ΑΠΟ ΤΗΝ Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Καθηγητής
ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΤΤΑΜΗΣ

Παραγωγή stress - πρωτεϊνών (hsp 70) στα φαγοκύτταρα του νεογνού

Από την

ΑΣΠΑΣΙΑ ΚΟΛΙΟΠΑΝΟΥ-ΓΟΥΡΔΟΥΠΑΡΗ

παιδίατρο

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 1999

Ημερομηνία ορισμού της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 12/1/1993

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Χρ. Καττάμης (Καθηγητής Παιδιατρικής)
2. Δ. Αναγνωστάκης (Αναπλ. Καθηγητής Παιδιατρικής)
3. Ε. Μάνδυλα (Επικ. Καθηγήτρια Παιδιατρικής)

Ημερομηνία κατάθεσης τελευταίας προόδου: 10/7/1998

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 22/10/1999

Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Χρ. Καττάμης (Καθηγητής)
2. Αικ. Μεταξωτού (Καθηγήτρια)
3. Γ. Πάγκαλης (Καθηγητής)
4. Δ. Καφετζής (Αναπλ. Καθηγητής)
5. Ε. Καναβάκης (Αναπλ. Καθηγητής)
6. Δ. Αναγνωστάκης (Αναπλ. Καθηγητής)
7. Ε. Μάνδυλα (Επικ. Καθηγήτρια)

Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος: Αντώνιος Κουτσελίνης

Η διατριβή έγινε αποδεκτή με το βαθμό: ΑΡΙΣΤΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 5

Α. Απάντηση των κυττάρων στο stress 5

Β. Λειτουργίες των πρωτεϊνών του θερμικού stress (hsp) 9

Γ. Σύνθεση των hsp 13

Δ. Ταξινόμηση των hsp 17
α. HSP70 17
β. HSP90 20
γ. HSP60 23
δ. HSP μικρού μοριακού βάρους (HSP27) 25

Ε. Ανάπτυξη θερμοαντοχής 27

Ζ. Ρόλος των hsp στη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. 35

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

– Απομόνωση πολυμορφοπυρήνων (ΠΜΠ) 44

– Σύνθεση HSP70 49
1. Επώαση ΠΜΠ 50
2. Απομόνωση και συλλογή των πρωτεϊνών των ΠΜΠ 50
3. Διαχωρισμός πρωτεϊνών (ηλεκτροφόρηση) 51
4. Ανίχνευση HSP70 με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (Western - blotting) 51

– Παραγωγή υπεροξειδίου (O_2^-) από τα ΠΜΠ. 52

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 55

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 67

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 77

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 79

ABSTRACT 83

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 85

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 104

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συχνότητα των νεογνικών λοιμώξεων, η βαρύτητα αυτών και η υψηλή θνητότητά τους έχουν οδηγήσει σε προσπάθειες διερεύνησης των αμυντικών μηχανισμών του νεογνού στη λοίμωξη[1].

Είναι γνωστό ότι στις μικροβιακές λοιμώξεις τα πολυμορφοπύρηνα (ΠΜΠ) παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στον παθογόνο μικροοργανισμό. Με την είσοδο των παθογόνων βακτηριδίων στον οργανισμό τα ΠΜΠ κινούνται προ το βακτηρίδιο (χημειοταξία), διέρχονται τα αγγεία και τους ιστούς (προσκόλληση στο ενδοθήλιο, διαπίδυση) και τελικά φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν τον μικροοργανισμό. Η μικροβιοκτονία των ΠΜΠ επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση ενζύμων από τα ειδικά κοκκία τους (αποκοκκίωση) και κυρίως με την παραγωγή ελευθέρων ριζών (O_2^-, H_2O_2, OH^-, HClOH, $^1O_2$) που παράγονται κατά τον οξειδωτικό μεταβολισμό των ΠΜΠ. Τα ΠΜΠ ενεργοποιούνται από διάφορους χημειοτακτικούς παράγοντες οι οποίοι αποτελούν είτε προϊόντα μεταβολισμού, απελευθέρωσης ή λύσης των βακτηριδίων [όπως το φορμυλοπεπτίδιο (FMLP), οι εξωτοξίνες, η ενδοτοξίνη των Gram (–) βακτηριδίων (LPS)], είτε προϊόντα της φλεγμονώδους αντίδρασης [όπως οι κυτταροκίνες (PAF, TNFa, IL_1, IL_2, IL_8), τα λευκοτριένια B_4 (LTB_4), το κλάσμα του συμπληρώματος C_{5a} κ.ά]. Έχει αποδειχθεί ότι προϊόντα βακτηριδίων όπως η ενδοτοξίνη των Gram (–) βακτηριδίων[2], ο TNFa[3] κ.ά. «πριμοδοτούν» τα ΠΜΠ τά οποία ανταποκρίνονται με αυξημένη παραγωγή O^-_2 στους παράγοντες που τα ενεργοποιούν. Αποτέλεσμα της «πριμοδότησης» και της ενεργοποίησης αυτής είναι η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2 και η αποτελεσματικότερη μικροβιοκτονία.

Έχει όμως βρεθεί ότι σε βαριές νεογνικές λοιμώξεις συχνά παρατηρείται καταστολή της λειτουργίας των ΠΜΠ και μειωμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2[4]. Η καταστολή αυτή πιθανολογείται ότι είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του stress στα ΠΜΠ. Σημειώνεται ότι για την επίδραση του stress στη λειτουργία των ΠΜΠ μεγάλη σημασία δίνεται σήμερα στη βιβλιογραφία.

Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα των διαφόρων οργανισμών όταν εκτίθενται σε διάφορες μορφές stress (υψηλή θερμοκρασία, ή αντίθετα υποθερμία, ανοξία, λοίμωξη, έκθεση σε βαρέα μέταλλα, άλλες τοξικές ουσίες κ.λπ.), υφίστανται ποικίλου βαθμού δομικές και λειτουργικές μεταβολές. Τα κύτταρα αντιδρούν στην επίδραση του stress με έναν κοινό αμυντικό μηχανισμό, ο οποίος ενεργοποιείται, πάντα

στο θερμικό shock» («heat shock response»)[5], επειδή μελετήθηκε περισσότερο μετά την επίδραση της θερμότητας. Ο αμυντικός αυτός μηχανισμός του κυττάρου αποσκοπεί όχι μόνο στο να προστατεύσει το κύτταρο από τη βλαπτική επίδραση του stress, να αποτρέψει τη λύση ή την απόπτωσή του και να αποκαταστήσει τη λειτουργία του, αλλά επί πλέον στο να το καταστήσει ανθεκτικό στην επίδραση ενός επόμενου, ισχυρότερου stress (φαινόμενο θερμοαντοχής). Έχει βρεθεί ότι η αντοχή των κυττάρων στους διαφόρους βλαπτικούς παράγοντες είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών, γνωστών ως «πρωτεΐνες του θερμικού stress» ή «heat shock proteins» (hsp).[5] Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εν τούτοις, παράγονται σε αυξημένο βαθμό σε συνθήκες stress.

Ο ρόλος των hsp στην κυτταρική λειτουργία είναι πολύ σημαντικός. Δρούν ως «μόρια-προστάτες» (molecular chaperons) των άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών, φροντίζοντας για τη διατήρηση της δομής τους, τη μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο ή/και την αποδόμησή τους. Σε συνθήκες stress του κυττάρου, όπου διακόπτεται η φυσιολογική πρωτεϊνοσύνθεση και παράγονται «παθολογικές» (μετουσιωμένες) πρωτεΐνες, οι hsp δεσμεύουν τις μετουσιωμένες αυτές πρωτεΐνες και ή τις αποκαθιστούν στη φυσιολογική τους δομή ή τις αποδομούν. Με αυτόν τον τρόπο οι hsp διατηρούν την ομαλή λειτουργία του κυττάρου και το καθιστούν ικανό να επιβιώνει και σε επόμενο, ισχυρότερο stress.

Οι hsp70, οι οποίες αποτελούν την κυριώτερη και πιο μελετημένη οικογένεια των hsp, παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην ικανότητα θερμοαντοχής του κυττάρου. Η σύνθεση των hsp70 και η λειτουργία τους έχουν μελετηθεί σε διάφορα κύτταρα του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Λίγες μελέτες αφορούν σε κύτταρα ενηλίκων ανθρώπων και ελάχιστες σε κύτταρα από περιφερικό αίμα. Δεν βρήκαμε μελέτη που να αφορά σε νεογνά. Και όμως τα νεογνά είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένα σε συνθήκες stress (λοιμώξεις, περιγεννητική υποξία, οξέωση κ.λπ.), καταστάσεις οι οποίες όπως ήδη αναφέρθηκε έχουν σοβαρή επίπτωση στο νεογνικό οργανισμό.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε αν τα ΠΜΠ των νεογνών συνθέτουν hsp70, δηλ. αν διαθέτουν αυτόν τον προστατευτικό μηχανισμό των κυττάρων και να μελετήσουμε εάν η σύνθεση αυτή των hsp70 δύναται να προστατεύσει τη λειτουργικότητα των νεογνικών ΠΜΠ σε συνθήκες stress, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η σήψη και η περιγεννητική υποξία.

Αισθάνομαι το χρέος να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου κ. Χρ. Καττάμη για τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση αυτής της μελέτης.
Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αντ. Αγαθόπουλο για τη συμπαράστασή του και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής αυτής.
Ευχαριστώ πολύ το Νοσηλευτικό προσωπικό του τμήματος Νεογνών της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία» για τη συνεργασία του και την προσφορά του στη συλλογή του υλικού της διατριβής αυτής.
Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή μου κ. Δ. Αναγνωστάκη, ο οποίος με τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την εποικοδομητική κριτική του συνέβαλε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.
Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ελένη Μάνδυλα η οποία μου συμπαραστάθηκε και με πολλή υπομονή εργάστηκε μαζί μου και με καθοδήγησε στην εκτέλεση της ερευνητικής αυτής δουλειάς.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ STRESS

Ολοι οι ζωντανοί οργανισμοί βρίσκονται εκτεθειμένοι σε διάφορες περιβαλλοντικές μεταβολές, οι οποίες είναι δυνατόν να έχουν δυσμενή επίδραση στην ακεραιότητα των διαφόρων λειτουργιών τους και ως εκ τούτου στην επιβίωσή τους.

Η κατανόηση των μηχανισμών που έχουν αναπτύξει τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και των άλλων ζωντανών οργανισμών για να προστατευτούν από τη δυσμενή επίδραση του stress έχει απασχολήσει επί μακρόν τους ερευνητές. Περισσότερο από κάθε άλλη μορφή stress έχει μελετηθεί η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας (θερμικό stress) στους οργανισμούς.

Η πρώτη παρατήρηση σχετικά με την επίδραση του θερμικού stress στο κύτταρο αναφέρεται από τον Ferrucio Ritossa, το 1962, ο οποίος σε πειράματα σε ένα έντομο, τη Drosophila, διαπίστωσε μεταβολές στους βρόχους των πολυταινικών χρωμοσωμάτων (puffs) στους σιελογόνους αδένες του εντόμου μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία[6]. Τη δεκαετία που ακολούθησε έγιναν μελέτες και σε άλλους οργανισμούς και υπό την επίδραση διαφόρων ειδών stress (κυρίως χημικών) διαπιστώθηκαν ίδιες αλλοιώσεις στα χρωμοσώματα. Το 1973 οι Tissières και Mitchell συνέδεσαν την ύπαρξη αυτών των μεταβολών στα χρωμοσώματα της Drosophila μετά από έκθεση σε θερμικό stress με τη σύνθεση νέων ειδικών mRNA και ειδικής ομάδος νέων πρωτεϊνών οι οποίες ονομάστηκαν πρωτεΐνες του θερμικού stress ή θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες [heat shock proteins (hsp)][7]. Έκτοτε η σύνθεση hsp διαπιστώθηκε και μελετήθηκε σε πολλούς οργανισμούς του φυτικού και ζωϊκού βασιλείου στα θηλαστικά και τον άνθρωπο[7,8].

Σήμερα είναι γνωστόν ότι τα κύτταρα παράγουν τις πρωτεΐνες αυτές όχι μόνο μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία (2°-3°C πάνω της φυσιολογικής θερμοκρασίας των οργανισμών), αλλά και σε άλλου είδους stress, όπως μετά έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ιούς, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ορισμένες κυτταροκίνες, μέταλλα κ.ά.[9-12].

Κατά την επίδραση ενός θερμικού ή άλλου είδους stress παρατηρείται διαταραχή των κυριωτέρων λειτουργιών του κυττάρου, αναστολή διαφόρων βιοσυνθετικών οδών, ως και επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του κυττάρου,

ώστε αυτό να διατηρήσει την ικανότητά του να αναρρώσει και να επιστρέψει στη φυσιολογική μεταβολική του κατάσταση. Οι διαταραχές των λειτουργιών του κυττάρου εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου[13] που υφίσταται το stress, είναι ανάλογες με τη διάρκεια και την ένταση του stress[14] και είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε απόπτωση ή λύση του κυττάρου. Ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του κυττάρου έχει ως κύρια χαρακτηριστικά την αναστολή της φυσιολογικής πρωτεϊνοσύνθεσης και τη σύνθεση των hsp. Το σύνολο των μεταβολών του κυττάρου που συνιστούν την απάντηση στο stress αποκαλείται «απάντηση στο θερμικό stress» (heat shock response) και στην «απάντηση» αυτή οι hsp παίζουν σημαντικώτατο ρόλο.

Τα κυτταρικά στοιχεία που επηρεάζονται περισσότερο από την επίδραση του stress είναι το DNA και οι πρωτεΐνες [15,16]. Η δομή του DNA διαταράσσεται και ο διπλασιασμός του διακόπτεται. Η χρωματίνη συμπυκνώνεται και οι ιστόνες αλλοιώνονται χημικά και φωσφορυλιώνονται όπως συμβαίνει σε πρώϊμα στάδια της μίτωσης. Η σύνθεση του RNA συνεχίζεται, αλλά η εξέλιξη σε ριβοσωματικό RNA (rRNA), μεταφορικό RNA (tRNA) και ώριμο RNA (mRNA) δεν ολοκληρώνεται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι πυρηνικές πρόδρομες μορφές των mRNA (pre-mRNA ή Sn-mRNA) απαλλάσσονται από τις μη μεταφράσιμες σε πρωτεΐνες περιοχές, τα ιντρόνια, με τη διαδικασία της αποκοπής και επανασυγκόλλησης (splicing) και ακολούθως μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, όπου ως ώριμα mRNA μεταφράζονται στα ριβοσώματα σε πρωτεΐνες . Υπό την επίδραση του stress, ο μηχανισμός του splicing διακόπτεται ή καταστρέφεται οριστικά για τα συγκεκριμένα mRNA[17]. Οι πρόδρομες μορφές των mRNA που δεν έχουν απαλλαγεί από τα ιντρόνια όταν εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα μεταφράζονται σε βλαπτικές για το κύτταρο πρωτεΐνες . Οι γόνοι που εκφράζουν τις hsp στερούνται ιντρονίων και ως εκ τούτου δεν απαιτείται splicing των pre-mRNA για να μεταφραστούν. Έτσι σε συνθήκες stress, ενώ η μετάφραση των γόνων σε φυσιολογικές πρωτεΐνες αναστέλλεται, οι γόνοι των hsp μεταφράζονται κανονικά σε hsp[17].

Στα κύτταρα που υφίστανται το stress διαπιστώνονται σημαντικές μορφολογικές αλλοιώσεις[15]. Η πυρηνική μεμβράνη γίνεται πιο διαθλαστική και σε ισχυρό stress ινίδια ακτίνης ανιχνεύονται μέσα στον πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα, το δίκτυο των ενδιάμεσων ινιδίων (intramedial filament, IFs), πολύ ευαίσθητο στο stress, συμπυκνώνεται σε ανόργανη μάζα γύρω από την πυρηνική μεμβράνη[18,19].

Παράλληλα τα επιμήκη σωληνάρια των μιτοχονδρίων θρυμματίζονται και αθροίζονται γύρω από τον πυρήνα όπου φαίνονται σαν άμορφη και χωρίς δομή μεμβράνη (σαν "blobs"). Το δίκτυο των μικροινιδίων μεταβάλλεται και δεσμίδες ινιδίων ακτίνης σχηματίζονται μετά από την επίδραση ισχυρού stress[20-22]. Το σύστημα των μικροσωληναρίων (ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi), που αποτελεί την «απεκκριτική μηχανή» του κυττάρου, δεν επηρεάζεται δομικά και λειτουργικά παρά μόνο σε ισχυρό stress. Παρομοίως, συστατικά των ενδοκυτταρίων οδών μετάδοσης του σήματος φαίνεται ότι δεν είναι πολύ ευαίσθητα στο stress, όπως διαπιστώνεται από τις μικρές μεταβολές που υφίστανται τα επίπεδα των Inositol-Tris phosphate, Ca, PH ή ATP, διαταράσσονται δε μόνο σε ισχυρό stress.

Επί πλέον, είναι γνωστό ότι το θερμικό ή άλλου είδους stress προκαλεί διαταραχή στη δομή των πρωτεϊνών. Οι μετουσιωμένες (denatured) και αποδομημένες (misfolded or malfolded) από το stress πρωτεΐνες αθροίζονται και συγκολλώνται (aggregation, σχηματισμός «inclusion bodies») με αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας του κυττάρου[15]. Η απώλεια της δομικής ακεραιότητας των διαφόρων κυτταρικών στοιχείων που αναφέρθηκαν παραπάνω (μεταβολές DNA, RNA, κυτταροσκελετού, μιτοχονδρίων κλπ), έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργικής ακεραιότητας του κυττάρου με κοινό παρονομαστή όλων αυτών των διαταραχών τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η σύνθεση των hsp παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της μη ανατρέψιμης μετουσίωσης των πρωτεϊνών και στην αποτροπή της συσσώρευσης αυτών των μετουσιωμένων και αποδομημένων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο οι hsp συμβάλλουν ενεργά στον μηχανισμό της σταθεροποίησης των πρωτεϊνών του κυττάρου.

Β. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ HSP

Μολονότι, όπως ήδη αναφέρθηκε, οι hsp δεν παράγονται μόνο κατά το θερμικό stress, ο όρος «heat shock proteins» θεωρείται πλέον δόκιμος από τον όρο «stress-proteins», διότι οι hsp δεν είναι οι μοναδικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται όταν το κύτταρο υφίσταται κάποιο stress. Είναι γνωστό ότι κατά το stress ενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε μεταβολικές λειτουργίες που προσβάλλονται από το stress. Τέτοια ένζυμα είναι ορισμένα γλυκολυτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή ATP, ένζυμα του συστήματος πρωτεόλυσης της ubiquitin, ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση [και κυρίως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)], η οξυγενάση της αίμης κ.α.[15].

Οι hsp ταξινομούνται σε οικογένειες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος που εκφράζεται σε kiloDaltons (kDa), όπως αυτό καθορίζεται σε κάθετη ηλεκτροφόρηση με SDS gel. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί και μελετηθεί περίπου 50 hsp. Οι κυριώτερες είναι αυτές με μοριακό βάρος 20-30kDa, 60-70kDa, 80-100kDa.

Ο κύριος ρόλος των hsp είναι να «φροντίζουν» τις άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Για το ρόλο τους αυτόν ονομάζονται και «μόρια-προστάτες» («molecular chaperons» or «house- keeping»)[23-26]. Είναι γνωστό ότι η σωστή λειτουργία και βιωσιμότητα κάθε κυττάρου εξαρτάται απόλυτα από την ακεραιότητα της δομής των πρωτεϊνών του. Η κύρια λειτουργία των «molecular chaperons» είναι να σταθεροποιηθούν τα πεπτίδια έτσι ώστε να αποτρέπεται η σύνθεση και η συνάθροιση παθολογικών πρωτεϊνών και να επιδιορθώνουν τις μετουσιωμένες από το stress πρωτεΐνες , έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου[23-29]. Το ρόλο τους αυτόν οι hsp πραγματοποιούν τόσο σε συνθήκες ηρεμίας όσο και σε συνθήκες stress του κυττάρου.

Οι hsp που παράγονται σε φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου αναφέρονται ως «δομικές» (heat shock cognates or constitutively expressed)[23]. Οι δομικές αυτές hsp συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της πρωτεϊνικής βιογένεσης (πρωτεϊνοσύνθεση, μεταφορά των πρωτεϊνών δια μέσου των μεμβρανών στα διάφορα μέρη του κυττάρου και αποδόμηση αυτών). Είναι γνωστό ότι κατά την πρωτεϊνοσύνθεση οι πρωτεΐνες παροδικά βρίσκονται σε μη πλήρως αναδιπλωμένη (unfolded) μορφή, οπότε εκτίθενται στην επιφάνειά τους υδρόφοβες περιοχές. Οι υδρόφοβες

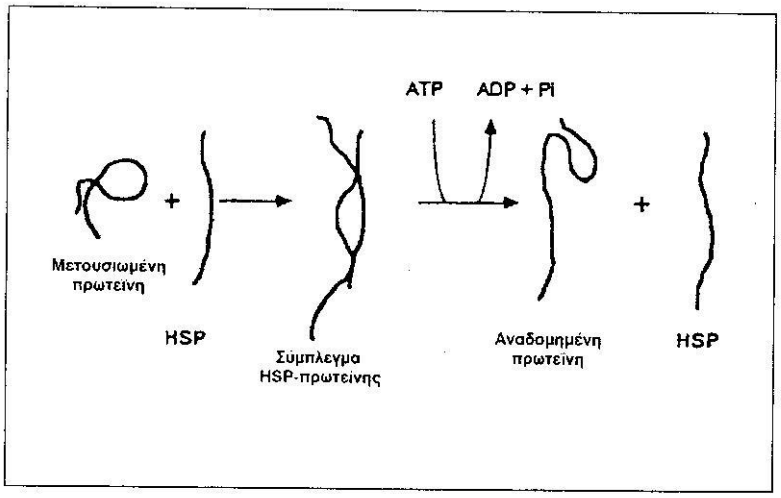
αυτές περιοχές, όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε πλήρη λειτουργική δομή δηλ. στη τεταρτοταγή της δομή, είναι αναδιπλωμένες μέσα στο μόριο της πρωτεΐνης[30,31]. Σημειώνεται ότι οι υδρόφοβες αυτές περιοχές είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα τη συνάθροιση και συγκόλληση των πρωτεϊνών και την αναστολή της λειτουργίας του κυττάρου. Οι hsp συνδέονται παροδικά με τις φυσιολογικές πρωτεΐνες του κυττάρου μέσω του καρβοξυλικού τους άκρου, ενώ το άλλο άκρο τους, που φέρει αμινοομάδα, συνδέεται με ATP. Η σύνδεση των δομικών hsp με τις «εν τω γεννάσθαι» πρωτεΐνες εμποδίζει ακατάλληλες για το κύτταρο συναθροίσεις και διευκολύνει την απόκτηση πλήρους τεταρτοταγούς λειτουργικής δομής[32].

Μία άλλη επίσης σημαντική λειτουργία των δομικών hsp είναι η μεταφορά των πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε διάφορα μέρη του κυττάρου, όπως μέσα στο κυτταρόπλασμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρήνα[33]. Για να γίνει εφικτή η μεταφορά αυτή πρέπει οι μεταφερόμενες πρωτεΐνες να μην βρίσκονται σε πλήρη αναδιπλωμένη δομή, ώστε να «μπορούν να περάσουν» από τις μεμβράνες του κυττάρου. Ρόλος των δομικών hsp είναι να συνδέονται με τις ατελώς δομημένες, μη λειτουργικές μορφές των πρωτεϊνών και να τις μεταφέρουν δια μέσου των μεμβρανών σε θέσεις λειτουργικές όπου και θα αποκτήσουν την πλήρη αρχιτεκτονική λειτουργική τους δομή. Εφ' όσον οι δομικές hsp επιτελέσουν αυτό το ρόλο τους αποδεσμεύονται από τις πρωτεΐνες. Για την αποδέσμευσή τους αυτή απαιτείται ATP-υδρόλυση.

Τέλος, ένας άλλος ρόλος που αποδίδεται στις δομικές hsp είναι η συμβολή τους στην αποδόμηση των πρωτεϊνών. Στον κύκλο ζωής των πρωτεϊνών υπάρχουν δύο επιλογές: οι πρωτεΐνες ή θα είναι πλήρως δομημένα λειτουργικά στοιχεία, ή θα διασπαστούν και θα αποβληθούν ως περιττές από το κύτταρο. Εάν οι δομικές hsp αποτύχουν να διατηρήσουν την πλήρη αρχιτεκτονική δομή μιας πρωτεΐνης τότε αυτές συμβάλλουν στη διάσπαση της πρωτεΐνης αυτής μέσω του πρωτεολυτικού συστήματος του κυττάρου[34]. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι δομικές hsp συνοδεύουν και φροντίζουν τις πρωτεΐνες του κυττάρου από τη γέννησή τους μέχρι το «θάνατό» τους.

Η λειτουργία των hsp σε συνθήκες stress αποτελεί κατά κάποιο τρόπο προέκταση της λειτουργίας τους υπό φυσιολογικές συνθήκες. Σε συνθήκες stress (υψηλής θερμοκρασίας ή άλλου είδους stress) οι πρωτεΐνες του κυττάρου μετου-

σιώνονται, χάνουν τη τεταρτοταγή δομή τους συναθροίζονται και καθιζάνουν. Η άθροιση των ανωμάλων πρωτεϊνών πυροδοτεί την επί πλέον παραγωγή hsp οι οποίες συνδέονται με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες , αποτρέπουν τη συγκόλληση και καθίζησή τους και συμβάλλουν στην ανάκτηση της τεταρτοταγούς δομής τους. (σχ. 1) Εάν οι hsp αποτύχουν σ' αυτό το ρόλο τους σε συνεργασία με το σύστημα των πρωτεασών συμβάλλουν στην αποδόμηση των μετουσιωμένων, τοξικών για το κύτταρο, πρωτεϊνών[24,34].

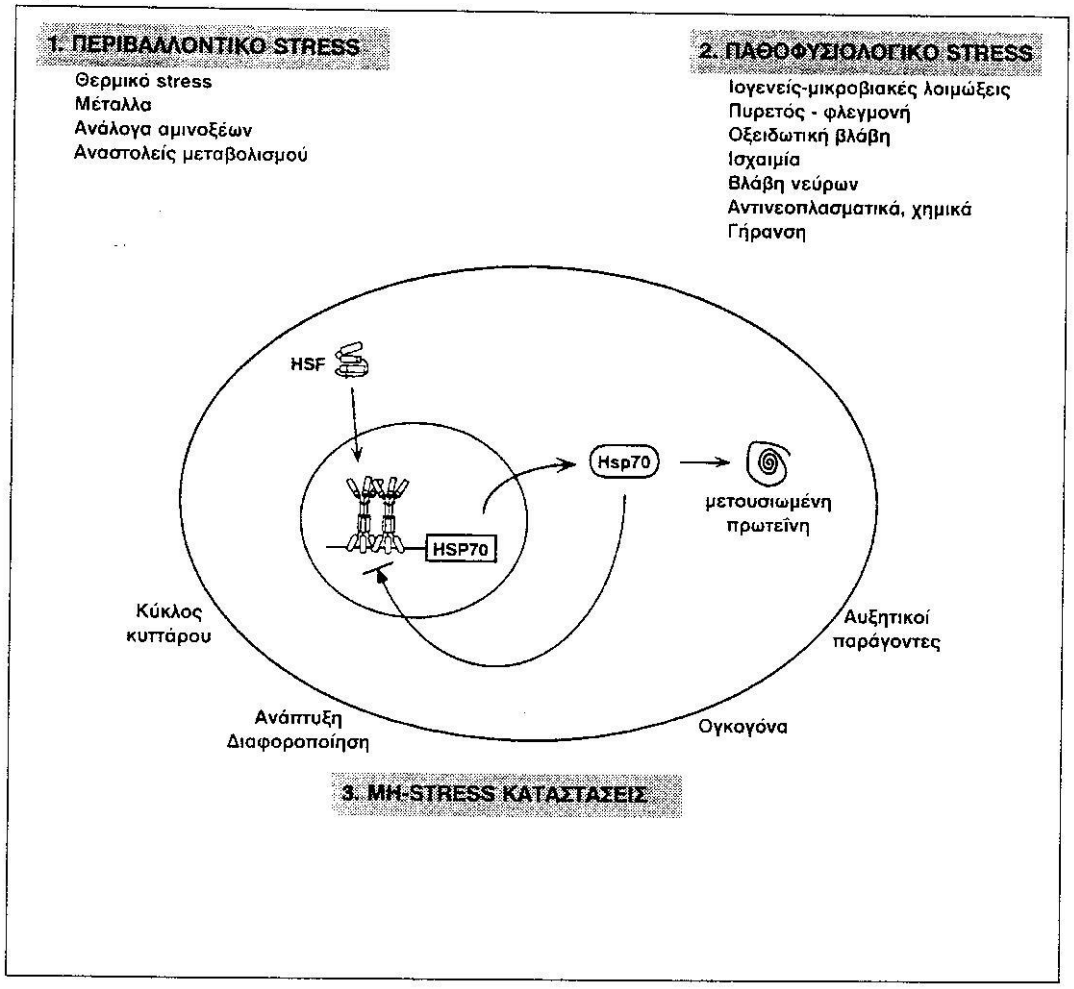


Σχήμα 1. *Οι hsp δεσμεύουν τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες και αποκαθιστούν τη δομή τους.*

Γ. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ HSP

Ο μηχανισμός επαγωγής των γόνων που παράγουν τις hsp είναι παρόμοιος στα διάφορα είδη των οργανισμών (από τη Drosophila, όπου έχουν γίνει πολλές μελέτες, έως και τον ανθρώπινο οργανισμό) και φαίνεται ότι έχει συντηρηθεί κατά την εξέλιξη των ειδών[35,36].

Οι συνθήκες που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των γόνων των hsp φαίνονται στο σχ. (2). Η επίδραση του περιβαλλοντικού stress (υψηλή θερμοκρασία, έκθεση



Σχήμα 2. *Συνθήκες που επάγουν την έκφραση των HS γόνων. Παρουσιάζονται τρεις ομάδες κυτταρικού stress και αντιπροσωπευτικά παραδείγματα καταστάσεων σε κάθε ομάδα που επάγουν την έκφραση του HS γόνου. Στο διάγραμμα φαίνεται η ενεργοποίηση του HSF ως απάντηση στις διάφορες stress καταστάσεις με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των HSP70.*

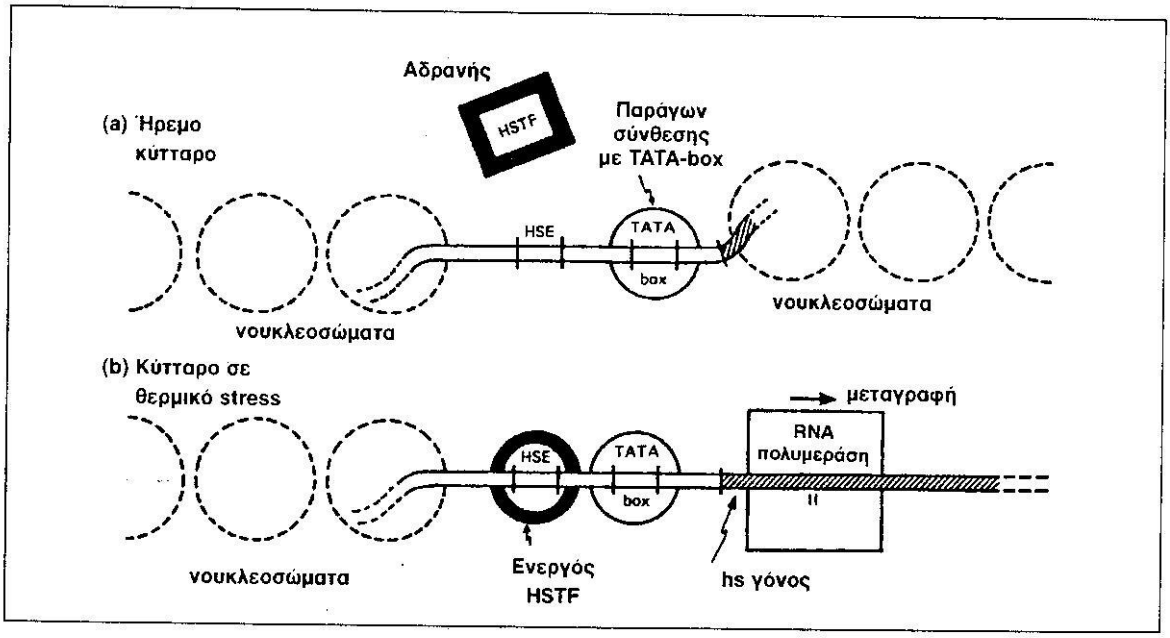
σε μέταλλα κ.λ.π.) στην παραγωγή hsp έχει μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλο stress (λοιμώξεις, υποξία κ.λ.π.). Έχει βρεθεί ότι το stress προκαλεί αυξημένα επίπεδα μετουσιωμένων πρωτεϊνών οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν αυξημένη σύνθεση hsp[37-39]. Ειδικότερα, η αυξημένη θερμοκρασία έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την απώλεια της τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και την παρουσία μη πλήρως δομημένων πρωτεϊνών. Πρέπει να σημειωθεί ότι με την πρόοδο της έρευνας όλο και περισσότερες καταστάσεις περιλαμβάνονται σ' αυτό που ονομάζεται παθοφυσιολογικό stress (βλ. σχ. 2), και που περιλαμβάνει ιογενείς και μικροβιακές λοιμώξεις, οξειδωτική βλάβη, ισχαιμία κ.ά. Τέλος, η επαγωγή της σύνθεσης των hsp ρυθμίζεται κατά την αύξηση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κυττάρου καθώς επίσης και από διάφορα ογκογόνα[9].

Οι γόνοι που είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση των hsp έχουν χαρτογραφηθεί και είναι ευρέως κατανεμημένοι μέσα στο γένωμα, στα χρωμοσώματα 1, 5, 6, 14, 21. Στα κύτταρα του ανθρώπου η ρύθμιση της μεταγραφής αυτών των γόνων προϋποθέτει την ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης γνωστής ως «heat shock transcriptional factor» (hstf ή hsf)[40-42]. Η hsf αναγνωρίζει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA η οποία ονομάζεται «heat shock element» (hse) και εντοπίζεται σε απόσταση 20 νουκλεοτιδίων προς την αντίθετη κατεύθυνση της μεταγραφής των γόνων και του TATA box[34]. Το hse και το TATA box είναι ειδικές θέσεις του DNA που δρουν ως υποκινητές της μεταγραφής των hs γόνων και διαθέτουν ικανότητα σύνδεσης με ειδικές πρωτεΐνες [43]. Σε συνθήκες ηρεμίας μόνο το TATA box είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνη και η hsf βρίσκεται σε μονομερή ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Σε συνθήκες stress (όπως η αυξημένη θερμοκρασία) η hsf αθροίζεται σε τριμερή μορφή μέσα στον πυρήνα και συνδέεται ως ενεργός μορφή με το hse. Η σύνδεση αυτή επιτρέπει τη μεταγραφή των γόνων των hsp με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης II (σχ. (3).

