



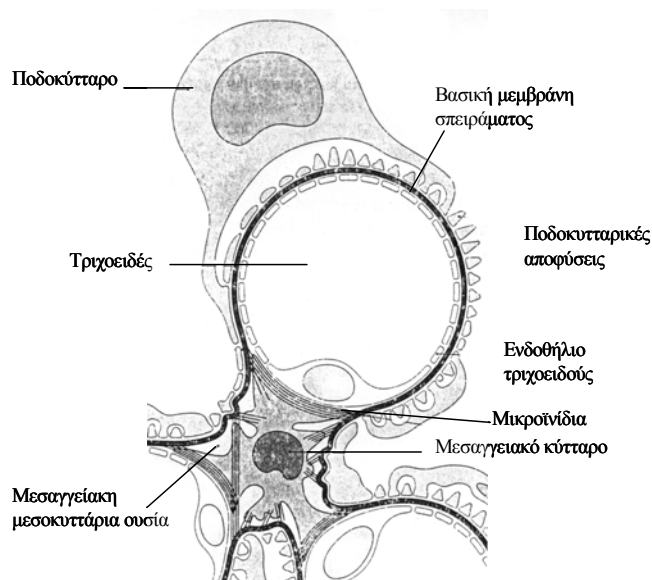
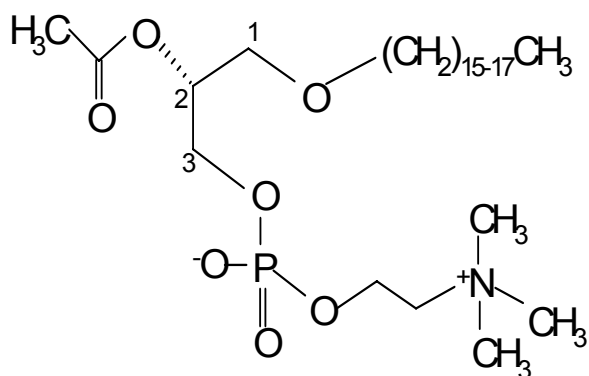
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ:

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΗ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (ΡΑΦ) ΑΠΟ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΕΣΑΓΓΕΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»



ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΡΕΚΛΕΙΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ, ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ-ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

-ΑΘΗΝΑ 2006-

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ:

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΤΗ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (ΡΑΦ) ΑΠΟ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΕΣΑΓΓΕΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»**

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΡΕΚΛΕΙΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ, ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ-ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

-ΑΘΗΝΑ 2006-

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή διατριβή έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών την περίοδο 2005-2006, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας-Διατροφής.

Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο Λέκτορας κ. Νομικός Τζώρτζης και μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, η Αντιπρύτανης και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αντωνοπούλου Σμαραγδή, ο Λέκτορας κ. Νομικός Τζώρτζης και η Λέκτορας κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ.

Με την αποπεράτωση της εργασίας αυτής θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, κ. Νομικό Τζώρτζη, για την πολύτιμη παροχή επιστημονικών γνώσεων, την ανεξάντλητη βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και κατά την συγγραφή της διατριβής.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Αντιπρύτανη και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αντωνοπούλου Σμαραγδή για τη βοήθειά της, πρακτικά και πνευματικά όλο αυτό τον καιρό καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, προ και μεταπτυχιακά.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Λέκτορα κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ για την άμεση και αποτελεσματική βοήθεια και γνώση που μου παρείχε παρά τον περιορισμένο χρόνο της. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Καραντώνη Χαράλαμπο, Επιστημονικό Συνεργάτη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, για την εξίσου πολύτιμη βοήθειά του καθώς και τον συνάδελφο Μίλεση Γεώργιο για τη βοήθειά του στην προετοιμασία των δειγμάτων που χρησιμοποίησα και την Ντετοπούλου Βίβιαν που συνέβαλε στην εξασφάλιση της διαθεσιμότητας των αναλώσιμων στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς και την αδερφή μου για την συμπαράστασή και την υπομονή τους.

11βOHD5 : Αφυδρογονάση των 11-β-υδροξυστεροειδών 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAGPC	: 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη	, 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycerolphosphatidylcholine
AAGPC	αλκυλοακετυλογλυκερυλοφωσφατιδυλοχολίνη	Alkylacetyl glycerylphosphatidylcholine
ADM	: αδρενομελίνη	, adrenomedulin
ALPA	: 1-O-αλκυλο-2-λυσσ-φωσφατιδικό οξύ	, 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidic acid
ANSA	: αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ	, aminenaphtholesulfonic acid
AP-1	: ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1	, activator protein-1
AVP	: αργινίνη-βασοπρεσίνη	
BH4	: τετραϋδροβιοπτερίνης	tetrahydrobiopteridine
BSA	: βόειος αλβουμίνη ορού	, Bovine Serum Albumin
C5α	: παράγοντας συμπληρώματος 5	, complement 5α
CDP	: φωσφοχολινοτρανσφεράση	, Cholinephosphotransferase
cGMP	: κυκλικής 3,5- μονοφωσφορικής γουανοσίνης	
COX I	: Κυκλοξυγονάση I	cyclooxygenase
COX II	Κυκλοξυγονάση II	, cyclooxygenase II
CPT	: κυτιδυλοδιφωσφορικό οξύ	, Cytidine diphosphate

DAG	: Διγλυκερίνη-ερόλη	, diacylglycerol
HRK	: Εξτερλευκίνη-6	, interleukin-6
HRK2	: Εξτερλευκίνη-8	, interleukin-8
IRAK -1	: Εξτερλευκίνη-1 με τον IL-1R κινάση-1	, Interleukin-1 associated kinase-1
IRAK -2	: Εξτερλευκίνη-2 με τον IL-1R κινάση-2	, Interleukin-2 associated kinase-2
ICAK -4	: Εξτερλευκίνη-4 με τον IL-1R κινάση-4	, Interleukin-4 associated kinase-4
IRAK -M	: Εξτερλευκίνη-M με τον IL-1R κινάση-M	, Interleukin-M associated kinase-M
GM-CSF	: Παράγοντας ανάπτυξης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων	, Granulocyte-macrophage-colony stimulated factor
GRASPAPK	: Ρυθμιστική πρωτεΐνη-2	, G-protein-coupled receptor-activated protein kinase
HPLC	: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	, High Performance Liquid Chromatography
IDL	: Λιποπρωτεΐνη-2	, Low density lipoproteins
LIF	: Ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας	, leukemia inhibitory factor
ICAM1	: ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1	, intracellular cell adhesion molecule-1
LPS	: Λιποπολυσακχαρίτης	, lipopolysaccharide
IFN-γ	: ιντερφερόνη γ	, interferon γ
LRP	: πρωτεϊνικός υποδοχέας λιποπρωτεϊνών	, lipoprotein related receptor protein
IGF1	: αυξητικός παράγοντας που προσομοιάζει	, insulin like growth factor
LTB4	: Λευκοτριένιο B4	, Leukotriene B4
IL-1	: ιντερλευκίνη-1	, interleukin-1
lyso-PAAT	: λυσοφωσφατιδικό οξύ:ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράση	, Lysophosphatidic acid:acyl-CoA acyltransferase
IL-2	: ιντερλευκίνη-2	, interleukin-2
Lyso-PAF	: 1-O-ακυλο-2-λυσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη	

MAPK	: Ηπρόσφιλη ενζύμωση πρωτεϊνική κινάση	, Mitogen-activated protein kinase
MGF	: μεταγενέστερο παράγοντας	, Mesodermal growth factor
MGST	: Πρωτοπλασματικό διεγερτικό αποικιών μακροφάγων	, macrophage colony stimulated factor
MBIC II	: 24ζονοφωσφολιπίδιασυσπλοκότητας II	, Phospholipid compatibility complex II
MAHK9	: Κατάλυση πρωτεϊνών με βάση το 39	, 3-phosphatidylinositol kinase
HRNA	: αφωσφολιπίδια RNA	, phospholipid RNA
MUFAs	: μονοακόρεστα διπαρα οξέα	, monounsaturated fatty acids
NIADPH	: βιοφωσφολιπίδια-Αδενο-φωσφοδινουκλεοτίδιο	, nicotinamide adenine phospho dinucleotide
RMN	: Αποξηλωτικό παράγοντα ενεργού κυττάρων	, Releasing factor neutrophils
RON	: πηροξονάση	, peroxidase
βPARα		, pertussis toxin-activated receptor α
PAP	: πρωτεϊνική φωσφοκινάση	, phosphatidyl phosphatases
PAF	: παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	, platelet activating factor
PGF	: Διεγερτικό παράγοντας μετασχηματισμού	, Transforming growth factor
PDGF	: αυξητικός παράγοντας αρχή μετασχηματισμού αιμοπετάλια	, Platelet-derived growth factor
PERs	: Τηλεπαράδοξη ενεργοποίησης-1β	, Phosphatidylethanolamine receptor
PSF	: Διεγερτικό παράγοντας	, prostaglandin factor

t-PA	: ιστικοί ενεργοποιητές πλασμινογόνου	, tissue-type plasminogen activators
TRAF6	: σχετιζόμενος με τον ογκονεκρωτικό υποδοχέα παράγοντας-6	, tumour necrosis receptor-associated factor-6
TXA2	:Θρομβοξάνη A2	, thromboxane A2
TXB2	:Θρομβοξάνη B2	, thromboxane B2
VCAM1	: Αγγειακό μόριο προσκόλλησης 1	, vascular cell adhesion molecule-1
αSMA	:Α-ακτίνη λείων μυικών κυττάρων	, alpha smooth muscle cell actin
AA	: αραχιδονικό οξύ	
HMM	:Μεταλλοπρωτεϊνάση ανθρώπινης θεμέλιας ουσίας	, human matrix metalloproteinases-13
MCP1	: χημειοελκτική για τα μονοκύτταρα πρωτεΐνη-1	, monocyte chemoattractant protein-1
PKC	: Πρωτεϊνική κινάση C	, Protein kinase C
PE	: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	, Phosphatidylethanolamine
PKB	: Πρωτεϊνική κινάση B	, Protein kinase B
TAK1	: κινάση 1 ενεργοποιούμενη από τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης	, transforming growth factor β-activated kinase-1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Φλεγμονή

1.1. Ανοσία – Είδη κυτταρικής ανοσίας.....	13
1.2. Φλεγμονή.....	14
1.2.1. Χαρακτηριστικά και εξέλιξη της φλεγμονής.....	15
1.2.2. Ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής.....	16
1.2.3. Αλληλεπίδραση των κυτταροκινών στα πλαίσια της φλεγμονής.....	18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Νεφρός-Μεσαγγειακά Κύτταρα

2.1. Γενικά.....	21
2.2. Λειτουργίες των νεφρών.....	21
2.2.1. Η ρύθμιση του νερού, της οξεοβασικής ισορροπίας και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών.....	21
2.2.2. Η απέκκριση των άχρηστων ουσιών.....	21
2.2.3. Η ρύθμιση της πίεσης του αίματος	22
2.2.4. Η νεφρική ορμονική ρύθμιση	22
2.2.5. Η ομοιόσταση της γλυκόζης.....	23
2.3. Δομή των νεφρών.....	23
2.4. Μεσάγγειο-Μεσαγγειακά κύτταρα.....	24
2.4.1. Γενικά.....	24
2.4.2. Ρόλος των μεσαγγειακών κυττάρων στη λειτουργία του σπειράματος.....	25
2.4.3. Ρύθμιση των μεσαγγειακών κυττάρων.....	27
2.4.3.1. Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων.....	27
2.4.3.2. Ρύθμιση της λειτουργικότητας των μεσαγγειακών κυττάρων.....	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Νεφρική φλεγμονή-Σπειραματοσκλήρυνση

3.1. Εισαγωγή.....	29
3.2. Ταξινόμηση.....	29
3.3. Παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν στην σπειραματοπάθεια.....	29
3.4. Ρόλος κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης.....	29
3.5. Πιθανοί μηχανισμοί εξέλιξης της νεφρικής βλάβης.....	31
3.6. Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση.....	32
3.7. Σπειραματονεφρίτιδα.....	32
3.8. Μεσαγγειακά κύτταρα και σπειραματοσκλήρυνση.....	34

3.9. Η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας.....	36
--	----

Κεφάλαιο 4. Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF)

4.1. Εισαγωγή.....	38
4.2. Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες PAF	38
4.3. Μοριακά είδη και ανάλογα PAF – Σχέση δομής-δραστικότητας.....	39
4.4. Μεταβολισμός του PAF – Ένζυμα μεταβολισμού PAF.....	41
4.4.1. Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης PAF.....	41
4.4.1.1. Σχηματισμός αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή.....	41
4.4.1.2. De novo (εξ' υπαρχής) πορεία βιοσύνθεσης του PAF.....	42
4.4.1.3. Βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού (remodeling πορεία).....	43
4.4.1.4. Μεταβολικές πορείες αποικοδόμησης PAF.....	45
4.4.1.5. Μηχανισμοί έκκρισης PAF από τα κύτταρα.....	49
4.4.1.6. Τοπολογία μεταβολισμού PAF.....	50
4.4.2. Σύντομη περιγραφή των σημαντικότερων ενζύμων μεταβολισμού του PAF.....	50
4.4.2.1. DTT - ανεξάρτητη CDP – χολίνη:αλκυλοακετυλογλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση, CPT.....	50
4.4.2.2. Ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερύλοφωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράση, rem AT	51
4.4.2.2. Ένζυμα καταβολισμού του PAF: PAF ακετυλοϋδρολάσες.....	52
4.4.2.3.1. Η PAF-AH του πλάσματος.....	52
4.4.2.3.2. Η ενδοκυτταρική ισομορφή II	53
4.4.2.3.3. Η ενδοκυτταρική ισομορφή Ib του εγκεφάλου	53
4.4.2.3.4. Η ενδοκυτταρική μορφή των ερυθροκυττάρων	54
4.5. Υποδοχέας PAF.....	54
4.6. Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος PAF.....	55
4.7. Φυσιολογικές δράσεις του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.....	55

Κεφάλαιο 5. Ιντερλευκίνη- 1

5.1. Γενικά	59
5.2. Δομή-Είδη.....	59
5.3. Οικογένεια υποδοχέων Toll/IL-1 (TIRs).....	60
5.3.1. Υπο-οικογένεια υποδοχέα IL-1.....	61
5.3.2. Οικογένεια Toll-υποδοχέων (Toll-like receptor subfamily-TRL).....	61
5.3.3. Το μόριο MyD88 των θηλαστικών.....	63

5.4. Μεταγωγή σήματος της οικογένειας IL-1R.....	63
5.4.1. 1 ^ο Βήμα: η κινητοποίηση της IRAK-1 στο σύμπλοκο του υποδοχέα μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης	65
5.4.2. 2 ^ο Βήμα: η αυτοφωσφορυλίωση της IRAK-1 και η αποκοπή της από το σύμπλοκο του υποδοχέα.....	65
5.4.3. 3 ^ο Βήμα: σχηματισμός του σηματοδότη IRAK/TRAF6	66
5.4.4. 4 ^ο Βήμα: Διεργασία μεταγωγής σήματος	66
5.4.5. Τελικό Βήμα: η τύχη της IRAK-1 και ο τερματισμός της σηματοδότησης...66	
5.5. Μεταγωγή σήματος που δεν σχετίζεται άμεσα με το σύστημα MyD88/IRAK/Tollip.....	68
5.5.1. Συμμετοχή της PI-3-K στη μεταγωγή σήματος της TIR οικογένειας.....	68
5.5.2. Συμμετοχή σφιγγομυελινασών στη μεταγωγή σήματος της IL-1.....	68
5.5.3. Εμπλοκή της PKC στη μεταγωγή σήματος της IL-1.....	68
5.5.4. Εμπλοκή των φωσφολιπασών στη μεταγωγή σήματος της IL-1.....	69
5.5.5. Εμπλοκή των κινασών καζεΐνης στη μεταγωγή σήματος της IL-1.....	69
5.6. Δράσεις IL-1.....	69

Κεφάλαιο 6. IL-1β και μεσαγγειακά κύτταρα

6.1. Εισαγωγή.....	72
6.2. Παραγωγή της IL-1 από τα MC.....	72
6.3. Η IL-1 σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.....	73
6.4. Έκφραση του γονιδίου της IL-1 από το μεσάγγειο.....	73
6.5. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της IL-1 στα MC	74
6.6. Δράσεις της IL-1 στα MC.....	74
6.6.1. Προσκόλληση κυττάρων.....	74
6.6.2. Έκφραση αντιγόνων.....	75
6.6.3. Απόπτωση.....	75
6.6.4. Έκφραση/Εκκρίση πρωτεϊνών.....	75
6.6.5. Μεταβολισμός λιπιδίων.....	75
6.6.6. Σύνθεση θεμέλιας ουσίας.....	76
6.6.7. Σύνθεση NO.....	79
6.6.8. Οξειδωτικό στρες.....	80
6.6.9. Σύνθεση PAF.....	81
6.6.10. Πολλαπλασιασμός των MC.....	81
6.6.11. Σύνθεση και έκκριση εικοσανοειδών.....	82
6.7. Μηχανισμός μεταγωγής σήματος.....	82

6.8. Επίδραση των φυσικών προϊόντων στην παραγωγή και τις δράσεις της IL-1β.....	85
--	----

Κεφάλαιο 7. PAF και Μεσαγγειακά κύτταρα

7.1. Σύνθεση του PAF στα MC.....	86
7.2. Μεταγωγή σήματος.....	87
7.3. Μεταβολισμός του PAF στα MC.....	88
7.4. Δράσεις του PAF στα μεσαγγειακά κύτταρα.....	89
7.4.1. Σύνθεση εικοσανοειδών.....	89
7.4.2. Σύνθεση κυτταροκινών.....	89
7.4.3. Μορφολογικές τροποποιήσεις	89
7.4.4. Συσσώρευση λιπιδίων.....	89
7.4.5. Σύνθεση της θεμέλιας ουσίας.....	90
7.4.6. Χημειοταξία.....	90
7.4.7. Πολλαπλασιασμός	90
7.4.8. Οξειδωτικό στρες	90
7.5. Ο PAF ως μεσολαβητής για τη δράση άλλων μορίων στα MC.....	90

8. Μεσογειακή διαίτα-Μικροθρεπτικά συστατικά

8.1. Εισαγωγή.....	92
8.2. Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας.....	92
8.3. Μεσογειακή Δίαιτα, μακρο και μικροθρεπτικά συστατικά.....	92
8.3.1. Λιπαρά Οξέα.....	92
8.3.2. Αντιοξειδωτικά.....	93
8.4. Ελαιόλαδο και Μεσογειακή Δίαιτα.....	93
8.4.1. Κατηγοριοποίηση και σύσταση του ελαιολάδου.....	93
8.4.2. Προστατευτική δράση ελαιολάδου	94
8.4.3. Ερευνητικά ευρήματα.....	96
8.5. Αλκοόλ και Μεσογειακή διαίτα.....	96
8.5.1. Σύσταση του κρασιού.....	96
8.5.2. Προστατευτική δράση κρασιού	96

9. Σκοπός 98

10. Μεθοδολογία

10.1. Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων.....	99
10.2. Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων.....	101
10.3. Διέγερση των κυττάρων	103
10.4. Προσδιορισμός PAF στα κύτταρα και το μέσο καλλιέργειας.....	104

10.4.A. Εκχύλιση PAF από τα κύτταρα και το θρεπτικό μέσο.....	104
10.4.B. Διαχωρισμός του PAF με HPLC.....	105
10.4.Γ. Προσδιορισμός του PAF με βιολογική διαδικασία συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....	106
10.5. Προσδιορισμός δραστηριότητας των ενζύμων.....	109
10.5.A. Επεξεργασία κυττάρων και μέσου για προσδιορισμό ενζύμων.....	109
10.5.B. Προσδιορισμός δραστηριότητας 1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορυλοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (REM AT) με TLC.....	110
10.5.Γ. Προσδιορισμός δραστηριότητας της DTT-ανεξάρτητης αλκυλοακετυλογλυκερόλη:CDP-χολίνη φωσφοχολινωτρανσφεράσης με TLC.....	112
10.6. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer.....	115
10.7. Προσδιορισμός φωσφόρου στα λιποειδή.....	116
10.8. Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή.....	117
10.9. Προσδιορισμός φαινολικών.....	118
10.10. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	119
10.11. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών.....	120

11. Αποτελέσματα

11.1. Προκαταρκτικά πειράματα.....	121
11.1.1. Εύρεση της περιοχής συλλογής του PAF από την HPLC.....	121
11.1.2. Επίδραση της BSA του θρεπτικού υλικού στην σύνθεση του PAF από τα HMCL	123
11.1.3. Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου παραλαβής των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας.	124
11.1.4. Μέτρηση λιποειδικού φωσφόρου στα HMCL.....	126
11.2. Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στην σύνθεση και έκκριση του PAF στα HMCL	127
11.2.1. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης της IL-1β για την σύνθεση και έκκριση του PAF από τα HMCL για χρόνο επώασης 6 h.....	127
11.2.2. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) στην σύνθεση του PAF.....	129
11.2.3. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) στην σύνθεση του PAF. Μελέτη της επίδρασης του LPS στην	

σύνθεση του PAF.....	129
11.2.4. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με διάφορες συγκεντρώσεις IL-1β στην σύνθεση του PAF.....	131
11.3. Πειράματα μελέτης του μηχανισμού σύνθεσης του PAF από τα HMCL.....	133
Επίδραση των οξικών στην ενδογενή παραγωγή του PAF.....	133
Επίδραση του refabloc στην ενδογενή παραγωγή του PAF.....	134
Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στη δραστικότητα των ενζύμων:	
A. 1 - O - αλκυλο – 2 - λυσο - sn - γλυκερυλο - 3 - φωσφορυλοχολίνη:ακετυλο- CoA ακετυλοτρανσφεράσης (REM AT)	
B. DTT - ανεξάρτητης αλκυλοακετυλογλυκερόλη : CDP – χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης	
Γ. PAF-ακετυλοϋδρολάσης.....	135
11.4. Σύσταση πολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.....	137
11.5. Πειράματα μελέτης της επίδρασης του OOPLE στην παραγωγή του PAF.....	137
Επίδραση του OOPLE στην σύνθεση του PAF από τα HMCL.....	137
Επίδραση του OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση του PAF (συνεπώαση) από τα HMCL.	139
Επίδραση του OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση του PAF (προεπώαση) από τα HMCL.....	140
12. Συζήτηση	142
13. Περίληψη	151
14. Summary	154
15. Βιβλιογραφία	153

1. Φλεγμονή

1.1. Ανοσία – Είδη κυτταρικής ανοσίας

Το ανοσολογικό σύστημα αποτελεί ένα σύνολο κυττάρων και οργάνων που συνεργάζονται στενά μεταξύ τους με στόχο την προστασία του οργανισμού έναντι βλαπτικών παραγόντων του εξωτερικού ή εσωτερικού περιβάλλοντος. Η λειτουργία αυτή ονομάζεται ανοσία ^[1].

Η ανοσία διακρίνεται στη μη ειδική (ή φυσική ή έμφυτη) και στην ειδική ανοσία. Η φυσική ανοσία υπάρχει εκ γενετής και δεν εξελίσσεται. Αναπτύσσεται αμέσως μετά το αρχικό ερέθισμα. Οι φορείς της φυσικής ανοσίας δεν διακρίνουν το ξένο από το ίδιο αλλά αντιλαμβάνονται τις διαφορές που επιφέρει η παρουσία του ξένου παράγοντα μέσα στον οργανισμό. Η ειδική ανοσία εξελίσσεται μετά τη γέννηση. Μετά την εμφάνιση της ειδικής ανοσίας, η μη ειδική ανοσία, παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό του αρχικού βλαπτικού ερεθίσματος. Τα δυο είδη της ανοσίας αλληλεπιδρούν σημαντικά μεταξύ τους. Συνήθως, οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας προετοιμάζουν τις συνθήκες για την ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας όταν παραμένει το αίτιο που προκαλεί την ανοσολογική απόκριση ^[1].

Οι φορείς της φυσικής ανοσίας διακρίνονται σε κύτταρα και χημικούς παράγοντες οι οποίοι είναι προϊόντα των κυττάρων. Τέτοια κύτταρα είναι τα μονοκύτταρα, μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα. Χημικοί παράγοντες είναι οι κυτταροκίνες (TNF, IL-1, IFN-α, IL-8) που είναι προϊόντα των ανωτέρω κυττάρων, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης που είναι προϊόντα του ήπατος και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος ^[1].

Η ειδική ανοσία διακρίνεται σε δυο μορφές, ανάλογα με τα συστατικά του ανοσολογικού συστήματος που επιτελούν την ανοσολογική απόκριση:

- A) η χημική ανοσία φέρεται σε μη ανοσοποιημένα άτομα από πλάσμα ή ορό του αίματος ατόμων με ενεργό ανοσία και επιτελείται από τα αντισώματα ενώ,
- B) η κυτταρική ανοσία φέρεται σε μη ανοσοποιημένα άτομα με κύτταρα ατόμων που έχουν αποκτήσει ειδική ανοσία αλλά όχι με τον ορό του αίματος. Εδώ τα αρμόδια κύτταρα είναι τα λεμφοκύτταρα ^[1].

1.2. Φλεγμονή

Η φλεγμονή αποτελεί την εντοπισμένη απόκριση του οργανισμού στη μόλυνση ή τον τραυματισμό. Αποτελεί μορφή φυσικής ανοσίας που ονομάζεται και απόκριση οξείας φάσης. Ανεξάρτητα από την αιτιολογία, η φλεγμονή είναι σχετικώς στερεότυπη διεργασία αφού ο μηχανισμός πυροδότησής της περιλαμβάνει κυρίως τον κυτταρικό ή ιστικό τραυματισμό ^[2]. Οι λειτουργίες που περιλαμβάνονται είναι η καταστροφή ή η απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων και η εγκατάσταση της επιδιόρθωσης της ιστικής βλάβης. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία αυτή κατέχουν τα φαγοκύτταρα, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα μακροφαγομιμητικά κύτταρα (Πίνακας 1.1.) ^[3].

Πίνακας 1.1. Οι δράσεις των σημαντικότερων φαγοκυττάρων ^[2].

Όνομα	Σημείο Παραγωγής	Λειτουργίες
Ουδετερόφιλα	Μυελός των οστών	1. Φαγοκυττάρωση 2. Απελευθέρωση χημικών ουσιών που εμπλέκονται στη φλεγμονή (αγγειοδιαστολή, χημειοταξία κ.λπ.)
Μακροφάγα τοξικών	Σχεδόν όλοι οι ιστοί και τα όργανα, διαφοροποιούνται από τα μονοκύτταρα	1. Φαγοκυττάρωση 2. Εξωκυττάρια εξολόθρευση μέσω της έκκρισης χημικών ουσιών 3. Επεξεργάζονται και παρουσιάζουν αντιγόνα στα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα 4. Εκκρίνουν κυτταροκίνες, που εμπλέκονται στη φλεγμονή, στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων και στις συστηματικές αποκρίσεις στη φλεγμονή και το τραύμα (αντίραση οξείας φάσης)
Μακροφαγομιμητικά κύτταρα	Σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα, μικρογλοία στο ΚΝΣ	Παρόμοιες με αυτές των μακροφάγων

Αποτελεί μια αντίδραση της μικροκυκλοφορίας που χαρακτηρίζεται από μετακίνηση υγρού και λευκοκυττάρων από το αίμα προς τους εξωαγγειακούς ιστούς. Το γεγονός αυτό αποτελεί συχνά έκφραση της προσπάθειας του ξενιστή να εντοπίσει και να εξαλείψει τα μεταβολικώς αλλοιωμένα κύτταρα, τα ξένα σωματίδια, τους μικροοργανισμούς ή τα αντιγόνα ^[4].

1.2.1. Χαρακτηριστικά και εξέλιξη της φλεγμονής

Η εκκίνηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τον εντοπισμό και την εξάλειψη των ξένων ουσιών και των προσβεβλημένων ιστών ενεργοποιείται από την αναγνώριση ότι έχει συμβεί ιστική βλάβη. Ακολουθεί η ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης κατά την οποία ενεργοποιούνται διαλυτοί μεσολαβητές και κυτταρικοί φλεγμονώδεις μηχανισμοί. Εν συνεχεία, αναγνωρίζεται η βλάβη. Ο τερματισμός της φλεγμονώδους αντίδρασης, μετά τη δημιουργία των παραγόντων φλεγμονής και την εξάλειψη του ξένου παράγοντα, ολοκληρώνεται από ειδικούς αναστολείς των διαβιβαστών ^[4].

Μετά την ιστική βλάβη, οι αλλοιώσεις της δομής του αγγειακού τοιχώματος επιφέρουν απώλεια της ακεραιότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων, διαρροή υγρού και συστατικών του πλάσματος από το ενδο-αγγειακό διαμέρισμα και μετανάστευση ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων από τον χώρο του αυλού, προς τους εξω-αγγειακούς ιστούς ^[4].

Συνήθη εκδήλωση του ιστικού τραύματος και της φλεγμονής αποτελεί η τοπική ερυθρότητα, το οίδημα, η αύξηση της θερμοκρασίας και ο πόνος. Τα γεγονότα της φλεγμονής που βρίσκονται κάτω από τις εκδηλώσεις αυτές, επάγονται και ρυθμίζονται από μια πληθώρα χημικών μεσολαβητών, μερικές εκ των οποίων είναι οι κυτταροκίνες. Κάθε γεγονός της φλεγμονής μπορεί να επάγεται από από πολλούς μεσολαβητές και κάθε μεσολαβητής, μπορεί να επάγει περισσότερα του ενός γεγονότα ^[3].

Οι μεσολαβητές, ανάλογα με την προέλευσή τους, διακρίνονται σε: α) πεπτίδια, που παράγονται στο σημείο της φλεγμονής με πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του πλάσματος και β) ουσίες που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υγρό από κύτταρα που, είτε προϋπάρχουν στη μολυσμένη περιοχή, είτε έφθασαν σε αυτή κατά τη διάρκεια της φλεγμονής ^[3].

Η αλληλουχία των γεγονότων σε μια μη ειδική τοπική φλεγμονώδη αντίδραση απέναντι σε βακτήρια περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1) Την αρχική είσοδο των βακτηρίων στους ιστούς.

2) Την αγγειοδιαστολή και την αύξηση της διαπερατότητας για τις πρωτεΐνες. Μια πληθώρα μεσολαβητών προκαλεί αγγειοδιαστολή στα περισσότερα αγγεία της μικροκυκλοφορίας σε μια μολυσμένη περιοχή και/ή στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη. Η αυξημένη αιματική ροή στη φλεγμαίνουσα περιοχή ενισχύει τη μεταφορά πρωτεϊνών και λευκοκυττάρων ενώ, η αυξημένη διαπερατότητα των πρωτεϊνών εξασφαλίζει τη μεταφορά τους

από το πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό, όπου και συμμετέχουν στη φλεγμονή. Η αγγειοδιαστολή και η αύξηση της διαπερατότητας των πρωτεϊνών, προκαλούν διήθηση του πλάσματος προς το μεσοκυττάριο υγρό και οίδημα.

3) Τη χημειοταξία. Με την έναρξη της φλεγμονής, τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα περνούν από το αίμα, μέσω του ενδοθηλίου, στη φλεγμαίνουσα περιοχή, μια διαδικασία που αποτελείται από πολλά στάδια. Συμμετέχουν πολυάριθμες πρωτεΐνες και υδατάνθρακες που λειτουργούν ως μόρια προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Η όλη διαδικασία ρυθμίζεται από μηνυματοφόρα μόρια τα οποία, απελευθερώνονται από κύτταρα στην περιοχή που έχει υποστεί τη βλάβη που ονομάζονται χημειοτακτικά. Στη φλεγμαίνουσα περιοχή μεταφέρονται τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα τα οποία, κατόπιν, μετατρέπονται σε μακροφάγα. Ομάδες λευκοκυττάρων μπορούν να διεγερθούν και να εισέλθουν σε συγκεκριμένους ιστούς, σε συγκεκριμένους χρόνους κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης ανάλογα με τον τύπο των εισβολέων και της αντίδρασης των κυτταροκινών που επάγονται.

4) Την εξολόθρευση των βακτηρίων είτε από τα φαγοκύτταρα, είτε μέσω μηχανισμών που δεν βασίζονται στη φαγοκυττάρωση.

Το αρχικό βήμα της φαγοκυττάρωσης περιλαμβάνει την επαφή του φαγοκυττάρου με την επιφάνεια του μικροοργανισμού. Η φαγοκυττάρωση κατά τη διάρκεια της επαφής αυτής οφείλεται στην αλληλεπίδραση των υποδοχέων των φαγοκυττάρων με συγκεκριμένους υδατάνθρακες και λιπίδια στα κυτταρικά τοιχώματα του μικροοργανισμού. Η φαγοκυττάρωση ενισχύεται σημαντικά από κάποιους χημικούς παράγοντες που παράγονται από τον οργανισμό και μπορούν να συνδεθούν στενά με το φαγοκύτταρο και το μικροοργανισμό. Κάθε ουσία με την ιδιότητα αυτή ονομάζεται οψωνίνη. Καθώς το φαγοκύτταρο εγγολώνει το μικροοργανισμό, δημιουργείται το φαγόσωμα. Εν συνεχεία, το φαγόσωμα έρχεται σε επαφή με τα λυσοσώματα του φαγοκυττάρου, τα οποία περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα, και δημιουργείται το φαγολυσόσωμα. Στο φαγολυσόσωμα, τα μακρομόρια του μικροοργανισμού διασπώνται από τα λυσοσωματικά ένζυμα. Επιπλέον, άλλα ένζυμα στη μεμβράνη του φαγολυσοσώματος παράγουν μονοξειδίο του αζώτου και υπεροξειδίο του υδρογόνου, καθώς και άλλα προϊόντα του οξυγόνου, όλα εξαιρετικά καταστροφικά για τα μακρομόρια του μικροοργανισμού. Τα φαγοκύτταρα όμως, μπορούν να καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς και μέσω της απελευθέρωσης στο εξωκυττάριο υγρό αντιμικροβιακών ουσιών, χωρίς να προαπαιτείται φαγοκυττάρωση. Μερικές από τις ουσίες που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό λειτουργούν και ως μεσολαβητές

της φλεγμονής μέσω της θετικής ανατροφοδοτικής τους δράσης. Όταν τα φαγοκύτταρα εισέλθουν στην περιοχή της φλεγμονής και συναντήσουν τους μικροοργανισμούς, απελευθερώνονται οι μεσολαβητές της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένων και των χημειοκινών, με αποτέλεσμα να προσελκύονται περισσότερα μακροφάγα.

Έναν ακόμη τρόπο για την εξωκυττάρια εξολόθρευση των μικροοργανισμών, πέρα από τη φαγοκύτταρωση, αποτελεί η δράση του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα περιλαμβάνει μια οικογένεια πρωτεϊνών του πλάσματος, ορισμένες από τις οποίες κυκλοφορούν συνέχεια στο αίμα σε ανενεργό κατάσταση.

Το σύστημα του συμπληρώματος, που αποτελείται από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες, φέρνει σε πέρας και άλλες σημαντικές λειτουργίες της φλεγμονής καθώς επιφέρει αγγειοδιαστολή, αύξηση της διαπερατότητας στη μικροκυκλοφορία των πρωτεϊνών και χημειοταξία.

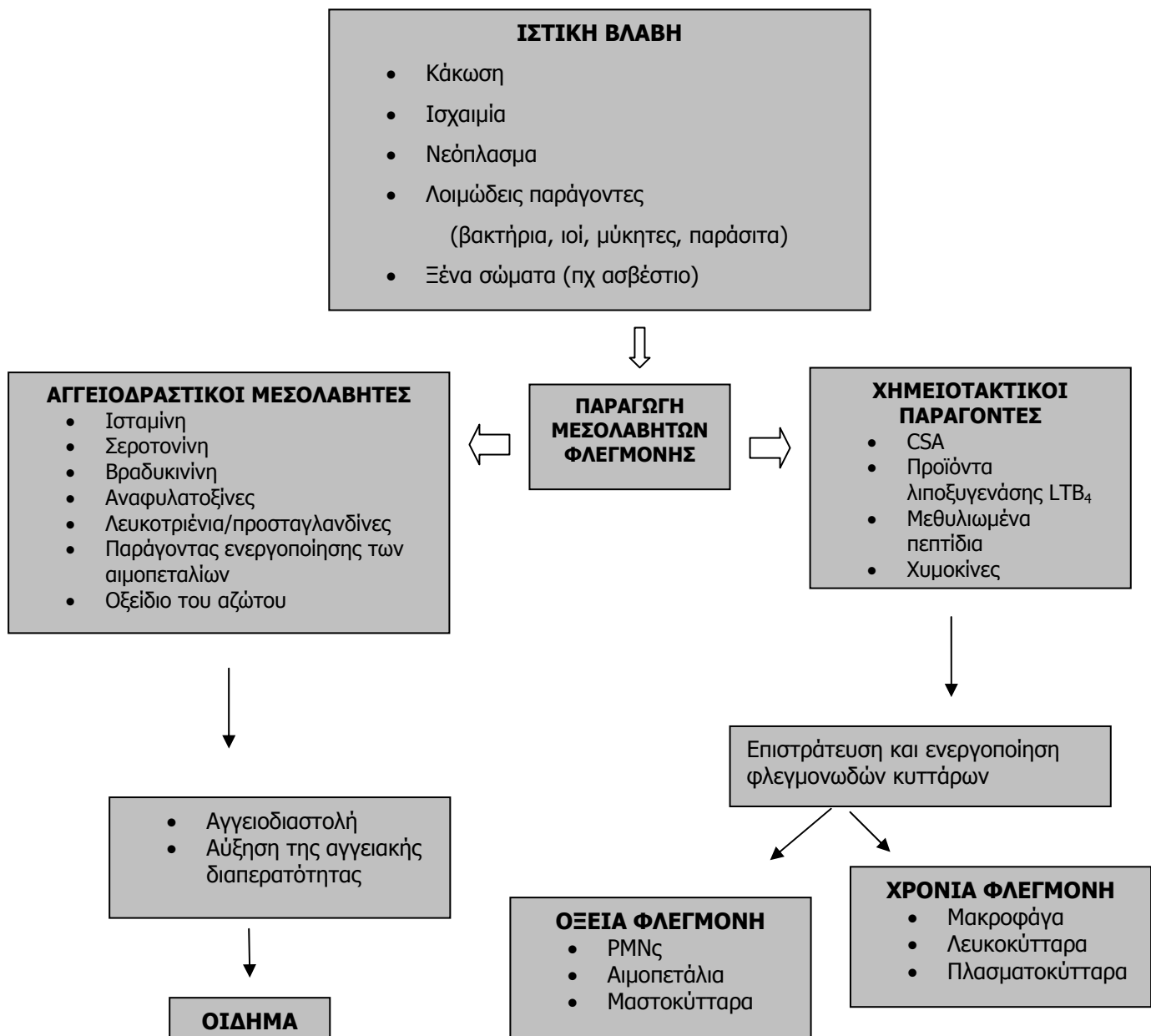
Υπάρχουν και άλλες οψωνίνες που μπορούν να συνδεθούν μη ειδικά με υδατάνθρακες ή λιπίδια στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών και να διευκολύνουν την οψωνοποίηση. Πολλές από αυτές παράγονται στο ήπαρ και βρίσκονται πάντα σε κάποια βασικά επίπεδα στο πλάσμα ενώ αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

5) Την ιστική επιδιόρθωση. Αποτελεί την τελευταία φάση της φλεγμονής. Ανάλογα με τον ιστό που έχει πληγεί, ο πολλαπλασιασμός των ειδικών, για τον ιστό, κυττάρων μέσω της κυτταρικής διαίρεσης μπορεί να συμβεί ή να μη συμβεί κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής. Σε κάθε περίπτωση, οι ινοβλάστες που εγκαθίστανται στην περιοχή διαιρούνται ταχύτατα εκκρίνοντας παράλληλα μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου, ενώ τα κύτταρα των αγγείων αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με τη διεργασία της αγγειογένεσης. Όλες οι παραπάνω δράσεις επάγονται από μια ομάδα αυξητικών παραγόντων που παράγονται τοπικά. Καθώς η διαδικασία της επούλωσης εξελίσσεται, παρατηρείται ο ιστικός επανασχεδιασμός ο οποίος όμως ενδέχεται να είναι ατελής και να αφήσει έτσι, ουλή ^[3].

1.2.2. Ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής

Οι ειδικοί μεσολαβητές της φλεγμονής που παράγονται στη θέση της βλάβης ρυθμίζουν την αντίδραση της αγγειακής κυκλοφορίας ως προς τη βλάβη (Σχήμα 1.1). μεταξύ των μεσολαβητών περιλαμβάνονται αγγειοδραστικά μόρια που δρουν απευθείας στην κυκλοφορία

αυξάνοντας την αγγειακή διαπερατότητα. Επιπλέον δημιουργούνται χημειοτακτικοί παράγοντες που επιστράτευουν λευκοκύτταρα από το αγγειακό διαμέρισμα προς τους προσβεβλημένους ιστούς. Από την στιγμή που εμφανίζονται στους ιστούς, τα κινητοποιημένα λευκοκύτταρα εκκρίνουν επιπρόσθετους φλεγμονώδεις μεσολαβητές που είτε επιτείνουν είτε αναστέλλουν τη φλεγμονώδη αντίδραση (Σχήμα 1.1) ^[4].

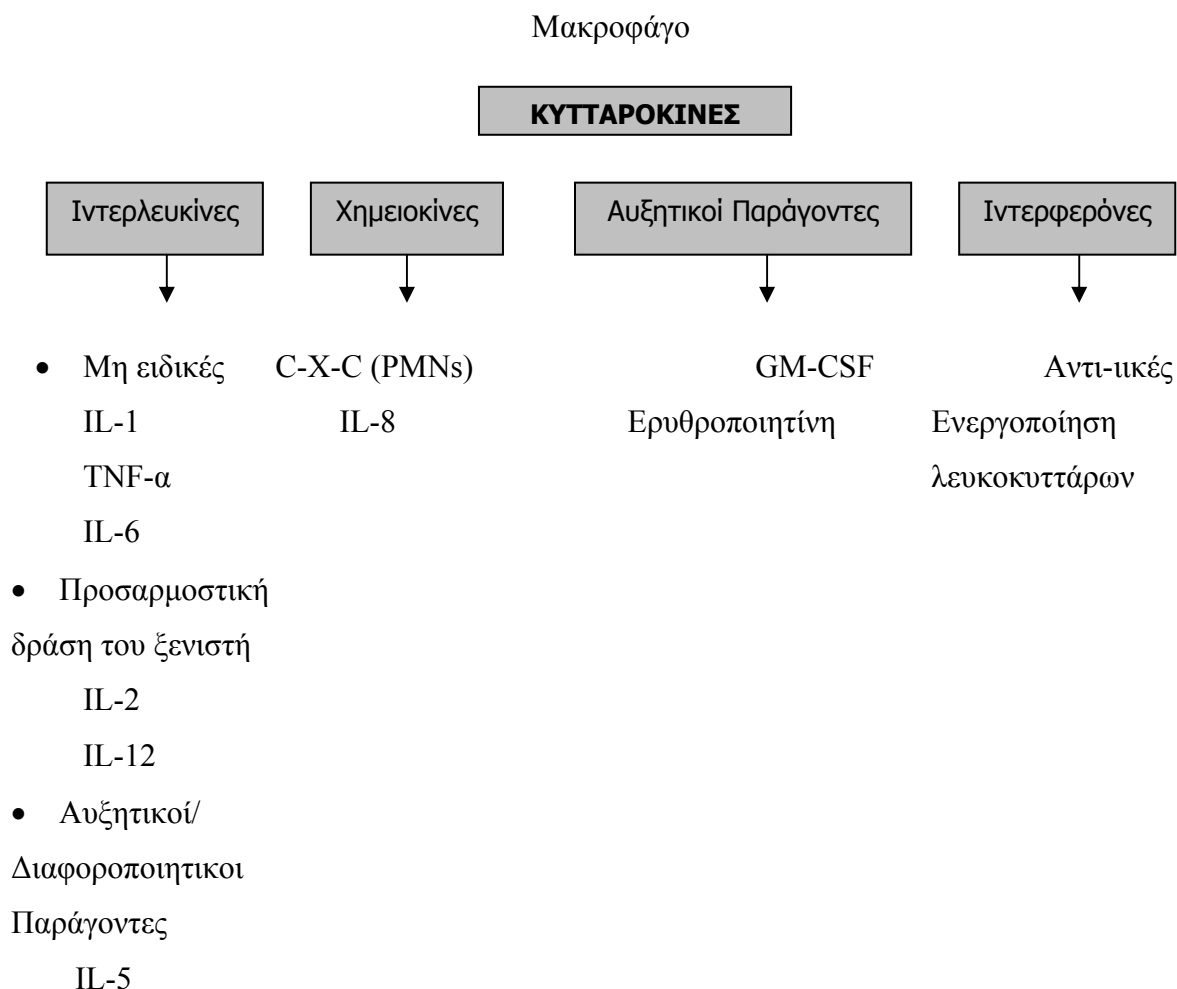


Σχήμα 1.1. Μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης ^[4].

1.2.3. Αλληλεπίδραση των κυτταροκινών στα πλαίσια της φλεγμονής

Η επιστράτευση των φλεγμονωδών κυττάρων στα σημεία της ιστικής βλάβης γίνεται μέσω ενός επικοινωνιακού δικτύου μεταξύ των κυττάρων (Σχήμα 1.2.). Αυτή η επικοινωνία επηρεάζεται τόσο από την άμεση κυτταρική επαφή όσο και από τη σύνδεση των κυτταροκινών

πάνω στα κύτταρα στόχους. Επιπλέον, η έκφραση συγκεκριμένων κατηγοριών πρωτεϊνών προσκόλλησης πάνω στα κύτταρα ρυθμίζεται από κυτταροκίνες που παράγονται στις θέσεις της φλεγμονής. Η επιστράτευση των ουδετερόφιλων στις θέσεις της βακτηριακής λοίμωξης αποτελεί παράδειγμα αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών προσκόλλησης, κυτταροκινών και φλεγμονωδών κυττάρων στις θέσεις της ιστικής βλάβης ^[4].



Σχήμα 1.2. Δράσεις των κυτταροκινών^[4].

Κατά τα αρχικά στάδια της βακτηριακής λοίμωξης παράγονται χημειοτακτικά πεπτίδια και δημιουργείται ο C5a ως απάντηση στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τους μικρο-οργανισμούς. Κάθε μια από τις ενώσεις αυτές αποτελεί έναν ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τα ουδετερόφιλα. Επιπρόσθετα, άλλα προϊόντα των βακτηρίων, όπως η ενδοτοξίνη, ενεργοποιούν τα ιστικά μακροφάγα προς παραγωγή IL-8, χημειοτακτικών μορίων των μακροφάγων και άλλων κυτταροκινών όπως TNF-α και IL-1.

Η IL-1 και ο TNF-α διεγείρουν μια πληθώρα κυτταρικών τύπων, μεταξύ των οποίων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και την παραγωγή χημειοτακτικών κυτταροκινών. Η μέγιστη έκκριση αυτών των χημειοτακτικών πεπτιδίων απαιτεί αρκετές ώρες σε αντίθεση με την ταχεία ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη δημιουργία του C5a ^[4].

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, θεωρείται πως η αρχική επιστράτευση των ουδετερόφιλων στις θέσεις ιστικής βλάβης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δημιουργία του C5a, ενώ η παρατεταμένη κινητοποίησή τους από 6 έως 48 ώρες μετά τη βλάβη επάγεται από την παραγωγή των χημειοτακτικών κυτταροκινών ^[4].

Πίνακας 1.2. Μερικοί σημαντικοί τοπικοί μεσολαβητές της φλεγμονής ^[3].

Μεσολαβητής	Προέλευση
Κινίνες	Παράγονται μετά από ενζυμική δράση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Συμπλήρωμα	Παράγεται μετά από ενζυμική δράση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Παράγοντες πήξης	Παράγονται μετά από ενζυμική δράση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος
Ισταμίνη	Εκκρίνεται από τα mastοκύτταρα
Εικοσανοειδή	Εκκρίνονται από μια πληθώρα κυττάρων
Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	Εκκρίνεται από μια πληθώρα κυττάρων
Κυτταροκίνες (περιλαμβανομένων και των χημειοκινών)	Εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και από πολλούς τύπους κυττάρων που δεν ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε αυτά τα κύτταρα συμπεριλαμβάνονται και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες.
Λυσοσωμικά ένζυμα, οξείδιο του αζώτου και άλλα παράγωγα του οξυγόνου	Εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα

2. Νεφρός-Μεσαγγειακά Κύτταρα

2.1. Γενικά

Με τα όργανα του ουροποιητικού συστήματος γίνεται η απέκκριση και η αποβολή των άχρηστων και επιβλαβών προϊόντων της ανταλλαγής της ύλης από τον οργανισμό. Το σύστημα αυτό έχει δυο μοίρες, την εκκριτική, που αποτελείται από τους δυο νεφρούς και με την οποία γίνεται η απέκκριση των ούρων και την αποχετευτική, με την οποία τα ούρα φέρονται έξω από τον οργανισμό. Με τους νεφρούς συνδέονται στενά και τα επινεφρίδια, τα οποία όμως δεν έχουν καμία λειτουργική σχέση με αυτούς ^[3]. Οι βασικές λειτουργίες των νεφρών παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.1. ^[4].

2.2. Λειτουργίες των νεφρών

Στις ομοιοστατικές λειτουργίες του νεφρού περιλαμβάνονται η ρύθμιση του νερού, της οξεοβασικής ισορροπίας και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών, η απέκκριση των άχρηστων ουσιών, η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, η νεφρική ορμονική ρύθμιση και η ομοιόσταση της γλυκόζης ^[5].

2.2.1. Η ρύθμιση του νερού, της οξεοβασικής ισορροπίας και του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών

Ο νεφρός είναι υπεύθυνος για την αποβολή της περίσσειας των προσλαμβανόμενων υγρών και διαλυτών ουσιών. Οι συχνότερες διαταραχές ισορροπίας αφορούν στη φυσιολογία του νατρίου, του καλίου, του νερού και της οξεοβασικής ισορροπίας ^[5].

Ο νεφρός παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο ισοζύγιο και άλλων ηλεκτρολυτών, όπως του ασβεστίου. Η επαναρρόφηση του ασβεστίου από το πειραματικό υπερδιήθημα συμβάλλει στη ρύθμιση του ισοζυγίου του ασβεστίου του οργανισμού ^[5].

2.2.2. Η απέκκριση των άχρηστων ουσιών

Ο νεφρός είναι υπεύθυνος για την αποβολή των αζωτούχων προϊόντων του καταβολισμού των λευκωμάτων, η οποία επιτυγχάνεται κυρίως με διήθηση στο νεφρικό σπείραμα. Επειδή οι απαιτήσεις της ομοιόστασης καθιστούν απαραίτητη τη διατήρηση χαμηλών

των συγκεντρώσεων αυτών των τοξικών ουσιών, για να απεκκριθεί η απόλυτη ποσότητά τους είναι αναγκαίος ο σχηματισμός πολύ μεγάλων όγκων υπερδιηθήματος ^[5].

Ένα δεύτερο μηχανισμό εξόδου των διαλυτών ουσιών στα ούρα αποτελεί η απέκκρισή τους από το νεφρικό σωληνάριο. Με τον τρόπο αυτό απεκκρίνονται διάφορα οργανικά οξέα (όπως το ουρικό και το γαλακτικό) καθώς και διάφορες οργανικές βάσεις (όπως η κρεατινίνη) ^[5].

Τέλος, ο νεφρός συμμετέχει στη μεταβολική αποσύνθεση ορισμένων πεπτιδικών ορμονών όπως εκείνων της υπόφυσης, τη γλυκαγόνη και την ινσουλίνη μέσω της διήθησής τους στο νεφρικό σπείραμα και τον καταβολισμό τους από τα κύτταρα του νεφρικού σωληναρίου ^[5].

2.2.3. Η ρύθμιση της πίεσης του αίματος

Σε ορισμένες περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπέρτασης, η κύρια αιτία μπορεί να οφείλεται σε ελάττωση της απέκκρισης νατρίου από το νεφρό με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου. Ως απόκριση στην κατακράτηση νατρίου απελευθερώνονται νατριουρητικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην αγγειοσυστολή και ευνοώντας την ανάπτυξη υπέρτασης. Τέλος, η πίεση του αίματος ρυθμίζεται με την απελευθέρωση ρενίνης η οποία επάγει την απελευθέρωση αγγειοτασίνης II ^[5].

2.2.4. Η νεφρική ορμονική ρύθμιση

Ο νεφρός αποτελεί το κύριο όργανο παραγωγής της ερυθροποιητίνης, της ορμόνης που διεγείρει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων επιδρώντας στο μυελό των οστών. Επιπλέον, ο νεφρός συμμετέχει στην ομοιοστάση του ασβεστίου όχι μόνο ρυθμίζοντας άμεσα την απέκκρισή του, αλλά και επηρεάζοντας την παραγωγή ορμονών. Τέλος, τα παρασπειραματικά κύτταρα, παράγουν και εκκρίνουν τη ρενίνη, η οποία επάγει τον σχηματισμό της αγγειοτασίνης II που επάγει με τη σειρά της την παραγωγή της αλδοστερόνης και προκαλεί αγγειοσυστολή. Η αλδοστερόνη διεγείρει τη νεφρική απορρόφηση του νατρίου και την απέκκριση του καλίου και των ιόντων υδρογόνου ^[5].

2.2.5. Η ομοιόσταση της γλυκόζης

Στο νεφρό λαμβάνει χώρα η νεογλυκογένεση σύμφωνα με την οποία συντίθεται γλυκόζη από γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ και αμινοξέα. Η λειτουργία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε καταστάσεις παρατεταμένης νηστείας όπου μέχρι και το 40% της γλυκόζης του πλάσματος προέρχεται από τη νεφρική νεογλυκογένεση ^[5].

Πίνακας 2.1. Νεφρικές Λειτουργίες ^[4].

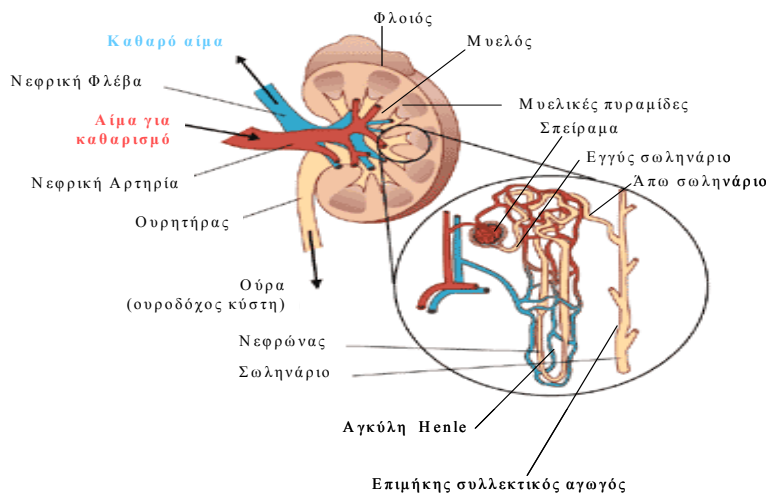
-
1. Ρύθμιση ισοζυγίου ύδατος και ανόργανων ιόντων.
 2. Απομάκρυνση των μεταβολικών παραπροϊόντων από το αίμα και απέκκρισή τους στα ούρα.
 3. Απομάκρυνση των ξένων χημικών ουσιών από το αίμα και απέκκρισή τους στα ούρα.
 4. Γλυκονεογένεση.
 5. Έκκριση ορμονών:
 - α. ερυθροποιητίνη (παραγωγή ερυθροκυττάρων)
 - β. ρενίνη (σχηματισμός αγγειοτενσίνης)
 - γ. 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D₃ (ισοζύγιο ασβεστίου)
-

2.3. Δομή των νεφρών

Οι δυο νεφροί κείνται στο στο πίσω μέρος του κοιλιακού τοιχώματος, χωρίς όμως να εμπεριέχονται στην κοιλιακή χώρα, και βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, δεξιά και αριστερά από την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Το βάρος του νεφρού ανέρχεται στον άνδρα σε 150-175 γρ και στην γυναίκα σε 120-150 γρ. ο αριστερός νεφρός είναι πιο βαρύτερος από το δεξιό ^[5].

