



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

*Μελέτη της επίδρασης σωματιδιακών συστατικών
της ρύπανσης σε μηχανισμούς επιβίωσης
κυττάρων ανθρώπου*

Διδακτορική Διατριβή
Όλγας Γ. Μαυροφρύδη
Βιολόγου

Αθήνα 2013



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Investigation of the effects of particulate pollution
on survival pathways of human cells

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

Olga G. Mavrofrydi

Biologist

Athens 2013

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας
Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μπέης Ισίδωρος

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων &
Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας
Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας
Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γαϊτανάκη Αικατερίνη

Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων &
Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κατσουγιάννη Ελένη-Κλεάνθη

Καθηγήτρια, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής -
Ψυχιατρικής & Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Μπέης Ισίδωρος

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων &
Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Νικολοπούλου-Σταμάτη Πολυξένη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Κλινικοεργαστη-
ριακός Τομέας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας
Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Στραβοπόδης Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας
Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας
Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής, από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (N. 5343/1932 άρθρο 202)

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα 2008-2013. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια ήταν η κ. **Παναγιώτα Παπαζαφείρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, την οποία ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική της καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της, αλλά και την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε από την πρώτη ημέρα, που πέρασα την πόρτα του εργαστηρίου 39, ξεκινώντας την προπτυχιακή μου διπλωματική εργασία, το 2005. Εκτός όμως από τη συνεργασία μας, σε επιστημονικό επίπεδο, θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερως, και σαν άνθρωπο, για την υπομονή, την κατανόηση, την ενθάρρυνση και τη συμπαράστασή της, σε όλες τις δύσκολες στιγμές, που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της δημιουργικής πορείας κάθε υποψήφιου διδάκτορα.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον Καθηγητή κ. **Ισίδωρο Μπέη**, Πρόεδρο του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την τιμή, που μου έκανε συμμετέχοντας στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, την εμπιστοσύνη του και την άψογη συνεργασία, που είχαμε, σε όλο το χρονικό διάστημα της Διδακτορικής Διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. **Ουρανία Τσιτσιλώνη**, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές της σε θέματα, που αφορούσαν στο ερευνητικό πεδίο της Ανοσολογίας, και για τον χρόνο, που διέθεσε για τη διόρθωση του κειμένου της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ, επίσης, για την ευγενική χορήγηση της IL-1β, που συνέβαλε στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας, και, φυσικά, για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. **Αικατερίνη Γαϊτανάκη**, για τη συμμετοχή της στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της, που συνέβαλαν καθοριστικά, στη διαμόρφωση της τελικής προφορικής υποστήριξης της διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Δημήτριο Στραβοπόδη**, τόσο για τη συμμετοχή του στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή, όσο και για τη χορήγηση του αντισώματος έναντι του GLUT1, το οποίο συνέβαλε σημαντικά σε μέρος της Διδακτορικής Διατριβής. Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, του

Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Ελένη-Κλεάνθη Κατσουγιάννη**, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Πολυξένη Νικολοπούλου-Σταμάτη**, που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. **Κωνσταντίνο Ελευθεριάδη**, Ερευνητή Α' του Εργαστηρίου Ραδιενέργειας Περιβάλλοντος, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για τη συλλογή των αστικών μικροσωματιδιακών ρύπων, καθώς και τον κ. **Νικόλαο Μιχαλόπουλο**, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη χημική ανάλυση των μικροσωματιδίων.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Σπυρίδωνα Ευθυμιόπουλο**, για τις εποικοδομητικές συμβουλές και παρατηρήσεις του, όσον αφορά στη Διδακτορική Διατριβή, όσο και για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση των προσπαθειών μου, όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τη Λέκτορα, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Ιωάννα-Αικατερίνη Αγγελή**, έναν υπέροχο άνθρωπο, που ήταν πάντα πρόθυμος να ακούσει τους προβληματισμούς μου και να με βοηθήσει, τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ευχαριστώ, επίσης, την κ. **Αθηνά Μαρμάρη**, ΕΔΤΠ του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου και την κ. **Αγγελική Φωτεινοπούλου**, τεχνικό του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, οι οποίες με στήριξαν σε κάθε δυσκολία, και πάντα μοιράζονταν μαζί μου τις επιτυχίες και τις ευτυχισμένες στιγμές αυτής της δημιουργικής ερευνητικής πορείας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. **Μαρία Ξυλούρη**, στην οποία οφείλω ένα μεγάλο μέρος των όσων έχω καταφέρει, από την πρώτη μου επαφή με τον εργαστηριακό πάγκο, μέχρι σήμερα. Η Μαρία ήταν εκείνη που με υπομονή, επιμονή, αγάπη για την έρευνα και πάντα θετική διάθεση, με καθοδήγησε, με συμβούλεψε και με ενθάρρυνε, στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα, κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και συνάδελφο κ. **Κυριακή Ζηκάκη**, Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, με την οποία, τα τελευταία τέσσερα χρόνια της παράλληλης πορείας μας, μοιραστήκαμε, κοινούς προβληματισμούς και ευχάριστες στιγμές, πάντα σε ένα κλίμα άψογης συνεργασίας, σε κάθε επίπεδο. Παρά το ασφυκτικό καθημερινό της πρόγραμμα, έβρισκε πάντα το χρόνο να με ακούσει, παροτρύνοντάς με να σκέφτομαι θετικά και κάνοντας ακόμα πιο ευχάριστη την καθημερινότητά μου, στο χώρο του εργαστηρίου. Ευχαριστώ, επίσης, την Υποψήφια Διδάκτορα κ. **Αικατερίνη**

Μελαχροινού, την κ. **Ελευθερία Περιστέρη**, M.Sc., και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές κ. **Παναγιώτα Μαυροειδή** και κ. **Γεώργιο Διβόλη**, για την απόλυτη στήριξη τους και τη φιλία τους, όλα αυτά τα χρόνια.

Δεν θα μπορούσα να μη συμπεριλάβω στις ευχαριστίες, κάποιους ανθρώπους, που αποτέλεσαν σταθμό στη ζωή μου, καθένας με τον δικό του τρόπο. Πρόκειται για τη Δρ. **Λουκία Καρακώστα**, το Δρ. **Μιχάλη Μαστρή** και την **Ανδριανή Μαϊμαρίδου**, οι οποίοι, εκτός από πολύτιμοι φίλοι, είναι για μένα πρότυπα ανθρώπων, που αγωνίζονται καθημερινά για τα όνειρά τους, όσα εμπόδια και αν βρεθούν στο δρόμο τους. Αν και βρίσκονται, πλέον, πολλά χιλιόμετρα μακριά, εξακολουθούν να με στηρίζουν, ώστε να συνεχίζω να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο. Εξίσου σημαντική σε αυτή την ιδιαίτερα εποικοδομητική πορεία των τελευταίων χρόνων, αλλά και στη ζωή μου, γενικότερα, ήταν και η συμβολή της πολύ καλής φίλης, **Μαριάννας Καπή**, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου, με πολλή αισιοδοξία και θετική ενέργεια.

Ευχαριστώ, επίσης, τους φίλους και κουμπάρους μου, **Βικτωρία-Ιωάννα Μιχαλακέλη** και **Νικόλαο Γυφτογιάννη**, οι οποίοι, επειδή βρίσκονται έξω από το πεδίο της επιστημονικής έρευνας, είχαν πάντα έναν διαφορετικό τρόπο αντίληψης των καταστάσεων, που πολλές φορές συνέβαλε στην αποφόρτιση της πίεσης και της έντασης της καθημερινότητας. Επιπλέον, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω, για το υπέροχο δώρο, που μου έκαναν για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας: την βαφτιστήρα μου, Σοφία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το **Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)**, για την προσωπική οικονομική ενίσχυση, κατά το χρονικό διάστημα 2009-2013, μέσω της χορήγησης υποτροφίας, για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, στο πλαίσιο του προγράμματος Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Εσωτερικού, στο ερευνητικό πεδίο των Βιολογικών Επιστημών. Καθοριστική για την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών, υπήρξε επίσης η οικονομική στήριξη των προγραμμάτων **NanoTEST** και **«Καποδίστριας»** (ΕΛΚΕ, ΕΚΠΑ).

Τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί, χωρίς την ανεκτίμητη και πολύπλευρη στήριξη των δικών μου ανθρώπων. Τέλος, λοιπόν, θα ήθελα να εκφράσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ ιδιαίτερα στους γονείς μου, **Γεώργιο** και **Μαρία**, καθώς και στην αδερφή μου, **Ανδριανή**, και τη γιαγιά μου, **Ελένη**, οι οποίοι ήταν και θα είναι πάντα δίπλα μου στηρίζοντας τις επιλογές μου, με υποστήριξαν ηθικά και οικονομικά κατά την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής και υπέμειναν το άγχος, τη νευρικότητα και την ένταση όλων αυτών των χρόνων.

Όλγα Μαυροφρύδη

Απρίλιος 2013

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

α.δ.: αεροδυναμική διάμετρος

ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

AhR: υποδοχέας των αρυλικών υδρογονανθράκων (aryl hydrocarbon receptor)

AIF: παράγοντας που επάγει την απόπτωση (apop^tosis inducing factor)

ANT: μεταφορέας νουκλεοτιδίων αδενίνης (adenine nucleotide translocator)

Apaf-1: παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης-1 (apop^tosis activating factor-1)

APS: υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate)

ARE: συναινετική αλληλουχία αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element)

ARF: παράγοντας ριβοζυλίωσης του ADP (ADP ribosylation factor)

ARNT: πυρηνικός μεταφορέας του AhR (AhR nuclear translocator)

ASK1/2: κινάση που ρυθμίζει το σήμα της απόπτωσης 1/2 (apop^tosis signal-regulating kinase 1/2)

ATM: μετάλλαξη του γονιδίου αταξίας-τηλαγγειεκτασίας (ataxia telangiectasia mutated)

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)

ATR: πρωτεΐνη που σχετίζεται με αταξία-τηλαγγειεκτασία και Rad3 (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)

B[α]P: βενζο[α]πυρένιο (benzo[a]p^yrene)

Bad: σχετιζόμενος με τις πρωτεΐνες Bcl-2 υποκινητής θανάτου (Bcl-2 associated death promoter)

BAF: παράγοντας ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων (B-cell activating factor)

Bax: σχετιζόμενη με τις πρωτεΐνες Bcl-2, πρωτεΐνη x (Bcl-2 associated protein x)

Bcl-2: πρωτεΐνη λεμφώματος B κυττάρων (B-cell lymphoma-2)

Bcl-xL: πολύ μεγάλη Bcl πρωτεΐνη (Bcl-extra large)

BER: επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (base excision repair)

BH: επικράτεια ομολογίας των πρωτεϊνών Bcl-2 (Bcl-2 homology domain)

bHLH: βασικό μοτίβο έλικας-θηλειάς-έλικας (basic helix-loop-helix)

Bid: αγωνιστής θανάτου, που αλληλεπιδρά με την επικράτεια BH3 (BH3-interacting domain death agonist)

BK: βραδυκίνη (brady^kinin)

bp: ζεύγη βάσεων (base pairs)

BPDE: B[α]P-7,8-διολ-9,10-εποξείδιο (B[a]P-7,8-diol-9,10-epo^xide)

BPQ: B[α]P-7,8-κινόνη (B[a]P-7,8-quinone)

BSA: αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)

Ca²⁺: ιόντα ασβεστίου

[Ca²⁺]_i: συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα

- CAD:** DNάση ενεργοποιούμενη από κασπάση (caspase-activated DNase)
- CA-IX:** ανθρακική ανυδράση-IX (carbonic anhydrase-IX)
- CBP:** πρωτεΐνη που προσδένεται στον CREB (CREB-binding protein)
- CCE:** εισροή Ca^{2+} ελεγχόμενη από την πληρότητα των αποθηκών (capacitative Ca^{2+} entry)
- CK2:** κινάση της καζεΐνης 2 (casein kinase 2)
- COPD:** χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (chronic obstructive pulmonary disease)
- CREB:** πρωτεΐνη που προσδένεται σε ακολουθία απόκρισης στο c-AMP (cAMP response element-binding protein)
- CYP1A1:** κυτόχρωμα P450, οικογένεια 1, υποοικογένεια 1, πολυπεπτίδιο 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1)
- Cyt c:** κυτόχρωμα c (cytochrome c)
- DAG:** διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol)
- DAMP:** μοριακό πρότυπο που σχετίζεται με κίνδυνο/βλάβη (danger/damage-associated molecular pattern)
- DAPI:** 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλ-ινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- DCM:** διχλωρομεθάνιο (dichloromethane)
- DD:** επικράτεια θανάτου (death domain)
- DEP:** σωματίδια εξατμίσεων μηχανών εσωτερικής καύσης (diesel exhaust particles)
- Diablo:** άμεσα συνδεόμενη πρωτεΐνη με τις IAPs με χαμηλό pI (direct IAP-binding protein with low pI)
- DISC:** σύμπλοκο σηματοδότησης που επάγει το θάνατο (death inducing signaling complex)
- DLF:** απομακρυσμένοι πνευμονικοί ινοβλάστες (distal lung fibroblasts)
- DMEM:** τροποποιημένο θρεπτικό υλικό Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- DMSO:** διμεθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)
- DNA:** δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid)
- DNA-PK:** εξαρτώμενη από DNA πρωτεϊνική κινάση (DNA-dependent protein kinase)
- DR5:** υποδοχέας θανάτου 5 (death receptor 5)
- DTPA:** διαιθυλενο-τριαμινο-πεντοξικό οξύ (diethylene-triamine-pentaacetic acid)
- DTT:** διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)
- ECL:** ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (enhanced chemiluminescence)
- EDTA:** αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylene diamine tetra-acetic acid)
- EGF:** επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor)
- EGFR:** υποδοχέας του EGF (EGF receptor)
- EGTA:** αιθυλενο-γλυκο-τετραοξικό οξύ (ethylene glycol tetra-acetic acid)
- eNOS:** ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικού οξέος (endothelial nitric oxide synthase)

- EpRE:** συναινετική αλληλουχία ηλεκτροφιλικής απόκρισης (electrophilic response element)
- EPO:** ερυθροποιητίνη (erythropoietin)
- ERK:** ρυθμιζόμενη από εξώκυττάρια σήματα πρωτεϊνική κινάση (extracellular signal regulated protein kinase)
- EtBr:** βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide)
- FADD:** πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον Fas και φέρει επικράτεια θανάτου (Fas-associated protein with death domain)
- FasL:** προσδέτης του υποδοχέα Fas (Fas ligand)
- FIH-1:** παράγοντας που παρεμποδίζει τον HIF-1 (fiactor inhibiting HIF-1)
- FBS:** ορός εμβρύου βοός (fetal hovine serum)
- FGF:** αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (fibroblast growth factor)
- FURA-2/AM:** ακετοξυμεθυλεστέρας της FURA-2 (Fura-2-acetoxymethyl ester)
- GLUT1:** μεταφορέας γλυκόζης 1 (glucose transporter 1)
- GMCSF:** παράγοντας που επάγει κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
- GPCR:** υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptor)
- GPx:** υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase)
- GSH:** γλουταθειόνη (glutathione)
- GSK3:** κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (glycogen synthase kinase 3)
- GST:** θειο-μεταφοράση της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase)
- HBSS:** ισορροπημένο διάλυμα αλάτων (Hank's balanced salt solution)
- HDF:** επιδερμικοί ινοβλάστες ανθρώπου (human dermal fibroblasts)
- Hepes:** 4-(2-υδροξυ-αιθυλο)-1-πιπεραζινο-αιθανο-θειικό οξύ (4-(2-hudroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HIF-1:** παράγοντας που επάγεται από υποξία-1 (hupxoxia-inducible factor-1)
- HIF-1α:** α υπομονάδα του HIF-1 (hupxoxia-inducible factor-1α)
- HIF-1β:** β υπομονάδα του HIF-1 (hupxoxia-inducible factor-1β)
- HO-1:** οξυγενάση της αίμης-1 (heme oxygenase-1)
- HRE:** συναινετική αλληλουχία απόκρισης στην υποξία (hupxoxia response element)
- HRP:** υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase)
- IAPs:** πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis proteins)
- ICAD:** αναστολέας της CAD (inhibitor of CAD)
- IGF-1:** ομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-1 (insulin-like growth factor-1)
- IκB:** αναστολέας του NFκB (inhibitor of NFκB)
- IKK:** κινάση του IκB (IκB kinase)
- Iono:** ιονομυκίνη (ionomycin)
- IP₃:** 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol 1,4,5-triphosphate)

- IP₃R**: υποδοχέας της IP₃ (IP₃ receptor)
- IVR**: παρεμβαλλόμενη περιοχή (intervening region)
- JAK**: κινάση Janus (Janus kinase)
- JNK**: κινάση του αμινοτελικού άκρου του c-Jun (c-Jun N_H₂-terminal kinase)
- Keap1**: ομοιάζουσα με Kelch πρωτεΐνη που σχετίζεται με ECH 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)
- KRH**: Krebs-Ringer-Hepes
- Maf**: πρωτεΐνη μυοαπονευρωτικού ινοσάρκωματος (musculoaponeurotic fibrosarcoma)
- MAPK**: επαγόμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (mitogen-activated protein kinase)
- MAPKK**: κινάση της MAPK (MAPK kinase)
- MAPKKK**: κινάση της MAPKK (MAPKK kinase)
- MDA**: μαλονδιαλδεΐδη (malondialdehyde)
- Mdm2**: μυοειδές διπλό λεπτό 2 (mouse double minute 2)
- mRNA**: αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA)
- mTOR**: στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin)
- MTT**: βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλο-θειαζολιο)-2,5-διφαινυλο-τετραζόλιο (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- NADPH**: φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
- NCX**: ανταλλάκτης Na⁺/Ca²⁺ (Na⁺/Ca²⁺ exchanger)
- NCKX**: ανταλλάκτης Na⁺/Ca²⁺-K⁺ (Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger)
- NFκB**: πυρηνικός παράγοντας κB (nuclear factor κB)
- NGF**: αυξητικός παράγοντας νευρώνων (nerve growth factor)
- NLS**: σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal)
- NP-40**: νονυλ-φαινοξυπολυαιθοξυλαιθανόλη-40 (nonyl phenoxy polyethoxyethanol-40)
- NQO1**: οξειδοαναγωγή NAD(P)H:κινόνης 1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1)
- Nrf2**: σχετιζόμενος με τον NFE2 παράγοντας 2 (NFE2-related factor 2)
- O.D.**: οπτική πυκνότητα (optical density)
- ODD**: επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (oxygen-dependent degradation domain)
- PAH**: πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας (polycyclic aromatic hydrocarbon)
- PBS**: διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline)
- PDGF**: προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor)
- PKD1**: κινάση εξαρτώμενη από την PIP3 (PIP3-dependent kinase)
- PH**: ομολογία πλεξκτρίνης (pleckstrin homology)

- PHD**: υδροξυλάση προλίνης (prolyl-hydroxylase domain)
- PI3K**: κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (phosphatidylinositol-3 kinase)
- PIP2**: 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate)
- PIP3**: 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate)
- PKB/Akt**: πρωτεϊνική κινάση B/Akt (protein kinase B/Akt)
- PKC**: πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C)
- PLC**: φωσφολιπάση C (phospholipase C)
- PLGA**: πολυ(γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (poly(lactic-co-glycolic acid))
- PM**: σωματιδιακή ύλη (particulate matter)
- PMCA**: Ca^{2+} ATPάση της πλασματικής μεμβράνης (plasma membrane Ca^{2+} ATPase)
- PMSF**: φαινυλο-μεθανο-σουλφονυλο-φθορίδιο (phenyl-methane-sulfonyl-fluoride)
- PRAS40**: πλούσιο σε προλίνη υπόστρωμα της Akt των 40kDa (proline-rich Akt substrate of 40kDa)
- PTEN**: ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης (phosphatase and tensin homolog)
- PTFE**: πολυτετραφθοροαιθυλένιο (polytetrafluoroethylene)
- PTP**: πόρος διαπερατότητας (permeability transition pore)
- PUMA**: ρυθμιζόμενος από την p53 τροποποιητής της απόπτωσης (p53 upregulated modulator of apoptosis)
- pVHL**: πρωτεΐνη των von Hippel και Lindau (protein von Hippel-Lindau)
- Raf**: πρωτεΐνη ταχέως εξελισσόμενου ινοσαρκώματος (rapidly accelerated fibrosarcoma)
- Ras**: πρωτεΐνη σαρκώματος αρουραίου (rat sarcoma)
- RIP1**: πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με υποδοχέα (receptor-interacting protein)
- ROS**: δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species).
- rpm**: στροφές ανά λεπτό (rounds per minute)
- RTK**: υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinase)
- RyR**: υποδοχέας ρυανοδίνης (ryanodine receptor)
- SD**: τυπική απόκλιση (standard deviation)
- SDS**: δωδεκυλο-θειικό νάτριο (sodium dodecyl-sulphate)
- SDS-PAGE**: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παρουσία SDS (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
- SERCA**: σαρκο-/ενδο-πλασματική Ca^{2+} ATPάση (sarco-/endo-plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase)
- Smac**: δεύτερος προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιητής των κασπασών (second mitochondria-derived activator of caspases)
- SOC**: διάυλος εξαρτώμενος από αποθήκες (store-operated channel)
- SOD**: υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase)

- STAT:** μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription)
- STIM1:** μόριο αλληλεπίδρασης με το στρώμα 1 (stromal interaction molecule 1)
- TAD:** περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (transactivation domain)
- TAK1:** ενεργοποιούμενη από τον TGF-β κινάση 1 (TGF-β activated kinase-1)
- TBS:** αλατούχο διάλυμα ρυθμιζόμενο με Tris (Tris-buffered saline)
- TCDF:** 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζοφουράνιο (2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran)
- TEMED:** τετραμεθυλ-μεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (tetramethyl-ethylene-diamine)
- Tf:** μεταφορίνη (transferrin)
- Tg:** θαψιγκαργκίνη (thapsigargin)
- TGF:** αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (transforming growth factor)
- TLC:** χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography)
- TNFR:** υποδοχέας του TNF (TNF receptor)
- TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α)
- TRADD:** σχετιζόμενη με τον TNFR1 πρωτεΐνη, που φέρει επικράτεια θανάτου (TNFR1-associated death domain protein)
- TRAF:** παράγοντας που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF (TNF receptor associated factor)
- TRAIL-R:** υποδοχέας του σχετιζόμενου με τον TNF-προσδέτη που επάγει την απόπτωση (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)
- Tris:** τρις(υδροξύμεθυλο)αμινομεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- Triton X-100:** πολυοξαιθυλεν-οκτυλο-φαινυλαιθέρας (polyoxyethylene-octyl-phenyl-ether)
- TRP:** μεταβλητοί υποδοχείς δυναμικού (transient receptor potential)
- TSC2:** πρωτεΐνη οζώδους σκλήρυνσης 2 (tuberous sclerosis protein 2)
- UFPS:** υπέρλεπτα σωματίδια (ultrafine particles)
- UV:** υπεριώδης ακτινοβολία (ultra violet)
- VDAC:** τασεοελεγχόμενος διάυλος ανιόντων (voltage-dependent anion channel)
- VEGF:** αυξητικός παράγοντας αγγείων ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor)
- VOC:** τασεο-ελεγχόμενος διάυλος (voltage-operated channel)
- xIAP:** συνδεόμενος με το χρωμόσωμα X αναστολέας της απόπτωσης (X-linked inhibitor of apoptosis protein)
- v/v:** συγκέντρωση κατ' όγκον (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)
- w/v:** συγκέντρωση κατά βάρος (g διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 6

1. Η ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ.....	6
1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	6
1.2. ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΥΛΗ (Particulate Matter, PM)	7
1.2.1. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗΣ ΥΛΗΣ	7
1.2.1.1. Το μέγεθος (αεροδυναμική διάμετρος)	7
1.2.1.2. Η χημική σύσταση	9
1.2.2. ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΥΛΗ	10
1.2.3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗΣ ΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	11
1.2.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ PM.....	13
1.2.4.1. Οξειδωτικό στρες και φλεγμονώδης απόκριση	13
1.2.4.2. Γενotoξική/μεταλλαξογόνος δράση.....	17
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ.....	20
2.1. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙ3Κ/Akt.....	20
2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ	20
2.1.2. Η ΚΙΝΑΣΗ PKB/Akt	20
2.1.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ Akt	21
2.1.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ Akt	23
2.2. ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΩΝ (ΜΑΡΚ).....	25
2.2.1. ΓΕΝΙΚΑ	25
2.2.2. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ERKs.....	26
2.2.3. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ JNKs.....	28
2.2.4. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ p38.....	29
2.3. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1	29
2.3.1. ΓΕΝΙΚΑ	29
2.3.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ HIF-1.....	30
2.3.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ HIF-1α	31
2.3.3.1. Οξυγονο-εξαρτώμενο μονοπάτι ρύθμισης του HIF-1α	31
2.3.3.2. Ρύθμιση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου	33
2.3.4. ΓΟΝΙΔΙΑ - ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ HIF-1	34
2.4. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ Nrf2	35
2.4.1. ΓΕΝΙΚΑ	35
2.4.2. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ Nrf2 ΚΑΙ ΤΗΣ Keap1	35
2.4.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ Nrf2	37
2.4.3.1. Κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης.....	37
2.4.3.2. Ενεργοποίηση του Nrf2 ανεξάρτητα από το οξειδωτικό στρες.....	38
2.5. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ NF-κΒ	40
2.5.1. ΓΕΝΙΚΑ	40
2.5.2. ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ NFκΒ	40
2.5.3. ΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ NFκΒ	41
2.5.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NFκΒ	43

2.6.	Η ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.....	45
2.6.1.	ΓΕΝΙΚΑ	45
2.6.2.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ Ca^{2+}	45
2.6.3.	ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ	47
3.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	49
3.1.	ΑΠΟΠΤΩΣΗ	49
3.1.1.	ΓΕΝΙΚΑ	49
3.1.2.	ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	50
3.2.	ΝΕΚΡΩΣΗ	53
3.3.	ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....	53
II.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	56
III.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ	60
2.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	61
2.1.	Η κυτταρική σειρά A549	61
2.2.	Η κυτταρική σειρά A431.....	62
2.3.	Πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών	63
3.	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	64
4.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΙΚΡΟ- ΚΑΙ ΝΑΝΟ-ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	66
4.1.	Τεχνητά νανοσωματίδια PLGA	66
4.2.	Αστικοί μικροσωματιδιακοί ρύποι (PM)	66
4.3.	Μίγμα νανοσωματιδίων <i>diesel</i> (DEP).....	67
4.4.	Βενζο[α]πυρένιο (B[α]P).....	67
5.	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΣ	68
5.1.	Διατήρηση στείρων συνθηκών.....	68
5.2.	Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών	69
5.3.	Κατάψυξη και ανάκτηση των κυττάρων	69
6.	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	71
6.1.	Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (MTT).....	71
6.2.	Μέθοδος ανίχνευσης θραυσμάτων DNA (DNA laddering).....	71
7.	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	73
7.1.	Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων (δοκιμασία comet).....	73
7.2.	Ανίχνευση προϊόντων προσθήκης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	74
8.	ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ($[Ca^{2+}]_i$)	75

9. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	76
9.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	77
9.2. Διαφορική απομόνωση κυτταροπλασματικών & πυρηνικών πρωτεϊνών	77
10. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	78
10.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση	78
10.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford).....	78
11. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	80
11.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	80
11.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS–πολυακρυλαμιδίου (<i>SDS- PAGE</i>).....	80
12. ΥΓΡΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	82
13. ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ WESTERN	83
14. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗ	84
15. ΧΡΩΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	85
16. ΧΡΗΣΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	86
17. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	86
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΟΙ ΡΥΠΟΙ ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ.....	88
1.1. Επίδραση των PM στη βιωσιμότητα των πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων, A549.....	88
1.2. Διαφορική επίδραση ολικού, ανόργανου και οργανικού κλάσματος των PM στον HIF-1α και την κινάση Akt.....	90
2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ DIESEL	91
2.1. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στη βιωσιμότητα των κυττάρων, A549.....	92
2.2. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP σε σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες των κυττάρων A549.	92
2.3. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP σε σύστημα συγκαλλιέργειας επιθηλιακών κυττάρων και φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα.	96
2.4. Επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β στον HIF-1α. Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt.....	99
2.5. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου.....	100
3. BENZO[A]ΠΥΡΕΝΙΟ	101
3.1. Επίδραση του B[α]P στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549.	101
3.2. Επίδραση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P.....	102

3.2.1. Ανίχνευση προϊόντων προσθήκης στο DNA	102
3.2.2. Ανίχνευση θραύσεων του DNA, με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης ολόκληρων κυττάρων.....	102
3.2.3. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA, με τη μέθοδο του DNA laddering.....	103
3.2.4. Επίδραση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P στην ενεργοποίηση της Akt και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α.....	104
3.2.5. Συνδυαστική επίδραση B[α]P και τεχνητών νανοσωματιδίων PLGA-PEO. ...	105
3.3. Επίδραση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P.....	109
3.3.1. Επίδραση της παρατεταμένης έκθεσης στο B[α]P, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της pAkt.....	109
3.3.2. Επίδραση του B[α]P, στα ολικά επίπεδα των μοριακών δεικτών pAkt, HIF-1α και NrF2.....	110
3.3.3. Πυρηνικός εντοπισμός και μεταγραφική ενεργοποίηση των παραγόντων HIF-1α και NrF2.....	113
3.3.4. Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στην επαγωγή των HIF-1α και NrF2.....	114
3.3.5. Συνδυαστική επίδραση B[α]P και άλλων στρεσογόνων συνθηκών.....	116
3.3.5.1. Υποξικές συνθήκες.....	116
3.3.5.2. Απουσία αυξητικών παραγόντων	117
3.3.6. Επίδραση του B[α]P σε διαφορετικά κυτταρικά είδη.....	119
3.3.6.1. Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα δέρματος.....	119
3.3.6.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα και δέρματος.....	121
3.3.6.3. Πνευμονικοί ινοβλάστες αρουραίου	123
3.3.7. Επίδραση του B[α]P στην ομοίωση των ιόντων ασβεστίου	125
3.3.8. Ο ρόλος της ομοίωσης των ιόντων ασβεστίου στη ρύθμιση της Akt και του HIF-1α.	128
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΟΙ ΡΥΠΟΙ ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ.....	134
2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ DEP	136
3. ΒΕΝΖΟ[Α]ΠΥΡΕΝΙΟ	143
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	161
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	191
ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	192
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	206

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν συσχετίσει την ατμοσφαιρική ρύπανση με την εμφάνιση ή την επιδείνωση προβλημάτων υγείας, που αφορούν κυρίως στο αναπνευστικό και καρδιαγγειακό σύστημα. Σήμερα, η πλειοψηφία των επιδημιολογικών και τοξικολογικών μελετών, προσανατολίζεται στους εισπνεόμενους ρύπους σωματιδιακής φύσης, οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί περισσότερο, σε σύγκριση με τα αέρια συστατικά της ρύπανσης (Maier και συν. 2008). Ειδικότερα, το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στην επίδραση του μεγέθους και της σύστασης των σωματιδίων αυτών, καθώς και στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών δράσης τους.

1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Γεγονότα, που έχουν καταγραφεί κατά τη διάρκεια της ιστορίας, μαρτυρούν ότι ο άνθρωπος κατανόησε, από πολύ νωρίς, τις επιβλαβείς επιπτώσεις της ρύπανσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά τον 17^ο αιώνα, η βασίλισσα Ελισάβετ απαγόρευσε την καύση του κάρβουνου γύρω από το παλάτι, λόγω της ενοχλητικής φύσης του καπνού. Επίσης, το 1661, ο John Evelyn στο πλαίσιο της διατριβής του, υποστήριξε ότι οι εργοστασιακές εγκαταστάσεις θα έπρεπε να απομακρυνθούν από την περιοχή του Λονδίνου. Το 19ο αιώνα, κλινικοί υπάλληλοι στο Λονδίνο, απέδωσαν την εκδήλωση αναπνευστικών προβλημάτων στην ατμοσφαιρική ρύπανση (Valavanidis και συν. 2008). Η σταδιακή συσσώρευση ανάλογων δεδομένων, δημιούργησε την ανάγκη μιας περισσότερο συστηματικής διερεύνησης των επιπτώσεων της ρύπανσης στην ανθρώπινη υγεία.

Παρά το πλήθος των επιδημιολογικών στοιχείων, τα μέτρα για τον περιορισμό των ρύπων στις περισσότερες βιομηχανικές περιοχές ήταν σχεδόν ανύπαρκτα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση σοβαρών επεισοδίων ρύπανσης. Τα κυριότερα από αυτά σημειώθηκαν στο Βέλγιο, το 1930 (Nemery και συν. 2001), στην Πενσυλβάνια των ΗΠΑ, το 1948 (Helfand και συν. 2001) και στο Λονδίνο, το 1952 (Logan 1953). Στις πρώτες δύο περιπτώσεις, κύρια αιτία ήταν η υπέρμετρη καύση κάρβουνου, τόσο σε οικιακές συσκευές, όσο και στους κλιβάνους των εργοστασιακών εγκαταστάσεων. Αντίθετα, στο Λονδίνο, μία θερμοκρασιακή αναστροφή, που προκλήθηκε από έναν αντικυκλώνα, παγίδευσε κρύο αέρα κάτω από μία θερμή μάζα αέρα, και σε συνδυασμό με την αυξημένη κατανάλωση

κάρβουνου, δημιούργησε ένα δηλητηριώδες φωτοχημικό νέφος («smog»), σε συνθήκες απόλυτης άπνοιας. Οι συγκεντρώσεις σωματιδίων άνθρακα και διοξειδίου του θείου, ξεπέρασαν κατά 10 φορές τα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ σημειώθηκαν περισσότεροι από 4.000 θάνατοι, κυρίως μικρών παιδιών και ηλικιωμένων ατόμων με χρόνιες καρδιαγγειακές και αναπνευστικές νόσους (Logan 1953).

Ακόμα ένα περιστατικό καταγράφηκε στο Los Angeles λόγω της χημικής αντίδρασης της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας με τα προϊόντα των εξατμίσεων των αυτοκινήτων, με αποτέλεσμα την επιβάρυνση της ατμόσφαιρας με υψηλές συγκεντρώσεις οξειδίων. Ανάλογες περιπτώσεις, κατά τις δεκαετίες του 1970 και 1980, σε ταχέως αναπτυσσόμενες περιοχές, όπως το Σικάγο, το Μεξικό, το Κάιρο, το Τόκιο και η Αθήνα, προκάλεσαν το ενδιαφέρον τις κοινής γνώμης και ανέδειξαν την ανάγκη λήψης αποτελεσματικών μέτρων για τον περιορισμό της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Valavanidis και συν. 2008).

1.2. ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΥΛΗ (Particulate Matter, PM)

Τα συστατικά των ατμοσφαιρικών ρύπων χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ετερογένεια, η οποία εξαρτάται άμεσα από μια ποικιλία παραγόντων, όπως είναι η πηγή προέλευσής τους, η γεωγραφική θέση και οι κλιματολογικές συνθήκες. Μια σημαντική κατηγορία, η οποία μελετήθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι τα αιωρούμενα σωματίδια ή η σωματιδιακή ύλη (Particulate Matter, PM). Πρόκειται για το σύνολο των σωματιδίων στερεής ή υγρής μορφής, που αιωρούνται στην ατμόσφαιρα και η αεροδυναμική τους διάμετρος (α.δ.) δεν ξεπερνά τα 10 μm . Οι ιδιότητες, καθώς και ο βαθμός τοξικότητας της PM, καθορίζονται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων και, ειδικότερα, από το μέγεθος και τη χημική τους σύσταση.

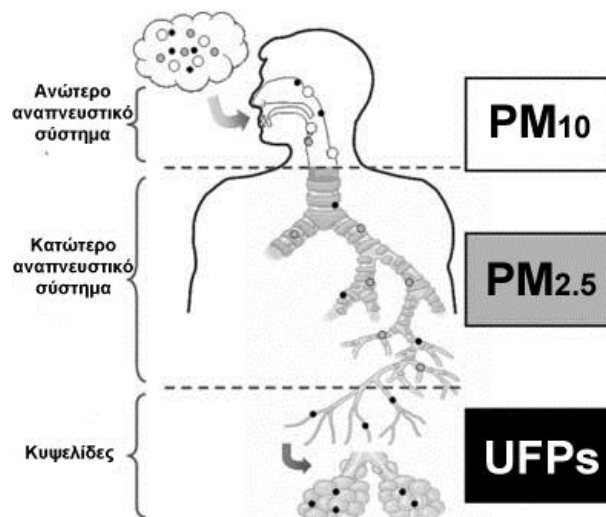
1.2.1. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗΣ ΥΛΗΣ

1.2.1.1. Το μέγεθος (αεροδυναμική διάμετρος)

Όπως, προαναφέρθηκε, τα σωματίδια της PM χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο εύρος α.δ., που κυμαίνεται από 0,005-10 μm . Ωστόσο, η διαφοροποίηση των ιδιοτήτων μεταξύ σωματιδίων διαφορετικού μεγέθους, οδήγησε στην καθιέρωση τριών διακριτών κατηγοριών, με αποκλειστικό κριτήριο την α.δ. Η πρώτη κατηγορία, αφορά στα PM₁₀ ή χονδρά σωματίδια (coarse particles) και περιλαμβάνει σωματίδια με α.δ. 2,5-10 μm . Ακολουθούν τα PM_{2,5} ή λεπτά σωματίδια (fine particles) με α.δ. 0,1-2,5 μm και τα υπέρλεπτα σωματίδια (ultrafine

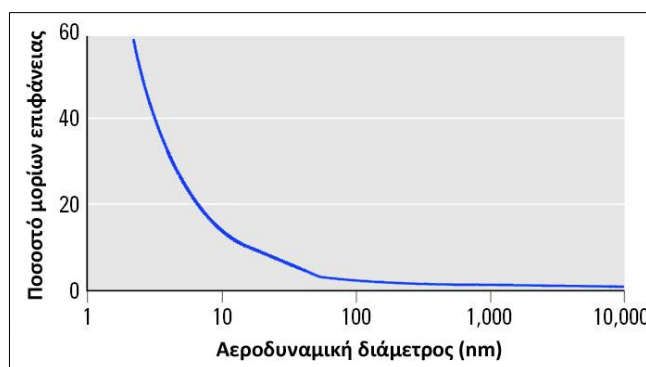
particles, UFPs) ή νανοσωματίδια με α.δ. μικρότερη των 100nm (BeruBe και συν. 2007).

Ανάλογη του μεγέθους είναι και η διασπορά των εισπνεόμενων σωματιδίων στα διάφορα επίπεδα του αναπνευστικού δέντρου. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**, τα σωματίδια PM_{10} , περιορίζονται στα ανώτερα σημεία του αναπνευστικού συστήματος, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στη ρινική κοιλότητα, το στόμα και το φάρυγγα. Αντίθετα, τα μικρότερα σωματίδια, $PM_{2.5}$, εισχωρούν στην τραχεία και τους αεραγωγούς, ενώ τα UFPs, έχουν πρόσβαση ακόμα και στις αναπνευστικές επιφάνειες των κυψελίδων (Churg & Brauer 2000, BeruBe και συν. 2007). Το αναπνευστικό σύστημα διαθέτει κατάλληλους μηχανισμούς (π.χ. αντανακλαστικός βήχας, φτέρνισμα, βλενώδεις εκκρίσεις, κίνηση βλεφαρίδων, φαγοκυττάρωση κλπ), ώστε να απομακρύνει με επιτυχία σημαντικό ποσοστό των μεγαλύτερων σωματιδίων. Οι μηχανισμοί αυτοί, όμως, δεν είναι εξίσου αποτελεσματικοί στην περίπτωση των λεπτών και υπέρλεπτων σωματιδίων, τα οποία εισχωρούν στα βαθύτερα σημεία του πνεύμονα. Η απομάκρυνση των σωματιδίων από τις κυψελίδες, είναι μια εξαιρετικά αργή διαδικασία, που διαρκεί από μερικές εβδομάδες έως πολλούς μήνες, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη έκθεση της ευαίσθητης επιφάνειας του ιστού, στα τοξικά συστατικά των σωματιδίων (Duzgoren-Aydin 2008).



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής των εισπνεόμενων χονδρών (PM_{10}), λεπτών ($PM_{2.5}$) και υπέρλεπτων (UFPs) σωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου. [Προσαρμογή από (BeruBe και συν. 2007)]

Περίπου το 90-95% του ατμοσφαιρικού μίγματος της PM αποτελείται από PM_{10} και τα μικρότερα σωματίδια συνιστούν μόλις το 1-8% της ολικής μάζας. Παρόλα αυτά, τα λεπτά και υπέρλεπτα σωματίδια ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα μεγάλους αριθμούς, έχουν πολύ υψηλότερο λόγο επιφάνειας/μάζας και, τέλος, η πορώδης επιφάνειά τους, επιτρέπει την προσρόφηση τοξικών χημικών ενώσεων (**Εικόνα 2**). Συγκριτική μελέτη, που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των κατοίκων του Μεξικού (υψηλά επίπεδα ρύπανσης) και του Βανκούβερ (πολύ χαμηλά επίπεδα ρύπανσης), αποκάλυψε έντονη συσσώρευση λεπτών και υπέρλεπτων σωματιδίων, μόνο στους πνεύμονες των κατοίκων του Μεξικού (Brauer και συν. 2001). Έχει υπολογιστεί ότι κατά τη διάρκεια ενός επεισοδίου έντονης ρύπανσης, σε κάθε αναπνευστικό βρογχιόλιο εναποτίθενται – κατά μέσο όρο – 30 εκατομμύρια σωματίδια και, σε κάθε κυψελίδα, περίπου 1500 σωματίδια, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών. Το 50% αυτού του σωματιδιακού φορτίου αποτυγχάνει να απομακρυνθεί, με αποτέλεσμα να παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα στην περιοχή (Seaton και συν. 1995). Τόσο το μέγεθος, όσο και το ποσοστό των σωματιδίων που παραμένουν στον πνεύμονα, με την έκθεση στην ατμοσφαιρική ρύπανση, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις επιπτώσεις των ρύπων στην ανθρώπινη υγεία.



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των επιφανειακών μορίων των σωματιδίων της PM, συναρτήσει της αεροδυναμικής τους διαμέτρου. [προσαρμογή από (Oberdorster και συν. 2005)]

1.2.1.2. Η χημική σύσταση

Η χημική σύσταση της σωματιδιακής ύλης της ατμόσφαιρας είναι εξαιρετικά ετερογενής και ευμετάβλητη, καθώς καθορίζεται από παράγοντες όπως η πηγή προέλευσής της, οι κλιματολογικές συνθήκες, η γεωγραφική θέση και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ίδιων των σωματιδίων. Στις αστικές και βιομηχανικές περιοχές, βασικές πηγές της PM αποτελούν οι εξατμίσεις των μέσων μεταφοράς, οι βιομηχανικοί ρύποι και τα σωματίδια που απελευθερώνονται κατά την επεξεργασία

κατασκευαστικών υλικών (π.χ. υλικά οικοδομών). Ειδικότερα, πρόκειται για πτητικές ή/και ημιπτητικές οργανικές ενώσεις (πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), νιτρο-PAHs, κινόνες) προσροφημένες στην επιφάνεια των σωματιδίων, στοιχεία μετάπτωσης (σίδηρος, νικέλιο, βανάδιο, χαλκός), νιτρικά και θειικά ιόντα, δραστικά αέρια (όζον, υπεροξείδια, αλδεΐδες), αιθάλη από διαδικασίες καύσης ή εξατμίσεις και ορυκτά (χαλαζίας, αμίαντος). Αντίθετα, στις επαρχιακές περιοχές κυριαρχούν συστατικά βιογενούς προέλευσης (π.χ. γυρεόκοκκοι, σπόρια μυκήτων, ιοί, βακτήρια, ενδοτοξίνες) και διάχυτη σκόνη από τη διάβρωση του εδάφους (Donaldson και συν. 2005). Η σύσταση των σωματιδίων διαφέρει, επίσης, και μεταξύ των κατηγοριών της PM. Έτσι, η PM₁₀ αποτελείται κυρίως από ορυκτά σωματίδια, θαλασσινό αλάτι και βιογενή υλικά, ενώ η PM_{2,5} και τα νανοσωματίδια έχουν τη μορφή συσσωματωμάτων, στα οποία ποικίλα μέταλλα και οργανικές ενώσεις προσροφώνται στην επιφάνεια πυρήνων άνθρακα (Aust και συν. 2002).

1.2.2. ΤΡΟΠΟΙ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗ ΥΛΗ

Η είσοδος των σωματιδίων της PM στον οργανισμό επιτυγχάνεται μέσω τριών διαφορετικών οδών. Ο πνεύμονας συνιστά πρωταρχικό στόχο της PM, καθώς εκτίθεται συνεχώς στα συστατικά της ατμόσφαιρας, μέσω της αναπνοής. Για το λόγο αυτό, έχει προσελκύσει και το ενδιαφέρον της πλειοψηφίας των τοξικολογικών μελετών. Το πεπτικό σύστημα έρχεται, επίσης, σε επαφή με τοξικές/καρκινογόνες ενώσεις, μέσω της κατανάλωσης «επιβαρυσμένων» τροφών (π.χ. καμένες τροφές, ψήσιμο με χρήση κάρβουνου κλπ). Η τρίτη οδός έκθεσης είναι το δέρμα, το οποίο, όμως, διαφοροποιείται από τους προηγούμενους ιστούς, λόγω της ιδιαίτερης ανατομίας του και της ύπαρξης της προστατευτικής στιβάδας κερατίνης (Kampa & Castanas 2008).

Εκτός από τους ιστούς, που εκτίθενται άμεσα στην PM, ένα ποσοστό του υπέρλεπτου κλάσματος των εισπνεόμενων σωματιδίων (UFPs), διαπερνά τις κυψελίδες και εισέρχεται στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα τη διασπορά του σε όλο το σώμα και την εναπόθεση σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς (Kampa & Castanas 2008, Terzano και συν. 2010). Αν και ο μηχανισμός μεταφοράς, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, έχουν διατυπωθεί ορισμένες προτάσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν: α) τη διακυτταρική μετατόπιση των σωματιδίων διαμέσου τις επιθηλιακής στιβάδας του πνεύμονα, β) τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα των κυψελίδων, τα οποία εισέρχονται, στη συνέχεια, στην κυκλοφορία (Nemmar και συν. 2002, Mills και συν. 2006) και γ) την άμεση πρόσβαση στην κυκλοφορία, μέσω ειδικών πόρων (διαμέτρου περίπου 400 nm) στις αναπνευστικές

επιφάνειες των κυψελίδων (Conhaim και συν. 1988). Το κυριότερο σημείο εναπόθεσης των σωματιδίων, που εισέρχονται στην κυκλοφορία είναι το ήπαρ (κύτταρα Kupffer) και ακολουθούν ο σπλήνας, ο μυελός των οστών, οι νεφροί, και η καρδιά (Peters και συν. 2006, Terzano και συν. 2010).

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις PM, συνδέεται με γεγονότα νευροεκφυλισμού στον ανθρώπινο εγκέφαλο, υποδηλώνοντας την πρόσβαση των σωματιδίων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) (Peters και συν. 2006). Μελέτες σε πειραματόζωα προτείνουν ότι η μετατόπιση των UFPs στο ΚΝΣ πραγματοποιείται, είτε μέσω των απολήξεων των αισθητήριων νευρώνων του αναπνευστικού επιθηλίου (Oberdorster και συν. 2004), είτε μέσω του οσφρητικού νεύρου, που συνδέεται με τον οσφρητικό λοβό του εγκεφάλου (Elder και συν. 2006). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς δεν έχει επιβεβαιωθεί στον άνθρωπο και, κατά συνέπεια, η ερμηνεία του νευροτοξικού δυναμικού της PM, σε αυτή την περίπτωση, συνεχίζει να αποτελεί ένα ανοιχτό ερευνητικό πεδίο.

Ωστόσο, οι βλάβες στους περιφερικούς ιστούς και τα αγγεία μπορούν να προκύψουν και με έναν πιο έμμεσο τρόπο, που περιλαμβάνει την επέκταση της τοπικής φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες του πνεύμονα (βλ. 1.2.4.1.), σε επίπεδο συστήματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών και προ-οξειδωτικών μορίων στην κυκλοφορία, τα οποία επηρεάζουν, για παράδειγμα, την ακεραιότητα των αγγείων και τη λειτουργία της καρδιάς (Seaton και συν. 1999, Evans και συν. 2006). Παρόμοιος μηχανισμός έχει προταθεί και για τη σύνδεση της PM με τον νευροεκφυλισμό (Peters και συν. 2006).

1.2.3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗΣ ΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Τα προβλήματα υγείας, που προκύπτουν από την έκθεση στους σωματιδιακούς ρύπους, καλύπτουν ένα ιδιαίτερα ευρύ φάσμα, το οποίο κυμαίνεται από σχετικά ήπιες καταστάσεις, όπως η ναυτία, η δύσπνοια ή ο ερεθισμός του δέρματος, μέχρι ασθένειες απειλητικές για τη ζωή, όπως ο καρκίνος και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Εκτός από τη σύνθεση της PM, τη συγκέντρωση και τη διάρκεια της έκθεσης, παράγοντες όπως η ηλικία, το παθολογικό υπόβαθρο και το κάπνισμα, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία του κάθε ατόμου (Cohen και συν. 2005, Kamra & Castanas 2008). Στην ενότητα αυτή, θα παρουσιαστούν αντιπροσωπευτικά δεδομένα επιδημιολογικών μελετών, που αφορούν στις επιδράσεις, τόσο της σύντομης, όσο και της μακροχρόνιας έκθεσης στους

σωματιδιακούς ρύπους, με έμφαση στο αναπνευστικό και το καρδιαγγειακό σύστημα.

ι. Βραχυχρόνιες επιδράσεις

Ορισμένες από τις πλέον ενδιαφέρουσες μελέτες είναι αυτές, που καταγράφουν τις μεταβολές του αριθμού των θανάτων, σε σχέση με πρόσκαιρες μεταβολές στα επίπεδα της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Παρά τις μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων, οι περισσότερες έρευνες υποστηρίζουν ότι αύξηση της PM κατά $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ αντιστοιχεί, κατά μέσο όρο, σε αύξηση της ημερήσιας θνησιμότητας κατά 0,5-1,5% (Fairley 1990, Pope και συν. 1992, Schwartz 1994).

Στο πλαίσιο των ευρωπαϊκών προγραμμάτων APHEA (Air Pollution and Health: A European Approach) 1 και 2, συλλέχθηκαν δεδομένα παλαιότερων, ανεξάρτητων επιδημιολογικών μελετών, που κάλυπταν ένα πληθυσμιακό δείγμα περίπου 43 εκατομμυρίων ατόμων, από 29 ευρωπαϊκές πόλεις. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων αυτών ανέδειξε ότι η επιβάρυνση της ατμόσφαιρας, κατά $10\mu\text{g PM}_{10}/\text{m}^3$, αντιστοιχεί σε αύξηση της ολικής ημερήσιας θνησιμότητας, κατά 0,6% (Katsouyanni και συν. 2001). Επίσης, εξετάζοντας μεμονωμένα τους θανάτους αναπνευστικής και καρδιαγγειακής αιτιολογίας, διαπιστώθηκε αύξηση κατά 0,6% και 0,8%, αντίστοιχα (Analitis και συν. 2006). Όσον αφορά στις εισαγωγές στα νοσοκομεία στις ίδιες συνθήκες ρύπανσης, τα συμπεράσματα που προέκυψαν, στο πλαίσιο του APHEA-2, από περίπου 38 εκατομμύρια άτομα σε 8 διαφορετικές ευρωπαϊκές πόλεις, ήταν τα εξής: α) αύξηση κατά 0,9% στα περιστατικά με αναπνευστικά προβλήματα, όπως οι κρίσεις άσθματος και χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD), σε άτομα μεγαλύτερα των 65 ετών (Atkinson και συν. 2001) και β) αύξηση κατά 0,5% στα καρδιαγγειακά προβλήματα (Le Tertre και συν. 2002). Αντίστοιχα, ήταν και τα δεδομένα παρόμοιων επιδημιολογικών μελετών στις ΗΠΑ (Samet και συν. 2000, Zanobetti και συν. 2000).

Η συσχέτιση των προαναφερθέντων προβλημάτων υγείας με τους σωματιδιακούς ρύπους επιβεβαιώνεται και ενισχύεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια, από μελέτες σε μεγάλες πόλεις, με υψηλά ποσοστά ρύπων, κυρίως από εξατμίσεις οχημάτων (Pope και συν. 2006, Larrieu και συν. 2007, Nawrot και συν. 2007).

ii. Μακροχρόνιες επιδράσεις

Η μακροχρόνια έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις ρύπων έχει, επίσης, συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, όπως η μειωμένη λειτουργικότητα των πνευμόνων, τα χρόνια αναπνευστικά και καρδιολογικά προβλήματα, η χρόνια βρογχίτιδα και η αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Όσον αφορά στις επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, η μακράς διάρκειας έκθεση σε λεπτά και υπέρλεπτα σωματίδια από εξατμίσεις οχημάτων, έχει ενοχοποιηθεί για επεισόδια αρρυθμίας, διαταραχές στην πήκτικότητα του αίματος, σχηματισμό, αποσταθεροποίηση και ρήξη αθηρωματικών πλακών (Seaton και συν. 1999, Baccarelli και συν. 2007, Baccarelli και συν. 2008). Επιπλέον, μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, τόσο στις ΗΠΑ, όσο και στην Ευρώπη, έχουν συνδέσει τη μακροχρόνια έκθεση σε PM_{10} και $PM_{2,5}$ με αυξημένα ποσοστά θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα (Vineis και συν. 2004, Gallus και συν. 2008). Μία από τις πλέον σημαντικές έρευνες σχετικά με τη μακροχρόνια επίδραση της $PM_{2,5}$, διενεργήθηκε στις ΗΠΑ από τον Pope και τους συνεργάτες του. Η έρευνα διήρκεσε 17 χρόνια (1982-1998) και περιελάμβανε 500.000 άτομα, σε περισσότερες από 100 πόλεις. Όπως διαπιστώθηκε, η αύξηση της μέσης τιμής της PM_{10} κατά $10\mu\text{g}/\text{cm}^3$, αντιστοιχούσε σε αύξηση της συνολικής θνησιμότητας, κατά 4%, και του ποσοστού των θανάτων, που οφείλονταν αποκλειστικά σε καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο του πνεύμονα, κατά 6% και 8%, αντίστοιχα (Pope και συν. 2002).

1.2.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ

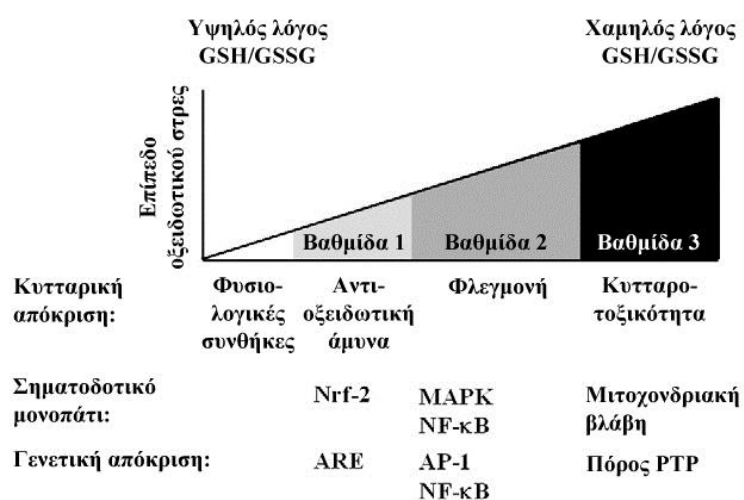
1.2.4.1. Οξειδωτικό στρες και φλεγμονώδης απόκριση

Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί προκειμένου να ερμηνευτούν οι επιβλαβείς επιπτώσεις των σωματιδιακών ρύπων στην υγεία. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης, την ενεργοποίηση των υποδοχέων «ερεθισμού» (*irritant receptors*) στον πνεύμονα, την ευαισθητοποίηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος, διαταραχές στο σύστημα πήξης του αίματος, ομοιοπολική τροποποίηση κυτταρικών συστατικών, μεταλλαξογένεση και παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Μεταξύ όλων των παραπάνω, η παραγωγή ROS (H_2O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, 1O_2) και η επακόλουθη επαγωγή οξειδωτικού στρες έχουν μονοπωλήσει σχεδόν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς ενοχοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για τα χρόνια αναπνευστικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, που προκαλούνται από την PM, αλλά και για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα (Nel και συν. 2006).

Η οξειδοαναγωγική ισορροπία ενός κυττάρου ρυθμίζεται αυστηρά από ένα σύνολο προστατευτικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, πρωτεΐνες και χαμηλού μοριακού βάρους μόρια, που δεσμεύουν τις ρίζες οξυγόνου. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει είτε λόγω της υπέρμετρης παραγωγής ROS, είτε εξαιτίας κάποιας ανεπάρκειας στους αμυντικούς μηχανισμούς (Valko και συν. 2007). Οποιαδήποτε αύξηση του οξειδωτικού φορτίου του κυττάρου οδηγεί σε ελάττωση του λόγου «γλουταθειόνη/δισουλφίδιο της γλουταθειόνης» (GSH/GSSG), ο οποίος αποτελεί ένα ευαίσθητο ανιχνευτή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες, που αντικατοπτρίζεται στον βαθμό αλλαγής του λόγου GSH/GSSG, ακολουθεί μια σειρά κυτταρικών αποκρίσεων, η οποία μπορεί να εξασφαλίσει την επιβίωση ή να επάγει τον κυτταρικό θάνατο (Li και συν. 2008).

Χρησιμοποιώντας ένα μίγμα σωματιδίων από την καύση υγρών καυσίμων (Diesel Exhaust Particles, DEP), ως πρότυπο ατμοσφαιρικό ρύπο, ο Nel A. και η ομάδα του ανέπτυξαν ένα σύστημα ιεράρχησης του οξειδωτικού στρες, που προκαλούν τα συστατικά της PM (Li και συν. 2008). Το σύστημα αυτό αποτελείται από 3 βαθμίδες και υποστηρίζει ότι το ήπιο οξειδωτικό στρες οδηγεί στην ενεργοποίηση προστατευτικών μηχανισμών, ενώ όταν η παραγωγή των ROS υπερβεί ένα κρίσιμο επίπεδο ενδέχεται να έχει επιβλαβείς έως και καταστροφικές συνέπειες για το μέλλον του κυττάρου (**Εικόνα 3**). Οι προστατευτικές αποκρίσεις (**Βαθμίδα 1**), επάγονται κυρίως από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NrF2 (Nuclear factor erythroid-2 related Factor 2), ο οποίος ελέγχει τη μεταγραφή τουλάχιστον 200 αντιοξειδωτικών ενζύμων, γνωστών και ως «ένζυμα φάσης II» (Cho και συν. 2006, Niture και συν. 2010). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζύμων φάσης II είναι η οξυγενάση της αίμης (HO-1), τα ισοένζυμα της θειομεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), η οξειδοαναγωγάση της NADPH κινόνης (NQO1), η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Chan & Kan 1999, Cho και συν. 2002, Li και συν. 2008). Οποιαδήποτε βλάβη ή ανεπάρκεια αυτών των παραγόντων, αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στην οξειδωτική δράση της PM. Συνεπώς, μέσω των προστατευτικών μηχανισμών της **Βαθμίδας 1**, η περιορισμένη παραγωγή ROS, από τους σωματιδιακούς ρύπους, δεν είναι απαραίτητα κυτταροτοξική. Όταν, όμως, τα επίπεδα των ROS αυξηθούν τόσο ώστε η δράση των ενζύμων φάσης II να μη επαρκεί για την εξουδετέρωσή τους, ενεργοποιούνται προφλεγμονώδεις μηχανισμοί (**Βαθμίδα 2**) ή ακόμα και ο κυτταρικός θάνατος (**Βαθμίδα 3**) (Xiao και συν. 2003, Mylonis και συν. 2006). Οι προφλεγμονώδεις αποκρίσεις της **Βαθμίδας 2**, μεσολαβούνται κυρίως από το σηματοδοτικό μονοπάτι των ενεργοποιούμενων από

μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών, MAPKs, και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ακολουθεί η έκφραση κυτταροκινών, χημειοκινών, μορίων προσκόλλησης και άλλων πρωτεϊνών, που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση του πνεύμονα (Huang και συν. 1998, Lancaster και συν. 2004, Ke & Costa 2006, BeruBe και συν. 2007). Στις κυτταροτοξικές επιδράσεις της *Βαθμίδα 3*, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν τα μιτοχόνδρια, τα οποία απελευθερώνουν στο κυτταρόπλασμα προαποπτωτικούς παράγοντες επάγοντας το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι (Hiura και συν. 2000, Χία και συν. 2004). Συνολικά, λοιπόν, το ιεραρχικό μοντέλο συμβάλει στην κατανόηση και την ερμηνεία των επιβλαβών επιδράσεων της PM.



Εικόνα 3: Ιεραρχικό μοντέλο της απόκρισης του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες. [Προσαρμογή από (Li και συν. 2008)]

Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό, μέσω του οποίου η PM αυξάνει τα επίπεδα των ROS. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα σωματίδια μικρότερης α.δ. χαρακτηρίζονται από μεγάλη επιφάνεια πορώδους υφής, η οποία τα καθιστά φορείς μετάλλων και μεγάλου αριθμού οργανικών ενώσεων άνθρακα, που προέρχονται κυρίως από διαδικασίες καύσης (PAHs και κινόνες). Τα μέταλλα συμβάλλουν στην παραγωγή ROS μέσω των χημικών αντιδράσεων Fenton και Haber Weiss, ενώ, η χημική τροποποίηση οργανικών ενώσεων, όπως οι κινόνες, μπορεί, επίσης, να οδηγήσει στο σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Kehrer 2000, Li και συν. 2008). Ακόμα και η διαμερισματοποίηση των σωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των ROS. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, έχει παρατηρηθεί ότι τα υπέρλεπτα σωματίδια εισχωρούν στο εσωτερικό των

μιτοχονδρίων, όπου, τόσο οι αρωματικές ενώσεις, όσο και οι κινόνες συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των οργανιδίων (Li και συν. 2003, Xia και συν. 2004).

Μελέτες σε οργανικό εκχύλισμα νανοσωματιδίων DEP, ανέδειξαν από πολύ νωρίς, ότι οι κινόνες και οι PAHs είναι οι πλέον δραστικές κατηγορίες χημικών ενώσεων, όσον αφορά στην οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων (Monks και συν. 1992, Kumagai και συν. 1997, Nel και συν. 1998). Εκτός από τις κινόνες που περιέχονται στα σωματίδια της ατμόσφαιρας και αποτελούν παραπροϊόντα της καύσης υγρών καυσίμων, οι ενώσεις αυτές μπορούν να παραχθούν και κατά τη μεταβολική ενεργοποίηση των χημικά αδρανών PAHs, από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, την εποξειδική υδρολάση και την αφυδρογονάση της διϋδροδιόλης (Penning και συν. 1999). Στη συνέχεια, οι κινόνες υφίστανται αναγωγή ενός ηλεκτρονίου από τη NADPH αναγωγή του κυτοχρώματος P450, προς σχηματισμό ανιονικών ριζών (ημικινόνες). Τελικά, κατά την επαναφορά των ημικινονών στην αρχική τους μορφή, παράγονται ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Baulig και συν. 2003).

Εξίσου σημαντική, όμως, είναι και η συμβολή των μετάλλων στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα σωματίδια της ατμόσφαιρας. Το προ-οξειδωτικό και προ-φλεγμονώδες δυναμικό των μετάλλων της PM, υποστηρίζεται τόσο από *in vitro*, όσο και από *in vivo* έρευνες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι μέταλλα μετάπτωσης, που ανιχνεύονται στα σωματίδια της PM (π.χ. Fe, Ni, Cu, Cr και Co), επάγουν προφλεγμονώδεις αποκρίσεις στο αναπνευστικό σύστημα, μέσω αύξησης των επιπέδων των ROS (Carter και συν. 1997, Kehrer 2000). Μελέτη των Becker και συν. υποστηρίζει ότι η PM_{10} οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της IL-8 και των ROS, στην κυτταρική σειρά φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (NHBE), και της IL-6, στα μακροφάγα των κυψελίδων. Περαιτέρω ανάλυση, έδειξε ότι η αύξηση της IL-8 οφειλόταν κυρίως στα μέταλλα Fe και Si, ενώ της IL-6 στο Cr (Becker και συν. 2005). Επιπλέον, PM με υψηλές συγκεντρώσεις βαναδίου (V) και Cu, προκάλεσαν επαγωγή του NF-κB και της έκκρισης κυτταροκινών, στις επιθηλιακές κυτταρικές σειρές πνεύμονα, NHBE και BEAS-2B, αντίστοιχα (Baeza-Squiban και συν. 1999). Εκτός από τις *in vitro* μελέτες, ανάλογα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν και κατά τη χορήγηση ενός, πλούσιου σε μέταλλα, μίγματος $PM_{2.5}$ σε πνεύμονες υγιών ανθρώπων. Συγκεκριμένα, τα άτομα αυτά εκδήλωσαν μια φλεγμονώδη κατάσταση στους αεραγωγούς του πνεύμονα, με κύρια χαρακτηριστικά, τα αυξημένα επίπεδα ROS και κυτταροκινών (IL-6 και TNF- α), καθώς και τον οψωνισμό περιφερικών μονοκυττάρων στην περιοχή (Schaumann και συν. 2004).

Συνοψίζοντας, γίνεται αντιληπτό ότι η συνεργιστική δράση των οργανικών ενώσεων άνθρακα και των μετάλλων, που προσροφώνται στην επιφάνεια της PM,

είναι υπεύθυνη για την επαγωγή οξειδωτικού στρες και φλεγμονής από τους ατμοσφαιρικούς σωματιδιακούς ρύπους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι εκτός από την τοπική δράση της φλεγμονής, η γενίκευσή της σε επίπεδο συστήματος, μπορεί να επηρεάσει και απομακρυσμένους ιστούς, όπως η καρδιά (Kunzli & Tager 2005).

1.2.4.2. Γενotoξική/μεταλλαξογόνος δράση

Η γενotoξική δράση των συστατικών της PM, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: 1) στην οξειδωτική βλάβη του DNA και 2) στη δημιουργία προϊόντων προσθήκης από τα οργανικά συστατικά της PM (π.χ. PAHs) (Schins & Knaapen 2007)

i. Οξειδωτική βλάβη του DNA

Η αύξηση του οξειδωτικού φορτίου σε ένα κύτταρο μπορεί να προκαλέσει οξείδωση, αποπουρίνωση, μεθυλίωση ή απαμίνωση των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων (αντικαταστάσεις, ελλείψεις, προσθήκες). Οι μεταλλάξεις αυτές παρατηρούνται ιδιαίτερα συχνά σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Wiseman & Halliwell 1996). Το πλέον δραστικό μέλος των ROS φαίνεται να είναι η υδροξυλική ρίζα ($\cdot\text{OH}$), η οποία ευθύνεται για την οξειδωτική μετατροπή των νουκλεοτιδίων γουανίνης σε 8-υδροξυδεοξυγουανίνη (8-OHdG) (Marnett 2000). Κατάλοιπα 8-OHdG έχουν ανιχνευτεί *in vitro*, ύστερα από έκθεση σε νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και του τιτανίου (TiO_2), ίνες αμιάντου, αιωρούμενη αιθάλη, PM_{10} και $\text{PM}_{2.5}$ (van Maanen και συν. 1999, Xu και συν. 1999, Prahallad και συν. 2001, Shi και συν. 2003). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι επώαση με σωματίδια χαλαζία, DEP, αιθάλης και TiO_2 οδηγεί σε θραύση του DNA, είτε μέσω άμεσης οξειδωτικής βλάβης στη δεοξυριβόζη του σκελετού του μακρομορίου, είτε κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA με εκτομή βάσης (base-excision repair, BER) (Zhong και συν. 1997, Don Porto Carero και συν. 2001, Schins 2002, Dybdahl και συν. 2004). Τέλος, η οξειδωτική βλάβη του DNA, μπορεί να προκληθεί και έμμεσα, από μεταλλαξογόνα, ηλεκτρονιόφιλα παράγωγα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (π.χ. μαλονδιαλδεΐδη, MDA) (Marnett 2000). Ανάλογη δράση έχουν εκδηλώσει νανοσωματίδια SiO_2 και ίνες αμιάντου (Shi και συν. 1994, Howden & Faux 1996).

Τα *in vitro* αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από μεγάλο αριθμό *In vivo* μελετών. Για παράδειγμα, χορήγηση μίγματος DEP ή αιθάλης σε πνεύμονες αρουραίων, οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα 8-OHdG (Ichinose και συν. 1997, Gallagher και συν. 2003). Δύο ανεξάρτητες μελέτες σε πνεύμονα (DEP) και

περιτόναιο (ίνες αμιάντου) αρουραίου υποστηρίζουν ότι ο σχηματισμός αυτών των οξειδωμένων καταλοίπων γουανίνης συνδέεται άμεσα με προώθηση της μεταλλαξογένεσης (G→T μεταστροφές) (Sato και συν. 2000, Unfried και συν. 2002).

Ωστόσο, η μεταλλαξογόνος δράση στην περίπτωση των νανοσωματιδίων αιθάλης και TiO₂, εκδηλώθηκε μόνο σε συγκεντρώσεις, οι οποίες προκαλούσαν παράλληλα έντονη φλεγμονώδη απόκριση σε πνεύμονες αρουραίου, ενώ απουσίαζε πλήρως σε *in vitro* καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (Driscoll και συν. 1997). Όταν, όμως, στην καλλιέργεια προστέθηκαν ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, ανιχνεύθηκαν, τόσο κατάλοιπα 8-OHdG, όσο και μονόκλωνες θραύσεις στο DNA των επιθηλιακών κυττάρων (Knaapen και συν. 1999, Knaapen και συν. 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι – εκτός από τις ROS, που παράγονται από τα συστατικά των ίδιων των σωματιδίων – στην επαγωγή της μεταλλαξογένεσης, συμβάλλουν εξίσου και οι ROS, που προκύπτουν δευτερογενώς κατά τη φλεγμονώδη απόκριση.

ii. Σχηματισμός προϊόντων προσθήκης στο DNA

Είναι γνωστό ότι ορισμένα μίγματα σωματιδιακών ρύπων περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών συστατικών, με αποδεδειγμένη μεταλλαξογόνο δράση. Η προσρόφηση αυτών των λιπόφιλων ενώσεων, στην επιφάνεια των ατμοσφαιρικών σωματιδίων, εξασφαλίζει τη μεταφορά και την εναπόθεσή τους στα βαθύτερα σημεία του πνεύμονα και άλλων οργάνων του σώματος. Κυρίαρχο ρόλο στη μεταλλαξογένεση διαδραματίζουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs), οι οποίοι ανιχνεύονται σε υψηλά ποσοστά στα μίγματα PM, που προέρχονται από αστικές και βιομηχανικές περιοχές (π.χ. DEP).

Οι PAHs παράγονται κατά την καύση οργανικών υλικών και εκλύονται στο περιβάλλον, είτε σε ημιπτητική μορφή, είτε ως συστατικά της PM (Bostrom και συν. 2002). Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, οι PAHs υφίστανται μεταβολική ενεργοποίηση από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε δραστικά ηλεκτρονιόφιλα μόρια (Penning και συν. 1999). Μεταξύ των μεταβολιτών, που προκύπτουν, συμπεριλαμβάνονται τα εποξειδία, τα οποία αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ιδιαίτερα σταθερά προϊόντα προσθήκης, και κατιονικές ρίζες, οι οποίες σχηματίζουν ασταθή προϊόντα προσθήκης. Ειδικότερα, τα εποξειδία διόλης χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια για τις εξωκυκλικές αμινομάδες της γουανίνης (G) και της αδενίνης (A). Τα προϊόντα προσθήκης διαταράσσουν την περιέλιξη της διπλής έλικας και, αν δεν αφαιρεθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, παρεμποδίζουν τις

διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής, οδηγώντας σε μεταλλάξεις και στην πλήρη αποδιοργάνωση της γονιδιακής έκφρασης (Luch 2005, Gillet & Scharer 2006).

Η *in vivo* ανίχνευση προϊόντων προσθήκης, προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή τους στην καρκινογόνο δράση των μιγμάτων DEP και αιθάλης, έχει καταλήξει σε σχετικά αντικρουόμενα αποτελέσματα (Borm και συν. 2004). Υπάρχουν, ωστόσο ικανοποιητικές ερμηνείες, που δικαιολογούν αυτή την ασυμφωνία. Αρχικά, η δημιουργία προϊόντων προσθήκης από τους PAHs προϋποθέτει την απελευθέρωσή τους από τα σωματίδια. Η ταχύτητα και το ποσοστό αποδέσμευσης εξαρτάται άμεσα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των σωματιδίων, όπως το εμβαδόν επιφάνειας και η πορώδης υφή τους. Είναι προφανές, ότι ο παράγοντας της βιοδιαθεσιμότητας παρακάμπτεται πλήρως στις περιπτώσεις, όπου χρησιμοποιούνται οργανικά εκχυλίσματα των σωματιδιακών μιγμάτων, σε αντίθεση με τις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιείται ολική PM (Borm και συν. 2005). Ο αριθμός των προϊόντων προσθήκης εξαρτάται, επίσης, από την έκφραση και τη λειτουργικότητα των ενζύμων μεταβολισμού των PAHs (π.χ. CYP1A1), καθώς και από την αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου (Gillet & Scharer 2006). Τέλος, η παραγωγή ROS από τα συστατικά της PM ή/και κατά τη φλεγμονώδη απόκριση έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει στο μεταβολισμό των PAHs, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην επαγωγή της απόπτωσης και, πιθανόν, στην επιδιόρθωση των προϊόντων προσθήκης (Knaapen και συν. 2006). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπ' όψιν, κατά την *in vivo* εκτίμηση της μεταλλαξογόνου δράσης των μιγμάτων της PM.

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Πολλοί από τους μοριακούς μηχανισμούς επιβίωσης των κυττάρων, θεωρούνται συστηματικοί διαμεσολαβητές των επιδράσεων της ρύπανσης. Σε αυτή την ενότητα, θα περιγραφούν τα κυριότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, καθώς και ορισμένοι αντιπροσωπευτικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που σχετίζονται με τη επαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης.

2.1. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙ3Κ/Akt

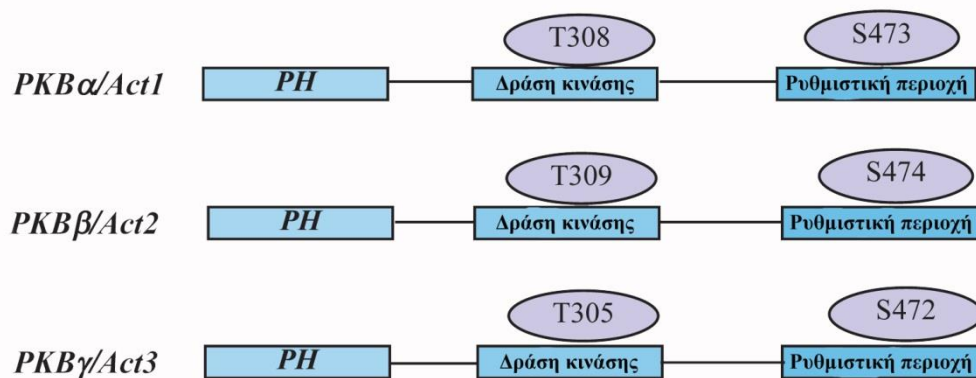
2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το μονοπάτι ΡΙ3Κ/Akt συνιστά ένα από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης του κυττάρου. Η εξασφάλιση της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού του κυττάρου επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης ενός ευρέως φάσματος βιολογικών λειτουργιών, που περιλαμβάνουν την αναστολή της απόπτωσης, την επαγωγή του κυτταρικού κύκλου, τη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης, την προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού, την αγγειογένεση, την οργάνωση του κυτταροσκελετού (Song και συν. 2005). Η απορρύθμιση του μονοπατιού, λόγω καταστολής, δυσλειτουργίας ή υπερέκφρασης κάποιου από τα συστατικά του, μπορεί να οδηγήσει, είτε στον κυτταρικό θάνατο, είτε στην αναστολή της απόπτωσης και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Το μονοπάτι ΡΙ3Κ/Akt ανιχνεύεται σε μόνιμα ενεργοποιημένη κατάσταση σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου και συνδέεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητά των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και τις ακτινοβολίες (Carnero 2010).

2.1.2. Η ΚΙΝΑΣΗ ΡΚΒ/Akt

Κεντρικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού ΡΙ3Κ/Akt είναι η κινάση ΡΚΒ/Akt (ή Akt). Πρόκειται για μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ανακαλύφθηκε το 1991 από τρεις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, με βάση την ομολογία της με τις πρωτεϊνικές κινάσες ΡΚΑ και ΡΚC, καθώς και με το ρετροϊκό ογκογονίδιο *v-Akt* (Bellacosa και συν. 1991, Coffey & Woodgett 1991, Jones και συν. 1991). Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί τρία μέλη της οικογένειας Akt, γνωστά ως Akt1 (ΡΚΒ α), Akt2 (ΡΚΒ β) και Akt3 (ΡΚΒ γ), με ομολογία μεγαλύτερη του 80%, σε επίπεδο αμινοξέων. Τα αντίστοιχα γονίδια (*akt1*, *akt2* και *akt3*) εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 14q32, 19q13 και 1q44. Και τα τρία γονίδια εκφράζονται συνεχώς,

αλλά η αναλογία στα επίπεδα έκφρασής τους εξαρτάται από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο (Datta και συν. 1999). Κάθε πρωτεϊνικό μόριο Akt, αποτελείται από μια αμινοτελική επικράτεια με ομολογία πλεξτρίνης (pleckstrin homology domain, PH domain) και μια καρβοξυτελική επικράτεια με δράση κινάσης, οι οποίες συνδέονται με ένα τμήμα α-έλικας (**Εικόνα 4**). Η επικράτεια PH επιτρέπει την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στη κυτταρική μεμβράνη, μέσω αλληλεπίδρασης με τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια (Haslam και συν. 1993). Στην καταλυτική επικράτεια και στην καρβοξυτελική ουρά του μορίου, εντοπίζονται δύο θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες, στην περίπτωση της Akt1, είναι η Thr308 και η Ser473, αντίστοιχα. Όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια, οι θέσεις αυτές φωσφορυλιώνονται κατά την επίδραση αυξητικών παραγόντων και άλλων εξωκυττάρων ερεθισμάτων και είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt (Song και συν. 2005).