Πρόσφατα έχουν κλωνοποιηθεί οι γόνοι των hsf σε διάφορα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί οικογένεια hsf με 3 τουλάχιστον μέλη (hsf_1, hsf_2, hsf_3) με ιδιαίτερα λειτουργικά χαρακτηριστικά η καθεμία. Έχει βρεθεί ότι η hsf_1 ενεργοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, μετά από έκθεση σε βαρέα μέταλλα και σε οξειδωτικό stress, η hsf_2 ενεργοποιείται κατά την εμβρυογένεση και τη σπερματογένεση, ενώ η hsf_3 ενεργοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία.

Ο μηχανισμός με τον οποίον ενεργοποιείται η hsf δεν είναι απόλυτα γνωστός.

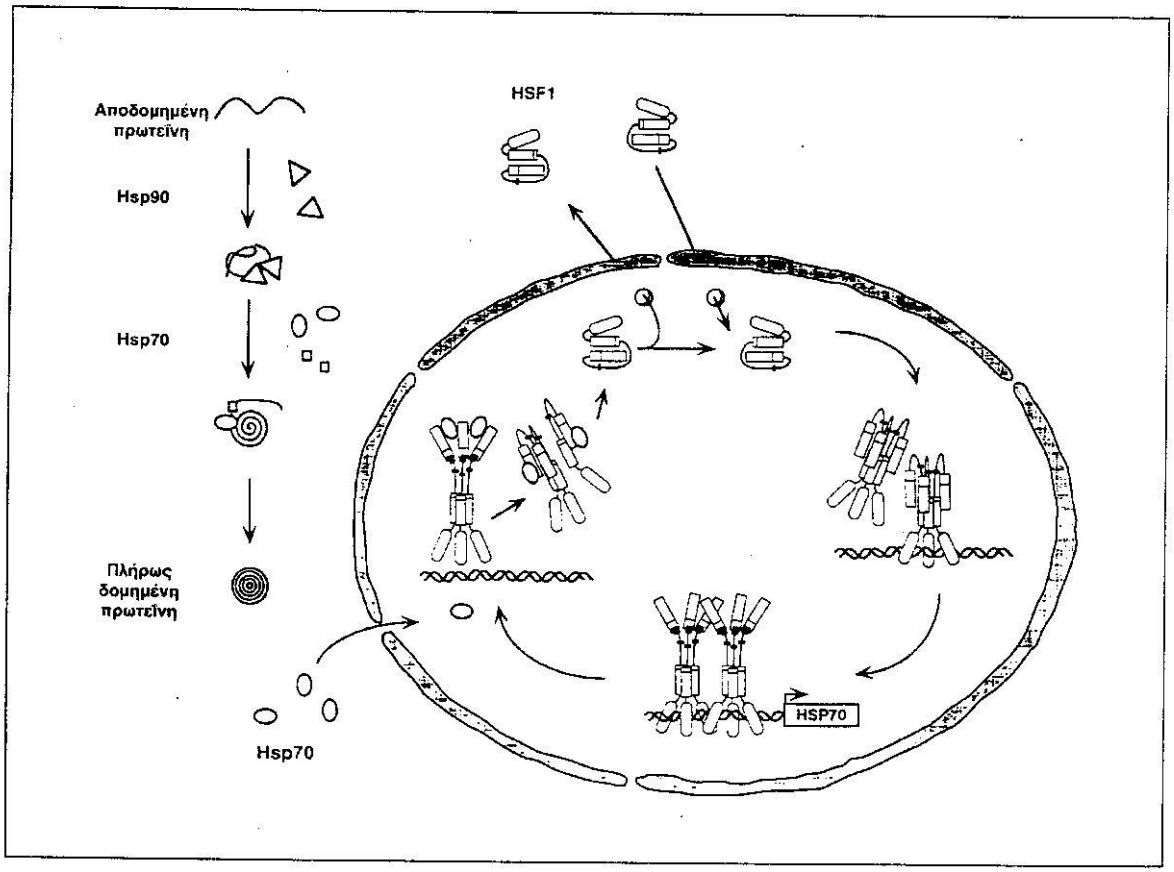
Η επικρατέστερη άποψη είναι ότι η συσσώρευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών αποτελεί το ερέθισμα για την ενεργοποίηση της hsf[37,44]. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει κάποιο μόριο που έχει την ικανότητα να «αντιλαμβάνεται» τα αυξημένα επίπεδα των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και να μεταφέρει αυτή την πληροφορία στην hsf.



Σχήμα 3. *Μηχανισμός ενεργοποίησης των hsγόνων από τις HSTF (HSF). Στο ήρεμο κύτταρο το TATA box είναι συνδεδεμένο με ειδικό παράγοντα (TATA box binding factor), ενώ το hse είναι ελεύθερο. Κατά το θερμικό stress ειδικές δομικές αλλαγές της HSTF επιτρέπουν τη σύνδεσή της με το HSE και έτσι αρχίζει η μεταγραφή του hs γόνου από την RNA πολυμεράση II*

Σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία η hsf είναι συνδεδεμένη με τις hsp. Οταν τα κύτταρα υποστούν stress παράγονται μετουσιωμένες πρωτεΐνες οι οποίες ανταγωνίζονται τη hsf στη σύνδεσή της με τις hsp. Τα επίπεδα των ελεύθερων hsp μειώνονται διότι συνδέονται με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κλάσμα της μη συνδεδεμένης hsf να αυξάνεται και συγχρόνως αυξάνεται η πιθανότητα σύνθεσης ενεργούς μορφής hsf. Με την ενεργοποίηση της hsf δραστηριοποιείται και το hse με αποτέλεσμα την έκφραση του hs γόνου και τη σύνθεση των hsp[45-47]. Όταν τα επίπεδα των μετουσιωμένων πρωτεϊνών μειωθούν, είτε διότι οι πρωτεΐνες με τη βοήθεια των hsp επανέρχονται στη φυσιολογική τεταρτοταγή δομή τους, είτε διότι υφίστανται πρωτεόλυση, τα επίπεδα των ελεύ-

θερων hsp αυξάνονται και έτσι οι hsp είναι πλέον διαθέσιμες να συνδεθούν με τη hsf η οποία μεταπίπτει σε ανενεργή μονομερή μορφή (σχ. 4)[39].



Σχήμα 4. *Ο κύκλος της HSF. Μοντέλο ρύθμισης της ενεργοποίησης της HSF_1 στο stress-κύτταρο. Τα αυξημένα επίπεδα των αποδομημένων από το stress πρωτεϊνών απαιτούν HSP70 κι άλλες hsp για την ορθή αναδόμησής τους. Έτσι απελευθερώνεται HSF_1 από το σύμπλεγμα της με τις HSP70 η οποία εισέρχεται στον πυρήνα, και ως τριμερές ενεργοποιείται. Δύο τριμερή μόρια HSF1 συνδέονται με το HSE του γόνου των HSP70 και έτσι ενεργοποιείται η μεταγραφή του γόνου των HSP70. Με την πάροδο του stress και με την αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων HSP70 οι HSF μεταπίπτουν σε μονομερή ανενεργή μορφή στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα και συνδέονται εκ νέου με τις HSP.*

Δ. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ HSP

Οι hsp παρουσιάζουν πολλά κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Για την καλύτερη μελέτη τους ταξινομούνται σε οικογένειες ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Από τις σπουδαιότερες οικογένειες είναι η οικογένεια των hsp70 στην οποία κυρίως επικεντρώνεται η μελέτη αυτή, οι οικογένειες των hsp90, των hsp60 και των μικρού μοριακού βάρους hsp.

HSP70

Η οικογένεια των hsp70 είναι η σπουδαιότερη λειτουργικά ομάδα των hsp και η πλέον μελετημένη σε όλα τα είδη των οργανισμών[48,49]. Αποτελείται από 4 κύρια μέλη:

α) την hsp70 η οποία αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη που συντίθεται στο κύτταρο σε μεγάλα ποσά υπό την επίδραση stress και μόνο σε μικρή ποσότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες.

β) την hsp72 η οποία συντίθεται μόνο μετά από έκθεση των κυττάρων σε stress.

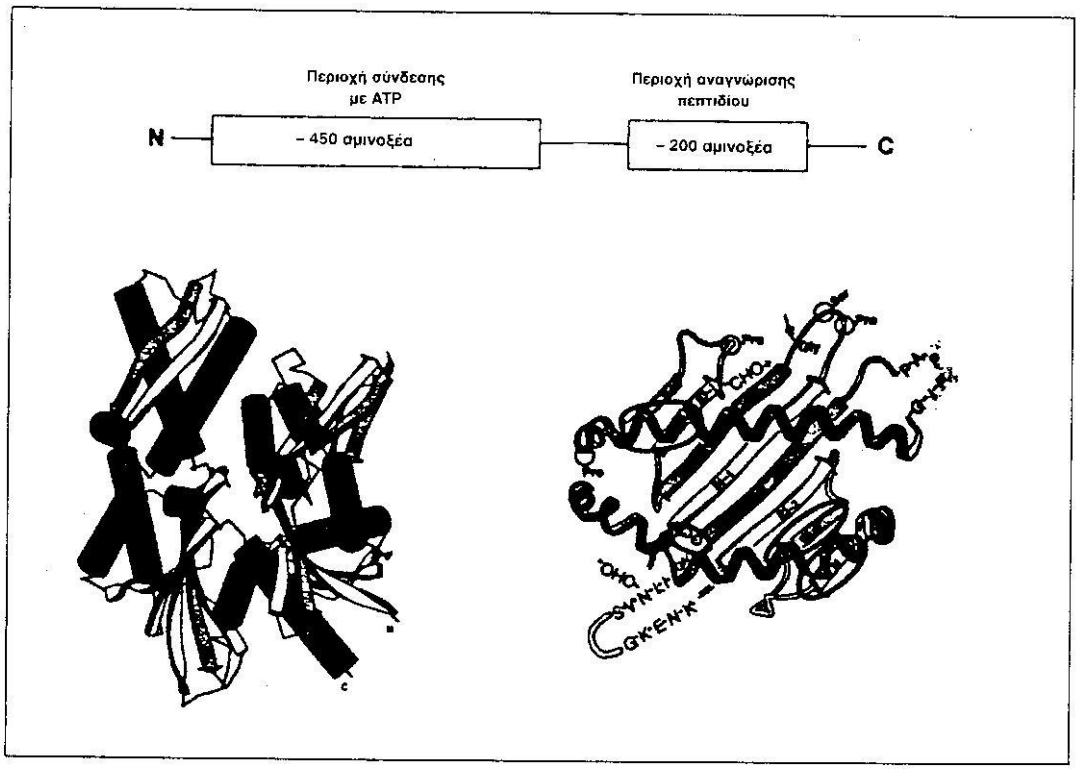
γ) την hsc73 η οποία εκφράζεται κυρίως σε φυσιολογικές συνθήκες και της οποίας η σύνθεση πολύ λίγο επηρεάζεται από το stress.

και δ) την grp78 ή hsp80 ή BIP (glycose-regulated protein) η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου, εκφράζεται σταθερά υπό φυσιολογικές συνθήκες και η σύνθεσή της αυξάνεται σε έλλειψη γλυκόζης[50,51].

Στην παρούσα μελέτη ο όρος hsp70 αναφέρεται μόνο στο μέλος hsp70 της οικογένειας των hsp70. Οι hsp70 στους διάφορους οργανισμούς παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες μεταξύ τους τόσο όσον αφορά στη δομή τους όσο και στη λειτουργία τους.

Όσον αφορά στη δομή τους, οι hsp70 φέρουν στο ένα άκρο τους μία αμινοομάδα η οποία συνδέεται με ATP και στο άλλο άκρο τους μια καρβοξυλοομάδα που συνδέεται με πεπτίδια (σχ.5). Οι hsp70 συνδέονται με ισχυρό δεσμό με ATP, ενώ παρουσιάζουν ασθενή δραστηριότητα ATPάσης όταν συνδεθούν με πεπτίδια και πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μη πλήρως αναδιπλωμένη μορφή[52,53]. Η σύνδεση και απελευθέρωση των πεπτιδίων με τις hsp70 γίνονται μέσω σύνδεσης και υδρόλυσης με ATP. Αυτή η ικανότητα των hsp70 να υφίστανται συνεχώς κύκλους σύνδεσης και απελευθέρωσης με τις υδρόφοβες περιοχές των εν μέρει αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, καθορίζει το ρόλο τους σε πολλές ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου[2],

όπως στην πρωτεϊνοσύνθεση, στη συναρμολόγηση και οργάνωση των πρωτεϊνών[54-57], στη μεταφορά τους[56,58] σε διάφορες λειτουργικές θέσεις ή/και στην ενδοκυττάρια πρωτεόλυση αυτών[59-61].



Σχήμα 5. *Η δομή της HSP70 αποτελείται από δύο κύρια τμήματα. Το ένα άκρο φέρει μία αμινοομάδα και συνδέεται με ATP και το άλλο άκρο που φέρει μία καρβοξυλοομάδα συνδέεται με πεπτίδια.*

Οι hsp70 είναι οι κυριώτερες από τις hsp που ασκούν προστατευτική («chaperoning» ή «house-keeping») δράση στα πεπτίδια. Συνδέονται με τις υδρόφοβες περιοχές των εν μέρει αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οι οποίες είναι είτε νεαρά πεπτίδια[62], είτε πρωτεΐνες που έχουν μετουσιωθεί ή αποδιαταχθεί από την επίδραση στρεσσογόνου ερεθίσματος[63,64]. Η σύνδεση αυτή αποτρέπει τη συσσώρευση και καθίζηση αδιάλυτων συμπλεγμάτων τα οποία θα έβλαπταν το κύτταρο[65]. Με τον ίδιο μηχανισμό οι hsp70 επιτυγχάνουν την «επιδιόρθωση» των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και τη συγκρότηση (assembly) των νεαρών και ατελώς δομημένων πεπτιδίων σε πλήρως δομημένες (τεταρτοταγείς) λειτουργικές πρωτεΐνες[55,56].

Οταν το κύτταρο βρίσκεται σε συνθήκες stress, οι hsp70 συγκεντρώνονται

στον πυρήνα[67], ενώ πολύ μικρή ποσότητα αυτών παραμένει μέσα στο κυτταρόπλασμα. Μετά την πάροδο του stress οι hsp70 επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα[68-70], ενώ επανέρχονται στον πυρήνα «δριμύτερες» σε ένα δεύτερο ισχυρότερο stress. Η συγκέντρωση των hsp70 μέσα στον πυρήνα είναι ανάλογη της έντασης του stress και φαίνεται ότι έχει σπουδαία λειτουργική σημασία[67].

Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι υπό την επίδραση ενός θερμικού stress η δομή του πυρήνα υφίσταται σημαντικές μεταβολές[15,19]. Ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες παρατηρείται διάχυτη κατανομή του DNA μέσα στον πυρήνα, σε συνθήκες stress το πυρηνικό DNA και η RNA πολυμεράση I συγκεντρώνονται στο εσωτερικό του πυρήνα και αποτελούν το πυκνό ινώδες συστατικό του πυρήνα (dense fibrillar component, DFC), το οποίο περιβάλλεται από μια λιγώτερη πυκνή, κοκκιώδη περιοχή (granular component, GC). Η κατανομή της hsp70 μέσα στον πυρήνα είναι πολύ συγκεκριμένη και περιορίζεται στη DFC περιοχή, δηλ. εκεί ακριβώς όπου εντοπίζονται τα πυρηνικά DNA, η RNA πολυμεράση I και η παραμένουσα μεταγραφική δραστηριότητα κατά το θερμικό stress. Η hsp70 και η RNA πολυμεράση I φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως μικρά στρογγυλά νησίδια μέσα στη DFC.

Από αυτές και άλλες παρατηρήσεις σε πρόσφατες μελέτες[67,71] συμπεραίνεται ότι οι hsp70 δρουν και στα πρώϊμα στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης, δηλ. της μεταγραφής των DNA και στη προ-ριβοσωματική σύνθεση, σταθεροποιώντας τις πρόδρομες πυρηνικές μορφές των mRNA και αναστέλλοντας την παραγωγή παθολογικών πρωτεϊνών. Όταν παύσει πλέον η επίδραση του stress, απελευθερώνονται πρόδρομες μορφές των mRNA από τις hsp70 και συνεχίζεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Οι hsp70 επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα όπου εποπτεύουν πλέον τη δομή και μεταφορά των πρωτεϊνών, ενώ η περαιτέρω σύνθεσή τους αναστέλλεται.

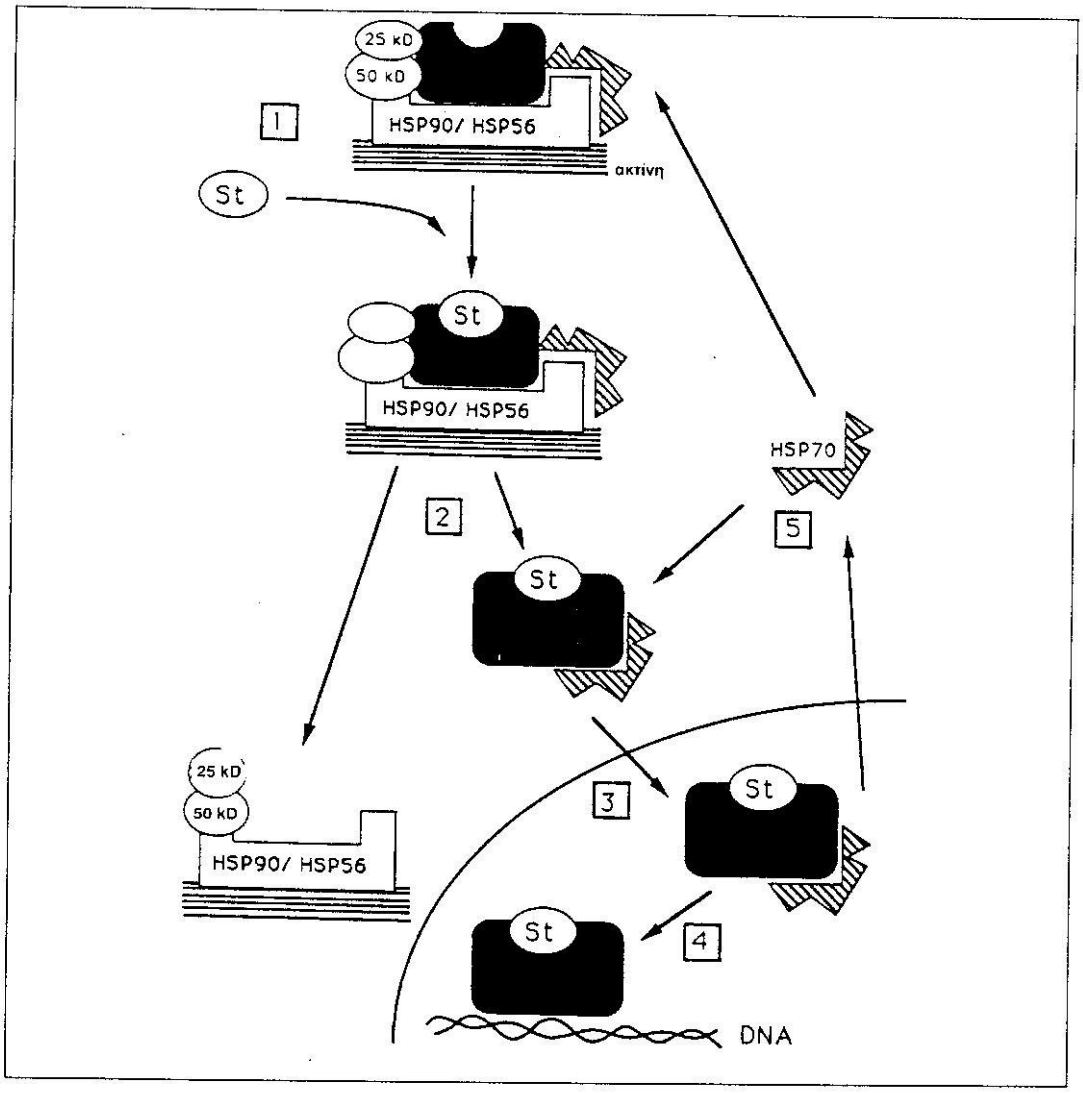
HSP90

Η οικογένεια των hsp90 βρίσκεται σε αφθονία σ' όλους σχεδόν τους οργανισμούς και τα θηλαστικά, έχει δε βρεθεί ότι η σύνθεσή τους αυξάνεται 10-15 φορές κατά το stress. Στον άνθρωπο η οικογένεια των hsp90 αποτελείται από δύο μέλη την α και β hsp90 οι οποίες κατά 70% παρουσιάζουν ομολογία στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους, εντοπίζονται δε κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε άλλα μέρη του κυττάρου[16,71].

Ο ρόλος των hsp90 στη λειτουργία του κυττάρου φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν ενεργά στην «εποπτεία» διαφόρων πρωτεϊνών προστατεύοντας τη δομή, τη λειτουργία και τη μεταφορά τους σε θέσεις-στόχους μέσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα[23,72,73]. Έχει επίσης βρεθεί ότι οι hsp90 συνδέονται παροδικά με διάφορες σημαντικές για τη λειτουργία του κυττάρου πρωτεΐνες και φαίνεται ότι παίζουν ρυθμιστικό ρόλο, είτε αναστέλλοντας είτε ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών αυτών[23,72,73].

Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί ο ρόλος των hsp90 στη ρύθμιση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (προγεστερόνης, τεστοστερόνης, αλατοκορτικοειδών, γλυκοκορτικοειδών)[74-78]. Κατά την είσοδο των στεροειδών στο κύτταρο, τα στεροειδή συνδέονται με ειδικό υποδοχέα, τον οποίον ενεργοποιούν. Ακολούθως, ο υποδοχέας αυτός συνδέεται με ειδικούς γόνους-στόχους οι οποίοι μεταγράφονται[16,79,80]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας των στεροειδών ορμονών στην ανενεργή μορφή του βρίσκεται συνδεδεμένος ως σύμπλεγμα με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες[81,82]. Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί, με την παρουσία των στεροειδών, απελευθερώνονται οι διάφορες πρωτεΐνες του συμπλέγματος και ο υποδοχέας, ως ενεργός πλέον, δρα στο DNA του κυττάρου και ενεργοποιεί τη μεταγραφική του δραστηριότητα (σχ. 6). Στο σύμπλεγμα του υποδοχέα συμμετέχουν οι hsp90 και οι hsp70. Ποιό ρόλο ακριβώς παίζουν αυτές οι hsp στο σύμπλεγμα του υποδοχέα των στερεοειδών δεν γνωρίζουμε. Φαίνεται πάντως ότι ο ρόλος τους, ιδιαίτερα των hsp90, είναι διπλός. Αφ' ενός διατηρούν τον υποδοχέα σε ανενεργή μορφή, όταν λείπουν τα στεροειδή, και αφ' ετέρου προστατεύουν τη δομή του διατηρώντας αυτόν συνεχώς σε ετοιμότητα να συνδεθεί με τα στεροειδή[82,83]. Έχει αποδειχθεί ότι μείωση των επιπέδων των hsp90 στο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη «απάντηση» των κυττάρων στις στεροειδείς ορμόνες[84]. Στην κλι-

νική πράξη έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι ασθενείς που πάσχουν από χρόνιο σοβαρό άσθμα παρουσιάζουν αντοχή στα κορτικοστεροειδή. Το γεγονός αυτό εικάζεται ότι οφείλεται στη μειωμένη έκφραση των hsp90 ή και σε μειωμένο ρυθμό αποδέσμευσης των hsp90 από το σύμπλεγμα των υποδοχέων των στεροειδών.



Σχήμα 6. *Μοντέλο ρύθμισης της δραστηριότητας του υποδοχέα των στεροειδών από τις HSP. (1) Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται σε αδρανή μορφή μέσα στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένος με την ακτίνη και την HSP90, HSP56, τις πρωτεΐνες 50 KD, 25KD, και πιθανόν και με την HSP 70. (2) Με την είσοδο στεροειδών (st) ο υποδοχέας αποσυνδέεται από το σύμπλεγμα. Η HSP70 παραμένει συνδεδεμένη ή συνδέεται εκείνη τη στιγμή με τον υποδοχέα των στεροειδών και (3) τον μεταφέρει στον πυρήνα διαμέσου των μεμβρανών (4) Η HSP70 απελευθερώνει τον υποδοχέα, ο οποίος συνδέεται και ενεργοποιεί το DNA (5). Η HSP70 ανακυκλώνεται.*

Έχει επίσης βρεθεί ότι, οι hsp90 συνδέονται και ρυθμίζουν τη λειτουργία και άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου, όπως της «heme-regulated eukaryotic initiation factor» (EIF-2a-kinase)[85,86], των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (ακτίνης "tubulin")[27,87], της καζεΐνης-κινάσης II[24], των MAP κινασών, και διαφόρων ογκογόνων ιογενών πρωτεϊνών, όπως της $pp60^{v\text{-}src}$ [88,89]. Η $pp60^{v\text{-}src}$, αποτελεί προϊόν του Rous Sarcoma virus και παίζει ρόλο στη νεοπλασματική μεταλλαγή των κυττάρων που έχουν μολυνθεί με τον ιόν αυτόν. Μελέτες έχουν δείξει ότι η $pp60^{v\text{-}src}$ συνδεδεμένη με την hsp90 και με μία άλλη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50kDa βρίσκεται σε ανενεργή μορφή. Όταν το σύμπλεγμα αυτό βρεθεί στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, οι hsp90 και η 50kDa πρωτεΐνη απελευθερώνουν την $pp60^{v\text{-}src}$, η οποία ως ενεργός πλέον δρα στον κατάλληλο στόχο[88,89]. Το γεγονός ότι οι hsp90 υπάρχουν σε αφθονία στα διάφορα κύτταρα, και υπό φυσιολογικές συνθήκες, υποδηλώνει ότι η λειτουργία τους είναι πολύ σημαντική. Πρέπει να υπάρχουν κι άλλες πρωτεΐνες-στόχοι των οποίων η λειτουργία τους ρυθμίζεται από τις hsp90, οι οποίες αποτελούν αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

HSP60

Οι hsp60 (ή «chaperonins») βρίσκονται σε αφθονία στα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια. Έχουν μελετηθεί πολύ σε διάφορα βακτηρίδια, όπως το Ecoli, όπου αποκαλούνται ως GroEl, GroES. Βρίσκονται σε φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου και αυξάνονται σε καταστάσεις stress.

Οι hsp60, όσον αφορά στη δομή τους, είναι πολύπλοκες και λειτουργούν ως «ζεύγη». Αποτελούνται από τις «chapenonin 60» (cpn60) η οποία είναι ένα μεγάλο ολιγομερές από 14 υποομάδες των 60kDa και τις «chapenonin-10» (cpn-10 που συνίστανται από 7 υποομάδες των 10KDa. Οι υποομάδες των cpn60 και cpn10 σχηματίζουν πολύπλοκο δακτύλιο και διαθέτουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης με διάφορες πρωτεΐνες μέσω ATP μηχανισμού.[57,90]

Οι hsp60 συνδέονται με πεπτίδια που βρίσκονται σε ατελώς οργανωμένη λειτουργική δομή («νεαρές» ή αποδομημένες μορφές) εμποδίζουν τη συνάθροιση και καθίζηση αυτών, διευκολύνουν την αναδόμησή τους (refolding) και τη μεταφορά τους σε λειτουργικές θέσεις μέσα στο κύτταρο. Οι hsp60, όπως και οι hsp70, έχουν παρόμοια βιοχημικά χαρακτηριστικά και είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι και οι δύο ομάδες των hsp δρουν διαδοχικά σε μία κοινή οδό με σκοπό να διευκολύνουν την αναδόμηση των μετουσιωμένων και ατελώς δομημένων πρωτεϊνών. Αντίθετα από τις hsp70 που διαθέτουν μία θέση σύνδεσης με πεπτίδιο, οι hsp60 διαθέτουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης. Οι hsp70 αναγνωρίζουν τα μη δομημένα πεπτίδια, σχηματίζουν ημιδομημένες μορφές οι οποίες ολοκληρώνονται από τις hsp60.

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι hsp60 παράγονται από διάφορα κύτταρα ποικίλων οργανισμών. Μελέτες σε αντιγόνα πολλών Gram(-), Gram(+) βακτηριδίων, παρασίτων και μυκήτων έδειξαν ότι πολλά από τα αντιγόνα αυτά είναι πρωτεΐνες του stress και ανήκουν στην ομάδα των hsp60[90-96]. Ενώ οι hsp60 είναι κυρίως ενδοκυττάριες πρωτεΐνες φαίνεται ότι υπό ειδικές συνθήκες εμφανίζονται στη μεμβράνη του κυττάρου ή ακόμη και εκκρίνονται. Έτσι οι hps60 δύνανται να δράσουν σαν αντιγόνα-στόχοι και να κινητοποιήσουν την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι οι hsp60 είναι πολύ ισχυροί στόχοι για το ανοσολογικό σύστημα, εκλύοντας τόσο χυμική όσο και κυτταρική ανοσολογική απάντη-

ση. Αυτό οφείλεται στην ομοιότητα μεταξύ των hsp60 που δρούν ως αντιγόνα των παθογόνων μικροοργανισμών και των hsp60 που παράγουν σε συνθήκες stress στα κύτταρα του ξενιστού. Η παρουσία των ίδιων hsp τόσο στον ξενιστή όσο και στους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι μία σημαντική πρόκληση επιλογής του ανοσολογικού συστήματος, λόγω της αντιγονικής ομοιότητας μεταξύ των hsp των βακτηριδίων και του ανθρώπου. Για παράδειγμα, αντισώματα έναντι των hsp60 των μυκοβακτηριδίων μπορεί να «αναγνωρίσουν» και τις hsp60 του ανθρώπου-ξενιστού. Έτσι ο κίνδυνος αυτοανοσίας είναι υπαρκτός. Μελέτες σε ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η ρευματοειδή αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, έχουν δείξει την παρουσία αντισωμάτων έναντι των hsp60 των μυκοβακτηριδίων στον ορό και σε ιστούς των ασθενών αυτών[97]. Επίσης ίδιες παρατηρήσεις έγιναν σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, νόσο Crohn και αθηροσκλήρυνση[95,98].

Το γεγονός ότι τα βακτηρίδια επάγουν μέσα στα μακροφάγα, με τη βοήθεια των hsp60, μια ιδιότητα αντιγονοπαρουσιαστική παίζει ρόλο στην ανοσοαντοχή του οργανισμού. Πιθανόν οι hsp60 να διεγείρουν ισχυρή και μακράς διάρκειας ανοσοαντοχή του οργανισμού. Πειραματικές μελέτες χρησιμοποιούν τις hsp60 ως ανοσορρυθμιστές και ως μόρια ενισχυτές σε διάφορα εμβόλια[99].

HSP ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ (HSP27)

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι hsp με μοριακό βάρος 20-40kDa. Αυτές έχουν περιγραφεί σ' όλους σχεδόν τους οργανισμούς, από τη Drosophila μέχρι τα θηλαστικά και τον άνθρωπο. Στη Drosophila έχει παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια και έχουν περιγραφεί πολλοί τύποι αυτών[100]. Στα περισσότερα θηλαστικά και τον άνθρωπο έχει περιγραφεί μία μόνο πρωτεΐνη χαμηλού ΜΒ των 25-30kDa η οποία αναφέρεται ως hsp27 (ή κατ' άλλους ερευνητές ως hsp24 ή hsp28)[16].

Η hsp27 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε μικρές ποσότητες στο φυσιολογικό κύτταρο, η σύνθεσή της δε 10πλασιάζεται και 20πλασιάζεται όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κι έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξαν ότι στο φυσιολογικό, «ήρεμο» κύτταρο η hsp27 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στη περιπυρηνική περιοχή κοντά στο σύμπλεγμα Golgi, με τη μορφή μεγαλομοριακών αθροισμάτων των 400 kDa (εικονίζεται σαν «κουβάρι»)[101]. Κατά την επίδραση ενός θερμικού stress η hsp27 μετακινείται στον πυρήνα όπου συναθροίζεται σε ακόμη μεγαλύτερα μόρια των 2000kDa, ενώ μετά την πάροδο του stress παύει να υφίσταται σε αθροίσματα και μετακινείται στο κυτταρόπλασμα[101].

Ο ρόλος της hsp27 στην κυτταρική λειτουργία δεν έχει πλήρως μελετηθεί. Είναι γνωστό ότι η hsp27 αυξάνεται σημαντικά κατά το stress. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα, τα οποία έχουν αυξημένα επίπεδα hsp27 μετά από «μετεμφύτευση» (transfection) σ' αυτά του ειδικού γόνου της hsp27, παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στο θερμικό stress συγκριτικά με κύτταρα τα οποία έχουν χαμηλά επίπεδα hsp27[102-104]. Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί ο ρόλος της hsp27 στην προστασία του κυτταροσκελετού των κυττάρων και ιδιαίτερα της ακτίνης[20]. Η hsp27 αναστέλλει τον πολυμερισμό της F-ακτίνης, δρώντας ως «ασπίδα προστασίας» αυτής. Σε κύτταρα πτηνών, έχει αποδειχθεί in vitro, ότι μειώνει τη γλοιότητα των διαλυμάτων της ακτίνης, αυξάνει τον ουδόν του πολυμερισμού των μορίων της ακτίνης και διασπά τα ήδη συναθροισμένα μόρια της F-ακτίνης[20]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η hsp27 αποτελεί κύριο στόχο φωσφορυλίωσης[105] μετά από διέγερση των κυττάρων από διάφορους παράγοντες, όπως η αυξημένη θερμοκρασία, οι ελεύθερες ρίζες, οι τοξίνες, οι κυτταροκίνες (TNF, IL_1, PAF) κ.ά.[106-108]. Στη περίπτωση του θερμικού stress, η φωσφορυλίωση της hsp27 η οποία επάγε-

ται μέσα στα πρώτα λεπτά του stress θεωρείται ότι αποτελεί κύριο βήμα για την ενεργοποίηση της θερμοπροστατευτικής δράσης της hsp27 στο σύστημα των ινιδίων της ακτίνης[20]. Δεν γνωρίζουμε ακριβώς τους μηχανισμούς φωσφορυλίωσης της hsp27. Έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες stress η ειδική stress κινάση P38 ενεργοποιείται άμεσα και φωσφορυλιώνει μία άλλη κινάση την MAPKAP-2 (45/54/kDa), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την hsp27[109]. Εν τούτοις, πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αμφισβητούν την αναγκαιότητα της φωσφορυλίωσης της hsp27 ως απαραίτητο βήμα για την έκφραση του προστατευτικού τους ρόλου στο κύτταρο[110]. Επίσης, διάφορες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα και/ή φωσφορυλίωση της hsp27 σχετίζονται με την αύξηση του κυττάρου[106,16]. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα η οποία θα καθορίσει την ακριβή βιοχημική λειτουργία της hsp27 και τον τρόπο με τον οποίον η φωσφορυλίωση μπορεί να είναι σημαντική για τη ρύθμιση της λειτουργίας της.