Κάθε νεφρός περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από: 1) ένα αρχικό διηθητικό σωματίδιο, το νεφρικό σωματίο και 2) ένα σωληνάριο που αποτελεί φυσική προέκταση του νεφρικού σωματίου. Κάθε νεφρικό σωματίο περιέχει ένα θύσανο αλληλοσυνδεδεμένων τριχοειδών βρόχων, ο οποίος ονομάζεται νεφρικό σπείραμα ή σπειραματικά τριχοειδή και το οποίο θηλυκώνει μέσα σε μια κάψουλα γεμάτη υγρό, την κάψα του Bowman. Το μέρος της κάψας το οποίο βρίσκεται σε επαφή με το σπείραμα, υποχωρεί προς τα μέσα χωρίς να έρχεται σε επαφή με το απέναντι χιτώνιο της κάψας. Έτσι δημιουργείται ένας

χώρος γεμάτος με υγρό, ο χώρος του Bowman ή καψική κοιλότητα. Το αίμα του σπειράματος διαχωρίζεται από το χώρο του Bowman από ένα φραγμό διήθησης που αποτελείται από τρεις επιφάνειες: α) το μονοστιβαδικό ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων, β) την ανώτερη πρωτεϊνική βασική μεμβράνη και γ) το το μονοστιβαδικό επιθηλιακό υμένα της κάψας του Bowman. Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα ονομάζονται ποδοκύτταρα. Το τμήμα του σωληναρίου στο



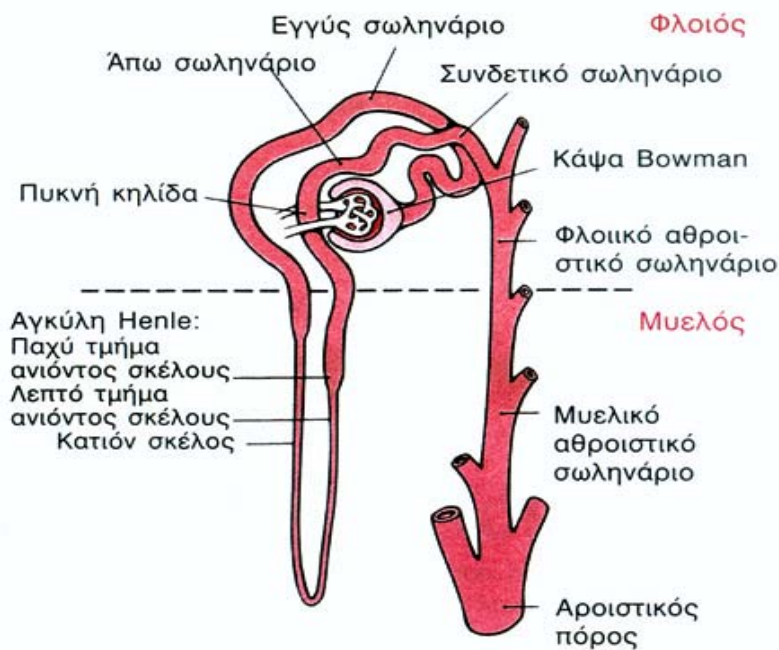
Σχήμα 2.1. Απεικόνιση της δομής του νεφρού [5].

οποίο εισρέει το υγρό από την κάψα του Bowman ονομάζεται εγγύς σωληνάριο και αποτελείται από το εγγύς εσπειραμένο και το εγγύς ευθύ σωληνάριο. Ακολουθεί η καμπύλη του Henle αποτελούμενη από ένα κατιόν σκέλος, το οποίο προέρχεται από το εγγύς σωληνάριο και ένα ανιόν σκέλος το οποίο οδηγεί στο επόμενο μέρος του νεφρώνα, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Μέσω αυτού, τα ενδοσωληναριακά υγρά ρέουν μέσα στο σύστημα των αθροιστικών πόρων. Ακολούθως, οι πολλαπλοί φλοιώδεις αθροιστικοί πόροι συγχωνεύονται διοχετεύοντας τα σχηματιζόμενα ούρα στην κεντρική νεφρική κοιλότητα, τη νεφρική πύελο, την οποία ακολουθεί ο αποχετευτικός ουρητήρας του κάθε νεφρού [4].

2.4. Μεσάγγειο-Μεσαγγειακά κύτταρα

2.4.1. Γενικά

Οι σπειραματικοί θύσανοι είναι αναρτημένοι μέσα στην ουροφόρο κοιλότητα της κάψας του Bowman σε ένα δίκτυο γνωστό ως μεσάγγειο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα



Σχήμα 2.2. Ο νεφρώνας με τα βασικά αγγειακά στοιχεία του ^[5].

περιβάλλονται από θεμέλια ουσία αποτελούμενη από ομοιογενές ινώδες υλικό. Μεταξύ του τριχοειδικού ενδοθηλίου και των μεσαγγειακών κυττάρων, δεν παρεμβάλλεται βασική μεμβράνη. Η διάταξη αυτή επιτρέπει την εύκολη είσοδο προϊόντων του πλάσματος και την αλληλεπίδραση με τα φλεγμονώδη κύτταρα ^[5].

Συνεπώς, εκτός από τα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα, υπάρχει και ένας τρίτος τύπος κυττάρων, τα μεσαγγειακά κύτταρα τα οποία αποτελούν τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτά, περιβάλλουν τους βρόγχους των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος, χωρίς όμως να παρεμβάλλονται στη διηθητική οδό ^[4]. Τα κύτταρα αυτά είναι τα σημαντικότερα μεταξύ των υπολοίπων καθώς εμπλέκονται σε διάφορα είδη σπειραματικών τραυματισμών ^[6].

2.4.2. Ρόλος των μεσαγγειακών κυττάρων στη λειτουργία του σπειράματος

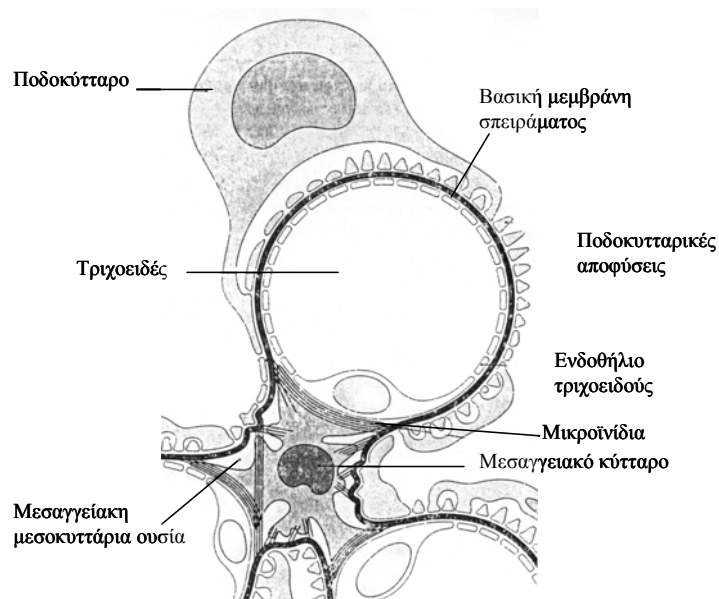
Στους ενδεχόμενους ρόλους των μεσαγγειακών κυττάρων συμπεριλαμβάνονται: α) η δομική υποστήριξη του σπειράματος, ιδιαίτερα των βρόγχων των τριχοειδών αγγείων, β) η παραγωγή και η αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (που αποτελείται από κολλαγόνο και γλυκοπρωτεΐνες και εκκρίνεται από αυτά υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων [TGFβ, PDGF-platelet derived growth factor] με αποτέλεσμα η διαδικασία αυτή να συμβάλλει στην αύξηση του πάχους της βασικής μεμβράνης του σπειράματος και να αποτελεί σημαντικό παράγοντα της παθογένειας διαφόρων σπειραματοπαθειών, γ) αποτελούν στόχο

αγγειοδραστικών παραγόντων όπως: (i) αγγειοσυσταλτικοί παράγοντες λ.χ. αγγειοτενσίνη II, ενδοθηλίνη, βασοπρεσσίνη και νορεπινεφρίνη, (ii) αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες λ.χ. atriopeptin, νιτρικό οξύ, προσταγλανδίνες E_2 και I_2 και ντοπαμίνη, δ) αποτελούν στόχο μεσολαβητών φλεγμονής, αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών με επίδραση στην αιμοδυναμική, την ανάπτυξη των κυττάρων και την αναδιοργάνωση του πυρήνα, ε) αποτελούν τόπο παραγωγής αγγειοδραστικών μεσολαβητών και παραγόντων καθοριστικών για την ανάπτυξη, όπως οι προσταγλανδίνες, τα θρομβοξάνια, τα προϊόντα της λιπο-οξυγενάσης, ο PAF κτλ, στ) αποτελούν τόπο παραγωγής διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης και κυτταροκινών όπως, η IL-1, ο TGF- β κτλ, ζ) η έκφραση χυμοκινών και μορίων προσκόλλησης, η) η έκφραση του ενεργοποιητή και του αναστολέα του πλασμινογόνου και θ) η ρύθμιση της σύνθεσης μακρομορίων όπως τα λιπίδια, ενώσεις του ανοσοποιητικού και παραπροϊόντα του μεταβολισμού [5, 7].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα συμμετέχουν στη δομική και τη λειτουργική ακεραιότητα του σπειράματος. Είναι σημαντικά για το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος καθώς, συμμετέχουν στην παραγωγή και τη διατήρηση των βρόγχων των σπειραματικών τριχοειδών. Η έλλειψη των κυττάρων αυτών επάγει τον σχηματισμό ενδοσπειραματικών αγγειακών σάκων, αντί για το φυσιολογικό τριχοειδικό δίκτυο. Επιπλέον, το μεσάγγειο μπορεί να επιφέρει τροποποίηση της σπειραματικής διήθησης. Συγκεκριμένα, το μεσάγγειο συμβάλλει σημαντικά στις μεταβολές της ενδοσπειραματικής πίεσης των τριχοειδών ενώ επηρεάζει την αιματική ροή δια μέσου του κάθε τριχοειδικού βρόχου τροποποιώντας με τον τρόπο αυτό την αποτελεσματική διηθητική περιοχή των τριχοειδών [7].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα συνδέονται στενά και με τον σπειραματικό τραυματισμό. Το μεσάγγειο εκτίθεται σε μια πληθώρα μακρομορίων εξαιτίας της δυνατότητας πρόσβασης στο σπειραματικό αγγειακό ενδοθήλιο και της απουσίας βασικής μεμβράνης μεταξύ του αυλού του τριχοειδούς και του μεσαγγείου. Τα μακρομόρια αυτά αποικοδομούνται από τα μεσαγγειακά κύτταρα είτε χωρίς συνέπειες είτε ενεργοποιώντας τα κύτταρα επιφέροντας, με τον τρόπο αυτό, σπειραματικό τραυματισμό- φλεγμονή [7].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους στοιχεία ακτίνης-μυοσίνης που τους προσδίδουν συσταλτική ιδιότητα. Η συστολή των μεσαγγειακών κυττάρων επιφέρει τροποποίηση του εμβαδού της επιφάνειας διήθησης με αποτέλεσμα την ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης [5].



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση του σπειραματικού λοβού. Φαίνεται ένα τριχοειδές και η τοποθεσία του μεσάγγειου (μεσαγγειακό κύτταρο και μεσαγγειακή μεσοκυττάρια ουσία) [6].

Επιπλέον, σημαντική λειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων αποτελεί η παραγωγή και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν και φαγοκυτταρικές ιδιότητες [5].

2.4.3. Ρύθμιση των μεσαγγειακών κυττάρων

2.4.3.1. Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων

Η ρύθμιση της ηρεμίας, της ανάπτυξης και του θανάτου των μεσαγγειακών κυττάρων επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη δομή και τη λειτουργία του σπειράματος στους υγιείς και νοσούντες νεφρούς. Κάποιους από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς αποτελούν συγκεκριμένοι, υδατοδιαλυτοί ή όχι, εξωκυττάριοι παράγοντες σε συνδυασμό με ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα σημάτων επαγόμενων από ειδικούς υποδοχείς τα οποία ελέγχουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ή του κυτταρικού θανάτου [8].

Ο μιτωτικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων ελέγχεται από ένα σύνολο σημείων ελέγχου των οποίων η σειρά καθορίζεται από τις CDKs. Αυτές δρουν σε συνδυασμό με τις ρυθμιστικές τους υπομονάδες, τις κυκλίνες. Οι αναστολείς των κινασών κυκλίνης αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλοντας τον σχηματισμό ή την

ενεργοποίηση των ενώσεων των κυκλινών. Από *in vivo* και *in vitro* μελέτες, έχει βρεθεί ότι μια πληθώρα εξωκυττάρων παραγόντων ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων κυτταροκινών, αυτακοειδών, ορμονών καθώς επίσης και διαφόρων μη υδατοδιαλυτών εξωκυτταρικών μορίων. Ο TGF- β αποτελεί έναν ενδογενή αναστολέα της ανάπτυξης, με την ικανότητα να αναστέλλει τη μιτωτική διεργασία των μεσαγγειακών κυττάρων, εκκρίνεται από τα ίδια τα μεσαγγειακά κύτταρα και δρα αυτοκρινικά ^[8].

Η συμπεριφορά των μεσαγγειακών κυττάρων καθορίζεται και από τη σύσταση της εξωκυττάριας ύλης. Μεταβολές της ποσότητας αλλά και της σύστασης της εξωκυττάριας ύλης του μεσαγγείου επηρεάζει άμεσα τη βιολογία του και αντίστροφα, οι μεταβολές της ενεργοποίησης του μεσαγγείου μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση της εξωκυττάριας ύλης ^[8].

2.4.3.2. Ρύθμιση της λειτουργικότητας των μεσαγγειακών κυττάρων

Σύμφωνα με ερευνητικά ευρήματα, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών βρέθηκε ότι καθορίζεται από κυτταροκίνες, αγγειοδραστικά πεπτίδια και αυτακοειδή τα οποία επάγουν τον πολλαπλασιασμό τους καθώς και την εναπόθεση της εξωκυττάριας ύλης μέσα στο σπείραμα. Ως επιβλαβείς παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί η αγγειοτενσίνη II, ο TGF- β , ο PDGF και άλλα μόρια. Περιορισμένος είναι ο αριθμός των παραγόντων που έχουν βρεθεί ότι ανταγωνίζονται την επιβλαβή αυτή δράση των παραπάνω μορίων. Συνεπώς, έμφαση έχει δοθεί στα νατριουρητικά πεπτίδια, το νιτρικό οξείδιο, τις αγγειοδιασταλτικές προσταγλανδίνες και την αδενοσίνη καθώς ενδεχομένως να αποτελούν θεραπευτικά μηνυματοφόρα συστατικά στην προοδευτική σπειραματική νόσο. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αυτό περιλαμβάνουν κυρίως την αναστολή του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων, την ενίσχυση της κυτταρικής ηρεμίας, της μετανάστευσης και της απόπτωσης ^[6].

3. Νεφρική φλεγμονή – Σπειραματοσκλήρυνση

3.1. Εισαγωγή

Ποικίλλα αίτια, ανοσολογικά, μεταβολικά, τοξικά, λοιμώδη, αιμοδυναμικά, συγγενή ή κληρονομικά κ.α. μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους νεφρούς και επομένως μείωση των δομικών μονάδων αυτών, δηλαδή των νεφρώνων. Ωστόσο, ακόμη και σε περίπτωση που οι μηχανισμοί για την πρωτοπαθή νεφρική βλάβη εκλείψουν, διάφοροι άλλοι δευτεροπαθείς μηχανισμοί (συστηματική και ενδοσπειραματική υπέρταση, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, λευκωματουρία, αυξημένη πρόσληψη λευκωμάτων και φωσφόρου, υπερλιπιδαιμία, αλλοιώσεις του ενδοσπειραματικού χώρου και η ενδοσπειραματική ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης) οδηγούν σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των νεφρώνων, η οποία επιφέρει σταδιακή πτώση και επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Συμπερασματικά, με την επίδραση των δευτεροπαθών μηχανισμών εξέλιξης της νεφρικής βλάβης, καταστρέφεται δομικά ο νεφρός και οδεύει προς την τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ανεξάρτητα από τον αρχικό αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης της νεφρικής βλάβης ^[9].

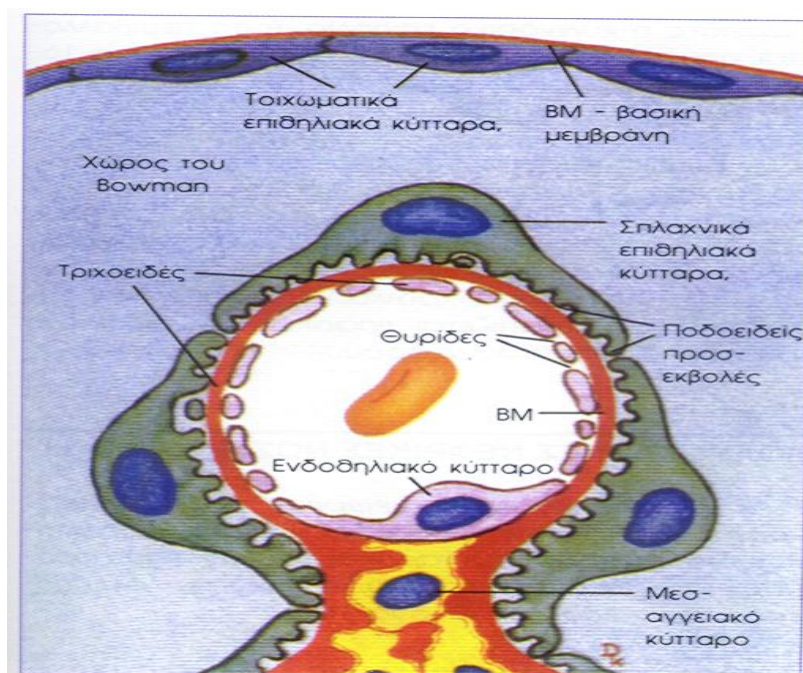
3.2. Ταξινόμηση

Οι νεφροπάθειες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση, είτε την εντόπιση της διαταραχής (π.χ. σπειραματοπάθεια), είτε τη φύση των παραγόντων που προκαλούν τη διαταραχή (π.χ. μεταβολικοί, ανοσολογικοί) ^[10].

Οι σπειραματοπάθειες ταξινομούνται περαιτέρω με βάση την κλινική εικόνα. Συγκεκριμένα, κάποιες διαταραχές εκδηλώνονται με σημαντικού βαθμού λευκωματουρία χωρίς στοιχεία κυτταρικού τύπου φλεγμονώδους αντίδρασης ενώ άλλες εκδηλώνονται με διαφόρου βαθμού λευκωματουρία η οποία συνοδεύεται όμως από την παρουσία ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων στα ούρα ^[10].

3.3. Παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν στην σπειραματοπάθεια

Αρκετές παθολογικές καταστάσεις προκαλούν δομικές αλλοιώσεις του σπειράματος και εκδηλώνονται σε συνδυασμό με την αιματουρία, τη λευκωματουρία, τη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) και την αρτηριακή υπέρταση ^[10].



Σχήμα 3.1. Το φυσιολογικό νεφρικό σπείραμα. Η εξωτερική επιφάνεια της βασικής μεμβράνης καλύπτεται εξ' ολοκλήρου από επιθηλιακές ποδοειδείς προσεκβολές. Τα εξωτερικά τμήματα του ενδοθηλιακού κυττάρου που επαλείφουν τον τριχοειδικό αυλό βρίσκονται σε επαφή με την εσωτερική επιφάνεια της βασικής μεμβράνης, ενώ το κεντρικό τμήμα έρχεται σε επαφή με το μεσαγγειακό κύτταρο του στελέχους ^[4].

Οι παθολογικές καταστάσεις που καταλήγουν στην σπειραματοπάθεια κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες:

A) Οξεία σπειραματονεφρίτιδα, η οποία εμφανίζεται κατά κανόνα στα πλαίσια κάποιας λοίμωξης. Παρατηρείται αιφνίδια εγκατάσταση αιματουρίας και πρωτεϊνουρίας με μείωση του GFR και κατακράτηση αλατος και ύδατος. Η πλήρης αποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας είναι εφικτή.

Αποτελεί επακόλουθο της ανοσολογικής αντίδρασης ενάντια σε κάποιον λοιμογόνου παράγοντα κατά την οποία λαμβάνει χώρα διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ του αντιγόνου του λοιμογόνου παράγοντα με κάποιο αντιγόνο του ανθρώπου και έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων και συμπληρώματος στα τριχοειδή του σπειράματος και το μεσάγγειο.

B) Ταχέως εξελισσόμενη (υποξεία) σπειραματονεφρίτιδα, η οποία καταλήγει σε μη αντιστρεπτή και πλήρη νεφρική ανεπάρκεια εντός μερικών εβδομάδων ή μηνών.

Χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η εξωτριχοειδική κυτταρική υπερπλασία ενώ συχνά παρατηρείται και λύση της συνέχειας της βασικής μεμβράνης των σπειραμάτων.

Γ) Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα, κατά την οποία η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, μετά το επεισόδιο της οξείας σπειραματονεφρίτιδας, εξελίσσεται με αργό ρυθμό ώστε να καταλήγει μετά από χρόνια σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Τα ακριβή αίτια δεν είναι ακόμη γνωστά.

Συχνά παρατηρείται υπερτροφία των κυττάρων είτε του μεσαγγείου, είτε των τριχοειδών ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται απόφραξη των σπειραμάτων.

Δ) Νεφρωσικό σύνδρομο, που μπορεί να αποτελεί μεμονωμένη εκδήλωση ή εκδήλωση κάποιου άλλου κλινικού συνδρόμου των σπειραμάτων. Χαρακτηρίζεται από βαριά πρωτεϊνουρία, υπολευκωματιναιμία, περιφερικά οιδήματα, υπερλιπιδαιμία και παρουσία λιποειδών σωματίων στα ούρα.

Ε) Ασυμπτωματικές διαταραχές από το ίζημα των ούρων, περιλαμβάνουν αιματουρία και λευκωματουρία χωρίς όμως την παρουσία λειτουργικών διαταραχών ^[10].

3.4. Ρόλος κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης

Οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες είναι πολυπεπίδια που παράγονται από ενδογενή νεφρικά κύτταρα όπως τα μεσαγγειακά, τα ενδοθηλιακά, τα σωληναριακά επιθήλια και οι ινοβλάστες καθώς και από κύτταρα αιματογενούς προέλευσης όπως τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα. Τα πολυπεπίδια αυτά, διηθούν το νεφρό αποτελώντας σημαντικότετους χυμικούς μεσολαβητές που εμπλέκονται στην παθογένεια της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης.

Οι μεσολαβητές αυτοί έχουν παρακρινική και αυτοκρινική δράση ενώ επιδρούν και σε απομακρυσμένα κύτταρα και όργανα στόχους. Η δράση τους επιτυγχάνεται μέσω ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων με υψηλή συγγένεια για αυτούς ^[11].

Τους πλέον σημαντικούς χημειοτακτικούς μεσολαβητές αποτελούν ο TNFα και η IL-1 (από τις κυτταροκίνες) και ο TGF και ο PDGF (από τους αυξητικούς παράγοντες). Επίσης, στο σπείραμα εκφράζονται και άλλοι παράγοντες όπως η ενδοθηλίνη, καθώς και φλεγμονώδεις

παράγοντες όπως τα εικοσανοειδή, ο PAF, χυμοκίνες και προερχόμενοι από λιπίδια χημειοτακτικοί παράγοντες ^[12]. Ο ρόλος τους έγκειται στην πολύπλευρη δράση τους ως μεταφραστές των αιμοδυναμικών και μεταβολικών μεταβολών στις υπερπλαστικές και υπερτροφικές απαντήσεις των νεφρικών κυττάρων (σπειραματικών, σωληναριακών και διαμέσων), και στην αυξημένη παραγωγή και άθροιση της εξωκυττάριας ουσίας και στην σπειραματοσκλήρυνση ^[11].

Ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω παραγόντων περιλαμβάνει την έξοδό τους από το σπείραμα μέσω διάχυσης στην κάψα του Bowman, περνώντας μέσα στο υπερδιήθημα, μέσω του αντίστοιχου αρτηριολίου, μέσω των μεσαγγειακών καναλιών στο εξωσπειραματικό μεσάγγειο όπου και εισέρχονται στο απαγωγό αρτηριόλιο, στο λεμφικό σύστημα ή στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Έπειτα, οι προερχόμενοι από το σπείραμα μεσολαβητές, αλληλεπιδρούν με το περισωληναριακό αγγειακό ενδοθήλιο, τα σωληναριακά κύτταρα και τους ινοβλάστες του διάμεσου ιστού και επάγουν την τοπική απελευθέρωση χυμοτακτικών παραγόντων καθώς και την έκφραση πρωτεϊνών προσκόλλησης των λευκοκυττάρων. Συνεπώς, προκαλείται συσσώρευση μονοκυττάρων- μακροφάγων και λεμφοκυττάρων. Τελικά, τα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν κυτταροκίνες όπως ο PDGF, ο TGFβ και ο bFGF οι οποίοι ενεργοποιούν την παραγόμενη από κύτταρα του διάμεσου ιστού (όπως ινοβλάστες) εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με αποτέλεσμα την ίνωση του διάμεσου ιστού ^[12].

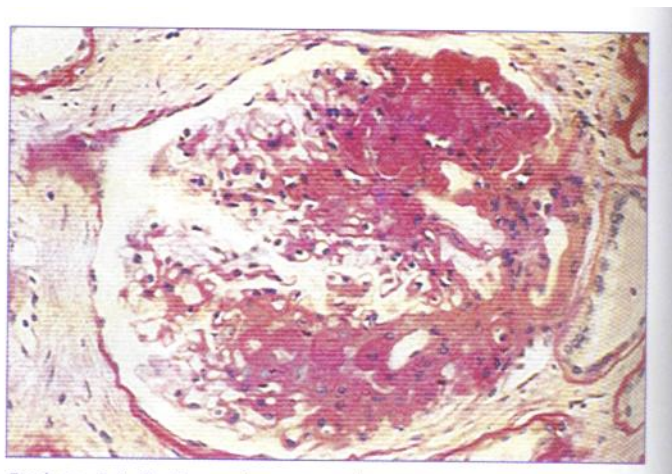
3.5. Πιθανοί μηχανισμοί εξέλιξης της νεφρικής βλάβης

Μέχρι πρόσφατα, η εξελισσόμενη νεφρική βλάβη, κατά την πορεία της προς τη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου χαρακτηριζόταν, σε παθολογοανατομικό επίπεδο, από δυο κύριες διεργασίες. Η πρώτη (ενδογενής μηχανισμός) αφορά στην απόφραξη των σπειραμάτων από τον συνεχώς αυξανόμενο αριθμό των κυττάρων (μεσαγγειακά και μακροφάγα) και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (υλικό που στη σύνθεσή του περιλαμβάνει κολλαγόνο τύπου IV και V, ινονεκτίνη, λαμνίνη, θειϊκή πρωταμίνη και πρωτεογλυκάνες θειϊκής χονδροϊτίνης). Δηλαδή, η σπειραματοσκλήρυνση αποτελεί απόρροια αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διηθητικών και των κυττάρων του σπειράματος. Η δεύτερη διεργασία (εξωγενής μηχανισμός) αφορά στον εξωσπειραματικό σωληναροδιάμεσο χώρο –ΣΔΧ- και περιλαμβάνει τη διήθηση αυτού από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, τον πολλαπλασιασμό των διαμέσων ινοβλαστών, την άθροιση του συνδετικού ιστού και τέλος, την ατροφία και την ουλοποίηση των ουροφόρων σωληναρίων. Δηλαδή, οι σωληναριακοί ινοβλάστες διηθούν το σπείραμα και συμβάλλουν στην ίνωσή του ^[9, 11].

3.6. Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση

Η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση αναφέρεται σε μία νόσο στην οποία μερικά (εστιακή) σπειράματα παρουσιάζουν ορισμένες περιοχές σκλήρυνσης (τμηματική) στον τριχοειδικό θύσανο, ενώ άλλα είναι φυσιολογικά ^[4].

Μια από τις αιτίες στις οποίες μπορεί να οφείλεται η εστιακή σπειραματοσκλήρυνση αποτελεί η ελαττωμένη νεφρική μάζα. Η ολική τριχοειδική επιφάνεια που παρέχεται για για σπειραματική διήθηση είναι εξαιρετικά ελαττωμένη. Ως αποτέλεσμα αυτού, η αυξημένη σπειραματική τριχοειδική πίεση και διήθηση βλάπτει τα κύτταρα του σπειράματος και οδηγεί σε τριχοειδική θρόμβωση, μικρο-ανευρύσματα, αύξηση του μεσαγγείου και υπενδοθηλιακή εναπόθεση υαλίνης. Η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση που προκαλείται από τους παράγοντες αυτούς μπορεί να εξελιχθεί σε ολική σκλήρυνση των προσβεβλημένων σπειραμάτων ^[4].



Σχήμα 3.2. Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση. Η χρώση δείχνει περιοχές τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης εντοπιζόμενες πλησίον του αγγειακού μίσχου και παρακείμενες συμφύσεις με την κάψα του Bowman ^[4].

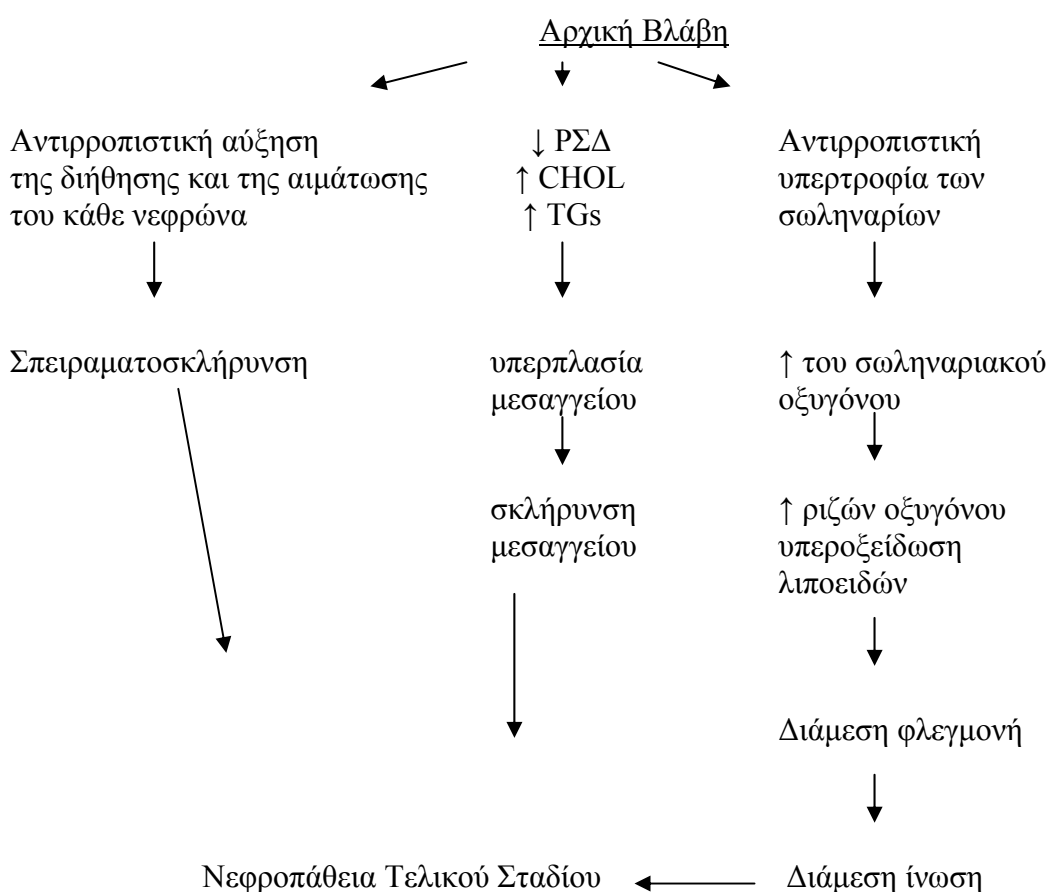
3.7. Σπειραματονεφρίτιδα

Αναφέρεται σε φλεγμονώδεις αλλοιώσεις του νεφρικού σπειράματος που χαρακτηρίζονται ιστολογικά από αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού των σπειραμάτων και κλινικά από νεφρικό σύνδρομο.

Η τελευταία περιλαμβάνει το συμπλήρωμα, τα εκλυόμενα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα που διηθούν το σπείραμα, συμμετέχουν στην αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού και συμβάλλουν στην παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν στην ιστική βλάβη, το σύστημα πήξης και τα αιμοπετάλια τα οποία συμβάλλουν στην καταστροφή του νεφρικού σπειράματος ^[4].

3.8. Μεσαγγειακά κύτταρα και σπειραματοσκλήρυνση

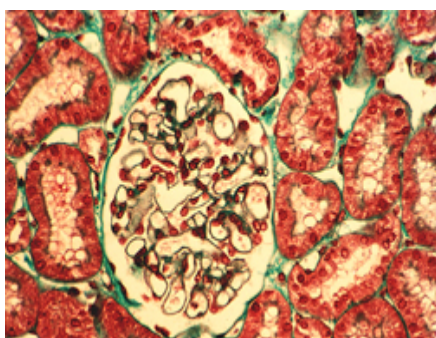
Τα μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του σπειραματικού αγγειακού συστήματος υπερδιήθησης. Ανεξάρτητα από το είδος του σπειραματικού τραύματος, ο ανεπαρκής έλεγχος του αριθμού των μεσαγγειακών κυττάρων συμβάλλει θετικά στην παθογένεια της προοδευτικής νεφρικής ανεπάρκειας ^[13].



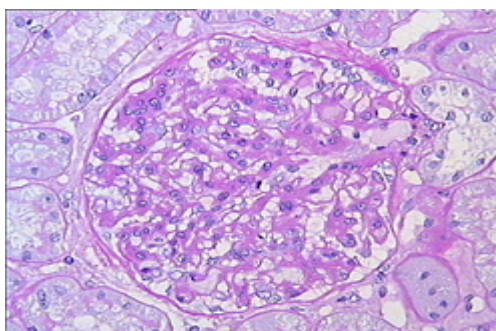
Σχήμα 3.3. Υπεύθυνοι παράγοντες για την πρόοδο της νεφροπάθειας. ΡΣΔ= ρυθμός σπειραματικής διήθησης ^[14].

Το σπειραματικό μεσάγγειο αποτελείται από μεσαγγειακά κύτταρα και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και συμμετέχει σημαντικά στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του σπειράματος. Το μεσάγγειο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το ενδοθήλιο εξαιτίας της ανεπαρκούς ανάπτυξης της σπειραματικής βασικής μεμβράνης του τριχοειδικού βρόγχου στο σημείο αυτό. Ο ρυθμός ανανέωσης των κυττάρων αυτών είναι χαμηλός, $< 1\%$. Συνεπώς, τα μεσαγγειακά κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, είτε δέχονται ερεθίσματα από λίγα μόνο μιτογόνα μόρια είτε, δεν ανταποκρίνονται σε αυτά εξαιτίας της παρουσίας παραγόντων που καθιστούν τους αντίστοιχους υποδοχείς μη ενεργούς ή προστατεύονται από την παρουσία παραγόντων αναστολέων της ανάπτυξης. Στις φλεγμονώδεις νόσους του ανθρώπινου σπειράματος έχουν ταυτοποιηθεί δυο κυρίαρχες ιστολογικές χαρακτηριστικές καταστάσεις. Η πρώτη είναι η μεσαγγειακή υπερπλασία εξαιτίας του υψηλού ρυθμού αύξησης ή του χαμηλού ρυθμού απώλειας και η δεύτερη είναι η τροποποιημένη και αυξημένη εναπόθεση μεσαγγειακής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

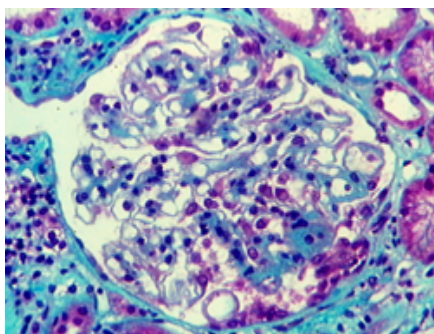
(α)



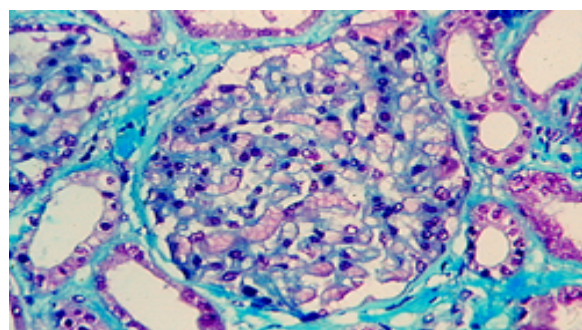
(γ)



(β)



(δ)

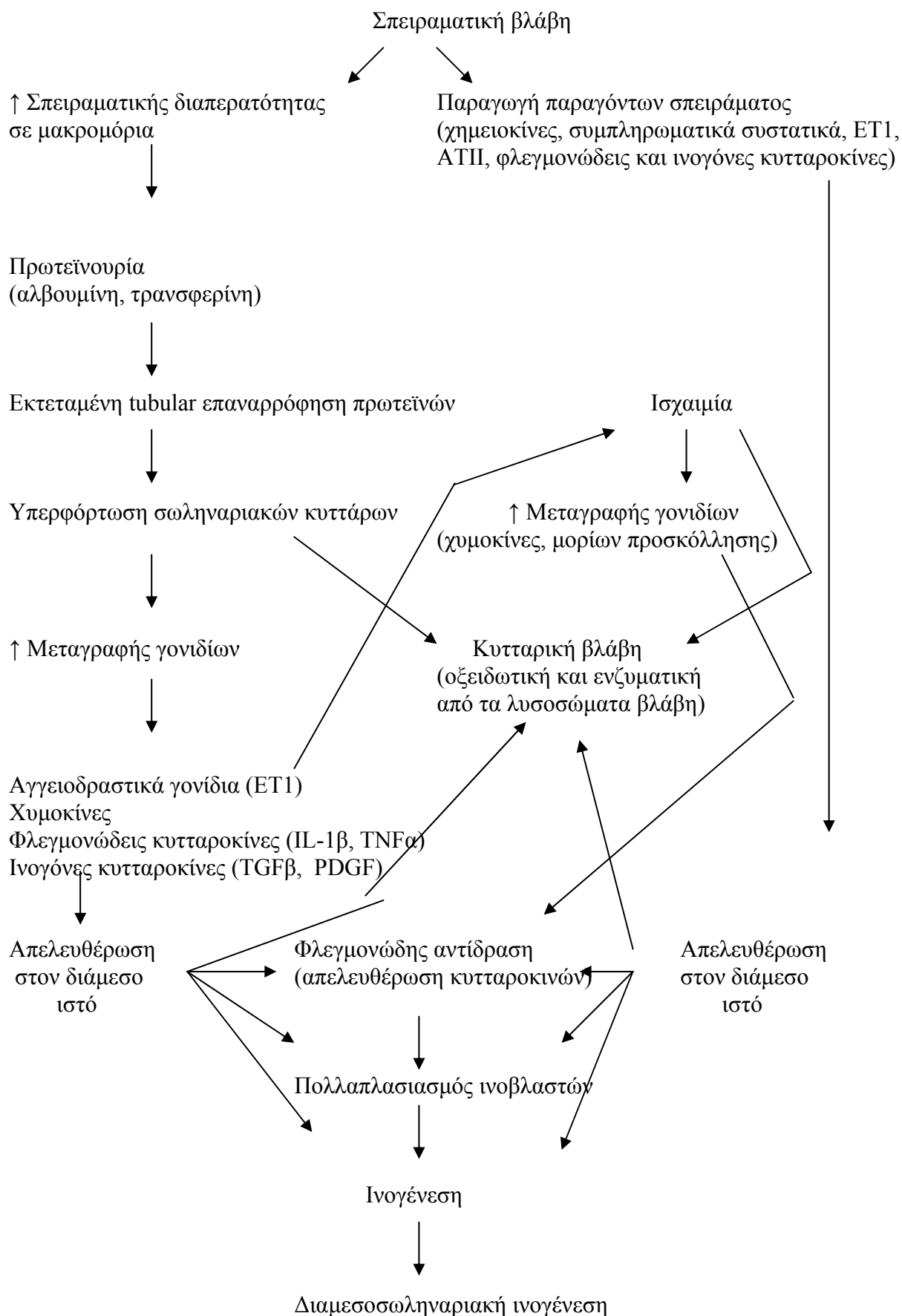


Σχήμα 3.4. (α) Φυσιολογικό σπείραμα, (β) φυσιολογικό σπείραμα, (γ) υπερτροφία μεσαγγείου και σπειραματική μεγέθυνση και (δ) αυξημένος αριθμός μεσαγγειακών κυττάρων ^[4].

Ο τροποποιημένος έλεγχος του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων συμβάλλει θετικά στην εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης. Στο νεφρικό σπείραμα, η ποσότητα και η σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας καθορίζεται από τα μεσαγγειακά κύτταρα. Μεταβολές της σύστασης και της ποσότητας της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των μεσαγγειακών κυττάρων συχνά οδηγεί σε σκλήρυνση και προδευτική μείωση του διηθούμενου κλάσματος και τελικά, νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Ο ακριβής μηχανισμός μεταγωγής σήματος στον πυρήνα που αφορά στην αλληλεπίδραση του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων και της σύστασης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ^[13].

3.9. Η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας

Η εξέλιξη της απώλειας της νεφρικής λειτουργίας αποτελεί απόρροια μιας παθογενετικής διεργασίας, η οποία αποτελεί κοινό τελικό μονοπάτι ανεξάρτητα από την πρωταρχική αιτιολογία της ασθένειας. Η σπειραματοσκλήρυνση και η εσωτερική ίνωση αποτελούν σημεία κλειδιά στο τελικό αυτό κοινό μονοπάτι ^[12].



Σχήμα 3.4. Παθογενετικοί μηχανισμοί που ενδεχομένως σχετίζονται με την διαμεσοσωληναριακή ινογένεση στις νεφρικές σπειραματικές παθήσεις [12].

4. Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF)

4.1. Εισαγωγή

Ο PAF αποτελεί την κοινή ονομασία ενός φωσφολιπιδίου, της 1-O- αλκυλο-2-ακέτυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης στην οποία έχουν αποδοθεί ποικίλες φυσιολογικές δράσεις. Πολλά είναι τα ενδιάμεσα λιποειδή που προέρχονται από τα φωσφολιπίδια αλλά ο PAF είναι το πρώτο φωσφολιποειδές στο οποίο αποδόθηκαν αυτακοειδείς και μηνυματοφόρες λειτουργίες ^[14].

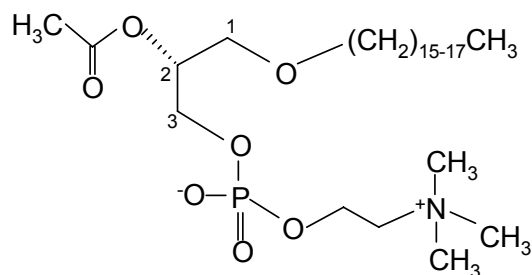
Οι λειτουργίες αυτές διενεργούνται μετά από την πρόσδεση του μορίου πάνω στον κατάλληλο υποδοχέα και μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων που προκύπτουν από αυτήν. Περιοριστικό παράγοντα για την πρόσδεση του PAF στον υποδοχέα του και για την αναγνώρισή του ως υπόστρωμα από τα συνθετικά και αποικοδομητικά του ένζυμα αποτελεί η δομή του. Το τελευταίο είναι ζωτικής σημασίας καθώς τα δομικά φωσφολιποειδή θα μπορούσαν να υδρολυθούν ανεξέλεγκτα από τα αποικοδομητικά ένζυμα του PAF ^[14].

Η μελέτη του μεταβολισμού του PAF ξεκίνησε σχεδόν ταυτόχρονα με την εύρεση της δομής του. Ο PAF μπορεί να βιοσυντίθεται και να αποικοδομείται με περισσότερο από μία πορείες στα κύτταρα, ανάλογα το είδος και το περιβάλλον του κυττάρου. Οι πορείες αυτές βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο και ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα που οδηγούν, είτε στην σύνθεση είτε στην απενεργοποίηση του PAF ανάλογα την παθοφυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Παράλληλα, έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση του μεταβολισμού του PAF με το μεταβολισμό και άλλων, βιολογικά δραστικών, λιποειδών, κυρίως εικοσανοειδών, ενώ έχουν βρεθεί καινούργιες αντιδράσεις και ένζυμα που καθορίζουν το είδος των δομικών αναλόγων του PAF σε κάθε κύτταρο ^[14].

4.2. Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες PAF ^[390]

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς, στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης (Σχήμα 4.1). Η παραπάνω δομή αντιπροσωπεύει την πιο δραστική μορφή του PAF όχι όμως και τη μοναδική αφού στη φύση έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών

ειδών και αναλόγων του PAF με παρόμοιες βιολογικές δράσεις. Οι ενώσεις αυτές περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.



Σχήμα 4.1. Χημική δομή του PAF

Ο PAF είναι διαλυτός σε μεθανόλη, αιθανόλη και σε μίγματα χλωροφορμίου:μεθανόλης ενώ είναι αδιάλυτος σε χλωροφόρμιο, αιθέρα, βενζόλιο και ακετόνη. Στα υδατικά διαλύματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, βρίσκεται υπό τη μορφή μονομερούς αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σχηματίζει μικκύλια. Η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωσή του έχει βρεθεί από 0,2 έως 3 μM , ανάλογα το μοριακό είδος και την τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι πολύ χαμηλότερες από τις συνήθεις συγκεντρώσεις του PAF στα βιολογικά δείγματα ($10^{-7} \text{ M} - 10^{-11} \text{ M}$) γεγονός που δείχνει ότι ο PAF εκδηλώνει τις βιολογικές του δράσεις ως μονομερές. Η διαλυτοποίησή του σε υδατικά διαλύματα επιτυγχάνεται συνήθως με αναδιάλυσή του σε υδατικό διάλυμα βόειου αλβουμίνης ορού (BSA) με την οποία συνδέεται ισχυρά.

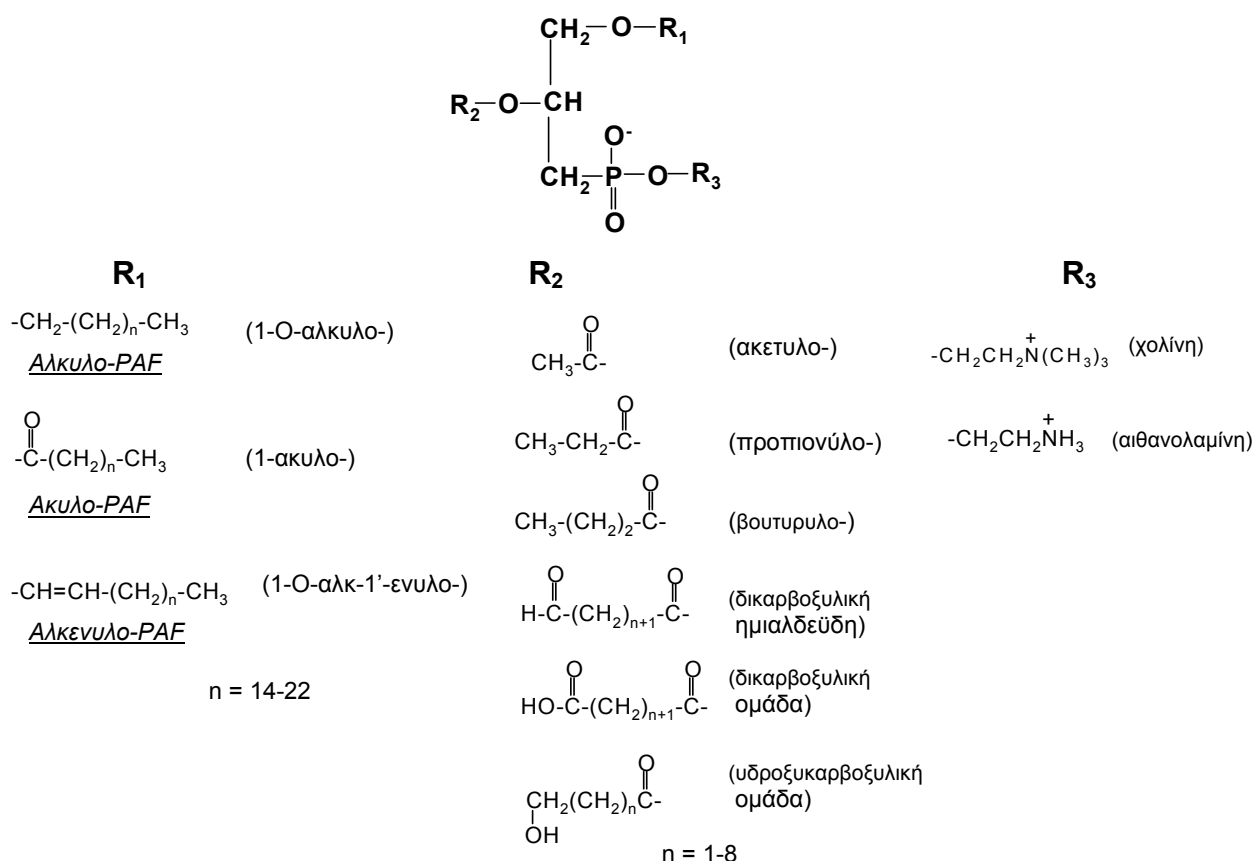
Ο PAF είναι ιδιαίτερα σταθερός σε ουδέτερα και όξινα υδατικά διαλύματα ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, η πιο αντιπροσωπευτική χημική του ιδιότητα είναι η μεγάλη του ευαισθησία σε αλκαλικά διαλύματα στα οποία υδρολύεται ταχύτατα η ακετυλομάδα από την δεύτερη θέση του γλυκερινικού σκελετού.

4.3. Μοριακά είδη και ανάλογα PAF – Σχέση δομής-δραστηκότητας

Εκτός από την κλασσική δομή του PAF (Σχήμα 4.1.), στη φύση έχουν βρεθεί και πιστοποιηθεί πλήθος μοριακών ειδών και αναλόγων του με παρόμοιες ή μικρότερες βιολογικές δραστηκότητες. Τα μοριακά είδη και ανάλογα του PAF διαφέρουν ως προς το είδος της λιπαρής αλυσίδας και του δεσμού με τον οποίο αυτή συνδέεται στην sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού, ως προς το είδος του λιπαρού οξέος που είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση και τέλος ως προς το είδος της βάσης στην sn-3 θέση (Σχήμα 4.2.).

Στην sn-1 θέση έχουν βρεθεί ανθρακικές αλυσίδες από 14 έως 22 άτομα άνθρακα με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς ενώ έχουν βρεθεί ανάλογα του PAF με υδροξυλιωμένες ανθρακικές αλυσίδες. Ο άκυλο-PAF, στον οποίο η ανθρακική αλυσίδα συνδέεται στην sn-1 θέση με εστερικό δεσμό, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στη φύση και αποτελεί το κυριότερο μοριακό είδος του PAF στα μαστοκύτταρα, βασεόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, έχουν βρεθεί και αλκένυλο- ανάλογα του PAF, όπου η λιπαρή αλυσίδα συνδέεται με βινυλαιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση. Τα ανάλογα αυτά προέρχονται από τα πλασμαλογόνα. Στην sn-2 θέση έχουν βρεθεί εστεροποιημένες τόσο προπιονύλο- όσο και βουτυρύλο- ομάδες ενώ τα τελευταία χρόνια μελετώνται, ιδιαίτερα εκτεταμένα, ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) όπου στην sn-2 θέση βρίσκονται εστεροποιημένες μικρές άκυλο- ομάδες που είναι συνήθως μονοκαρβοξυλικά, δικαρβοξυλικά και υδροξυκαρβοξυλικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές έχουν δράση ανάλογη του PAF και σχηματίζονται με οξείδωση της PC, που έχει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση, σε καταστάσεις όπου σχηματίζεται ένα ισχυρά οξειδωτικό περιβάλλον όπως στις διάφορες ισχαιμίες και στις χρόνιες φλεγμονές. Τέλος, έχουν βρεθεί ανάλογα του PAF όπου στην sn-3 θέση αντί για χολίνη υπάρχει αιθανολαμίνη. Σε αυτά τα ανάλογα, η λιπαρή αλυσίδα συνδέεται στην sn-1 θέση κυρίως με βινυλαιθερικό δεσμό.

Μελέτες που έχουν γίνει με συνθετικά ανάλογα του PAF έχουν δείξει πως η δομή των μοριακών ειδών καθορίζει και την βιολογική τους δραστηριότητα. Το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό για την ύπαρξη βιολογικής δραστηριότητας είναι η παρουσία ακετυλομάδας στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Απομάκρυνση της ακετυλομάδας οδηγεί στο λυσο-PAF, ο οποίος είναι ανενεργός. Αντικατάσταση της ακετυλομάδας με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί σε μόρια με μικρότερη βιολογική δραστηριότητα. Επίσης, ο χημικός δεσμός στην sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την βιολογική δραστηριότητα του PAF. Η δραστηριότητα ακολουθεί γενικά την σειρά αλκυλο-PAF>αλκενυλο-PAF>άκυλο-PAF. Όσον αφορά το είδος της ανθρακικής αλυσίδας στην sn-1 θέση, η μέγιστη δραστηριότητα εμφανίζεται για κορεσμένα ή μονοακόρεστα λιπαρά οξέα με 16 ή 18 άτομα άνθρακα. Η σειρά δραστηριότητα όσον αφορά την βάση στην sn-3 θέση είναι η εξής : χολίνη>διμεθυλοαιθανολαμίνη>μονομεθυλοαιθανολαμίνη> αιθανολαμίνη. Τέλος, ο PAF εμφανίζει στερεοεξειδίκευση αφού η δραστική εναντιομερής μορφή του στην sn-2 θέση είναι η φυσικά απαντώμενη R μορφή.



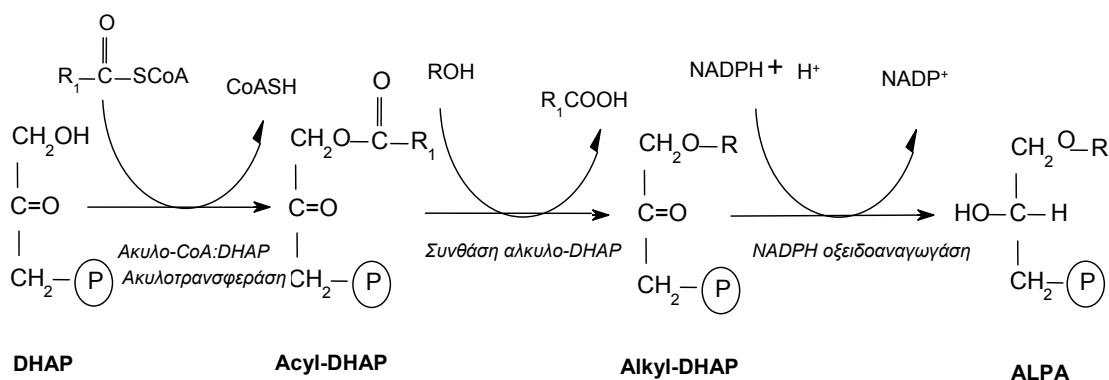
Σχήμα 4.2. Χημικές δομές των κυριοτέρων μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF.

Η ύπαρξη όλων αυτών των μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF οφείλεται κυρίως στην σχετικά ευρεία εξειδίκευση των ενζύμων βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του. Το κάθε είδος κυττάρου δίνει ένα διαφορετικό μίγμα μοριακών ειδών PAF, το οποίο εξαρτάται από την σύσταση των φωσφολιποειδών στις μεμβράνες του κυττάρου, την κατανομή του αραχιδονικού οξέος στις διάφορες τάξεις των φωσφολιποειδών καθώς και από την σχετική ταχύτητα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης αυτών των ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια έχει επανεκτιμηθεί η σημασία των αναλόγων του PAF αφού σχηματίζονται σε πολύ μεγαλύτερα ποσά απ'ότι είχε αρχικά βρεθεί, έχουν ανακαλυφθεί καινούριες βιολογικές δράσεις για αυτά και φαίνεται ότι δρουν ως ενδογενείς ρυθμιστές της δραστηριότητας του PAF.

4.4. Μεταβολισμός του PAF – Ένζυμα μεταβολισμού PAF ^[15-16]

4.4.1. Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης PAF

4.4.1.1. Σχηματισμός αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή

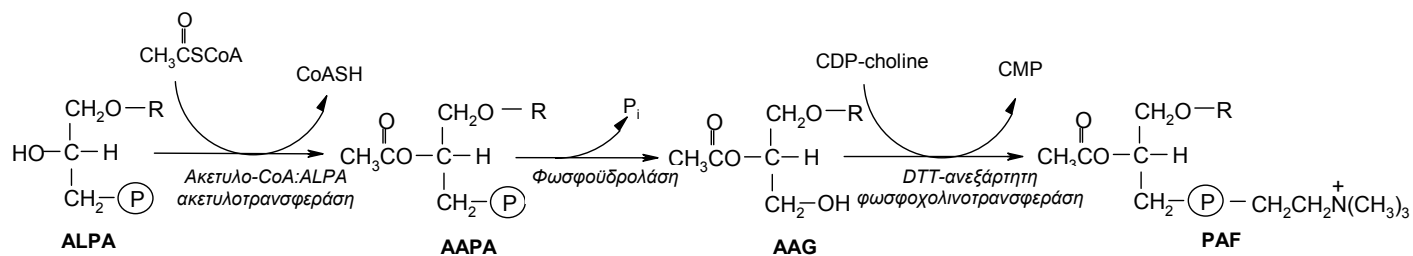


Σχήμα 4.3. Πορεία σχηματισμού αιθερικού δεσμού στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή.

Ο σχηματισμός του αιθερικού δεσμού στα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή γίνεται με πορεία τριών σταδίων, η οποία ξεκινά με την μετατροπή της φωσφοδιϋδροξυακετόνης (DHAP), η οποία προέρχεται από την γλυκολυτική πορεία, σε 1-ακυλοφωσφοδιϋδροξυακετόνη (ακυλο-DHAP) με την δράση του ενζύμου ακυλο-CoA:DHAP ακυλοτρανσφεράση. Στην συνέχεια, η ακυλο- ομάδα της ακυλο-DHAP αντικαθίσταται από μία αλειφατική ανθρακική αλυσίδα μίας λιπαρής αλκοόλης, η οποία ενώνεται με αιθερικό δεσμό στην DHAP, προς σχηματισμό της 1-αλκυλο-φωσφοδιϋδροξυακετόνης (αλκυλο-DHAP). Η αντίδραση καταλύεται από την συνθάση της αλκυλο-DHAP. Η αλκυλο-DHAP ανάγεται στην συνέχεια από μία NADPH εξαρτώμενη οξειδοαναγωγή προς 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικό οξύ (ALPA). Το ALPA είναι το ενδιάμεσο προϊόν από το οποίο μπορούν να σχηματιστούν, είτε τα κλασσικά γλυκεριναιθερικά φωσφολιποειδή των μεμβρανών, είτε ο PAF (Σχήμα 4.3.).