Εικόνα 4: Οι τρεις ισομορφές της κινάσης Akt. [προσαρμογή από (Song και συν. 2005)]

2.1.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ Akt

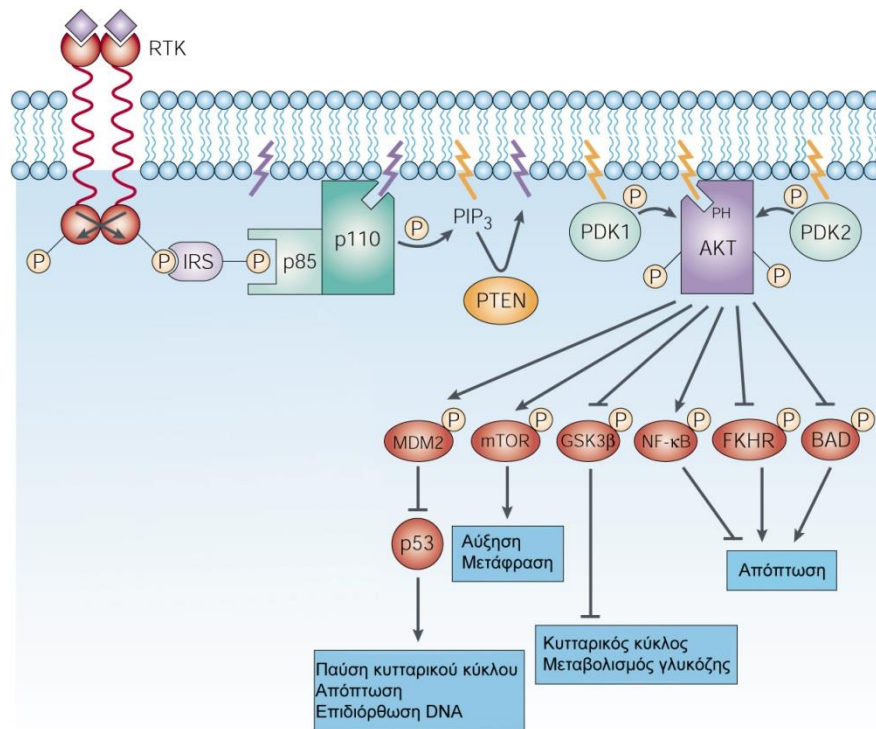
Η ενεργοποίηση της Akt ρυθμίζεται αναρροϊκά από τις κινάσες PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase). Η οικογένεια των κινάσων PI3K διαχωρίζεται σε 4 τάξεις. Οι τρεις από αυτές φωσφορυλιώνουν λιπίδια, ενώ τα μέλη της τάξης IV (mTOR, ATM, ATR και DNA-PK) φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες. Η τάξη I είναι η πλέον μελετημένη, περιλαμβάνει ετεροδιμερείς κινάσες, που αποτελούνται από μια καταλυτική (p110α, β, γ και δ) και μία ρυθμιστική υπομονάδα και χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποτάξεις: την IA που προκύπτει από το συνδυασμό των p110α, β ή δ και μιας ρυθμιστικής υπομονάδας (p85, p65 ή p55) και την IB, που αποτελείται από την p110γ και τη ρυθμιστική υπομονάδα p101 (Carnero 2010). Τα μέλη της των υποτάξεων IA και IB ενεργοποιούνται από υποδοχείς με δράση

κινάσης τυροσίνης και υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες, αντίστοιχα (Haslam και συν. 1993).

Μετά την επιστράτευση και την ενεργοποίησή της από τους μεμβρανικούς υποδοχείς, η κινάση PI3K καταλύει τη μετατροπή της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PIP2) σε 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP3) (**Εικόνα 5**). Τα επίπεδα της PIP3 ρυθμίζονται αυστηρά από τη δράση της φωσφατάσης PTEN, η οποία καταλύει την αντίστροφη αντίδραση αφαιρώντας την επιπλέον φωσφορική ομάδα (Simpson & Parsons 2001). Η κινάση Akt αλληλεπιδρά με την PIP3, μέσω της PH επικράτειας, και επιστρατεύεται στην πλασματική μεμβράνη (Andjelkovic και συν. 1997). Η αλληλεπίδραση αυτή μεταβάλλει την στερεοδιάταξη της Akt, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωσή της, από την κινάση PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), στο αμινοξικό κατάλοιπο Thr308 (Stephens και συν. 1998). Ωστόσο, η πλήρης ενεργοποίηση της Akt, απαιτεί και μια δεύτερη φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser473, η οποία προτείνεται ότι επιτυγχάνεται με τη δράση της κινάσης PDK-2 (Vivanco & Sawyers 2002), του συμπλόκου rictor-mTOR (Sarbasov και συν. 2005) ή DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Feng και συν. 2004). Οι φωσφορυλίωσεις των καταλοίπων Thr308 και Ser473, μπορούν να ανασταλούν από τις φωσφατάσες PP2A (Andjelkovic και συν. 1996) και PHLPP1/2 (Brognard και συν. 2007), αντίστοιχα.

Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες, που υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της Akt διαδραματίζει και η φωσφορυλίωση ορισμένων καταλοίπων τυροσίνης και, συγκεκριμένα, των Tyr315 και Tyr326 της καταλυτικής επικράτειας και της Tyr474 (Chen και συν. 2001, Conus και συν. 2002). Παρ' όλα αυτά, οι υπεύθυνες κινάσες δεν έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διευκρινιστεί ο βαθμός συμβολής αυτών των τροποποιήσεων στη ενεργοποίηση της Akt.

Σε κάθε περίπτωση, η ενεργοποιημένη Akt, απομακρύνεται από την πλασματική μεμβράνη και μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της.



Εικόνα 5: Το σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης PI3K/Akt. [προσαρμογή από (Vivanco & Sawyers 2002)]

2.1.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ Akt

Η ενεργοποιημένη κινάση Akt εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες ρυθμίζοντας – θετικά ή αρνητικά – έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, με τελικό στόχο την εξασφάλιση της επιβίωσης, της αύξησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στη συνέχεια, καταγράφονται τα κυριότερα υποστρώματα της Akt, με βάση τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν.

ι. Αναστολή της απόπτωσης και προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης

Η προ-επιβιωτική δράση της Akt εκδηλώνεται, είτε μέσω φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων, είτε μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η Akt ρυθμίζει αρνητικά τους *forkhead* μεταγραφικούς παράγοντες, FKHR, FKHRL1 και AFX (Biggs και συν. 1999, Brunet και συν. 1999, Rena και συν. 1999), που προωθούν την έκφραση γονιδίων κυτταρικού θανάτου, ενώ ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες, που ελέγχουν αντι-αποπτωτικά γονίδια, όπως ο CREB (cyclic-AMP response element-binding protein) (Du & Montminy 1998) και ο NFκB. Η επαγωγή του NFκB επιτυγχάνεται με

φωσφορυλίωση της κινάσης του αναστολέα IκB (IKK) (Romashkova & Makarov 1999). Η Akt προάγει, επίσης, την κυτταρική επιβίωση απενεργοποιώντας μόρια-κλειδιά της αποπτωτικής μηχανής, όπως η Bad και η προ-κασπάση 9 (Song και συν. 2005).

ii. Προώθηση κυτταρικού κύκλου

Έχει δειχθεί ότι η Akt ενεργοποιείται κατά τη μετάβαση από τη φάση G1, στη φάση S, προκειμένου να ρυθμίσει υποστρώματα, που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα υποστρώματα αυτά περιλαμβάνουν την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β), τους μεταγραφικούς παράγοντες *forkhead*, τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, p21^{WAF1} και p27^{KIP1} και τον mTOR (Liang & Slingerland 2003).

Η κινάση GSK3β επάγει την αποικοδόμηση της κυκλίνης D1 και του c-Myc, τα οποία συμβάλλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Η απενεργοποίηση της GSK3β από την Akt, επιτρέπει τη σταθεροποίηση των δύο πρωτεϊνών (Diehl και συν. 1998).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες *forkhead* καταστέλλουν την έκφραση της κυκλίνης D1 και, παράλληλα, επάγουν την μεταγραφή των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p21^{WAF1} και p27^{KIP1}. Η φωσφορυλίωσή τους από την κινάση Akt, αναστρέφει αυτές τις επιδράσεις (Kors και συν. 2002, Schmidt και συν. 2002, Burgering & Medema 2003). Όσον αφορά, ειδικότερα, στην p27^{KIP1}, η Akt διαταράσσει, και την σταθερότητα της πρωτεΐνης, πιθανά μέσω ενεργοποίησης της Skp2 (Mamillapalli και συν. 2001, Liang και συν. 2002). Επιπλέον, έχει αναφερθεί άμεση φωσφορυλίωση, τόσο της p27^{KIP1}, όσο και της p21^{WAF1}, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη στόχευσή τους στο κυτταρόπλασμα (Zhou και συν. 2001).

Τέλος, η καλύτερα χαρακτηρισμένη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, p53, αποικοδομείται, ύστερα από ενεργοποίηση του αναστολέα της, Mdm2, από την Akt (Zhou και συν. 2001).

iii. Ρύθμιση της μετάφρασης

Η κινάση mTOR ενεργοποιείται καταρροϊκά της Akt και συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλιωμένη Akt, απενεργοποιεί τους αναστολείς της mTOR, PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40kDa) και TSC2 (tuberous sclerosis protein 2) (Vander Haar και συν. 2007). Στη συνέχεια, η mTOR δρα στα υποστρώματά της, ενεργοποιώντας την κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (p70S6K) και καταστέλλοντας την πρωτεΐνη που προσδένεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (4E-BP)

(Wendel και συν. 2004). Και τα δύο γεγονότα, προωθούν, τελικά, τη διαδικασία της μετάφρασης.

iv. Ρύθμιση του μεταβολισμού

Η Akt διαδραματίζει, ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου, απενεργοποιώντας την GSK3β, προωθεί τη στόχευση του GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη, επάγει τη μεταγραφή του GLUT1 (του σημαντικότερου μεταφορέα γλυκόζης, που επάγεται στην πλειοψηφία των κυτταρικών τύπων), επιταχύνει τη γλυκόλυση και διατηρεί την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων συνδέοντας τη γλυκόλυση με την παραγωγή ATP. Επιλέον, συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταφοράς και του μεταβολισμού των αμινοξέων (Plas & Thompson 2005).

v. Αγγειογένεση

Εξίσου σημαντική είναι και η συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στην αγγειογένεση. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση της Akt, ως απόκριση στον αγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα VEGF, προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση. Επίσης, η Akt ενεργοποιεί την ενδοθηλιακή συνθάση του νιτρικού οξέος (eNOS) και επιτρέπει τη δημιουργία νέων αγγείων και τη μεσολαβούμενη από τον VEGF, κυτταρική μετανάστευση (Dimmeler και συν. 2000).

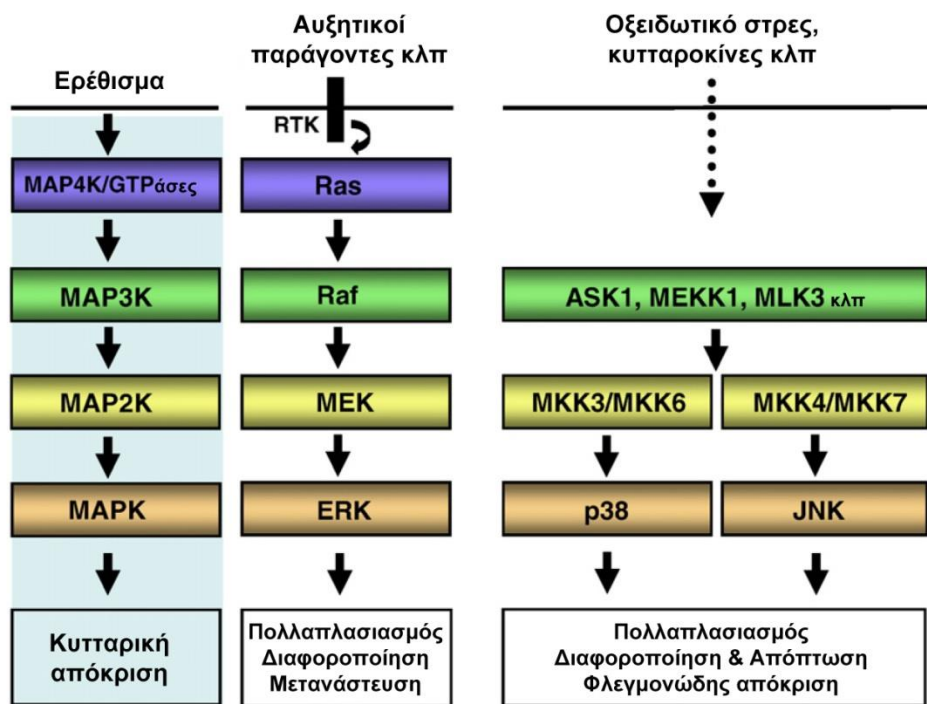
Ο HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α) αποτελεί τον μεταγραφικό παράγοντα-κλειδί, στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων, που προωθούν την αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένου του VEGF (Semenza 2003). Η επαγωγή του μονοπατιού PI3K/Akt ή η μειωμένη ενεργοποίηση του αναστολέα PTEN, έχουν συνδεθεί με αυξημένη έκφραση του HIF-1α και, κατά συνέπεια, του VEGF και της αγγειογένεσης (Zhong και συν. 2000, Zundel και συν. 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι η Akt μπορεί να επάγει την έκφραση του HIF-1α και ανεξάρτητα από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Li και συν. 2005).

2.2. ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΩΝ (ΜΑΡΚ)

2.2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Οι επαγόμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες, MAPK (mitogen-activated protein kinases) συμμετέχουν σε ένα πολύπλοκο και εξαιρετικά συντηρημένο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία συνδέουν ερεθίσματα του εξωκυττάριου περιβάλλοντος με ένα ευρύ φάσμα βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η επιβίωση, η αύξηση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η

μετανάστευση και η απόπτωση. Κάθε μονοπάτι οργανώνεται σε τρεις διαδοχικές βαθμίδες, όπου ένα μόριο MAPK ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από μία κινάση της MAPK (MAPKK), η οποία έχει ήδη ενεργοποιηθεί με φωσφορυλίωση από μια κινάση της κινάσης της MAPK (MAPKKK) (**Εικόνα 6**). Η οικογένεια των MAPK, στα θηλαστικά, αποτελείται από τρεις διακριτές υποοικογένειες: α) τις ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια ερεθίσματα κινάσες ERK1/2, ERK3/4, ERK5 και ERK7/8, β) τις κινάσες του αμινοτελικού άκρου του παράγοντα Jun, JNK1/2/3 και γ) τις ισομορφές της κινάσης p38, α/β/γ(ERK6) και δ (Dhillon και συν. 2007, Kim & Choi 2010).



Εικόνα 6: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP κινασών. [προσαρμογή από (Kim & Choi 2010)]

2.2.2. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ERKs

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERKs είναι το πλέον μελετημένο, καθώς απορρυθμίζεται, περίπου στο 1/3 των ανθρώπινων καρκίνων. Συνοπτικά, οι κινάσες ERK1/2, ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από τις MAPKK, MEK1 και MEK2, οι οποίες επάγονται από τις MAPKKK, Raf (Raf-1, B-Raf και A-Raf) (Dhillon και συν. 2007).

Οι ERKs φωσφορυλιώνονται ως απόκριση σε ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα, με επικρατέστερα, τους αυξητικούς παράγοντες και τα μιτογόνα. Η αλληλεπίδραση αυτών των μορίων με υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, προάγει την

πρόσδεση ενός μορίου GTP στη Ras GTPάση. Στη συνέχεια, η Ras επιστρατεύει στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης τις κινάσες Raf, καθώς και πρωτεΐνες ικριώματος (*scaffold proteins*), όπως οι KSR και η SUR-8/SHOC-2, οι οποίες υποβοηθούν την φωσφορυλίωση της Raf από τη Ras (Kolch 2005). Αν και οι τρεις ισομορφές της Raf παρουσιάζουν πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά, διαφέρουν ως προς τη ρύθμιση και την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τις κινάσες MEK (Wellbrock και συν. 2004). Η ενεργοποίηση των Raf επιτυγχάνεται μέσω μιας πολύπλοκης ακολουθίας γεγονότων, που περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση και αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και λιπίδια. Αποτέλεσμα αυτών των γεγονότων είναι η ενίσχυση της καταλυτικής ενεργότητας των Raf, με εξουδετέρωση της αυτοκαταστολής τους και ενεργοποίηση του καταλυτικού τους κέντρου (Chong και συν. 2003). Η ενεργοποίηση των Raf-1 και A-Raf περιλαμβάνει την απομάκρυνση της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο Ser259 και νέες φωσφορυλίωσεις στο κατάλοιπο Ser338 του αμινοτελικού άκρου και στη θηλιά ενεργοποίησης. Αντίθετα, στην περίπτωση της B-Raf, η Ser338 είναι μόνιμα φωσφορυλιωμένη. Επιπλέον, η μεμονωμένη δράση της Ras επαρκεί για την πλήρη ενεργοποίηση της B-Raf, ενώ οι άλλες δύο ισομορφές απαιτούν τη παρουσία επιπλέον παραγόντων. Μέχρι σήμερα, δεν έχει προσδιοριστεί η Raf, που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των ERKs, αν και έχει προταθεί ότι αυτό εξαρτάται από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο και τη στοιχειομετρία των διαφορετικών ισομορφών (Galabova-Konacs και συν. 2006).

Μετά την ενεργοποίησή τους από τις MEK, οι ERKs φωσφορυλιώνουν πολυάριθμες κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν κινάσες, φωσφατάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση λειτουργιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η μετανάστευση, η αγγειογένεση και η οργάνωση της χρωματίνης (Yoon & Seger 2006). Η ένταση και η διάρκεια του σήματος συμβάλλουν καθοριστικά στην τελική έκβαση της κινητοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού. Η παροδική ενεργοποίηση των ERKs, οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών, που προωθούν τον κυτταρικό κύκλο (π.χ. Fos, Jun, Myc, Egr-1), ενώ η έντονη ή/και παρατεταμένη ενεργοποίηση αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό επάγοντας την έκφραση αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (π.χ. p21, p27) (Mirza και συν. 2004, Murphy και συν. 2004). Ο έλεγχος της διάρκειας και της έντασης του σήματος πραγματοποιείται από τους μηχανισμούς αρνητικής ανάδρασης, που περιλαμβάνουν τις φωσφατάσες των MAP κινασών (MPK) και τα μέλη της οικογένειας Sprouty (Tsujiita και συν. 2005, Fong και συν. 2006). Η εξασφάλιση της ισορροπίας μεταξύ των θετικών και αρνητικών

ερεθισμάτων συμβάλλει στην αποφυγή της παρατεταμένης ενεργοποίησης και, κατά συνέπεια, της κυτταροστατικής δράσης των ERKs.

2.2.3. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ JNKs

Σε αντίθεση με τις ERKs, οι υποοικογένειες των JNKs και της p38 επάγονται κατά την επίδραση στρεσογόνων συνθηκών. Συνεπώς, η κινητοποίηση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών έχει κυρίως κυτταροστατική και προ-αποπτωτική δράση, αν και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση (Dhillon και συν. 2007).

Οι JNKs επάγονται κυρίως από κυτταροκίνες, υπεριώδη ακτινοβολία, στέρηση αυξητικών παραγόντων και γενετοξικούς παράγοντες (Weston & Davis 2002). Έχουν προσδιοριστεί 10 διαφορετικές ισομορφές των JNK κινασών, οι οποίες προκύπτουν κατά την εναλλακτική συρραφή των προϊόντων των γονιδίων *jnk1*, *jnk2* και *jnk3*. Τα γονίδια *jnk1* και *jnk2* εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, ενώ η έκφραση του *jnk3* περιορίζεται στον εγκέφαλο, την καρδιά και τους όρχεις. Η ενεργοποίηση των JNKs απαιτεί διπλή φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης και ενός καταλοίπου θρεονίνης στο μοτίβο TPY, από τις MAPKK, MEK4 και MEK7. Οι MEK 4 και 7 φωσφορυλιώνονται από ένα σύνολο MAPKKK, που περιλαμβάνει τις MEKK1-4, MLL2/3, YTrl-2, DLK, TAO1/2, TAK1 και ASK1/2. Οι ενεργοποιημένες JNK μεταβαίνουν στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες-στόχους τους. Το κυριότερο υπόστρωμα των JNKs είναι ο μεταγραφικός παράγοντας c-Jun, ο οποίος, μετά από φωσφορυλίωση στις Ser63 και Ser73, ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του AP-1. Καταρροϊκά των JNKs βρίσκονται, επίσης, οι μεταγραφικοί παράγοντες, ATF2, NF-ATc1, HSF-1 και STAT3 (Weston & Davis 2002). Ορισμένα μόρια ενεργοποιημένων JNKs παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, αλλά ο βιολογικός τους ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί, μέχρι σήμερα.

Κατά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας UVB, οξειδωτικού στρες ή παρουσία βλαβών στο DNA, οι JNKs φωσφορυλιώνουν την p53, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση και την αύξηση της μεταγραφικής της ενεργότητας (Buschmann και συν. 2001, Wu 2004). Η ρύθμιση της σταθερότητας της p53 από τις JNKs, έχει παρατηρηθεί και απουσία στρεσογόνων συνθηκών, μέσω ενός μηχανισμού, που εξαρτάται από την Mdm-2. Με τον τρόπο αυτό, οι JNKs προκαλούν παύση του κυτταρικού κύκλου και – ανάλογα με την ένταση του στρες και το μέγεθος της βλάβης – μπορούν να επάγουν τον αποπτωτικό θάνατο (Fuchs και συν. 1998).

2.2.4. Η ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ p38

Οι ισομορφές της p38 επάγονται ισχυρά από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η ενεργοποίηση της p38 είναι απαραίτητη για την έκφραση του TNF- α και της ιντερλευκίνης IL-1, στο πλαίσιο της φλεγμονώδους απόκρισης του κυττάρου. Επίσης, μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης, τα ερεθίσματα, που ενεργοποιούν την p38, επάγουν, παράλληλα, και την έκφραση της κινάσης (Zarubin & Han 2005).

Και οι 4 ισομορφές της κινάσης φέρουν ένα συντηρημένο μοτίβο TGY, στη θηλιά ενεργοποίησης του μορίου (Kumar και συν. 2003). Το μοτίβο αυτό φωσφορυλιώνεται από τις MAPKK, MEK3 και MEK6, οι οποίες ενεργοποιούνται από ένα μεγάλο αριθμό MAPKKK, κατά την επίδραση φυσικών ή χημικών στρεσογόνων ερεθισμάτων (οξειδωτικό στρες, υποξία, ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία και κυτταροκίνες). Στη φωσφορυλίωση της p38 συμμετέχει, επίσης, και η MEK4, η οποία είναι γνωστή κυρίως ως ενεργοποιητής των JNK. Η ενεργοποιημένη p38, μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης (Zarubin & Han 2005, Dhillon και συν. 2007). Η ογκοκατασταλτική δράση της p38 εκδηλώνεται κυρίως μέσω ενεργοποίησης της p53, με αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της – μεσολαβούμενης από την p53 – απόπτωσης (Bulavin & Fornace 2004).

Εκτός από την απόκριση σε συνθήκες στρες, η p38 συμβάλλει σημαντικά στη ρύθμιση της απόπτωσης, της προώθησης του κυτταρικού κύκλου, της αύξησης και της διαφοροποίησης, παρουσία αυξητικών παραγόντων (π.χ. GMCSF, FGF, IGF-1, PDGF, NGF κλπ) και ορμονών. Στις περιπτώσεις αυτές η ενεργοποίηση της p38 μεσολαβείται από διαφορετικές MAPKKK, που περιλαμβάνουν τις TAK1, ASK1/2, DLK, MEKK4, TAO1-3 και MLK2/3 (Zarubin & Han 2005, Dhillon και συν. 2007).

2.3. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1

2.3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ως υποξία, χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία, η παροχή οξυγόνου (O_2) σε ένα κύτταρο ή έναν ιστό, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών του. Μειωμένη διαθεσιμότητα O_2 παρατηρείται, τόσο στο πλαίσιο φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού (π.χ. εμβρυϊκή ανάπτυξη, άσκηση), όσο και σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις (π.χ. έμφραγμα του μυοκαρδίου, φλεγμονή, καρκίνος). Οι συμπαγείς καρκινικοί όγκοι εκτίθενται σε

υποξικές συνθήκες από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους, λόγω της μειωμένης παροχής αίματος στην περιοχή. Συνεπώς, η ενεργοποίηση μηχανισμών προσαρμογής στην υποξία, είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Κεντρικός ρυθμιστής αυτών των μηχανισμών είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*). Συνοπτικά, ο HIF-1 αναδιαμορφώνει το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων, που συμβάλλουν στην άμεση προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού και στην επαγωγή της αγγειογένεσης (Semenza 2003). Ωστόσο, σχετικά πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την επαγωγή του HIF-1 και σε φυσιολογικές συνθήκες O₂ από παράγοντες, όπως οι κυτταροκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι ορμόνες (Lee και συν. 2004).

Η υπερέκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα ανιχνεύεται σε μεγάλο ποσοστό συμπαγών καρκίνων και συνδέεται με κακή πρόγνωση και ανθεκτικότητα στις συμβατικές θεραπείες (ακτινοβολίες και χημειοθεραπευτικά φάρμακα). Κατά συνέπεια, συνιστά έναν ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών (Semenza 2003, Poon και συν. 2009).

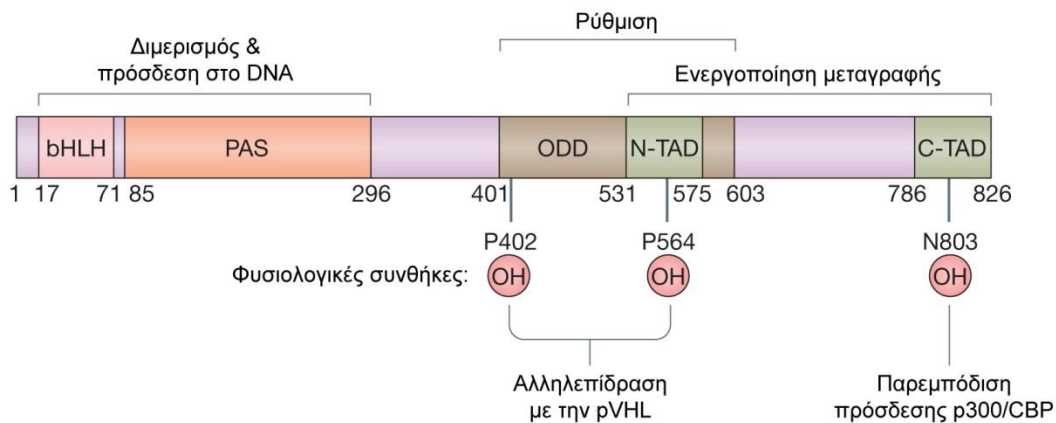
2.3.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ HIF-1

Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας, που αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β, που φέρουν το χαρακτηριστικό μοτίβο «έλικα-θηλιά-έλικα» (basic helix-loop-helix, bHLH) (Wang και συν. 1995). Η υπομονάδα HIF-1β, γνωστή και ως ARNT (ARyl hydrocarbon Nuclear Translocator), εκφράζεται σταθερά σε όλες τις συνθήκες. Η λειτουργικότητα, ωστόσο, του μεταγραφικού παράγοντα εξαρτάται από τη ρυθμιστική υπομονάδα HIF-1α, η οποία υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση (βλ. 2.3.3.).

Μεταξύ των κοινών χαρακτηριστικών των δύο υπομονάδων είναι το σήμα πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Signal, NLS), που στοχεύει τις πρωτεΐνες στον πυρήνα. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, και οι δύο υπομονάδες φέρουν το βασικό μοτίβο «έλικα-θηλιά-έλικα», καθώς και την επικράτεια PER-ARNT-SIM (PAS), που απαιτούνται για τον ετεροδιμερισμό και την πρόσδεση στο DNA (Jiang και συν. 1996).

Ο HIF-1α φέρει ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της επικράτειας οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (Oxygen-dependent Degradation Domain, ODD) (**Εικόνα 7**). Η ODD εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 401-603 και σχετίζεται με την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης σε φυσιολογικές συνθήκες O₂ (Huang και συν. 1998). Επιπλέον, στην αλληλουχία της υπομονάδας α

περιέχονται δύο επικράτειες TAD (TransActivation Domains), που είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-1. Η N-TAD εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 531-575, ενώ η C-TAD συγκροτείται από τα ακραία αμινοξέα, 813-826. Η αλληλουχία, που βρίσκεται μεταξύ τους, δρα ως αναστολέας της μεταγραφικής δραστηριότητας. Σε αυτές τις δύο περιοχές, συνδέονται, επίσης, συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι πρωτεΐνες p300/CBR και Ref-1 (Pugh και συν. 1997). Οι επικράτειες ODD και TAD καθιστούν τον HIF-1α, τη βασική λειτουργική πρωτεΐνη του συμπλόκου. Έχουν αναγνωριστεί άλλες δύο ισομορφές της υπομονάδας HIF-1α, η HIF-2α και η HIF-3α. Παρόλα αυτά, μελέτες καταστολής αυτών των ισομορφών, έχουν αναδείξει τον κυρίαρχο ρόλο της υπομονάδας 1α, στη ρύθμιση της μεταγραφής, κατά την υποξία (Dery και συν. 2005).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του πρωτεϊνικού μορίου του HIF-1α, όπου διακρίνονται οι κυριότερες λειτουργικές και ρυθμιστικές περιοχές του. [προσαρμογή από (Poon και συν. 2009)]

2.3.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ HIF-1α

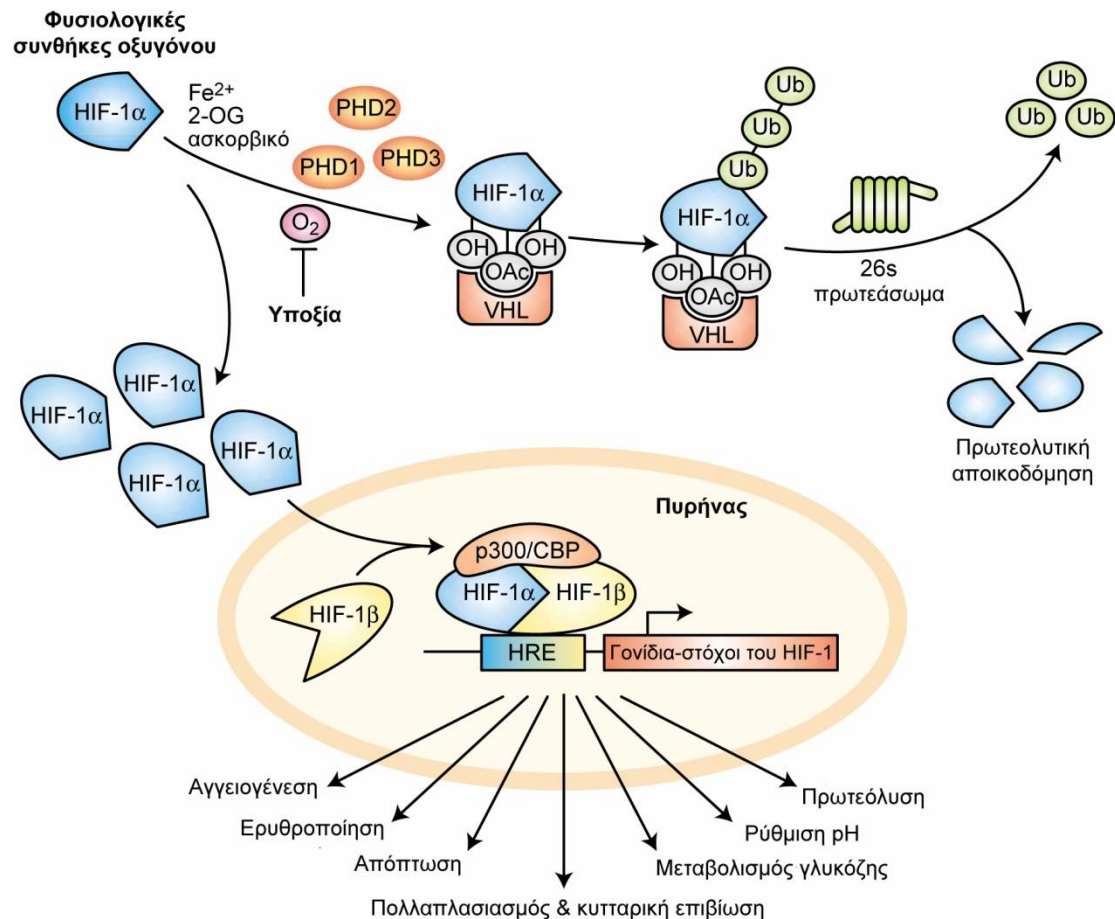
2.3.3.1. Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α.

Το γονίδιο του HIF-1α εκφράζεται σταθερά και ανεξάρτητα από τη διαθεσιμότητα του O_2 , κυρίως με τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Συνεπώς, η μεταγραφή και η μετάφραση του γονιδίου παραμένουν αμετάβλητες κατά τη μετάβαση από τις φυσιολογικές συνθήκες O_2 , στην υποξία.

Ωστόσο, ο χρόνος ημιζωής της παραγόμενης πρωτεΐνης, παρουσία O_2 , δεν ξεπερνά τα 5 λεπτά. Η αστάθεια αυτή οφείλεται σε ένα σύνολο μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων του μορίου, που οδηγούν στην ταχύτατη αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα (**Εικόνα 8**). Συγκεκριμένα, παρουσία O_2 , ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης, στις θέσεις 402 και

564, από τρεις ειδικές οξυγονο-εξαρτώμενες υδροξυλάσες προλίνης (PHD1-3). Εκτός από το O₂, ο σίδηρος και το 2-οξογλουταρικό είναι εξίσου απαραίτητα για την πλήρη ενζυμική ενεργοποίηση των PHDs (Schofield & Ratcliffe 2004). Επαγωγή της έκφρασης των PHDs έχει παρατηρηθεί και σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας, στο πλαίσιο ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης (Marxsen και συν. 2004). Ο υδροξυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη pVHL, που αποτελεί προϊόν του ογκογονιδίου von Hippel Lindau και μέλος του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Με τον τρόπο αυτό, προωθείται η ουβικιτινυλίωση του HIF-1α και η στόχευσή του στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Jaakkola και συν. 2001). Η ακετυλίωση του καταλοίπου Lys532, από την ARD-1 (arrest-defective-1), επίσης οδηγεί στην αποσταθεροποίηση και την πρωτεασωμική αποικοδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα (Jeong και συν. 2002). Τέλος, η οξυγενάση FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) υδροξυλιώνει το κατάλοιπο Asp803 στην περιοχή C-TAD, παρουσία O₂. Σε αντίθεση με την υδροξυλίωση των προλινών, η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης, αναστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον CBP/p300 (Lando και συν. 2002).

Σε υποξικές συνθήκες, οι παραπάνω μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις καταστέλλονται, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α, τη σύνδεσή του με την β υπομονάδα και τη συγκρότηση του λειτουργικού μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Το ετεροδιμερές προσδένεται στις συναινετικές αλληλουχίες απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HRE), που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του, και επάγει τη μεταγραφή τους. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 συμβάλλει στη ενίσχυση της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση των αμινοξικών καταλοίπων Ser641 και Ser643 παρεμποδίζει την έξοδο του μεταγραφικού παράγοντα από τον πυρήνα, ενώ η φωσφορυλίωση της Thr796 καταστέλλει τη δράση της FIH-1 (Lancaster και συν. 2004, Mylonis και συν. 2006). Και στις δύο περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και προώθηση της μεταγραφής. Ωστόσο, η καταγραφή του συνόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης είναι ένα πεδίο έρευνας, που παραμένει ανοιχτό.



Εικόνα 8: Το οξυγόνο-εξαρτώμενο μονοπάτι ρύθμισης του HIF-1α. [προσαρμογή από (Ashcroft 2005)]

2.3.3.2. Ρύθμιση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός από την υποξία, ερεθίσματα όπως οι αυξητικοί παράγοντες (Feldser και συν. 1999, Richard και συν. 2000), οι κυτταροκίνες (Hellwig-Burgel και συν. 1999), οι ορμόνες (Richard και συν. 2000, Gorlach και συν. 2001) και οι ιικές πρωτεΐνες (Moon και συν. 2004, Wakisaka και συν. 2004) μπορούν να επάγουν τον HIF-1α, σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης. Η ρύθμιση, σε αυτές τις περιπτώσεις, πραγματοποιείται κυρίως σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Παρά το γεγονός ότι η πρωτεασμική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης διατηρείται, η επιτάχυνση της σύνθεσής της μετατοπίζει την ισορροπία σύνθεσης/αποικοδόμησης, οδηγώντας στη συσσώρευση του HIF-1α.

Σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt και οι κινάσες mTOR και p70S6, που βρίσκονται καταρροϊκά αυτού, επάγουν τη μετάφραση του HIF-1α (Stiehl και συν. 2002, Dery και συν. 2005, Befani

και συν. 2012). Συγκεκριμένα, η κινάση p70S6 φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη S6 της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μετάφρασης μορίων mRNA, που φέρουν την αλληλουχία 5'-TOP (5'-terminal oligopyrimidine) στην 5' αμετάφραστη περιοχή τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το mRNA του HIF-1α. Επιπλέον, η Akt αναστέλλει έμμεσα την αποικοδόμηση του HIF-1α, μέσω αρνητικής ρύθμισης της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (Glycogen Synthase Kinase 3, GSK3) και της πρωτεΐνης FOXO4 (fork-head box O4). Τα αυξημένα επίπεδα της FOXO4, καθώς και η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τη GSK3, επάγουν την ουβικιτινυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα και την πρωτεασωματική του αποικοδόμηση, με μηχανισμό ανεξάρτητο από την pVHL (Tang & Lasky 2003, Flugel και συν. 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες, που υποστηρίζουν ότι η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α από το μονοπάτι PI3K/Akt είναι ιδιαίτερα μικρή, σε σύγκριση με την υποξία, και δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Arsham και συν. 2002). Συνεπώς, είναι πιθανό, η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα από την Akt, να εμφανίζει κάποιο βαθμό ιστοειδικότητας.

Οι κινάσες MAPKs, και ειδικότερα οι ERKs, συμβάλλουν, επίσης, σημαντικά στη ρύθμιση του HIF-1α. Εκτός από τη φωσφορυλίωση, που περιγράφηκε νωρίτερα και παρατείνει την παραμονή του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα, οι ERKs ενισχύουν τη μεταγραφική του ενεργότητα προωθώντας τον σχηματισμό του συμπλόκου HIF-p300/CBP (Sang και συν. 2003). Παρόμοιο μηχανισμό δράσης παρουσιάζει και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Datta και συν. 2004). Επιπλέον, η PKC ρυθμίζει τον HIF-1α άμεσα αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου του από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1, αλλά και έμμεσα καταστέλλοντας τη μεταγραφή του αναστολέα του, FIH-1 (Page και συν. 2002, Datta και συν. 2004).

Σε πολλές μορφές καρκίνου, τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια ανιχνεύονται, σε μόνιμα ενεργοποιημένη κατάσταση, με αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α και τη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος, για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

2.3.4. ΓΟΝΙΔΙΑ - ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ HIF-1

Έως σήμερα, έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 100 γονίδια, τα οποία φέρουν στον υποκινητή τους τη συναινετική αλληλουχία απόκρισης στην υποξία, HRE (Hypoxia-Response Element). Όπως διαπιστώθηκε με την τεχνική των μικροσυστοιχιών DNA, είναι χαρακτηριστικό ότι τουλάχιστον το 2% του γονιδιώματος των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων βρίσκεται υπό τον άμεσο ή

έμμεσο έλεγχο του HIF-1 (Manalo και συν. 2005). Εξίσου ευρύ είναι και το φάσμα των λειτουργιών, στις οποίες συμμετέχουν τα προϊόντα αυτών των γονιδίων. Συγκεκριμένα, η επαγωγή του HIF-1α και κατ' επέκταση των γονιδίων-στόχων του, ενεργοποιούν πολύπλοκες διαδικασίες, όπως η αγγειογένεση (VEGF), η ρύθμιση του αγγειακού τόνου (iNOS, ενδοθηλίνη 1, αδρενομελίνη, α_{1B} αδρενεργικός υποδοχέας), ο μεταβολισμός του σιδήρου (τρανσφερίνη, Tf), η ερυθροποίηση (ερυθροποιητίνη, EPO), η πρόσληψη γλυκόζης (GLU1, GLUT3), η κυτταρική επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός (αυξητικοί παράγοντες IGF2, TGF- α) (Ke & Costa 2006).

2.4. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ NrF2

2.4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο μεταγραφικός παράγοντας NrF2 (Nuclear factor erythroid-2 related Factor 2) αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή της προστατευτικής απόκρισης του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες, ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης, που προκαλούνται από τις ROS και τα ηλεκτρονιόφιλα μόρια. Για το λόγο αυτό, ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα σε ιστούς που έρχονται συχνά σε επαφή με τοξικές ουσίες, όπως το ήπαρ, ο πνεύμονας και τα νεφρά. Μετά την αποδέσμευσή του από την ανασταλτική πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1), ο NrF2 επάγει τη έκφραση ενός συνόλου αντιοξειδωτικών ενζύμων και κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών, που συμμετέχουν στη σύνθεση της γλουταθειόνης, την εξουδετέρωση των ROS και τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (Taguchi και συν. 2011, Kansanen και συν. 2013).

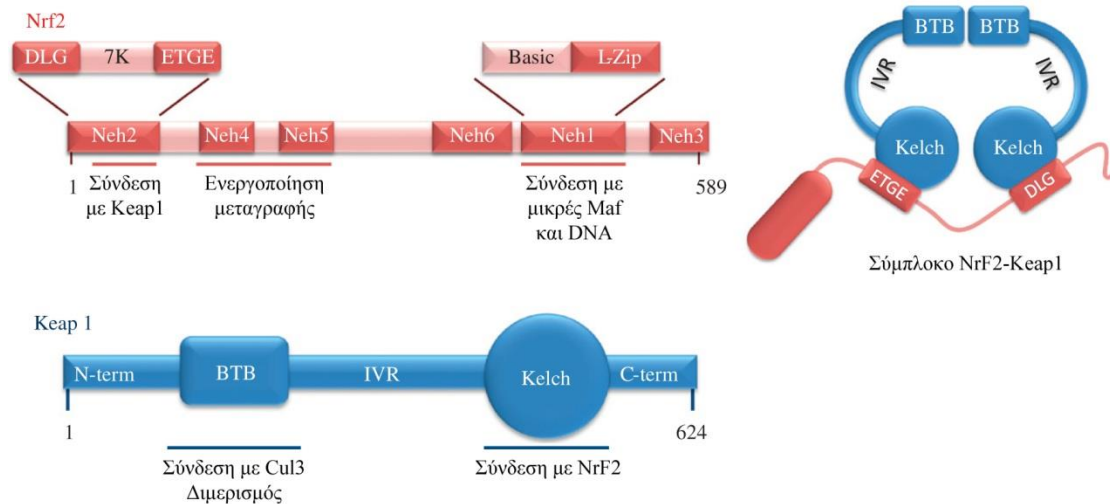
2.4.2. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ NrF2 ΚΑΙ ΤΗΣ Keap1

Όπως προαναφέρθηκε, μόρια-κλειδιά του προστατευτικού μηχανισμού του κυττάρου, έναντι του οξειδωτικού και ηλεκτροφιλικού στρες, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NrF2 και η ανασταλτική πρωτεΐνη Keap1, η οποία – σε φυσιολογικές συνθήκες – δεσμεύει τον NrF2, επάγοντας την πρωτεασωμική του αποικοδόμηση (Kansanen και συν. 2013).

Ο NrF2 ανήκει στην οικογένεια των «cap'n'collar» μεταγραφικών παραγόντων, με δομή βασικού φερμουάρ λευκίνης (basic leucine zipper, bZip) (Sykiotis & Bohmann 2010). Η πρωτεΐνη αποτελείται από 589 αμινοξέα και διαθέτει έξι εξελικτικά συντηρημένες επικράτειες, τις Neh1-6 (**Εικόνα 9**). Η Neh1 διακρίνεται σε δύο περιοχές: τη βασική περιοχή, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το DNA και την L-Zip περιοχή, που συμβάλει στον ετεροδιμερισμό με τις μικρές Maf

πρωτεΐνες. Η επικράτεια Neh3-5 ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του Nrf2, ενώ η Neh6, την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα (ανεξάρτητα από την Keap1). Τέλος, στην επικράτεια Neh2 εντοπίζονται τα μοτίβα αλληλεπίδρασης με την Keap1, ETGE και DLG, και – ανάμεσά τους – μια υδρόφιλη περιοχή 7 καταλοίπων λυσίνης (7K), απαραίτητη για την πολυ-ουβικτινυλίωση και την αποικοδόμηση του Nrf2 από το πρωτεάσωμα (Kansanen και συν. 2013).

Η Keap1 είναι μια πρωτεΐνη 624 αμινοξέων, πλούσια σε αντιδρώσες κυστεΐνες, οι οποίες – όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια – λειτουργούν ως «αισθητήρες» του οξειδωτικού και ηλεκτροφιλικού στρες. Το μόριο φέρει 2 επικράτειες διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που διαχωρίζονται από τη συνδετική περιοχή, IVR (intervening region) (**Εικόνα 9**). Συγκεκριμένα, η επικράτεια BTB, στο N-τελικό άκρο, είναι υπεύθυνη για τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης και την αλληλεπίδραση με την Cul3, ενώ η επικράτεια Kelch, στο C-άκρο, αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του Nrf2. Σε φυσιολογικές συνθήκες (απουσία στρες), κάθε μόριο Nrf2 αλληλεπιδρά με ένα ομοδιμερές Keap1, μέσω των μοτίβων ETGE και DLG της περιοχής Neh2 (Baird & Dinkova-Kostova 2011).



Εικόνα 9: Μοριακή δομή του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, της ανασταλτικής πρωτεΐνης Keap1 και του συμπλόκου Nrf2-Keap1. [προσαρμογή από (Kansanen και συν. 2013)]

2.4.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ NrF2

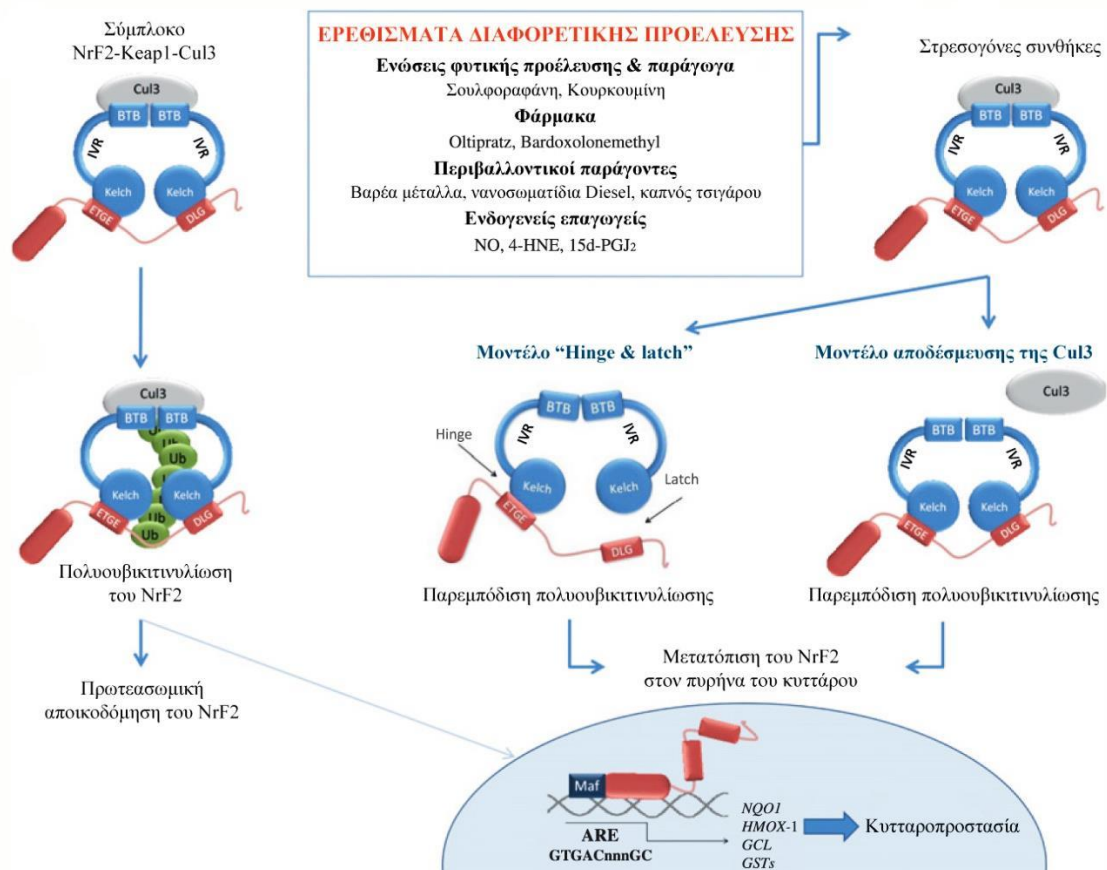
2.4.3.1. ΚΛΑΣΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο μεταγραφικός παράγοντας NrF2 συντίθεται συνεχώς, αλλά συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα, λόγω της πρόσδεσής του στην Keap1. Η αλληλεπίδραση της Keap1 με την Cul3, επάγει την ουβικιτινυλίωση του NrF2 και τη στόχευσή του στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Στις συνθήκες αυτές, ο χρόνος ημιζωής του μεταγραφικού παράγοντα δεν ξεπερνά τα 20 λεπτά (Kobayashi και συν. 2004). Ένα μικρό ποσοστό της συντιθέμενης πρωτεΐνης διαφεύγει της δέσμευσης από την Keap1 και μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης επάγοντας χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων του (Kansanen και συν. 2013).

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ή παρουσία ηλεκτρονιόφιλων μορίων (π.χ. μεταβολίτες οργανικών ρύπων) στο εσωτερικό του κυττάρου, η Keap1 αποδεσμεύει τον NrF2, λειτουργώντας ως μια «γέφυρα» μεταξύ των κυτταροτοξικών σημάτων και της ενεργοποίησης της μεταγραφής. 3 από τις 27 κυστεΐνες, της ανθρώπινης Keap1 (C151, C273 και C288), βρίσκονται τοποθετημένες κοντά σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, με αποτέλεσμα να αποτελούν ιδανικούς στόχους για τα ηλεκτρονιόφιλα και προ-οξειδωτικά μόρια. Το πρότυπο τροποποίησης των κυστεϊνών διαφέρει, ανάλογα με τη δομή του εκάστοτε επαγωγέα («κώδικας κυστεϊνών») (Taguchi και συν. 2011). Σε κάθε περίπτωση, η τροποποίηση αυτών των καταλοίπων, μεταβάλλει τη διαμόρφωση του ομοδιμερούς της Keap1, διαταράσσοντας την αλληλεπίδρασή του με τον NrF2 (Kobayashi και συν. 2009, Holland & Fishbein 2010).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός αποδέσμευσης του Nrf2 δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα, έχουν προταθεί δύο εναλλακτικά μοντέλα (**Εικόνα 10**). Το πρώτο μοντέλο είναι γνωστό ως «*hinge and latch model*» και διατυπώθηκε από τους Tong και συν, το 2006 (Tong και συν. 2006). Σύμφωνα με αυτό, η τροποποίηση των αντιδρώντων κυστεϊνών, στη συνδετική περιοχή IVR, και η επακόλουθη αλλαγή στη διαμόρφωση της Keap1, οδηγεί στη διάσπαση της σχετικά χαλαρής σύνδεσης του μοτίβου DLG, από το ένα μόριο του ομοδιμερούς της Keap1, ενώ το, υψηλής συγγένειας, ETGE μοτίβο παραμένει συνδεδεμένο στο σύμπλοκο. Το εναλλακτικό μοντέλο προτείνει ότι η τροποποίηση των κυστεϊνών της Keap1, και κυρίως της C151 στην επικράτεια BTB, καταστέλλει την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη Cul3 (Rachakonda και συν. 2008). Τόσο η μερική αποδέσμευση του Nrf2, όσο και η απομάκρυνση της Cul3, δεν επιτρέπουν την πολυουβικιτινυλίωση του NrF2.

Κατά συνέπεια, τα νεοσυντιθέμενα μόρια του μεταγραφικού παράγοντα, παρακάμπτουν την Keap1 και μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί, ο Nrf2 αλληλεπιδρά με τις μικρές Maf πρωτεΐνες και επάγει τη μεταγραφή κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, που φέρουν στον υποκινητή τους τις συναινετικές αλληλουχίες αντιοξειδωτικής (ARE) ή ηλεκτροφιλικής (ErRE) απόκρισης (Taguchi και συν. 2011). Τα πλέον αντιπροσωπευτικά γονίδια-στόχοι του Nrf2 είναι η οξειδοαναγωγή της NAD(P)H κινόνης (NQO1), η οξυγενάση της αίμης (HO-1), η λιγάση γλουταμικού-κυστεΐνης (GCL) και οι θειο-μεταφορές της γλουταθειόνης (GSTs).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών ρύθμισης του Nrf2. [προσαρμογή από (Kansanen και συν. 2013)]

2.4.3.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ Nrf2 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι, εκτός από την άμεση τροποποίηση της Keap1 από τις προ-οξειδωτικές ενώσεις και τα ηλεκτρονιόφιλα μόρια, ο Nrf2 μπορεί να ενεργοποιηθεί και από ορισμένες ενδογενείς πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου.

Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι το C-τελικό άκρο της p21 αλληλεπιδρά με το μοτίβο DLG του NrF2, αποδεδειγμένα από την Kearn1 (Chen και συν. 2009). Η p21 αποτελεί έναν από τους στόχους της p53, στο πλαίσιο της παύσης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Ωστόσο, η ενεργοποίηση της p53 καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του NrF2, μέσω άμεσης πρόσδεσης στις αλληλουχίες ARE (Faraonio και συν. 2006). Τα αντιφατικά δεδομένα οδήγησαν τους Wakabayashi και συν. στη διατύπωση ενός δυναμικού μοντέλου απόκρισης του κυττάρου στο στρες, βασιζόμενο στην αλληλεπίδραση μεταξύ των p53, p21 και NrF2 (Komatsu & Ichimura 2010, Wakabayashi και συν. 2010). Συγκεκριμένα, πρότειναν ότι κατά το ήπιο στρες, η – επαγόμενη από την p21 – παύση του κυτταρικού κύκλου και η επακόλουθη σταθεροποίηση και μεταγραφική ενεργοποίηση του NrF2, προστατεύουν το κύτταρο και εξασφαλίζουν την επιβίωσή του. Αντίθετα, σε περιπτώσεις έντονου στρες, τα υψηλά επίπεδα της p53 καταστέλλουν την κυτταροπροστατευτική απόκριση και επάγουν την απόπτωση.

Ένας ακόμη πρωτεϊνικός επαγωγέας του NrF2 είναι η πρωτεΐνη p62, η οποία συνδέεται στα πολυμερή ουβικιτίνης κατά την αυτοφαγία (Komatsu & Ichimura 2010). Το μοτίβο ETGE της p62 χαρακτηρίζεται από παρόμοιο βαθμό συγγένειας, για την Kearn1, με το DLG μοτίβο του NrF2 (Komatsu και συν. 2010). Όταν, για κάποιο λόγο, η διαδικασία της αυτοφαγίας δεν ολοκληρώνεται, τα συσσωματώματα πολυουβικιτινυλιωμένων πρωτεϊνών, που περιέχουν μόρια p62, παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, ως έγκλειστα σωμάτια. Τα αυξημένα επίπεδα της p62 αποσπούν το μοτίβο DLG του NrF2, λόγω ανταγωνισμού, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του μεταγραφικού παράγοντα και την έκφραση των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων.

Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι στη ρύθμιση του NrF2 συμμετέχουν και σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως των MAPK, των PI3K/Akt, της PKC και της κινάσης της καζεΐνης (CK2) (Surh και συν. 2008). Τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser40 και Tyr568, έχουν αναγνωριστεί ως πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από την PKC και την κινάση τυροσίνης Fyn, αντίστοιχα (Huang και συν. 2002, Bloom & Jaiswal 2003, Numazawa και συν. 2003, Jain & Jaiswal 2006). Ανάλογες θέσεις έχουν εντοπιστεί και στην περίπτωση των MAPK. Παρ' όλα αυτά, δεν έχει αποδειχθεί με βεβαιότητα η συμβολή αυτών των τροποποιήσεων στη ρύθμιση της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Αν και αυτό το θέμα εξακολουθεί να βρίσκεται υπό διερεύνηση, η φωσφορυλίωση από τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια, είναι πιθανό να ενισχύει έμμεσα τη μεταγραφική δραστηριότητα του NrF2, ρυθμίζοντας, επιπλέον, την ενεργότητα των συμπαραγόντων του μεταγραφικού συμπλόκου (Taguchi και συν. 2011).

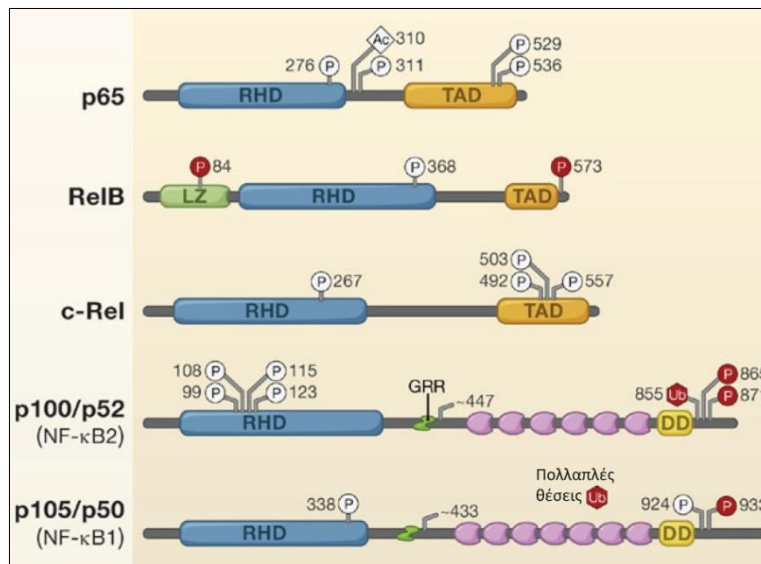
2.5. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ NF-κB

2.5.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο NFκB (Nuclear Factor kappa B) περιγράφηκε, αρχικά, ως ένας εξειδικευμένος μεταγραφικός παράγοντας των B λεμφοκυττάρων, υπεύθυνος για την έκφραση της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (Bonizzi & Karin 2004). Σύντομα, όμως, έγινε αντιληπτό ότι ο παράγοντας αυτός εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους συμμετέχοντας στη ρύθμιση βασικών λειτουργιών, όπως η ανοσολογική απόκριση, η φλεγμονή, η επιβίωση και η αύξηση των κυττάρων. Μεταξύ των ποικίλων ενεργοποιητών του NFκB, περιλαμβάνονται οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. TNFα και IL-1), ορισμένες ικές πρωτεΐνες, το οξειδωτικό και άλλες μορφές κυτταρικού στρες και οι βλάβες του DNA (Hayden & Ghosh 2008).

2.5.2. ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ NFκB

Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB έχει τη μορφή ομοδιμερών ή ετεροδιμερών, που συγκροτούνται από τα μέλη της οικογένειας NFκB. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μέλη αυτής της οικογένειας: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) και p52/p100 (NFκB2). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11** και οι πέντε πρωτεΐνες φέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους, την επικράτεια RHD (Rel Homology Domain), η οποία είναι υπεύθυνη για τον ομο- ή ετερο-διμερισμό, την πρόσδεση στο DNA και την αλληλεπίδραση με τον αναστολέα του NFκB, IκB. Ένα, επιπλέον, κοινό χαρακτηριστικό όλων των μελών είναι το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) στο κέντρο του πρωτεϊνικού μορίου (Lin και συν. 2010). Οι p65 (RelA), RelB και c-Rel διαθέτουν, επίσης, μια καρβοξυτελική επικράτεια TAD, η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Οι NFκB1 και NFκB2 μεταφράζονται ως πρόδρομες πρωτεΐνες, p105 και p100, αντίστοιχα, και φέρουν μια καρβοξυτελική περιοχή, που παρουσιάζει ομολογία με την IκB προσδίδοντάς τους κατασταλτικές ιδιότητες. Η πρωτεολυτική επεξεργασία των πρόδρομων μορίων, αφαιρεί τη συγκεκριμένη περιοχή και παράγει τις ώριμες πρωτεΐνες p50 και p52. Όμως, η απουσία της επικράτειας TAD δεν επιτρέπει τη μεταγραφική ενεργοποίηση των p50 και p52, εκτός αν συνδυαστούν με άλλα μέλη της οικογένειας ή με πρωτεΐνες, που μπορούν να προσελκύσουν συνενεργοποιητές της μεταγραφής. Τέλος, τα ομοδιμερή p50 και p52, καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων του NFκB, μέσω πρόσδεσής τους στους αντίστοιχους υποκινητές (Hayden & Ghosh 2008).



Εικόνα 11: Η μοριακή δομή των μελών της οικογένειας του NFκB. [προσαρμογή από (Numazawa και συν. 2003)]

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα διμερή του NFκB συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα από την ανασταλτική πρωτεΐνη ΙκΒ, η οποία καλύπτει το μοτίβο NLS. Η οικογένεια των παραγόντων ΙκΒ αποτελείται από τις πρωτεΐνες ΙκΒα, ΙκΒβ, ΙκΒγ, ΙκΒε και ΒCL-3. Επίσης, στην ίδια οικογένεια κατατάσσονται και οι πρόδρομες πρωτεΐνες p105 και p100 (Lin και συν. 2010).

2.5.3. ΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ NFκB

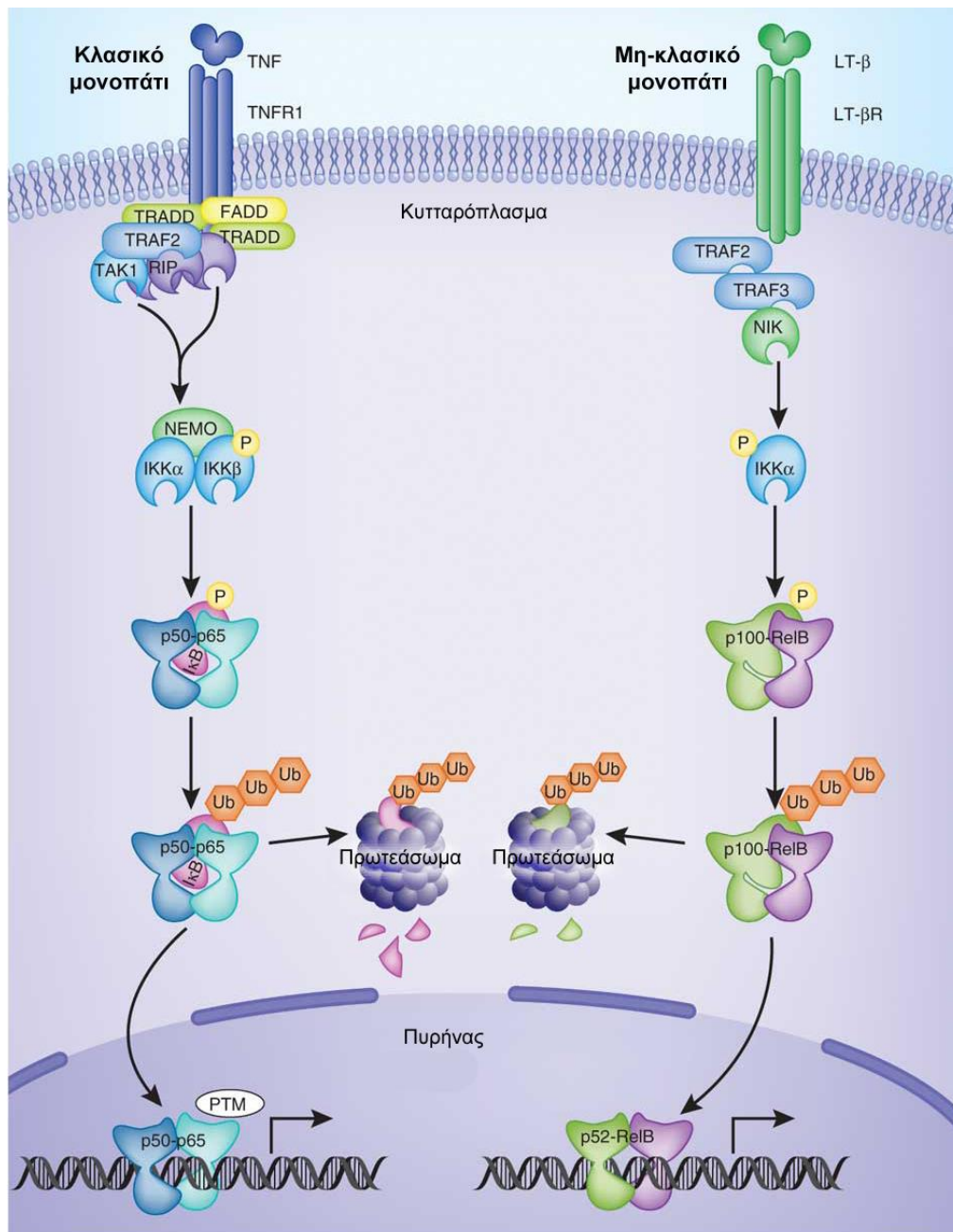
Η ενεργοποίηση του NFκB επιτυγχάνεται μέσω του κλασικού ή μέσω του μη-κλασικού μονοπατιού, ανάλογα με το εκάστοτε ερέθισμα (**Εικόνα 12**).

Το κλασικό μονοπάτι είναι η βασική οδός ενεργοποίησης του NFκB στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και βασίζεται στην αποικοδόμηση του ΙκΒ και την επακόλουθη αποδέσμευση του NFκB (κυρίως του ετεροδιμερούς p65/p50). Το μονοπάτι ενεργοποιείται παρουσία προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-1β ή ο TNF-α, και ποικίλων στρεσογόνων συνθηκών, όπως οι βλάβες του DNA (Numazawa και συν. 2003). Η αλληλεπίδραση του εκάστοτε επαγωγέα με τον αντίστοιχο υποδοχέα (π.χ. TNF-α/TNFR) προσελκύει στο επίπεδο της μεμβράνης την κινάση της ΙκΒ, ΙΚΚ. Η ΙΚΚ είναι ένα ετεροτριμερές, που αποτελείται από δύο καταλυτικές (ΙΚΚα/ΙΚΚ1, ΙΚΚβ/ΙΚΚ2) και μια ρυθμιστική (ΙΚΚγ/ΝΕΜΟ) υπομονάδα. Στο σύμπλοκο, που δημιουργείται συμμετέχουν, επίσης, οι πρωτεΐνες TRAF, RIP1 (Receptor-Interacting Protein kinase 1) και οι E3 λιγάσες της ουβικιτίνης, cIAP-1 και cIAP-2. Στη συνέχεια, η ΙΚΚ ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την RIP1 και

την MEKK3 ή την TAK1 (TGFβ-activated kinase 1) (Devin και συν. 2000, Yang και συν. 2001). Η ενεργοποιημένη υπομονάδα IKKβ φωσφορυλιώνει την IκB στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser32 και Ser36 επάγοντας την πολυουβικτινυλίωση και την άμεση αποικοδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Η απομάκρυνση της IκB, εκθέτει το μοτίβο NLS της p65 και της p50, με αποτέλεσμα τον ετεροδιμερισμό τους και τη στόχευσή τους στον πυρήνα. Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς NFκB, μπορεί να ρυθμιστεί, μέσω φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης της υπομονάδας p65. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η κινάση MSK1, η οποία βρίσκεται καταρροϊκά των κινασών ERK1/2 και p38, είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της p65, στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser276, στους σκελετικούς μυοβλάστες, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Kefaloyianni και συν. 2006). Οι τροποποιήσεις αυτές ενισχύουν την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA και την αλληλεπίδρασή του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως το σύμπλοκο CBP/p300 (Hayden & Ghosh 2004).

Το μη-κλασικό μονοπάτι επάγεται από ορισμένα μέλη της οικογένειας των TNFR, όπως η CD40, από τη λεμφοτοξίνη β (LTβ), τον παράγοντα ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων (BAF) και συγκεκριμένες ικές πρωτεΐνες, όπως η LMP-1 του ιού Epstein-Barr. Το μονοπάτι ξεκινά με την ενεργοποίηση της IKKα από την κινάση NIK (NFκB-inducing kinase). Η IKKα, με τη σειρά της, επάγει την πρωτεόλυση της p100 και την παραγωγή της ώριμης p52. Ακολουθεί η συγκρότηση του λειτουργικού ετεροδιμερούς p52/RelB, η μετατόπισή του στον πυρήνα και η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Hayden & Ghosh 2004). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες cIAP, οι οποίες ρυθμίζουν θετικά το κλασικό μονοπάτι, καταστέλλουν το μη-κλασικό μονοπάτι επάγοντας την ουβικτινυλίωση και την αποικοδόμηση της NIK (Zarnegar και συν. 2008).

Εκτός από τα παραπάνω μονοπάτια, σε σπάνιες περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του NFκB, μεσολαβείται από κάποιες εναλλακτικές οδούς, γνωστές ως μη τυπικά μονοπάτια (atypical pathways). Για παράδειγμα, η μικρού μήκους κύματος υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποιεί τον NFκB, μέσω μιας διαδικασίας, που περιλαμβάνει φωσφορυλίωση από την CK2 και την αποικοδόμηση της IκB από το σύστημα των καλπαϊνών (Kato και συν. 2003). Επίσης, έχει δειχθεί ότι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, επάγει τον NFκB, μέσω φωσφορυλίωσης της IκB, στην Tyr42, από τις κινάσες c-Src και Syk (Tergaonkar και συν. 2003, Viatour και συν. 2005).



Εικόνα 12: Το κλασικό και το μη-κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NFκB. [προσαρμογή από (Oeckinghaus και συν. 2011)]

2.5.4. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NFκB

Ως ένας πολυλειτουργικός παράγοντας, ο NFκB εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη, η έμφυτη και επίκτητη ανοσία, η ομοίωση των ιστών και η φλεγμονή. Σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, ο NFκB ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση, τον πολλαπλασιασμό, αλλά και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Lin και συν. 2010).

i. Ρύθμιση της μεταγραφής

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο NFκB δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής των γονιδίων, που φέρουν στον υποκινητή τους τη συναινετική αλληλουχία κΒ. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων, τα οποία ξεπερνούν τα 200, συμμετέχουν στις περισσότερες βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της ανοσολογικής απόκρισης και της ανάπτυξης (Aggarwal 2004). Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι ο NFκB είναι δυνατό να καταστείλει τη γονιδιακή έκφραση στην περίπτωση της επίδρασης γενοτοξικών παραγόντων. Αν και ο υπεύθυνος μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα, υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή αναστολέων της μεταγραφής ή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, όπως η p53 και η ARF (Janssens & Tschopp 2006). Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι αυτή η ανασταλτική ιδιότητα του NFκB, έχει, πιθανότατα, ιστοειδικό χαρακτήρα, καθώς οι ίδιοι γενοτοξικοί παράγοντες ρυθμίζουν θετικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του NFκB, σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Hur και συν. 2003, Chen και συν. 2008).

ii. Ρύθμιση της απόπτωσης

Ο NFκB θεωρείται, γενικά, ένας από τους βασικούς παράγοντες επιβίωσης του κυττάρου, λόγω της ιδιότητάς του να επάγει την έκφραση πρωτεϊνών με αντι-αποπτωτική δράση, όπως οι cIAP-1, cIAP-2, TRAF1, TRAF2, Bcl-XI, XIAP, MnSOD και IEX-1L (Karin & Greten 2005). Ειδικότερα, οι cIAP-1 και cIAP-2 αναστέλλουν τα αποπτωτικά μονοπάτια, μέσω πρόσδεσης στις κασπάσες-τελεστές (Varfolomeev και συν. 2008, Wang και συν. 2008). Παρ' όλα αυτά, ορισμένες μελέτες συγκαταλέγουν στους μεταγραφικούς στόχους του NFκB τα γονίδια των πρωτεϊνών DR5, FasL, PUMA και Bax, τα οποία προσδίδουν στο μεταγραφικό παράγοντα και προ-αποπτωτικές ιδιότητες (Shou και συν. 2002, Singh και συν. 2007, Wang και συν. 2009).

iii. Ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο NFκB προωθεί την κυτταρική διαίρεση αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 και του πρωτο-ογκογονιδίου c-Myc. Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α, IL-1β και IL-8, οι οποίες επάγουν τη φλεγμονή, αλλά και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αποτελούν, επίσης, στόχους του NFκB (Karin & Greten 2005). Όμως, και σε αυτή την περίπτωση, ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα φαίνεται να είναι διττός, καθώς έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την κινάση JNK και επάγει την έκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p21 (Aggarwal 2004).

2.6. Η ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

2.6.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα ιόντα ασβεστίου αποτελούν ένα δεύτερο μήνυμα, που συμμετέχει σχεδόν στο σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών (π.χ. γονιδιακή έκφραση, μεταβολισμός, κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, οργάνωση του κυτταροσκελετού, έκκριση και κυτταρικός θάνατος). Η ανταπόκριση ενός απλού δισθενούς κατιόντος σε ένα τόσο μεγάλο εύρος διαφορετικών λειτουργιών, πολλές από τις οποίες διενεργούνται ταυτόχρονα στο κύτταρο, επιτυγχάνεται μέσω ενός πολύπλοκου και αυστηρά ελεγχόμενου δικτύου ομοιοστατικών μηχανισμών. Σε συνθήκες ηρεμίας, η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι 55-100nM, ενώ κατά τη διέγερση του κυττάρου αυξάνεται, κατά προσέγγιση, στο 1μM. Αντίθετα, στον εξωκυττάριο χώρο, τα επίπεδα του ασβεστίου ξεπερνούν περίπου κατά 20000 φορές τα βασικά κυτταροπλασματικά, αγγίζοντας τα 2mM. Η διατήρηση αυτής της διαβάθμισης αντανακλά την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών, που ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ιόντων, για τους οποίους το κύτταρο διαθέτει ένα μεγάλο μέρος της ενέργειάς του (Clapham 2007, Rhodes & Sanderson 2009).

2.6.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ Ca^{2+}

Πρωταγωνιστές στη ρύθμιση της διακίνησης των ιόντων, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση και να εξασφαλιστεί η σωστή κυτταρική σηματοδότηση, είναι ένα πολύπλοκο σύστημα διαύλων, αντλιών και ιοντοανταλλακτών, στην πλασματική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) (**Εικόνα 13**).

Η απομάκρυνση του Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα είναι μια ενεργητική διαδικασία, που πραγματοποιείται αφενός μέσω της αντλίας PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) και των ιοντοανταλλακτών Na^+/Ca^{2+} (NCX) και $Na^+/Ca^{2+}-K^+$ (NCKX), στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, και αφετέρου μέσω της αντλίας SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) στη μεμβράνη του ΕΔ. Οι αντλίες PMCA και SERCA, μεταφέρουν συνεχώς Ca^{2+} στον εξωκυττάριο χώρο και το κυταρόπλασμα, αντίστοιχα, αντίθετα προς τη διαβάθμιση συγκέντρωσης, με παράλληλη υδρόλυση ATP (Clapham 2007). Οι ιοντικοί ανταλλάκτες κατέχουν εξίσου θεμελιώδη ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου. Ο NCX ανταλλάσσει 3 ιόντα Na^+ προς 1 ιόν Ca^{2+} , ενώ ο NCKX ανταλλάσσει 1 ιόν K^+ και 1 ιόν Ca^{2+} προς 4 ιόντα Na^+ (Belkacemi και συν. 2005). Η διαφορά στους ρόλους των δύο συστημάτων μεταφοράς, έγκειται στο γεγονός ότι η PMCA είναι υπεύθυνη για τη μακροχρόνια διατήρηση των χαμηλών επιπέδων κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ οι ανταλλάκτες

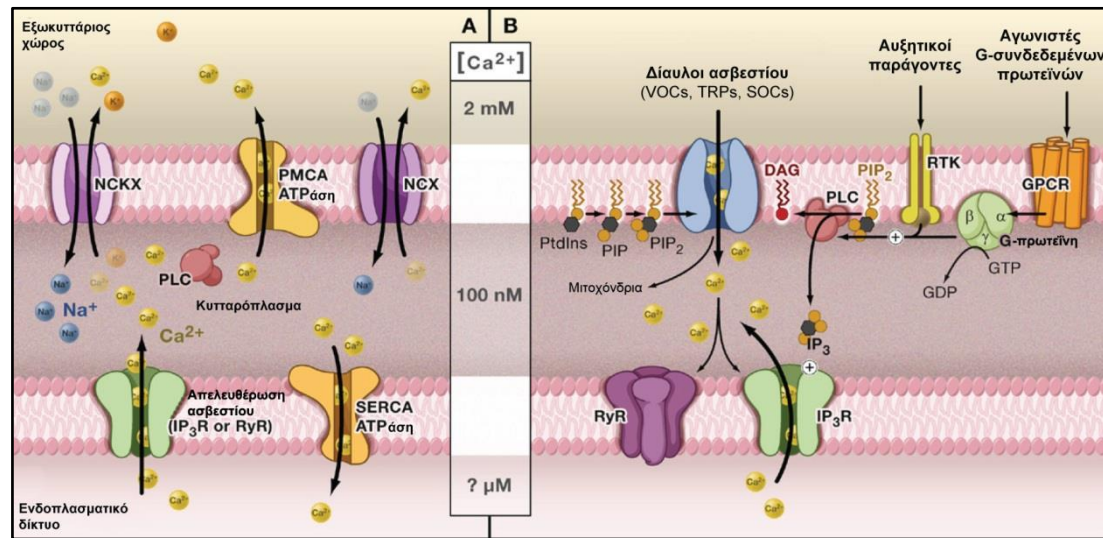
αποκαθιστούν πολύ γρήγορα την ισορροπία, ύστερα από στιγμιαίες διαταραχές, όπως η εκπόλωση των νευρώνων (Hilgemann και συν. 2006).

Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} πραγματοποιείται με εισροή ιόντων από τον εξωκυττάριο χώρο ή/και απελευθέρωσή τους από το ΕΔ. Η έξοδος των ιόντων από το ΕΔ, το οποίο αποτελεί τη βασική αποθήκη Ca^{2+} στο κύτταρο, επιτυγχάνεται μέσω δύο διαμεμβρανικών υποδοχέων: του υποδοχέα της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3R) και του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR). Οι IP_3R ενεργοποιούνται με πρόσδεση του δεύτερου μηνύματος, IP_3 , το οποίο παράγεται καταρροϊκά υποδοχέων, που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPCR). Οι $RyRs$, που εντοπίζονται, τόσο στο ενδοπλασματικό, όσο και στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, ενεργοποιούνται από χαμηλά επίπεδα κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις τους καταστέλλουν. Και οι δύο τύποι υποδοχέων διαθέτουν ογκώδη κυτταροπλασματικά τμήματα, με μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών περιοχών και θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών, όπως η καλμοδουλίνη (Clapham 2007). Επίσης, παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τις κινόνες (Waring 2005).

Οι δίαυλοι εισόδου ασβεστίου στην πλασματικής μεμβράνης ενεργοποιούνται μετά από κατάλληλο ερέθισμα και περιλαμβάνουν τους τασεο-ελεγχόμενους διαύλους (voltage-gated Ca^{2+} channels, VOCs), την υπεροικογένεια των TRPs (transient receptor potential) και τους διαύλους, που ελέγχονται από την πληρότητα των αποθηκών (store-operated Ca^{2+} channels, SOCs). Οι VOCs αποκρίνονται ταχύτατα στις αλλαγές του διαμεμβρανικού δυναμικού και, λόγω της μεγάλης διαβάθμισης στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , είναι ικανοί να δεκαπλασιάσουν τα κυτταροπλασματικά επίπεδα των ιόντων, σε λίγα μόλις χιλιοστά του δευτερολέπτου (Catterall 2011). Τα μέλη της υπεροικογένειας των TRPs επάγονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως οι μεταβολές της θερμοκρασίας ή του pH, οι πτητικές οργανικές ενώσεις και ποικίλα φυτικά συστατικά. Πρόκειται για μη ειδικούς κατιονικούς διαύλους, οι οποίοι εκπολώνουν την πλασματική μεμβράνη και αυξάνουν τη συγκέντρωση Ca^{2+} και Na^+ στο κυτταρόπλασμα. Η δραστηριότητά τους επάγεται από GPCR ή υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTK), μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (PLC) (Ramsey και συν. 2006). Τέλος, οι δίαυλοι SOCs ενεργοποιούνται από την εκκένωση του ΕΔ από ιόντα Ca^{2+} , προκειμένου να αναπληρωθούν οι ενδοκυττάρια αποθήκες. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως «είσοδος Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας» ή CCE (Capacitative Calcium Entry), είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ομαλής κυτταρικής σηματοδότησης. Ο μηχανισμός που συνδέει την εκκένωση των αποθηκών με την εισροή εξωκυττάρια Ca^{2+} δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο,

κρίσιμο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η διαμεμβρανική πρωτεΐνη STIM1 του ΕΔ, η οποία λειτουργεί ως «αισθητήρας» των επιπέδων Ca^{2+} , στο εσωτερικό του ΕΔ και, κατά την εκκένωσή του, σχηματίζει συσσωματώματα, ακριβώς κάτω από τους διαύλους SOCs (Putney 2007, Putney 2009).

Ως πηγές ιόντων Ca^{2+} , μπορούν, επίσης, να λειτουργήσουν τα ενδοσώματα, τα εκκριτικά κυστίδια, τα λυσοσώματα, κυστίδια του συστήματος Golgi και τα μελανοσώματα (Rizzuto & Pozzan 2006).



Εικόνα 13: Δίκτυο αντλιών, διαύλων και ιοντοανταλλακτών της πλασματικής μεμβράνης και του ΕΔ, που ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου. Α) Διατήρηση της ομοιόστασης σε συνθήκες ηρεμίας, Β) Σηματοδότηση ιόντων ασβεστίου. [προσαρμογή από (Clapham 2007)]

2.6.3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ

Η κυτταρική σηματοδότηση μέσω ιόντων Ca^{2+} βασίζεται στην απελευθέρωσή τους από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Η ενεργοποίηση της PLC_β και της PLC_γ από τους μεμβρανικούς υποδοχείς GPCR και RTK, αντίστοιχα, οδηγεί στην υδρόλυση του PIP_2 και την παραγωγή των δεύτερων μηνυμάτων, IP_3 και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η πρόσδεση της IP_3 στον υποδοχέα IP_3R του ΕΔ, επιτρέπει την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, αυξάνοντας την συγκέντρωσή τους περίπου στο $1\mu\text{M}$. Τα ελεύθερα ιόντα Ca^{2+} αλληλεπιδρούν με την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και επάγουν τη μεταφορά της στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, όπου ενεργοποιεί την DAG, μέσω φωσφορυλίωσης. Κατά την επεξεργασία της DAG από ειδικές κινάσες και φωσφατάσες, προκύπτουν δύο βιοενεργά μόρια: το φωσφατιδικό και το αραχιδονικό οξύ, αντίστοιχα. Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι κινητοποιείται καταρροϊκά της ενεργοποίησης των περισσότερων υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης (Clapham 2007).

Η επίδραση του ασβεστίου στην επιβίωση του κυττάρου έχει διττό χαρακτήρα. Μικρές, ελεγχόμενες αυξήσεις στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων, μπορούν να επάγουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλεπιδρώντας με αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. PI3K/Akt) και μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. NF-κB, HIF-1). Για παράδειγμα, το Ca^{2+} συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt, μέσω του ένζυμου καλμοδουλίνη (Deb και συν. 2004, Perez-Garcia και συν. 2004). Η καλμοδουλίνη ενεργοποιείται από τα ιόντα Ca^{2+} και προσδένεται στην ανενεργή Akt μεταφέροντάς την στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται από τις αντίστοιχες κινάσες. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι η καλμοδουλίνη επάγει απευθείας την ενεργοποίηση της PI3K, η οποία ακολούθως μεσολαβεί τη φωσφορυλίωση της Akt (Perez-Garcia και συν. 2004).

Ωστόσο, η μαζική και παρατεταμένη εισροή Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, πυροδοτεί μια σειρά γεγονότων, που ενδέχεται να έχουν καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Στις περιπτώσεις αυτές, παρατηρείται εκτεταμένη πρωτεόλυση, μέσω ενεργοποίησης Ca^{2+} -εξαρτώμενων πρωτεασών (π.χ. καλπαΐνες), καθώς και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Ένα από τα υποστρώματα των καλπαϊνών είναι η προκασπάση-12, η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη του ΕΔ. Η κασπάση-12, με τη σειρά της, ενεργοποιεί πρωτεολυτικά τις κασπάσες τελεστές, επάγοντας την αποπτωτική διαδικασία, ανεξάρτητα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Mosserova & Kralova 2012). Παράλληλα, τα μιτοχόνδρια ανταποκρίνονται άμεσα στην υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Η διέλευση των ιόντων Ca^{2+} από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω των τασεοελεγχόμενων διαύλων, VDAC. Αφού τα ιόντα διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη, μπορούν να εισέλθουν στη μήτρα, είτε μέσω των ιοντοανταλλακτών Na^+/Ca^{2+} και H^+/Ca^{2+} , είτε μέσω ενός ειδικού μεταφορέα που επιτρέπει την είσοδο ιόντων, λόγω της διαφοράς δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στη μιτοχονδριακή μήτρα, το Ca^{2+} αλληλεπιδρά με τη κυκλοφιλίνη D επάγοντας την ευθυγράμμιση του μεταφορέα αδενίνης (ANT) της εσωτερικής μεμβράνης, με τον διάυλο VDAC της εξωτερικής μεμβράνης και τη δημιουργία του πόρου PTP (Permeability Transition Pore). Το γεγονός αυτό, προκαλεί διόγκωση και ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων (AIF, ενδονουκλεάση G) στο κυτταρόπλασμα και επαγωγή του αποπτωτικού θανάτου (Jeong & Seol 2008). Επιπλέον, το άνοιγμα του πόρου PTP, έχει συνδεθεί και με μια έκρηξη παραγωγής ROS από το μιτοχόνδριο, λόγω της διατάραξης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την επαγωγή έντονου οξειδωτικού στρες και τη γενίκευση της βλάβης (Adam-Vizi & Starkov 2010).

3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί μια βασική βιολογική διαδικασία, απαραίτητη για την ανάπτυξη, τη διατήρηση της ομοιόστασης και τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης των πολυκύτταρων οργανισμών. Οι διαφορετικοί τύποι κυτταρικού θανάτου διακρίνονται με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (αποπτωτικός, νεκρωτικός, αυτοφαγικός), τα ένζυμα που συμμετέχουν στον εκάστοτε μηχανισμό (διαφορετικές τάξεις πρωτεασών και νουκλεασών), λειτουργικά κριτήρια (προγραμματισμένος ή τυχαίος, φυσιολογικός ή παθολογικός) και ανοσολογικά κριτήρια (ανοσογενής ή μη ανοσογενής) (Galluzzi και συν. 2007). Στη συνέχεια, θα περιγραφούν οι τρεις κυριότερες κατηγορίες κυτταρικού θανάτου, με ιδιαίτερη έμφαση στην απόπτωση, η οποία φαίνεται να επάγεται στις συνθήκες στρες, που εξετάζονται στην παρούσα διατριβή (π.χ. οξειδωτικό στρες).

3.1. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

3.1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη, γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία, η οποία επάγεται, είτε στο πλαίσιο φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού (π.χ. μορφογένεση οργάνων, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη), είτε λόγω της αδυναμίας του κυττάρου να ανακτήσει την ομοιόστασή του, ύστερα από την επίδραση έντονων, ενδογενών ή εξωγενών, στρεσογόνων συνθηκών. Τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση του κυττάρου, η δημιουργία «φουσαλίδων» στην πλασματική μεμβράνη και η συμπύκνωση της χρωματίνης (Duprez και συν. 2009).

Οι πρωτεΐνες, που πρωταγωνιστούν σε αυτές τις διαδικασίες, είναι η οικογένεια των Bcl-2, που ρυθμίζουν την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων, και οι κασπάσες (πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού), που εμπλέκονται στην «εκτελεστική» φάση της απόπτωσης (Youle & Strasser 2008). Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 φέρουν 4 ομόλογες και εξελικτικά συντηρημένες περιοχές, τις BH1-4 (Bcl-2 homology domains 1-4) και κατατάσσονται σε 2 υποκατηγορίες: τις πρωτεΐνες με αντι-αποπτωτική (π.χ. Bcl-2, Bcl-xL) και τις πρωτεΐνες με προ-αποπτωτική δράση (π.χ. Bax, Bad, Bid). Το αμινοτελικό άκρο της περιοχής BH4, ευθύνεται για την αντι-αποπτωτική δράση και απουσιάζει από τα προ-αποπτωτικά μέλη, ενώ οι περιοχές BH1-3, παρέχουν την ικανότητα διμερισμού με άλλα μέλη της οικογένειας (Salvesen & Riedl 2008, Youle & Strasser 2008). Οι οικογένεια των κασπασών περιλαμβάνει 12 μέλη, τα οποία διακρίνονται στις εναρκτήριες

κασπάσες (κασπάση-2, -8, -9, -10) και τις κασπάσες-τελεστές (κασπάση-3, -6, -7). Όλα τα μέλη της οικογένειας συντίθενται, αρχικά, ως ανενεργά προ-ένζυμα και ενεργοποιούνται μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία (Salvesen & Riedl 2008).

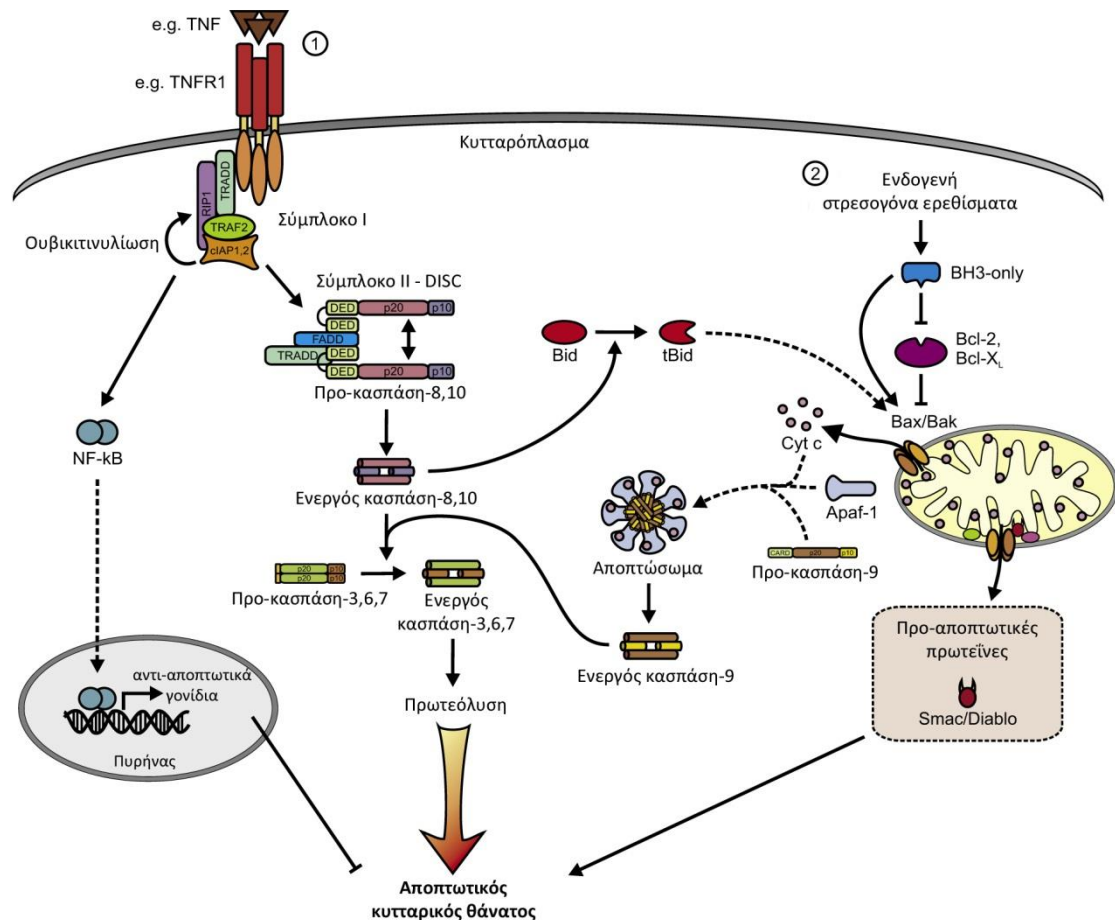
3.1.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί δύο διαφορετικά μονοπάτια αποπτωτικού θανάτου: το εξωγενές (ή επαγόμενο από υποδοχείς θανάτου) και το ενδογενές (ή μιτοχονδριακό) μονοπάτι (**Εικόνα 14**). Και τα δύο καταλήγουν στον κατακερματισμό του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία φαγοκυτταρώνονται άμεσα από τα περιβάλλοντα μακροφάγα, ώστε να αποφευχθεί η φλεγμονώδης αντίδραση στον παρακείμενο ιστό (Duprez και συν. 2009).

ι. Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι επάγεται ως απόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα ενδογενούς προέλευσης, όπως η απουσία αυξητικών παραγόντων, διάφορες τοξίνες, η υπερθερμία, η υποξία, το οξειδωτικό στρες, οι βλάβες του γενετικού υλικού κλπ. Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν τα μιτοχόνδρια και οι πρωτεΐνες τις οικογένειας Bcl-2.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, διατηρούν την ακεραιότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, δεσμεύοντας τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak και καταστέλλοντας τη δράση τους. Υπό συνθήκες στρες, οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 καταστέλλονται, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των Bax και Bak και τον ολιγομερισμό τους. Τα ολιγομερή δημιουργούν πόρους PTP (Permeability Transition Pores) στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, επιτρέποντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το κυτόχρωμα c δεσμεύει και ενεργοποιεί (με κατανάλωση ATP) τον παράγοντα Araf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) και την προ-κασπάση-9 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο, γνωστό ως «αποπτώσωμα» (Riedl & Salvesen 2007). Ακολούθως, η ενεργοποιημένη εναρκτήρια κασπάση-9 ενεργοποιεί, μέσω πρωτεόλυσης, τις κασπάσες τελεστές 3, 6 και 7. Εκτός από το κυτόχρωμα c, από τους μιτοχονδριακούς πόρους απελευθερώνονται και άλλες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και η Smac/Diablo. Η πρόσδεση της Smac/Diablo στην πρωτεΐνη XIAP, παρεμποδίζει την αρνητική της αλληλεπίδραση με τις κασπάσες-9, -3 και -7 (Duprez και συν. 2009).



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση (1) του εξωγενούς και (2) του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού. [προσαρμογή από (Durrze και συν. 2009)]

ii. Εξωγενές μονοπάτι

Το εξωγενές μονοπάτι κινητοποιείται ως απόκριση στην ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχών της οικογένειας των TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), όπως οι TNFR, Fas και TRAIL-R. Η σηματοδότηση καταρροϊκά αυτών των υποδοχών μπορεί να επάγει ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, μέχρι τον κυτταρικό θάνατο. Στην περίπτωση ενεργοποίησης των υποδοχών Fas και TRAIL-R, από τους προσδέτες FasL και TRAIL, η απόπτωση επάγεται μέσω συγκρότησης του συμπλόκου DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Στο σύμπλοκο αυτό, οι πρωτεΐνες FADD, που συνδέονται στον υποδοχέα, προσελκύουν τις κασπάσες-8 και -10, μέσω αλληλεπίδρασης των περιοχών DD (Death Domain) (Peter & Krammer 2003). Αντίθετα, η ενεργοποίηση του υποδοχέα TNFR1 από τον TNF, οδηγεί στη διαδοχική συγκρότηση δύο συμπλόκων (Wilson και συν. 2009). Το Σύμπλοκο I σχηματίζεται στο επίπεδο της μεμβράνης, από τον υποδοχέα TNFR1 και τις πρωτεΐνες TRADD

(TNFR-associated death domain), TRAF2, RIP1, cIAP1 και cIAP2. Οι πρωτεΐνες αυτές μεσολαβούν την – επαγόμενη από τον TNF – ενεργοποίηση του NFκB και των MAPK. Η ενδοκυττάρωση του TNFR1 ακολουθείται από τη συγκρότηση του Συμπλόκου II, το οποίο είναι ανάλογο του DISC και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες FADD, TRADD, καθώς και τις κασπάσες-8 ή/και -10. Η ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών-3, -6 και -7. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η κασπάση-8 επάγει, επίσης, την προ-αποπτωτική Bid, με αποτέλεσμα την παράλληλη ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μονοπατιού και την ενίσχυση του σήματος θανάτου (Li και συν. 1998).

Τόσο το ενδογενές, όσο και το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών, οι οποίες ρυθμίζουν τις καταβολικές αντιδράσεις, που προσδίδουν στα κύτταρα, τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (Slee και συν. 2001).

Η κασπάση-3 είναι η πλέον σημαντική και αποτελεί υπόστρωμα όλων των εναρκτήριων κασπασών. Μετά την ενεργοποίησή της, η κασπάση-3 πρωτεολύει τον αναστολέα ICAD, οδηγώντας στην αποδέσμευση της ενδονουκλεάσης CAD, που αποικοδομεί το χρωμοσωμικό DNA και επάγει τη συμπύκνωση της χρωματίνης (Sakahira και συν. 1998). Η κασπάση-3 επάγει, επίσης την αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τον σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων. Υπόστρωμα-κλειδί της κασπάσης-3 είναι η γελσολίνη, η οποία αποτελεί τον πυρήνα πολυμερισμού της ακτίνης και, παράλληλα, αλληλεπιδρά με την PIP2 γεφυρώνοντας την οργάνωση της ακτίνης με την κυτταρική σηματοδότηση. Συνεπώς, η πρωτεόλυση της γελσολίνης, διαταράσσει την οργάνωση του κυτταροσκελετού, τους μηχανισμούς μεταφοράς, την κυτταρική διαίρεση, αλλά και την μεταγωγή σήματος (Kothakota και συν. 1997).

Τελικό στάδιο της αποπτωτικής διαδικασίας είναι η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματίων. Η αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων και σωματίων από τα παρακείμενα μακροφάγα βασίζεται στην εξωτερίκευση μορίων φωσφατιδυλοσερίνης στη εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Άλλοι ειδικοί δείκτες, που ανιχνεύονται στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, είναι η αννεξίνη I και η καλρετικουλίνη. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγεται η φλεγμονώδης αντίδραση, καθώς τα αποπτωτικά σωματίδια απομακρύνονται πριν διαταραχθεί η συνεκτικότητα της μεμβράνης τους και απελευθερωθούν κυτταρικά συστατικά στην περιοχή (Fadok και συν. 2001).

3.2. ΝΕΚΡΩΣΗ

Η νέκρωση είναι μια τυχαία, μη ρυθμιζόμενη και μη προγραμματισμένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, που επάγεται, κατά κανόνα, ύστερα από πολύ έντονο στρες ή φυσική/μηχανική καταπόνηση των κυττάρων. Παραδείγματα παθολογικών καταστάσεων, που συνοδεύονται από νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, είναι τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, ενώ τα μορφολογικά της χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τη διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων, την απώλεια της συνεκτικότητας της πλασματικής μεμβράνης και, τέλος, την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στον περιβάλλοντα εξωκυττάριο χώρο. Επειδή τα νεκρωτικά κύτταρα δεν εκφράζουν ειδικούς δείκτες στην επιφάνειά τους, η διαδικασία της μακροπινοκυττάρωσης είναι σχετικά αργή και πραγματοποιείται, μόνο μετά τη ρήξη της μεμβράνης. Επιπλέον, η παθητική απελευθέρωση μορίων DAMP (Danger/damage-associated molecular pattern) επάγει προφλεγμονώδεις αποκρίσεις στην περιοχή, προκαλώντας βλάβες και στα γειτονικά κύτταρα (Duprez και συν. 2009). Η φλεγμονώδης απόκριση ενισχύεται περαιτέρω από την έκκριση κυτταροκινών (IL-6) από τα νεκρωτικά κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης του NFκB και των MAPK (Vanden Berghe και συν. 2006).

Ωστόσο, επαγωγή του νεκρωτικού θανάτου έχει παρατηρηθεί και παράλληλα με την απόπτωση ή σε περιπτώσεις δυσλειτουργίας των αποπτωτικών μηχανισμών (Vandenabeele και συν. 2006). Συνεπώς, η νέκρωση, λειτουργεί ενδεχομένως και ως δικλείδα ασφαλείας, για τις περιπτώσεις στις οποίες ένα κύτταρο αδυνατεί να ολοκληρώσει επιτυχώς την αποπτωτική διαδικασία.

3.3. ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Η αυτοφαγία είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο, προγραμματισμένο και πλήρως ελεγχόμενο καταβολικό μονοπάτι, που επιτρέπει στα ευκαρυωτικά κύτταρα να αποικοδομήσουν και να ανακυκλώσουν τα συστατικά τους. Πρωτεΐνες και οργανίδια, που προορίζονται προς αποικοδόμηση εγκλωβίζονται σε κυστίδια με διπλή λιπιδική μεμβράνη, γνωστά ως αυτοφαγοσώματα. Τα αυτοφαγοσώματα αποτελούν και το βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό της αυτοφαγίας. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα βασικά επίπεδα αυτοφαγίας, εξασφαλίζουν την ανακύκλωση των κυτταρικών συστατικών, ενώ, σε συνθήκες στρες, η αυτοφαγία διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο, απομακρύνοντας τα κατεστραμμένα οργανίδια

και τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, ώστε να διατηρηθεί η ενδοκυττάρια ομοιόσταση (Duprez και συν. 2009).

Αυτοφαγικά κυστίδια έχουν εντοπιστεί και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων, που πεθαίνουν, δημιουργώντας ερωτήματα σχετικά με τον πιθανό ρόλο της αυτοφαγίας στον κυτταρικό θάνατο. Η άποψη, που επικρατεί σήμερα είναι ότι η αυτοφαγία, περισσότερο συνοδεύει, παρά προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, η μαζική επαγωγή της, δεν αποκλείεται να αποβεί μοιραία για την τύχη του κυττάρου (Maiuri και συν. 2007, Scarlatti και συν. 2009).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως περιγράφηκε και στην Ενότητα της *Εισαγωγής*, η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι εμπλέκονται στις επιπτώσεις των ατμοσφαιρικών ρύπων στην υγεία, συνιστά ένα πολυδιάστατο και πολυπαραγοντικό πρόβλημα, που αποτελεί αντικείμενο έρευνας, για αρκετές δεκαετίες. Σήμερα, η πλειοψηφία των τοξικολογικών και επιδημιολογικών ερευνών έχει επικεντρωθεί κυρίως στη διερεύνηση του μικροσωματιδιακού κλάσματος της ρύπανσης, το οποίο θεωρείται και το πλέον επικίνδυνο. Λόγω των διαστάσεών τους, τα σωματίδια αυτά διεισδύουν και συσσωρεύονται στα βαθύτερα σημεία του αναπνευστικού συστήματος, ενώ ο υψηλός λόγος «επιφάνεια/μάζα», επιτρέπει την προσρόφηση και αλληλεπίδραση ποικίλων τοξικών ενώσεων στην επιφάνειά τους. Μεταξύ αυτών, τα βαρέα μέταλλα, οι πολυκυκλικές οργανικές ενώσεις, ανόργανα ιόντα και ποικίλα συστατικά βιογενούς προέλευσης, ενοχοποιούνται – κατά κανόνα – για την τοξική δράση των ρύπων. Εκτός, όμως, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των σωματιδιακών ρύπων, στον καθορισμό των επιπτώσεών τους στην υγεία υπεισέρχονται και επιπλέον παράγοντες, που αφορούν κυρίως στις συνθήκες έκθεσης (συγκέντρωση ρύπων, διάρκεια και συχνότητα επεισοδίων έκθεσης) και στην ατομική ευαισθησία (ηλικία, φυσική κατάσταση, παθολογικό υπόβαθρο). Το σύνολο των παραγόντων αυτών, καθιστούν τη μελέτη των επιπτώσεων της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, ένα μοναδικό τοξικολογικό πρόβλημα και ένα πεδίο έρευνας, που εξακολουθεί να παραμένει ανοιχτό, μέχρι σήμερα.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η καταγραφή των αποκρίσεων ενός μοντέλου επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (A549) παρουσία μικρο- και νανο-σωματιδιακών ρύπων, διαφορετικής σύνθεσης και πολυπλοκότητας, προκειμένου να εντοπιστούν πρώιμες αλλαγές στη φυσιολογία και τη σηματοδότηση των κυττάρων, που ενδέχεται να συμβάλλουν, μακροπρόθεσμα, στην ανάπτυξη παθολογικού φαινοτύπου. Οι αντιπροσωπευτικές κατηγορίες σωματιδιακών ρύπων, που μελετήθηκαν, ήταν οι εξής: α) ένα πολύπλοκο μικροσωματιδιακό μίγμα ($PM_{2,5-10}$), που συλλέχθηκε στους χώρους εργοστασίου, σε βιομηχανική περιοχή της Αθήνας, β) ένα πρότυπο μίγμα νανოსωματιδίων από εξατμίσεις μηχανών εσωτερικής καύσης (Diesel Exhaust Particles, DEP) και γ) ο κοινός οργανικός ρύπος, βενζο[α]πυρένιο (B[α]P). Το B[α]P, αν και δεν έχει σωματιδιακή φύση, επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικά οργανικά συστατικά των δύο προηγούμενων μιγμάτων, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των οργανικών ρύπων. Επιπλέον, εξετάστηκε η ενδεχόμενη τροποποίηση της δράσης του B[α]P, κατά το συνδυασμό του με τα

τεχνητά νανοσωματίδια, PLGA, τα οποία χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών.

Τα επιθηλιακά κύτταρα επιλέχθηκαν ως ο κύριος κυτταρικός τύπος του πνεύμονα, που έρχεται σε άμεση επαφή με τους εισπνεόμενους ρύπους. Παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα A549 προέρχονται από αδenoκαρκίνωμα, διατηρούν πολλά από τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II, του πνεύμονα, όπως είναι η έκκριση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επιπλέον, διαθέτουν λειτουργικά ένζυμα φάσης I, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταβολική ενεργοποίηση ξενοβιοτικών ενώσεων, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και άλλοι οργανικοί ρύποι. Συνεπώς, αποτελούν ένα αξιόπιστο και ευρέως διαδεδομένο πειραματικό μοντέλο, για *in vitro* τοξικολογικές μελέτες. Η ιστοειδικότητα των παρατηρούμενων αποκρίσεων διερευνήθηκε μέσω συγκριτικής μελέτης της ανθρώπινης επιθηλιακής κυτταρικής σειράς καρκινώματος δέρματος, A431. Παράλληλα, μελετήθηκε ο ρόλος των αντίστοιχων φυσιολογικών ινοβλαστών και εξετάστηκε η ενδεχόμενη τροποποίηση της απόκρισης των επιθηλιακών κυττάρων σε σύστημα συγκαλλιέργειάς τους, με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ινοβλάστες.

Μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων και των μεταγραφικών παραγόντων, που μελετήθηκαν, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην κινάση Akt και στον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α, οι οποίοι προωθούν την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, και οι δύο πρωτεΐνες θεωρούνται, τυπικοί καρκινικοί δείκτες, καθώς ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα στην πλειοψηφία των κακοηθειών. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α, ειδικότερα, μπορεί να τροποποιήσει σημαντικά τη φυσιολογία ενός κυττάρου, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό του και επάγοντας την αγγειογένεση στον περιβάλλοντα ιστό, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η κυτταρική επιβίωση, σε μη ευνοϊκές συνθήκες. Συνεπώς, είναι εύλογο να υποθέσουμε, ότι σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη μεταλλαξογόνο δράση ορισμένων συστατικών της ατμόσφαιρας, η επαγωγή του HIF-1α θα μπορούσε να συμβάλει καθοριστικά στην εξαλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου. Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που αφορούν στην απόκριση του HIF-1α παρουσία ατμοσφαιρικών ρύπων, είναι ιδιαίτερα περιορισμένα. Επιπλέον, η έκθεση στη σωματιδιακή ρύπανση έχει, συστηματικά, συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες, το οποίο – με τη σειρά του – μπορεί να επηρεάσει την ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου. Η αυστηρά ρυθμιζόμενη και άμεση κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου, ως απόκριση σε ποικίλα εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα, εμπλέκεται στην πλειοψηφία των σηματοδοτικών μονοπατιών και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο

στη ρύθμιση της λεπτής ισορροπίας μεταξύ επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου. Έτσι, σε μια προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης του μηχανισμού δράσης των οργανικών ρύπων, εξετάσθηκε, αφενός, η πιθανή εμπλοκή τους στη διατάραξη της ενδοκυττάριας ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου, και, αφετέρου, η ενδεχόμενη συμμετοχή αυτού του μηχανισμού στην απόκριση της κινάσης Akt.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

III. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ

Ο πνεύμονας είναι ένα όργανο ιδιαίτερα ευάλωτο στις επιπτώσεις της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, καθώς έρχεται σε άμεση επαφή με τους ρύπους, μέσω της εισπνοής. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα του πνεύμονα αποτελούν ένα κατάλληλο *in vitro* μοντέλο για τη διερεύνηση της δράσης των μικροσωματιδιακών συστατικών της ρύπανσης. Αν και οι πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων προσεγγίζουν περισσότερο τις *in vivo* συνθήκες, η απομόνωσή τους περιλαμβάνει μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, η οποία τελικά οδηγεί σε κύτταρα με περιορισμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και μικρό χρόνο ζωής *in vitro*. Στο πλαίσιο αυτό, στο μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε μια καλά χαρακτηρισμένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα, η οποία – αν και καρκινική – διατηρεί πολλές από τις ιδιότητες των αντίστοιχων φυσιολογικών κυττάρων και αποτελεί κλασικό κυτταρικό σύστημα για τοξικολογικές μελέτες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε και μια πρωτογενής καλλιέργεια φυσιολογικών ινοβλαστών από τον ίδιο ιστό, προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση και η τυχόν διαφορική απόκριση των δύο κυτταρικών τύπων. Η ιστοειδικότητα των αποκρίσεων ελέγχθηκε με παράλληλα πειράματα σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά επιδερμικού καρκινώματος και στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ινοβλάστες.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η κατηγορία των μικρο- και νανο-σωματιδίων χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ετερογένεια, με μοναδικό κοινό στοιχείο την αεροδυναμική τους διάμετρο. Συνεπώς, στο πλαίσιο μιας πιο ολοκληρωμένης προσέγγισης του θέματος, χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια διαφορετικής προέλευσης και σύστασης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν μίγματα μικροσωματιδιακών ρύπων της ατμόσφαιρας από την περιοχή της Αθήνας και ένα πρότυπο μίγμα νανοσωματιδίων από εξατμίσεις *diesel*. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μοριακός μηχανισμός που εμπλέκεται στις παρατηρούμενες αποκρίσεις, ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων επικεντρώθηκε στη δράση του βενζο[α]πυρενίου, ενός ιδιαίτερα κοινού οργανικού ρύπου (**Πίνακας 1**), που αποτελεί κοινό παρονομαστή των παραπάνω μιγμάτων. Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση του Β[α]Ρ σε συνδυασμό με τα τεχνητά νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA), τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα – με έγκριση του FDA – ως μεταφορείς φαρμακευτικών ουσιών.

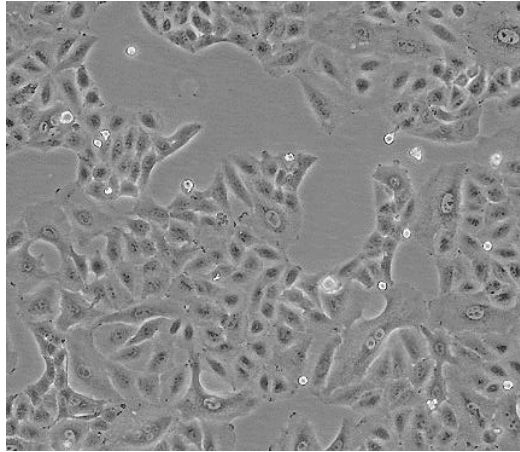
Πίνακας 1: Εκτίμηση της συγκέντρωσης του Β[α]Ρ στο περιβάλλον. [πηγή: (Perera 1981)]

Πηγή	Συγκέντρωση Β[α]Ρ
Νερό	
Πόσιμο	0,1-23,4 µg/m ³
Εδάφους	0,6-114 µg/m ³
Έδαφος	
Αγροτικές περιοχές	0-127 µg/kg
Αστικά κέντρα	0,939 µg/kg
Βιομηχανικές περιοχές	650,000 µg/kg
Τροφές	
Κρέας σχάρας	2,6-11,2 µg/kg
Λαχανικά	0,2-7,4 µg/kg
Καφές	0,1-4,0 µg/kg
Τσάι	3,9-21,3 µg/kg
Καπνός τσιγάρου	10-50 µg/100 τσιγάρα

2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

2.1. Η κυτταρική σειρά A549

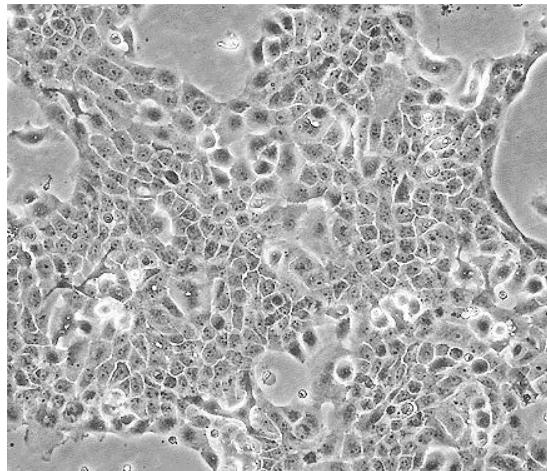
Η κυτταρική σειρά A549 είναι επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, τα οποία απομονώθηκαν το 1972 από έναν 58χρονο άνδρα της Καυκάσιας φυλής. Πρόκειται για κύτταρα που προσκολλώνται στο πλαστικό υλικό (πολυστυρένιο) των δοχείων καλλιέργειας, αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες και διαιρούνται περίπου ανά 22 ώρες (**Εικόνα 15**). Παρά την καρκινική τους φύση, διατηρούν πολλές από τις ιδιότητες των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων τύπου II, από τα οποία έχουν προέλθει. Έχουν δομή πλακώδους επιθηλίου και συνθέτουν πρωτεϊνικά και λιπιδικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα των κυψελίδων, τα οποία σχηματίζουν χαρακτηριστικά πεταλοειδή σωμάτια, στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, εκφράζουν λειτουργικά ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450, όπως το CYP1A1, τα οποία είναι απαραίτητα για τη μεταβολική ενεργοποίηση πολλών ρυπογόνων παραγόντων, της κατηγορίας των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων, με ένα υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, σε ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας, καθιστά τα A549 ένα χρήσιμο *in vitro* μοντέλο, κυρίως για τοξικολογικές μελέτες.



Εικόνα 15: Καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων αδenoκαρκινώματος πνεύμονα, A549.

2.2. Η κυτταρική σειρά A431

Η κυτταρική σειρά A431 αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα επιδερμικού καρκινώματος, που απομονώθηκαν το 1997 από μία γυναίκα, ηλικίας 85 ετών. Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στο δοχείο καλλιέργειας, αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες, και διαιρούνται περίπου ανά 24 ώρες (Εικόνα 16). Θεωρούνται ιδανικό *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου και των σηματοδοτικών μονοπατιών, που σχετίζονται με τον καρκίνο, καθώς υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Επιπλέον, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι μη λειτουργική, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητα σε μιτογόνα ερεθίσματα.



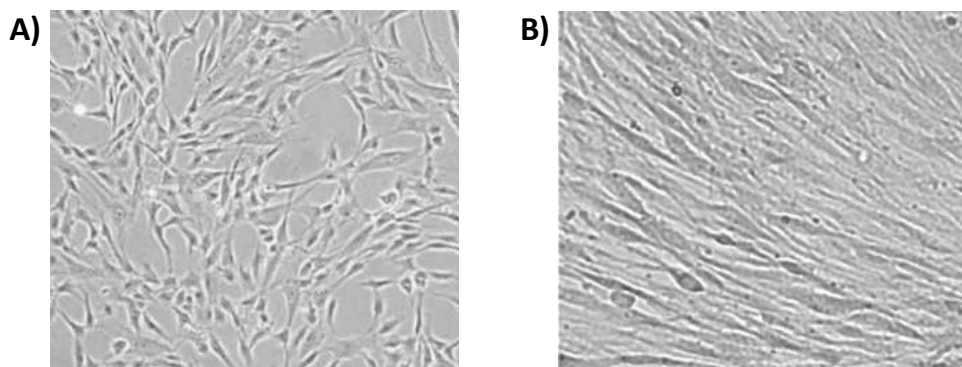
Εικόνα 16: Καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων επιδερμικού καρκινώματος, A431.

2.3. Πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα (distal lung fibroblasts, DLF) και δέρματος (human dermal fibroblasts, HDF) προέκυψαν από τμήματα φυσιολογικού ιστού ασθενών με καρκίνο, κατά τη διάρκεια χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου (**Εικόνα 17**). Σε κάθε περίπτωση η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ύστερα από συγκατάθεση και πλήρη ενημέρωση του ασθενούς. Τμήματα ιστών, που δεν απαιτούνταν για τη κλινική διάγνωση, τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, που περιείχε 10% (v/v) FBS (σε πάγο), και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο. Ως πηγή ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά φυσιολογικοί ιστοί (με βάση την ιστολογική εξέταση).

Η ενζυμική διαδικασία απομόνωσης των κυττάρων βασίστηκε σε αντίστοιχα πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας (Roth και συν. 1992, Uhal και συν. 1998). Εν συντομία, πραγματοποιήθηκε πέψη του ιστού με κολλαγενάση (0.5μg/ml) και DNAση (20μg/ml) σε ισότονο διάλυμα αλάτων HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution), παρουσία 0,5mM EDTA, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα και τα μικροσκοπικά τμήματα ιστού συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, εμπλουτισμένο με 10% FBS, και τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο καλλιέργειας. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων στο τρυβλίο καλλιέργειας, ακολούθησε απομάκρυνση τυχόν τμημάτων ιστού και αιωρούμενων κυττάρων με διάλυμα PBS. Οι ινοβλάστες παρέμειναν στο τρυβλίο, μέχρι να καλύψουν την επιφάνειά του. Ακολούθησαν τουλάχιστον τρεις ανακαλλιέργειες (αραίωση 1:2), προκειμένου τα κύτταρα να χρησιμοποιηθούν σε κάποιο πείραμα. Τα πειράματα της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν με ινοβλάστες γενιάς 5-10.

Το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε και για την απομόνωση και καλλιέργεια φυσιολογικών ινοβλαστών από πνεύμονες υγιών αρουραίων αρσενικού φύλου.



Εικόνα 17: Πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών A) δέρματος (HDF) και B) πνεύμονα (DLF).

3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα κοινά χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, USA), AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany) και Merck (Darmstadt, Germany).

Το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006) για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, καθώς και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς αγοράστηκαν από την εταιρεία Bio-Rad (Munich, Germany). Το μίγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες (#MWP02) ήταν της εταιρείας Nippon Genetics (Dueren, Germany), ενώ το αντίστοιχο μίγμα για το DNA (#N0468G) και για τα προϊόντα PCR (#N0467G) ήταν της εταιρείας New England Biolabs (Ipswich, England).

Η νιτροκυτταρίνη [porablot NCP (0.45 μ m)], που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών αγοράστηκε από την Macherey-Nagel (Dueren, Germany).

Η ομάδα αντιδραστηρίων ECL (ECL kit, #RPN2135), που χρησιμοποιήθηκε για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, προμηθεύτηκε από την Amersham International (Uppsala, Sweden) και το X-Ray φιλμ, 100 NIF, 18x24 cm, από την εταιρεία Fuji Medical (Tokyo, Japan).

Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ❖ **Akt:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει τα ολικά επίπεδα των κινασών Akt1, Akt2 και Akt3 (#9272, Cell Signalling Technology).
- ❖ **phospho-Akt:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης Akt, στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη 473 (#9271, Cell Signalling Technology).
- ❖ **HIF-1 α :** μονοκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε ποντίκι και αναγνωρίζει την περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 610-727 προς το καρβοξυτελικό άκρο της ενδογενούς πρωτεΐνης (#610959, BD Transduction Laboratories).
- ❖ **phospho-NF- κ B p65:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της υπομονάδας p65 του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη 536 (#3031, Cell Signalling Technology).
- ❖ **NrF2:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει μια περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του μεταγραφικού παράγοντα NrF-2 (#4399, Cell Signalling Technology).

- ❖ **HO-1:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 184-288 στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης ενδογενούς πρωτεΐνης (sc-10789, Santa Cruz Biotechnology)
- ❖ **GLUT1:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει την περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 218-260 της ανθρώπινης ενδογενούς πρωτεΐνης (sc-7903, Santa Cruz Biotechnology)
- ❖ **phospho-p38 MAPK:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης p38, στα αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνη 180 ή/και τυροσίνη 182 (#9211, Cell Signaling Technology, Beverly).
- ❖ **Phospho-p44/42 MAPK (ERKs):** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης p38, στα αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνη 202 και τυροσίνη 204 (#9102, Cell Signaling Technology, Beverly).
- ❖ **ακτίνη:** πολυκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε κουνέλι και αναγνωρίζει μια περιοχή του αμινοτελικού άκρου της ακτίνης (#A2103, Sigma-Aldrich).
- ❖ **H3:** μονοκλωνικό αντίσωμα, που παράγεται σε ποντίκι και αναγνωρίζει μια περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης ιστόνης H3 (#5192, Cell Signalling Technology).
- ❖ **Anti-rabbit IgG-HRP conjugated:** αντίσωμα που παράγεται σε αίγα έναντι της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G του κουνελιού, συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (#AP132P, Millipore).
- ❖ **Anti-mouse IgG-HRP conjugated:** αντίσωμα που παράγεται σε αίγα της Fc περιοχής των ανοσοσφαιρινών τάξης G του ποντικού, συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (#P0447, DAKO A/S).

Για την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της κινάσης PI3K, wortmannin (#W1628, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Η RNάση (#A3832) και η πρωτεϊνάση K (#A3830), που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία απομόνωσης του γενωμικού DNA, αγοράστηκαν από την AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany).

Ο χηλικός παράγοντας FURA-2 AM (#344905), που χρησιμοποιήθηκε για τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, ήταν της εταιρείας Calbiochem, San Diego, CA, USA.

Το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, #E15-843), ο ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, #A15-043), τα αντιβιοτικά πενικιλίνη

και στρεπτομυκίνη (#P11-010) και το διάλυμα θρυψίνης-EDTA (#L11-003) που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες, αγοράστηκαν από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria).

4. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΙΚΡΟ- ΚΑΙ NANO-ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

4.1. Τεχνητά νανοσωματίδια PLGA

Τα νανοσωματίδια PLGA, είναι τεχνητά βιοδιασπώμενα συμπολυμερή, πολυ(γαλακτικού-γλυκολικού) οξέος (PLGA). Το υδατικό εναιώρημα νανοσωματιδίων, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή αγοράστηκε από την εταιρεία AdvanCell (Santiago de Compostela, Spain).

4.2. Αστικοί μικροσωματιδιακοί ρύποι (PM)

Η συλλογή των αστικών μικροσωματιδιακών ρύπων πραγματοποιήθηκε στους χώρους εργοστασίου απορρυπαντικών στην περιοχή της Αθήνας, από την ερευνητική ομάδα του κ. Κ. Ελευθεριάδη (Εργαστήριο Ραδιενέργειας Περιβάλλοντος, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»). Για τη συλλογή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κατηγορίες συστημάτων άντλησης αέρα. Στην πρώτη περίπτωση, ένα φίλτρο πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE ή Teflon), στο εσωτερικό της συσκευής, συγκρατούσε το σύνολο των σωματιδίων με αεροδυναμική διάμετρο $\leq 10\mu\text{M}$, ενώ στη δεύτερη περίπτωση διαδοχικά φίλτρα, με πόρους διαφορετικής διαμέτρου, συγκρατούσαν μικροσωματίδια συγκεκριμένου μεγέθους. Σε κάθε περίπτωση, η διάμετρος των σωματιδίων δεν ξεπερνούσε τα $10\mu\text{M}$. Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής, κάθε φίλτρο κόπηκε σε δύο ίσα τμήματα, προκειμένου να γίνει διαφορική εκχύλιση του ανόργανου και οργανικού φορτίου. Τα οργανικά συστατικά εκχυλίστηκαν με ανακίνηση του φίλτρου σε απιονισμένο νερό για 72 ώρες, ενώ για το οργανικά συστατικά χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης διχλωρομεθάνιο (DCM). Ακολούθησε εξάτμιση του νερού σε ξηραντήρα, υπό συνθήκες κενού (Speedvac, ThermoScientific, Holbrook, NY), ενώ το DCM απομακρύνθηκε με ήπιο ρεύμα αέριου αζώτου. Τέλος, προσδιορίστηκε το καθαρό βάρος των σωματιδίων, τα οποία επαναιωρήθηκαν σε απιονισμένο νερό (ανόργανο κλάσμα) και DMSO (οργανικό κλάσμα) σε τελική συγκέντρωση $25\mu\text{g/ml}$. Ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων, τα δύο κλάσματα χρησιμοποιήθηκαν είτε μεμονωμένα, είτε σε αναλογία 1:1.

4.3. Μίγμα νανοσωματιδίων *diesel* (DEP)

Το μίγμα νανοσωματιδίων DEP, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας διατριβής, προέκυψε ύστερα από κατάλληλη εκχύλιση ενός μίγματος νανοσωματιδίων γνωστής σύνθεσης (Standard Reference Material 2975, SRM2975), το οποίο συλλέγεται, σε μορφή σκόνης, από εξατμίσεις ανυψωτικών μηχανημάτων, και διατίθεται από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Προτύπων (National Institute of Standards and Technology, NIST) των ΗΠΑ. Η διαδικασία εκχύλισης βασίστηκε σε ανάλογα πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας, με μικρές τροποποιήσεις (Danielsen και συν. 2009, Shi και συν. 2009). Συγκεκριμένα, 500mg σκόνης προστέθηκαν σε 100ml ακετόνης και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπερήχων, για 1 ώρα, προκειμένου να διασπαστούν οποιαδήποτε συσσωματώματα. Στη συνέχεια, ένα μέρος του οργανικού διαλύτη (~60ml) εξατμίστηκε με τη βοήθεια ήπιου ρεύματος αζώτου και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές/λεπτό, για 30 λεπτά. Ακολούθησε συλλογή του υπερκειμένου της φυγοκέντρησης, διήθησή του μέσω φίλτρου και πλήρης εξατμίστη της ακετόνης με αέριο άζωτο. Το ίζημα, που προέκυψε, ζυγίστηκε και διαλύθηκε με DMSO, σε τελική συγκέντρωση 50mg/ml. Πριν τη προσθήκη των DEP στην κυτταροκαλλιέργεια, απαιτείται ισχυρή ανάδευση (vortex) του εκχυλίσματος για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα, ώστε να αποφευχθεί, κατά το δυνατό, η συσσωμάτωση των υπέρλεπτων σωματιδίων.

Με βάση την πιστοποιημένη χημική ανάλυση του μίγματος, όπως αυτή παρέχεται από το NIST, η συγκέντρωση του B[α]P σε αυτό είναι $52.2 \pm 5.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ SRM2975. Στο σύνολο των πειραμάτων, που αφορούν στην επίδραση των νανοσωματιδίων DEP, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα, από το ίδιο μίγμα SRM2975.

4.4. Βενζο[α]πυρένιο (B[α]P)

Ο πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας, βενζο[α]πυρένιο (B[α]P), αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (B1760). Για τα πειράματα παρασκευάστηκε διάλυμα σε DMSO με τελική συγκέντρωση 20mM, το οποίο διατηρήθηκε στους -20°C , προστατευμένο από το φως και για χρονικό διάστημα, όχι μεγαλύτερο του ενός μήνα. Προκειμένου η συγκέντρωση του DMSO στα κύτταρα να μην ξεπεράσει το 0,1% (v/v), οι απαραίτητες περαιτέρω αραιώσεις έγιναν με θρεπτικό υλικό DMEM, λίγα μόλις λεπτά πριν από κάθε πείραμα.

5. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

5.1. Διατήρηση στειρών συνθηκών

Για τη διατήρηση σταθερών κυτταρικών σειρών απαιτούνται αυστηρά στείρες συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της αποστείρωσης, η οποία πραγματοποιείται με: α) υγρή θερμότητα-αυτόκαυστο (για διαλύματα αλάτων, ανθεκτικά πλαστικά αναλώσιμα, γυάλινα αναλώσιμα και νερό), β) διήθηση με τη χρήση ηθμού, με πόρους διαμέτρου 0,2μm και γ) αποστείρωση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (για πλαστικά αναλώσιμα και χώρους). Η υγρή αποστείρωση, πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο, στους 121°C για 20 λεπτά, υπό πίεση 1,1kr/cm². Στις συνθήκες αυτές επιτυγχάνεται η νέκρωση των περισσότερων μικροοργανισμών και των σπορίων τους, κυρίως λόγω αποδιάταξης των πρωτεϊνών τους. Για την αποστείρωση διαλυμάτων, που είναι ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες, γίνεται διήθηση μέσα από πόρους 0,2μm (συνά με τη βοήθεια σύριγγας), η οποία αποτρέπει τη διέλευση βακτηρίων και των περισσότερων σπορίων τους. Με τη χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας, επιτυγχάνεται θάνατος των κυττάρων, λόγω καταστροφής του DNA τους, καθώς δημιουργούνται δεσμοί μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (συχνότερα μεταξύ δύο μορίων θυμίνης), που παρεμποδίζουν το σωστό διπλασιασμό του μακρομορίου, κατά την κυτταρική διαίρεση. Το δραστικότερο μήκος κύματος είναι τα 260nm, στο οποίο παρατηρείται το μέγιστο απορρόφησης από το DNA. Με αυτό τον τρόπο αποστειρώνονται αντικείμενα και επιφάνειες, που μπορούν να εκτεθούν άμεσα στο υπεριώδες φως, δηλαδή όταν δεν καλύπτονται από στερεά υλικά (όπως γυαλί ή πλαστικό).

Η πλειοψηφία των διαλυμάτων, που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες, αγοράζονται αποστειρωμένα από την εκάστοτε εταιρεία. Ωστόσο, όσα απαιτείται να διαχωριστούν σε μικρότερα κλάσματα, (π.χ. θρυψίνη, αντιβιοτικά), διηθούνται, πριν τη χρήση τους, προς αποφυγή μόλυνσεων. Τα διαλύματα που παρασκευάζονται στο εργαστήριο και είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες (όπως το ρυθμιστικό διάλυμα PBS) αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο. Ο ορός (FBS) θερμαίνεται στους 56°C για 30 λεπτά (απενεργοποίηση συστατικών του συμπληρώματος), διηθείται και μοιράζεται σε ίσα κλάσματα. Όλες οι διαδικασίες, που αφορούν στις κυτταροκαλλιέργειες, εκτελούνται σε θάλαμο νηματικής ροής (hood), όπου ο αέρας αποστειρώνεται με διήθηση από φίλτρα υψηλής απόδοσης, εξασφαλίζοντας ένα περιβάλλον απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Σε καθημερινή βάση, πριν από την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών, ο χώρος εκτίθεται σε υπεριώδη

ακτινοβολία για 15-20 λεπτά, ενώ για την τοπική αποστείρωση περιορισμένου χώρου, χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης 70%.

5.2. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Ο κλίβανος καθαρίζεται συστηματικά ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ένα ειδικό δοχείο με αποστειρωμένο νερό στο εσωτερικό του κλιβάνου διατηρεί τις απαιτούμενες συνθήκες υγρασίας.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες της παρούσας διατριβής, ήταν το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), το οποίο διατηρείται στους 4°C. Κάθε φιάλη, που αγοράζεται από την εταιρεία, περιέχει 4,5g/l D-γλυκόζη, 0.11g/l πυροσταφυλικό νάτριο, ερυθρό της φαινόλης (ως δείκτη pH), αμινοξέα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα (265mg/l CaCl₂, 400mg/l KCl, 6400mg/l NaCl, 3700mg/l NaHCO₃, 141mg/l NaH₂PO₄, 98mg/l MgSO₄). Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού διαλύματος DMEM, προστίθενται επίσης ορός εμβρύου βοός (FBS) 10% (v/v) και μίγμα αντιβιοτικών, 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη.

Τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 100mm (Greiner bio-one, Cellstar®), με ανανέωση του θρεπτικού υλικού δύο ή τρεις φορές την εβδομάδα.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, όταν η κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου φτάσει περίπου το 80%, είναι απαραίτητη, προκειμένου να διατηρηθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο καλλιέργειας και ακολουθεί έκπλυση με PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM NaHPO₄, 1,7mM KH₂PO₄, pH 7,4) για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA [0,05%-0,02% (w/v) σε PBS] και επώαση των κυττάρων στους 37°C, για λίγα λεπτά, έως ότου αποκολληθούν από το υπόστρωμα. Η ενζυμική αντίδραση της θρυψίνης τερματίζεται με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού. Το εναιώρημα των κυττάρων, που προκύπτει, διαμοιράζεται σε νέα τρυβλία καλλιέργειας.

5.3. Κατάψυξη και ανάκτηση των κυττάρων

Τα κύτταρα A549, ως καρκινικά, μπορούν – σε θεωρητικό επίπεδο – να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον σε ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας. Ωστόσο, ενδείκνυται η χρήση κυττάρων νεαρής γενιάς (περιορισμένος αριθμός

ανακαλλιέργειών). Αυτό προϋποθέτει να υπάρχουν πάντα διαθέσιμα κύτταρα μικρής γενιάς σε ψύξη.

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο υγρό άζωτο, σε θερμοκρασία -196°C , μειώνοντας τον μεταβολισμό τους στο ελάχιστο. Η διαδικασία της προετοιμασίας των κυττάρων για ψύξη, περιλαμβάνει αποκόλλησή τους από την επιφάνεια του τρυβλίου (βλ. 5.2.), επαναιώρηση σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκέντρηση (1200 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά). Το ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο ειδικού διαλύματος κατάψυξης, «*freezing buffer*» [90% (v/v) FBS και 10% (v/v) DMSO], έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι περίπου 5×10^6 κύτταρα/ml. Το DMSO δρα ως κρυσταλλοπροστατευτικό ελαττώνοντας το σημείο τήξης του διαλύματος (Ausubel 1991, Freshney 1993, Spector 1998). Το κυτταρικό εναιώρημα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικά πλαστικά αποστειρωμένα φιαλίδια (*cryovials*), στα οποία αναγράφεται το όνομα της κυτταρικής σειράς και η ημερομηνία κατάψυξής τους. Τα *cryovials* μεταφέρονται διαδοχικά στον πάγο για 10 λεπτά, στους -20°C για 1-2 ώρες, στους -80°C για 16 ώρες και, τέλος, σε ειδικό δοχείο, που περιέχει υγρό άζωτο. Η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας είναι ζωτικής σημασίας για την αποφυγή της απώλειας μεγάλου αριθμού κυττάρων, λόγω της δημιουργίας κρυστάλλων, και της καταστροφής μεμβρανών και οργανιδίων, από την αλλαγή του pH και της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών κατά την κατάψυξη.

Σε αντίθεση με την διαδικασία κατάψυξης, στην απόψυξη των κυττάρων απαιτείται ταχεία μετάβαση από την εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία του υγρού αζώτου, στην ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή τους 37°C . Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγεται – κατά το δυνατόν – ο τραυματισμός των κυττάρων από την απόψυξη των κρυστάλλων, που σχηματίζονται, καθώς τα κύτταρα παγώνουν. Συγκεκριμένα, το *cryovial* μεταφέρεται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C , και, στη συνέχεια, στο κυτταρικό εναιώρημα αραιώνεται με πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρείται (1200 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά). Με τη φυγοκέντρηση επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του DMSO, το οποίο σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό στις συνθήκες καλλιέργειας. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό θερμοκρασίας 37°C , τοποθετούνται σε τρυβλίο καλλιέργειας και επωάζονται στον ειδικό κλίβανο, όπου προσκολλώνται σταδιακά στο υπόστρωμα.

6. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

6.1. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (MTT)

Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann, το 1983 (Mosmann 1983). Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του MTT στα λειτουργικά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, προς σχηματισμό ενός έγχρωμου προϊόντος φορμαζανίου. Συγκεκριμένα, μόνο τα ζωντανά κύτταρα προσροφούν και μεταβολίζουν τη χρωστική, με αποτέλεσμα να βάφονται κυανά, ενώ τα νεκρά κύτταρα παραμένουν άχρωμα. Πρόκειται για μια απλή, οικονομική και ταχεία μέθοδο, που δεν απαιτεί μεγάλο αριθμό κυττάρων ανά δείγμα και παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης σε πολλά δείγματα. Τα κύτταρα διαμοιράζονται σε μια πλάκα καλλιέργειας 96 θέσεων με πυκνότητα 10^4 κύτταρα/φρεάτιο και αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. Στη συνέχεια, επώάζονται παρουσία ή απουσία των διαφόρων υπό μελέτη χημικών παραγόντων, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ενώ 4 ώρες πριν το τέλος της επώασης προστίθενται 20μl διαλύματος MTT (2,5mg/ml MTT σε PBS) σε κάθε θέση. Μετά το πέρας της επώασης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα ζωντανά κύτταρα, που παραμένουν προσκολλημένα στο υπόστρωμα λύνονται με 100μl διαλύματος HCl 0,1N σε άνυδρη ισοπροπανόλη. Η πλάκα ανακινείται για περίπου 30 λεπτά, ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου και το υγρό στα φρεάτια να αποκτήσει ομοιογενές χρώμα. Ακολουθεί καταγραφή της οπτικής πυκνότητας σε μετρητή ELISA (DENLEY, West Sussex, UK), σε μήκος κύματος 545nm. Συγκρίνοντας την οπτική πυκνότητα των φρεατίων που εκτέθηκαν στον εκάστοτε παράγοντα με τα φρεάτια-μάρτυρες, υπολογίζεται το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων σε κάθε συνθήκη. Πρέπει να σημειωθεί, ότι με τη μέθοδο αυτή δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ νεκρωτικού και αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

6.2. Μέθοδος ανίχνευσης θραυσμάτων DNA (DNA laddering)

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του αποπτωτικού θανάτου, που αποτελεί και ένα δείκτη διάκρισης μεταξύ νέκρωσης και απόπτωσης, είναι ο κατακερματισμός του DNA σε θραύσματα μεγέθους πολλαπλάσιου των 180 ζευγών βάσεων (bp). Κατά την ηλεκτροφόρηση του γενωμικού DNA, σε πήκτωμα αγαρόζης, τα διαφορετικού μήκους τμήματα του DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους (Helling και συν. 1974). Στη συνέχεια, η παρατήρηση των θραυσμάτων είναι δυνατή με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά, μεταξύ των

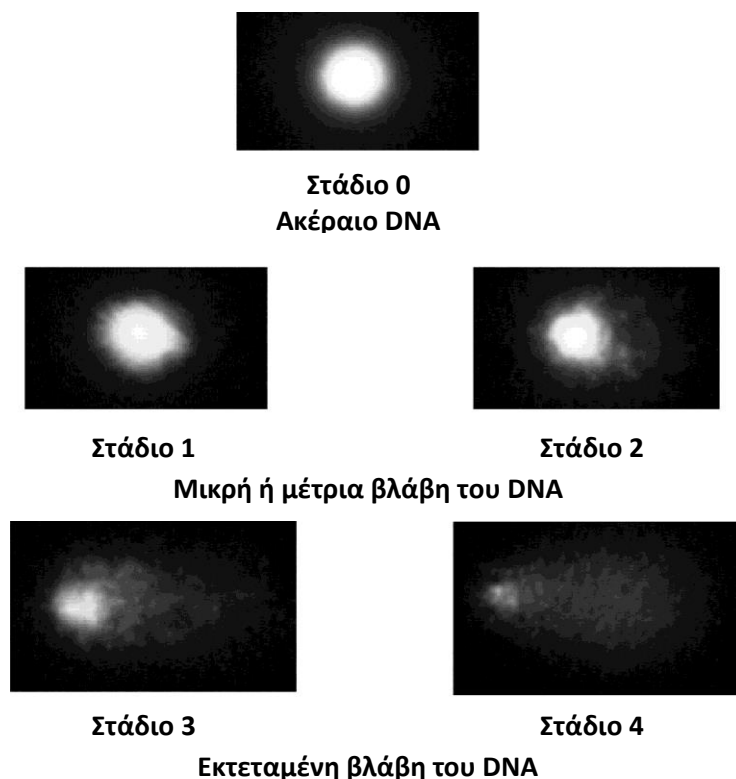
ζευγών βάσεων A-T (Sharp και συν. 1973). Στις περιπτώσεις όπου έχει ενεργοποιηθεί η αποπτωτική διαδικασία, το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του DNA αποκτά μια χαρακτηριστική μορφή σκάλας (*ladder*).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παραπάνω τεχνική, απαιτείται σε πρώτη φάση η απομόνωση του ολικού DNA των κυττάρων. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε στην Ενότητα 4.2., με μια μικρή τροποποίηση. Επειδή ένα ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων χάνει την ικανότητα προσκόλλησης στο υπόστρωμα καλλιέργειας, προκειμένου να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα του δείγματος, το αρχικό θρεπτικό υλικό (που περιέχει τυχόν αιωρούμενα κύτταρα) συλλέγεται και χρησιμοποιείται κατά την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3200 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά, 4°C) και 2 διαδοχικές εκπλύσεις με PBS στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε διάλυμα επαναιώρησης (*suspension buffer*: 100mM Tris/HCl pH 8.0, 200mM NaCl, 10mM EDTA) και τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος πέψης (*digestion buffer*: 100mM Tris/HCl pH 8.0, 200mM NaCl, 10mM EDTA, 0.4% (w/v) SDS, 100μg/δείγμα πρωτεΐνωση K). Ο όγκος του διαλύματος εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων (ενδεικτικά, για κύτταρα που προέρχονται από ένα τρυβλίο καλλιέργειας διαμέτρου 100mm, απαιτούνται 300μl διαλύματος). Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά και επωάζονται στους 55°C για 16 ώρες. Μετά την επαναφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί απομόνωση του γενωμικού DNA με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου. Οι οργανικοί διαλύτες συμβάλουν στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από την υδατική φάση, ενώ η διαδικασία είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί διαλύτες (Sambrook 1989). Στο σωλήνα προστίθενται 600μl διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου 1:1 (v/v) και το περιεχόμενο αναδεύεται, έως ότου σχηματιστεί γαλάκτωμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (14000 στροφές/λεπτό, 20 λεπτά, 4°C), μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα, προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Στην υδατική φάση της δεύτερης φυγοκέντρησης προστίθεται RNάση σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml. Το DNA κατακρημνίζεται με 100% αιθανόλη θερμοκρασίας 0°C. Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα προστίθεται διπλάσιος όγκος παγωμένης αιθανόλης, τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 30-60 λεπτά και, κατόπιν, φυγοκεντρώνται (12000 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά, 4°C). Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου και την εξάτμιση της αιθανόλης, ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό.

7. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

7.1. Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων (δοκιμασία comet)

Η δοκιμασία comet (comet assay) περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πήκτωμα αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE) και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1984, από τους Ostling & Johanson, με σκοπό την άμεση απεικόνιση βλαβών του γενετικού υλικού. (Ostling & Johanson 1984) Συνοπτικά, μεμονωμένα κύτταρα, ενσωματώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, λύνονται, ακολουθεί χαλάρωση και αποδιάταξη του DNA, ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH, και χρώση του. Το κατακερματισμένο DNA εμφανίζει αυξημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σύγκριση με το ακέραιο, με αποτέλεσμα να δημιουργείται, το χαρακτηριστικό σχήμα του “κομήτη” (**Εικόνα 18**). Το μέγεθος της ουράς και το ποσοστό του DNA, που μετατοπίζεται σε αυτήν, είναι ανάλογα της έκτασης της βλάβης.



Εικόνα 18: Διαδοχικά στάδια βλάβης του DNA, όπως αυτά απεικονίζονται κατά τη δοκιμασία comet. (προσαρμογή από Waters και συν.,2007(Waters και συν. 2007))

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Μετά την επώαση με τον επιθυμητό παράγοντα/συνθήκη, τα κύτταρα αποκολλώνται από το υπόστρωμα και μετά την έκπλυσή τους με PBS, επαναιωρούνται στο ίδιο διάλυμα σε πυκνότητα 500.000 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, 50μl κυτταρικού εναιωρήματος αναμιγνύονται με 50μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Point, LMP) 1,5% και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, καλυμμένη με λεπτή στρώση αγαρόζης, φυσιολογικού σημείου τήξεως (Normal Melting Point, NMP) 1%, σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλάκα εμβαπτίζεται σε διάλυμα λύσης (2,5M NaCl, 0,1M EDTA, 10mM Tris και 1% Triton-X100), με pH 10, και επωάζεται στους 4°C για 1 ώρα. Όλη η διαδικασία, από το στάδιο της λύσης, μέχρι και το στάδιο της παρατήρησης των κομητών, διεξάγεται στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της λύσης, τα δείγματα ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και τοποθετούνται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει αλκαλικό διάλυμα (0,3M NaOH και 1mM EDTA) με pH>12, στους 4°C. Οι αντικειμενοφόροι παραμένουν στο διάλυμα αυτό, για 15-20 λεπτά, έτσι ώστε να εξισορροπηθεί το πήκτωμα αγαρόζης στις αλκαλικές συνθήκες. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 25V για 30-45 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα επανέρχονται σε ουδέτερο pH με δύο επώσεις των 10 λεπτών σε PBS, pH7,4. Η χρώση του DNA, σε κάθε δείγμα, έγινε με 15λ διαλύματος χρωστικής DAPI (5μg/ml). Για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, απαιτείται η παρατήρηση τουλάχιστον 100 πυρήνων/δείγμα σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές ανίχνευσης βλαβών του DNA, η δοκιμασία comet υπερέχει, διότι χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, σύντομο και σχετικά εύκολο πρωτόκολλο και απαιτεί μικρό αριθμό κυττάρων.

7.2. Ανίχνευση προϊόντων προσθήκης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής, η μεταλλαξογόνος δράση του B[α]P και, γενικότερα, των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, αποδίδεται στην ιδιότητα των ηλεκτρονιόφιλων μεταβολιτών τους να προσδένονται ομοιοπολικά σε πουρινικά κατάλοιπα (κυρίως γουανίνη) δημιουργώντας προϊόντα προσθήκης (*DNA adducts*). Για την ανίχνευση αυτών των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική, που επιτρέπει την ανίχνευση συμπλόκων με διαφορετικές χημικές δομές και, συνεπώς, ενδείκνυται για τη μελέτη της επίδρασης πολύπλοκων μιγμάτων, όπως ο καπνός του

τσιγάρου και οι περιβαλλοντικοί ρύποι. Συνοπτικά, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας περιλαμβάνει 4 στάδια: 1) ενζυμική πέψη απομονωμένου DNA, 2) εμπλουτισμό του δείγματος με προϊόντα προσθήκης, με τη δράση της νουκλεάσης P1, 3) σήμανση του 5'-άκρου με ραδιενεργό φωσφόρο (^{32}P) από το ένζυμο πολυνουκλεοτιδική κινάση και 4) χρωματογραφικό διαχωρισμό και ανίχνευση των προϊόντων προσθήκης. Το μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι δεν παρέχει πληροφορίες για τη δομή των συμπλόκων, που ανιχνεύονται (Phillips και συν. 2000).

Η απομόνωση του DNA, βασίστηκε στο πρωτόκολλο, που προαναφέρθηκε (βλ. 6.2.). 10μg DNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκαν σε ενζυμική πέψη με 0,04U/ml μικροκοκκική νουκλεάση και 0,4μg/ml φωσφοδιεστεράση σε pH 6,0, στους 37°C, για περίπου 3,5 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, έγινε επεξεργασία των απομονωμένων νουκλεοτιδίων με 0,6μg/ml νουκλεάση P1, για 40 λεπτά, και σήμανσή τους με προσθήκη 4000Ci/mmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ και 0,5U/ml T4 νουκλεοτιδικής κινάσης σε pH 9,5, στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σημασμένα νουκλεοτίδια διαχωρίστηκαν με TLC τριών διαστάσεων. Οι διαλύτες, που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε διάσταση ήταν οι εξής: α) 1^η διάσταση: 1M NaH_2PO_4 , β) 2^η διάσταση (περιστροφή κατά 180°): 3,6M φορμικό λίθιο και 8,5M ουρία, γ) 3^η διάσταση (περιστροφή κατά 90°): 0,8M LiCl , 0,5M Tris-HCl και 8,5M ουρία. Ακολούθησε έκθεση των φύλλων χρωματογραφίας σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, για 16 ώρες, στους -80°C. Οι κηλίδες των δειγμάτων που είχαν επωαστεί με $\text{B}[\alpha]\text{P}$, συγκρίθηκαν με τις κηλίδες στα δείγματα-μάρτυρες, προκειμένου να εντοπιστούν τα προϊόντα προσθήκης.

8. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Για τη μέτρηση του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φθορισμομετρίας, όπως έχει περιγραφεί από τον Fasolato και συνεργάτες (Fasolato και συν. 1991), με μικρές τροποποιήσεις ώστε να προσαρμοστεί στο σύστημα των κυττάρων A549. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της χρωστικής Fura-2 σε ζωντανά κύτταρα με τη χρήση ειδικού φθορισμόμετρου και κατάλληλου λογισμικού σε έναν συνδεδεμένο ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το μόριο Fura-2 είναι δείκτης φθορισμού με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία για τα ιόντα Ca^{2+} και χορηγείται στα κύτταρα με τη μορφή του ακετυλομεθυλεστέρα, Fura-2/AM (Grynkiewicz και συν. 1985). Όταν τα μόρια της χρωστικής διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη, οι ομάδες ακετυλομεθυλεστέρα αποκόπτονται ενζυμικά από εστεράσες του κυττάρου, με αποτέλεσμα

την παγίδευση της χρωστικής στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτή τη μορφή, η Fura-2 παρουσιάζει ένα μέγιστο εκπομπής στα 510nm και δύο μέγιστα διέγερσης, ένα στα 340nm (το οποίο αυξάνεται με την αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$) και ένα στα 380nm (το οποίο μειώνεται με την αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$). Ο υπολογισμός της $[Ca^{2+}]_i$ σε κάθε περίπτωση βασίζεται στο λόγο των τιμών φθορισμού 340nm/380nm. Η μέθοδος επιτρέπει, τόσο την μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα ή στις ενδοκυττάρια αποθήκες, όσο και την παρακολούθηση της κινητοποίησής τους, σε πραγματικό χρόνο, με εξωγενή χορήγηση χημικών παραγόντων, που διαταράσσουν – με ελεγχόμενο τρόπο – την ομοιόσταση των ιόντων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τα κύτταρα A549 είναι η εξής: Μετά το τέλος της επώασης με τον εκάστοτε επιθυμητό παράγοντα, τα κύτταρα αποκολλώνται και επαναιωρούνται στο ίδιο θρεπτικό υλικό, στο οποίο έγινε η επώαση, για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με 2 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1500 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου) με το ισότονο διάλυμα KRH (25mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM $MgSO_4$, 1,2mM KH_2PO_4 , 25mM HEPES/NaOH pH 7,4, 2mM $CaCl_2$, 6mM γλυκόζη). Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε KRH, στο οποίο έχει προστεθεί ο δείκτης Fura-2/AM σε τελική συγκέντρωση 2,5μM, καθώς και 50μM DTPA (*diethylenetriaminepentanoic acid*), το οποίο αυξάνει τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης. Τα κύτταρα επωάζονται στο διάλυμα αυτό για 30 λεπτά, στους 37°C, ώστε ο φθορίζων δείκτης να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του Fura-2/AM με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλο όγκο KRH, ώστε το τελικό εναιώρημα να περιέχει περίπου 600.000 κύτταρα/ml. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 200μM σουλφινοπιραζόνης (sulfipirazole), η οποία αποτρέπει τη διάχυση της χρωστικής. Πριν την έναρξη των μετρήσεων, τα κύτταρα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά. Ωστόσο, η παραμονή ενός δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη μέτρηση δεν πρέπει να ξεπερνά τις 2 ώρες. Στις περιπτώσεις προσδιορισμού της κινητοποίησης του ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες (*capacitative calcium entry*), τα κύτταρα ξεπλένονται πριν την τοποθέτησή τους στο φθορισμόμετρο με διάλυμα KRH, το οποίο δεν περιέχει Ca^{2+} και στο ίδιο διάλυμα παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων.

9. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι μέθοδοι εκχύλισης των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την επώαση των κυττάρων με κατάλληλα διαλύματα λύσης, τα οποία προκαλούν δομική

καταστροφή των μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο διάλυμα. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών, καθώς και η διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 0°C, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η δράση των ενδογενών πρωτεασών και η απώλεια των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών (πχ. φωσφορυλίωση).

9.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Μετά το πέρας του χρόνου εφαρμογής των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, τα τρυβλία με τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθούν δύο εκπλύσεις με παγωμένο PBS. Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος λύσης, *Buffer G* (20mM β-φωσφογλυκερινικό οξύ, 20mM NaF, 2mM EDTA, 0,2mM Na₃VO₄, 20mM HEPES pH 7.5, 10mM βενζαμιδίνη, 0,5% (v/v) Triton X-100, 200μM λευπεπτίνη, 5mM DTT, 300μM PMSF και 10μM trans-epoxy-succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E64)). Τα κύτταρα συλλέγονται, μαζί με το διάλυμα, με τη βοήθεια κατάλληλου ξύστρου, επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο, υπό συχνή ανάδευση, και φυγοκεντρώνονται (10000 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά, 4 °C). Στο υπερκείμενο κάθε δείγματος (πρωτεϊνικό εκχύλισμα), όγκου V, προστίθεται 0.33V διαλύματος κατεργασίας των δειγμάτων (*sample buffer 4X*, SB4X), το οποίο περιέχει: 330mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 13% (v/v) γλυκερόλη, 20% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% (w/v) κυανούνης της βρωμοφαινόλης. Τέλος, τα δείγματα βράζονται για 3 λεπτά και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

9.2. Διαφορική απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών

Η διαφορική εκχύλιση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Clerk & Sugden (Clerk & Sugden 1997) και περιλαμβάνει την επεξεργασία των δειγμάτων με 2 διαφορετικά διαλύματα λύσης. Το πρώτο διάλυμα (*Buffer A*) χρησιμοποιείται για τη λύση της πλασματικής μεμβράνης και την απομόνωση των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, ενώ το δεύτερο διάλυμα (*Buffer B*) για την καταστροφή του πυρηνικού φακέλου και την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών.

