



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ-ΣΤΡΕΣ ΣΤΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΥΩΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ
ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Αλαούνη Βασιλική (1803)**

**Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Βενυχάκη Μαρία
Υπεύθυνο μέλος ΔΕΠ Τμήματος Χημείας: Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**

**Εργαστήριο Κλινικής Χημείας
Ιατρική Σχολή**

Ηράκλειο Κρήτης 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Μαρία Βενυχάκη, η οποία με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της. Θα επιθυμούσα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την κατανόηση και την συμπαράσταση της, τις δύσκολες περιόδους που προέκυψαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής, αλλά και για την υποστήριξη της για την υλοποίηση του παρόντος έργου. Επίσης, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τον κ. Κατερινόπουλο Χαράλαμπο για την εμπιστοσύνη του και τις πολύτιμες του συμβουλές ως συνυπεύθυνος καθηγητής του Τμήματος Χημείας.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στην Σμαράγδα Πουλάκη για την καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια της πτυχιακής μου. Η βοήθεια, η στήριξη και η υπομονή της ήταν πολύτιμος συνοδοιπόρος μου όλους αυτούς τους μήνες. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ισίδωρο Αξιώτη για την συνεργασία και την βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, που με την οικονομική και συναισθηματική τους στήριξη αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα για κάθε μου προσπάθεια. Ξεχωριστά ευχαριστώ τις φίλες μου, Κωνσταντίνα, που αποτέλεσε σπουδαία παρέα σε όλη αυτήν την πορεία και Αντωνία, για τις πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες της.

Γιατί ποτέ δεν αφήνουμε τους στόχους μας

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--------------------------|---------|
| ▪ Συντμήσεις | σελ. 5 |
| ▪ Περίληψη | σελ. 8 |
| ▪ Εισαγωγή | σελ. 11 |
| ▪ Σκοπός μελέτης | σελ. 32 |
| ▪ Υλικά και μέθοδος | σελ. 34 |
| ▪ Αποτελέσματα | σελ. 65 |
| ▪ Συζήτηση αποτελεσμάτων | σελ. 72 |
| ▪ Βιβλιογραφία | σελ. 76 |

Συντμήσεις

| | |
|-----------------------|--|
| ACTH | Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη (Adenocorticotropin Hormone) |
| ANG | Αγγειοτενσίνη (Angiotensin) |
| AP-1 | Πρωτεΐνη ενεργοποίησης (Activator Protein 1) |
| AVP | Πεπτίδιο αργινίνης- βασοπρεσίνης (Arginin- Vasopressin Peptide) |
| β-actin | Εκκινητής για το γονίδιο β-ακτίνης |
| BNST | Bed nucleus of the stria terminalis |
| BSA | Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin) |
| cAMP | Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Cyclic Adenosine MonoPhosphate) |
| CCK | Χοληκυστοκινίνη (Cholecystokinin) |
| cDNA | Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA) |
| conA | Concanavalin A |
| CRF | Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Factor) |
| CRH | Εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone) |
| <i>Crh</i> +/+ | Μύες με ανέπαφο το γονίδιο CRH |
| <i>Crh</i> -/- | Μύες με ανεπάρκεια του γονιδίου CRH |
| CRH-R1(ή 2) | Υποδοχέας 1(ή 2) της CRH (Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1(ή 2)) |
| DMSO | Διμεθυσουλφοξίδιο (Dimethyl sulfoxide) |
| dNTPs | Δεοξυ-τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (Deoxytriphosphate nucleotides) |
| DRG | Νωτιαία ρίζα γαγγλίων (Dorsal root ganglion) |
| ELISA | Ανοσοπροσοφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) |

| | |
|------------------|---|
| FBS | Ορός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum) |
| GC | Γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid) |
| GR | Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (Glycocorticoid receptor) |
| CPCR | Υποδοχέας που είναι συζευγμένος με G-πρωτεΐνη (G protein–coupled receptor) |
| HPA | Υποθάλαμικός υποφυσιακός επινεφριδιακός άξονας (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis) |
| IL- | Ιντερλευκίνη- (Interleukin-) |
| IFN- | Ιντερφερόνη- (Interferon-) |
| LPS | Λιποσακχαρίτης (Lipopolysaccharide) |
| LTB4 | Λευκοτριένιο B4 (Leukotriene B4) |
| MC2-R | Υποδοχέας τύπου 2 της μελανοκορτίνης |
| ME | Median Eminence |
| mRNA | Αγγελιοφόρο RNA (Messenger RNA) |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide |
| NGF | Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve growth factor) |
| PACAP | Πολυπεπτίδιο ενεργοποιημένης αδενυλικής κυκλάσης (Adenylate cyclase activating polypeptide 1) |
| PAF | Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet-activating factor) |
| PBS | Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline) |
| POMC | Προοπιομελανοκορτίνη (Prorionmelanocortin) |
| PVN | Παρακουλιακός πυρήνας (Paraventricular nucleus) |
| StAR mRNA | Ένζυμο βιοσύνθεσης γλυκοκορτικοειδών |
| TACE | Ένζυμο μετατροπής TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme) |
| TAE | Tris/Acetic acid/EDTA |

| | |
|------------------|--|
| TH1 / TH2 | Τύπος 1 Βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων |
| TNF-α | Παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor necrosis factor) |
| TNF-R1(2) | Υποδοχέας TNF-α 1 (ή 2) (Tumor necrosis factor receptor 1,2) |
| UCN | Ουροκορτίνη (Urocortin) |
| VIP | Αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο (Vasoactive Intestinal Peptide) |
| VP | Βασοπρεσσίνη (Vasopressin) |

Περίληψη

Η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση αποτελεί διαδικασία αντίδρασης του αγγειακού συνδετικού ιστού, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός του οργανισμού ενάντια σε κυτταρικές βλάβες και σε καταστάσεις στρες. Η απόκριση αυτή υλοποιείται μέσω συμμετοχής ποικίλων κυτταρικών πληθυσμών και παραγόντων, που συνεργάζονται χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό μοριακών σημάτων. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του υποθαλαμικού υποφισιακού επινεφριδιακού (HPA) άξονα, ο οποίος μεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής. Έτσι, κατά τη διάρκεια ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης, προκαλείται διέγερση της CRH, που τελικά οδηγεί στην απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών (GC) από τα επινεφρίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από ισχυρή ενδογενή αντιφλεγμονώδη δράση. Όσον αφορά τη δράση της CRH, η οποία διαμεσολαβείται μέσω διαφορετικών τύπων υποδοχέων (CRH-R1 και CRH-R2), έμμεσα είναι ικανή να καταστείλει την φλεγμονή μέσω απελευθέρωσης γλυκοκορτικοειδών, ενώ άμεσα ασκεί προ-φλεγμονώδη δράση σε περιφερικούς ιστούς. Η απόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις φλεγμονής επιτυγχάνεται τόσο από προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες, όπως οι κυτοκίνες (π.χ. Ιντερλευκίνη 6, IL-6) όσο και από μία μεγάλη ποικιλία νευροπεπτιδίων (π.χ. NGF).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση, χρησιμοποιώντας μύες που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια του γονιδίου της CRH (*Crh* -/-), και φυσιολογικούς (*Crh* +/+). Αρχικά, προκλήθηκε επαγωγή περιφερικής φλεγμονής στο πόδι των δύο διαφορετικών γονοτύπων μυών, με ένεση CFA (Complete Freund's Adjuvant) και ακολούθησε απομόνωση σπληνοκυττάρων για τη δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών T λεμφοκυττάρων. Εν συνεχεία, τα κύτταρα που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω πειράματα, με σκοπό να εντοπιστούν διαφορές τόσο στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όσο και για να συγκριθεί η έκφραση των προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών στους δύο διαφορετικούς γονότυπους.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ανεπάρκεια της CRH δεν συνοδεύεται από διαφορές στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων μετά από επαγωγή φλεγμονής, αφού και στους δύο γονότυπους παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, αναφορικά με την έκφραση και την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και νευροπεπτιδίων εντοπίστηκε διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων, αλλά όχι στατιστικώς σημαντική ώστε να

εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την επίδραση της ανεπάρκειας της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση.

Εισαγωγή

A. HPA άξονας, CRH και συγγενή πεπτίδια

A₁. Ο Υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός άξονας (HPA)

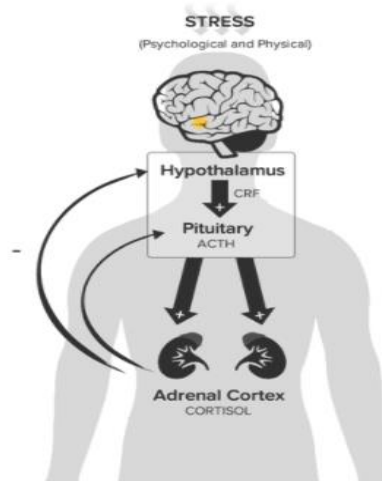
Για την απόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις στρες διαμεσολαβούν δομές που εντοπίζονται τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όσο και σε περιφερικούς ιστούς. Ένα από τα σημαντικότερα συστήματα δομών που συμμετέχουν στην απόκριση του οργανισμού στο στρες είναι ο υποθαλαμικός-υποφυσιακός-επινεφριδιακός άξονας HPA (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Η ενεργοποίηση του HPA άξονα λαμβάνει χώρα ως απόκριση του οργανισμού σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, ο οποίος μπορεί να αποτελεί οποιοδήποτε φυσικό ή ψυχολογικό ερέθισμα, το οποίο διαταράσσει την ομοιόσταση του και δίνει εντολή στον εγκέφαλο να ασκήσει τη δράση του. Στην πραγματικότητα ο HPA άξονας λειτουργεί ως το κομβικό σημείο σύνδεσης μεταξύ του κεντρικού νευρικού και του ενδοκρινικού συστήματος.

Η ενεργοποίηση του HPA άξονα ξεκινά με την απελευθέρωση του υποθαλαμικού παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF), που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του. Ο CRF συχνά αναφέρεται και ως εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Οι νευρώνες CRH προέρχονται από τον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου και καταλήγουν στο εξωτερικό στρώμα της ME (Median Eminence). Η CRH με την σειρά της επιδρά στους υποδοχείς CRH-R1 στα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης, ώστε να διεγείρει την ταχεία απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) και την σύνθεση του πρόδρομου μορίου της ACTH, την προοπιομελανοκορτίνη (POMC) (Marni N. Silverman, et al., 2005). Η POMC αποτελεί ένα πεπτίδιο 266 αμινοξέων, που εκφράζεται σε υψηλό βαθμό τόσο στην υπόφυση όσο και στον υποθάλαμο και εμπεριέχει στο μοριο της την ACTH, την β-ενδορφίνη, την β-λιποτροπική ορμόνη και τις μελανοκορτίνες (Kyrou I. & Tsigos C., 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ενεργοποίηση της POMC φαίνεται πως είναι ανεξάρτητη από υποθαλαμικές δομές του εγκεφάλου ή την έκφραση της CRH στον υποθάλαμο (Venihaki M. & Majzoub J., 2002). Μάλιστα, η απόκριση της ACTH διαμορφώνεται από τον αριθμό των υποδοχέων CRH-R1 στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (Markella Nezi et al., 2015). Εν συνεχεία, ακολουθεί απελευθέρωση της ACTH στην περιφερική κυκλοφορία, όπου δεσμεύεται στον υποδοχέα τύπου 2 της μελανοκορτίνης (MC2-R) του φλοιού των επινεφριδίων. Η ACTH αποτελεί ένα πεπτίδιο 39 αμινοξέων, που εκκρίνεται από τα βασεόφιλα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης και η βιολογική της δράση εντοπίζεται στο N-τερματικό άκρο, με τα 24 πρώτα αμινοξέα να είναι υπεύθυνα για τη

μέγιστη δραστικότητα της (Kyrou I. & Tsigos C., 2005). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα MC2-R έχει ως συνέπεια την σηματοδότηση του μονοπατιού της cAMP, που οδηγεί τελικά στην έκκριση γλυκοκορτικοειδών (GC), καθώς επίσης η απελευθέρωση της ACTH είναι υπεύθυνη για την αύξηση πρόσληψης χοληστερόλης από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και για την διέγερση μεταγενέστερων σταδίων της σύνθεσης στεροειδών (Sean M. Smith et al., 2005). Επιπλέον, η απελευθέρωση της CRH έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης, που σε συνδυασμό με τα γλυκοκορτικοειδή (GC) επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και την φλεγμονώδη απόκριση (Elizabeth L. Webster et al., 1988).