4.4.1.2. De novo (εξ' υπαρχής) πορεία βιοσύνθεσης του PAF

Το πρώτο στάδιο της *de novo* πορείας είναι η μεταφορά μίας ακετυλομάδας από το ακετυλο-CoA στο ALPA προς σχηματισμό του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος (AAPA). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακετυλο-CoA:ALPA ακετυλοτρανσφεράση (*de novo AT*). Στην συνέχεια η φωσφορική ομάδα του AAPA αντικαθίσταται από φωσφορυλοχολίνη με την διαδοχική δράση μίας φωσφοϋδρολάσης, που υδρολύει την φωσφορική ομάδα και μίας DTT ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης (CPT) που μεταφέρει την ομάδα της φωσφορυλοχολίνης, ενεργοποιημένης υπό την μορφή κιτυδιλοδιφωσφορικής χολίνης (CDP-χολίνης), στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού (Σχήμα 4.4.).



Σχήμα 4.4. De novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF.

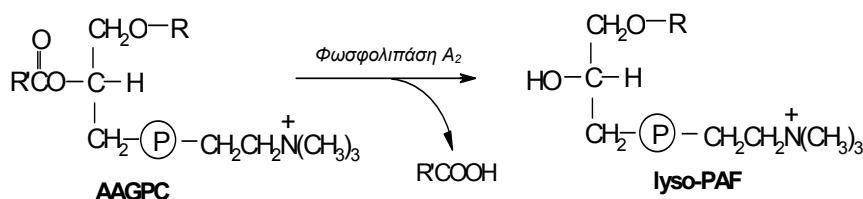
Όλα τα ένζυμα της *de novo* πορείας είναι μεμβρανικά και διαφέρουν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την *de novo* σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών.

Η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF δεν ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι υπεύθυνη για την συνεχή, σταθερή παραγωγή PAF από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του στο αίμα και στους ιστούς [17].

4.4.1.3. Βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού (remodeling πορεία)

Η βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού (remodeling πορεία) περιλαμβάνει την μετατροπή γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών, που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, σε PAF. Είναι η πρώτη πορεία βιοσύνθεσης του PAF που περιγράφηκε. Ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα.

Πρόδρομη ένωση του PAF στην *remodeling* πορεία είναι το μεμβρανικό γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές AAGPC. Στην sn-2 θέση του φωσφολιποειδούς βρίσκονται εστεροποιημένα κυρίως αραχιδονικό οξύ και λιγότερο άλλα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα οξέα. Το πρώτο στάδιο της *remodeling* πορείας περιλαμβάνει την υδρόλυση της AAGPC προς λυσο-PAF. Αρχικά, η αντίδραση αυτή αποδίδονταν αποκλειστικά στην δράση μιας υποθετικής (PLA₂), με εξειδίκευση για αιθερικά υποστρώματα. Ωστόσο σήμερα έχει βρεθεί ότι η αντίδραση μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικές πορείες ανάλογα το είδος του κυττάρου. Η πρώτη πορεία



περιλαμβάνει την

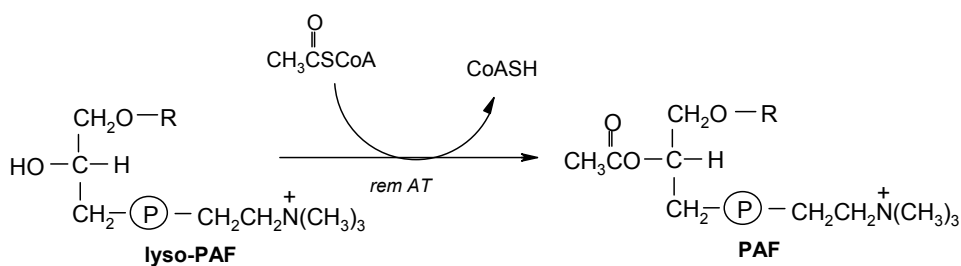
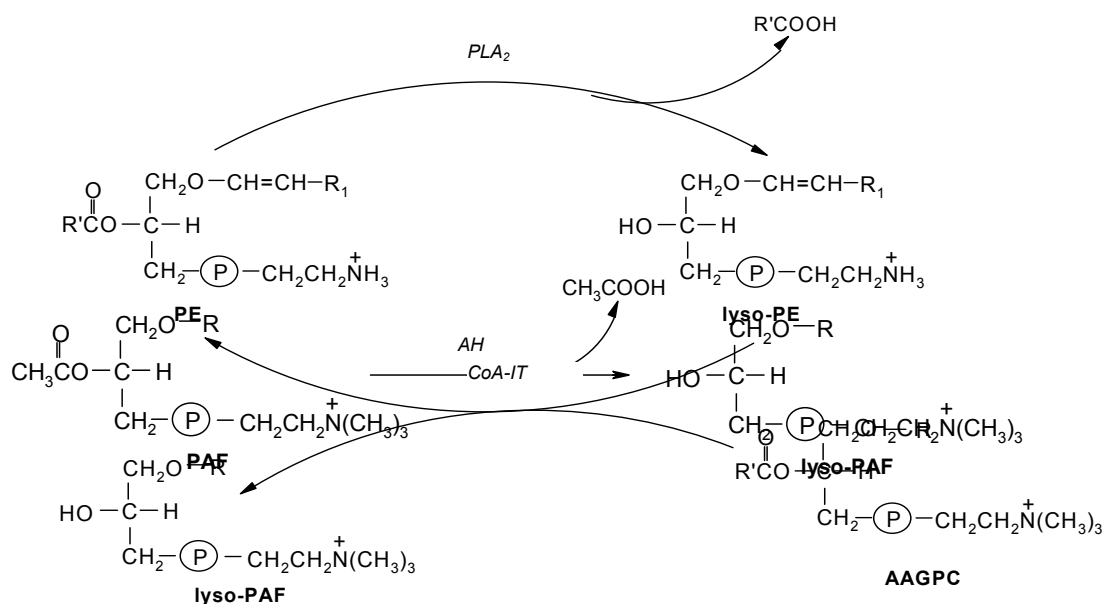
Σχήμα 4.5. Σχηματισμός λυσο-PAF από AAGPC με την δράση PLA₂.

δράση μιας PLA₂, η οποία έχει εξειδίκευση για πολυακόρεστες αλυσίδες στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού της AAGPC αλλά δεν φαίνεται να δείχνει ιδιαίτερη εξειδίκευση για το είδος του δεσμού στην sn-1 θέση (Σχήμα 4.5.). Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχτεί η ύπαρξη ειδικής PLA₂, η οποία υδρολύει εξειδικευμένα την AAGPC σε λυσο-PAF. Με αυτόν το τρόπο σχηματίζεται ο λυσο-PAF σε περιτοναϊκά κύτταρα ποντικού^[18], σε μακροφάγα αρουραίου^[19, 20], σε ουδετερόφιλα^[21] και ηωσινόφιλα ανθρώπου^[22] κ.α.

Στη δεύτερη πορεία σχηματισμού του λυσο-PAF, η οποία έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, μια CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση (CoA-IT) μεταφέρει την ακυλο- ομάδα (κυρίως αραχιδονόυλο-) από την sn-2 θέση της AAGPC σε λυσο- πλασμαλογόνα αιθανολαμίνης (λυσο-PE). Η λυσο-PE σχηματίζεται από PE με την δράση μιας PLA₂ ειδικής για τα πλασμαλογόνα αιθανολαμίνης και για αραχιδονόυλο- ομάδες στην sn-2 θέση των πλασμαλογόνων^[23] (Σχήμα 4.6.). Χαρακτηριστικό της *remodeling* πορείας είναι ότι και στις δύο πορείες σχηματισμού του λυσο-PAF ελευθερώνεται παράλληλα αραχιδονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε βιολογικά δραστικά εικοσανοειδή όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, κ.α.

Το δεύτερο στάδιο της *remodeling* πορείας είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF από το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (*rem AT*). Η *rem AT* δείχνει εξειδίκευση για αιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση και μεταφέρει μικρού Mr άκυλο- ομάδες (2 ή 3 ατόμων C) στην sn-2 θέση (Σχήμα 4.7.).

Σχήμα 4.6. Σχηματισμός λυσο-PAF με τη δράση τρανσακυλασών.

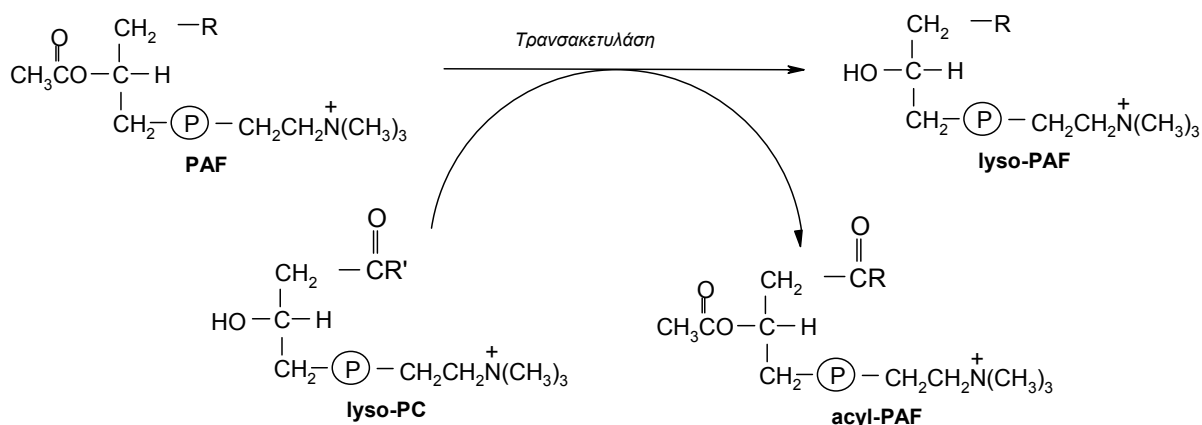


Σχήμα 4.7. Ακετυλίωση λυσο-PAF προς PAF.

4.4.1.4. Μεταβολικές πορείες αποικοδόμησης PAF

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο αποικοδόμησης του PAF είναι η υδρόλυση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό του βιολογικά ανενεργού λυσο-PAF. Η αντίδραση υδρόλυσης της ακετυλομάδας μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους :

Σχήμα 4.8. Υδρόλυση του PAF από την AH.



α) Με την δράση της PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), μίας Ca^{2+} -ανεξάρτητης PLA_2 που δείχνει εξειδίκευση για μικρού Mr (2 ή 3 ατόμων C) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού (Σχήμα 4.8.). Έχουν βρεθεί τόσο εξωκυτταρικές όσο και ενδοκυτταρικές ισομορφές του ενζύμου που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βιολογικής δραστηριότητας του PAF [24-27].

β) Με τη δράση τρανσακετυλασών που μεταφέρουν την ακετυλομάδα σε άλλα λιποειδικά υποστρώματα με ελεύθερο υδροξύλιο όπως λυσο-πλασμαλογόνα, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (Σχήμα 4.9.), λιπαρές αλκοόλες, σφινγοςίνη κ.α. Μέσω αυτής της αντίδρασης σχηματίζονται ακετυλιωμένα μόρια στα οποία έχουν αποδοθεί σημαντικές βιολογικές δράσεις τα τελευταία χρόνια. Ενζυμική δραστηριότητα τρανσακετυλάσης έχει βρεθεί σε HL-60 κύτταρα [28, 29], σε ενδοθηλιακά κύτταρα [30] καθώς και σε κλάσματα LDL ανθρώπινου πλάσματος [31].

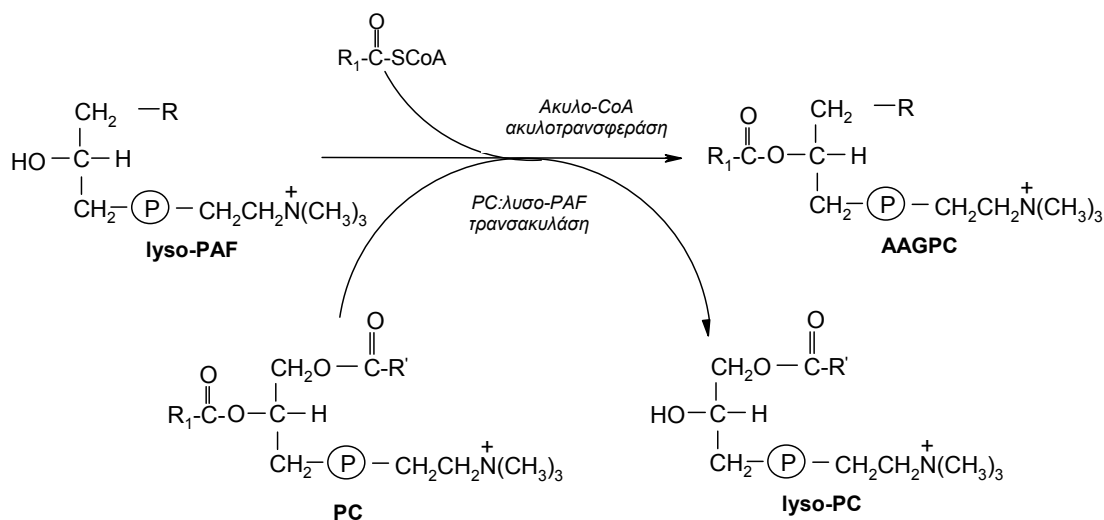
Σχήμα 4.9. Υδρόλυση PAF από τρανσακετυλάσες.

γ) Με τη δράση της λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράσης (LCAT), η οποία μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-PC στο πλάσμα ανθρώπου. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τρανσακετυλάση και η LCAT αποτελούν διαφορετικά ένζυμα [32].

Ενδοκυτταρικά, ο λυσο-PAF είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικός λόγω των απορρυπαντικών ιδιοτήτων του γι' αυτό και είτε εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο, είτε μεταβολίζεται περαιτέρω στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταβολική τύχη του λυσο-PAF εξαρτάται από το

είδος του κυττάρου και μπορεί να είναι η εξής :

α) Μπορεί να επανακυλιωθεί προς AAGPC, το οποίο στην συνέχεια ενσωματώνεται στις μεμβράνες των κυττάρων. Η ακυλίωση μπορεί να γίνει είτε από ακυλο-CoA



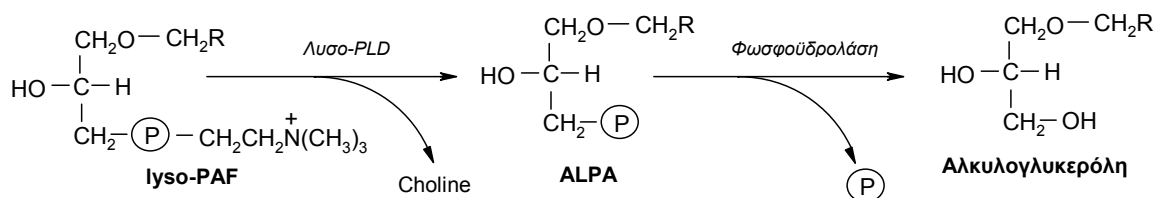
ακυλοτρανσφεράσες, είτε από τρανσσυκλάσες που μεταφέρουν ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως αραχιδονικό οξύ, από την PC στον λυσο-PAF (Σχήμα 4.10). Η μετατροπή του PAF σε AAGPC είναι ο συνηθέστερος τρόπος αποικοδόμησης του στα περισσότερα κύτταρα, κυρίως στα λευκοκύτταρα και στα αιμοπετάλια^[15,16].

β) Μπορεί να μεταβολιστεί από λυσο-φωσφολιπάση C σε αλκυλογλυκερόλη, η οποία

Σχήμα 4.10. Ακυλίωση του λυσο-PAF προς AAGPC.

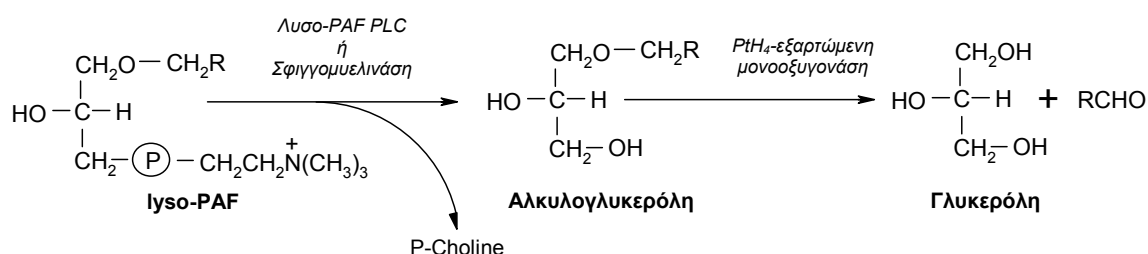
Σχήμα 4.11. Υδρόλυση λυσο-PAF προς αλκυλογλυκερόλη.

είναι δυνατόν στη συνέχεια να διασπαστεί περαιτέρω σε γλυκερόλη και λιπαρή αλδεύδη από την τετραϋδροπτερίδινη-εξαρτώμενη μονοοξυγονάση (Σχήμα 4.12). Η πορεία αυτή έχει αποδειχτεί



σε ηπατοκύτταρα αρουραίου^[33]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι κλωνοποιημένη ουδέτερη σφιγγομυελινάση μπορεί να λειτουργήσει και ως λυσο-PAF PLC στα κύτταρα^[34].

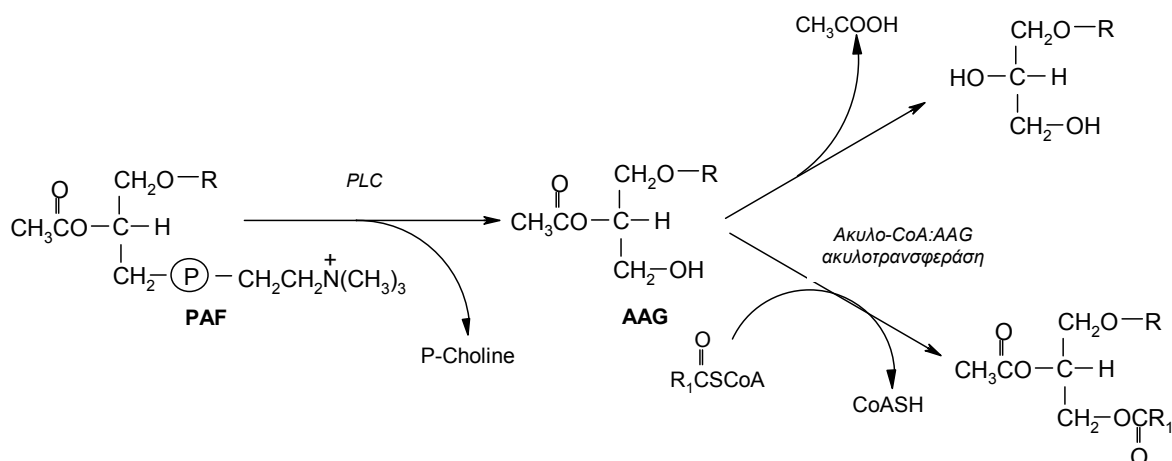
γ) Μπορεί να υδρολυθεί από μία λυσο-PLD σε ALPA, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε AAG με την δράση μίας φωσφοϋδρολάσης (Σχήμα 4.13). Η πορεία αυτή αποικοδόμησης του λυσο-PAF έχει βρεθεί σε μυοκύτταρα αρουραίου^[35], σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου αρουραίου^[36] και σε πλάσμα κουνελιού^[37].



Σχήμα 4.12. Υδρόλυση λυσο-PAF από PLD.

δ) Ο αιθερικός δεσμός του λυσο-PAF μπορεί να διασπαστεί από την τετραϋδροπτερίδινη-εξαρτώμενη μονοοξυγονάση προς λιπαρές αλδεύδες. Η μονοοξυγονάση διασπά τον αιθερικό δεσμό στα γλυκεριναιθερικά λιποειδή και για να δράσει απαιτεί τουλάχιστον ένα ελεύθερο υδροξύλιο^[16].

Εκτός από την PAF-AH και την τρανσακετυλάση, στο μόριο του PAF μπορεί να δράσει μία PLC η δράση της οποίας οδηγεί στον σχηματισμό AAG (Σχήμα 4.13.).



Σχήμα 4.13. Υδρόλυση PAF από PLC.

4.4.1.5. Μηχανισμοί έκκρισης PAF από τα κύτταρα

Ο νεοσυντιθέμενος PAF μπορεί, είτε να μεταβολιστεί άμεσα, είτε να δράσει στο εσωτερικό του κυττάρου και ύστερα να μεταβολιστεί, είτε να εκκριθεί στον εξωκυτταρικό χώρο και να δράσει σε γειτονικά κύτταρα. Το ποσό του PAF που εκκρίνεται από τα κύτταρα εξαρτάται, τόσο από το είδος του κυττάρου, όσο και από τις συνθήκες ενεργοποίησης του. Τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν 0 έως 60% του νεοσυντιθέμενου PAF ανάλογα το εξωτερικό ερέθισμα και τις συνθήκες ενεργοποίησης^[38-41]. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν από λίγο έως καθόλου PAF ανεξαρτήτως ερεθίσματος^[42, 43].

Έχει βρεθεί ότι η έκκριση του PAF ρυθμίζεται από G πρωτεΐνες ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτη και από την ενεργοποίηση της PLC, του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και την κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου^[44,45]. Η ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεταγωγής σήματος επηρεάζει τα σύστημα των μικροϊνιδίων και επάγει αλλαγές στον κυτταροσκελετό που προκαλούν μεταβολή στις φυσικές ιδιότητες και την συμμετρία της μεμβράνης, οι οποίες με την σειρά τους προκαλούν την έκκριση PAF^[46-48]. Η παρουσία αλβουμίνης ευνοεί την έκκριση λόγω εκχύλισης του PAF από την μεμβράνη^[49]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο PAF δεν εκκρίνεται αλλά μετά την σύνθεση του μπορεί να βρεθεί στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και από εκεί να δράσει ως διακυτταρικός μεσολαβητής. Με αυτόν τον τρόπο ο παραγόμενος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα PAF μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα, ενώ με παρόμοιο μηχανισμό ο PAF των ουδετεροφίλων μπορεί να ενεργοποιήσει την προσκόλληση αιμοπεταλίων σε αυτά δρώντας από την επιφάνεια τους^[50].

4.4.1.6. Τοπολογία μεταβολισμού PAF

Οι ενδοκυτταρικές περιοχές στις οποίες διεξάγονται οι μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης του PAF δεν έχουν πλήρως εντοπιστεί. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει με κλασσικά πειράματα υποκυτταρικής κατανομής των ενζύμων και των ραδιενεργών υποστρωμάτων τους και έχουν δείξει ότι τα ένζυμα βιοσύνθεσης του PAF εντοπίζονται κυρίως σε ενδοκυτταρικά μεμβρανικά σωματίδια όπως στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), στις πυρηνικές μεμβράνες και σε άλλα μη διευκρινισμένα μεμβρανικά κλάσματα^[15,16]. Η μεταφορά του PAF και των προϊόντων αποικοδόμησης του μεταξύ των μεμβρανών γίνεται, είτε με την βοήθεια ειδικών για τον PAF μεταφορικών πρωτεϊνών, είτε με την σύντηξη λιποειδικών κυστιδίων όπως έχει βρεθεί στα ουδετερόφιλα^[51].

4.4.2. Σύνοψη περιγραφή των σημαντικότερων ενζύμων μεταβολισμού του PAF

4.4.2.1. DTT-ανεξάρτητη CDP-χολίνη : αλκυλοακετυλογλυκερόλη φωσφοχολινوترansφεράση, CPT^[16,52].

Το ένζυμο αυτό καταλύει το τελευταίο στάδιο της *de novo* πορείας τη μεταφορά δηλαδή της φωσφορυλοχολίνης από την CDP-χολίνη σε AAG που οδηγεί στον σχηματισμό του PAF.

Διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες διαχωρίζουν την ενζυμική δραστηριότητα που είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του PAF με αυτή που είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των κοινών φωσφολιποειδών όπως η PC. Η πιο χαρακτηριστική διαφορά είναι το γεγονός ότι η CPT που συμμετέχει στην βιοσύνθεση του PAF ενεργοποιείται ελαφρά από το DTT σε αντίθεση με το ένζυμο που βιοσυνθέτει PC, το οποίο αναστέλλεται σχεδόν πλήρως. Το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου είναι 8,0, αναστέλλεται από δεοξυχολικό οξύ, απαιτεί Mg^{2+} για την δράση του και αναστέλλεται από Ca^{2+} .

Όπως και τα άλλα ένζυμα της *de novo* πορείας έτσι και η DTT-ανεξάρτητη CPT δεν επηρεάζεται από φλεγμονώδη ερεθίσματα, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από φυσιολογικούς παράγοντες όπως η ακετυλοχολίνη και η ντοπαμίνη. Επίσης, ενεργοποίηση της PKC από φορβολικούς εστέρες προκαλεί ενεργοποίηση του ενζύμου σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι το τελευταίο στάδιο της *de novo* πορείας παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης του PAF και στα επίπεδα του παραγόμενου PAF.

4.4.2.2. Ακετυλο-CoA:1-O-αλκυλο-2-λυσσο-sn-γλυκερύλοφωσφοχολίνη ακετυλοτρανσφεράση, rem AT ^[15,16]

Η *rem AT* καταλύει το τελευταίο στάδιο της *remodeling* πορείας που είναι η ακετυλίωση του λυσσο-PAF προς PAF. Εντοπίζεται στο μικροσωμιακό κλάσμα σχεδόν όλων των ιστών και των κυττάρων που παράγουν PAF. Πειράματα υποκυτταρικής κατανομής του ενζύμου έχουν δείξει ότι η *rem AT* κατανέμεται στις πλάσματικές μεμβράνες, στο ER και στα τεταρτοταγή κοκκία ανθρώπινων ουδετερόφιλων και HL-60 κυττάρων^[53-55], ενώ σε φλοιό εγκεφάλου αρουραίου και κουνελιού εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη και στον πυρηνικό φάκελο^[56,57].

Το ένζυμο παρουσιάζει σχετικά ευρεία εξειδίκευση όσον αφορά τα λιποειδικά υποστρώματα αφού μπορεί να ακετυλιώσει αιθερικά και εστερικά ανάλογα PAF καθώς και ανάλογα με σκελετό αιθανολαμίνης. Επίσης, μικρού Mr ακυλο-CoA (C₂-C₆) αποτελούν υποστρώματα για την *rem AT*. Μελέτες εξειδίκευσης του ενζύμου ως προς τα διάφορα λιποειδικά υποστρώματα έχουν δείξει ότι η σειρά προτίμησης της *rem AT* είναι : αλκυλο-λυσσο-PAF>ακυλο-λυσσο-PAF>αλκενυλο-λυσσο-PAF>αλκυλο-λυσσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη>ακυλο-λυσσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Τα λιποειδή ακυλο-λυσσο-φωσφατιδυλοσερίνη, αλκυλο-λυσσο-φωσφατιδυλοϊνσιτόλη και ακυλο-λυσσο-φωσφατιδικό οξύ δεν αποτελούν υποστρώματα για την *rem AT*^[58], ενώ μεγάλου Mr ακυλο-CoA, όπως παλμιτοϋλο-CoA, ελαϋλό-CoA, αραχιδονοϋλό-CoA είναι συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου^[58]. Το ένζυμο προτιμά ως υπόστρωμα τον C_{16:0}-λυσσο-PAF από τον C_{18:0}-λυσσο-PAF^[59,60]. Το ακετυλο-CoA δεν συναγωνίζεται το ακυλο-CoA στο ενζυμικό προσδιορισμό της ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράσης^[58], ενώ η ακετυλοτρανσφεράση είναι πιο ευαίσθητη σε απορρυπαντικά^[58] και στην θερμική απενεργοποίηση¹⁶². Τα παραπάνω αποτελέσματα διαχωρίζουν την δραστηριότητα της ακυλοτρανσφεράσης από αυτή της ακετυλοτρανσφεράσης.

Το ένζυμο αναστέλλεται από φυσικά παραγόμενες ενώσεις όπως ακυλο-CoA, αραχιδονικό οξύ, ελαϊκό οξύ, λυσσο-PC, από μη ειδικούς αναστολείς όπως τα χηλικά αντιδραστήρια EDTA, EGTA, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, DIFP καθώς και από συνθετικές ενώσεις που αντιδρούν με -SH ομάδες πάνω στο ένζυμο^[15,16].

Η *rem AT* δεν έχει καθαριστεί και μόνο μία απόπειρα μερικού καθαρισμού της έχει αναφερθεί σε σπλήνα αρουραίου οπότε και επιτεύχθηκε μερικός καθαρισμός 1500 φορές, ενώ η

ανάκτηση του ενζύμου ήταν μόνο 1,6 %. Ραδιοεπισημάνση της πρωτεΐνης με ραδιενεργό λυσο-PAF και ηλεκτρόφορηση έδειξε ότι η ραδιενέργεια καταναμεται σε μία μπάντα των 29 kDa^[61].

Το ένζυμο υφίσταται ομοιοπολική ρύθμιση της δραστικότητας τους μέσω φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης^[61]. Το ένζυμο είναι ενεργό φωσφορυλιωμένο και απενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση. Καταλυτικές υπομονάδες της cAMP-εξαρτώμενης PK και της Ca/καλμοδουλίνης-εξαρτώμενης PK^[62] ενεργοποιούν την *rem AT in vitro*. Αντιθέτως, η *rem AT* από νευρώνες κουνελιού είναι ευαίσθητη σε πυρηνικές και κυτοσολικές φωσφατάσες^[60], ενώ αναστολείς φωσφατασών επιμηκύνουν την ενεργοποίηση της *rem AT* σε ανθρώπινα EC. Σε πειράματα φωσφορυλίωσης που έχουν γίνει σε μερικώς καθαρισμένο ένζυμο, έχει βρεθεί ότι ένα κατάλοιπο σερίνης φωσφορυλιώνεται^[61]. Επίσης, στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της φαίνεται ότι συμμετέχει και η PKC αφού φορβολικοί εστέρες και η AAG ενεργοποιούν το ένζυμο, ενώ η σφινγγοσίνη το αναστέλλει.

4.4.2.2. Ένζυμα καταβολισμού του PAF: PAF ακετυλοϋδρολάσες^[62,63].

Οι PAF ακετυλοϋδρολάσες ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των PLA₂ υδρολύοντας τον PAF και οξειδωμένα φωσφολιποειδή στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Έκτοτε, έχει βρεθεί ότι οι PAF-AHs αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ενζύμων με διαφορετικές φυσιολογικές δράσεις. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί μία εκκρινόμενη (κυτταροπλασματική) και τέσσερις ενδοκυτταρικές ισομορφές του ενζύμου ενώ έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί με ακρίβεια τρεις ισομορφές, η ετεροτριμερής PAF-AH του εγκεφάλου, η PAF-AH του πλάσματος και η ενδοκυτταρική ισομορφή II.

4.4.2.3.1. Η PAF-AH του πλάσματος

Η PAF-AH του πλάσματος έχει κλωνοποιηθεί τόσο από τον άνθρωπο όσο και από άλλους οργανισμούς. Το cDNA της PAF-AH κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 45 KDa και 441 αμινοξέων. Για την δράση του ενζύμου απαιτείται, εκτός από την Ser273, ένα Asp 296 και μία His351, τα οποία αποτελούν την χαρακτηριστική τριάδα των α/β υδρολασών. Η PAF-AH του πλάσματος μπορεί να υδρολύσει λιπαρά οξέα μέχρι και 9 ατόμων άνθρακα καθώς και οξειδωμένα φωσφολιποειδή. Η δραστικότητα της είναι ανεξάρτητη μετάλλων.

Η ενζυμική δραστικότητα της PAF-AH εντοπίζεται κατά τα 2/3 στις LDL λιποπρωτεΐνες και κατά το 1/3 στις HDL λιποπρωτεΐνες. Κυτταρική πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι

κυρίως τα λευκοκύτταρα του αίματος όπως τα μακροφάγα αλλά και τα ηπατοκύτταρα. Η δραστηριότητα της πλασματικής PAF-AH μπορεί να διαφέρει μέχρι και 5 φορές σε ένα πληθυσμό υγιών ανθρώπων. Το 60% αυτών των διαφορών οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της PAF-AH μπορεί να είναι αυξημένα ή μειωμένα σε διάφορες ασθένειες. Αυξημένη δραστηριότητα παρατηρείται κυρίως σε ασθένειες που έχουν φλεγμονώδη αίτια όπως για παράδειγμα υπέρταση, αγγειακές παθήσεις, ισχαιμίες, εγκεφαλικά επεισόδια, διαβήτη, ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.α.. Μειωμένα επίπεδα PAF-AH παρατηρούνται σε ασθένειες όπως το άσθμα, συστηματικός ερυθρελάτης, λήκος, σπληνίτις, νόσος Crohns κ.α.

Γενικότερα, η πλασματική PAF-AH δρα ως ένας ανιχνευτής (scavenger) όλων των προφλεγμονωδών φωσφολιποειδών στα θηλαστικά και με αυτό τον τρόπο παίζει ρυθμιστικό ρόλο στους μηχανισμούς της φλεγμονής απενεργοποιώντας τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή.

4.4.2.3.2. Η ενδοκυτταρική ισομορφή II

Η ισομορφή αυτή εκφράζεται κυρίως σε ήπαρ και νεφρό και έχει Mr 40 KDa. Η πρωτοταγής δομή της έχει ομοιότητα 43% με αυτή του πλάσματος και παρουσιάζει παρόμοια εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα. Δεν περιέχει την χαρακτηριστική αλληλουχία των 17 πρώτων αμινοξέων που οδηγούν την πρωτεΐνη στην έκκριση. Ο πιθανότερος βιολογικός της ρόλος είναι η προστασία του κυττάρου από τον οξειδωτικό τραυματισμό. Το ένζυμο είναι N-μυριστυλιωμένο και μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες υδrolύοντας τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που σχηματίζονται εκεί. Φαίνεται λοιπόν ότι η ισομορφή αυτή αντιλαμβάνεται την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και αποτρέπει την οξείδωση των PL που οδηγεί σε τραυματισμό του κυττάρου.

4.4.2.3.3. Η ενδοκυτταρική ισομορφή Ib του εγκεφάλου

Ο εγκέφαλος περιέχει μικρά ποσά PAF-AH του πλάσματος αλλά μεγάλα ποσά ενδοκυτταρικής PAF-AH. Η ενδοκυτταρική μορφή του εγκεφάλου αποτελείται από τρεις διαφορετικές ισομορφές τις Ia, Ib και II. Η ισομορφή με το μεγαλύτερο ποσοστό είναι η Ib, η οποία είναι ετεροτριμερής αποτελούμενη από δύο καταλυτικές υπομονάδες ($\alpha 1$ και $\alpha 2$) και από μία ρυθμιστική β υπομονάδα, έχει δηλαδή δομή παρόμοια με αυτή των G-πρωτεϊνών. Μία

αλληλουχία 30 αμινοξέων κοντά στο ενεργό κέντρο έχει σημαντική ομολογία με την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα του PAF.

Οι α υπομονάδες δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση για ακέτυλο- ομάδα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Το α2/α2 ομοδιμερές έχει μεγαλύτερη εξειδίκευση για PAF και τα ανάλογα του με πολική κεφαλή φωσφοαιθανολαμίνης, ενώ το α1/α2 ετεροδιμερές υδρολύει καλύτερα το AAPA, γεγονός που δείχνει ότι η μορφή αυτή της PAF-AH μπορεί να ρυθμίζει και τη *de novo* βιοσύνθεση του PAF.

4.4.2.3.4. Η ενδοκυτταρική μορφή των ερυθροκυττάρων

Η ενδοκυτταρική μορφή των ερυθροκυττάρων έχει απομονωθεί από το κυτόπλασμα των ερυθροκυττάρων και αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες 25 kDa. Είναι ανεξάρτητη Ca^{2+} , υδρολύει PAF και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, απαιτεί αναγωγικά αντιδραστήρια για την μέγιστη δραστηριότητα της και είναι ευαίσθητη στην πρωτεόλυση. Η ύπαρξη δραστηριότητας PAF-AH σε κύτταρα που δεν παράγουν και δεν ενεργοποιούνται από τον PAF, όπως είναι τα ερυθροκύτταρα, οφείλεται στον αντιοξειδωτικό της ρόλο αφού υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που παράγονται στα ερυθροκύτταρα όταν αυτά εκτίθενται σε ισχυρά οξειδωτικά περιβάλλοντα.

4.5. Υποδοχέας PAF^[64]

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του μέσω της σύνδεσης του σε ειδικό υποδοχέα στη μεμβράνη των κυττάρων. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται, όχι μόνο στην επιφάνεια, αλλά και σε ενδοσώματα ενδοθηλιακών κυττάρων γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του PAF ως ενδοκυτταρικού μεσολαβητή.

Οι πρωτεΐνες του υποδοχέα, που κωδικοποιούνται στον άνθρωπο και το ινδικό χοιρίδιο, είναι απλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες 342 αμινοξέων και έχουν Mr 39 kDa. Μία ομάδα εννέα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, κοντά στο καρβοξυτελικό κυτοπλασματικό άκρο, είναι πιθανές περιοχές φωσφορυλίωσης από κινάσες υποδοχέων G πρωτεϊνών.

Το mRNA εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς, η κατανομή της έκφρασης όμως διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί για κάθε ιστό άλλα και για κάθε οργανισμό που ρυθμίζουν την έκφραση του υποδοχέα του PAF.

4.6. Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος PAF^[65]

Η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του προκαλεί την ενεργοποίηση πορειών στο εσωτερικό του κυττάρου που οδηγούν στον σχηματισμό ή στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών μηνυματοφόρων μορίων όπως Ca^{2+} , cAMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), διακυλογλυκερόλη (DAG), αραχιδονικό οξύ, τα οποία με την σειρά τους προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου. Στην ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεσολαβούν G πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με τον υποδοχέα του PAF. Το είδος του μηχανισμού μεταγωγής σήματος εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση ενώ πολλές φορές η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί παραπάνω από ένα μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

4.7. Φυσιολογικές δράσεις του PAF.

Ένας από τους πρωταρχικούς ρόλους του PAF είναι η επαγωγή ενδοκυτταρικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, συντίθεται από μια πληθώρα κυττάρων, προσδένεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς άλλων κυττάρων, τα ενεργοποιεί και μεταβάλλει το φαινότυπό τους. Εκτός από τη διακυτταρική του δράση, του έχει αποδοθεί επίσης αυτοκρινής και ενδοκρινής δράση με τη δεύτερη να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς ^[14].

Όσον αφορά την ενδοκυτταρική του δραστηριότητα, αυτή ανιχνεύεται στα αγγειακά και φλεγμονώδη συστήματα, συμπεριλαμβάνοντας τη μεταφορά μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, του γαστρεντερικού, του ενδοκρινικού συστήματος και άλλων οργάνων ^[14].

Πολυάριθμοι μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση της διακυτταρικής επαγωγής σήματος μέσω του PAF. Αυτοί περιλαμβάνουν τα αυστηρά ελεγχόμενα συνθετικά του μονοπάτια, ρύθμιση της έκθεσης και της βιολογικής διαθεσιμότητας του PAF, έκφραση του υποδοχέα του ειδική για κάθε κύτταρο, ομόλογη ή ετερόλογη απευαισθητοποίηση του υποδοχέα και ταχύτατη αποικοδόμηση του PAF από εξωκυτταρικές ή ενδοκυτταρικές ακετυλοϋδρολάσες.

Όλες οι παραπάνω ρυθμιστικές διεργασίες έγκεινται στην εξειδικευμένη λειτουργικότητα του PAF ως ένα διακυτταρικό μηνυματοφόρο μόριο ενώ ο αριθμός τους αποτελεί φυσική απόρροια της ανάγκης για ακριβή έλεγχο των βιολογικών του δραστηριοτήτων. Συνεπώς, η ανεπαρκής ή η διαταραγμένη μεταγωγή σήματος μέσω του PAF μπορεί να αντικατοπτρίζει ένα μηχανισμό νόσου ^[14].

Πίνακας 4.1. Δράσεις του PAF σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς ^[390].

<i>Είδος κυττάρου/ιστού</i>	<i>Δράσεις</i>
<i>Αιμοπετάλια</i>	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
<i>Ουδετερόφιλα</i>	Αποκοκκίωση, συσσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών
<i>Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα</i>	Συσσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, παραγωγή IL-1, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων
<i>Ηωσινόφιλα</i>	Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, σύνθεση LTC ₄ , παραγωγή υπεροξειδίων, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, σύνθεση IL-8, πολυμερισμός ακτίνης
<i>Λεμφοκύτταρα</i>	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2
<i>Ενδοθηλιακά</i>	Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητα με τα ουδετερόφιλα
<i>Νευρώνες</i>	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca ²⁺ , ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun, έκκριση προλακτίνης
<i>Σπερματοζωάρια</i>	Αύξηση κινητικότητας, αύξηση της διεισδυτικότητας τους στον τράχηλο της μήτρας
<i>Πρωτόζωα</i>	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβολή στην σύσταση των λιποειδών
<i>Φυτικά κύτταρα</i>	Ρύθμιση δραστηριότητας H ⁺ ATPασών, επίδραση στο φωτοσύστημα II των θυλακοειδών
<i>Ήπαρ</i>	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση έκκρισης γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος

<i>Πνεύμονας</i>	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητας του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα
<i>Καρδιά</i>	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών
<i>Εντερο</i>	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

Πίνακας 4.2. Δράσεις του PAF *in vivo* ^[390].

Βρογχόσπασμος

Θρομβοπενία, ουδετεροπενία, βασεοφιλοπενία

Σηπτικό σοκ

Μεσολαβητής του σηπτικού σοκ που επάγεται από βακτηριακές λοιμώξεις και χορήγηση ενδοτοξίνης

Αναφυλακτικές αντιδράσεις

α) *Στον αναπνευστικό*: Μείωση αναπνευστικής συχνότητας, βρογχόσπασμο, αύξηση πνευμονικών αντιστάσεων, αύξηση της ενδοτικότητα του πνεύμονα, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος. Μεσολαβητής του άσθματος

β) *Στο κυκλοφοριακό*: Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης

Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα

Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης (υπόταση), μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων

Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες

Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκληρώσεως

Επίδραση στο πεπτικό σύστημα

Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία

Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας

Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής

Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης

Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού

Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία

Μεσολαβητής της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραυματισμού των νευρώνων σε ισχαιμικές καταστάσεις

Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και έκκριση ορμονών, ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροπεπτιδίων
Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος (retrograde) μεσολαβητής

Επίδραση στο ανοσολογικό

Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση, είτε άμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα λευκοκύτταρα και την παραγωγή εικοσανοειδών από αυτά.

Μεσολαβητής της οξείας απόρριψης των μοσχευμάτων

5. Ιντερλευκίνη- 1

5.1. Γενικά

Η IL-1 αποτελεί την πρότυπη πολυλειτουργική και προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που παράγεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και άλλα κύτταρα^[66]. ως απάντηση σε μια πληθώρα ερεθισμάτων και αντικατοπτρίζει τα πρώτα στάδια αντίδρασης του οργανισμού σε κάποιο παθογόνο ερέθισμα^[67].

Επηρεάζει σχεδόν κάθε τύπο κυττάρου και συχνά σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες ή μεσολαβητές. Είναι μια φλεγμονώδης κυτταροκίνη και το όριο μεταξύ του κλινικού της οφέλους και της τοξικότητας στον άνθρωπο είναι μικρό^[68].

Μετά την παραγωγή και απελευθέρωσή της, στο μέρος της εισβολής/μόλυνσης, ενεργοποιεί γειτονικά κύτταρα και επάγει την παραγωγή και απελευθέρωση χημειοκινών (που προσελκύουν στο σημείο της μόλυνσης PMN, μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα), άλλων κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-6) οι οποίες ενεργοποιούν κύτταρα σε διάφορα όργανα. Συνεπώς, η IL-1 επάγει αμυντικούς μηχανισμούς μη ειδικής (φλεγμονώδης απόκριση) αλλά και ειδικής άμυνας^[67].

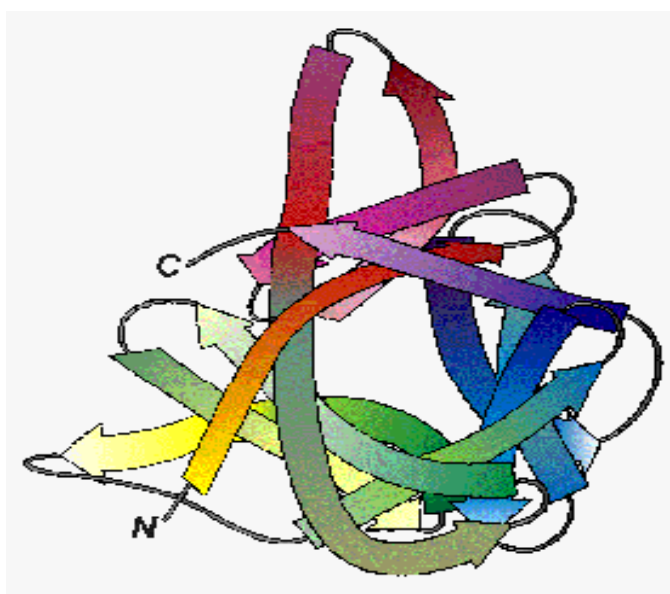
Η IL-1 είναι ζωτικής σημασίας για έναρξη και την εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης στη φλεγμονή. Εξαιτίας της πλειοτροπικής της δράσης και των αμυντικών διεργασιών που επάγει, η δραστηριότητά της ρυθμίζεται αυστηρά από ένα πολύπλοκο σύστημα ελέγχου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δυο είδη αναστολέων, το μόριο IL-1ra που λειτουργεί ως ανταγωνιστής του υποδοχέα και ένας δεύτερος υποδοχέας για την IL-1, ο IL-1R_{II} στον οποίο δεσμεύεται η IL-1 χωρίς να επάγει σήμα. Ρυθμιστική δράση ασκείται και στη δεσμευτική ικανότητα των υποδοχέων της IL-1 (IL-1R_I και IL-1R_{II}). Επιπρόσθετος έλεγχος είναι εφικτός μέσω της ρύθμισης των επιπέδων της διαλυτής μορφής των υποδοχέων και των διαφόρων ειδών της pro-IL-1^[67].

5.2. Δομή-Είδη

Η οικογένεια της ιντερλευκίνης 1 (IL-1) περιλαμβάνει μια ομάδα κυτταροκινών, δυο πρωτεϊνών αγωνιστών (IL-1α και IL-1β), εκ των οποίων η κάθε μια προέρχεται από πρόδρομες

πρωτεΐνες (pro-IL-1α και pro-IL-1β) μετά από ενζυματική επεξεργασία και τριών ειδών ανταγωνιστικές πρωτεΐνες (IL-1ra, icIL-1raI και icIL-1raII)^[67].

Η IL-1α και η IL-1β, που αποτελούν τις δυο ομόλογες μορφές της ιντερλευκίνης 1, είναι αγωνιστές ενώ η IL-1 Ra, ειδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα. Οι δυο ομόλογες μορφές α και β, που μπορούν να πυροδοτήσουν την κυτταρική απόκριση μετά από αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, επάγουν πολλά από τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής όπως ο πυρετός, η απόκριση οξείας φάσης, η συσσώρευση λευκοκυττάρων και η ιστική καταστροφή μετά από δράση σε μια πληθώρα κυττάρων^[66,67].

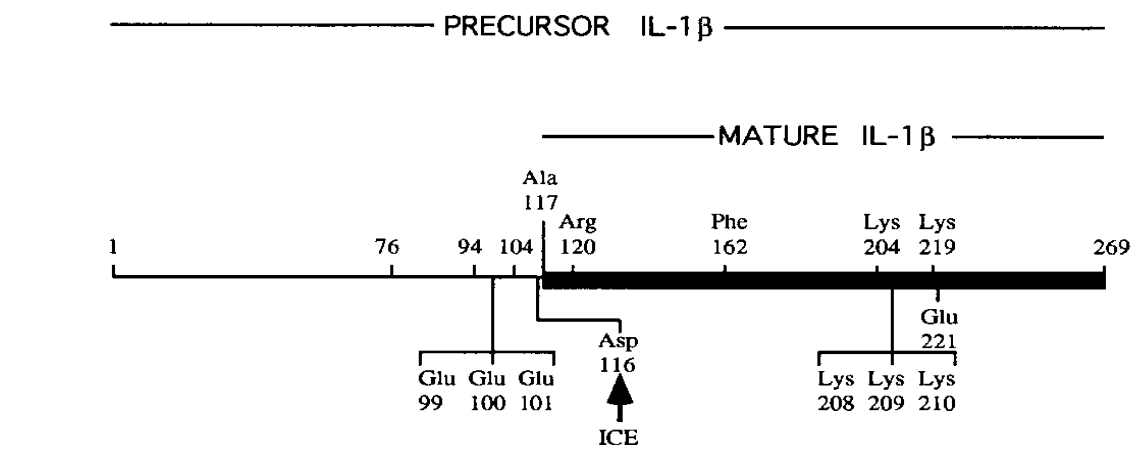


Σχήμα 5.1. Η τρισδιάστατη δομή της IL-1β^[67].

Οι ιντερλευκίνες 1α και 1β συντίθενται ως πρόδρομα μόρια χωρίς κύριες αλληλουχίες. Το μοριακό βάρος κάθε πρόδρομου μορίου είναι 31 kDa (proIL-1α και proIL-1β). Ενώ η proIL-1α και η IL-1α είναι και οι δυο βιολογικά ενεργές, η proIL-1β δεν παρουσιάζει βιολογική δραστηριότητα^[69]. Η επεξεργασία για το σχηματισμό της ώριμης μορφής των 17 kDa γίνεται με ειδικές κυτταρικές πρωτεάσες^[68]. Το υπεύθυνο ένζυμο για την ωρίμανση του πρόδρομου μορίου pro-IL-1β στην ώριμη μορφή των 17 kDa είναι το ICE (interleukin-1 converting enzyme). Η ωρίμανση της pro-IL-1α δεν διενεργείται από το ένζυμο αυτό^[67].

Οι πρωτεΐνες της IL-1 υπολείπονται σηματοδοτικών πεπτιδίων και για το λόγο αυτό δεν εκκρίνονται μέσω των κλασικών μονοπατιών και αποτελούν μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες.

Παρουσιάζουν 20% αναλογία σε επίπεδο αμινοξέων αλλά η συνολική δομή του σπαρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες^[67]. Αν και οι ιντερλευκίνες α και β έχουν αρκετές ομοιότητες, σε πολλούς τομείς, η IL-1β αποτελεί διαφορετικό μόριο από την 1α. Οι πλέον σημαντικές διαφορές έγκεινται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τη σταθερότητα του mRNA, τη μετάφραση, την ενδοκυτταρική πορεία, την έκκριση και την εξωκυτταρική τους πορεία^[68].



Σχήμα 5.2. Δομή πρόδρομου και ώριμου μορίου IL-1β^[67].

5.3. Οικογένεια υποδοχέων Toll/IL-1 (TIRs)^[70].

Οι υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση δομών που σχετίζονται με παθγόνα μόρια, οι Toll-υποδοχείς (TLR) και οι υποδοχείς για τις ενδογενείς κυτταροκίνες IL-1 και IL-18, μοιραζονται ένα παρόμοιο κυτταροπλασματικό μοτίβο, το τμήμα του υποδοχέα Toll/IL-1 (TIR).

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει δυο ομάδες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με παρόμοια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Ο σημαντικότερος λειτουργικός λόγος για την ομαδοποίηση των μορίων αυτών είναι επειδή εμπλέκονται στην προστασία ενάντια στις βακτηριακές, ιικές και πρωτοζωικές μολύνσεις του ενήλικα οργανισμού, των ζώων και των φυτών. Αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της άμυνας του ξενιστή.

Πέρα από τη βιολογική τους λειτουργία, η ομαδοποίηση έγκειται και σε δομική αιτία καθώς μοιράζονται ένα κοινό ενδοκυτταρικό μοτίβο μεγίστης σημασίας για τη μεταγωγή σήματος των υποδοχέων και των προσαρμοστικών αυτών μορίων. Το μοτίβο αυτό ονομάζεται

TIR ή TIR περιοχή. Με εξαίρεση τον υποδοχέα τύπου II της IL-1 (IR-1R), ο οποίος δεν επάγει τη μεταγωγή σήματος, σε όλους τους κυτταροπλασματικούς και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς περιλαμβάνεται αυτή η TIR περιοχή.

Η TIR οικογένεια αποτελείται από 3 υπο-οικογένειες ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων, την υπο οικογένεια των υποδοχέων IL-1, των MyD88 και των Toll υποδοχέων.

5.3.1. Υπο-οικογένεια υποδοχέα IL-1

Η οικογένεια του υποδοχέα της IL-1 περιλαμβάνει ένα σύνολο δομικά ομόλογων πρωτεϊνών με ζωτική σημασία για την επαγωγή της άμυνας του ξενιστή ενάντια στη μόλυνση, την αλλεργική και μη λοίμωξη, το τραύμα και το στρες. Επιπλέον, οι υποδοχείς συμβάλλουν στη γεφύρωση των ενδογενών και προσαρμοστικών αποκρίσεων του ανοσοποιητικού μέσω της επαγωγής του TNF-α, της IL-1, της IL-6, της IL-12 και της IL-18^[71].

Τα διάφορα μέλη χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας αρχέγονης ενδοκυττάριας περιοχής, της Toll/IL-1R. Η οικογένεια διακρίνεται σε δυο κατηγορίες: στα μέλη που αποτελούν διαμεμβρανικές και διαλυτές πρωτεΐνες με εξωκυτταρικές περιοχές που προσομοιάζουν στην ανοσοσφαιρίνη (Ig) και στις διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές τύπου 1 πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξωκυττάρια επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη. Στις Ig-περιοχές αποδίδονται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-υποστρώματος^[70,71].

5.3.2. Οικογένεια Toll-υποδοχέων (Toll-like receptor subfamily-TRL)^[70]

Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται μόρια με επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη. Επίσης, περιλαμβάνουν και μια κυτταροπλασματική TIR περιοχή στην οποία αποδίδεται και η δυνατότητά τους για μεταγωγή σήματος.

Στον άνθρωπο, οι υποδοχείς αυτοί έχουν ταυτοποιηθεί ως υποδοχείς για παθολογικές δομές. Οι κυρίαρχες μορφές είναι ο TLR2 και ο TLR4. Χρησιμεύουν περισσότερο στον οργανισμό σαν ανιχνευτές κινδύνου καθώς προσδένονται σε αυτούς πολλά διαφορετικά μόρια προερχόμενα από ιούς, βακτήρια κτλ.

B. Αλληλεπίδραση του ανταγωνιστή IL-1ra (απεικονίζονται με το μωβ κεφαλαίο γράμμα A) με τους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου. Η πρόσδεση του μορίου αυτού στους υποδοχείς αναστέλλει την πρόσδεση των αγωνιστών^[67].

Μέσα σε λίγα λεπτά μετά την πρόσδεση της στον αντίστοιχο υποδοχέα, η IL-1 επάγει μια πληθώρα βιοχημικών αντιδράσεων. Ωστόσο, δεν έχει ταυτοποιηθεί η αλληλουχία ή ο καταρράκτης των αντιδράσεων αυτών αλλά πολλά σήματα έχει βρεθεί ότι λαμβάνουν χώρα τα πρώτα 2 με 5 λεπτά. Πολλές από τις βιοχημικές αλλαγές, που σχετίζονται με τη μεταγωγή σήματος, πιθανότατα εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου. Μέσα στα δυο πρώτα λεπτά έχει παρατηρηθεί υδρόλυση του GTP, της φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοσερίνης ή της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης καθώς και απελευθέρωση κηραμιδίου. Γενικότερα, τα πρώτα 5 λεπτά έχουν σημειωθεί πολλαπλές φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών και ενεργοποίηση φωσφατασών ενώ ορισμένα από αυτά επάγονται από την απελευθέρωση ενδιαμέσων των λιπιδίων ^[68].

Μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα, λαμβάνει χώρα μια εκτεταμένη επαγωγή σήματος η οποία περιλαμβάνει κυρίως πολλαπλές και συνεχείς φωσφορυλιώσεις (ή αποφωσφορυλιώσεις) κινασών που οδηγούν στην πυρηνική μετάθεση μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποίηση παραγόντων που συμμετέχουν στη μετάφραση του mRNA ^[68].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η IL-1 δεν επιδρά στην υδρόλυση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης ή στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου. Χωρίς να παρατηρείται μια καθαρή αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου, τα γεγονότα που ακολουθούν της πρόσδεση στον υποδοχέα περιλαμβάνουν την υδρόλυση του GTP, χωρίς να παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της αδενυλικής κυκλάσης, υδρόλυση των φωσφολιπιδίων, απελευθέρωση κηραμιδίου και απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια με τη δράση της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂) μετά την ενεργοποίησή της. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί φωσφορυλιώσεις τυροσίνης ^[68].