Αναλυτικά, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας (100mm) και την έκπλυση με PBS, τα κύτταρα συλλέγονται με 150μl *Buffer A* (10mM Tris-HCl pH 7,9, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,3mM Na₃VO₄, 200μM λευπεπτίνη, 10μM E64, 5mM DTT, 300μM PMSF), αναδεύονται ισχυρά και

επωάζονται στον πάγο, για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (10.000 στροφές/λεπτό, 5 λεπτά, 4 °C) και στο υπερκείμενο (κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες) προστίθενται 0,33V διαλύματος κατεργασίας των δειγμάτων (*sample buffer* 4X, SB4X). Το ίζημα επαναιωρείται με 150μl του ίδιου διαλύματος λύσης, στο οποίο, όμως, έχει προστεθεί 0,1% (v/v) απορρυπαντικό Nonidet P40 (NP-40), ώστε να αυξηθεί η ρευστότητα των πυρηνικών φακέλων, και μετά από επώαση 10 λεπτών στον πάγο, φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 40μl *Buffer B* [20mM HEPES pH 7,9, 420mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 25% (v/v) γλυκερόλη, 0,3mM Na₃VO₄, 200μM λευπεπτίνη, 10μM E64, 5mM DTT, 300μM PMSF]. Μετά από 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση στους 4 °C, τα δείγματα φυγοκεντρούνται (14000 στροφές/λεπτό, 10 λεπτά, 4°C) και στο υπερκείμενο (πυρηνικές πρωτεΐνες), προστίθενται 0,33V διαλύματος SB4X. Σε κάθε περίπτωση, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βράζονται για 3 λεπτά και φυλάσσονται στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

10. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

10.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν μέγιστα στα 260nm. Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του DNA σε ένα δείγμα, καταγράφεται η οπτική του πυκνότητα (O.D.) στα 260nm και 280nm με τη βοήθεια ειδικής κυψελίδας χαλαζία. Στην περίπτωση του δίκλωνου DNA, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γίνεται με βάση την παραδοχή ότι η τιμή $O.D._{260nm}=1$ αντιστοιχεί σε 50μg/ml. Η καθαρότητα των δειγμάτων εκτιμάται από το λόγο $O.D._{260nm}/O.D._{280nm}$, ο οποίος πρέπει να είναι ίσος ή μεγαλύτερος του 1,8.

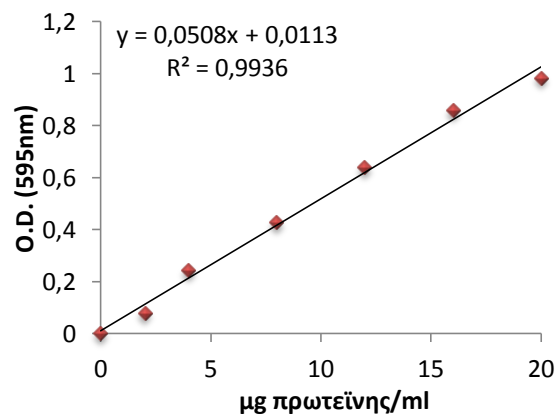
10.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford)

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιείται η φωτομετρική μέθοδος Bradford (Bradford 1976). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να δεσμεύεται μη αντιστρεπτά στις πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον, μεταβάλλοντας το χρώμα της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595nm. Σε σύγκριση με άλλες αντίστοιχες μεθόδους (όπως η Lowry, η Biuret ή η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm) (Lowry και συν. 1951), η Bradford πλεονεκτεί ως προς την ειδικότητά της για

τις πρωτεΐνες, διότι επηρεάζεται λιγότερο από κοινά αντιδραστήρια και μη πρωτεϊνικά συστατικά, που πιθανώς περιέχονται στα δείγματα.

Απαραίτητη είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προκύπτει από τη μέτρηση της O.D. γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (*Bovine Serum Albumin*, BSA) σε απιονισμένο νερό (**Εικόνα 19**). Συγκρίνοντας την O.D. του δείγματος, μετά από κατάλληλη αραίωσή του (100 φορές), με την O.D. των προτύπων, προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε αυτό. Αναλυτικότερα, γνωστές ποσότητες της πρωτεΐνης BSA (2μg, 4μg, 8μg, 12μg, 16μg, και 20μg), καθώς και τα αραιωμένα υπό εξέταση δείγματα, αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford (αραιωμένο 1:4 (v/v) με απιονισμένο H₂O) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η O.D. στα 595nm. Η αραίωση των δειγμάτων θα πρέπει να είναι κατάλληλη, έτσι ώστε η οπτική τους πυκνότητα να βρίσκεται εντός του εύρους των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Επειδή οι ακριβείς τιμές της οπτικής πυκνότητας επηρεάζονται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή της χρωστικής μέχρι τη χρήση της, η πρότυπη καμπύλη πρέπει να κατασκευάζεται σε κάθε μέτρηση.

BSA (1mg/ml)	H ₂ O	Χρωστική	OD _{595nm} *
0 μl	100 μl	1 ml	0.000
2 μl	98 μl	1 ml	0.079
4 μl	96 μl	1 ml	0.242
8 μl	92 μl	1 ml	0.427
12 μl	88 μl	1 ml	0.639
16 μl	84 μl	1 ml	0.858
20 μl	80 μl	1 ml	0.983
1 μl δείγμα	99 μl	1 ml	x



Εικόνα 19: Ενδεικτικές τιμές απορρόφησης O.D.(595nm) γνωστών συγκεντρώσεων διαλύματος BSA και πρότυπη καμπύλη Bradford. *Οι τιμές απορρόφησης προέρχονται από ένα τυχαίο πείραμα, αλλά είναι χαρακτηριστικές για τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

11. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

11.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ακόμη και ο καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων, γίνεται συνήθως με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Καθώς τα μόρια του DNA ή του RNA είναι αρνητικά φορτισμένα, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους προς την άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) (Yue και συν. 1999), για το οποίο 1.2g αγαρόζης διαλύονται σε 120ml διαλύματος TBE [89mM Tris/HCl pH 8.0, 89mM βορικό οξύ, 2mM EDTA]. Το διάλυμα της αγαρόζης θερμαίνεται σε κατάλληλη συσκευή, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Όταν η θερμοκρασία της υγρής αγαρόζης μειωθεί στους 50-60°C, τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή έχει ήδη τοποθετηθεί ειδικό κτενάκι, έτσι ώστε, κατά την στερεοποίηση του πηκτώματος, να δημιουργηθούν τα φρεάτια, όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Όταν ολοκληρωθεί η πήξη, το πήκτωμα μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, καλύπτεται με διάλυμα TBE και αφαιρείται το κτενάκι. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται ίση ποσότητα δείγματος (συνήθως 5μg), στο οποίο έχει προστεθεί το διάλυμα φόρτωσης (*loading buffer*: 0,25% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και 30% (v/v) γλυκερόλη) και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 70V. Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα βάφεται για 15-20 λεπτά σε H₂O που περιέχει 0,5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Στη συνέχεια, παρατηρείται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

11.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS–πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε περιβάλλον με pH διαφορετικό από το ισοηλεκτρικό τους σημείο,. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται είναι ανάλογη του λόγου «φορτίο/μοριακό βάρος». Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι ηλεκτροφόρησης με συγκεκριμένα πλεονεκτήματα, αλλά και μειονεκτήματα.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το αλκαλικό, ασυνεχές σύστημα SDS ηλεκτροφόρησης, σε επίπεδο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπως περιγράφεται από τον Laemmli (Laemmli 1970). Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται το διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (*sample buffer*), το οποίο – όπως

προαναφέρθηκε – περιέχει: i) β-μερκαπτοαιθανόλη, για τη δημιουργία των απαραίτητων αποδιατακτικών συνθηκών για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, ii) SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, iii) γλυκερόλη, για τη αύξηση του ειδικού βάρους των δειγμάτων και τη διευκόλυνση της φόρτωσής τους στα φρεάτια και iv) κυανούν της βρωμοφαινόλης, το οποίο βοηθάει στην παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Μετά από αυτή την επεξεργασία, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται πλήρως και αποκτούν αρνητικό φορτίο ανάλογο του μοριακού τους βάρους, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να πραγματοποιείται αποκλειστικά με βάση αυτό. Κατά συνέπεια, πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος της πηκτής, συγκριτικά με πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Weber & Osborn 1969, Reynolds & Tanford 1970).

Τα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου το πήκτωμα σχηματίζεται στο χώρο που οριοθετείται από δύο κάθετες πλάκες (επίπεδο πήκτωμα, *slab gel*). Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με μόρια N,N-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (ή bis ακρυλαμιδίου, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου και του bis ακρυλαμιδίου. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού (*separating gel*) με συγκέντρωση ακρυλαμίδης από 8% (w/v) έως 15% (w/v), ανάλογα με το μέγεθος της εκάστοτε εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Πριν την είσοδό τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες διασχίζουν το πήκτωμα επιστοίβαξης (*stacking gel*), η οποία έχει συγκέντρωση ακρυλαμίδης 5% (w/v) και ουδέτερο pH 6,8, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδο των πρωτεϊνών στο αλκαλικό πήκτωμα διαχωρισμού (pH 8,8). Παράλληλα με τα δείγματα, σε ένα από τα φρεάτια, ηλεκτροφορείται και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης και για την ασφαλέστερη αναγνώριση των πρωτεϊνών των δειγμάτων.

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή των πηκτωμάτων και τη φόρτωση των δειγμάτων είναι η εξής: Οι γυάλινες πλάκες καθαρίζονται με μεθανόλη και τοποθετούνται σε κατάλληλη συσκευή στήριξης. Στη συνέχεια, τοποθετείται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες το διάλυμα που θα σχηματίσει το πήκτωμα διαχωρισμού και περιέχει: 375mM Tris/HCl pH 8.8, 8% έως 10% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.275% έως 0.4125% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.15%

(w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Πριν πολυμεριστεί, προστίθεται στην κορυφή του μια στοιβάδα απιονισμένου νερού, έτσι ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το επιπλέον νερό αφαιρείται και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης, το οποίο περιέχει: 125mM Tris/HCl pH 6.8, 5% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.165% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Παράλληλα, τοποθετείται ειδικό χτενάκι για τον σχηματισμό των φρεατίων, στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Οι πλάκες με το πήκτωμα μεταφέρονται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (*running buffer*): 25mM Tris-base, 192mM Γλυκίνη, 0.1% (w/v) SDS. Κατόπιν, τα δείγματα βράζονται στους 100°C για 3 λεπτά, αναδεύονται και φορτώνονται με τη βοήθεια μικροσύριγγας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 180V, η πορεία της παρακολουθείται με τη βοήθεια της χρωστικής που περιέχεται στο διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων και τερματίζεται όταν η χρωστική αυτή φτάσει στο τέλος του πηκτώματος.

12. ΥΓΡΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες μετά τον διαχωρισμό τους στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Towbin και συν. 1979, Burnette 1981). Η μέθοδος βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες, λόγω του SDS, κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής.

Μεταξύ των διαθέσιμων μεθόδων μεταφοράς, εκείνη που επιλέχθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα, ήταν η υγρή μεταφορά. Ειδικότερα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα διαχωρισμού, 2 φύλλα Whatman, 2 απορροφητικά υλικά και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται για τουλάχιστον 15 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (*transfer buffer*), το οποίο περιέχει: 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM γλυκίνη και 20% (v/v) μεθανόλη. Στη συνέχεια, τοποθετούνται από το θετικό πόλο της συσκευής προς τον αρνητικό με την εξής σειρά: 1 απορροφητικό υλικό, 1 φύλλο Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα ακρυλαμίδης, άλλο 1 φύλλο Whatman και, τέλος, το δεύτερο απορροφητικό υλικό. Η τοποθέτηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδων αέρα μεταξύ των υλικών. Στη συσκευή τοποθετείται, επιπλέον, το διάλυμα μεταφοράς και ένα δοχείο με πάγο, έτσι ώστε να αποτραπεί η μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας. Η μεταφορά πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 100V για 60 λεπτά ακριβώς.

13. ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blot, WB)

Με τη μέθοδο της ανοσοδοκιμασίας κατά Western, μπορεί να ανιχνευτεί μια πρωτεΐνη-στόχος πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (Burnette 1981). Η παρασκευή ειδικών αντισωμάτων επιτρέπει την ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών που διαφέρουν ελάχιστα, όπως στην περίπτωση πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας ή πρωτεϊνών που διαφέρουν μόνο ως προς κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση (π.χ. φωσφορυλίωση σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο).

Αρχικά, ένα ειδικό αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης (πρωτογενές αντίσωμα) προσδένεται σε αυτή, πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές), συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης γίνεται μέσω του εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος, με κατάλληλη μέθοδο, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (*Enhanced Chemilluminescence*, ECL). Η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας, δηλαδή στην εκπομπή φωτός από ένα μόριο, καθώς αυτό χάνει ενέργεια κατά τη μετάπτωσή του από μία διεγερμένη κατάσταση στη βασική. Ένα γνωστό σύστημα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης της αγριοραφανίδας (*Horseradish Peroxidase*, HRP), που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει στη βασική μέσω της εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες (Whitehead και συν. 1979).

Αναλυτικότερα, η διαδικασία, που ακολουθείται στην ανάλυση κατά Western είναι η εξής: Αρχικά η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων [5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween-20), το οποίο περιέχει 20mM Tris/HCl pH 7.6, 137mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20]. Αφού ξεπλυθεί (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 16-18 ώρες με κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) BSA ή 5% (w/v) σκόνη γάλακτος σε TBS-T, στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 1% (w/v) σκόνης γάλακτος σε TBS-T, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (*anti-rabbit* ή *anti-mouse*,

ανάλογα με το πρωτογενές) είναι συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Μετά την έκπλυση της μεμβράνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ομάδα των αντιδραστηρίων του ECL (RPN 2106, Amersham International) περιλαμβάνει δύο αντιδραστήρια. Το Α, το οποίο περιέχει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου-ιχνηθέτη, που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα και το Β, που περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης, για 2 λεπτά, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύπτεται με ζελατίνη και εκτίθεται σε κατάλληλο φιλμ μέσα σε ειδική κασέτα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την υπό μελέτη πρωτεΐνη (την ποσότητά της στο κυτταρικό εκχύλισμα και την ειδικότητα της αλληλεπίδρασής της με το πρωτογενές αντίσωμα). Τέλος, γίνεται εμφάνιση του φιλμ (σε διάλυμα εμφανιστή, *developer*) και σταθεροποίηση του παραγόμενου σήματος (σε διάλυμα σταθεροποιητή, *fixer*). Η διαδικασία που ακολουθείται από την επώαση της μεμβράνης στο ECL μέχρι και την εμφάνιση του φιλμ, γίνεται σε ειδικό θάλαμο απουσία φωτός.

14. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗ (Stripping)

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εμφάνισης, υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, έτσι ώστε αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μιας διαφορετικής πρωτεΐνης (*stripping*) (Legocki & Verma 1981, Kaufmann και συν. 1987). Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση, όπου χρειάζεται να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης μάρτυρα (π.χ. ακτίνη) ή όταν η ποσότητα των δειγμάτων δεν επαρκεί για επανάληψη της ηλεκτροφόρησης.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα αποκόλλησης του αντισώματος (100mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (w/v) SDS, 62,5mM Tris/HCl pH 6,7) στους 55°C, για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) με TBS-T και επώαση με το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως ακριβώς παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα.

15. ΧΡΩΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

15.1. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250

Το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην πηκτή διαχωρισμού μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250, η οποία προσδένεται μη αντιστρεπτά στις πρωτεΐνες. (Weber & Osborn 1969) Με τον τρόπο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των πρωτεϊνών, αλλά και να ελεγχθεί η επιτυχία της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Συγκεκριμένα, το πήκτωμα διαχωρισμού επωάζεται για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα της χρωστικής [0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 50% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ], υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός, με διαδοχικές εκπλύσεις του πηκτώματος με το διάλυμα αποχρωματισμού [10% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ], ώστε να αποβληθεί η χρωστική από τις περιοχές του πηκτώματος που δεν περιέχουν πρωτεΐνες. Τέλος, το διάλυμα αποχρωματισμού απομακρύνεται πλήρως με απιονισμένο νερό και το πήκτωμα μπορεί, πλέον, να φωτογραφηθεί και να διατηρηθεί στους 4°C, σε σφραγισμένες πλαστικές θήκες.

15.2. Χρώση πρωτεϊνών με Ponceau S

Μετά τη μεταφορά, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας, αλλά και το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων, η νιτροκυτταρίνη βάφεται με διάλυμα της χρωστικής Ponceau S. Σε αντίθεση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue, η πρόσδεση της Ponceau S στις πρωτεΐνες είναι αντιστρεπτή, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί προβλήματα στην διαδικασία της ανοσοδοκιμασίας που θα ακολουθήσει και, επιπλέον, δεν προκαλεί ισχυρό σήμα «υποβάθρου», εφόσον η μεμβράνη αποχρωματιστεί κατάλληλα (Salinovich & Montelaro 1986).

Συγκεκριμένα, η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής [0.4% (w/v) Ponceau S, σε 7.5% (v/v) τριχλωροξικού οξέος (TCA)] για 1 έως 2 λεπτά, υπό ανάδευση. Ο αποχρωματισμός της μεμβράνης γίνεται με διαδοχικές εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T. Όταν αποχρωματιστεί επαρκώς το «υπόβαθρο» διακρίνονται με ικανοποιητική ευκρίνεια οι ζώνες των πρωτεϊνών. Με περισσότερες εκπλύσεις, επιτυγχάνεται πλήρης αποχρωματισμός, προκειμένου η μεμβράνη να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια της ανοσοδοκιμασίας.

16. ΧΡΗΣΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής λογισμικά προγράμματα:

- ✓ Microsoft Office Word 2010, για τη συγγραφή της διατριβής
- ✓ Adobe Photoshop CS5, για την επεξεργασία των εικόνων
- ✓ Gel Analyzer 1.0 και ImageJ 1.45s, για την πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων
- ✓ Microsoft Office Excel 2010 και GraphPad 5.0, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη δημιουργία των γραφημάτων
- ✓ EndNote X5, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών

17. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο που ακολουθεί, είναι αντιπροσωπευτικά των αντίστοιχων πειραμάτων. Όλες οι τιμές συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD), εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 5.0 και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα-μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's unpaired t test. Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε – όπου ήταν απαραίτητη – με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA), ακολουθούμενη από το Student-Newman-Keuls' test. Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $P < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

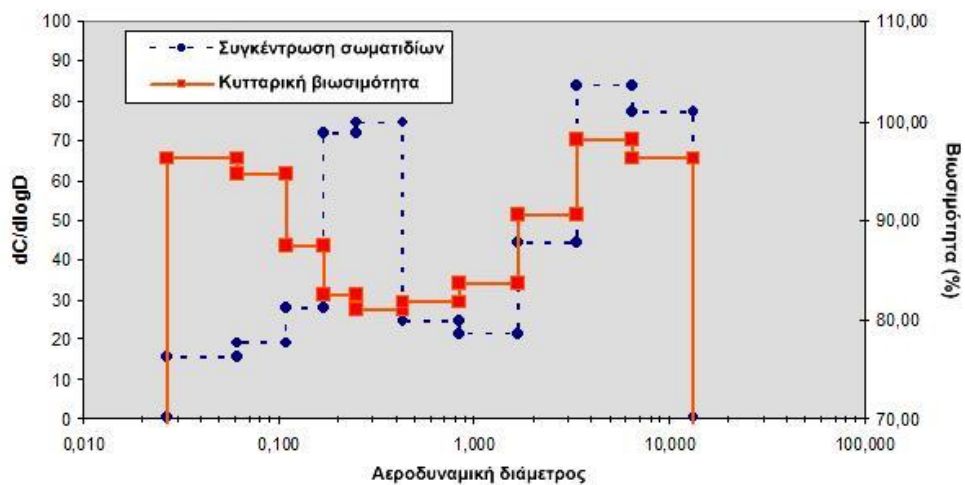
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΟΙ ΡΥΠΟΙ ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Οι μικροσωματιδιακοί ρύποι (Particulate Matter, PM), επιλέχθηκαν ως ένα αντιπροσωπευτικό ετερογενές μίγμα ατμοσφαιρικών ρύπων από βιομηχανία στο κέντρο της Αθήνας. Μετά τη συλλογή τους σε κατάλληλα φίλτρα (βλ. 4.2.), πραγματοποιήθηκε χημική ανάλυση του σωματιδιακού φορτίου και διαφορική εκχύλιση του οργανικού και υδατοδιαλυτού κλάσματος των ρύπων, προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός κυτταροτοξικότητάς τους και η επίδρασή τους στους μοριακούς δείκτες επιβίωσης, Akt και HIF-1α.

1.1. Επίδραση των PM στη βιωσιμότητα των πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων, A549.

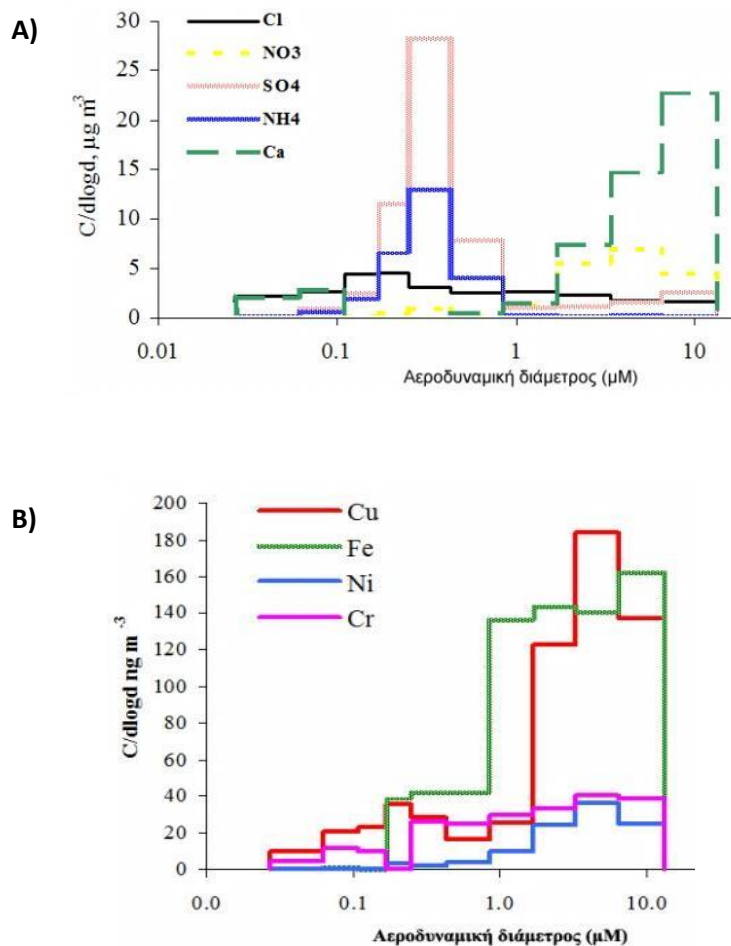
Η διαδοχική τοποθέτηση φίλτρων με πόρους φθίνουσας διαμέτρου, στα συστήματα άντλησης αέρα, παρείχε τη δυνατότητα τη διακριτή μελέτη της επίδρασης μικροσωματιδίων διαφορετικών κατηγοριών μεγέθους. Όπως καταγράφεται στην **Εικόνα 20**, η κυτταροτοξική δράση των σωματιδίων, ύστερα από επώαση 24 ωρών, ήταν ήπια (<20%) και εκδηλώθηκε μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων σωματιδίων με αεροδυναμική διάμετρο 0,1-2,5μM, ενώ σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις μεγαλύτερων σωματιδίων δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην επιβίωση των κυττάρων. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μετρήσεις, που αφορούν στα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, A549.



Εικόνα 20: Καταγραφή της κυτταροτοξικής δράσης και της συγκέντρωσης των μικροσωματιδίων συναρτήσει της αεροδυναμικής διαμέτρου τους (μm). Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν παρουσία μικροσωματιδίων διαφορετικής συγκέντρωσης και αεροδυναμικής διαμέτρου, για 24 ώρες, και η βιωσιμότητά τους προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. Οι μετρήσεις αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η απόκλιση σε κάθε περίπτωση είναι ≤5% του Μ.Ο.

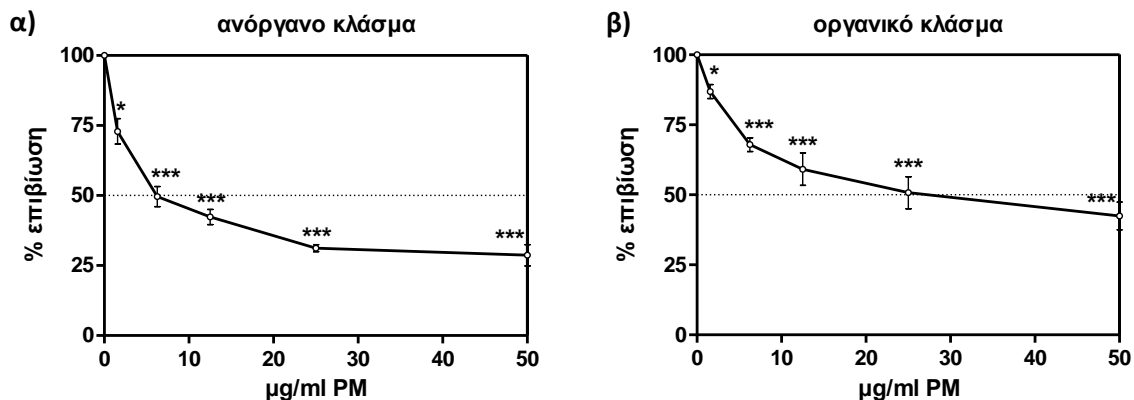
Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι παρόμοιο πρότυπο παρατηρήθηκε και σε τρεις επιπλέον κυτταρικές σειρές, ανθρώπινης προέλευσης, A431, MCF7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού) και PC3 (καρκίνωμα προστάτη).

Η χημική ανάλυση των ανόργανων συστατικών του σωματιδιακού μίγματος, η οποία πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του κ. Ν. Μιχαλόπουλου (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) ανιχνεύθηκαν ιόντα Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ και Ca^{2+} , καθώς και τα μέταλλα Cu, Fe, Ni και Cr, σε όλο το εύρος μεγεθών, χωρίς, ωστόσο να παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή (**Εικόνα 21**). Συγκεκριμένα, ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις SO_4^{2-} και NH_4^+ εντοπίστηκαν στα σωματίδια αεροδυναμικής διαμέτρου 0,1-1 μM , ενώ στα μεγαλύτερα σωματίδια (1-10 μM) υπερίσχυαν τα ιόντα Ca^{2+} και τα μέταλλα Cu και Fe. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μείωση της βιωσιμότητας παρατηρείται στα PM με τα υψηλά ποσοστά SO_4^{2-} και NH_4^+ , επιβεβαιώνοντας τον κρίσιμο ρόλο, τόσο της χημικής σύστασης, όσο και των διαστάσεων των μικροσωματιδιακών ρύπων, στο καθορισμό της τοξικότητάς τους.



Εικόνα 21: Χημική ανάλυση του σωματιδιακού φορτίου των φίλτρων PTFE. Καταγραφή της συγκέντρωσης (A) ανόργανων ιόντων και (B) μετάλλων συναρτήσει της αεροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων.

Όπως προαναφέρθηκε, το δεύτερο σύστημα άντλησης αέρα, που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε φίλτρα, τα οποία συγκρατούσαν το σύνολο των σωματιδίων με αεροδυναμική διάμετρο $\leq 10\mu\text{M}$. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε διαφορετική εκχύλιση των ανόργανων και οργανικών συστατικών τους με νερό και διχλωρομεθάνιο (DCM), αντίστοιχα, και ακολούθησε επώαση των κυττάρων A549 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις, για 24 ώρες. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε έντονος δόσοεξαρτώμενος κυτταρικός θάνατος (**Εικόνα 22**). Συγκρίνοντας, τα δύο εκχυλίσματα, το υδατοδιαλυτό κλάσμα φαίνεται να εκδηλώνει ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση ($IC50_{\text{ΥΔΑΤ}}=6,25\mu\text{g/ml}$, $IC50_{\text{ΑΝΟΡ}}=25\mu\text{g/ml}$). Οι μετρήσεις αφορούν ένα από τα φίλτρα, που μελετήθηκαν. Παρόλα αυτά θεωρούνται αντιπροσωπευτικές του συνόλου των δειγμάτων, καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών φίλτρων.

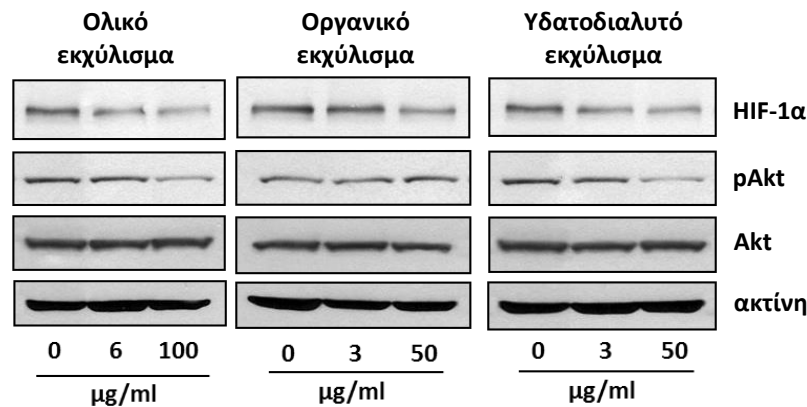


Εικόνα 22: Διαφορική επίδραση του οργανικού και του ανόργανου κλάσματος των $PM_{2,5-10}$ στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (α) ανόργανου ή (β) οργανικού εκχυλίσματος PM (0-50µg/ml) για 24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P<0.05$, *** $P<0.001$)

1.2. Διαφορική επίδραση ολικού, ανόργανου και οργανικού κλάσματος των PM στον HIF-1α και την κίνηση Akt

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των PM και σε μοριακό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων A549 με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού, υδατοδιαλυτού ή οργανικού εκχυλίσματος, για 24 ώρες, και ακολούθησε ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων των δεικτών επιβίωσης, HIF-1α και pAkt (**Εικόνα 23**). Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση, τόσο του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, όσο και του βαθμού

ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της κινάσης Akt. Ειδικότερα, η μείωση της pAkt, φαίνεται να οφείλεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα συστατικά του οργανικού κλάσματος, σε αντίθεση με τον HIF-1α, στον οποίο τόσο το οργανικό, όσο και το υδατοδιαλυτό κλάσμα έδρασαν αθροιστικά.



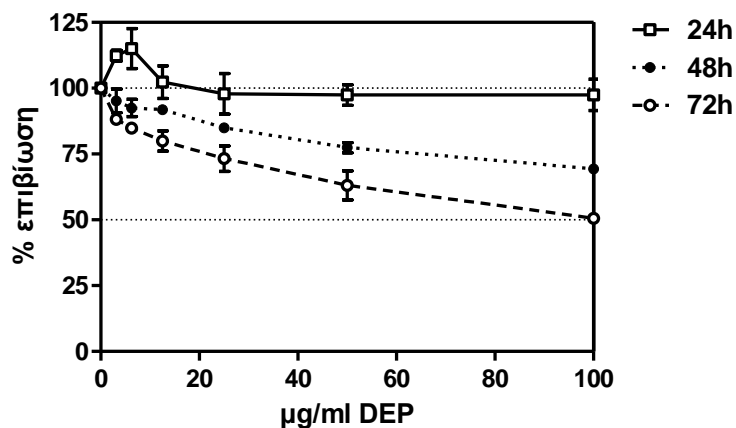
Εικόνα 23: Επίδραση των μικροσωματιδιακών ρύπων (PM) στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και στη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt. Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολικού (6 και 100μg/ml), υδατοδιαλυτού (3 και 50μg/ml) και οργανικού εκχυλίσματος PM, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε ανοσοδοκιμασία κατά Western έναντι του HIF-1α, της φωσφορυλιωμένης και της ολικής Akt. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. ($P < 0,05$)

2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ DIESEL

Τα νανοσωματίδια (*Diesel Exhaust Particles*, DEP) εκλύονται στην ατμόσφαιρα από εξατμίσεις μηχανών εσωτερικής καύσης. Συνεπώς, πρόκειται για κοινούς ρύπους, οι οποίοι ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά, κυρίως στα μεγάλα αστικά κέντρα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο μίγμα νανοσωματιδίων (*SRM2975*), γνωστής χημικής σύστασης, που συλλέχθηκε από εξατμίσεις ανυψωτικών μηχανημάτων. Διερευνήθηκε η κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων, καθώς και η πιθανή επίδρασή τους σε ένα μεγάλο εύρος προ-επιβιωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα συγκαλλιέργειας των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα με φυσιολογικούς ινοβλάστες από τον ίδιο ιστό, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της αλληλεπίδρασης διαφορετικών κυτταρικών τύπων στη διαμόρφωση των αποκρίσεων των επιθηλιακών κυττάρων.

2.1. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 24**, η κυτταροτοξική δράση των DEP εκδηλώθηκε μόνο μετά από παρατεταμένη επώαση (≥ 48 ωρών), ενώ οι 24 ώρες επώασης δεν επηρέασαν αρνητικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων, στο εύρος συγκεντρώσεων, που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, η επιβίωση των κυττάρων φαίνεται να ευνοείται σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 12 $\mu\text{g/ml}$. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι τα DEP – ως παραπροϊόντα καύσης υγρών καυσίμων – περιέχουν υψηλά ποσοστά οργανικών ρύπων, ορισμένοι από τους οποίους έχουν αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση.

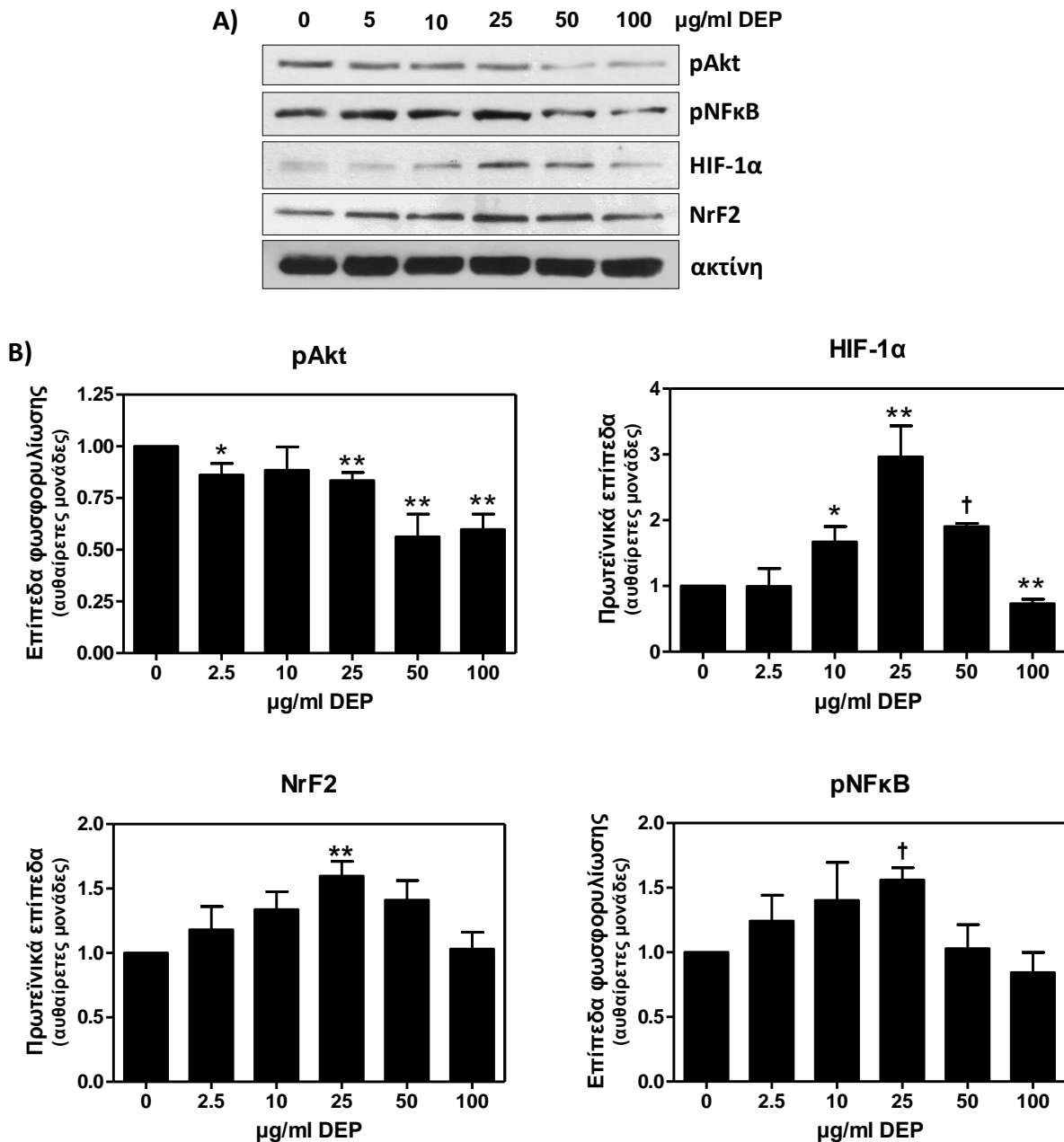


Εικόνα 24: Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DEP (0-100 $\mu\text{g/ml}$) για 24, 48 και 72 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) ($P < 0.05$)

2.2. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP σε σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες των κυττάρων A549.

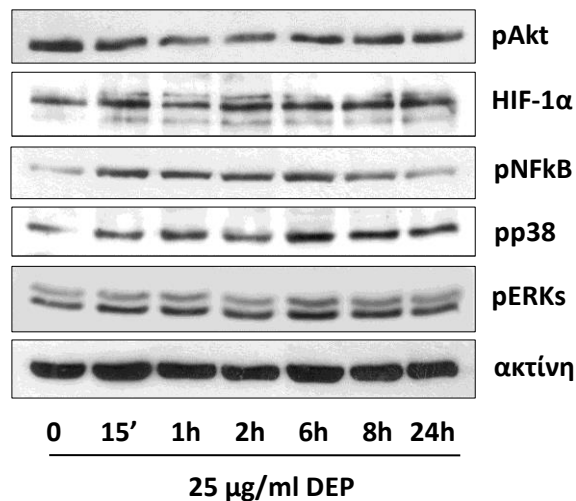
Επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DEP (0-100 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες, οδήγησε σε ένα κωδωνοειδές πρότυπο απόκρισης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 α , NrF2 και pNF κ B, με μέγιστη τιμή στα 25 $\mu\text{g/ml}$ (**Εικόνα 25**). Η επαγωγή των δεικτών NrF2 και pNF κ B υποδηλώνει τη διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου, παρουσία των νανοσωματιδίων DEP. Στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, η κινάση Akt παρουσίασε μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης. Η μείωση αυτή, ωστόσο, δεν επηρέασε την επιβίωση των κυττάρων, πιθανά λόγω παράλληλης ενεργοποίησης άλλων σηματοδοτικών

μονοπατιών επιβίωσης. Η συγκέντρωση των 25μg/ml χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που ακολούθησαν, καθώς είναι μη κυτταροτοξική και ικανή να κινητοποιήσει μοριακούς δείκτες με προστατευτική και προ-επιβιωτική δράση.



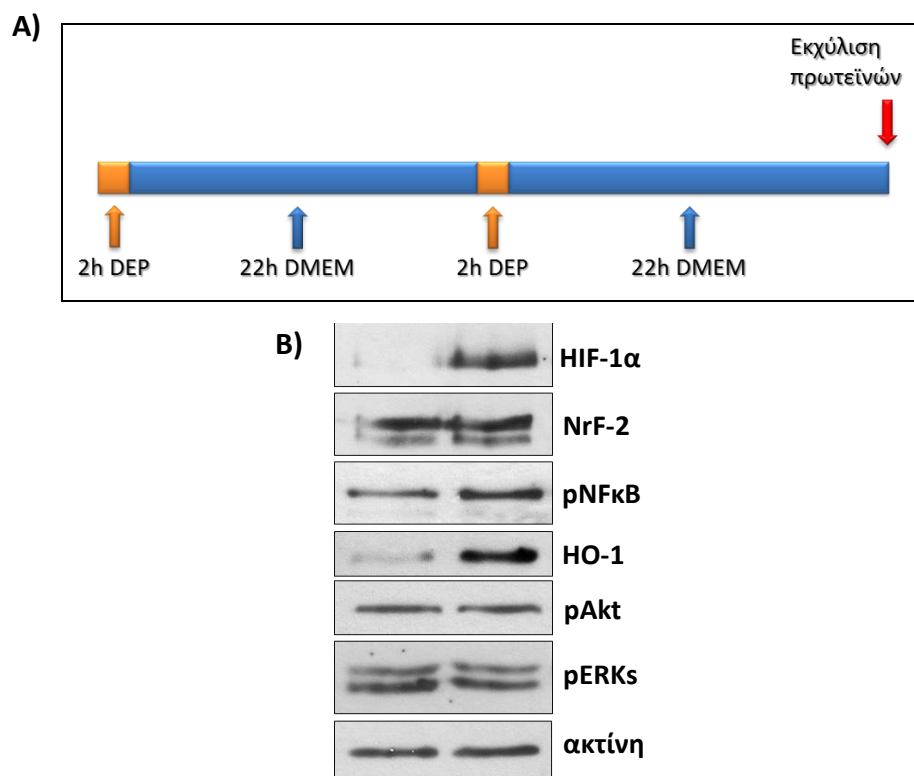
Εικόνα 25: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και NrF2 και στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt και NFκB. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DEP (0-100μg/ml) για 24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western έναντι των ολικών επιπέδων των HIF-1α και NrF2 και των φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών Akt και NFκB. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. **(B)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

Προκειμένου να διευκρινιστεί το ακριβές χρονοδιάγραμμα των παραπάνω αποκρίσεων, πραγματοποιήθηκαν επώσεις μικρότερης διάρκειας με 25μg/ml DEP. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 26**, η επαγωγή του HIF-1α και του NFκB είναι άμεση και εκδηλώνεται ήδη από τα 15 λεπτά επώασης. Η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt παρουσιάζεται ελαφρώς μειωμένη σε σύγκριση με το μάρτυρα σε όλα τα χρονικά διαστήματα, που μελετήθηκαν και, συνεπώς, δε φαίνεται να εμπλέκεται στις αποκρίσεις των μεταγραφικών παραγόντων. Επειδή, όμως, τα μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης της Akt δεν συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο, εξετάστηκαν και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, που επάγουν την επιβίωση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η φωσφορυλίωση δύο μελών των MAP κινασών, της p38 και των ERKs. Η ενεργοποίηση και των δύο κινασών ανιχνεύθηκε επίσης από τα 15 λεπτά επώασης και διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα τουλάχιστον μέχρι τις 24 ώρες. Είναι πιθανό, η μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt να αντισταθμίζεται από τη δράση των MAPKs, εξασφαλίζοντας την επιβίωση των κυττάρων A549.



Εικόνα 26: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt, NFκB, p38 και pERKs. Τα κύτταρα επώασηκαν με 25μg/ml DEP για 0-24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε ανοσοδοκιμασία κατά Western έναντι των ολικών επιπέδων του HIF-1α και των φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών Akt, NFκB, p38 και pERKs. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Είναι γεγονός ότι οι μακράς διάρκειας επωάσεις απέχουν κατά πολύ από τις πραγματικές συνθήκες έκθεσης του ανθρώπου στους ρύπους της ατμόσφαιρας. Στο πλαίσιο μιας καλύτερης προσέγγισης των καθημερινών συνθηκών έκθεσης, πραγματοποιήθηκαν μικρής διάρκειας, επαναλαμβανόμενες επωάσεις (**Εικόνα 27A**). Ειδικότερα, τα κύτταρα επωάστηκαν με 25μg/ml DEP για 2 ώρες και στη συνέχεια τα νανοσωματίδια απομακρύνθηκαν με ανανέωση του θρεπτικού υλικού για 22 επιπλέον ώρες. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλη μία φορά και ακολούθησε διαφορετική εκχύλιση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών για την ανίχνευση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και των μεταγραφικών παραγόντων, αντίστοιχα.



Εικόνα 27: Επίδραση των σύντομων, επαναλαμβανόμενων εκθέσεων στα νανοσωματίδια DEP. Τα κύτταρα A549 επωάστηκαν παρουσία 25μg/ml DEP για 2 ώρες και στη συνέχεια οι ρύποι απομακρύνθηκαν και τα κύτταρα παρέμειναν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό για 22 επιπλέον ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά και ακολούθησε διαφορετική εκχύλιση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(A)** Σχηματική περιγραφή του πειραματικού πρωτοκόλλου. **(B)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western έναντι των πυρηνικών επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α, NrF2 και pNFκB, καθώς και των κυτταροπλασματικών επιπέδων των πρωτεϊνών pAkt, HO-1 και pERKs. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Οι διαδοχικές σύντομες επώσεις με τα νανοσωματίδια DEP προκάλεσαν αξισημείωτες μεταβολές στα κύτταρα A549, οι οποίες, στις περισσότερες περιπτώσεις, διατηρήθηκαν ακόμα και 22 ώρες μετά την απομάκρυνσή τους από το μέσο καλλιέργειας (**Εικόνα 27B**). Συγκεκριμένα, όσον αφορά, στον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α, οι επαναλαμβανόμενες επώσεις έδρασαν αθροιστικά, καθώς η συσσώρευσή του στον πυρήνα ήταν περισσότερο μαζική σε σύγκριση με την απλή δίωρη επώαση. Επιπλέον, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας NrF2 ανιχνεύεται στον πυρήνα σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του μάρτυρα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα μιας πρώιμης παροδικής επαγωγής. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την επαγωγή του προστατευτικού ενζύμου οξυγενάση της αίμης (HO-1), που αποτελεί προϊόν ενός από τα κυριότερα γονίδια-στόχους του NrF2. Επιπλέον, η διατήρηση της HO-1 σε υψηλά επίπεδα καταδεικνύει ότι η οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου εξακολουθεί να είναι διαταραγμένη.

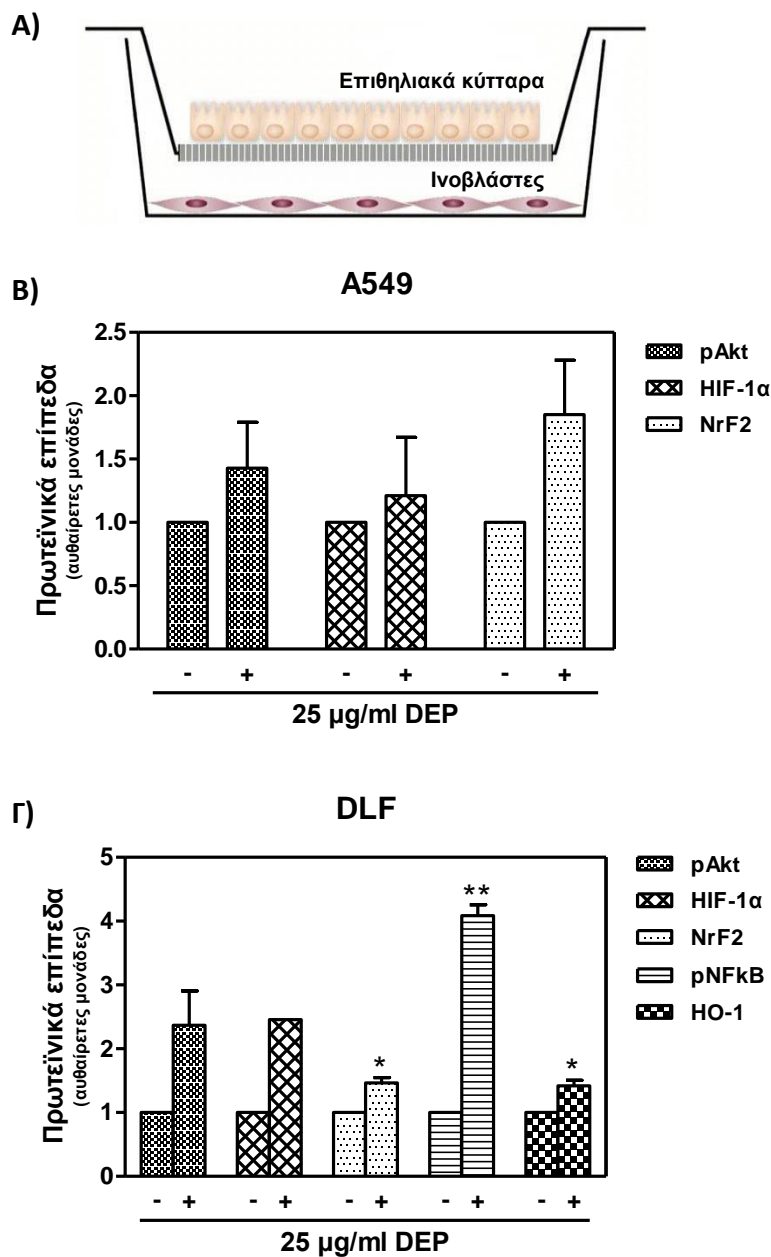
Τα αποτελέσματα αυτά είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα, καθώς υποδηλώνουν ότι ακόμα και μικρής διάρκειας έκθεση στους ατμοσφαιρικούς ρύπους – που αντιπροσωπεύουν καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες – είναι ικανή να αφήσει ένα είδος «αποτυπώματος» στα κύτταρα. Παρατεταμένη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη μεταλλαξογόνο δράση των οργανικών ρύπων, είναι πιθανό να συμβάλουν μακροπρόθεσμα στην εξαλλαγή των κυττάρων και την καρκινογένεση. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τις μικρές επαναλαμβανόμενες επώσεις, οι οποίες συνολικά διήρκεσαν 48 ώρες, η κυτταρική βιωσιμότητα δεν επηρεάστηκε, σε αντίθεση με τη συνεχή 48ωρη επώαση, η οποία μείωσε την επιβίωση κατά περίπου 15% σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 24**).

2.3. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP σε σύστημα συγκαλλιέργειας επιθηλιακών κυττάρων και φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα.

Το μικροπεριβάλλον του πνεύμονα *in vivo*, όπως και κάθε ιστού, αποτελείται από ένα σύνολο διαφορετικών κυτταρικών τύπων, η αλληλεπίδραση των οποίων είναι καθοριστική για την διαμόρφωση της τελικής απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα. Συνεπώς, η αποκλειστική χρήση μεμονωμένων κυτταρικών τύπων, αν και μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες, δεν είναι απόλυτα αντιπροσωπευτική. Στην παρούσα μελέτη, στο πλαίσιο μιας πιο ολοκληρωμένης προσέγγισης των *in vivo* συνθηκών, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα συγκαλλιέργειας των επιθηλιακών κυττάρων, A549, με ανθρώπινους φυσιολογικούς ινοβλάστες πνεύμονα νεαρής γενιάς, DLF (*Distal Lung Fibroblasts*). Η διάταξη του συστήματος συγκαλλιέργειας «*transwell*» (**Εικόνα 28A**), παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης

καλλιέργειας διαφορετικών κυτταρικών τύπων στο ίδιο θρεπτικό υλικό, χωρίς άμεση επαφή μεταξύ τους. Μια ημιπερατή μεμβράνη, επιτρέπει την αμοιβαία επικοινωνία των δύο κυτταρικών πληθυσμών, μέσω εκκρινόμενων μεσολαβητών και, παράλληλα, τη διακριτή επεξεργασία τους, μετά το πέρας του πειράματος. Επειδή ο ιστός που έρχεται σε άμεση επαφή με τους ατμοσφαιρικούς ρύπους κατά την εισπνοή, είναι το επιθήλιο των αεραγωγών και των κυψελίδων, το μίγμα των DEP χορηγήθηκε στα κύτταρα A549 (ανώτερο διαμέρισμα). Μετά το πέρας της επίδρασης πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών και από τους δύο κυτταρικούς τύπους. Οι μοριακοί δείκτες, που εξετάστηκαν, ήταν αντίστοιχοι με τα πειράματα στην απλή καλλιέργεια των A549, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο πειραματικών μοντέλων.

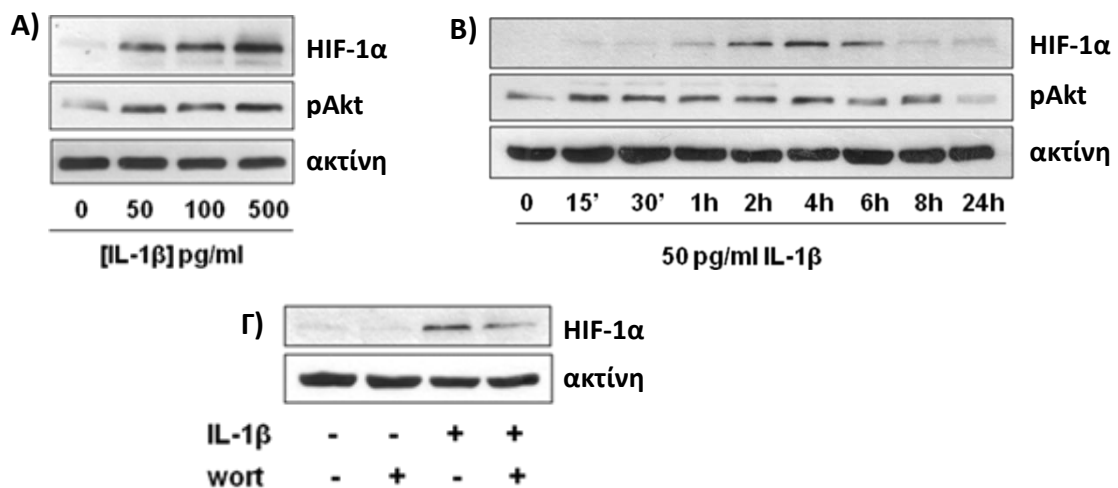
Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 28B**, οι αποκρίσεις των A549 δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές, σε σύγκριση με την απλή μονοκαλλιέργεια. Ιδιαίτερα σημαντικές ήταν οι αποκρίσεις των φυσιολογικών ινοβλαστών (**Εικόνα 28Γ**). Συγκεκριμένα, όπως και στη μονοκαλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρήθηκε έντονη ενεργοποίηση του φωσφορυλιωμένου NFκB και των ολικών επιπέδων του HIF-1α. Μικρότερη, αλλά στατιστικά σημαντική ήταν η επαγωγή του NrF2 και της προστατευτικής πρωτεΐνης-στόχου του, HO-1, υποδηλώνοντας την παρουσία συνθηκών οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα επιθηλιακά κύτταρα, στους ινοβλάστες παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt, ενώ οι κινάσες ERKs δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή μετά την 24ωρη επώαση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποκρίσεις των ινοβλαστών οφείλονται κυρίως σε παρακρινικούς μεσολαβητές, αλλά και μεταβολίτες των οργανικών ρύπων, που εκκρίνονται, κατά τη διάρκεια της επώασης, από τα επιθηλιακά κύτταρα, και διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη.



Εικόνα 28: Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP σε σύστημα συγκαλλιέργειας επιθηλιακών κυττάρων, A549, και φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα, DLF. Τα κύτταρα A549, στο ανώτερο διαμέρισμα της πειραματικής διάταξης, επώαστηκαν παρουσία 25µg/ml DEP για 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και από τους δύο κυτταρικούς τύπους. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **A)** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος συγκαλλιέργειας *transwell*. **B)** Καταγραφή της απόκρισης των επιθηλιακών κυττάρων, A549, στη μονοκαλλιέργεια (M) και τη συγκαλλιέργεια (T), σε σύγκριση με το μάρτυρα. **Γ)** Καταγραφή της απόκρισης των φυσιολογικών πνευμονικών ινοβλαστών της συγκαλλιέργειας. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ σε σύγκριση με το μάρτυρα)

2.4. Επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β στον HIF-1α. Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt.

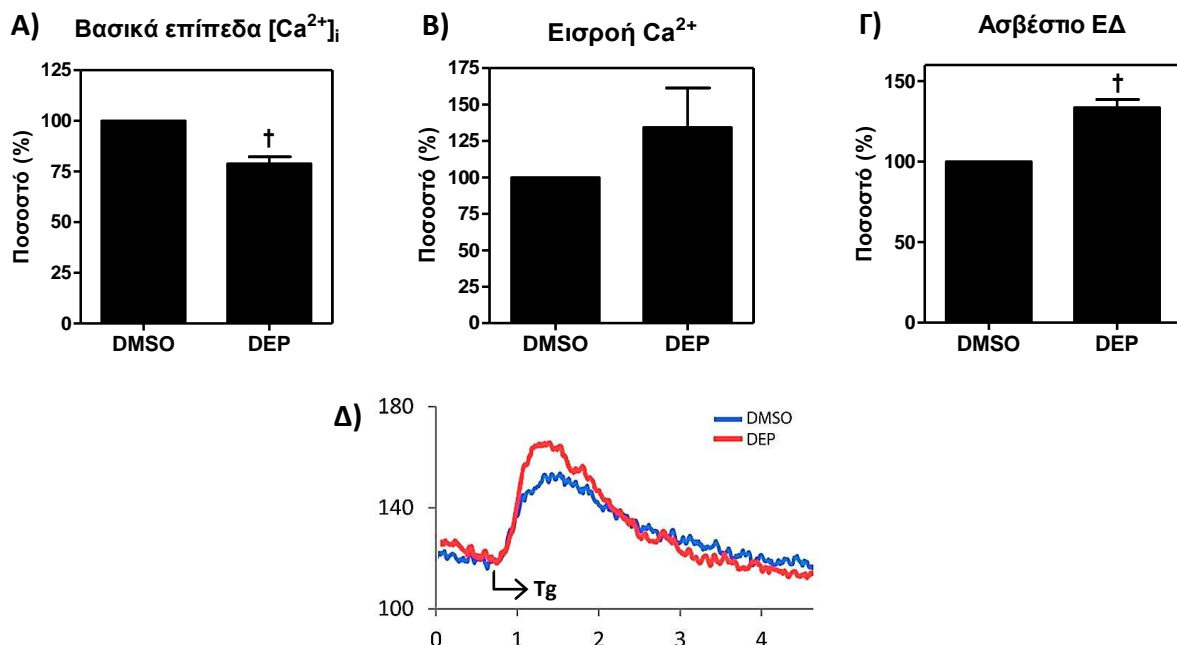
Όπως προαναφέρθηκε, οι παρατηρούμενες αποκρίσεις στο σύστημα της συγκαλλιέργειας οφείλονται, τόσο στην άμεση επίδραση των νανοσωματιδίων DEP, όσο και στην αμοιβαία παρακρινική επικοινωνία των διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, στο πλαίσιο της ταυτοποίησης μοριακών μεσολαβητών, που συμμετέχουν στην απόκριση στα DEP, εξετάστηκε η επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης, IL-1β, στον HIF-1α. Η επιλογή της συγκεκριμένης ιντερλευκίνης βασίστηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα, που επιβεβαιώνουν την έκκρισή της από ινοβλάστες πνεύμονα. Πράγματι, εξωγενής χορήγηση IL-1β στα κύτταρα A549, ακόμα και σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των 50pg/ml, οδήγησε σε άμεση και μαζική αύξηση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α, με μέγιστη τιμή στις 6 ώρες επώασης (**Εικόνα 29A,B**). Ο αναστολέας της PI3K, wortmannin, ανέστειλε σε μεγάλο ποσοστό την απόκριση του HIF-1α, υποδηλώνοντας ότι – παρουσία IL-1β – το μονοπάτι PI3K/Akt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο αναρροϊκά του μεταγραφικού παράγοντα (**Εικόνα 29Γ**). Συνεπώς, είναι πιθανό η συγκεκριμένη ιντερλευκίνη να εμπλέκεται, σε συνδυασμό με άλλους μεσολαβητές, στην παρατηρούμενη απόκριση των κυττάρων στο σύστημα της συγκαλλιέργειας.



Εικόνα 29: Επίδραση της ιντερλευκίνης IL-1β στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και στη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt. Τα κύτταρα A549 επωάστηκαν (**A**) με διαφορετικές συγκεντρώσεις IL-1β για 24 ώρες, (**B**) με 50pg/ml IL-1β για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και (**Γ**) με 50pg/ml IL-1β για 24 ώρες παρουσία ή απουσία 100 nM wortmannin (wort). Η wort προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό 30 λεπτά πριν την IL-1β. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε ανοσοδοκιμασία κατά Western έναντι του HIF-1α και της φωσφορυλιωμένης Akt. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

2.5. Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου.

Τα ιόντα ασβεστίου, αποτελούν ένα δεύτερο μήνυμα, το οποίο κινητοποιείται άμεσα ως απόκριση σε ποικίλα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα και συμμετέχει στη ρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων, η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, αλλά και ο κυτταρικός θάνατος. Βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, που υποστηρίζουν την εμπλοκή των οργανικών ρύπων στην διατάραξη της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου – κυρίως μέσω της επαγωγής οξειδωτικού στρες – χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φθορισμομετρίας προκειμένου να προσδιοριστούν ανάλογες μεταβολές στο παρόν πειραματικό μοντέλο. Επώαση των κυττάρων A549 με 25μg/ml DEP για 24 ώρες, μείωσε κατά $21,06 \pm 3,30\%$ τα βασικά επίπεδα του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου, ενώ, αντίθετα, αύξησε κατά $33,71 \pm 4,86\%$ το περιεχόμενο του ενδοπλασματικού δικτύου (**Εικόνα 30**). Η επιπλέον συσσώρευση ιόντων ασβεστίου στις ενδοκυττάρια αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) υποδηλώνει ένα αυξημένο δυναμικό σηματοδότησης παρουσία των νανοσωματιδίων DEP.



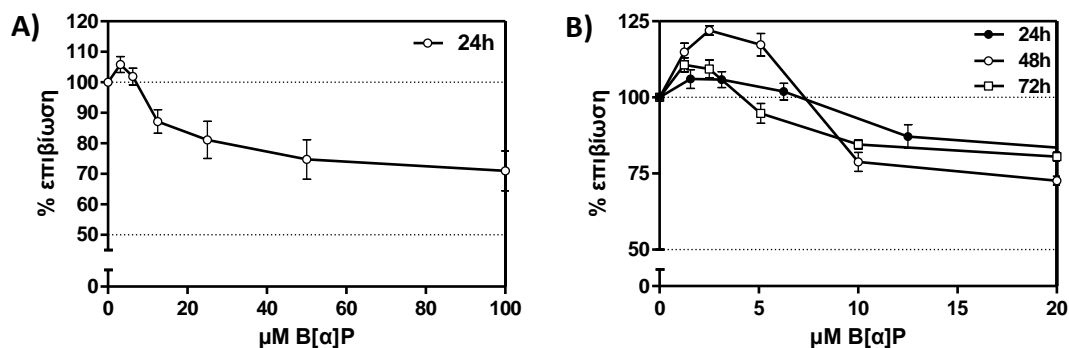
Εικόνα 30: Επίδραση των νανοσωματιδίων DEP στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου. Τα κύτταρα A459 επώαστηκαν με 25μg/ml DEP για 24 ώρες και ακολούθησε φθορισμομετρικός προσδιορισμός **(Α)** των βασικών επιπέδων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, **(Β)** της εισροής Ca^{2+} ύστερα από τεχνητή εκκένωση του ΕΔ με θαψιγκαργκίνη (Tg) και **(Γ)** του περιεχομένου του ΕΔ σε Ca^{2+} . Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με τον οργανικό διαλύτη των DEP, DMSO. **(Δ)** Αντιπροσωπευτική καταγραφή της άμεσης απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από το ΕΔ, ύστερα από χορήγηση Tg (100nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) ($^{\dagger}P < 0.001$)

3. BENZO[α]ΠΥΡΕΝΙΟ

Το βενζο[α]πυρένιο (B[α]P) ανήκει στην ομάδα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) και είναι ένας ιδιαίτερα κοινός οργανικός ρύπος, με καρκινογόνες ιδιότητες. Αν και δεν έχει σωματιδιακή φύση, επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικά οργανικά συστατικά και των δύο σωματιδιακών μιγμάτων που προηγήθηκαν, ώστε να συμβάλει στη διεξοδικότερη διερεύνηση της δράσης τους.

3.1. Επίδραση του B[α]P στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549.

Αρχικά, εξετάστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων A549 παρουσία B[α]P. Υψηλές συγκεντρώσεις του ρύπου ($\geq 10\mu\text{M}$) εκδήλωσαν ήπια κυτταροτοξική δράση, με την κυτταρική βιωσιμότητα να μειώνεται κατά $30\pm 6,5\%^\dagger$, μετά από 24 ώρες επίδρασης με $100\mu\text{M}$ (**Εικόνα 31A**). Αντίθετα, οι χαμηλότερες, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις φαίνεται να ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όπως καταγράφεται στην αντίστοιχη καμπύλη επιβίωσης, το B[α]P προκαλεί μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική, αύξηση της βιωσιμότητας, η οποία διατηρείται σε επίπεδα υψηλότερα από τον μάρτυρα ακόμα και μετά από 72 ώρες επώασης (**Εικόνα 31B**). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που υποστηρίζουν την προ-καρκινική δράση του συγκεκριμένου ρύπου σε συνθήκες παρατεταμένης έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί, ότι ανάλογη μιτογόνος δράση, στις 24 ώρες, παρατηρήθηκε και σε χαμηλές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων DEP.

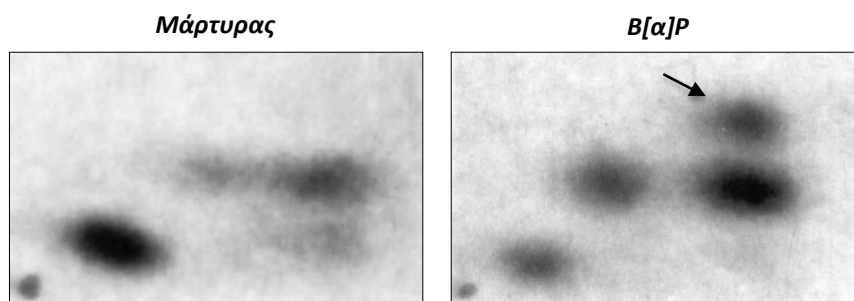


Εικόνα 31: Επίδραση του (B[α]P) στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν με (A) 0-100μM B[α]P για 24 ώρες και (B) 0-20μM B[α]P για 24, 48 και 72 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) ($P < 0.05$)

3.2. Επίδραση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P.

3.2.1. Ανίχνευση προϊόντων προσθήκης στο DNA

Είναι γνωστό ότι κατά τον μεταβολισμό του B[α]P από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, παράγονται ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις με ισχυρή μεταλλαξογόνο δράση. Σε αντίθεση με το μη-πολικό B[α]P, οι ηλεκτρονιόφιλοι μεταβολίτες του συνδέονται ομοιοπολικά σε πουρινικά κατάλοιπα του DNA, σχηματίζοντας σύμπλοκα, γνωστά ως «προϊόντα προσθήκης» (*DNA adducts*). Αντίστοιχα σύμπλοκα ανιχνεύθηκαν και στα κύτταρα A549 με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), δύο διαστάσεων, μετά από 24 ώρες επώασης με 100μM B[α]P (**Εικόνα 32**). Αν και η συγκεκριμένη τεχνική δεν παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των συμπλόκων, βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το πλέον σύνηθες προϊόν προσθήκης είναι αυτό που δημιουργείται μεταξύ του εποξειδίου διόλης του B[α]P (Benzo[α]Pyrene Diol Epoxide, BPDE) και του νουκλεοτιδίου γουανίνης.

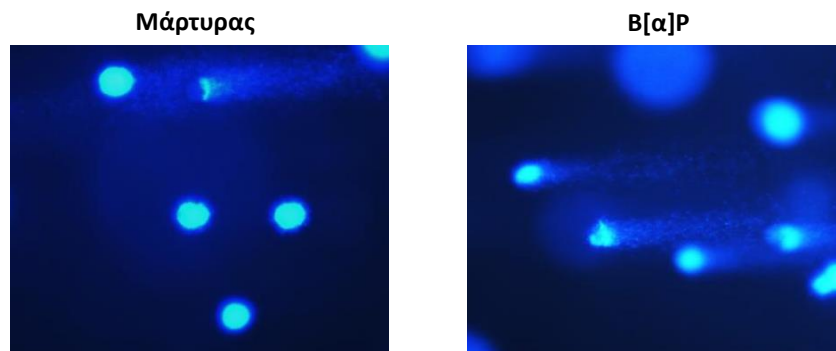


Εικόνα 32: Ανίχνευση προϊόντων προσθήκης στο DNA των κυττάρων A549, παρουσία κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 100μM B[α]P για 24 ώρες και μετά από σήμανση των μεμονωμένων νουκλεοτιδίων τους με ραδιενεργό φωσφόρο ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) δύο διαστάσεων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Η κηλίδα, που υποδεικνύει το βέλος, αντιπροσωπεύει προϊόντα προσθήκης.

3.2.2. Ανίχνευση θραύσεων του DNA, με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης ολόκληρων κυττάρων.

Η αφαίρεση των προϊόντων προσθήκης, στο πλαίσιο της επιδιόρθωσης της γενετικής βλάβης, οδηγεί στη δημιουργία θραύσεων στην αλυσίδα του DNA. Πράγματι, επωάζοντας τα κύτταρα A549 στις συνθήκες, στις οποίες ανιχνεύτηκαν προϊόντα προσθήκης, και εφαρμόζοντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης ολόκληρων κυττάρων (δοκιμασία *comet*), παρατηρήσαμε τον σχηματισμό των χαρακτηριστικών «κομητών» στο 70,5±13,4% των κυττάρων, που επώαστηκαν με B[α]P και μόλις στο 16,3±3,2% των κυττάρων-μαρτύρων. Οι «ουρές» αυτών των σχηματισμών αποτελούνται από τα θραύσματα του γενετικού υλικού, τα οποία

εμφανίζουν υψηλότερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Οι εκτεταμένες θραύσεις του DNA κατά την επίδραση υψηλών κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P, θα μπορούσε να ευθύνεται για τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο σε αυτές τις συνθήκες.



Δείγμα	% κομητών
Μάρτυρας	16,3 ± 3,2
100μM B[α]P	70,5 ± 13,4**

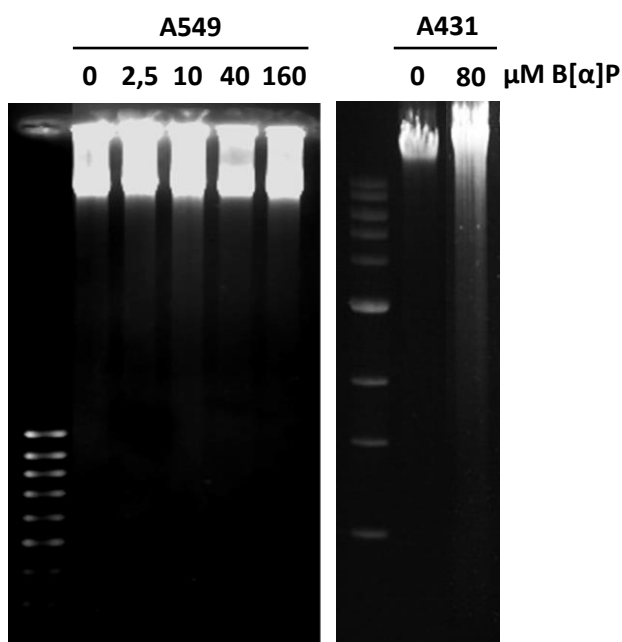
Εικόνα 33: Ανίχνευση θραύσεων στο γενετικό υλικό των κυττάρων A549, παρουσία κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 100μM B[α]P για 24 ώρες και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ολόκληρων κυττάρων (δοκιμασία comet) και χρώση του DNA με DAPI. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Παρουσιάζονται φωτογραφίες αντιπροσωπευτικών οπτικών πεδίων από τρία ανεξάρτητα πειράματα και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, ύστερα από παρατήρηση τουλάχιστον 100 τυχαίων κυττάρων ανά δείγμα.

3.2.3. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA, με τη μέθοδο του DNA laddering.

Ένα από τα κυριότερα γεγονότα, που λαμβάνουν χώρα κατά την επαγωγή αποπτωτικού (και όχι νεκρωτικού) θανάτου, είναι ο κατακερματισμός του DNA σε θραύσματα, με μέγεθος πολλαπλάσιο των 180 ζευγών βάσεων (180bp). Όπως περιγράφεται στην ενότητα *Υλικά & Μέθοδοι*, τα θραύσματα αυτά μπορούν να ανιχνευτούν ύστερα από απομόνωση του γενωμικού DNA, ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων B[α]P, οφείλεται στην επαγωγή απόπτωσης, εφαρμόστηκε η παραπάνω τεχνική σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (A549) και δέρματος (A431), τα οποία είχαν επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις B[α]P, για 24 ώρες (**Εικόνα 34**). Όσον αφορά στα κύτταρα A549, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στο ηλεκτροφορητικό προφίλ των επωασμένων κυττάρων, σε

σύγκριση με το μάρτυρα, ακόμα και σε συγκέντρωση 160μM. Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων A431 με 80μM B[α]P, προκάλεσε θραύση του DNA σε μικρό βαθμό, χωρίς, όμως, να ανιχνεύεται το χαρακτηριστικό πρότυπο της «σκάλας». Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις B[α]P, οδηγούν είτε σε παύση του πολλαπλασιασμού, είτε σε νέκρωση. Παρόλα αυτά, το ενδεχόμενο του αποπτωτικού θανάτου, δεν μπορεί να αποκλειστεί με ασφάλεια, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου, ειδικά σε περιπτώσεις, όπου η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας δεν ξεπερνά το 30% (**Εικόνα 31**).

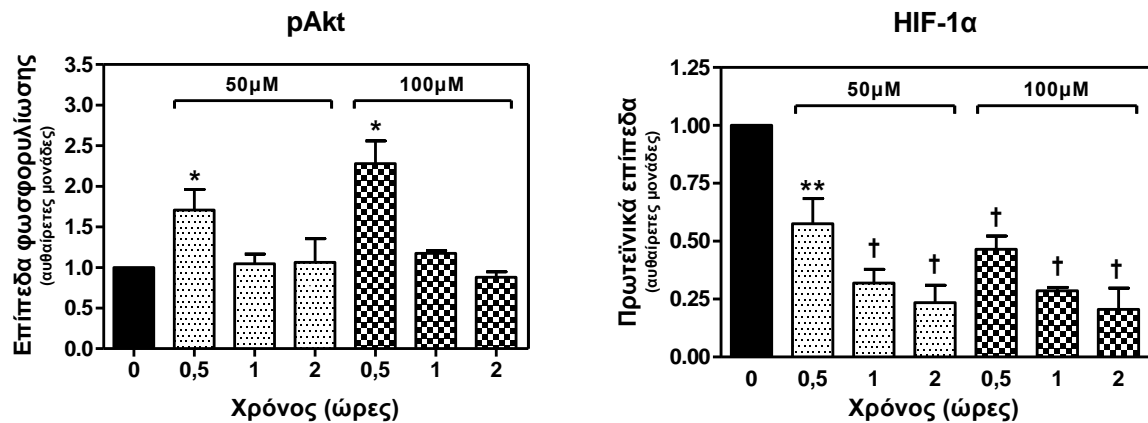


Εικόνα 34: Έλεγχος κατακερματισμού του γενωμικού DNA, παρουσία B[α]P. Τα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (A549) και δέρματος (A431) επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις B[α]P, για 24h και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά πηκτώματα ύστερα από χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο.

3.2.4. Επίδραση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P στην ενεργοποίηση της Akt και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α.

Επεκτείνοντας τη μελέτη σε μοριακό επίπεδο, εξετάσθηκε η απόκριση των δεικτών επιβίωσης, pAkt και HIF-1α, στις κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του B[α]P. Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν με 50 και 100μM B[α]P για 0,5-2 ώρες και ακολούθησε απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Όπως καταγράφεται στην **Εικόνα 35**, η ενεργοποίηση της κινάσης Akt, αν και παρουσίασε μια πρώιμη αύξηση στα 30 λεπτά (κατά $70,60 \pm 25,60\%$ στα 50μM και $127,90 \pm 27,90\%$ στα 100μM), μετά τη 1 ώρα επανήλθε στα επίπεδα του μάρτυρα, με φθίνουσα τάση

στα 100μΜ. Αντίθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α, εκδήλωσε ήδη από τα 30 πρώτα λεπτά, σημαντική μείωση (κατά $42,50 \pm 6,30\%^{**}$ στα 50μΜ και $53,50 \pm 3,30\%$ στα 100μΜ), η οποία συνεχίστηκε κατά ένα δόσοεξαρτώμενο πρότυπο. Η απόκριση και των δεικτών συνάδει με την κυτταροτοξική δράση, που παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερους χρόνους σε αυτές τις συγκεντρώσεις.



Εικόνα 35: Επίδραση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P στη pAkt και τον HIF-1α. Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν με 50 και 100μΜ B[α]P για 0,5-2 ώρες και, στη συνέχεια, ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt και του HIF-1α σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

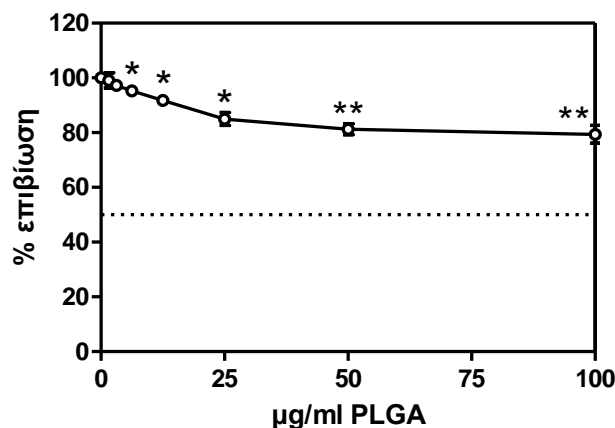
3.2.5. Συνδυαστική επίδραση B[α]P και τεχνητών νανοσωματιδίων PLGA-PEO.