Σύμφωνα λοιπόν με όσα ήδη αναφέρθηκαν η ενεργοποίηση του HPA άξονα έχει ως τελικό αποτέλεσμα την έκκριση κορτιζόλης στους ανθρώπους, ενώ σε ποντίκια και αρουραίους παρατηρείται έκλυση κορτικοστερόνης. Μάλιστα, σε κατάσταση ανάπαυσης η δραστηριότητα του HPA άξονα εμφανίζει κιρκάδια δραστηριότητα που χαρακτηρίζεται από παλμική έκκριση γλυκοκορτικοειδών (GC) (μία ανά ώρα), με υψηλότερα επίπεδα δράσης κατά τη διάρκεια της ημέρας στους ανθρώπους, και τη νύχτα στα ποντίκια και τους αρουραίους (Lightman SL. & Conway-Campbell BL., 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο τρόπος δράσης του HPA άξονα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε καταστάσεις που διαταράσσουν την ομοιόσταση του. Πράγματι, η υπερβολική απόκριση του HPA άξονα (π.χ. σε κατάσταση στρες) θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της ευαισθησίας του ανοσοποιητικού συστήματος σε μολυσματικούς παράγοντες. Επιπλέον, η υπερλειτουργία του HPA άξονα μπορεί να ενισχύσει την αντίσταση του οργανισμού σε αυτοάνοσες φλεγμονώδεις ασθένειες. Από την άλλη πλευρά, μία ελαττωματική απόκριση του HPA άξονα θα ήταν ικανή να οδηγήσει σε μείωση της ευαισθησίας σε μολυσματικούς παράγοντες και ελάττωση της πιθανότητας σχηματισμού όγκων, όμως συγχρόνως ελλοχεύει κίνδυνος αύξησης της ευαισθησίας σε αυτοάνοσες φλεγμονώδεις ασθένειες. Οι υποθέσεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί μέσω πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε επίμυες Fischer και Lewis, δύο συγγενή γένη που επιλέχθηκαν τόσο για την αντοχή τους (αρουραίοι Fischer) όσο για την επιδεκτικότητα τους (αρουραίοι Lewis) σε φλεγμονώδεις νόσους (Markella Nezi et al., 2015).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του άξονα HPA

(<https://www.integrativepro.com/Resources/Integrative-Blog/2016/The-HPA-Axis>)

A₂. CRH

Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone-CRH), ή όπως συχνά αναφέρεται εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Factor-CRF) είναι μία πεπτιδική ορμόνη που αποτελείται συνολικά από 41 αμινοξέα, η οποία απομονώθηκε από εκχυλίσματα υποθαλάμου προβάτου το 1981 από τον Wiley Vale (Wylie W. Vale, 1981). Η ονομασία της προέρχεται από τον ρόλο που διαδραματίζει στην πρόσθια υπόφυση, όπου μεσολαβεί στην απελευθέρωση της ACTH. Αξίζει να σημειωθεί ότι η CRH αποτελεί το κύριο μέσο ενεργοποίησης του HPA άξονα, και με αυτόν τον τρόπο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση ποικίλων νευροενδοκρινικών λειτουργιών, αλλά συγχρόνως εμπλέκεται στην ρύθμιση της μάθησης, της συμπεριφοράς και των αναπαραγωγικών συμπεριφορών, καθώς επίσης συμμετέχει στην απόκριση έναντι στρεσογόνων παραγόντων (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006; Kyrou I. & Tsigos C., 2005). Γενικότερα γίνεται κατανοητό ότι η CRH αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα νευροπεπτιδίου με πολλαπλές δράσεις σε όλους τους ιστούς του σώματος (Baigent S., 2001). Όσον αφορά την έκκριση της ACTH, η CRH δρα μέσω του υποδοχέα τύπου 1 της CRH, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην διέγερση της αδενυλικής κυκλάσης, η οποία με την σειρά της έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της cAMP στα κορτικοτρόφα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης. Η CRH διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH μέσω της cAMP-πρωτεϊνικής κινάσης A, η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για την αύξηση της μεταγραφής της POMC, όσο και για την διέγερση της πεπτιδικής σύνθεσης και την αύξηση του

ενδοκυττάριου ασβεστίου (Majzoub J. A, 2006). Το πολυπεπτίδιο της ενεργοποιημένης αδενυλικής κυκλάσης (PACAP) της υπόφυσης αυξάνει τα επίπεδα του CRH mRNA του PVN του υποθαλάμου, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι το πολυπεπτίδιο αυτό εμπλέκεται στη θετική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της CRH (Mastorakos G., Karoutsou E.I. & Mizamtsidi M, 2006).

Η μέγιστη συγκέντρωση της CRH εντοπίζεται στον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου, στον εγκεφαλικό φλοιό, στον πυρήνα Barington και στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Η έκφραση της CRH έχει βρεθεί σε ποικίλα μέρη του κεντρικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλικού φλοιού, των νευρώνων του νωτιαίου μυελού, το μυελό των επινεφριδίων, τα συμπαθητικά γάγγλια του αυτόνομου νευρικού συστήματος, τους εμβρυϊκούς πνεύμονες μύς μόνο, τον θύμο αδένα, το δέρμα, τον γαστρεντερικό σωλήνα και τα T λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Joseph A. Majzoub, 2006; Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι η CRH έχει την ικανότητα να εκφράζεται σημαντικά σε σπληνοκύτταρα, αλλά η έκφραση του CRH mRNA δεν υφίσταται κάποια μεταβολή μετά την έκθεση σε λιποσακχαρίτη (LPS) (Aird et al., 1993).

A₃. Το γονίδιο της CRH

Το γονίδιο της CRH αποτελείται από δύο εξώνια, που ενώνονται με ένα εσώνιο περίπου 800 ζευγών βάσεων. Αξίζει να επισημανθεί ότι το γονίδιο της CRH χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά διατηρημένο μεταξύ των σπονδυλωτών, και μάλιστα η κωδικοποιούσα περιοχή της ανθρώπινης CRH εμφανίζει 94% ομοιότητα με την αντίστοιχη των επίμυων (Mastorakos G. et al., 2006). Το δεύτερο εξώνιο περιλαμβάνει ολόκληρη την κωδικοποιημένη περιοχή της πρωτεΐνης. Τόσο η ανθρώπινη CRH, όσο και η CRH των μυών διαθέτει μία χαρακτηριστική αλληλουχία αμινοξέων, εν συγκρίσει με την CRH του προβάτου που διαφέρει κατά επτά αμινοξέα. Η περιοχή του υποκινητή της CRH περιλαμβάνει ποικίλα ρυθμιστικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα στοιχεία απόκρισης της cAMP, αλληλουχίες ενεργοποίησης πρωτεΐνης (AP-1), καθώς επίσης και στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GC) (Majzoub J. A., 2006).

A₄. CRH υποδοχείς

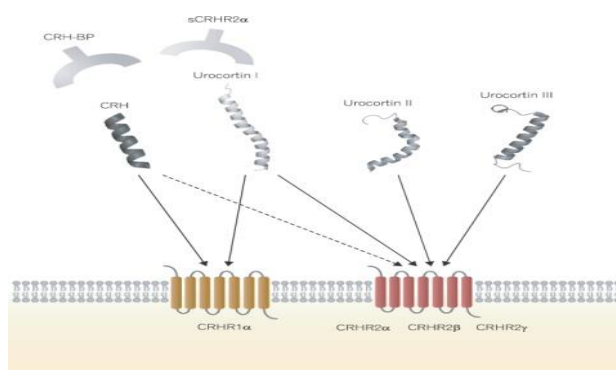
Η φυσιολογική βιολογική δράση της CRH διαμεσολαβείται από διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, τον υποδοχέα CRH-R1 και τον υποδοχέα CRH-R2, που ανήκουν στην οικογένεια του υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη (GPCR), και τυπικά είναι συνδεδεμένοι με την αδενυλική κυκλάση (Mastorakos G. et al., 2006). Η κατανομή των υποδοχέων τύπου CRH-R1 και CRH-R2 ποικίλει σημαντικά. Δομικά οι τύποι υποδοχέων CRH-R1 και CRH-R2 παρουσιάζουν 70% ομολογία ως προς τα αμινοξέα τους, ενώ αποκλίνουν κατά 45% ως προς τη N-τελική εξωκυττάρια τους περιοχή (Grammatopoulos D.K., 2012).

Ο *CRH-R1* ,είναι ο κύριος υπότυπος υποδοχέα της υπόφυσης, αποτελεί μία πρωτεΐνη 415 αμινοξέων και εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον εγκέφαλο, την αμυγδαλή και τον οσφρητικό λοβό, όπου μάλιστα το γονίδιο του CRH-R1 εκφράζει εννιά υπότυπους (a,b,c,d,e,f,g,h και v₁), που σχηματίζονται μέσω εναλλακτικής σύνδεσης των εξωνίων 3-6 και 10-13 (Mastorakos G. et al., 2006), ενώ εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στους περιφερικούς ιστούς, όπως τα επινεφρίδια, τους όρχεις και τις ωθήκες (Sean M. Smith et al., 2006). Στην πλειονότητα των θηλαστικών, η πλήρως δραστική πρωτεΐνη του υποδοχέα CRH-R1 προκύπτει από την μεταγραφή 13 εξωνίων που βρίσκονται στην αλληλουχία του γονιδίου του CRH-R1. (Mastorakos G. et al., 2006). Βρίσκεται συγκεντρωμένος στην πρόσθια υπόφυση των κορτικοτρόφων κυττάρων, εν αντιθέσει με την κατανομή του υποδοχέα CRH-R2 που είναι αρκετά διακριτή (Majzoub J. A., 2006). Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι ο CRH-R1 διαμεσολαβεί τις διεγερτικές δράσεις της CRH κατά την έκκριση της ACTH (Aguilera G., Nikodemova M., Wynn P.C. & Catt K. J., 2004) και δεσμεύει τόσο την CRH όσο και την Ουροκορτίνη με υψηλή συγγένεια (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006).