Οι μηχανισμοί επαγωγής σήματος που λαμβάνουν χώρα μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου. Για παράδειγμα, η IL-1 αποτελεί αυξητικό παράγοντα και η μεταγωγή σήματος σχετίζεται με φωσφορυλίωση της σερίνης/θρεονίνης της κινάσης MAP p42/44 στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[68].

Εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού υποδοχέων ιντερλευκίνης (<200) που εκφράζονται στα κύτταρα και βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και, επιπλέον, του γεγονότος

ότι ελάχιστοι από τους υποδοχείς αυτούς (<10%) κινητοποιούνται για την έναρξη της βιολογικής απάντησης, συμπεραίνεται ότι η διαδικασία μεταγωγής σήματος είναι πολύ εξειδικευμένη και ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό^[69]. Η μεγάλη αυτή ενίσχυση οφείλεται στις πολλαπλές φωσφορυλιώσεις των πρωτεϊνικών κινασών. Οι φωσφορυλιώσεις και αποφωσφορυλιώσεις των μεταγραφικών παραγόντων καθιστούν το κύτταρο ικανό για γονιδιακή έκφραση η οποία καθορίζεται από την επίδραση της IL-1 επί των μεταγραφικών αυτών παραγόντων. Οι πολλαπλές φωσφορυλιώσεις αποτελούν και την αιτιολογία της ταυτόχρονης έκφρασης πολλών διαφορετικών γονιδίων^[68].

Η περιοχή TIR αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα για τη μεταγωγή σήματος των μελών ολόκληρης της TIR οικογένειας. Η απαλοιφή των κρίσιμων αμινοξέων του TIR τομέα ή ολόκληρου του τομέα στους υποδοχείς IL-1R και IL-1RAcP έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δυνατότητας για κυτταρική απόκριση στην IL-1. Ομοίως και την οικογένεια των TLRs^[70].

5.4.1. 1^ο Βήμα: η κινητοποίηση της IRAK-1 στο σύμπλοκο του υποδοχέα μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης^[70,71].

Το πρωταρχικό βήμα της μεταγωγής σήματος της οικογένειας IL-1R περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του υποστρώματος, του υποδοχέα και του συνυποδοχέα. Στα σύμπλοκα αυτά οι TIR περιοχές αλληλεπιδρούν επιφέροντας τροποποιήσεις των κυταροπλασματικών περιοχών. Συνεπώς, καθίσταται δυνατή η πρόσδεση του προσαρμοστικού μορίου MyD88 το οποίο κινητοποιεί τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης αλλά και η εμπλοκή του Tollip με τους TIR τομείς. Συγκεκριμένα, οι κινάσες που κινητοποιούνται είναι η IRAK -1, η IRAK-2, η IRAK-M και η IRAK-4. Η IRAK-1 μετατοπίζεται ταχύτατα στο ενεργό σύμπλοκο του υποδοχέα και αλληλεπιδρά με τον N-τελικό νεκρό τομέα μαζί με το MyD88. Το Tollip πιθανότατα αλληλεπιδρά με τον N-τελικό τομέα αποτελώντας τμήμα της IRAK-1.

Σε κατάσταση ηρεμίας, το Tollip δρα ως αναστολέας της IRAK-1 πιθανότατα εμποδίζοντας το διμερισμό της. Μετά την πρόσδεση της IL-1, το σύμπλοκο Tollip/IRAK-1 μετατοπίζεται στο ενεργό σύμπλοκο του IL-1R. Συνεπώς, οι νεκρές περιοχές της IRAK-1 και του MyD88 έρχονται κοντά.

5.4.2. 2^ο Βήμα: η αυτοφωσφορυλίωση της IRAK-1 και η αποκοπή της από το σύμπλοκο του υποδοχέα^[70,71].

Η IRAK-1 ταχύτατα αυτοφωσφορυλιώνεται ή/και φωσφορυλιώνεται στο ενεργό σύμπλοκο του υποδοχέα με αποτέλεσμα φωσφορυλίωση στην περιοχή της κινάσης. Η IRAK-4 έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την φωσφορυλίωση της IRAK-1. Έπειτα, αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα. Στο στάδιο αυτό είναι πιθανή η αλληλεπίδραση της IRAK-1 με τον TAB2.

5.4.3. 3^ο Βήμα: σχηματισμός του σηματοδότη IRAK/TRAF6 ^[70,71] .

Στο κυτταρόπλασμα, η IRAK-1 αλληλεπιδρά με τον TRAF6. Εν τω μεταξύ, η IRAK-1 αλληλεπιδρά μεταβατικά με τον μεμβρανικό TAB2, ένα προσαρμοστικό μόριο για την TAK1. Φαίνεται ότι η IRAK-1 εισάγει τον TAB2 σε ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τον TRAF6 μαζί με την TAK1 και την πρωτεΐνη ενεργοποίησης TAB1. Το πολυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο καθιστά δυνατό το σχηματισμό νέων αλυσίδων πολυ-ουβικιτίνης. Ο TRAF6, στο βήμα αυτό, δρα ως E3 λιγάση ουβικιτίνης.

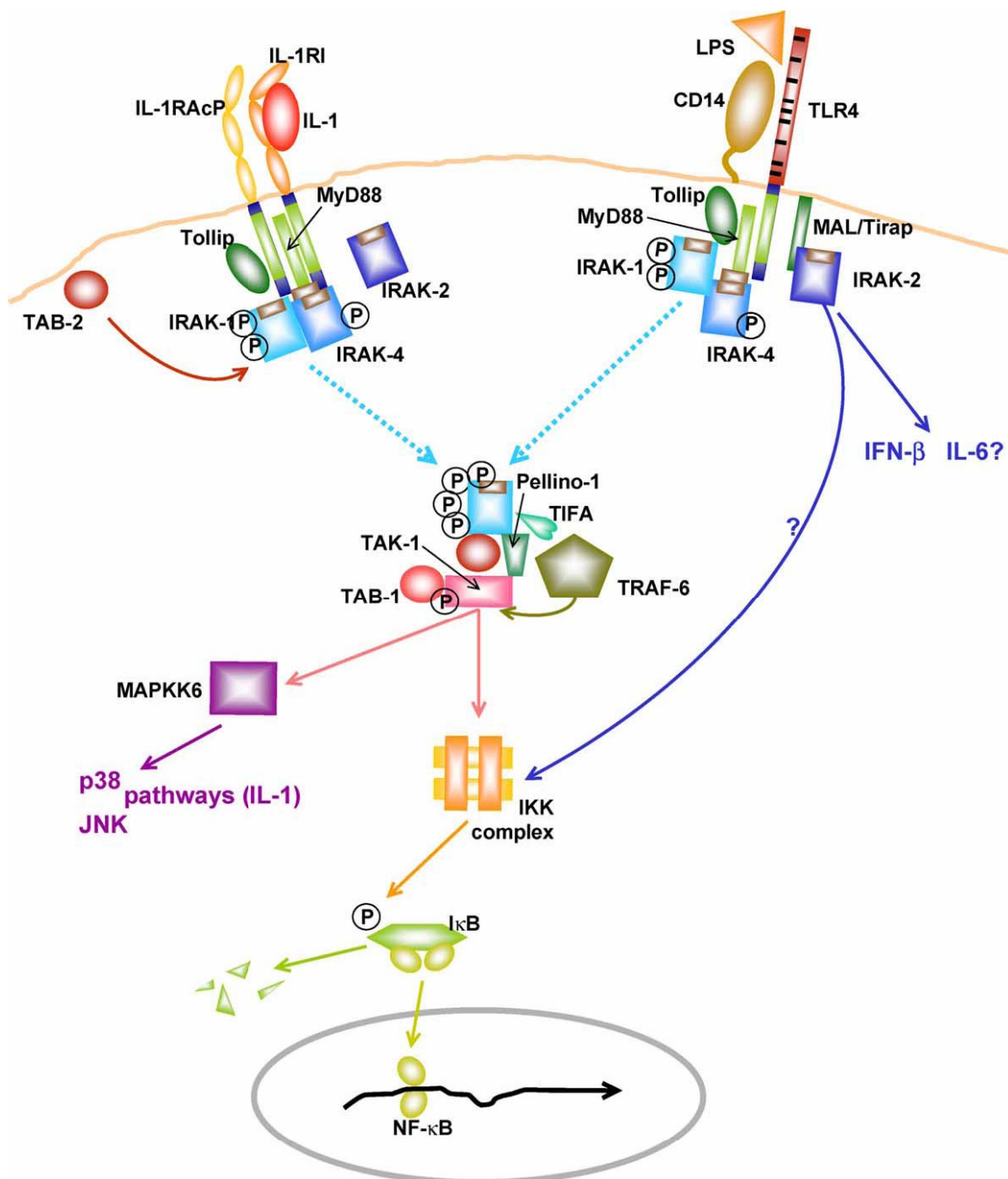
5.4.4. 4^ο Βήμα: Διεργασία μεταγωγής σήματος ^[70,71] .

Ο TRAF6 σε συνδυασμό με την ομάδα της πολυ-ουβικιτίνης, επάγει την πλήρη ενεργοποίηση της TAK1, η οποία ενεργοποιεί τον εαυτό της μέσω αυτοφωσφορυλίωσης. Έπειτα, φωσφορυλιώνει την IKKβ. Συνεπώς, ενεργοποιείται το μονοπάτι του NF-kB και το p38. Στη συνέχεια, το μόριο αυτό αποικοδομείται επιτρέποντας τη μετατόπιση του NF-kB στον πυρήνα και και την έκφραση φλεγμονωδών και ανοσολογικών γονιδίων. Η TAK-1 επίσης ενεργοποιεί τους παράγοντες JNK και AP-1.

Ο ρόλος της IRAK-1 είναι διττός: κατά πρώτον, δρα ως ικρίωμα για τον ολιγομερισμό του TRAF6, κατά δεύτερον, επάγει τη μετατόπιση του TAB2 στην TAK1 που πλέον αποκτά δράση συμπαράγοντα. Η απουσία του TRAF6 καθιστά αδύνατη τη μεταγωγή σήματος της TIR οικογένειας.

5.4.5. Τελικό Βήμα: η τύχη της IRAK-1 και ο τερματισμός της σηματοδότησης ^[70,71] .

Η τύχη της υπερφωσφορυλιωμένης IRAK-1 περιλαμβάνει την πρωτεολυτική αποδόμησή της. Μετά την υπερφωσφορυλίωσή της, τμήματα της IRAK-1 αποσπώνται πρωτεολυτικά. Συνεπώς, η πολυπρωτεϊνική σηματοδοτική κάλυψη του TRAF6 παύει να υφίσταται και ο TRAF6 χάνει τη δράση του περιορίζοντας τη διάρκεια στην απόκριση του κυττάρου στο ερέθισμα της IL-1 (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.4. Απεικόνιση της πορείας μεταγωγής σήματος που ακολουθείται από τα μέλη της IL-1/TLR υπεροικογένειας^[71].

5.5. Μεταγωγή σήματος που δεν σχετίζεται άμεσα με το σύστημα MyD88/IRAK/Tollip^[70].

Ο κεντρικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος περιλαμβάνει 3 γεγονότα: την ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK που οδηγεί σε μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα, την ενεργοποίηση του μονοπατιού του JNK που οδηγεί στη φωσφορυλίωση των συμπλόκων AP-1 και την ενεργοποίηση του μονοπατιού του p38 το οποίο σχετίζεται με τη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA.

Ωστόσο, η IL-1 και η LPS ενεργοποιούν και άλλα μονοπάτια. Η IRAK λειτουργεί διπλά στο σύμπλοκο του IL-1R. Αφενός, δρα προσαρμοστικά και ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον TRAF6, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα. Ο δεύτερος τρόπος δράσης της όμως είναι ανεξάρτητος από τις σηματοδοτικές της ικανότητες.

5.5.1. Συμμετοχή της PI-3-K στη μεταγωγή σήματος της TIR οικογένειας^[70].

Σύμφωνα με το μονοπάτι αυτό, η IL-1 επάγει την ενεργοποίηση της PI-3-K η οποία με τη σειρά της επιφέρει την ενεργοποίηση της PKB. Η PI-3-K έχει βρεθεί ότι μετατοπίζεται στον πυρήνα.

5.5.2. Συμμετοχή σφιγγομυελινασών στη μεταγωγή σήματος της IL-1^[69,70].

Η IL-1 έχει βρεθεί ότι επάγει την παραγωγή κηραμιδίου ενεργοποιώντας τη δράση της σφιγγομυελινάσης σε ορισμένα κύτταρα. Ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

Η σφιγγομυελίνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης υδρολύεται από την σφιγγομυελινάση προς κηραμίδιο, ένα δεύτερο μηνυματοφόρο μόριο το οποίο διαπερνά τη διπλοστιβάδα και ενεργοποιεί την κινάση CAPK και τη φωσφατάση CAPP.

5.5.3. Εμπλοκή της PKC στη μεταγωγή σήματος της IL-1^[69,70].

Το κηραμίδιο, όπως και το p62 προσαρμοστικό μόριο που αλληλεπιδρά με την περιοχή TRAF του TRAF6, ενεργοποιεί άμεσα την πρωτεϊνική κινάση Cζ. Η IL-1 εξαρτώμενη ενεργοποίηση της κινάσης ενδεχομένως να οφείλεται στην απελευθέρωση διαγλυκερόλης μετά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης.

Οι G πρωτεΐνες, η εξαρτώμενη από το cAMP κινάση (PKA) και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) έχουν βρεθεί ότι ενεργοποιούνται από την ιντερλευκίνη 1 σε διάφορα είδη κυττάρων. Ωστόσο, τα ευρήματα για τους τρεις αυτούς επαγωγείς σήματος είναι αντιφατικά.

Η ενεργοποίηση της PKC ακολουθείται από την κυτταρική ανακατανομή της και την πρόσδεση σε PL της εσωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Συνέπεια της ενεργοποίησής της αποτελεί η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NFκB και NF-IL6, οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιηθούν και άμεσα από την IL-1.

5.5.4. Εμπλοκή των φωσφολιπασών στη μεταγωγή σήματος της IL-1^[69,70]

Τα τελευταία 10 χρόνια υποστηρίζεται η ενεργοποίηση διαφόρων ειδών φωσφολιπασών από την IL-1 με επακόλουθη απελευθέρωση κηραμιδίου και DAG. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στην ενεργοποίηση κινασών και φωσφατασών που εμπλέκονται στη μεταγωγή δευτέρων σημάτων. Ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος.

Η IL-1 έχει βρεθεί ότι επάγει την παραγωγή της PGE₂ σε πολλά διαφορετικά κύτταρα και η δράση αυτή εξαρτάται από την PLA₂ και την απελευθέρωση AA από τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

5.5.5. Εμπλοκή των κινασών καζεΐνης στη μεταγωγή σήματος της IL-1^[69]

Η IL-1 ενεργοποιεί την κινάση II της καζεΐνης. Επιπρόσθετα, μια δεύτερη κινάση ικανή για φωσφορυλίωση της καζεΐνης ενεργοποιείται από την IL-1 και τον TNF.

5.6. Δράσεις IL-1^[66, 68, 69, 71]

Στην IL-1 έχουν αποδοθεί ποικίλες επιδράσεις σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Επίσης, ασκεί επίδραση και σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η κυτταρική δράση της ιντερλευκίνης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω της αύξησης της παραγωγής IL-2 από αυτά. Επιπλέον, ενισχύει την παραγωγή άλλων κυτταροκινών, πρωτεΐνσών και προσταγλανδινών από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρούνται και στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου καθώς επίσης σημειώνεται άμεση επαγωγή της παραγωγής πρωτεϊνών οξείας φάσης

από τα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι επιδρά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του θύμου αδένος, στους οστεοκλάστες, στον συνδετικό ιστό αλλά επιδρά και στην ανάρρωση από τραύμα, στη ρύθμιση της όρεξης, του ύπνου και σε νευρικές διαταραχές όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, το σύνδρομο Down και η ασθένεια Alzheimer. Οι συνηθέστερες βιολογικές δράσεις της ιντερλευκίνης 1 παρατίθενται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Βιολογικές Δράσεις της IL-1^[68].

Δράσεις συστηματικά εγχυόμενης IL-1

Πυρετός, κοινωνική κατάθλιψη, ανορεξία

Υπόταση, ταχυκαρδία, γαλακτική οξέωση, καρδιομυοπάθεια

Αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντος μονοξειδίου του αζώτου, υπαμινοξεοναμία

Υπερινσουλιναιμία, υπογλυκαιμία, υπεργλυκαιμία

Τόνωση του υποθαλαμικού- υποφυσιακού- αδρενεργικού άξονα

Απελευθέρωση υποφυσιακών μονοαμινών και νευροπεπτιδίων

Ουδετεροφιλία, αυξημένα αιμοπετάλια, αυξημένη κυτταρική μάζα μυελού

Αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης

Μειωμένα επίπεδα σιδήρου αίματος, ψευδαργύρου, αυξημένη απέκκριση νατρίου

Υπερλιπιδαιμία, αυξημένος καταβολισμός μυικών πρωτεϊνών

Υπαλβουμιναιμία, μειωμένος μεταβολισμός φαρμακευτικών ουσιών

Αυξημένες μεταστάσεις

Αυξημένη μη ειδική αντίσταση στις μολύνσεις

Μαθησιακές δυσκολίες των απογόνων μετά από θεραπεία με IL-1 της μητέρας

Επιπτώσεις τοπικά εγχυόμενης IL-1

Διήθηση ουδετερόφιλων σε κλειδώσεις κουνελιών

Αυξημένος καταβολισμός πρωτεογλυκάνων σε κλειδώσεις κουνελιών

Αγγειογένεση στον πρόσθιο χώρο του ματιού

Κυτταρική διήθηση και επαγωγή κυτταροκινών σε εγκεφαλικές μικρές κοιλίες

Εισροή ουδετερόφιλων και αλβουμίνης στον πνεύμονα μετά από ενδοτραχειακή ενστάλλαξη

Αλλαγές στις ανοσολογικές αποκρίσεις

Αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών

Αυξημένη παραγωγή λεμφοκυττάρων

Αύξηση αριθμού υποδοχέων IL-2

Δημιουργία κλώνων των T κυττάρων τύπου 2
Πτώση της αντίστασης σε πρωτεϊνικά αντιγόνα
Ενίσχυση της μιτωτικής απόκρισης της σπλήνας στο LPS

Επιπτώσεις της IL-1 σε καλλιέργειες κυττάρων ή ιστών

Αυξημένη έκφραση ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1
Κυτταροτοξικότητα των β νησιδίων του παγκρέατος
Περιορισμός της παραγωγής θυρεογλοβουλίνης των κυττάρων του θυρεοειδούς αδένος
Απελευθέρωση ασβεστίου από τα οστά, καταστροφή αρθρικών χόνδρων
Αυξημένη απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος, εικοσανοειδών και προστανοειδών
Αυξημένη παραγωγή βλέννης και εισροής χλωρίου στα κύτταρα του εντέρου
Ενισχυμένη εισροή χλωρίου στις εγκεφαλικές συνάψεις
Πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών, των μαλακών μυϊκών κυττάρων και των μεσαγγειακών κυττάρων
Περιορισμός ανάπτυξης των θυλακίων των μαλλιών
Αυξημένη σύνθεση κορτικοστερόνης από τα επινεφρίδια
Αυξημένη έκφραση του HIV-1

6. IL-1β και μεσαγγειακά κύτταρα

6.1. Εισαγωγή

Το μεσάγγειο κατέχει κυρίαρχη θέση στην παθογένεση της σπειραματονεφρίτιδας. Το κύτταρο αυτό είναι μεταβολικά ενεργό και παράγει πληθώρα κυτταροκινών οι οποίες δρουν ως αυτακοειδή. Τέτοιες κυτταροκίνες παράγονται και απελευθερώνονται και από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα τα οποία διηθούν το σπείραμα στη νεφρίτιδα ^[72].

Οι μεταβολές της σύστασης της ΕΘΟ επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη συμπεριφορά των MC. Η παραγωγή της ΕΘΟ από τα μεσαγγειακά κύτταρα καθορίζεται από την αυτοκρινή ή την παρακρινή δράση ορισμένων κυτταροκινών όπως η IL-1, ο PDGF και ο TGFβ ^[73].

Τα MC παράγουν αλλά και αποκρίνονται σε μια πληθώρα πολυπεπτιδικών κυτταροκινών. Έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διαλυτούς μεσολαβητές οι οποίοι δρουν είτε παρακρινικά, εκκλύοντας ή ενεργοποιώντας φλεγμονώδη κύτταρα (αιμοπετάλια, μονοκύτταρα-μακροφάγα) όπως για παράδειγμα η IL-6 και η IL-8, είτε αυτοκρινικά πάνω στα ίδια τα MC τον πολλαπλασιασμό τους και την αύξηση της ΕΘΟ όπως συμβαίνει με την IL-1 ^[74].

6.2. Παραγωγή της IL-1 από τα MC

Τα MC έχει βρεθεί ότι παράγουν έναν παράγοντα που ενεργοποιεί τα κύτταρα του θύμου αδένος (MC-TAF) ο οποίος φυσικοχημικά και βιολογικά προσομοιάζει την προερχόμενη από τα μακροφάγα IL-1 ^[75].

Η έκθεση των μεσαγγειακών κυττάρων ανθρώπινης προέλευσης στο πλάσμα και σε έναν παράγοντα που ενεργοποιεί το σύστημα του συμπληρώματος οδηγεί στην απελευθέρωση διαφόρων μορίων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η IL-1. Η IL-1 στη συνέχεια ενεργοποιεί την απελευθέρωση της προσταγλανδίνης ^[76].

Έναν σημαντικό παράγοντα που επάγει την σύνθεση της IL-1 αποτελούν τα IC ^[77]. Αυτά ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό γενικότερα τη λειτουργία των MC και ενεργοποιούν τις φλεγμονώδεις απαντήσεις του νεφρού ^[78].

Τα κυτταρικά τοιχώματα των gram – βακτηρίων περιέχει διάφορα βιολογικά ενεργά συστατικά όπως το LPS, οι λιποπρωτεΐνες και η πρωτεΐνη 1. Κάθε ένα από τα συστατικά αυτά μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή της IL-1 από τα MC. Ακολούθως, απελευθερώνονται αγγειοδραστικές PGs και πεπτιδικά μιτογόνα μόρια που σχετίζονται με τις πειραματικές αιμοδυναμικές τροποποιήσεις και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [79]. Το σπείραμα μετά από κάποιο βακτηριακό ερέθισμα μπορεί να απελευθερώσει τοπικά IL-1 [80].

Η IL-1 δρα ως παράγοντας ανάπτυξης, αυτοκρινικά και παρακρινικά. Η τοπική έκκρισή της αποτελεί σημαντικό παράγοντα στις πειραματικές ασθένειες και χαρακτηριστικό του είναι ο πολλαπλασιασμός των MC και η αύξηση της ΕΘΟ [81].

Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι τα MC δεν παράγουν IL-1β [82] ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι η παραγωγή αυτή είναι πραγματική και πως η IFN-γ και η ET1 την ενισχύει σε αντίθεση με τη λοβαστατίνη που την αναστέλλει [83-85].

6.3. Η IL-1 σε φλεγμονώδεις καταστάσεις

Στην πειραματοσκλήρυνση την προκαλούμενη από ανοσοσυμπλέγματα, δεν υπάρχει στο μεσάγγειο IL-1, IL-2, TNF-α, και IFN-γ [86].

Η υψηλή παραγωγή IL-1 σημειώνεται στα πρώτα στάδια της πειραματονεφρίτιδας προερχόμενη από τα MC ή/και τα μακροφάγα και συμβάλλει στην εξέλιξή της σε πειραματοσκλήρυνση [87].

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της μεσαγγειακής νεφροπάθειας IgM παίζει και ο αυξημένος ρυθμός παραγωγής του mRNA της IL-1β [88].

Στην περίπτωση των ανοσοσυμπλεγμάτων IgA-IC, επάγεται ο πολλαπλασιασμός των MC και η παραγωγή ανοσολογικών/χυμικών μεσολαβητών όπως η IL-1, η IL-6, ο PAF καθώς επίσης και υπεροξειδία [89].

6.4. Έκφραση του γονιδίου της IL-1 από το μεσάγγειο

Τα MC που έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν μπορούν να εκφράσουν το mRNA που κωδικοποιεί και την IL-1α και την IL-1β. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στην

σπειραματική νόσο ενδεχομένως να οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου και την παραγωγή της πρωτεΐνης της IL-1 εξαιτίας της δράσης του πεπτιδικού παράγοντα ανάπτυξης PGF ^[90].

Ανασταλτικό παράγοντα στην έκφραση των φλεγμονωδών γονιδίων αποτελεί η μανιδιπίνη ^[91].

6.5. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της IL-1 στα MC

Η ακυλίωση ορισμένων πρωτεϊνών με τα λιπαρά οξέα μυριστικό ή παλμιτικό αποτελεί απαραίτητη μεταμεταφραστική τροποποίησή τους. Το λιπίδιο A, το βιολογικά ενεργό συστατικό της βακτηριακής ενδοτοξίνης, ενεργοποιεί τη σύνθεση και την επακόλουθη ακυλίωση με μυριστικό των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών των μονοκυττάρων και του μεσαγγείου. Η ακυλίωση του πρόδρομου μορίου της IL-1 διευκολύνει την προσέλευσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ^[92].

6.6. Δράσεις της IL-1 στα MC

Η IL-1 σε συνδυασμό με την IL-6 μπορεί να επιφέρει αύξηση του πολλαπλασιασμού των MC καθώς και αυξημένη παραγωγή χυμικών/ανοσολογικών μεσολαβητών και ανιόντων υπεροξειδίου ^[93].

Συμμετέχει στην εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου του ICAM-1 ^[94].

6.6.1. Προσκόλληση κυττάρων

Η IL-1 αυξάνει την προσκόλληση των φαγοκυττάρων πάνω στα MC και αυτό είναι κάτι που μάλλον οφείλεται στην επαγόμενη από τις κυτταροκίνες αυξημένη σύνθεση της VCAM-1 ^[95].

6.6.2. Έκφραση αντιγόνων

Τα ενεργοποιημένα MC συμπεριφέρονται ως κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα επάγοντας με τον τρόπο αυτό ανοσολογικές αντιδράσεις στο σπείραμα καθώς μπορούν ακόμη και να αντιδρούν με τα T λεμφοκύτταρα ^[96-98].

6.6.3. Απόπτωση

Στην IL-1β έχει αποδοθεί κυτταροπροστατευτική δράση και συγκεκριμένα ότι επάγει την κυτταρική απόπτωση η οποία προκαλείται από τα παραγόμενα οξειδωτικά ^[99]. Ως δεύτερα μηνύματα στο μηχανισμό της απόπτωσης έχει ταυτοποιηθεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η υπεροξείδωση των λιπιδίων ^[100]. Ωστόσο, η κυτταροκίνη αυτή επάγει και την παραγωγή παραγόντων που αναστέλλουν την απόπτωση των MC, όπως συμβαίνει με το NO ^[101].

6.6.4. Έκφραση/Εκκριση πρωτεϊνών

Η ικανότητα των καλλιεργούμενων MC να παράγουν διαλυτούς παράγοντες πιθανότατα σχετιζόμενους με τους μηχανισμούς της φλεγμονής και της ανοσίας, έχει μελετηθεί ευρύτατα. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στη μελέτη των MC μετά από ενεργοποίησή τους με κάποια κυτταροκίνη ή με συνδυασμό αυτών (Πίνακες 6.1 και 6.2.).

Η IL-1β ρυθμίζει την έκφραση της 5'-νουκλεοτιδάσης στην πλασματική μεμβράνη των MC που βρίσκονται σε καλλιέργεια ^[102].

6.6.5. Μεταβολισμός λιπιδίων

Η IL-1 ενεργοποιεί την lyso-PA AT στα MC και εκείνη με τη σειρά της συμμετέχει στην PA από τα PL της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα PA αποτελούν σημαντικά μηνυματοφόρα μόρια της IL-1 μέσω της ενεργοποίησης της lyso-PA AT και μιας G-πρωτεΐνης ^[195].

Επιπλέον, η IL-1 επάγει τη δραστικότητα της PLD η οποία υδρολύει την PE παράγοντας τα PA ^[196].

6.6.6. Σύνθεση θεμέλιας ουσίας

Μεταξύ των κυτταροκινών και του σπειράματος λαμβάνουν χώρα σύνθετες αλληλεπιδράσεις μερικές εκ των οποίων περιλαμβάνουν τη ΕΘΟ και ειδικότερα, τα βιοσυνθετικά και αποικοδομητικά μονοπάτια αυτής ^[197]. Γενικότερα, έχει βρεθεί ότι η IL-1 τροποποιεί την παραγωγή και την έκκριση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών της ΕΘΟ (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο IV, βιτρονεκτίνη, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνη και ακτίνη). Αυτό έχει ως συνέπεια τη μεταβολή του μεγέθους των πόρων, τις ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας και της διηθητικής ικανότητας των MC ^[198].

Η IL-1 ενισχύει την σύνθεση των μακρομοριακών μορφών των προσταγλανδινών και την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τέτοιου είδους μεταβολές οδηγούν σε μη φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων συστατικών της σπειραματικής βασικής μεμβράνης και αποδεκατίζουν την υπερδιηθητική μονάδα του σπειράματος ^[199].

Η IL-1 επάγει και τη μετάφραση του mRNA για τους τύπους (I) και (IV) του κολλαγόνου και την φιμπρονεκτίνη ^[200].

Πίνακας 6.1. Επίδραση IL-1 στην παραγωγή και τη δραστικότητα πρωτεϊνών/ενζύμων στα MC

Κυτταρ/ν η	Δράση	Επαγωγή της δράσης της	Αναστολή της δράσης της	Συμπα -ράγο- ντας	Αναφορά
IL-1	↑ MHC II	-	-	-	103
IL-1β	↑ PLA ₂	Φορσκολίνη	Κυκλοσπορίνη, ασπιρίνη, τετρακυκλίνη, δεξαμεθαζόνη, PDGF, TGFβ, PDTC, BMP7, λοβαστατίνη	-	104-112
IL-1β	↑ MCP1	IFNγ	Αντιοξειδωτικά, εξωγενές NO, PGs	p38	113-123
IL-1β	↑ GMCSF	TNFα	-	-	113

	↑ MCSF				
IL-1β	↑ IL-6 ↑ IL-8	-	-	-	125-129
IL-1β	↑ λιποξυγενάση	TNFα	-	-	130
IL-1, IL-1β	↑ ICAM1 ↑ VCAM1	-	SIN1	-	131-134
IL-1	↑ C3	-	-	-	135, 136
IL-1β	↑ Κολλαγενάσης II ↑ Συσσώρευσης PRO	-	-	-	137, 138
IL-1, IL-1 ^α	↑ KC	-	-	-	139, 140
IL-1β	↑ LIF	-	-	-	141, 142
IL-1β	↑ τζελατινάσης	-	IL-13	-	143
IL-1, IL-1β	↑ COX II	NO	15d-PGJ2, γενιστεΐνη, αντιοξειδωτικά	-	144-150
IL-1β	↑ τρανζίνης	-	ηπαρίνη	-	151
IL-1	↑ ενεργοποίησης 5'- νουκλεοτιδάσης	-	-	-	152
IL-1 ^α	↑ παράγοντα B	-	-	-	153
IL-1, IL-1β	↑ COX I	-	PGE2	-	154, 155
IL-1β	↑ NGF	-	PDGF	-	157
IL-1β	↑ MMP-9		-	-	158
IL-1, IL-1β	↑ t-PA	-	TGF-β	-	159, 160
IL-1 ^α	↑ απόπτωσης	-	-	-	161
IL-1β	↑ ρεδοκτάσης 11βOHD51	-	-	-	162

IL-1β	↑ ADM	-	-	-	163, 164
IL-1β	↑ PGE2	IGF1, ινσουλίνη	Κυκλοσπορίνη, IL-4, δεξαμεθαζόνη, αλδοστερόνη	-	164-168
IL-1β	↑ PGH2	-	-	-	169
IL-1, IL-1β	↑ NO	IGF1, ινσουλίνη	-	-	164, 170
IL-1β	↑ φωσφορυλάσης των 3 MAPKs	-	-	-	171
IL-1	↑ AP2	-	-	-	172
IL-1β	↑ Fca/muR	-	-	-	173
IL-1β	↑ αSMA	-	-	-	174
IL-1, IL-1β	↑ MMP-9	ATP	Δεξαμεθαζόνη, PPARα	-	175-177
IL-1β	↑ HMMP-13	-	-	-	178
IL-1β	↑ TF	-	-	-	178
IL-1	↑ εξωκίνησης	-	-	-	179
IL-1β	↑ FasL	-	-	-	180
IL-1β	↑ PON=> ↓ PGIS	-	-	NOS2	181

Πίνακας 6.2. Επίδραση IL-1 στην έκφραση γονιδίων

Κυτταρ/νη	Δράση	Επαγωγή της δράσης της	Αναστολή της δράσης της	Συμπαράγοντας	Αναφορά
IL-1	↑ mRNA PUMP1	-	-	-	182
IL-1	↑ mRNA LRP	-	-	-	183
IL-1	↑ υποδοχέα IL1	-	-	-	184-186
IL-1	↑ mRNA C3	-	-	-	187, 136
IL-1β	↑ mRNA	-	-	-	188

	RANTES				
IL-1, IL-1 ^α	↑έκφραση γονιδίου KC	-	-	-	139, 140
IL-1, IL-1 ^β	↑ mRNA COX II	NO	15d-PGJ2, γενιστεΐνη, αντιοξειδωτικά	-	140, 145-150
IL-1 ^β	↑ mRNA GRO	-	γενιστεΐνη	-	189
IL-1 ^α	↑έκφραση γονιδίου στρομελυσίνης (MMP)	-	-	-	190
IL-1 ^β	↑ mRNA Fas	-	-	-	191
IL-1 ^β	↑έκφραση γονιδίου LDL	-	PPARα	-	192-194
IL-1 ^β	↑έκφραση γονιδίου ET	-	-	-	124

6.6.7. Σύνθεση NO

Το NO αποτελεί ένα πολυδιάστατο από άποψη λειτουργιών μηνυματοφόρο μόριο με μεγάλη σημασία για τη χαλάρωση των αγγείων, την επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και τη μικροβιακή δραστηριότητα. Ο σχηματισμός του NO από την L-αργινίνη καταλύεται από τη συνθετάση του NO (NOS). Τα MC αποκρινόμενα στην IL-1, είτε αυξάνουν την έκφραση και την παραγωγή των NOS, είτε οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ^[201].

Η IL-1 αποτελεί τη μοναδική κυτταροκίνη που επάγει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή του NO στα MC όπως φαίνεται από τον αυξημένο σχηματισμό NO και cGMP ^[202]. Η IL-1 πιθανότατα να το καταφέρνει αυτό μέσω ορισμένων τυροσινικών κινασών ^[203].

Τα επίπεδα του mRNA για τις NOS καθορίζονται από δυο μονοπάτια. Το ένα από αυτά φορά το cAMP και το άλλο την IL-1^β ^[204]. Παράλληλα έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα

mRNA, μετά από ενεργοποίηση με την κυτταροκίνη, και για έναν τύπο συνθάσης στα μακροφάγα ^[205].

Το NO πιθανότατα δρα αυτοκρινικά ρυθμίζοντας την σπειραματική απόκριση στη φλεγμονή ^[206]. Η υπερβολική παραγωγή του δεν επηρεάζει μόνο τη σπειραματική διήθηση αλλά προκαλεί και τραυματισμό των ιστών και συμβάλλει στην παθογένεση διαφόρων μωρών σπειραματοσκλήρυνσης. Συμμετέχει στη διακυτταρική επικοινωνία, της κυτταρικής άμυνα και τον κυτταρικό τραυματισμό ^[207]. Το NO ενισχύει την ίδια του τη βιοσύνθεση ^[208]. Επιπλέον, το παραγόμενο NO έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην επαγόμενη από τις κυτταροκίνες παραγωγή της sPLA₂-IIA ^[209].

Τα γεγονότα που μεσολαβούν μεταξύ της ενεργοποίησης του κυττάρου με την ιντερλευκίνη και την παραγωγή του NO είναι η ενεργοποίηση της JNK/SAPK και της p38 ^[210].

Πίνακας 6.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή του NO

Αναστολείς της παραγωγής NO

TGFβ ²¹¹	PDTC ²¹⁵	ET-1 ²¹⁹	IL-13 ²²²
Κυκλοσπορίνη ²¹²	δεξαμεθαζόνη ²¹⁶	τετρανακτίνη ²²⁰	p-38 ²²³
H ₂ O ₂ ²¹³	PDGFBB ²¹⁷	AVP ²²¹	USF1, USF2 ²²⁴
ΑγγειοτενσίνηII ²¹⁴	ακετυλίωση H4 ²¹⁸		

Επαγωγείς της παραγωγής NO

Υπεροξειδίο ²²⁵
Διακετυλάσες των ιστώνων ²²⁶
Αγωνιστές των PPAR ²²⁷
Src ενεργοποιητές του NFκβ ²²⁸

Απαραίτητοι συμπαράγοντες για την παραγωγή NO

BH4 ^{229, 230}

6.6.8. Οξειδωτικό στρες

Τα ενεργοποιημένα HMCL μπορούν να παράγουν με χαμηλούς ρυθμούς δραστικά προϊόντα οξυγόνου. Η χαμηλή παραγωγή υπεροξειδίου από αυτά επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική μεταγωγή σήματος και συμβάλλει στον σπειραματικό τραυματισμό ^[231].

Η IL-1 επάγει την σύνθεση του mRNA της NADPH οξειδάσης στα MC, ενώ η κύρια ρίζα που σχηματίζεται μετά την επίδραση της IL-1β σε αυτά είναι η ρίζα O^{2-} [231,232]. Επιπλέον, η IL-1β ενεργοποιεί την υπεροξειδική δισμουτάση [233].

Η CRP ενισχύει την απελευθέρωση υπεροξειδίου το οποίο ακολούθως, απενεργοποιεί το NO [234].

6.6.9. Σύνθεση PAF

Τα MC που βρίσκονται σε καλλιέργεια, μετά από ενεργοποίηση με κυτταροκίνες όπως η IL-1β, σημειώνουν αύξηση του παραγόμενου PAF κυρίως μέσω του remodeling μονοπατιού, δηλαδή με ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 και της ακετυλο-συνενζυμο:2-λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράσης [236].

6.6.10. Πολλαπλασιασμός των MC

Ένας πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των MC από τη συλλογική δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων και αιμοπεταλιακών παραγόντων [237].

Η β-ενδορφίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των MC [238] ενώ αντίθετα, η PGE2 τον αναστέλλει [239]. Επίσης, ο επαγόμενος από την IL-1β πολλαπλασιασμός των MC μπορεί να ανασταλλεί μετά από τροποποίηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού pH και Ca [240].

Φάρμακα που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των MC και πιθανότατα συμβάλλουν στην πρόληψη της σπειραματοσκλήρυνσης, είναι η υδροχλωρική νικαρδιπίνη, η κεταμίνη και η σεριβαστατίνη [241-243].

Ωστόσο, υπάρχουν και έρευνες που υποστηρίζουν πως η IL-1 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των MC και την ανάπτυξή τους [244]. Η IL-1β αναστέλλει τη μίτωση και τον πολλαπλασιασμό, εν μέρει, μέσω της ενδογενούς παραγωγής PGs [245,246]. Παράλληλα ενισχύεται η παραγωγή της εξωκυττάριας ουσίας [247].

6.6.11. Σύνθεση και έκκριση εικοσανοειδών

Τα ενεργοποιημένα από την IL-1β μεσαγγειακά κύτταρα απελευθερώνουν PGs και συγκεκριμένα την PGE₂ ενώ παράλληλα αυξάνονται και τα επίπεδα της παραγόμενης PLA₂ [248-250].

6.7. Μηχανισμός μεταγωγής σήματος

Η IL-1 επάγει μια πληθώρα βιολογικών αντιδράσεων στα MC. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται η ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η παραγωγή PGs και η έκκριση της κολλαγενάσης τύπου II. Η δραστηριότητα αυτή εξαρτάται από την ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών στα MC. Η IL-1 επάγει άμεσα την φωσφορυλίωση πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνικών κινασών του πλάσματος [251].

Ορισμένα μιτογόνα μόρια υδρολύουν τα PL της ινοσιτόλης μέσω της PLC παράγοντας την 1,2-διακυλογλυκερόλη, έναν συμπαράγοντα της PKC, και την 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη η οποία κινητοποιεί το ενδοκυτταρικό ασβέστιο. Επομένως, η IL-1β επάγει την κυτταρική ενεργοποίηση, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω δεύτερων μηνυματοφόρων μορίων που προέρχονται από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης [252]. Τα διγλυκερίδια αυτά χρησιμεύουν ως δεύτερα μηνυματοφόρα σήματα και για την αναστολή της δραστηριότητας της PKC [253].

Τα διγλυκερίδια που παράγονται είναι αλκυλο-, ακυλο- και αλκενυλο- γλυκερόλες και δρουν περιορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των ευαίσθητων στο ασβέστιο ισομορφών της PKC αναστέλλοντας την ανάπτυξη του κυττάρου [254].

Η IL-1β ρυθμίζει τη δραστηριότητα των διαφόρων μορφών της PKC [255]. Από όλες τις ισομορφές της κινάσης αυτής, η ισομορφή ζ φαίνεται πως εμπλέκεται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος της IL-1β [256].

Η IL-1β επάγει την παραγωγή του AA και αυξάνει τη δραστηριότητα της COX [257]. Η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την αύξηση της παραγόμενης PGE₂ από τα MC [258]. Απαραίτητη για την παραγωγή της PGE₂ είναι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης [259].

Απαραίτητη για την έκφραση της COX II και την παραγωγή της PGE₂ είναι η ενεργοποίηση της JNK/SAPK και της p38 MAPK. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούνται από την IL-1β μέσω του AA ^[260,261].

Η IL-1β προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων του cGMP ^[262]. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα αποκρίνονται στο NO με αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της cGMP ^[263]. Δεν έχει βρεθεί ότι η IL-1β επιφέρει αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP ^[264].

Η IL-1β επιφέρει αύξηση της PLA₂ μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το κυκλικό AMP. Η πρωτεϊνική κινάση που εμπλέκεται στο μηχανισμό μεταγωγής σήματος της IL-1β είναι ανεξάρτητος από την PKA και την PKC ^[265].

Η PLA₂ ενεργοποιεί ταχύτατα την κινάση MAP. Η ενεργοποίηση της MAP από την IL-1β λαμβάνει χώρα σε δυο φάσεις και η αργή ενεργοποίηση στην αργή φάση γίνεται παράλληλα με την υψηλή έκκριση της PLA₂ που επάγεται από την IL-1β. Δηλαδή, η ενεργοποίηση του αργού μονοπατιού οφείλεται στην ενεργοποίηση με την IL-1β αλλά επάγεται από την εκκρινόμενη PLA₂ ^[266].

Η sPLA₂ δρα αυτοκρινικά επάγοντας τις ισομορφές δ και ε της PKC και την p42 μορφή της MAPK, δυο πιθανών ενεργοποιητών της cPLA₂. Η sPLA₂ επίσης ενεργοποιεί την Raf-1 κινάση που με τη σειρά της μεταβιβάζει σήματα από τις αντιδράσεις της PKC στον καταρράκτη αντιδράσεων της MAPK ^[267].

Μεταξύ των προϊόντων της PLA₂ συγκαταλέγονται και λυσοφωσφολιπίδια, όπως η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, η λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και το λυσοφωσφατιδικό οξύ, αλλά όχι λιπαρά οξέα, τα οποία μιμούνται τη δράση της φωσφολιπάσης και της ιντερλευκίνης. Για παράδειγμα, λειτουργούν ως μηνυματοφόρα μόρια επάγοντας την ανάπτυξη των μεσαγγειακών κυττάρων ^[267].

Η IL-1β φαίνεται ότι χρησιμοποιεί το μονοπάτι της σφιγγομυελίνης και της παραγωγής AA για την επαγωγή της παραγωγής της MAPK. Συγκεκριμένα, το κηραμίδιο, προσδένεται και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση c-Raf η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι παραγωγής της MAPK ^[268].

Ο ενδογενές κηραμίδιο παράεται με τη δράση όξινων ή ουδέτερων σφιγγομυελινασών (SMase) μετά από την επίδραση κάποιας προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ^[269]. Η αποικοδόμηση του κηραμιδίου διενεργείται από τις ουδέτερες και όξιμες κηραμιδάσες ^[270].

Ο σχηματισμός των προσταγλανδινών από το AA καταλύεται από την COX. Η συνθάση του νιτρικού οξέος καταλύει την παραγωγή του NO. Και τα δυο αυτά ένζυμα επάγονται από την IL-1β μέσω της δράσης της PKCζ ^[271].

Η πρωτεϊνική κινάση που έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται από την IL-1β είναι η MAPK ^[272,273]. Επίσης, μια νέα ομάδα πρωτεϊνικών κινασών φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος της IL-1β στα MC, η ομάδα των JNK πρωτεϊνικών κινασών ^[274,275]. Τα μέλη της οικογένειας των MAP κινασών που ενεργοποιούνται από την IL-1β είναι η ERK2 και η p54. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων ^[273].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα μπορούν να παράγουν ειδικούς για τα μονοκύτταρα χημειοτακτικούς παράγοντες, την MCP-1 μετά την ενεργοποίησή τους με την IL-1β. Η δράση αυτή ενδεχομένως να επάγεται μέσω των PTKs ^[276].

Η ενεργοποίηση του NFκΒ δεν βασίζεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της τυροσινικής κινάσης ^[277].

Η IL-1β μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση της PI3. Το ένζυμο αυτό επάγει την παραγωγή της PGE₂ καθώς επίσης και τον σχηματισμό του NO στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[278]. Απαραίτητη για την παραγωγή του NO είναι και η σύνθεση της BH₄. Η η GTP κυκλοϋδρολάση I είναι το απαραίτητο ένζυμο για τη βιοσύνθεση της BH₄ και αυτό του οποίου η παραγωγή επάγεται από την IL-1β ^[279].

Η αγγειοτενσίνη II και III οδηγεί σε γρήγορη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKB ^[280]. Επίσης, το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται και από τα εξωκυττάρια νουκλεοτίδια ATP και UTP. Η IL-1β φαίνεται πως αναστέλλει, βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα, την επαγόμενη από το ATP ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού. Η βραχυπρόθεσμη αναστολή αφορά στην παραγωγή του κηραμιδίου ενώ η μακροπρόθεσμη, αφορά στον σχηματισμό του NO ^[281].

Το κηραμίδιο παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μεταγωγή σήματος καθώς επάγει αντιδράσεις όπως η φλεγμονή, η διαφοροποίηση, η έκφραση γονιδίων, η αναστολή της ανάπτυξης και η απόπτωση. Έχει βρεθεί ότι προσδένεται και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση c-Raf, η οποία ακολούθως ενεργοποιεί την ERK ^[282].

6.8. Επίδραση των φυσικών προϊόντων στην παραγωγή και τις δράσεις της IL-1β

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί σε μια πληθώρα εκχυλισμάτων από κινέζικα βότανα τα οποία, όπως έχει βρεθεί, περιορίζουν την παραγωγή της IL-1β στα μεσαγγειακά κύτταρα του ανθρώπου ^[283,284]. Η δράση αυτή των βοτάνων πιθανότατα σχετίζεται με τη δυσλειτουργία της γονιδιακής έκφρασης και της παραγωγής των κυτταροκινών στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[285,286].

Η κερκετίνη έχει βρεθεί πως περιορίζει την επαγόμενη από την IL-1β έκφραση της MCP-1 ^[287]. Η εμοντίνη, συστατικό των κινέζικων βοτάνων, επιφέρει μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της συγκέντρωσης ασβεστίου ^[288]. Το όμοιας προέλευσης με την εμοντίνη, το H1-A, περιορίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων από τη ιντερλευκίνη μεσαγγειακών κυττάρων ^[289]. Η κουρκουμίνη περιόρισε και αυτή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την παραγωγή της IL-1β και την έκφραση της MCP-1 μετά την επίδραση του LPS στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[290]. Τέλος, άλλο βότανο επέφερε μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων του μεσαγγείου μέσω της αύξησης της δραστηριότητας της τελομεράσης ^[291].

7. PAF και Μεσαγγειακά κύτταρα

7.1. Σύνθεση του PAF στα MC

Τα MC του σπειράματος μπορούν να παράγουν PAF ο οποίος συμβάλλει σημαντικά στη ρύθμιση της σπειραματικής λειτουργίας [292,293]. Επιπρόσθετα, η διευκρίνιση των μηχανισμών ενεργοποίησης- απενεργοποίησης των μονοπατιών παραγωγής του πιθανότατα να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης της σπειραματικής φλεγμονής [294].

Παράγοντας	Είδος Κυττάρων	Αποτέλεσμα
LPS [295,296]	MC αρουραίου	↑ παραγωγής PAF
Ενδοτοξίνη E.Coli [297]	»	»
Ανοσοσφαιρίνη G [298]	»	»
Αγγειοτενσίνη II [299]	»	»
Συμπλήρωμα Se [300]	MC ανθρώπου	↓ παραγωγής PAF
Ιονοφόρο Ca A23187 [301]	»	↑ παραγωγής PAF
Φαγοκυττάρωση [301]	»	»
TNF [301]	»	»
IL-1β [301]	»	»
Πορίνες [302]	»	»
PBDB [302]	»	↓ παραγωγής PAF
IgA-Ic [303]	»	↑ παραγωγής PAF
Αλληλεπίδραση MC		
με αιμοτετάλια [304]	»	»
IL 12 [304]	»	»
LBP [305]	»	»
sCD14 [306]	»	»
↑ μεταφορά Pgp [307]	»	»
Γενταμυκίνη [308]	»	»
Πεντραξίνη PTX3 [309]	»	»

Πίνακας 7.1. Παράγοντες που τροποποιούν την παραγωγή του PAF στα MC

7.2. Μεταγωγή σήματος

Οι μεταβολίτες των PL όπως η DAG και η PI χρησιμεύουν ως αρχικά μηνυματοφόρα μόρια για κάποια δευτερεύοντα ενδοκυτταρικά γεγονότα συμπεριλαμβανομένης και της απελευθέρωσης ιόντων Ca από ενδοκυτταρικές αποθήκες, της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης, της μεταβολής του pH και της μεταβολής της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε διάφορα ιόντα. Οι υπόλοιπες λειτουργικές αποκρίσεις του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης και τη συστολής και του πολλαπλασιασμού, καθορίζονται από βιοδραστικά λιποειδή όπως ο PAF και τα εικοσανοειδή ^[310].

Η χορήγηση εξωγενούς PAF προκαλεί την αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$). Προτείνονται δυο πιθανοί μηχανισμοί για αυτό: η κινητοποίηση των ήδη υπάρχοντων ενδοκυτταρικών αποθεμάτων ασβεστίου και η αυξημένη εισροή του μέσα στο κύτταρο δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ^[311].

Ο PAF συμμετέχει στις αιμοδυναμικές και φλεγμονώδεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο νεφρικό σπείραμα με ενεργοποίηση του υποδοχέα της PLC, η οποία επιφέρει αύξηση των επιπέδων του ($[Ca^{2+}]_i$) ^[311].

Ακολούθως, ο PAF προκαλεί άμεση αύξηση των επιπέδων του AA, της DAG και της PI3 ^[312]. Η ενεργοποίηση της PLC γίνεται μέσω μιας ειδικής G πρωτεΐνης, πιθανότατα της G_{a12} ^[313].

Ο PAF επάγει την παραγωγή της PGE_2 , του 3H-αραχιδονικού οξέος και της lyso-PC. Πιθανή πηγή της PGE_2 αποτελεί το AA που απελευθερώνεται από την PC μέσω της PLA_2 ^[314].

Στις PGs έχουν αποδοθεί δράσεις που αντιτίθενται στην συσταλτική και προφλεγμονώδη δράση του PAF μέσω της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης. Ωστόσο, η εξωγενής χορήγηση του PAF, έχει βρεθεί ότι επιφέρει μείωση των βασικών και των επαγόμενων από τον υποδοχέα επιπέδων του cAMP προτείνοντας ότι τα επαγόμενα από τον PAF διαμεμβρανικά μονοπάτια αντιτίθενται στην επαγόμενη από τον υποδοχέα ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης ^[314].

Οι υποδοχείς του PAF ενεργοποιούν τη PLC που επάγει την παραγωγή προσταγλανδινών μέσω της GTPγS πρωτεΐνης που είναι μια GTP δεσμεύουσα πρωτεΐνη ^[314].

Ο PAF ενεργοποιεί την PLC και ακολούθως επάγει την υδρόλυση της 2φωσφορικής-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns-4,5-P₂). Επιπλέον, προκαλεί αύξηση των επιπέδων της DAG. Επομένως, άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνουν την υδρόλυση της PC και της PE σχηματίζοντας DAG και PA μέσω της PLD ή της PLC, επεξηγούν τις επαγόμενες από τον PAF κυτταρικές αποκρίσεις ^[315].

Επομένως, τα MC αποκρίνονται στον PAF με αύξηση της δραστηριότητας της PLD και της PLC κινάσης καθώς επίσης και με την αύξηση του ρυθμού de novo σύνθεσης λιπιδίων που αυξάνουν τα PA. Τα τελευταία αποτελούν πιθανά ενδοκυτταρικά μηνυματοφόρα μόρια ^[315].

Τα υψηλά επίπεδα του PAF επάγουν την παραγωγή PGE₂ η οποία με τη σειρά της επιφέρει αύξηση του παραγόμενου cAMP το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της έκφρασης του υποδοχέα του PAF ^[316].

7.3. Μεταβολισμός του PAF στα MC

Τα επίπεδα του PAF στα MC καθορίζονται από τα ήδη γνωστά βιοσυνθετικά και αποικοδομητικά του ένζυμα. Έρευνες έχουν ταυτοποιήσει την ύπαρξη και των δυο βιοσυνθετικών ενζύμων, της lyso-PAF AT και της CDP-CPT που ρυθμίζουν την remodeling και την de novo πορεία σχηματισμού του PAF αντίστοιχα, στα MC ^[294]. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί και η ύπαρξη του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF, η PAF-AH ^[293].

Τα επίπεδα του PAF καθορίζονται από την ισορροπία μεταξύ της βιοσύνθεσης και της αποικοδόμησής του. Η de novo βιοσύνθεσή του ευθύνεται για τη διατήρησή του στα βασικά επίπεδα ενώ η remodeling ενεργοποιείται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ο αποικοδόμησή του γίνεται μέσω της PAF-AH η οποία τον μετατρέπει στον ανενεργό lyso-PAF. Η lyso-PAF AT αποτελεί το κύριο ένζυμο του remodeling μονοπατιού και μετατρέπει τον lyso-PAF σε PAF χρησιμοποιώντας το ακετυλο-CoA σαν δότη της ακετυλομάδας. Η lyso-PAF AT έχει ταυτοποιηθεί και στη φλοιώδη αλλά και στη μυελώδη μοίρα του νεφρού καθώς επίσης και στα μεσαγγειακά κύτταρα και η δραστηριότητά της έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και στα μικροσώματα και αποτελεί την κύρια πηγή του PAF στο νεφρό ^[317,318]. Η CDP- CPT έχει βρεθεί ότι πράγματι υπάρχει στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των βασικών επιπέδων του PAF ^[319]. Χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη de novo σύνθεση του PAF. Όποιος παράγοντας ενεργοποιεί την κυτιδυλοτρανσφεράση, επάγει και την σύνθεση του PAF. Έναν τέτοιο παράγοντα αποτελεί το ολεϊκό οξύ, η ντοπαμίνη και η

ακετυλοχολίνη. Ανασταλτικά φαίνεται πως δρα το Ca ^[320]. Η PAF-AH, το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF, έχει βρεθεί ότι πράγματι υπάρχει στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι εκκρίνεται και στο εξωκυττάριο υγρό ^[321].

7.4. Δράσεις του PAF στα μεσαγγειακά κύτταρα

7.4.1. Σύνθεση εικοσανοειδών

Ο PAF έχει βρεθεί ότι επάγει την παραγωγή των PGs και ιδιαίτερα της PGE₂ ^[322,323]. Στη δράση αυτή του PAF αντιτίθεται η τοξίνη του κοκκύτη καθώς και οι ανταγωνιστές του PAF, BN52021, SRI 63-072 και η kadsurenone ^[324,325].

7.4.2. Σύνθεση κυτταροκινών

Ο PAF δεν έχει βρεθεί να επάγει την παραγωγή της IL6 από τα MC και το σπείραμα αν και έχει ανιχνευτεί στα ούρα ατόμων υγιών αλλά και ασθενών που έχουν λάβει νεφρικό μόσχευμα ^[326].

7.4.3. Μορφολογικές τροποποιήσεις

Ο PAF προκαλεί μείωση της επιφάνειας του σπειράματος, μετά από αλληλεπίδραση με συγκεκριμένο υποδοχέα και την επακόλουθη μεταβολή των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου. Η αλλαγή των επιπέδων του AA δεν έχει φανεί ότι επιδρά στην αλλαγή της σπειραματικής επιφάνειας. Συμπερασματικά, περιορίζεται η διηθητική επιφάνεια και μειώνεται ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης ^[327-329].

Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου επιφέρει τη συστολή των MC. Η συστολή αυτή σχετίζεται με το βαθμό της φωσφορυλίωσης των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης ^[330-332].

7.4.4. Συσσώρευση λιπιδίων

Ο PAF επάγει την έκφραση του υποδοχέα του και έπειτα την συσσώρευση λιπιδίων απορρυθμίζοντας τη λειτουργικότητα του υποδοχέα της LDL και επάγοντας την έκφραση των εκκαθαριστών υποδοχέων στα MC του ανθρώπου ^[333].