Ε. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΗΣ

Έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί σε κάποιο θερμικό ή και άλλου είδους stress γίνονται για κάποιο χρονικό διάστημα ανθεκτικά στην επίδραση ενός νέου ισχυρότερου stress, το οποίο υπό διαφορετικές συνθήκες θα τα κατέστρεφε. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται θερμοαντοχή[111-113]. Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το κύτταρο μετά ένα πρώτο stress μπορεί να αποκτήσει αντοχή όχι μόνο στο stress στο οποίο είχε αρχικά εκτεθεί αλλά και σε άλλο διαφορετικού είδους stress. Για παράδειγμα, μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία το κύτταρο μπορεί να «αντέξει» ένα ισχυρό χημικό stress, όπως έκθεση σε αιθανόλη, χωρίς να υποστεί βλάβη.

Εχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού διαφέρουν ως προς την αντοχή τους στις αυξημένες θερμοκρασίες[114]. Η θερμοαντοχή αυτή είναι μόνιμη (permanent), φαίνεται ότι είναι γενετικά καθορισμένη και διαφέρει από την παροδική θερμοαντοχή που αναπτύσσουν τα κύτταρα όταν προηγουμένως έχουν εκτεθεί σε θερμικό ή άλλο stress[12,115]. Μια πιθανή ερμηνεία της μόνιμης θερμοαντοχής είναι ότι αυτή οφείλεται σε γενετικά καθορισμένη διαφοροποίηση δομικών μακρομορίων εντός του κυττάρου, ίδιων με αυτών τα οποία επάγονται κατά το θερμικό stress. Ανάλογα με την ένταση του στρεσσογόνου ερεθίσματος και τη διάρκεια επίδρασής του, η ανάπτυξη θερμοαντοχής του κυττάρου μπορεί να είναι μικρότερης ή μεγαλύτερης διάρκειας[112]. Για παράδειγμα, in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα τα οποία εκτίθενται για βραχύ χρονικό διάστημα στους 43 °C, εάν αφεθούν να «ηρεμήσουν» στους 37 °C και κατόπιν εκτεθούν εκ νέου σε δεύτερο θερμικό stress αναπτύσσουν αντοχή μικρής χρονικής διάρκειας. Όταν όμως τα κύτταρα εκτεθούν για μακρύ χρονικό διάστημα σε αυξημένες θερμοκρασίες, χαμηλότερες όμως των 42 °C, αποκτούν θερμοαντοχή μεγάλης διάρκειας. Ο βαθμός θερμοαντοχής στη δεύτερη αυτή περίπτωση είναι μεγάλος και αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων σε σημαντικό βαθμό.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όταν το κύτταρο εκτεθεί σε κάποιου είδους stress παρουσιάζει διαταραχές δομικές και λειτουργικές, οι οποίες κατά κύριο λόγο αφορούν στις πρωτεΐνες του κυττάρου. Ετσι, η πρωτεΐνη αναστέλλεται, η δομή των πρωτεϊνών διαταράσσεται, και μετουσιωμένες πρωτεΐνες συναθροίζονται με αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη[15,19]. Μολονότι όλο το κύτταρο δέχεται την επίδραση

του στρεσσογόνου ερεθίσματος, έχει παρατηρηθεί ότι, σε κύτταρα που έχουν αποκτήσει θερμοαντοχή, αυξημένη αντοχή παρουσιάζουν μόνον εκείνες οι πρωτεΐνες που κατεξοχήν βλάπτονται από το αρχικό στρεσσογόνο ερέθισμα. Για παράδειγμα, όταν το κύτταρο αποκτήσει θερμοαντοχή μετά από επίδραση χημικών ουσιών (όπως π.χ. το άλας του αρσενικού) η θερμοαντοχή του αφορά μόνο στις κυτταρικές πρωτεΐνες που κατά κύριο λόγο βλάπτονται από την επίδραση του αρσενικού[112]. Με άλλα λόγια, η θερμοαντοχή δεν αφορά όλο το κύτταρο αλλά θέσεις-στόχους που εξαρτώνται από το είδος του stress που προκάλεσε την αντοχή.

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους τα κύτταρα αναπτύσσουν θερμοαντοχή δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί υπάρχουν στοιχεία από μελέτες που υποστηρίζουν την άποψη ότι οι hsp παίζουν τον κύριο ρόλο στην ανάπτυξη της θερμοαντοχής των κυττάρων. Στις μελέτες αυτές φαίνεται ότι τα κύτταρα τα οποία συνθέτουν υψηλά επίπεδα hsp καθίστανται ανθεκτικά σε βλάβες που προκαλεί το θερμικό ή άλλου είδους stress[73, 116-119]. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι «μετεμφύτευση» (transfection) ανθρώπινων γόνων των hsp σε κύτταρα τρωκτικών ζώων προκαλεί θερμοαντοχή στα κύτταρα των πειραματοζώων αυτών[120]. Αντιθέτως, εάν αναστα-λεί η σύνθεση των hsp με ειδικές ουσίες, όπως με διάφορους αναστολείς της σύνθεσης του RNA (π.χ. actinomycin D) ή με αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης (π.χ. cyclohemide) ή με τη χορήγηση ειδικών αντισωμάτων έναντι των hsp το κύτταρο γίνεται πιο θερμοευαίσθητο[121,122].

Πρωτεύοντα ρόλο στην απόκτηση θερμοαντοχής φαίνεται ότι παίζουν οι hsp70. Η θέση αυτή υποστηρίζεται από πειραματικές μελέτες, σε πολλές από τις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως «μοντέλο» το ένζυμο λουσιφεράση. Το ένζυμο αυτό καθίσταται δυσδιάλυτο με την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας και αδρανοποιείται ταχέως[123]. Οι hsp70 «προστατεύουν» τη λουσιφεράση από την επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας. Τούτο αποδεικνύεται από πειραματικά δεδομένα κατά τα οποία ενέθηκε το ένζυμο λουσιφεράση σε ανθρώπινα κύτταρα που είχαν υψηλά επίπεδα hsp70. Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκε μειωμένη θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου[112].

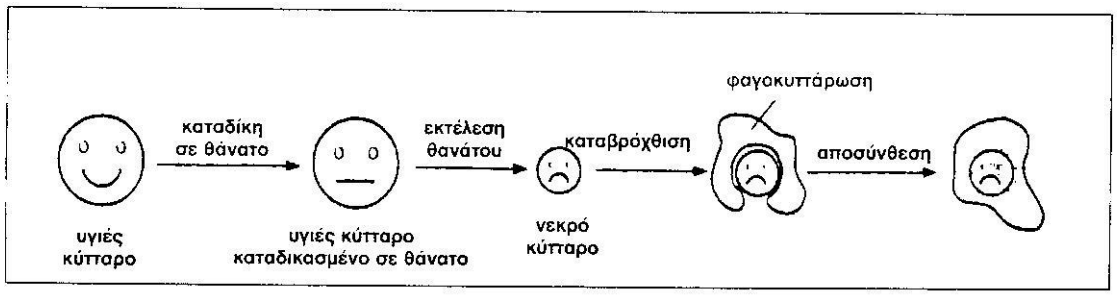
Οι hsp70 προστατεύουν τις πρωτεΐνες του κυττάρου σε διάφορα στάδια του «κύκλου ζωής τους». Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι hsp70 σε συνθήκες stress προστατεύουν το «splicing» του RNA στη φάση της μεταγραφής των πρωτεϊνών του

κυττάρου[124]. Υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα τη διακοπή του «splicing» του RNA και τη συνάθροιση πρόδρομων μορφών mRNA[15]. Όμως σε κύτταρα θερμοανθεκτικά, που έχουν υψηλά επίπεδα hsp70, δεν διακόπτεται το «splicing» του RNA και ώριμα mRNA μεταγράφονται σε πρωτεΐνες[17,124,125]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι σε συνθήκες stress οι hsp70 σταθεροποιούν και αναστέλλουν τη μετουσίωση των φυσιολογικων πρωτεϊνών (επιτυγχάνουν δηλ. περιορισμό της αρχικής βλάβης από το stress), διευκολύνουν την «επιδιόρθωση» των αποδομημένων πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο αποτρέπουν τη συνάθροιση αυτών των βλαπτικών για το κύτταρο πρωτεϊνών[111,115].

Εκτός της ομάδος 70 των hsp και άλλες hsp, όπως οι hsp27, φαίνεται ότι συνεργάζονται για την προστασία του κυττάρου από το θερμικό stress. Σε πειραματικές μελέτες σε κύτταρα όπου χορηγήθηκε hsp27 παρατηρήθηκε ταχεία διάλυση των αθροισμάτων των μετουσιωμένων από το θερμικό stress πρωτεϊνών[20,94,126,127].

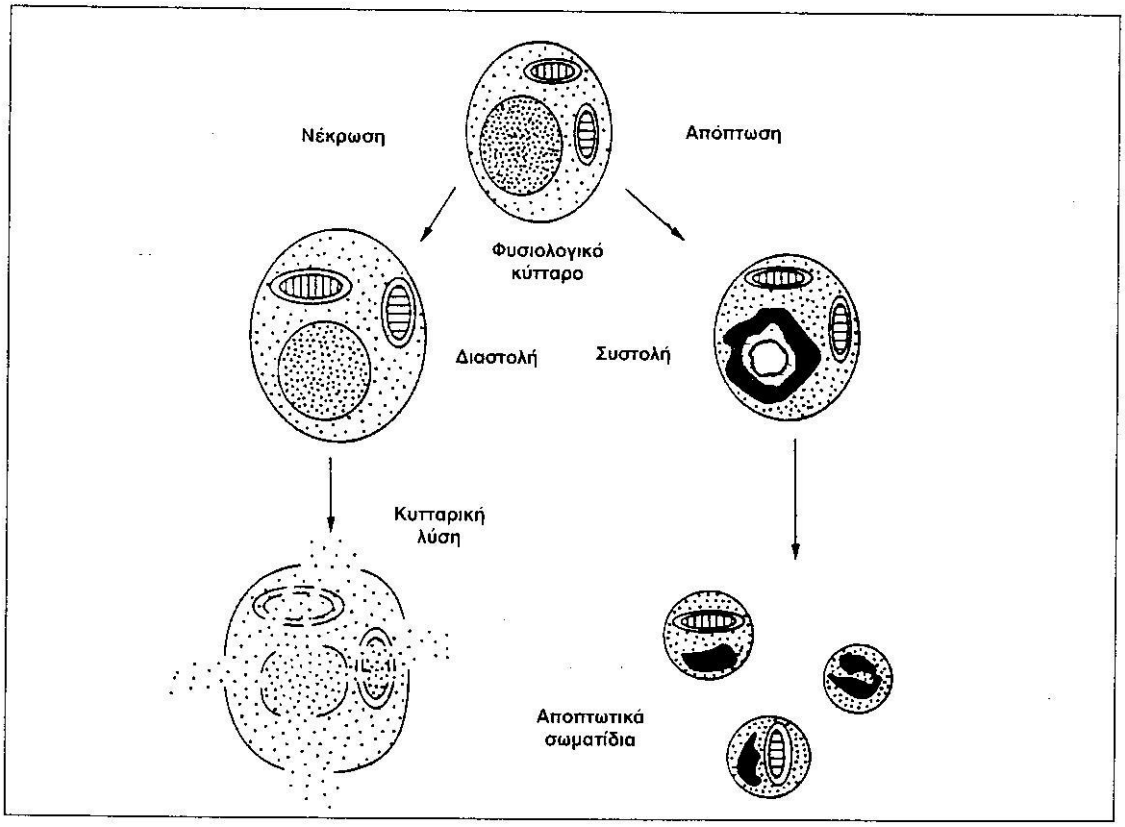
Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι hsp70 προστατεύουν τις πρωτεΐνες του κυττάρου από τη βλαπτική επίδραση του stress δρώντας ως «μόρια-προστάτες» των πρωτεϊνών. Έχει εν τούτοις βρεθεί, ότι οι hsp70 υπό συνθήκες stress δύνανται να δρουν προστατευτικά για το κύτταρο και με άλλο μηχανισμό. Ο προστατευτικός αυτός ρόλος αφορά στην επίδραση των hsp στο μηχανισμό απόπτωσης του κυττάρου.

Είναι γνωστό ότι απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που χρησιμοποιείται σ' όλους σχεδόν τους ζώντες οργανισμούς προκειμένου να καταστραφούν κύτταρα τα οποία πλέον είναι άχρηστα ή έχουν υποστεί σημαντική βλάβη[128-130] (σχ. 7). Η απόπτωση είναι ένα φυσιολογικό γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των φυσιολογικών ιστών. Κατά την απόπτωση παρατηρούνται συγκεκριμένες μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές που περιλαμβάνουν την κατάτμηση του DNA με τη δράση ειδικών ενζύμων



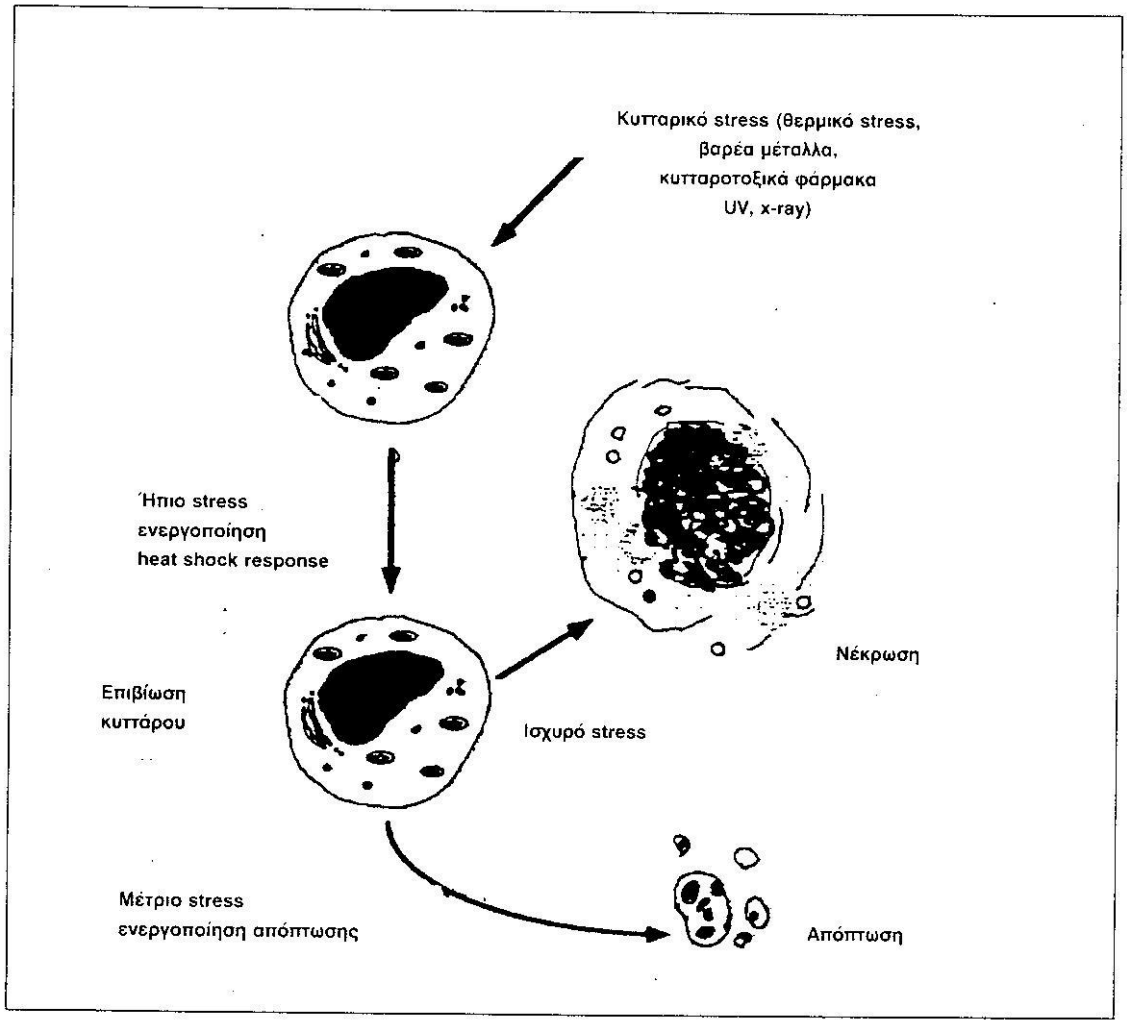
Σχήμα 7. *Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση)*

(των ενδονουκλεασών), τη συμπύκνωση της χρωματίνης του κυττάρου και του κυτταροπλάσματος. Προοδευτικά ακολουθεί αλλοίωση του σχήματος του πυρήνα και συστολή του κυττάρου. Σε επόμενο στάδιο ο πυρήνας διασπάται και τα θραύσματα αυτού συγκεντρώνονται και αλλοιώνουν την κυτταρική μεμβράνη η οποία εν τούτοις δεν χάνει την ακεραιότητά της. Τελικά τα θραύσματα του κυττάρου σχηματίζουν ειδικά «αποπτωτικά» σωματίδια και απομακρύνονται από το κύτταρο (σχ. 8). Οι μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης ενεργοποιούν ταχύτατα τη φαγοκυτ-



Σχήμα 8. *Μορφολογικές μεταβολές του κυττάρου κατά την απόπτωση και τη νέκρωση*

ρωση των κυττάρων που έχουν υποστεί απόπτωση από τα γειτονικά φαγοκύτταρα χωρίς να απελευθερώνονται τοξικά συστατικά στην περιφέρεια. In vivo η απόπτωση δεν συνοδεύεται από φλεγμονή[131-136]. Αντιθέτως, τα κύτταρα που υφίστανται νέκρωση, ως συνέπεια ενός πολύ ισχυρού stress και μεγάλης βλάβης, λύονται και απελευθερώνουν κυτταροπλασματικό υλικό το οποίο ενεργοποιεί τα μακροφάγα και πυροδοτεί φλεγμονώδη αντίδραση (σχ. 9).



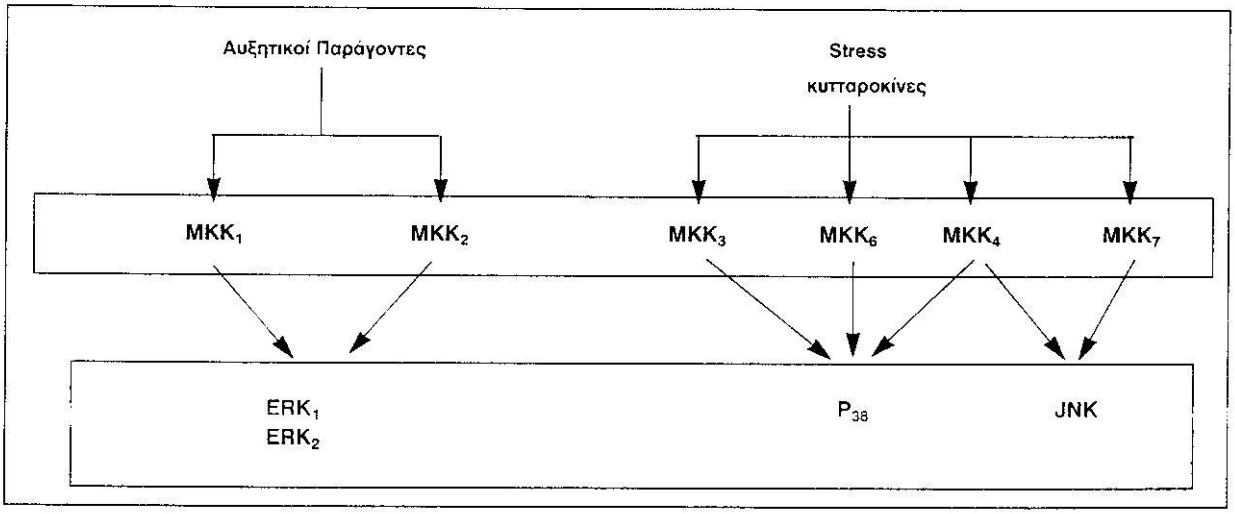
Σχήμα 9. *Σχηματική αναπαράσταση δοσοεξαρτώμενης επαγωγής του κυτταρικού θανάτου. Ο τύπος και η ένταση του stress καθορίζει την απάντηση του κυττάρου στο stress επιβίωση ή θάνατο. Γενικά, σε ήπιο stress μοριακές και βιοχημικές μεταβολές λαμβάνουν χώρα μέσα στο κύτταρο που επιτρέπουν την επιβίωσή του. Εν τούτοις, αυτές οι μεταβολές δεν μπορούν να προστατεύσουν το κύτταρο όταν η ένταση του stress αυξάνεται, και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Όταν επιδράσει πολύ ισχυρό stress, το κύτταρο είναι ανίκανο να «επιλέγει» τον τρόπο θανάτου του και οδηγείται «υποχρεωτικά» στη νέκρωση.*

Η απόπτωση είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης ενός προϋπάρχοντος στο κύτταρο προγράμματος «αυτοκτονίας». Ο βασικός μηχανισμός με τον οποίον τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση φαίνεται ότι υπάρχει σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών, αλλά η ενεργοποίηση του προγράμματος αυτού ρυθμίζεται από διάφορα ερεθίσματα που προέρχονται τόσο από το ενδοκυττάριο όσο και από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Αν και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της απόπτωσης δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο στην έναρξη του αποπτωτικού

προγράμματος παίζει η ενεργοποίηση μιας πολύπλοκης διαδικασίας μεταβίβασης σήματος των πρωτεϊνικών κινασών[137].

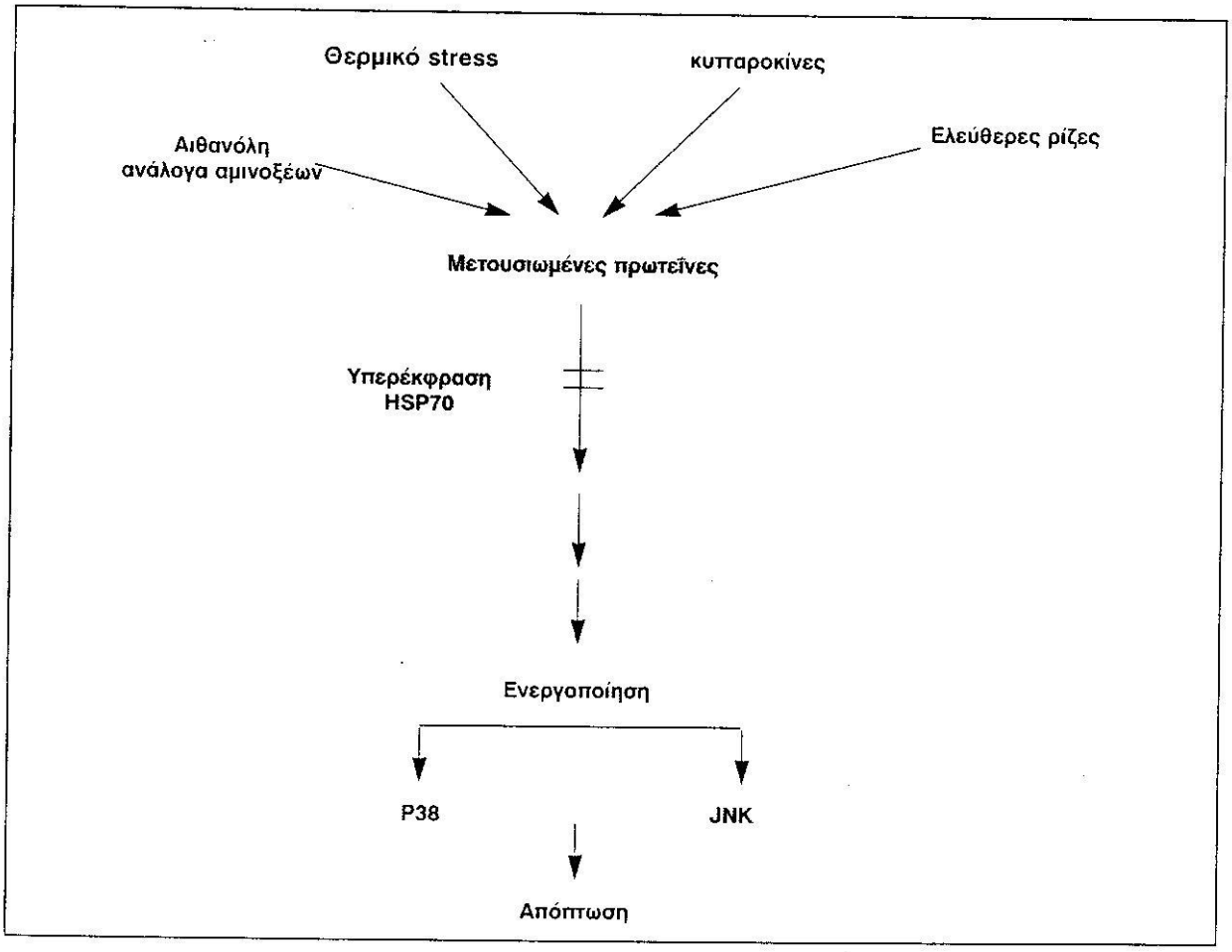
Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών, μέσω ενός καταρράκτου μεταβολικών οδών, μεταβιβάζουν διάφορα ερεθίσματα από την κυτταρική μεμβράνη προς το εσωτερικό του κυττάρου με τα οποία ρυθμίζονται σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Στην αντίδραση του κυττάρου στο stress σημαντικό ρόλο παίζει η οικογένεια των MAP (mitogen-activated protein) κινασών[138-140]. Είναι γνωστές τρεις οικογένειες MAP κινασών, οι ERK, οι c-Jun N-terminal (JNK) και οι P38. Η οδός των ERK MAP κινασών ενεργοποιείται από μιτογόνα και αυξητικούς παράγοντες, ενώ η οδός των JNK και P38 ενεργοποιείται όταν το κύτταρο εκτεθεί σε περιβαλλοντικό stress και σε παράγοντες φλεγμονής (ιντερλευκίνες, TNF, παράγωγα βακτηριδίων όπως LPS κ.ά.)[141-144] σχ.(10). Οι MAP κινάσες ενεργοποιούνται από ειδικά ένζυμα, τις MAP κινάσες-κινάσες (MKKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν τα αμινοξέα θρεονίνη και τυροσίνη. Κάθε MAP κινάση ρυθμίζεται από διαφορετικές MKKs επιτρέποντας την ανεξάρτητη ρύθμισή τους[141,143]. Ο ρόλος των MAP κινασών είναι να φωσφορυλιώνουν ειδικές πρωτεΐνες, διαφορετικές για κάθε μία MAP κινάση, και να ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα ρυθμίζοντας τη λειτουργία του κυττάρου. Τελευταία έχει βρεθεί ότι η οδός των JNK και P38 αποτελούν σημαντικό συστατικό μιας μεταβολικής οδού μεταβίβασης σήματος που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης, σαν απάντηση σε ερεθίσματα που προκαλούν stress[145].

Οι hsp παρεμβαίνουν ανασταλτικά στον μηχανισμό της απόπτωσης του κυττάρου. Μέχρι πρό τινος εθεωρείτο ότι ο κύριος μηχανισμός της αντιαποπτωτικής λει-



Σχήμα 10. *Οι κυριώτερες MAP κινάσες των θηλαστικών που συμμετέχουν*

τουργίας των hsp ήταν η ικανότητά τους να προστατεύουν τις φυσιολογικές πρωτεΐνες του κυττάρου. Η προστατευτική αυτή λειτουργία των hsp εθεωρείτο ότι σχετίζεται με την προστασία των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (ακτίνης, Vimentin κλπ), την προστασία του συστήματος των μικροσωληναρίων, του διάμεσου δικτύου και της χρωματίνης από διάφορες πρωτεάσες και νουκλεάσες (ένζυμα που προκαλούν την απόπτωση). Εν τούτοις, πρόσφατες μελέτες έδειξαν, ότι σε ορισμένες συνθήκες stress, ο κύριος αντιαποπτωτικός μηχανισμός των hsp70 είναι η αναστολή της ενεργοποίησης των JNK και P38 MAP κινασών[146,147]. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι αναστέλλεται η «αυτοκτονία» του κυττάρου. Έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση των επιπέδων των hsp70 και της ενεργοποίησης των JNK και P38. Έκθεση κυττάρων σε υψηλή θερμοκρασία, κυτταροκίνες (TNF, IL-1) ή άλλου είδους stress προκαλεί συνάθροιση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, μείωση των επιπέδων των ελεύθερων hsp70 και ενεργοποίηση των JNK και P38 κινασών[145,146] σχ. (11).



Σχήμα 11. *Ο ρόλος των HSP70 στη ρύθμιση της δραστηριότητας των stress-κινασών. Ποικίλοι τοξικοί παράγοντες προκαλούν μείωση των επιπέδων των ελεύθερων HSP70 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των stress-κινασών. Σε θερμοανθεκτικά κύτταρα (με υψηλά επίπεδα HSP70) η ενεργοποίηση των stress-κινασών*

Παράλληλα, στα ίδια κύτταρα παρατηρήθηκαν μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στην αποπτωτική διαδικασία όπως σύμπτυξη του πυρήνα, αυξημένη θραύση της Poly-ADP-ribose-polymerase (της PARP, πρωτεολυτικού ενζύμου που χρησιμοποιείται σήμερα για τη μέτρηση της αποπτωτικής λειτουργίας των κυττάρων). Αντίθετα, όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί προηγουμένως ήπιο stress και έχουν αποκτήσει υψηλά επίπεδα hsp70, δηλ. έχουν αναπτύξει θερμοαντοχή, αναστέλλουν την ενεργοποίηση των JNK και P38 κινασών μετά την επίδραση ενός δευτέρου στρεσσογόνου ερεθίσματος[147]. Ταυτόχρονα στα κύτταρα αυτά δεν παρατηρείται σύμπτυξη του πυρήνα και θραύση του ενζύμου PARP, δηλ. στοιχεία που χαρακτηρίζουν την απόπτωση. Η άμεση συσχέτιση των hsp70 και των stress-κινασών (JNK, P38) έχει αποδειχθεί και με άλλον τρόπο. Σε συνθήκες stress των κυττάρων χορηγήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των hsp70 και ως εκ τούτου ανεστάλη η δράση τους. Στη περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των JNK και P38 κινασών[147].

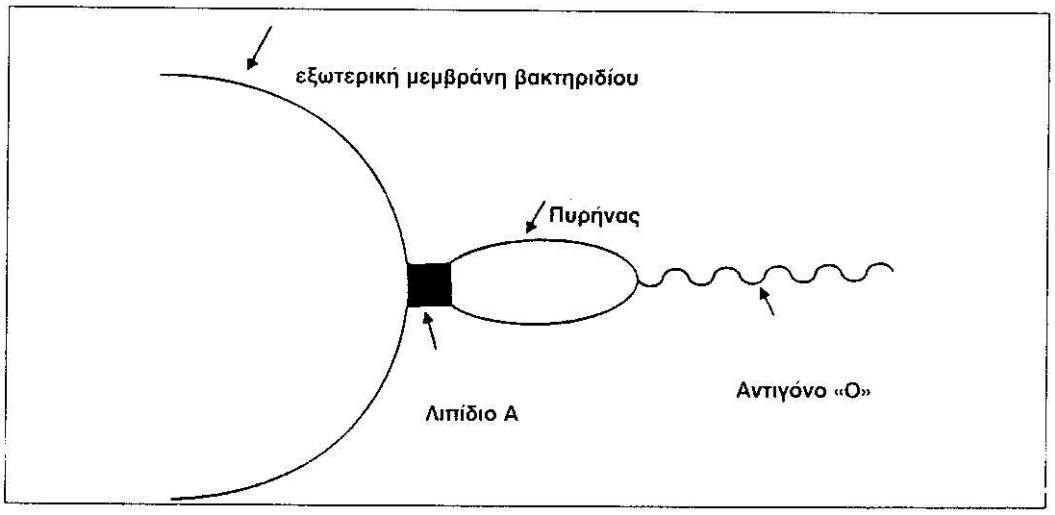
Η προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης των hsp70, μέσω της αναστολής των κινασών, φαίνεται να αφορά σε ήπια stress[147]. Έχει παρατηρηθεί ότι, όταν το stress είναι τόσο ισχυρό ώστε ο κυτταρικός θάνατος να μην οφείλεται σε απόπτωση αλλά σε νέκρωση του κυττάρου, η ικανότητα των hsp70 να δρούν ως «μόρια-προστάτες», αναστέλλοντας τη συνάθροιση αποδομημένων πρωτεϊνών και διευκολύνοντας την απόκτηση της φυσιολογικής πλήρους αρχιτεκτονικής τους δομής, είναι κριτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου[149].

Ζ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HSP ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Ως γνωστόν ο οργανισμός αντιδρά σε πληθώρα βλαπτικών παραγόντων (υποξία, αιμορραγία, λοίμωξη) με σειρά παθοφυσιολογικών λειτουργιών που συνιστούν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Σκοπός της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι η προστασία του οργανισμού από το βλαπτικό παράγοντα.

Στη νεογνική ηλικία οι λοιμώξεις είναι από τα συχνότερα αίτια που κινητοποιούν τη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. Στις λοιμώξεις των νεογνών ο εκλυτικός παράγοντας μπορεί να είναι βακτηρίδια, ιοί ή παράσιτα.
Τη φλεγμονώδη αντίδραση κινητοποιούν διάφορα στοιχεία ή προϊόντα μικροοργανισμών, όπως η ενδοτοξίνη των Gram(-) βακτηριδίων (LPS), στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος των Gram(+) βακτηριδίων, διάφορα αντιγόνα ιών και μυκήτων, η εντεροτοξίνη, η τοξίνη -1 του τοξικού συνδρόμου κ.ά. Ο μηχανισμός της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος[150].

Περισσότερο έχει μελετηθεί η αντίδραση που προκαλεί η ενδοτοξίνη των Gram(-) βακτηριδίων (LPS), η οποία και χρησιμοποιείται «ως μοντέλο» για τη μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης[151]. Η ενδοτοξίνη αυτή αποτελείται δομικά από τρία μέρη: εξωτερικά από το αντιγόνο «Ο», στο μέσο από τον πυρήνα και εσωτερικά από το λιπίδιο Α σχ. (12). Το αντιγόνο «Ο» είναι ειδικό και χαρακτηρίζει αντιγονικά κάθε μικροβιακό είδος, ενώ το λιπίδιο Α που είναι κοινό σε όλα τα μικρόβια είναι το πλέον τοξικό προϊόν τους[152,153].