Το γονίδιο του *CRH-R2* εκφράζει στον άνθρωπο τρεις γνωστούς υπότυπους (α,β,γ), ενώ σε τρωκτικά δύο υποτύπους (α,β), που σχηματίζονται με χρήση εναλλακτικών 5'-εξωνίων. (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Ο CRH-R2 εντοπίζεται κυρίως στον πλευρικό πυρήνα διαφράγματος, σε πυρήνες του υποθαλάμου και το χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου (Mastorakos G et al., 2006). Έχουν εντοπιστεί συνολικά δύο παραλλαγές του υποδοχέα CRH-R2, που εμφανίζουν ανομοιόμορφη κατανομή στον εγκέφαλο (CRH-R2a) και την περιφέρεια (CRH-RR2b) σε τρωκτικά (M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Ο CRH-R2a εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στον εγκέφαλο και μάλιστα εμφανίζει μεγαλύτερη κατανομή από τον υποδοχέα CRH-R1, ενώ ο CRH-R2b εκφράζεται κυρίως στην περιφέρεια, με τα υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται στη καρδιά, τους σκελετικούς μύες και τον γαστρεντερικό σωλήνα (Majzoub J. A., 2006). Εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για την Ουροκορτίνη I (Sean M. Smith &

Wylie W. Vale, 2006). Η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών τύπων υποδοχέων υποδηλώνει ότι τα δύο διαφορετικά είδη επιτελούν ξεχωριστούς λειτουργικούς ρόλους. Ο υποδοχέας CRH-R1 συνδέεται και ενεργοποιείται, τόσο από την CRH όσο και από την Ουροκορτίνη I (UCN I), και μάλιστα διαμεσολαβεί τη δράση της CRH στα κορτικοτρόφα κύτταρα, καθώς επίσης και σε μερικές καταστάσεις απόκρισης στο στρες (π.χ. άγχος, φόβος). Ο υποδοχέας CRH-R2 δεσμεύει την Ουροκορτίνη I με 20 φορές μεγαλύτερη συγγένεια, εν συγκρίσει με την CRH. Πειραματικά αποτελέσματα έχουν αποδείξει ότι ο υποδοχέας CRH-R2 συμμετέχει στην αγγειοδιαστολή και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, ενώ αναφέρεται ότι είναι υπεύθυνος για την μείωση της όρεξης και την γαστρεντερική κινητικότητα (Majzoub, J. A., 2006). Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι οι Ουροκορτίνες I και II (UCN I,II) είναι εξαιρετικά επιλεκτικές για τον υποδοχέα CRH-R2, ενώ έχουν χαμηλή συγγένεια για τον CRH-R1 και ελαχιστοποιούν την παραγωγή της cAMP. Ακόμα, η Ουροκορτίνη III (UCN III) έχει αποδειχθεί ότι είναι επιλεκτική για τον υποδοχέα CRH-R2 (Venihaki et al., 2004).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ακόμα ένα είδος υποδοχέα CRH, ο *CRH-R3*, στον εγκέφαλο και την υπόφυση του γατόψαρου (*Ameiurus nebulosus*), ο οποίος εμφανίζει υψηλή ομολογία με τον CRH-R1, αλλά προς το παρόν δεν έχει ανευρεθεί σε άλλα είδη (Arai M., 2001).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων CRH-R1 και CRH-R2 (Im E., 2014)

A₅. Συγγενή πεπτιδία προς την CRH (CRH related peptides)

Τα ασπόνδυλα διαθέτουν δύο συγγενή πεπτιδία της CRH, που αναφέρονται ως διουρητικές ορμόνες και είναι δομικά ομόλογες της CRH, ενώ στα θηλαστικά, η οικογένεια της CRH αποτελείται από τέσσερα παράλογα πεπτιδία, την CRH και τις Ουροκορτίνες I, II και III (UCN I, II, III). Επιπροσθέτως, τα ψάρια και τα αμφίβια διαθέτουν την CRH, όμως επίσης έχουν ένα

ακόμα συγγενές πεπτίδιο, την Ουροτενσίνη I για τα ψάρια και την Σωβαζίνη για τα αμφίβια. Ο ρόλος της CRH ποικίλει, για παράδειγμα στα ασπόνδυλα η CRH φαίνεται ότι συμβάλλει στη διατήρηση και την σίτιση, ενώ στα σπονδυλωτά συμμετέχει στην ρύθμιση του HPA άξονα (Majzoub J. A., 2006).

Ουροτενσίνη I και Σωβαζίνη

Η λειτουργία τόσο της Ουροτενσίνης I, όσο και της Σωβαζίνης δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Το 1995 ανακαλύφθηκε η Ουροτενσίνη I, ένα προπεπτίδιο 122 αμινοξέων, που μέσω διάσπασης μετατρέπεται σε ώριμο πεπτίδιο 41 αμινοξέων. Απομονώθηκε από ένα είδος ψαριού (*Catostomus commersoni*) και είναι δομικά συγγενής με την Σωβαζίνη, επομένως τα δύο πεπτίδια επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες (Pallai P. V. et al., 1983). Η Ουροτενσίνη I έχει εντοπιστεί στον υποθάλαμο και την υπόφυση, στις εμβρυακές μεμβράνες, καθώς και στον ανθρώπινο πλακούντα. Η Σωβαζίνη αποτελεί ένα πεπτίδιο 40 αμινοξέων, που απομονώθηκε από ένα είδος βατράχου (*Phyllomedusa sauvagei*) και επιτελεί παρόμοιες δράσεις με την CRH, όπως για παράδειγμα την απελευθέρωση της ACTH και της β-ενδορφίνης, ενώ εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την CRH (Pallai P. V. et al., 1983).

Ουροκορτίνες

Ουροκορτίνη I (UCN I)

Η Ουροκορτίνη I ή αλλιώς Ουροκορτίνη (UCN I) αποτελεί μία πρωτεΐνη 40 αμινοξέων, που έχει ταυτοποιηθεί τόσο στον άνθρωπο όπως και σε ποντικούς και αρουραίους, και έχει μία εξαιρετικά διατηρημένη αλληλουχία (83-95%) (Wu V., Yuan P. et al., 2013). Εκφράζεται κυρίως στον πυρήνα Edinger-Westphal (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Η αλληλουχία αμινοξέων της Ουροκορτίνης I εμφανίζει 63% ομολογία ως προς την Ουροτενσίνη I και 45% ομολογία ως προς την CRH (Richards M. & Rademaker M., 2013). Το mRNA της Ουροκορτίνης I εκφράζεται σε ποικίλα σπλαχνικά όργανα όπως για παράδειγμα το στομάχι και το παχύ έντερο (Wu V., Yuan P. et al., 2013). Έχει παρατηρηθεί ότι συνθήκες οι οποίες αυξάνουν τη δραστηριότητα της CRH στον εγκέφαλο (π.χ. στρες), έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης της Ουροκορτίνης I στον πυρήνα Edinger-Westphal, αλλά επίσης ισχύει και το αντίστροφο (Fekete É. M. & Zorrilla E. P., 2007).

Ουροκορτίνη II (UCN II)

Η Ουροκορτίνη II (UCN II) κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων που αποτελεί επιλεκτικό συναγωνιστή του υποδοχέα CRH-R2, αλλά δεν εμφανίζει κάποια συγγένεια με τον υποδοχέα CRH-R1 (Majzoub J. A., 2006). Εκφράζεται κυρίως στον PVN του υποθαλάμου και τον υπομέλανα τόπο (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006) και εμφανίζει 37-40% ομολογία με την CRH (Richards M. & Rademaker M., 2013). Στα τρωκτικά μάλιστα εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον οισοφάγο, την καρδιά και το δέρμα (Wu V., et al., 2013).

Ουροκορτίνη III (UCN III)

Η Ουροκορτίνη III (UCN III) κωδικοποιεί ένα προπεπτίδιο 161 αμινοξέων με ένα ώριμο πεπτικό προϊόν 40 αμινοξέων, και μάλιστα χαρακτηρίζεται από επιλεκτική σύνδεση στον υποδοχέα CRH-R2 (Majzoub, J. A., 2006). Παρουσιάζει ευρύτερη κατανομή στον εγκέφαλο, ενώ εντοπίζεται στην περιοχή του υποθαλάμου, της BNST (Bed nucleus of the stria terminalis), του πλευρικού διαφράγματος (LS) και την αμυγδαλή (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Γενικότερα, η Ουροκορτίνη III εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με την CRH (Richards, M. & Rademaker M., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Ουροκορτίνες II και III συμμετέχουν στην καταστολή της όρεξης, το μειωμένο θερμαινόμενο οίδημα και την μειωμένη γαστρική κένωση (Majzoub, J. A., 2006).

Α₆. Άλλα νευροπεπτίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση του άξονα HPA

Ένας μεγάλος αριθμός νευροπεπτιδίων συμπεριλαμβανομένων της Βασοπρεσίνης (VP), της Αγγειοτενσίνης II (ANG II), της Οξυτοκίνης, της Αδενυλικής κυκλάσης της υπόφυσης, της Ορεξίνης και της Χολυκυστοκινίνης (CCK) εμπλέκονται στη ρύθμιση του HPA άξονα, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο είτε την έκκριση της CRH είτε της ACTH στο επίπεδο της υπόφυσης ή απευθείας στα επινεφρίδια (Aguilera G., 2011).

Το PACAP αποτελεί ένα νευροπεπτίδιο που εκκρίνεται στον εγκέφαλο σε καταστάσεις στρες και είναι πιθανό ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση του HPA άξονα σε καταστάσεις στρες, προκαλώντας διέγερση της έκφρασης της CRH. Σε συνδυασμό με την CRH, το PACAP λειτουργεί ως πιθανός μεσολαβητής της απόκρισης της cAMP στον υποφυσιοτροπικό νευρώνα της CRH, δηλαδή αποτελεί ένα είδος “αγγελιοφόρου” μηνύματος για την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της CRH (Aguilera G., 2011).

Επίσης, ένα ακόμα νευροπεπτίδιο που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του HPA άξονα είναι το *αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο (VIP)*. Στοιχεία έχουν αποδείξει ότι κατά την διάρκεια καταστάσεων στρες το νευροπεπτίδιο αυτό ελευθερώνεται στην υπόφυση όπου πιθανόν δρα προκαλώντας διέγερση (Aguilera G. ,2011).

Τα πεπτίδια *Ορεξίνης Α και Β*, που συχνά αναφέρονται και ως *Υποκρετίνες*, παράγονται από νευρώνες στον πλευρικό υποθάλαμο και έχουν αναγνωρισθεί για τις επιδράσεις τους στην διατροφική συμπεριφορά. Οι νευρώνες που παράγονται τα πεπτίδια αυτά έχουν εντοπισθεί σε ποικίλες θέσεις του εγκεφάλου συμπεριλαμβανομένου του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου και μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την δράση του HPA άξονα. Πειραματικά στοιχεία επιπλέον έχουν αποδείξει ότι η Ορεξίνη συμμετέχει στη διέγερση της έκκρισης της CRH, αν και δεν εξακριβωθεί ακόμα αν το αποτέλεσμα αυτό είναι άμεσο ή έμμεσο (Aguilera G., 2011).

Η *Γκρελίνη*, ένα γαστρεντερικό πεπτίδιο 28 αμινοξέων, εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην περιοχή του υποθαλάμου, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στην ενεργειακή ομοιόσταση αφού ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η Γκρελίνη συμμετέχει στην απελευθέρωση της ACTH τόσο στους ανθρώπους όσο και τα τρωκτικά, αλλά με μηχανισμό που διαφέρει μεταξύ των ειδών. Στους ανθρώπους παρατηρείται αύξηση της ACTH μετά από περιφερική έγχυση Γκρελίνης, ενώ η ένεση Γκρελίνης προκαλεί επίδραση μόνο σε αρουραίους, και μάλιστα στην περίπτωση αυτή έχει παρατηρηθεί ότι το πεπτίδιο δεν έχει καμία επίδραση σε καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης. Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται ότι η Γκρελίνη μπορεί να δράσει στο επίπεδο των κορτικοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης στον άνθρωπο, ενώ στα τρωκτικά ενεργεί μέσω κεντρικών μηχανισμών που πιθανόν εμπλέκονται στην διέγερση των νευρώνων CRH (Aguilera G., 2011).