7.4.5. Σύνθεση της θεμέλιας ουσίας

Ο PAF επάγει την σύνθεση της φимπρονεκτίνης μέσω της ενεργοποίησης του TGF-β. Επομένως, ενδεχομένως ο PAF να εμπλέκεται στην συσσώρευση της θεμέλιας ουσίας στη νεφρική φλεγμονή και συμβάλλει στην εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης ^[334].

7.4.6. Χημειοταξία

Η υπερδιήθηση του σπειραματικού μεσαγγείου από μονοκύτταρα και μακροφάγα αποτελεί ένα σημαντικό παθολογικό παράγοντα για διάφορες μορφές σπειραματονεφρίτιδας. Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην υπερδιήθηση του σπειράματος από τα κύτταρα αυτά. Ωστόσο, ο PAF δεν έχει βρεθεί ότι αποτελεί έναν από τους παράγοντες αυτούς ^[335].

7.4.7. Πολλαπλασιασμός

Ο PAF επάγει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης η οποία λαμβάνει χώρα μέσω της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης. Το μονοπάτι αυτό επεξηγεί την επαγωγή του μιτογόνου σήματος μέσω του υποδοχέα του PAF ^[336].

7.4.8. Οξειδωτικό στρες

Ως γνωστό, ο PAF επάγει την παραγωγή της PGE₂. Συνεπώς, αυξάνεται η απελευθέρωση του H₂O₂ με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες ^[337].

7.5. Ο PAF ως μεσολαβητής για τη δράση άλλων μορίων στα MC

Η κυκλοσπορίνη μέσω της αύξησης των επιπέδων του PAF προκαλεί σύσπαση των MC γεγονός που οδηγεί τελικά σε αγγειοσυστολή, σε μείωση της νεφρικής αιματικής ροής και τέλος, σε μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης ^[338,339]. Μεταβολές του κυτταρικού σχήματος και του κυτταροσκελετού προκαλούνται στα MC μέσω του PAF και μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων με TNF ^[340]. Με παρόμοιο τρόπο και η ενδοθηλίνη επιφέρει συστολή του σπειράματος και των MC καθώς επίσης και επάγει και τον πολλαπλασιασμό τους ^[341,342].

Ο PAF εμπλέκεται και στην τροποποίηση της επιφάνειας των MC και στη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης εξαιτίας των υψηλών επιπέδων των δραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ιδιαίτερα του H_2O_2 . Τα υψηλά επίπεδα H_2O_2 επάγουν και τον πολλαπλασιασμό των MC. Επιπρόσθετα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου επάγει την σπειραματική παραγωγή της TXB2 και της PGE2 μέσω της αύξησης της παραγωγής του PAF [343-345].

Επιπλέον, η TXA_2 και ο PAF ευθύνονται για τη συστολή των MC και τη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης μετά την αλληλεπίδραση του μεσαγγείου με το υπερκείμενο των αιμοπεταλίων [346].

Τα διγλυκερίδια, τα οποία αποτελούν δευτερογενή μηνυματοφόρα μόρια που προέρχονται από τα PL, συμμετέχουν ως συμπαράγοντες στην, επαγόμενη από τον PAF, ενεργοποίηση της PKC [339].

Η δοξορουμπικίνη έχει βρεθεί ότι επιφέρει αύξηση της παραγόμενης IL-1 β μετά από ενεργοποίηση του σπειράματος, των MC και των μακροφάγων και αύξηση της παραγωγής του PAF [347].

Ομοίως, η γενταμυκίνη ενεργοποιεί τα MC μέσω της αύξησης της σύνθεσης και της απελευθέρωσης του PAF. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί συστολή στο μεσάγγειο, αυξάνει την απελευθέρωση αγγειοδραστικών ορμονών και επιφέρει μείωση του ΡΣΔ [348].

8. Μεσογειακή δίαιτα-Μικροθρεπτικά συστατικά

8.1. Εισαγωγή

Ο όρος «Μεσογειακή Δίαιτα» περιλαμβάνει τις διατροφικές συνήθειες των περιοχών της Μεσογείου με παραγωγή ελαιολάδου μεταξύ 1950 και 1960. Η Μεσόγειος θάλασσα περιβάλλεται από 18 χώρες και συνεπώς, η διατροφή ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Αυτό που ανταπροσωπεύει ο όρος «Μεσογειακή Διατροφή» διαφέρει από χώρα σε χώρα αλλά πάντα σχετίζεται με την καλή υγεία και τη μακροζωία ^[349].

Η δημοτικότητα της Μεσογειακής Δίαιτας έγκειται στα ευρήματα πολυάριθμων επιδημιολογικών μελετών που υποστηρίζουν πως η εμφάνιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και ορισμένων τύπων καρκίνου είναι χαμηλότερη στις χώρες της Μεσογείου. Έχει προταθεί πως αυτό οφείλεται στις υγιείς και προστατευτικές διατροφικές συνήθειες της περιοχής αυτής ^[350].

8.2. Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Δίαιτας

Παρά τις διάφορες εκδοχές της Μεσογειακής Δίαιτας, ορισμένα χαρακτηριστικά παραμένουν αναλλοίωτα: τα χαμηλά κορεσμένα λίπη, τα υψηλά μονοακόρεστα λίπη, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ κυρίως με τη μορφή του κρασιού κατά τη διάρκεια του γεύματος, η υψηλή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, οσπρίων και δημητριακών, η μέτρια κατανάλωση ψαριού, γάλατος και τυριού και η μικρή κατανάλωση κρέατος και των προϊόντων που προέρχονται από αυτό ^[349,351].

Η Μεσογειακή Δίαιτα έχει ως κύρια πηγή λίπους το ελαιόλαδο και χαρακτηρίζεται από μέτρια ή υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, δημητριακών, ψαριών και οσπρίων σε συνδυασμό με την περιορισμένη κατανάλωση κρέατος και κρασιού στα γεύματα. Όσον αφορά στα μικροθρεπτικά συστατικά, η Μεσογειακή Δίαιτα είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένο λίπος και υψηλής περιεκτικότητας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, σε αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E καθώς επίσης και σε φυτικές ίνες και σε φυλλικό οξύ ^[349].

8.3. Μεσογειακή Δίαιτα, μακρο και μικροθρεπτικά συστατικά

8.3.1. Λιπαρά Οξέα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ιδιαίτερα υψηλή είναι η κατανάλωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και χαμηλή των κορεσμένων. Κύρια πηγή λίπους αποτελεί το ελαιόλαδο τις χώρες της Μεσογείου. Το 1960 στην Κρήτη, η μέση πρόσληψη του λινολενικού οξέος έφτανε τα 1,2 γρ ημερησίως ^[349].

8.3.2. Αντιοξειδωτικά

Χαρακτηριστική για τη Μεσογειακή Δίαιτα είναι η υψηλή πρόσληψη της βιταμίνης E, περίπου 23 mg ημερησίως και η ακόμη υψηλότερη πρόσληψη της βιταμίνης C, περίπου 135 mg ημερησίως ^[349].

8.4. Ελαιόλαδο και Μεσογειακή Δίαιτα

8.4.1. Κατηγοριοποίηση και σύσταση του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο κατατάσσεται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οξείδωσής του και τις χημικές του ιδιότητες. Από την κατηγοριοποίηση αυτή προκύπτει ότι το πιο πολύτιμο ελαιόλαδο είναι το έξτρα παρθένο ^[350].

Κατά την παραγωγή του ελαιολάδου, περιορίζεται η ενεργοποίηση των κυτταρικών λιπασών και η αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων ^[350].

Παράδοση για το ελαιόλαδο είναι η υψηλή περιεκτικότητά του σε ελαϊκό οξύ, ένα πολυακόρεστο οξύ του οποίου αποτελεί το 56–84% της συνολικής ποσότητας των λιποειδών του ελαιολάδου ενώ το λινολενικό, το ευρύτερα προσλαμβανόμενο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στην διατροφή του ανθρώπου, συναντάται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 3-21% (συνήθως 7-10%) ^[350].

Μεταξύ μερικών από τα συστατικά του ελαιολάδου περιλαμβάνονται και βιταμίνες όπως οι α και γ-τοκοφερόλες, το β-καροτένιο, οι φυτοστερόλες, τα pigments, τα υδροξυ- και διυδροξυ-τερπενικά οξέα, τα φλαβονοειδή, το σκουαλένιο και φαινολικές ενώσεις, με πιο γνωστές τις πολυφαινόλες ^[349,351,352]. Επιπρόσθετα, συστατικά αυτού αποτελούν και κάποια φωσφολιποειδή και ανθοκυανιδίνες. Τα δευτερεύοντα αυτά συστατικά αποτελούν το 1-2% των συστατικών του. Η σύσταση του ελαιολάδου σε όλα αυτά τα συστατικά εξαρτάται από ποικίλλους παράγοντες, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού και ο χειρισμός του ^[351].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι παρά την καλή απορρόφηση των φαινολών του ελαιολάδου από τον οργανισμό, η προστατευτική τους δράση ενάντια στην οξείδωση της LDL δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων αυτών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής [353].

Στο ελαιόλαδο έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ποικίλων ανασταλτικών παραγόντων του PAF και της θρομβίνης ταυτόχρονα με ασθενείς αγωνιστές που προσομοιάζουν στον PAF. Οι περισσότεροι ενεργοί αγωνιστές έχουν δραστηριότητα 9 φορές μικρότερη σε σχέση με τον PAF και συνεπώς, επάγουν πολύ πιο ασθενείς βιολογικές δράσεις στα κύτταρα όταν προσδεθούν στους υποδοχείς του αντί για αυτόν, ελαχιστοποιώντας τις δράσεις του [352].

8.4.2. Προστατευτική δράση ελαιολάδου

Η συμβολή του μεγάλου αριθμού των ελευθέρων ριζών στην έναρξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηρωματική καρδιακή νόσος και ο καρκίνος, απαιτούν υψηλότερη πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής [350].

Η υψηλή περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινόλες και αντιοξειδωτικά το καθιστά σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα για την πρόκληση της αθηρωμάτωσης [349].

Η κατανάλωση του ελαιολάδου μπορεί να αποβεί αποτελεσματική στην πρόληψη της αθηρωμάτωσης εξαιτίας του ότι περιέχει συστατικά που μοιάζουν με λιποειδή τα οποία έχουν αντιθρομβωτική και αντιαθηρωματική δράση *in vitro*.

Πειράματα σε κουνέλια έχουν δείξει ότι η αντιαθηρωματική και αντιθρομβωτική δράση του ελαιολάδου επιτυγχάνεται μέσω της χορήγησης του ολικού πολικού εκχυλίσματος λιποειδών αυτού και όχι μέσω χορήγησης ελαιολάδου ή του εκχυλίσματος των ουδέτερων λιποειδών. Το OOPLE λοιπόν είναι αυτό που έχει βρεθεί πως επιφέρει αύξηση των επιπέδων της PAF-AH του πλάσματος, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και περιορίζει την οξείδωση που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα και συμβάλλει στη διατήρηση της ελαστικότητας των αγγείων [351].

Η προστατευτική δράση του ελαιολάδου έγκειται στην περιεκτικότητά του στα πολικά λιποειδή, τα γλυκολιπίδια, τα γλυκοφαινολικά και τα φαινολικά οξέα. Αυτά περιέχονται μόνο στο ελαιόλαδο και στο OOPLE. Η PAF-AH του πλάσματος σημείωσε αύξηση μετά από

χορήγηση ελαιολάδου αλλά όχι μετά από χορήγηση OOPLE. Επιπλέον, η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε αγωνιστές και ανταγωνιστές του PAF, επεξηγεί την αντιαθηρωματική και καρδιοπροστατευτική του δράση ^[351].

Στα περισσότερα από τα συστατικά αυτά έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες. Οι μηχανισμοί που επιδρούν τα συστατικά αυτά στη ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας περιλαμβάνουν την απελευθέρωση του νιτρικού οξέος, των εικοσανοειδών (προσταγλανδίνες και λευκοτριένια) και μορίων προσκόλλησης μέσω της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα NKκΒ από τα ROS ^[352].

Η προστατευτική δράση του ελαιολάδου έγκειται στις προστατευτικές δράσεις των επιμέρους συστατικών του. Οι σημαντικότερες δράσεις των κυριότερων συστατικών του παρουσιάζονται εδώ. Το ελαϊκό οξύ έχει προταθεί πως περιορίζει τον αριθμό των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας τα μόρια της LDL από την οξείδωση. Σημαντική αντιοξειδωτική δράση ασκούν οι πιο συχνά εμφανιζόμενες φαινόλες στο ελαιόλαδο, η ολευροπεΐνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη περιορίζοντας τον αριθμό των ελευθέρων ριζών αλλά και της προσκόλλησης των μονοκυττάρων. Επιπλέον, τους έχει αποδοθεί και αντιφλεγμονώδης δράση. Ορισμένες από αυτές περιορίζουν την παραγωγή κυτταροκινών και εικοσανοειδών καθώς και την έκφραση και τη δραστηριότητα της COX-2. Το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει τις τοκοφερόλες, τις στερόλες και τις τερπενικές ενώσεις. Η α τοκοφερόλη δρα ως αντιοξειδωτικό περιορίζοντας τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, εμποδίζει την παραγωγή των μορίων προσκόλλησης, την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και περιορίζει το μεταβολισμό των εικοσανοειδών, την απόπτωση και την οξείδωση της LDL. Η ευρύτερα συναντόμενη στερόλη του ελαιολάδου, η β-σιτοστερόλη, έχει βρεθεί ότι επιφέρει μείωση των επιπέδων της CHOL του πλάσματος, έχει αντιφλεγμονώδη δράση και επιφέρει μείωση του AA μέσω μείωσης των επιπέδων των ελευθέρων ριζών. Οι τερπενικές ενώσεις έχουν βρεθεί ότι επιφέρουν αγγειοδιαστολή μέσω της παραγωγής NO ^[352]. Το OOPLE που μελετήθηκε στο πείραμα αυτό περιείχε και καφεϊκό οξύ. Στο καφεϊκό οξύ έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις και η ικανότητα του για δέσμευση του NO και πρόληψη της έκφρασης των γονιδίων διαφόρων φλεγμονώδων παραγόντων ^[354].

Στο καφεϊκό οξύ, ένα σημαντικό συστατικό του ελαιολάδου, έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις οι οποίες ασκούνται μέσω της δέσμευσης του NO και της ικανότητάς του για ρύθμιση της έκφρασης των iNOS καθώς και άλλων φλεγμονώδων παραγόντων ^[354].

Είναι πραγματικά δύσκολο να αποδοθεί η προστατευτική δράση της Μεσογειακής διαίτας σε ένα μονο θρεπτικό συστατικό. Για παράδειγμα, η υψηλότερη κατανάλωση του ελαιολάδου σχετίζεται έμμεσα με την υψηλότερη κατανάλωση ωμών φρέσκων λαχανικών ^[350].

8.4.3. Ερευνητικά ευρήματα

Πολυάριθμες έρευνες υποστηρίζουν την προστατευτική δράση της κατανάλωσης του ελαιολάδου ενάντια στα καρδιαγγειακά νοσήματα και τον καρκίνο. Οι προστατευτικές δράσεις του έγκεινται στην περιεκτικότητά του σε ελαϊκό οξύ και στο α-λινολενικό και στην χαμηλή περιεκτικότητά του σε κορεσμένα λιπαρά οξέα. Τελευταία, έχει βρεθεί ότι το ελαιόλαδο επιφέρει μείωση των επιπέδων της συστολικής και της διαστολικής πίεσης ενώ οι λιποπρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε MUFAs έχουν βρεθεί ότι είναι λιγότερο επιρρεπείς στην οξείδωση ^[352].

8.5. Αλκοόλ και Μεσογειακή διαίτα

Το κρασί αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό της Μεσογειακής διαίτας. Σε αυτό έχει αποδοθεί καρδιοπροστατευτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι επιφέρει αύξηση της HDL και μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της θρόμβωσης του αίματος ^[355].

8.5.1. Σύσταση του κρασιού

Σε κάποια από τα συστατικά του κρασιού έχει αποδοθεί ευεργετική δράση. Μερικά από αυτά αποτελούν ορισμένες φαινόλες (κερκετίνη, κατεχίνη, μυρκετίνη, p-κουμαρικά, καφεϊκά και γαλλικά οξέα ^[355-357].

8.5.2. Προστατευτική δράση κρασιού

Η ευεργετική τους δράση των φαινολικών φλαβονοειδών έγκειται κυρίως στην αντιοξειδωτική τους δράση και της προστασία της LDL από την οξείδωση, στην αναστολή της φωσφολιπάσης A₂ και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, το κρασί δρα προστατευτικά ενάντια στην θνησιμότητα και τη θνητότητα εξαιτίας της κίρρωσης του ήπατος ^[355-357].

Η καρδιοπροστατευτική δράση του κόκκινου και του λευκού κρασιού έγκειται εν μέρει στην παρουσία αντιοξειδωτικών και εν μέρει στην παρουσία ανταγωνιστών του PAF με αποτέλεσμα να περιορίζεται η οξείδωση της LDL και επομένως και η παραγωγή του PAF ^[358].

9. ΣΚΟΠΟΣ

Τα μεσαγγειακά κύτταρα ενέχουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς φλεγμονής στο επίπεδο του νεφρού αφού δέχονται την επίδραση κυτταροκινών και άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών από τα διηθούντα το μεσαγγείο λευκοκύτταρα. Υπό την επίδραση αυτών των παραγόντων τα μεσαγγειακά κύτταρα επιτείνουν την φλεγμονώδη απόκριση εκκρίνοντας με την σειρά τους φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λιπίδια, ελεύθερες ρίζες και αγγειοδραστικούς παράγοντες ενώ παράλληλα μεταβάλλεται η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από αυτά αλλάζοντας η μορφολογία και η λειτουργικότητα του σπειράματος. Στα πλαίσια αυτά σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν : α) Η μελέτη της σύνθεσης του φλεγμονώδη λιποειδικού μεσολαβητή Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, PAF από κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (HMCL) υπό την επίδραση της κυτταροκίνης IL-1β, β) Η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος πολικών λιποειδών ελαιολάδου (OOPLE), με αντιθρομβωτικές και αντιαθηρογόνες ιδιότητες, στην βασική σύνθεση PAF και στην επαγόμενη από IL-1β σύνθεση PAF από τα HMCL.

10. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

10.1. Καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε μια εξακριβωμένη σταθερή κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (**Human mesangial cell line, HMCL**). Τα κύτταρα έγιναν αθάνατα με την προσθήκη των ογκογονιδίων SV40 και H-ras. Τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων διατηρήθηκαν και στη κυτταρική σειρά (Κλώνος C2M12) όπως φαίνεται και στον πίνακα.

	Ανθρώπινα Μεσαγγειακά κύτταρα	Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων.
<i>Μορφολογία</i>		
Αστεροειδές σχήμα	+	+
Κυτοπλασμικές προεκτάσεις	+	+
Μικρολαχνές	+	+
Αντιγονικοί δείκτες		
α-ακτίνη	+	+
T-SV 40	-	+
<i>Συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας</i>		
Κολλαγόνο I	+	+
Κολλαγόνο IV	+	+
Λαμίνη	+	+
Φιμπρονεκτίνη	+	+
<i>Βιοσύνθεση</i>		
IL-6	+	+
Ρενίνη	+	+
t-PA	+	+
u-PA	+	+
PAI1	+	+

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Δοχεία καλλιέργειας (flask) 75 cm² και 25 cm²
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.

- Αποστειρωμένα δοχεία
- Πιπέτες 200, 1000 ml
- Αποστειρωμένα tips μπλε και κίτρινα
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Δοχεία καλλιέργειας επιφάνειας 25 και 75 cm²
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37 °C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής.
- Φυγόκεντρος RC-5B Sorvall.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Ορός νεογνού μόσχου (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Αμφοτερικίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Ανθρώπινη τρανσφερίνη, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4.1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7.66 mg / mL τρανσφερίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr Na₂HPO₄·2H₂O, 0.2408 gr NaH₂PO₄·2H₂O, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110 °C.
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).

Αναλυτική πορεία

Οι κάψουλες (vials) των κυττάρων φυλάσσονταν σε ειδικό δοχείο ισοπροπανόλης στους -80°C και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο. Για να γίνει καλλιέργεια των κυττάρων, προθερμαίνονταν το RPMI και ετοιμαζόταν το θρεπτικό τους υλικό. Το θρεπτικό υλικό περιείχε RPMI1640, 5% FCS, 2 mmol / L γλουταμίνη, 105 unit / L πενικιλίνη, 0.1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5×10^{-3} g / L αμφοτερικίνη, 5×10^{-3} g / L ινσουλίνη, 5×10^{-3} g / L ανθρώπινη τρανσφερρίνη, 5×10^{-3} g / L σεληνιώδες νάτριο (*sodium selenite*). Τα κύτταρα ξεπάγωνουν σε υδατόλουτρο (37°C) και φυγοκεντρώνονταν ($2000\text{ rpm} \times 10\text{ min}$, θερμοκρασία δωματίου) αφού αναδιαλύονταν σε 20 ml RPMI. Αποχυνόταν το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, αναδιασπείρονταν τα κύτταρα σε 14 ml θρεπτικό υλικό και τοποθετούνταν σε δοχεία (flask) εμβαδού 25 και 75 cm^2 . Στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστήρα, στους 37°C .

10.2. Συντήρηση και αναδιασπορά κυττάρων

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αποστειρωμένα δοχεία καλλιέργειας (flask) 75 cm^2 και 25 cm^2
- Αποστειρωμένα σιφώνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Αποστειρωμένα δοχεία
- Πιπέτες 200, 1000 ml
- Αποστειρωμένα tips μπλε και κίτρινα
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO_2 και σταθερής θερμοκρασία 37°C .
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής.
- Φυγόκεντρος RC-5B Sorvall.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Ορός νεογνού μόσχου (FCS) (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- L-Γλουταμίνη (Sigma): 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 10 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 200 mM. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 20 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, και προκύπτει διάλυμα 10000 units / mL πενικιλίνη-

και 25 mg / mL στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .

- Αμφοτεरिकίνη (Sigma). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 5 ml αποστειρωμένο DMSO, και προκύπτει διάλυμα 50 mg/ mL. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ανθρώπινη μεταφοράση, ινσουλίνη (ITS). 1 φιαλίδιο (vial) αναδιαλύεται σε 4.1 ml αποστειρωμένο νερό, και προκύπτει διάλυμα 5 mg / mL ινσουλίνη και 7.66 mg / mL τρανσφερρίνη. Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Θρυψίνη (Gibco BRL, Paisley, UK). Το διάλυμα χωρίζεται σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσεται στους -20°C .
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Διαλύονται 0.9076 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 gr NaCl σε απεσταγμένο νερό, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 110°C .
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v.v).

Αναλυτική πορεία

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα έφθαναν στο 80% της συμβολής στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη θρυψίνης και τα κύτταρα επωάζονταν για 2 λεπτά στους 37°C . Η αποκόλληση των κυττάρων ελεγχόταν με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντιστρόφου φάσης και ενισχύονταν με απότομη ανακίνηση του δοχείου καλλιέργειας. Η ενζυματική δράση της θρυψίνης τερματίζονταν με προσθήκη μέσου ανάπτυξης που περιείχε 5% FCS και η παραλαβή του ιζήματος των κυττάρων γινόταν με φυγοκέντρηση στα 1000*g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιασπείρονταν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας και τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας (25 και 75 cm^2) σε αναλογία διάσπασης 1:3.

10.3. Διέγερση των κυττάρων

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Αποστειρωμένα δοχεία καλλιέργειας κυττάρων 25 cm²
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 10 και 50 mL.
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL.
- Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας CO₂ και σταθερής θερμοκρασία 37 °C.
- Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής.
- Φυγόκεντρος RC-5B Sorvall.
- RPMI1640 (Gibco BRL, Paisley, UK).
- Φρέσκο μέσο ανάπτυξης RPMI1640.
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων και χαμηλής ενδοτοξίνης (Sigma)
- Φρέσκο μέσο χωρίς ορό (SFM: περιέχει 0.2 % BSA, 2 mmol / L γλουταμίνη, 105 unit / L πενικιλίνη, 0.1g / L στρεπτομυκίνη, 2.5 x 10⁻³ g / L αμφοτερικίνη.
- *IL-1β* 1 μg/ml : αναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος PBS 0,1% BSA-FFA ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 1 μg/ml IL-1β.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS).
- Διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v).

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα HMCL καλλιεργούνταν σε μέσο ανάπτυξης RPMI1640 σε αποστειρωμένα δοχεία καλλιέργειας κυττάρων 25 cm² με βάση τη μεθοδολογία που αναλύθηκε στην παράγραφο 1.A.

Κάθε 2-3 μέρες γινόταν αλλαγή στο μέσο καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα έφθαναν στο 80% της συμβολής στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας, απομακρύνονταν το μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη φρέσκου μέσου χωρίς ορό που περιείχε 0.2 % BSA (SFM) και ακολουθούσε παραμονή σε αυτό το μέσο για 24 ώρες ώστε να επέλθει συγχρονισμός των κυττάρων. Μετά τις 24 ώρες απομακρύνονταν το μέσο και τα κύτταρα πλένονταν με PBS. Ακολουθούσε προσθήκη φρέσκου μέσου SFM που

περιείχε είτε σκέτη BSA (κοντρόλ) είτε διαλύματα IL-1β κατάλληλης συγκέντρωσής σε PBS 0,1% BSA, είτε κάποιον άλλο παράγοντα ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος.

10.4. Προσδιορισμός PAF στα κύτταρα και το μέσο καλλιέργειας

10.4.A. Εκχύλιση PAF από τα κύτταρα και το θρεπτικό μέσο

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- Φυγόκεντρος RC-5B Sorvall
- Μεγάλοι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μικροί γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες 1 ml
- Αποστειρωμένα tips μπλε
- Scrappers πλαστικά
- Μεγάλες γυάλινες πιπέτες pasteur
- Αναδευτήρας (Vortex)
- Μεθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία

Η επεξεργασία του μέσου για τον προσδιορισμό του PAF περιελάμβανε καταρχήν την παραλαβή του με χρήση tip, σε πλαστικό σωλήνα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 500 g x 10 min, στους 10°C, ώστε να καταβυθιστούν τυχόν αποκολλημένα κύτταρα και ακολουθούσε παραλαβή του υπερκλειμένου σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα. Οι μεγάλοι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν αμέσως σε πάγο. Το μίγμα των λιποειδών του υπερκλειμένου εκχυλιζόταν με εκχύλιση Bligh-Dyer ως εξής: γινόταν προσθήκη με σιφώνι 3,3 ml C + 3,33 ml M και καλή ανάδευση. Το σύστημα γινόταν διφασικό και κολουθούσε παραλαβή τη κάτω φάσης (M) με μεγάλη πιπέτα pasteur. Ακολούθως, προστίθονταν επιπλέον 2 ml C, γινόταν καλή ανάδευση και ξανά παραλαβή της κάτω φάσης. Η κάτω φάση φυλαγόταν στο ψυγείο σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.

Η επεξεργασία των κυττάρων για τον προσδιορισμό του PAF περιελάμβανε καταρχήν την έκπλυση των κυττάρων στη φλάσκα με 3 ml PBS. Στη συνέχεια, προστίθονταν με *tip* του 1 ml MeOH και οι φλάσκες φυλάσσονταν στο ψυγείο για 1 h. Ακολουθούσε παραλαβή των κυττάρων με πλαστικά scrapers σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες και έκπλυση με άλλο 1 ml MeOH. Το μίγμα των λιποειδών των κυττάρων εκχυλιζόταν με εκχύλιση Bligh-Dyer. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 2 ml C + 1,8 ml W με γυάλινο σιφώνι, ακολουθούσε καλή ανάδευση σε vortex, φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 5 min, και παραλαβή της κάτω φάσης σε γυάλινες μεγάλες πιπέτες pasteur. Ακολουθούσε έκπλυση της πάνω φάσης με 1 ml C, ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 5 min και ξανά παραλαβή κάτω φάσης (C). Ακολουθούσε εξάτμιση μέχρι ξηρού σε αέριο άζωτο και έπειτα αναδιάλυση κάτω φάσης σε 2 ml C:M (1:1) από τα οποία παραλαμβάνονταν με *tip* 0,3 ml για προσδιορισμό P.

10.4.B. Διαχωρισμός του PAF με HPLC

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπα λιποειδή από Merck, Supelco, Sigma
- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-Packard (HP SERIES 1100) συνδεδεμένος με στήλη κατιοντοανταλλαγής SCX, ανιχνευτή υπεριώδους στα 208 nm και καταγραφέα HP 1100
- Μικροσύριγγες ακριβείας 50 και 250 μ L
- Λουτρό υπερήχων Branson 1200
- Αέριο άζωτο
- Διάλυμα C:M 1:1
- Αναδευτήρας (Vortex)

Αρχή μεθόδου-Αναλυτική πορεία

Αρχικά, η στήλη προετοιμάζοταν με την έκλουσή της από την κινητή φάση, η οποία ήταν AcN:MeOH:W (60:32:8, v/v/v), για περίπου 30 min. Στη συνέχεια γίνονταν διαδοχικές ενέσεις μίγματος φωσφολιποειδών μέχρι ωσότου οι χρόνοι έκλουσης των κορυφών μεταξύ δυο διαδοχικών χρωματογραφημάτων να είναι ίδιοι. Στην συνέχεια, ενίονταν όλη η ποσότητα του δείγματος, το οποίο είχε αναδιαλυθεί πρώτα σε 100 μ L. Για κάθε δείγμα συλλεγόταν η περιοχή έκλουσης του PAF (περιοχή B), μια περιοχή 3 min πριν την περιοχή του PAF (περιοχή A) και μια περιοχή 3 min μετά την περιοχή του PAF (περιοχή Γ).

Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml/min και η ανίχνευση των κορυφών γινόταν με ανιχνευτή UV στα 208 nm.

10.4.Γ. Προσδιορισμός του PAF με βιολογική διαδικασία συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα 10x Tyrodes stock : Σε 1 lt νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock : Σε 100 ml νερού διαλύονται 1,911 g CaCl_2
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock : Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 ml νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M
- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg EGTA pH 6,5) : Σε 80 ml νερό προσθέτονται 10 ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προσθέτονται 2,5 ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν, προσθέτονται 5 ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203 g NaHCO_3 σε 10 ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 ml. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25 μL EGTA 0,2 M. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1 N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 16 ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes-ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2) : Σε 5 ml Tyrodes 10x προστίθενται 40 ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 ml διαλύματος ζελατίνης 10%. Στη συνέχεια προσθέτονται 0,5 ml διαλύματος CaCl_2 100x. Κατόπιν προστίθενται 2,5 ml διαλύματος NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1 N. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιπηκτικό διάλυμα ACD : Σε 1000 ml νερού διαλύονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.

- Διάλυμα βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/ml : Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) διαλύεται σε 1 ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους -20 °C
- Διάλυμα BSA 2,5 mg/ml : Από 10 ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μ L και προστίθενται 250 μ L BSA stock
- Ficoll-Paque (Pharmacia)
- Υγρό επίστρωσης σιλικόνης (Serva)
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 ml
- Πλαστικά σιφώνια των 20 ml
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log
- pHμετρο ORION 410A
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb
- Υδρόλουτρο 37 °C
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont

Αναλυτική πορεία

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 ml προστίθονταν 7 ml ACD. Το αίμα συλλέγονταν από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού, ο σωλήνας γέμιζε με αίμα μέχρι τα 50 ml και αναμιγνύονταν ήπια με αναστροφή. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 500g (~ 1800 στροφές ανά λεπτό, rpm). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρωσης μεταφέρονταν 2 ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 ml. Αναρροφόνταν τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφόνιο των 20 ml και μεταφέρονταν σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 ml. Τοποθετούνταν το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό πλάσματος τα 9 ml για κάθε 2 ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονταν ίσοι όγκοι πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζονταν με parafilm και οι σωλήνες φυγοκεντρούνταν για 20 min στους 24 °C στα 750g (2200 rpm). Μετά την φυγοκέντρωση τα αιμοπετάλια εμφανίζονταν σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Ακολουθούσε αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκείμενου πλάσματος (φτωχό σε αιμοπετάλια) με πλαστική σύριγγα των 20 ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων το διαπερνούσε σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφόταν το Ficoll και απορρίπτονταν. Αν υπάρχουν 2 σωλήνες προστίθονταν 7 ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφηνόταν να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχυνόταν το αιώρημα σε άλλο πλαστικό

σωλήνα των 14 ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Αν υπήρχαν 3 σωλήνες προστίθονταν 3 ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφηνόταν να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχυνόταν το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml του οποίου το περιεχόμενο χωριζόταν σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονταν σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθονταν περίπου 3 ml Tg EGTA pH 6,5. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφερόταν σε 2 ml Ficoll (8 ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλυπτόταν με parafilm. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 2400 rpm και στην συνέχεια, απορρόφηση και απόχυση του υπερκείμενου ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθούσε διαπέραση του στρώματος των αιμοπεταλίων με πιπέτα pasteur, αναρρόφηση και απόχυση του Ficoll. Στην συνέχεια προστίθονταν ίσοι όγκοι (~ 8 ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφερόταν το ελαιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 ml και καλύπτονταν με parafilm. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 15 min στους 24 °C στα 2350 rpm και σακολούθως, απορρόφηση και απόρριψη του υπερκείμενου ρυθμιστικού διαλύματος μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Προστίθονταν 0,8 ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνονταν με πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμαζόταν ελαιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που περιείχε $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονταν 10 μ L τα οποία αραιώνονταν με 990 μ L Tg pH 6,5 και ακολουθούσε φωτομέτρηση του διαλύματος στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μ L δινόταν από τον τύπο : $\text{κύτταρα}/10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \cdot 10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων, υπολογίζονταν ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζονταν το επιθυμητό ελαιώρημα αιμοπεταλίων.

Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθονταν 100 μ L από το ελαιώρημα αιμοπεταλίων και 400 μ L Tg Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρεφόταν με 1200 rpm. Επωάζονταν για 15 min σε υδρόλουτρο 37 °C. Ρυθμιζόταν το 100 της κλίμακας του συσσωρευματομέτρου με Tg Ca pH 7,2 και το 0 με το ελαιώρημα αιμοπεταλίων. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το ελαιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείτο στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθονταν διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο ήταν διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5 mg/ml και καταγράφονταν η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της

διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζονταν το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διερχόταν η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης ήταν ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων καθοριζόταν από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιαζόταν η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100 % συσσώρευση οριζόταν η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γινόταν ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που είχε την ίδια βιολογική δραστικότητα. Εξετάζονταν επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα έμοιαζε με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις).

10.5. Προσδιορισμός δραστικότητας των ενζύμων

10.5.A. Επεξεργασία κυττάρων και μέσου για προσδιορισμό ενζύμων

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Φυγόκεντρος RC-5B Sorvall
- Μικροί γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μεγάλοι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες 1000 ml
- Scrappers πλαστικά
- Μη αποστειρωμένη BSA
- Ομογενοποιητής υπερήχων
- Σωλήνες eppendorf
- PBS
- Ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης: όπως στην παράγραφο 10.5.A.

Αναλυτική πορεία

Η επεξεργασία του μέσου για τον προσδιορισμό των ενζύμων περιελάμβανε την παραλαβή υπερκειμένου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 500 g x 10 min, στους 10°C,

ώστε να καταβυθιστούν τυχόν αποκολλημένα κύτταρα και ακολουθούσε παραλαβή του υπερκλειμένου και φύλαξη στο ψυγείο και μετά μοίρασμά του σε 3 vials του 1 ml (3x1 ml).

Η επεξεργασία των κυττάρων για τον προσδιορισμό των ενζύμων περιελάμβανε καταρχήν, την έκπλυση κυττάρων με παγωμένο PBS. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης και απόξυση υπό ψύξη. Ακολουθούσε κατεργασία των κυττάρων στον ομογενοποιητή υπερήχων, 4 x 10 sec, υπό ψύξη. Κατόπιν, γινόταν φυγοκέντρωση στα 500g x 10 min υπό ψύξη και παραλαβή υπερκλειμένου. Φυλάσσονταν 200 λ για προσδιορισμό Bradford και το υπόλοιπο μοιραζόταν σε eppendorfs 4x200 μL.

10.5.B. Προσδιορισμός δραστηριότητας 1-O-αλκυλο-2-λυσω-sn-γλυκερυλο-3-

φωσφορυλογολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (REM AT) με TLC^[380]

Όργανα

- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
- Φυγόκεντρος
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αναλώσιμα

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου
- Tips κίτρινα, μπλε

Στερεά αντιδραστήρια

- Tris
- Sucrose
- lyso-PAF (C_{16:0}) (Sigma)
- Ακετυλο-CoA (Sigma)
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
- Silica gel H

Διαλύτες

- MeOH
- CHCl₃
- AcOH

Διαλύματα

- **Διάλυμα φύλαξης (stock) λυσο-PAF 2,5 mg/ml** : Διαλύονται 10 mg λυσο-PAF σε 4 ml MeOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 °C.
- **Διάλυμα ακετυλο-CoA 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50mM-pH 7,4)** : Διαλύονται 25 mg σε 1540 ml ρυθμιστικού διαλύματος
- **Διάλυμα BSA 10 mg/ml** : Διαλύονται 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM-pH 7,4)
- **Διάλυμα λυσο-PAF σε BSA (10mg/ml) συγκέντρωσης 800 μM (διάλυμα εργασίας)**: Φέρονται 40 μL διαλύματος λυσο-PAF 2,5 mg/ml σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε 259 μL BSA 10 mg/ml. Παρασκευάζεται καινούριο διάλυμα κάθε φορά. Προσθήκη 5 μL από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση λυσο-PAF 20 μM και τελική συγκέντρωση BSA 0,25 mg/ml.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4)** : Διαλύονται 0,605 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,4 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό.
- **Διάλυμα αναδιάλυσης Tris (50 mM-pH 7,4)-Suc 0,25 M-DTT 1 mM** : Διαλύονται 0,605 g Tris, 8,55 g σακχαρόζης και 0,0154 g DTT σε 100 ml νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 1 N

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηρότητας της *gem AT* βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με λυσο-PAF και ακετυλο-CoA, παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αναλυτική πορεία

Ενζυμική δοκιμασία

- Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), 5 μL διαλύματος εργασίας λυσο-PAF (τελική συγκέντρωση 20 μM), 2 μL διαλύματος ακετυλο-CoA (τελική συγκέντρωση 200 μM) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50 μL

προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μL .

- Προεπώαση για 5 min στους 37 °C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος.
- Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 °C για 30 min.

Προσδιορισμός παραγόμενου PAF

- Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μL παγωμένου H_2O και 1111 μL μίγματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2 % AcOH).
- Μετά από έντονη ανάδευση φυγοκεντρείται το μίγμα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση, η οποία εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel H.
- Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης C:M:AcOH:W (100:57:16:8).
- Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2 .
- Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ Sm και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Το ξύσμα φέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ο PAF εκχυλίζεται με 2 ml μίγματος C:M:W (1:2:0,8) (x 2). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα C και W ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF, η οποία φυλάσσεται στους -20°C .
- Το κλάσμα του PAF αναδιαλύεται σε BSA 2,5 mg/ml και η συγκέντρωσή του προσδιορίζεται με βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

10.5.Γ. Προσδιορισμός δραστηρότητας της DTT-ανεξάρτητης

αλκυλοακετυλογλυκερόλη:CDP-χολίνη φωσφοχολινوترασφεράσης με TLC^[404]

Όργανα

- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
- Φυγόκεντρος
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο

Αναλώσιμα

- Σωλήνες πολυπροπυλενίου

- Tips κίτρινα, μπλε

Στερεά αντιδραστήρια

- Tris
- EDTA
- $MgCl_2$
- DTT
- Αλκυλακέτυλογλυκερόλη (AAG) ($C_{16:0}$) (Biomol)
- CDP-χολίνη (Sigma)
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
- Silica gel H

Διαλύτες

- MeOH
- $CHCl_3$
- AcOH

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM-pH 8,0)/EDTA 0,5 mM/ $MgCl_2$ 10mM/DTT 15 mM : Διαλύονται 1,2114 g Tris, 0,2033 g $MgCl_2$, 0,0146 g EDTA και 0,2313 g σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 8,0. Αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό.
- Διάλυμα AAG 10mM : Διαλύονται τα 5 mg του φιαλιδίου σε 1324 μ L EtOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20 °C (σταθερό για 6 μήνες)
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Choline 100mM : Διαλύονται 100 mg σε 1830 μ L απεσταγμένου νερού (ανάλογα την καθαρότητα του αντιδραστηρίου)
- Διάλυμα εργασίας (working) CDP-Choline 4mM
- Διάλυμα BSA 40 mg/ml : Διαλύονται 200 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CDP-CPT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με CDP-choline και AAG παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται από το μίγμα της αντίδρασης με όξινη

εκχύλιση Bligh-Dyer, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με TLC και προσδιορίζεται με βιολογικό πείραμα.

Αναλυτική πορεία

Ενζυμική δοκιμασία

- Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM-pH 7,4), 5 μ L διαλύματος CDP-choline 4 mM (τελική συγκέντρωση 100 μ M), 5 μ L διαλύματος BSA 40mg/ml (τελική συγκέντρωσης 1mg/ml) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50 μ L προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μ L ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 μ L.
- Προεπώαση για 5 min στους 37 °C
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος και μετά από 30 sec προστίθενται 2 μ L διαλύματος AAG 10mM (τελική συγκέντρωση 100 μ M)
- Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο υπό ανάδευση στους 37 °C για 20 min.

Προσδιορισμός παραγόμενου PAF

- Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 300 μ L παγωμένου H_2O και 1111 μ L μίγματος $CHCl_3/MeOH$ (2 % AcOH).
- Μετά από έντονη ανάδευση φυγοκεντρείται το μίγμα ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση, η οποία εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο και φέρεται σε πλάκα TLC επιστρωμένη με Silica gel H.
- Η πλάκα αναπτύσσεται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης C:M:AcOH:W (100:57:16:8).
- Μετά το τέλος της ανάπτυξης, εξατμίζεται ο διαλύτης και εμφανίζεται η πλάκα σε ατμούς I_2 .
- Εντοπίζεται η περιοχή του PAF (μεταξύ Sm και λυσο-PC) και ξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Το ξύσμα φέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ο PAF εκχυλίζεται με 2 ml μίγματος C:M:W (1:2:0,8) (x 2). Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα C και W ώστε το σύστημα να γίνει

διφασικό και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF, η οποία φυλάσσεται στους -20°C

10.6. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer ^[359]

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Rotavapor Buch RE III

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως αλάτων, αμινοξέων κ.α. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στην μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζονταν με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v), αναδεύονταν έντονα και φυγοκεντρούνταν, αν χρειαζόταν, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Στην συνέχεια προσθέτονταν υπολογισμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O (0,25 ml για κάθε 1 ml προστιθέμενου μίγματος διαλυτών) ώστε η αναλογία των διαλυτών να γίνει $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v) και το σύστημα να μετατραπεί σε διφασικό. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση μεταφέρονταν, ανάλογα τον όγκο της, είτε σε γυάλινο σωλήνα, είτε σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμιζόταν σε ρεύμα αζώτου ή σε flash evaporator, αντίστοιχα. Τα λιποειδή αναδιαλύονταν σε μικρή ποσότητα μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία. Τα όξινα φωσφολιποειδή όπως το ALPA και το AAPA εκχυλίζονταν με όξινο μονοφασικό σύστημα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (HCl1N)/ H_2O (1:2:0,8, v/v/v), που περιείχε και 0,1 mg/ml PC, η οποία λειτουργούσε ως φορέας των όξινων φωσφολιποειδών και υποβοηθούσε την μεταφορά τους στην οργανική φάση. Μετά την εκχύλιση, η χλωροφορμική φάση εκπλένονταν με νερό.

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Υπερχλωρικό οξύ (HClO_4) 70%.
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4% : Ζυγίζονται 2.21 g Μολυβδαινικό αμμωνίου και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL.
- Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ): Διαλύονται 30 g NaHSO_3 και 6 g Na_2SO_3 σε 250 mL νερό. Στο διάλυμα αυτό διαλύονται 0.5 g 1.2.4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος. Αν μετά από τρεις ώρες σχηματιστεί ίζημα, διηθείται και το αντιδραστήριο φυλάσσεται υπό ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του.
- Αντιδραστήριο ANSA : Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού με ανάμιξη 4 mL διαλύματος ANSA και 6 mL απεσταγμένου νερού.
- Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 4 $\mu\text{g P/mL}$.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες από θερμοανθεκτική βιοπολυμερική ύαλο (pyrex)
- Σιφόνιο των 10 mL.
- Αυτόματη πιπέτα των 1000 mL.
- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 $^{\circ}\text{C}$
- Φωτόμετρο Novaspec II (Pharmacia Biotech)

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή με καύση, παρουσία υπερχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο, το οποίο παρουσία του ANSA ως αναγωγικού μέσου και με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον ανάγεται προς κυανούν του μολυβδαινίου.

Αναλυτική πορεία

Δοκιμαστικοί σωλήνες pyrex πλένονταν με χρωμοθειικό οξύ και ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό. Το δείγμα, που περιείχε 0.5-5 $\mu\text{g P}$, φέρονταν στο δοκιμαστικό σωλήνα pyrex, εξατμιζόταν ο διαλύτης, προσθέτονταν 0.5 mL υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 170-180 $^{\circ}\text{C}$ για 1 h. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προσθέτονταν 1 mL

απεσταγμένου νερού, 3 mL μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 mL αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα, οι σωλήνες τοποθετούνταν σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 100 °C για 10 min. Αφήνονταν να ψυχθούν για 20 min και φωτομετρούνταν στα 820 nm. Παράλληλα, γινόταν τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα δισόξινου φωσφορικού καλίου που περιείχαν 0.5 έως 5 μg φωσφόρου.

10.8. Προσδιορισμός σακχάρων στα λιποειδή ^[361]

Αντιδραστήρια- Όργανα:

- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL
- Σιφώνια των 10 mL.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II
- Πυκνό θειικό οξύ (H₂SO₄)
- Διάλυμα φαινόλης 5%
- Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης

Αρχή μεθόδου

Οι εξόζες με την επίδραση πυκνού θειικού οξέος σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρφουρόλη, που με φαινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται και οι πεντόζες.

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα το οποίο περιείχε 20-150 μg σακχάρου φέρονταν σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμιζόταν ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1 mL νερού, 1mL διαλύματος φαινόλης και 2.5 mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος. Ύστερα από παραμονή 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φωτομετρούνταν στα 490 nm. Παράλληλα γινόταν τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με δείγματα που περιείχαν 20-150 μg γλυκόζης.

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu : Διαλύονται 10 g βολφραμικού νατρίου και 2.5g μολυβδαινικό νάτριο σε 70 mL νερό. Προστίθενται 5 mL φωσφορικού οξέος (H₃PO₄) 85% και 10 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το όλο μίγμα αφήνεται σε επαναρροή για 10 h. Στη συνέχεια προστίθενται 16g θειικού λιθίου, 5 mL νερό και μια σταγόνα βρωμίου και ακολουθεί επαναρροή για 15 min. Αφήνεται προς ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και φέρεται σε όγκο 100mL συμπληρώνοντας με νερό. Εξασθενή σύμπλοκα των φωσφομολυβδαινικού/ φωσφοβολφραμικού οξέων με τις ακόλουθες μορφές σχηματίζονται στο διάλυμα:



- Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος, τυροσόλης
- Διάλυμα Na₂CO₃ 35% (w/v)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL
- Σιφόνια των 20 mL.
- Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου του Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος το οποίο και φωτομετρείται στα 725 nm.

Αναλυτική πορεία

Το προς εξέταση δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται διαδοχικά 3.5 mL νερό, 0.1 mL Folin-Ciocalteu και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση. Μετά από παραμονή 3 min προσθέτονταν 0.4 mL Na₂CO₃ 35% (w/v) και το όλο μίγμα αφού είχε αναδευτεί εντόνως με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα, αφηνόταν προς αντίδραση για μια ώρα και ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 725 nm. Παράλληλα γινόταν τυφλός προσδιορισμός καθώς και

προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα που περιείχαν από 1 έως 60 μg γαλλικό οξύ και τυροσόλη.

10.10. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford^[352]

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) 3,3 mg/10 ml : Διαλύονται 33 mg BSA σε 100 ml νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα
- Stock διάλυμα Coomassie Blue G : 100mg σε 50 ml MeOH και αυτό προστίθεται σε 100 ml H_3PO_4 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 200 ml με H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C
- Αντιδραστήριο Bradford. Αναμιγνύεται 1 όγκος stock διαλύματος με 4 όγκους νερού.
- Φωτόμετρο 4040-LKB Biochrom, Novaspec

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες προκαλώντας μια μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465 σε 595 nm. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 1 μg σε 140 μg πρωτεΐνης, ως προς BSA.

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζονταν πρότυπα διαλύματα BSA των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Παρασκευαζόταν διάλυμα του άγνωστου δείγματος σε νερό ώστε η τελική του συγκέντρωση να βρίσκεται στην περιοχή από 3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Σε κάθε δείγμα προστίθονταν 200 μL αντιδραστηρίου Bradford και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ε ήταν 1 ml.

Προσδιοριζόταν η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων μετά από 5 min στα 590 nm. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης χρωστικής είναι σταθερό για 60 min. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη γινόταν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

10.11. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών

Αντιδραστήρια - Όργανα

- 2,5-Διφαινυλοξαζόλιο (PPO), BDH Chemicals
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (POPOP), BDH Chemicals
- Ναφθαλίνιο
- Διοξάνη, τολουόλιο
- Υγρά σπινθηρισμού :
 - α) Dioxane base : Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 ml νερό.
 - β) Toluene base : Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 5 g PPO και 0,3 g POPOP σε 1 L τολουολίου.
- Αναδευτήρας τύπου δίνης (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20 ml
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100

Αρχή μεθόδου

Το ραδιενεργό δείγμα αναμιγνύεται με το διάλυμα σπινθηρισμού που περιέχει ένα διαλύτη και μία ή περισσότερες ουσίες που φθορίζουν. Τα εκπεμπόμενα από το ραδιενεργό δείγμα β σωματίδια διεγείρουν το διαλύτη και αυτός με τη σειρά του διεγείρει τις φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φωτόνια, τα οποία καταγράφονται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Το σύνολο των φωτονίων, που εκπέμπονται μετά από κάθε εκπομπή β σωματιδίων, ανιχνεύονται σαν ένας παλμός, ο οποίος μεταβιβάζεται σε ένα σύστημα μέτρησης το οποίο καταγράφει τους παλμούς σαν ξεχωριστές κρούσεις.

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα, όγκου μέχρι 0,1 ml, φέρονται στα πλαστικά φιαλίδια στα οποία έχουν προστεθεί 5 ml υγρού σπινθηρισμού. Αναδεύονται ισχυρά με κυκλοαναδευτήρα, κλείνονται ερμητικά με τα πώματα των φιαλιδίων και τοποθετούνται με ειδικές υποδοχές (raks) στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Μετρώνται οι κρούσεις του ραδιενεργού δείγματος για 5 ή 10 min και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm) αφού αφαιρεθούν οι κρούσεις ανά λεπτό του τυφλού προσδιορισμού που περιέχει μόνο το υγρό σπινθηρισμού.

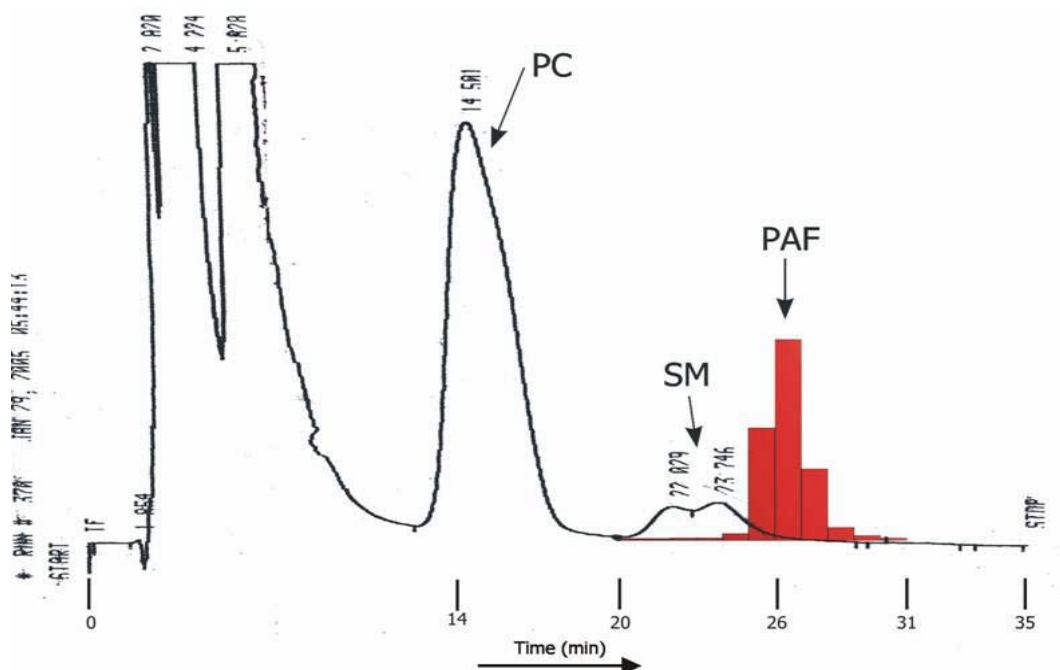
11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1. Προκαταρκτικά πειράματα

11.1.1. Εύρεση της περιοχής συλλογής του PAF από την HPLC.

Σκοπό του πειράματος αυτού αποτέλεσε η διερεύνηση των περιοχών παραλαβής των διαφόρων κλασμάτων των λιποειδών από την HPLC ώστε να βρεθεί η περιοχή παραλαβής του PAF. Για τον σκοπό αυτό εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή από το θρεπτικό υλικό και από κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε δοχεία καλλιέργειας των 75 cm². Στο μίγμα των ολικών λιποειδών προστέθηκε ποσότητα ραδιενεργού PAF συνολικής δραστηριότητας 20 000 cpm και τα μίγματα ενέθηκαν στην στήλη κατιοντοανταλλαγής με σύστημα έκλουσης AcN:MeOH:W (60:32:8, v/v/v).

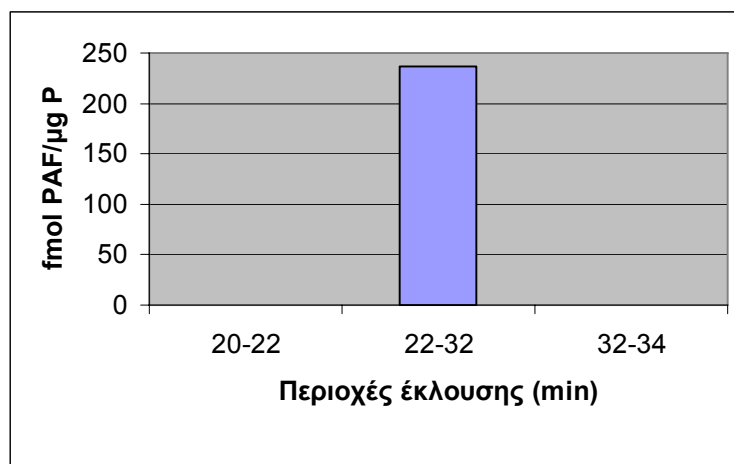
Συλλέχθηκαν τα κλάσματα σε διάφορες χρονικές στιγμές ώστε να εξασφαλιστεί η σίγουρη συλλογή του PAF αφού δεν ήταν γνωστή η ακριβής περιοχή. Συλλέχθηκαν τα κλάσματα στους χρόνους 20-21, 21-22, 22-23, 23-24, 24-25, 25-26, 26-27, 27-28, 28-29, 29-30, 30-31 min. Στη συνέχεια ακολούθησε μέτρηση της ραδιενέργειας των συλλεγόμενων κλασμάτων. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα με τις αντίστοιχες τιμές ραδιενέργειας φαίνεται στο σχήμα 11.1.



Σχήμα 11.1. Χρωματογράφημα μίγματος ολικών λιποειδών από HMCL τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε δοχείο καλλιέργειας των 75 cm² που είχε προστεθεί ραδιενεργός PAF συνολικής δραστηριότητας 20 000 cpm. Η έκλουση έγινε με σύστημα can:MeOH:W (60/32/8, v/v/v) και η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml/min. η ανίχνευση των κορυφών έγινε με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας στα 208 nm. Με τις κόκκινες μπάρες απεικονίζεται η ποσότητα της ραδιενέργειας τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

Από το σχήμα 11.1. φαίνεται ότι η περιοχή έκλουσης του PAF βρίσκεται μετά την σφιγγομυελίνη, μεταξύ 22-32 min περίπου.

Τα παραπάνω ευρήματα εφαρμόστηκαν για τη συλλογή και τον προσδιορισμό του PAF από κύτταρα τα οποία δεν είχαν ενεργοποιηθεί με κάποιον παράγοντα. Η συλλογή του κλάσματος αυτού και ο προσδιορισμός του PAF μέσω της βιολογικής μεθόδου έδωσαν τα παρακάτω επίπεδα PAF.



Σχήμα 11.2. Επίπεδα PAF στις 3 περιοχές συλλογής από την HPLC.

