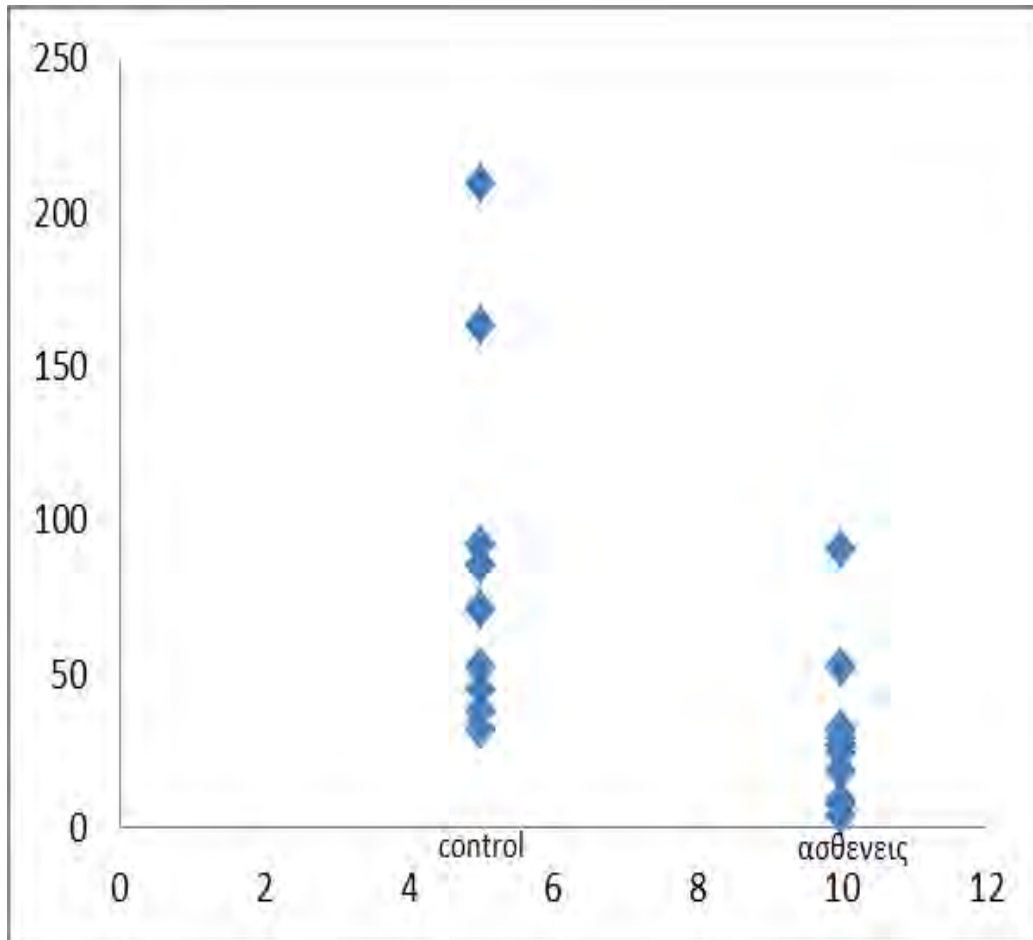
$b$  : το μήκος οπτικής διαδρομής (σε cm),

$V_t$  : ο συνολικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης (ml).

**Πίνακας 4:** Ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I

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

Στον πίνακα όπου A οι ασθενείς και όπου E τα φυσιολογικά άτομα.