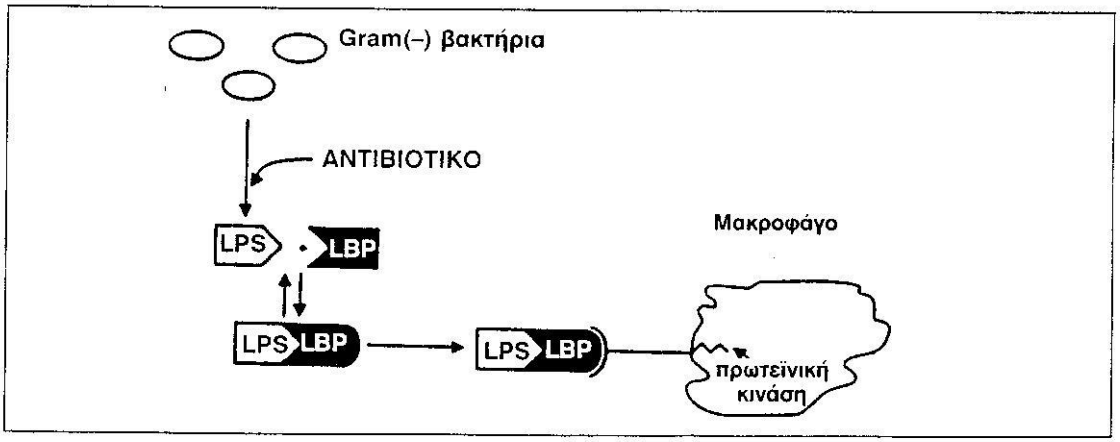


Σχήμα 12. *Η δομή της LPS του Gram(–) βακτηριδίου*

Η LPS, μετά την απελευθέρωσή της από το βακτηρίδιο, συνδέεται με τα κύτταρα-στόχους του ξενιστή μέσω ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και επάγει τη μεταφορά του ερεθίσματος στο εσωτερικό των κυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυρίως του συστήματος πήξης και συμπληρώματος και την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων.

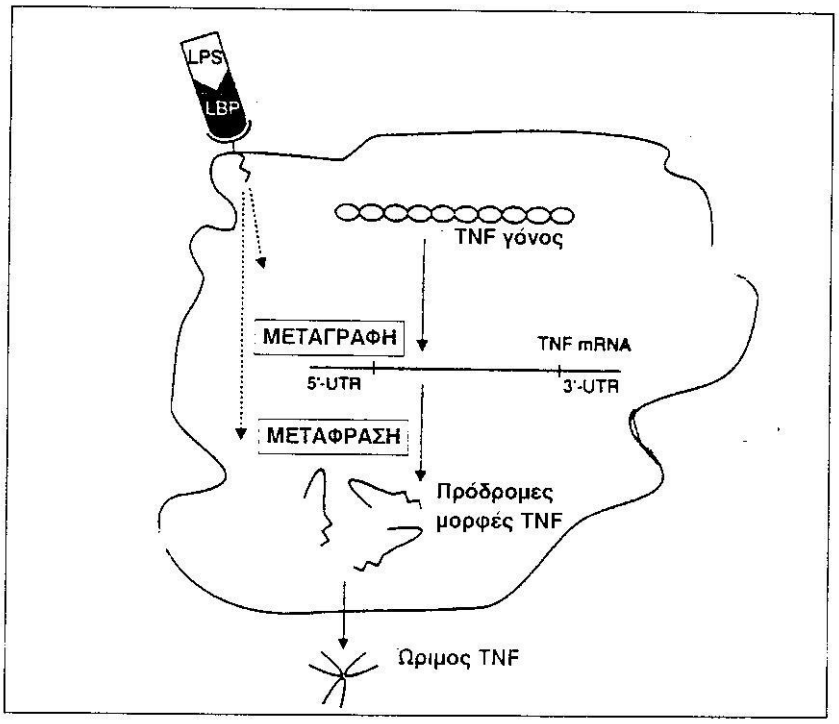
Από τους διάφορους υποδοχείς των LPS των φαγοκυττάρων περισσότερο έχουν μελετηθεί οι υποδοχείς CD14 και CD18[154]. Οι υποδοχείς CD14 είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια κυρίως των μονοκυττάρων-μακροφάγων και σε μικρότερο βαθμό και των πολυμορφοπυρήνων. Αυτοί «υποδέχονται» το σύμπλεγμα της LPS με μία πρωτεΐνη οξείας φάσης την LBP (liposacharide binding protein), μοριακού βάρους 60κDa. Το σύμπλεγμα LPS-LBP συνδέεται με τους υποδοχείς CD14 και ακολούθως ενεργοποιείται ομάδα κινασών (πρωτεϊνική κινάση C, MAP κινάσες)[155], οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του ερεθίσματος και επομένως στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των πολυμορφοπυρήνων σχ.(13). Οι άλλοι υποδοχείς των LPS που έχουν επίσης μελετηθεί είναι οι υποδοχείς CD18 ή οικογένεια των ιντεγκρινών. Αυτοί είναι γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και αποτελούνται από δύο μέρη, μία α-υποομάδα (CD11a, CD11b, CD11c) που συνδέεται με μία κοινή β-υποομάδα CD18. Η ιντεγκρίνη CD11a/CD18 αναφέρεται και ως LFA_1, η CD11b/CD18 ονομάζεται και MAC-1 και η CD11c/CD18 είναι επίσης γνωστή ως $P_{150,95}$[156,157].

Η διέγερση των φαγοκυττάρων από την LPS, διάφορους χημειοτακτικούς παράγοντες κ.λπ., έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία έκφραση αυτών των υποδοχέων στη μεμβράνη των κυττάρων. Οι CD18 υποδοχείς των LPS φαίνεται ότι δεν παίζουν



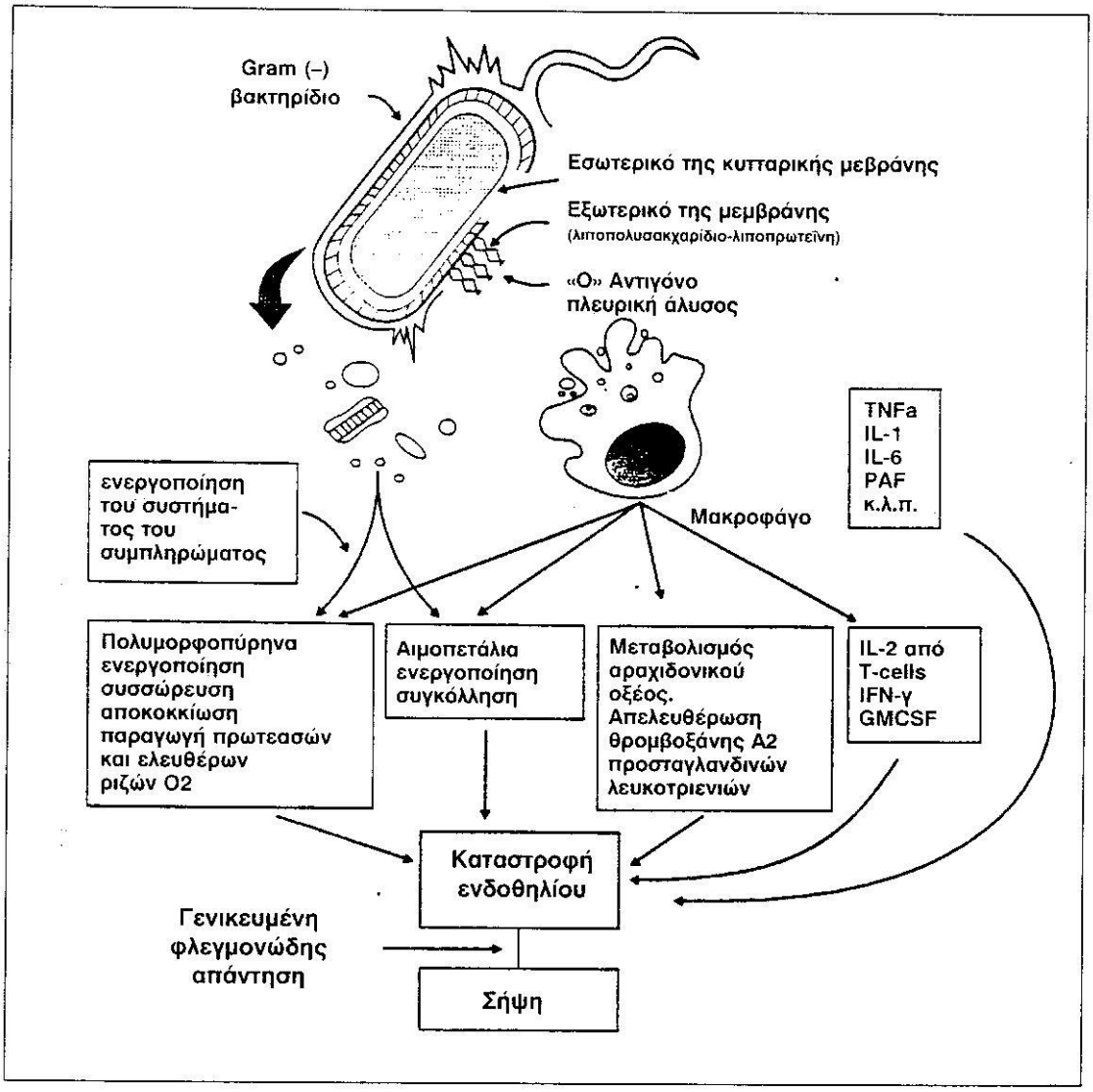
σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων από τις LPS, δεδομένου ότι η χορήγηση αντι-CD18 μονοκλωνικών αντισωμάτων δεν αναστέλλει την απελευθέρωση των κυτταροκινών (σαν απάντηση στη δράση των LPS)[154]. Ακόμα, η έλλειψη των CD18 δύναται να συνυπάρχει με ενεργοποίηση του κυττάρου από τις LPS[154]. Εντούτοις, οι CD18 φαίνεται ότι είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων[158,159]. Το ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) αποτελεί τουλάχιστον ένα από τα μόρια με το οποίο συνδέεται η οικογένεια των CD18 ιντεγκρινών[158-160]. Φυσιολογικά το μόριο ICAM-1 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε διάφορα κύτταρα που δεν ανήκουν στο αιμοποιητικό σύστημα. Η διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων από διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες (όπως IL-1, TNF-a, IF-γ, LPS) αυξάνει κατά πολύ την έκφραση των υποδοχέων ICAM-1 στα κύτταρα αυτά[161-163]. Η αλληλεπίδραση των CD18 και των ICAM-1 είναι απαραίτητη για την προσκόλληση των πολυμορφοπυρήνων στο ενδοθήλιο των αγγείων, τη διαπίδυση αυτών στον τόπο της λοίμωξης και την ανάπτυξη και διεύρυνση της φλεγμονώδους αντίδρασης[158].

Κατά την ενεργοποίηση των μακροφάγων παράγονται διάφοροι μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης κυριώτεροι των οποίων είναι οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, TNF-a, PAF κ.ά.). Στο σχ. (14) φαίνεται ένα παράδειγμα σύνθεσης του TNF.



Σχήμα 14. *Σύνθεση του TNF στα μακροφάγα. Όταν το σύμπλεγμα LPS-LBP*

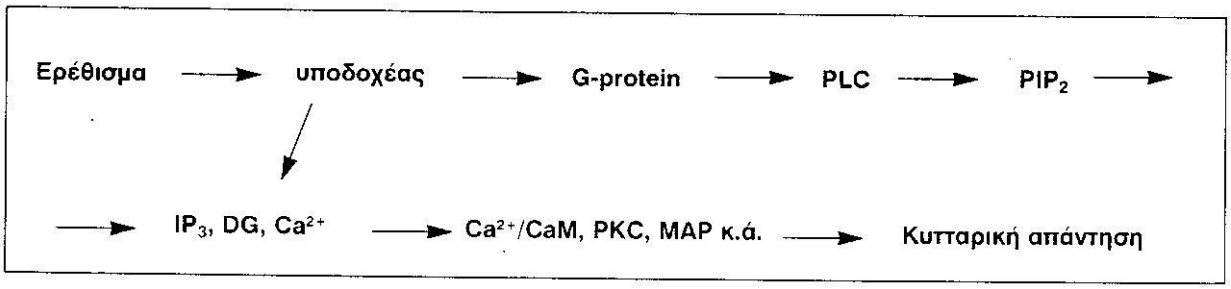
Κυτταροκίνες παράγονται και από άλλα κύτταρα του οργανισμού όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα αιμοπετάλια. Οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν αυτά τα ίδια κύτταρα καθώς και άλλα κύτταρα του οργανισμού με αποτέλεσμα έναν «καταρράκτη» αντιδράσεων[164] που απλουστευμένα φαίνεται στο σχ. (15).



Σχήμα 15. *Σχηματική παράσταση του ρόλου που διαδραματίζουν τα αρνητικά κατά Gram(–) βακτήρια στη φλεγμονώδη αντίδραση και στη σήψη.*

Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ενεργοποίηση των πολυμορφοπυρήνων (ΠΜΠ) κατά την εξέλιξη της φλεγμονώδους αντίδρασης. Οταν το ΠΜΠ δεχτεί ένα ερέθισμα, το μήνυμα μεταφέρεται ενδοκυτταρίως μέσω διαφόρων μηχανισμών και ρυθμίζεται ανάλογα η λειτουργία του κυττάρου[165,166].

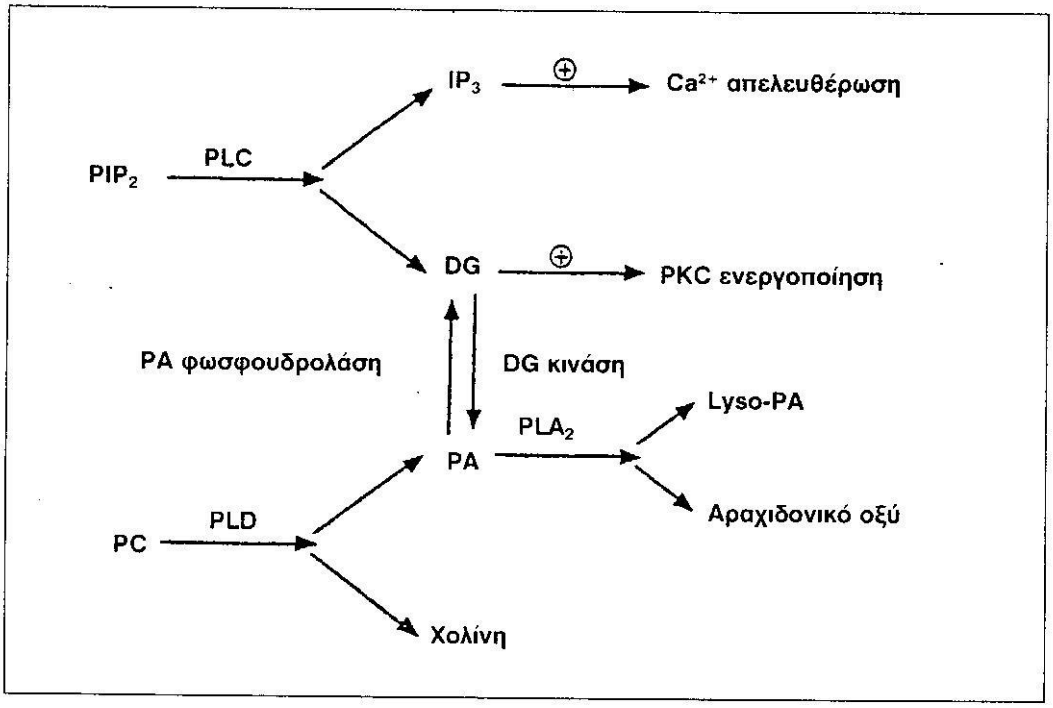
Στο σχ. (16) φαίνεται επιγραμματικά ο βασικός μηχανισμός μεταβίβασης ενός εξωκυττάριου σήματος μέσα στο ΠΜΠ.



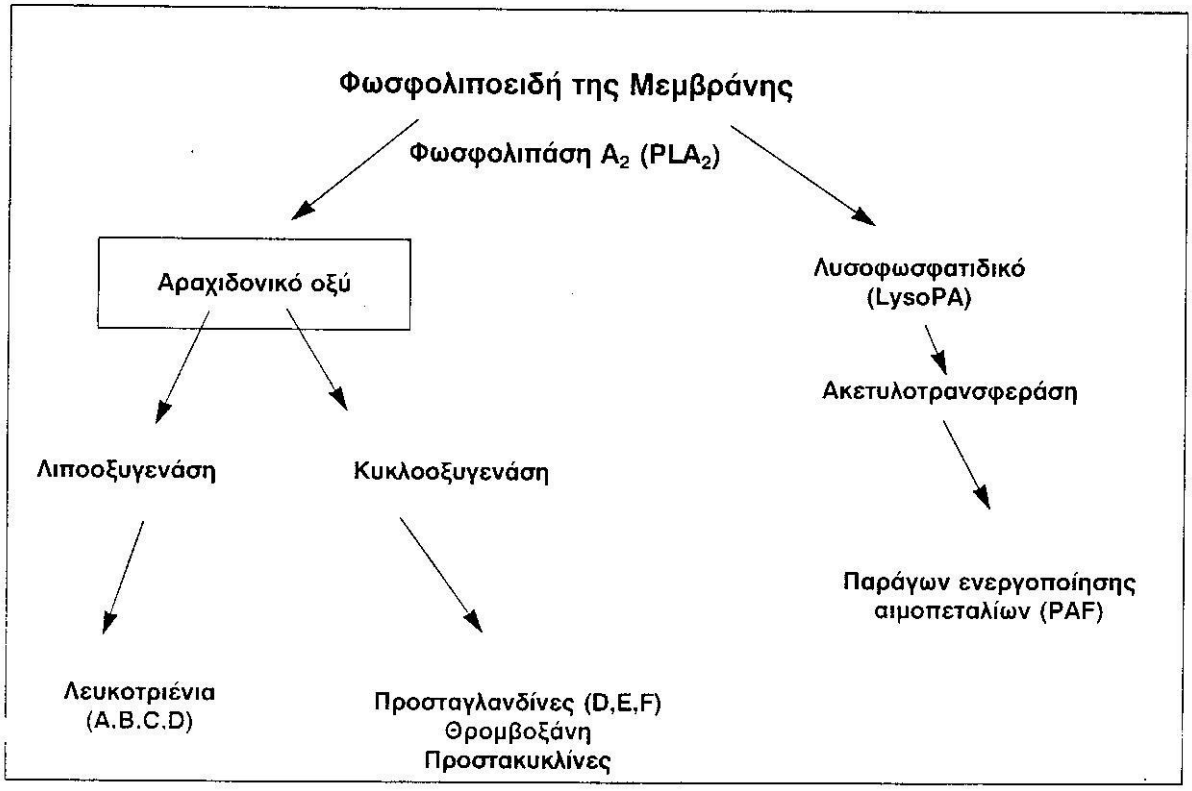
Σχήμα 16. *Στάδια ενεργοποίησης ΠΜΠ*

Ο παράγοντας που ενεργοποιεί το ΠΜΠ, π.χ. το χημειοπεπτίδιο, συνδέεται με το κύτταρο μέσω ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στη μεμβράνη του κυττάρου[167,168]. Το σήμα μεταφέρεται ενδοκυτταρίως μέσω των G-πρωτεϊνών (GTP-binding proteins). Το επόμενο βήμα είναι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) η οποία διασπά φωσφολιποειδή της μεμβράνης του κυττάρου με αποτέλεσμα τη γένεση δύο δευτέρων μεσολαβητών των inositol-1,4,5 trisphosphate (IP_3) και των 1,2-diacylglycerol(DG)[169]. Η IP3 διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και προκαλεί απελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες με αποτέλεσμα παροδική αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Η DG παραμένει στη μεμβράνη του κυττάρου όπου συμμετέχει στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)[168]. Εκτός της φωσφολιπάσης C ενεργοποιείται επίσης η φωσφολιπάση D μέσω της οποίας παράγεται το φωσφατιδικό οξύ (PA) το οποίο ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση A_2 (PLA_2) (σχ. 17). Η PLA_2 επάγει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιποειδή της μεμβράνης το οποίο μεταβολίζεται σε λευκοτριένες, θρομβοξάνες και προσταγλανδίνες[168] σχ. (18). Η ενδοκυττάρια αύξηση των ιόντων Ca^{++}, η ενεργοποίηση της PKC, το φωσφατιδικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ ενεργοποιούν το ενζυμικό σύμπλεγμα της NADPH οξειδάσης στη μεμβράνη του ΠΜΠ[168,170].

Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση των ΠΜΠ δεν ακολουθείται πάντα αυτή η σειρά των αντιδράσεων. Πολλά ερεθίσματα ενεργοποιούν τα ΠΜΠ χωρίς να χρησιμοποιούν όλους αυτούς τους μηχανισμούς, αλλά συνδέουν και ενεργοποιούν απ' ευθείας την πρωτεϊνική κινάση C (όπως ο phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)[171].



Σχήμα 17. *Παραγωγή φωσφατιδικού και λυσοφωσφατιδικού οξέος στα μακροφάγα του ανθρώπου*



Σχήμα 18. *Σύνθεση του αραχιδονικού οξέος και των προϊόντων του από τα φωσφολιπο-*

Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στη μεταβίβαση του σήματος και κατ' επέκταση στη ρύθμιση της λειτουργίας του κυττάρου εκτός της πρωτεϊνικής κινάσης C ενεργοποιούνται κι άλλες κινάσες όπως οι MAP κινάσες[140]. Έχει βρεθεί ότι η επίδραση της ενδοτοξίνης, της IL-1, του TNFa και ποικίλων άλλων stress ερεθισμάτων στα ΠΜΠ ενεργοποιεί την MAP κινάση P38 και την MAPKAP κινάση-2 (ή MEKK)[144]. Στα ΠΜΠ του ανθρώπου η MAPKAP κινάση-2 ενεργοποιείται και από τον χημειοτακτικό παράγοντα FMLP (φορμυλοπεπτίδιο) και το PMA[172]. Η ενεργοποίηση της P38 κινάσης από την MAPKAP κινάση-2 φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της PLA_2. Η ενεργοποίηση της MAPKAP κινάσης-2 αποτελεί μία άλλη εναλλακτική οδό στην ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης. Όταν τα ΠΜΠ ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες, η ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος και η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης γίνεται κυρίως μέσω των οδών των ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών[144, 173].

Η NADPH οξειδάση είναι ένα ένζυμο-κλειδί για τη λειτουργία των ΠΜΠ. Είναι σύμπλεγμα ενζύμων, (κυρίως των grp91-phox και p_{22}phox υποομάδων του κυτοχρώματος b_{558} που βρίσκονται στη μεμβράνη του κυττάρου και των P_{47}-phox και P_{67}-phox που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα), το οποίο δρα ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH στο μοριακό οξυγόνο. Η NADPH οξειδάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή φάση του ΠΜΠ και μεταναστεύει στη μεμβράνη του κυττάρου κατά την ενεργοποίηση του ΠΜΠ[174]. Η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης οδηγεί σε μία σειρά μεταβολικών αντιδράσεων, γνωστή ως «αναπνευστική δραστηριότητα» των ΠΜΠ (respiratory burst), κατά την οποίαν παράγονται ελεύθερες ρίζες[175-180], οι οποίες μαζί με τα πρωτεολυτικά ένζυμα της αποκοκκίωσης των ΠΜΠ φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς (δηλ. ευθύνονται για τη μικροβιοκτονία των ΠΜΠ)[176].

Κατά την αναπνευστική δραστηριότητα των ΠΜΠ παράγεται αρχικά ιόν υπεροξειδίου (O_2^-) από την αναγωγή του μοριακού O_2[181]. Το O_2^- αποτελεί την πρόδρομη μητρική ουσία όλων των μικροβιοκτόνων οξειδωτικών ουσιών που παράγονται από το ενεργοποιημένο ΠΜΠ. Αναγωγή του O_2^- οδηγεί σε σχηματισμό H_2O_2 μέσω του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD)[182].

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Παράγονται επίσης ρίζες υδροξυλίου (OH^-) και οξυγόνο απλής κατάστασης ($^1O_2$) με την ακόλουθη αντίδραση[183]:

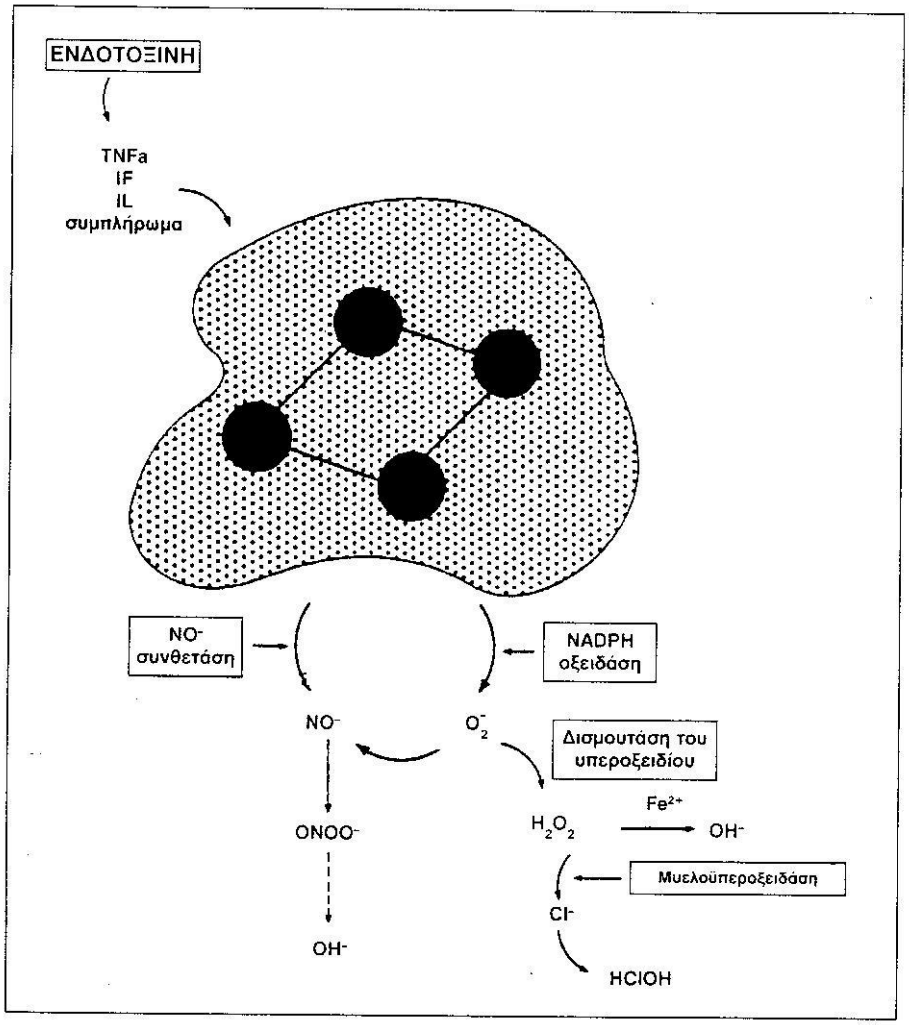
$$O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{Fe} OH + OH^- + {}^1O_2$$

Τα ενεργοποιημένα ΠΜΠ απελευθερώνουν επίσης ένζυμα, όπως τη μυελοϋπεροξειδάση[184], η οποία καταλύει την οξείδωση των αλογόνων (Cl^-)[185] παρουσία H_2O_2 σε υποχλωριώδες οξύ (HClOH) και σε $^1O_2$. Οι ρίζες OH^-, το $^1O_2$ και το HClOH είναι ουσίες με ιδιαίτερα ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση.

Τα τελευταία χρόνια πολύ συζητείται ο ρόλος μιας ελεύθερης ρίζας που παράγεται κι αυτή από την ενεργοποίηση των ΠΜΠ, το μονοξείδιο του αζώτου (NO^-)[177,186188]. Μέχρι το 1987 ο μόνος βιοχημικός μηχανισμός που μπορούσε να ερμηνεύσει την κυτταροτοξικότητα των ενεργοποιημένων μακροφάγων και ΠΜΠ ήταν η σύνθεση ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τη NADPH οξειδάση. Όμως ο μηχανισμός αυτός δεν ήταν επαρκής για να ερμηνεύσει το γεγονός ότι μακροφάγα με γενετική έλλειψη της NADPH οξειδάσης (όπως π.χ. στη χρόνια κοκκιωματώδη νόσο) ήταν κυτταροτοξικά σε καρκινικά κύτταρα και πρωτόζωα. Την απάντηση στο ερώτημα αυτό έδωσε η ανακάλυψη της βιοσύνθεσης του NO^- από το αμινοξύ L-αργινίνη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο NO^- συνθετάση, η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες παρουσιάζει μικρή δραστικότητα, ενώ διέγερση των ΠΜΠ (π.χ. από LPS ή INF-γ) προκαλεί μαζική βιοσύνθεση της NO^- συνθετάσης σε λίγες ώρες και παραγωγή μεγάλης ποσότητας NO^-.[189] Το NO^- αντιδρά επίσης με το O_2^- για να σχηματίσει ισχυρά οξειδωτική ουσία, το υπεροξυνιτρώδες ιόν (peroxynitrate).

$$NO^- + O_2^- \rightarrow ONOO^- \dashrightarrow OH^-$$

Το NO^- παράγεται από διάφορα κύτταρα και η δράση του είναι πολλαπλή. Είναι ένας ενδοδιακυττάριος μεσολαβητής ο οποίος έχει ως στόχο του πρωτεΐνες – ένζυμα και κλάσματα του DNA που περιέχουν θειόλες ή και σίδηρο. Το αποτέλεσμα είναι ότι το NO^- δρα τοξικά ενάντια σε μικρόβια και καρκινικά κύτταρα αλλά και ως ρυθμιστής σε διάφορα συστήματα του οργανισμού[189-191] π.χ. το καρδιαγγειακό, το νευρομυικό, το ανοσοβιολογικό. Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών O_2^- και του NO^- από τα ενεργοποιημένα ΠΜΠ φαίνεται σχηματικά στο σχ. (19).



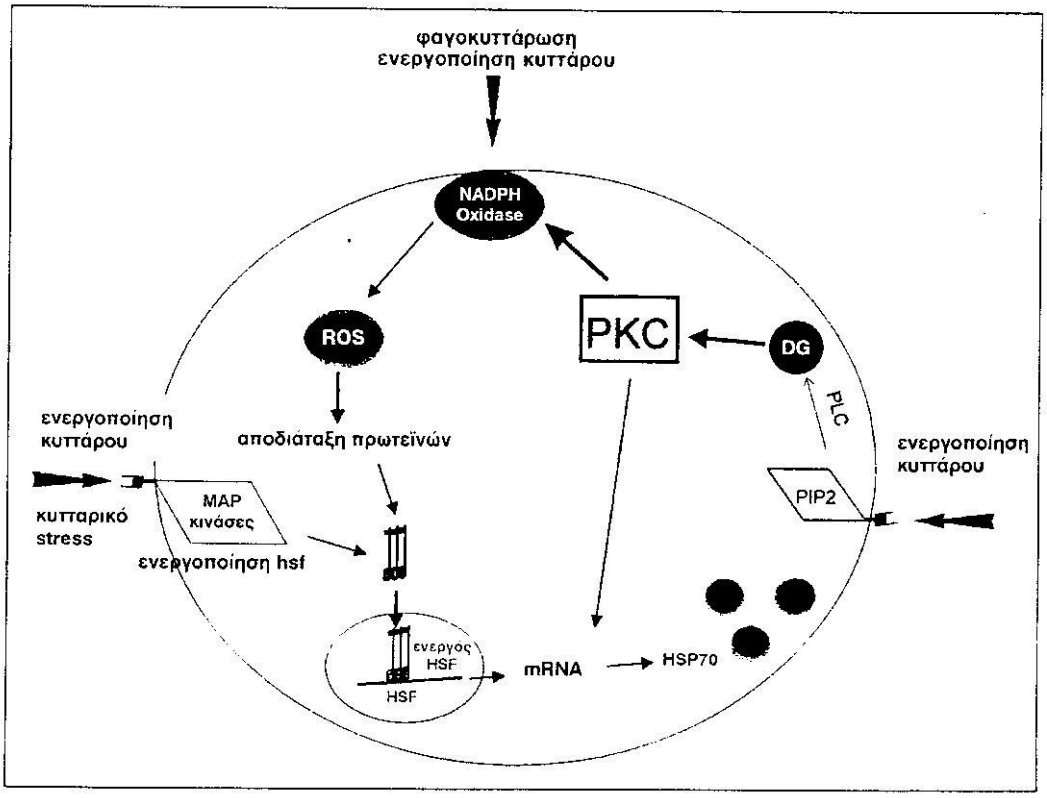
Σχήμα 19. *Παραγωγή ελευθέρων ριζών από ενεργοποιημένα πολυμορφοπύρηνα*

Στην κυτταροτοξικότητα και τη μικροβιοκτόνο ικανότητα των ΠΜΠ, εκτός των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και του NO^-, συμμετέχουν και διάφορα ένζυμα που απελευθερώνονται από τα ΠΜΠ κατά την ενεργοποίησή τους. Σε συνθήκες ηρεμίας των κυττάρων τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Όταν τα ΠΜΠ ενεργοποιηθούν τα ένζυμα μεταναστεύουν στην κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνονται είτε στο φαγοσώμιο των ΠΜΠ, είτε στο περιβάλλον τους (αποκοκκίωση)[192]. Τα ένζυμα των ΠΜΠ αφ' ενός μεν έχουν μικροβιοκτόνο ικανότητα (όπως η μυελοϋπεροξειδάση, οι πρωτεάσες και η λυσοζύμη των αζουρόφιλων κοκκίων, η λυσοζύμη και η λακτοφερρίνη των ειδικών κοκκίων), αφ' ετέρου βοηθούν στη μετανάστευση των ΠΜΠ στους ιστούς (ελαστάση, κολλαγενάση, γελατινάση κ.ά.)[193]. Επίσης, κατά την αποκοκκίωση των ΠΜΠ τα κοκκία εμπλουτίζουν την κυτταρική μεμβράνη με διάφορα πρωτεϊνικά μόρια όπως το κυτόχρωμα b_{558}[174] που αποτελεί βασικό συστατικό του συμπλέγματος της NADPH οξειδάσης

Τελικός στόχος όλων αυτών των προαναφερθεισών λειτουργιών (ενεργοποίηση ΠΜΠ, παραγωγή ROS και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως το αραχιδονικό οξύ και τα προϊόντα του, οι κυτταροκίνες κλπ) είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών.