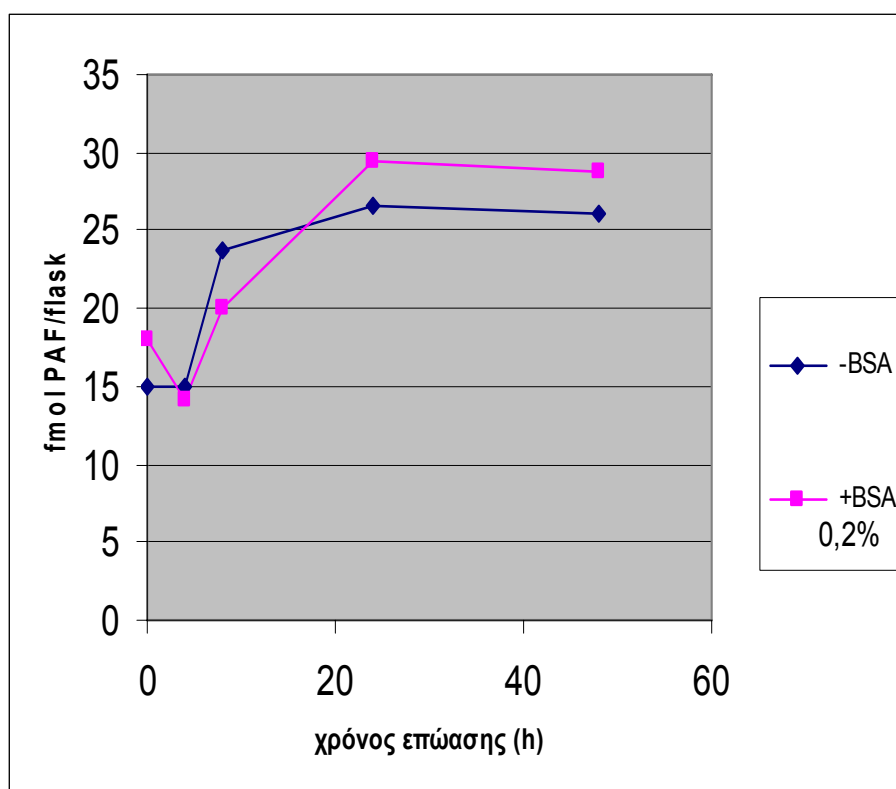
Από ότι φαίνεται όλη η ποσότητα του PAF εκλύεται στην αναμενόμενη, βάση των αποτελεσμάτων της ραδιενέργειας, περιοχή μεταξύ 22-32 min. Η περιοχή αυτή ήταν η περιοχή συλλογής του PAF στα επόμενα πειράματα.

11.1.2. Επίδραση της BSA του θρεπτικού υλικού στην σύνθεση του PAF από τα HMCL .

Η BSA ως πρωτεΐνη δεν επηρεάζει την ενδογενή παραγωγή του PAF από τα HMCL. Ενδεχομένως όμως κάποιο συστατικό που βρίσκεται μαζί με αυτήν να επηρεάζει τα επίπεδα του PAF, όπως για παράδειγμα κάποια λιπαρά οξέα ή ενδοτοξίνες [364]. Στην περίπτωση αυτή, η παραγωγή του PAF θα επηρεάζεται ανεξάρτητα από το αν έχει προστεθεί παράγοντας διέγερσης στα κύτταρα ή όχι.

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να βρεθεί αν η επώαση των HMCL σε διάφορα χρονικά διαστήματα με και χωρίς BSA επηρεάζει την σύνθεση PAF.

Για το σκοπό αυτό καλλιέργειες HMCL επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό με και χωρίς BSA για διάφορα χρονικά διαστήματα και στην συνέχεια προσδιορίστηκε ο PAF τόσο στο μέσο καλλιέργειας όσο και στα κύτταρα.



Σχήμα 11.3. Επίδραση BSA θρεπτικού υλικού στην σύνθεση του PAF από τα HMCL

Από το σχήμα 11.2. φαίνεται ότι η ενδοκυτταρική παραγωγή του PAF λαμβάνει χώρα στα HMCL με και χωρίς BSA στο θρεπτικό υλικό χωρίς η BSA να επηρεάζει την σύνθεση του PAF. Αυτό το πείραμα, το οποίο ήταν και το 1^ο πείραμα μελέτης της σύνθεσης του PAF από τα

HMCL, επιβεβαίωσε ότι μπορούν να μετρηθούν τα επίπεδα του PAF σε καλλιέργειες των HMCLτων 25 cm² με την προαναφερθείσα μεθοδολογία. Πρέπει να τονιστεί ότι δεν ανιχνεύτηκε PAF στο μέσο καλλιέργειας.

Τέλος, παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της C_{PAF} στις 24 ώρες με και χωρίς BSA.

11.1.3. Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου παραλαβής των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραλαβή των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας. Η επιλογή της καλύτερης μεθόδου καθορίζεται από την επίδραση αυτής ή όχι στις κυτταρικές λειτουργίες καθώς και από το κόστος και την ευκολία.

Σκοπός ήταν η εύρεση του καλύτερου τρόπου παραλαβής των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας (προσθήκη MeOH στο δοχείο ή παραλαβή κυττάρων με θρυψίνη και μετά εκχύλιση Bligh-Dyer).

Χρησιμοποιήθηκαν 9 δοχεία καλλιέργειας των οποίων η επεξεργασία παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

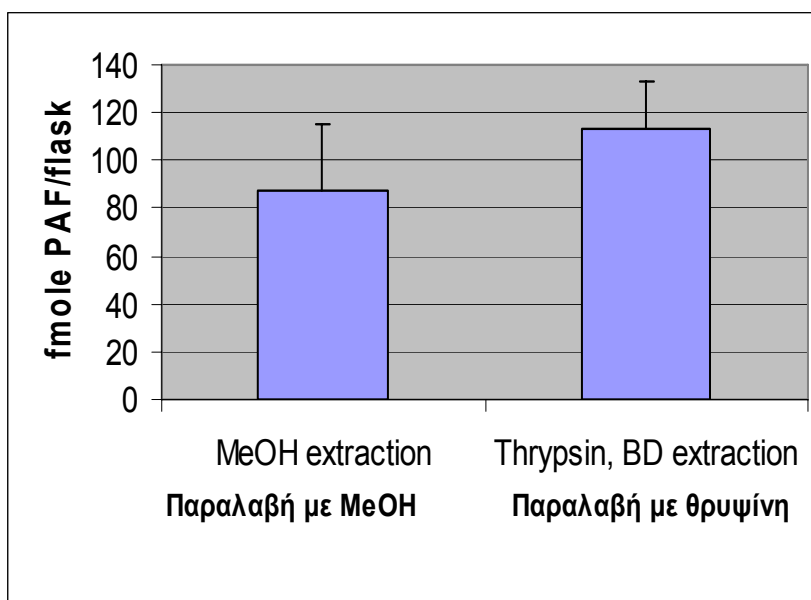
Πίνακας 11.1. Αναλυτική παρουσίαση των διαφορετικών πορειών που ακολουθήθηκαν για την επεξεργασία των δοχείων καλλιέργειας και την επακόλουθη παραλαβή των κυττάρων.

Δοχεία καλλιέργειας	Επεξεργασία μέσου	Επεξεργασία κυττάρων
Επεξεργασία με MeOH	• Παραλαβή σε πλαστικό σωλήνα • Φυγοκέντρηση 500 g x 10 min, 10°C και παραλαβή υπερκειμένου σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα • Προσθήκη 3,3 ml C + 3,33 ml M, ανάδευση, ψυγείο, παραλαβή κάτω φάσης (M)	• Έκπλυση με 3 ml PBS • Προσθήκη 2 ml MeOH, ψυγείο 1 h. • Παραλαβή κυττάρων με πλαστικά scrapers σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες • Προσθήκη 2 ml C + 1,8 ml W, ανάδευση, φυγοκέντρηση, παραλαβή κάτω φάσης • Έκπλυση πάνω φάσης με 1 ml C, ανάδευση, φυγοκέντρηση, παραλαβή κάτω φάσης (C)
Επεξεργασία με θρυψίνη	-/-	• Έκπλυση με 3 ml PBS • Προσθήκη 1 ml διαλύματος θρυψίνης και επώασης για 3 min στους 37 °C. • Προσθήκη 3 ml PBS (5% FCS) και παραλαβή υπερκειμένου σε πλαστικούς

		σωλήνες (TM) • Παραλαβή σε πλαστικό σωλήνα • Φυγοκέντρωση 500 g x 10 min, 10°C και παραλαβή υπερκειμένου σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα • Προσθήκη 4,4 ml C + 4,4 ml M, ανάδευση, ψυγείο, παραλαβή κάτω φάσης (C) • Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 2 ml W + 2,2 ml C + 2,2 ml M, ανάδευση, φυγοκέντρωση, παραλαβή κάτω φάσης • Έκπλυση πάνω φάσης με 1 ml C, ανάδευση, φυγοκέντρωση, παραλαβή κάτω φάσης
--	--	--

Αξίζει να σημειωθεί πως παρά το γεγονός ότι και τα υπερκείμενα των κυττάρων συλλέχθηκαν και πέρασαν από την επεξεργασία της HPLC, σε αυτά δεν ανιχνεύτηκε PAF στην συλλεγόμενη φάση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 11.4.

Φαίνεται ότι υπάρχει μια μικρή αύξηση, μη στατιστικά σημαντική, στην παραλαβή του PAF αν η επεξεργασία των κυττάρων γίνει με θρυψίνη. Ωστόσο, επειδή η διαφορά αυτή δεν είναι μεγάλη, και επειδή η θρυψίνη θα μπορούσε να ενεργοποιεί τα κύτταρα για σύνθεση του PAF, αποφασίστηκε η παραλαβή των κυττάρων να γίνεται με τη μέθοδο της MeOH.



Σχήμα 11.4. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυτταρικού PAF μετά από επεξεργασία των κυττάρων είτε με MeOH είτε με θρυψίνη όπως φαίνεται στον πίνακα 11.1.

11.1.4. Μέτρηση λιποειδικού φωσφόρου στα HMCL.

Τα επίπεδα του PAF εξαρτώνται από τον αριθμό των κυττάρων μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Ωστόσο, ο αριθμός των κυττάρων μέσα στο δοχείο καλλιέργειας δεν είναι καθορισμένος και για το λόγο αυτό ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών δοχείων καλλιέργειας. Επομένως, δεν είναι εφικτή η σύγκριση των επιπέδων του παραγόμενου PAF μεταξύ των διαφορετικών δοχείων καλλιέργειας. Για να είναι εφικτή η σύγκριση των επιπέδων του PAF μεταξύ των διαφορετικών δοχείων καλλιέργειας, θα πρέπει να γίνει κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς κάποιο μέγεθος ανάλογο της ποσότητας των κυττάρων.

Η κανονικοποίηση μπορεί να γίνει στην προκειμένη περίπτωση είτε ως προς το λιποειδικό φώσφορο είτε ως προς την πρωτεΐνη. Ωστόσο, η δεύτερη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί εξαιτίας της παρουσίας της MeOH, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας και η οποία επηρεάζει τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, καθώς εκείνος απαιτεί υδατικό περιβάλλον.

Αντίθετα, ο λιποειδικός φώσφορος είναι ανάλογος με τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των HMCL και συνεπώς, και με τον αριθμό των ίδιων των κυττάρων σε κάθε δοχείο καλλιέργειας και μπορεί να μετρηθεί σε ένα μέρος του εκχυλίσματος ολικών λιποειδών των κυττάρων.

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η διερεύνηση της ποσότητας που πρέπει να ληφθεί από το εκχύλισμα των κυττάρων για να μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια ο λιποειδικός φώσφορος των κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν 2 δοχεία καλλιέργειας. Από κάθε ένα παραλήφθησαν τα κύτταρα και εκχυλίστηκαν κατά Bligh-Dyer. Έγινε προσδιορισμός P στο 1/10 και στα 9/10 της ολικής ποσότητας των λιποειδών για κάθε δοχείο καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού λιποειδικού φωσφόρου σε δυο διαφορετικά κλάσματα για κάθε δοχείο καλλιέργειας

Δοχείο καλλιέργειας	Αναλυόμενη Ποσότητα	A	Ποσότητα P στο κλάσμα (μg P)	Συνολική ποσότητα P στο δοχείο καλλιέργειας
---------------------	---------------------	---	------------------------------	---

				($\mu\text{g P}$)
1	1/10	0,113	0,667	6,67
1	9/10	1,236	6,95	7,73
2	1/10	0,136	0,795	7,95
2	9/10	1,229	6,91	7,68

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, από ένα δοχείο καλλιέργειας χωρητικότητας 25 cm³ εκχύλιζονται κατά μέσο όρο περίπου 7,5 μg λιποειδικού P. Επίσης, βρέθηκε ότι το 1/10 του λιποειδικού εκχυλίσματος βρίσκεται στο κατώτερο όριο της καμπύλης αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων φωσφόρου. Τελικά, για τον προσδιορισμό του λιποειδικού φωσφόρου και την επακόλουθη κανονικοποίηση των επιπέδων του ενδογενώς παραγόμενου PAF λαμβάνοταν ποσότητα κυττάρων ίση με τα 1,5/10 της συνολικής ποσότητας ανά δοχείο καλλιέργειας δηλαδή, 0,3 ml. Η ποσότητα αυτή επαρκούσε για τον ακριβή προσδιορισμό του λιποειδικού φωσφόρου ενώ ταυfmol PAF/ g Pτόχρονα εξασφαλιζόταν η μέγιστη ποσότητα δείγματος και για τον προσδιορισμό των επιπέδων του παραγόμενου PAF.

Συνεπώς, η συγκέντρωση του PAF σε κάθε δοχείο καλλιέργειας εκφράζεται από εδώ και στο εξής ως fmol PAF/ $\mu\text{g P}$.

11.2. Μελέτη της επίδρασης της IL-1 β στην σύνθεση και έκκριση του PAF στα HMCL

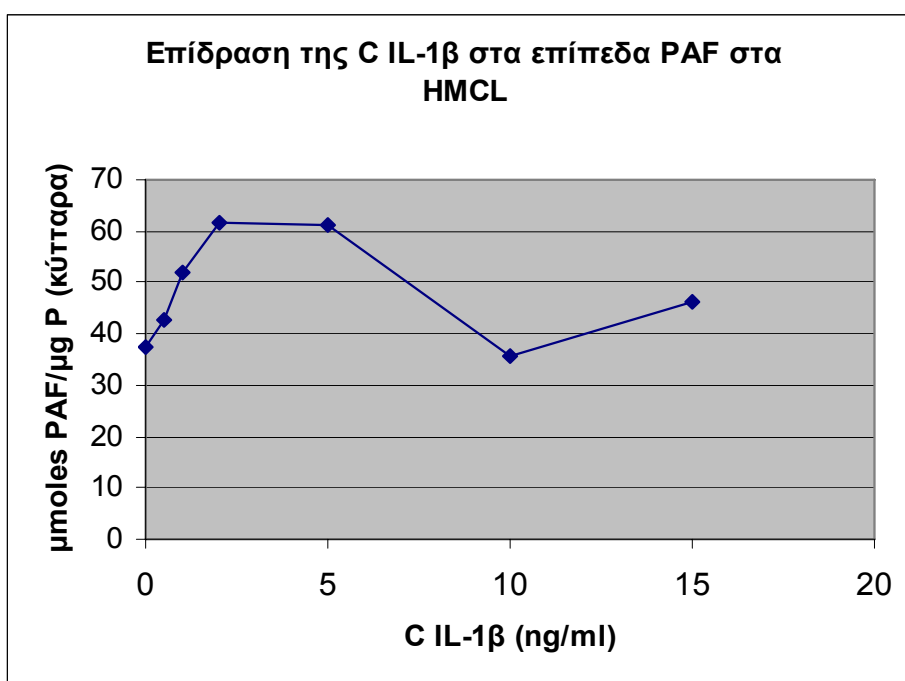
11.2.1. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης της IL-1 β για την σύνθεση και έκκριση του PAF από τα HMCL για χρόνο επώασης 6 h.

Αρχικά, στόχος ήταν η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης IL-1 β και του βέλτιστου χρόνου επώασης των HMCL με αυτήν ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή σύνθεση PAF από τα HMCL.

Η επίδραση της IL-1 β στα επίπεδα παραγωγής του PAF δεν έχει μελετηθεί ξανά σε HMCL. Προηγούμενα πειράματα που είχαν γίνει σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων με την κυτταροκίνη χρειαζόταν τουλάχιστον 2 ώρες για να εκδηλωθεί ενώ τα παραγόμενα επίπεδα του PAF άρχιζαν να μειώνονται στις 18 ώρες επώασης. Επιπλέον, από παρόμοια πειράματα βρέθηκε μεγιστοποίηση της αύξησης του PAF μετά από επώαση 4-6 ωρών ^[365,366]. Έν πείραμα επώασης μεσαγγειακών κυττάρων αρουραίου είχε δείξει ότι επώαση των κυττάρων αυτών με IL-1 β οδηγούσε σε αύξηση του εκκρινόμενου PAF ^[367]. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στο να ξεκινήσουμε τη μελέτη επώασης των HMCL με IL-1 β

από έναν σχετικά μεγάλο χρόνο επώασης, τις 6 h και να δοκιμάσουμε διάφορες συγκεντρώσεις IL-1β στο χρόνο αυτό.

Επομένως, στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων IL-1β στην παραγωγή του PAF από τα HMCL μετά από επώαση 6 ωρών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.5.



Σχήμα 11.5. Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων IL-1β στα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF στα HMCL μετά από επώαση 6 ωρών. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μεσο όρο 2 πειραμάτων.

Σε κανένα υπερκείμενο κυττάρων δεν ανιχνεύτηκε PAF.

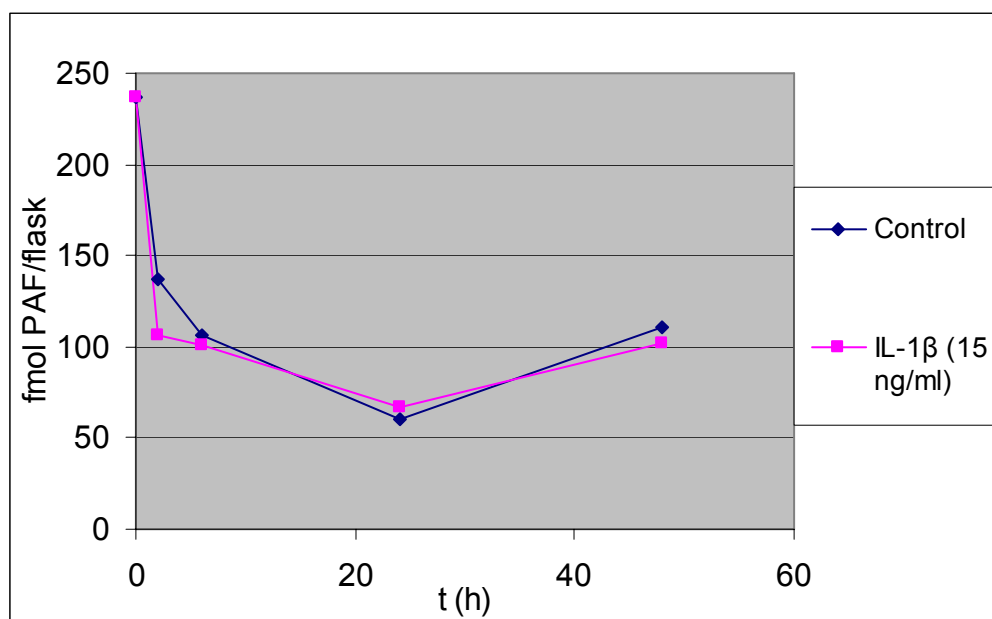
Από το σχήμα φαίνεται ότι σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 15 ng/ml της IL-1β, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του ενδογενώς παραγόμενου. Αν και οι μεγαλύτερες αυξήσεις PAF παρατηρήθηκαν στα 1-5 ng/ml IL-1β, στα επόμενα πειράματα κινητικής χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση IL-1β 15 ng/ml θεωρώντας ότι η συγκέντρωση αυτή θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την σύνθεση του PAF ακόμη και σε μικρότερους χρόνους επώασης.

11.2.2. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) στην σύνθεση του PAF.

Στο πείραμα αυτό έγινε προσπάθεια να βρεθεί ο βέλτιστος χρόνος επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή σύνθεση PAF. Οι χρόνοι επώασης ήταν 2, 6, 24, 48 h ενώ έγιναν και τα αντίστοιχα control χωρί την παρουσία της IL-1β. τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.6.

Στα υπερκείμενα των κυττάρων δεν ανιχνεύτηκε PAF.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος φάνηκε αφενός μεν, πως η IL-1β δεν μεταβάλλει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF σε σχέση με το control, αφετέρου δε ότι τα επίπεδα του PAF μειώνονται με το πέρασμα του χρόνου τόσο για το control όσο και για τα πειράματα με IL-1β.

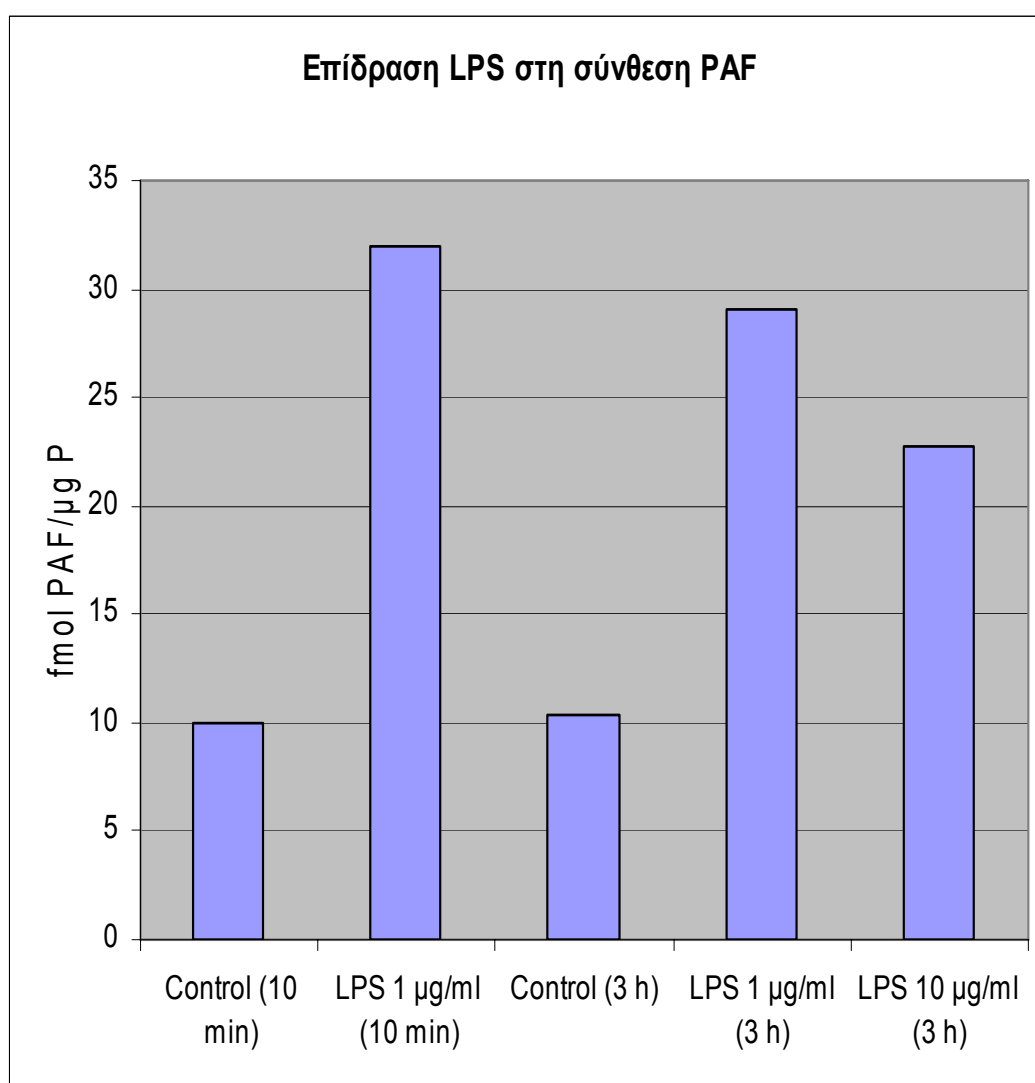


Σχήμα 11.6. Επίδραση του χρόνου επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) στα κυτταρικά επίπεδα PAF. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο πειραμάτων.

11.2.3. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με IL-1β (15 ng/ml) στην σύνθεση του PAF. Μελέτη της επίδρασης του LPS στην σύνθεση του PAF.

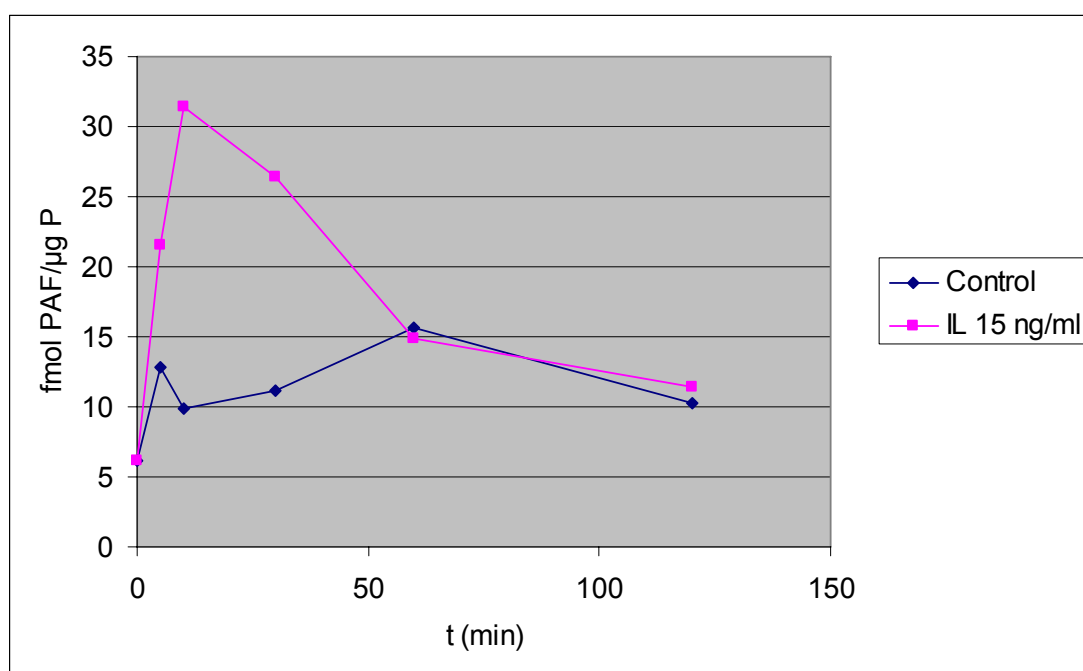
Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν διττός. Επειδή, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δεν είχαν δείξει ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF λόγω της IL-1β,

επιδιώχθηκε να ενεργοποιηθούν τα HMCL με έναν παράγοντα, ο οποίος ήταν γνωστό ότι προκαλούσε ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από τα HMCL. Ο παράγοντας αυτός ήταν ο LPS [368]. Με το πείραμα αυτό επιδιώχθηκε να διευκρινιστεί αν υπήρχε κάποιο πρόβλημα στο όλο πρωτόκολλο ενεργοποίησης των HMCL από την IL-1β ή αν τελικά το πρόβλημα ήταν η συγκέντρωση και ο χρόνος ενεργοποίησης των HMCL με IL-1β. Στα πλαίσια αυτά, ενεργοποιήθηκαν τα HMCL με δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1β σε δυο διαφορετικούς χρόνους. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.6. και δείχνουν την σημαντική ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από τον LPS κυρίως στη μικρή συγκέντρωση, 1 $\mu\text{g/ml}$, και στο μικρό χρόνο επώασης, 10 min. Και σε αυτή την περίπτωση δεν ανιχνεύτηκε εκκρινόμενος PAF.



Σχήμα 11.7. Επίδραση της επώασης των HMCL με LPS (1, 10 ng/ml) σε χρόνους 10 min και 3 h, στα επίπεδα του ενδογενώς παραγόμενου PAF.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάτω από τις συνθήκες του πειράματος, τα HMCL μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή ενδοκυτταρικού PAF. Συνεπώς, αναζητήθηκε το κατά πόσο η IL-1β μπορεί να προκαλέσει άμεση αύξηση του PAF σε μικρούς χρόνους επώασης. Έτσι, στο επόμενο πείραμα ενεργοποιήθηκαν HMCL με IL-1β (15 ng/ml) για χρόνους επώασης 5, 10, 30, 60, 120 min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 11.7. Από το σχήμα φαίνεται πως η IL-1β μπορεί να προκαλέσει μια ταχύτατη αύξηση της σύνθεσης του PAF στα 5-30 min ενώ μετά από το χρονικό αυτό διάστημα τα επίπεδα του PAF επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα. Ο παραγόμενος PAF παραμένει ενδοκυτταρικά αφού πάλι δεν ανιχνεύτηκε PAF στο μέσο καλλιέργειας.

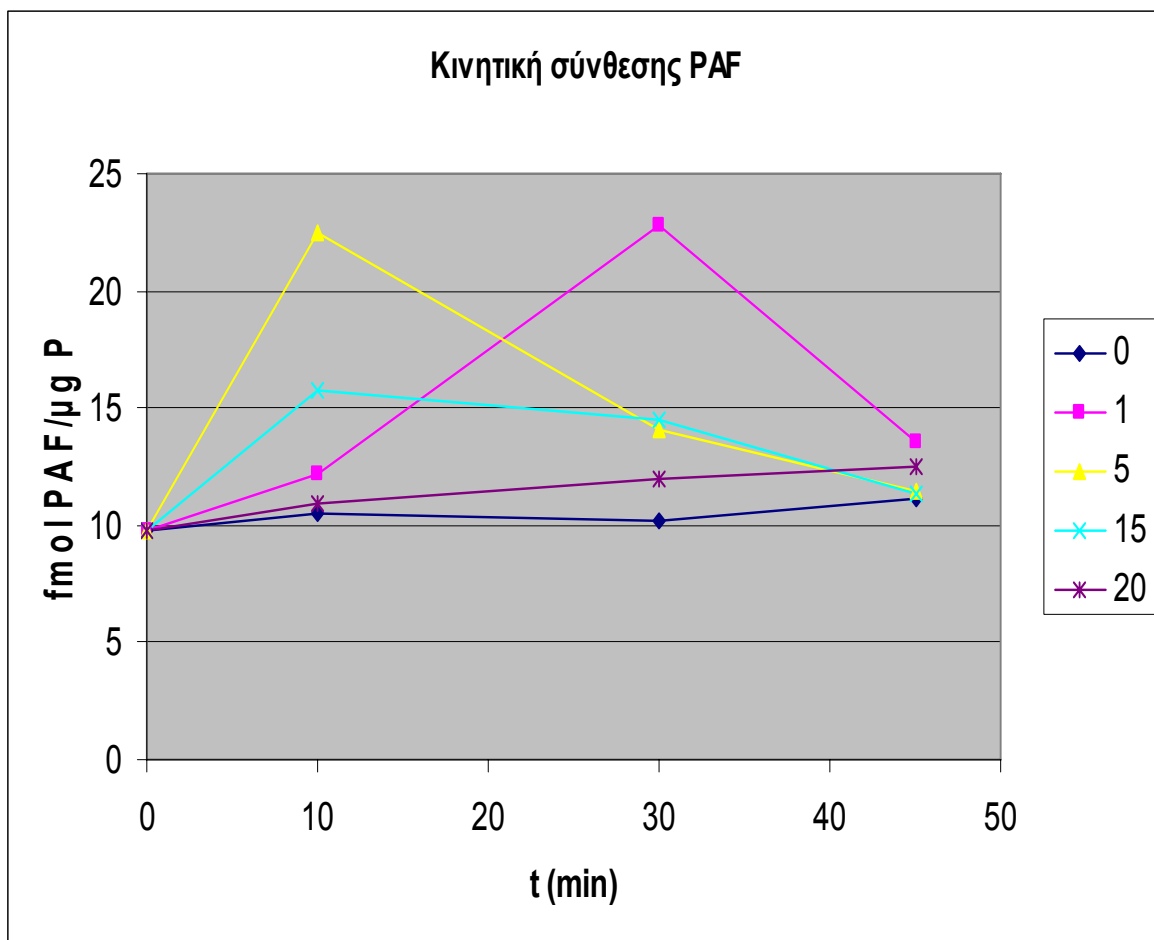


Σχήμα 11.8. Επίδραση του χρόνου επώασης των HMCL με και χωρίς IL-1β (15 ng/ml) στα κυτταρικά επίπεδα PAF. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δυο πειραμάτων.

11.2.4. Μελέτη επίδρασης του χρόνου επώασης των HMCL με διάφορες συγκεντρώσεις IL-1β στην σύνθεση του PAF.

Σκοπός ήταν στο σημείο αυτό να μελετηθεί η κινητική σύνθεσης του PAF από τα HMCL υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-1β, χαμηλών και πιο υψηλών, ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης με IL-1β. χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις IL-1β 1, 5, 15, 20 ng/ml και χρόνοι επώασης από 10-45 min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.9.

Από το σχήμα παρατηρείται ότι υπάρχει μια μεταβατική αύξηση της σύνθεσης του PAF, ο οποίος ταχύτατα αυξάνει υπό την επίδραση της IL-1β και στην συνέχεια επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα. Ο βέλτιστος χρόνος επώασης εξαρτάται από την συγκέντρωση της IL-1β. όσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση της IL-1β, τόσο πιο μεγάλος ο χρόνος επώασης. Οι μέγιστες αυξήσεις της σύνθεσης του PAF παρατηρήθηκαν στην συγκέντρωση IL-1β 5 ng/ml και σε χρόνο επώασης 10 min. Η μεγάλη συγκέντρωση IL-1β, 20 ng/ml, προκάλεσε μια μικρή έως ελάχιστη σύνθεση PAF. Και στο πείραμα αυτό δεν ανιχνεύτηκε εκκρινόμενος PAF.



Σχήμα 11.9. Επίδραση της επώασης των HMCL με και χωρίς IL-1β διαφόρων συγκεντρώσεων (0, 1, 5, 15 και 20 ng/ml), στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού PAF.

Συμπερασματικά, η μέγιστη ενδογενής σύνθεση του PAF σημειώθηκε μετά από επώαση των HMCL για 10 λεπτά με διάλυμα IL-1β συγκέντρωσης 5 ng/ml.

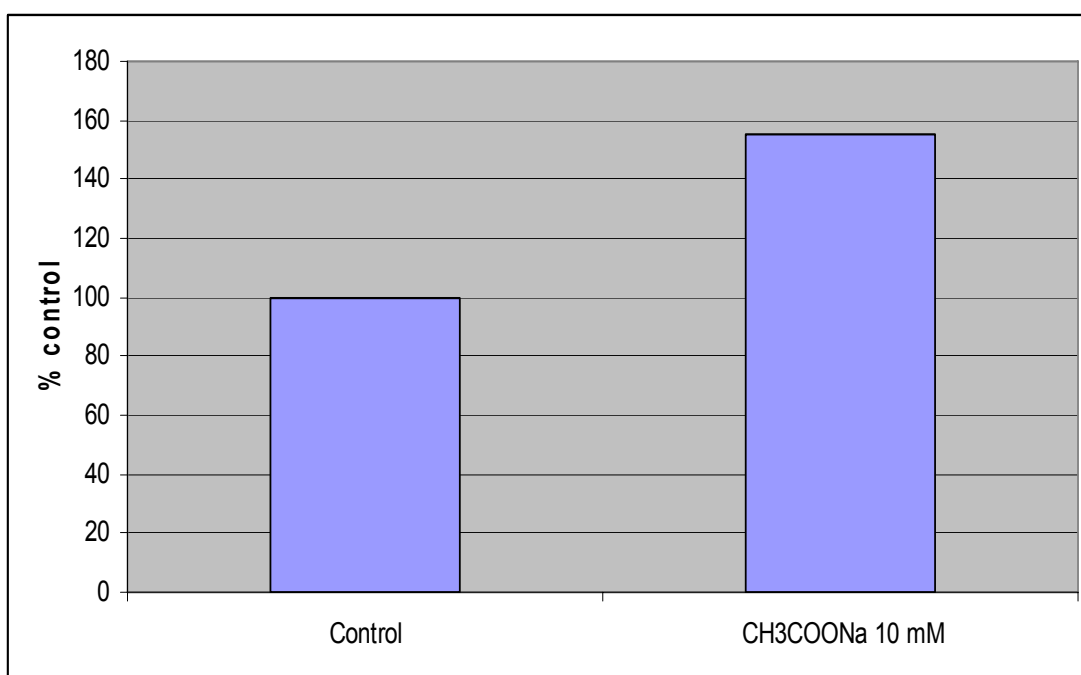
11.3. Πειράματα μελέτης του μηχανισμού σύνθεσης του PAF από τα HMCL

Επίδραση των οξικών στην ενδογενή παραγωγή του PAF

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο βιοσύνθεσης του PAF, τα οξικά αποτελούν το υπόστρωμα για τη βιοσύνθεσή του μέσω της remodeling πορείας. Επομένως, η προσθήκη των οξικών στο διάλυμα επώασης θα μπορούσε να επιφέρει αύξηση της παραγωγής του PAF τόσο σε βασικά επίπεδα όσο και μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας οξικών (10 mM) κατά την επώαση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό, χωρίς κάποιον παράγοντα διέγερσης, στην σύνθεση του PAF. Χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση CH_3COONa 10 mM. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.10.

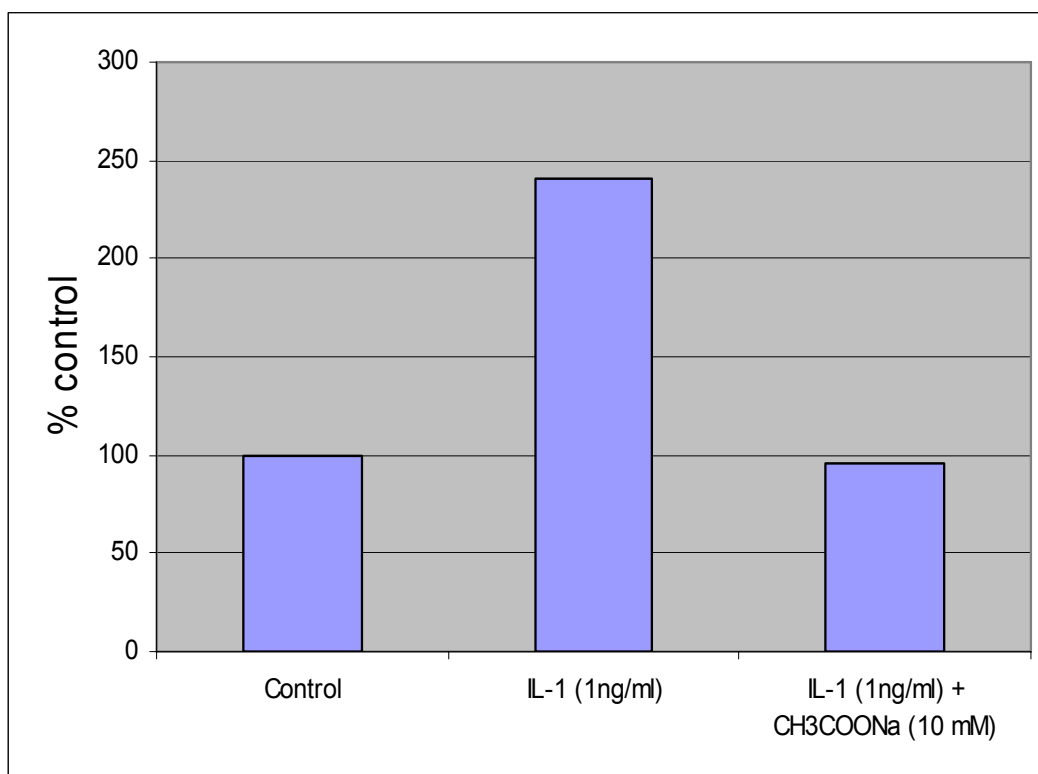
Στο πείραμα αυτό τα οξικά επέφεραν αύξηση της ενδογενούς σύνθεσης του PAF κατά ένα ποσοστό περίπου 155% σε σχέση με το control.



Σχήμα 11.10. Επίδρασης της επώασης με και χωρίς οξικά στα επίπεδα του ενδογενώς παραγόμενου PAF, εκφραζόμενη ως επί τοις % επί του control. Η τιμή του control ήταν 15,6 fmol/μg P.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της επώασης των HMCL με διάλυμα IL-1β, 1ng/ml, με και χωρίς παρουσία οξικών, χωρίς προεπώαση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.11.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 11.11., τα οξικά όχι μόνο δεν ενεργοποιούν περαιτέρω την σύνθεση του PAF λόγω IL-1β, αντιθέτως, παρατηρήθηκε αναστολή της δράσης της IL-1β.



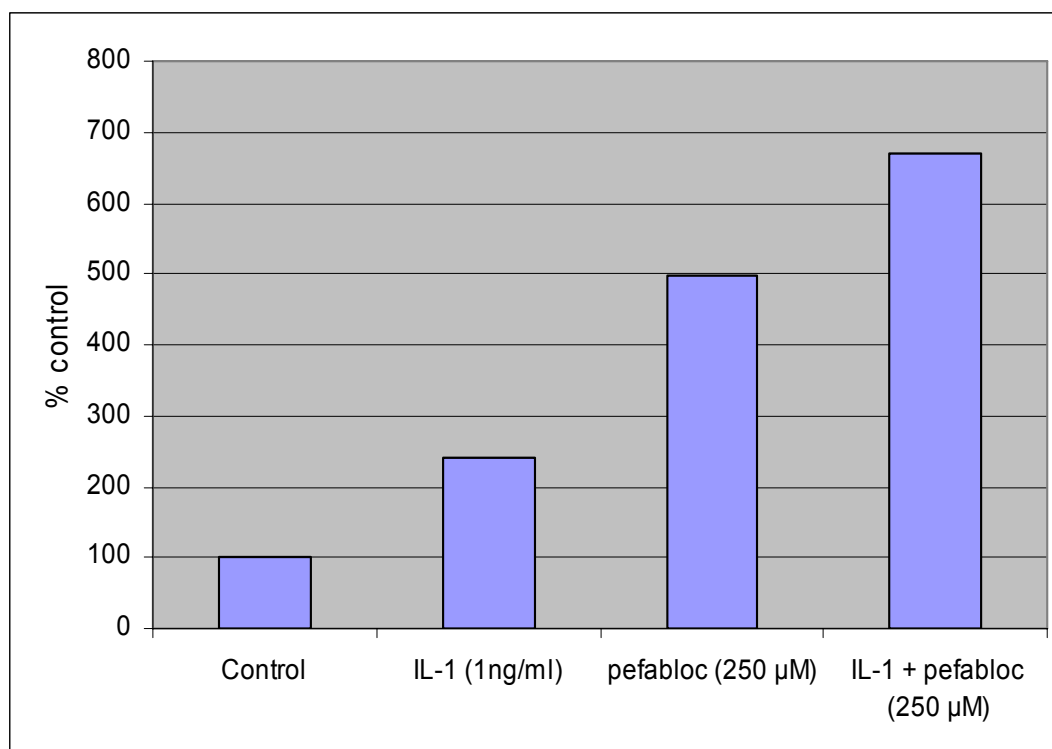
Σχήμα 11.11. Επίδραση της παρουσίας CH_3COOH 10 mM στην ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από HMCL παρουσία IL-1β (1 ng/ml). Ο χρόνος επώασης ήταν 30 min.

Επίδραση του refabloc στην ενδογενή παραγωγή του PAF

Το refabloc είναι αναστολέας του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF, της PAF-AH ^[368], θεωρητικά επιφέρει αύξηση των επιπέδων του PAF μετά από προσθήκη του σε διάλυμα επώασης.

Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο η PAF-AH ρυθμίζει τη βασική παραγωγή του PAF από τα HMCL, επώαστηκαν HMCL με και χωρίς refabloc απουσία και παρουσία IL-1β (1 ng/ml).

Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.12. Φαίνεται πως η παρουσία του pefabloc οδηγεί σε δραματική αύξηση των βασικών επιπέδων του PAF κατά περίπου 5 φορές. Επιπλέον, φαίνεται ότι το pefabloc δρα συνεργιστικά με την IL-1β στην ενεργοποίηση των HMCL αφού ταυτόχρονη ενεργοποίηση των HMCL με pefabloc και IL-1β οδηγεί σε σύνθεση PAF μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται όταν οι δυο παράγοντες προστεθούν μόνοι τους.



Σχήμα 11.12. Επίδραση pefabloc με και χωρίς IL-1β (1 ng/ml) σε χρόνο 30 min, στα ενδοκυτταρικά επίπεδα PAF. Η τιμή του control ήταν 5,71 fmol/μg P. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων.

Συμπερασματικά, το pefabloc συμβάλλει θετικά στην αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού PAF αλλά η παρουσία του στο υλικό της επώασης των κυττάρων στα μετέπειτα πειράματα θα μπορούσε να αποβεί προβληματική εξαιτίας του ότι μπορεί να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό διάφορες από τις κυτταρικές λειτουργίες.

Μελέτη της επίδρασης της IL-1β στη δραστητικότητα των ενζύμων:

A. 1 - O - αλκυλο - 2 - λυσο - sn - γλυκερυλο - 3 - φωσφορυλοχολίνη:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράσης (REM AT)

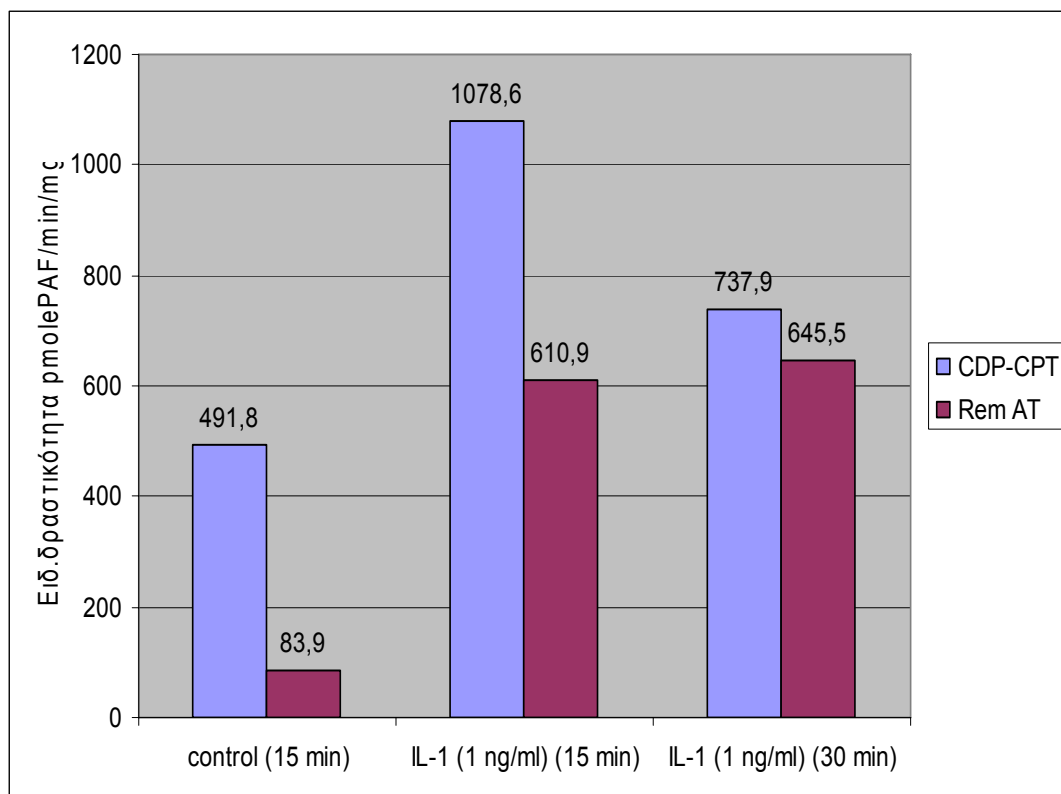
B. DTT - ανεξάρτητης αλκυλοακετυλογλυκερόλη : CDP - χολίνη φωσφοχολινοτρανσφεράσης

Γ. PAF-ακετυλοϋδρολάσης

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να βρεθεί κατά πόσο η ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από την IL-1β οφείλεται σε ενεργοποίηση των μηχανισμών βιοσύνθεσής και ειδικότερα στην ενεργοποίηση της rem AT που είναι υπεύθυνη για την σύνθεση του PAF μέσω της remodeling πορείας βιοσύνθεσής του, και στην ενεργοποίηση της CPT που αποτελεί το τελευταίο ένζυμο της de novo βιοσύνθεσής του.

Για τον σκοπό αυτό μετρήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων σε control συνθήκες καθώς και ύστερα από ενεργοποίηση των κυττάρων με IL-1β για 15 και 30 min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.13.

Από το Σχήμα 11.13 φαίνεται ότι τα επίπεδα της rem AT αυξήθηκαν κατά 728 και 769 % αντίστοιχα σε σχέση με το control εξαιτίας της επώασης με IL-1β, για 15 και 30 min αντίστοιχα. Επιπλέον, τα επίπεδα της CDP-CPT αυξήθηκαν κατά 219 και 150% σε σχέση με το control, εξαιτίας της επώασης με IL-1β, για 15 και 30 min αντίστοιχα.



Σχήμα 11.13. Απεικόνιση των τιμών της ειδικής δραστηριότητας των ενζύμων ανάλογα με το χρονικό διάστημα επώασης και την παρουσία ή όχι του διεγέρτη.

Η βασική δραστηριότητα της CDP-CPT ήταν υψηλότερη από της Rem AT. Σε όλες τις περιπτώσεις, η δραστηριότητα της CDP-CPT παρέμεινε υψηλότερη σε σχέση με της Rem AT.

Ωστόσο, τα ποσοστά αύξησης της δραστηριότητας της Rem AT ήταν πάντα υψηλότερα, μετά από την επώαση με την IL-1β, σε σχέση με τη δραστηριότητα της CDP-CPT.

11.4. Σύσταση πολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου.

Το πολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου [OOPLE], το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα περαιτέρω πειράματα, εκχυλώστηκε όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Στο κλάσμα αυτό έγινε προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γαλλικό οξύ, καθώς και προσδιορισμός σακχάρων, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γλυκόζη. Η συγκέντρωση των σακχάρων στο κλάσμα είναι μέτρο της συγκέντρωσης των γλυκολιποειδών στοκλάσμα αυτό.

Η συγκέντρωση των φαινολικών και των σακχάρων στο κλάσμα του OOPLE, εξεφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και γλυκόζης αντίστοιχα, φαίνονται παρακάτω:

19,13 μg glu/mg OOPLE
24,2 μg γαλλικού οξέος/mg OOPLE

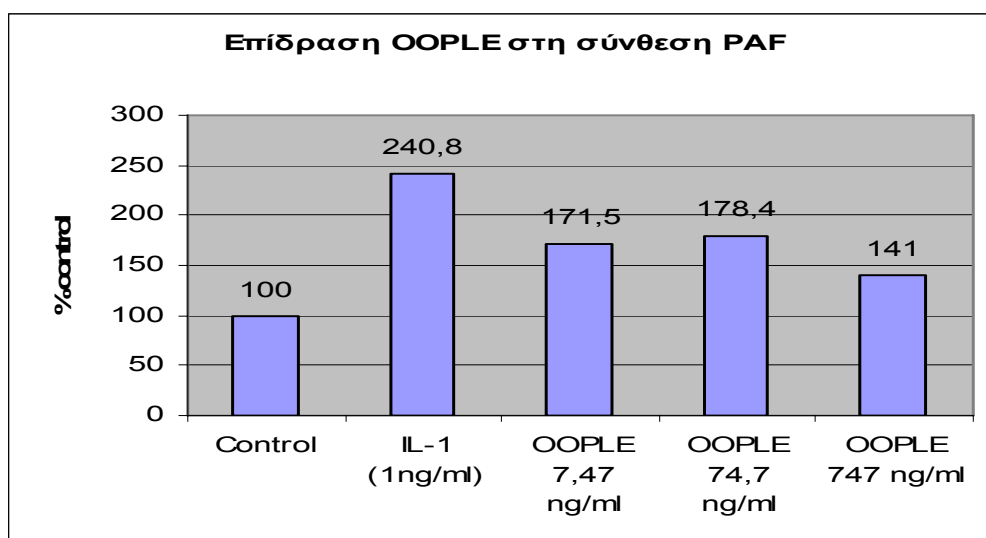
11.5. Πειράματα μελέτης της επίδρασης του OOPLE στην παραγωγή του PAF

Επίδραση του OOPLE στην σύνθεση του PAF από τα HMCL

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων OOPLE στην ενδογενή σύνθεση του PAF. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.14.

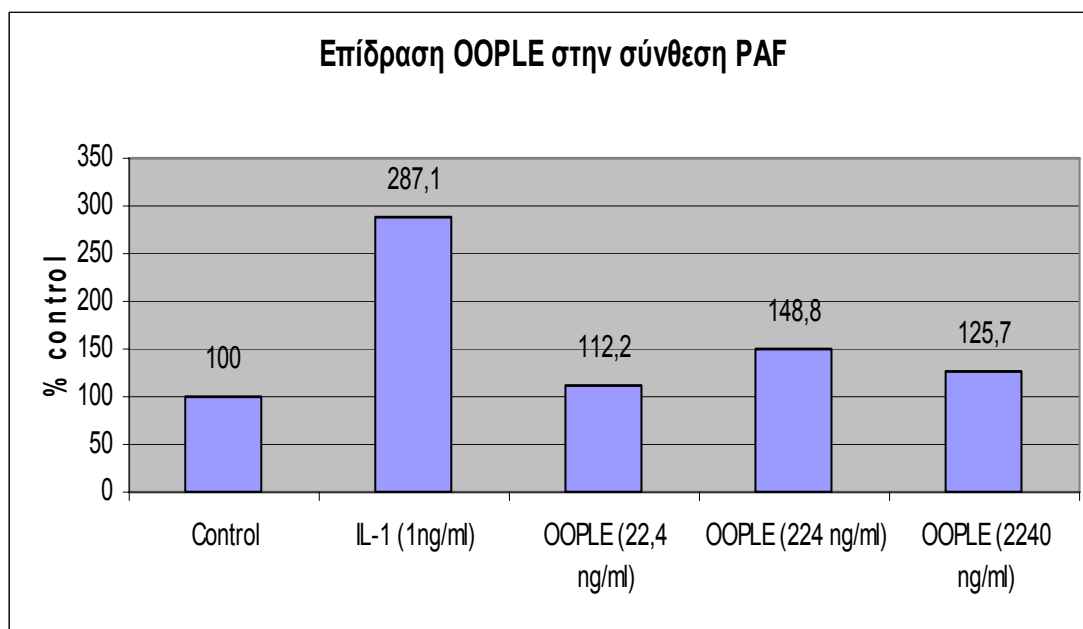
Από το Σχήμα 11.14. φαίνεται ότι τα OOPLE σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF κατά περίπου 1,5 φορά. Η δράση τους αυτή είναι λιγότερο ισχυρή από εκείνη της IL-1β αφού αυτή προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε μικρότερη συγκέντρωση.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με 3πλάσιες συγκεντρώσεις OOPLE για κάθε τάξη μεγέθους με παρόμοια αποτελέσματα.



Σχήμα 11.14. Επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων OOPLE στην σύνθεση του PAF από τα HMCL. Ο χρόνος επώασης ήταν 30 min. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του control και είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων. Η τιμή του control ήταν 5,71 fmol/μg P.

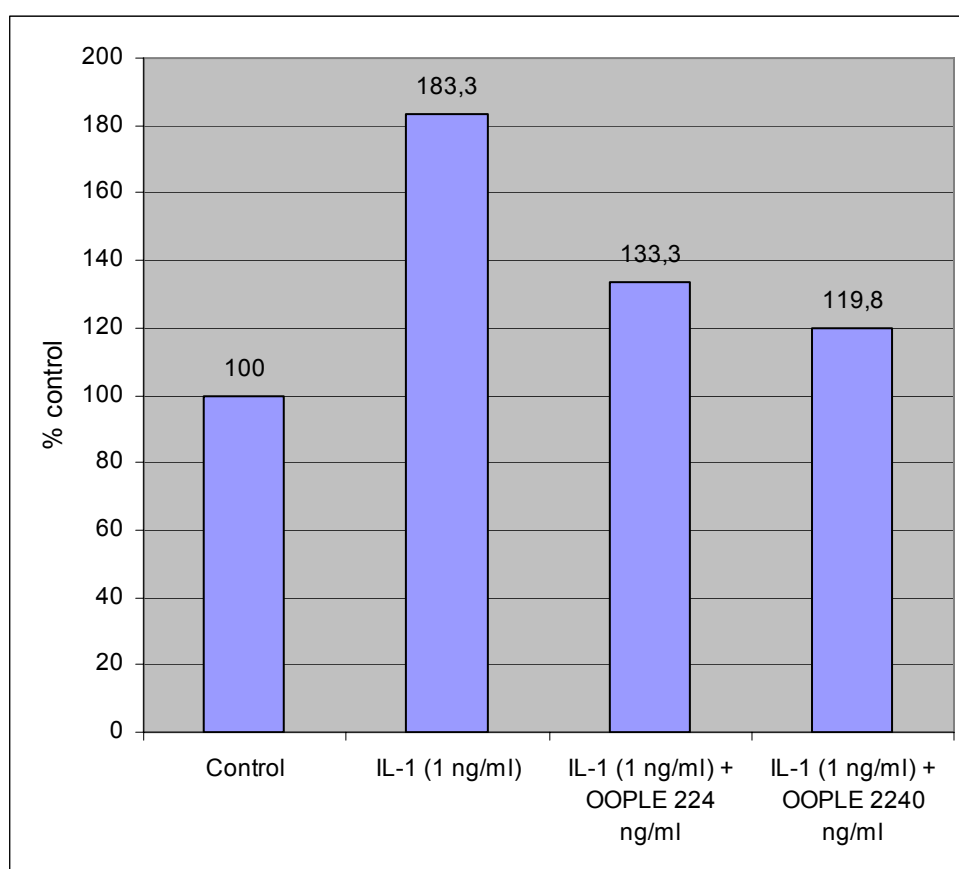
Από το Σχήμα 11.15. φαίνεται ότι τα OOPLE σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF κατά περίπου 1,5 φορά. Η δράση τους αυτή είναι λιγότερο ισχυρή από εκείνη της IL-1β αφού αυτή προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε μικρότερη συγκέντρωση.