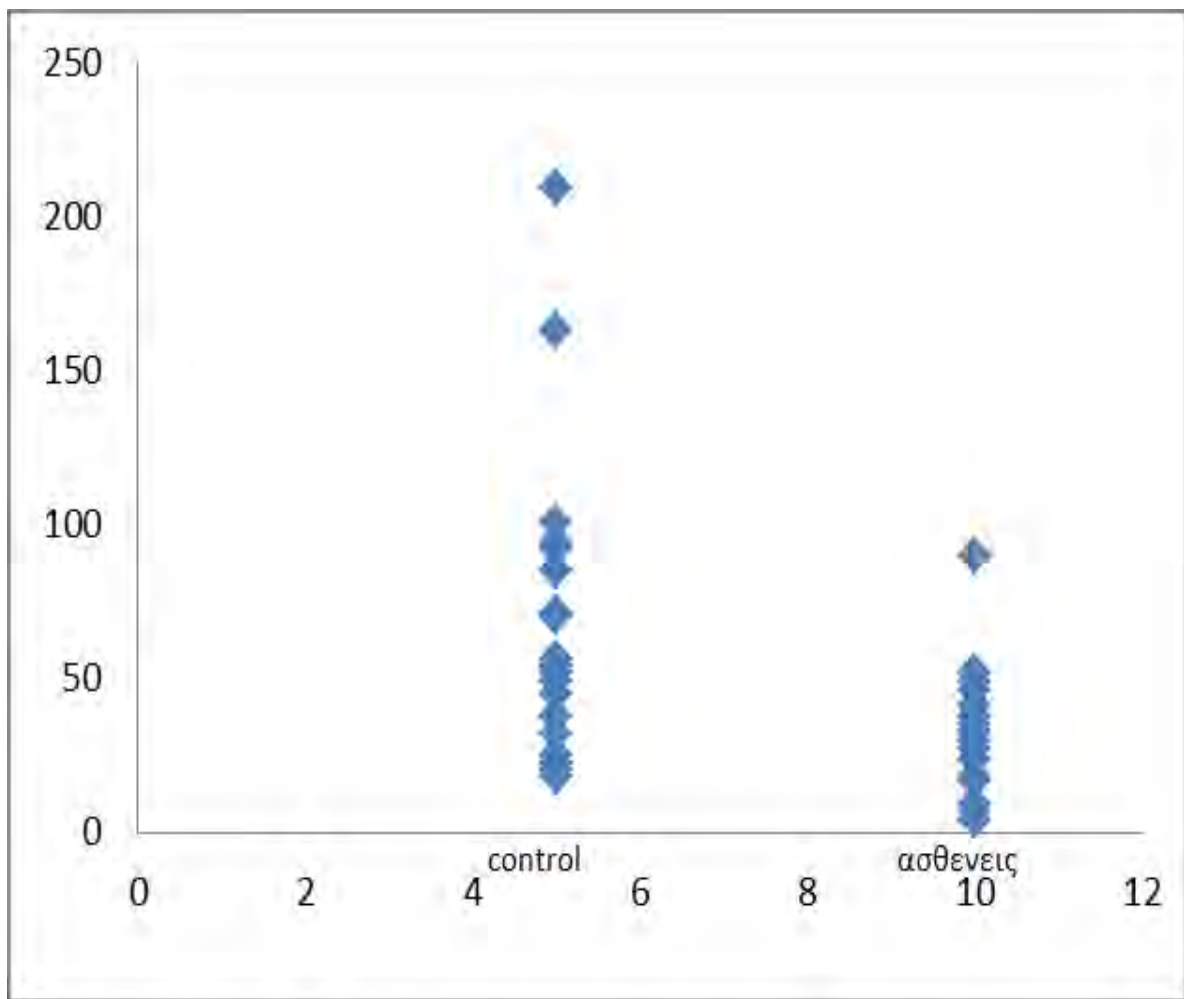


**Διάγραμμα 3:** Ο άξονας y απεικονίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα σε  $\mu\text{u/mgr}$ . Σύγκριση της δραστηριότητας του Συμπλόκου I ανάμεσα σε μία ομάδα ελέγχου ( $N_1=10$ ) και μία ομάδα κλινικών δειγμάτων ( $N_2=10$ ) οι μέσες τιμές ήταν αντίστοιχα  $\mu_1=85,8$  ( $SD=50,76$ ) και  $\mu_2=29,2$  ( $SD=24,33$ ). Η τιμή του t test ( $p$ ): 0,01418. Το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό.

**Πίνακας 5:** Ειδική ενζυμική δραστικότητα του Συμπλόκου I

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

(Έρευνα Ελένης Παναγιωτίδου)



**Διάγραμμα 4** Συνολικό διάγραμμα από έρευνα Ελένης Παναγιωτίδου και έρευνα στην τρέχουσα εργασία. Ο άξονας y απεικονίζει την ειδική ενζυμική δραστηριότητα του Συμπλόκου I σε  $\mu\text{u}/\text{mgr}$ .

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

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

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

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

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

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

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

Στους παραπάνω πίνακες παρατίθενται τα στοιχεία των ατόμων που έλαβαν μέρος στο πείραμα.



## **Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η σαρκοείδωση είναι μια αυτοάνοση διαταραχή η οποία προκαλεί μη τυροειδοποιημένα κοκκιώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα με πιο μεγάλη συχνότητα τους πνεύμονες.

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζει τον ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της νόσου, ειδικότερα υπάρχουν ενδείξεις της συμβολής του οξειδωτικού στρες στον σχηματισμό των κοκκιωμάτων.