Ένα ακόμη πεπτίδιο που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, η *Νεσφατίνη Ι*, βρίσκεται κυρίως στους νευρώνες του υποθαλάμου, καθώς επίσης και σε στελέχη του εγκεφάλου, όπου εντοπίζεται μαζί με την CRH, τις Οξυτοκίνες, την POMC, την νοραδρεναλίνη και τους νευρώνες σεροτονίνης. Η έκφραση της Νεσφατίνης Ι διεγείρεται σημαντικά σε καταστάσεις στρες, ενώ συμμετέχει στην αύξηση του ασβεστίου στους ανοσοδραστικούς νευρώνες της CRH, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση δράση του νευροπεπτιδίου αυτού στην ενεργοποίηση του άξονα HPA (Aguilera G., 2011).

A7. Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve growth factor-NGF)

Ο NGF αποτελεί ένα νευροπεπτίδιο, που ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1956, το οποίο συμμετέχει στην ρύθμιση της διαφοροποίησης και του φαινοτύπου των αισθητήριων και συμπαθητικών νευρώνων και την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος καθ' όλη την διάρκεια της ζωή ενός οργανισμού. Η παραγωγή του NGF στους περιφερικούς ιστούς ρυθμίζεται αυστηρά, καθώς οι μεταβολές στην συγκέντρωση του μπορεί να οδηγήσουν σε νευροπάθεια, υπεραλγησία και φλεγμονώδη πόνο. Σύμφωνα με μελέτες, η ύπαρξη φλεγμονής μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την σύνθεση του NGF στους ιστούς (Prencipe G. et al., 2014). Πειράματα που έχουν διεξαχθεί *in vitro* έχουν αποδείξει ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α) επάγουν την παραγωγή του NGF από μία ποικιλία κυττάρων όπως οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε ιστούς που υφίσταται φλεγμονή η συγκέντρωση του NGF φαίνεται ότι συσχετίζεται με την έκταση της φλεγμονής. Έχει μάλιστα θεωρηθεί ότι το νευροπεπτίδιο αυτό ασκεί προ-φλεγμονώδη δράση κατά την διάρκεια της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης. Αντιθέτως, τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η χορήγηση NGF έχει ως συνέπεια την μείωση της φλεγμονής σε ιστούς και μάλιστα ενισχύει την παραγωγή της IL-10. Προς το παρόν δεν έχει καταστεί σαφές για ποιο λόγο η παραγωγή του NGF αυξάνεται σε φλεγμονώδεις ιστούς ή με ποιο τρόπο μπορεί να επηρεάσει του κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων (Prencipe G. et al., 2014).

B. HPA άξονας, CRH και ανοσοφλεγμονώδης απόκριση

B₁. Ανοσοφλεγμονώδης απόκριση (Immune-inflammatory response)

Η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση είναι η διαδικασία απόκρισης του αγγειακού συνδετικού ιστού, που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση υγρών και λευκοκυττάρων σε εξωκυττάρους ιστούς. Πιστεύεται ότι λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός του οργανισμού, ώστε να απαλλαγεί από τυχόν κυτταρικές βλάβες (π.χ. τοξίνες, αντιγόνα) και τις συνέπειες του άγχους-στρες. Τα κυτταρικά συστατικά της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης είναι τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, τα πολυπυρηνικά ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Το σύνολο αυτών των κυττάρων συνεργάζονται χρησιμοποιώντας μοριακά σήματα συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών (ILs), των παραγόντων διέγερσης (CSDs), τις Ιντερφερόνες (IFNs), τον TNF, τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (TGF), τις Χημειοκίνες, τις αγγειοδραστικές αμίνες (ισταμίνη, σερετονίνη), τις πρωτεάσες πλάσματος (σύστημα κίνησης), τους μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος (προσταλαγδίνες, λευκοτριένια), τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), το Νιτρικό οξείδιο (NO) και τα νευροπεπτίδια. Το πρώτο βήμα της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης λοιπόν είναι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η μη ειδική απόκριση χρησιμεύει για τον εντοπισμό του ζημιογόνου παράγοντα, τον περιορισμό της βλάβης των ιστών και την εξάλειψη του, την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον προσδιορισμό της κυτταρικής και χυμικής απόκρισης. Επίσης αξίζει να γίνει αναφορά στην κατάσταση του φλεγμονώδους πόνου. Ο φλεγμονώδης πόνος λοιπόν χαρακτηρίζεται από αυξημένη απόκριση απέναντι σε μηχανικά και θερμικά ερεθίσματα. Μετά τον τραυματισμό του ιστού οι μεσολαβητές παρέχονται από την κυκλοφορία (π.χ. βραδυκίνη) και τα μακροφάγα των τοπικών ιστών. Στο εργαστήριο για την προσομοίωση του φλεγμονώδη πόνου σε μύες προκαλείται επαγωγή περιφερικής φλεγμονής μέσω ένεσης σε κάποιο σημείο του σώματος του ζώου, για παράδειγμα ένεση CFA (complete Freund's adjuvant), ένεση καραγενάσης κ.α. *{στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιελάμβανε ένεση CFA με σκοπό τον σχηματισμό φλεγμονής στο πόδι μύων δύο διαφορετικών γονότυπων}* (Rittner H. & Stein C., 2005). Η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση επηρεάζεται σημαντικά από τον εγκέφαλο, μέσω ρύθμισης της λειτουργίας του περιφερικού νευρικού συστήματος και της ενδοκρινολογικής απόκρισης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω ρύθμισης του HPA άξονα, αλλά και από έναν αριθμό ορμονών, νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων που

μεταφέρονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που τελικά οδηγούν σε διαμόρφωση της απόκρισης του οργανισμού μέσω νευροενδοκρινικών μεταβολών. Τα προϊόντα της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης (π.χ. κυτοκίνες) επηρεάζουν σημαντικά την λειτουργία του εγκεφάλου, ενώ τα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν έναν αριθμό ορμονών και νευροπεπτιδίων, την CRH και την ACTH, που δρουν τόσο στα πρώιμα όσο και τα τελικά στάδια της διαδικασίας (Markella Nezi et al., 2015). Η απόκριση του νευροενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος γίνεται μέσω ποικίλων παραγόντων όπως η CRH και η Ιντερλευκίνη 1 (IL-1), οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι εκδηλώνουν τόσο διεγερτική όσο και ανασταλτική δράση. Η IL-1 παράγεται από διεγερμένα μακροφάγα και μονοκύτταρα και λειτουργεί ως ένα προ-φλεγμονώδες μόριο, που είναι υπεύθυνο για την διέγερση της CRH και της ACTH, οδηγώντας τελικά σε αυξημένα επίπεδα αντιφλεγμονωδών γλυκοκορτικοειδών (Majzou J. A., 2006).

B₂. HPA άξονας και η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση

Τα τελευταία χρόνια έχουν συλλεχθεί αρκετά αποδεικτικά στοιχεία τα οποία συνηγορούν αλληλεπίδραση μεταξύ του HPA άξονα και του ανοσοποιητικού συστήματος για την απόκριση ενάντια σε ανοσολογικές προκλήσεις. Οι κυτοκίνες καθώς και μία άλλη μεγάλη ποικιλία διαμεσολαβητών συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της κεντρικής αντίδρασης του στρες.

Οι τρεις κύριες φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), η Ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) εκκρίνονται σε φλεγμονώδεις θέσεις, όπου πρώτα εμφανίζεται ο TNF-α και διαδοχικά ακολουθούν η IL-1 και η IL-6. Οι τρεις φλεγμονώδεις κυτοκίνες δρουν είτε άμεσα είτε έμμεσα ώστε να ενισχύσουν την σύνθεση και την έκκριση της CRH στο επίπεδο του υποθαλάμου (Κγρου Ι. & Τσιγος C., 2005). Η ενεργοποίηση του HPA άξονα έχει ανασταλτικά αποτελέσματα σε καταστάσεις φλεγμονής καθώς όλα τα συστατικά της ανοσοαπόκρισης αναστέλλονται από την κορτιζόλη.

B₃. Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες αποτελούν μία κατηγορία μικρών πρωτεϊνών που παράγονται σε φλεγμονώδεις ιστούς καθώς και σε λεμφοειδή όργανα, ασκώντας τόσο διεγερτικές όσο και κατασταλτικές δράσεις στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν

συνολικά τέσσερις κυτοκίνες με προ-αναλγητική δράση, μετά από υποδόρια έγχυση τους σε μη φλεγμονώδη ιστό, (όπως αυτή εξετάστηκε από τους Cunha και Ferreira το 2003), η IL-1 (IL-1 β), η IL-1 α , ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α) και η IL-6. Ωστόσο, τα αποτελέσματα τους δεν είναι άμεσα, αφού η IL-1 β και η IL-6 διεγείρουν σημαντικά την παραγωγή προσταγλαδινών, ενώ ο TNF- α ασκεί τις επιδράσεις του μέσω των προσταγλαδινών, όπως επίσης και μέσω των συμπαθομμητικών αμινών. Αξίζει επιπλέον να αναφερθεί ότι η IL-1 β είναι ικανή να διεγείρει την έκκριση του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) από τα ιστιοκύτταρα, καθώς επίσης ασκεί τις υπεραλγησιακές της δράσεις μέσω του Λευκοτριενίου B4 (LTB4). Επιπροσθέτως, οι κυτοκίνες (κυρίως η IL-1 β και ο TNF- α) μπορούν εμμέσως να προκαλέσουν υπεραλγησία σε θερμικά ερεθίσματα (Rittner H. & Stein C., 2005). Η παραγωγή των παραπάνω κυτοκινών από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί διέγερση παραγωγής της CRH στον υποθάλαμο, ασκώντας επιδράσεις όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)

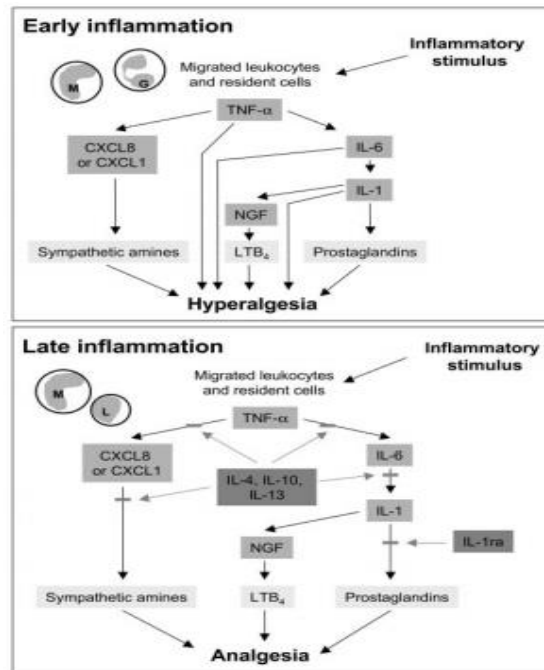
Μετά την πρώτη κλωνοποίηση του γονιδίου της IL-6, η κυτοκίνη αυτή συνδυάστηκε με μία αντιφατική συστοιχία λειτουργιών, όπως η προστασία από λοιμώξεις και η εμπλοκή της σε φλεγμονώδεις ασθένειες. Για χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι η IL-6 αποτελούσε το κομβικό σημείο για την ωρίμανση των B κυττάρων και αποτελούσε μέλος μια ομάδας κυτοκινών, συνολικά τριών μελών, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω συμπεριλαμβάνει την IL-1 (α & β) και τον TNF- α . Σύγχρονες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η δυσλειτουργία της σηματοδοτημένης IL-6 συμβάλλει σε καταστάσεις φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη (Naugle W. E. & Karin M., 2008). Η IL-6 λοιπόν αποτελεί μία πλειοτροπική κυτοκίνη που συμμετέχει στην ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων, τις αντιδράσεις οξείας φάσης και την αιμοποίηση (Naugle W. E. & Karin M., 2008). Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο υπερκείμενο υγρό των διεγερμένων από φυτοαιμαγλουτινίνη T κυττάρων. Η πρωτεΐνη προκάλεσε την τελική διαφοροποίηση των B κυττάρων σε κύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες και ονομάστηκε TRF (Naugler W. E. & Karin M., 2008). Η παραγωγή πραγματοποιείται από ποικίλα κύτταρα σε τοπικό επίπεδο ιστών, μετά την διέγερση τους, όπως συμβαίνει σε καταστάσεις λοίμωξης, τραύματος ή γενικότερα ανοσολογικής απόκρισης, με κύριο σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασης (Xing Z. et al., 1998). Επίσης, η IL-6 διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στον λιποσακαχαρίτη (LPS)-γαλακτοζαμινικού σηπτικού σοκ σε επίμυες, ενώ συμβάλλει στην