Σχήμα 11.15. Επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων OOPLE στην σύνθεση του PAF από τα HMCL. Ο χρόνος επώασης ήταν 30 min. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % του control και είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων. Η τιμή του control ήταν 9,01 fmol/μg P.

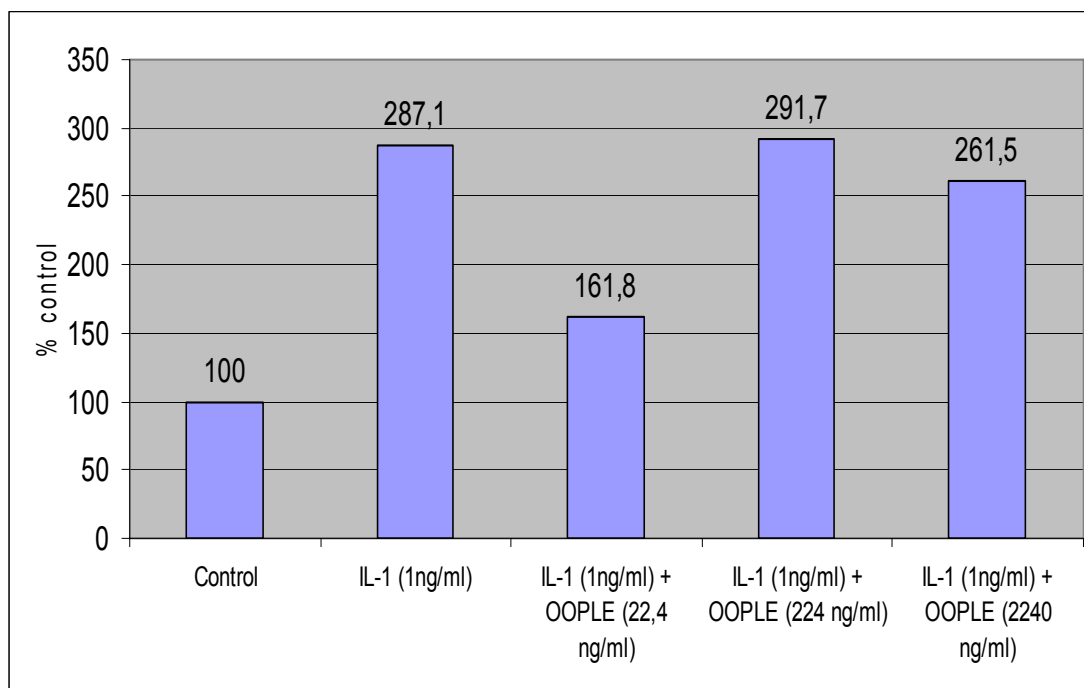
Επίδραση του OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση του PAF (συνεπώαση) από τα HMCL.

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση του PAF από τα HMCL. Η μελέτη έγινε με συνεπώαση της IL-1β με τα OOPLE για 30 min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.16. από όπου προκύπτει ότι η μικρή συγκέντρωση του OOPLE επιφέρει αναστολή της σύνθεσης του PAF κατά 60% περίπου ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση κατά 77% σε σχέση με την σύνθεση του PAF της επαγόμενης μόνο από την IL-1β.



Σχήμα 11.15. Επίδραση της συνεπώασης των HMCL με IL-1β (1 ng/ml) και διάφορες συγκεντρώσεις OOPLE, στα επίπεδα του παραγόμενου PAF, εκφραζόμενη ως % του control. Η τιμή του control ήταν 18,6 fmol/μg P.

Η μελέτη της επίδρασης της συνεπώασης των HMCL με IL-1β (1 ng/ml) και OOPLE, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στην ενδογενή σύνθεση του PAF αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης ενός ακόμη πειράματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.16.



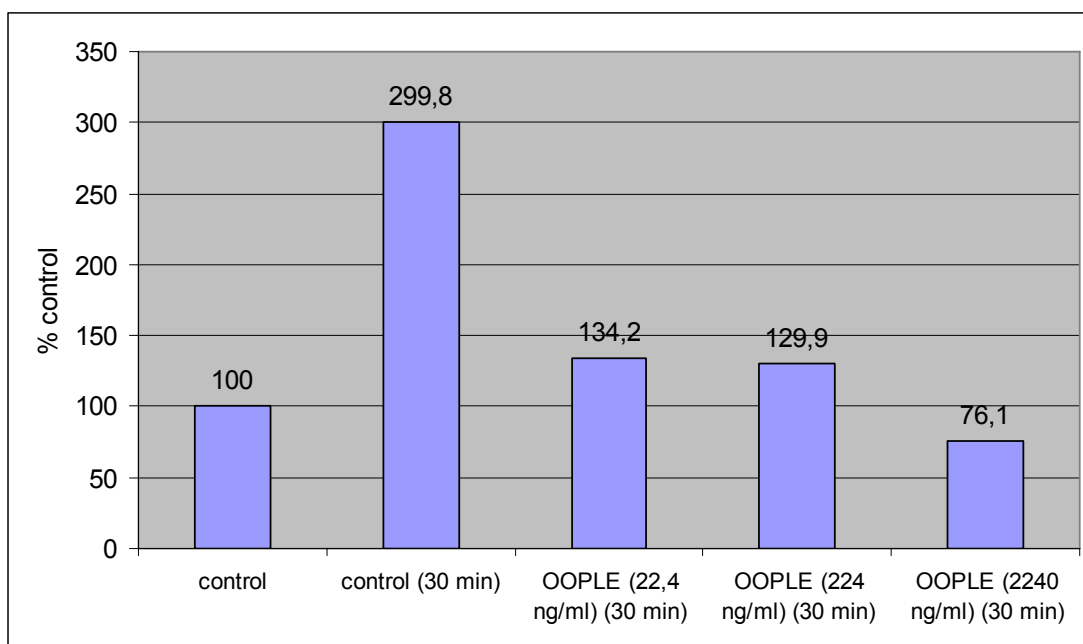
Σχήμα 11.16. Επίδραση της συνεπώασης των HMCL με IL-1β (1 ng/ml) και διάφορες συγκεντρώσεις OOPLE, στα επίπεδα του ενδογενώς παραγόμενου PAF, εκφραζόμενη ως % του control. Η τιμή του control ήταν 9,01 fmol/μg P.

Παρατηρούμε ότι κατά την συνεπώαση των κυττάρων η αναστολή της επαγόμενης από την IL-1β σύνθεσης του PAF είναι 67 και 14% από τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση OOPLE, αντίστοιχα. Η μεσαία συγκέντρωση φάνηκε πως δεν επιδρά σχεδόν καθόλου στη σύνθεση του PAF.

Επίδραση του OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση του PAF (προεπώαση) από τα HMCL.

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η μελέτη της επίδρασης της προεπώασης των HMCL με διάφορες συγκεντρώσεις OOPLE στην επαγόμενη από την IL-1β βιοσύνθεση του PAF. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 11.17.

Σύμφωνα με τα ευρήματα του πειράματος αυτού βρέθηκε ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του OOPLE στο διάλυμα προεπώασης τόσο πιο υψηλή είναι και η αναστολή της σύνθεσης του PAF σε σχέση με το control. Συγκεκριμένα σημειώθηκε αναστολή κατά 83, 86 και 100% στην χαμηλότερη, μεσαία και υψηλότερη συγκέντρωση αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη μάλιστα συγκέντρωση έδωσε τιμές PAF χαμηλότερες ακόμη και από το control.



Σχήμα 11.17. Επίδραση της προεπώασης των HMCL με διάφορες συγκεντρώσεις OOPLE, στην επαγόμενη από IL-1 β σύνθεση PAF, εκφραζόμενη ως % του control. Η τιμή του control ήταν 21,2 fmol/ μ g P.

Συνεπώς, όσο υψηλότερη η συγκέντρωση του OOPLE στο διάλυμα προεπώασης τόσο υψηλότερη και η αναστολή της σύνθεσης του PAF από τα HMCL που επάγεται από την επώαση με IL-1 β .

12. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μεσαγγειακά κύτταρα ενέχουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς φλεγμονής στο επίπεδο του νεφρού αφού δέχονται την επίδραση κυτταροκινών και άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών από τα διηθούντα το μεσάγγειο λευκοκύτταρα ^[73]. Οι κυτταροκίνες είναι πολυπεπίδια που παράγονται από ενδογενή νεφρικά κύτταρα όπως τα μεσαγγειακά, τα ενδοθηλιακά, τα σωληναριακά επιθήλια και οι ινοβλάστες καθώς και από κύτταρα αιμοτογενούς προέλευσης όπως τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα. Τα πολυπεπίδια αυτά, διηθούν το νεφρό αποτελώντας σημαντικότερους χημειοτακτικούς μεσολαβητές που εμπλέκονται στην παθογένεια της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης ^[11]. Υπό την επίδραση αυτών των παραγόντων τα μεσαγγειακά κύτταρα επιτείνουν την φλεγμονώδη απόκριση εκκρίνοντας με την σειρά τους φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λιπίδια, ελεύθερες ρίζες και αγγειοδραστικούς παράγοντες ενώ παράλληλα μεταβάλλεται η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από αυτά αλλάζοντας η μορφολογία και η λειτουργικότητα του σπειράματος ^[103-250]. Οι αλλαγές αυτές δυσχεραίνουν την σπειραματική και συνεπώς και ολόκληρη τη νεφρική λειτουργία και συμβάλλουν θετικά στην πρόκληση της σπειραματονεφρίτιδας και στην εξέλιξή της σε σπειραματοσκλήρυνση ^[11].

Τα μεσαγγειακά κύτταρα δέχονται την επίδραση της IL-1β η οποία παράγεται από τα μακροφάγα και επιφέρει αύξηση του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων καθώς και αυξημένη παραγωγή χημειοτακτικών/ανοσολογικών μεσολαβητών ^[103-181]. Επιπλέον, επάγει την προσκόλληση των φαγοκυττάρων πάνω στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[95], την κυτταρική απόπτωση ^[99], την παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA) από τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τροποποιεί την παραγωγή και την έκκριση των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο IV, βιτρονεκτίνη, λαμνίνη, πρωτεογλυκάνη και ακτίνη) με αποτέλεσμα τη μεταβολή του μεγέθους των πόρων, τις ιδιότητες της θεμέλιας ουσίας και της διηθητικής ικανότητας των μεσαγγειακών κυττάρων ^[198], επάγει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή του NO ^[204-206], επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ^[243-246], αυξάνει τα επίπεδα της παραγόμενης φωσφολιπάσης A₂ και της PGE2 ^[248-250], μεσολαβεί στην παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών, δρα ως ενδιάμεσος μεσολαβητής για την επικοινωνία μεταξύ των μεσαγγειακών και άλλων κυττάρων ^[235, 236, 237, 238, 239].

Η σπειραματοσκλήρυνση (GS) είναι το κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων νεφρικών παθήσεων και σχετίζεται άμεσα με τη εξέλιξη αυτών σε νεφρική ανεπάρκεια. Τα τελευταία χρόνια μια σειρά μελετών επισημαίνουν ότι η αθηροσκλήρυνση και η σπειραματοσκλήρυνση παρουσιάζουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά και έχει προταθεί ο

όρος «σπειραματική αθηροσκλήρυνση». Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, έχει προταθεί ο μηχανισμός εμπλοκής του PAF στην πρόκληση της αθηροσκλήρυνσης και δεδομένου της ομοιότητας ανάμεσα στις δυο νόσους, ο μηχανισμός αυτός φαίνεται ότι βρίσκει εφαρμογή και στην GS. Όπως έχει επίσης ήδη αναφερθεί, σημαντικός είναι και ο ρόλος των μεσαγγειακών κυττάρων στην πρόκληση της σπειραματοσκλήρυνσης ^[371]. Τέλος, έχει φανεί ότι η IL-1β μπορεί να επάγει την σύνθεση του PAF από τα μεσαγγειακά κύτταρα ενεργοποιώντας το remodeling μονοπάτι της βιοσύνθεσής του μέσω της ενεργοποίησης της rem AT. Ο παραγόμενος από το μεσάγγειο PAF, μπορεί να ενισχύσει την σπειραματική φλεγμονή και να συνεισφέρει στους παθογενετικούς μηχανισμούς σπειραματοσκλήρυνσης ^[370,371]. Επιπρόσθετα, ο παραγόμενος από το μεσάγγειο PAF μπορεί να δράσει αυτοκρινώς. Συγκεκριμένα, από μελέτες που έχουν γίνει σε HMCL, έχει ταυτοποιηθεί η έκφραση των υποδοχέων του και πως ο PAF επάγει την έκφραση του mRNA για τον ίδιο του τον υποδοχέα. Επιπλέον, ο PAF απορρυθμίζει τη λειτουργικότητα των υποδοχέων της LDL και συμβάλλει στη μετατροπή των μεσαγγειακών κυττάρων σε αφρώδη κύτταρα επάγοντας την συσσώρευση των λιπιδίων σε αυτά ^[373]. Το κλειδί του μηχανισμού αυτού αποτελεί η απορρύθμιση των υποδοχέων της LDL, κάτι που έχει βρεθεί ότι επάγεται και από την IL-1β στα μεσαγγειακά κύτταρα ^[192-194]. Συνεπώς, ο PAF ενδεχομένως εμπλέκεται στο μηχανισμό της σπειραματοσκλήρυνσης η οποία αποτελεί το τελευταίο στάδιο πριν τη νεφρική ανεπάρκεια ^[373].

Θα ήταν λοιπόν ενδιαφέρον να βρεθούν αρχικά παράγοντες της διατροφής μας που θα μπορούσαν να αναστείλουν αυτό το στάδιο της φλεγμονώδους διεργασίας δηλαδή, την επαγωγή της σύνθεσης PAF από την IL-1β.

Η επιλογή του πολικού εκχυλίσματος του ελαιολαδου (OOPLE) έγκειται στα προϋπάρχοντα ερευνητικά ευρήματα. Σύγκριση των TPL του ελαιολάδου με εκείνα των σπορελαιών έδειξε ότι τα TPL του ελαιολάδου επιφέρουν σημαντική αναστολή της επαγόμενης από τον PAF συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Η δράση τους αυτή οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε ανταγωνιστές του PAF ^[351]. Επίσης, χορήγηση του OOPLE σε κουνέλια στα οποία προκαλούνταν πειραματικά αρτηριοσκλήρυνση, οδηγούσε σε σημαντική μείωση του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας ^[351]. Δεδομένου ότι ο σχηματισμός αθηρωματικών πλακών αποτελεί μια φλεγμονώδη διεργασία, τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος υποδηλώνουν την ύπαρξη αντιφλεγμονώδων ενώσεων στο κλάσμα του OOPLE.

Τα πρώτα πειράματα αποσκοπούσαν στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επώασης και παραλαβής του PAF από τα κύτταρα. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραλαβής των προσκολλημένων στα δοχεία καλλιέργειας κυττάρων είναι με την χρήση θρυψίνης. Ωστόσο, η χρήση της θρυψίνης ενέχει τον κίνδυνο ενεργοποίησης των HMCL προς παραγωγή PAF αφού έχει βρεθεί ότι οι πρωτεάσες σερίνης επάγουν την σύνθεση του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα [373]. Στα ίδια κύτταρα, η ενεργοποίηση με IL-1α επέφερε αύξηση των πρωτεασών σερίνης οι οποίες κρίθηκαν ότι είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της rem AT [374]. Τέλος, η χορήγηση θρυψίνης σε ποντίκια επέφερε ομοίως αύξηση του παραγόμενου PAF [375].

Από την άλλη δεν ήταν γνωστό κατά πόσο η εκχύλιση του PAF από τα προσκολλημένα κύτταρα με MeOH θα έδινε ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης. Για το λόγο αυτό συγκρίθηκαν οι δυο μέθοδοι ανάκτησης του PAF από τα κύτταρα. Τόσο η μέθοδος της MeOH όσο και της θρυψίνης δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Φαίνεται ότι με τη μέθοδο της θρυψίνης λαμβάνονται λίγο μεγαλύτερα ποσά PAF χωρίς όμως να μπορεί να διευκρινιστεί αν αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων ή στην καλύτερη ανάκτηση του PAF με τη μέθοδο της θρυψίνης.

Ένας δεύτερος παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει την επώαση των κυττάρων με IL-1β ήταν η παρουσία της BSA στο θρεπτικό υλικό και αυτό γιατί η BSA μπορεί να περιέχει ενδοτοξίνη η οποία ενεργοποιεί την σύνθεση του PAF [364]. Αν και χρησιμοποιήθηκε BSA χαμηλής ενδοτοξίνης, μελετήθηκε κατά πόσο μπορεί η παρουσία της BSA να επηρεάσει τα επίπεδα του PAF στα HMCL και όπως φαίνεται από το Σχήμα 11.3. τα επίπεδα του PAF των HMCL σε θρεπτικό υλικό με και χωρίς BSA ήταν τα ίδια. Άρα, η παρουσία της BSA στο θρεπτικό υλικό δεν θα επηρέαζε τα αποτελέσματά μας.

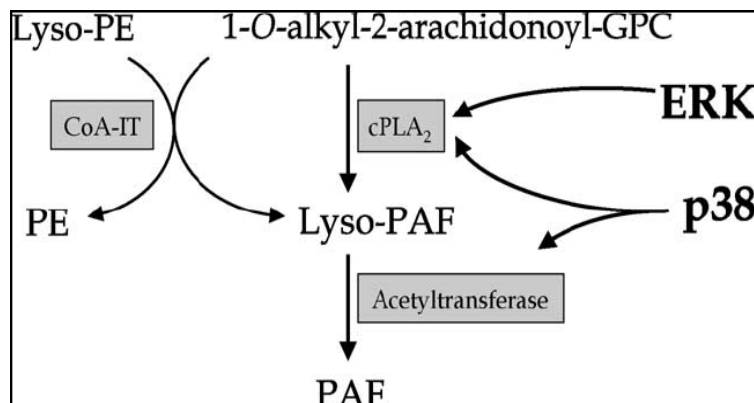
Πρώτος στόχος της εργασίας αυτής ήταν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης των HMCL με IL-1β ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη σύνθεση του PAF. Το βασικό αποτέλεσμα των πειραμάτων αυτών ήταν ότι η ενεργοποίηση της σύνθεσης του PAF από την IL-1β γίνεται ταχύτατα και μεταβατικά στα πρώτα 30 min. στους μεγάλους χρόνους επώασης, από 2 h και πάνω, δεν παρατηρήθηκε καμμία δράση της IL-1β στα επίπεδα του PAF.

Με το πείραμα αυτό φάνηκε πως η IL-1β επάγει την σύνθεση του PAF και πως οι μικρές συγκεντρώσεις της IL-1β, 1 και 5 ng/ml, επέφεραν τη μεγαλύτερη αύξηση. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η σύνθεση του PAF μετά από επώαση των κυττάρων με IL-1β συγκέντρωσης 5 ng/ml για 10 min. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν επέφεραν σημαντική αύξηση της σύνθεσης του PAF. Συμπερασματικά, η μέγιστη ενδογενής σύνθεση του PAF σημειώθηκε μετά από επώαση των

HMCL για 10 λεπτά με διάλυμα IL-1β συγκέντρωσης 5 ng/ml. Αν και η αύξηση ήταν σημαντική στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού PAF, αυτός δεν ανιχνεύτηκε καθόλου εξωκυτταρικά. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με εκείνα άλλων ερευνών που έχουν γίνει σε ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα και έχουν δείξει ότι η επώαση με IL-1β επάγει την σύνθεση του PAF [376]. Ωστόσο, διαφωνούν όσον αφορά το χρόνο δράσης της IL-1β αφού πειράματα σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν δείξει ότι η αύξηση της παραγωγής του PAF που επιφέρει αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας [377] είναι ορατή στις 2 h επώασης ενώ η μεγιστη παραγωγή του επιτυγχάνεται στις 8-12 h [378,379]. Τα επίπεδά του αρχίζουν να μειώνονται μετά από τις 18 h επώασης με IL-1. Σε ορισμένα πειράματα έχει βρεθεί ότι ένα μικρό ποσοστό του PAF εκκρίνεται και στο υπερκείμενο, ένα 25% [380]. Συγκεκριμένα, σε ένα πείραμα που έλαβε χώρα σε μονοκύτταρα του ανθρώπου βρέθηκε πως η σύνθεση του PAF μεγιστοποιείται σε δυο χρονικά διαστήματα, στις 1-2 h και στις 6-8 h επώασης. Στο διάστημα των 6-8 ωρών παρατηρείται έκκρισή του και στο υπερκείμενο [381].

Τα επίπεδα του PAF καθορίζονται από την ισορροπία μεταξύ της βιοσύνθεσης και της αποικοδόμησής του. Η *de novo* βιοσύνθεσή του ευθύνεται για τη διατήρησή του στα βασικά επίπεδα ενώ η remodeling ενεργοποιείται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ο αποικοδόμησή του γίνεται μέσω της PAF-AH η οποία τον μετατρέπει στον ανενεργό lyso-PAF. Η lyso-PAF AT αποτελεί το κύριο ένζυμο του remodeling μονοπατιού και μετατρέπει τον lyso-PAF σε PAF χρησιμοποιώντας το ακετυλο-CoA σαν δότη της ακετυλομάδας. Η lyso-PAF AT έχει ταυτοποιηθεί και στη φλοιώδη αλλά και στη μυελώδη μοίρα του νεφρού καθώς επίσης και στα μεσαγγειακά κύτταρα και η δραστηριότητά της έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και στα μικροσώματα και αποτελεί την κύρια πηγή του PAF στο νεφρό [382,383]. Στο πείραμα αυτό είδαμε ότι τα επίπεδα της Rem AT αυξήθηκαν κατά 728 και 769% σε σχέση με το control εξαιτίας της επώασης με IL-1β για 15 και 30 min αντίστοιχα. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο και με άλλες έρευνες που έχουν γίνει σε ενδοθηλιακά κύτταρα και έχουν δείξει πως η επώαση με IL-1β επιφέρει αύξηση της δραστηριότητας της PAF-AT η οποία βρίσκεται στο μέγιστο στις 6-12 h επώασης [381]. Ωστόσο, στο πείραμα αυτό, η αύξηση της AT έλαβε χώρα σε μικρό χρονικό διάστημα, μετά από επώαση μόνο μερικών min. Τα ευρήματα αυτά αντιτίθενται σε εκείνα άλλων μελετών σε ενδοθηλιακά κύτταρα στις οποίες έχει βρεθεί ότι η IL-1β δεν επιδρά καθόλου στην CPT [381]. Συνεπώς, η αύξηση αυτή είναι άμεση για τόσο μικρό χρονικό διάστημα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως η αύξηση αυτή της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου να μην οφείλεται σε γονιδιακή έκφραση αλλά σε κάποια ομοιοπολική μεταβολή. Πράγματι, η lyso-PAF AT έχει βρεθεί από πολλές έρευνες ότι ενεργοποιείται σε καταστάσεις στρες κυρίως μέσω της ενεργοποίησης των MAPK και ιδιαίτερα,

μέσω της p38 MAPK η οποία και τη φωσφορυλιώνει [383-388]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη σύνθεση του PAF που παρατηρείται μετά από επώαση με IL-1 οφείλεται στην ενεργοποίηση των MAPKs από την IL-1 καθώς αυτή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες δράσεις της [386]. Η CPT έχει βρεθεί ότι πράγματι υπάρχει στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι είναι



Σχήμα 12.1. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης PAF μέσω του remodeling μονοπατιού στα PMN. Η cPLA₂ μπορεί να φωσφορυλιωθεί και να ενεργοποιηθεί και από τις ERKs και την p38 MAPK. Όταν η lyso-PAF AT ενεργοποιηθεί από την p38 σημειώνεται ταχύτατη σύνθεση PAF [383].

υπεύθυνη για την παραγωγή των βασικών επιπέδων του PAF [389]. Χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη de novo σύνθεση του PAF. Στο πείραμα αυτό είδαμε ότι τα επίπεδα της CPT αυξήθηκαν κατά 219 και 150% σε σχέση με το control εξαιτίας της επώασης με IL-1β για 15 και 30 min αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά αντιτίθενται σε εκείνα άλλων μελετών σε ενδοθηλιακά κύτταρα στις οποίες έχει βρεθεί ότι η IL-1β δεν επιδρά καθόλου στην CPT [381]. Η PAF-AH, το αποικοδομητικό ένζυμο του PAF, έχει βρεθεί ότι πράγματι υπάρχει στα μεσαγγειακά κύτταρα και ότι εκκρίνεται και στο εξωκυττάριο υγρό [321]. Συμπερασματικά, ο πιθανός μηχανισμός της άμεσης αύξησης της σύνθεσης του PAF μετά από την ενεργοποίηση των κυττάρων με IL-1β περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των MAPKs και την επακόλουθη κατάλυση της φωσφορυλίωσης της lyso-PAF AT.

Στο πείραμα αυτό, το LPS επέφερε αύξηση της ενδογενούς σύνθεσης του PAF, τόσο σε μικρά όσο και σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επώασης σε συγκέντρωση 1 και 10 µg/ml. Πράγματι το LPS έχει βρεθεί πως επάγει την σύνθεση του PAF μέσω της rem-AT στα μεσαγγειακά κύτταρα [387].

Η παρουσία οξικών ιόντων στο μέσο καλλιέργειας θα μπορούσε να αυξήσει την σύνθεση που επάγεται από τη lyso-PAF AT αφού τα οξικά ιόντα ενσωματώνονται σε κύτταρα και

μετατρέπονται σε ακετυλο-CoA το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα για την lyso-PAF AT. Για αυτό το λόγο πολλοί ερευνητές τα χρησιμοποιούν στο μέσο καλλιέργειας σε τέτοιου είδους πειράματα ^[386]. Στην προκειμένη περίπτωση η παρουσία οξικών ιόντων οδήγησε σε αυξημένη βασική σύνθεση PAF αλλά αντίθετα από το αναμενόμενο, όχι μόνο δεν επέτεινε τη δράση της IL-1β αλλά αντίθετα, την ανέστειλε. Πιθανότατα, η ύπαρξη των οξικών ιόντων θα μπορούσε να επηρεάσει άλλες μη διευκρινισμένες πορείες, οι οποίες θα μπορούσαν να δράσουν ανασταλτικά στη δράση τη IL-1β.

Από ότι φάνηκε από το πείραμα αυτό και από το σχήμα που προηγήθηκε, το refabloc, που αποτελεί ειδικό αναστολέα της PAF-AH, επέφερε 500% επί του control αύξηση των επιπέδων του κυτταρικού PAF. Αύξηση κατά 670% επέφερε η ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με refabloc και IL-1β. Το refabloc, δρα συνεργιστικά με την IL-1 επιφέροντας την απενεργοποίηση του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF, της AH, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του PAF μετά από προσθήκη του σε διάλυμα επώασης ^[352]. Επομένως, η κύρια ρύθμιση των επιπέδων του PAF φαίνεται να γίνεται μέσω της δραστηριότητας της AH.

Από τα πειράματα που έλαβαν χώρα δεν ανιχνεύτηκε παραγόμενος PAF στο υπερκείμενο των κυττάρων. Το ποσοστό του PAF που εκκρίνεται στον αξωκυττάριο χώρο εξαρτάται από το είδος του κυττάρου. Ο νεοσυντιθέμενος PAF μπορεί, είτε να μεταβολιστεί άμεσα, είτε να δράσει στο εσωτερικό του κυττάρου και ύστερα να μεταβολιστεί, είτε να εκκριθεί στον εξωκυτταρικό χώρο και να δράσει σε γειτονικά κύτταρα. Το ποσό του PAF που εκκρίνεται από τα κύτταρα εξαρτάται, τόσο από το είδος του κυττάρου, όσο και από τις συνθήκες ενεργοποίησης του. Τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν 0 έως 60% του νεοσυντιθέμενου PAF ανάλογα το εξωτερικό ερέθισμα και τις συνθήκες ενεργοποίησης. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν από λίγο έως καθόλου PAF ανεξαρτήτως ερεθίσματος ^[390]. Όσον αφορά στα μεσαγγειακά κύτταρα, οι Chen και συν παρατήρησαν αύξηση της έκκρισης του PAF σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα για 24 ώρες, χωρίς όμως να αναφέρουν οτιδήποτε για τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του PAF ^[367]. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκε PAF στο υπερκείμενο δεν σημαίνει ότι τα επίπεδά του σε αυτό είναι μηδενικά απλά μη ανιχνεύσιμα. Πιθανότατα, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων κάτι τέτοιο να ήταν εφικτό.

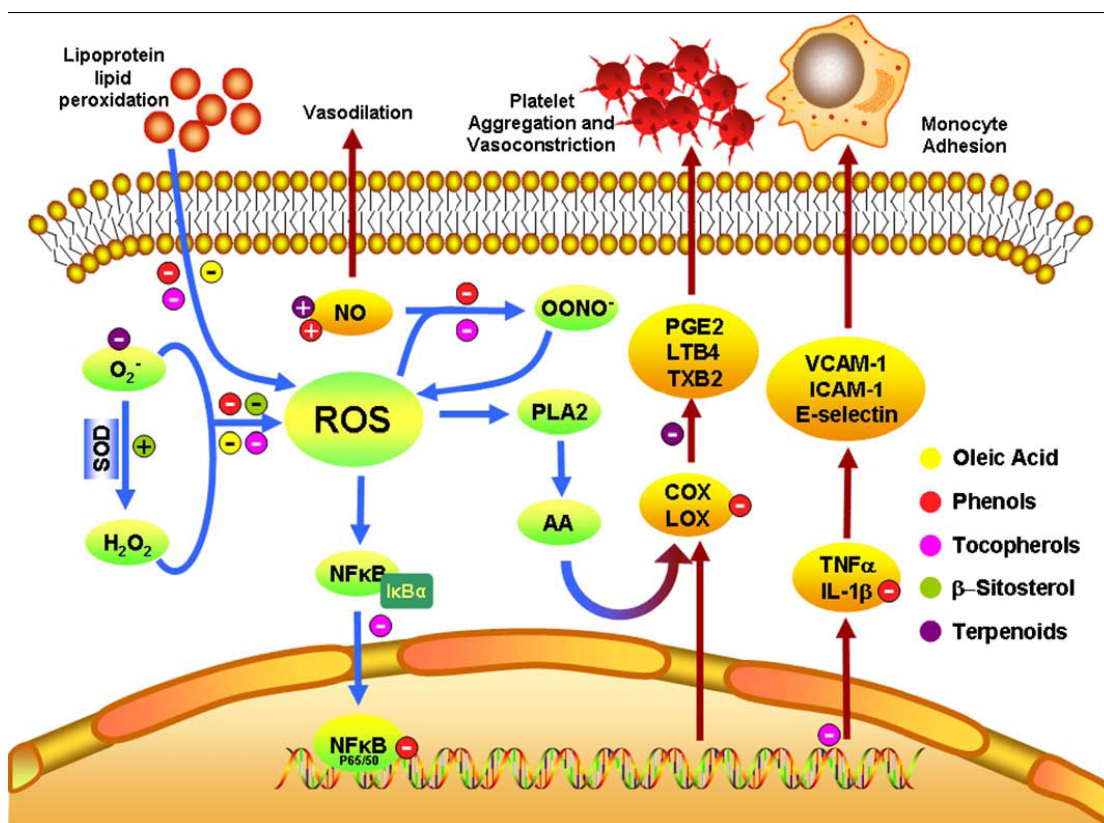
Ο κύριος τρόπος δράσης του PAF είναι οι διακυτταρικές επιδράσεις μέσω της πρόσδεσής του στους μεμβρανικούς υποδοχείς άλλων κυττάρων και επιφέρει αλλαγές στη μορφολογία τους. Έχει προταθεί όμως ότι έχει ενδοκυτταρικές δράσεις μέσω ενός ή περισσότερων

ενδοκυτταρικών υποδοχέων. Οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς του PAF δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Η πρόσδεσή του στους αντίστοιχους υποδοχείς ενεργοποιεί σήματα ανάλογα με τα επίπεδά του, το είδος του κυττάρου και την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες, ενδοκυτταρικούς και διακυτταρικούς. Στο καρδιαγγειακό, επιδρά στην αγγειογένεση, στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος (υπόταση) και προκαλεί καρδιακές δυσλειτουργίες. Επιπλέον, επιφέρει κινητοποίηση των λευκοκυττάρων σε φλεγμαίνουσα περιοχή επάγοντας την ενεργοποίηση των κυττάρων και την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο ^[391].

Ο δεύτερος στόχος της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η επίδραση του OOPLE αφενός στην σύνθεση του PAF από τα HMCL αφετέρου στην επαγόμενη από την IL-1β σύνθεση PAF στις βέλτιστες συνθήκες επώασης δηλαδή, για 1 mg/ml και επώαση για 30 min. Παρατηρήσαμε ότι όλες οι συγκεντρώσεις του OOPLE (7,47- 2240 ng/ml) επέφεραν αύξηση των επιπέδων του παραγόμενου PAF στα HMCL, κατά ένα ποσοστό 112-178% σε σχέση με το control, μετά από επώαση 30 min. Ωστόσο, η επώαση με IL-1β επέφερε μεγαλύτερη αύξηση της σύνθεσής του από τα HMCL, σε σύγκριση με το OOPLE. Η συνεπώαση των κυττάρων με OOPLE και IL-1β έδειξε ότι οι μικρές συγκεντρώσεις του OOPLE δρουν ανασταλτικά, όσον αφορά στην σύνθεση του PAF την επαγόμενη από την IL-1β. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επιφέρουν μικρότερη αναστολή. Φαίνεται ότι το OOPLE δρα ως ασθενής αγωνιστής της IL-1β στα κύτταρα. Τέλος, πειράματα προεπώασης με OOPLE σε διάφορες συγκεντρώσεις πριν την επώαση με IL-1β έδειξαν ότι όσο υψηλότερη η συγκέντρωση του OOPLE, στο διάλυμα προεπώασης, τόσο υψηλότερη αναστολή παρατηρείται στην σύνθεση του PAF από τα HMCL, που επάγεται από την επώαση με IL-1β.

Αν και πειράματα με παρόμοια εκχυλίσματα ελαιολάδου δεν έχουν γίνει, ειδικότερα στα μεσαγγειακά κύτταρα κάποιες γενικότερες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν. Το πρώτο που πρέπει να τονιστεί είναι ότι το OOPLE αποτελεί μίγμα ενώσεων μεταξύ των οποίων θα μπορούσαν να υπάρχουν τόσο αναστολείς της δράσης της IL-1β όσο και ενεργοποιητές. Για το λόγο αυτό, δεν φαίνεται να υπάρχει μια φυσιολογική σχέση μεταξύ της δράσης και της συγκέντρωσης. Για τον ίδιο λόγο, ενώ από μόνο του το OOPLE προκαλεί σύνθεση του PAF, παρουσία της IL-1β αναστέλλει τη δράση της πιθανότατα δρώντας ανταγωνιστικά σε κάποιο στάδιο του μηχανισμού μεταγωγής σήματος της IL-1β. πολλά πιθανά συστατικά του κλάσματος αυτού, όπως το ελαϊκό οξύ, οι πολυφαινόλες κ.α. θα μπορούσαν να επιδράσουν στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος της IL-1β. Συγκεκριμένα, το ελαϊκό οξύ έχει προταθεί πως περιορίζει τον αριθμό των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας τα μόρια της LDL από την οξείδωση. Σημαντική αντιοξειδωτική δράση ασκούν οι πιο συχνά εμφανιζόμενες φαινόλες στο

ελαιόλαδο, η ολευροπεΐνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη περιορίζοντας τον αριθμό των ελευθέρων ριζών αλλά και της προσκόλλησης των μονοκυττάρων. Επιπλέον, τους έχει αποδοθεί και αντιφλεγμονώδης δράση. Ορισμένες από αυτές περιορίζουν την παραγωγή κυταροκινών και εικοσανοειδών καθώς και την έκφραση και τη δραστηριότητα της COX-2. Το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει τις τοκοφερόλες, τις στερόλες και τις τερπενικές ενώσεις. Η α τοκοφερόλη δρα ως αντιοξειδωτικό περιορίζοντας τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, περιορίζει το μεταβολισμό των εικοσανοειδών, την απόπτωση και την οξείδωση της LDL. Η ευρύτερα συναντώμενη στερόλη του ελαιολάδου, η β-σιτοστερόλη, έχει βρεθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση και επιφέρει μείωση του AA μέσω μείωσης των επιπέδων των ελευθέρων ριζών. Οι τερπενικές ενώσεις έχουν βρεθεί ότι επιφέρουν αγγειοδιαστολή μέσω της παραγωγής NO [392]. Το OOPLE που μελετήθηκε στο πείραμα αυτό πιθανόν να περιέχει και καφεϊκό οξύ. Στο καφεϊκό οξύ έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις και η ικανότητα του για δέσμευση του NO και πρόληψη της έκφρασης των γονιδίων διαφόρων φλεγμονώδων παραγόντων [393].



Σχήμα 12.2. Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του ελαιικού οξέος και των άλλων κύριων συστατικών του ελαιολάδου. Ο κύριος μηχανισμός περιλαμβάνει τον περιορισμό των ROS. Το ελαιϊκό και β-σιτοστερόλη περιορίζουν την παραγωγή τους και δημιουργούν τις προϋποθέσεις για ένα λιγότερο όξινο περιβάλλον. Η β-σιτοστερόλη, επιπλέον, αυξάνει τη δραστηριότητα της SOD μειώνοντας τα επίπεδα των ριζών οξυγόνου. Οι τοκοφερόλες και οι φαινόλες

περιορίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων και δεσμεύουν τα ενδοκυτταρικά ROS και το ελεύθερο NO. Τα ROS επάγουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω του NFκB. Έτσι ελαττώνεται η παραγωγή των εικοσανοειδών και των μορίων προσκόλλησης. Οι φαινόλες και οι τερπενικές ενώσεις περιορίζουν την παραγωγή της IL-1β περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό της συστολή των αγγείων, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την προσκόλληση των μονοκυττάρων. Η αγγειοδιαστολή επιτυγχάνεται και από την παραγωγή NO από την ολευροπείνη ^[392].

Οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή του τσαγιού έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνών. Έχει βρεθεί ότι επιφέρουν σημαντική μείωση των επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών των οποίων η σύνθεση επάγεται από την IL-1β, μείωση των ενζύμων που επιδρούν στον πυρήνα, μείωση της δραστηριότητας της lyso-PAF AT και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αυξημένη μετατροπή του PAF σε ακυλο-PAF, περιορισμό της ενεργοποίησης των MAPKs από την IL-1β, μείωση των επιπέδων των COXII και NOSII ^[394-400]. Επιπλέον, η τυροσόλη και το καφεϊκό οξύ ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις επέφεραν μείωση της παραγόμενης IL-1β ^[401,402]. Στο πείραμα φάνηκε πως το OOPLE σε άλλες συγκεντρώσεις επιφέρει αύξηση και σε άλλες μείωση των επιπέδων του παραγόμενου PAF.

Ο περιορισμός της βιβλιογραφίας σχετικά με την επίδραση των συστατικών του ελαιολάδου στην ενδογενή σύνθεση του PAF δεν καθιστά εφικτή τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων συμπερασμάτων για την κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των συστατικών του λαδιού. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα η οποία θα επικεντρωθεί στο ελαιόλαδο και τη δράση των συστατικών του.

13. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεσαγγειακά κύτταρα ενέχουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς φλεγμονής στο επίπεδο του νεφρού αφού δέχονται την επίδραση κυτταροκινών και άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών από τα διηθούντα το μεσαγγείο λευκοκύτταρα. Υπό την επίδραση αυτών των παραγόντων τα μεσαγγειακά κύτταρα επιτείνουν την φλεγμονώδη απόκριση εκκρίνοντας με την σειρά τους φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λιπίδια, ελεύθερες ρίζες και αγγειοδραστικούς παράγοντες ενώ παράλληλα μεταβάλλεται η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας από αυτά αλλάζοντας η μορφολογία και η λειτουργικότητα του σπειράματος. Στα πλαίσια αυτά σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν : α) Η μελέτη της σύνθεσης του φλεγμονώδη λιποειδικού μεσολαβητή Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, PAF από κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (HMCL) υπό την επίδραση της κυτταροκίνης IL-1β, β) Η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος πολικών λιποειδών ελαιολάδου (OOPLE), με αντιθρομβωτικές και αντιαθηρογόνες ιδιότητες, στην βασική σύνθεση PAF και στην επαγόμενη από IL-1β σύνθεση PAF από τα HMCL.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η IL-1β μπορεί να επάγει ταχύτατα, δοσοεξαρτώμενα και χρονοεξαρτώμενα, τη σύνθεση PAF από τα HMCL. Οι βέλτιστες συνθήκες ενεργοποίησης των κυττάρων είναι με 1ng/ml IL-1β και χρόνο επώασης 30 min. Όλος ο παραγόμενος PAF παραμένει στα κύτταρα και δεν εκκρίνεται. Η επαγωγή της σύνθεσης του PAF οφείλεται εν μέρει στην αύξηση της δραστηριότητας του βιοσυνθετικού ενζύμου lyso-PAF:ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράση. Τα επίπεδα του PAF ρυθμίζονται επίσης από το αποικοδομητικό ένζυμο αυτού PAF-ακετυλουδρολάση, αφού η προσθήκη ειδικού αναστολέα της οδηγεί σε δραματική αύξηση της βασικής σύνθεσης του από τα HMCL. Το OOPLE έχει την ικανότητα να προκαλεί σύνθεση PAF από τα HMCL, η δραστηριότητα του όμως είναι μικρότερη απ'αυτή της IL-1β. Το OOPLE μπορεί επίσης σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις να αναστείλει την επαγόμενη από IL-1β σύνθεση PAF από τα HMCL αποτέλεσμα το οποίο υποδεικνύει ένα πιθανό αντιφλεγμονώδη ρόλο του κλάσματος αυτού στο επίπεδο του μεσαγγείου.

14. SUMMARY

Mesangial cells are of vital importance as they can interact with many substances produced and secreted from the leukocytes which penetrate the mesangium. Mesangial cells, under the action of these molecules, can also produce cytokines and lipids, free radicals and vasoactive molecules while affecting the composition of the extracellular matrix. The subject of this object was: a) to study the impact of IL-1 β on platelet activating factor- PAF production from human mesangial cells- HMCL and b) to study the effect of the olive oil polar lipid extract- OOPLE on basal PAF synthesis and on the impact of IL-1 β on HMCL.

According to the results, we saw that IL-1 β can induce PAF production from HMCL very quickly in a dose and time-dependent manner. The best concentration for IL-1 β was 1 ng/ml and the incubation time 30 min. The PAF produced, is not secreted. The induction of PAF synthesis is due to the increment of the synthetic enzyme lyso-PAF:acetyl-CoA acetyltransferase. The levels of PAF are depended on the action of the degradation enzyme PAF-acetylhydrolase. the OOPLE can also induce PAF production from HMCL but much less than IL-1 β does. The OOPLE can also cease the synthesis of PAF due to the IL-1 β action and that is the reason why a potential protective role against renal, and particularly, mesangial inflammation has been given to it.

15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mc Phee S, X Μουτσόπουλος. Παθολογική Φυσιολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2000, Ανοσολογία , σελ 43-93.
2. Borob WF, Boulpaep EL. Ιατρική Φυσιολογία-Κυτταρική & Μοριακή Προσέγγιση, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, τόμος ΙΙΙ σελ 1671-1716.
3. Ν Γελαδάς, Μ Τσακόπουλος. Φυσιολογία του ανθρώπου, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001, Αμυντικοί Μηχανισμοί του Οργανισμού, σελ 903-960.
4. Rubin E. Βασική Παθολογική Ανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001, Φλεγμονή, σελ 27-56.
5. Andreoli TE, Carpenter CCJ, Bennett JC, Plum F. Βασική Παθολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2000, Κεφ 24, σελ 225-275.
6. Buschhausen L, Seibold S, Gross O, Matthaeus T, Weber M, Schulze-Lohoff E. Regulation of messangial cell function by vasodilatory signaling molecules. *Cardiovascular research* 2001;51:463-469.
7. Schlondorff D. Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney International*, 1996;49:1583-1585.
8. Schocklmann HO, Lang S, Sterzel RB. Regulation of messangial cell proliferation. *Kidney International*, 1999;56:199-1207.
9. Nahas AMEI. Glomerulosclerosis: intrinsic and extrinsic pathways. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:773-777.
10. McPhee S, Μουτσόπουλος X. Παθολογική φυσιολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας (2000), κεφ 16, σελ 571-603.
11. Ιατρού Χ. Παθογενετικοί μηχανισμοί της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης. *Ελληνική Νεφρολογία* 1996;8(2):229-236.
12. Vleming LJ, Bruijin JA, van Es LA. The pathogenesis of progressive renal failure. *The Netherlands Journal of Medicine* 1999;54:114-128.
13. Haas CS, Schocklmann HO, Lang S, Kralewski M, Sterzel RB. Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation. *JNEPHROL* 1999; 12: 405-415.
14. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet – Activating Factor and Related Lipid Mediators. *Annu Ren Biochem* 2000;69:419-45.
15. Snyder F. Platelet-activating factor and its analogs, metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254:231-249.
16. Snyder F. Platelet-activating factor, the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* 1995;305:689-705.

17. Pinckard RN, Woodard DS, Showell HJ, Conklyn MJ, Novak MJ, McManus LM. Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin.Rev.Allergy* 1994;12:329-359.
18. Mencia-Huerta JM, Ninio E, Roubin R, Benveniste J. Is platelet activating factor synthesis by murine peritoneal cells a two step process? *Agents Actions* 1981;11:556-558.
19. Albert DH, Snyder F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J.Biol.Chem* 1983;258:97-102.
20. Winkler JD, Sung CM, Hubbard WC, Chilton FH. Evidence for different mechanisms involved in the formation of lyso platelet-activating factor and the calcium-dependent release of arachidonic acid from human neutrophils. *Biochem.Pharmacol.* 1992;44:2055-2066.
21. Bauldry SA, Wooten RE. Leukotriene B4 and platelet activating factor production in permeabilized human neutrophils, role of cytosolic PLA2 in LTB4 and PAF generation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1303:63-73.
22. White SR, Sterk ME, Kulp GV, Spaethe SM, Burch RA, Neelev SP, Leff AR. Regulation of human eosinophil degranulation and activation by endogenous phospholipase A2. *J Clin Invest* 1993;91(5): 2118-25.
23. Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122:1-16.
24. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:102-123.
25. Derewenda ZS, Ho YS. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441:229-236.
26. Stafforini DM, Tjoelker LW. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. *Methods Mol Biol* 1999;109:49-58.
27. Derewenda ZS, Derewenda U. The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:446-455.
28. Lee TC, Uemura Y, Snyder F. A novel CoA-independent transacylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1992;267:19992-20001.

29. Lee TC, Ou MC, Shinozaki K, Malone B, Snyder F. Biosynthesis of N-acetyl sphingosine by platelet-activating factor, sphingosine CoA-independent transacetylase in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1996;271:209-217.
30. Balestrieri ML, Servillo L, Lee T. The role of platelet-activating factor-dependent transacetylase in the biosynthesis of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by stimulated endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:17431-17437.
31. Tsoukatos DC, Liapikos TA, Tselepis AD, Chapman MJ, Ninio E. Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein. *Biochem J* 2001;357:457-64.
32. Liu M, Subbaiah PV. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6035-6039.
33. Okayasu T, Hoshii K, Seyama K, Ishibashi T, Imai Y. Metabolism of platelet-activating factor in primary cultured adult rat hepatocytes by a new pathway involving phospholipase C and alkyl monooxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1986;876:58-64.
34. Sawai H, Domae N, Nagan N, Hannun YA. Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J Biol Chem* 1999;274:38131-38139.
35. Qian CG, Lee TC, Snyder F. Metabolism of platelet activating factor (PAF) and related ether lipids by neonatal rat myocytes. *J Lipid Mediat* 1989;1:113-123.
36. Furukawa M, Muguruma K, Frenkel RA, Johnston JM. Metabolic fate of platelet-activating factor in the rat enterocyte, the role of a specific lysophospholipase D. *Arch. Biochem. Biophys* 1995;319:274-280.
37. Yamashita M, Homma H, Inoue K, Nojima S. The metabolism of platelet activating factor in platelets and plasma of various animals. *J Toxicol Sci* 1983;8:177-188.
38. Ludwig JC, Mcmanus LM, Clark PO, Hanahan DJ, Pinckard RN. Modulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and release from human polymorphonuclear leukocytes (PMN), role of extracellular Ca^{2+} . *Arch Biochem Biophys* 1984;232:102-110.
39. Jouvin-Marche E, Ninio E, Beaurain G, Tence M, Niaudet P, Benveniste J. Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyltransferase activity in human leukocytes. *J Immunol.*, 1984;133:892-898.
40. Sisson JH, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA. Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B₄ metabolism. *J Immunol* 1987;138:3918-3926.

41. Denichilo MO, Stewart AG, Vadas MA, Lopez AF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a stimulant of platelet-activating factor and superoxide anion generation by human neutrophils. *J Biol Chem* 1991;266:4896-4902.
42. McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K, Prescott SM. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest* 1985;76:271-280.
43. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2204-2208.
44. Alonso F, Sanchez-Crespo M, Mato JM. Modulatory role of cAMP in the release of PAF from human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1982;45:492-500.
45. Gomez-Cambronero J, Durstin M, Molski TF, Naccache PH, Shaafi RI. Calcium is necessary but not sufficient for the platelet-activating factor release in human neutrophils stimulated by physiological stimuli. Role of G-proteins. *J Biol Chem* 1989;264:12699-12704.
46. Camussi G, Anglietta M, Malavasi F, Tetta C, Piacibello W, Sanavio F, Bussolino F. The release of PAF from human endothelial cells in culture. *J Immunol* 1983;131:2397.
47. Bratton DL, Kailey JM, Clay KL, Henson PM. A model for the extracellular release of PAF, the influence of plasma membrane phospholipid asymmetry. *Biochim Biophys Acta* 1991;1062:24-34.
48. Bratton DL. Release of platelet activation factor from activated neutrophils. Transglutaminase-dependent enhancement of transbilayer movement across the plasma membrane. *J Biol Chem* 1993;268:3364-3373.
49. Ludwig JC, Hoppens CL, Mcmanus LM, Mott GE, Pinckard RN. Modulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and release from human polymorphonuclear leukocytes (PMN), role of extracellular albumin. *Arch Biochem Biophys* 1985;241:337-347.
50. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cell-associated platelet-activating factor, a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990;110:529-540.
51. Riches DW, Young SK, Secombe JF, Henson JE, Clay KL, Henson PM. The subcellular distribution of platelet-activating factor in stimulated human neutrophils. *J Immunol* 1990;145:3062-3070.
52. Lee TC, Malone B, Snyder F. A new de novo pathway for the formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor. Biochemical characterization

- of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-P, acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen. *J Biol Chem* 1986;261:5373-5377.
53. Ribbes G, Ninio E, Fontan P, Record M, Chap H, Benveniste J, Douste-Blazy L. Evidence that biosynthesis of platelet-activating factor (paf-acether) by human neutrophils occurs in an intracellular membrane. *FEBS* 1985;191:195-199.
 54. Ribbes G, Gelas P, Lumb R, Record M, Terce F, Chap H. Subcellular localization of enzymes related to PAF metabolism in Krebs-II ascites cells, evidence for the lack of intracellular PAF transfer activity. *J Lipid Mediat* 1991;4:251-263.
 55. Record M, Snyder F. Intracellular location of acetyltransferase in the remodeling pathway of PAF biosynthesis in undifferentiated human leukemic cells (HL-60). *J Lipid Mediat* 1990;2:1-8.
 56. Baker RR, Chang HY. Alkylglycerophosphate acetyltransferase and lyso platelet activating factor acetyltransferase, two key enzymes in the synthesis of platelet activating factor, are found in neuronal nuclei isolated from cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302:257-263.
 57. Baker RR, Chang HY. Neuronal nuclear acetyltransferase involved in the synthesis of PAF are located in the nuclear envelope and show differential losses in activity. *BBA-Lipid Lipid Metab* 1997;1345:197-206.
 58. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho choline, a hypotensive and platelet aggregating lipid. *J Biol Chem* 1980;255:10256-10260.
 59. Ninio E, Bessou G. Biosynthesis of PAF-acether. XVI. Acetyltransferase specificity determines composition of PAF-acether molecular species in human polymorphonuclear neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1991;1085:136-139.
 60. Baker RR, Chang H. Substrate specificities of neuronal nuclear acetyltransferases involved in the synthesis of platelet-activating factor, differences in the use of 1-alkyl and 1-akyl lysophospholipid acceptors. *BBA-Lipid Lipid. Metab* 1998;1390:215-224.
 61. Gomez-Cambronerio J, Mato JM, Vivanco F, Sanchez-Crespo M. Phosphorylation of partially purified 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphorylcholine:Acetyl-CoA acetyltransferase from rat spleen. *Biochem J* 1987;245:893-898.
 62. Nieto ML, Velasco S, Sanchez Crespo M. Modulation of acetyl-CoA, 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 1988;263:4607-4611.

63. Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:102-123.
64. Ishii S, Shimizu T. Platelet-Activating Factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000;39:41-82.
65. Izumi T, Honda Z, Mutoh H, Kume K, Shimizu T. Regulation and signal transduction of PAF receptor. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995;23:461-466.
66. O'Neill LAJ, Bird TA, Gearing AJH, Saklatvala J. Interleukin-1 Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265(6):3146-3152.
67. Borashi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A. structure- function relationship in the IL-1 family. *Frontiers in Bioscience* 1995;1:270-308.
68. Dinarello C. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood* 1996;87(6):2095-2147.
69. Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 Signal Transduction. *Life Sciences* 1996;59(2):61-83.
70. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1592:265-280.
71. Subramanian S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. *Developmental and Comparative Immunology* 2004;28:415-428.
72. Ooi BS, Cohen DJ, Veis JH. Biology of the mesangial cell in glomerulonephritis--role of cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996;213(3):230-7.
73. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, Goodman SL. Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992 Mar;41(3):595-9.
74. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Marx M. Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int Suppl.* 1993;39:S26-31.
75. Lovett DH, Ryan JL, Sterzel RB. A thymocyte-activating factor derived from glomerular mesangial cells. *J Immunol.* 1983;130(4):1796-801.
76. Schonermack M, Deppisch R, Riedasch G, Rother K, Hansch GM. Induction of mediator release from human glomerular mesangial cells by the terminal complement components C5b-9. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;96(4):331-7.
77. Matsumoto K, Hatano M. Renal tubular epithelial antigen-containing immune complexes stimulate interleukin-1 production by cultured rat glomerular mesangial cells. *Nephron.* 1991;59(1):116-20.
78. Matsumoto K, Hatano M. Soluble immune complexes stimulate production of interleukin-1 by cultured rat glomerular mesangial cells. *Am J Nephrol.* 1991;11(2):138-43.

79. Lovett DH, Bursten SL, Gemsa D, Bessler W, Resch K, Ryan JL. Activation of glomerular mesangial cells by gram-negative bacterial cell wall components. *Am J Pathol.* 1988;133(3):472-84.
80. Morell GP, Pirotzky E, Erard D, Desmottes RM, Bidault J, Damais C, Benveniste J. Paf-acether (platelet-activating factor) and interleukin-1-like cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated glomeruli. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988;46(3):396-405.
81. Lovett DH, Szamel M, Ryan JL, Sterzel RB, Gemsa D, Resch K. Interleukin 1 and the glomerular mesangium. I. Purification and characterization of a mesangial cell-derived autogrowth factor. *J Immunol.* 1986;136(10):3700-5.
82. Abbott F, Tam FW, Ryan JJ, Rees AJ. Human mesangial cells synthesize interleukin 1 alpha but not interleukin 1 beta, interleukin 1 receptor antagonist, or tumour necrosis factor. *Nephrol Dial Transplant.* 1992;7(10):997-1001.
83. Kakizaki Y, Kraft N, Atkins RC. Interferon-gamma stimulates the secretion of IL-1, but not of IL-6, by glomerular mesangial cells. *Clin Exp Immunol.* 1993;91(3):521-5.
84. Chen Y, Sun Y, Lin J, Zhou A, Wang H. Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med J (Engl).* 1997;110(7):530-4.
85. Li H, Li X, Dhan L, Li C. Inhibition of lovastatin on proliferation and expression of proinflammatory cytokines in cultured human glomerular mesangial cells. *Chin Med J (Engl).* 2003;116(9):1366-9.
86. Waldherr R, Noronha IL, Niemir Z, Kruger C, Stein H, Stumm G. Expression of cytokines and growth factors in human glomerulonephritides. *Pediatr Nephrol.* 1993;7(4):471-8.
87. Matsumoto K, Atkins RC. Glomerular cells and macrophages in the progression of experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 1989;134(4):933-45.
88. Chen WP, Lin CY. Augmented expression of interleukin-6 and interleukin-1 genes in the mesangium of IgM mesangial nephropathy. *Nephron.* 1994;68(1):10-9.
89. Chen A, Chen WP, Sheu LF, Lin CY. Pathogenesis of IgA nephropathy: in vitro activation of human mesangial cells by IgA immune complex leads to cytokine secretion. *J Pathol.* 1994;173(2):119-26.
90. Lovett DH, Larsen A. Cell cycle-dependent interleukin 1 gene expression by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1988 Jul;82(1):115-22.
91. Roth M, Keul R, Emmons LR, Horl WH, Block LH. Manidipine regulates the transcription of cytokine genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(9):4071-5.