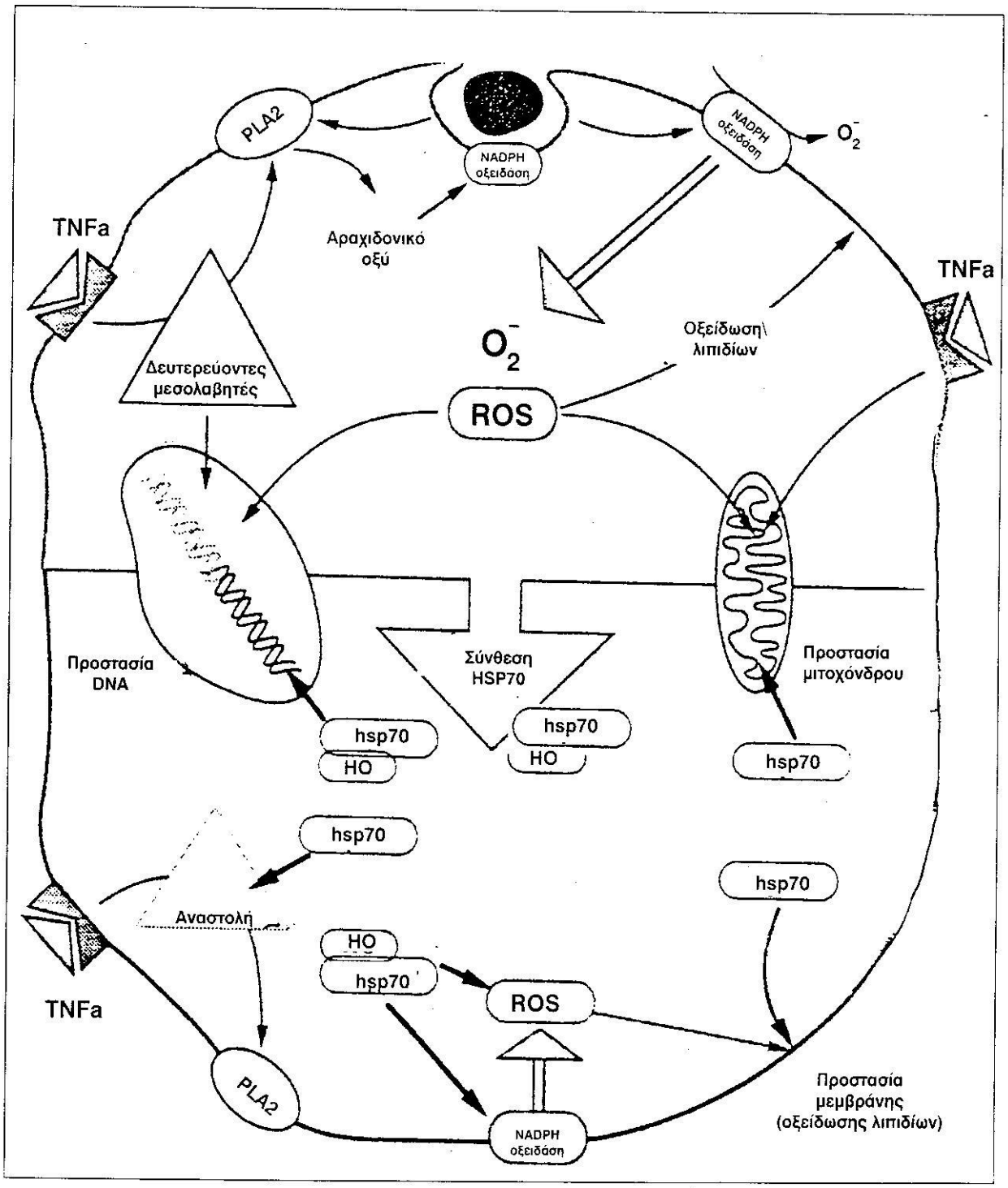
Εν τούτοις, οι μικροβιοκτόνες αυτές ουσίες και κυρίως οι ROS εκτός της ευεργετικής τους δράσης (δηλ. την καταπολέμηση των μικροοργανισμών) έχουν συγχρόνως τοξική δράση και για το ίδιο το κύτταρο και τους ιστούς του ξενιστού[179]. Οι ROS προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων με αποτέλεσμα βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης, αποδιάταξη των πρωτεϊνών, βλάβη του DNA, καθώς επίσης και διαταραχή της δομής και λειτουργίας των μιτοχονδρίων[179]. Οι διαταραχές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα το κύτταρο να μην είναι πλέον ικανό να επιτελέσει τις φυσιολογικές λειτουργίες του και να οδηγείται σε θάνατο με τη διαδικασία της λύσης ή της απόπτωσης.

Ωστόσο, οι ROS κυρίως αλλά και οι διάφοροι μεσολαβητές της φλεγμονής και διάφορες κυτταροκίνες ενεργοποιούν τη σύνθεση των hsp, μέσω διαφόρων κυτταρικών οδών, τόσο στα ΠΜΠ όσο και στα μονοκύτταρα/μακροφάγα[194-198]. Στο (σχ.20) περιγράφεται συνοπτικά η ρύθμιση των hsp στα φαγοκύτταρα του ανθρώπου με μηχανισμό που επεμβαίνει στη μεταγραφή και στη μετάφραση των hsp.



Σχήμα 20. *Η σύνθεση hsp κατά τη φαγοκυττάρωση ενεργοποιείται είτε από την παραγωγή των ROS που προκαλούν αποδιάταξη των πρωτεϊνών, είτε από*

Οι hsp, οι οποίες παράγονται στα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση, προστατεύουν τα κύτταρα του ξενιστού από τη βλαπτική επίδραση των ROS και των κυτταροκινών(TNF, IL_1, κ.ά.)[199-203] (σχ. 21)



Σχήμα 21. *Προστασία του κυττάρου. Ο ρόλος των ROS, TNF-a και hsp70 στην ενεργοποίηση του μακροφάγου, στην οξειδωτική βλάβη και στην προστασία του κυττάρου. Οι hsp70 προστατεύουν το κύτταρο σε διάφορα επίπεδα*

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε αν τα ΠΜΠ των νεογνών έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν hsp70 και να μελετήσουμε εάν η σύνθεση αυτή των hsp70 δύναται να προστατεύσει τη λειτουργικότητα των ΠΜΠ και συγκεκριμένα την παραγωγή O^{-}_{2} σε συνθήκες stress, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η σήψη και η υποξία.

ΥΛΙΚΟ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν ΠΜΠ τα οποία ελήφθησαν από τις παρακάτω ομάδες:

Στην πρώτη ομάδα περιελήφθησαν 13 τελειόμηνα νεογνά ηλικίας 5-30 ημερών, κανονικού βάρους για την ηλικία κύησης, χωρίς συγγενείς ανωμαλίες, λοίμωξη, περιγεννητική ασφυξία ή κάποια άλλη σοβαρή περιγεννητική κατάσταση, που νοσηλεύονταν στο τμήμα για ήπια προβλήματα (αναγωγές, ελαφρές διάρροιες κ.λπ.).

Στη δεύτερη ομάδα περιελήφθησαν 10 τελειόμηνα νεογνά υπό stress, ηλικίας 0-30 ημερών, που έπασχαν από σοβαρή μικροβιακή λοίμωξη (7) ή περιγεννητική ασφυξία (3). Από τα νεογνά με λοίμωξη τα 4 είχαν πυρετό (>38,5°C), ενώ τα υπόλοιπα ήταν απύρετα όταν περιελήφθησαν στη μελέτη.

Στην τρίτη ομάδα (ομάδα ενηλίκων) περιελήφθησαν 13 νεαροί υγιείς ενήλικες. Όλες οι αιμοληψίες από τα νεογνά έγιναν στο πλαίσιο των συνήθων αιμοληψιών των απαραίτητων για τη νοσηλεία τους. Από τους ενήλικες ελήφθη αίμα με τη συγκατάθεσή τους.

ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΩΝ (ΠΜΠ)

Με φλεβοκέντηση ελήφθησαν 5 ml φλεβικού αίματος (με αντιπηκτικό EDTA) και απομονώθηκαν τα ΠΜΠ. Για το διαχωρισμό των ΠΜΠ από τα άλλα κύτταρα του αίματος χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή της μεθόδου των Boyum.[204,205] Σε κωνικό αποστειρωμένο σωληνάριο επιστιβάζονται διαδοχικά 3ml Histopaque-1119, 3ml Histopaque-1077 και ολικό αίμα όγκου 4-5 ml. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 2000 g. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται οι στιβάδες του πλάσματος, των μονοκυττάρων και των ΠΜΠ, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθιζάνουν. Ακολούθως συλλέγεται η στιβάδα των ΠΜΠ και τα κύτταρα υποβάλλονται σε πλύση με το ομόλογο πλάσμα (platelet poor plasma, PPP) με φυγοκέντρηση στις 2000 g για 10 λεπτά. Κατόπιν συλλέγονται τα ΠΜΠ που έχουν ήδη καθιζήσει, πλένονται με Phosphate-Buffer Saline (PBS) για 10 λεπτά, αραιώνονται με 500μl Dulbecco's PBS (PH 7,4) και μετρώνται. Όλα τα στάδια διαχωρισμού των ΠΜΠ από το ολικό αίμα γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες στείρες. Το ποσοστό των ΠΜΠ στο τελικό υλικό ήταν μεγαλύτερο των 95%, όπως διαπιστωνόταν με επίστρωση και μικροσκοπική εξέταση, ενώ το ποσοστό των ζώντων ΠΜΠ ήταν επίσης μεγαλύτερο των 95%, όπως διαπιστωνόταν με τη μέθοδο με tryptan-blue.

Στα απομονωθέντα ΠΜΠ εκτιμήθηκε:

I) η σύνθεση των HSP70 και

II) η παραγωγή O_2^-, μητρικής ουσίας των μικροβιοκτόνων ελευθέρων ριζών των ΠΜΠ.

I. ΣΥΝΘΕΣΗ HSP70

Για την εκτίμηση της σύνθεσης των HSP70 ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

1. Επώαση των ΠΜΠ

2. Απομόνωση και συλλογή όλων των πρωτεϊνών του κυττάρου.

3. Διαχωρισμός και ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης - SDS (Sodium Dodecyl Salt) 10% και
4. Ανίχνευση των hsp70 με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (Western - blotting).

1. Επώαση ΠΜΠ

α) Επώαση ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων

Μετά την απομόνωση των ΠΜΠ διαχωρίζονται τρία δείγματα από κάθε άτομο (νεογνό ή ενήλικα). Κάθε δείγμα περιέχει ίδιο αριθμό κυττάρων (2 x 10^6) και αραιώνεται σε 500 μl RPMI 1640 εμπλουτισμένο με Clutamine και FCS (Fetal calf serum) 10%. Το πρώτο δείγμα επωάζεται στους 37°C επί 30 λεπτά και τα άλλα δύο δείγματα επωάζονται στους 42°C, επίσης για 30 λεπτά. Οι επωάσεις γίνονται ταυτόχρονα σε ανακινούμενα υδατόλουτρα. Μετά την επώαση όλα τα δείγματα αφήνονται στους 37°C επί 3 ώρες προκειμένου να «ηρεμήσουν» τα κύτταρα. Ακολούθως, το ένα από τα δείγματα που είχε επωαστεί στους 42°C επωάζεται για δεύτερη φορά στους 42°C επί 30 λεπτά και στη συνέχεια αφήνεται και πάλι να «ηρεμήσει» επί 3 ώρες στους 37°C.

β) Επώαση ΠΜΠ νεογνών υπό stress

Αφού απομονώθηκαν τα ΠΜΠ διαχωρίστηκαν δύο δείγματα από κάθε ασθενή. Κάθε δείγμα περιείχε ίδιο αριθμό ΠΜΠ (2 x 10^6) και αραιώθηκαν σε 500 μl RPMI 1640 εμπλουτισμένο με Glutamine και FCS 10%. Το πρώτο δείγμα επωάστηκε στους 42°C επί 30 λεπτά και αφέθηκε να «ηρεμήσει» στους 37°C επί 3 ώρες. Το δεύτερο δείγμα των ΠΜΠ αμέσως μετά το διαχωρισμό του ακολούθησε το επόμενο στάδιο της απομόνωσης των πρωτεϊνών.

2. Απομόνωση και συλλογή των πρωτεϊνών των ΠΜΠ

Πολυμορφοπύρηνα από κάθε δείγμα και ομάδα (δηλ. από τα υγιή νεογνά, τους ενήλικες και τα νεογνά υπό stress), μετά την επώασή τους, τίθενται σε 1 ml TCA (tetrachloroacetic acid) στους 4°C επί μία ώρα για να γίνει καθίζηση και συγκέντρωση (precipitation) των κυττάρων. Ακολούθως αφήνονται σε πάγο για 5 λεπτά προκειμένου να διακοπεί κάθε αντίδραση και να αποκτήσουν τα κύτταρα θερμικό συγχρονισμό. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε ψυκτική φυγόκεντρο (4°C) στις 2000g επί 10 λεπτά και το ίζημα πλένεται τρείς φορές με κρύο PBS

(PH7,2) στις 400 g. Το ίζημα συλλέγεται και τα κύτταρα λύονται με SDS sample buffer (62,5 mM, Tris HCl PH 6,8, 10% Clycerol, 5% b-mercaptoethanol, 2,3% SDS, 0,05% bromophenol blue) και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μM Leupeptin), σε αναλογία 100λ sample buffer/1x10^6 κύτταρα. Η λύση των κυττάρων ολοκληρώνεται με τη βοήθεια υπερήχων. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία 4°C επί 10 λεπτά στις 2000g και το υπερκείμενο υλικό συλλέγεται και φυλάσσεται στους –20°C. Το υλικό αυτό αποτελείται από τις πρωτεΐνες των κυττάρων.

3. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες των κυττάρων υπόκεινται σε σύντομο βρασμό επί 5 λεπτά, προκειμένου να αποδιαταχθούν. Στη συνέχεια αναλύονται σε γέλη πολυακρυλαμίδης-SDS 10% με συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης.[206] Αφού αναλυθούν στη γέλη μεταφέρονται σε νιτροκυτταρίνη με ειδική συσκευή μεταφοράς μέσω ηλεκτρικού πεδίου. Η μεταφορά γίνεται σε 4°C επί 16 ώρες και υπό συνεχή ανάδευση[207].

4. Ανίχνευση των HSP70 με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα[208,209] (Western-blotting)

Η νιτροκυτταρίνη υποβάλλεται σε πολλαπλές πλύσεις και καθαρίζεται από τις μη ειδικές πρωτεΐνες με ειδικό «blocking solution». Στη συνέχεια η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSP70 (Santa-Cruz, Anti-HSP70) υπό συνεχή ανακίνηση, επί 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση μιάς ώρας με «Horseradish peroxidase-conjugated» αντίσωμα στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας[210] (Super signal Ultra Chemiluminescent substrate, Pierce) ανιχνεύεται το σήμα της HSP70.

ΙΙ. ΠΑΡΑΓΩΓΗ O^-_2 ΑΠΟ ΤΑ ΠΜΠ

α) Παραγωγή O^-_2 από ΠΜΠ υγιών νεογνών (13) και υγιών ενηλίκων (13).

Μετά την απομόνωση των ΠΜΠ διαχωρίζονται τρία δείγματα από κάθε άτομο (νεογνό ή ενήλικα) που περιέχουν ίδιο αριθμό κυττάρων ($1x10^6$). Το πρώτο δείγμα επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά, το δεύτερο δείγμα στους 42°C για 30 λεπτά και το τρίτο δείγμα επωάστηκε αρχικά στους 42°C για 30 λεπτά, αφήνεται να «ηρεμήσει» για 3 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια επωάζεται για δεύτερη φορά στους 42°C για 30 λεπτά.

β) Παραγωγή O^-_2 από ΠΜΠ νεογνών υπό stress (10).

Μετά την απομόνωση των ΠΜΠ διαχωρίζονται τρία δείγματα από κάθε άτομο, με τον ίδιο αριθμό κυττάρων ($1x10^6$). Στο πρώτο δείγμα η μέτρηση του O^-_2 γίνεται αμέσως μετά το διαχωρισμό του δείγματος. Το δεύτερο δείγμα επωάστηκε στους 42°C για 30 λεπτά και ακολούθως μετρήθηκε το παραγόμενο O^-_2. Το τρίτο δείγμα αρχικά επωάστηκε στους 42°C για 30 λεπτά, αφέθηκε να «ηρεμήσει» στους 37°C επί 3 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκε για δεύτερη φορά στους 42°C για 30 λεπτά. Ακολούθως μετρήθηκε η παραγωγή O^-_2.

Σε όλα τα δείγματα η μέτρηση του O^-_2 έγινε με βάση την αναγωγή του κυτοχρώματος C[211,212]. Η παραγωγή του O^-_2 μετρήθηκε ως η διαφορά στην απορρόφηση στα 550 nm μεταξύ δύο σωληναρίων από κάθε δείγμα, όπου στο ένα παράγεται O^-_2 (και ανάγει το κυτόχρωμα C), ενώ στο άλλο σωληνάριο αναστέλλεται η παραγωγή του O^-_2 με την προσθήκη SOD (superoxide dismutase). Τα δύο αυτά σωληνάρια περιείχαν υλικό τελικού όγκου 1ml το καθένα. Το πρώτο σωληνάριο-δείγμα (S) περιείχε διάλυμα ΠΜΠ (1×10^6), 50 μl κυτοχρώματος C (horseheat cytochrome C type V, SIGMA) και 25μλ Dulbecco's medium (D-PBS, GIBCO).Το δεύτερο σωληνάριο -μάρτυρας (R) περιείχε τα ίδια με τη διαφορά ότι αντί για 25μl D-PBS περιείχε ίσον όγκο SOD (bovine-erythrocyte SOD 3000μον/mg). Τα δύο σωληνάρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 25μl FMLP (formyl-peptide) σε συγκέντρωση 4×10^{-6} M, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 10^{-7} M. Τα σωληνάρια παραμένουν στο υδατόλουτρο επί 6 λεπτά μετά την προσθήκη του FMLP και ακολουθεί διακοπή της αντίδρασης με την άμεση τοποθέτησή τους σε πάγο. Στη συνέχεια τα διαλύματα φυγοκεντρούνται σε ψυκτική φυγόκεντρο (4° C), σε 15.000 rpm, για 5

λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 550 nm και των δύο σωληναρίων (του S και του R). Μετρείται επίσης η απορρόφηση των σωληναρίων στο ίδιο μήκος κύματος με περιεχόμενο απεσταγμένο νερό (S′ και R′) αντίστοιχα. Η τιμή της απορρόφησης εκφράζεται σε nanomoles αναγμένου κυτοχρώματος C (nmol O^-_2/1x10^6 κύτταρα) σύμφωνα με την εξίσωση:

O^-_2ng/1x10^6 κύτταρα = [(S-S′) - (R-R′)]/21.

Ο τύπος αυτός προκύπτει βάσει του συντελεστού κλίσεως (extinction coefficient) για τη διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του αναγμένου κυτοχρώματος μείον την απορρόφηση του οξειδωμένου κυτοχρώματος C και ισούται με 21 x 10^3 cm^2/M.[213]

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τις δοκιμασίες pair samples t-test και independent samples t-test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ι. ΣΥΝΘΕΣΗ HSP70

1. Σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ νεογνών και ενηλίκων

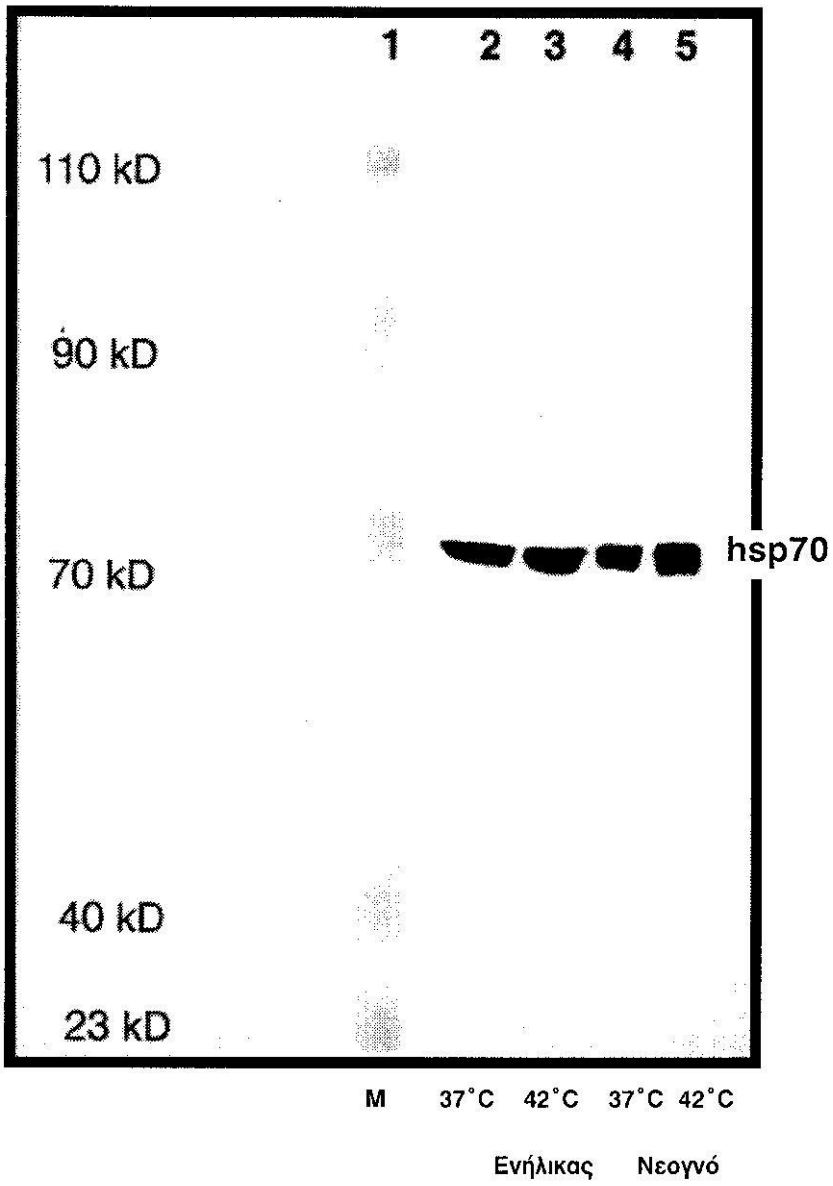
Όπως αναφέρθηκε ήδη, ανιχνεύθηκε με Western-blotting η σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ 13 φυσιολογικών νεογνών και στα ΠΜΠ 13 φυσιολογικών ενηλίκων μετά από έκθεσή τους στους 37° C (hsp70 constitutive) και στους 42° C (hsp70 stress). Διαπιστώθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών είναι ικανά να συνθέσουν hsp70 όπως και εκείνα των ενηλίκων εικ. (1). Επιπλέον, στους 42°C τα ΠΜΠ των νεογνών (όπως και των ενηλίκων) συνθέτουν hsp70 σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτές που συνθέτουν σε φυσιολογική θερμοκρασία (37° C). Εντούτοις, η σύνθεση των hsp70 από τα ΠΜΠ των νεογνών στους 42°C φαίνεται να υπολείπεται εκείνης των ενηλίκων στην ίδια θερμοκρασία (Εικ. 1).

2. Σύνθεση hsp70 μετά από επίδραση διαδοχικών θερμικών stress

Όπως ήδη αναφέρθηκε, διαχωρίστηκαν τρία δείγματα (με τον ιδιο αριθμό ΠΜΠ) από κάθε άτομο νεογνό ή ενήλικα. Το πρώτο δείγμα επωάστηκε στους 37°C για 30 λεπτά, το δεύτερο δείγμα στους 42°C για 30 λεπτά και ένα τρίτο επωάσθηκε αρχικά στους 42° C για 30 λεπτά, αφέθηκε να «ηρεμήσει» για 3 ώρες στους 37° C και επωάστηκε για δεύτερη φορά στους 42° C για 30 λεπτά. Μετά την επώαση κάθε δείγμα αφέθηκε να «ηρεμήσει» για 3 ώρες στους 37° C και ελέγχθηκε σε καθένα η σύνθεση hsp70 με τη μέθοδο Western - blotting.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, ενώ η σύνθεση των hsp70 μετά το πρώτο θερμικό stress είναι υψηλή σε σχέση με τη σύνθεση αυτών υπό φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, ύστερα από το δεύτερο θερμικό stress η σύνθεση των hsp70 υπολείπεται εκείνης του πρώτου θερμικού stress. Τούτο παρατηρείται τόσο στα ΠΜΠ των νεογνών όσο και των ενηλίκων (εικ. 2).Εν τούτοις, φαίνεται ότι στα ΠΜΠ

Επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στη σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ υγιούς νεογνού και ενήλικα (in vitro stress)



Στήλη 1: marker κυτταρικών πρωτεϊνών

Στήλη 2: hsp70 ενήλικα στους 37° C

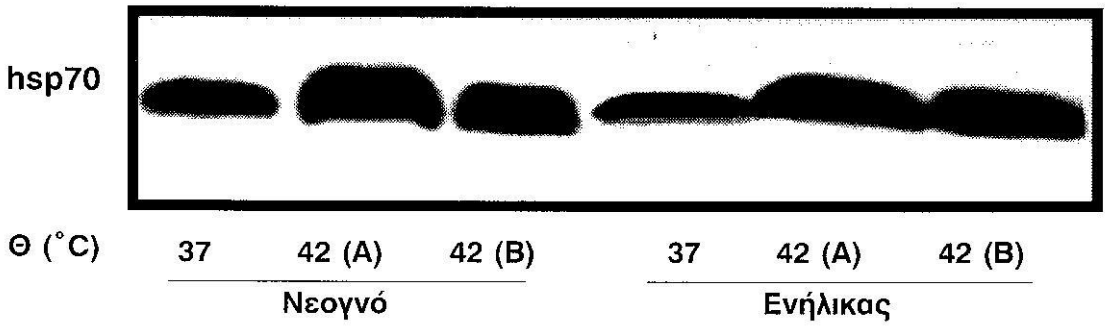
Στήλη 3: hsp70 ενήλικα στους 42° C

Στήλη 4: hsp70 νεογνού στους 37 ° C

Στήλη 5: hsp70 νεογνού στους 42 ° C

Εικόνα (1)

Επίδραση διαδοχικών θερμικών stress στη σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ υγιούς νεογνού και ενήλικα



A: 1ο stress

B: 2ο stress

Εικόνα (2)

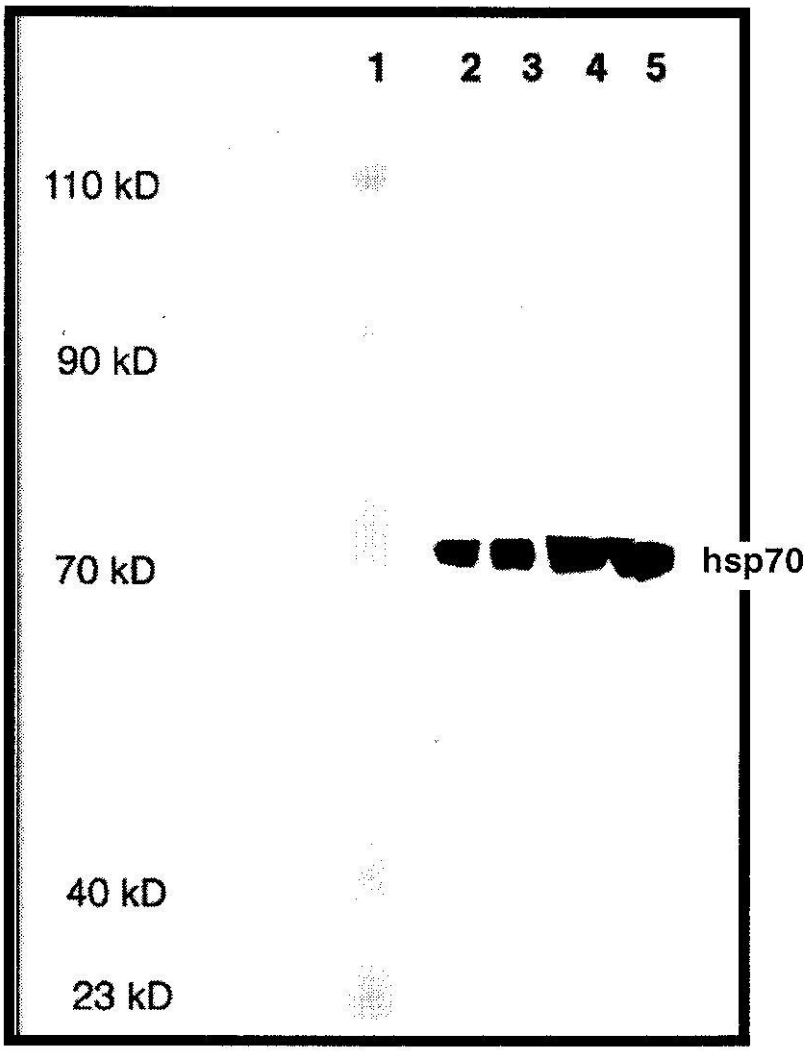
των νεογνών η μείωση των επιπέδων των hsp70 μετά το δεύτερο θερμικό stress είναι μεγαλύτερη αυτής που παρατηρείται στα ΠΜΠ των ενηλίκων (εικ. 2).

3. Σύνθεση hsp70 από τα νεογνά σε stress

Ελέγχθηκε η σύνθεση των hsp70 στα ΠΜΠ 10 νεογνών που βρίσκονταν σε stress (7 έπασχαν από μικροβιακή λοίμωξη και 3 από περιγεννητική ασφυξία). Τα ΠΜΠ που απομονώθηκαν από κάθε νεογνό χωρίστηκαν σε δύο δείγματα που περιείχαν τον ίδιο αριθμό κυττάρων (2×10^6). Στο ένα δείγμα η σύνθεση των hsp70 προσδιορίστηκε ευθύς μόλις απομονώθηκαν τα κύτταρα, ενώ στο άλλο αφού τα ΠΜΠ επωάσθηκαν στους 42° C επί 30 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκαν να «ηρεμήσουν» στους 37° C επί 3 ώρες.

Διαπιστώθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονταν σε stress παράγουν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες hsp70 (εικ. 3,4) σε σύγκριση με τα υγιή νεογνά. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των επιπέδων των hsp70 που παράγουν τα νεογνά με περιγεννητική ασφυξία και αυτών με λοίμωξη. Επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των σηπτικών νεογνών που παρουσιάζουν πυρετό και αυτών που ήταν απύρετα. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι ο αριθμός των νεογνών στις ομάδες αυτές (δηλ. νεογνά με ανοξαιμία και περιγεννητική ασφυξία και σηπτικά νεογνά με ή χωρίς πυρετό) ήταν μικρός. Ενδιαφέρον είναι ότι τα επίπεδα των hsp70 που παράγουν τα ΠΜΠ των νεογνών σε stress είναι σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με εκείνα που παράγουν τα ΠΜΠ υγιών νεογνών ακόμα και μετά την έκθεσή τους σε θερμικό stress (έκθεση στους 42° C) εικ. (3,4). Τέλος, ενώ τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται υπό συνθήκες stress συνθέτουν σημαντική ποσότητα hsp70, όταν στη συνέχεια εκτεθούν σε in vitro θερμικό stress συνθέτουν μικρότερη ποσότητα hsp70. Η επίδραση των θερμικών stress στην παραγωγή hsp70 τόσο στα υγιή νεογνά όσο και στα νεογνά με stress φαίνεται στην εικ. (5).

Σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ υγιών και σηπτικών νεογνών

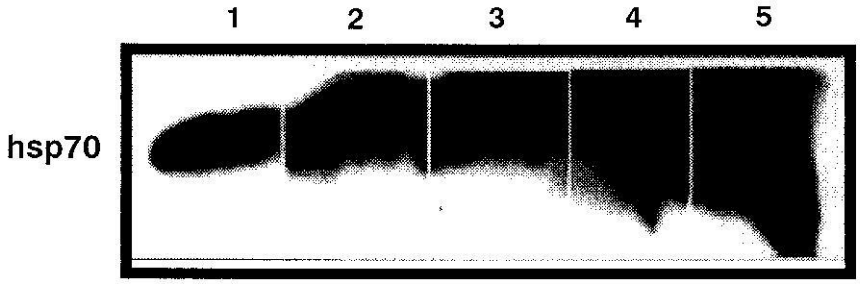


Στήλη 1: marker κυτταρικών πρωτεϊνών Στήλη 2: hsp70 υγιούς νεογνού στους 37° C

Στήλη 3: hsp70 υγιούς νεογνού στους 42° C Στήλη 4,5: hsp70 (2) σηπτικών νεογνών

Εικόνα (3)

Σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ υγιούς νεογνού και νεογνών υπό stress (in vivo)



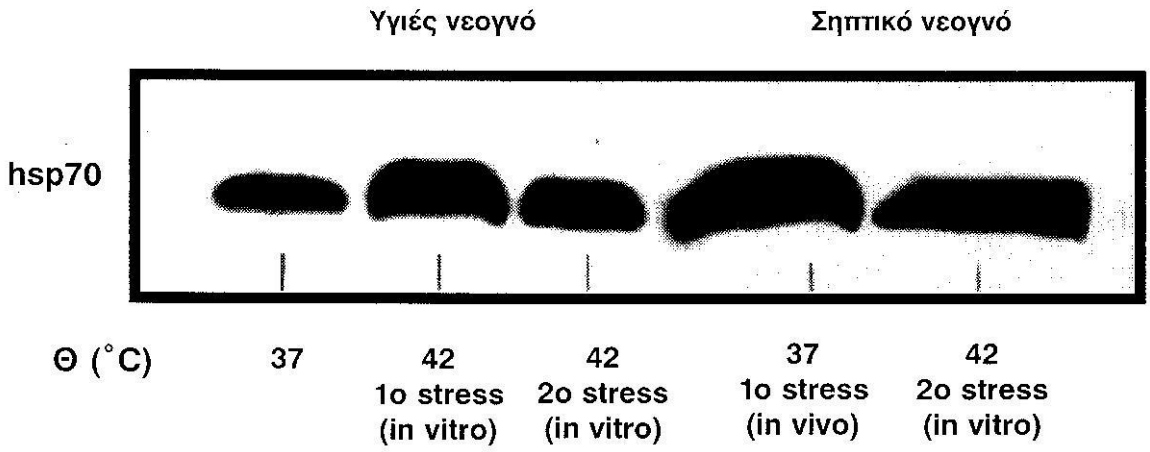
Στήλη 1: hsp 70 υγιούς νεογνού στους 37° C

Στήλη 2: hsp 70 υγιούς νεογνού στους 42° C

Στήλες 3,4,5: hsp70 (3) stress - νεογνών

Εικόνα (4)

Επίδραση διαδοχικών stress στη σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ υγιούς και σηπτικού νεογνού



Εικόνα (5)

ΙΙ. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ

1. Παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων μετά από επίδραση θερμικών stress

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα ΠΜΠ μετά την απομόνωσή τους διαχωρίστηκαν σε δύο δείγματα, με ίσο αριθμό κυττάρων ($1X10^6$) από κάθε άτομο. Το ένα δείγμα εκτέθηκε σε θερμοκρασία 37°C επί 30 λεπτά και το άλλο σε θερμοκρασία 42°C επίσης για 30 λεπτά. Και στα δύο δείγματα μετρήθηκε η παραγωγή O^-_2.

Διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές (σε επίπεδο άνω του 99%) του O^-_2 που παράγεται από τα ΠΜΠ που είχαν εκτεθεί σε έντονο θερμικό stress (42°C) σε σχέση με το O^-_2 που παράγεται από τα ΠΜΠ που παρέμειναν σε φυσιολογικές συνθήκες (37°C) εικ. (6,7,8). Η διαφορά αυτή βρέθηκε ότι είναι το ίδιο σημαντική στα ΠΜΠ των νεογνών όσο και των ενηλίκων.