καταστολή της οξείας απόκρισης των ουδετερόφιλων. Η μείωση ή ακόμα και η αναστολή του TNF- α έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η IL-6 διαθέτει ανοσοφλεγμονώδεις ιδιότητες (Naugler W. E. & Karin M., 2008). Η IL-6 αποτελεί μία προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη, η οποία συμβάλλει στην διέγερση του HPA άξονα (Markella Nezi et al., 2015). Η IL-6 που παράγεται από τον PVN του υποθαλάμου διεγείρει την έκφραση του γονιδίου της CRH τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα. Επιπλέον, η IL-6 συνεκφράζεται με την CRH και την AVP σε νευρώνες του PVN του υποθαλάμου, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση τόσο της CRH, όσο και του PVN στον υποθάλαμο, ενώ παράλληλα αυξάνει την έκφραση και την έκκριση του γονιδίου της CRH στον PVN του υποθαλάμου. Επίσης, η IL-6 καθίσταται σημαντική για την διατήρηση της δραστηριότητας των γονιδίων της CRH και της AVP (Markella Nezi et al., 2015). Η παραγωγή της IL-6, όπως αναφέρθηκε έχει εντοπιστεί σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ωστόσο οι κύριες πηγές της κυτοκίνης αυτής είναι τα μονοκύτταρα και μακροφάγα σε θέσεις όπου έχει προκληθεί φλεγμονή, και τα T κύτταρα σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής. Σε κατάσταση ομοιόστασης τα επίπεδα της IL-6 βρίσκονται χαμηλά, ενώ σε καταστάσεις στρες τα επίπεδα αυτά αυξάνονται ταχύτατα στον ορό. Η παραγωγή της IL-6 στα μονοκύτταρα και σε άλλα κύτταρα εξαρτάται σημαντικά από διάφορους παράγοντες μεταγραφής, κυρίως το NF-KB και το AP-1. Τα ερεθίσματα που προκαλούν την ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων μεταγραφής είναι κατά κύριο λόγο ο TNF- α , η IL-1 καθώς και βακτηριακά προϊόντα, όπως για παράδειγμα ο λιποσακχαρίτης (LPS), και γενικότερα κάθε παράγοντας που προκαλεί φλεγμονή και οδηγεί τελικά στην διέγερση παραγωγής της IL-6. Αφού λοιπόν η IL-6 εκκρίνεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα ή μακροφάγα μπορεί να επιδράσει συστηματικά ή τοπικά σε άλλα είδη κυττάρων. Στην κλασική σηματοδότηση της IL-6, η κυτοκίνη δεσμεύει τον υποδοχέα της, IL-6Ra, στην κυτταρική επιφάνεια. Ο υποδοχέας IL-6Ra αποτελεί έναν μη σηματοδοτικό υποδοχέα που κανονικά εντοπίζεται μόνο στα ηπατοκύτταρα και ορισμένα λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, κύτταρα T και B). Στην συνέχεια ακολουθούν ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης, όπου για παράδειγμα συμμετέχουν κινάσες και ποικίλα άλλα μόρια, και τελικό αποτέλεσμα είναι η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση (Naugler W. E. & Karin M., 2008).

Παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), που συχνά αναφέρεται και ως TNF- α , αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1975, ως μία ενδοτοξίνη -επαγόμενη γλυκοπρωτεΐνη- που προκάλεσε αιμορραγική νέκρωση των σαρκωμάτων που είχαν μεταμοσχευτεί σε επίμυες. Η

κλωνοποίηση του ανθρώπινου TNF-α επιτεύχθηκε το 1985 (Bradley J., 2008). Ο TNF-α αποτελεί μία προφλεγμονώδη κυτοκίνη που εμπλέκεται στην έναρξη μιας αλληλουχίας κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, ως απόκριση σε κατάσταση φλεγμονής (Rittner H. L., 2005). Η κυτοκίνη αυτή παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα-μακροφάγα και Τ λεμφοκύτταρα των ιστών, ως μία πρωτεΐνη 16kD, τον προ-TNF, ο οποίος εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου έχει την δυνατότητα να διασπαστεί στον εξωκυττάριο χώρο από μεταλλοπρωτεΐνες, που τελικά οδηγούν στην απελευθέρωση του TNF-α, μία διαλυτή πρωτεΐνη 17kD (Bradley J., 2008). Το ένζυμο μετατροπής του TNF-α (TACE) μεσολαβεί στην απελευθέρωση του TNF-α απ' την κυτταρική επιφάνεια, αλλά συγχρόνως εμπλέκεται στην επεξεργασία αρκετών κυτταρικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να παράγει διαλυτές δομές που εξουδετερώνουν τις δράσεις του TNF-α. Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το TACE μπορεί να λειτουργήσει είτε ως προφλεγμονώδες, είτε ως αντιφλεγμονώδες σήμα, κάτι που εξαρτάται σημαντικά από τον τρόπο που επιδρά, δηλαδή αν δρα ως τελεστής (π.χ. μακροφάγα) ή αν ασκεί άμεση επίδραση στο κύτταρο στόχο (π.χ. ενδοθηλιακά κύτταρα) (Bradley J., 2008). Σε καταστάσεις φλεγμονής ή μόλυνσης ο TNF-α εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα (Bradley J., 2008). Η κυτοκίνη αυτή ασκεί τις δράσεις της μέσω δύο γνώριμων υποδοχέων, τον TNF-R1 και τον TNF-R2, που έχουν την ικανότητα να εκφράζονται σε κύτταρα φλεγμονής και την νωτιαία ρίζα των γαγγλίων (DRG). Έχει παρατηρηθεί ότι σε καταστάσεις φλεγμονής ή νευροπάθειας, οι δύο αυτοί υπότυποι υποδοχέων υφίστανται αύξηση της ρύθμισης τους (Rittner H. L., 2005). Η συμμετοχή του TNF-α στον φλεγμονώδη πόνο επιβεβαιώθηκε επίσης μέσω πειραμάτων που διεξήχθησαν με την χρήση TNF-R1 Knock out μυών. Μέσω πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η ένταση της υπεραλγησίας στους μύες αυτού του γονοτύπου, μετά από ενδυμυελική έγχυση καραγενάσης, ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ο TNF-α επιτυγχάνει την ενεργοποίηση μιας αλληλουχίας σταδίων που περιλαμβάνει την IL-6 και την IL-8. Εν συνεχεία ακολουθεί η ενεργοποίηση της IL-1 και του NGF και τελικά πραγματοποιείται η ενεργοποίηση των προσταγλαδινών και των συμπαθητικομιμητικών αμινών (Rittner H. L., 2005).



Εικόνα 3: Προ-και αντι-φλεγμονώδεις μηχανισμοί της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης.

{Στα πρώτα στάδια της φλεγμονής, ένας φλεγμονώδης παράγοντας διεγείρει την μεταφορά λευκοκυττάρων (π.χ. μονοκυττάρων) στον φλεγμονώδη ιστό. Στην περίπτωση αυτή τα λευκοκύτταρα και τα ήδη υπάρχοντα κύτταρα αποτελούν εκκινήτες ενός καταρράκτη σταδίων που περιλαμβάνει τις κυτοκίνες, τις Ιντερλευκίνες (ILs), τις χυμοκίνες (CXCL8), τον NGF και τις προσταγλαδίνες με τελικό αποτέλεσμα την υπεραλγησία. Ο TNF-α, η IL-6 και η IL-1 ασκούν επίσης άμεσες υπεραλγησιακές επιδράσεις. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα αρχίζουν να παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως είναι οι IL-4, IL-10, IL-13.}

(Rittner H. L., 2005)

B₄. CRH και ανοσοφλεγμονώδης απόκριση

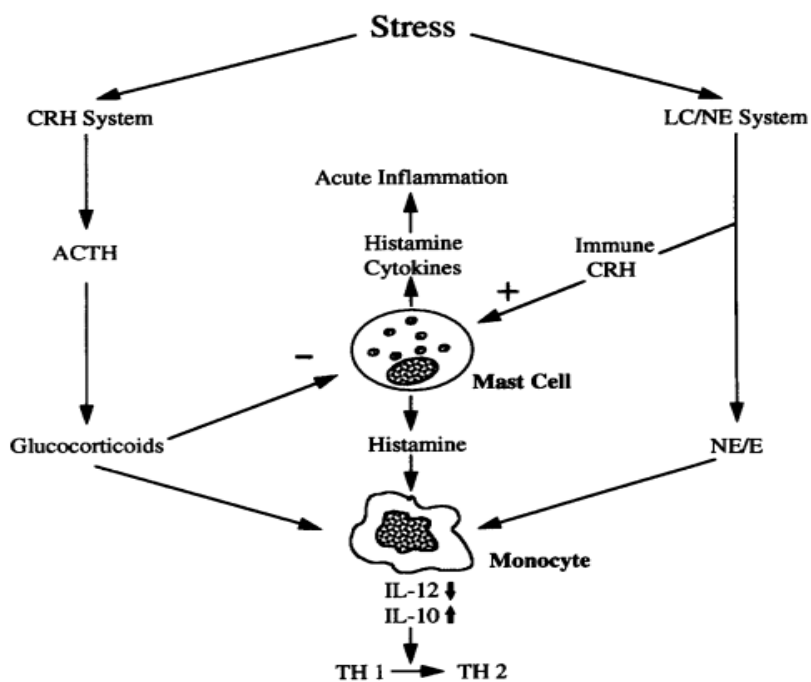
Η CRH διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της νευρωνικής και ορμονικής σηματοδότησης στα σπονδυλωτά ως αντίδραση τους σε καταστάσεις στρες (Markella Nezi et al., 2015). Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε αρουραίους έχει αποδειχθεί η παρουσία της CRH σε φλεγμονώδεις ιστούς, αλλά όχι στην συστηματική κυκλοφορία (Markella Nezi et al., 2015). Θεωρείται ότι η CRH ασκεί τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Έμμεσα η CRH είναι ικανή να καταστείλει την φλεγμονή μέσω απελευθέρωσης γλυκοκορτικοειδών, ενώ άμεση προ-φλεγμονώδης δράση της CRH μπορεί να εμφανιστεί σε περιφερικούς ιστούς. Βέβαια δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα η άμεση δράση της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση, αλλά εικάζεται ότι περιλαμβάνει αποκοκκίωση ιστοκυττάρων, αγγειοδιαστολή εξαρτώμενη από νιτρικό οξείδιο, πολλαπλασιασμό λευκοκυττάρων και απελευθέρωση κυτοκινών από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα

(Majzoub J A., 2006). Η CRH που παράγεται σε περιφερικές φλεγμονώδεις θέσεις, σε αντίθεση με τις έμμεσες ανοσοκατασταλτικές δράσεις, λειτουργεί ως αυτοκρινής ή παρακρινής φλεγμονώδης κυτοκίνη (Markella Nezi et al., 2015). Γενικότερα είναι σημαντικό να αναφερθεί η δράση της CRH στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε πειράματα, που έχουν διεξαχθεί *in vitro*, έχει αποδειχθεί ότι η CRH διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Β και Τ λεμφοκυττάρων, την έκφραση των υποδοχέων της IL-2, καθώς επίσης ενισχύει την έκκριση της IL-6. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η CRH αναστέλλει την έκκριση της Ιντερφερόνης-γ (IFN-γ). Σε πειράματα που έχουν λάβει χώρα *in vivo*, έχει διαπιστωθεί ότι η CRH ασκεί προ-φλεγμονώδη δράση, δεδομένου ότι η χορήγηση αντιορού CRH μπορεί να μειώσει σημαντικά την οξεία φλεγμονή *in vivo*, σε διάφορα μοντέλα φλεγμονής (Karalis K., et al., 1997).