Τα νανοσωματίδια PLGA είναι τεχνητά συμπολυμερή νανοσωματίδια γλυκολικού-γαλακτικού οξέος, τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα ως μεταφορείς φαρμακευτικών ουσιών, με έγκριση του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (FDA). Η χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων με τη χρήση νανοφορέων, κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο ιδιότητες αυτών των σκευασμάτων: αφενός στη δυνατότητα στόχευσής τους στον επιθυμητό ιστό, ώστε να απαιτούνται μικρότερες δόσεις και να αποφεύγονται οι συστηματικές παρενέργειες, και αφετέρου, στη δυνατότητα ελέγχου του ρυθμού απελευθέρωσης της φαρμακευτικής ουσίας. Ειδικότερα, τα νανοσωματίδια PLGA έχουν ένα επιπλέον πλεονέκτημα: τα προϊόντα διάσπασής τους – γλυκολικό και γαλακτικό οξύ – εισέρχονται φυσιολογικά στον κύκλο του Krebs, όπως και τα αντίστοιχα ενδογενή μόρια, ελαχιστοποιώντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες για τον οργανισμό.

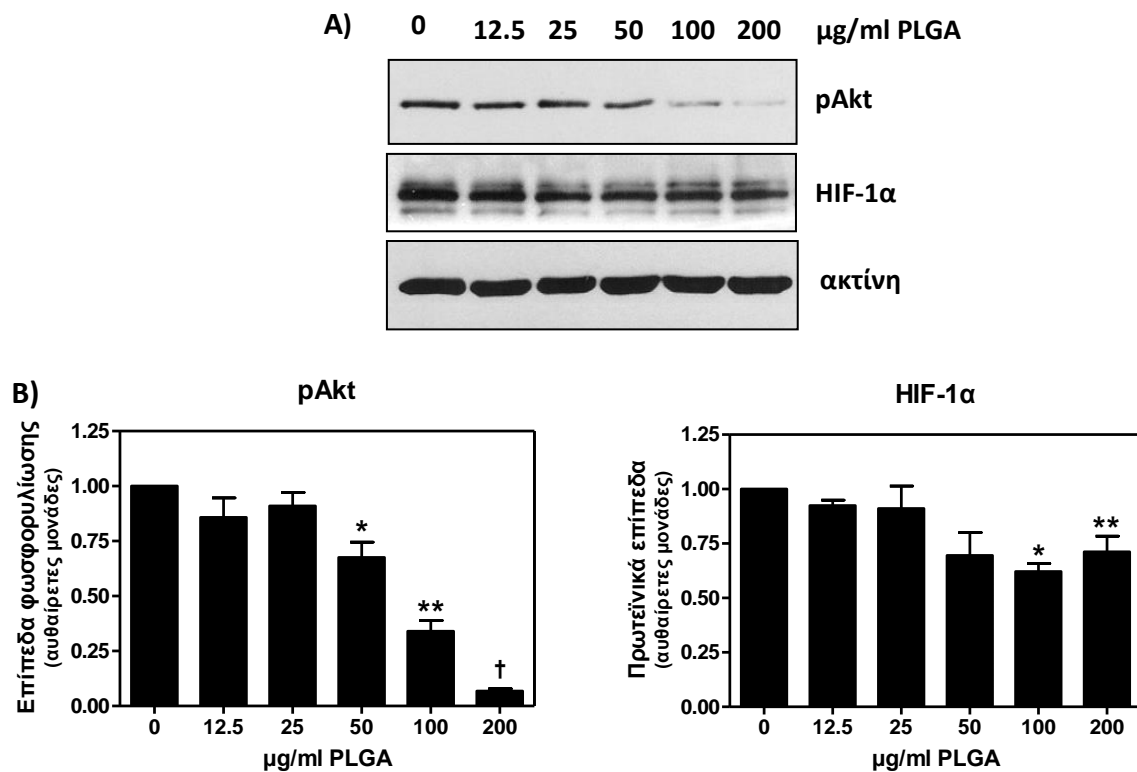
Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, τα σωματίδια αυτής της κλίμακας μεγέθους, χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα αυξημένη

τάση προσρόφησης άλλων μορίων στην επιφάνειά τους. Η ιδιότητα αυτή δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με τις επιπτώσεις που θα μπορούσε να έχει η προσρόφηση ατμοσφαιρικών ρύπων στην επιφάνεια των νανοσωματιδιακών φορέων, κυρίως στην περίπτωση εισπνεόμενων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο, αφού ελέγξαμε την επίδραση των νανοσωματιδίων PLGA μεμονωμένα, διερευνήσαμε την απόκριση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα στην ταυτόχρονη χορήγηση PLGA και B[α]P.

Επώαση των κυττάρων με 0-100μg/ml PLGA για 24 ώρες προκάλεσε ήπια κυτταροτοξική δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις, μειώνοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά $20,6 \pm 3,2\%^{**}$ στα 100μg/ml (**Εικόνα 36**). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο και αποδίδεται στη βιοδιασπώμενη φύση των σωματιδίων. Αντίστοιχα, σε μοριακό επίπεδο, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση, μόνο σε συγκεντρώσεις $\geq 100\mu\text{g/ml}$ (**Εικόνα 37**). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt ελαττώθηκε κατά ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο, παρουσία PLGA (**Εικόνα 37**). Ωστόσο, η αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού επιβίωσης PI3K/Akt δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση των κυττάρων.



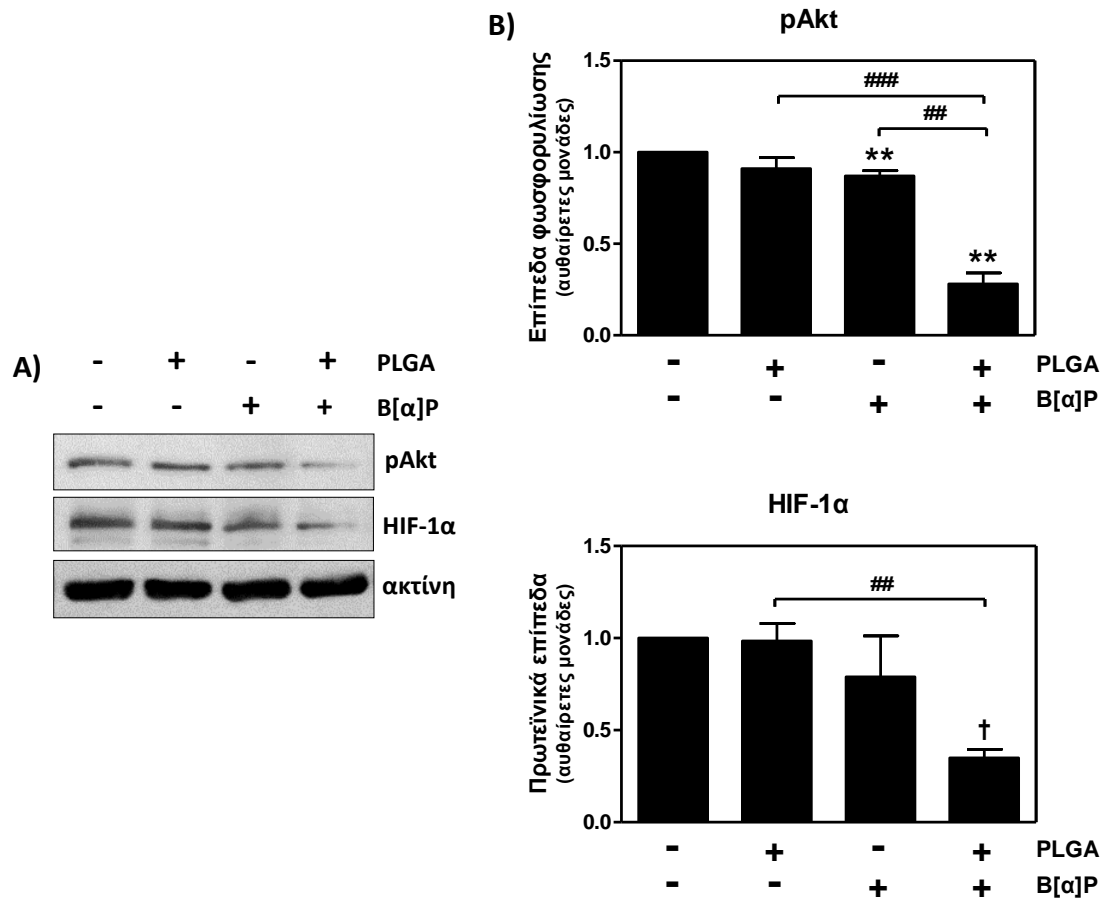
Εικόνα 36: Επίδραση των νανοσωματιδίων PLGA στη βιωσιμότητα των κυττάρων A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις PLGA (0-100μg/ml) για 24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)



Εικόνα 37: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση των νανοσωματιδίων PLGA στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της φωσφορυλιωμένης Akt. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις PLGA (0-200 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυψώματα κατά Western έναντι της φωσφορυλιωμένης κινάσης Akt και του HIF-1α. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. **(B)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυψωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με 25 $\mu\text{g/ml}$ PLGA (μη τοξική συγκέντρωση) και 20 μM B[α]P, για 24 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό, αλλά και με προσθήκη του κάθε χημικού παράγοντα ξεχωριστά. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 38**, η συνδυαστική επίδραση με PLGA και B[α]P μείωσε δραστηρικά, τόσο τη φωσφορυλίωση της Akt, όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α (72 \pm 6,1% και 65 \pm 4,6%, αντίστοιχα) σε σύγκριση με την απλή επίδραση με PLGA ή B[α]P. Αυτή η διαπίστωση έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με το πόσο ασφαλή είναι τελικά τα – θεωρητικά – ακίνδυνα τεχνητά νανοσωματίδια, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και τη νανοβιομηχανία, σε περίπτωση που συνδυαστούν με άλλα τοξικά σωματίδια της ατμόσφαιρας. Δεν αποκλείεται, η αλληλεπίδραση αυτή να οδηγεί στη συσσώρευση

και την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα των ατμοσφαιρικών ρύπων στον πνεύμονα και, κατά συνέπεια, στην ενίσχυση των επιβλαβών επιπτώσεών τους.



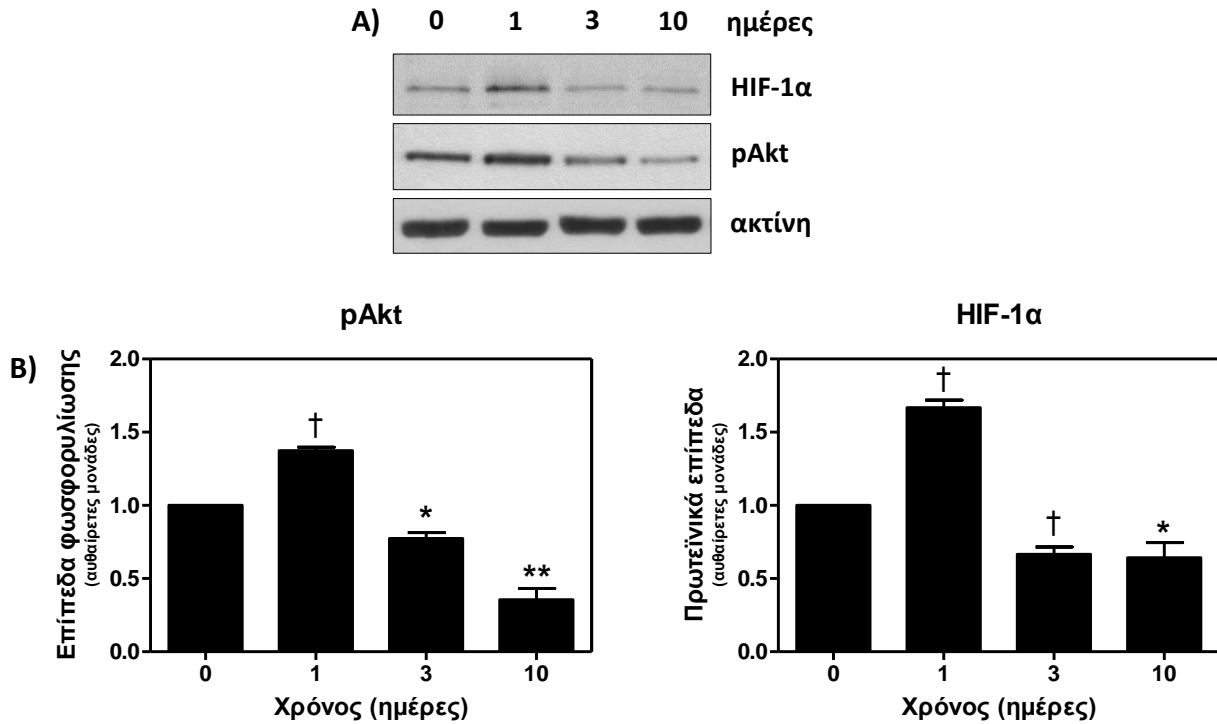
Εικόνα 38: Συνδυαστική επίδραση B[α]P και PLGA στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της pAkt. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 20μM B[α]P, 25μg/ml PLGA ή με το συνδυασμό τους, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western έναντι της φωσφορυλιωμένης κινάσης Akt και του HIF-1α. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. **(B)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (** $P < 0.01$, † $P < 0.001$ σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ σε σύγκριση με τα κύτταρα παρουσία μόνο B[α]P ή PLGA)

3.3. Επίδραση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P.

Το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων, εστιάστηκε στις χαμηλές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του B[α]P, που προσεγγίζουν περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες έκθεσης και, επιπλέον, ευνοούν την κυτταρική επιβίωση. Και σε αυτή την περίπτωση, εξετάστηκε η επίδραση του ρύπου σε σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες, που προωθούν την επιβίωση και την προστασία του κυττάρου έναντι του οξειδωτικού στρες. Παράλληλα με τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, διερευνήθηκαν οι αντίστοιχες αποκρίσεις σε επιθηλιακά κύτταρα δέρματος, καθώς και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες και από τους 2 ιστούς, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές μεταξύ ιστών ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτταρικών τύπων. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση του B[α]P στην ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} και η πιθανή συμμετοχή τους στις αποκρίσεις των, υπό μελέτη, μοριακών δεικτών, με έμφαση στην κινάση Akt και το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α. Τέλος, μελετήθηκε η απόκριση των παραπάνω δεικτών στο B[α]P παρουσία επιπρόσθετων στρεσογόνων συνθηκών, που προσομοιώνουν παθολογικές καταστάσεις.

3.3.1. Επίδραση της παρατεταμένης έκθεσης στο B[α]P, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της pAkt.

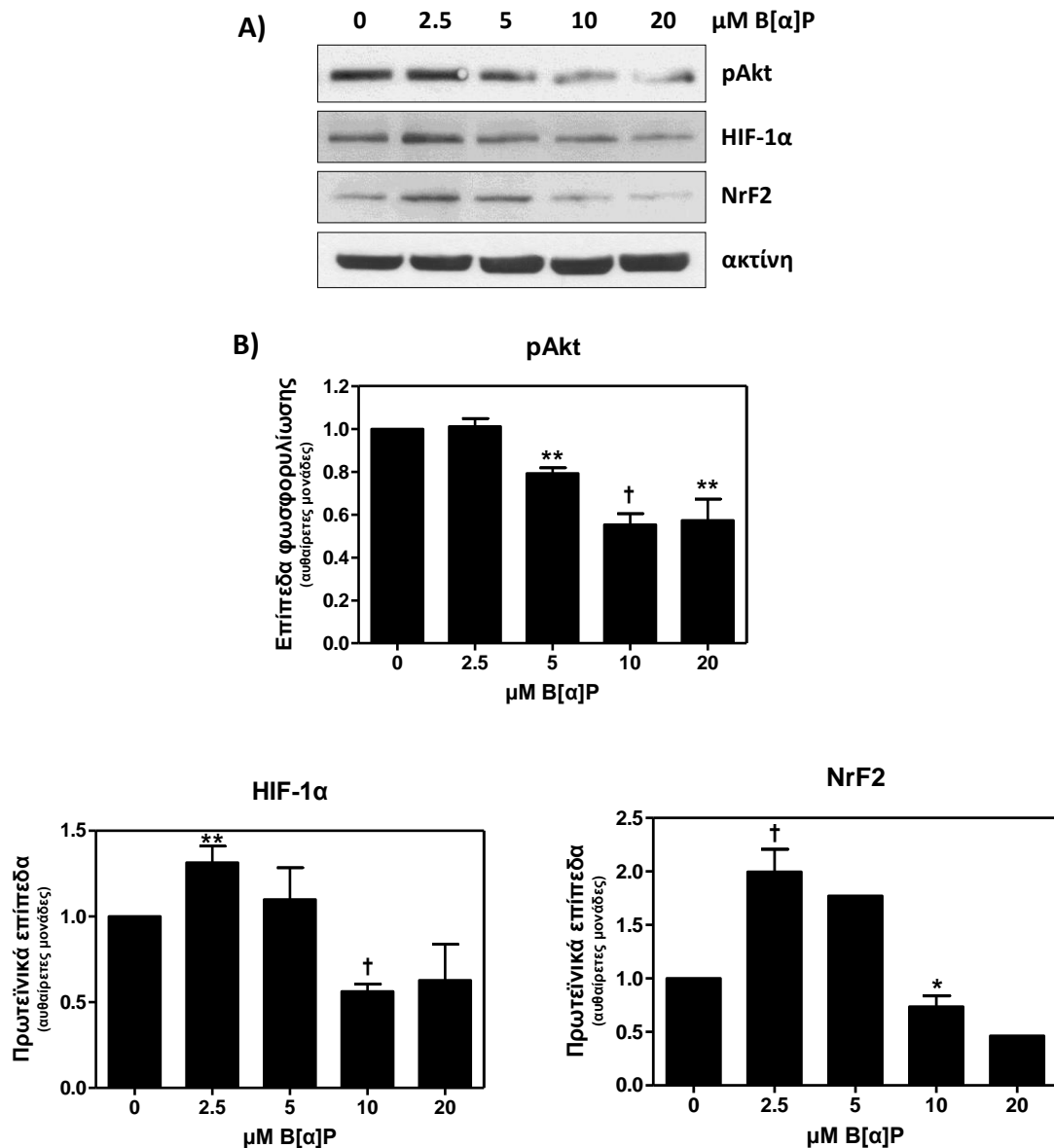
Είναι γεγονός, ότι στα αστικά κέντρα, η έκθεση ενός ατόμου στους ατμοσφαιρικούς ρύπους είναι χρόνια. Σε αυτό το πλαίσιο, τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν παρουσία χαμηλής, μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης B[α]P (2,5μM) για μεγάλο χρονικό διάστημα και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και pAkt ανιχνεύθηκαν μετά από 1, 3 και 10 ημέρες. Όπως διαπιστώθηκε, αν και οι δύο δείκτες επιβίωσης επάγονται στις 24 ώρες επώασης, η παρατεταμένη παρουσία του ρύπου οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων τους, σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 39**). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα δεδομένα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας, όπου, κατά τις 72 ώρες επώασης, η κυτταρική βιωσιμότητα – αν και βρίσκεται ακόμα σε υψηλά επίπεδα – εμφανίζει μια φθίνουσα τάση σε σύγκριση με τις 48 ώρες (**Εικόνα 31**). Είναι πιθανό το συσσωρευόμενο οξειδωτικό στρες κατά την παρατεταμένη έκθεση να υπερβαίνει την ικανότητα των προστατευτικών μηχανισμών του κυττάρου να το περιορίσουν.



Εικόνα 39: Επίδραση της παρατεταμένης έκθεσης στο Β[α]Ρ, στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της φωσφορυλιωμένης Akt. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 2,5μM Β[α]Ρ για 1, 3 και 10 ημέρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(Α)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western έναντι της φωσφορυλιωμένης Akt και του HIF-1α. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. **(Β)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

3.3.2. Επίδραση του Β[α]Ρ, στα ολικά επίπεδα των μοριακών δεικτών pAkt, HIF-1α και NrF2.

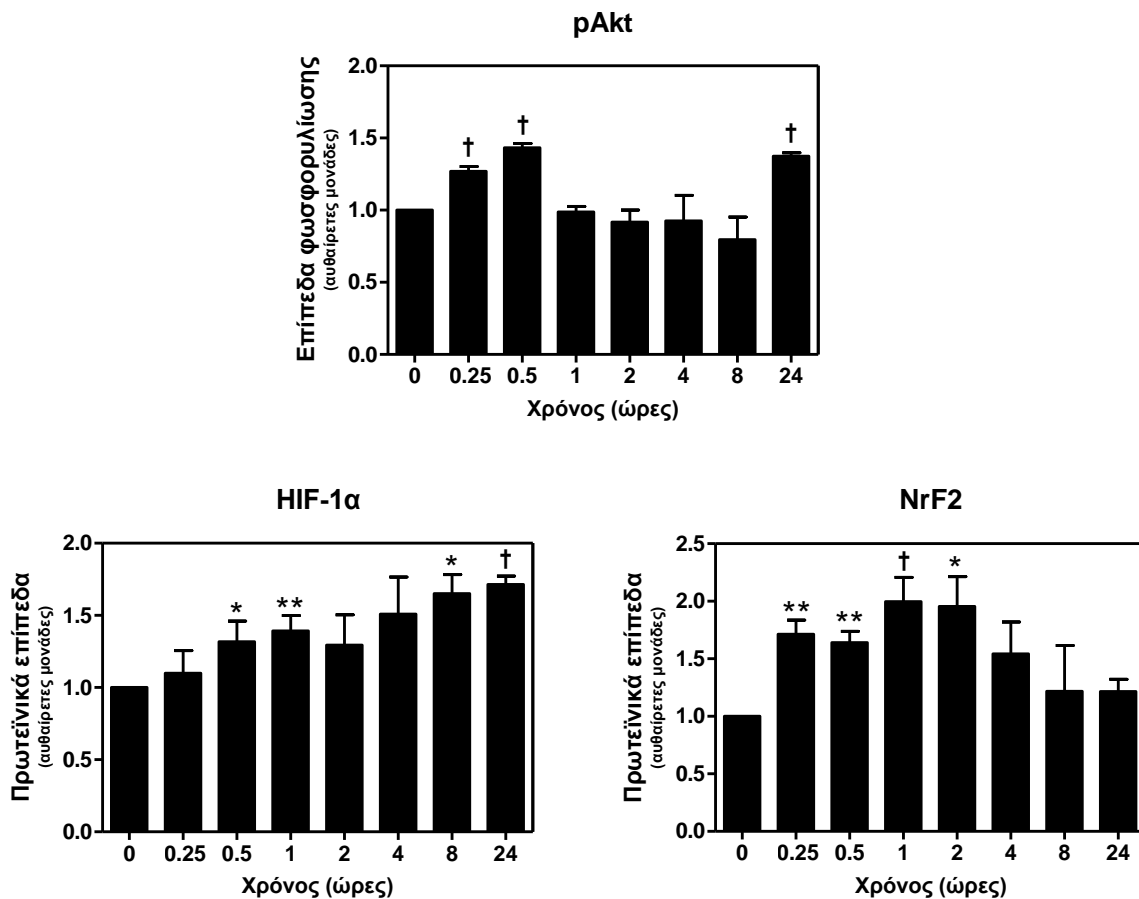
Παρατηρώντας την μείωση των δεικτών επιβίωσης ως αποτέλεσμα της συνεχούς, παρατεταμένης έκθεσης στον ρύπο, προσανατολιστήκαμε στον έλεγχο των αντίστοιχων αποκρίσεων σε σύντομα χρονικά διαστήματα επώασης. Άλλωστε, όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση των νανοσωματιδίων DEP, η χρόνια έκθεση στους ατμοσφαιρικούς ρύπους συνίσταται – ουσιαστικά – στην επανάληψη πολλών και σύντομων γεγονότων έκθεσης. Αρχικά, εξετάστηκε η απόκριση των κυττάρων A549 σε ένα εύρος συγκεντρώσεων Β[α]Ρ (0-20μM) για 1 ώρα. Όπως καταγράφεται στην **Εικόνα 40**, η συγκέντρωση των 2,5μM προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α ($1,32 \pm 0,09^{**}$) και NrF2 ($2,00 \pm 0,21^{\dagger}$), χωρίς, όμως, παράλληλη μεταβολή στη φωσφορυλίωση της Akt, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και οι τρεις δείκτες παρουσίασαν ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο μείωσης.



Εικόνα 40: Επίδραση του B[α]P στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt και στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και NrF2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων B[α]P (2,5-20μM) για 1 ώρα, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **(A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western έναντι της pAkt, του HIF-1α και του NrF2. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. **(B)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

Προκειμένου να εξεταστεί το ακριβές χρονοδιάγραμμα των παραπάνω αποκρίσεων κατά το πρώτο 24ωρο, πραγματοποιήθηκε χρονοεξαρτώμενη επώαση των κυττάρων παρουσία 2,5μM B[α]P (**Εικόνα 41**). Διαπιστώθηκε ότι η κινάση Akt παρουσιάζει μια άμεση, αλλά παροδική ενεργοποίηση, με μέγιστο στα 30 λεπτά

($1,43 \pm 0,03^\dagger$) και μια δευτερογενή επαγωγή στις 24 ώρες ($1,37 \pm 0,02^\dagger$). Τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α ακολουθούν ένα ομαλό, δοσοεξαρτώμενο πρότυπο αύξησης, η οποία, ανιχνεύεται ήδη από τα 30 λεπτά επώασης ($1,32 \pm 0,14^*$) και αγγίζει, στις 24 ώρες, το $1,71 \pm 0,05^\dagger$. Επιπλέον, ο NrF2 εμφανίζει μέγιστο στη 1 ώρα ($2,00 \pm 0,21^\dagger$), ενώ μετά τις 2 ώρες επανέρχεται στα επίπεδα του μάρτυρα. Η επαγωγή του NrF2 υποδηλώνει, και σε αυτή την περίπτωση, την ύπαρξη συνθηκών οξειδωτικού στρες.

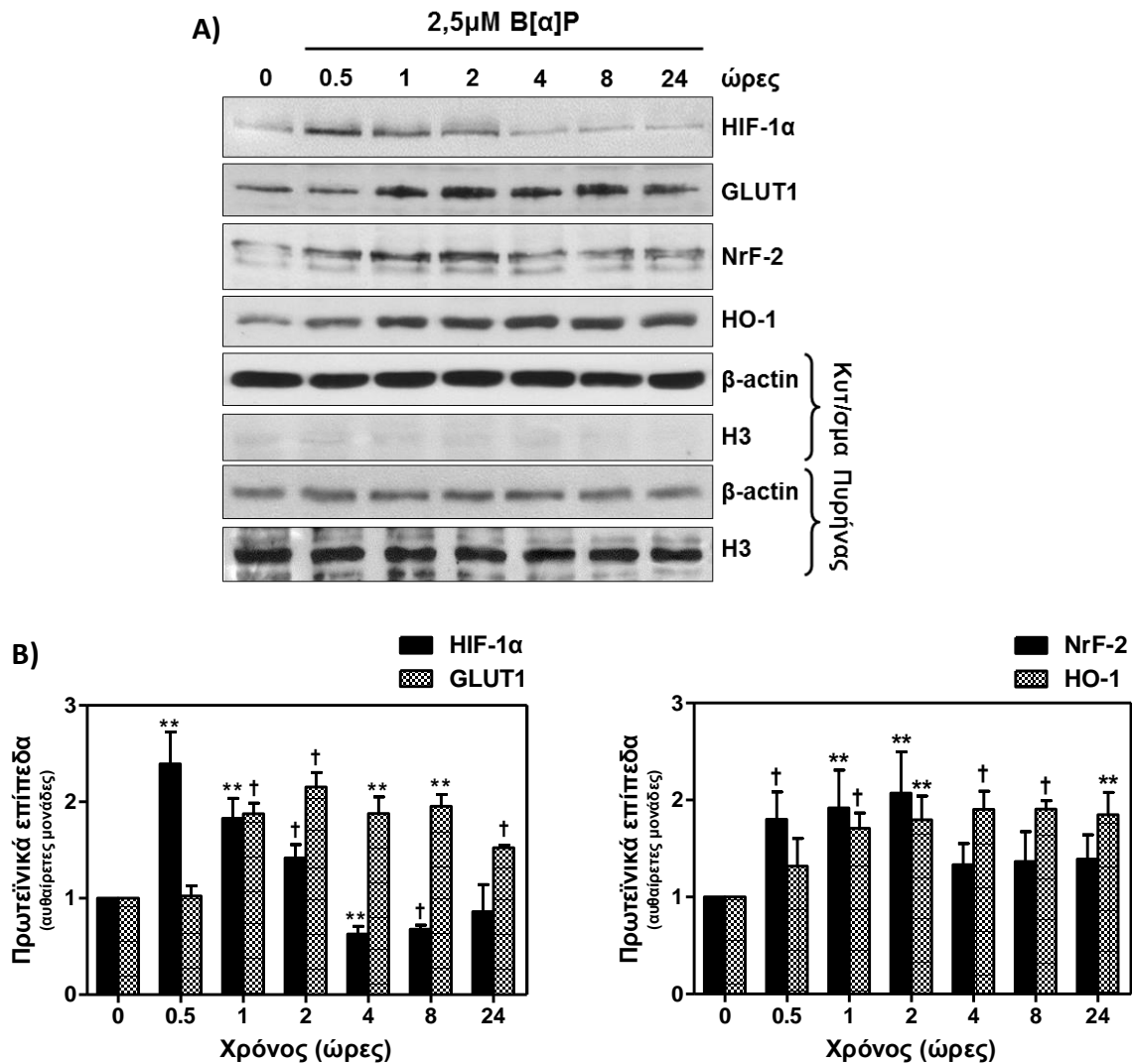


Εικόνα 41: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση του B[α]P στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt και στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και NrF2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 2,5μM B[α]P για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων κατά Western. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

3.3.3. Πυρηνικός εντοπισμός και μεταγραφική ενεργοποίηση των παραγόντων HIF-1α και NrF2.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αύξηση στα ολικά επίπεδα των δύο μεταγραφικών παραγόντων συνδέεται με την μεταγραφική τους ενεργοποίηση, τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν παρουσία 2,5μM B[α]P για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαφορική εκχύλιση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών. Στο πυρηνικό κλάσμα, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα των HIF-1α και NrF2, ώστε να επιβεβαιωθεί η συσσώρευσή τους στον πυρήνα, ενώ στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, ανιχνεύθηκαν τα προϊόντα δύο αντιπροσωπευτικών γονιδίων-στόχων τους: του μεταφορέα γλυκόζης, GLUT1 (στόχος του HIF-1α), και της οξυγενάσης της αίμης, HO-1 (στόχος του NrF-2) (**Εικόνα 42**).

Και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες παρουσίασαν άμεση συσσώρευση στον πυρήνα, με μέγιστο στα 30 λεπτά, για τον HIF-1α ($2,39 \pm 0,33^{**}$), και στις 2 ώρες, για τον NrF2 ($1,99 \pm 0,21^{**}$), ενώ μετά τις 2 ώρες επανήλθαν στα επίπεδα του μάρτυρα. Ο GLUT1 και η HO-1 εμφάνισαν στατιστικά σημαντική επαγωγή από τη 1 ώρα επώασης ($1,88 \pm 0,06^{\dagger}$ και $1,71 \pm 0,09^{\dagger}$, αντίστοιχα) και παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα, τουλάχιστον μέχρι τις 24 ώρες. Συνεπώς, η παροδική παρουσία των δύο μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα, είναι ικανή να ενεργοποιήσει την έκφραση γονιδίων-στόχων, τα προϊόντα των οποίων παραμένουν στο κυτταρόπλασμα για μεγάλο χρονικό διάστημα.

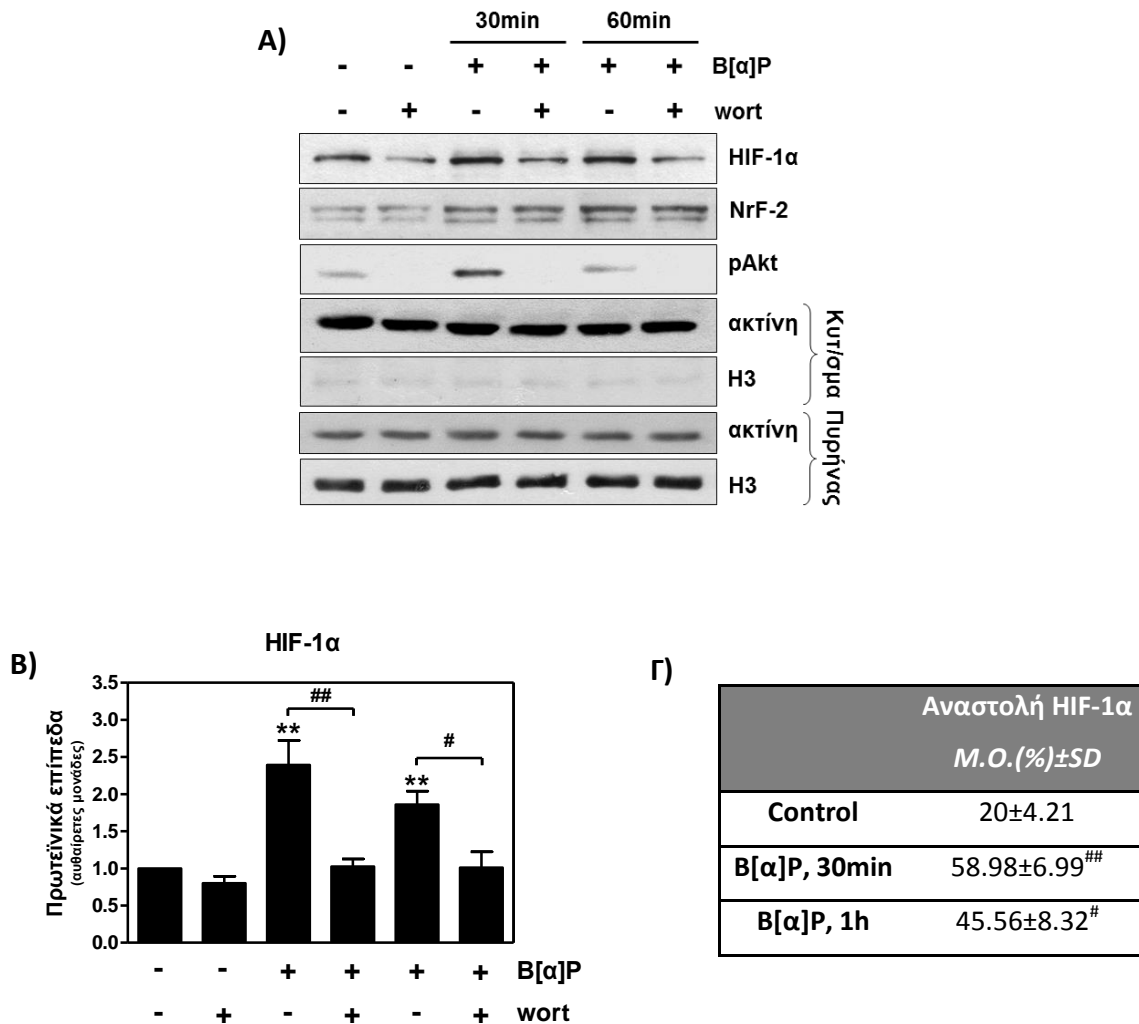


Εικόνα 42: Πυρηνικός εντοπισμός και μεταγραφική ενεργοποίηση των παραγόντων HIF-1α και NrF2. Τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν παρουσία 2,5μM B[α]P, για χρονικό διάστημα 0-24 ωρών, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε διαφορική εκχύλιση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, για τους μεταγραφικούς παράγοντες (HIF-1α, NrF-2) και τις πρωτεΐνες στόχους τους (GLUT-1, HO-1), αντίστοιχα. **(A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα ανοσοδοκιμασίας κατά Western. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών και η αποτελεσματικότητα της κλασμάτωσης, ελέγχθηκαν με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης και της ιστόνης H3. **(B)** Πυκνομετρική ανάλυση των ανοσοστυπωμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

3.3.4. Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στην επαγωγή των HIF-1α και NrF2.

Είναι βιβλιογραφικά γνωστό, ότι μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που δρουν αναρροϊκά των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και NrF2, συμπεριλαμβάνεται και το μονοπάτι PI3K/Akt. Συνεπώς, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η πρώτη ενεργοποίηση της Akt, να συμμετέχει στην επαγωγή των δύο

μεταγραφικών παραγόντων, παρουσία B[α]P. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα A549 επωάστηκαν με 2,5μM B[α]P για 30 λεπτά και 1 ώρα, παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα της PI3K, wortmannin, και ακολούθησε διαφορική εκχύλιση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών (**Εικόνα 43**).



Εικόνα 43: Διερεύνηση της συμμετοχής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt στην απόκριση του HIF-1α και του NrF2 στο B[α]P. Τα κύτταρα A549 επωάστηκαν με 2,5μM B[α]P για 30 λεπτά και 1 ώρα, παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα της PI3K, wortmannin (wort) σε συγκέντρωση 100nM. Σε κάθε περίπτωση, η wort προστέθηκε στην καλλιέργεια 30 λεπτά πριν το B[α]P. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό και κύτταρα, που επωάστηκαν με τον αναστολέα για 1,5 ώρα. **A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι της κυτταροπλασματικής pAkt και των πυρηνικών επιπέδων των HIF-1α και NrF2. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών και η διαφορική κλασμάτωση, ελέγχθηκαν με ανίχνευση της ακτίνης και της ιστόνης H3. **B)** Πυκνομετρική ανάλυση των πυρηνικών πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α. **Γ)** Ποσοστά αναστολής του HIF-1α, παρουσία wortmannin. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (*P<0.05, **P<0.01, †P<0.001 και #P<0.05, ##P<0.01)

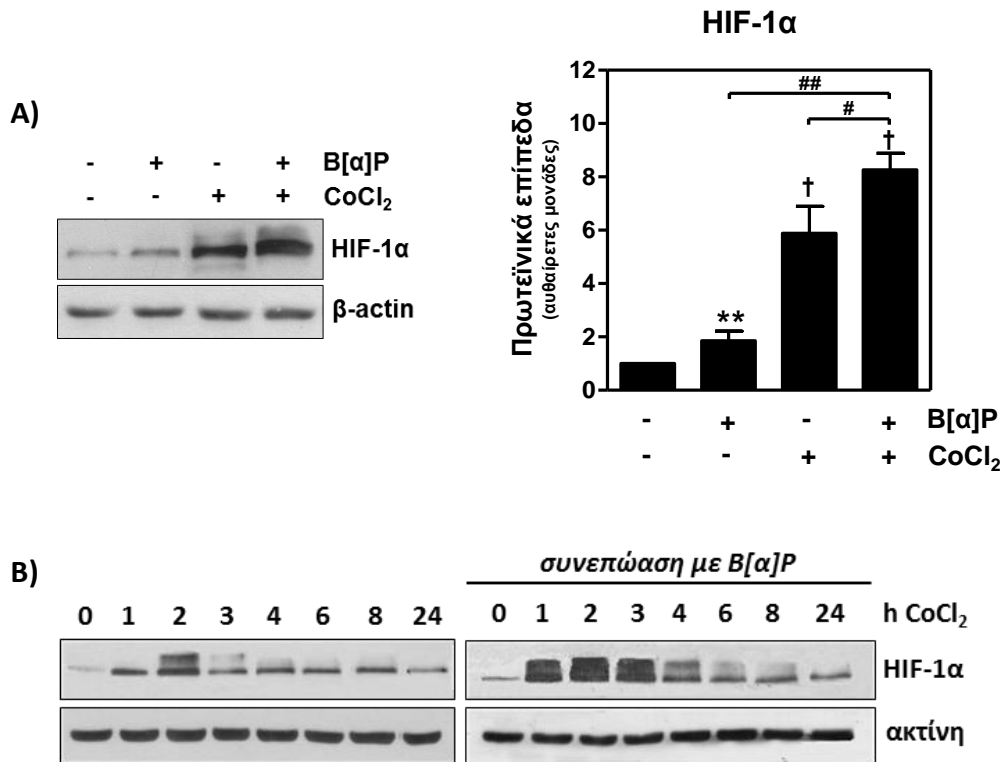
Όπως ήταν αναμενόμενο, η αναστολή της PI3K εκμηδένισε τη φωσφορυλίωση της Akt. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, σε αυτές τις συνθήκες, ανεστάλη πλήρως και η συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, υποδηλώνοντας τον καθοριστικό ρόλο του μονοπατιού PI3K/Akt στη διαμόρφωση της απόκρισης του HIF-1α στο ρύπο. Μείωση (κατά $20\pm 4,21\%$) παρατηρήθηκε και στα βασικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα, ωστόσο, το ποσοστό της αναστολής, παρουσία του B[α]P, ήταν υπερδιπλάσιο (κατά $58,98\pm 6,99\%$ και $45,56\pm 8,32\%$ στα 30 λεπτά και τη 1 ώρα, αντίστοιχα). Αντίθετα, η επαγωγή του NrF2, παρουσία B[α]P, φαίνεται μεσολαβείται από διαφορετικά αναρροϊκά μονοπάτια στο παρόν σύστημα, καθώς παρέμεινε ανεπηρέαστη από τη wortmannin.

3.3.5. Συνδυαστική επίδραση B[α]P και άλλων στρεσογόνων συνθηκών.

3.3.5.1. Υποξικές συνθήκες

Οι υποξικές συνθήκες χαρακτηρίζουν πολλές παθολογικές καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως το άσθμα, η κυστική ίνωση, αλλά και ο καρκίνος. Επιπλέον, η συσσώρευση των ρύπων στις αναπνευστικές επιφάνειες του πνεύμονα, είναι, επίσης, ικανή να μειώσει τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου στην περιοχή. Συνεπώς, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί κατά πόσο, ατμοσφαιρικοί ρύποι, όπως το B[α]P, θα μπορούσαν να επιφέρουν περαιτέρω βλάβες σε άτομα με ανάλογη παθολογία.

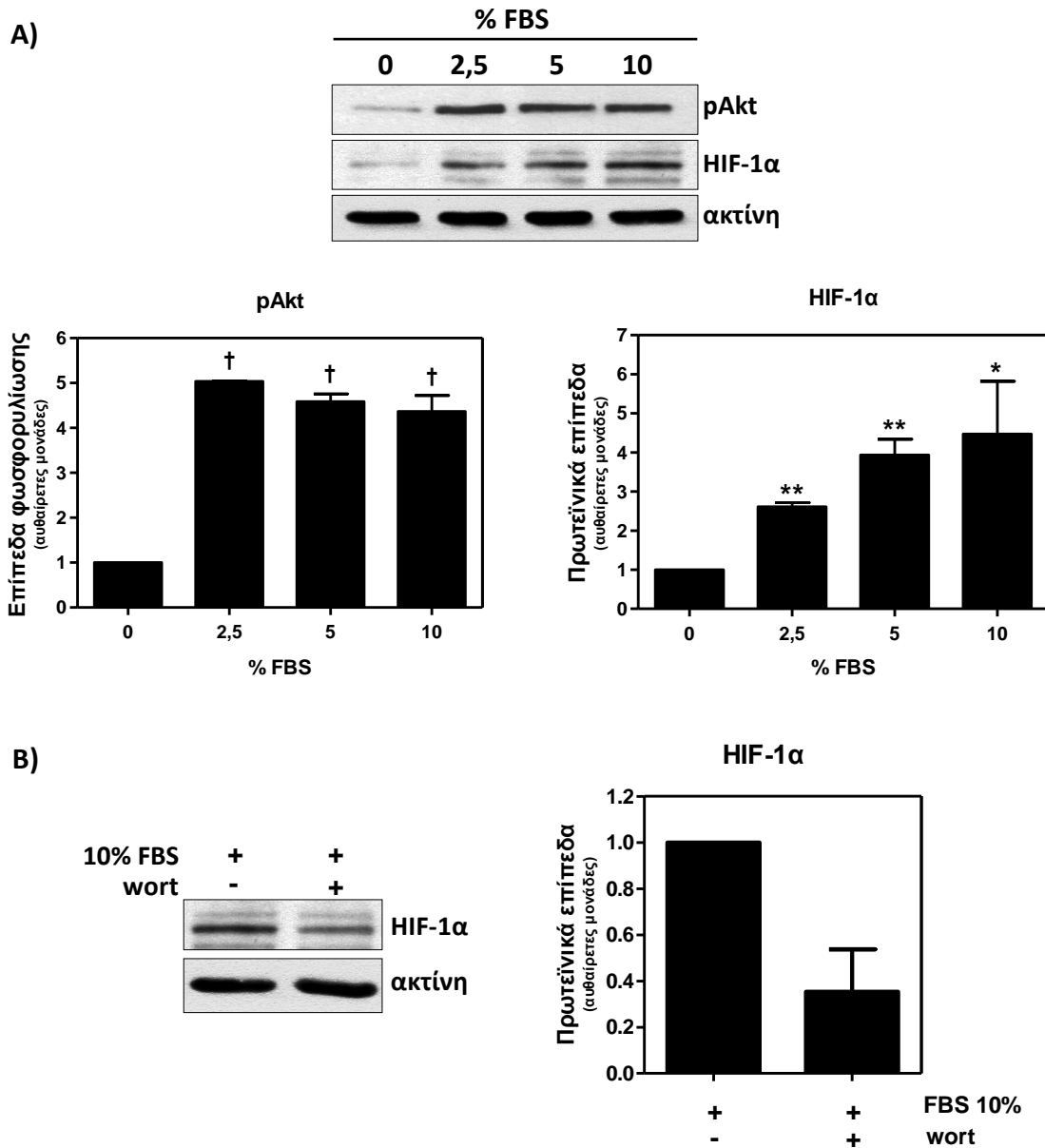
Προκειμένου να προσομοιωθούν οι συνθήκες ήπιας υποξίας *in vitro*, επιλέχθηκε μια συγκέντρωση CoCl_2 , η οποία να επάγει σημαντικά τον HIF-1α, χωρίς, όμως, να επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση. Ειδικότερα, τα κύτταρα A549 προεπώαστηκαν για 1 ώρα με το μιμητικό υποξίας CoCl_2 ($50\mu\text{M}$) και, στη συνέχεια, προστέθηκε B[α]P ($2,5\mu\text{M}$) για 1 επιπλέον ώρα (**Εικόνα 44A**). Ακολούθησε εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών εστιάζοντας στην ανίχνευση του HIF-1α, που, όπως προαναφέρθηκε, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση και την καρκινογένεση. Όπως ήταν αναμενόμενο, το CoCl_2 , μεμονωμένα, οδήγησε σε μαζική συσσώρευση του HIF-1α ($5,90\pm 1,01^\dagger$). Παρόλα αυτά, η παρουσία του B[α]P έδρασε αθροιστικά, επιφέροντας στατιστικά σημαντική περαιτέρω αύξηση στα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα ($8,26\pm 0,62^\dagger$). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται και από το χρονικό πρότυπο απόκρισης του HIF-1α, στην ταυτόχρονη επίδραση των δύο χημικών παραγόντων (**Εικόνα 44B**). Συγκεκριμένα, κατά την συνεπώαση των κυττάρων με B[α]P ($2,5\mu\text{M}$) και CoCl_2 ($50\mu\text{M}$), για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, παρατηρήθηκε επιπρόσθετη αύξηση του HIF-1α, σε σύγκριση με τη μεμονωμένη επίδραση του μιμητικού υποξίας, σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 44: Επίδραση του B[α]P στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Α) Τα κύτταρα A549 προεπώαστηκαν με CoCl₂ (50μM) για 1 ώρα και, στη συνέχεια, προστέθηκε B[α]P (2,5μM) για 1 επιπλέον ώρα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western και πυκνομετρική ανάλυση του HIF-1α. **Β)** Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν με CoCl₂ (50μM), παρουσία ή απουσία B[α]P (2.5μM) για 0-24 ώρες. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western. Σε κάθε περίπτωση, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό και το ισόποσο φόρτωμα του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ελέγχθηκε με την ανίχνευση της ακτίνης. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (**P<0.01, †P<0.001 και #P<0.05, ##P<0.01)

3.3.5.2. Απουσία αυξητικών παραγόντων

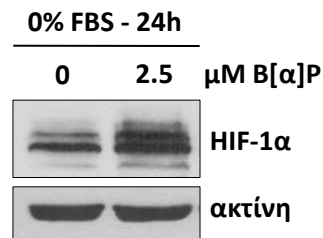
Μια επιπλέον στρεσογόνος συνθήκη, που επιλέχθηκε να μελετηθεί είναι η στέρηση των αυξητικών παραγόντων του ορού. In vivo, οι αυξητικοί παράγοντες μεταφέρονται στα κύτταρα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Συνεπώς, στην περίπτωση του πνεύμονα, μια παρόμοια στρεσογόνος κατάσταση θα μπορούσε να προκύψει ως αποτέλεσμα της αλλαγής της πνευμονικής πίεσης, ή της εμβολής κάποιου αγγείου στην περιοχή. Επιπλέον, βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά και πειράματα του εργαστηρίου μας σε πολυάριθμα κυτταρικά συστήματα, μεταξύ των οποίων και τα A549, έχουν αποδείξει οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν θετικά τα επίπεδα του HIF-1α, μέσω ενός μηχανισμού, που μεσολαβείται, σε μεγάλο βαθμό, από το μονοπάτι PI3K/Akt (**Εικόνα 45**).



Εικόνα 45: Επίδραση των αυξητικών παραγόντων του ορού, στους δείκτες επιβίωσης pAkt και HIF-1α. A) Τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες στέρησης ορού και στη συνέχεια προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ορού για 2 ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που παρέμειναν σε θρεπτικό υλικό με 0% FBS. **B)** Κύτταρα A549 επώαστηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (10% FBS), παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα της PI3K, wortmannin (wort, 100nM) για 30 λεπτά. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα και πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

Προκειμένου, να διερευνηθεί αν η επαγωγή του HIF-1α από το B[α]P, διατηρείται ακόμα και σε συνθήκες μη-ευνοϊκές για την έκφρασή του, τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού (0% FBS) για 24 ώρες και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επίδραση με 2,5μM B[α]P για 24 επιπλέον ώρες. Πράγματι, όπως καταγράφεται στην **Εικόνα 46**, το B[α]P ενίσχυσε τα πρωτεϊνικά

επίπεδα του HIF-1 α , και, μάλιστα, κατά ~12% περισσότερο, σε σύγκριση με την επίδραση σε πλήρες θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 46: Επίδραση του B[a]P στον HIF-1 α , σε συνθήκες στέρησης αυξητικών παραγόντων. Τα κύτταρα A549, επώαστηκαν με 2,5 μM B[a]P, για 24 ώρες, σε θρεπτικό υλικό, απουσία ορού (FBS). Ακολούθησε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών και ανίχνευση των επιπέδων του HIF-1 α . Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση της ακτίνης. Τα ανοσοστυπώματα είναι αντιπροσωπευτικά, τουλάχιστον τριών, ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.3.6. Επίδραση του B[a]P σε διαφορετικά κυτταρικά είδη

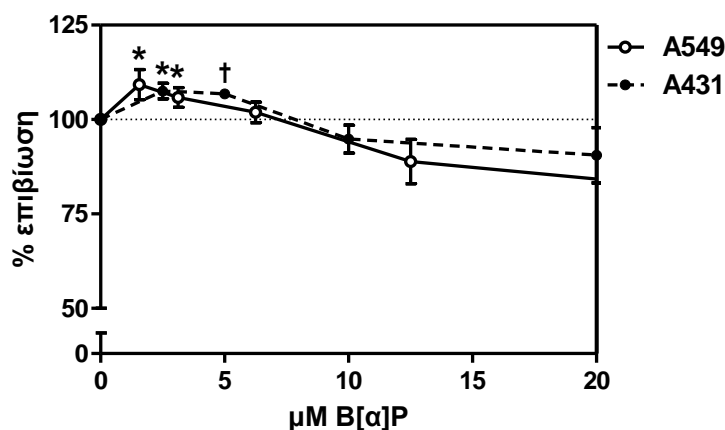
Παράλληλα με τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, στο πειραματικό υλικό προστέθηκε και μια κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων δέρματος, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών και από τους δύο ιστούς, προκειμένου να ελεγχθούν τυχόν διαφορές μεταξύ κυτταρικών τύπων και ιστών. Τέλος, επεκτείνοντας τη μελέτη και σε άλλους οργανισμούς, εξετάστηκε η επίδραση του B[a]P σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες αρουραίου.

3.3.6.1. Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα δέρματος

Το δέρμα, ως ένας ιστός άμεσα εκτεθειμένος στο περιβάλλον, αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό στόχο των ατμοσφαιρικών ρύπων. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση των χημικών ρύπων σε κύτταρα δέρματος εξακολουθούν να είναι ιδιαίτερα ελλειπή. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος δέρματος, A431, προκειμένου να μελετήσουμε τις αποκρίσεις των επιδερμικών κυττάρων στο B[a]P και να τις συγκρίνουμε με τις αντίστοιχες του πνεύμονα.

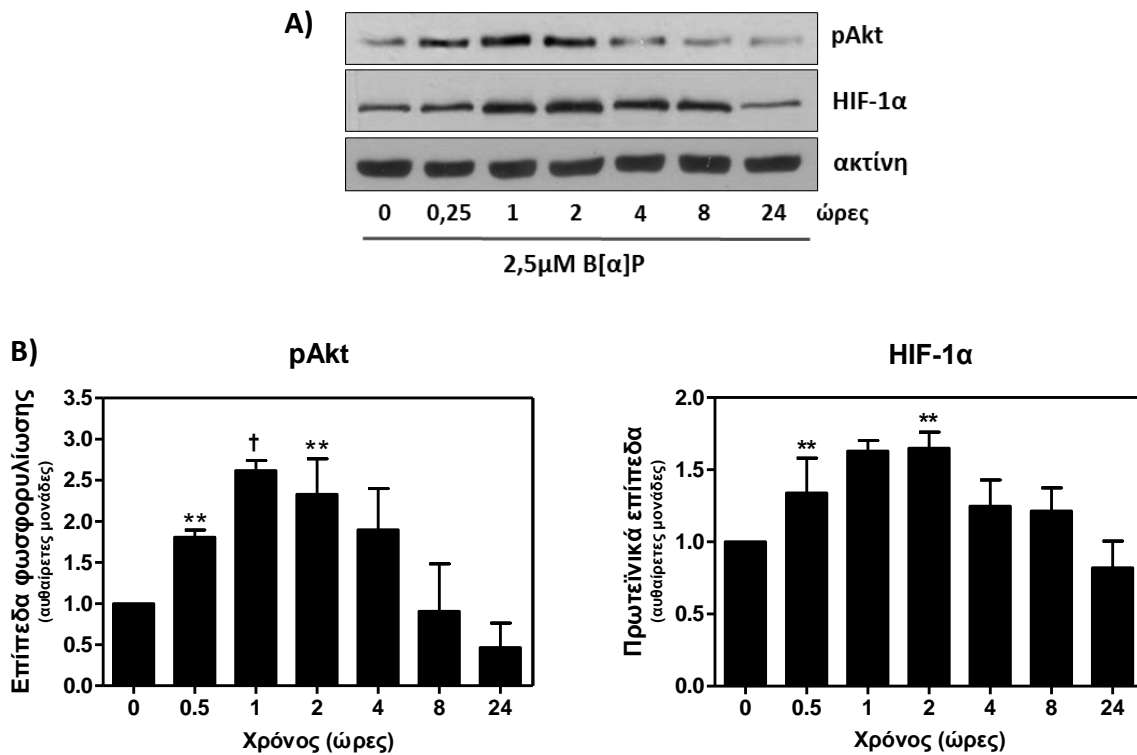
Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του B[a]P στη βιωσιμότητα των κυττάρων A431, ύστερα από έκθεσή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ρύπου (0-20 μM) για 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 47**, τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος παρουσίασαν ένα σχεδόν πανομοιότυπο πρότυπο απόκρισης με τα πνευμονικά. Και σε αυτή την περίπτωση, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του ρύπου ($\leq 7\mu\text{M}$) οδήγησαν σε μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της επιβίωσης (με μέγιστο στα 2,5 μM :

107,51±2,07%* σε σύγκριση με το μάρτυρα), ενώ οι υψηλότερες δόσεις εκδήλωσαν ήπια κυτταροτοξική δράση.



Εικόνα 47: Δοσο-εξαρτώμενη επίδραση του B[a]P στη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων δέρματος, A431, και σύγκριση με τα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, A549. Οι δύο κυτταρικές σειρές επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις B[a]P για 24 ώρες και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η βιωσιμότητά τους με τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, MTT. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0.05$, † $P < 0.001$)

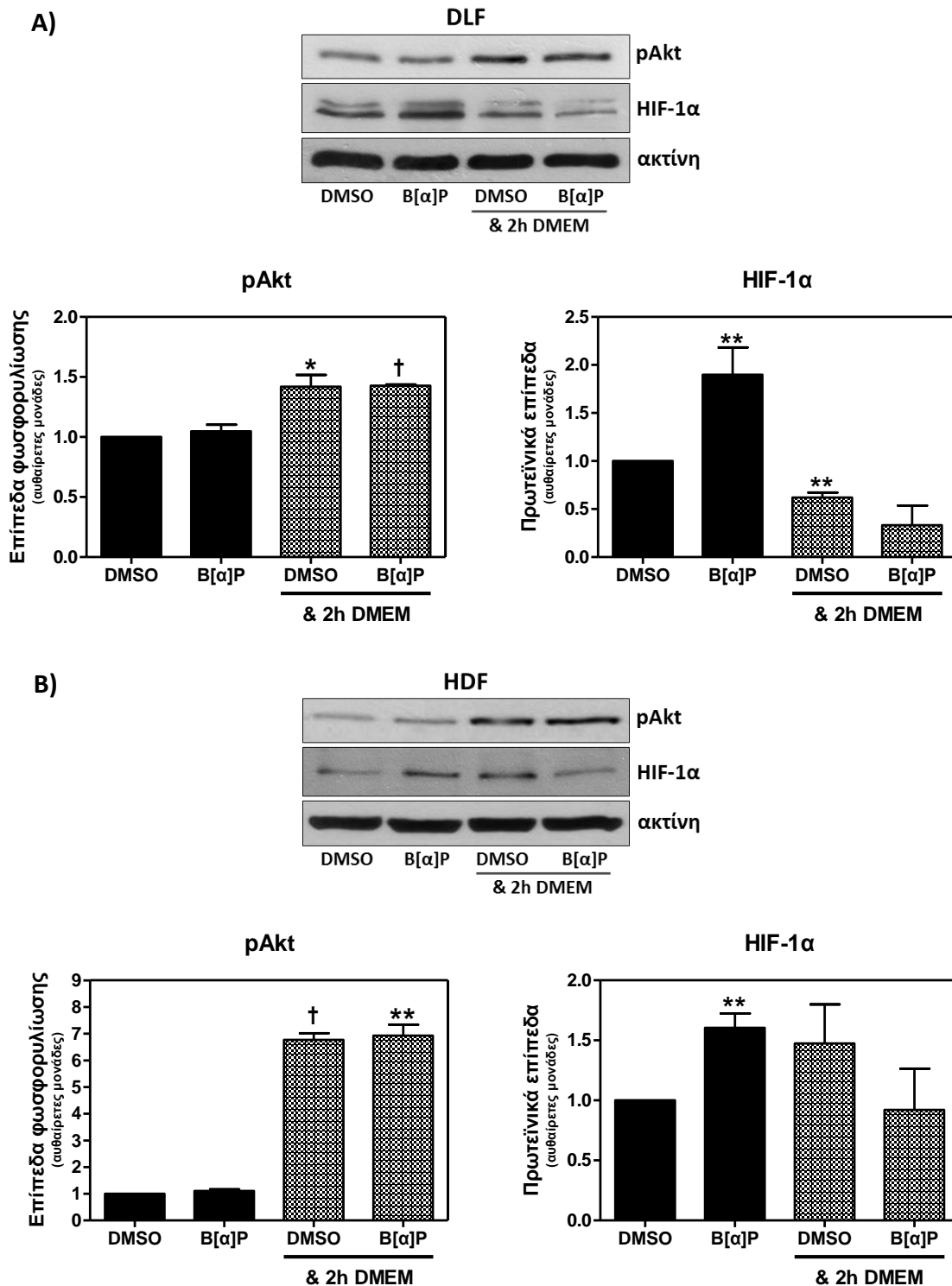
Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων του πνεύμονα, εστιάσαμε στην επίδραση του B[a]P στους δείκτες Akt και HIF-1α. Τα κύτταρα A431 επώαστηκαν με 2,5μM B[a]P για 15 λεπτά έως 24 ώρες, και ακολούθησε εκχύλιση των ολικών τους πρωτεϊνών. Σε αναλογία με τα πνευμονικά κύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, η Akt παρουσίασε ένα παροδικό πρότυπο απόκρισης (**Εικόνα 48**). Ωστόσο, στα A431 παρατηρείται πιο έντονη φωσφορυλίωση, με μέγιστο ($2.61 \pm 0.21^\dagger$) στη 1 ώρα, η οποία διατηρείται σε επίπεδα υψηλότερα του μάρτυρα μέχρι και τις 4 ώρες. Αντίθετα, η μέγιστη ενεργοποίηση της Akt στα A549 ήταν μικρότερης διάρκειας και η μέγιστη τιμή της ήταν χαμηλότερη κατά 36% ($1.67 \pm 0.05^\dagger$). Διαφορές εντοπίστηκαν και στο πρότυπο απόκρισης του HIF-1α, στις ίδιες συνθήκες. Σε αντίθεση με την δοσοεξαρτώμενη απόκριση στα A549, στα κύτταρα A431 παρατηρήθηκε παροδική συσσώρευση των ολικών επιπέδων του HIF-1α, με μέγιστο στις 2 ώρες επώασης ($1,65 \pm 0,11^{**}$) και σταδιακή επαναφορά στα επίπεδα του μάρτυρα.



Εικόνα 48: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση του B[a]P στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt και στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, στα επιθηλιακά κύτταρα δέρματος. Τα κύτταρα A431 καλλιεργήθηκαν παρουσία 2,5μM B[a]P για 0-24 ώρες, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Α) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western. Β) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανίχνευση των επιπέδων της ακτίνης. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

3.3.6.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα και δέρματος

Οι ινοβλάστες, αν και βρίσκονται βυθισμένοι στον συνδετικό ιστό, μπορούν να έρθουν σε επαφή με τους νανοσωματιδιακούς ρύπους και τα συστατικά τους, είτε μέσω διάχυσής τους από την επιθηλιακή στιβάδα, είτε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση του B[a]P στους φυσιολογικούς ινοβλάστες πνεύμονα (DLF), που χρησιμοποιήθηκαν και στην μελέτη των νανοσωματιδίων DEP, αλλά και σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος (Human Dermal Fibroblasts, HDF). Οι πρωτογενείς καλλιέργειες επώαστηκαν, παρουσία 2,5μM B[a]P για 24 ώρες, και στη συνέχεια ο ρύπος απομακρύνθηκε και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν, για 2 επιπλέον ώρες, σε φρέσκο θρεπτικό υλικό. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν, τόσο μετά την 24ωρη επώαση, όσο και μετά την ανανέωση του θρεπτικού υλικού. Σκοπός του πειράματος ήταν η συγκριτική καταγραφή της επίδρασης του B[a]P στα κύτταρα αυτά, και, παράλληλα, ο έλεγχος της διατήρησης των αλλαγών μετά την απομάκρυνση του ρύπου.



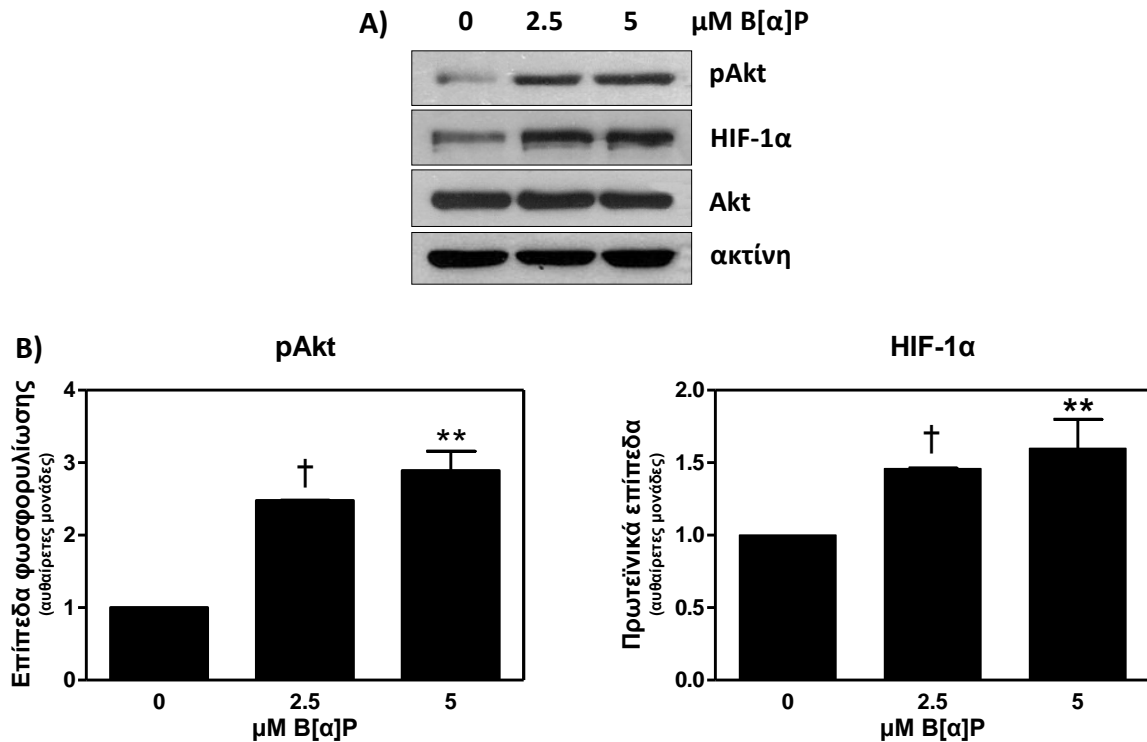
Εικόνα 49: Επίδραση του B[α]P σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών A) πνεύμονα (DLF) και B) δέρματος (HDF). Οι ινοβλάστες επώαστηκαν παρουσία 2,5μM B[α]P για 24 ώρες και στη συνέχεια, ο ρύπος απομακρύνθηκε με ανανέωση του θρεπτικού υλικού για 2 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών και ανοσοσύτωμα κατά Western για τη pAkt και τον HIF-1α. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοσύτωματα και πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD) (*P<0.05, **P<0.01, †P<0.001)

Σε κάθε περίπτωση, το B[α]P δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια μεταβολή στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt μετά από 24 ώρες (**Εικόνα 49**). Αυτό, βέβαια, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο παροδικής ενεργοποίησης της κινάσης σε μικρότερους χρόνους, όπως συμβαίνει, συνήθως, με τα σηματοδοτικά μόρια. Η ανανέωση του μέσου καλλιέργειας οδήγησε σε επαγωγή των βασικών επιπέδων της pAkt. Αυτή η απόκριση ήταν αναμενόμενη, λόγω της προσθήκης νέων αυξητικών παραγόντων, που περιέχονται στον ορό (FBS) και ανεξάρτητη της προεπάσης με το B[α]P. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε αντιστοιχία με τα επιθηλιακά κύτταρα, οι επιδερμικοί ινοβλάστες, αποκρίνονται πιο έντονα σε σύγκριση με τους πνευμονικούς.

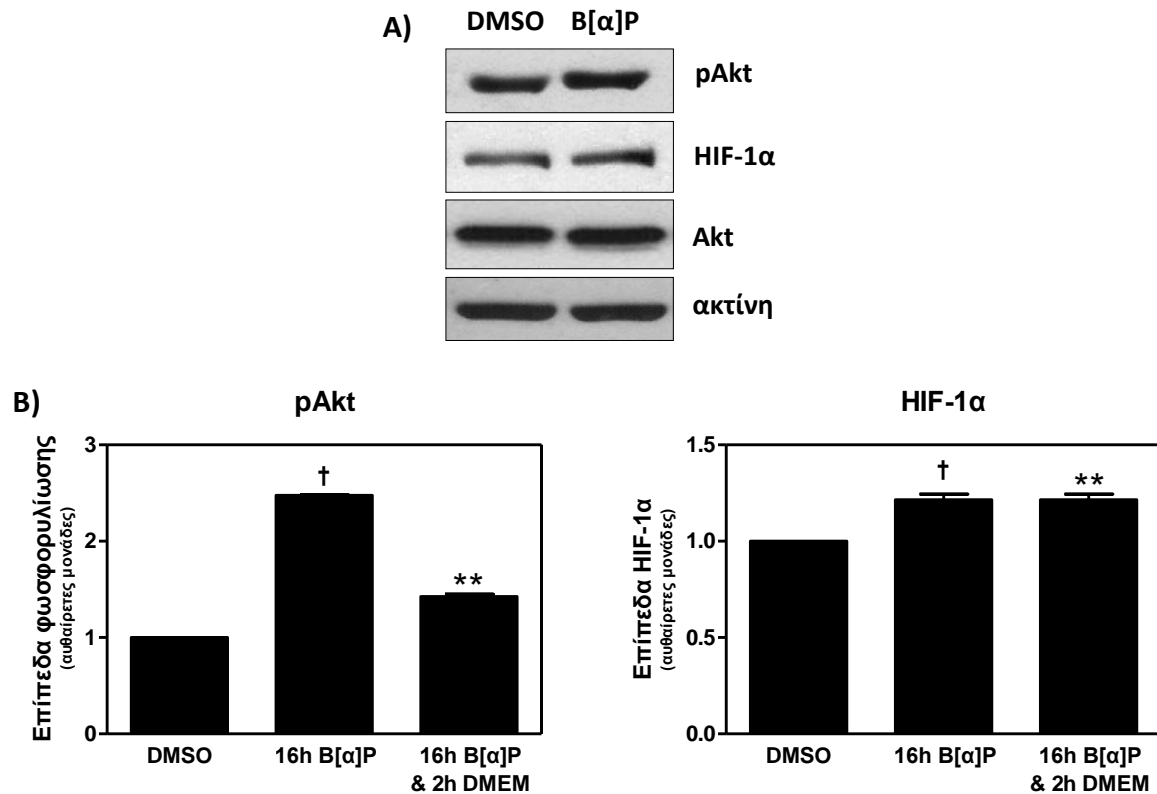
Σε αντίθεση με την Akt, τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση, παρουσία B[α]P για 24 ώρες και στους δύο τύπους ινοβλαστών ($1.90 \pm 0.63^{**}$ και $1.61 \pm 0.19^{**}$ στους DLF και HDF, αντίστοιχα) (**Εικόνα 49**). Αυτή η αλλαγή, όμως, δεν φαίνεται να είναι μόνιμη, καθώς η ανανέωση του θρεπτικού υλικού αναστέλλει πλήρως τη συσσώρευση του HIF-1α στους προ-επωασμένους ινοβλάστες. Συνεπώς, οι μεταβολές που προκαλούνται, τουλάχιστον μέχρι τις 24 ώρες έκθεσης, είναι αναστρέψιμες και άμεσα εξαρτώμενες από την παρουσία του ρύπου στο μέσο καλλιέργειας.

3.3.6.3. Πνευμονικοί ινοβλάστες αρουραίου

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του B[α]P και σε κύτταρα άλλων οργανισμών, χρησιμοποιήθηκε μια πρωτογενής καλλιέργεια πνευμονικών ινοβλαστών αρουραίου. Και σε αυτή την περίπτωση, το B[α]P εκδήλωσε ένα προ-καρκινικό προφίλ, σε συγκεντρώσεις 2,5 και 5μM, επάγοντας τους δείκτες HIF-1α ($1,45 \pm 0,002^{\dagger}$ και $1,60 \pm 0,20^{**}$, αντίστοιχα) και pAkt ($2,48 \pm 0,01^{\dagger}$ και $2,89 \pm 0,26^{**}$, αντίστοιχα), μετά από 16 ώρες επάσης (**Εικόνα 50**). Όσον αφορά, ειδικότερα στη pAkt, το αποτέλεσμα αυτό δεν συμβαδίζει με την απόκριση των ανθρώπινων ινοβλαστών (**Εικόνα 49**). Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, απαιτείται διερεύνηση της απόκρισης της κινάσης και σε μικρότερους χρόνους επάσης, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το σύστημα των ανθρώπινων ινοβλαστών. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αύξηση της pAkt και του HIF-1α διατηρούνται – εν μέρει – ύστερα από την απομάκρυνση του ρύπου με ανανέωση του θρεπτικού υλικού για 2 ώρες (**Εικόνα 51**).



Εικόνα 50: Δοσο-εξαρτώμενη επίδραση του B[α]P στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt και στα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α στους ανθρώπινους πρωτογενείς ινοβλάστες δέρματος. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 2,5 και 5μM B[α]P για 16 ώρες και ακολούθησε εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. **A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western. **B)** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με την ανίχνευση της ακτίνης. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (** $P < 0.01$, † $P < 0,001$)



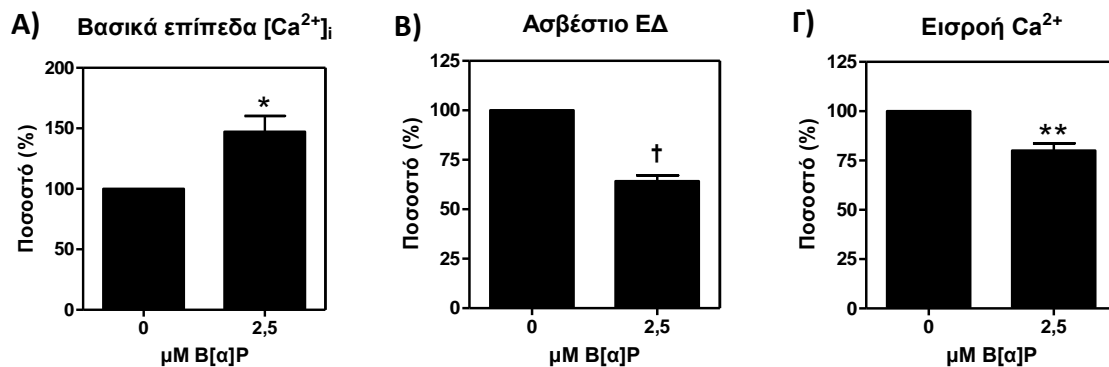
Εικόνα 51: Διαμόρφωση της απόκρισης της pAkt και του HIF-1α, μετά την απομάκρυνση του B[α]P από το μέσο καλλιέργειας. Οι πνευμονικοί ινοβλάστες αρουραίου επωάστηκαν με 2,5μM B[α]P για 16 ώρες και, στη συνέχεια, ο ρύπος απομακρύνθηκε με ανανέωση του θρεπτικού υλικού για 2 επιπλέον ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε DMSO για 18 ώρες. **A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western. **B)** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με την ανίχνευση της ακτίνης. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (** $P < 0.01$, † $P < 0.001$)

3.3.7. Επίδραση του B[α]P στην ομοίωση των ιόντων ασβεστίου

Όπως προαναφέρθηκε, τα ιόντα ασβεστίου, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Επιπλέον, βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζουν ότι ένας από τους μηχανισμούς δράσης των οργανικών ρύπων είναι η διατάραξη της ομοίωσης αυτών των ιόντων. Συνδυάζοντας τα δύο στοιχεία, εξετάστηκε, αφενός, η επίδραση του B[α]P στην ομοίωση ασβεστίου στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα και, αφετέρου, η πιθανή συμμετοχή των ιόντων στις αποκρίσεις της Akt και του HIF-1α.