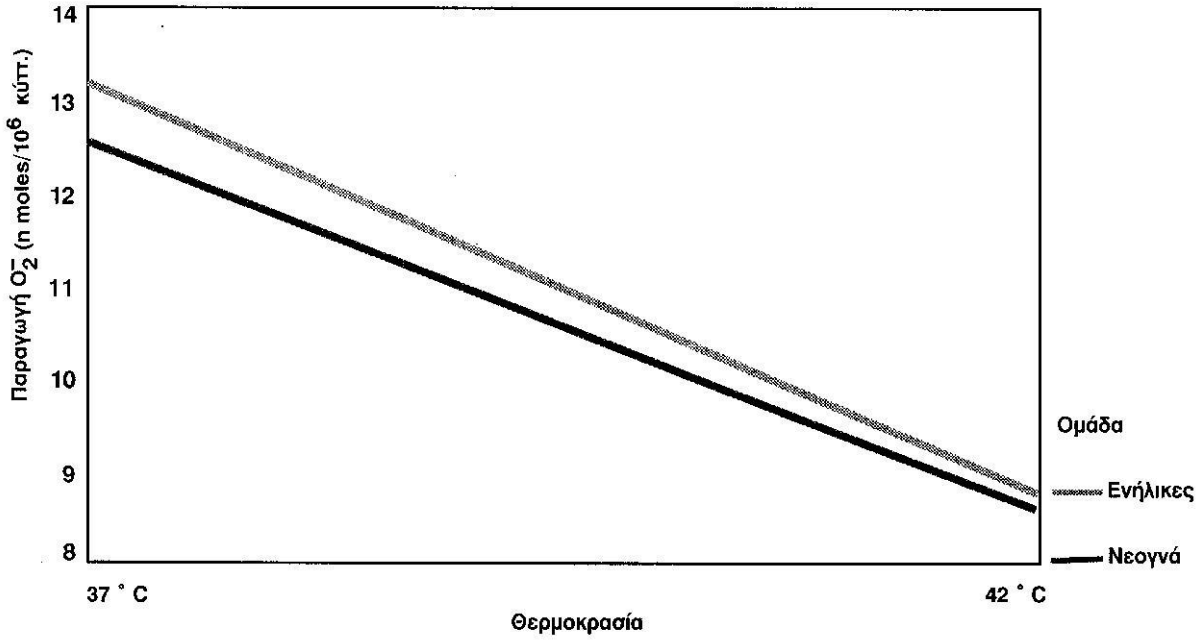
2. Παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων μετά την επίδραση πολλαπλών θερμικών ερεθισμάτων.

Με ανάλογο, όπως προηγούμενα, τρόπο διαχωρίστηκαν τρία δείγματα κυττάρων από κάθε άτομο και μετρήθηκε σ'αυτά η παραγωγή του O^-_2. Το πρώτο δείγμα είχε επωαστεί στους 37°C για 30 λεπτά, το δεύτερο στους 42°C επίσης για 30 λεπτά και το τρίτο είχε επωαστεί στους 42° C δύο φορές με μεσοδιάστημα ηρεμίας (στους 37° C) για 3 ώρες.

Όπως διαπιστώθηκε και από τα προηγούμενα πειράματα, τα ΠΜΠ που είχαν εκτεθεί σε έντονο θερμικό stress παρήγαγαν σε σημαντικά χαμηλότερα ποσά O^-_2 συγκριτικά με εκείνα τα οποία βρίσκονταν σε συνθήκες ηρεμίας (37°C). Τα κύτταρα όμως που εκτέθηκαν για δεύτερη φορά σε θερμικό stress είχαν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο άνω του 99%) υψηλότερες τιμές O^-_2 από εκείνα που είχαν εκτεθεί σε ένα μόνο stress. Μάλιστα, τα επίπεδα του O^-_2 στα ΠΜΠ που εκτέθηκαν για δεύτερη φορά σε έντονο θερμικό stress ήταν παρόμοια με τα επίπεδα O^-_2 που είχαν τα κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) εικ. (9,10, 11).

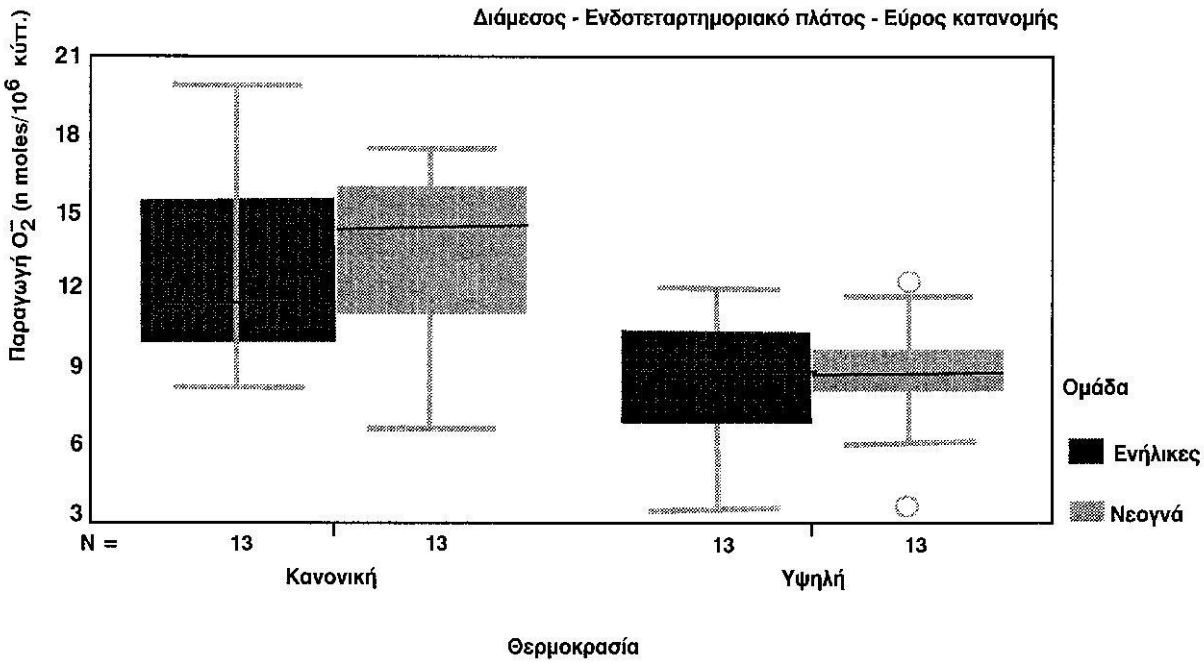
Οι διακυμάνσεις αυτές στην παραγωγή του O^-_2 από τα ΠΜΠ μετά την έκθεσή τους σε διαδοχικά θερμικά stress αφορούσαν τόσο στα ΠΜΠ των νεογνών όσο και των ενηλίκων.

Κατανομή των τιμών παραγωγής O_2^- των ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων μετά την επίδραση ενός θερμικού stress (42°C)

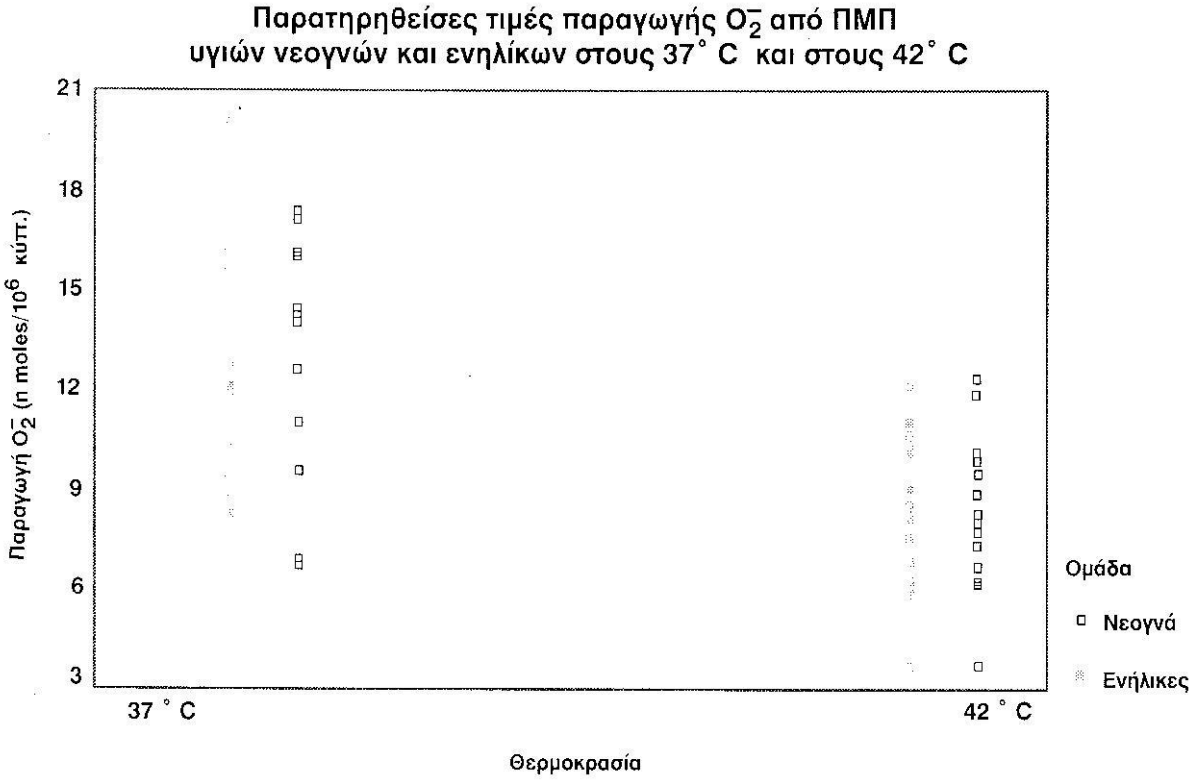


Εικόνα (6)

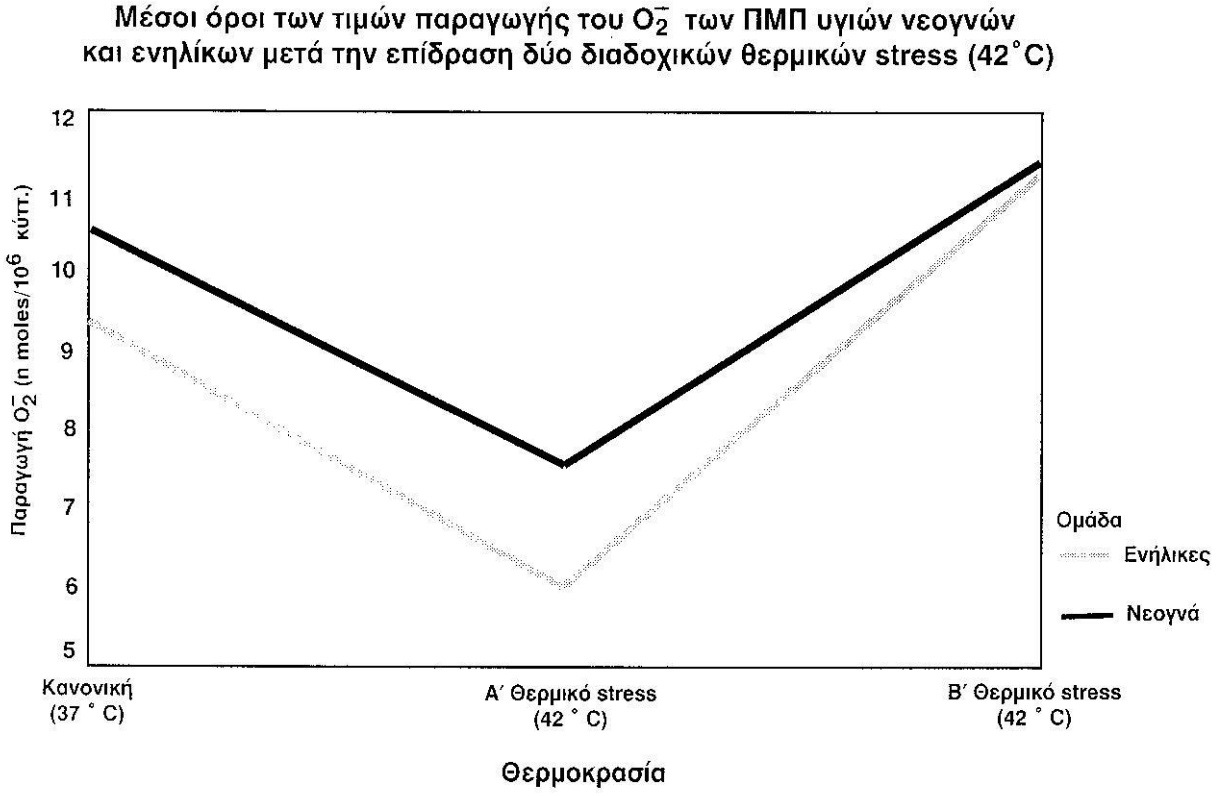
Κατανομή των τιμών παραγωγής O_2^- των ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων μετά την επίδραση ενός θερμικού stress (42°C)



Εικόνα (7)

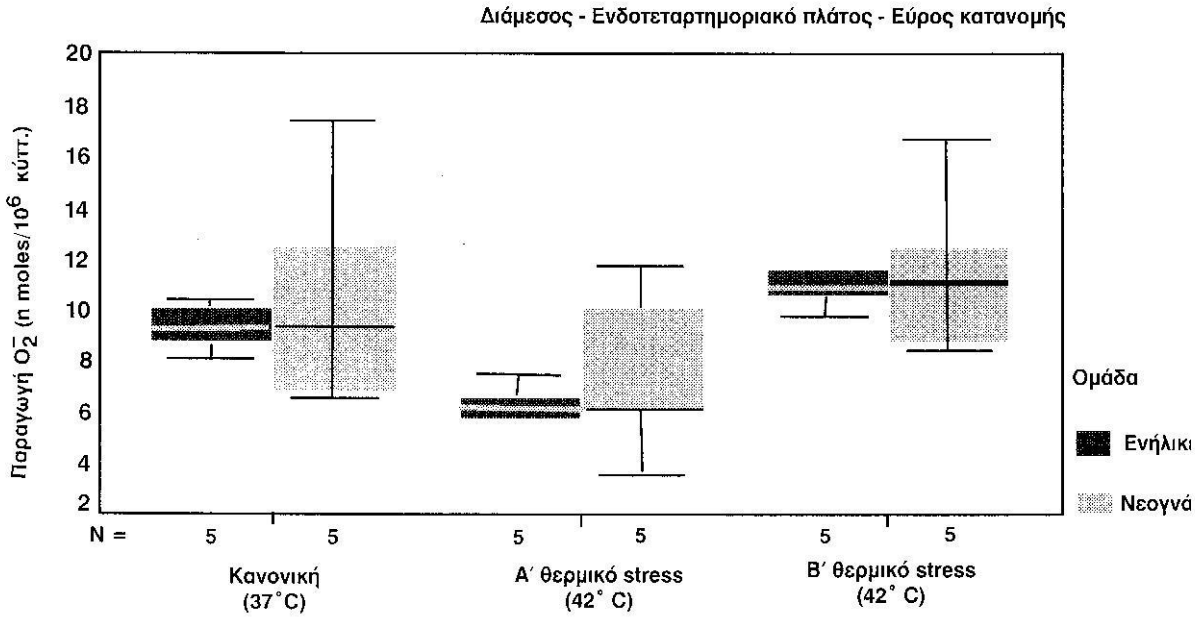


Εικόνα (8)



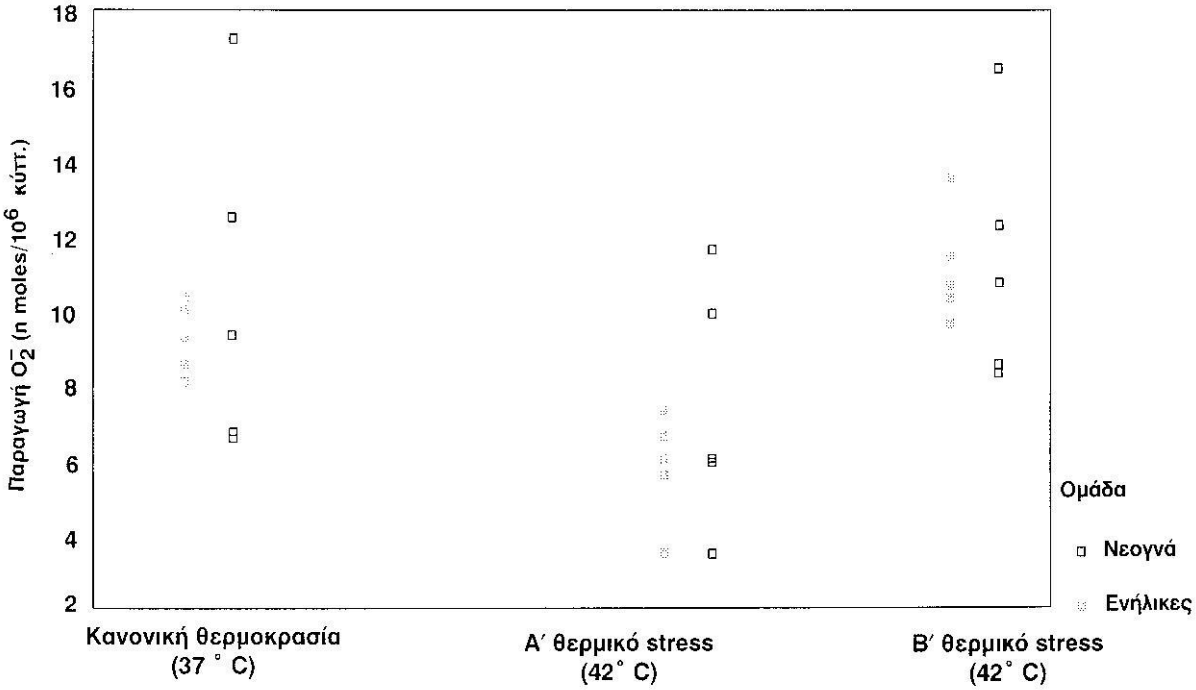
Εικόνα (9)

Κατανομή των τιμών παραγωγής O_2^- των ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων μετά την επίδραση δύο διαδοχικών θερμικών stress (42˚C)



Εικόνα (10)

Παρατηρηθείσες τιμές παραγωγής O_2^- από ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων και μετά την επίδραση δυο διαδοχικών θερμικών stress στους 42 ˚ C



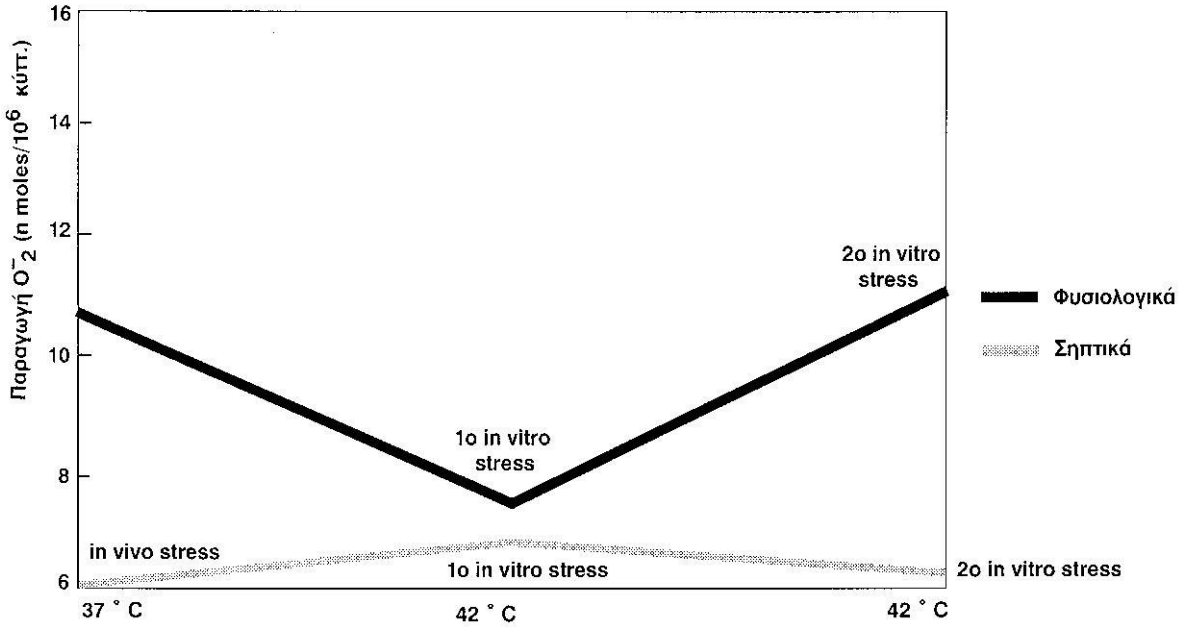
Εικόνα (11)

3. Παραγωγή O^-_2 από ΠΜΠ νεογνών υπό stress μετά την επίδραση θερμικού stress.

Τα ΠΜΠ από κάθε νεογνό σε stress μετά την απομόνωσή τους διαχωρίστηκαν σε δύο δείγματα με ίσο αριθμό κυττάρων ($1x10^6$). Στο πρώτο δείγμα μετρήθηκε η παραγωγή O^-_2 αφού εκτέθηκε στους 37°C επί 30 λεπτά και στο δεύτερο δείγμα αφού εκτέθηκε στους 42°C επίσης για 30 λεπτά. Σε μικρό αριθμό νεογνών υπό stress μελετήθηκε και τρίτο δείγμα ΠΜΠ το οποίο εκτέθηκε στους 42°C δύο φορές με μεσοδιάστημα ηρεμίας 3 ωρών.

Σε όλα αυτά τα δείγματα η παραγωγή O^-_2 ήταν χαμηλή συγκρινόμενη με την αντίστοιχη παραγωγή σε φυσιολογικά νεογνά εικ. (12). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι στα νεογνά υπό stress η παραγωγή O^-_2 παρέμεινε χαμηλή και μετά το πρώτο και μετά το δεύτερο in vitro θερμικό stress, σε αντίθεση με ότι παρατηρήθηκε στα φυσιολογικά νεογνά όπου υπήρξε αύξηση του O^-_2 μετά την έκθεση σε δεύτερο θερμικό stress (σχ. 12).

Μέσοι όροι τιμών παραγωγής O^-_2 από ΠΜΠ φυσιολογικών και σηπτικών νεογνών στους 37° C, μετά από ένα πρώτο (in vitro) θερμικό stress και ένα δεύτερο (in vitro) θερμικό stress



Εικόνα (12)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ακεραιότητα και η άριστη λειτουργικότητα των κυττάρων εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία πλήρως δομημένων πρωτεϊνών. Μετά τα επιτυχή πειράματα του Anfinsen[214], ο οποίος κατόρθωσε in vitro να «επαναφέρει» στη φυσιολογική τριτοταγή της δομή τη μετουσιωμένη κεκαθαρμένη ριβονουκλεάση του σταφυλοκόκκου, για πολύ καιρό επικρατούσε η άποψη ότι η δυνατότητα να αποκτήσει μια πρωτεΐνη την πλήρη λειτουργική δομή της ήταν ένα «ενδογενές» χαρακτηριστικό της πρωτοταγούς δομής το οποίο ήταν ανεξάρτητο από άλλους παράγοντες. Η άποψη αυτή παρέμεινε παρά το ότι ο ίδιος ο Anfinsen υπέθεσε την ύπαρξη ειδικών ενζύμων τα οποία θα μπορούσαν να καταλύουν διάφορες αντιδράσεις στην οργάνωση της πρωτεϊνικής δομής και παρά την αδυναμία πολλών ερευνητών να επιτύχουν την in vitro επανάκτηση της πλήρους λειτουργικής δομής των μετουσιωμένων και αποδομημένων πρωτεϊνών.

Σήμερα είναι γνωστή η παρουσία ειδικής ομάδας πρωτεϊνών, οι οποίες «φροντίζουν» για τη διατήρηση των πρωτεϊνών σε πλήρη οργανωμένη δομή και για τη μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο. Για το ρόλο τους αυτόν αποκαλούνται «molecular chaperons», (μόρια – «προστάτες»), όρος που αποδόθηκε για πρώτη φορά από τους Ron Lackey και τους συνεργάτες του[215] και αργότερα από τον Ellis[215].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι hsp παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική λειτουργία τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου, όσο κυρίως σε καταστάσεις stress. Ο σημαντικός αυτός ρόλος των hsp φαίνεται και από το γεγονός ότι, ενώ οι hsp αποτελούν το 2-3% του συνολικού ποσού των πρωτεϊνών του κυττάρου στα ήρεμα φυσιολογικά κύτταρα, στα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε θερμικό stress το ποσοστό των hsp δύναται να φθάσει το 20% των ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου[216].

Περισσότερο όλων έχει μελετηθεί η οικογένεια των hsp70 η οποία ίσως έχει και τον ουσιαστικώτερο ρόλο. Έχει αποδειχθεί ότι οι hsp70 υπό φυσιολογικές συνθήκες του κυττάρου «συνοδεύουν» τις πρωτεΐνες σ' όλα τα στάδια του κύκλου ζωής τους (σύνθεση, μεταφορά, λειτουργία, αποδόμηση) και αναστέλλουν οποιαδήποτε βλαπτική επίδραση στις πρωτεΐνες του κυττάρου. Σε συνθήκες stress, οι hsp70 αφ' ενός μεν ενισχύουν την ικανότητα του κυττάρου να διατηρεί τη λει-

τουργικότητά του (οι hsp70 «φροντίζουν» για την αποκατάσταση των μετουσιωμένων από το stress πρωτεϊνών) και αφ' ετέρου προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση ή τη λύση του.

Αναφέρονται πολλές μελέτες σχετικά με τη σύνθεση hsp70 από διάφορα κύτταρα ποικίλων οργανισμών του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Λίγες όμως μελέτες αφορούν στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και ελάχιστες στη σύνθεση hsp70 από κύτταρα του περιφερικού αίματος. Έτσι, έχει βρεθεί ότι hsp70 παράγονται στα μονοκύτταρα-μακροφάγα του ανθρώπου υπό φυσιολογικές συνθήκες και μετά από ενεργοποίηση αυτών από διάφορες τοξίνες (LPS, τοξίνη στρεπτοκόκκου κ.ά.) και μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης (π.χ. κυτταροκίνες)[217-219]. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα δεν συνθέτουν υπό φυσιολογικές συνθήκες hsp70. Εν τούτοις συνθέτουν hsp70 ως απάντηση σε stress[220-222]. Τουναντίον, τα ΠΜΠ του ανθρώπου συνθέτουν hsp70 και υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ σε συνθήκες stress συνθέτουν ιδιαίτερα υψηλές ποσότητες hsp70, όπως π.χ. σε υψηλή θερμοκρασία[223,224], σε υποθερμία[225], υπό την επίδραση προϊόντων βακτηριδίων[226] και προϊόντων μεταβολισμού των ΠΜΠ τα οποία παράγονται κατά την ενεργοποίησή τους (αραχιδονικό οξύ[197] και 12-HETE[195]).

Όσον αφορά στη σύνθεση hsp70 από τα ΠΜΠ όταν αυτά εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία, έχει διαπιστωθεί ότι η αυξημένη σύνθεση αρχίζει όταν η θερμοκρασία υπερβεί κατά 2-3°C τη φυσιολογική θερμοκρασία του ατόμου. Σύμφωνα με τις μελέτες των Eid και συν.[223] η μέγιστη in vitro σύνθεση hsp70 επάγεται όταν τα ΠΜΠ εκτεθούν στους 42-43°C για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Όλες οι παραπάνω μελέτες έχουν γίνει σε ΠΜΠ ενηλίκων.

Απ' όσο γνωρίζουμε η μελέτη μας είναι η πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία που αναφέρεται στη σύνθεση hsp70 από ΠΜΠ νεογνών. Το ενδιαφέρον μας για τα συγκεκριμένα κύτταρα οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροβιακές λοιμώξεις αποτελούν σημαντική αιτία θνησιμότητας στη νεογνική ηλικία, τα δε ΠΜΠ παίζουν βασικό ρόλο στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων αυτών.

Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση του θερμικού stress στα ΠΜΠ υγιών τελειομήνων νεογνών και υγιών ενηλίκων. Βρήκαμε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών όταν εκτεθούν σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (στους 42°C επί 30 λεπτά) συνθέτουν αυξημένα ποσά hsp70. Εν τούτοις, η σύνθεση αυτή βρέθηκε ότι υπολείπεται συγκριτικά με αυτή των ΠΜΠ των ενηλίκων στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας.

Έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση hsp70 είναι ανάλογη της έντασης του ερεθίσματος που τα προκαλεί. Ως εκ τούτου θα ήταν αναμενόμενο υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας τα ΠΜΠ των νεογνών να συνθέτουν ίδια ποσά hsp70 όπως και εκείνα των ενηλίκων.Το εύρημα της μειωμένης σύνθεσης hsp70 από τα ΠΜΠ των νεογνών είναι ενδεικτικό κάποιας «μειοπραγίας» των ΠΜΠ των νεογνών έναντι των ΠΜΠ των ενηλίκων, όσον αφορά σ' αυτόν τον προστατευτικό για το κύτταρο μηχανισμό.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την (in vivo) σύνθεση hsp70 σε ΠΜΠ νεογνών που βρίσκονταν σε συνθήκες stress. Εκλυτικοί παράγοντες σύνθεσης hsp70 στα νεογνά αυτά ήταν η σήψη (με ή χωρίς πυρετό) και η υποξία. Βρήκαμε ότι τα ΠΜΠ των stress - νεογνών συνθέτουν in vivo πολύ υψηλά επίπεδα hsp70. Η αυτόματη αυτή σύνθεση των hsp70 στα ΠΜΠ των stress-νεογνών είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρείται μετά την επίδραση in vitro θερμικού stress στα ΠΜΠ των υγιών νεογνών. Έχει βρεθεί ότι σε ΠΜΠ τα οποία in vitro έχουν εκτεθεί επί μακρόν σε υψηλή θερμοκρασία παρατείνεται η σύνθεση hsp70 για χρονικό διάστημα ανάλογο με την ένταση του stress. Σε πειράματα με συνεχή έκθεση των ΠΜΠ στους 42-43°C οι hsp70 παράγονται για 10 περίπου ώρες ενώ ακολούθως μειώνονται σημαντικά[223]. Φαίνεται ότι και σε καταστάσεις in vivo stress, επειδή το ερέθισμα είναι συνεχές, οι hsp70 παράγονται επί μακρύ χρονικό διάστημα.

Δεν υπάρχουν παρά ελάχιστες μελέτες για την αυτόματη σύνθεση hsp70 από ΠΜΠ ενηλίκων. Από όσο γνωρίζουμε αυτόματη σύνθεση hsp70 (in vivo) από ΠΜΠ έχει αναφερθεί σε μία μελέτη των Mügge και συν.[227] και αφορά σε ενήλικες πολυτραυματίες και χειρουργικούς ασθενείς. Επίσης, οι Hotchkiss και συν. παρατήρησαν ότι λευκοκύτταρα σηπτικών ασθενών με πυρετό της τάξεως των 38,5-39°C επάγουν τη σύνθεση hsp70[228]. In vivo σύνθεση hsp70 έχει περιγραφεί και σε άλλα κύτταρα όπως στα μονοκύτταρα σηπτικών ασθενών[229-231], σε χονδροκύτταρα ασθενών που πάσχουν από σοβαρή οστεοαρθρίτιδα[232], καθώς και σε ηπατικά κύτταρα αλκοολικών κιρρωτικών ασθενών[233].

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε αυξημένη σύνθεση hsp70 στα ΠΜΠ των σηπτικών νεογνών είτε αυτά είχαν πυρετό, είτε όχι. Τούτο φαίνεται να δείχνει ότι ο εκλυτικός παράγοντας της σύνθεσης hsp70 κατά τη σήψη δεν είναι μόνο ο πυρετός αλλά ενδεχομένως κι άλλοι παράγοντες της σήψης όπως οι διάφοροι μεσολαβη-

τές. Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν στην in vivo επίδραση των μεσολαβητών αυτών στη σύνθεση των hsp70. Όμως από διάφορες in vitro μελέτες φαίνεται ότι προϊόντα βακτηριδίων (όπως π.χ. ο LPS) και διάφοροι μεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης (TNF, IL-2) επάγουν άμεσα την παραγωγή των hsp70 σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα του ανθρώπου[234]. Έχει ακόμα αποδειχθεί σε in vitro μελέτες ότι και το αραχιδονικό οξύ επάγει άμεσα τη μεταγραφή του γόνου των hsp70 σε Hela κύτταρα και με δοσοεξαρτώμενο τρόπο ρυθμίζει την απάντηση των κυττάρων στο θερμικό stress[197]. Τέλος βρέθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση κινητοποιούν άμεσα τη σύνθεση των hsp70 όχι μόνο στα βακτήρια αλλά και στα ανθρώπινα κύτταρα[235]. Από όλα τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι όχι μόνο η υπερθερμία αλλά και διάφορες ουσίες ενδογενείς ή εξωγενείς είναι δυνατόν να κινητοποιήσουν την in vivo σύνθεση των hsp70. Κατά τη σήψη δεν είναι εύκολο να καθοριστεί και να εκτιμηθεί χωριστά η σημασία των διαφόρων παραγόντων (αυξημένη θερμοκρασία ή μεσολαβητές φλεγμονής) στην επαγωγή της σύνθεσης των hsp70. Φαίνεται όμως ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά εκλυτικά αίτια της «απάντησης του κυττάρου στο stress». Επι πλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι, η αυξημένη θερμοκρασία επάγει τη σύνθεση των hsp70 τόσο στα κύτταρα του περιφερικού αίματος[223], (όπως έχει ήδη αναφερθεί), όσο και στα κύτταρα των διαφόρων οργάνων του οργανισμού[228].

Σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι η διαπίστωση της αυτόματης σύνθεσης hsp70 όχι μόνο από τα ΠΜΠ των σηπτικών νεογνών αλλά και από τα ΠΜΠ ανοξαιμικών νεογνών. Μάλιστα δεν παρατηρήσαμε διαφορά στη σύνθεση hsp70 μεταξύ σηπτικών και ανοξαιμικών νεογνών. Είναι πιθανόν η ανοξία να ενεργοποιεί τη σύνθεση hsp70 μέσω διαφόρων μηχανισμών που επεμβαίνουν άμεσα και έμμεσα στην ενεργοποίηση των hsf (πτώση PH, έλλειψη ATP που συνεπάγονται μείωση των επιπέδων των ελευθέρων hsp70 λόγω διακοπής της ανακύκλωσης των hsp70, αύξηση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, απελευθέρωση hsf υπό ειδικές συνθήκες κ.λπ.[236]). Παρόμοια σύνθεση hsp70 έχει διαπιστωθεί σε κύτταρα ανοξαιμικών οργάνων σε in vitro μελέτες καθώς και σε μελέτες σε πειραματόζωα[236-238]

Η παραγωγή των hsp70 στο κύτταρο ασκεί κυτταροπροστατευτική δράση ενάντια σε βλαπτικούς παράγοντες, και επί πλέον αποτελεί δείκτη κυτταρικής βλάβης.