Β5. Έμμεση δράση της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση

Η CRH επιτυγχάνει την ρύθμιση της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης μέσω υποδοχέων που διαμεσολαβούν στις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς του ανοσολογικού συστήματος και τα κύτταρα. Τα γλυκοκορτικοειδή (GC) συμβάλλουν στην πρόληψη της μεταφοράς των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία σε εξωαγγειακούς χώρους, μειώνουν την συγκέντρωση των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων σε ιστούς που έχουν υποστεί φλεγμονή και επίσης καταστέλλουν την παραγωγή ή ακόμα και την δράση κυτοκινών και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Markella Nezi et al., 2015). Οι φυσιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από μία πρωτεΐνη 94kD του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος κατανέμεται ευρέως σε ολόκληρο τον εγκέφαλο και τους περιφερικούς ιστούς (Sean M. Smith & Wylie W. Vale, 2006). Οι ενδοκυττάριοι νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου είναι επίσης γνωστό ότι εκφράζουν υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, που έχουν ως συνέπεια την ρύθμιση της μεταγραφής και της έκφρασης του γονιδίου της CRH στον πυρήνα (Markella Nezi et al., 2015). Η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος ρυθμίζεται από ποικίλα είδη κυττάρων (π.χ. μονοκύτταρα-μακροφάγα) και από μία ομάδα βοηθητικών Τ λευκοκυττάρων (T Helper-TH), TH1 και TH2. Από την μία πλευρά τα TH1 κύτταρα συμβάλλουν εκκρίνοντας IFN-γ, IL-2 και τον TNF-α, τα οποία με την σειρά τους ενεργοποιούν κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, τα οποία συνολικά συμμετέχουν στην κυτταρική ανοσία. Από την άλλη πλευρά τα TH2 κύτταρα εκκρίνουν τις IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13, οι οποίες ενεργοποιούν τα Β λεμφοκύτταρα, τα ηωσινοφιλα και τα

ιστιοκύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στην χυμική ανοσία. Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι το στρες και οι ορμόνες του στρες επηρεάζουν σημαντικά την εξέλιξη, την πορεία και την παθολογία της φλεγμονής, κατά κύριο λόγο διεγείροντας τα κύτταρα TH2, εν αντιθέσει με τα κύτταρα TH1, που ενισχύουν την χυμική ανοσία, ενώ καταστέλλουν την κυτταρική ανοσία. Έχει αποδειχθεί ότι οι ορμόνες του στρες ενισχύουν επιλεκτικά την ανοσοαπόκριση των TH2 κυττάρων, καταστέλλοντας την απόκριση των TH1 κυττάρων, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω αλλαγή των ρυθμιστικών κυτοκινών (Eleknov I. J et al., 1999; Markella Nezi et al., 2015).



Εικόνα 4: Έμμεση επίδραση της CRH στην ανοσοαπόκριση τύπου TH1 και TH2
(Eleknov I. J., Webster E. L., Torpy D. J. & Chrousos G. P., 1999)

Γ. *Crh* *-/-* μύες

Η δυνατότητα παραγωγής και χρήσης μυών, που χαρακτηρίζονται από γενετικές μεταλλάξεις ή πλήρεις διαγραφές συγκεκριμένων γονιδίων, αποτέλεσε σπουδαίο εργαλείο για την μελέτη του ρόλου, καθώς και τη λειτουργία ποικίλων γονιδίων *in vivo*, όπως επίσης και του τρόπου σύνδεσης τους με ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Μάλιστα, η δυνατότητα παραγωγής μυών με ανεπάρκεια στην CRH (*Crh* *-/-*) έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τον ενδογενή ρόλο της CRH τόσο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και την απόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής (Karalis et al., 1997; Venihaki and Majzoub, 2002).

Οι *Crh* *-/-* μύες λοιπόν δημιουργήθηκαν μέσω στοχευμένης απαλειφής γονιδίων σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ES). Ένεση των κυττάρων αυτών σε βλαστοκύτταρα αγρίου τύπου είχε ως συνέπεια τον σχηματισμό μορίων, ικανών να μεταβιβάσουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονίδιο τους στους απογόνους, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην δημιουργία ετεροζυγωτών που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια στην CRH. Η ανεπάρκεια της CRH επιβεβαιώθηκε μέσω της μεθόδου RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), χρησιμοποιώντας primers κατάλληλους για το CRH mRNA. Για την γέννηση *Crh* *-/-* μυών πραγματοποιήθηκαν ζευγαρώματα μεταξύ ετερόζυγων, σύμφωνα με το Μενδελικό μοντέλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ζευγάρι ομόζυγων *Crh* *-/-*, μυών είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο τους, την πρώτη κιάλας μέρας της ζωής τους ως αποτέλεσμα αναπνευστικής ανεπάρκειας και μη φυσιολογικής ανάπτυξης των πνευμόνων. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε μέσω χορήγησης πόσιμου νερού με κορτικοστερόνη στις έγκυες μητέρες. Ιστολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα έμβρυα *Crh* *-/-*, χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή ανάπτυξη των πνευμόνων, κάτι που υποστηρίζει ότι η συνδυασμένη ανεπάρκεια γλυκοκορτικοειδών και CRH σε μητέρες και έμβρυα έχει ως αποτέλεσμα καθυστέρηση στην ανάπτυξη των πνευμόνων (Venihaki M. & Majzoub J., 2002). Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ο HPA άξονας αποτελεί το κύριο ενδοκρινικό σύστημα που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της νεογνικής ζωής, και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση. Επιπλέον, καθώς η CRH είναι ο κύριος ρυθμιστής του HPA άξονα, η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (π.χ. απομόνωση, νηστεία, αιμορραγία, υπογλυκαιμία) όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα. Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε μύες *Crh* *-/-*, συνέβαλαν στην κατανόηση του ρόλου της CRH και

των γλυκοκορτικοειδών (GC) στην φυσιολογία, καθώς και συμμετοχή τους στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση. Τα έμβρυα *Crh* *-/-* χαρακτηρίζονται από φυσιολογική δομή των βλεννογόνων και έκφραση του POMC mRNA, ενώ συγχρόνως είναι γόνιμα, και έχουν φυσιολογική μακροβιότητα, παρά τα χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών που τα χαρακτηρίζουν. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι το μέγεθος των επινεφριδίων, η έκφραση του StAR (ένζυμο βιοσύνθεσης γλυκοκορτικοειδών) mRNA και τα επίπεδα κορτικοστερόνης στο αίμα παρατηρήθηκαν ότι είναι πολύ χαμηλότερα σε *Crh* *-/-* μύες, εν συγκρίσει με τους *Crh* *+/+*. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η εμβρυϊκή CRH δεν θεωρείται απαραίτητη για ανάπτυξη των κορτικοτρόφων και την έναρξη της έκφρασης του POMC mRNA. Όμως, η CRH θεωρήθηκε ότι είναι αναγκαία για την φυσιολογική ανάπτυξη και την λειτουργία των επινεφριδίων. Η απουσία της εμβρυϊκής CRH προκάλεσε ελλιπή ανάπτυξη των επινεφριδίων, καταστολή της έκκρισης κορτικοστερόνης και μειωμένη ανάπτυξη των πνευμόνων (Venihaki M. & Majzoub J., 2002). Η φυσιολογική λειτουργία του άξονα HPA σε ενήλικους ανθρώπους και τρωκτικά ρυθμίζεται από μία μεγάλη ποικιλία νευροπεπτιδίων, με κυρίαρχα την CRH και την Βασοπρεσσίνη (VP). Ενώ οι *Crh* *-/-* μύες χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών (GC) και υψηλό mRNA βασοπρεσσίνης στον υποθάλαμο, ταυτόχρονα διαθέτουν φυσιολογική έκφραση του POMC mRNA και κανονικές συγκεντρώσεις ACTH. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι *Crh* *-/-* μύες εμφανίζουν χαμηλότερη ανοσοφλεγμονώδη απόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής-στρες (Venihaki M. & Majzoub J., 2002).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της ανεπάρκειας της CRH στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα που συγκρίνουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού *Crh* *+/+* και *Crh* *-/-* σπληνοκυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες ή έπειτα από διέγερση με LPS (Venihaki, M., Zhao, J., & Karalis, K. P., 2003). Τα πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν ότι η ενδογενής CRH είναι αναγκαία για τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων *in vitro*, αφού η CRH κατόρθωσε να διεγείρει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων, ενώ συγχρόνως παρατηρήθηκε ότι ο πολλαπλασιασμός των σπληνοκυττάρων με ανεπάρκεια CRH (*Crh* *-/-*) μειωνόταν σημαντικά, εν αντιθέσει με τον σταθερό πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων *Crh* *+/+*.

Σκοπός μελέτης

Η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση είναι η διαδικασία απόκρισης του αγγειακού συνδετικού ιστού, που λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός του οργανισμού, ώστε να απαλλαγεί από τυχόν κυτταρικές βλάβες και τις συνέπειες του στρες. Τα κυτταρικά συστατικά της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης ποικίλουν και περιλαμβάνουν τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, καθώς επίσης τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του υποθαλαμικού υποφυσιακού επινεφριδιακού (HPA) άξονα, ο οποίος μεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, που στο τελικό στάδιο της ενεργοποίησης του περιλαμβάνει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών. Μεταξύ των μορίων που έχουν προταθεί ότι λαμβάνουν μέρος στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση είναι οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), αλλά και ποικίλα νευροπεπτίδια, όπως ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF), τα οποία ενισχύουν την σύνθεση και την έκκριση της CRH στο επίπεδο του υποθαλάμου του εγκεφάλου. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται φανερό ότι η ενεργοποίηση του HPA άξονα έχει ανασταλτικά αποτελέσματα σε καταστάσεις φλεγμονής καθώς όλα τα συστατικά της ανοσοαπόκρισης αναστέλλονται από την κορτιζόλη.

Το μοντέλο των μυών στους οποίους έχει αφαιρεθεί γενετικά το γονίδιο της CRH, *Crh* ^{-/-}, έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την επίδραση της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση. Σύμφωνα με μελέτες οι *Crh* ^{-/-} μύες χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών (GC), διαθέτουν φυσιολογική έκφραση του POMC mRNA και εμφανίζουν χαμηλότερη ανοσοφλεγμονώδη απόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής. Επιπλέον, πειράματα έχουν αποδείξει ότι η CRH διεγείρει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης έχει προσδιοριστεί ότι ο πολλαπλασιασμός των σπληνοκυττάρων μυών με ανεπάρκεια CRH (*Crh* ^{-/-}) μειωνόταν σημαντικά, εν αντιθέσει με τον σταθερό πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων μυών που ήταν φυσιολογικοί ως προς την CRH, *Crh* ^{+/+}.