Τα κύτταρα A549 επωάστηκαν παρουσία 2,5μM B[α]P για 24 ώρες και οι μεταβολές του κυτταροπλασματικού ασβεστίου προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας. Όπως καταγράφεται στην **Εικόνα 52A**, τα βασικά επίπεδα του ασβεστίου αυξήθηκαν κατά $47,00 \pm 12,92\%*$ παρουσία B[α]P, σε σύγκριση με το

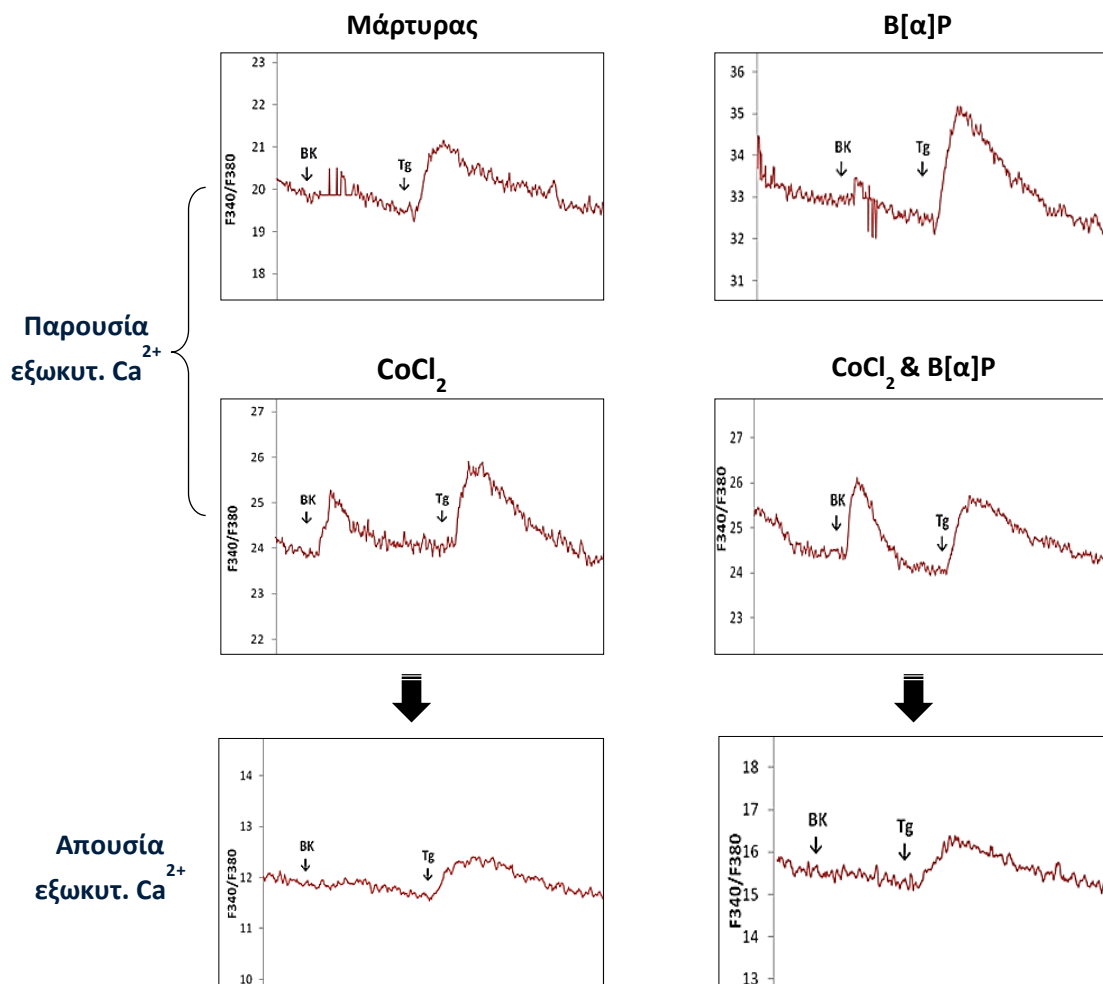
μάρτυρα. Βιβλιογραφικά δεδομένα αποδίδουν αυτό το φαινόμενο στην αλληλεπίδραση του B[α]P με τους υποδοχείς ρυανοδίνης της μεμβράνης του ΕΔ, με αποτέλεσμα την εκροή ιόντων. Πράγματι, η συγκέντρωση ασβεστίου στις ενδοκυττάρια αποθήκες, ύστερα από την επίδραση του ρύπου, ανιχνεύθηκε χαμηλότερη κατά $35,77 \pm 2,87\% \dagger$, σε σύγκριση με το μάρτυρα (**Εικόνα 52B**). Τέλος, μειωμένη, κατά $20,94 \pm 3,59\% **$, ήταν και η ικανότητα επαναπρόσληψης ιόντων, ύστερα από εκκένωση του ΕΔ, με εξωγενή χορήγηση του ειδικού αναστολέα της αντλίας SERCA (*Sarco-/Endo-plasmic Reticulum ATPase*), θαψιγκαργκίνη (Tg, 100nM) (**Εικόνα 52Γ**). Η πρόσληψη Ca^{2+} μέσω των διαύλων SOCs (*Store-Operated Channels*) της πλασματικής μεμβράνης, ως απόκριση στην εκκένωση του ΕΔ, συνιστά μηχανισμό ζωτικής σημασίας για την ομαλή μεταγωγή σήματος. Η διατάραξη αυτού του μηχανισμού είναι πιθανό να οφείλεται, είτε στην ενσωμάτωση του λιπόφιλου B[α]P στην πλασματική μεμβράνη και την άμεση αλληλεπίδρασή του με κανάλια Ca^{2+} σε αυτή, είτε σε βλάβες σε σηματοδοτικά μόρια, που συμμετέχουν στο μηχανισμό επαναπρόσληψης.



Εικόνα 52: Επίδραση του B[σ]P στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου, στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα. Τα κύτταρα A549, επώαστηκαν με 2,5μM B[α]P για 24 ώρες και στη συνέχεια, με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας, προσδιορίστηκαν α) τα βασικά επίπεδα των ιόντων στο κυτταρόπλασμα, β) το περιεχόμενο του ΕΔ και γ) η εισροή ιόντων από το εξωκυττάριο περιβάλλον ως απόκριση στην εκκένωση του ΕΔ με 100nM Tg. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, † $P < 0,001$)

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η εμπλοκή του B[α]P, στη σηματοδότηση του ασβεστίου, διερευνήθηκε η απόκριση των ιόντων στην εξωγενή χορήγηση βραδυκινίνης (BK), ενός αγωνιστή, που εμπλέκεται κυρίως σε φλεγμονώδεις παθοφυσιολογικές καταστάσεις και σχετίζεται με την ενεργοποίηση κατιονικών διαύλων TRPs. Με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας, διαπιστώθηκε η επιλεκτική απόκριση των ιόντων στη BK (αύξηση $[Ca^{2+}]_i$ κατά $32,4 \pm 6,2\% \dagger$ σε

σύγκριση με το μάρτυρα), ύστερα από παρατεταμένη επώαση των κυττάρων με CoCl_2 (100 μM) για 48 ώρες (**Εικόνα 53**). Αντίθετα, στην περίπτωση του μάρτυρα, αλλά και κατά τη μεμονωμένη επίδραση με $\text{B}[\alpha]\text{P}$ (2,5 μM , 24 ώρες), δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα του Ca^{2+} . Η απόκριση στη BK σε συνθήκες υποξίας εκμηδενίστηκε, ύστερα από αφαίρεση των ιόντων Ca^{2+} από εξωκυττάριο περιβάλλον, αποδίδοντας την αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ στην εισροή ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης και όχι στην απελευθέρωσή τους από ενδοκυττάρια αποθήκες. Εξαιρετικά ενδιαφέροντα, ωστόσο, ήταν η ενίσχυση της



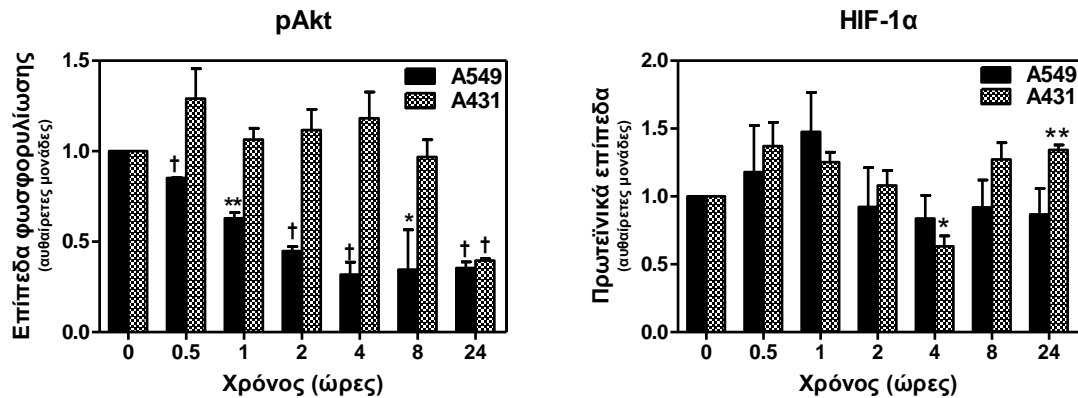
Εικόνα 53: Επίδραση του $\text{B}[\alpha]\text{P}$ και των υποξικών συνθηκών στην κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου, παρουσία του αγωνιστή, βραδυκινίνη (BK). Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (100 μM CoCl_2) για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό 2,5 μM $\text{B}[\alpha]\text{P}$, για 24 επιπλέον ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία, είτε καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό, είτε επώαστηκαν με τους παράγοντες CoCl_2 (48 ώρες) και $\text{B}[\alpha]\text{P}$ (24 ώρες), μεμονωμένα. Ακολούθησε φθορισμομετρική καταγραφή των κυτταροπλασματικών ιόντων ασβεστίου, προκειμένου να προσδιοριστεί η απόκρισή τους στην εξωγενή χορήγηση βραδυκινίνης σε κάθε συνθήκη. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές καταγραφές από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

απόκρισης στη ΒΚ, κατά τη συνδυασμένη επίδραση CoCl_2 και Β[α]Ρ. Ειδικότερα, τα κύτταρα A549 επώστηκαν σε συνθήκες υποξίας (CoCl_2 , 100 μM) για 24 ώρες και, στη συνέχεια, προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό 2,5 μM Β[α]Ρ, για 24 επιπλέον ώρες. Παρά το γεγονός ότι – σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου – το Β[α]Ρ δεν φαίνεται να επηρεάζει την απόκριση των κυττάρων στην ΒΚ, στις υποξικές συνθήκες οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (κατά 13,6%), σε σύγκριση με τη μεμονωμένη επίδραση του CoCl_2 . Και σε αυτή την περίπτωση, η απομάκρυνση του Ca^{2+} από το εξωκυττάριο περιβάλλον, έδρασε ανασταλτικά.

3.3.8. Ο ρόλος της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου στη ρύθμιση της Akt και του HIF-1 α .

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα, που καταδεικνύουν τη διαταραχή της ομοιόστασης του Ca^{2+} παρουσία, τόσο των νανοσωματιδίων DEP, όσο και του Β[α]Ρ, εξετάστηκε η εμπλοκή αυτών των ιόντων στη ρύθμιση των μοριακών δεικτών επιβίωσης, Akt και HIF-1 α , στο παρόν σύστημα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν παράλληλα στα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα και δέρματος.

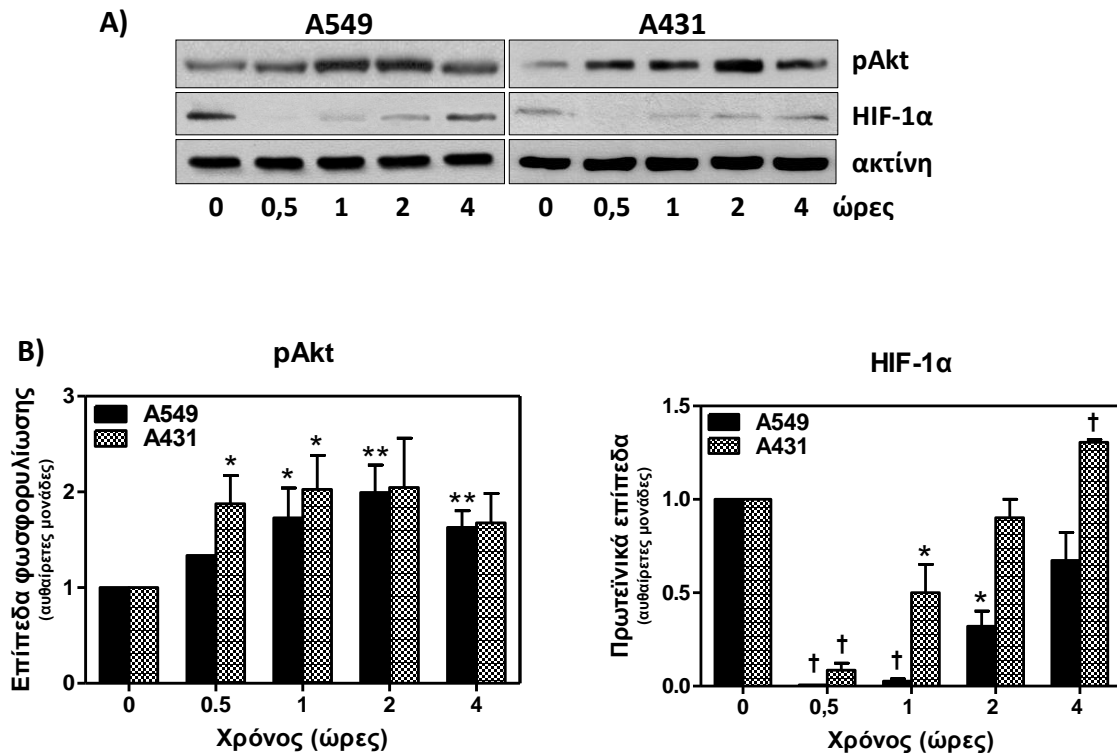
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το ιονοφόρο ασβεστίου, ιονομυκίνη, προκειμένου να προσομοιωθεί μια κατάσταση μαζικής και μη ειδικής κινητοποίησης (κυρίως εισροής) ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα επώστηκαν με 500 μM ιονομυκίνης για 0-24 ώρες και ακολούθησε ανίχνευση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt και του HIF-1 α , σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (**Εικόνα 54**). Όσον αφορά στην κίνηση Akt, στα πνευμονικά κύτταρα παρατηρήθηκε μια ομαλή χρονοεξαρτώμενη μείωση της φωσφορυλίωσής της. Αντίθετα, ένα περισσότερο «ανθεκτικό» προφίλ εκδήλωσαν τα επιδερμικά κύτταρα, με τη pAkt να πέφτει κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα (κατά 60,50 \pm 1,50%†), μόνο μετά από παρατεταμένη επώαση 24 ωρών. Λιγότερο σαφής ήταν η απόκριση του HIF-1 α , αν και, σε γενικές γραμμές, καμία κυτταρική σειρά δεν φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά, παρουσία του ιονοφόρου.



Εικόνα 54: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της ιονομικίνης στην κινάση Akt και τον HIF-1α. Τα κύτταρα A549 και A431 επώαστηκαν με 500μM ιονομικίνης για 30 λεπτά έως 24 ώρες και, στη συνέχεια, έγινε ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης Akt και του HIF-1α σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, † $P < 0,001$)

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της αύξησης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, μέσω μιας περισσότερο ειδικής οδού και, συγκεκριμένα, των καναλιών SOCs. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο χημικός παράγοντας θαψιγκαργκίνη (Tg), ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, προκαλεί εκκένωση του ΕΔ, λόγω μη αντιστρεπτής αναστολής της αντλίας SERCA, και επακόλουθη εισροή εξωκυττάρου Ca^{2+} από τα κανάλια SOCs. Τα κύτταρα A549 και A431 επώαστηκαν με 100nM Tg, για 0-4 ώρες. Στην περίπτωση αυτή, αποφεύχθηκε η παρατεταμένη επώαση, λόγω της τεκμηριωμένης κυτταροτοξικής δράσης της Tg και στις δύο κυτταρικές σειρές. Σε αντίθεση με τη μη ειδική αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου από την ιονομικίνη, το πρότυπο απόκρισης των δύο κυτταρικών σειρών στην εκκένωση του ΕΔ φαίνεται να συμπίπτει (**Εικόνα 55**). Η ενεργοποίηση της κινάσης Akt, ήταν άμεση και ακολούθησε ένα παροδικό προφίλ με μέγιστο στις 2 ώρες επώασης ($2,04 \pm 0,51$ και $1,99 \pm 0,29^{**}$ φορές, σε σύγκριση με το μάρτυρα). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η απόκριση του HIF-1α, καθώς η Tg οδήγησε σε άμεση και σχεδόν πλήρη αποικοδόμησή του, από τα 30 πρώτα λεπτά και επακόλουθη σταδιακή ανάκαμψη των επιπέδων του, πιθανόν λόγω εκ νέου σύνθεσής της πρωτεΐνης. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν, ότι η αύξηση του ασβεστίου ενισχύει την ενεργότητα των ασβεστιο-εξαρτώμενων υδροξυλασών PHDs, που είναι υπεύθυνες για την υδροξυλίωση και επακόλουθη πρωτεασωμική αποικοδόμηση του HIF-1α. Ωστόσο, η πρώιμη ενεργοποίηση του μονοπατιού της Akt, είναι πιθανό να επιταχύνει τον ρυθμό σύνθεσης του HIF-1α, ο οποίος σταδιακά υπερβαίνει τον

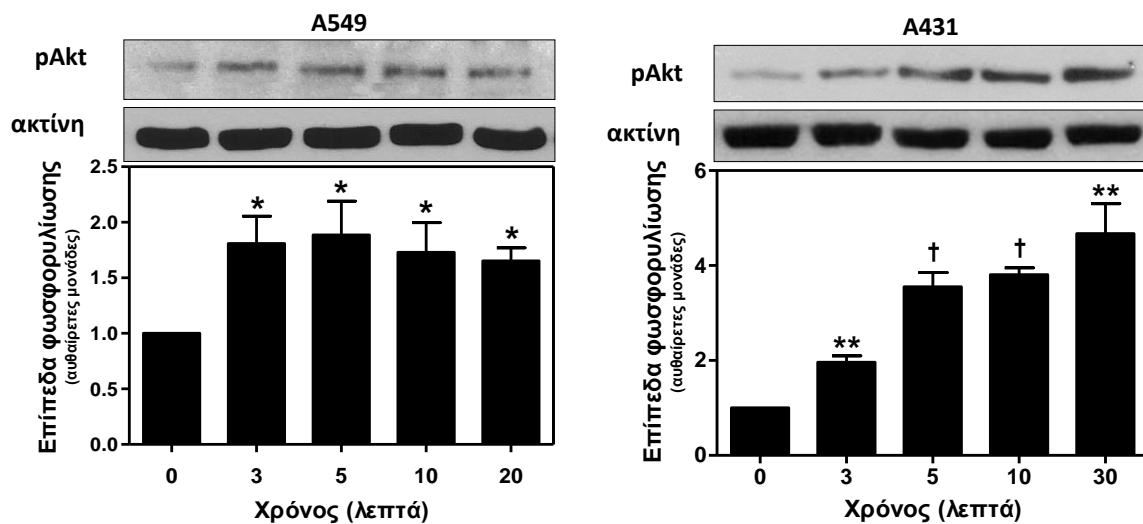
ρυθμό αποικοδόμησής του, με αποτέλεσμα την ανάκαμψη των πρωτεϊνικών του επιπέδων.



Εικόνα 55: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της θαψιγκαργκίνης (Tg) στην κινάση Akt και τον HIF-1α. Τα κύτταρα A549 και A431 επώαστηκαν με 100nM Tg για 30 λεπτά έως 4 ώρες και, στη συνέχεια, έγινε ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης Akt και του HIF-1α σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. **A)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western. **B)** Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, † $P < 0,001$)

Το γεγονός ότι και στους δύο τύπους επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της Akt, παρουσία Tg, οδήγησε στην υπόθεση της πιθανής σύνδεσης του μεμβρανικού γεγονότος της εισροής, με τη φωσφορυλίωση της κινάσης, ανεξάρτητα από το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης. Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, έγινε κατάλληλη τροποποίηση του πρωτοκόλλου της φθορισμομετρίας, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα απομόνωσης των ολικών πρωτεϊνών, μετά το πέρας της διαδικασίας. Συνοπτικά, τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε μορφή εναιωρήματος στο ίδιο διάλυμα αλάτων, που χρησιμοποιείται κατά τη φθορισμομετρία, απουσία εξωκυττάρου ασβεστίου. Στο εναιώρημα προστέθηκε Tg (100nM) για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η εκκένωση του ΕΔ και, στη συνέχεια,

διάλυμα CaCl_2 (2,5mM), με σκοπό την άμεση εισροή ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, μέσω των – ήδη ενεργοποιημένων – SOCs. Δείγματα κυτάρων συλλέχθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ το δείγμα-μάρτυρας συλλέχθηκε πριν την προσθήκη του CaCl_2 . Προς επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης, παρατηρήθηκε ότι η κινητοποίηση ιόντων Ca^{2+} στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, προκάλεσε άμεση φωσφορυλίωση της κινάσης Akt και στις δύο κυτταρικές σειρές, ήδη από τα 3 λεπτά μετά την χορήγηση CaCl_2 (Εικόνα 56).



Εικόνα 56: Επίδραση της εισροής ιόντων Ca^{2+} , μέσω των καναλιών SOCs της πλασματικής μεμβράνης, στη φωσφορυλίωση της Akt. Τα κύτταρα A549 και A431 διατηρήθηκαν σε εναιώρημα, απουσία εξωκυττάρου Ca^{2+} και μετά την εκκένωση του ΕΔ με προσθήκη Tg (100nM) χορηγήθηκε εξωγενώς διάλυμα CaCl_2 . Ακολούθησε συλλογή δειγμάτων ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και προσδιορισμός της φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που συλλέχθηκαν πριν την προσθήκη CaCl_2 . Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα και πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, † $P < 0,001$)

Αν συνδυάσουμε τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων με τα αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου, που ανιχνεύθηκαν παρουσία $\text{B}[\alpha]\text{P}$, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση της Akt από τον συγκεκριμένο ρύπο, εκτός από το κλασικό μονοπάτι, ίσως μεσολαβείται, εν μέρει, και από την διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αποκαλύπτουν πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων δεκαετιών, η ατμοσφαιρική ρύπανση, και ιδιαίτερα το μικροσωματιδιακό κλάσμα της, ενοχοποιείται για ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα προβλημάτων υγείας, που περιλαμβάνει από απλούς δερματικούς ερεθισμούς ή αλλεργικές αντιδράσεις, μέχρι χρόνια αναπνευστικά προβλήματα, θανάτους από καρδιαγγειακά αίτια και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Maier και συν. 2008). Το γεγονός αυτό, καθιστά επιτακτική την ανάγκη αποσαφήνισης των μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται σε αυτές τις επιπτώσεις, με απώτερο στόχο να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα για την πρόληψη ή τον περιορισμό τους. Ωστόσο, η έκθεση στους ρύπους της ατμόσφαιρας και οι επακόλουθες επιπτώσεις τους στην υγεία δεν είναι μια απλή αντιστοιχία δόσης-αποτελέσματος. Αντίθετα, πρόκειται για ένα πολυδιάστατο τοξικολογικό πρόβλημα, στο οποίο υπεισέρχονται πολλαπλοί παράγοντες, που αφορούν τόσο στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ίδιων των σωματιδιακών ρύπων (διάμετρος, χημική σύσταση), όσο και στις συνθήκες έκθεσης (συγκέντρωση, διάρκεια, συχνότητα επεισοδίων) και την ατομική ευαισθησία (ηλικία, παθολογικό υπόβαθρο). Κατά συνέπεια, παρά τις εκτεταμένες μελέτες και τις πολυάριθμες υποθέσεις, που έχουν διατυπωθεί μέχρι σήμερα, ο μηχανισμός δράσης των σωματιδιακών ρύπων εξακολουθεί να παραμένει ένα ανοιχτό ερευνητικό πεδίο.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μια προσπάθεια καταγραφής των επιδράσεων αντιπροσωπευτικών ατμοσφαιρικών ρύπων, διαφορετικής σύνθεσης και πολυπλοκότητας, προκειμένου να εντοπιστούν πρώιμες αλλαγές στη φυσιολογία και τη σηματοδότηση των κυττάρων, που ενδέχεται να συμβάλλουν, μακροπρόθεσμα, στην ανάπτυξη παθολογικού φαινοτύπου. Μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων και των μεταγραφικών παραγόντων, που προωθούν την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στην κινάση Akt και τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α. Πρόκειται για δύο τυπικούς καρκινικούς δείκτες, καθώς ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα στην πλειοψηφία των ανθρώπινων όγκων. Παράλληλα, η ανίχνευση των επιπέδων του κυτταροπροστατευτικού μεταγραφικού παράγοντα, NrF2, χρησιμοποιήθηκε ως ένας τυπικός δείκτης οξειδωτικού στρες. Ως βασικό πειραματικό υλικό επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, A549, η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζει πολλές μορφολογικές και λειτουργικές ομοιότητες με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, του πνεύμονα και αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο σύστημα, για *in vitro* τοξικολογικές μελέτες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η επιθηλιακή σειρά καρκινώματος δέρματος, A431, καθώς και πρωτογενείς

καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα και δέρματος, εξετάστηκαν με σκοπό τον έλεγχο της ιστοειδικότητας των αποκρίσεων και της αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Οι κατηγορίες σωματιδιακών ρύπων, που εξετάστηκαν, ήταν οι εξής: α) ένα ετερογενές μίγμα μικροσωματιδιακών ρύπων (PM), β) ένα πρότυπο μίγμα νανοσωματιδίων από εξατμίσεις μηχανών εσωτερικής καύσης (DEP) και γ) ο πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας, βενζο[α]πυρένιο (B[α]P). Το B[α]P δεν έχει σωματιδιακή φύση, αλλά επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικά οργανικά συστατικά των δύο προηγούμενων μιγμάτων, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των οργανικών ρύπων. Στην συνέχεια, θα αναλυθούν τα κυριότερα αποτελέσματα, που αφορούν στις τρεις κατηγορίες ρύπων.

1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΟΙ ΡΥΠΟΙ ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ

Ο άνθρωπος εκτίθεται καθημερινά σε πολύπλοκα μίγματα σωματιδιακών ρύπων, διαφορετικής προέλευσης και σύνθεσης. Τα συστατικά αυτών των αιωρούμενων σωματιδίων μπορούν να δράσουν μεμονωμένα, αθροιστικά ή συνεργιστικά, καθώς, επίσης, και να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ή με άλλους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, σχηματίζοντας δευτερογενή τοξικά προϊόντα. Συνεπώς, τα συμπεράσματα, που προκύπτουν από τη μελέτη ενός μεμονωμένου ρύπου, αν και προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της συγκεκριμένης ουσίας, δεν αντιπροσωπεύουν απόλυτα τις επιδράσεις ενός πραγματικού μίγματος ατμοσφαιρικών ρύπων. Στο πλαίσιο αυτό, πολλές τοξικολογικές έρευνες προσανατολίζονται κυρίως στη μελέτη της δράσης πολύπλοκων μιγμάτων μικροσωματιδιακών ρύπων από την επιβαρυσμένη ατμόσφαιρα αστικών κέντρων ή βιομηχανικών περιοχών (Frampton και συν. 1999, Alfaro-Moreno και συν. 2002, Wichmann και συν. 2009).

Αντίστοιχα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, εξετάστηκε – μεταξύ άλλων – ένα σύνθετο μίγμα μικροσωματιδιακών ρύπων (PM), οι οποίοι συλλέχθηκαν με τη βοήθεια ειδικών συστημάτων άντλησης αέρα, από μια βιομηχανία στην περιοχή της Αθήνας.

Η κυτταροτοξική δράση του μίγματος PM ήταν αντιστρόφως ανάλογη της αεροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων. Συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις PM με α.δ. 0,1-2,5 μ m (PM_{2,5}) εκδήλωσαν ήπια κυτταροτοξική δράση, σε όλες τις κυτταρικές σειρές, που εξετάστηκαν (A549, A431, MCF7, PC3), ενώ αντίστοιχες συγκεντρώσεις μεγαλύτερων σωματιδίων (PM_{2,5-10}) δεν επηρέασαν σημαντικά την κυτταρική επιβίωση (**Εικόνα 20**). Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται κυρίως στις

ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των μικρότερων συστατικών της PM και υποστηρίζεται από πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων. Τα σωματίδια της τάξης PM_{2,5} χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο αριθμό και εμβαδό επιφάνειας ανά μονάδα βάρους και, κατά συνέπεια, φέρουν υψηλότερο ποσοστό τοξικών μορίων στην επιφάνειά τους, σε σύγκριση με τα PM₁₀ (Choi και συν. 2004). Τα στοιχεία μετάπτωσης, τα ιόντα και οι οργανικές ενώσεις είναι οι κύριοι μεσολαβητές της τοξικής δράσης των σωματιδίων αυτών και δρουν μέσω έντονου οξειδωτικού στρες και επακόλουθης οξειδωτικής βλάβης του DNA και άλλων κυτταρικών μακρομορίων (Hsiao και συν. 2000, Osornio-Vargas και συν. 2003, Choi και συν. 2004). Κατά τη χημική ανάλυση του σωματιδιακού φορτίου των φίλτρων, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η μείωση της βιωσιμότητας συμπίπτει με υψηλές συγκεντρώσεις θειικών (SO₄²⁻) και αμμωνιακών (NH₄⁺) ιόντων. Τα θειικά ιόντα σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα κατά την οξείδωση του SO₂ και αντιδρώντας με τα αμμωνιακά ιόντα σχηματίζουν άλατα (NH₄)₂SO₄ ή NH₄HSO₄ (Harrison & Yin 2000). Και τα δύο αυτά ανόργανα συστατικά έχουν συνδεθεί με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου, αλλά και με την έκκριση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (Morio και συν. 2001, Perrone και συν. 2010).

Στη συνέχεια, εξετάζοντας τη διαφορική επίδραση του ανόργανου και του οργανικού κλάσματος της ολικής PM, διαπιστώσαμε – σε κάθε περίπτωση – σημαντική δόσοεξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, η οποία, όμως, ήταν περισσότερο έντονη στην περίπτωση των υδατοδιαλυτών συστατικών (**Εικόνα 22**). Η κυτταροτοξικότητα του ανόργανου κλάσματος, θα μπορούσε να αποδοθεί, όπως προαναφέρθηκε, στην υψηλή περιεκτικότητα σε θειικά και αμμωνιακά ιόντα. Αντίθετα, η περισσότερο ήπια δράση των οργανικών συστατικών είναι πιθανό να οφείλεται στην παρουσία καρκινογόνων οργανικών ενώσεων, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι οποίοι προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αντισταθμίζοντας, σε κάποιο βαθμό, τη δράση των κυτταροτοξικών συστατικών (Jung και συν. 2012). Για το λόγο αυτό, ο μηχανισμός δράσης των οργανικών ρύπων διερευνήθηκε περαιτέρω στη συνέχεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Σε μοριακό επίπεδο, παράλληλα με την κυτταροτοξική δράση, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση στη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt και στα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α. Η ανασταλτική επίδραση των μικροσωματιδίων στους δύο δείκτες επιβίωσης εκδηλώθηκε παρουσία, τόσο του ολικού εκχυλίσματος, όσο και του κάθε κλάσματος μεμονωμένα. Είναι γεγονός ότι σημαντικός αριθμός αντίστοιχων μελετών υποστηρίζει ότι τα μίγματα των αστικών μικρο- και νανο-σωματιδιακών ρύπων

επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης, όπως της κινάσης Akt και των ERK1/2, κυρίως μέσω του οξειδωτικού στρες και της επακόλουθης ενεργοποίησης του μεμβρανικού υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR (Tamaoki και συν. 2004, Weissenberg και συν. 2010). Αντίστοιχος μηχανισμός προτείνεται και για την επαγωγή του HIF-1α και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, που εμφανίζουν ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες (Tharappel και συν. 2010, Yu και συν. 2012). Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν ειδικότερα στον HIF-1α, δεν επαρκούν για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων ως προς την απόκρισή του στους σωματιδιακούς ρύπους. Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι τα μίγματα PM_{2,5} και PM₁₀ ενισχύουν την ενεργοποίηση της κινάσης Akt, στην κυτταρική σειρά BEAS-2B, μέσω πρωτεόλυσης της ανασταλτικής πρωτεΐνης PTEN από τις καλπαΐνες (Watterson και συν. 2012). Οι μελέτες, στις οποίες παρατηρείται καταστολή του μονοπατιού PI3K/Akt, αφορούν κυρίως στην επίδραση μικροσωματιδιακών εκχυλισμάτων από τον καπνό του τσιγάρου σε ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (Togo και συν. 2010, Kim και συν. 2012). Μάλιστα, έχει προταθεί ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα αυξάνουν την έκφραση της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, TTC3, με αποτέλεσμα την επιλεκτική πολυουβικτινυλίωση της ενεργοποιημένης – και λιγότερο της ανενεργής – Akt και την αποικοδόμησή της, στο πρωτεάσωμα (Kim και συν. 2011). Συνολικά, είναι εμφανές ότι οι κυτταρικές αποκρίσεις στα πολύπλοκα και ευμετάβλητα μίγματα των σωματιδιακών ρύπων παρουσιάζουν εξαιρετική ετερογένεια και καθορίζονται, σε μεγάλο βαθμό, από τη σύσταση και την πηγή προέλευσης του εκάστοτε μίγματος.

2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ DEP

Τα οργανικά συστατικά της ατμοσφαιρικής ρύπανσης είναι αυτά, που κατά κανόνα ενοχοποιούνται για τις καρκινογόνες επιπτώσεις της, σε βάθος χρόνου. Στο οργανικό κλάσμα των σωματιδιακών ρύπων των αστικών και βιομηχανικών περιοχών, συνεισφέρουν σημαντικά τα σωματίδια, που εκλύονται κατά την καύση υγρών καυσίμων (Diesel Exhaust Particles, DEP). Πρόκειται για σφαιρικούς σχηματισμούς, με έναν πυρήνα άνθρακα, ο οποίος περιβάλλεται από δραστικά μέταλλα και ανόργανα ιόντα, ενώ στην εξωτερική τους στιβάδα προσροφάται μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων (π.χ. PAHs). Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η δράση των οργανικών ρύπων επιλέχθηκε ένα μίγμα νανοσωματιδίων DEP (SRM2975), γνωστής σύνθεσης, από το Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας (NIST) των ΗΠΑ. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η

επίδραση των οργανικών συστατικών του μίγματος, μετά από κατάλληλη εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (βλ. 4.3.).

Η κυτταροτοξική δράση των DEP εκδηλώθηκε μόνο ύστερα από εξαιρετικά παρατεταμένη επώαση (≥ 48 h), η οποία απέχει σημαντικά από τις πραγματικές συνθήκες έκθεσης στους ατμοσφαιρικούς ρύπους. Αντίθετα, μέχρι τις 24 ώρες, δεν παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, στο εύρος συγκεντρώσεων, που εξετάστηκε (3-100 μ g/ml). Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Πράγματι, η τοξική δράση των DEP, σε ανάλογα συστήματα επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα, παρατηρείται σε συγκεντρώσεις, που ξεπερνούν τα 100 μ g/ml (Danielsen και συν. 2008, Akhtar και συν. 2010). Αντίστοιχη μελέτη, στα κύτταρα A549, υποστηρίζει ότι οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των DEP προωθούν τον κυτταρικό κύκλο, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται άμεσα από το οξειδωτικό στρες και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των MAP κινασών, του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B και την αναστολή της πρωτεΐνης p21 (Bayram και συν. 2006). Οι αλλαγές αυτές καταστέλλουν την απόπτωση και εξασφαλίζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ακόμα και απουσία των αυξητικών παραγόντων του ορού. Επιπλέον, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παρατηρείται και γενετοξική δράση των DEP, με τη ανίχνευση προϊόντων προσθήκης, μονόκλωνων θραύσεων ή οξειδωτικής βλάβης του DNA, η οποία, όμως δεν συνοδεύεται από κυτταρικό θάνατο (Danielsen και συν. 2008, Danielsen και συν. 2009, Akhtar και συν. 2010). Η προώθηση της κυτταρικής διαίρεσης, σε αυτές τις συνθήκες, δεν εξασφαλίζει στο κύτταρο τον απαραίτητο χρόνο για την επιδιόρθωση των βλαβών του γενετικού υλικού, συμβάλλοντας έτσι, σταδιακά, στη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη καρκίνου.

Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων A549, παρουσία DEP επιβεβαιώθηκε και από τη συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα NrF2. Όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο της *Εισαγωγής*, ο NrF2 αποτελεί το βασικό ενορχηστρωτή των προστατευτικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, κατά την απόκριση στο ήπιο οξειδωτικό στρες (*Βαθμίδα I*), που προκαλείται από τους σωματιδιακούς ρύπους (Χiao και συν. 2003). Το 2003, αναφέρθηκε για πρώτη φορά η επαγωγή και η μεταγραφική ενεργοποίηση του NrF2 από τα νανοσωματίδια DEP, και κυρίως το οργανικό κλάσμα τους, σε πρωτογενή καλλιέργεια ρινικών επιθηλιακών κυττάρων και στην κυτταρική σειρά 16HBE (Baulig και συν. 2003). Από τότε, δημοσιεύτηκαν και επιπλέον μελέτες, που επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα, τόσο σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, όσο και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα μακροφάγα των κυψελίδων (Li και συν.

2004, Zhang και συν. 2004). Εκτός, όμως, από τον Nrf2, τα DEP ενίσχυσαν και τη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65, του NF-κB. Ο NF-κB είναι και αυτός ένας μεταγραφικός παράγοντας, ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες, ο οποίος ρυθμίζει – μεταξύ άλλων – τη φλεγμονώδη απόκριση επάγοντας την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α, η IL-1β και η IL-8 και μορίων προσκόλλησης (Karin & Greten 2005). Η ενεργοποίησή του στα κύτταρα του πνεύμονα, ως απόκριση στους σωματιδιακούς ρύπους της ατμόσφαιρας, και, ειδικότερα, σε μίγματα νανοσωματιδίων DEP, έχει τεκμηριωθεί επανειλημμένα και φαίνεται πως μεσολαβείται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPKs (Shukla και συν. 2000, Marano και συν. 2002, Pourazar και συν. 2005, Li και συν. 2010, Silbajoris και συν. 2011). Πράγματι, παράλληλα με τον NF-κB, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των κινασών ERKs και p38. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, υποδηλώνει ότι διαθέτουμε ένα αξιόπιστο *in vitro* πειραματικό μοντέλο.

Μεταξύ των μοριακών δεικτών, που μελετήθηκαν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α (**Εικόνα 26**). Ο HIF-1α επάγεται κυρίως κατά την υποξία, αλλάζοντας ριζικά το μεταβολικό δυναμικό του κυττάρου και εξασφαλίζοντας την επιβίωσή του σε αυτές τις λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες (Roop και συν. 2009). Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα, που υποστηρίζουν την κινητοποίησή του και σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Haddad & Land 2001, BelAiba και συν. 2004, Bonello και συν. 2007), γεγονός που τον καθιστά πιθανό στόχο των μικροσωματιδιακών ατμοσφαιρικών ρύπων. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα έχει δημοσιευτεί μόνο μία σχετική μελέτη, η οποία αφορά στην απόκριση του HIF-1α, παρουσία ενός μίγματος νανοσωματιδίων DEP. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι τα DEP (5-30μg/ml για 4 ώρες) αύξησαν τα επίπεδα mRNA του HIF-1α και του γονιδίου-στόχου του, *vegf*, ενώ, παράλληλα, μείωσαν την έκφραση της υδροξυλάσης του HIF-1α, PHD2, στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε *in vivo* επαγωγή της αγγειογένεσης, σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών ApoE^{-/-}, ύστερα από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στα DEP για χρονικό διάστημα 2, 5 και 8 εβδομάδων (Xu και συν. 2009). Η επιβεβαίωση της επαγωγής του HIF-1α, παρουσία μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων σωματιδιακών μιγμάτων, που περιέχουν ενώσεις με μεταλλαξιγόνο δράση, θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της καρκινογόνου δράσης των ατμοσφαιρικών ρύπων.

Οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, που μελετήθηκαν, παρουσίασαν μέγιστη απόκριση στη συγκέντρωση των 25μg/ml DEP (**Εικόνα 26**), η οποία εκδηλώθηκε ήδη από τα 15 πρώτα λεπτά της επώασης (**Εικόνα 25**). Η συγκέντρωση αυτή, αντιστοιχεί

σε $\sim 2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ και βρίσκεται εντός του εύρους συγκεντρώσεων, οι οποίες θεωρούνται κατάλληλες για ανάλογες *in vitro* μελέτες ($0,2-20\mu\text{g}/\text{cm}^2$), προκειμένου να ανταποκρίνονται στις πραγματικές συνθήκες έκθεσης (Li και συν. 2003). Εκτός, όμως, από τη συγκέντρωση, καθοριστικό ρόλο στις επιπτώσεις των εισπνεόμενων ρύπων διαδραματίζει και το χρονικό πρότυπο της έκθεσης. Στο πλαίσιο αυτό, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο σύντομων, επαναλαμβανόμενων επωάσεων, που θεωρούνται περισσότερο αντιπροσωπευτικές των πραγματικών συνθηκών, σε σύγκριση με μια συνεχόμενη έκθεση 24 ωρών (**Εικόνα 27**). Οι επαναλαμβανόμενες δώρες επωάσεις έδρασαν αθροιστικά στα επίπεδα του HIF-1 α , τα οποία παρέμειναν υψηλά, ανεξάρτητα από την παρουσία των DEP, για τουλάχιστον 22 ώρες. Εξίσου παρατεταμένη ήταν και η φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 του NF- κ B. Αντίθετα, η απόκριση του NrF2 ήταν παροδική, αλλά ικανή να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του, όπως διαπιστώνεται από την παρατεταμένη επαγωγή του ενζύμου οξυγενάση της αίμης (HO-1). Συνεπώς, φαίνεται πως ακόμα και η παροδική έκθεση στους ρύπους της ατμόσφαιρας, μπορεί να διαταράξει την οξειδοαναγωγική ισορροπία ενός κυττάρου και να προκαλέσει προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Δυστυχώς, το συγκεκριμένο *in vitro* σύστημα δεν επιτρέπει την εφαρμογή περισσότερων επαναληπτικών επωάσεων, ώστε να εξετάσουμε τις μεταβολές αυτές σε βάθος χρόνου. Ωστόσο, η δυνατότητα αυτή παρέχεται σε μοντέλα πειραματοζώων. Για παράδειγμα, η έκθεση κουνελιών σε μίγματα PM₁₀, 2 φορές την εβδομάδα για 4 εβδομάδες, οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή πολυμορφοπύρηνων στο μυελό των οστών και απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία, καθώς και συσσώρευση μονοκυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες των αγγείων (Mukai και συν. 2001, Yatera και συν. 2008). Επίσης, ενδείξεις τοπικής (έκκριση IL-8, από τα κύτταρα του πνεύμονα και οψωνισμός λεμφοκυττάρων), αλλά και συστηματικής φλεγμονής (αυξημένα επίπεδα IL-6 και TNF-1 α στο αίμα) παρατηρήθηκαν 6 και 24 ώρες, αντίστοιχα, μετά από σύντομη (1 ώρα) έκθεση ανθρώπων, σε εισπνεόμενα μίγματα νανοσωματιδίων DEP (Salvi και συν. 2000, Tornqvist και συν. 2007). Επομένως, η καταγραφή του HIF-1 α , σε αντίστοιχες συνθήκες, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ώστε να διατυπωθεί μια καθολική υπόθεση για την απόκρισή του.

Σε επίπεδο οργανισμού, όμως, η κυτταρική απόκριση δεν διαμορφώνεται αποκλειστικά από εξωγενείς παράγοντες, όπως η δόση ή η συχνότητα του εκάστοτε ερεθίσματος, αλλά και από ένα πολύπλοκο δίκτυο παρακρινικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων, στο μικροπεριβάλλον του ιστού. Ο πνεύμονας, συγκεκριμένα, αποτελείται από πολλές διαφορετικές κατηγορίες

κυττάρων, μεταξύ των οποίων επιθηλιακά κύτταρα τύπου I και II, μακροφάγα, δενδριτικά, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, αν και οι περισσότερες *in vitro* τοξικολογικές μελέτες, που αφορούν στις επιπτώσεις της σωματιδιακής ρύπανσης, έχουν πραγματοποιηθεί σε μονοκαλλιέργειες, τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μια συνεχώς αυξανόμενη τάση χρησιμοποίησης συστημάτων ταυτόχρονης καλλιέργειας δύο ή και περισσότερων κυτταρικών τύπων (Klein και συν. 2011). Στην πλειοψηφία αυτών των μελετών εξετάζεται η αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα, με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ή/και ενδοθηλιακά κύτταρα (Alfaro-Moreno και συν. 2008, Klein και συν. 2011). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το σύστημα συγκαλλιέργειας Transwell®, προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων A549 και μιας πρωτογενούς καλλιέργειας φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα (*Distal Lung Fibroblasts*, DLF) (**Εικόνα 28**). Σε *in vivo* συνθήκες, τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τους ινοβλάστες του υποκείμενου συνδετικού ιστού, λόγω της παρεμβαλλόμενης βασικής μεμβράνης. Ωστόσο, έχει επιβεβαιωθεί η αμοιβαία επικοινωνία μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων, με τους ινοβλάστες να έχουν κυρίως τροφικό ρόλο για τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία, με τη σειρά τους, διεγείρουν την παραγωγή κολλαγόνου τύπου I από τους ινοβλάστες, μέσω IGF-1 (Griffin και συν. 1993). Εξίσου σημαντική είναι και η αλληλεπίδραση επιθηλίου-ινοβλαστών σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η φλεγμονή και ο καρκίνος (Knight 2001, Ostman & Augsten 2009). Στο σύστημα συγκαλλιέργειας, τα νανοσωματίδια DEP χορηγήθηκαν στο διαμέρισμα των επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία εκτίθενται άμεσα στους ατμοσφαιρικούς ρύπους, κατά την εισπνοή. Διαπιστώθηκε ότι, οι αποκρίσεις των A549 δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές, σε σύγκριση με την απλή μονοκαλλιέργεια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι αποκρίσεις των φυσιολογικών ινοβλαστών, όπου παρατηρήθηκε επαγωγή, τόσο της κινάσης Akt, όσο και των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α, NrF2 και NFκB. Οι αποκρίσεις αυτές μπορούν να αποδοθούν, κατά κύριο λόγο, στην παρακρινική επικοινωνία των κυττάρων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια δεν διαπερνούν τους πόρους της ημιπερατής μεμβράνης, που διαχωρίζει τα δύο διαμερίσματα του Transwell® (Geys και συν. 2006). Άλλωστε, η σύνθεση και, κατά συνέπεια, η έκκριση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών επιβεβαιώνεται και από τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης του NFκB. Επιπλέον, η έκκριση ηλεκτρονιόφιλων μορίων, ύστερα από τη μεταβολική ενεργοποίηση των οργανικών συστατικών των DEP, στα κύτταρα A549, ενδέχεται να προκαλεί ήπιο οξειδωτικό στρες στους ινοβλάστες, το οποίο «αποτυπώνεται» στην επαγωγή του NrF2.

Ένας από τους μεταγραφικούς στόχους του NFκB, στο πλαίσιο της ρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης, είναι και η ιντερλευκίνη IL-1β. Πρόκειται για μια προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη, η οποία εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, η μικρογλοία, τα ουδετερόφιλα και οι ινοβλάστες, ενώ ο υποδοχέας της εντοπίζεται κυρίως στα T λεμφοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα επιθηλιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Akdis και συν. 2011). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η IL-1β, σε συνδυασμό με την IL-6 και τον TNF-α, διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην τοπική και συστηματική φλεγμονή, που επάγεται από τους σωματιδιακούς ρύπους (Nam και συν. 2006, Pronoost και συν. 2011, Tsaï και συν. 2012). Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, υποθέσαμε ότι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, στο σύστημα της συγκαλλιέργειας, ύστερα από την προσθήκη των DEP, οδηγεί – μεταξύ άλλων – σε έκκριση IL-1β από τους ινοβλάστες, η οποία δρα, είτε παρακρινώς στα επιθηλιακά κύτταρα, είτε αυτοκρινώς στους ίδιους τους ινοβλάστες. Όπως διαπιστώθηκε, η εξωγενής χορήγηση IL-1β στα κύτταρα A549 προκαλεί έντονη δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη αύξηση στα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, η οποία μεσολαβείται σε μεγάλο ποσοστό από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζεται από πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων (Haddad 2002, Stiehl και συν. 2002, Jung και συν. 2003, Naldini και συν. 2010) και καθιστά τον HIF-1α μόριο-κλειδί μεταξύ φλεγμονώδους απόκρισης και καρκινογένεσης. Αν και η συγκεκριμένη απόκριση καταγράφηκε στα επιθηλιακά κύτταρα, ο μηχανισμός αυτός δεν φαίνεται να παρουσιάζει ιστοειδικότητα. Συνεπώς, θα μπορούσε να ερμηνεύσει, τουλάχιστον εν μέρει, και τις αποκρίσεις των ινοβλαστών.

Τα αποτελέσματα του συστήματος της συγκαλλιέργειας, επιβεβαιώνουν, για μια ακόμη φορά, ότι οι βλάβες, που προκαλούν τα μίγματα σωματιδιακών ρύπων της ατμόσφαιρας, δεν περιορίζονται αποκλειστικά στα κύτταρα, που εκτίθενται άμεσα στα σωματίδια, αλλά μπορούν να επεκταθούν και σε παρακείμενους ιστούς ή απομακρυσμένα όργανα. Οι επιπτώσεις των ρύπων, σε επίπεδο συστήματος, μπορεί να οφείλονται, τόσο στη μεταφορά προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, όσο και των ίδιων των σωματιδίων ή συστατικών τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Τέλος, το οξειδωτικό στρες, το οποίο συνοδεύει την έκθεση στους σωματιδιακούς ρύπους, έχει συνδεθεί και με τη διατάραξη της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου (Mazzoli-Rocha και συν. 2010). Το ασβέστιο συνιστά ένα ταχύτατα αποκρινόμενο δεύτερο μήνυμα και εμπλέκεται σχεδόν στο σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ευαίσθητη

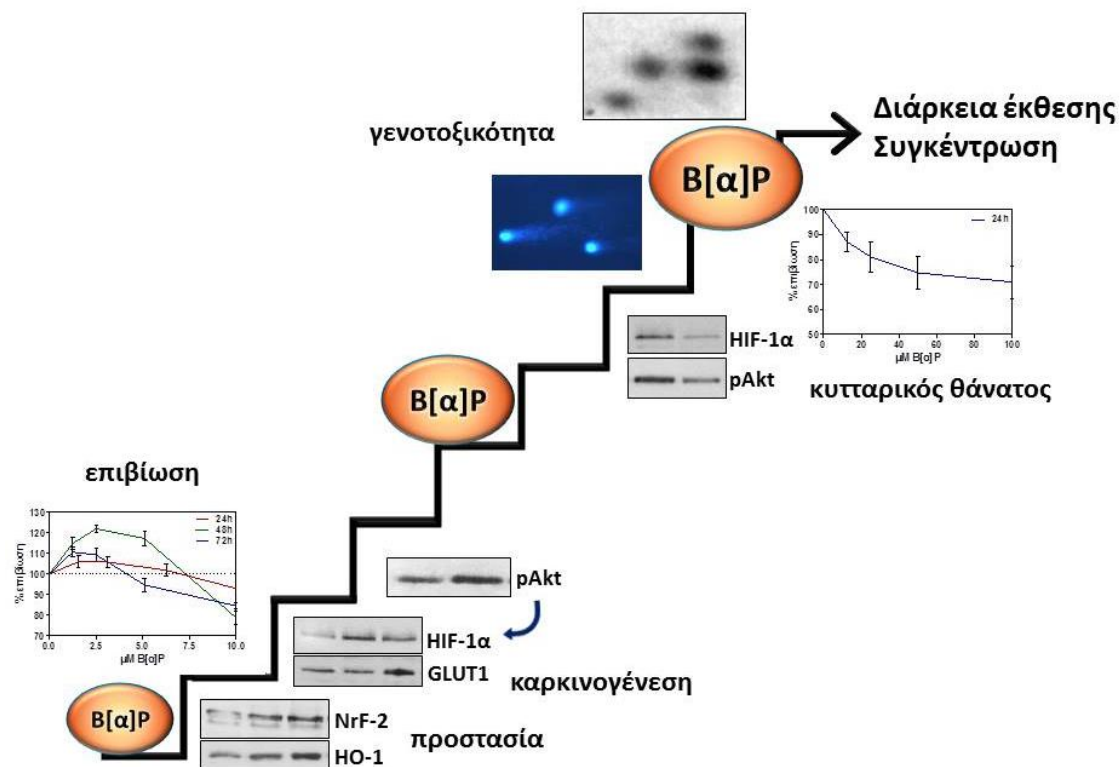
ισορροπία μεταξύ επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου (Berridge και συν. 1998). Το οξειδωτικό στρες αυξάνει τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση πολλών Ca^{2+} -εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών, την ενεργοποίηση καταρροϊκών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NFκB, και τη σύνθεση προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Μέσω αυτού του μηχανισμού θεωρείται ότι τα ιόντα ασβεστίου συνδέονται με την – επαγόμενη από τους σωματιδιακούς ρύπους – φλεγμονώδη απόκριση (Brown και συν. 2004). Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί και ένας εναλλακτικός μηχανισμός εισροής ιόντων ασβεστίου, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το οξειδωτικό στρες και αφορά ειδικότερα στα νανοσωματίδια DEP. Συγκεκριμένα, προτείνεται ότι τα οργανικά συστατικά των DEP αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα, στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, με τους κατιονικούς διαύλους, TRPA1 και TRPV4, αντίστοιχα (Deering-Rice και συν. 2011, Li και συν. 2011). Ο έμμεσος μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του συζευγμένου με G-πρωτεΐνες υποδοχέα, PAR-2, και τη διάνοιξη του διαύλου TRPV4, μέσω κινητοποίησης των σηματοδοτικών μορίων PI3K και PLC γ (Li και συν. 2011). Παρόλα αυτά, ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός των ιόντων ασβεστίου στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, αποκάλυψε μειωμένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου, παρουσία DEP, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αυτή η κατάσταση δεν συνάδει με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα και η ερμηνεία της απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση στο περιεχόμενο του ΕΔ, που αποτελεί την κυριότερη αποθήκη Ca^{2+} του κυττάρου. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, που δρουν μέσω κινητοποίησης ιόντων ασβεστίου, όπως αυτά των ιντερλευκινών, περιλαμβάνουν την απελευθέρωση ιόντων στο κυτταρόπλασμα από τους υποδοχείς τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP $_3$ R) ή ρυανοδίνης (RyR) του ΕΔ και την επακόλουθη εισροή εξωκυττάρων ιόντων Ca^{2+} , από ειδικούς διαύλους της πλασματικής μεμβράνης, με σκοπό την αναπλήρωση των αποθηκών (Clapham 2007). Συνεπώς, η υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} στο ΕΔ, σε συνθήκες ηρεμίας, υποδηλώνει ένα ενισχυμένο δυναμικό κυτταρικής σηματοδότησης, το οποίο επιβεβαιώνεται από την αυξημένη εισροή ιόντων, που παρατηρήθηκε, μετά την τεχνητή εκκένωση του ΕΔ με την προσθήκη θαψιγκαργκίνης. Αντίστοιχη απόκριση έχει παρατηρηθεί και σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων μακροφάγων, παρουσία νανοσωματιδίων άνθρακα (ultrafine carbon black, ufCB) (Stone και συν. 2000). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι στην περίπτωση της επίδρασης ενός αγωνιστή, όπως, για παράδειγμα, μιας κυτταροκίνης, τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη σηματοδότηση των ιόντων ασβεστίου και, κατά συνέπεια, την έκφραση των προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι η ευαισθητοποίηση κυττάρων A549 με TNF- α , ενισχύει την

παραγωγή IL-8, κατά την επίδραση υπολειμμάτων τέφρας πετρελαίου, σε σύγκριση με τα μη ευαίσθητοποιημένα κύτταρα (Stringer & Kobzik 1998). Κατά συνέπεια, άτομα με προϋπάρχοντα αναπνευστικά προβλήματα, που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή, αναμένεται να παρουσιάσουν σημαντική επιδείνωση, ύστερα από έκθεση σε ναοσωματιδιακά μίγματα της ατμόσφαιρας.

3. BENZO[α]ΠΥΡΕΝΙΟ

Το βενζο[α]πυρένιο (B[α]P) είναι ένας ιδιαίτερα κοινός και καλά χαρακτηρισμένος οργανικός ρύπος, της κατηγορίας των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα μίγματα, δεν έχει σωματιδιακή φύση, αλλά επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικά συστατικά του οργανικού κλάσματος των ναοσωματιδίων DEP και, γενικότερα των ατμοσφαιρικών ρύπων, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των οργανικών ρύπων.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι σημαντικότερες επιδράσεις του B[α]P, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του. Τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα, αναλύονται λεπτομερώς στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 57: Η διαφορετική επίδραση του B[α]P στην κυτταρική επιβίωση, συναρτήσει της συγκέντρωσής του.

Το Β[α]Ρ, λόγω της λιποφιλικότητάς του, εισέρχεται με παθητική διάχυση στο εσωτερικό του κυττάρου και προσδένεται στον κυτταροπλασματικό υποδοχέα AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Στη συνέχεια, ο AhR συνδέεται με τον ARNT (ή HIF-1β) στον πυρήνα και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων του κυτοχρώματος Ρ450. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων είναι ένζυμα της φάσης Ι, που μεταβολίζουν το χημικά αδρανές Β[α]Ρ και άλλους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, παράγοντας ισχυρά ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις, όπως οι κινόνες και τα εποξειδία διόλης (Shimada & Fujii-Kuriyama 2004). Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), που παράγονται στις αντιδράσεις μεταβολισμού και οι ηλεκτρονιόφιλοι μεταβολίτες, είναι υπεύθυνοι για την οξειδωτική βλάβη του DNA και το σχηματισμό σταθερών προϊόντων προσθήκης (DNA adducts), αντίστοιχα (Marnett 2000, Alexandron και συν. 2010). Τα κύτταρα Α549 εκφράζουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος Ρ450 και, συνεπώς μπορούν να μεταβολίσουν το Β[α]Ρ (Hukkanen και συν. 2000). Η γενετοξική δράση του ρύπου στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα, επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση προϊόντων προσθήκης στο γενετικό υλικό (**Εικόνα 32**), καθώς και θραύσεων της αλυσίδας του DNA (**Εικόνα 33**). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν ιδιαίτερα υψηλές (100μΜ), με αποτέλεσμα οι βλάβες να είναι εκτεταμένες και να συνοδεύονται από ήπια κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, οι γενετοξικές επιδράσεις του Β[α]Ρ, έχουν παρατηρηθεί και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (1-5μΜ), σε διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, χωρίς επιπτώσεις στην κυτταρική επιβίωση (Hockley και συν. 2006, Takemura και συν. 2010, Tarantini και συν. 2011). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η βλάβη του γενετικού υλικού οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου, έτσι ώστε να δράσουν τα επιδιορθωτικά ένζυμα ή – αν αυτό δεν είναι δυνατό – να πυροδοτηθεί ο αποπτωτικός θάνατος (Epoch & Norbury 1995). Οποιαδήποτε ανεπάρκεια στα μόρια που ρυθμίζουν αυτό το μηχανισμό, μπορεί να οδηγήσει στη διατήρηση των βλαβών και την προοδευτική εξαλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα κύτταρα LNCaP, αποτυγχάνουν να προχωρήσουν σε παύση του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση, ακόμα και μετά από αναστολή του μονοπατιού PI3K/Akt, παρά τον υψηλό αριθμό προϊόντων προσθήκης, που δημιουργούνται κατά την επώασή τους με 25μΜ Β[α]Ρ. Όπως διαπιστώθηκε, αυτό οφείλεται στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (Hrubá και συν. 2010). Τελικά, η γενετοξικότητα, συνιστά μια συστηματική επίδραση, η οποία, σε συνδυασμό με αλλαγές στη σηματοδότηση, μπορεί να αλλάξει τη «μοίρα» του κυττάρου.

Στη συνέχεια, επιλέχτηκε μια λιγότερο κυτταροτοξική συγκέντρωση Β[α]Ρ (20μΜ), προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση του ρύπου, σε συνδυασμό με τα

τεχνητά νανοσωματίδια PLGA. Τα PLGA, όπως και πολλά άλλα νανοσωματίδια, αποτελούν προϊόντα της νανοτεχνολογίαςˆ μιας σύγχρονης και ταχύτατα αναπτυσσόμενης επιστήμης, με εφαρμογές από τη βιομηχανία καταλυτών, μέχρι την κοσμετολογία και την ιατρική. Η νέα τεχνολογία βασίζεται στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, που χαρακτηρίζουν τα σωματίδια αυτής της κλίμακας μεγέθους, όπως ο υψηλός λόγος «επιφάνειας/μάζας» και το αυξημένο δυναμικό προσρόφησης/εγκλεισμού άλλων μορίων. Ωστόσο, παρά την ευρεία χρήση αυτών των προϊόντων, οι ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις τους στην υγεία και το περιβάλλον, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλα τοξικά συστατικά της ατμόσφαιρας, βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση (Smita και συν. 2012). Τα νανοσωματίδια PLGA, συγκεκριμένα, είναι βιοδιασπώμενα συμπολυμερή γαλακτικού-γλυκολικού οξέος, που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών, τη διάγνωση, την κλινική και τη βασική έρευνα, με την έγκριση του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ. Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν δύο βασικά πλεονεκτήματα. Αφενός, η τροποποίηση της αναλογίας των δύο μονομερών παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου του ρυθμού διάσπασης των νανοσωματιδίων και απελευθέρωσης της ενεργής ουσίας, και, αφετέρου, τα προϊόντα καταβολισμού τους, μεταβολίζονται στον κύκλο του Krebs, όπως οι αντίστοιχες ενδογενείς ενώσεις, χωρίς τοξικές επιπτώσεις για τα κύτταρα (Ming και συν. 2009). Στην παρούσα μελέτη, πριν εξετάσουμε την αλληλεπίδραση των PLGA με το B[α]P, ελέγξαμε την επίδρασή τους στα κύτταρα A549. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα PLGA δεν επηρέασαν σημαντικά την κυτταρική επιβίωση, ενώ η μείωση στην ενεργοποίηση της Akt και στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α, παρατηρήθηκε μόνο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50μg/ml. Η μείωση των δύο δεικτών επιβίωσης, σε αυτές τις συνθήκες, είναι πιθανό να οφείλεται στην αδυναμία του κυττάρου να διαχειριστεί τις υψηλές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών, που προκύπτουν από τη διάσπαση των νανοσωματιδίων και, κυρίως του γαλακτικού οξέος. Η συσσώρευση γαλακτικού οξέος ελαττώνει το pH του κυττάρου, με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των μονοπατιών σηματοδότησης και της γονιδιακής έκφρασης, ενώ, πρόσφατα, διαπιστώθηκε και η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της κινάσης Akt (Chen και συν. 2008). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, επιλέξαμε τη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση των 25μg/ml και πραγματοποιήσαμε ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με PLGA και B[α]P. Σε αντίθεση με τη μεμονωμένη επίδραση των δύο παραγόντων, η οποία δεν είχε ιδιαίτερη επίπτωση στους δείκτες επιβίωσης, ο συνδυασμός PLGA και B[α]P μείωσε δραστικά, τόσο την ενεργοποίηση της Akt, όσο και τα επίπεδα του HIF-1α (**Εικόνα 38**). Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία του PLGA, ενίσχυσε

σημαντικά την τοξική δράση του ρύπου. Όπως προαναφέρθηκε, τα νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται από αυξημένη τάση προσρόφησης μορίων στη επιφάνειά τους. Συνεπώς, η απόκριση αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στην προσρόφηση μορίων B[α]P στην επιφάνεια των PLGA, με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του ρύπου. Με τον τρόπο αυτό, ακόμα και θεωρητικά ασφαλείς συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικών ρύπων, θα μπορούσαν να εκδηλώσουν τοξικότητα, ανάλογη με αυτή που αναμένουμε από πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Κατά συνέπεια, λόγω της ευρείας χρήσης και της ανεξέλεγκτης απελευθέρωσης των νέων προϊόντων της νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον, κατά το διεξοδικό έλεγχο της τοξικότητάς τους, είναι αναγκαίο να λαμβάνεται υπ' όψιν και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους με άλλα συστατικά της ατμόσφαιρας.

Η συνέχεια των πειραμάτων επικεντρώθηκε στη μελέτη της δράσης μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P, με σκοπό να διαπιστωθούν μεταβολές σε σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες, που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην κατανόηση της καρκινογόνου δράσης των οργανικών ρύπων. Παρατηρώντας την καμπύλη βιωσιμότητας, διαπιστώσαμε ότι το B[α]P, σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 7μM, ενισχύει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A549 (**Εικόνα 31**). Μάλιστα, ο αριθμός των κυττάρων διατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά του μάρτυρα, ακόμα και μετά από 72 ώρες συνεχούς επώασης. Επειδή, ο σχεδιασμός του πειράματος δεν επιτρέπει την ανανέωση του θρεπτικού υλικού κατά τη διάρκεια της επώασης, η πτωτική τάση, που παρουσιάζεται στις 72 ώρες, μπορεί να αποδοθεί στην εξάντληση των αυξητικών παραγόντων του θρεπτικού υλικού, σε συνδυασμό με τη συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων, στο περιβάλλον της καλλιέργειας. Σε μοριακό επίπεδο, αντίστοιχη ήταν και η απόκριση των δεικτών επιβίωσης, Akt και HIF-1α. Συγκεκριμένα, η επώαση των κυττάρων με 2,5μM B[α]P, όπου παρατηρήθηκαν οι μέγιστες τιμές βιωσιμότητας, ενίσχυσε, τόσο την ενεργοποίηση της Akt, όσο και τον HIF-1α, μετά από 24 ώρες. Το πρότυπο αυτό, όμως, ανεστράφη σε χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα των 72 ωρών, γεγονός που αντανακλάται στην πτωτική τάση της καμπύλης κυτταροτοξικότητας. Μελέτη σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου υποστηρίζει ότι το B[α]P (2,5μM) διαταράσσει τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 και προωθώντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S. Η ενεργοποίηση των ERKs φαίνεται να μεσολαβεί την έκφραση της κυκλίνης D1, ενώ, τόσο οι JNKs, όσο και οι p38, ήταν απαραίτητες για τη μετάβαση G1/S (Du και συν. 2006). Η συσσώρευση των κυττάρων στη φάση S, παρατηρήθηκε και στην κυτταρική σειρά MCF7, παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης B[α]P. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας

συγχρονισμένες καλλιέργειες, διαπιστώθηκε η επαγωγή διαφορετικών μοριακών δεικτών, σε κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, οι κινάσες ERKs ενεργοποιήθηκαν στις φάσεις G1 και S, ο NrF2 στις φάσεις G2/M και το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt στη φάση G2/M (Hamouchene και συν. 2011). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια έρευνα των Kometani και συν., η οποία υποστηρίζει τη δυναμική του B[α]P να προκαλεί μόνιμες αλλαγές στο κυτταρικό προφίλ, ύστερα από μακροχρόνια επώαση. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν για 24 εβδομάδες, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, που περιείχε 1μM B[α]P, και για 8 επιπλέον εβδομάδες σε θρεπτικό με DMSO. Μετά το πέρας των 8 εβδομάδων, διαπιστώθηκε συστηματικά αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, απουσία ορού, η οποία συνοδεύεται από υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR και υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt (Kometani και συν. 2009). Το αποτέλεσμα αυτό δεν έρχεται απαραίτητα σε αντίθεση με τη μείωση των δεικτών επιβίωσης, που παρατηρήθηκε στο δικό μας κυτταρικό σύστημα μετά τις 72 ώρες, διότι, αφενός, χρησιμοποιήθηκε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση του ρύπου και, αφετέρου, υπήρχε η δυνατότητα ανακαλλιέργειας και ανανέωσης του θρεπτικού υλικού, ώστε να διατηρείται ο εκθετικός ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ορισμένες μελέτες, που υποστηρίζουν ότι το B[α]P εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, κυρίως σε κυτταρικούς τύπους με έντονο ρυθμό μεταβολισμού και υψηλά επίπεδα έκφρασης των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι ηπατικές κυτταρικές σειρές Hepa1c1c7 και F258. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η επαγωγή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, αποδόθηκε στην μαζική συσσώρευση ROS και δραστικών ηλεκτρονιόφιλων μεταβολιτών (Holme και συν. 2007, Nguyen και συν. 2010).

Στα πειράματα, που ακολούθησαν, εξετάστηκε η επίδραση του B[α]P, στη συγκέντρωση των 2,5μM, που, όπως διαπιστώθηκε, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα. Στις συνθήκες αυτές, πράγματι, παρατηρήθηκε επαγωγή όλων των δεικτών επιβίωσης, που μελετήθηκαν (**Εικόνα 41**). Η Akt παρουσίασε ένα διφασικό πρότυπο ενεργοποίησης με μια πολύ πρώιμη φωσφορυλίωση, η οποία διήρκεσε λιγότερο από μία ώρα και ένα δεύτερο μέγιστο στις 24 ώρες. Η αρχική, παροδική ενεργοποίηση της κινάσης – αν και ιδιαίτερα σύντομη – είναι χαρακτηριστική της απόκρισης ενός σηματοδοτικού μορίου. Η δευτερογενής ενεργοποίηση είναι πιθανό να μην οφείλεται στη δράση του ίδιου του B[α]P, αλλά στους δραστικούς μεταβολίτες, που παράγονται σταδιακά, κατά τη χημική τροποποίηση του ρύπου, από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Το εποξειδίο διόλης του B[α]P (BPDE), έχει αναφερθεί ότι επάγει το μονοπάτι της Akt

και των ERKs, μέσω φωσφορυλίωσης του αναρροϊκού μεμβρανικού υποδοχέα, EGFR, σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-10A) και δέρματος (C141) (Li και συν. 2004, Burdick και συν. 2006). Η ενεργοποίηση του EGFR στα MCF-10A, οφείλεται στην αύξηση του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου και την επακόλουθη φωσφορυλίωση της κινάσης Pyk2 (Burdick και συν. 2006). Ανάλογη επίδραση είχε και η κινόνη του B[α]P (BPQ), στην ίδια κυτταρική σειρά, με τη διαφορά ότι η επαγωγή του EGFR, σε αυτή την περίπτωση, αποδίδεται στο ήπιο οξειδωτικό στρες και, ειδικότερα, στη συσσώρευση H₂O₂ (Burdick και συν. 2003).

Συνθήκες ήπιου οξειδωτικού στρες διαπιστώθηκαν και στα κύτταρα A549, παρουσία B[α]P, όπως υποδηλώνεται από την αύξηση των ολικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα NrF2. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο NrF2 επάγεται κατά τα πρώτα στάδια του οξειδωτικού στρες, προκειμένου να κινητοποιήσει τους προστατευτικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και να αποτρέψει τον κυτταρικό θάνατο. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του NrF2 επιβεβαιώθηκε μέσω της μετατόπισής του στον πυρήνα και της επαγωγής της οξυγενάσης της αίμης (HO-1), που αποτελεί έναν από τους κυριότερους μεταγραφικούς στόχους του. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά το γεγονός της παροδικής παραμονής του NrF2 στον πυρήνα (2 ώρες), τα κυτταροπλασματικά επίπεδα της HO-1 παρέμειναν υψηλά, τουλάχιστον για 24 ώρες. Αντίστοιχο πρότυπο απόκρισης των δύο πρωτεϊνών είχε παρατηρηθεί και στις επαναλαμβανόμενες επώσεις με τα νανοσωματίδια DEP. Η καταστολή της έκφρασης της ανασταλτικής πρωτεΐνης, Keap1, έχει προταθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός έμμεσης θετικής ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα, από το B[α]P (Nguyen και συν. 2010). Είναι γνωστό ότι, τα χαμηλά επίπεδα ROS μπορούν να εκδηλώσουν μιτογόνο δράση ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά της κινάσης Akt, των ERKs, της φωσφολιπάσης PLCγ και των JAK/STAT (Martindale & Holbrook 2002). Συνεπώς, η ενίσχυση της επιβίωσης των κυττάρων A549, που παρατηρήθηκε παρουσία μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P, θα μπορούσε να αποδοθεί – τουλάχιστον εν μέρει – στο ήπιο οξειδωτικό στρες.

Ο τρίτος δείκτης, που μελετήθηκε, κατά την επώαση με B[α]P, ήταν ο μεταγραφικός παράγοντας και καρκινικός δείκτης, HIF-1α. Ο αριθμός των μελετών, που εξετάζουν την απόκριση του HIF-1α στο B[α]P είναι σχετικά μικρός και τα αποτελέσματα, μέχρι σήμερα, αντικρουόμενα. Σε ανθρώπινα κύτταρα ηωσινοφιλικής λευχαιμίας (EoL-1) και αδενοκαρκινώματος πνεύμονα (CL-5) έχει παρατηρηθεί επαγωγή του μεταγραφικού στόχου του HIF-1α, VEGF (Ueng και συν. 2005, Gu και συν. 2011). Η αντίστοιχη απόκριση σε επιδερμικά κύτταρα ποντικού (C141), παρουσία του μεταβολίτη BPDE, φαίνεται να μεσολαβείται από το μονοπάτι PI3K/Akt/AP-1, ανεξάρτητα από τον HIF-1α (Ding και συν. 2006). Πρέπει να

σημειωθεί ότι η συγκέντρωση B[α]P, που χρησιμοποιήθηκε στις παραπάνω μελέτες ήταν 10μM και, κατά συνέπεια, δεν περιλαμβάνεται στο εύρος συγκεντρώσεων με «προ-επιβιωτική» (*pro-survival*) δράση. Στην παρούσα διατριβή, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, εστίασαμε στη συγκέντρωση των 2,5μM, η οποία φαίνεται να ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αυτές τις συνθήκες, και σε αντιστοιχία με την επίδραση του οργανικού μίγματος των DEP, το B[α]P ενίσχυσε άμεσα τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α, ήδη από τα 30 πρώτα λεπτά της επώασης, ενώ, παράλληλα, παρατηρήθηκε μετατόπισή του στον πυρήνα και έκφραση του γονιδίου-στόχου του, GLUT1 (**Εικόνα 42**). Είναι γεγονός, ότι το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο αύξησης των ολικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα δεν συμπίπτει με την παροδική συσσώρευσή του στον πυρήνα. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, όπως και στην περίπτωση της HO-1, παραμένουν υψηλά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μια πιθανή ερμηνεία της ασυμφωνίας ολικών/πυρηνικών επιπέδων του HIF-1α, θα μπορούσε να είναι η ανάπτυξη ανταγωνισμού, μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα και του κυτταροπλασματικού υποδοχέα του B[α]P, AhR, για ετεροδιμερισμό με τον ίδιο προσδέτη, τη πρωτεΐνη HIF-1β (ή ARNT). Η ύπαρξη κοινού προσδέτη αναφέρθηκε για πρώτη φορά στα ηπατικά κύτταρα HepG2, από τους Gradin και συν., οι οποίοι διαπίστωσαν, επιπλέον, ότι η χημικά επαγόμενη υποξία, μέσω CoCl₂, μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του CYP1A1, ενώ ο αγωνιστής του AhR, TCDF, δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση HIF-1α/ARNT (Gradin και συν. 1996). Μελέτες στην κυτταρική σειρά Hepa1, επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα (Gassmann και συν. 1997, Kim & Sheen 2000). Από την άλλη πλευρά, ανάλογες έρευνες υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι του AhR παρεμποδίζει την απόκριση στην υποξία, χωρίς, όμως, να συμβαίνει το αντίθετο. Για παράδειγμα, η επαγωγή του AhR, από το TCDD, μειώνει την έκφραση του γονιδίου-στόχου του HIF-1α, CA-IX, στα κύτταρα HeLa (Takacova και συν. 2009). Ωστόσο, υπάρχουν και ενδείξεις υπέρ της αμοιβαίας αναστολής των δύο μονοπατιών, δηλαδή της καταστολής των υποξικών αποκρίσεων, από αγωνιστές του AhR και, παράλληλα, της μειωμένης σύνθεσης των γονιδίων-στόχων του ετεροδιμερούς AhR/ARNT, σε συνθήκες υποξίας (Chan και συν. 1999, Nie και συν. 2001). Πρόσφατη μελέτη, στα κύτταρα A549, υποστηρίζει ότι, σε συνθήκες υποξίας, το B[α]P, προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση στη μεταγραφή του CA-IX, ενώ, αντίστοιχα, το CoCl₂ παρεμποδίζει την έκφραση των ενζύμων μεταβολισμού του B[α]P (Schults και συν. 2010). Τελικά, αν και η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μονοπατιών έχει επανειλημμένως τεκμηριωθεί, η αποσαφήνιση του υπεύθυνου μηχανισμού χρίζει περαιτέρω διερεύνησης και φαίνεται να επηρεάζεται άμεσα από

παράγοντες, όπως ο κυτταρικός τύπος, ο εκάστοτε αγωνιστής του AhR και το ερέθισμα, που επάγει τον HIF-1α.

Είναι γνωστό βιβλιογραφικά, ότι μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που εντοπίζονται αναρροϊκά των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και NrF2, συμπεριλαμβάνεται και το μονοπάτι PI3K/Akt. Έτσι, στη συνέχεια, εξετάσαμε το ενδεχόμενο η πρώιμη ενεργοποίηση της κινάσης Akt, παρουσία του B[α]P, να εμπλέκεται στην επαγωγή των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Όσον αφορά στον HIF-1α, συγκεκριμένα, η καταστολή της PI3K παρεμπόδισε πλήρως τη συσσώρευση του στον πυρήνα, υποδηλώνοντας ότι, πράγματι, η κινάση Akt διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτήν την απόκριση (**Εικόνα 43**). Έχουν διατυπωθεί πολλές υποθέσεις σχετικά με το επίπεδο ρύθμισης του HIF-1α από το μονοπάτι της κινάσης Akt, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Σε μεταφραστικό επίπεδο, ύστερα από την επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών ή μικρών σηματοδοτικών μορίων, η Akt αυξάνει το ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-1α, μέσω των καταρροϊκών στόχων της, mTOR και p70S6K1 (Zhong και συν. 2000, Zundel και συν. 2000, Fukuda και συν. 2002, Fukuda και συν. 2003, Jiang & Liu 2009). Επίσης, αυξάνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης μέσω δύο διακριτών μηχανισμών: αφενός, ενισχύοντας την έκφραση των μοριακών συνοδών hsp, οι οποίες προστατεύουν τον HIF-1α από την αλληλεπίδραση με την pVHL (Zhou και συν. 2004), και αφετέρου, καταστέλλοντας την κινάση GSK3, η οποία φωσφορυλιώνει την ODD επικράτεια του HIF-1α, επάγοντας την αποικοδόμησή του (Sodhi και συν. 2001). Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η κινάση Akt αλληλεπιδρά με τη σταθερή υπομονάδα HIF-1β, αυξάνοντας τη συγγένεια πρόσδεσής της με τη ρυθμιστική υπομονάδα HIF-1α (Li και συν. 2005). Συνεπώς, η συσσώρευση του HIF-1α, παρουσία B[α]P, θα μπορούσε να αποδοθεί, τόσο στη μετα-μεταφραστική του σταθεροποίηση, όσο και στην εκ νέου σύνθεσή του. Δεν ισχύει, όμως το ίδιο και για την απόκριση του μεταγραφικού παράγοντα NrF2, ο οποίος δεν παρουσίασε καμία μεταβολή, κατά την καταστολή της PI3K. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανό να εμπλέκονται διαφορετικά αναρροϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως, για παράδειγμα, των MAP κινασών ή/και της PKC (Neerghen και συν. 2010).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο HIF-1α είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που μπορεί να προκαλέσει ριζικές αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία, είτε συμβάλλοντας στην εξαλλαγή φυσιολογικών κυττάρων, σε συνδυασμό με άλλους μεταλλαξογόνους παράγοντες, είτε εξασφαλίζοντας την επιβίωση και αυξάνοντας το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η επιβεβαίωση της πρώιμης επαγωγής του, παρουσία του B[α]P και, γενικότερα, κοινών καρκινογόνων ρύπων, στους οποίους εκτιθέμεθα καθημερινά, έχει ιδιαίτερη

σημασία για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους και, ακολούθως, για την πρόληψη των επιπτώσεών τους στην υγεία. Στο πλαίσιο αυτό, εξετάσαμε αν η απόκριση, που παρατηρήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, ανιχνεύεται και σε άλλα κυτταρικά συστήματα ή σε συνδυασμό με επιπλέον στρεσογόνες συνθήκες, που χαρακτηρίζουν παθολογικές καταστάσεις του πνεύμονα.