Η άμεση συσχέτιση της επαγωγής της σύνθεσης των hsp70 και της ανάπτυξης θερμοαντοχής υποστηρίζουν ισχυρά τη θέση για τον προστατευτικό ρόλο των hsp70[112].

Ως γνωστόν η θερμοαντοχή είναι παροδικό φαινόμενο που εμφανίζεται μετά από ένα αρχικό ήπιο (μη θανατηφόρο) stress και προστατεύει τον οργανισμό από ένα επόμενο πιο σοβαρό stress. Είναι σημαντικό ότι η επαγωγή της σύνθεσης των hsp70 από ένα είδος stress προσφέρει προστασία και έναντι άλλου stress διαφορετικού είδους. Έτσι, ένα ήπιο θερμικό stress «προστατεύει» τα κύτταρα έναντι βλαβών από έκθεση σε βαρέα μέταλλα, αιθανόλη, ισχαιμία κ.λπ. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ένταση της θερμοαντοχής στα κύτταρα των θηλαστικών είναι ανάλογη των επιπέδων των hsp70 σε αυτά[239-241]. Μελέτες στα ΠΜΠ έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των hsp70 σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί επί 30-60 λεπτά στους 42°C (και ακολούθως αφέθηκαν να ηρεμήσουν στους 37° C) φτάνουν στο μέγιστο στις 3 ώρες και ακολούθως μειώνονται σημαντικά 5 ώρες μετά το αρχικό stress[223]. Η σύνθεση όμως των hsp παρατείνεται εφόσον παρατείνεται και η επίδραση του stress.

Στη μελέτη μας διερευνήσαμε τη δυνατότητα ανάπτυξης θερμοαντοχής στα ΠΜΠ των νεογνών. Γι' αυτόν το σκοπό μελετήσαμε στα ΠΜΠ υγιών νεογνών την επίδραση δύο διαδοχικών θερμικών stress (με μεσοδιάστημα ηρεμίας τριών ωρών) στην παραγωγή του O^-_2, το οποίο ως γνωστόν είναι πρόδρομη ουσία των μικροβιοκτόνων ελευθέρων ριζών. Με τον ίδιο τρόπο μελετήσαμε ΠΜΠ υγιών ενηλίκων. Διαπιστώσαμε ότι μετά το πρώτο θερμικό stress καταστέλλεται η μικροβιοκτόνος ικανότητα των ΠΜΠ τόσο στα νεογνά όσο και στους ενήλικες. Αυτό είναι συμβατό με την καταστολή της λειτουργίας του κυττάρου λόγω του stress,κατά την οποία διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών του κυττάρου. Η μετουσίωση διαφόρων ενζύμων κατά το θερμικό stress παίζει σημαντικό ρόλο στη διαταραχή της πρωτεϊνοσύνθεσης και των διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου. Όμως έχει βρεθεί ότι στην περίπτωση της NADPH οξειδάσης (δηλαδή του ενζύμου των ΠΜΠ, που ως γνωστόν είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του O^-_2), η αναστολή της λειτουργίας της εξαιτίας του stress δεν οφείλεται σε μετουσίωσή της αλλά σε αδυναμία μετακίνησης και συνάθροισης στη μεμβράνη του κυττάρου των διαφόρων δομικών συστατικών που αποτελούν το σύμπλεγμα του ενζύμου της NADPH οξειδάσης[242]. Μετά την επίδραση του δεύτερου θερμικού stress διαπι-

στώνουμε ότι η παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα τόσο στα νεογνά όσο και στους ενήλικες, δηλ. τα κύτταρα επανέκτησαν τη λειτουργικότητά τους. Μελέτες σε ΠΜΠ ενηλίκων έχουν δείξει ότι , ΠΜΠ τα οποία έχουν αποκτήσει θερμοαντοχή υπό την επίδραση ενός πρώτου stress, κατά τη επίδραση ενός δεύτερου stress παρήγαγαν φυσιολογικά ποσά O^-_2. Τούτο πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι δεν αναστέλλεται η συνάθροιση των δομικών συστατικών της NADPH οξειδάσης κατά την επίδραση ενός δεύτερου stress[242]. Έχει βρεθεί πράγματι σε in vitro μελέτες ότι η λειτουργία της NADPH οξειδάσης αποκαθίσταται 2-3 ώρες μετά την επίδραση ενός πρώτου stress, δηλ. μετά τόσο χρόνο όσο χρειάζεται για την παραγωγή hsp70 από το κύτταρο. Στη μελέτη μας διαπιστώθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών έχουν την ικανότητα in vitro να αναπτύξουν θερμοαντοχή και επί πλέον αυτά δεν υπολείπονται σημαντικά των ΠΜΠ των ενηλίκων όσον αφορά στην παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ, δηλ. στην προστατευτική δράση των hsp70 στη λειτουργικότητα των κυττάρων αυτών.

Επιπλέον στη μελέτη μας ελέγξαμε εάν τα ΠΜΠ των νεογνών τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες in vivo stress και τα οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, συνθέτουν αυτόματα υψηλά επίπεδα hsp70, έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν θερμοαντοχή. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η ικανότητα των ΠΜΠ των νεογνών υπό stress να συνθέτουν O^-_2. Διαπιστώθηκε ότι, παρ' όλο ότι τα ΠΜΠ των νεογνών υπό stress συνθέτουν υψηλά επίπεδα hsp70, η σύνθεση O^-_2 και κατ' επέκταση η μικροβιοκτόνος ικανότητα των ΠΜΠ παραμένει πολύ χαμηλή. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παρουσία των hsp70 στα ΠΜΠ των stress-νεογνών (ακόμη και σε επίπεδα πολύ υψηλότερα αυτών που παρατηρούνται στα ΠΜΠ των υγιών νεογνών που έχουν υποστεί μόνο θερμικό stress), δεν είναι ικανή να προστατεύσει τη λειτουργία των ΠΜΠ αυτών. Υποβάλλοντας τα ΠΜΠ των σηπτικών νεογνών σε διαδοχικά θερμικά stress διαπιστώσαμε ότι η μεν παραγωγή των hsp70 παραμένει υψηλή, η λειτουργία όμως της NADPH οξειδάσης δεν επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Υποστηρίζεται ότι η αυξημένη σύνθεση hsp70 σε καταστάσεις stress, όπως π.χ. κατά τη σήψη, έχει προστατευτική δράση στο κύτταρο και στους ιστούς[235]. Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας φαίνεται ότι οι hsp70 in vivo αδυνατούν να αποκαταστήσουν τη φυσιολογική λειτουργία των ΠΜΠ. Πιθανότατα τούτο να αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ευθύνονται για την αυξημένη θνητότητα της

νεογνικής σηψαιμίας. Παρ' όλα αυτά, οι hsp70 μπορούν να προστατεύουν τα ΠΜΠ από τη λύση ή την απόπτωσή τους και βοηθούν έτσι ώστε τα ΠΜΠ να διατηρούν έστω και μία μικρή σχετικά λειτουργικότητα. Είναι εξ άλλου δυνατόν οι hsp70 που παράγονται στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού κατά τη σήψη να ασκούν προστατευτικό ρόλο παρεμβαίνοντας σε άλλους μηχανισμούς της σήψης που σχετίζονται με την ιστική βλάβη και ανεπάρκεια των οργάνων.

Πράγματι, πειραματικά δεδομένα σε μονοκύτταρα ανθρώπου και σε μακροφάγα επίμυων αποδεικνύουν ότι η σύνθεση hsp70 αναστέλλει τη σύνθεση των κυτταροκινών όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιηθούν από LPS[243-245]. Ακόμα οι hsp70 ασκούν προστατευτικό ρόλο έναντι της κυτταροτοξικότητας του TNFa και αυτός ο ρόλος έχει μελετηθεί ειδικά σε καρκινικά κύτταρα: οι Jaatella και συν. διαπίστωσαν σε πειραματόζωα ότι η μικρής διάρκειας προθέρμανση των καρκινικών κυττάρων μείωσε κατά 50% τη λύση των κυττάρων αυτών από τον TNFa[244,245]. Επιπλέον, μελέτες σε διάφορα βακτηρίδια όπως σαλμονέλλα, λεϊσμάνια κ.λπ. έχουν δείξει τον προστατευτικό ρόλο των hsp70 έναντι της βλαπτικής επίδρασης των ελευθέρων ριζών στους μικροοργανισμούς αυτούς[246,247]. Έχει ακόμη αποδειχθεί σε μονοκύτταρα ανθρώπου ότι η σύνθεση hsp70 προστατεύει έναντι της οξειδωτικής δράσης διαφόρων ουσιών[248,249].

In vivo μελέτες σε πειραματόζωα τα οποία υπερθερμάνθηκαν έχουν δείξει αυξημένη σύνθεση hsp70 στα κύτταρα των διαφόρων οργάνων τους. Διαπιστώθηκε ότι τα όργανα τα οποία είναι πιο ευάλωτα και προσβάλλονται ενωρίτερα κατά τη σήψη είναι αυτά που παράγουν και υψηλότερα επίπεδα hsp70 (ήπαρ, νεφροί, πνεύμονες, λεπτό έντερο) σε αντίθεση με άλλα όργανα λιγότερο ευάλωτα στη σήψη τα οποία παράγουν μικρότερα ποσά hsp70 (καρδιά, εγκέφαλος)[228]. Η σύνθεση hsp70 είναι ειδική σε κάθε όργανο και ποικίλλει ακόμα και σε περιοχές του ίδιου οργάνου (όπως π.χ. στον εγκέφαλο)[250]. ο δε χρόνος ημίσσειας ζωής των hsp70 διαφέρει ανάλογα με το όργανο στο οποίο παράγονται[251].

Η in vivo σύνθεση hsp70 στα πειραματόζωα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής και τη μείωση της θνητότητάς τους όπως έδειξαν πολύ καλά σχεδιασμένες μελέτες[251-255]. Στις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη αντίσταση στη σήψη (και η μείωση της θνητότητας) άρχιζε 1 με 2 ώρες μετά το θερμικό stress, ήταν μεγίστη μετά από 12 ώρες, ενώ μειωνόταν σημαντικά μετά από 48 ώρες από το θερμικό stress. Την ίδια καμπύλη ακολουθούσαν και τα επίπεδα των

hsp70[251-255]. Διαπιστώθηκε δηλαδή, ότι στις περιπτώσεις όπου η επιβίωση ήταν η μεγίστη τα επίπεδα των hsp70 ήταν τα υψηλότερα, γεγονός που υποδηλώνει τον προστατευτικό ρόλο των hsp70 στη σήψη[228]. Η υψηλή θερμοκρασία φαίνεται ότι αποτελεί ένα ισχυρό εκλυτικό παράγοντα της «heat shock response» και επομένως ένα ισχυρό εκλυτικό παράγοντα ανάπτυξης θερμοαντοχής των κυττάρων. Διάφοροι παράγοντες, όπως π.χ. η ενδοτοξίνη, δεν επάγουν από μόνοι τους τη σύνθεση των hsp70 στα πειραματόζωα με αποτέλεσμα αυτά να μην προστατεύονται από τη σήψη. Εάν όμως τα ίδια πειραματόζωα «προθερμανθούν» η επιβίωσή τους κατά τη σήψη είναι 5 φορές μεγαλύτερη εκείνης των μη προθερμασμένων[228]. Αρκετές μελέτες αναφέρονται στην ευεργετική επίδραση του πυρετού στην έκβαση των λοιμώξεων. Μελέτες σε θηλαστικά έδειξαν ότι όταν οι λοιμώξεις συνοδεύονται από πυρετό (αύξηση της θερμοκρασίας 2-3°C πάνω από τη φυσιολογική) η επιβίωση των πειραματόζωων είναι μεγαλύτερη[256-264]. Αναφέρεται π.χ. ότι ποντίκια μολυσμένα με Pasteurella multocida είχαν μεγαλύτερη επιβίωση εάν παρουσίαζαν πυρετό, συγκρινόμενα με εκείνα που ήταν απύρετα[261]. Αντίθετα, πειραματόζωα μολυσμένα με Salmonella enteritidis παρουσίασαν αύξηση της θνητότητάς τους μετά από πειραματική ψύξη του υποθαλάμου τους[262].

Η ευεργετική επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας και της συνέπεια αυτής αυξημένης σύνθεσης hsp70 έχει μελετηθεί σε in vivo μελέτες σε περιπτώσεις αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκου τύπου (ARDS). Το ARDS ως γνωστόν είναι οξεία φλεγμονή των πνευμόνων με υψηλή θνητότητα (περίπου 50%). Διάφορες μελέτες[265-267] έδειξαν ότι «προθερμασμένα» πειραματόζωα στα οποία πειραματικά προκλήθηκε ARDS έχουν επιβίωση κατά 30% υψηλότερη από εκείνη των μη «προθερμασμένων» πειραματόζωων. Η προθέρμανση προκάλεσε μαζική παραγωγή hsp70 στους πνεύμονες και στην αύξηση αυτή των hsp70 αποδόθηκε η μείωση της θνητότητας. Μελέτες σε ανθρώπους ασθενείς με ARDS δεν έχουν γίνει. Έχει όμως βρεθεί ότι τα ΠΜΠ ασθενών που πάσχουν από ARDS υπερπαράγουν hsp70[227]. Επίσης έχει βρεθεί αυξημένη σύνθεση hsp70 στους πνεύμονες ασθενών που πάσχουν από άσθμα και χρόνια βρογχίτιδα[268].

Είναι γνωστό ότι οι βαριές λοιμώξεις των νεογνών οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη θνητότητα συχνά δεν συνοδεύονται από πυρετό. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην αυξημένη θνητότητα των νεογνών αυτών είναι και η έλλειψη πυρετού και η συνέπεια αυτής μη παραγωγή

hsp70. Φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες επάγουν τη σύνθεση hsp70 στο βαθμό και στην έκταση που αυτή επιτυγχάνεται από την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού κατά των λοιμώξεων χωρίς τις αρνητικές επιπτώσεις που προκαλεί ο υψηλός πυρετός στον οργανισμό[269]. Δεν είναι γνωστό εάν η αυξημένη αντίσταση των κυττάρων στους τοξικούς παράγοντες οφείλεται στη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας τους ή σε άλλο μηχανισμό.

Στη δική μας μελέτη διαπιστώσαμε ότι τα ΠΜΠ των τελειομήνων νεογνών παράγουν hsp70 όπως και τα ΠΜΠ των ενηλίκων όταν υποστούν ένα έντονο stress, όπως θερμικό stress, επίδραση ανοξίας ή κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Μολονότι όμως τα ΠΜΠ των νεογνών δεν στερούνται αυτού του σοβαρού προστατευτικού μηχανισμού, η μελέτη μας δείχνει ότι ο μηχανισμός αυτός δεν επαρκεί για να συντηρήσει τη φυσιολογική μικροβιοκτόνο δράση των ΠΜΠ του νεογνού. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην ανωριμότητα των νεογνικών ΠΜΠ ή σε άλλους παράγοντες που δεν έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) συνθέτουν hsp70, όπως και τα ΠΜΠ ενηλίκων στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας. Υπό την επίδραση θερμικού stress (42°C) η σύνθεση των hsp70 από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών αυξάνεται σημαντικά συγκριτικά με την αντίστοιχη σε φυσιολογική θερμοκρασία και δεν διαφέρει ουσιαστικά από τη σύνθεση hsp70 των ΠΜΠ των ενηλίκων στις ίδιες συνθήκες stress. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν hsp70, δηλαδή διαθέτουν αυτόν τον δυνητικά προστατευτικό μηχανισμό των κυττάρων.

2. Η παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών μετά την επίδραση ενός θερμικού stress καταστέλλεται σημαντικά ($p<0,001$) συγκρινόμενη με αυτήν που παρατηρείται σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, εύρημα συμβατό με την καταστολή της κυτταρικής λειτουργίας από την επίδραση ενός έντονου stress. Εν τούτοις, μετά την έκθεση των ΠΜΠ αυτών σε ένα δεύτερο θερμικό stress δεν παρατηρείται καταστολή της παραγωγής του O^-_2 όπως συμβαίνει κατά το πρώτο θερμικό stress, τα δε επίπεδα του O^-_2 είναι ανάλογα αυτών που παρατηρούνται σε φυσιολογική θερμοκρασία. Η ικανότητα των ΠΜΠ των υγιών νεογνών να διατηρούν την παραγωγή του O^-_2 σε φυσιολογικά επίπεδα μετά την επίδραση ενός δεύτερου θερμικού stress αποδίδεται στη θερμοαντοχή (δηλ. στα υψηλά επίπεδα hsp70) που αποκτούν τα ΠΜΠ μετά την επίδραση του πρώτου θερμικού stress.Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα ΠΜΠ των ενηλίκων.

3. Τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται σε συνθήκες stress (σήψη, περιγεννητική ασφυξία) συνθέτουν υψηλότερα ποσά hsp70 όχι μόνον από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών (που βρίσκονται σε φυσιολογική θερμοκρασία) αλλά ακόμη και από τα ΠΜΠ που έχουν εκτεθεί σε έντονο in vitro θερμικό stress. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι όταν τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται σε in vivo stress υποστούν ένα in vitro θερμικό stress, διατηρούν υψηλά τα επίπεδα των hsp70 παρόμοια με αυτά που παράγονται κατά το in vivo stress.

4. Τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται σε συνθήκες in vivo stress συνθέτουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα O^-_2 από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών υπό φυσιολογική θερμοκρασία. Ακόμη τα επίπεδα του O^-_2 των ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται σε συνθήκες in vivo stress παραμένουν χαμηλά μετά την επίδραση ενός ή και δύο δια-

δοχικών θερμικών stress και δεν αποκαθίστανται στα φυσιολογικά. Διαπιστώνεται δηλαδή, ότι τα ΠΜΠ των stress-νεογνών, παρά τα υψηλά επίπεδα των hsp70 που συνθέτουν, παρουσιάζουν σημαντική καταστολή της παραγωγής του O^-_2 η οποία παραμένει και μετά την επίδραση διαδοχικών in vitro θερμικών stress. Συμπεραίνεται ότι τα ΠΜΠ των νεογνών σε συνθήκες συνεχούς stress (όπως σήψη, ανοξία), αν και συνθέτουν υψηλά ποσά hsp70, αδυνατούν να διατηρήσουν τη φυσιολογική μικροβιοκτόνο δράση τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στη σύνθεση ειδικής ομάδας πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών θερμικού stress ή heat shock proteins (hsp) που παράγονται ως απάντηση του κυττάρου σε διάφορα είδη stress, περιλαμβανομένης και της σήψης. Ρόλος των hsp είναι να διατηρούν σε συνθήκες stress τη σταθερότητα των πρωτεϊνών του κυττάρου αναστέλλοντας τη μετουσίωση και συσσώρευση αυτών, που θα έβλαπταν την κυτταρική λειτουργία.

Έχει αποδειχθεί ότι οι hsp που παράγονται από την επίδραση ηπίων μορφών stress προστατεύουν το κύτταρο από επόμενα stress ισχυρότερα και δυνητικά θανατηφόρα. Το φαινόμενο αυτό της «αντοχής» του κυττάρου στα επόμενα stress, επειδή μελετήθηκε για πρώτη φορά σε πειράματα μετά από θερμικό stress, ονομάζεται θερμοαντοχή. Οι hsp70, οι οποίες αποτελούν τη σπουδαιότερη και πιο καλά μελετημένη ομάδα των hsp στα θηλαστικά και τον άνθρωπο, παίζουν «πρωταγωνιστικό» ρόλο στην απόκτηση θερμοαντοχής του κυττάρου. Πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η επαγωγή της σύνθεσης hsp70 σε κύτταρα διαφόρων οργάνων (πνεύμονες, ήπαρ, έντερο κ.λπ.), η οποία προκλήθηκε μετά την έκθεση των πειραματόζωων σε αυξημένη θερμοκρασία καθιστά τα πειραματόζωα αυτά πιο ανθεκτικά στη χορήγηση ενδοτοξίνης ή σε διάφορους άλλους βλαπτικούς παράγοντες της σήψης, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι επιπλοκές και η θνητότητα της νόσου. Με άλλα λόγια η σύνθεση των hsp70 δρα προστατεύοντας τα πειραματόζωα σε περίπτωση βαριάς λοίμωξης.

Η σημασία των hsp στον ανθρώπινο οργανισμό πολύ λίγο έχει μελετηθεί. Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που αναφέρονται στην in vivo αυτόματη έκφραση των hsp σε ενήλικες και αυτές αφορούν στα φαγοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Πρόσφατα έχει περιγραφεί αυξημένη αυτόματη σύνθεση hsp70 σε ΠΜΠ βαρέως πασχόντων πολυτραυματιών και χειρουργημένων, ως και σε μονοκύτταρα σηπτικών αρρώστων. Εν τούτοις δεν υπάρχουν μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό που να πιστοποιούν τον προστατευτικό ρόλο των hsp στην επιβίωσή του κατά τη σήψη ή άλλες δυνητικά θανατηφόρες καταστάσεις. Απ' ότι γνωρίζουμε ουδεμία μελέτη υπάρχει που να αφορά τη σύνθεση hsp70 στα νεογνά. Είναι γνωστό ότι τα νεογνά συχνά βρίσκονται κάτω από συνθήκες έντονου stress όπως π.χ. σε καταστάσεις περιγεννητικής ασφυξίας και σήψης, οι οποίες είναι νόσοι με υψηλή θνη-

τότητα στη νεογνική ηλικία. Πρέπει να τονιστεί ότι όσον αφορά στις λοιμώξεις ο ρόλος των πολυμορφοπυρήνων (ΠΜΠ) είναι σημαντικός για την εξουδετέρωση του παθογόνου αιτίου και ως εκ τούτου η διατήρηση ακέραιης της λειτουργικότητάς τους σε συνθήκες σήψης είναι σημαντική για την επιβίωση των νεογνών.

Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν διπλός:

α) να ελέγξουμε εάν τα ΠΜΠ των νεογνών έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν hsp70 και β) να διαπιστώσουμε αν οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να προστατεύσουν τα νεογνικά ΠΜΠ από την επίδραση διαφόρων ειδών stress (σηπτικό, ανοξαιμικό κ.λπ.) Για το σκοπό αυτό α) μελετήσαμε τη σύνθεση hsp70 από τα ΠΜΠ υγιών νεογνών και νεογνών που βρίσκονταν υπό την επίδραση έντονου in vivo stress (σήψη, περιγεννητική ασφυξία) και β) διερευνήσαμε το ρόλο των hsp70 στη λειτουργία των νεογνικών ΠΜΠ και συγκεκριμένα στην ικανότητα των ΠΜΠ να συνθέτουν υπεροξείδιο (O^-_2). Τούτο ως γνωστόν αποτελεί μητρική ουσία των μικροβιοκτόνων ελευθέρων ριζών. Με άλλα λόγια διερευνήσαμε έμμεσα τη μικροβιοκτόνο δράση των ΠΜΠ.

Η σύνθεση hsp70 ελέγχθηκε με τη μέθοδο Western-blotting, η δε παραγωγή του O^-_2 εκτιμήθηκε έμμεσα με τη μέθοδο της αναγωγής του κυτοχρώματος C.

Πιο συγκεκριμένα στη διατριβή αυτή:

1. Μελετήθηκε η σύνθεση των hsp70:

1.1. σε δείγματα ΠΜΠ υγιών νεογνών και ενηλίκων, που είχαν εκτεθεί σε φυσιολογική θερμοκρασία (37 °C) και σε ένα in vitro θερμικό stress (42° C για 30 λεπτά).

Βρέθηκε ότι τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας συνθέτουν hsp70 σε ποσά ανάλογα αυτών που συνθέτουν τα ΠΜΠ των ενηλίκων στις ίδιες συνθήκες. Ενδιαφέρον είναι ότι σε συνθήκες θερμικού stress η σύνθεση των hsp70 από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών είναι αυξημένη και δεν διαφέρει ουσιαστικά από την ανάλογη παραγωγή των ΠΜΠ των ενηλίκων στις ίδιες συνθήκες stress. Με άλλα λόγια, τα ΠΜΠ των νεογνών έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν hsp70, τα κύτταρά τους δηλ. διαθέτουν αυτόν τον δυνητικά προστατευτικό μηχανισμό.

1.2. σε δείγματα ΠΜΠ σηπτικών και ανοξαιμικών νεογνών. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η σύνθεση hsp70 στα νεογνικά αυτά κύτταρα που βρίσκονταν ήδη σε συνθήκες in vivo stress, καθώς επίσης και μετά την έκθεση των κυττά-

ρων αυτών σε in vitro θερμικό stress (στους 42°C για 30 λεπτά). Διαπιστώθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονται σε in vivo stress συνθέτουν μεγαλύτερη ποσότητα hsp70 από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών σε φυσιολογική θερμοκρασία (37°C). Σημαντικό εν τούτοις εύρημα είναι ότι η σύνθεση των hsp από τα ΠΜΠ των νεογνών σε stress είναι μεγαλύτερη ακόμα και από αυτήν που παρατηρήθηκε στα ΠΜΠ υγιών νεογνών που είχαν εκτεθεί σε ένα έντονο in vitro θερμικό stress. Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών υπό stress μετά την επίδραση σ' αυτά ενός in vitro θερμικού stress διατηρούν υψηλά τα επίπεδα των hsp70 που παράγουν, ανάλογα αυτών που παράγονται κατά το in vivo stress.

2. Ελέγχθηκε η παραγωγή O^-_2:

2.1.από τα ΠΜΠ των υγιών νεογνών και ενηλίκων που είχαν εκτεθεί σε φυσιολογική θερμοκρασία (37° C) και όταν υπέστησαν την επίδραση δύο διαδοχικών θερμικών stress (έκθεση δύο φορές στους 42° C για 30 λεπτά με μεσοδιάστημα ηρεμίας 3 ωρών).

Βρέθηκε ότι μετά την επίδραση του πρώτου θερμικού stress (πρώτη έκθεση στους 42° C) η παραγωγή O^-_2 από τα ΠΜΠ τόσο των νεογνών όσο και των ενηλίκων καταστέλλεται σημαντικά ($p<0,001$) συγκριτικά με εκείνη που παρατηρείται σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με την καταστολή της κυτταρικής λειτουργίας από την επίδραση του έντονου θερμικού stress. Εν τούτοις, μετά την έκθεση στο δεύτερο θερμικό stress δεν παρατηρήθηκε καταστολή της παραγωγής του O^-_2, όπως είχε συμβεί μετά το πρώτο θερμικό stress. Η παραγωγή του O^-_2 μετά το δεύτερο θερμικό stress ήταν ανάλογη με εκείνη που παρατηρείται σε φυσιολογική θερμοκρασία (37° C).

2.2.από τα ΠΜΠ των νεογνών που βρίσκονταν σε stress υπό τις παρακάτω συνθήκες: Χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα ΠΜΠ (με ίσον αριθμό κυττάρων το καθένα) από κάθε νεογνό με stress. Στο πρώτο δείγμα μετρήθηκε το O^-_2 αμέσως μετά την απομόνωση των ΠΜΠ. Το δεύτερο δείγμα επωάστηκε στους 42 °C για 30 λεπτά και το τρίτο δείγμα επωάστηκε δύο φορές στους 42° C για 30 λεπτά με μεσοδιάστημα ηρεμίας 3 ωρών. Μετά την επώαση κάθε δείγματος ακολούθησε η μέτρηση του παραγόμενου O^-_2. Η διαδικασία αυτή θεωρήθηκε σκόπιμη για να διαπιστωθεί εάν τα ΠΜΠ των νεογνών υπό

stress, τα οποία όπως αποδείχθηκε (βλ. παραπάνω 1.2) έχουν υψηλά επίπεδα hsp70, έχουν και τη δυνατότητα να παράγουν υψηλά επίπεδα O^-_2, να διατηρούν δηλ. τη λειτουργικότητά τους.

Βρέθηκε ότι τα ΠΜΠ των νεογνών υπό stress παράγουν O^-_2 σε χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με των ΠΜΠ των υγιών νεογνών υπό φυσιολογική θερμοκρασία ($p<0,001$). Επίσης βρέθηκε ότι τα επίπεδα του O^-_2 στα νεογνά υπό stress παρέμειναν χαμηλά τόσο μετά την επίδραση ενός ή και δύο διαδοχικών θερμικών stress και δεν αποκαταστάθηκαν στα φυσιολογικά επίπεδα. Διαπιστώθηκε δηλ. ότι τα νεογνά που βρίσκονταν σε συνθήκες stress παρουσιάζουν σημαντική καταστολή της παραγωγής του O^-_2 παρά τα υψηλά επίπεδα των hsp70 που διαθέτουν. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι, μετά την επίδραση διαδοχικών in vitro θερμικών stress, η παραγωγή του O^-_2 παραμένει χαμηλή και δεν αποκαθίσταται σε φυσιολογικά επίπεδα, παρά το ότι τα επίπεδα των hsp70 διατηρούνται υψηλά. Φαίνεται ότι στα νεογνά υπό stress τα υψηλά επίπεδα των hsp70 δεν καθιστούν τα ΠΜΠ αυτών ανθεκτικά στην επίδραση επόμενων stress, σε αντίθεση απ' ότι συμβαίνει στα υγιή νεογνά όπου η έκθεση σε διαδοχικά stress διατηρεί τη λετουργικότητα των κυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα.

Συμπερασματικά, από τη μελέτη μας φαίνεται ότι τα ΠΜΠ των νεογνών αν και έχουν την ικανότητα να συνθέτουν hsp70, (διαθέτουν δηλαδή αυτόν τον προστατευτικό μηχανισμό του κυττάρου), αδυνατούν σε συνθήκες συνεχούς stress (όπως σήψη, ανοξία κ.ά.) να διατηρήσουν τη φυσιολογική μικροβιοκτόνο τους δράση. Η αδυναμία αυτή προφανώς αποτελεί έναν από τους λόγους για τη βαρύτερη πρόγνωση της νεογνικής σηψαιμίας και υποδεικνύει την ανάγκη αναζήτησης νέων θεραπευτικών μεθόδων που να ευοδώνουν τη λειτουργικότητα των κυττάρων.

ABSTRACT

It is now well established that, when cells of different organisms are exposed to a variety of environmental stresses, including high temperature, anoxia, trauma, inflammation etc. induce the expression of a group of highly conserved proteins, known as heat shock proteins (hsp).

The hsp play a vital role in the survival of cells exposed to stress. Particularily, they help cells pre-exposed to a non lethal stress to survive from subsequent exposure to lethal stress (thermotolerance). The most prominent and profoundly investigated member of this protein group is hsp of a molecular weight of about 70kDa (hsp70). The hsp70 provide protection not only against heat shock, but also against a wide range of other stresses. Invading pathogens represent a common and potentially fatal stress for the organism. Recent reports have shown that the induction of hsp70 reduces the mortality rates from sepsis in several animal models. Only a few studies have referred to human cells and particularly to the in vivo expression of hsp70 by peripheral blood cells. None study had been referred to production of hsp70 by neonatal cells. It is known that neonates have increased susceptibility to different stress-conditions (such as sepsis, anoxia etc). The present study was designed to investigate a) whether the neonatal polymorphonuclear (PMNs) have the ability to synthesize hsp70 and b) if this synthesis could protect the neonatal PMNs from stress-conditions like sepsis and anoxia.

In the first part of this research we have studied venous blood PMNs derived from healthy fullterm and from neonates exposed to stress (sepsis, anoxia). PMNs from healthy adults served as controls. Using the method of Western-blotting we have found the following: 1. PMNs of healthy newborns have the ability to synthesize hsp70 and this synthesis is enhanced when PMNs are exposed to an in vitro stress (exposure of PMNs at a temperature of 42°C). Similar results have been obtained from PMNs of adults exposed to the same conditions. 2. PMNs from neonates with sepsis or hypoxia (that are from neonates exposed to an in vivo stress) had spontaneously overexpressed hsp70 and this expression was much higher than that observed from normal neonatal PMNs that have been exposed to an in vitro stress (temperature of 42°C) 3. PMNs of stressed neonates when exposed to an in vitro heat stress (42°C) continue to synthesize high amounts of

hsp70, that were higher than the amount of hsp70 produced by PMNs of normal neonates exposed to similar heat stress.

In the second part of this study we have investigated the role of hsp70 on the superoxide (O_2^-) generation from PMNs derived from normal and stressed neonates. It is known that O_2^- is the precursor substance of the bactericidal free radicals. The generation O_2^- was measured by the superoxide dismutase - inhibitable reduction of ferricytochrome C. We have found the following: 1. When PMNs of healthy newborns had been exposed to a heat shock (42°C) the generation of O_2^- was temporarily inhibited. This is in aggreement with the notion that cells under stress exhibit a repression of their function. However, the preexposure of these neonatal PMNs to a heat shock prevented the inhibition of O_2^- generation during a challenge of a second heat shock. This finding suggests that the neonatal PMNs acquired thermotolerance, as do the PMNs from adults. 2. The O_2^- generation from PMNs of stressed neonates is inhibited and the amount of O_2^- generated is significantly lower than that generated by healthy neonatal PMNs exposed to a heat shock. The O_2^- genaration from the PMNs of stressed neonates was not reestablished after a high temperature exposure in spite of the high production of hsp70 by these cells.

Our results suggest that neonatal PMNs have the ability to synthesize hsp70. However, the hsp70 synthesis cannot protect the normal bactericidal function of the PMNs of stressed neonates and consequently their ability to fight against infections. This may be one of the mechanisms that can explain the high susceptibility of newborns to infection and the increased mortality of neonatal infections. Further investigations on the complex neonatal immunological mechanisms and on the complicated PMNs functions are mandatory if we want to confront neonatal infections that represent a potential danger for neonates.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilson C. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection J. Pediat. 1986; 108:1.
2. DeLeo F., Renee J., McCormick S. et al. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assemply. J Clin. Invest. 1998; 101:455.
3. Hallett M. Lloyds D. Neutrophils priming: the cellular signals that say «amber» but not «green». Immunol Today 1995;16:264.
4. Κλεάνθους Π. Η επίδραση των συνθηκών του τοκετού στον οξειδωτικό μεταβολισμό των πολυμορφοπυρήνων του νεογνού. Διδακτορική διατριβή (στο στάδιο της συγγραφής) Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία».
5. Villar J., Mullen J., Slutsky A. Stress proteins, disease and survival. Int. Care Med. 1993;3:140.
6. Rittosa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experienta 1962;18: 571.
7. Tissieres A., Mitchell H., Fracy W. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 1974;84:389.
8. Schlesinger M., Ashburner M., Tissières A. In: Heat shock: From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor 1982:10.
9. Morimoto R., Kroeger P., Cotto J. The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. In Stress-Inducible Cellular Responses, ed by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:139.
10. Welch W., Kang H., Beckmann R. et al. Response of mammalian cells to metabolic stress. Curr. Top Micr. Imm. 1991; 167:31.
11. Schlesinger M. Heat shock proteins. J. Biol. Chem. 1990;265: 1211.
12. Nowak T. Synthesis of heat shock/stress proteins during cellular injury. Ann. NY. Acad. Sci 1993;10:142.
13. Graven K., Zimmerman L., Dickson E. et al. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. J. Cell. Phys. 1993;157:544.
14. Di Domenico B., Bugaiski G., Lindquist S., The heat shock response is self-

regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. Cell. 1982;31:593.