Βασιζόμενοι λοιπόν στα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της επίδρασης της CRH στην ανοσοφλεγμονώδη απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων. Πιο ειδικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών γονοτύπων μυών (*Crh* ^{+/+}, *Crh* ^{-/-}) ώστε να εντοπιστούν διαφορές στην απόκριση τους μετά την επαγωγή φλεγμονής ως προς την έκφραση παραγόντων που λαμβάνουν μέρος σε αυτήν, αλλά επίσης και να διασαφηνιστεί η επίδραση της CRH στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων των δύο γονοτύπων.

Υλικά και μέθοδοι

Βιολογικά υλικά

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

- i. Μύες κανονικού τύπου ως προς την CRH, *Crh +/+* (Wild type)
- ii. Μύες με ανεπάρκεια της CRH, *Crh -/-* (CRH Knock out)

Οι μύες στεγάστηκαν σε δωμάτιο με κύκλο φωτός/σκότους 12/12h. Όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είχαν εγκριθεί από την Επιτροπή Ζωικών Πειραματικών Πρωτοκόλλων του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς επίσης και από το Αρμόδιο τμήμα της Κτηνιατρικής υπηρεσίας της Περιφέρειας Κρήτης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στους μύες με ανεπάρκεια στην CRH, χορηγούταν στο πόσιμο νερό κορτικοστερόνη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας.

Θρεπτικό υλικό

Υλικά

- RPMI 1640, Biosera
- Fatal Bovine Serum Gibco (FBS)
- Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)
- Υδατόλουτρο (με απιονισμένο νερό) ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Sodium Pyruvate 100mM
- Αποστειρωμένες πιπέτες 5ml και 25ml

Μέθοδος

Αρχικά, τοποθετήθηκε ο απενεργοποιημένος ορός (FBS 10%) σε υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσει. Στην συνέχεια, από το μπουκάλι του θρεπτικού αφαιρέθηκαν με αποστειρωμένη πιπέτα 55mL, και αντικαταστάθηκαν από 50mL απενεργοποιημένου ορού (FBS 10%), καθώς και 5mL αντιβιοτικού (Pen-Strep 1%). Επίσης προστέθηκαν 5mL Sodium Pyruvate, το οποίο εν συνεχεία λειτούργησε ως πηγή ενέργειας για τα κύτταρα. Φυλάσσεται στους 4°C.

Απομόνωση σπληνών – Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων

Υλικά

- CFA (Complete Freund's Adjuvant)
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος ελεύθερου μαγνησίου και ασβεστίου: Dulbecco PBS, D-PBS (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- Θρεπτικό υλικό RPMI με ορό
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer I)
- Concanavalin A (conA)
- Ιντερλευκίνη 2 (IL-2)
- Δοχεία 75cm² και 175cm² (flasks)
- Τρυβλία καλλιέργειών κυττάρων (petri dishes)
- Στείρα εργαλεία (λαβίδες, ψαλίδια, σύριγγες, βελόνες, πιπέτες, σωλήνες falcon, αντικειμενοφόρες πλάκες με αδρή επιφάνεια) διαφόρων μεγεθών
- Φίλτρα μεγέθους οπών 0,45μm
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow hood)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo (Thermo Fisher Scientific Inc., ΗΠΑ)
Συνθήκες: 37°C και 5% CO₂
- Φυγόκεντρος
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός
- Υδατόλουτρο (με απιονισμένο νερό) ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- Πάγος

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer I)

Σε αποστειρωμένο ποτήρι ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,8g NH₄Cl, 0.084g NaHCO₃, 0.037g EDTA, τα οποία εν συνεχεία διαλύθηκαν σε 100mL απιονισμένο νερό. Έπειτα, το περιεχόμενο του ποτηριού διήλθε μέσα από φίλτρο μεγέθους οπών 0,45μm και τοποθετήθηκε σε σωλήνες falcon των 50mL. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο για περίπου ένα μήνα.

Concanavalin A (conA) 5mg/mL

Η Concanavalin A αποτελεί μία λεκτίνη, προερχόμενη από την εκχύλιση του φασολιού *Canavalia ensiformis* (Jack bean), η οποία κατορθώνει να συνδέεται ειδικά σε δομές που απαντώνται σε διάφορα σάκχαρα, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Σε καλλιέργειες κυττάρων έχει την ικανότητα να επάγει την μιτογονική δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων, καθώς και να αυξάνει την σύνθεση κυτταρικών προϊόντων. Επίσης, χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες ανοσολογικής ρύθμισης από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Φυλάσσεται στους -20°C . Το stock διάλυμα της Concanavalin A είχε αρχική συγκέντρωση 5mg/mL, και με κατάλληλους υπολογισμούς προσδιορίστηκε ότι σε 10mL θρεπτικού υλικού RPMI με ορό θα έπρεπε να προστεθούν συνολικά 8μL.

Ιντερλευκίνη 2 (IL-2) 10μg/mL

Η Ιντερλευκίνη 2 (IL-2) αποτελεί μία κυτοκίνη, δηλαδή μια πρωτεΐνη με 133 αμινοξέα, που έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε έναν ειδικό τριμερή υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων και λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας τους. Φυλάσσεται στους -80°C . Το stock διάλυμα της Ιντερλευκίνης 2 είχε αρχική συγκέντρωση 10μg/mL, και με κατάλληλους υπολογισμούς προσδιορίστηκε ότι σε 50mL θρεπτικού υλικού RPMI με ορό θα έπρεπε να προστεθούν συνολικά 2,5μL.

Μέθοδος

Όλα τα στάδια έλαβαν χώρα σε στείρες συνθήκες, χρησιμοποιώντας θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπως επίσης και αποστειρωμένα σκεύη και συσκευές.

Ημέρα 1^η

Αρχικά, στο πόδι ενός μύος Wild Type (*Crh* +/+, WT) και ενός Knock Out (*Crh* -/-, KO) έγινε ένεση CFA 20μL και αναμέναμε 6 ώρες, αφήνοντας τα σε ήσυχο και σκοτεινό μέρος, ώστε να προκληθεί φλεγμονή. Μετά το πέρας των 6 ωρών και αφού βεβαιωθήκαμε ότι το πόδι κάθε μύος είχε επαρκές οίδημα ακολούθησε θανάτωση τους με αποδιάταξη της σπονδυλικής στήλης. Με την βοήθεια στείρων ψαλιδιών και λαβίδων απομονώθηκαν αρχικά οι σπλήνες των δύο μυών και τοποθετήθηκαν στον πυθμένα στείρων τρυβλίων όπου

προστέθηκαν 15mL D-PBS και με την αδρή επιφάνεια αντιμενοφόρων πλακών επιτεύχθηκε το λιώσιμο τους. Μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε σωλήνες falcon 50mL και ταυτόχρονα προστέθηκαν 3mL από το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer I), που συνέβαλλε στην λύση των ερυθροκυττάρων και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση τους στις 1800rpm για 25 λεπτά, με σκοπό να απομακρυνθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Μετά το πέρας των 25 λεπτών το υπερκείμενο αποχύθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν ξανά 15mL D-PBS και 3mL ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer I) και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα, το υπερκείμενο αποχύθηκε ξανά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10mL θρεπτικό RPMI με ορό. Οι σωλήνες falcon φυγοκεντρήθηκαν στις 1200rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο αποχύθηκε. Κάθε ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20mL θρεπτικό RPMI με ορό. Αφού επιτεύχθηκε πλήρης ομογενοποίηση, το περιεχόμενο κάθε σωλήνα falcon διαχωρίστηκε σε δυο νέα στείρα τρυβλία (κάθε γονότυπος ήταν σε 2 διαφορετικά τρυβλία) όπου στο κάθε ένα προστέθηκαν 8μL concanavalin A (conA). Τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και τοποθετήθηκαν για επώαση στον επωαστικό κλίβανο για ένα βράδυ (overnight).



Εικόνα 4: Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών

(<https://www.coleparmer.com/i/sterile-petri-dishes-60-mm-dia-x-15-mm-h-500-box/0613901>)

Ημέρα 2^η

Την επόμενη ημέρα, παρατηρήθηκαν τα τρυβλία των κυτταροκαλλιιεργειών στο μικροσκόπιο, και σε κάθε ένα προστέθηκαν 2,5μL Ιντερλευκίνη 2 (IL-2 0.5mg/mL). Προετοιμάστηκαν τέσσερα αποστειρωμένα δοχεία των 75cm² προσθέτοντας σε κάθε ένα 40mL θρεπτικό RPMI με ορό και 10mL κύτταρων από κάθε τρυβλίο. Τα δοχεία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και τοποθετήθηκαν για επώαση στον επωαστικό κλίβανο.



Εικόνα 5: Δοχεία καλλιέργειών κυττάρων
(<https://www.coleparmer.com/i/mn/0192842>)

Επόμενες ημέρες

Τις επόμενες ημέρες κύρια ασχολία αποτελούσε η προσθήκη θρεπτικού στα δοχεία όποτε αυτό κρινόταν αναγκαίο. Όμως, το θρεπτικό που προστίθεται περιείχε επιπλέον και Ιντερλευκίνη 2 (σε σωλήνες falcon 50ml προστέθηκαν 2,5μL IL-2 και 50mL θρεπτικό υλικό RPMI με ορό). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο από τα δοχεία των 75cm² μεταφέρθηκε σε νέα αποστειρωμένα δοχεία των 175cm². Η επώαση των κυττάρων διήρκησε περίπου μία εβδομάδα, δηλαδή μέχρι να κριθεί ο πληθυσμός των κυττάρων ικανοποιητικός.

Μέτρηση κυττάρων

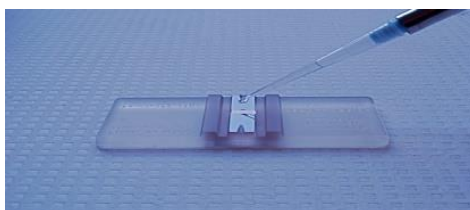
Υλικά

- Χρωστική Trypan Blue
- Στείρα εργαλεία (πιπέτες, σωλήνες falcon) διαφόρων μεγεθών
- Αιματοκυτταρομέτρο Neubauer
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow hood)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo (Thermo Fisher Scientific Inc., ΗΠΑ)
Συνθήκες: 37°C και 5% CO₂
- Φυγόκεντρος

Μέθοδος

Προτού ξεκινήσει η ανάλυση της πειραματικής διαδικασίας είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όλα τα στάδια έλαβαν χώρα σε στείρες συνθήκες, χρησιμοποιώντας θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπως επίσης και αποστειρωμένα σκεύη και συσκευές.