Όπως είναι γνωστό τα μιτοχόνδρια παράγουν μεγάλες ποσότητες οξειδωτικών ριζών (ROS) ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων αποτελεί το κύριο σημείο παραγωγής ROS στο κύτταρο. Στην δημιουργία των κοκκιωμάτων φαίνεται επιπλέον να συμμετέχουν και αντιαποπτωτικοί μηχανισμοί. Η απόπτωση είναι μία καλά ρυθμισμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει μία σειρά από ATP-εξαρτώμενα στάδια. Δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας θα μπορούσε να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή ATP ενισχύοντας την αντιαποπτωτική δράση και την επιβίωση των κοκκιωμάτων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις καθιστούν τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο μελέτης.

Το σύμπλοκο I αποτελεί το πρώτο από τα πέντε σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και η έλλειψη της δραστηριότητάς του αποτελεί πιθανόν την πιο συχνή αιτία μιτοχονδριακών ασθενειών, ενώ έχει παρατηρηθεί αντίστροφη σχέση της λειτουργικότητάς του και της παραγωγής προϊόντων υπεροξειδίου (JanssenRJ.etal.2006; VercaatS.etal.2007).

Στην εργασία αυτή μετρήσαμε την ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου I σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση και σε υγιή άτομα.

Το σύμπλοκο I αποτελεί το σημείο εισόδου για τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της οξείδωσης του NADH και της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q.

Η εκτίμηση της ενζυμικής δραστικότητας στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, γίνεται μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του NADH στα 340nm (JanssenAJ.etal.2007).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ένα ισχυρό πλεονέκτημα της δραστικότητας του συμπλόκου I σε υγιείς δότες σε σύγκριση με αυτήν ατόμων που πάσχουν από την νόσο. Απαιτείται ωστόσο ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων αφενός για την συσχέτιση της ενζυμικής δραστικότητας του συμπλόκου I και της ύπαρξης μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα με την ασθένεια, αφετέρου για την αποσαφήνιση του πιθανού ρόλου των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της ασθένειας.

## **E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z and Stathopoulos C Mitochondrial tRNA Mutations : Clinical and Functional Perturbations (2007) *RNA Biology*, 4:1, 38-66.
- Ivanisevic J, Kotur-Stevuljevic J, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Videnovic-Ivanov J et al (2012) Dyslipidemia and oxidative stress in sarcoidosis patients. *Clin Biochem* 45(9):677-682, Epub 2012/03/28
- Janssen AJ, Trijbels FJ, Sengers RC, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Wintjes LT, Stoltenberg-HogenkampBJ, RodenburgRJ. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem.* 2007 Apr;53(4):729-34.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA Mitochondrial complex I: structure, function and pathology *J Inherit Metab Dis.* 2006 Aug;29(4):499-515
- Kjellin H, Silva E, Branca R, Eklund A, Jakobsson PJ, Grunewald J Alterations in the membrane-associated proteome fraction of alveolar macrophages in sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.*, 2016 Mar 29; 33(1):17-28
- L.E.A de Wit, L.Spruijt, G.C Schoonderwoerd, I.F.M de Coo, H.J.M Smeets, H.R Scholte, W. Sluiter, A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes (2007)
- Mermigkis C, Polychronopoulos V, Mermigkis D, Tsakanika K, Heretis M, Karagianidis N, Bouros D, Overexpression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage lymphocytes and macrophages in sarcoidosis, *Respiration*, 2006; 73(2):221-6.
- Peletidou S, Zifa E, Grammatikopoulos A, Malli F, Bardaka F, Gourgoulianis K, Mamuris Z, Daniil Z. Mitochondrial tRNA gene mutations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and sarcoidosis, *European Respiratory Journal* (2014).

- *Stridh H, Planck A, Gigliotti D, Eklund A, Grunewald J, Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis, , 2002 Oct; 57(10):897-901.*
- *Stridh H<sup>1</sup>, Cotgreave I, Müller M, Orrenius S, Gigliotti D, Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes, Chem Res Toxicol, 2001 Jul; 14(7):791-8*
- *Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, et al. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathway who's expression is controlled at multiple levels. Immunity, 1996; 4: 329–36.*
- *Xaus J, Comalada M, Cardó M, Valledor AF, Celada A,. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27 (Kip1) and p21(Waf1) Blood, 2001 Oct 1; 98(7):2124-33.*
- *Xaus J, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mañá J, Celada A, High expression of p21 Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation, J Leukoc Biol., 2003 Aug; 74(2):295-301.*