15. Schlesinger M. How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. Ped. Res. 1994; 36:1
16. Welch W. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for Medicine and Disease. Phys. Rev. 1992;72:1063.
17. Yost J., Lindquist S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. Cell. 1986:45, 185.
18. Collier N.C. Sheetz M., Schlesinger M. Concomitant changes in the intermediate filament network and mitochondria during heat shock and recovery in chicken embryo fibroblasts. J. Cell. Bioch. 1993;52:297.
19. Welch W. Suhan J.P Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. J. Cell. Biol. 1986;103: 2035.
20. Miron T., Vancompernolle K., Vandekerckhore J. et al. A 25kDa inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. J. Cell. Biol. 1991; 114:255.
21. Lida K., Iida H., Yahara I. Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. Exp. cell. Res. 1986; 165:207.
22. Vilaboa N.., Permejo G., Perez C. et al. Heat shock and cadmium chloride increase the vimentin mRNA and protein levels in U-937 human promonocytic cells. J. cell. Sci. 1997; 110:201.
23. Becker J., Graig E. Heat shock proteins as molecular chaperones. Eur. J. Bioch. 1994;219:11.
24. Craig E., Weissman J., Horwich A. Heat shock proteins and Molecular chaperones: Mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell. 1994;78:365.
25. Ellis J.. Molecular Chaperones. Annu. Rev. Bioch. 1991;60:321.
26. Lund P. The roles of molecular chaperones in vivo. Essays in Bioch. 1995:29:113.
27. Liang P., MacRae T. Molecular chaperones and the cytoskeleton J. Cell. Sci. 1997;110:1431.
28. Hendrick J., Hartl F. The role of molecular chaperones in protein folding. Faseb

J. 1995;9:1559.

29. Hightower L. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. Cell. 1991;66,191
30. Gething M., Sambrook J. Protein folding in the cell. Nature 1992;355:33.
31. Rutherford S., Zuker C. Protein folding and the regulation of signaling pathways. Cell. 1994;79:1129.
32. Frydman J., Nimmesgorn E., Ohtsuka K. et al. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. Nature 1994;370:111.
33. Stuart R., Cyr D., Graig E. et al. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. TIBS 1994;19:87.
34. Burdon R.H. Heat shock and the heat shock proteins. Bioch. J. 1986;240:313.
35. Morange M. Developmental control of heat shock and chaperone gene expression. CMLS 1997;53,78.
36. Christian E., Michel E., Renard J. Developmental control of heat shock and chaperone gene expression. CMLS 1997;53,168.
37. Ananthan J., Goldberg A., Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science 1986;232, 522.
38. Voellmy R. Sensing stress and responding to stress. In Stress-Inducible Cellular Responses by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:121.
39. Baler R., Welch W. J., Voellmy R. Heat shock regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. J. Cell. Biol. 1992;117,1151.
40. Nover L., Scharf K. Heat stress proteins and transcriptional factors. CMLS 1997;80,103.
41. Cotto J., Fox S., Moritomo R. HSF1 granules: a novel stress - induced nuclear compartment of human cells. J. Cell. Sci 1997;110:2925.
42. Jolly C., Morimoto R., Nicond M. HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. J. Cell. Sci 1997; 110:2935.
43. Greene J., Kingston R. TATA-dependent and TATA - Independent function of the

basal and heat shock elements of a human hsp70 promoter. Mol. Cell. Biol. 1990;10:1319.

44. Goff S., Goldberg A. Production of abnornal proteins in E.coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes. Cell. 1985;41,587.
45. Baler R., Dahl G., Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligonerization, modification and repair translocation of heat shock transcription factor HSF1, Mol. Cell. Biol. 1993;13: 2486.
46. Amin J., Ananthan J., Voellmy R. Key features of heat shock regulatory elements. Mol. Cell. Biol. 1988; 8:3761.
47. Morimoto R. Cell in stress - transcriptional activation of heat shock genes. Science 1993:259:1409.
48. Pelham H. Speculations on the functions of the major heat shock and glycose-regulated proteins. Cell. 1986;46:959.
49. Milarski K., Welsch W., Morimoto R. Cell cycle-dependent association of hsp70 with specific cellular proteins. J. Cell. Biol. 1989;108:413.
50. Haas I. BIP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum.Experientia 1994;50:1012.
51. Munro S., Pelhan H.. An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78kd glycose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell. 1986;46:291.
52. McKay D. Structure and mechanism of 70kDa heat-shock-related proteins. Ann NY Acad Sci 1993;19:66.
53. Lewis M., Pelham H. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70kDa heat shock protein. EMBO J. 1985;4:3137.
54. Hartl F., Martin J. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones hsp70 and hsp60. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1992;21:293.
55. Hartl F., Hlodan R., Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations TIBS 1994;19:20.
56. Langer T., Neupert W. Heat shock proteins hsp60 and hsp70. Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. Curr. Top. Micr. Immun. 1991;167:3.
57. Burston S., Clarke A. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. Essays Bioch. 1995;29:125.

58. Stuart R., Cyr D., Graig E et al. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. TIBS 1994;19:87.
59. Rivett J. Intracellular protein degradation. Essays Bioch. 1990;25:39.
60. Langer T., Newpert W. Regulated protein degradation mitochondria. Experientia 1996;52:1069.
61. Terlecky S. Hsp70 and lysosomal proteolysis. Experientia 1994;50:1021.
62. Beckmann R., Mizzen L., Welch W. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: Implication for protein folding and assembly. Science 1990;248: 850.
63. James P., Pfund C., Graig E. Functional specificity among hsp70 molecular chaperones. Science 1997;275:387.
64. Palleros D., Welch W., Fink A. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1991;88:5719.
65. Kabakov A., Gabaji V. Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stress. Experientia 1993;49:706.
66. Skowyra D., Georgopoulos C., Zylicz M. The E. coli dnak gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. Cell. 1990; 62:939.
67. Morcillo G., Gorad E., Tanguay R. et al. Specific intranuclear distribution of hsp70 during heat shock in polytene cells. Exp. Cell. Res. 1997; 236:361.
68. Velazquez J., Lindquist S., Di Domenico B. Intracellular localisation of heat shock proteins in Drosophila. Cell. 1980;20:679.
69. Velazquez J., Lindquist S. Hsp70: nuclear function during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery Cell. 1984;36:655.
70. Pelham H. Hsp70 accelerates the recovery of nuclear morphology after heat shock. EMBO J. 1984;3:3095.
71. Hansen L., Houchins J., O'Leary J. Differential Regulatin of HSC70, HSP70, HSP90a and HSP90β mRNA Expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. Exp. Cell. Res 1991;192:587.
72. Obermann W., Sandermann H., Russo A. et al. In Vivo function of hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. J. Cell. Biol. 1998;143:901.
73. Lindquist S., Graig E. The heat shock proteins. Ann. Rev. Genetics 1988;22:631.
74. Howard K., Holley S., Yamamoto K. et al. Mapping the hps90 binding region of

the glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 1990;265:11928.

75. Dalman F., Sherrr L., Taylon L. et al. Localization of the 90kDa heat shock protein-binding site with the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. J. Biol. Chem. 1991;266:3482.
76. Sanchez E., Housley P., Pratt W. The molybdat - stabilized glycocorticoid binding complex of L-cells contains a 98-100 Kdalton non steroid-binding phosphoprotein that is part of the murine heat-shock complex. J. steroid Biochem 1986;24:9.
77. Sanchez E., Meshinchi S., Tienrungroi W et al. Relation of the 90kD murine heat-shock protein to the untrasformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 1987;262:6986.
78. Renoir J., Buchou Z., Bailieu E. Involvement of a nonhormone-binding 90-kiladalton protein in the nontransformed 8S form of the rapid uterus progesterone receptor. Biochemistry 1986;25:6405.
79. Pratt W., Sanchez E., Bresnick E. et al. Interaction of the glucocorticoid receptor with the Mr 90.000 heat shock protein: an envolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation. Cancer Res. 1989;49 Suppl: 2222S.
80. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. Cell. 1987;56:335.
81. Pratt W. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 1993;268:21455.
82. Cadepont F., Schweizer - Groyer G., Segard-Maurel J. et al. Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticoid receptor in nonfuctional state. J. Biol. Chem. 1991;266:5834.
83. Pratt W., Gehring U., Toft D. Molecular Chaperoning of steroid hormone receptors. In Stress-Inducible Cellular Responses ed. by Feige U., Morimoto R., Yahara I., and Polla B. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:79.
84. Picard D., Khursheed B., Garabedian M et al. Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. Nature 1990;348:166.
85. Dunkan R., Hershey J. Heat Shock-induced translational alterations in HeLa cells. J. Biol.Chem. 1984;259:11882.
86. Rose D., Welch J., Kramor G. et al. Possible involvement of the 90kDa heat shock protein in the regulation of protein synthesis. J. Biol. Chem. 1989;264:6239.

87. Williams N., Nelsen M. Hsp70 and Hsp90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of Tetrahymena. J. Cell. Sci 1997;110: 1665.

88. Oppermann H. Levinson W., Bishop J. A cellular protein that associates with a transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat shock protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981;78:1067.

89. Brugge J., Erikson E., Erikson R. The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60^{src}, with cellular proteins. Cell. 1981;25:363.

90. Kaufmann S. Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today 1990;11:129.

91. Young R. Stress proteins and immunology. Annu. Rev. Immunol. 1990;8:401.

92. Young R, Elliott T., Stress proteins, infection and immune surveillance Cell. 1989;59:5.

93. Koga T., Werttenberger W., Debruyn J. et al. T Cells against a bacterial heat shock protein recognise stressed macrophages. Science 1989; 180-1112.

94. Young D., Lathigva R., Hendrix R. et al. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1988;85:4267.

95. Feige U., Eden W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. In Stress-Inducible Cellular Responses ed by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B., Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:359.

96. Buchmeier N., Heffron F. Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages. Science 1990;248:730.

97. Schultz D., Arnold P. Heat shock (stress) proteins and autoimmunity in Rheumatic disease. Sem. Arth. Rh. 1993; 22:357.

98. Seitz C., Kleindienst R., Xu Q. et al. Coexpression of heat-shock protein 60 and intercellular-adhesion molecule-1 is related to increased adhesion of monocytes and T-cells to aortic endothelium of rats in response to endotoxin. Lab. Invest. 1996;74:241.

99. Suzue K., Young R. Heat shock proteins as immunological carriers and vaccines. In Stress-Inducible Cellular Responses ed. by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B., Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:451.

100. Ashburner M., Bonner J. The induction of gene activity in Drosophila by heat shock. Cell. 1979;17:241.

101. Arrigo F., Suhan J. Welch J. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. Mol. Cell. Biol. 1988;8:5059.

102. Huot J., Roy G., Lambert H. et al. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27.000 heat shock protein. Cancer Res. 1991;51:5245.

103. Lavoie J., Bingras-Breton G., Landry J. Induction of Chinese hamster hsp27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. J. Biol. Chem. 1993;268:3420.

104. Landry J., Weber L. Heat shock resistance conferred by expression of the human hsp27 gene in rodent cells. J. Cell. Biol. 1989;109:7.

105. Kato K., Hasegawa K., Goto S. et al. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27, J. Biol. Chem. 1994;269:11274.

106. Minowada G., Welch W. Variation in the expression and/or Phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation. J. Biol. Chem. 1995;270: 7047.

107. Guesolon F., Saklatvala J. Identification of a cytoplasmic protein kinase regulated by IL-1 that posphorylates the small heat shock protein, hsp27. J. Immunol 1991;147:3402.

108. Robane B., Hepburn R., Lecoq W. et al. Tumor necrosis factor-a induces the phosphorylation of 28kDa stress proteins in endothelial cells: possible role in protection against cytoxicity? Biochem. Biophys. Res. Commun1989;163:301.

109. Rouse J., Cohen P., Trigon S. et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell. 1994;78:1027.

110. Knauf U., Jacob V., Engel K. et al. Stress -and mitogen- induced phosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by MAPKAP kinase-2 is not essential for chaperone properties and cellular thermoresistance EMBO J. 1994;13:54.

111. Kampinga H. Thermotolerance in mammalian cells. Protein denaturation and aggregation and stress proteins. J. Cell. Sci. 1993;104:11.

112. Li G., Nusseuzweig A. Thermotolerance and heat shock proteins. In: Stress-

Inducible Cellular Responses ed by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:425.

113. Subjeck J., Thung-Tai S. Stress protein systems of mammalian cells. Am J. Physiol 1986;250:C1.
114. Raaphorst G, Romano S., Mitchell J. et al. Intrinsic differences in heat and or/x-ray sensitivity of seven mammalian cell lines cultured and treated under identical conditions. Cancer Res. 1979;39:396.
115. Laszo A. The thermoresistant state: Protection from initial damage or better repair? Exp. Cell. Res. 1992;202:519.
116. Mizzen L., Welch W. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. J. Cell. Biol 1988;106:1105.
117. Welch W., Mizzen L. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments and small nuclear ribonucleoprotein complexes. J. Cell. Biol 1988;106:1117.
118. Parsell D., Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet. 1993;27:437.
119. Li G., Mak J. Induction of heat shock protein synthesis in murine tumors during the development of thermotolerance. Cancer Res. 1985;45:3816.
120. Landry J., Chretien P., Lambert H. et al. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. J. Cell. Biol 1989;109:7.
121. Widelitz R., Magun B.E., Gerner E. Effects of cycloheximide on thermotolerance expression, heat shock protein syntesis and heat shock protein mRNA accumulation in rat fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 1986;6:1088.
122. Riabowal K., Mizzen L., Welch W. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. Science 1998;242:432.
123. Nguyen V., Morange M., Bensande O. Protein denaturation during heat shock and related stress. J. Biol Chem 1989;264:10487.
124. Corell R., Gross R. Splicing thermotolerance maintains pre-mRNA transcripts in the splicing pathway during severe heat shock. Exp. Cell. Res. 1992;202:233.
125. Yost H., Lindquist S. Translation of unspliced transcripts after heat shock.

Science 1988;242:1544.

126. Huot J., Houle F., Spitz D., et al. Hsp27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. Cancer Res. 1996;56:273.
127. Huot J., Lambert H., Lavoie J. et al. Characterization of 45kDa/54kDa hsp27 Kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation - dependent protective function of mammalian 27kDa heat shock protein hsp27. EJB 1995;227:416.
128. Graig T. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995:267:1456.
129. Τσάγκαρης Γ., Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου Φ. Απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Ένα φυσιολογικό γεγονός με ιδιαίτερο ρόλο στη γένεση και θεραπεία του καρκίνου. Ιατρική 1996;69:146.
130. Williams G., Smith C., McGarthy N. et al. Apoptosis: final control point in cell biology. Trend Cell. Biol 1992;2:263.
131. Samali A., Gorman M., Cotter G. Apoptosis - the story so far... Experientia 1996;52:933.
132. Montagne J., Cidlowski J. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. Experientia 1996;52:957.
133. Rowan S., Fisher D. Mechanisms of apoptotic cell death. Leukemia 1997;11:457.
134. Zhivotovksy B., Burgess D., Orrenius S. Proteases in apoptosis. Experientia 1996:52:968.
135. Hart S., Haslett C., Dransfield I. Recognition of apoptotic cells by phagocytes. Experientia 1996;52:950.
136. Steller H. Mechanisms and Genes of cellular suicide. Science 1995;267:1445.
137. Lavin M., Watters D., Song Q. Role of protein kinase activity in apoptosis. Experientia 1996;52:979.
138. Kyriakis J., Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. J. Biol. Chem. 1996;271:24313.
139. Cornelius G., Engel M. Stress causes induction of MAP kinase-specific phosphatase and rapid repression of MAP kinase activity in Drosophila. Cell. Sign. 1995; 7:611.

140. Guan K.L. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. Cell. Sign. 1994;6:581.

141. Sutherland C., Heath A., Pelech S. et al. Differential activation of the ERK, JNK and P38 Mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. J. Immunol. 1996:157:3381.

142. Raingeand J. Gupta J., Rogers M. et al. Pro-inflammatory cytokines and enviromental stress cause P38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J. Biol. Chem. 1995:270:7420.

143. Cobb M., Goldsmith A. How MAP kinases are regulated. J. Biol. Chem. 1995;270:14843.

144. Tony Ip Y., Davis R. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. Curr. Biol. 1998;10:205.

145. Ichijo H., Nishida E., Ivie K. et al. Induction of Apoptosis by ASK, a Mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and P38 singalling pathways. Science 1997;275:90.

146. Chen Y-R., Wang X., Templeton D. et al. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolent C and γ Radiation. J. Biol. Chem. 1996;271:31929.

147. Gabai V., Meriin A., Mosser D. et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases. J. Biol. Chem. 1997;272:18033.

148. Gabai V., Zamulaeva I., Mosin A. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins. FEBS 1995;375:21.

149. Kabakov A., Gabai V. Heat shock-induced accumulation of 70 kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis 1995;217:15.

150. Roger C., Bone M. The pathogenesis of sepsis. Ann. Int. Med. 1991;115:457.

151. Brett P., Giroir M. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. Crit. Care Med. 1993;21:780.

152. Raetz C. Biochemistry of endotoxins. Annu Rev. Biochem. 1990;59:129.

153. Raetz C., Ulevitch R.J, Wright S., et al. Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. 1991;5:2652.

154. Lynn W., Golenbock D. Lipopolysaccharide antagonist. Immunol. today 1992;13:271.

155. Wright S., Kolesnick R. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? Immunol. Today. 1995;16:297.

156. Hogg W., Berlin G. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. Immunol. Today. 1995;16:327.

157. Springer T. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990;346:425.

158. Argenbright L., Barton R. Interactions of leukocyte Integrins with intercellular adhesion molecule-1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. J. Clin. Invest. 1992;89:259.

159. Korthuis R., Anderson D., Granger N. Role of Neutrophil - Endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. J. Crit. Care 1994;9:47.

160. Angel del Pozo M., Sanchez-Mateos P., Sanchez-Madrid F. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? Immunol. Today 1996;17:127.

161. Lavkan A., Astiz M., Rackow E. Effects of proinflammatory cytokines and bacterial toxins on neutrophil rheologic properties. Crit. Care Med. 1998;26: 1677.

162. Issekutz A., Lopes N. Endotoxin activation of enthothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon-γ. Immunology 1993;79:600.

163. Mantovani A., Bussolino F., Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. FASEB J. 1992:6:2591.

164. Cassatella M. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol. Today 1995;16:21.

165. Sha'afi R., Molski T. Activation of the Neutrophil. Prog. Allergy 1988;42:1

166. Krause K., Lew D. Bacterial Toxins and neutrophil activation. Sem. Hematol. 1988;25:112.

167. Painter R., Sklar L., Jesaitis A. et al. Activation of neutrophils by N-formyl chemotactic peptides. Federation Proc. 1984;43:2737.

168. Baggiolini M., Bonlay F., Badwey J. et al. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. FASEB J. 1993;7:1004.

169. Fällman M., Lew D., Stendahl O. et al. Receptor-mediated Phagocytosis in

human neutrophil is associated with increased formation of inositol phosphates and diacylglycerol. J. Clin. Invest. 1989;84:886.

170. Bauldry S., Elsey K., Bass D. Activation of NADPH oxidase and phospholipase D in permeabilized human neutrophils. J. Biol. Chem. 1992;267:25141.
171. Nihizuka Y. Studies and perspective of protein kinase C. Science 1986;233:305.
172. You-Li Zu, Youxi A., Gilchrist A. et al. Activation of MAP kinase-activated protein kinase-2 in human neutrophils after phorbol ester or fMLP peptide stimulation. Blood 1996;87:5287.
173. Read M., Whitely M., Gupta S. et al. TNFa induced E-selection expressin is activated by the NF-kB and JNK/P38 MAP kinase pathways. J. Biol. Chem. 1997;272:2753.
174. Borregaard N., Tomber Al. Subcellar localization of human neutrophil NADPH oxidase, b-cytochrome and associated flavoprotein. J. Biol. Chem. 1984;259:47.
175. Babior B. The respiratory burst oxidase. TIBS 1987;12:241.
176. Weiss S., LoBuglio A. Biology of Disease. Phagocyte - Generated oxygen metabolits and cellular injury. Lav. Inv. 1982;47:5.
177. Goode H., Webster N. Free radicals and antioxidants in sepsis. Crit. Care Med. 1993;21:1770.
178. Finkel T. Oxygen radicals and signalling. Curr. Opin. Cell. Biol. 1998;10:248.
179. Reiter R. Oxidative processes and antioxidatire defense mechanisms in the agin brain. FASEB J. 1995;9:526.
180. Babior B. Oxygen microbial killing by phagocytes. N. Eng. J. Med. 1978;298:659.
181. Badwey J., Karnovski M. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Annu. Rev. Bioch. 1980;49:695.
182. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase. Accounts Chem. Res. 1972;5:321.
183. McCord J., Day ED. Jr. Superoxide dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron - EDTA complex. FEBS Lett. 1978;86:139.
184. Klebanoff S. Myeloperoxidase - halide - hydrogen peroxide antibacterial system. J. Bacter., 1968;95:2131.

185. Harrison J., Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxi-dase. J. Biol. Chem. 1976;251:1371.

186 Lowenstein C., Dinerman J., Snyder S. Nitric Oxide: A physiologic messenger.Ann. Intern. Med. 1994;120:227.

187. Synder S., Bredt D. Biological roles of nitric oxide Sci. Am. 1992;266:28.

188. Nathan C., Hibbs J. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicroboal activity. Curr. Opin. Immunol. 1991;3:65.

189. Nava E., Palmer R., Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: How much is beneficial? Lancet 1991;338:1555.

190. Wright C., Rees D., Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxic shock. Cardiovasc. Res. 1992;26:48.

191. Yuan Shi, Hua-giang Li, Chi-kao Shen et al. Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. J. Pediatr. 1993;123:435.

192. Sengelov H., Kjeldsen L., Borregaard N. Control of Exocytosis in early neutrophil activation. J. Immunol. 1993;150(4):1535.

193. Spitznagel J., Snafer W. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: A historical summary. Rev. Infect. Dis. 1985;7:398.

194. Jacquier - Sarlin M., Fuller K., Xuan Din A. et al. Protective effects of hsp70 in inflammatory. Experientia 1994;50:1031.

195. Koller M., Koning W. 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) induces heat shock proteins in human leukocytes. Bioch. Bioph. Res. Comm. 1991;175:804.

196. Koller M., Koning W. Arachidonic acid metabolism in heat-shock treatment human leukocytes. Immunology 1990;70:458.

197. Jurivich D., Sistoven L., Surge K. et al. Arachidonate is a potent modulator of human heat shock gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:2280.

198. Klebanoff S., Vadas M. Harlan J. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J. Immunol. 1986;136:4220.

199. Polla B., Cossarizza A. Stress proteins in inflammation. In: Stress - Inducible Cellular Responses ed. by Feige U., Morimoto R., Yahara I. and Polla B. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996:375.

200. Kusher D., Wave C., Cooding L. Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor. J. Immunol. 1990;145: 2925.

201. Hirroven M.R., Brune B., Lapetina E. Heat shock protein and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide. Bioch. J. 1996;315:845.
202. Jäätela M., Wissing D. Heat shock proteins protect cells from monocytes cytoxicity: possible mechanism of self protection. J. Expl. Med. 1993;177:231.
203. Kantengwa S., Donati Y., Clerget M. et al. Heat shock proteins: an autoprotective mechanism for inflammatory cells? Sem. Immunol. 1991;3:49.
204. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone narrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968;21: suppl. 97:77.
205. English D., Andersen B. Single step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J. Immunol. Methods 1974;5:249.
206. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 1970;227:680.
207. Towbin H. Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979; 76:4350.
208. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. J. Immunol Methods, 1984;72:313.
209. Hauri H., Bucher K. Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. Anal Biochem, 1986;159:386.
210. Mattson D., Bellehumur T. Comparison of three Chemiluminescent horseradish peroxidase substrates for immunobloting. Anal. Biochem. 1996;240:306.
211. Babior B., Cohen H.J. Measurement of neutrophil function: Phagocytosis, degranulation, the respiratory bust and bacterial killing. In: «Leukocyte Function». ed by Cline M.J. New York Churchill Livingstone 1981:1
212. Yamazaki M., Matsnoka T., Yasui K et al. Increased production of superoxide anion by neonatal polymorphonuclear leukocytes stimulated with a chemotactic peptide. Am J. Hemat. 1988;27:169.
213. Massey V. The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome C. Biochem. Biophys. Acta 1959;34:255.
214. Anfinsen C. Principles that govern the folding of protein chains. Science 1973;181:223.
215. Georgopoulos C. The emergence of the chaperone machines. TIBS

1992;17:295.

216. Donati Y. Slosman D., Polla B. Oxidative injury and th heat shock response. Bioch. Pharm. 1990;40:2571.
217. Fincato C., Palentavutti N., Siue A. et al. Expression of a heat-inducible gene of the hsp70 family in human myelomonocytic cells: Regulation by bacterial products and cytokines. Blood 1991;77:572.
218. Joslin G., Haffeez W., Perlumutter D. Expresion of stress protein in human mononuclear phagocytes. J. Immunol. 1991;147:1614.
219. Polla B., Healy A., Wojno W. et al. Hormone 1,a 25-hydroxyvitamin D3 modulates heat shock response in monocytes. Am. J. Physiol (Cell Physiol 21) 1987;252: C640.
220. Spector N., Freedman A.S., Freeman G et al. Activation primes human B lymphocytes to respond to heat shock J. Exp. Med. 1989;170:1763.
221. Haive R., Peterson M., O' Leary J. Mitogen activation induces the enhanced synthesis of two heat-shock proteins in human lymphocytes. J. Cell. Biol. 1988;106:883.
222. Ferris D., Bellan-Havel R., Morimoto R. et al. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:3850.
223. Eid N., Kravath R., Lanks K. Heat shock protein synthesis by human polymorphonuclear cells. J. Exp. Med. 1987;165:1448.
224. Maridonneau-Parini J. Clevi J., Polla B. Heat shock inhibits NADPH oxidase in human neurophils. Bioch. Bioph. Res. Comm. 1988;154:179.
225. Cox G., Moseley P., Hunninghake G. Induction of heat shock protein 70 in neutrophils during exposure to subphysiologic temperatures. J. Infect. Dis. 1993; 167:769.
226. Hensler T., Köller M., Alouf J. Bacterial toxins induce heat shock proteins in human neutrophils. Bioch. Bioph. Res. Comm. 1991;179:872.
227. Kindas-Mügge I., Hammerle A., Fröhlich I. et al. Granulocytes of critically ill patients spontaneously express the 72 kD heat shock protein. Circ. Shock 1993;39:247.
228. Hotchkiss R., Nunnally I. Lindquist S. et al. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. Am. J. Physiol. 1993;265:R1447.

229. Delogu G., Bosco L, Marandola M. et al Heat shock protein (HSP70) expression in septic patients. J. Crit. Care 1997;12:188.

230. Schroeder S., Bischoff J., Lehmann L. et al. Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (hsp70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis. Int. Care Med. 1999;25:52.

231. Martins G., David C., Mitchel C. et al. Expression of heat shock protein 70 in leukocytes of patients with sepsis. Int. J. Mol. Med. 1999;3:401.

232. Kubo T., Towle C., Mankin H. et al. Stess-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arth. Rheum. 1985;28:1140.

233. Omar R., Pappola M., Saran B. Immunocytochemical detection of the 70 kDa heat shock protein in alcoholic liver disease. Arch. Path. Lab. Med. 1990;114:589.

234. Polla B., Perin M., Pizurki L. Regulation and induction of stress proteins in allergy and inflammation. Clin. Exp. Allergy 1993;23:548.

235. Polla B., Cossarizza A. Stress proteins in inflammation In: Stress - inducible Cellular Responses ed. by Feige U., Morimoto R., Yahara I. et Polla B. Birkhaüser Verlag Basel/Switzerland 1996:375.

236. Benjamin J., Horje S., Greenberg M. et al. Induction of stress protein in cultured myogenic cells. J. Clin. Invest. 1992;89:1685.

237. Knowlton A., Brecher P., Apstein C. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. J. Clin. Invest. 1991;97:139.

238. Tomohiko A., Hideo I. Shinpei K. Heat shock protein 70 messenger RNA reflects the severity of ischemia / hypoxia-reperfusion injury in the perfused rat liver. Crit. Care Med 1997;25:324.

239. Anderson R., Kapp D., Woo S. et al. Predictive assays for tumor response to single and multiple fractions of hyperthermia. Rec. Results Cancer Res.1989;109:239.

240. Li G,. Mak J., Induction of heat shock protein synthesis in murine tumors during the development of thermotolerance. Cancer Res. 1985;45:3816.

241. Marquez C., Sneed P., Li G. et al. HSP70 synthesis in clinical hyperthermia patients: preliminary results of a new technique. Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys. 1993;28:425.

242. Maridonneau - Parini J., Malawista St. Stubbe H. Heat shock in Human

Neutrophils:Superoxide generation is inhibited by a mechanism distinct from heat-denaturation of NADPH oxidase and is protected by heat shock proteins in thermotolerant cells. J. Cell. Phys. 1993;156:204.

243. Hall T. Role of hsp70 in cytokine production. Experientia 1994;50:1048.

244.Jäätelä M., Wissing D. Heat shock protein protect cells from monocytes cytoxicity: possible mechanism of self protection. J. Expl. Med. 1993;177: 231.

245. Jäätelä M.,Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. J. Immunol. 1993;151:4286.

246. Buchmeier N. Heffron F. Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages. Science 1990;248:730.

247. Zarley J. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for Leismania donovani chage-si promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. J. Clin. Invest. 1991;88:1511.

248. Polla B., Bonvehtve J.V., Krane S.M., 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases the toxicity of hydroxen peroxide in the human monocyte line U937: the role of calcium and heat shock. J. Cell. Biol. 1988;107:373.

249. Polla B., Mili N., Kantengwa S. Heat shock and oxidative injury in human cells. In: Heat shock ed. by Marresca B. and Lindquist S. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1991:279.

250. Li Y., Chopp M., Yoshiba Y. Distribution of 72 kDa heat-shock protein in rat brain after hyperthermia. Acta Neuropathol. 1992;84:94.

251., Stojadinovic A., Kiang J., Goldhill J. et al. Induction of the heat shock response prevents tissue injury during acute inflammation of the rat ileum. Crit. Care Med. 1997;25:309.

252. Villar J., Ribeiro S., Mullan B. et al. Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. Crit. Care Med. 1994;22:914.

253. Barbe M., Tytell M., Gower D. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. Science, 1988;230:1817.

254. Trost S., Omens J., Karlon W. et al. Protection against myocardial dysfun-ction after a brief ischemia period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70. J. Clin. Invest. 1998;101:855.

255. Ryan A. Flamangan, W., Moseley P. et al. Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. J. Appl. Physiol. 1992;73:1517.

256. Mackowiak P. Fever: Blessing or Curse? A Unifying Hypothesis. Ann. Intern. Med. 1994;120:1037.

257. Styrt B., Stugarman B. Antipyresis and Fever. Arch. Intern. Med. 1990;150: 1589.

258. Kluger M. Fever: Role of Pyrogens and Gryogens. Phys. Rev. 1991;71:93.

259. Kluger M. Fever. Ped. 1980;66:720.

260. Super C., Breder G. The neurologic basis of fever N. Engl. J. Med. 1994;330: 1880.

261. Kluger B., Vaughn L. Fever and survival in rabbits infected with Pasteurella multocida. J. Physiol. 1978;282:243.

262. Banet M. Fever and survival in the rat: the effect of enhancing fever. Pfugers Arch. 1979;381:35.

263. Schundt J., Rasmussen A. The influence of enviromental temperature on the course of experimental herpes simplex infection. J. Infect. Dis. 1960;107:356.

264. Bell J., Moore G. Effects of hight ambient temperature on various stages of rabies virus infection in mice. Infect. Immun. 1974;10:510.

265. Barazzone C., Christie P., Polla B. Heat-shock proteins in the cell defence mechanisms of the lung. In: Airways and Environment: From injury to repair. ed. by Chretien J., Dusser D. Marcel Dekker Inc., New York. 1996:20.

266. Jolliet P. Slosman D., Polla B., Heat shock proteins in critical illness: marker of cellular stress or more? In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. ed. by Vincend J. Springer-Verlag, Berlin, 1994:24.

267. Villar J., Edelson J., Post M., et al. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. Am. Rev. Respir. Dis. 1993;147:177.

268. Vinglola A., Chanez P., Polla B. Increased expression of hsp70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1995;13: 683.

269. Ribeiro S., Villar J., Downey C. et al. Sodium arsenite induces heat shock protein- 72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. Crit. Care Med. 1994;22:922.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DG: διακυλγλυκερόλη

FMLP:φορμυλοπεπτίδιο

GMCSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor (διεγερτικός παράγων των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων)

HClOH: υποχλωριώδες οξύ

hse: heat shock element (νουκλεοτιδική αλληλουχία του γόνου των hsp)

hsf: heat shock factor (μεταγραφικός παράγων των hsp)

hsp: heat shock protein (πρωτεΐνη του θερμικού stress)

ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1 (μόριο προσκόλλησης στο ενδοθήλιο των αγγείων)

IL: ιντερλευκίνες

IP3: inositol 1,4 5, trisphosphate (τριφωσφορική ινοσιτόλη)

JNK: C-Jun N-terminal kinase (ομάδα MAP κινασών)

LPS: λιποπολυσακχαρίτης

LBP: lipopolysacharide binding protein (πρωτεΐνη που συνδέεται με το λιποσακχαρίτη)

Lyso-PA: λυσοφωσφατιδικό οξύ

LTB4: λευκοτριένια B4

MAP: mitogen - activated protein (ομάδα πρωτεϊνικών κινασών)

NADPH: νικοτιναμιδοαδενινοφωσφορικό νουκλεοτίδιο

$ONOO^-$: υπεροξυνιτρώδες ιόν

PA:φωσφατιδικό οξύ

PAF: παράγων ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

PBS: phosphate - buffer saline

PIP2: φωσφολιποειδές της μεμβράνης

PKC: πρωτεϊνική κινάση C

PLA_2: φωσφολιπάση A_2

PLC: φωσφολιπάση C

PLD: φωσφολιπάση D

PMA: phorbol 12-myristate 13acetate

ROS: Reactive oxygen species (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου)

SDS: sodium - dodecyl salt

SOD: δισμουτάση υπεροξειδίου

Splicing: διαδικασία αποκοπής και επανασυγκόλλησης των pre-mRNA

TNF: Παράγων νέκρωσης όγκων

Western - blotting: μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνου με μονοκλωνικό αντίσωμα