92. Pfeilschifter J, Huwiler A. Identification of ceramide targets in interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha signaling in mesangial cells. *Kidney Int Suppl.* 1998 ;67:S34-9.
93. Kitamura M. Adoptive transfer of genetically modified macrophages elucidated TGF-beta-mediated 'self-defence' of the glomerulus against local action of macrophages. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(1):35-8.
94. Sugiura T, Wada A, Moriyama T, Horio M, Ueda N, Imai E, Hori M. Probucol suppresses ICAM1 expression in rat mesangial cells: possible role of IL-1. *Kidney Int Suppl* 1999;71:167-170.
95. Denton MD, Marsden MA, Luscinskas FW, Brenner BM, Brady HR. Cytokine induced phagocyte adhesion to human mesangial cells: role for CD11/CD18 integrins and ICAM-1. *Am J Physiol* 1991;261:1071-1079.
96. Martin M, Schwinzer R, Schellekens H, Resch K. Glomerular mesangial cells in local inflammation. Induction of the expression of MHC class II antigens by IFN-gamma. *J Immunol.* 1989;142(6):1887-94.
97. Hawkins NJ, Ward RL, Wakefield D. Cytokine-mediated induction of HLA antigen expression on human glomerular mesangial cells. *Cell Immunol.* 1994;155(2):493-500.
98. Ikeda M, Minota S, Kano S. Pegulation of MHC class I expression by inflammatory cytokines in rat mesangial cells. *Nephron.* 1997;76(1):90-5.
99. Yokoo T, Kitamura M. IL-1beta depresses expression of the 70-kilodalton heat shock protein and sensitizes glomerular cells to oxidant-initiated apoptosis. *J Immunol.* 1997;159(6):2886-92.
100. Bohler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, Hambach P, Budde K, Neumayer HH. TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine.* 2000;12(7):986-91.
101. Manderscheid M, Messmer UK, Franzen R, Pfeilschifter J. Regulation of inhibitor of apoptosis expression by nitric oxide and cytokines: relation to apoptosis induction in rat mesangial cells and raw 264.7 macrophages. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1151-63.
102. Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH. The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):508-13.
103. Brennan DC, Jevnikar AM, Takei F, Reubin-Kelley VE. Mesangial cell accessory functions: mediation by intercellular adhesion molecule-1. *Kidney Int.* 1990;38(6):1039-46.

104. Schalkwijk C, Pfeilschifter J, Marki F, van den Bosch H. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;174(1):268-75.
105. Muhl H, Geiger T, Pignat W, Marki F, van den Bosch H, Vosbeck K, Pfeilschifter J. PDGF suppresses the activation of group II phospholipase A2 gene expression by interleukin 1 and forskolin in mesangial cells. *FEBS Lett.* 1991;291(2):249-52.
106. van den Bosch H, Schalkwijk C, Pfeilschifter J, Marki F. The induction of cellular group II phospholipase A2 by cytokines and its prevention by dexamethasone. *Adv Exp Med Biol.* 1992;318:1-10.
107. Muhl H, Geiger T, Pignat W, Marki F, van den Bosch H, Cerletti N, Cox D, McMaster G, Vosbeck K, Pfeilschifter J. Transforming growth factors type-beta and dexamethasone attenuate group II phospholipase A2 gene expression by interleukin-1 and forskolin in rat mesangial cells. *FEBS Lett.* 1992;301(2):190-4.
108. Walker G, Kunz D, Pignat W, van den Bosch H, Pfeilschifter J. Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects cytokine- and cAMP-induced expression of group II phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.* 1995;364(2):218-22.
109. Walker G, Kunz D, Pignat W, Wiesenberg I, Van den Bosch H, Pfeilschifter J. Tetranactin inhibits interleukin 1 beta and cAMP induction of group II phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol.* 1996;306(1-3):265-70.
110. Vervoordeldonk MJ, Pineda Torra IM, Aarsman AJ, van den Bosch H. Aspirin inhibits expression of the interleukin-1beta-inducible group II phospholipase A2. *FEBS Lett.* 1996;397(1):108-12.
111. Walker G, Kunz D, Pignat W, van den Bosch H, Pfeilschifter J. Suppression by cyclosporin A of interleukin 1 beta-induced expression of group II phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol.* 1997;121(4):787-93.
112. Petry C, Fritz G, Pfeilschifter J, Huwiler A. Inhibition of Rho modulates cytokine-induced prostaglandin E2 formation in renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1636(2-3):108-18.
113. Zoja C, Wang JM, Bettoni S, Sironi M, Renzi D, Chiaffarino F, Abboud HE, Van Damme J, Mantovani A, Remuzzi G, et al. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am J Pathol.* 1991;138(4):991-1003.

114. Rovin BH, Yoshiumura T, Tan L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol.* 1992;148(7):2148-53.
115. Grandaliano G, Valente AJ, Rozek MM, Abboud HE. Gamma interferon stimulates monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human mesangial cells. *J Lab Clin Med.* 1994;123(2):282-9.
116. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1995;48(4):1263-71.
117. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Fassler J. Modulation of IL-1-induced chemokine expression in human mesangial cells through alterations in redox status. *Cytokine.* 1997;9(3):178-86.
118. Schwarz M, Radeke HH, Resch K, Uciechowski P. Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and T cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int.* 1997;52(6):1521-31.
119. Rovin BH, Wilmer WA, Danne M, Dickerson JA, Dixon CL, Lu L. The mitogen-activated protein kinase p38 is necessary for interleukin 1beta-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression by human mesangial cells. *Cytokine.* 1999;11(2):118-26.
120. Rovin BH, Lu L, Cosio A. Cyclopentenone prostaglandins inhibit cytokine-induced nf-kappab activation and chemokine production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(8):1659-67.
121. Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T. Tranilast inhibits interleukin-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. *Eur J Pharmacol.* 2001;427(2):151-8.
122. Lee SK, Kim CS, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS. Exogenous nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha- or interleukin-1-beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells. Role of IkappaB-alpha and cyclic GMP. *Nephron.* 2002;92(4):780-7.
123. Lee MJ, Yang CW, Jin DC, Chang YS, Bang BK, Kim YS. Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway. *J Immunol.* 2003;170(5):2557-63.
124. Zoja C, Orisio S, Perico N, Benigni A, Morigi M, Benatti L, Rambaldi A, Remuzzi G. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial

- cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest.* 1991;64(1):16-20.
125. Brown Z, Strieter RM, Chensue SW, Ceska M, Lindley I, Neild GH, Kunkel SL, Westwick J. Cytokine-activated human mesangial cells generate the neutrophil chemoattractant, interleukin 8. *Kidney Int.* 1991;40(1):86-90.
 126. Abbott F, Ryan JJ, Ceska M, Matsushima K, Sarraf CE, Rees AJ. Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8. *Kidney Int.* 1991;40(4):597-605.
 127. Zoja C, Bettoni S, Morigi M, Remuzzi G, Rambaldi A. Interleukin-1 regulates cytokine gene expression in human mesangial cells through the interleukin-1 receptor type 1. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(12):1709-15.
 128. Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi G. Interleukin-1 and glomerular mesangial cells. *Ren Physiol Biochem.* 1993;16(1-2):89-92.
 129. Robson RL, Westwick J, Brown Z. Interleukin-1-induced IL-8 and IL-6 gene expression and production in human mesangial cells is differentially regulated by cAMP. *Kidney Int.* 1995 Dec;48(6):1767-77.
 130. Steiner P, Pfeilschifter J, Boeckh C, Radeke H, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 1991;261:792-8.
 131. 19
 132. Khachigian LM, Collins T, Fries JW. Nuclear factor-kappa B mediates induction of vascular cell adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1995 Mar;47(3):829-36.
 133. Yang B, Shen Y, Ma L. Regulative effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules on human mesangial cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1996;76(6):416-9.
 134. Ikeda M, Ikeda T, Takaishi M, Sheimada K, Minota S, Kano S. Nitric oxide inhibits intracellular adhesion molecule-1 expression in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(10):2213-8.
 135. Montinaro V, Serra L, Perissutti S, Tedesco F, Selvaggi FP, Schena FP. Study on the synthesis of complement components by human renal mesangial cells in culture. Assessment of the effect of cytokines. *Cytotechnology.* 1993;11(1):103-5.
 136. van den Dobbelen ME, Verhasselt V, Kaashoek JG, Timmerman JJ, Schroeijers WE, Verweij CL, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR. Regulation of C3

- and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 1994;95(1):173-80.
137. Marti HP, McNeil L, Davies M, Martin J, Lovett DH. Homology cloning of rat 72 kDa type IV collagenase: cytokine and second-messenger inducibility in glomerular mesangial cells. *Biochem J.* 1993;291(2):441-6.
 138. Daphna-Iken D, Morrison AR. Interleukin-1 beta induces interstitial collagenase gene expression and protein secretion in renal mesangial cells. *Am J Physiol.* 1995;269(6):831-7.
 139. Feng L, Xia Y, Kreisberg JJ, Wilson CB. Interleukin-1 alpha stimulates KC synthesis in rat mesangial cells: glucocorticoids inhibit KC induction by IL-1. *Am J Physiol.* 1994;266(2):713-22.
 140. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1669-75.
 141. Hartner A, Sterzel RB, Reindl N, Hocke GM, Fey GH, Goppelt-Strube M. Cytokine-induced expression of leukemia inhibitory factor in renal mesangial cells. *Kidney Int.* 1994;45(6):1562-71.
 142. Morel DS, Taupin JL, Potier M, Deminiere C, Potaux L, Gualde N, Moreau JF. Renal synthesis of leukaemia inhibitory factor (LIF), under normal and inflammatory conditions. *Cytokine.* 2000;12(3):265-71.
 143. Martin J, Knowlden J, Davies M, Williams JD. Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases. *Kidney Int.* 1994;46(3):877-85.
 144. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1669-75.
 145. Rzymkiewicz DM, DuMaine J, Morrison AR. IL-1 beta regulates rat mesangial cyclooxygenase II gene expression by tyrosine phosphorylation. *Kidney Int.* 1995;47(5):1354-63.
 146. Rzymkiewicz D, Morrison AR. Tyrosine Phosphorylation: Biochemical Events Involved in Cyclooxygenase II Activation by IL-1beta *Am J Ther.* 1995;2(9):620-625.
 147. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1996 May 1;97(9):2051-6.

148. Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1996;271(20):11689-93.
149. Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J, Jimenez W, Fresno M, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells--transcriptional inhibition by IL-13. *Eur J Biochem.* 1999;260(1):268-74.
150. Sasano H, Xaneda M, Shgimoto T, Inoki K, Kowa D, Kikassa P. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 2002;61(6):1957-67.
151. Kitamura M, Maruyama N, Mitarai T, Nagasawa R, Yokoo T, Sakai O. Heparin selectively inhibits gene expression of matrix metalloproteinase transin in cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(2):1333-8.
152. Stefanovic V, Vlahovic P, Ardaillou R. Characterization and control of expression of cell surface alkaline phosphodiesterase I activity in rat mesangial glomerular cells. *Ren Physiol Biochem.* 1995;18(1):12-20.
153. Timmerman JJ, Verweij CL, van Gijlswijk-Janssen DJ, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR. Cytokine-regulated production of the major histocompatibility complex class-III-encoded complement proteins factor B and C4 by human glomerular mesangial cells. *Hum Immunol.* 1995;43(1):19-28.
154. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Morrison AR. Regulation of heme oxygenase mRNA in mesangial cells: prostaglandin E2 negatively modulates interleukin-1-induced heme oxygenase-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(2):617-23.
155. Tsai CY, Yu CL, Wu TH, Hsieh SC, Tsai YY. Proinflammatory cytokines enhance COX-1 gene expression in cultured rat glomerular mesangial cells. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(1):47-56.
156. Pluss KM, Pfeilschifter J, Muhl H, Huwiler A, Boeckh C, Otten U. Modulatory role of platelet-derived growth factor on cytokine-induced nerve growth factor synthesis in rat glomerular mesangial cells. *Biochem J.* 1995;312(3):707-11.
157. Yokoo T, Kitamura M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol.* 1996;270(2):123-30.
158. Wilson HM, Haites NE, Reid FJ, Booth NA. Interleukin-1 beta up-regulates the plasminogen activator/plasmin system in human mesangial cells. *Kidney Int.* 1996;49(4):1097-104.

159. Wilson HM, Haites NE, Booth NA. Opposing effects of interleukin-1 and transforming growth factor-beta on the regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 expression by human mesangial cells. *Exp Nephrol.* 1997;5(3):233-8.
160. Liu ZH, Striker GE, Stetler-Stevenson M, Fukushima P, Patel A, Striker LJ. TNF-alpha and IL-1 alpha induce mannose receptors and apoptosis in glomerular mesangial but not endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996;270(6):1595-601.
161. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med.* 1997;186(2):189-98.
162. Chini EN, Chini CC, Bolliger C, Jougasaki M, Grande JP, Burnett JC Jr, Dousa TP. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int.* 1997;52(4):917-25.
163. Hofbauer KH, Schoof E, Kurtz A, Sandner P. Inflammatory cytokines stimulate adrenomedullin expression through nitric oxide-dependent and -independent pathways. *Hypertension.* 2002;39(1):161-7.
164. Guan Z, Buckman SY, Baier LD, Morrison AR. IGF-I and insulin amplify IL-1 beta-induced nitric oxide and prostaglandin biosynthesis. *Am J Physiol.* 1998;274(4):673-9.
165. Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 1994;45(1):150-8.
166. Nakazato Y, Okada H, Sato A, Iwaita Y, Hayashida T, Hayashi M, Suzuki H, Saruta T. Interleukin 4 downregulates cell growth and prostaglandin release of human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197(2):486-93.
167. Rzymkiewicz D, Leingang K, Baird N, Morrison AR. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta. *Am J Physiol.* 1994;266(1):39-45.
168. Schaefers HJ, Goppelt-Struebe M. Interference of corticosteroids with prostaglandin E2 synthesis at the level of cyclooxygenase-2 mRNA expression in kidney cells. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(9):1415-21.
169. Soler M, Camacho M, Sola R, Vila L. Mesangial cells release untransformed prostaglandin H2 as a major prostanoid. *Kidney Int.* 2001;59(4):1283-9.

170. Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H, Pfeilschifter J. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 2000;57(1):59-69.
171. Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol.* 2000;165(10):5788-97.
172. Suyama K, Kabuyama Y, Suzuki S, Kawasaki Y, Suzuki J, Suzuki H, Homma Y. Induction of transcription factor AP-2 by cytokines and prostaglandins in cultured mesangial cells. *Am J Nephrol.* 2001;21(4):307-14.
173. McDonald KJ, Cameron AJ, Allen JM, Jardine AG. Expression of Fc alpha/mu receptor by human mesangial cells: a candidate receptor for immune complex deposition in IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):438-42.
174. Wang Y, Li XM, Wang HY. [IL-1beta stimulates alpha-smooth muscle actin expression through JNK/p38 signal pathway in cultured rat mesangial cells]. *Sheng Li Xue Bao.* 2002;25;54(3):244-50.98.
175. Eberhardt W, Akool el-S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J. Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33518-28.
176. Eberhardt W, Schulze M, Engels C, Klasmeier E, Pfeilschifter J. Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Mol Endocrinol.* 2002;16(8):1752-66.
177. Huwiler A, Akool el-S, Aschrafi A, Hamada FM, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51758-69.
178. Yu Q, Cok SJ, Zeng C, Morrison AR. Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR). *J Biol Chem.* 2003;278(3):1579-84.
179. Taneja N, Coy PE, Lee I, Bryson JM, Robey RB. Proinflammatory interleukin-1 cytokines increase mesangial cell hexokinase activity and hexokinase II isoform abundance. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(2):548-57.

180. Tsukinoki T, Sugiyama H, Sunami R, Kobayashi M, Onoda T, Maeshima Y, Yamasaki Y, Makino H. Mesangial cell Fas ligand: upregulation in human lupus nephritis and NF-kappaB-mediated expression in cultured human mesangial cells. *Clin Exp Nephrol*. 2004;8(3):196-205.
181. Zou MH, Klein T, Pasquet JP, Ullrich V. Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J*. 1998;336(2):507-12.
182. Marti HP, McNeil L, Thomas G, Davies M, Lovett DH. Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metalloproteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1. *Biochem J*. 1992;285:899-905.
183. Moriyama T, Fujiwara Y, Imai E, Takenaka M, Kawanishi S, Inoue T, Noguchi T, Tanaka T, Kamada T, Ueda N. cDNA cloning of rat LRP, a receptor like protein tyrosine phosphatase, and evidence for its gene regulation in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;188(1):34-9.
184. Zoja C, Bettoni S, Morigi M, Remuzzi G, Rambaldi A. Interleukin-1 regulates cytokine gene expression in human mesangial cells through the interleukin-1 receptor type 1. *J Am Soc Nephrol*. 1992;2(12):1709-15.
185. Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi G. Interleukin-1 and glomerular mesangial cells. *Ren Physiol Biochem*. 1993;16(1-2):89-92.
186. Montinaro V, Serra L, Perissutti S, Ranieri E, Tedesco F, Schena FP. Biosynthesis of C3 by human mesangial cells. Modulation by proinflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(2):462-7.
187. Montinaro V, Serra L, Perissutti S, Tedesco F, Selvaggi FP, Schena FP. Study on the synthesis of complement components by human renal mesangial cells in culture. Assessment of the effect of cytokines. *Cytotechnology*. 1993;11(1):103-5.
188. Wolf G, Aberle S, Thaiss F, Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RA. TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int*. 1993;44(4):795-804.
189. Wu X, Dolecki GJ, Lefkowitz JB. GRO chemokines: a transduction, integration, and amplification mechanism in acute renal inflammation. *Am J Physiol*. 1995;269(2):F248-56.
190. Yokoo T, Kitamura M. Opposite, binary regulatory pathways involved in IL-1-mediated stromelysin gene expression in rat mesangial cells. *Kidney Int*. 1996;50(3):894-901.

191. Ortiz-Arduan A, Danoff TM, Kalluri R, Gonzalez-Cuadrado S, Karp SL, Elkon K, Egido J, Neilson EG. Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol.* 1996;271(6):1193-201.
192. Ruan XZ, Varghese Z, Fernando R, Moorhead JF. Cytokine regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(6):1391-7.
193. Ruan XZ, Varghese Z, Powis SH, Moorhead JF. Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation. *Kidney Int.* 2001;60(5):2037-8.
194. Ruan XZ, Moorhead JF, Fernando R, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z. PPAR agonists protect mesangial cells from interleukin 1beta-induced intracellular lipid accumulation by activating the ABCA1 cholesterol efflux pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(3):593-600.
195. Bursten SL, Harris WE, Bomsztyk K, Lovett D. Interleukin-1 rapidly stimulates lysophosphatidate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase activities in human mesangial cells. *J Biol Chem.* 1991;266(31):20732-43.
196. Bursten SL, Harris WE. Interleukin-1 stimulates phosphatidic acid-mediated phospholipase D activity in human mesangial cells. *Am J Physiol.* 1994;266(4):1093-104.
197. Pawluczyk IZ, Harris KP. Cytokine interactions promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney Int.* 1998;54(1):62-70.
198. Mukhtar A. Effect of PMA and IL-1 on matrix proteins with special reference to kidney mesangial cells. *Indian J Med Sci.* 1997;51(6):186-91.
199. Kashiwara N, Watanabe Y, Makino H, Kanwar YS. Interleukin-1-induced alterations in glomerular proteoglycans: biochemical and tissue autoradiographic aspects. *J Am Soc Nephrol.* 1992;3(2):203-13.
200. Suzuki S. Effects of growth factors on the gene expression of extracellular matrix components in cultured rat mesangial cells] *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1993;35(2):97-104.
201. Nitsch DD, Ghilardi N, Muhl H, Nitsch C, Brune B, Pfeilschifter J. Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cells. *Am J Pathol.* 1997;150(3):889-900.
202. Mohaupt M, Schoecklmann HO, Schulze-Lohoff E, Sterzel RB. Altered nitric oxide production and exogenous nitric oxide do not affect the proliferation of rat mesangial cells. *J Hypertens.* 1994;12(4):401-8.
203. Tetsuka T, Morrison AR. Tyrosine kinase activation is necessary for inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-1 beta. *Am J Physiol.* 1995;269(1):55-9.

204. Kunz D, Muhl H, Walker G, Pfeilschifter J. Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5387-91.
205. Muhl H, Pfeilschifter J. Possible role of protein kinase C-epsilon isoenzyme in inhibition of interleukin 1 beta induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem J*. 1994;303(2):607-12.
206. Ikeda M, Ikeda U, Ohkawa F, Shimada K, Kano S. Nitric oxide synthesis in rat mesangial cells induced by cytokines. *Cytokine*. 1994;6(6):602-7.
207. Taniuchi M, Otani H, Kodama N, Tone Y, Sakagashira M, Yamada Y, Mune M. Lysophosphatidylcholine up-regulates IL-1 beta-induced iNOS expression in rat mesangial cells. *Yukawa S. Kidney Int Suppl*. 1999;71:156-8.
208. Muhl H, Pfeilschifter J. Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1941-6.
209. Rupprecht G, Scholz K, Beck KF, Geiger H, Pfeilschifter J, Kaszkin M. Cross-talk between group IIA-phospholipase A2 and inducible NO-synthase in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*. 1999;127(1):51-6.
210. Guan Z, Buckman SY, Springer LD, Morrison AR. Both p38alpha(MAPK) and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*. 1999;274(51):36200-6.
211. Pfeilschifter J, Vosbeck K. Transforming growth factor beta 2 inhibits interleukin 1 beta- and tumour necrosis factor alpha-induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175(2):372-9.
212. Muhl H, Kunz D, Rob P, Pfeilschifter J. Cyclosporin derivatives inhibit interleukin 1 beta induction of nitric oxide synthase in renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol*. 1993;249(1):95-100.
213. Jaimes EA, Nath KA, Raij L. Hydrogen peroxide downregulates IL-1-driven mesangial iNOS activity: implications for glomerulonephritis. *Am J Physiol*. 1997;272(6):721-8.
214. Kihara M, Yabana M, Toya Y, Kobayashi S, Fujita T, Iwamoto T, Ishigami T, Umemura S. Angiotensin II inhibits interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int*. 1999;55(4):1277-83.
215. Eberhardt W, Kunz D, Pfeilschifter J. Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin 1 beta- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200(1):163-70.

216. Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Pfeilschifter J. Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):255-9.
217. Kunz D, Walker G, Pfeilschifter J. Transforming growth factor-beta 2 inhibits interleukin 1 beta-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Inflamm Res*. 1997;46(9):327-31.
218. Yu Z, Kone BC. Targeted histone H4 acetylation via phosphoinositide 3-kinase- and p70s6-kinase-dependent pathways inhibits iNOS induction in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(2):496-502.
219. Beck KF, Mohaupt MG, Sterzel RB. Endothelin-1 inhibits cytokine-stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int*. 1995;48(6):1893-9.
220. Kunz D, Walker G, Wiesenberg I, Pfeilschifter J. Inhibition by tetranactin of interleukin 1 beta- and cyclic AMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol*. 1996;118(7):1621-6.
221. Saura M, Martinez-Dalmau R, Minty A, Perez-Sala D, Lamas S. Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells. *Biochem J*. 1996;313(2):641-6.
222. Umino T, Kusano E, Muto S, Akimoto T, Yanagiba S, Ono S, Amemiya M, Ando Y, Homma S, Ikeda U, Shimada K, Asano Y. AVP inhibits LPS- and IL-1beta-stimulated NO and cGMP via V1 receptor in cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol*. 1999;276(3):433-41.
223. Guan Z, Baier LD, Morrison AR. p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 1997;272(12):8083-9.
224. Gupta AK, Kone BC. USF-1 and USF-2 trans-repress IL-1beta-induced iNOS transcription in mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):1065-72.
225. Beck KF, Eberhardt W, Walpen S, Apel M, Pfeilschifter J. Potentiation of nitric oxide synthase expression by superoxide in interleukin 1 beta-stimulated rat mesangial cells. *FEBS Lett*. 1998;435(1):35-8.
226. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(8):2009-17.

227. Cernuda-Morollon E, Rodriguez-Pascual F, Klatt P, Lamas S, Perez-Sala D. PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NF-kappaB: implications for mesangial cell activation by cytokines. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2223-31.
228. Jalal DI, Kone BC. Src activation of NF-kappaB augments IL-1beta-induced nitric oxide production in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(1):99-106.
229. Muhl H, Pfeilschifter J. Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1994;46(5):1302-6.
230. Saura M, Perez-Sala D, Canada FJ, Lamas S. Role of tetrahydrobiopterin availability in the regulation of nitric-oxide synthase expression in human mesangial cells. *J Biol Chem.* 1996;271(24):14290-5.
231. Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5(7):1483-91.
232. Radeke HH, Meier B, Topley N, Flöge J, Habermehl GG, Resch K. Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;37(2):767-75.
233. Stephanz GB, Gwinner W, Cannon JK, Tisher CC, Nick HS. Heat-aggregated IgG and interleukin-1-beta stimulate manganese superoxide dismutase in mesangial cells.
234. Franki N, Singhal PC. Nitric oxide and superoxide in rat mesangial cells: modulation by C-reactive protein. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(5):619-26.
235. Biancone L, Tetta C, Turello E, Montrucchio G, Iorio EL, Servillo L, Balestrieri C, Camussi G. Platelet-activating factor biosynthesis by cultured mesangial cells is modulated by proteinase inhibitors. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(7):1251-61.
236. Lovett DH, Ryan JL, Sterzel RB. Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. *J Immunol.* 1983;131(6):2830-6.
237. Ooi BS, MacCarthy EP, Hsu A. Beta-endorphin amplifies the effect of interleukin-1 on mouse mesangial cell proliferation. *J Lab Clin Med.* 1987;110(2):159-63.
238. Stahl RA, Thaiss F, Haberstroh U, Kahf S, Shaw A, Schoeppe W. Cyclooxygenase inhibition enhances rat interleukin 1 beta-induced growth of rat mesangial cells in culture. *Am J Physiol.* 1990;259(3):419-24.
239. Ganz MB, Perfetto MC, Boron WF. Effects of mitogens and other agents on rat mesangial cell proliferation, pH, and Ca²⁺. *Am J Physiol.* 1990;259(2):269-78.
240. Oda H, Yorioka N, Ito T, Yamashita K, Kushiata S, Yamakido M. Nicardipine hydrochloride suppresses DNA synthesis in human mesangial cells stimulated with

- recombinant human (rh) platelet-derived growth factor AA, rh interleukin-1 alpha, or rh tumor necrosis factor-alpha. *Nephron*. 1996;73(1):16-22.
241. Jimi N, Segawa K, Minami K, Sata T, Shigematsu A. Inhibitory effect of the intravenous anesthetic, ketamine, on rat mesangial cell proliferation. *Anesth Analg*. 1997;84(1):190-5.
 242. Blume C, Sabuda-Widemann D, Pfeilschifter J, Plum J, Schror K, Grabensee B, Beck KF. Cerivastatin inhibits proliferation of interleukin-1 beta-induced rat mesangial cells by enhanced formation of nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 2004;485(1-3):1-10.
 243. Ikeda M, Ikeda T, Takeda K, Kano S. Recombinant interleukin-1 alpha inhibits the growth of rat mesangial cells in culture. *Clin Exp Immunol*. 1991;83(1):149-53.
 244. Ikeda M, Ikeda T, Kano S. Interleukin-1 suppresses mesangial cell growth via inhibition of Ca²⁺ entry. *Cytokine*. 1991;3(2):131-3.
 245. Matsell DG, Gaber LW, Malik KU. Cytokine stimulation of prostaglandin production inhibits the proliferation of serum-stimulated mesangial cells. *Kidney Int*. 1994;45(1):159-65.
 246. Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23305-9.
 247. Ivanov AA, Gladskih OP, Shilov EM, Gitel' EP, Meshcheriakova MA, Pal'tsev MA. [Effects of a number of cytokines on the proliferation of mesangial cells and the production of extracellular matrix in anti-GBM nephritis]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 1995;(5):56-9.
 248. Pfeilschifter J, Pignat W, Vosbeck K, Marki F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159(2):385-94.
 249. Pfeilschifter J, Muhl H. Interleukin 1 and tumor necrosis factor potentiate angiotensin II- and calcium ionophore-stimulated prostaglandin E2 synthesis in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;169(2):585-95.
 250. Nakazato Y, Simonson MS, Herman WH, Konieczkowski M, Sedor JR. Interleukin-1 alpha stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A2. *J Biol Chem*. 1991;266(21):14119-27.

251. Lovett DH, Martin M, Bursten S, Szamel M, Gems D, Resch K. Interleukin 1 and the glomerular mesangium. III. IL-1-dependent stimulation of mesangial cell protein kinase activity. *Kidney Int.* 1988;34(1):26-35.
252. Kester M, Simonson MS, Mene P, Sedor JR. Interleukin-1 generates transmembrane signals from phospholipids through novel pathways in cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1989;83(2):718-23.
253. Musial A, Mandal A, Coroneos E, Kester M. Interleukin-1 and endothelin stimulate distinct species of diglycerides that differentially regulate protein kinase C in mesangial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(37):21632-8.
254. Mandal A, Wang Y, Ernsberger P, Kester M. Interleukin-1-induced ether-linked diglycerides inhibit calcium-insensitive protein kinase C isoforms. Implications for growth senescence. *J Biol Chem.* 1997;272(32):20306-11.
255. Ganz MB, Saksa B, Saxena R, Hawkins K, Sedor JR. PDGF and IL-1 induce and activate specific protein kinase C isoforms in mesangial cells. *Am J Physiol.* 1996;271(1):108-13.
256. Rzymkiewicz DM, Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava S, Morrison AR. Interleukin-1 β activates protein kinase C zeta in renal mesangial cells. Potential role in prostaglandin E2 up-regulation. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17241-6.
257. Topley N, Floege J, Wessel K, Hass R, Radeke HH, Kaever V, Resch K. Prostaglandin E2 production is synergistically increased in cultured human glomerular mesangial cells by combinations of IL-1 and tumor necrosis factor- α 1. *J Immunol.* 1989;143(6):1989-95.
258. Floege J, Topley N, Wessel K, Kaever V, Radeke H, Hoppe J, Kishimoto T, Resch K. Monokines and platelet-derived growth factor modulate prostanoid production in growth arrested, human mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;37(3):859-69.
259. Coyne DW, Morrison AR. Effect of the tyrosine kinase inhibitor, genistein, on interleukin-1 stimulated PGE2 production in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(2):718-24.
260. Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem.* 1998;273(44):28670-6.
261. Huang S, Konieczkowski M, Schelling JR, Sedor JR. Interleukin-1 stimulates Jun N-terminal/stress-activated protein kinase by an arachidonate-dependent mechanism in mesangial cells. *Kidney Int.* 1999;55(5):1740-9.

262. Pfeilschifter J, Schwarzenbach H. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.* 1990;273(1-2):185-7.
263. Marsden PA, Ballermann BJ. Tumor necrosis factor alpha activates soluble guanylate cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine-dependent mechanism. *J Exp Med.* 1990;172(6):1843-52.
264. Pfeilschifter J, Leighton J, Pignat W, Marki F, Vosbeck K. Cyclic AMP mimics, but does not mediate, interleukin-1- and tumour-necrosis-factor-stimulated phospholipase A2 secretion from rat renal mesangial cells. *Biochem J.* 1991;273(1):199-204.
265. Sugiura T, Wada A, Itoh T, Tojo H, Okamoto M, Imai E, Kamada T, Ueda N. Group II phospholipase A2 activates mitogen-activated protein kinase in cultured rat mesangial cells. *FEBS Lett.* 1995;370(1-2):141-5.
266. Huwiler A, Staudt G, Kramer RM, Pfeilschifter J. Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1348(3):257-72.
267. Wada A, Tojo H, Sugiura T, Fujiwara Y, Kamada T, Ueda N, Okamoto M. Group II phospholipase A2 as an autocrine growth factor mediating interleukin-1 action on mesangial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1345(1):99-108.
268. Huwiler A, Brunner J, Hummel R, Vervoordeldonk M, Stabel S, van den Bosch H, Pfeilschifter J. Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(14):6959-63.
269. Kaszkin M, Huwiler A, Scholz K, van den Bosch H, Pfeilschifter J. Negative regulation of interleukin-1beta-activated neutral sphingomyelinase by protein kinase C in rat mesangial cells. *FEBS Lett.* 1998;440(1-2):163-6.
270. Franzen R, Pautz A, Brautigam L, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Huwiler A. Interleukin-1beta induces chronic activation and de novo synthesis of neutral ceramidase in renal mesangial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35382-9.
271. Miller BW, Baier LD, Morrison AR. Overexpression of protein kinase C-zeta isoform increases cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 1997;273(1):130-6.
272. Huwiler A, Pfeilschifter J. Interleukin-1 stimulates de novo synthesis of mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.* 1994;350(1):135-8.
273. Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH. Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem.* 1997;272(16):10877-81.

274. Guan Z, Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Interleukin-1 beta activates c-jun NH2-terminal kinase subgroup of mitogen-activated protein kinases in mesangial cells. *Am J Physiol.* 1996;270(4):634-41.
275. Uciechowski P, Saklatvala J, von der Ohe J, Resch K, Szamel M, Kracht M. Interleukin 1 activates jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 but not extracellular regulated MAP kinase (ERK) in human glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.* 1996;394(3):273-8.
276. Rovin BH, Tan LC. Role of protein kinase pathways in IL-1-induced chemoattractant expression by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1994;46(4):1059-68.
277. Tetsuka T, Srivastava SK, Morrison AR. Tyrosine kinase inhibitors, genistein and herbimycin A, do not block interleukin-1 beta-induced activation of NF-kappa B in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;218(3):808-12.
278. Donaldson A, Daphna-Iken D, Tetsuka T, Morrison AR. Interleukin-1 beta activates PI 3-kinase in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;227(1):289-93.
279. Pluss C, Werner ER, Blau N, Wachter H, Pfeilschifter J. Interleukin 1 beta and cAMP trigger the expression of GTP cyclohydrolase I in rat renal mesangial cells. *Biochem J.* 1996;318(2):665-71.
280. Rolz W, Xin C, Ren S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Interleukin-1 inhibits angiotensin II-stimulated protein kinase B pathway in renal mesangial cells via the inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 2002;442(3):195-203.
281. Rolz W, Xin C, Ren S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Interleukin-1beta inhibits ATP-induced protein kinase B activation in renal mesangial cells by two different mechanisms: the involvement of nitric oxide and ceramide. *Br J Pharmacol.* 2003;138(3):461-8.
282. Sugiura T, Wada A, Moriyama T, Horio M, Ueda N, Imai E, Hori M. Probucol suppresses ICAM-1 expression in rat mesangial cells: possible role of IL-1. *Kidney Int Suppl.* 1999;71:S167-70.
283. Liu T, Ye C. [Effect of shenshuaining on proliferation and autocrine interleukin-1 secretion of human mesangial cells] *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1999;19(5):299-301.
284. Zhang L, Bi Z, Li X. [Inhibitory effects of monomer T4 from *Tripterygium wilfordii* hook on cultured mesangial cells proliferation and IL-1 production] *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 1994;16(4):270-4.

285. Kuo YC, Sun CM, Tsai WJ, Ou JC, Chen WP, Lin CY. Chinese herbs as modulators of human mesangial cell proliferation: preliminary studies. *J Lab Clin Med.* 1998;132(1):76-85.
286. Kuo YC, Sun CM, Tsai WJ, Ou JC, Chen WP, Lin CY. Blocking of cell proliferation, cytokines production and genes expression following administration of Chinese herbs in the human mesangial cells. *Life Sci.* 1999;64(23):2089-99.
287. Ishikawa Y, Sugiyama H, Stylianou E, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kappaB. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(11):2290-6.
288. Kuo YC, Tsai WJ, Meng HC, Chen WP, Yang LY, Lin CY. Immune responses in human mesangial cells regulated by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. *Life Sci.* 2001;68(11):1271-86.
289. Yang LY, Huang WJ, Hsieh HG, Lin CY. H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J Lab Clin Med.* 2003;141(1):74-83.
290. Bao HY, Chen RH, Huang SM, Pan XQ, Fei L. [Curcumin inhibited the proliferation and extracellular matrix production of human mesangial cells] *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2003;41(11):822-6.
291. Hu Y, Liang H, Gong WK, Xu ZF, Zou QL. [The effect of kanglaite injection(KLT) on the proliferation and telomerase activity of rat mesangial cells] *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2005;30(6):450-3.
292. Schlondorff D, Goldwasser P, Neuwirth R, Satriano JA, Clay KL. Production of platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. *Am J Physiol.* 1986 Jun;250(6 Pt 2):F1123-7.
293. Neuwirth R, Ardaillou N, Schlondorff D. Extra- and intracellular metabolism of platelet-activating factor by cultured mesangial cells. *Am J Physiol.* 1989 Apr;256(4 Pt 2):F735-41.
294. Lianos EA, Zanglis A. Biosynthesis and metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):8990-3.
295. Morell GP, Pirotzky E, Erard D, Desmottes RM, Bidault J, Damais C, Benveniste J. Paf-acether (platelet-activating factor) and interleukin-1-like cytokine production by

- lipopolysaccharide-stimulated glomeruli. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988 Mar;46(3):396-405.
296. Camussi G, Biancone L, Iorio EL, Silvestro L, Da Col R, Capasso C, Rossano F, Servillo L, Balestrieri C, Tufano MA. Porins and lipopolysaccharide stimulate platelet activating factor synthesis by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992 Dec;42(6):1309-18.
 297. Wang J, Kester M, Dunn MJ. The effects of endotoxin on platelet-activating factor synthesis in cultured rat glomerular mesangial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1988 May 13;969(3):217-24.
 298. Neuwirth R, Singhal P, Diamond B, Hays RM, Lobmeyer L, Clay K, Schlondorff D. Evidence for immunoglobulin Fc receptor-mediated prostaglandin₂ and platelet-activating factor formation by cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1988 Sep;82(3):936-44.
 299. Neuwirth R, Satriano JA, DeCandido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circ Res.* 1989 Jun;64(6):1224-9.
 300. Hampel G, Reinke M, Hren J. Prostaglandin synthesis is increased in selenium supplemented human mesangial cells despite suppression of phospholipase A₂-activity. *Life Sci.* 1991;49(12):881-8.
 301. Biancone L, Tetta C, Turello E, Montrucchio G, Iorio EL, Servillo L, Balestrieri C, Camussi G. Platelet-activating factor biosynthesis by cultured mesangial cells is modulated by proteinase inhibitors. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Jan;2(7):1251-61.
 302. Camussi G, Biancone L, Iorio EL, Silvestro L, Da Col R, Capasso C, Rossano F, Servillo L, Balestrieri C, Tufano MA. Porins and lipopolysaccharide stimulate platelet activating factor synthesis by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992 Dec;42(6):1309-18.
 303. Chen A, Chen WP, Sheu LF, Lin CY. Pathogenesis of IgA nephropathy: in vitro activation of human mesangial cells by IgA immune complex leads to cytokine secretion. *J Pathol.* 1994 Jun;173(2):119-26.
 304. Arribas I, Rodriguez-Puyol D, Garcia-Escribano MC, Diez-Marques ML, Perez de Lema G, Rodriguez-Puyol M. Thromboxane A₂ and platelet-activating factor decrease in the platelet-mesangial cell interactions. *Life Sci.* 1995;57(10):957-65.
 305. Bussolati B, Mariano F, Biancone L, Foa R, David S, Cambi V, Camussi G. Interleukin-12 is synthesized by mesangial cells and stimulates platelet-activating factor

- synthesis, cytoskeletal reorganization, and cell shape change. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):623-32.
306. Camussi G, Mariano F, Biancone L, De Martino A, Bussolati B, Montrucchio G, Tobias PS. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 modulate the synthesis of platelet-activating factor by human monocytes and mesangial and endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):316-24.
 307. Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov;10(11):2306-13.
 308. Martinez-Salgado C, Rodriguez-Barbero A, Tavares P, Eleno N, Lopez-Novoa JM. Role of calcium in gentamicin-induced mesangial cell activation. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10(1-2):65-72.
 309. Bussolati B, Peri G, Salvidio G, Verzola D, Mantovani A, Camussi G. The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1466-72.
 310. Mene P, Simonson MS, Dunn MJ. Phospholipids in signal transduction of mesangial cells. *Am J Physiol.* 1989 Mar;256(3 Pt 2):F375-86.
 311. Kester M, Mene P, Dubyak GR, Dunn MJ. Elevation of cytosolic free calcium by platelet-activating factor in cultured rat mesangial cells. *FASEB J.* 1987 Sep;1(3):215-9.
 312. Bonventre JV, Weber PC, Gronich JH. PAF and PDGF increase cytosolic [Ca²⁺] and phospholipase activity in mesangial cells. *Am J Physiol.* 1988 Jan;254(1 Pt 2):F87-94.
 313. Schlondorff D, Singhal P, Hassid A, Satriano JA, DeCandido S. Relationship of GTP-binding proteins, phospholipase C, and PGE₂ synthesis in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol.* 1989 Jan;256(1 Pt 2):F171-8.
 314. Kester M, Thomas CP, Wang J, Dunn MJ. Platelet-activating factor stimulates multiple signaling pathways in cultured rat mesangial cells. *J Cell Physiol.* 1992 Nov;153(2):244-55.
 315. Kester M. Platelet-activating factor stimulates phosphatidic acid formation in cultured rat mesangial cells: roles of phospholipase D, diglyceride kinase, and de novo phospholipid synthesis. *J Cell Physiol.* 1993 Aug;156(2):317-25.
 316. Nakao A, Watanabe T, Bitoh H, Imaki H, Suzuki T, Asano K, Taniguchi S, Nosaka K, Shimizu T, Kurokawa K. cAMP mediates homologous downregulation of PAF receptor mRNA expression in mesangial cells. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt 2):F445-50.

317. Fragopoulou E, Iatrou C, Demopoulos CA. Characterization of Acetyl-CoA:Lyso-PAF Acetyltransferase of human mesangial cells. *Mediators of Inflammation* 2005;5:263-272.
318. Nomikos T, Iatrou C, Demopoulos CA. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur J Biochem* 2003;270:2992-3000.
319. Lianos EA, Zanglis A. Biosynthesis and metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in rat glomerular mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262(19):8990-8993.
320. Snyder F. CDP-choline:alkylacylglycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet activating factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1348:111-116.
321. Neuwirth R, Ardaillou N, Schlondorff D. Extra- and intracellular metabolism of platelet-activating factor by cultured mesangial cells. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* 1989;256(4):F25-4.
322. Schlondorff D, Satriano JA, Hagege J, Perez J, Baud L. Effect of platelet-activating factor and serum-treated zymosan on prostaglandin E₂ synthesis, arachidonic acid release, and contraction of cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1984 Apr;73(4):1227-31.
323. Ardaillou N, Hagege J, Nivez MP, Ardaillou R, Schlondorff D. Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured human mesangial cells. *Am J Physiol.* 1985 Feb;248(2 Pt 2):F240-6.
324. Schlondorff D, Satriano JA, DeCandido S. Different concentrations of pertussis toxin have opposite effects on agonist-induced PGE₂ formation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Nov 26;141(1):39-45.
325. Neuwirth R, Singhal P, Satriano JA, Braquet P, Schlondorff D. Effect of platelet activating factor antagonists on cultured rat mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Nov;243(2):409-14.
326. Pirotzky E, Delattre RM, Hellegouarch A, Lonchampt MO, Aarden L, Braquet P, Galanaud P. Interleukin-6 production by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide-stimulated rat renal cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990 Aug;56(2):271-9.
327. Barnett R, Goldwasser P, Scharschmidt LA, Schlondorff D. Effects of leukotrienes on isolated rat glomeruli and cultured mesangial cells. *Am J Physiol.* 1986 May;250(5 Pt 2):F838-44.

328. de Arriba G, Barrio V, Hernando L, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Puyol D. Changes in glomerular cross-sectional area induced by platelet activating factor. *Nephrol Dial Transplant*. 1987;2(4):224-7.
329. Sharma R, Sharma M, Li JZ, McCarthy ET, Savin VJ. Direct effects of platelet-activating factor on glomerular capillary permeability. *Kidney Blood Press Res*. 1997;20(1):25-30.
330. Olivera A, Caramelo C, Arriba G, Lamas S, Rodriguez-Puyol D, Schrier RW, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM. Effect of atrial natriuretic peptide and calcium antagonists on platelet-activating factor-induced contraction and intracellular calcium mobilization in rat mesangial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994 Sep;24(3):388-93.
331. Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G, Iglesias-Cruz MC, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):E990-5.
332. Iglesias-De La Cruz MC, Ruiz-Torres MP, De Lucio-Cazana FJ, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. Phenotypic modifications of human mesangial cells by extracellular matrix: the importance of matrix in the contractile response to reactive oxygen species. *Exp Nephrol*. 2000 Mar-Apr;8(2):97-103.
333. Fragopoulou E, Iatrou C, Antonopoulou S, Ruan XZ, Fernando RL, Powis SH, Moorhead JF, Varghese Z. Platelet-activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells. *J Lab Clin Med*. 2006 Jun;147(6):281-9.
334. Ruiz-Ortega M, Largo R, Bustos C, Gomez-Garre D, Egido J. Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Aug;8(8):1266-75.
335. Brady HR, Denton MD, Jimenez W, Takata S, Palliser D, Brenner BM. Chemoattractants provoke monocyte adhesion to human mesangial cells and mesangial cell injury. *Kidney Int*. 1992 Aug;42(2):480-7.
336. Komatsu H, Ishiwari K, Shikata A, Nishida M, Kawakatsu H, Sawada T. Platelet-activating factor induces cell growth through tyrosine phosphorylation pathway in cultured rat mesangial cells. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1995 Nov;37(11):622-31.
337. Baud L, Perez J, Ardaillou R. Dexamethasone and hydrogen peroxide production by mesangial cells during phagocytosis. *Am J Physiol*. 1986 Apr;250(4 Pt 2):F596-604.
338. Rodriguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, Lopez-Farre A, Ortega G, Hernando L, Lopez-Novoa JM. Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int*. 1989 Feb;35(2):632-7.

339. Bagnis C, Deray G, Dubois M, Pirotzky E, Jacquiaud C, Baghos W, Aupetit B, Braquet P, Jacobs C. Prevention of cyclosporin nephrotoxicity with a platelet-activating factor (PAF) antagonist. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Mar;11(3):507-13.
340. Camussi G, Turello E, Tetta C, Bussolino F, Baglioni C. Tumor necrosis factor induces contraction of mesangial cells and alters their cytoskeletons. *Kidney Int*. 1990 Nov;38(5):795-802.
341. Lopez-Farre A, Gomez-Garre D, Bernabeu F, Montanes I, Millas I, Lopez-Novoa JM. Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF. *Kidney Int*. 1991 Apr;39(4):624-30.
342. Montero A, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM. A role for platelet-activating factor in endothelin-1-induced rat mesangial cell proliferation. *Eur J Pharmacol*. 1993 Oct 26;243(3):235-40.
343. Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodriguez-Puyol D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol*. 1992 Sep;263(3 Pt 2):F466-73.
344. Duque I, Rodriguez Puyol M, Ruiz P, Gonzalez-Rubio M, Diez Marques ML, Rodriguez Puyol D. Calcium channel blockers inhibit hydrogen peroxide-induced proliferation of cultured rat mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Nov;267(2):612-6.
345. Arribas-Gomez I, Duque-Marin I, Perez de Lema G, Diez-Marques ML, Lucio-Cazana J, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. A possible role for platelet-activating factor in the hydrogen peroxide-induced TXB2 and PGE2 glomerular synthesis. *J Lipid Res*. 1995 Feb;36(2):260-5.
346. Arribas I, Martin Ambrosio R, Diez Marques ML, Garcia Escribano C, Rodriguez Puyol D, Rodriguez Puyol M. Direct interactions between platelets and cultured rat mesangial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993 Aug;49(2):597-602.
347. Bricio T, Molina A, Martin A, Mampaso F. In vitro modulation of interleukin-1 beta secretion by cultured rat doxorubicin-stimulated whole glomeruli and dissociated mesangial glomerular cells. *Immunology*. 1994 Jan;81(1):53-7.
348. Rodriguez-Barbero A, Rodriguez-Lopez AM, Gonzalez-Sarmiento R, Lopez-Novoa JM. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney Int*. 1995 May;47(5):1346-53.
349. Kok FJ, Kromhout D. Atherosclerosis: Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 2004;43:2-5.

350. Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil. *Med Res Rev* 2002;22(1):65–75.
351. Karantonis H, Antonopoulou S, Demopoulos CA. antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. *J Agric Food Chem* 2002;50:1150-1160.
352. Perona JS, Moruno RC, Gutierrez VR. The role of olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006;17:429-445.
353. Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 2004;58:955-965.
354. Cunha FM, Duma D, Assreyua J, Buzzib F, Nierob R, Camposa MM, Calixtoa JO. Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo. Anti-inflammatory Properties. *Free Radical Research* 2004;38(11):1241-1253.
355. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA. biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. *J Agric Food Chem* 2002;50:2684-2694.
356. Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Mitsopoulou CA, Demopoulos CA. separation of biologically active lipids from red wine. *J Agric Food Chem* 2000;48:1234-1238.
357. Fragopoulou E, Nomikos T, Tsantila N, Mitropoulou A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Biological activity of total lipids from red and white wine and must. *J Agric Food Chem* 2001;49:5186-5193.
358. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Nomikos T, Demopoulos CA. Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1632:90-99.
359. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Pharmacol* 1959;37:911-917.
360. Barlett GR. *J Biol Chem* 1959;234:466.
361. Galanos DS, Kapoulas VM. *Biochim Biophys Acta* 1965;98:275.
362. Gutfinger T. *JAOCS* 1981;966-969.
363. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
364. Wang J, Kester M, Dum MJ. The effects of endotoxin on platelet-activating factor synthesis in cultured rat glomerular mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;969:217.

365. Bussolino F, Breviario F, Tetta C, Aglietta M, Mantovani A, Dejana E. Interleukin 1 stimulates platelet activating factor production in cultured human endothelial cells. *American Society for clinical investigation* 1986;77:2027-2033.
366. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 α . *Journal of Biochemical Chemistry* 1988;253(24):11856-11861.
367. Chen W, Chen A. In vitro effects of interleykins on human mesangial cells: implications for glomerulonephritis. *J Pathol* 1995;175(93):327-337.
368. Camussi G, Biancone L, Iorio E, Silvestro, L, Da Col R, Capasso C, Rossano F, Servillo L, Balestrieri C, Tufano MA. Porins and lipopolysaccharide stimulate platelet activating factor synthesis by human mesangial cells. *Kidney International* 1992;42(6):1309-1318.
369. Tselepis AD, Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet activating factor acetylhydrolase. *Atherosclerosis Supplements* 2002;3:57-68.
370. Demopoulos C, Karantonis C, Antonopoulou S. Platelet activating factor- a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003;105:705-716.
371. Φραγκοπούλου Ε. Μελέτη του μεταβολισμού και της δράσης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό και νεφρικά κύτταρα. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 2004.
372. Fragopoulou E, Iatrou C, Antonopoulou S, Ruan XZ, Fernando RL, Powis SH, Moorhead JF, Varghese Z. Platelet activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells. *J Lab Clin Med*, 2006.
373. Bussolino F, Arese M, Silvestro L, Soldi R, Benfenati E, Sanavio F, Aglietta M, Bosia A, Camussi G. Involvement of a serine protease in the synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α or interleukin-1 α . *European Journal of Immunology* 1994;24(12):3131-3139.
374. Kald B, Kald A, Ihse I, Tagesson C. Release of platelet-activating factor in acute experimental pancreatitis. *Pancreas* 1993;8(4):440-442.
375. Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kioka K, Kawada N, Kobayashi K, Yamamoto S. Effects of arachidonic acid metabolites and interleukin-1 on platelet activating factor

- production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1991;6(3):283-288.
376. Montruccio G, Alloatti G, Cammussi G. Role of platelet activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews* 2000;80(4):1669-1699.
 377. Fragopoulou E, Iatrou C, Demopoulos CA. Characterization of Acetyl-CoA:Lyso-PAF Acetyltransferase of human mesangial cells. *Mediators of Inflammation* 2005;5:263-272.
 378. Valone FH, Epstein LB. Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1- β , tumor necrosis factor, or IFN- γ . *Journal of Immunology* 1988;141(11):3945-3950.
 379. Rubin RM, Rosenbaum JT. A platelet-activating factor antagonist inhibits interleukin 1-induced inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988;154(1):429-436.
 380. Nomikos T, Iatrou C, Demopoulos CA. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue. *Eur J Biochem* 2003;270:2992-3000.
 381. Bussolino F, Breviario F, Tetta C. Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1986;77(6):2027-2033.
 382. Owen JS, Baker PRS, Flaherty JTO, Thomas MJ, Samuel MP, Wooten RE, Wykle RL. Stress-induced platelet activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1733:120-129.
 383. Baker PRS, Owen JS, Nixon AB, Thomas LN, Wooten R, Daniel LW, Flaherty JTO, Wykle RL. Regulation of platelet activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1592:175-184.
 384. Bernatchez PN, Allen BG, G  linas DS, Guillemette G, Sirois MG. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: Role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *British Journal of Pharmacology* 2001;134(6):1253-1262.
 385. Nixon AB, O'Flaherty JT, Salyer JK, Wykle RL. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(9): 5469-5473.
 386. Bussolino F, Arese M, Silvestro L, Soldi R, Benfenati E, Sanavio F, Aglietta M, Bosia A, Camussi G. Involvement of a serine protease in the synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α or interleukin-1 α . *European Journal of Immunology* 1994;24(12):3131-3139.

387. Camussi G, Biancone L, Iorio E, Silvestro, L, Da Col R, Capasso C, Rossano F, Servillo L, Balestrieri C, Tufano MA. Porins and lipopolysaccharide stimulate platelet activating factor synthesis by human mesangial cells. *Kidney International* 1992;42(6):1309-1318.
388. Snyder F. CDP-choline:alkylaketyl-glycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet activating factor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1348:111-116.
389. Bussolino F, Breviario F, Aglietta M, Savario F, Bosia A, Dejana E. Studies on the mechanism of interleukin-1 stimulation of platelet activating factor synthesis in human endothelial cells in culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987;927:43-54.
390. Νομικός TN. Μελέτη του μεταβολισμού του παράγοντα αναργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) σε ανθρώπινο νεφρό και της συμμετοχής του στην πρόκληση σπειραματονεφρίτιδας. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα 2002.
391. Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzzi F, Niero F, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radical Research* 2004;38(11):1241-1253.
392. Corps AN, Curry VA, Buttle DJ, Hazleman BL, Riley GP. Inhibition of interleukin-1 β -stimulated collagenase and stromelysin expression in human tendon fibroblasts by epigallocatechin gallate ester. *Matrix Biology* 2004;23(3):63-169.
393. Ahmed S, Wang N, Lalonde, M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Differentially Inhibits Interleukin-1 β -Induced Expression of Matrix Metalloproteinase-1 and -13 in Human Chondrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004;308(2):767-773.
394. Sugatani J, Fukazawa N, Ujihara K, Yoshinari K, Abe I, Noguchi H, Miwa M. Tea polyphenols inhibit acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycerol-3-phosphocholine acetyltransferase (a key enzyme in platelet-activating factor biosynthesis) and platelet-activating factor-induced platelet aggregation. *International Archives of Allergy and Immunology* 2004;134(1):17-28.
395. Balestrieri ML, Castaldo D, Balestrieri C, Quagliuolo L, Giovane A, Servillo L. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *Journal of Lipid Research* 2003;44(2):380-387.
396. Singh R, Ahmed S, Malesmud CJ, Goldberg VM, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits interleukin-1 β -induced activation of mitogen activated protein

- kinase subgroup c-Jun N-terminal kinase in human osteoarthritis chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research* 2003;21(1):102-109.
397. Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;33(8):1097-1105.
 398. Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 β -induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: Suppression of nuclear factor κ B activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor κ B. *Arthritis and Rheumatism* 2002;46(8):2079-2086.
 399. Bertelli A, Migliori M, Bertelli AAE, Origlia N, Filippi C, Panichi V, Falchi M, Giovannini L. Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 2002;28(1):11-15.
 400. Bertelli AAE, Migliori M, Panichi V, Longoni B, Origlia N, Ferretti A, Giuseppa Cuttano M, Giovannini L. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;957:295-301.
 401. Bielenberg J. Isoflavonoids from licorice root as mediators of anti-inflammatory and anti-allergic effects [Isoflavonoide als mediatoren anti-inflammatorischer und antiallergischer wirkungen der sußholzwurzel]. *Zeitschrift fur Phytotherapie* 2001;22(6):289-293.
 402. Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine* 2001;13(5):280-286.
 403. Gotto MA. Antioxidants, Statins, and Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1205–1210.
 404. Τσούπρας ΑΒ, Νομικός Τ, Φραγκοπούλου Ε, Αντωνοπούλου Σ, Ιατρού Χ, Δημόπουλος ΚΑ. Χαρακτηρισμός της ανεξάρτητης διθειοθρεϊτόλης φωσφοχολινوترansφοράσης σε κυτταρική σειρά μεσαγγειακών κυττάρων ανθρώπου. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Μάιος 2006.