Το δέρμα αποτελεί μία από τις κύριες οδούς έκθεσης στους ατμοσφαιρικούς ρύπους, λόγω της άμεσης επαφής του με το εξωτερικό περιβάλλον. Αν και ο καρκίνος του δέρματος συνδέεται, κατά κανόνα, με την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (UVA και UVB) και λιγότερο με τους ατμοσφαιρικούς ρύπους, έχει προταθεί ότι η παράλληλη έκθεση σε οργανικούς ρύπους, όπως το B[α]P, ενισχύει την καρκινογόνο δράση της ακτινοβολίας, αυξάνοντας σημαντικά την παραγωγή H₂O₂ και την επακόλουθη οξειδωτική βλάβη του DNA (Liu και συν. 1998, Shyong και συν. 2003, Burke & Wei 2009). Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, το δεύτερο κυτταρικό σύστημα, στο οποίο εξετάστηκε η επίδραση του B[α]P, ήταν τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα καρκινώματος δέρματος, A431. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των βιοχημικών αποκρίσεων, που επάγονται από αγωνιστές του AhR, καθώς εκφράζει υψηλά επίπεδα του υποδοχέα, στο κυτταρόπλασμα (Harper και συν. 1988). Κατά τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, τα κύτταρα A431, παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο απόκρισης με τα πνευμονικά, όσον αφορά στην προώθηση της επιβίωσης σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις B[α]P, επιβεβαιώνοντας και σε αυτό το *in vitro* σύστημα, την «προ-επιβιωτική» δράση του ρύπου. Αντίστοιχες με τα πνευμονικά κύτταρα ήταν και οι αποκρίσεις των A431, σε μοριακό επίπεδο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε άμεση και στατιστικά σημαντική επαγωγή των δεικτών επιβίωσης Akt και HIF-1α (**Εικόνα 48**), με ορισμένες διαφορές, όσον αφορά στην ένταση και το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο των αποκρίσεων. Σε αντίθεση με τα A549, η συσσώρευση του HIF-1α στα επιδερμικά κύτταρα, ήταν παροδική και τα επίπεδα του επανήλθαν σταδιακά σε αυτά του μάρτυρα, μετά τις 2 ώρες επώασης. Σημαντικά πιο έντονη και μεγαλύτερης διάρκειας, σε σύγκριση με τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, ήταν η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt. Αυτή η διαφοροποίηση θα μπορούσε να αποδοθεί, στην ιδιότητα των κυττάρων A431 να υπερεκφράζουν τον υποδοχέα EGFR (Wrann & Fox 1979). Στην περίπτωση αυτή, η ενεργοποίηση του EGFR από το ήλιο οξειδωτικό στρες, που προκαλούν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις B[α]P, είναι αναμενόμενο να οδηγεί σε έντονη επαγωγή του μονοπατιού PI3K/Akt, αλλά και όλων των μονοπατιών μεταγωγής σήματος καταρροϊκά του υποδοχέα. Επίσης, η ενεργοποίηση της Akt, παρουσία B[α]P, ήταν εμφανής από τα πρώτα 15 λεπτά της επώασης και προηγείτο της

συσσώρευσης του HIF-1α. Συνεπώς, και σε αυτή την περίπτωση, η απόκριση του μεταγραφικού παράγοντα είναι πιθανό να μεσολαβείται – τουλάχιστον εν μέρει – από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Άλλωστε, όπως έχει ήδη περιγραφεί, η αλληλεπίδραση των δύο μονοπατιών, σε συνθήκες, που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, έχει παρατηρηθεί σε πολλά διαφορετικά κυτταρικά συστήματα (Zhong και συν. 2000, Zundel και συν. 2000, Sodhi και συν. 2001, Fukuda και συν. 2002, Fukuda και συν. 2003, Zhou και συν. 2004, Jiang & Liu 2009) και επιβεβαιώθηκε και στα κύτταρα A549, κατά την επίδραση αυξητικών παραγόντων του ορού.

Αν και οι κυτταρικές σειρές A549 και A431 χρησιμοποιούνται ευρέως σε *in vitro* τοξικολογικές μελέτες, θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν ότι πρόκειται για καρκινικά και όχι φυσιολογικά κύτταρα. Η σχετικά σύντομη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και το θεωρητικά απεριόριστο δυναμικό διπλασιασμού των κυτταρικών σειρών, είναι τα κυριότερα πλεονεκτήματά τους, σε σύγκριση με τις πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, η αναγωγή των οποιωνδήποτε αποκρίσεων ενός ανάλογου συστήματος, στις φυσιολογικές συνθήκες, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και επιφυλακτικότητα. Στην παρούσα διατριβή, παράλληλα με τις κυτταρικές σειρές, ελέγξαμε τις αποκρίσεις στο B[α]P και σε δύο πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα και δέρματος ανθρώπου. Οι ινοβλάστες, στις *in vivo* συνθήκες δεν ανήκουν στους κυτταρικούς τύπους, που έρχονται σε άμεση επαφή με τους ατμοσφαιρικούς ρύπους, καθώς βρίσκονται βυθισμένοι στο στρώμα του συνδετικού ιστού. Οι σωματιδιακοί ρύποι, όμως, ή ορισμένα συστατικά τους, μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση σε αυτά τα κύτταρα, είτε με διακυτταρική ή/και παρακυτταρική μεταφορά, διαμέσου της επιθηλιακής στιβάδας, είτε μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Η επαγωγή του HIF-1α επιβεβαιώθηκε και στις δύο πρωτογενείς καλλιέργειες, μετά από 24 ώρες επώασης με 2,5μM B[α]P (**Εικόνα 49**). Η κινάση Akt, αντίθετα, δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή στο ίδιο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, επειδή πρόκειται για ένα τυπικό σηματοδοτικό μόριο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο παροδικής ενεργοποίησής της σε μικρότερους χρόνους. Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση του B[α]P σε πρωτογενείς καλλιέργειες είναι περιορισμένα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όμως, παρουσιάζει μια μελέτη σε ανθρώπινα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, τα οποία μετά από δύο ή τρεις επαναλαμβανόμενες 24ωρες επώσεις με 1μg/ml B[α]P (~4μM), απέκτησαν χαρακτηριστικά αθανатоποιημένων κυττάρων. Αν και δεν παρατηρήθηκε κακοήθης εξαλλαγή, τα κύτταρα αυτά, εμφάνισαν πολλές από τις ιδιότητες των αντίστοιχων καρκινικών κυττάρων (Stampfer & Bartley 1985). Στην περίπτωση των φυσιολογικών ινοβλαστών, η 24ωρη επώαση δεν άφησε κάποια

μακροπρόθεσμη επίπτωση στα κύτταρα, καθώς τα επίπεδα του HIF-1α επανήλθαν πλήρως, 2 ώρες μετά την απομάκρυνση του ρύπου. Θα είχε, όμως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον, να διερευνηθεί, μελλοντικά, η απόκριση αυτών των δεικτών, σε ένα πρωτόκολλο επαναλαμβανόμενων επώασεων, όπως στην προηγούμενη έρευνα ή στην περίπτωση των νανοσωματιδίων DEP. Την παραπάνω υπόθεση ενισχύουν τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από πρωτογενή καλλιέργεια ινοβλαστών αρουραίου. Στην περίπτωση αυτή, ανιχνεύτηκε σημαντική επαγωγή, τόσο της κινάσης Akt, όσο και του HIF-1α, παρουσία B[α]P και το προφίλ αυτό διατηρήθηκε, σε μεγάλο ποσοστό, δύο ώρες μετά την απομάκρυνση του ρύπου. Η διαπίστωση αυτή αποτελεί μια ακόμη ένδειξη της ικανότητας του B[α]P να προκαλεί «μόνιμες» αλλαγές στην κυτταρική φυσιολογία. Ωστόσο, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα, εξακολουθεί να είναι αναγκαία.

Μεταξύ των επιπτώσεων της ρύπανσης στην υγεία του ανθρώπου, περιλαμβάνεται και η επιδείνωση προϋπαρχόντων αναπνευστικών προβλημάτων, όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Στο πλαίσιο αυτό, εκτός από τη σύγκριση των αποκρίσεων διαφορετικών κυτταρικών τύπων και ιστών στο B[α]P, εξετάσαμε την επίδραση του ρύπου στον HIF-1α, σε συνδυασμό με στρεσογόνες συνθήκες, που χαρακτηρίζουν ορισμένες από αυτές τις παθολογικές καταστάσεις. Αρχικά, επιλέξαμε την υποξία, η οποία, προσομοιώθηκε με τη χρήση μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης CoCl_2 . Υποξικές συνθήκες σε έναν πνεύμονα συναντώνται κυρίως σε παθήσεις όπως το άσθμα, η κυστική ίνωση και ο καρκίνος, αλλά μπορούν να προκύψουν, τοπικά, και κατά τη συσσώρευση εισπνεόμενων ρύπων στις αναπνευστικές επιφάνειες των κυψελίδων. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου αποτελεί το κατ' ενοχήν επαγωγικό ερέθισμα, για τον HIF-1α (Greer και συν. 2012). Επώαση με B[α]P για 1 ώρα, σε υποξικές συνθήκες (κύτταρα A549, προ-επωασμένα με CoCl_2 , για 1 ώρα) προκάλεσε στατιστικά σημαντική ενίσχυση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα, σε σύγκριση με την επίδραση του CoCl_2 , μεμονωμένα (**Εικόνα 44**). Αντίστοιχη ήταν η απόκριση και στην περίπτωση, όπου οι δύο παράγοντες προστέθηκαν ταυτόχρονα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η διαπίστωση αυτή έρχεται, φαινομενικά, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Schults και συν., στο ίδιο κυτταρικό σύστημα, τα οποία υποστηρίζουν ότι το B[α]P μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α, παρουσία CoCl_2 , λόγω του ανταγωνισμού, που αναπτύσσεται μεταξύ AhR και HIF-1α, για πρόσδεση στον HIF-1β/ARNT (Schults και συν. 2010). Η υψηλότερη συγκέντρωση CoCl_2 (300μM, έναντι των 50μM), που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς και η μεγαλύτερη χρονική διάρκεια της επώασης (19 ώρες), θα μπορούσαν να αιτιολογήσουν αυτή την ασυμφωνία. Επιπλέον, τα μόρια HIF-1α, που

συσσωρεύονται, παρουσία της χαμηλής συγκέντρωσης CoCl_2 , είναι πιθανό να μην επαρκούν για τη δέσμευση του συνόλου των διαθέσιμων μορίων HIF-1 β /ARNT, με αποτέλεσμα να μην παρεμποδίζεται η παράλληλη πρόσδεση του AhR και ο μεταβολισμός του ρύπου. Η αθροιστική επίδραση υποξίας και B[α]P, υποδηλώνει ότι η έκθεση στο B[α]P ή σε ανάλογους οργανικούς ρύπους της ατμόσφαιρας, ενδέχεται να επιδεινώσει τα συμπτώματα της νόσου, ενισχύοντας την προϋπάρχουσα φλεγμονώδη κατάσταση. Είναι προφανές ότι, ο συνδυασμός της μιτογόνου και μεταλλαξογόνου δράσης του B[α]P, με τα εξαιρετικά ενισχυμένα επίπεδα του HIF-1 α , σε αυτές τις συνθήκες, διαμορφώνει ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό περιβάλλον για την εξαλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου και την σταδιακή ανάπτυξη ενός όγκου.

Η επόμενη στρεσογόνος συνθήκη, που επιλέχθηκε να μελετηθεί είναι η στέρηση των αυξητικών παραγόντων, μέσω της αφαίρεσης του ορού, από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Επειδή, η κύρια πηγή αυξητικών παραγόντων, *in vivo*, είναι η κυκλοφορία του αίματος, αυτή η στρεσογόνος κατάσταση θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει την περίπτωση της εμβολής κάποιου αγγείου. Επίσης, όπως αναλύθηκε νωρίτερα, βιβλιογραφικά δεδομένα, αλλά και πειράματα του εργαστηρίου μας σε πολυάριθμα κυτταρικά συστήματα, μεταξύ των οποίων και τα A549, έχουν αποδείξει ότι οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν θετικά τα επίπεδα του HIF-1 α , μέσω ενός μηχανισμού, που μεσολαβείται, σε μεγάλο ποσοστό, από το μονοπάτι PI3K/Akt. Όπως ήταν αναμενόμενο, η στέρηση του ορού, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα. Ωστόσο, η επίδραση του B[α]P σε κύτταρα A549, τα οποία είχαν ήδη καλλιεργηθεί απουσία ορού, για 24 ώρες, αύξησε τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 α , σε συνθήκες, μη-ευνοϊκές για την έκφρασή του. Αξίζει, μάλιστα, να σημειωθεί ότι η αύξηση του HIF-1 α , ήταν ενισχυμένη κατά ~12%, σε σχέση με την απόκριση, που παρατηρήθηκε στο πλήρες θρεπτικό υλικό (**Εικόνα 46**). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού MCF-10A, προτείνεται ότι οι ROS, που παράγονται από τους δραστικούς μεταβολίτες του B[α]P, 1,3-BPQ και 1,6-BPQ, ενεργοποιούν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ακόμα και απουσία EGF, από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας (Rodriguez-Fragoso και συν. 2009). Αν και στη συγκεκριμένη μελέτη, τα μονοπάτια που εξετάστηκαν καταρροϊκά του EGFR ήταν αυτά της PLC γ_1 και των STAT, είναι τεκμηριωμένο ότι μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών, που κινητοποιούνται από τον υποδοχέα, συμπεριλαμβάνεται και το μονοπάτι PI3K/Akt. Συνεπώς, η ανεξάρτητη από αυξητικούς παράγοντες, ενεργοποίηση του EGFR, και η επακόλουθη φωσφορυλίωση της Akt, θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη συσσώρευση του HIF-1 α , σε συνθήκες απουσίας ορού. Επιπλέον, οι ίδιοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η

ενεργοποίηση του EGFR από τις BPs δεν ακολουθείται από ενδοκυττάρωση του υποδοχέα, όπως συμβαίνει κατά την επαγωγή του από προσδέτη. Η απουσία αυτού του μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη σηματοδότηση του υποδοχέα, η οποία προωθεί την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενισχύοντας την προ-καρκινική δράση του B[a]P.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι **η άμεση επαγωγή του HIF-1α, παρουσία του οργανικού ρύπου B[a]P, σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, είναι συστηματική, καθώς επιβεβαιώθηκε σε όλα τα κυτταρικά συστήματα και τις συνθήκες, που εξετάστηκαν.** Στις περισσότερες περιπτώσεις, ανιχνεύθηκε παράλληλη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt, το οποίο – τουλάχιστον στα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, A549 – αποδείχθηκε ότι μεσολαβεί την απόκριση του HIF-1α. Η παραγωγή ROS, κατά το μεταβολισμό του B[a]P, αποτελεί αναμφισβήτητα έναν από τους μηχανισμούς επαγωγής του μονοπατιού της Akt (Burdick και συν. 2003). Το γεγονός, όμως ότι η Akt παρουσίασε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (15 λεπτά), μετά την προσθήκη του ρύπου, μας οδήγησε στη διατύπωση μιας εναλλακτικής υπόθεσης για την επίδραση του B[a]P στην κινάση, η οποία βασίζεται στην κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου. Τα ιόντα ασβεστίου συνιστούν ένα ταχύτατα αποκρινόμενο δεύτερο μήνυμα, που κινητοποιείται από ποικίλα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα και συμμετέχει στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, μεταξύ των οποίων, η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός, η κυτταρική διαίρεση, αλλά και ο αποπτωτικός θάνατος (Clapham 2007). Ένα ποσοστό του B[a]P, λόγω της λιπόφιλης φύσης του, εγκλωβίζεται στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών, όπου αλληλεπιδρά με διαύλους ασβεστίου διαταράσσοντας την ομοιόσταση των ιόντων (Barhoumi και συν. 2000). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt καταλύεται, ύστερα από προσέλευση της πρωτεΐνης στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης (Song και συν. 2005). Με βάση αυτά τα δεδομένα εξετάστηκε, αρχικά, ο ρόλος του B[a]P στην ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου στα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα, A549, και, στη συνέχεια, η πιθανή εμπλοκή των ιόντων στην φωσφορυλίωση της κινάσης Akt.

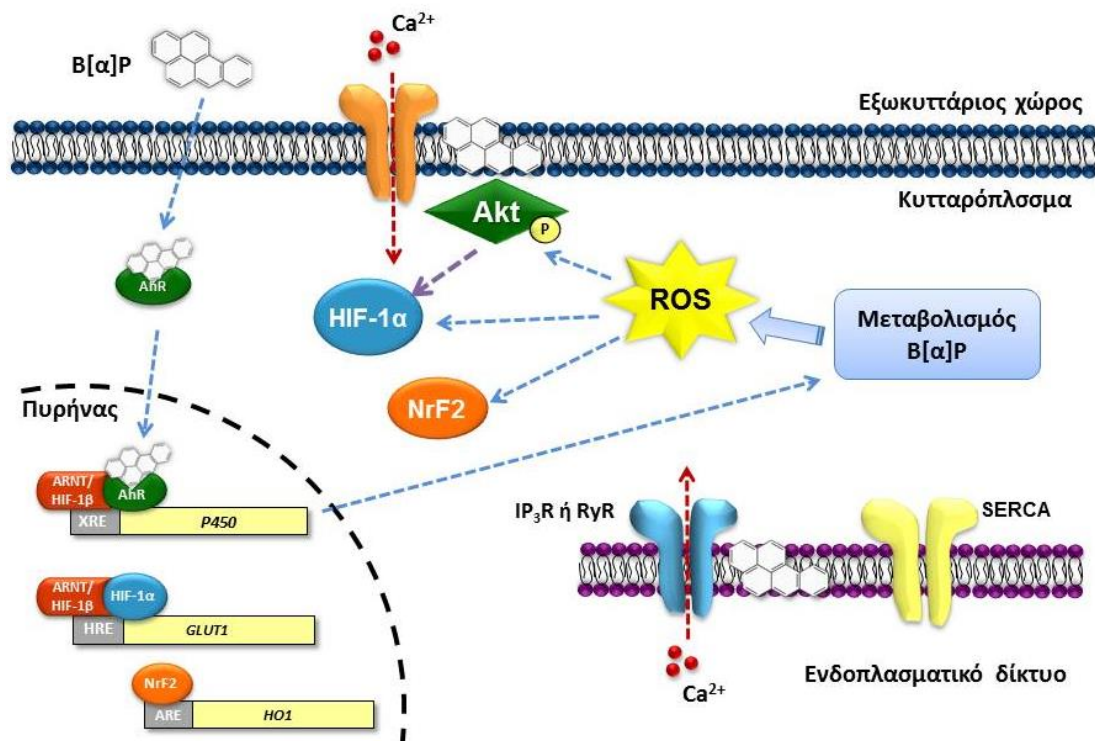
Η ιδιότητα του B[a]P και άλλων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων να αυξάνουν τα επίπεδα του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου $[Ca^{2+}]_i$, καταγράφηκε αρκετά νωρίς. Η πλειοψηφία των μελετών, επικεντρώθηκε σε κύτταρα της λεμφοειδούς σειράς, όπου η αύξηση του Ca^{2+} συνδέθηκε με τις ανοσοκατασταλτικές επιπτώσεις των PAHs, και σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού και ήπατος (Krieger και συν. 1994, Tannheimer και συν. 1997, Tannheimer και συν. 1999, Barhoumi και συν. 2000). Αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επιπλέον ιόντα

προέρχονται από τον εξωκυττάριο χώρο (Tannheimer και συν. 1999), ο μηχανισμός εισροής Ca^{2+} , παρουσία του $\text{B}[\alpha]\text{P}$ δεν έχει διαλευκανθεί μέχρι σήμερα. Πράγματι, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας, η επώαση των κυττάρων A549 με 2,5 μM $\text{B}[\alpha]\text{P}$ αύξησε τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και, παράλληλα, μείωσε το περιεχόμενο του ΕΔ (**Εικόνα 52**). Η μείωση του Ca^{2+} στο ΕΔ πυροδοτεί την πρόσληψη ιόντων από το εξωκυττάριο περιβάλλον, διαμέσου των διαύλων SOCs, προκειμένου να αναπληρωθούν οι κυτταρικές αποθήκες (Putney 2009). Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως CCE (Capacitative Calcium Entry) και είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή κυτταρική σηματοδότηση. Παρ' όλα αυτά, τα κύτταρα A549, που είχαν επωαστεί με $\text{B}[\alpha]\text{P}$, εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα πρόσληψης Ca^{2+} , μετά από τεχνητή εκκένωση του ΕΔ, από τον αναστολέα της αντλίας SERCA, θαψιγκαργκίνη. Συνεπώς, οι διάυλοι SOCs δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην αύξηση του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, παρουσία $\text{B}[\alpha]\text{P}$, στο παρόν σύστημα. Μία άλλη κατηγορία διαύλων της πλασματικής μεμβράνης είναι η υπεροικογένεια των μη ειδικών κατιονικών διαύλων TRPs, οι οποίοι ενεργοποιούνται έμμεσα, από την πρόσδεση αγωνιστών σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs), ή συζευγμένους με G πρωτεΐνες (GPCRs) (Ramsey και συν. 2006). Ένας τέτοιος αγωνιστής είναι και η βραδυκικίνη (BK). Πρόκειται για ένα μικρό πεπτίδιο, που εκκρίνεται κυρίως από τον τραυματισμένο ιστό και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η φλεγμονή, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και αυξάνοντας τη διαπερατότητα των αγγείων (Golias και συν. 2007). Οι υποδοχείς της BK ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs και δρώντας, κυρίως, μέσω της PLC, ενεργοποιούν τους μεμβρανικούς διαύλους TRPV1 και TRPA1, με αποτέλεσμα την εισροή ιόντων Ca^{2+} και Na^+ στο κυτταρόπλασμα. Η PLC μπορεί να ενεργοποιήσει τους TRPs με δύο εναλλακτικούς τρόπους: αφενός, υδρολύοντας την PIP₂, η οποία καταστέλλει τη λειτουργία των διαύλων και, αφετέρου, μέσω παραγωγής IP₃ και απελευθέρωσης Ca^{2+} από το ΕΔ (Bessac & Jordt 2008). Στα κύτταρα A549, η λειτουργικότητα των υποδοχέων της BK διαπιστώθηκε, μόνο σε συνθήκες υποξίας (CoCl_2). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι η αύξηση του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, κατά την επίδραση της BK, σε αυτές τις συνθήκες, ήταν σημαντικά ενισχυμένη στα κύτταρα, που είχαν προεπωαστεί με $\text{B}[\alpha]\text{P}$ (**Εικόνα 53**). Επιπλέον, και στις δύο περιπτώσεις, η απόκριση στη BK εκμηδενίστηκε, όταν το πείραμα πραγματοποιήθηκε, απουσία ιόντων Ca^{2+} από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Συνεπώς, η παρατηρούμενη αύξηση του ασβεστίου οφείλεται στην εισροή ιόντων διαμέσου διαύλων της πλασματικής μεμβράνης και φαίνεται πως το $\text{B}[\alpha]\text{P}$, πράγματι, ενισχύει το δυναμικό πρόσληψης αυτών των ιόντων.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν φαρμακευτικοί παράγοντες, έτσι ώστε να εξεταστεί η απόκριση της Akt και του HIF-1α, στις αλλαγές της ομοιόστασης ιόντων ασβεστίου. Για λόγους σύγκρισης, παράλληλα με τα πνευμονικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν και τα κύτταρα A431. Η μαζική, μη ειδική κινητοποίηση Ca^{2+} , από το ιονοφόρο ιονομυκίνη, είχε ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση της Akt, με τα κύτταρα A549 να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο ιονοφόρο, ενώ λιγότερο σαφή ήταν τα αποτελέσματα για τον HIF-1α. Η μείωση στη φωσφορυλίωση της Akt ήταν ασύμφωνη με την απόκριση της κινάσης στο B[α]P. Αντίθετα, η εκκένωση του ΕΔ, από τη θαψιγκαργκίνη και η επακόλουθη εισροή ιόντων, μέσω διαύλων της πλασματικής μεμβράνης, ενεργοποίησε την κινάση Akt και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ενδιαφέρον, σε αυτή την περίπτωση, παρουσιάζει και το πρότυπο απόκρισης του HIF-1α. Ο μεταγραφικός παράγοντας μειώθηκε δραματικά, αμέσως μετά την εκκένωση του ΕΔ, ενώ, στη συνέχεια, παρατηρήθηκε σταδιακή ανάκαμψη των επιπέδων του. Είναι γνωστό ότι η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου ενεργοποιεί ένα εναλλακτικό μονοπάτι αποικοδόμησης του HIF-1α, το οποίο περιλαμβάνει την αποικοδόμησή του από τις καλπαΐνες, ανεξάρτητα από την pVHL και το πρωτεάσωμα (Zhou και συν. 2006). Η ανακατανομή των ιόντων Ca^{2+} με την πάροδο του χρόνου, σε συνδυασμό με την ενίσχυση της μετάφρασης του HIF-1α, από το μονοπάτι της κινάσης Akt, θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν το ρυθμό αποικοδόμησης και να ερμηνεύσουν τη σταδιακή ανάκαμψη των πρωτεϊνικών του επιπέδων. Είναι γεγονός, ότι αυτό το πρότυπο απόκρισης διαφοροποιείται σε μεγάλο βαθμό από την επίδραση του B[α]P στο μεταγραφικό παράγοντα. Ωστόσο, η μείωση του περιεχομένου του ΕΔ κατά ~36%, παρουσία B[α]P, απέχει σημαντικά από το έντονο στρες της πλήρους και μη αντιστρεπτής εκκένωσης των ενδοκυττάρων αποθηκών, από τη θαψιγκαργκίνη.

Ιδιαίτερα, όσον αφορά στην κινάση Akt, η επιλεκτική φωσφορυλίωσή της, κατά την επαγωγή του μηχανισμού CCE, και όχι κατά τη μη ειδική συσσώρευση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνει πως η απόκριση της κινάσης σχετίζεται περισσότερο με τη δραστηριότητα των μεμβρανικών διαύλων, παρά με τη γενικότερη αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω αυτή την υπόθεση, προσαρμόσαμε την πειραματική διαδικασία, έτσι ώστε να απομονώσουμε το γεγονός της εισροής και να εξετάσουμε την επίδρασή του στην κινάση. Συγκεκριμένα, μετά από τεχνητή εκκένωση του ΕΔ, σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} από το εξωκυττάριο περιβάλλον, χορηγήθηκε ασβέστιο εξωγενώς. Η επακόλουθη εισροή ιόντων, οδήγησε, πράγματι, σε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της Akt, τουλάχιστον από τα 3 πρώτα λεπτά (**Εικόνα 56**). Το αποτέλεσμα αυτό προσθέτει ένα επιπλέον υποστηρικτικό στοιχείο στην αρχική

υπόθεση, ότι η ενισχυμένη διακίνηση Ca^{2+} , διαμέσου μεμβρανικών διαύλων, συνιστά έναν από τους μηχανισμούς, που ευθύνονται για την άμεση ενεργοποίηση της Akt, από το B[α]P. Συνεπώς, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να ταυτοποιηθούν οι κατηγορίες διαύλων, που συμμετέχουν σε αυτό το μηχανισμό, καθώς και να διερευνηθεί ο ακριβής τρόπος αλληλεπίδρασής τους με την κινάση.



Εικόνα 58: Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων B[α]P σε μοριακούς δείκτες, που σχετίζονται με την προστασία του κυττάρου έναντι του οξειδωτικού στρες και την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης. Τα μόρια του B[α]P, τα οποία διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, αλληλεπιδρούν με τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα AhR και επάγουν έμμεσα την έκφραση των ενζύμων μεταβολισμού τους (ένζυμα κυτοχρώματος P450). Οι ηλεκτρονιόφιλοι μεταβολίτες, καθώς και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου, που παράγονται, ενεργοποιούν τον κυτταροπροστατευτικό μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, καθώς και τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α. Η απόκριση του τελευταίου μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από την ενεργοποιημένη κινάση Akt. Επιπλέον, ένα ποσοστό B[α]P, λόγω της λιποφιλικότητάς του, εγκλωβίζεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες του κυττάρου, και αλληλεπιδρά με διαύλους ασβεστίου, αυξάνοντας την συγκέντρωση του ελεύθερου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και ενισχύοντας το δυναμικό πρόσληψης ιόντων Ca^{2+} . Η εισροή Ca^{2+} , μέσω διαύλων της πλασματικής μεμβράνης, φαίνεται να ενισχύει άμεσα τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt, η οποία, με τη σειρά της, επάγει τον HIF-1α. Σε κάθε περίπτωση, η αύξηση των ολικών επιπέδων των δύο μεταγραφικών παραγόντων ακολουθείται από τη συσσώρευσή τους στον πυρήνα και τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα κυριότερα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, συνοψίζονται ως εξής:

- ❖ Οι χαμηλές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις οργανικών ρύπων, επάγουν άμεσα τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη μεταγραφική δραστηριότητα του καρκινικού δείκτη, HIF-1α. Η απόκριση αυτή ήταν συστηματική μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων πνεύμονα και δέρματος, που εξετάστηκαν, και διατηρείται, παρουσία στρεσογόνων συνθηκών, που χαρακτηρίζουν ποικίλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του HIF-1α διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.
- ❖ Η ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου τροποποιείται σημαντικά παρουσία μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων οργανικών ρύπων. Ειδικότερα, ο κοινός καρκινογόνος ρύπος, B[α]P, αυξάνει το δυναμικό πρόσληψης ιόντων ασβεστίου μέσω διαύλων της πλασματικής μεμβράνης και η ενισχυμένη εισροή των ιόντων ρυθμίζει έμμεσα την επαγωγή του HIF-1α, μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt.
- ❖ Οι επιπτώσεις της βραχυπρόθεσμης, αλλά επαναλαμβανόμενης, έκθεσης στους ατμοσφαιρικούς ρύπους, φαίνεται να είναι αθροιστικές και ικανές να προκαλέσουν μη αναστρέψιμες αλλαγές, στο μοριακό υπόβαθρο του κυττάρου. Όταν η τροποποίηση σηματοδοτικών μορίων και μεταγραφικών παραγόντων, που προωθούν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, συνδυαστεί με την γενετοξική και μεταλλαξογόνο δράση ορισμένων συστατικών της ρύπανσης, οι πιθανότητες σταδιακής εξαλλαγής του κυτταρικού φαινοτύπου αυξάνονται σημαντικά.
- ❖ Οι επιπτώσεις της έκθεσης στους ατμοσφαιρικούς ρύπους, δεν αφορούν αποκλειστικά τα κύτταρα και τους ιστούς, που έρχονται σε άμεση επαφή με την ατμόσφαιρα. Αντίθετα, η μεταφορά συστατικών της ρύπανσης, αλλά κυρίως προφλεγμονωδών παρακρινικών παραγόντων, σε παρακείμενους ή απομακρυσμένους ιστούς, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μπορεί να επεκτείνει τις βλάβες σε επίπεδο συστήματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adam-Vizi, V. and A. A. Starkov (2010). "Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts." J Alzheimers Dis **20 Suppl 2**: S413-426.
2. Aggarwal, B. B. (2004). "Nuclear factor-kappaB: the enemy within." Cancer Cell **6**(3): 203-208.
3. Akdis, M., S. Burgler, et al. (2011). "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 701-721 e701-770.
4. Akhtar, U. S., R. D. McWhinney, et al. (2010). "Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles." Inhal Toxicol **22 Suppl 2**: 37-47.
5. Alexandrov, K., M. Rojas, et al. (2010). "The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation." Toxicol Lett **198**(1): 63-68.
6. Alfaro-Moreno, E., L. Martinez, et al. (2002). "Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City." Environ Health Perspect **110**(7): 715-720.
7. Alfaro-Moreno, E., T. S. Nawrot, et al. (2008). "Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10." Eur Respir J **32**(5): 1184-1194.
8. Analitis, A., K. Katsouyanni, et al. (2006). "Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality." Epidemiology **17**(2): 230-233.
9. Andjelkovic, M., D. R. Alessi, et al. (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." J Biol Chem **272**(50): 31515-31524.
10. Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, et al. (1996). "Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5699-5704.
11. Arsham, A. M., D. R. Plas, et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription." J Biol Chem **277**(17): 15162-15170.
12. Ashcroft, M. (2005). "HIF-1 α regulation by proline hydroxylation." Expert Rev Mol Med **7**(6).
13. Atkinson, R. W., H. R. Anderson, et al. (2001). "Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. Air Pollution and Health: a European Approach." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1860-1866.
14. Aust, A. E., J. C. Ball, et al. (2002). "Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells." Res Rep Health Eff Inst(110): 1-65; discussion 67-76.
15. Ausubel, F. M. (1991). "Current Protocols in Molecular Biology." New York: Wiley Interscience.
16. Baccarelli, A., I. Martinelli, et al. (2008). "Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis." Arch Intern Med **168**(9): 920-927.
17. Baccarelli, A., A. Zanobetti, et al. (2007). "Effects of exposure to air pollution on blood coagulation." J Thromb Haemost **5**(2): 252-260.
18. Baeza-Squiban, A., V. Bonvallot, et al. (1999). "Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors." Cell Biol Toxicol **15**(6): 375-380.
19. Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." Arch Toxicol **85**(4): 241-272.

20. Barhoumi, R., Y. Mouneimne, et al. (2000). "Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line." Toxicol Sci **53**(2): 264-270.
21. Baulig, A., M. Garlatti, et al. (2003). "Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(3): L671-679.
22. Baulig, A., M. Sourdeval, et al. (2003). "Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles." Toxicol In Vitro **17**(5-6): 567-573.
23. Bayram, H., K. Ito, et al. (2006). "Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles." Eur Respir J **27**(4): 705-713.
24. Becker, S., L. A. Dailey, et al. (2005). "Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress." Environ Health Perspect **113**(8): 1032-1038.
25. Befani, C. D., P. J. Vlachostergios, et al. (2012). "Bortezomib represses HIF-1alpha protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells." J Mol Med (Berl) **90**(1): 45-54.
26. BelAiba, R. S., T. Djordjevic, et al. (2004). "Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells." Biol Chem **385**(3-4): 249-257.
27. Belkacemi, L., I. Bedard, et al. (2005). "Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review." Cell Calcium **37**(1): 1-8.
28. Bellacosa, A., J. R. Testa, et al. (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." Science **254**(5029): 274-277.
29. Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-648.
30. BeruBe, K., D. Balharry, et al. (2007). "Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(10): 1044-1050.
31. Bessac, B. F. and S. E. Jordt (2008). "Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control." Physiology (Bethesda) **23**: 360-370.
32. Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, et al. (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7421-7426.
33. Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal (2003). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." J Biol Chem **278**(45): 44675-44682.
34. Bonello, S., C. Zahringer, et al. (2007). "Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(4): 755-761.
35. Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.
36. Borm, P. J., G. Cakmak, et al. (2005). "Formation of PAH-DNA adducts after in vivo and vitro exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks." Toxicol Appl Pharmacol **205**(2): 157-167.
37. Borm, P. J., R. P. Schins, et al. (2004). "Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment." Int J Cancer **110**(1): 3-14.
38. Bostrom, C. E., P. Gerde, et al. (2002). "Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air." Environ Health Perspect **110** Suppl 3: 451-488.

39. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
40. Brauer, M., C. Avila-Casado, et al. (2001). "Air pollution and retained particles in the lung." Environ Health Perspect **109**(10): 1039-1043.
41. Brognard, J., E. Sierceki, et al. (2007). "PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms." Mol Cell **25**(6): 917-931.
42. Brown, D. M., K. Donaldson, et al. (2004). "Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(2): L344-353.
43. Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.
44. Bulavin, D. V. and A. J. Fornace, Jr. (2004). "p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor." Adv Cancer Res **92**: 95-118.
45. Burdick, A. D., J. W. Davis, 2nd, et al. (2003). "Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells." Cancer Res **63**(22): 7825-7833.
46. Burdick, A. D., I. D. Ivnitski-Steele, et al. (2006). "PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells." Carcinogenesis **27**(11): 2331-2340.
47. Burgering, B. M. and R. H. Medema (2003). "Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty." J Leukoc Biol **73**(6): 689-701.
48. Burke, K. E. and H. Wei (2009). "Synergistic damage by UVA radiation and pollutants." Toxicol Ind Health **25**(4-5): 219-224.
49. Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
50. Buschmann, T., O. Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress." Mol Cell Biol **21**(8): 2743-2754.
51. Carnero, A. (2010). "The PKB/AKT pathway in cancer." Curr Pharm Des **16**(1): 34-44.
52. Carter, J. D., A. J. Ghio, et al. (1997). "Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent." Toxicol Appl Pharmacol **146**(2): 180-188.
53. Catterall, W. A. (2011). "Voltage-gated calcium channels." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(8): a003947.
54. Chan, K. and Y. W. Kan (1999). "Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12731-12736.
55. Chan, W. K., G. Yao, et al. (1999). "Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation." J Biol Chem **274**(17): 12115-12123.
56. Chen, J. L., J. E. Lucas, et al. (2008). "The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers." PLoS Genet **4**(12): e1000293.
57. Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **276**(34): 31858-31862.
58. Chen, W., Z. Sun, et al. (2009). "Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response." Mol Cell **34**(6): 663-673.

59. Chen, W., X. Wang, et al. (2008). "Blockage of NF-kappaB by IKKbeta- or RelA-siRNA rather than the NF-kappaB super-suppressor IkappaBalpha mutant potentiates adriamycin-induced cytotoxicity in lung cancer cells." J Cell Biochem **105**(2): 554-561.
60. Cho, H. Y., A. E. Jedlicka, et al. (2002). "Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(2): 175-182.
61. Cho, H. Y., S. P. Reddy, et al. (2006). "Nrf2 defends the lung from oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(1-2): 76-87.
62. Choi, J. H., J. S. Kim, et al. (2004). "Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells." J Vet Sci **5**(1): 11-18.
63. Chong, H., H. G. Vikis, et al. (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." Cell Signal **15**(5): 463-469.
64. Churg, A. and M. Brauer (2000). "Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs." Ultrastruct Pathol **24**(6): 353-361.
65. Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-1058.
66. Clerk, A. and P. H. Sugden (1997). "Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes." Biochem J **325** (Pt 3): 801-810.
67. Coffey, P. J. and J. R. Woodgett (1991). "Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families." Eur J Biochem **201**(2): 475-481.
68. Cohen, A. J., H. Ross Anderson, et al. (2005). "The global burden of disease due to outdoor air pollution." J Toxicol Environ Health A **68**(13-14): 1301-1307.
69. Conhaim, R. L., A. Eaton, et al. (1988). "Equivalent pore estimate for the alveolar-airway barrier in isolated dog lung." J Appl Physiol **64**(3): 1134-1142.
70. Conus, N. M., K. M. Hannan, et al. (2002). "Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase." J Biol Chem **277**(41): 38021-38028.
71. Danielsen, P. H., S. Loft, et al. (2009). "Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines." Mutat Res **674**(1-2): 116-122.
72. Danielsen, P. H., S. Loft, et al. (2008). "DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles." Part Fibre Toxicol **5**: 6.
73. Datta, K., J. Li, et al. (2004). "Protein kinase C zeta transactivates hypoxia-inducible factor alpha by promoting its association with p300 in renal cancer." Cancer Res **64**(2): 456-462.
74. Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-2927.
75. Deb, T. B., C. M. Coticchia, et al. (2004). "Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells." J Biol Chem **279**(37): 38903-38911.
76. Deering-Rice, C. E., E. G. Romero, et al. (2011). "Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP." Chem Res Toxicol **24**(6): 950-959.
77. Dery, M. A., M. D. Michaud, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." Int J Biochem Cell Biol **37**(3): 535-540.
78. Devin, A., A. Cook, et al. (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-429.
79. Dhillon, A. S., S. Hagan, et al. (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." Oncogene **26**(22): 3279-3290.

80. Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* **12**(22): 3499-3511.
81. Dimmeler, S., E. Dernbach, et al. (2000). "Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration." *FEBS Lett* **477**(3): 258-262.
82. Ding, J., J. Li, et al. (2006). "Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on vascular endothelial growth factor induction through phosphatidylinositol 3-kinase/AP-1-dependent, HIF-1 α -independent pathway." *J Biol Chem* **281**(14): 9093-9100.
83. Don Porto Carero, A., P. H. Hoet, et al. (2001). "Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1)." *Environ Mol Mutagen* **37**(2): 155-163.
84. Donaldson, K., L. Tran, et al. (2005). "Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure." *Part Fibre Toxicol* **2**: 10.
85. Driscoll, K. E., L. C. Deyo, et al. (1997). "Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells." *Carcinogenesis* **18**(2): 423-430.
86. Du, H. J., N. Tang, et al. (2006). "Benzo[a]pyrene-induced cell cycle progression is through ERKs/cyclin D1 pathway and requires the activation of JNKs and p38 mapk in human diploid lung fibroblasts." *Mol Cell Biochem* **287**(1-2): 79-89.
87. Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." *J Biol Chem* **273**(49): 32377-32379.
88. Duprez, L., E. Wirawan, et al. (2009). "Major cell death pathways at a glance." *Microbes Infect* **11**(13): 1050-1062.
89. Duzgoren-Aydin, N. S. (2008). "Health effects of atmospheric particulates: a medical geology perspective." *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **26**(1): 1-39.
90. Dybdahl, M., L. Risom, et al. (2004). "Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo." *Mutat Res* **562**(1-2): 119-131.
91. Elder, A., R. Gelein, et al. (2006). "Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system." *Environ Health Perspect* **114**(8): 1172-1178.
92. Enoch, T. and C. Norbury (1995). "Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM." *Trends Biochem Sci* **20**(10): 426-430.
93. Evans, S. A., A. Al-Mosawi, et al. (2006). "Inflammation, edema, and peripheral blood changes in lung-compromised rats after instillation with combustion-derived and manufactured nanoparticles." *Exp Lung Res* **32**(8): 363-378.
94. Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." *J Biol Chem* **276**(2): 1071-1077.
95. Fairley, D. (1990). "The relationship of daily mortality to suspended particulates in Santa Clara County, 1980-1986." *Environ Health Perspect* **89**: 159-168.
96. Faraonio, R., P. Vergara, et al. (2006). "p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes." *J Biol Chem* **281**(52): 39776-39784.
97. Fasolato, C., M. Zottini, et al. (1991). "Intracellular Ca²⁺ pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca²⁺ accumulation, storage, and release." *J Biol Chem* **266**(30): 20159-20167.
98. Feldser, D., F. Agani, et al. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2." *Cancer Res* **59**(16): 3915-3918.
99. Feng, J., J. Park, et al. (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **279**(39): 41189-41196.

100. Flugel, D., A. Gorch, et al. (2007). "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner." Mol Cell Biol **27**(9): 3253-3265.
101. Fong, C. W., M. S. Chua, et al. (2006). "Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **66**(4): 2048-2058.
102. Frampton, M. W., A. J. Ghio, et al. (1999). "Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells." Am J Physiol **277**(5 Pt 1): L960-967.
103. Freshney, R. (1993). "Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique." New York: Wiley-Liss.
104. Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells." Genes Dev **12**(17): 2658-2663.
105. Fukuda, R., K. Hirota, et al. (2002). "Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38205-38211.
106. Fukuda, R., B. Kelly, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1." Cancer Res **63**(9): 2330-2334.
107. Galabova-Kovacs, G., A. Kolbus, et al. (2006). "ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts." Cell Cycle **5**(14): 1514-1518.
108. Gallagher, J., R. Sams, 2nd, et al. (2003). "Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black." Toxicol Appl Pharmacol **190**(3): 224-231.
109. Gallus, S., E. Negri, et al. (2008). "European studies on long-term exposure to ambient particulate matter and lung cancer." Eur J Cancer Prev **17**(3): 191-194.
110. Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death Differ **14**(7): 1237-1243.
111. Gassmann, M., I. Kvietikova, et al. (1997). "Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells." Kidney Int **51**(2): 567-574.
112. Geys, J., L. Coenegrachts, et al. (2006). "In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study." Toxicol Lett **160**(3): 218-226.
113. Gillet, L. C. and O. D. Scharer (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair." Chem Rev **106**(2): 253-276.
114. Goliass, C., A. Charalabopoulos, et al. (2007). "The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin." Hippokratia **11**(3): 124-128.
115. Gorch, A., I. Diebold, et al. (2001). "Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase." Circ Res **89**(1): 47-54.
116. Gradin, K., J. McGuire, et al. (1996). "Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor." Mol Cell Biol **16**(10): 5221-5231.
117. Greer, S. N., J. L. Metcalf, et al. (2012). "The updated biology of hypoxia-inducible factor." EMBO J **31**(11): 2448-2460.
118. Griffin, M., R. Bhandari, et al. (1993). "Alveolar type II cell-fibroblast interactions, synthesis and secretion of surfactant and type I collagen." J Cell Sci **105** (Pt 2): 423-432.
119. Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.

120. Gu, J., L. S. Chan, et al. (2011). "Effect of benzo[a]pyrene on the production of vascular endothelial growth factor by human eosinophilic leukemia EoL-1 cells." J Environ Pathol Toxicol Oncol **30**(3): 241-249.
121. Haddad, J. J. (2002). "Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism." Eur Cytokine Netw **13**(2): 250-260.
122. Haddad, J. J. and S. C. Land (2001). "A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha." FEBS Lett **505**(2): 269-274.
123. Hamouchene, H., V. M. Arlt, et al. (2011). "Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo[a]pyrene." BMC Genomics **12**: 333.
124. Harper, P. A., C. L. Golas, et al. (1988). "Characterization of the Ah receptor and aryl hydrocarbon hydroxylase induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benz(a)anthracene in the human A431 squamous cell carcinoma line." Cancer Res **48**(9): 2388-2395.
125. Harrison, R. M. and J. Yin (2000). "Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?" Sci Total Environ **249**(1-3): 85-101.
126. Haslam, R. J., H. B. Koide, et al. (1993). "Pleckstrin domain homology." Nature **363**(6427): 309-310.
127. Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
128. Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
129. Helfand, W. H., J. Lazarus, et al. (2001). "Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century." Am J Public Health **91**(4): 553.
130. Helling, R. B., H. M. Goodman, et al. (1974). "Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis." J Virol **14**(5): 1235-1244.
131. Hellwig-Burgel, T., K. Rutkowski, et al. (1999). "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1." Blood **94**(5): 1561-1567.
132. Hilgemann, D. W., A. Yaradanakul, et al. (2006). "Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease." J Cardiovasc Electrophysiol **17** Suppl 1: S47-S56.
133. Hiura, T. S., N. Li, et al. (2000). "The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles." J Immunol **165**(5): 2703-2711.
134. Hockley, S. L., V. M. Arlt, et al. (2006). "Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo(a)pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2." BMC Genomics **7**: 260.
135. Holland, R. and J. C. Fishbein (2010). "Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1." Antioxid Redox Signal **13**(11): 1749-1761.
136. Holme, J. A., M. Gorria, et al. (2007). "Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells." Chem Biol Interact **167**(1): 41-55.
137. Howden, P. J. and S. P. Faux (1996). "Fibre-induced lipid peroxidation leads to DNA adduct formation in Salmonella typhimurium TA104 and rat lung fibroblasts." Carcinogenesis **17**(3): 413-419.
138. Hrubá, E., L. Trilecova, et al. (2010). "Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells." Toxicol Lett **197**(3): 227-235.

139. Hsiao, W. L., Z. Y. Mo, et al. (2000). "Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5--10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays." Mutat Res **471**(1-2): 45-55.
140. Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." J Biol Chem **277**(45): 42769-42774.
141. Huang, L. E., J. Gu, et al. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-7992.
142. Hukkanen, J., A. Lassila, et al. (2000). "Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(3): 360-366.
143. Hur, G. M., J. Lewis, et al. (2003). "The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation." Genes Dev **17**(7): 873-882.
144. Ichinose, T., Y. Yajima, et al. (1997). "Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles." Carcinogenesis **18**(1): 185-192.
145. Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-472.
146. Jain, A. K. and A. K. Jaiswal (2006). "Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2." J Biol Chem **281**(17): 12132-12142.
147. Janssens, S. and J. Tschopp (2006). "Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response." Cell Death Differ **13**(5): 773-784.
148. Jeong, J. W., M. K. Bae, et al. (2002). "Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation." Cell **111**(5): 709-720.
149. Jeong, S. Y. and D. W. Seol (2008). "The role of mitochondria in apoptosis." BMB Rep **41**(1): 11-22.
150. Jiang, B. H. and L. Z. Liu (2009). "PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis." Adv Cancer Res **102**: 19-65.
151. Jiang, B. H., E. Rue, et al. (1996). "Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(30): 17771-17778.
152. Jones, P. F., T. Jakubowicz, et al. (1991). "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4171-4175.
153. Jung, M. H., H. R. Kim, et al. (2012). "Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter(PM 10)collected from a subway tunnel in Seoul, Korea." Mutat Res **749**(1-2): 39-47.
154. Jung, Y. J., J. S. Isaacs, et al. (2003). "IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis." FASEB J **17**(14): 2115-2117.
155. Kampa, M. and E. Castanas (2008). "Human health effects of air pollution." Environ Pollut **151**(2): 362-367.
156. Kansanen, E., S. Kuosmanen, et al. (2013). "The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and desregulation in cancer." Redox Biology.
157. Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." Nat Rev Immunol **5**(10): 749-759.
158. Kato, T., Jr., M. Delhase, et al. (2003). "CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response." Mol Cell **12**(4): 829-839.
159. Katsouyanni, K., G. Touloumi, et al. (2001). "Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project." Epidemiology **12**(5): 521-531.

160. Kaufmann, S. H., C. M. Ewing, et al. (1987). "The erasable Western blot." *Anal Biochem* **161**(1): 89-95.
161. Ke, Q. and M. Costa (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." *Mol Pharmacol* **70**(5): 1469-1480.
162. Kefaloyianni, E., C. Gaitanaki, et al. (2006). "ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts." *Cell Signal* **18**(12): 2238-2251.
163. Kehrer, J. P. (2000). "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." *Toxicology* **149**(1): 43-50.
164. Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." *Biochim Biophys Acta* **1802**(4): 396-405.
165. Kim, J. E. and Y. Y. Sheen (2000). "Inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-stimulated Cyp1a1 promoter activity by hypoxic agents." *Biochem Pharmacol* **59**(12): 1549-1556.
166. Kim, S. Y., J. H. Lee, et al. (2011). "Cigarette smoke induces Akt protein degradation by the ubiquitin-proteasome system." *J Biol Chem* **286**(37): 31932-31943.
167. Kim, S. Y., J. H. Lee, et al. (2012). "Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**(9): L891-908.
168. Klein, S. G., J. Hennen, et al. (2011). "Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung." *Toxicol In Vitro* **25**(8): 1516-1534.
169. Knaapen, A. M., C. Albrecht, et al. (2002). "DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation." *Carcinogenesis* **23**(7): 1111-1120.
170. Knaapen, A. M., N. Gungor, et al. (2006). "Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review." *Mutagenesis* **21**(4): 225-236.
171. Knaapen, A. M., F. Seiler, et al. (1999). "Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells." *Free Radic Biol Med* **27**(1-2): 234-240.
172. Knight, D. (2001). "Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation." *Immunol Cell Biol* **79**(2): 160-164.
173. Kobayashi, A., M. I. Kang, et al. (2004). "Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2." *Mol Cell Biol* **24**(16): 7130-7139.
174. Kobayashi, M., L. Li, et al. (2009). "The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds." *Mol Cell Biol* **29**(2): 493-502.
175. Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 827-837.
176. Komatsu, M. and Y. Ichimura (2010). "Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy." *FEBS Lett* **584**(7): 1374-1378.
177. Komatsu, M., H. Kurokawa, et al. (2010). "The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1." *Nat Cell Biol* **12**(3): 213-223.
178. Kometani, T., I. Yoshino, et al. (2009). "Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway." *Cancer Lett* **278**(1): 27-33.
179. Kops, G. J., R. H. Medema, et al. (2002). "Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors." *Mol Cell Biol* **22**(7): 2025-2036.
180. Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* **278**(5336): 294-298.

181. Krieger, J. A., J. L. Born, et al. (1994). "Persistence of calcium elevation in the HPB-ALL human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons." Toxicol Appl Pharmacol **127**(2): 268-274.
182. Kumagai, Y., T. Arimoto, et al. (1997). "Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage." Free Radic Biol Med **22**(3): 479-487.
183. Kumar, S., J. Boehm, et al. (2003). "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases." Nat Rev Drug Discov **2**(9): 717-726.
184. Kunzli, N. and I. B. Tager (2005). "Air pollution: from lung to heart." Swiss Med Wkly **135**(47-48): 697-702.
185. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
186. Lancaster, D. E., L. A. McNeill, et al. (2004). "Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity." Biochem J **383**(Pt. 3): 429-437.
187. Lando, D., D. J. Peet, et al. (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16**(12): 1466-1471.
188. Larrieu, S., J. F. Jusot, et al. (2007). "Short term effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular diseases in eight French cities: the PSAS program." Sci Total Environ **387**(1-3): 105-112.
189. Le Tertre, A., S. Medina, et al. (2002). "Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities." J Epidemiol Community Health **56**(10): 773-779.
190. Lee, J. W., S. H. Bae, et al. (2004). "Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions." Exp Mol Med **36**(1): 1-12.
191. Legocki, R. P. and D. P. Verma (1981). "Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel." Anal Biochem **111**(2): 385-392.
192. Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
193. Li, J., P. Kanju, et al. (2011). "TRPV4-mediated calcium influx into human bronchial epithelia upon exposure to diesel exhaust particles." Environ Health Perspect **119**(6): 784-793.
194. Li, J., M. S. Tang, et al. (2004). "A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal Cl41 cells." Oncogene **23**(22): 3932-3944.
195. Li, N., J. Alam, et al. (2004). "Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals." J Immunol **173**(5): 3467-3481.
196. Li, N., M. Hao, et al. (2003). "Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects." Clin Immunol **109**(3): 250-265.
197. Li, N., C. Sioutas, et al. (2003). "Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage." Environ Health Perspect **111**(4): 455-460.
198. Li, N., T. Xia, et al. (2008). "The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles." Free Radic Biol Med **44**(9): 1689-1699.

199. Li, R., Z. Ning, et al. (2010). "Ultrafine particles from diesel vehicle emissions at different driving cycles induce differential vascular pro-inflammatory responses: implication of chemical components and NF-kappaB signaling." Part Fibre Toxicol **7**: 6.
200. Li, Y. M., B. P. Zhou, et al. (2005). "A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells." Cancer Res **65**(8): 3257-3263.
201. Liang, J. and J. M. Slingerland (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." Cell Cycle **2**(4): 339-345.
202. Liang, J., J. Zubovitz, et al. (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." Nat Med **8**(10): 1153-1160.
203. Lin, Y., L. Bai, et al. (2010). "The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy." Expert Opin Ther Targets **14**(1): 45-55.
204. Liu, Z., Y. Lu, et al. (1998). "Benzo[a]pyrene enhances the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by ultraviolet A radiation in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells." Biochemistry **37**(28): 10307-10312.
205. Logan, W. P. (1953). "Mortality in the London fog incident, 1952." Lancet **1**(6755): 336-338.
206. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
207. Luch, A. (2005). "Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis." Nat Rev Cancer **5**(2): 113-125.
208. Maier, K. L., F. Alessandrini, et al. (2008). "Health effects of ambient particulate matter--biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures." Inhal Toxicol **20**(3): 319-337.
209. Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-752.
210. Mamillapalli, R., N. Gavrilova, et al. (2001). "PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKP2)." Curr Biol **11**(4): 263-267.
211. Manalo, D. J., A. Rowan, et al. (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1." Blood **105**(2): 659-669.
212. Marano, F., S. Boland, et al. (2002). "Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles." Cell Biol Toxicol **18**(5): 315-320.
213. Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-370.
214. Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.
215. Marxsen, J. H., P. Stengel, et al. (2004). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases." Biochem J **381**(Pt 3): 761-767.
216. Mazzoli-Rocha, F., S. Fernandes, et al. (2010). "Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter." Cell Biol Toxicol **26**(5): 481-498.
217. Mills, N. L., N. Amin, et al. (2006). "Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?" Am J Respir Crit Care Med **173**(4): 426-431.
218. Ming, C., N. Gong, et al. (2009). "The current state of pancreas-kidney transplantation in China: the indications, surgical techniques and outcome." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **29**(3): 269-272.
219. Mirza, A. M., S. Gysin, et al. (2004). "Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT." Mol Cell Biol **24**(24): 10868-10881.
220. Monks, T. J., R. P. Hanzlik, et al. (1992). "Quinone chemistry and toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **112**(1): 2-16.

221. Moon, E. J., C. H. Jeong, et al. (2004). "Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha." FASEB J **18**(2): 382-384.
222. Morio, L. A., K. A. Hooper, et al. (2001). "Tissue injury following inhalation of fine particulate matter and hydrogen peroxide is associated with altered production of inflammatory mediators and antioxidants by alveolar macrophages." Toxicol Appl Pharmacol **177**(3): 188-199.
223. Moserova, I. and J. Kralova (2012). "Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways." PLoS One **7**(3): e32972.
224. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
225. Mukae, H., R. Vincent, et al. (2001). "The effect of repeated exposure to particulate air pollution (PM10) on the bone marrow." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 201-209.
226. Murphy, L. O., J. P. MacKeigan, et al. (2004). "A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration." Mol Cell Biol **24**(1): 144-153.
227. Mylonis, I., G. Chachami, et al. (2006). "Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha." J Biol Chem **281**(44): 33095-33106.
228. Naldini, A., I. Filippi, et al. (2010). "Interleukin-1beta regulates the migratory potential of MDAMB231 breast cancer cells through the hypoxia-inducible factor-1alpha." Eur J Cancer **46**(18): 3400-3408.
229. Nam, H. Y., E. K. Ahn, et al. (2006). "Diesel exhaust particles increase IL-1beta-induced human beta-defensin expression via NF-kappaB-mediated pathway in human lung epithelial cells." Part Fibre Toxicol **3**: 9.
230. Nawrot, T. S., R. Torfs, et al. (2007). "Stronger associations between daily mortality and fine particulate air pollution in summer than in winter: evidence from a heavily polluted region in western Europe." J Epidemiol Community Health **61**(2): 146-149.
231. Neergheen, V. S., T. Baborun, et al. (2010). "Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention." Toxicology **278**(2): 229-241.
232. Nel, A., T. Xia, et al. (2006). "Toxic potential of materials at the nanolevel." Science **311**(5761): 622-627.
233. Nel, A. E., D. Diaz-Sanchez, et al. (1998). "Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system." J Allergy Clin Immunol **102**(4 Pt 1): 539-554.
234. Nemery, B., P. H. Hoet, et al. (2001). "The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster." Lancet **357**(9257): 704-708.
235. Nemmar, A., P. H. Hoet, et al. (2002). "Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans." Circulation **105**(4): 411-414.
236. Nguyen, P. M., M. S. Park, et al. (2010). "Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message." Toxicol Sci **116**(2): 549-561.
237. Nie, M., A. L. Blankenship, et al. (2001). "Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways." Environ Toxicol Pharmacol **10**(1-2): 17-27.
238. Niture, S. K., J. W. Kaspar, et al. (2010). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 37-42.
239. Numazawa, S., M. Ishikawa, et al. (2003). "Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress." Am J Physiol Cell Physiol **285**(2): C334-342.

240. Oberdorster, G., E. Oberdorster, et al. (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environ Health Perspect* **113**(7): 823-839.
241. Oberdorster, G., Z. Sharp, et al. (2004). "Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain." *Inhal Toxicol* **16**(6-7): 437-445.
242. Oeckinghaus, A., M. S. Hayden, et al. (2011). "Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways." *Nat Immunol* **12**(8): 695-708.
243. Osornio-Vargas, A. R., J. C. Bonner, et al. (2003). "Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition." *Environ Health Perspect* **111**(10): 1289-1293.
244. Ostling, O. and K. J. Johanson (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* **123**(1): 291-298.
245. Ostman, A. and M. Augsten (2009). "Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players." *Curr Opin Genet Dev* **19**(1): 67-73.
246. Page, E. L., G. A. Robitaille, et al. (2002). "Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms." *J Biol Chem* **277**(50): 48403-48409.
247. Penning, T. M., M. E. Burczynski, et al. (1999). "Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones." *Chem Res Toxicol* **12**(1): 1-18.
248. Perera, F. (1981). "Carcinogenicity of airborne fine particulate benzo(a)pyrene: an appraisal of the evidence and the need for control." *Environ Health Perspect* **42**: 163-185.
249. Perez-Garcia, M. J., V. Cena, et al. (2004). "Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." *J Biol Chem* **279**(7): 6132-6142.
250. Perrone, M. G., M. Gualtieri, et al. (2010). "Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan." *Chemosphere* **78**(11): 1368-1377.
251. Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
252. Peters, A., B. Veronesi, et al. (2006). "Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update." *Part Fibre Toxicol* **3**: 13.
253. Phillips, D. H., P. B. Farmer, et al. (2000). "Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity." *Environ Mol Mutagen* **35**(3): 222-233.
254. Plas, D. R. and C. B. Thompson (2005). "Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving." *Oncogene* **24**(50): 7435-7442.
255. Poon, E., A. L. Harris, et al. (2009). "Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer." *Expert Rev Mol Med* **11**: e26.
256. Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, et al. (2002). "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." *JAMA* **287**(9): 1132-1141.
257. Pope, C. A., 3rd, J. B. Muhlestein, et al. (2006). "Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution." *Circulation* **114**(23): 2443-2448.
258. Pope, C. A., 3rd, J. Schwartz, et al. (1992). "Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley." *Arch Environ Health* **47**(3): 211-217.
259. Pourazar, J., I. S. Mudway, et al. (2005). "Diesel exhaust activates redox-sensitive transcription factors and kinases in human airways." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(5): L724-730.

260. Prahalad, A. K., J. Inmon, et al. (2001). "Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity." Chem Res Toxicol **14**(7): 879-887.
261. Provoost, S., T. Maes, et al. (2011). "NLRP3/caspase-1-independent IL-1beta production mediates diesel exhaust particle-induced pulmonary inflammation." J Immunol **187**(6): 3331-3337.
262. Pugh, C. W., J. F. O'Rourke, et al. (1997). "Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit." J Biol Chem **272**(17): 11205-11214.
263. Putney, J. W. (2009). "Capacitative calcium entry: from concept to molecules." Immunol Rev **231**(1): 10-22.
264. Putney, J. W., Jr. (2007). "Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here)." Cell Calcium **42**(2): 103-110.
265. Rachakonda, G., Y. Xiong, et al. (2008). "Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3." Chem Res Toxicol **21**(3): 705-710.
266. Ramsey, I. S., M. Delling, et al. (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
267. Rena, G., S. Guo, et al. (1999). "Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B." J Biol Chem **274**(24): 17179-17183.
268. Reynolds, J. A. and C. Tanford (1970). "The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes." J Biol Chem **245**(19): 5161-5165.
269. Rhodes, J. D. and J. Sanderson (2009). "The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens." Exp Eye Res **88**(2): 226-234.
270. Richard, D. E., E. Berra, et al. (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **275**(35): 26765-26771.
271. Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 405-413.
272. Rizzuto, R. and T. Pozzan (2006). "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences." Physiol Rev **86**(1): 369-408.
273. Rodriguez-Fragoso, L., K. Melendez, et al. (2009). "EGF-receptor phosphorylation and downstream signaling are activated by benzo[a]pyrene 3,6-quinone and benzo[a]pyrene 1,6-quinone in human mammary epithelial cells." Toxicol Appl Pharmacol **235**(3): 321-328.
274. Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.
275. Roth, M., M. Soler, et al. (1992). "Cell cultures from cryopreserved human lung tissue." Tissue Cell **24**(4): 455-459.
276. Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-99.
277. Salinovich, O. and R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **156**(2): 341-347.
278. Salvesen, G. S. and S. J. Riedl (2008). "Caspase mechanisms." Adv Exp Med Biol **615**: 13-23.
279. Salvi, S. S., C. Nordenhall, et al. (2000). "Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 1): 550-557.

280. Sambrook, J., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A Laboratory manual 2nd edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
281. Samet, J. M., F. Dominici, et al. (2000). "Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994." N Engl J Med **343**(24): 1742-1749.
282. Sang, N., D. P. Stiehl, et al. (2003). "MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300." J Biol Chem **278**(16): 14013-14019.
283. Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
284. Sato, H., H. Sone, et al. (2000). "Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust." Carcinogenesis **21**(4): 653-661.
285. Scarlatti, F., R. Granata, et al. (2009). "Does autophagy have a license to kill mammalian cells?" Cell Death Differ **16**(1): 12-20.
286. Schaumann, F., P. J. Borm, et al. (2004). "Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects." Am J Respir Crit Care Med **170**(8): 898-903.
287. Schins, R. P. (2002). "Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers." Inhal Toxicol **14**(1): 57-78.
288. Schins, R. P. and A. M. Knaapen (2007). "Genotoxicity of poorly soluble particles." Inhal Toxicol **19 Suppl 1**: 189-198.
289. Schmidt, M., S. Fernandez de Mattos, et al. (2002). "Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D." Mol Cell Biol **22**(22): 7842-7852.
290. Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 343-354.
291. Schults, M. A., L. Timmermans, et al. (2010). "Diminished carcinogen detoxification is a novel mechanism for hypoxia-inducible factor 1-mediated genetic instability." J Biol Chem **285**(19): 14558-14564.
292. Schwartz, J. (1994). "Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis." Environ Res **64**(1): 36-52.
293. Seaton, A., W. MacNee, et al. (1995). "Particulate air pollution and acute health effects." Lancet **345**(8943): 176-178.
294. Seaton, A., A. Soutar, et al. (1999). "Particulate air pollution and the blood." Thorax **54**(11): 1027-1032.
295. Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.
296. Sharp, P. A., B. Sugden, et al. (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis." Biochemistry **12**(16): 3055-3063.
297. Shi, T., A. M. Knaapen, et al. (2003). "Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter." Occup Environ Med **60**(5): 315-321.
298. Shi, X., M. J. Keane, et al. (2009). "Diesel exhaust particulate material expression of in vitro genotoxic activities when dispersed into a phospholipid component of lung surfactant." Journal of Physics: Conference Series **151**(1).
299. Shi, X., Y. Mao, et al. (1994). "Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation." Environ Health Perspect **102 Suppl 10**: 149-154.
300. Shimada, T. and Y. Fujii-Kuriyama (2004). "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1." Cancer Sci **95**(1): 1-6.

301. Shou, Y., N. Li, et al. (2002). "NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis." J Neurochem **81**(4): 842-852.
302. Shukla, A., C. Timblin, et al. (2000). "Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(2): 182-187.
303. Shyong, E. Q., Y. Lu, et al. (2003). "Synergistic enhancement of H₂O₂ production in human epidermoid carcinoma cells by Benzo[a]pyrene and ultraviolet A radiation." Toxicol Appl Pharmacol **188**(2): 104-109.
304. Silbajoris, R., A. R. Osornio-Vargas, et al. (2011). "Ambient particulate matter induces interleukin-8 expression through an alternative NF-kappaB (nuclear factor-kappa B) mechanism in human airway epithelial cells." Environ Health Perspect **119**(10): 1379-1383.
305. Simpson, L. and R. Parsons (2001). "PTEN: life as a tumor suppressor." Exp Cell Res **264**(1): 29-41.
306. Singh, N. P., M. Nagarkatti, et al. (2007). "Role of dioxin response element and nuclear factor-kappaB motifs in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated regulation of Fas and Fas ligand expression." Mol Pharmacol **71**(1): 145-157.
307. Slee, E. A., C. Adrain, et al. (2001). "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." J Biol Chem **276**(10): 7320-7326.
308. Smita, S., S. K. Gupta, et al. (2012). "Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach." Environ Health **11 Suppl 1**: S13.
309. Sodhi, A., S. Montaner, et al. (2001). "MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 292-300.
310. Song, G., G. Ouyang, et al. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.
311. Spector, D. (1998). "Cells: a Laboratory Manual." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
312. Stampfer, M. R. and J. C. Bartley (1985). "Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(8): 2394-2398.
313. Stephens, L., K. Anderson, et al. (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." Science **279**(5351): 710-714.
314. Stiehl, D. P., W. Jelkmann, et al. (2002). "Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." FEBS Lett **512**(1-3): 157-162.
315. Stone, V., M. Tuinman, et al. (2000). "Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black." Eur Respir J **15**(2): 297-303.
316. Stringer, B. and L. Kobzik (1998). "Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress." J Toxicol Environ Health A **55**(1): 31-44.
317. Surh, Y. J., J. K. Kundu, et al. (2008). "Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals." Planta Med **74**(13): 1526-1539.
318. Sykiotis, G. P. and D. Bohmann (2010). "Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease." Sci Signal **3**(112): re3.
319. Taguchi, K., H. Motohashi, et al. (2011). "Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution." Genes Cells **16**(2): 123-140.

320. Takacova, M., T. Holotnakova, et al. (2009). "Role of aryl hydrocarbon receptor in modulation of the expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX." Biochem J **419**(2): 419-425.
321. Takemura, H., H. Nagayoshi, et al. (2010). "Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells." Toxicology **274**(1-3): 42-48.
322. Tamaoki, J., K. Isono, et al. (2004). "Ultrafine carbon black particles stimulate proliferation of human airway epithelium via EGF receptor-mediated signaling pathway." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(6): L1127-1133.
323. Tang, T. T. and L. A. Lasky (2003). "The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism." J Biol Chem **278**(32): 30125-30135.
324. Tannheimer, S. L., S. L. Barton, et al. (1997). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca²⁺ and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells." Carcinogenesis **18**(6): 1177-1182.
325. Tannheimer, S. L., F. T. Lauer, et al. (1999). "Factors influencing elevation of intracellular Ca²⁺ in the MCF-10A human mammary epithelial cell line by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons." Mol Carcinog **25**(1): 48-54.
326. Tarantini, A., A. Maitre, et al. (2011). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells." Toxicology **279**(1-3): 36-44.
327. Tergaonkar, V., V. Bottero, et al. (2003). "IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy." Mol Cell Biol **23**(22): 8070-8083.
328. Terzano, C., F. Di Stefano, et al. (2010). "Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung." Eur Rev Med Pharmacol Sci **14**(10): 809-821.
329. Tharappel, J. C., J. Cholewa, et al. (2010). "Effects of cigarette smoke on the activation of oxidative stress-related transcription factors in female A/J mouse lung." J Toxicol Environ Health A **73**(19): 1288-1297.
330. Togo, S., H. Sugiura, et al. (2010). "Hepatic growth factor (HGF) inhibits cigarette smoke extract induced apoptosis in human bronchial epithelial cells." Exp Cell Res **316**(20): 3501-3511.
331. Tong, K. I., A. Kobayashi, et al. (2006). "Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism." Biol Chem **387**(10-11): 1311-1320.
332. Tornqvist, H., N. L. Mills, et al. (2007). "Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation." Am J Respir Crit Care Med **176**(4): 395-400.
333. Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
334. Tsai, D. H., N. Amyai, et al. (2012). "Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population." Part Fibre Toxicol **9**: 24.
335. Tsujita, E., A. Taketomi, et al. (2005). "Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma." Oncology (Williston Park) **69**(4): 342-347.
336. Ueng, T. H., C. C. Hung, et al. (2005). "Induction of fibroblast growth factor-9 and interleukin-1alpha gene expression by motorcycle exhaust particulate extracts and benzo(a)pyrene in human lung adenocarcinoma cells." Toxicol Sci **87**(2): 483-496.
337. Uhal, B. D., C. Ramos, et al. (1998). "Cell size, cell cycle, and alpha-smooth muscle actin expression by primary human lung fibroblasts." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): L998-L1005.

338. Unfried, K., C. Schurkes, et al. (2002). "Distinct spectrum of mutations induced by crocidolite asbestos: clue for 8-hydroxydeoxyguanosine-dependent mutagenesis in vivo." Cancer Res **62**(1): 99-104.
339. Valavanidis, A., K. Fiotakis, et al. (2008). "Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev **26**(4): 339-362.
340. Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
341. van Maanen, J. M., P. J. Borm, et al. (1999). "In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells." Inhal Toxicol **11**(12): 1123-1141.
342. Vanden Berghe, T., M. Kalai, et al. (2006). "Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not." Cell Signal **18**(3): 328-335.
343. Vandenabeele, P., T. Vanden Berghe, et al. (2006). "Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways." Sci STKE **2006**(358): pe44.
344. Vander Haar, E., S. I. Lee, et al. (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." Nat Cell Biol **9**(3): 316-323.
345. Varfolomeev, E., T. Goncharov, et al. (2008). "c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **283**(36): 24295-24299.
346. Viatour, P., M. P. Merville, et al. (2005). "Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation." Trends Biochem Sci **30**(1): 43-52.
347. Vineis, P., F. Forastiere, et al. (2004). "Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence." Int J Cancer **111**(5): 647-652.
348. Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
349. Wakabayashi, N., S. L. Slocum, et al. (2010). "When NRF2 talks, who's listening?" Antioxid Redox Signal **13**(11): 1649-1663.
350. Wakisaka, N., S. Kondo, et al. (2004). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha." Mol Cell Biol **24**(12): 5223-5234.
351. Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5510-5514.
352. Wang, L., F. Du, et al. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.
353. Wang, P., W. Qiu, et al. (2009). "PUMA is directly activated by NF-kappaB and contributes to TNF-alpha-induced apoptosis." Cell Death Differ **16**(9): 1192-1202.
354. Waring, P. (2005). "Redox active calcium ion channels and cell death." Arch Biochem Biophys **434**(1): 33-42.
355. Waters, D. J., S. Shen, et al. (2007). "Noninvasive prediction of prostatic DNA damage by oxidative stress challenge of peripheral blood lymphocytes." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1906-1910.
356. Watterson, T. L., B. Hamilton, et al. (2012). "Urban particulate matter activates Akt in human lung cells." Arch Toxicol **86**(1): 121-135.
357. Weber, K. and M. Osborn (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." J Biol Chem **244**(16): 4406-4412.
358. Weissenberg, A., U. Sydlik, et al. (2010). "Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles." Free Radic Biol Med **49**(4): 597-605.

359. Wellbrock, C., M. Karasarides, et al. (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-885.
360. Wendel, H. G., E. De Stanchina, et al. (2004). "Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy." Nature **428**(6980): 332-337.
361. Weston, C. R. and R. J. Davis (2002). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 14-21.
362. Whitehead, T. P., D. G. Bullock, et al. (1979). "High-density lipoprotein cholesterol analysis." Clin Chem **25**(12): 2055-2057.
363. Wichmann, G., U. Franck, et al. (2009). "Different immunomodulatory effects associated with sub-micrometer particles in ambient air from rural, urban and industrial areas." Toxicology **257**(3): 127-136.
364. Wilson, N. S., V. Dixit, et al. (2009). "Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks." Nat Immunol **10**(4): 348-355.
365. Wiseman, H. and B. Halliwell (1996). "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." Biochem J **313** (Pt 1): 17-29.
366. Wrann, M. M. and C. F. Fox (1979). "Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line." J Biol Chem **254**(17): 8083-8086.
367. Wu, G. S. (2004). "The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways." Cancer Biol Ther **3**(2): 156-161.
368. Xia, T., P. Korge, et al. (2004). "Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity." Environ Health Perspect **112**(14): 1347-1358.
369. Xiao, G. G., M. Wang, et al. (2003). "Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line." J Biol Chem **278**(50): 50781-50790.
370. Xu, A., L. J. Wu, et al. (1999). "Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells." Cancer Res **59**(23): 5922-5926.
371. Xu, X., N. Kherada, et al. (2009). "Diesel exhaust exposure induces angiogenesis." Toxicol Lett **191**(1): 57-68.
372. Yang, J., Y. Lin, et al. (2001). "The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation." Nat Immunol **2**(7): 620-624.
373. Yatera, K., J. Hsieh, et al. (2008). "Particulate matter air pollution exposure promotes recruitment of monocytes into atherosclerotic plaques." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H944-953.
374. Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth Factors **24**(1): 21-44.
375. Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
376. Yu, H., Q. Li, et al. (2012). "Regulation of cigarette smoke-mediated mucin expression by hypoxia-inducible factor-1alpha via epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathways." J Appl Toxicol **32**(4): 282-292.
377. Yue, T. L., E. H. Ohlstein, et al. (1999). "Apoptosis: a potential target for discovering novel therapies for cardiovascular diseases." Curr Opin Chem Biol **3**(4): 474-480.
378. Zanobetti, A., J. Schwartz, et al. (2000). "Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease." Environ Health Perspect **108**(11): 1071-1077.
379. Zarnegar, B. J., Y. Wang, et al. (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." Nat Immunol **9**(12): 1371-1378.

380. Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." Cell Res **15**(1): 11-18.
381. Zhang, Q., S. R. Kleeberger, et al. (2004). "DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(2): L427-436.
382. Zhong, B. Z., W. Z. Whong, et al. (1997). "Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay." Mutat Res **393**(3): 181-187.
383. Zhong, H., K. Chiles, et al. (2000). "Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics." Cancer Res **60**(6): 1541-1545.
384. Zhou, B. P., Y. Liao, et al. (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." Nat Cell Biol **3**(3): 245-252.
385. Zhou, B. P., Y. Liao, et al. (2001). "HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation." Nat Cell Biol **3**(11): 973-982.
386. Zhou, J., R. Kohl, et al. (2006). "Calpain mediates a von Hippel-Lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1alpha." Mol Biol Cell **17**(4): 1549-1558.
387. Zhou, J., T. Schmid, et al. (2004). "PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation." J Biol Chem **279**(14): 13506-13513.
388. Zundel, W., C. Schindler, et al. (2000). "Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression." Genes Dev **14**(4): 391-396.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

(στην ελληνική & την αγγλική γλώσσα)



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

*Μελέτη της επίδρασης σωματιδιακών συστατικών της
ρύπανσης σε μηχανισμούς επιβίωσης κυττάρων ανθρώπου*

Υποψήφια Διδάκτωρ
Όλγα Γ. Μαυροφρύδη
Βιολόγος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

ΠΑΠΑΖΑΦΕΙΡΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

ΜΠΕΗΣ ΙΣΙΔΩΡΟΣ, Καθηγητής

ΤΣΙΤΣΙΛΩΝΗ ΟΥΡΑΝΙΑ, Επίκουρος Καθηγήτρια

Αθήνα 2013

Περίληψη Διδακτορικής διατριβής

Η μελέτη των επιπτώσεων της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην υγεία συνιστά ένα πολυδιάστατο και πολυπαραγοντικό πρόβλημα, που εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο ενός τεράστιου αριθμού τοξικολογικών και επιδημιολογικών ερευνών. Σήμερα, η πλειοψηφία αυτών των μελετών επικεντρώνεται κυρίως στο σωματιδιακό κλάσμα της ρύπανσης (particulate matter, PM), δηλαδή στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια με αεροδυναμική διάμετρο $\leq 10\mu\text{m}$, τα οποία θεωρούνται τα πλέον επικίνδυνα. Λόγω των διαστάσεών τους, τα σωματίδια αυτά διεισδύουν και συσσωρεύονται στα βαθύτερα σημεία του αναπνευστικού συστήματος, ενώ ο υψηλός λόγος «επιφάνεια/μάζα», επιτρέπει την προσρόφηση ποικίλων τοξικών ενώσεων στην επιφάνειά τους. Μεταξύ αυτών, τα βαρέα μέταλλα, οι πολυκυκλικές οργανικές ενώσεις, ανόργανα ιόντα και ποικίλα βιογενή συστατικά ενοχοποιούνται – κατά κανόνα – για την τοξική δράση των ρύπων. Σε επίπεδο οργανισμού, οι επιπτώσεις της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών καταστάσεων, από απλούς δερματικούς ερεθισμούς και αλλεργικές αντιδράσεις, έως χρόνια αναπνευστικά προβλήματα, θανάτους από καρδιαγγειακά αίτια και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Εκτός, όμως, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των σωματιδιακών ρύπων, καθοριστικό ρόλο σε αυτές τις επιπτώσεις διαδραματίζουν και επιπλέον παράγοντες, που αφορούν κυρίως στις συνθήκες έκθεσης (διάρκεια και συχνότητα επεισοδίων έκθεσης, συγκέντρωση ρύπων) και στην ατομική ευαισθησία (ηλικία, παθολογικό υπόβαθρο).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η καταγραφή των πρώιμων σηματοδοτικών αποκρίσεων ενός μοντέλου επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (A549), παρουσία μικρο- και νανο-σωματιδιακών ρύπων, διαφορετικής προέλευσης και πολυπλοκότητας, προκειμένου να εντοπιστούν πρώιμες αλλαγές στη φυσιολογία και τη σηματοδότηση των κυττάρων, που ενδέχεται να συμβάλλουν μακροπρόθεσμα στην ανάπτυξη παθολογικού φαινοτύπου. Η ιστοειδικότητα των παρατηρούμενων αποκρίσεων διερευνήθηκε μέσω συγκριτικής καταγραφής της απόκρισης ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων δέρματος (A431), ενώ παράλληλα, μελετήθηκε και ο ρόλος των αντίστοιχων φυσιολογικών ινοβλαστών. Μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων και των μεταγραφικών παραγόντων, που μελετήθηκαν, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην κίνηση Akt και στον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 α , οι οποίοι προωθούν την κυτταρική επιβίωση και θεωρούνται, πλέον, τυπικοί καρκινικοί δείκτες, καθώς ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα κατά τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας NrF2 χρησιμοποιήθηκε ως ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωτικού στρες. Οι κατηγορίες ρύπων, που

μελετήθηκαν, ήταν οι εξής: α) ένα πολύπλοκο μικροσωματιδιακό μίγμα ($PM_{2,5-10}$), που συλλέχθηκε στους χώρους εργοστασίου, σε βιομηχανική περιοχή της Αθήνας, β) ένα πρότυπο μίγμα νανοσωματιδίων από εξατμίσεις μηχανών εσωτερικής καύσης (Diesel Exhaust Particles, DEP) και γ) ο κοινός οργανικός ρύπος, βενζο[α]πυρένιο (B[α]P). Το B[α]P, αν και δεν έχει σωματιδιακή φύση, επιλέχθηκε ως ένα από τα βασικά οργανικά συστατικά των δύο προηγούμενων μιγμάτων, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης των οργανικών ρύπων.

Παρουσία των μικροσωματιδιακών ρύπων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, η οποία ήταν αντιστρόφως ανάλογη της διαμέτρου των σωματιδίων. Η κυτταροτοξική δράση του ανόργανου κλάσματος ήταν εντονότερη, σε σύγκριση με το οργανικό, και θα μπορούσε, εν μέρει, να αποδοθεί στις υψηλές συγκεντρώσεις θειικών και αμμωνιακών ιόντων, που ανιχνεύθηκαν κατά τη χημική ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, παρατηρήθηκε, παράλληλη δόσοεξαρτώμενη μείωση στην φωσφορυλίωση της κινάσης Akt και στα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α.

Τα νανοσωματίδια DEP επιλέχθηκαν ως βασικό συστατικό του οργανικού κλάσματος της σωματιδιακής ρύπανσης. Χαμηλές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των DEP προκάλεσαν ήπιο οξειδωτικό στρες (επαγωγή NrF2), χωρίς να μειώνουν την κυτταρική επιβίωση και οδήγησαν σε άμεση συσσώρευση του HIF-1α. Επιπλέον, τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα αυξήθηκαν αθροιστικά, ύστερα από δύο δίωρες επωάσεις με τα νανοσωματίδια και δεν επανήλθαν, ακόμα και μετά την απομάκρυνση των ρύπων, για 22 ώρες. Η παράλληλη επαγωγή της οξυγενάσης της αίμης, HO-1, σε αυτές τις συνθήκες, υποδηλώνει την προηγηθείσα ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NrF2. Οι αποκρίσεις των κυττάρων A549 ήταν αντίστοιχες, στο σύστημα συγκαλλιέργειας των επιθηλιακών κυττάρων με φυσιολογικούς ινοβλάστες πνεύμονα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι η παρακρινική επικοινωνία των δύο κυτταρικών τύπων ενεργοποίησε όλους τους – υπό μελέτη – δείκτες επιβίωσης στους φυσιολογικούς ινοβλάστες, οι οποίοι δεν βρίσκονταν σε άμεση επαφή με τα νανοσωματίδια. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, αλλά και υποστηρικτικά βιβλιογραφικά δεδομένα, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-1β, συμβάλουν σημαντικά στις παρατηρούμενες αποκρίσεις.

Το B[α]P εκδήλωσε ήπια κυτταροτοξικότητα, μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις, στις οποίες επιβεβαιώθηκε και η γενετοξική του δράση, μέσω της ανίχνευσης σταθερών προϊόντων προσθήκης (DNA adducts) και θραύσεων του γενετικού υλικού. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με τα τεχνητά, βιοσυμβατά νανοσωματίδια PLGA ενισχύει τις επιπτώσεις, ακόμα και λιγότερο κυτταροτοξικών

συγκεντρώσεων του ρύπου, πιθανόν μέσω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητάς του. Ωστόσο, οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις B[α]P ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A549, πιθανόν λόγω ήπιου οξειδωτικού στρες (επαγωγή NrF2), και προκαλούν συσσώρευση του HIF-1α, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt. Η επαγωγή των δύο μεταγραφικών παραγόντων συνοδεύεται από την μετατόπισή τους στον πυρήνα και τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση. Η απόκριση του HIF-1α στο B[α]P επιβεβαιώθηκε και στην επιθηλιακή κυτταρική σειρά καρκινώματος δέρματος, A431, καθώς και σε πρωτογενείς καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος και πνεύμονα. Ανάλογα αποτελέσματα καταγράφηκαν και κατά την επίδραση του B[α]P, παρουσία επιπλέον στρεσογόνων συνθηκών, που χαρακτηρίζουν ποικίλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η υποξία. Τέλος, η ενσωμάτωση ενός ποσοστού του λιπόφιλου B[α]P στις κυτταρικές μεμβράνες και η αλληλεπίδρασή του με διαύλους Ca^{2+} , διαταράσσει την ομοιόσταση των ιόντων, αυξάνοντας τα βασικά επίπεδα Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, μειώνοντας το περιεχόμενο του ΕΔ και ενισχύοντας το δυναμικό πρόσληψης ιόντων από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Το σημειακό γεγονός της εισροής Ca^{2+} , μέσω των διαμεμβρανικών διαύλων, ενισχύει άμεσα τη φωσφορυλίωση της Akt, στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, συμβάλλοντας, με τον τρόπο αυτό, στην πρόιμη συσσώρευση του HIF-1α.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

- ❖ Ο καρκινικός δείκτης HIF-1α επάγεται άμεσα, παρουσία χαμηλών, μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων οργανικών ρύπων. Η απόκριση αυτή είναι συστηματική μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων και ιστών, συνοδεύεται από τη μεταγραφική του ενεργοποίηση και μεσολαβείται – σε σημαντικό βαθμό – από το σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης, PI3K/Akt.
- ❖ Η σύντομη, αλλά επαναλαμβανόμενη, έκθεση στους ρύπους έχει τη δυναμική να προκαλέσει μακροπρόθεσμες αλλαγές στο σηματοδοτικό δυναμικό των κυττάρων. Όταν οι μεταβολές αυτές αφορούν μόρια, που προωθούν την κυτταρική επιβίωση, είναι πιθανό να συνεισφέρουν στη σταδιακή εξαλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου.
- ❖ Η αλληλεπίδραση μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών, μέσω παρακρινικών παραγόντων, συμβάλει στη διαμόρφωση της τελικής απόκρισης των κυττάρων στους ρύπους. Συνεπώς, σε *in vivo* συνθήκες, η παρακρινική επικοινωνία μπορεί να προκαλέσει μεταβολές ακόμη και σε κύτταρα, τα οποία δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα σωματίδια.

- ❖ Η ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου τροποποιείται παρουσία μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων οργανικών ρύπων. Συγκεκριμένα, το B[α]P αυξάνει το δυναμικό πρόσληψης ιόντων ασβεστίου μέσω της πλασματικής μεμβράνης και η εισροή των ιόντων ρυθμίζει έμμεσα την επαγωγή του HIF-1α, μέσω ενίσχυσης της φωσφορυλίωσης της Akt.

Λέξεις-κλειδιά: σωματιδιακή ρύπανση, πνεύμονας, καρκινογένεση, HIF-1α, ασβέστιο



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis Abstract:

***Investigation of the effects of particulate pollution
on survival pathways of human cells***

Doctorate (*Ph.D.*) Candidate

Olga G. Mavrofrydi

Biologist

Three-member consulting committee:

PAPAZAFIRI PANAGIOTA, Associate Professor (Supervisor)

BEIS ISIDOROS, Professor

TSITSILONIS OURANIA, Assistant Professor

Athens 2013

Doctorate (Ph.D.) Thesis Abstract

The effects of atmospheric pollutants on human health constitute an open research field for many decades. Today, the great majority of the relevant toxicological and epidemiological studies is mainly focused on particles with an aerodynamic diameter $\leq 10\mu\text{m}$ (particulate matter, PM), which are considered to be the most health threatening. Due to their size, these particles are able to penetrate and accumulate in the respiratory system, while the high «surface/mass» ratio allows the adsorption of various toxic compounds on their surface. Transition metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), inorganic ions and various biogenic compounds are thought to be responsible for the toxic effects of air pollution. The effects of air pollution on human health include a large number of pathophysiological conditions ranging, from simple skin irritations and mild allergic reactions, to chronic respiratory problems, cardiovascular dysfunction and increased cancer risk. Additionally, apart from the aforementioned physicochemical properties of PM, additional factors, such as specific conditions of exposure (duration and frequency of exposure episodes, concentration of pollutants) and individualized sensitivity (age, pathological background), play a key role in the determination of the final outcome.

The aim of this Ph.D. thesis was to assess the effects of micro- and nano-particulate pollutants, of variable composition and complexity, on lung epithelial cells (namely of the human cell line A549), in order to identify early changes in cell physiology and signaling, which could contribute to cell transformation overtime. The responses of A549 were compared to those of human skin epithelial cells (A431), as well as of primary cultures of normal lung and dermal fibroblasts. Among the signaling molecules and transcription factors studied, we particularly focused on Akt kinase and transcription factor HIF-1 α , which promote cell survival and are typical biomarkers of early stages of tumor development. A second transcription factor, NrF2, was used as a reliable oxidative stress marker. The three categories of atmospheric pollutants studied were: 1) a complex mixture of PM_{2,5-10} collected from an industrial workplace near Athens, b) a Standard Reference Material (SRM2975) of diesel nanoparticles (Diesel Exhaust Particles, DEP) and c) the common PAH, benzo[α]pyrene (B[α]P). B[α]P was selected as a representative component of the organic fraction of the previous mixtures, in order to investigate, in more detail, its molecular mechanism of action.

Urban PM were found to significantly decrease cell survival, in a way inversely related to particle aerodynamic diameter. The cytotoxic effect of the inorganic fraction was more pronounced compared to the organic fraction, a result

that could be partly attributed to the high concentrations of SO_4^{2-} and NH_4^+ ions detected in the PM mixture. In all cases, reduced cell survival was accompanied by a parallel decrease in Akt phosphorylation and HIF-1 α protein levels.

The main component of the organic fraction of urban PM is DEP nanoparticles. Low DEP concentrations produced mild oxidative stress conditions, as revealed by the induction of NrF2, and resulted in an immediate accumulation of HIF-1 α . Repetitive 2-hour exposure of A549 cells to DEP, induced a cumulative increase of HIF-1 α levels, which was maintained for 22 hours, even after DEP removal. Although, NrF2 was not affected under the same culture conditions, the concomitant upregulation of its target protein, HO-1, indicates the induction of NrF2, at earlier time points. Coculture with normal lung fibroblasts, did not alter the profile of A549 responses. However, using the same experimental setup, the responses of lung fibroblasts, which were not in direct contact with the nanoparticles, were of particular interest. Specifically, the paracrine communication between the two cell types resulted in a substantial induction of all the survival markers investigated in fibroblasts. Based on these results, in conjunction with supportive literature data, we propose that pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , may play a key role to the observed responses.

B[α]P cytotoxicity was mild and detected only at high concentrations. Its genotoxic effects were confirmed by the formation of stable adducts and by DNA fragmentation. Interestingly, combined exposure of A549 cells to B[α]P and manufactured, biocompatible PLGA nanoparticles enhanced the toxic potential of the pollutant, possibly by increasing its bioavailability. However, low doses of B[α]P promoted cell proliferation, which was accompanied by upregulation of NrF2, HIF-1 α and Akt. The induction of total protein levels of both transcription factors was followed by their nuclear accumulation and transcriptional activation. The response of HIF-1 α to B[α]P was confirmed in the epidermoid carcinoma cell line, A431, as well as in both lung and skin primary fibroblast cultures. Also, similar results were obtained during exposure of A549 to B[α]P in the presence of stress conditions, such as hypoxia, that characterize various lung diseases. Therefore, it seems that HIF-1 α is an early marker of B[α]P effects and, interestingly, its induction was – at least partially – mediated by the PI3K/Akt pathway. In order to elucidate the mechanism of HIF-1 α induction by B[α]P, we investigated Ca^{2+} homeostasis. Indeed, we showed that B[α]P disturbs intracellular Ca^{2+} homeostasis, increasing basal cytoplasmic ion levels, decreasing ion ER content and, thus, enhancing the potential of extracellular ion uptake. It should be noted that Ca^{2+} influx, through the plasma membrane

channels, directly triggers Akt phosphorylation, contributing to the early accumulation of HIF-1 α .

In conclusion, the most important results of this doctorate thesis are summarized as follows:

- ❖ The cancer biomarker HIF-1 α is directly upregulated in the presence of low, non-cytotoxic concentrations of organic pollutants. This response appears to be consistent among different cell types and tissues, is mediated – at least in part – by the PI3K/Akt survival pathway and results in the transcriptional activation of HIF-1 α .
- ❖ Short-term but repetitive exposure to atmospheric pollutants can possibly cause long-term alterations in molecular pathways of the cell. In the case that the affected pathways are implicated in the promotion of cell survival, an environment which favors gradual cell transformation, could be generated.
- ❖ The paracrine interaction between epithelial cells and fibroblasts contributes to the modulation of the final cell response to pollutants. Therefore, under *in vivo* conditions, paracrine communication can possibly affect cell types that are not even in direct contact with the particles.
- ❖ Calcium homeostasis is disturbed by organic pollutants at low, non-cytotoxic doses. In particular, B[α]P increases the potential of Ca²⁺ uptake through the plasma membrane. This enhanced Ca²⁺ influx contributes to HIF-1 α upregulation by inducing upstream Akt phosphorylation.

Keywords: particulate pollution, lung, carcinogenesis, HIF-1 α , calcium

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ
ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Mavrofydi O. and Papazafiri P.

Hypoxia-Inducible Factor-1 α Increase is an Early and Sensitive Marker of Lung Cells Responding to Benzo[a]Pyrene.

Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology, 2012, Vol. 31, Issue 4, pg. 335-347

Pilou M., Housiadas C., Eleftheriadis K., Papazafiri P. and Mavrofydi O.

Computational modeling as an alternative testing strategy.

Nanotoxicology

In press (due on: 12/7/2013)

❖ **ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ σε στάδιο προετοιμασίας**

Mavrofydi O., Mavroeydi P. and Papazafiri P.:

Comparative assessment of HIF-1 α and Akt responses of human lung and skin cells exposed to benzo[a]pyrene. (*In preparation, 2013*)

Mavrofydi O., Divolis G., Mavroeydi P., Giampazolias E. and Papazafiri P.:

Calcium homeostasis contribution to benzo[a]pyrene effects on human lung and skin epithelial cells. (*In preparation, 2013*)

Mavrofydi O., Eleftheriadis K., Vratolis S., Mihalopoulos N., Housiadas C. and Papazafiri P.:

Toxicity induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter collected in urban and detergent industrial workplace. (*In preparation, 2013*)

Hypoxia-Inducible Factor-1 α Increase is an Early and Sensitive Marker of Lung Cells Responding to Benzo[a]Pyrene

Olga Mavrofydi & Panagiota Papazafiri*

Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, University of Athens, 15784 Panepistimiopolis, Ilissia, Athens, Greece

*Address all correspondence to: Panagiota Papazafiri, Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, University of Athens, 15784 Panepistimiopolis, Ilissia, Athens, Greece; Tel.: +302107274665; e-mail: ppapaz@biol.uoa.gr

ABSTRACT: Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a central regulator of tumor survival and metastasis, responsible for metabolic adaptation to hypoxic conditions and promotion of angiogenesis. It has been also shown to respond to non-hypoxic stimuli, such as growth factors and moderate oxidative stress. We examined the protein levels of HIF-1 α in A549 human lung cells exposed to the typical carcinogen benzo[a]pyrene (B[a]P). Our results revealed that B[a]P, at low, non-cytotoxic concentrations, induced a transient increase of nuclear HIF-1 α and its target, GLUT1. HIF-1 α upregulation was partly mediated by Akt kinase and coincided with increased nuclear levels of the redox-sensitive marker, nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf-2). B[a]P-induced HIF-1 α was also detected during serum depletion or treatment with the hypoxia-mimicking agent, CoCl₂. In addition, exposure of A549 cells to B[a]P containing diesel exhaust particles enhanced HIF-1 α accumulation, probably due to the presence of additional carcinogenic compounds. B[a]P-induced increase of HIF-1 α was further confirmed in normal rat and human lung fibroblasts. Our findings indicate that HIF-1 α stimulation may act as an early and sensitive marker of exposure to low, non-cytotoxic concentrations of B[a]P and/or other carcinogens.

KEY WORDS: air pollution, cell signaling, Nrf-2, cancer, cell survival, lung toxicity, primary fibroblasts, diesel exhaust particles

ABBREVIATIONS

AhR, aryl hydrocarbon receptor; ARNT, AhR nuclear translocator; B[a]P, Benzo[a]pyrene; DEP, diesel exhaust particles; GLUT1, g transporter 1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; HO-1, heme oxygenase-1; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Nrf-2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons; ROS, reactive oxygen species

I. INTRODUCTION

The lung is an organ directly exposed to atmospheric pollutants, and numerous epidemiological studies support a direct link between particulate pollutants and lung disease, including cancer.¹ Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), formed during incomplete combustion of organic matter, are a common component of air pollution, abundantly present in tobacco smoke, urban air, and various working environments.² The most thoroughly studied member

of these environmental contaminants is benzo[a]pyrene (B[a]P), which has been listed in the Second Annual Report on Carcinogens since 1981.³ Although this listing was based on animal studies, recent epidemiologic data support that exposure to various PAH mixtures containing B[a]P is clearly associated with an increased risk of cancer.⁴

Due to its lipophilic nature, B[a]P readily diffuses into cells, and its biological effects are initiated by binding to an aryl hydrocarbon receptor (AhR). Liganded AhR forms a complex with AhR

nuclear translocator (ARNT/HIF-1 β) and other co-factors, inducing transcription of a variety of genes, including genes responsible for the metabolism of the pollutant into reactive electrophilic metabolites. 7,8-BaP-9,10-Diol epoxide, in particular, is considered an ultimate carcinogen: it forms stable DNA adducts responsible for mutations and increased cancer susceptibility.⁵

Although the genotoxic effects of B[a]P can definitely contribute to cell transformation over time, transient exposure to low doses of PAH may also involve modulation of cell signaling. Indeed, under these conditions, B[a]P and other PAHs have been reported to induce alterations in various signaling pathways, promoting survival and proliferation. For instance, B[a]P has been shown to accelerate the G1 \rightarrow S transition by activation of ERK1/2, JNK1/2 and p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways in human diploid lung fibroblasts⁶ or to mimic growth factor signaling through activation of IGF-1 and PI3K in human mammary epithelial cells.⁷ Vondracek et al. also reported that PAHs, including B[a]P, have estrogenic properties that may be responsible for cell cycle progression and tumor promotion.⁸ Finally, a study on prostate cancer cells showed that, even in the presence of DNA adducts formed by B[a]P, neither apoptosis or cell cycle arrest are induced, due to inhibition of p53 activation.⁹

Oxidative stress represents a major mechanism by which B[a]P and other airborne pollutants exert their biological effects. In fact, AhR mediates the activation of detoxification enzymes that catalyze electrophilic reactions, leading to ROS production and a shift of cellular redox balance.^{5,10,11} Under these conditions, the formation of 8-OH-G on DNA¹² or the elevation of free intracellular calcium¹³ are considered to contribute to cancer initiation, whereas cancer promotion can be supported by the mitogenic properties of ROS.¹⁴ Low ROS levels are found to act as signals promoting cell survival and proliferation. This is achieved through transactivation of growth factor receptors, such as EGFR and PDGFR, which in turn signal through several redox-sensitive pathways, including MAPKs, PI3K/Akt and PLC- γ 1 and their downstream transcription factors (NrF-2, NF- κ B, AP-1).¹⁴⁻¹⁹

HIF-1 α is the regulatory subunit of the transcription factor HIF-1, which is primarily involved in O₂ sensing and promoting cell survival under

hypoxic conditions. Hypoxia is a common consequence of solid tumor growth, due to abnormal cell proliferation combined with insufficient blood supply. Under these conditions, HIF-1 α is upregulated and stabilized, leading to metabolic adaptation and angiogenesis.²⁰ Statistics reveal that HIF-1 α is overexpressed in 70% of human cancers and their metastases.²¹ Thus, it is considered a central regulator of cancer cells and a promising therapeutic target in solid tumors. However, HIF-1 α has been recently shown to respond to non-hypoxic stimuli. Interestingly, these studies indicate that ROS regulate HIF-1 α stability and transcriptional activity in well-oxygenated cells.^{22, 23} Consequently, ROS appear to be key players in regulating HIF-1-dependent pathways under both normal and pathological circumstances.

Although it has been clearly shown that metabolism of carcinogenic PAHs triggers ROS production, little is known about HIF-1 α response under these conditions. In the present study, we used the human lung adenocarcinoma cell line, A549, to examine the effects of non-cytotoxic doses of B[a]P on HIF-1 α protein levels. NrF-2 was used as a sensitive marker of oxidative stress to ensure that the redox imbalance induced by B[a]P and the implication of PI3K/Akt pathway was examined as a typical survival marker. Our study was extended on serum depleted and hypoxic A549 cells, as well as normal rat and human lung fibroblasts, to test whether HIF-1 α responses are condition- or cell-type-specific.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Chemicals

Fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and trypsin were purchased from PAA Laboratories (Pasching, Austria). SRM2975 was purchased from the National Institute of Standard and Technology (Gaithersburg, MD, USA). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA).

B. B[a]P Stock Solution Preparation

Stock solutions of B[a]P (Sigma-Aldrich) were prepared in DMSO at a final concentration of 20 mM and were stored, protected from light, at -20°C

for up to 1 month. Further dilutions were prepared in culture medium (DMEM) immediately before use. B[a]P solutions were carefully vortexed prior cell treatments. DMSO concentration did not exceed 0.5% (v/v) in all cases.

C. SRM2975 Organic Extract Preparation

Standard Reference Material SRM2975 is a fork-lift-generated diesel exhaust particulate material provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST). To obtain the organic fraction of this mixture, 500 mg of the SRM2975 was dispersed in 100 ml acetone and sonicated in a water bath for 1 h. The liquid was then evaporated under a gentle stream of N₂ to reduce the volume to ~30 ml, and centrifuged at 288 g for 30 min. The supernatant was collected, syringe-filtered, and evaporated to dryness under N₂. This evaporated solvent extract residue was weighed and mixed into DMSO at a final concentration of 50 mg/ml as a stock solution. Working concentrations were prepared in culture medium, and the solution was vortexed for at least 30 s prior to cell treatments. DMSO concentration did not exceed 0.5% (v/v) in all cases. The concentration of B[a]P in the SRM2975 mixture, according to the NIST certified analysis, was 52.2±5.3 µg/kg.

D. Cells and Culture Conditions

A549 cells, an *in vitro* model for type II pulmonary epithelial cells derived from human lung adenocarcinoma, were cultured as monolayers in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were grown in 100-mm or 60-mm tissue culture dishes in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. When an 80–90% confluence was attained, the monolayers were subcultured using 0.25% trypsin-1 mM EDTA or were used for experiments.

The human distal lung fibroblasts (DLF) were obtained from lung tissues of patients that had undergone resection of localized lung tumors. Before the operation, informed consent was obtained from patients following a full explanation of the procedures involved. Only tissues in excess of those required for clinical diagnoses were harvested and placed in DMEM containing 10% (v/v) FBS and antibiotics for urgent transportation on ice to the

laboratory. Minced pieces from histologically normal areas of surgically resected lung tissue served as the source of fibroblasts. The cells were isolated by enzymatic dispersion largely as previously described.^{24,25} Briefly, the tissue was digested for 1 h at room temperature with collagenase (0.5 µg/ml) and DNase (20 µg/ml) in Hanks' balanced salt solution in the presence of 0.5 mM EDTA. Cells and ultrafine tissue pieces were then collected by centrifugation, washed once in DMEM, resuspended in fresh DMEM containing 10% FBS, and finally plated onto 100-mm tissue culture dishes. When cells had attached to the plastic, the culture medium was discarded, cells were vigorously washed with phosphate-buffered saline (PBS), and the remaining tissue samples were removed by aspiration. Cells were then allowed to reach confluence with medium renewal on alternate days thereafter. At confluence, fibroblasts were expanded by treatment with 0.25% trypsin in PBS for 2 min. After removal of trypsin solution, incubation of the monolayer continued for 15 min at 37°C. Cell cultures were diluted 1:2 and passaged at least three times before use. For the experiments described here, cells of passages 5–10 were used to avoid the probable impact of cellular senescence. The same protocol was effectively applied to obtain primary fibroblast cultures from lungs excised from healthy adult male rats.

E. Cell Viability Test

Cell viability was evaluated using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were seeded in 96-well tissue culture dishes (10⁴ cells/well), and 24 h later they were treated with various concentrations of B[a]P for the indicated time periods. Untreated cells served as a control group. MTT solution (0.5 mg/ml final concentration) was added in each well 4 h before the end of the incubation period, and the assay was stopped by replacement of the MTT-containing culture medium with 100 µl of 0.1N HCl in anhydrous isopropanol. Cell viability was determined by measuring absorbance at 545 nm using an ELISA microplate reader (Denley, West Sussex, UK).

F. Preparation of Total Protein Extracts

Cells were washed twice with ice-cold PBS, har-

vested by scraping the dishes, lysed in ice-cold Buffer G [20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 2 mM EDTA, 0.2 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidine, 20 mM HEPES, pH 7.5] supplemented with 0.5% (v/v) Triton X-100 and a mixture of protease inhibitors [200 μM leupeptin, 5 mM DTT, 300 μM PMSF, and 10 μM E64]. Cells were then incubated for 30 min at -80°C . Lysates were centrifuged (939 g, 10 min, 4°C) and the supernatant (total protein extract) was collected. Protein concentration was determined using the Bradford assay (BioRad Laboratories). After quantification, the samples were supplemented with 0.33 volumes of SDS-PAGE sample buffer [330 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 13% (v/v) glycerol, 20% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.2% (w/v) bromophenol blue] and boiled before electrophoretic separation.

G. Preparation of Cytoplasmic and Nuclear Proteins

Cells were washed twice with ice-cold PBS, harvested by scraping the dishes, lysed in ice-cold Buffer A [10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin]. Following extraction on ice for 30 min, samples were centrifuged, and supernatants containing the cytoplasmic protein fraction were then collected. The remaining pellets were resuspended in Buffer A supplemented with 0.10% (v/v) Nonidet P-40. After extraction on ice for 10 min, samples were centrifuged (1840 g, 10 min, 4°C), and supernatants were discarded. The remaining pellets were resuspended in ice-cold Buffer B [20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 20 mM β -glycerophosphate, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin]. After extraction at 4°C for 1 h, samples were centrifuged (1840 g, 10 min, 4°C) and supernatants (nuclear fraction) were collected. Protein concentration was again determined by the Bradford assay (BioRad Laboratories). Similar to total protein extracts, both cytosolic and nuclear fractions were boiled with 0.33 volumes of SDS-PAGE sample buffer [330 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 13% (v/v) glycerol,

20% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.2% (w/v) bromophenol blue] before electrophoresis.

H. Western blotting

Equal amounts of protein (50 μg per lane) were separated by SDS-PAGE on 8%, 10%, or 15% (w/v) polyacrylamide gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then blocked in a solution of 5% (w/v) non-fat dry milk in TBS-T [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20] for 1 h at room temperature and then probed overnight at 4°C with primary antibodies against NrF-2 (1:1000, Cell Signaling), HIF-1 α (1:1000, BD Transduction), pAkt (1:1000, Cell Signaling), GLUT1 (1:1000, Santa Cruz), HO-1 (1:1000, Santa Cruz), Histone H3 (1:15,000, Millipore), or β -actin (1:2500, Sigma-Aldrich). After washing in TBS-T (4×5 min), blots were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody [1:5000 in TBS-T containing 1% (w/v) non-fat dry milk] for 1 h at room temperature. After washing the blots in TBS-T (4×5 min), bands were detected using enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Biosciences) reagent, exposed to super RX film and quantified by densitometry (Gel Analyzer v.1.0, Biosure, Athens, Greece).

The densitometric values of total or cytosolic proteins were normalized against β -actin, while those of nuclear proteins were normalized against H3 levels. The values of treated samples were expressed as "fold" induction over respective control samples, which were set at one.

I. Data Analysis

Western blots shown are representative of at least three independent experiments. All data are presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed using Student's *t* test and two-way analysis of variance (ANOVA). The differences between groups were evaluated using Fisher's LSD *post-hoc* test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

III. RESULTS

A. B[a]P Promotes Proliferation of A549 Cells at Low Concentrations

To examine the effects of B[a]P on cell viability, A549 cells were initially exposed to increasing B[a]P concentrations (0–100 μM) for 24 h in complete DMEM medium, and their viability was evaluated using the MTT assay. As shown in Fig. 1, B[a]P is cytotoxic only at doses higher than 5 μM , while below this threshold it induces a slight but statistically significant increase in cell proliferation. Notably, in the presence of 2.5 μM B[a]P, cell growth was 10% higher compared to control cells after 24 h ($P < 0.05$) of incubation, reached 20% after 48 h ($P < 0.01$) and was maintained, although to a lesser extent, up to 72 h ($P < 0.01$) of exposure. Hence, the concentration of 2.5 μM was chosen for the experiments presented herein.

B. Pro-survival B[a]P Doses Induce Cellular Antioxidant Response Through NrF-2 Transcription Factor

Based on the ability of PAHs to generate ROS during their metabolic bioactivation, we examined the effect of B[a]P on NrF-2, a master regulator of cellular antioxidant response. Cells were exposed to B[a]P at various concentrations and time intervals, and NrF-2 protein levels were analyzed by Western blotting. Short-term (1-h) exposure to 2.5 μM B[a]P resulted in a two-fold increase of total NrF-2 protein levels, while at concentrations higher than 5 μM , total levels of NrF-2 were significantly decreased (Fig. 2). This observation is in agreement

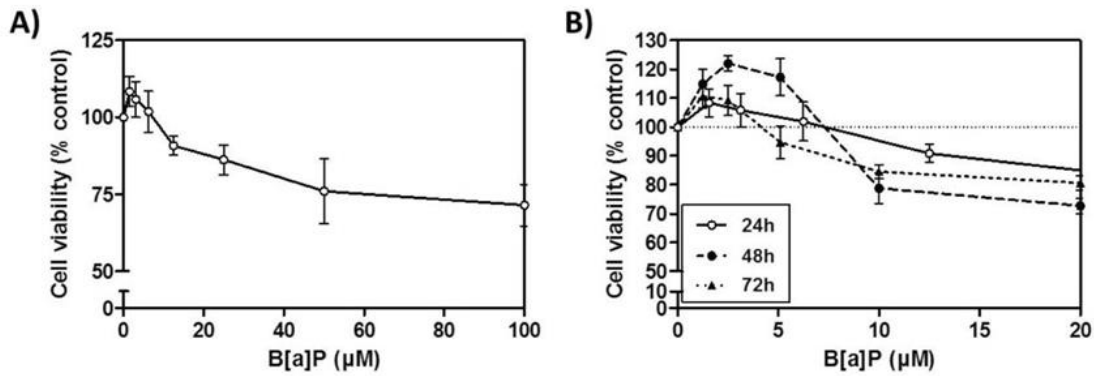


FIGURE 1. Low concentrations of B[a]P stimulate proliferation of A549 cells. A549 cells were incubated with (A) 0–100 μM B[a]P for 24 h or (B) 0–20 μM B[a]P for 24, 48, and 72 h, and their viability was evaluated using an MTT assay. Data are means \pm SD of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control.

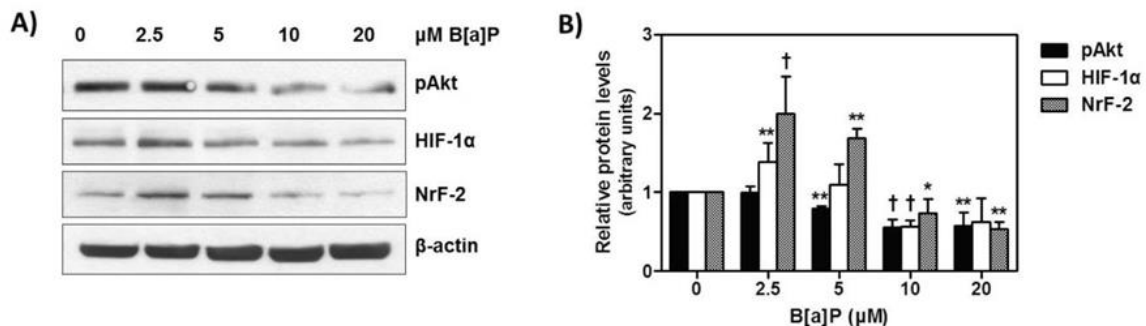


FIGURE 2. Low doses of B[a]P upregulate HIF-1 α and NrF-2 transcription factors. A549 cells were exposed to 0–20 μM B[a]P for 1 h, and total protein extracts were immunoblotted for pAkt, HIF-1 α , and NrF-2. (A) Representative blots of the dose-dependent exposure of A549 to B[a]P. Equal loading was verified using an antibody against β -actin. (B) Densitometric analysis of pAkt, HIF-1 α , and NrF-2 protein levels. Data are means \pm SD of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and † $P < 0.001$ compared with control.

with MTT data where, as previously described, B[a]P doses higher than 5 μ M exhibit a cytotoxic profile. Also, in the presence of 2.5 μ M B[a]P, nuclear levels of NrF-2 were rapidly increased and remained high up to 2 h. The nuclear accumulation of NrF-2, although transient, was followed by a prolonged upregulation of its target protein, HO-1 (Fig. 3A and B).

C. Rapid HIF-1 α Accumulation and Transcriptional Activation in the Presence of Low B[a]P Doses

Similar to NrF-2, low B[a]P concentrations (2.5 μ M) induced an increase of HIF-1 α total protein levels, while cytotoxic doses had the opposite effect (Fig. 2). Furthermore, treatment with 2.5 μ M B[a]P for different time intervals showed a direct nuclear accumulation of HIF-1 α , reaching the maximum (2.39 \pm 0.33-fold increase) at 30 min and lasting up to 2 h (Fig. 3A and C). Although the enhanced nuclear levels of HIF-1 α were transient,

we observed a subsequent sustained upregulation of its target protein, GLUT1. GLUT1 protein levels were found to have increased 1 hour following B[a]P treatment; they remained significantly greater than control values for at least 24 h (Fig. 3A and C). Thus, HIF-1 α appears to be another key transcription factor mediating early cellular responses to B[a]P.

D. HIF-1 α Accumulation Is Connected to the PI3K/Akt Signaling Pathway

Reduction of cell viability in the presence of B[a]P concentration higher than 5 μ M was accompanied by a decrease of pAkt (Fig. 2), a master pro-survival regulator. However, examination of pAkt levels during the short-time incubation of A549 cells with 2.5 μ M B[a]P revealed an early (at 30 min) and transient increase to 1.47 \pm 0.05 of control value (Fig. 3A). Interestingly, this increase coincided with NrF-2 and HIF-1 α upregulation and remained slightly over control up to 24 h. To test whether

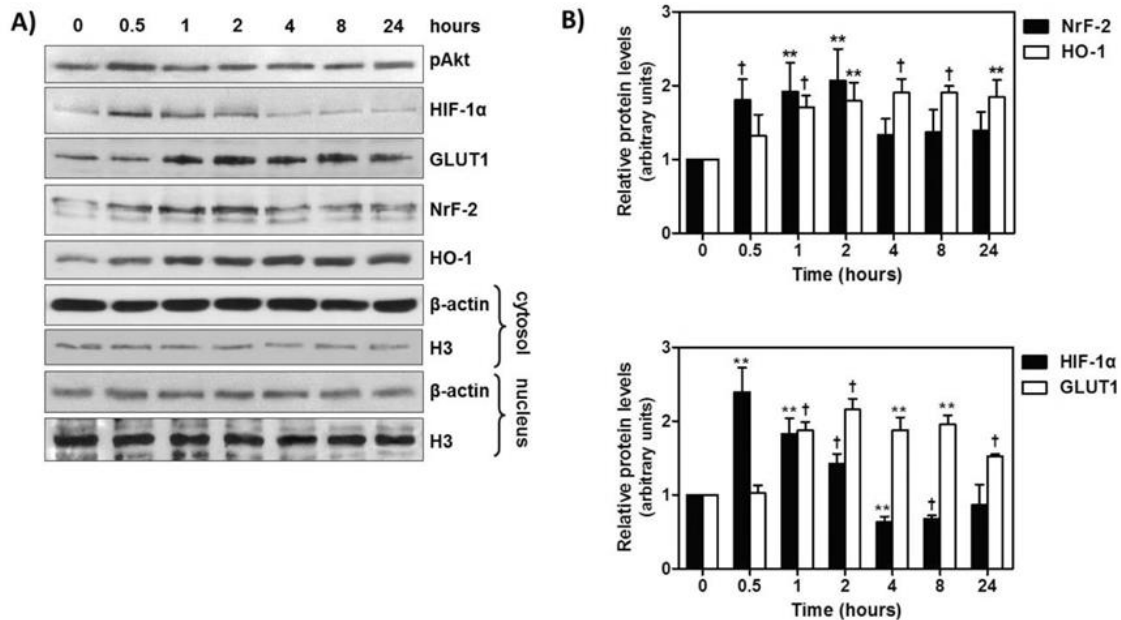


FIGURE 3. B[a]P induces the nuclear accumulation of HIF-1 α and NrF-2 and upregulation of their targets, GLUT1 and HO1. A549 cells were exposed to 2.5 μ M B[a]P for 0-24h. Cytosolic protein extracts were immunoblotted for pAkt, GLUT1, and HO-1, while nuclear extracts were immunoblotted for HIF-1 α and NrF2. (A) Representative blots of at least three independent experiments. Equal loading was verified by using an antibody against β -actin or H3 for cytosolic and nuclear extracts, respectively. Differential extraction was verified by minimal levels of nuclear β -actin and cytosolic H3. (B, C) Densitometric analysis of HIF-1 α , GLUT1, NrF2 and HO-1 protein levels. Data are means \pm SD of at least three independent experiments. * P <0,05, ** P <0.01 and † P <0.001 compared with control.

PI3K/Akt signaling pathway mediates HIF-1 α and NrF-2 responses to B[a]P, we used wortmannin (100 nM), a specific PI3K inhibitor. Wortmannin, added 30 min before B[a]P, completely abolished phosphorylation of Akt and inhibited the nuclear accumulation of HIF-1 α (Fig. 4A and B). Statistical analysis of densitometric values of HIF-1 α protein levels showed that wortmannin reduced nuclear levels of HIF-1 α by approximately 20% in untreated cells, by 59% in cells treated with B[a]P for 30 min, and by 45% in cells treated with B[a]P for 1 h (Fig. 4C). Thus, Akt phosphorylation appears to be a significant upstream event for HIF-1 α induction in the presence of B[a]P. On the contrary, both basal and B[a]P-induced NrF-2 increase were not affected by wortmannin (Fig. 4A), indicating that NrF-2 activation is Akt-independent under these conditions.

E. Decrease of pAkt and HIF-1 α Protein Levels During Long-term Exposure to B[a]P

Our next objective was to determine whether the effects of low B[a]P concentrations on HIF-1 α and pAkt were sustained over time. Cells were maintained in culture medium containing 2.5 μ M B[a]P for up to 10 d. As shown in Fig. 5, total protein levels of HIF-1 α and pAkt were increased at 24 h (1.67 \pm 0.09- and 1.37 \pm 0.05-fold increases, respectively), whereas this profile was reversed at later time points. Specifically, the levels of HIF-1 α and pAkt appeared significantly decreased and reached 0.64 \pm 0.18 and 0.36 \pm 0.11 of control values, respectively, after 10 d of incubation. This observation could also explain the reduced cell viability detected in the presence of 2.5 μ M B[a]P for 72 h, compared to 48 h. Although similar exposure sce-

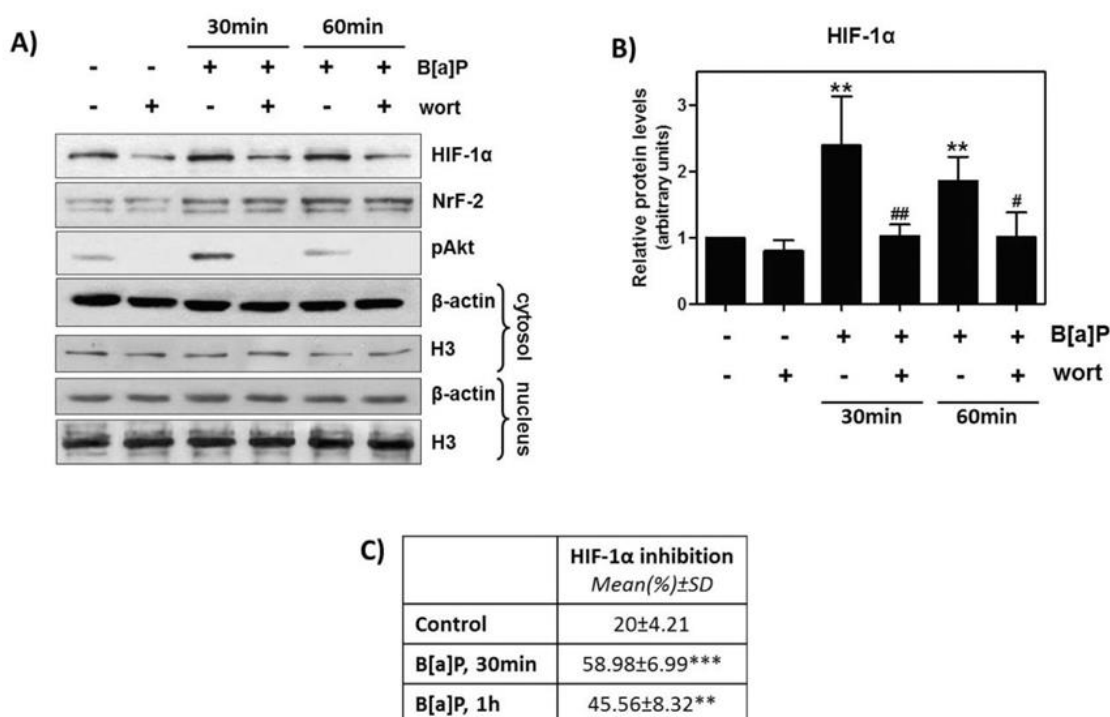


FIGURE 4. Inhibition of PI3K/Akt signaling pathway attenuates HIF-1 α , but not NrF2, nuclear accumulation. Cells were incubated with 2.5 μ M B[a]P in the presence or in the absence of the specific PI3K inhibitor, wortmannin (100 nM), added to the culture medium 30 min prior to B[a]P. (A) Representative blots of cytosolic protein extracts immunoblotted for pAkt and nuclear extracts immunoblotted for HIF-1 α and NrF2. Equal loading was verified using an antibody against β -actin or H3 for cytosolic and nuclear extracts, respectively. Differential extraction was verified by minimal levels of nuclear β -actin and cytosolic H3. (B) Densitometric analysis of HIF-1 α protein levels. (C) Percentage of HIF-1 α inhibition in the presence of wortmannin. Data are means \pm SD of at least three independent experiments. ** P <0.01 compared with control, # P <0.05, ## P <0.01 compared with respective conditions without wortmannin (ANOVA).

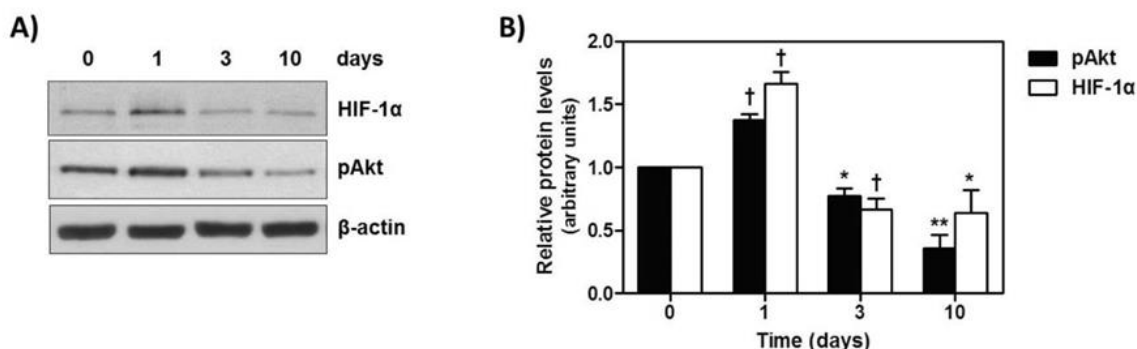


FIGURE 5. Long-term exposure to B[a]P attenuates both Akt phosphorylation and HIF-1 α total protein levels. Cells were cultured in the presence of 2.5 μ M B[a]P for 1, 3, and 10 days and total protein extracts were then immunoblotted against pAkt and HIF-1 α (A). Equal loading was verified using an antibody against β -actin. Densitometric analysis of pAkt and HIF-1 α protein levels (B). Data are means \pm SD of at least three independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01, and † P <0.001 compared with control.

narios under physiological conditions are exaggerated, the above results indicate that cell responses are subject to modulation during sustained stress.

F. Normal Lung Fibroblasts Respond to B[a]P Similar to Adenocarcinoma Cells

Given that lung tissue consists of many different cell types, except epithelial cells, we included in our study primary cultures of lung fibroblasts of both human and rat origin. Interestingly, the HIF-1 α increases in human and rat fibroblasts (2.35 \pm 0.18- and 2.72 \pm 0.72-fold increases, respectively) were similar to the increase observed in epithelial cells (1.67 \pm 0.09-fold increase), in the presence of 2.5 μ M B[a]P for 24 h (Fig. 6). Also considering recent unpublished findings of our lab on the A431 cell line (human epidermoid carcinoma) showing induction of HIF-1 α in the presence of B[a]P, we can hypothesize that HIF-1 α response may be maintained through different cell types and probably of different origin. On the contrary, the Akt phosphorylation profile exhibited significant differences between these cell types. Specifically, no difference of pAkt levels was observed in human fibroblasts treated with B[a]P (Fig. 6A), whereas a potent increase was detected in rat fibroblasts (2.48 \pm 0.01-fold increase).

G. Exposure to B[a]P under Stress Conditions Intensifies HIF-1 α Protein Induction

Because people are usually exposed to complex mixtures of airborne particles, we investigated the effects of diesel exhaust particles (DEP) on HIF-1 α and pAkt. In this context, we compared the effects of B[a]P to those of SRM2975, a standard mixture of DEP collected from an industrial forklift. We extracted the organic particulate component of this mixture (*see* Materials and Methods), which contained a variety of PAHs, including B[a]P. The final concentration of DEP used was 25 μ g/ml and equalled 3.5 μ g/cm², which falls within the estimated range of the biological relevant tissue culture concentrations (0.2–20 μ g/cm²).²⁶ Exposure of cells to DEP for 24 h induced total HIF-1 α accumulation (Fig. 7A, 2.97 \pm 0.94-fold increase) that was more potent compared to B[a]P alone (Fig. 5, 1.67 \pm 0.09-fold increase). This increase could be attributed to the presence of various different carcinogenic compounds in DEP mixture acting in an additive or synergistic way.

Finally, to simulate certain pathological conditions of the lung, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or pulmonary artery infraction, we incubated A549 cells with B[a]P under two different stress conditions: serum deprivation and treatment with the hypoxia-mimicking agent, CoCl₂. Exposure to 2.5 μ M B[a]P in the absence of serum factors in the culture medium resulted in approximately 12% greater induction of total HIF-1 α protein levels compared to the increase detected in serum-containing medium (Fig. 7B, *cf.* Fig. 5). Furthermore, when B[a]P was added (2.5 μ M for 1 h) in cells preincubated for 1 h with 50 μ M CoCl₂,

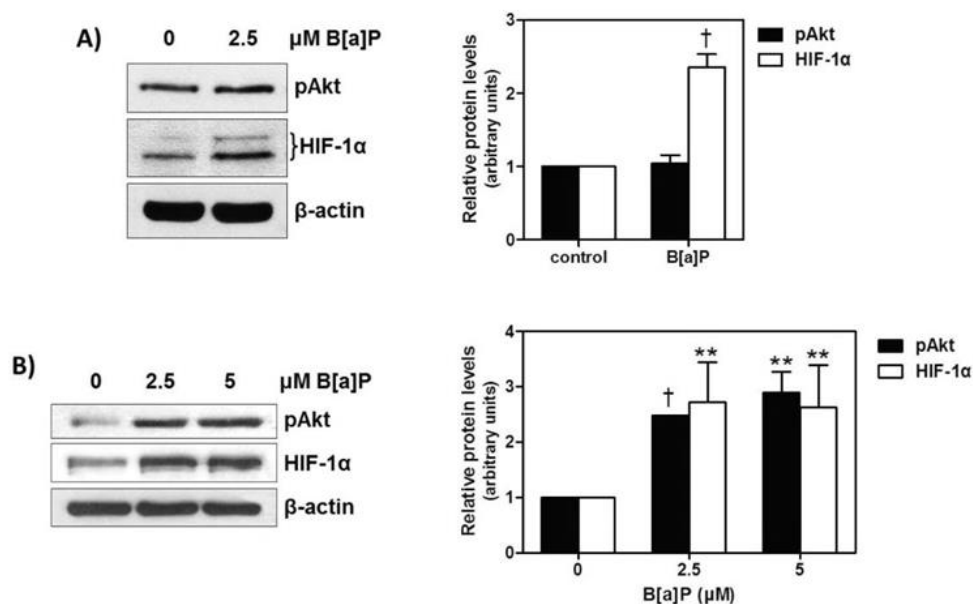


FIGURE 6. Normal lung fibroblasts respond to B[a]P in a similar way as epithelial adenocarcinoma cells. Primary cultures of normal human and rat lung fibroblasts were treated with the indicated doses of B[a]P for 24 h. Total protein extracts were then immunoblotted against pAkt and HIF-1α. (A) Representative blots and densitometric analysis of pAkt and HIF-1α of human fibroblasts. (B) Representative blots and densitometric analysis of pAkt and HIF-1α of rat fibroblasts. Equal loading was verified using an antibody against β-actin. Data are means ± SEM of at least three independent experiments. ***P*<0.01 and †*P*<0.001 compared with control.

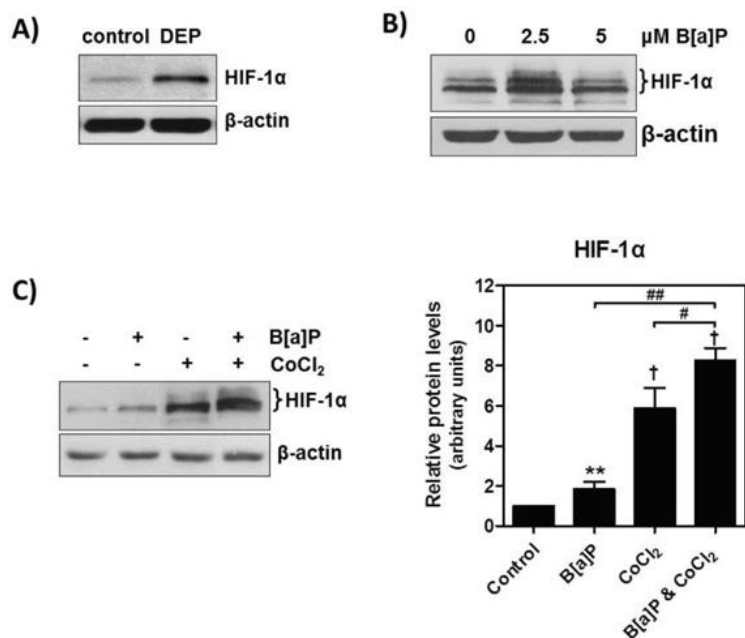


FIGURE 7. B[a]P intensifies HIF-1α protein induction under stress conditions. A549 cells were treated with (A) 25 μg/ml DEP for 24 h, (B) 2.5 μM B[a]P in serum free culture medium for 24 h or (C) 2.5 μM B[a]P for 1 h following preincubation with 50 μM CoCl₂ for 1 h. Total protein extracts were immunoblotted against pAkt and HIF-1α, respectively. Equal loading was verified using an antibody against β-actin. The blots are representative of at least three independent experiments. ***P*<0.01, †*P*<0.001 compared with control, #*P*<0.05, ###*P*<0.001 compared with B[a]P and CoCl₂.

additive effects on HIF-1 α levels were observed (Fig. 7C). As expected, CoCl₂ alone induced a significant increase of HIF-1 α (12.48 \pm 3.70-fold). Addition of B[a]P enhanced the HIF-1 α response, raising its levels by approximately 40% over CoCl₂ alone. These results indicate that the adverse effects of inhaled pollutants may become more intense in cases of pre-existing lung damage.

IV. DISCUSSION

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is generally known as an important transcription factor that regulates cellular metabolism and survival under hypoxia.²⁷ However, recent data support the hypothesis that HIF-1 α can also be activated by non-hypoxic stimuli, including growth factors, hormones, vasoactive peptides, and metal ions, in part through increased ROS production.²³ In the present study, we examined the response of HIF-1 α to B[a]P, a typical carcinogenic pollutant known to produce intracellular ROS as a result of its metabolic bioactivation. Briefly, we showed that HIF-1 α is increased and transcriptionally activated in human lung epithelial cells exposed to low, non-cytotoxic concentrations of B[a]P.

First, we observed a pro-survival effect of B[a]P at low concentrations, relevant to mainstream exposure conditions. This result is in agreement with previous studies supporting the ability of B[a]P to promote G1 \rightarrow S transition or p53 inactivation in human embryo lung fibroblasts and prostate cancer cells, respectively.^{6,9} Moreover, Kometani et al.²⁸ reported that long-term (24-week) treatment of A549 cells with 1 μ M B[a]P resulted in induced serum-independent proliferation and sustained EGFR and Akt upregulation, even 8 weeks after pollutant removal. In our long-term (3- and 10-d) exposure experiments, we observed down-regulation of pAkt (Fig. 4), although cell death was not detected. This discrepancy may partly be explained by the higher (2.5 μ M) concentration of B[a]P used in our experiments. Otherwise, the continuous presence of growth factors preventing tyrosine kinase receptors and the connected PI3K-Akt survival pathway from over activation, could modulate their sensitivity to external factors such as B[a]P. Nonetheless, it is possible that under pathologic conditions, excessively prolonged

exposure to airborne pollutants leads gradually to permanent cell cycle modifications and abnormal proliferation. On the contrary, other cell types exhibited high sensitivity to B[a]P. For example, human hepatic epithelial cell lines, Hepa1c1c7 and F258 appear more prone to B[a]P cytotoxicity.^{29,30} Liver cells possess a powerful metabolic machinery and therefore may accumulate earlier and larger amounts of reactive B[a]P metabolites, which are then responsible for toxicity.

The metabolic bioactivation of B[a]P by enzymes of the cytochrome P450 is a critical step for exerting adverse biological effects and is known to produce intracellular ROS, leading to redox imbalance.^{5,10,11} ROS have a "double-faced" profile; they can be both beneficial and deleterious, depending on their concentration and the antioxidant capacity of the cell.¹⁴ Li et al. have developed a three-tier model to explain the role of oxidative stress in mediating the biological effects of air pollutants.³¹ According to this model, at low levels of oxidative stress (tier 1), NrF-2 transactivates antioxidant enzymes to restore redox homeostasis. Further increase in ROS production (tier 2) triggers proinflammatory responses through signaling molecules and transcription factors, such as MAPKs and NF- κ B. Finally, exacerbated ROS levels (tier 3) impair mitochondrial function and lead to cell death. In our study, exposure to low B[a]P concentrations induced a rapid and time-dependent nuclear translocation of NrF-2, indicating mildly oxidative stress conditions. On the other hand, higher concentrations attenuated protective NrF-2 response and induced cell death. This observation is in accord with the previously reported induction of the NrF-2 pathway in the presence of non-cytotoxic doses of B[a]P, in Caco-2 and Jurkat cells.^{30,32} In addition to the NrF-2 increase, we report a concomitant induction of HIF-1 α , which may be considered noteworthy regarding cell survival. HIF-1 α regulates a vast array of genes responsible for adaptation of cells to hypoxia, and NrF-2 induces the antioxidant defense of the cell. Hence, the simultaneous augmentation of HIF-1 α and NrF-2 may underlie the extent of cytoprotective cellular responses.

As mentioned earlier, HIF-1 α is a transcription factor known to respond to redox imbalance. However, little is known regarding its response to carcinogenic pro-oxidant compounds, such as B[a]

P. On the other hand, B[a]P and its metabolites are known to activate multiple survival signaling pathways. Mainly, PI3K/Akt, ERK1/2, and JNKs are believed to contribute in B[a]P-induced cell cycle alternations, cell transformation, and tumorigenesis.^{33–36} Therefore, we examined Akt activation, a major survival marker also known to be activated under mild oxidative stress,³⁷ as a possible upstream regulator of HIF-1 α response. Our results showed that non-cytotoxic doses of B[a]P induced Akt phosphorylation on lung epithelial cells, with an activation profile similar to that of HIF-1 α . Notably, inhibition of PI3K attenuated HIF-1 α nuclear accumulation, indicating that B[a]P-induced HIF-1 α is mediated by the PI3K/Akt pathway. The cross-talk between HIF-1 α and Akt has been previously described in numerous studies. Akt has been reported to stimulate HIF-1 α mRNA translation through mTOR under normoxic conditions in response to specific growth factors, cytokines, and signaling molecules.^{38–42} In addition, PI3K/Akt pathway regulates HIF-1 α in a post-translational level, provoking the expression of heat-shock proteins that enhance its protein stability.⁴³

The induction of HIF-1 α in the presence B[a]P was more pronounced in normal lung fibroblasts of both human and rat origin. These results are further supported by preliminary unpublished data of our lab on human epidermoid carcinoma cells, showing a dose- and time-dependent induction of HIF-1 α in the presence of B[a]P. Studies on human lung adenocarcinoma⁴⁴ and eosinophil leukemia cells⁴⁵ reporting that B[a]P induced VEGF mRNA expression, a main target gene of HIF-1 α , further support our observations. Hence, HIF-1 α appears to act as an early and sensitive marker in response to B[a]P, and this effect is probably not limited in lung epithelial cells or lung tissue.

Interestingly, HIF-1 α upregulation was further confirmed when moderate stress conditions were applied; namely, in cells treated with a DEP mixture or with B[a]P combined with serum deprivation or the hypoxia mimicking-agent, CoCl₂. Notably, none of these conditions was accompanied by cell death. In a previous study, B[a]P was found to decrease HIF-1 α in A549 cells exposed to CoCl₂, and a competition for ARNT binding was postulated.⁴⁶ However, the high concentration of CoCl₂ used in that work (300 μ M) in combination with the longer

treatment duration (19 h) could be responsible for this variability. Nevertheless, because AhR (the B[a]P cytosolic receptor) and HIF-1 α share a common dimerization partner (ARNT/HIF-1 β), it is possible that they may compete for the shared ARNT/HIF-1 β pool, interfering with one another's function. Cross talk between these two pathways has previously been demonstrated; however, some studies reveal mutual inhibition,^{46–48} and others show that HIF-1 α pathway activation inhibits AhR pathway but not vice versa.^{49–51} Notably, most of these results were taken under hypoxia-simulating conditions, when HIF-1 α was excessively upregulated, whereas in normoxia, the ARNT pool seems to be sufficient for independent regulation of both ARNT ligands.⁵²

In summary, we observed a remarkably early increase of HIF-1 α protein levels in the presence of pro-survival B[a]P concentrations under normoxic conditions. This increase is followed by its transcriptional activation, which coincides with NrF-2 upregulation, placing HIF-1 α among the first players in cytoprotective cellular responses.

ACKNOWLEDGMENTS

Olga Mavrofydi is supported by the National Scholarships Foundation of Greece. This work was partially supported by the Special Research Account of the University of Athens.

REFERENCES

1. Kunzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak F Jr, Puybonnieux-Textier V, Quénel P, Schneider J, Seethaler R, Vergnaud JC, Sommer H. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*. 2000;356(9232):795–801.
2. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194–1210.
3. NTP 12th Report on Carcinogens. Report on carcinogens: carcinogen profiles. US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 2011;12:iii–499.
4. Pelkonen O, Nebert DW. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev*. 1982;34(2):189–222.
5. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;206(1):73–93.

6. Du HJ, Tang N, Liu BC, You BR, Shen FH, Ye M, Gao A, Huang CS. Benzo[a]pyrene-induced cell cycle progression is through ERKs/cyclin D1 pathway and requires the activation of JNKs and p38 mapk in human diploid lung fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2006;287(1–2):79–89.
7. Tannheimer SL, Ethier SP, Caldwell KK, Burchiel SW. Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line. *Carcinogenesis.* 1998;19(7):1291–1297.
8. Vondracek J, Kozubik A, Machala M. Modulation of estrogen receptor-dependent reporter construct activation and G0/G1-S-phase transition by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Toxicol Sci.* 2002;70(2):193–201.
9. Hruha E, Trilecova L, Marvanova S, Kremer P, Vykopalova L, Milcova A, Libalová H, Topinka J, Staršichová A, Soucek K, Vondráček J, Machala M. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LN-CaP cells. *Toxicol Letts.* 2010;197(3):227–235.
10. Dalton TP, Puga A, Shertzer HG. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact.* 2002;141(1–2):77–95.
11. Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(1):65–85.
12. Tokiwa H, Sera N, Nakanishi Y, Sagai M. 8-Hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles. *Free Rad Biol Med.* 1999;27(11–12):1251–1258.
13. Tannheimer SL, Barton SL, Ethier SP, Burchiel SW. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca²⁺ and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997;18(6):1177–1182.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1–40.
15. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84.
16. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1–15.
17. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Rad Biol Med.* 2002;33(8):1047–1060.
18. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47–95.
19. Huang RP, Wu JX, Fan Y, Adamson ED. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *Journal Cell Biol.* 1996;133(1):211–220.
20. Nagy MA. HIF-1 is the commander of gateways to cancer. *J Cancer Sci Ther.* 2011;3(2):035–040.
21. Escuin D, Simons JW, Giannakakou P. Exploitation of the HIF axis for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(7):608–611.
22. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012;31(11):2448–2460.
23. Pouyssegur J, Mehta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biolog Chem.* 2006;387(10–11):1337–1346.
24. Roth M, Soler M, Hornung M, Emmons LR, Stulz P, Perruchoud AP. Cell cultures from cryopreserved human lung tissue. *Tissue Cell.* 1992;24(4):455–459.
25. Uhal BD, Ramos C, Joshi I, Bifero A, Pardo A, Selman M. Cell size, cell cycle, and alpha-smooth muscle actin expression by primary human lung fibroblasts. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 1):L998–L1005.
26. Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Lag M. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Particle Fibre Toxicol.* 2010;7:41.
27. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters.* 2007;581(19):3582–3591.
28. Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, Takenaka T, Shoji F, Yano T, Maehara Y. Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Lett.* 2009;278(1):27–33.
29. Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebo S, Solhaug A, Tekpli X, Landvik NE, Huc L, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c7 cells. *Chem Biol Interact.* 2007;167(1):41–55.
30. Nguyen PM, Park MS, Chow M, Chang JH, Wrischnik L, Chan WK. Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message. *Toxicol Sci.* 2010;116(2):549–561.
31. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Rad Biol Med.* 2008;44(9):1689–1699.
32. Niestroy J, Barbara A, Herbst K, Rode S, van Liempt M, Roos PH. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and

- Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(3):671–683.
33. Ding J, Ning B, Gong W, Wen W, Wu K, Liang J, He G, Huang S, Sun W, Han T, Huang L, Cao G, Wu M, Xie W, Wang H. Cyclin D1 induction by benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/MAPK- and p70s6k-dependent pathway promotes cell transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem*. 2009;284(48):3331–3339.
 34. Gao A, Liu B, Shi X, Jia X, Ye M, Jiao S, You B, Huang C. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/p70S6K/AP-1 signaling pathway mediated benzo(a) pyrene-induced cell cycle alternation via cell cycle regulatory proteins in human embryo lung fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2007;170(1):30–41.
 35. Jiao S, Liu B, Gao A, Ye M, Jia X, Zhang F, Liu H, Shi X, Huang C. Benzo(a)pyrene-caused increased G1-S transition requires the activation of c-Jun through p53-dependent PI-3K/Akt/ERK pathway in human embryo lung fibroblasts. *Toxicol. Lett*. 2008;178(3):167–175.
 36. Li J, Tang MS, Liu B, Shi X, Huang C. A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal C141 cells. *Oncogene*. 2004;23(22):3932–3944.
 37. Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2008;266(1):30–36.
 38. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38205–38211.
 39. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 2003;63(9):2330–2334.
 40. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*. 2000;60(6):1541–1545.
 41. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Devel*. 2000;14(4):391–396.
 42. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;102:19–65.
 43. Zhou J, Schmid T, Frank R, Brune B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13506–513.
 44. Ueng TH, Hung CC, Kuo ML, Chan PK, Hu SH, Yang PC, Chang LW. Induction of fibroblast growth factor-9 and interleukin-1alpha gene expression by motorcycle exhaust particulate extracts and benzo(a) pyrene in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol Sci*. 2005;87(2):483–496.
 45. Gu J, Chan LS, Wong CK, Wong NS, Leung KN, Mak NK. Effect of benzo[a]pyrene on the production of vascular endothelial growth factor by human eosinophilic leukemia EoL-1 cells. *J Envir Pathol Tox Oncol*. 2011;30(3):241–249.
 46. Schults MA, Timmermans L, Godschalk RW, Theys J, Wouters BG, van Schooten FJ, Chiu RK. Diminished carcinogen detoxification is a novel mechanism for hypoxia-inducible factor 1-mediated genetic instability. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14558–14564.
 47. Chan WK, Yao G, Gu YZ, Bradfield CA. Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem*. 1999;274(17):12115–12123.
 48. Nie M, Blankenship AL, Giesy JP. Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Envir Tox Pharm*. 2001;10(1–2):17–27.
 49. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, fhitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M, Poellinger L. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Molec Cell Biol*. 1996;16(10):5221–5231.
 50. Gassmann M, Kvietikova I, Rolfs A, Wenger RH. Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int*. 1997;51(2):567–574.
 51. Pollenz RS, Davarinos NA, Shearer TP. Analysis of aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling during physiological hypoxia reveals lack of competition for the aryl hydrocarbon nuclear translocator transcription factor. *Molec Pharm*. 1999;56(6):1127–1137.
 52. Carlson DB, Perdew GH. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Molec Toxicol*. 2002;16(6):317–325.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Όλγα Μαυροφρύδη

ΗΜ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 12/09/1984

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Μαρούσι Αττικής

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: ΧΡΗΣΤΟΥ ΜΑΝΤΙΚΑ 17, Τ.Κ.:18454, ΝΙΚΑΙΑ

ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: 210-4901298, 6936608504

email: omavrofrydi@biol.uoa.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

2002-2007: Πτυχίο Βιολογίας «Λίαν Καλώς» (7,34/10). Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2008-2013: Διδακτορική διατριβή: «Μελέτη της επίδρασης σωματιδιακών συστατικών της ρύπανσης σε μηχανισμούς επιβίωσης κυττάρων ανθρώπου».

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ (First Certificate in English, Cambridge University)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

2009-2013: Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής, στο πλαίσιο του Προγράμματος Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Εσωτερικού

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Κυτταροκαλλιέργειες (καλλιέργεια κυτταρικών σειρών, πρωτογενείς καλλιέργειες, συγκαλλιέργειες)
- Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (MTT)
- Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA για την εκτίμηση του αποπτωτικού θανάτου (DNA Laddering)

- Δοκιμασία ηλεκτροφόρησης ολόκληρων κυττάρων για την ανίχνευση θραύσεων του DNA (Comet assay)
- Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και διαφορική απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών
- Ανοσοδοκιμασία κατά Western
- Απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)
- Φθορισμομετρικός προσδιορισμός ιόντων Ca^{2+}

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Πολύ καλή γνώση των ακόλουθων λογισμικών προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή:

- Εφαρμογές Microsoft Office 2010: Word, Excel, PowerPoint
- Λογισμικά επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων: Adobe Photoshop CS5, GelAnalyzer 1.0, ImageJ
- Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης: GraphPad Prism 5

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) **28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Ιωάννινα, 2006.**
Καρακώστα Λ., Κλεόπα Μ., Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.
«Επίδραση ασβεστίου σε μηχανισμούς κυτταρικής επιβίωσης»
- 2) **29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Καβάλα, 2007.**
Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.,
«Επίδραση του βενζο[α]πυρενίου σε μηχανισμούς κυτταρικής επιβίωσης»
- 3) **31^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Πάτρα, 2009.**
Κομσέλη Ειρ.-Στ., Μαυροφρύδη Όλ., Ελευθεριάδης Κ., Χουσιάδας Χρ., και Παπαζαφείρη Π.,
«Μελέτη της επίδρασης μικρο- και νανο-σωματιδίων σε ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα.»
- 4) **32^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Καρπενήσι, 2010.**
Διβόλης Γ., Μαυροφρύδη Όλ., και Παπαζαφείρη Π.,
«Μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης.»

Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Επίδραση του βενζο[α]πυρενίου σε μηχανισμούς επιβίωσης ανθρώπινων πνευμονικών κυττάρων.»

5) 33^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Έδεσσα, 2011.

Μαυροειδή Π., Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Διερεύνηση των συνθηκών για τη συνδυασμένη ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης και κυτταρικού ασβεστίου σε καρκινικά κύτταρα»

Γιαμπαζολιάς Ε., Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Ασβεστιο-εξαρτώμενα μονοπάτια επιβίωσης ως απόκριση σε διαφορετικού τύπου κυτταρικό στρες.»

6) 62^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β., Αθήνα, 2011.

Διβόλης Γ., Μαυροφρύδη Όλ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1α survival pathways»

7) 34^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Ε., Τρίκαλα, 2012.

Μαυροφρύδη Όλ., Διβόλης Γ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Αύξηση ασβεστίου και HIF-1α κατά την καρκινογένεση»

8) Εκπαιδευτική Νευροεπιστημονική Διημερίδα, ΙΙΒΕΑΑ, 2012

Πασχαλίδη Μ., Μαυροφρύδη Όλ., Κούρτη Μ. και Παπαζαφείρη Π.,

«Duration-dependent effects of glucose deprivation on SHSY-5Y cells are mediated by endoplasmic reticulum dysfunction»

Οργανωτική και γραμματειακή υποστήριξη των συνεδρίων της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (Ε.Ε.Β.Ε.)

ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ ΕΡΓΟ:

A) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Προπτυχιακές διπλωματικές εργασίες:

1) Περιστέρη Ελευθερία (2007-2008): «Μελέτη του μηχανισμού δράσης αιθερικών φωσφολιπιδίων με αντικαρκινικές ιδιότητες»

2) Κούρτη Μαρία (2007-2008): «Μελέτη του μηχανισμού δράσης των νευροστεροειδών σε καρκινικά κύτταρα»

3) Νεοφύτου Χριστιάνα (2007-2008): «Διερεύνηση σηματοδοτικών μηχανισμών, που επάγονται από το βενζο[α]πυρενίο σε κύτταρα A549»

- 4) **Κομσέλη Ειρήνη (2008-2009):** «Μελέτη στις επίδρασης μικρο- και νανοσωματιδίων σε κύτταρα ανθρώπινου πνεύμονα»
- 5) **Διβόλης Γιώργος (2009-2010):** «Μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης»
- 6) **Μαυροειδή Παναγιώτα (2010-2011):** «Μελέτη της ενεργοποίησης μονοπατιών επιβίωσης σε συνθήκες τροποποιημένης ομοιόστασης ασβεστίου»
- 7) **Πασχαλίδη Μαρία (2011-2012):** «Διερεύνηση παραγόντων, που επηρεάζουν την επιβίωση κυττάρων σε συνθήκες στρες»
- 8) **Μπούντη Λάουρα (2011-2012):** «Κυτταρική βιωσιμότητα. Συγκριτική εκτίμηση σηματοδοτικών μηχανισμών και δυνατότητα πρόβλεψης»
- 9) **Γιαγκλήση Ιωάννα (2012-2013):** «Επίδραση της στέρσης γλυκόζης στην κυτταρική σηματοδότηση και μιτοχονδριακή λειτουργία νευρικών κυττάρων»

Μεταπτυχιακές διπλωματικές εργασίες:

- 1) **Γιαμπαζολιάς Ευάγγελος (2010-2011):** «Διερεύνηση της ενεργοποίησης του επαγόμενου από τη υποξία μεταγραφικού παράγοντα, HIF-1, σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα»
- 2) **Κούρτη Μαρία (2009-2010):** «Διερεύνηση του ρόλου του ασβεστίου κατά την απόκριση νευρικών κυττάρων στην υποξία»

Β) ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

Επίβλεψη και συμμετοχή σε εργαστηριακές ασκήσεις, στο πλαίσιο των εξής μαθημάτων:

«Φυσιολογία Ζώων και Ανθρώπου»:

- Πηγή ενέργειας για τη μυϊκή σύσπαση. Τα φωσφογόνα και οι κινάσες τους. Μέτρηση της δραστικότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης.
- Επίδραση ορμονών στο γλυκογόνο του ήπατος και τη γλυκόζη του αίματος.
- Επίδραση της στέρσης τροφής στο μεταβολισμό του ήπατος.
- Πεπτικά ένζυμα των θηλαστικών.
- Πρόσληψη της γλυκόζης από το εντερικό τοίχωμα.

«Ανοσολογία»:

- Ανοσοδιάχυση
- Ανοσοηλεκτροφόρηση
- Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

A) ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Mavrofyridi O. and Papazafiri P.:

Hypoxia-Inducible Factor-1 α Increase is an Early and Sensitive Marker of Lung Cells Responding to Benzo[a]Pyrene.

Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology, 2012, Vol. 31, Issue 4, pp. 335-347

Pilou M., Housiadas C., Eleftheriadis K., Papazafiri P. and Mavrofyridi O.:

Computational modelling as an alternative testing strategy.

Nanotoxicology, In press (due on: 12/7/2013)

B) ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ υπό προετοιμασία

Mavrofyridi O., Mavroeidi P. and Papazafiri P.:

Comparative assessment of HIF-1 α and Akt responses of human lung and skin cells exposed to benzo[a]pyrene. Effect of conditioned medium from pre-exposed primary fibroblasts. (*In preparation, 2013*)

Mavrofyridi O., Divolis G., Mavroeidi P., Giampazolias E. and Papazafiri P.:

Calcium homeostasis contribution to benzo[a]pyrene effects on human lung and skin epithelial cells. (*In preparation, 2013*)

Mavrofyridi O., Eleftheriadis K., Vratolis S., Mihalopoulos N., Housiadas C. and Papazafiri P.:

Toxicity induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter collected in urban and detergent industrial workplace. (*In preparation, 2013*)

Mavrofyridi O., Mavroeidi P., Karacosta L., Calogeropoulou Th. and Papazafiri P.:

Miltefosine effects on calcium homeostasis in skin epithelial cells (A431) leading to irreversible cell damage. (*In preparation, 2013*)

Kourti M., Mavrofrydi O. and Papazafiri P.:

Sustained activation of PI3K/Akt in hypoxic-ischemic SH-SY5Y cells is mediated by endoplasmic reticulum calcium depletion. (*In preparation*, 2013)