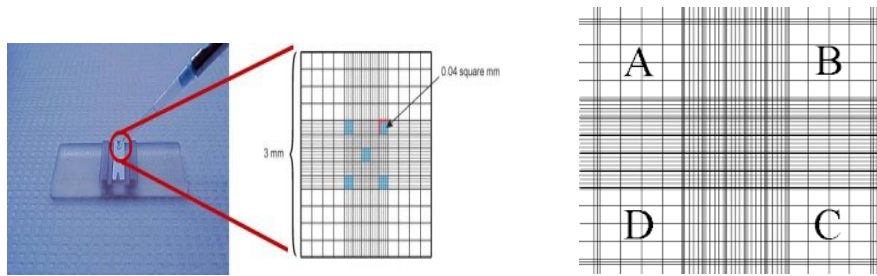
Αφού εξασφαλίστηκε ότι τα κύτταρα είχαν πολλαπλασιαστεί επαρκώς και ήταν απαλλαγμένα από τυχόν μολύνσεις τότε το περιεχόμενο κάθε δοχείου κυττάρων μεταφέρθηκε σε στείρους σωλήνες falcon 50mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 1800rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο αποχύθηκε και κάθε ίζημα κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 10ml θρεπτικό υλικό RPMI με ορό. Σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5mL προστέθηκαν 90μL χρωστική trypan blue και 10μL εναιωρήματος κυττάρων και με την βοήθεια πιπέτας Gilson 200μL μεταφέρθηκαν σε αιματοκυτταρομέτρο Neubauer. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η διαδικασία έγινε γρήγορα διότι τα κύτταρα δεν επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην χρωστική, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά ο πληθυσμός τους και να υπάρχει κίνδυνος εσφαλμένης μέτρησης.



Εικόνα 6: Αιματοκυτταρομέτρο Neubauer

(<https://agristudentbikash.wordpress.com/2015/06/18/counting-fungal-spores-using-a-hemocytometer/>)

Αφού επιτεύχθηκε η μεταφορά των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο μετρήθηκε το σύνολο των κυττάρων που βρίσκονται στις 4 περιοχές γύρω από τον σταυρό (αριθμημένες με A-B, όπως παρουσιάζεται παρακάτω) και καταγράφονται.



Εικόνα 7 : Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

(<https://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/Haemocytometer.htm> / https://www.researchgate.net/figure/263277102_fig3_Haemocytometer-showing-the-counting-area-blue-for-sperm-count-and-motility)

Ο αριθμός των κυττάρων που προέκυψε ύστερα από την μέτρηση τους πολλαπλασιάστηκε με 10^5 . Ανάλογα με την μέθοδο που πρόκειται να ακολουθήσει χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος σωλήνας που περιείχε την επιθυμητή ποσότητα κυττάρων.

Στρώσιμο κυττάρων για απομόνωση RNA (RNA extraction) , ELISA και Bradford

Υλικά

- Αποστειρωμένα τρυβλία καλλιέργειών 24 οπών
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow hood)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo (Thermo Fisher Scientific Inc., ΗΠΑ)
Συνθήκες: 37°C και 5% CO₂

Μέθοδος

Γνωρίζουμε ότι κάθε οπή (well) στα πιάτα καλλιέργειας για την μέθοδο αυτή χωράει συνολικά 1000μL, δηλαδή 1.000.000 κύτταρα. Επομένως, ανάλογα με την ποσότητα των οπών (wells) που επιθυμούμε να στρώσουμε κάθε φορά πρέπει να γίνονται και οι αντίστοιχοι υπολογισμοί. Αφού έχει προηγηθεί η μέθοδος «Μέτρηση κυττάρων» επιλέγουμε το σωλήνα falcon που διαθέτει την επιθυμητή ποσότητα κυττάρων, και τον αριθμό αυτόν τον πολλαπλασιάζουμε με 10, όση δηλαδή ήταν και η ποσότητα του θρεπτικού υλικού RPMI με ορό στο οποίο διαλύθηκε το αρχικό μας ίζημα. Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας των κυττάρων που θέλουμε να στρώσουμε (δηλαδή τον

αριθμό των οπών συνολικά για κάθε γονότυπο) κάνοντας τις κατάλληλες αναγωγές. Αφού προκύψει η ποσότητα, αφαιρείται από το σωλήνα falcon φυγοκεντρείται στις 1800rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται στην υπόλοιπη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI χωρίς ορό που απαιτείται. Ακολουθεί στρώσιμο στα πιάτα, και αφήνονται να επωαστούν σε επωαστικό κλίβανο για μία ημέρα (overnight).

Στρώσιμο κυττάρων για διαδικασία μέτρησης ρυθμού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Υλικά

- Διάλυμα MTT (5-dimethyl tetrazolium bromide) 5mg/ml
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος ελεύθερου μαγνησίου και ασβεστίου: Dulbecco PBS, D-PBS (Gibco-BRL Co, MD, ΗΠΑ)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Αποστειρωμένα τρυβλία καλλιέργειών 96 οπών
- Φωτόμετρο ELISA
- Shaker ανάδευσης
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow hood)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo (Thermo Fisher Scientific Inc., ΗΠΑ)
Συνθήκες: 37°C και 5% CO₂

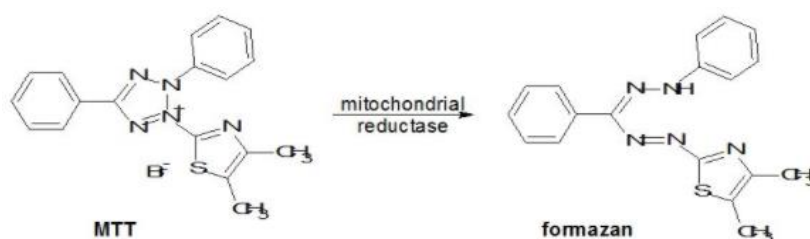
Διαλύματα

Διάλυμα MTT

Το MTT διαλύθηκε σε PBS σε συγκέντρωση 5mg/mL και στη συνέχεια διηθήθηκε πριν τη χρήση, προκειμένου να αποστειρωθεί και να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα σωματίδια. Επειδή είναι φωτοευαίσθητο, αποθηκεύτηκε σε σκοτεινή φιάλη στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Το MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) αποτελεί μία χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την μελέτη του πολλαπλασιασμού κυττάρων. Βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (κίτρινη χρωστική) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Πιο συγκεκριμένα το MTT οξειδώνεται από αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυροί κρύσταλλοι φορμαζάνης που συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η οξείδωση του MTT λαμβάνει χώρα μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.



Εικόνα 8: Το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου μετατρέπεται σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης.

(<https://www.intechopen.com/books/practical-applications-in-biomedical-engineering/biocompatibility-and-immunocompatibility-assessment-of-poly-2-oxazolines->)

Εν συνεχεία οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται σε διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και παράγουν χρωματικό διάλυμα, η ένταση χρώματος του οποίου είναι ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Με την φωτομετρική ανάλυση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος εξάγονται συμπεράσματα για την μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση για την μεταβολή της βιωσιμότητάς τους.

Μέθοδος

Γενικά η μέθοδος για την μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων με MTT διαρκεί τέσσερις ημέρες. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα πιάτα

καλλιέργειας 96 οπών (wells), ένα για κάθε ημέρα. Πριν την έναρξη του πειράματος χρειάζεται να γίνουν οι απαραίτητες αναγωγές ώστε να στρωθούν στα πιάτα οι κατάλληλες ποσότητες κυττάρων. Γνωρίζουμε ότι κάθε οπή στα πιάτα καλλιέργειας για την μέθοδο αυτή χωράει συνολικά 100μL, δηλαδή 250.000 κύτταρα. Επομένως, ανάλογα με την ποσότητα των οπών που επιθυμούμε να στρώσουμε κάθε φορά πρέπει να γίνονται και οι αντίστοιχοι υπολογισμοί. Αφού έχει προηγηθεί η μέθοδος «Μέτρηση κυττάρων» επιλέγουμε το σωλήνα falcon που διαθέτει την επιθυμητή ποσότητα κυττάρων, και τον αριθμό αυτόν τον πολλαπλασιάζουμε με 10, όση δηλαδή ήταν και η ποσότητα του θρεπτικού υλικού RPMI με ορό στο οποίο διαλύθηκε το αρχικό μας ίζημα Ακολουθεί υπολογισμός της ποσότητας των κυττάρων που θέλουμε να στρώσουμε (δηλαδή τον αριθμό των οπών συνολικά για κάθε γονότυπο) κάνοντας τις κατάλληλες αναγωγές. Αφού προκύψει η ποσότητα, αφαιρείται από το σωλήνα falcon φυγοκεντρείται στις 1800rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται στην υπόλοιπη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI χωρίς ορό που απαιτείται. Ακολουθεί στρώσιμο στα πιάτα. Γενικά προτιμάται τα κύτταρα να τοποθετούνται στην μέση του πιάτου και περιμετρικά να προστίθενται στις οπές 100μL D-PBS. Αφού τα κύτταρα στρώθηκαν στα τέσσερα πιάτα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης για μία νύχτα (overnight). Για τις επόμενες τέσσερις ημέρες ακολούθησε η ίδια διαδικασία για κάθε πιάτο. Αρχικά, το πιάτο τοποθετήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου στις οπές που είχαν τοποθετηθεί τα κύτταρα προστέθηκαν 11μL διαλύματος MTT κάνοντας καλή ανάμειξη. Το πιάτο αφέθηκε να επωαστεί για τέσσερις ώρες σε κλίβανο επώασης και ακολούθησε προσθήκη 100μL DMSO σε κάθε οπή κυττάρων. Το πιάτο σκεπάστηκε με αλουμινόχαρτο, διότι το DMSO είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο, και τοποθετήθηκε για ανάδευση σε shaker για 30 λεπτά. Τέλος το πιάτο φωτομετρήθηκε σε φωτόμετρο ELISA στα 550 και 595nm. Οι τιμές των απορροφήσεων χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία γραφήματος.

Λήψη κυττάρων από καλλιέργεια για ELISA και Bradford

Υλικά

- Φυγόκεντρος (Hettich Mikro 22R)
- Πιπέτες Gilson 200 και 1000μL
- Αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf 1,5mL
- Διάλυμα RIPA

Διαλύματα

Διάλυμα RIPA

Σε δοχείο αναμείχθηκαν τα εξής συστατικά:

- i. NP-40 (1%)
- ii. Deoxycholate (DOC) (0.5%)
- iii. SDS (0.1%)
- iv. NaCl (150 mM)
- v. Tris-Cl (50 mM, pH 8.0)

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Μέθοδος

Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, τέθηκε σε λειτουργία η φυγόκεντρος, ώστε να προσαρμοστεί στους 22°C που απαιτούνταν για την διεξαγωγή του πειράματος. Αρχικά τα κύτταρα που είχαν στρωθεί την προηγούμενη ημέρα, και αφού είχαν επωαστεί για μία νύχτα (overnight) μεταφέρθηκαν με πίπετα 1000μL σε αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf. Εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000rpm για 10 λεπτά στους 22°C. Σε νέα αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα (είχαν ροζ χρώμα) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για να ακολουθήσει η διαδικασία της ELISA. Στα ιζήματα που προέκυψαν από την φυγοκέντρηση προστέθηκαν 50μL RIPA, που λειτουργεί ως αποδιατακτικό, κάνοντας καλή ομογενοποίηση. Τα ιζήματα μαζί με το διάλυμα RIPA τοποθετήθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά, κάνοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα ομογενοποίηση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 9.000rpm για 20 λεπτά στους 22°C. Τέλος κρατήθηκε το υπερκείμενο σε νέα αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C για να ακολουθήσει η διαδικασία της Bradford.

Λήψη κυττάρων από καλλιέργεια για απομόνωση RNA (RNA extraction)

Υλικά

- Διάλυμα NucleoZOL (Macherey Nagel)
- Φυγόκεντρος (Hettich Mikro 22R)

- Πιπέτες Gilson 200 και 1000μL
- Αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf 1,5mL

Μέθοδος

Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, τέθηκε σε λειτουργία η φυγόκεντρος, ώστε να προσαρμοστεί στους 22°C που απαιτούνταν για την διεξαγωγή του πειράματος. Αρχικά τα κύτταρα που είχαν στρωθεί την προηγούμενη ημέρα, και αφού είχαν επωαστεί για μία νύχτα (overnight) μεταφέρθηκαν με πίπετα 1000μL σε αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf. Εν συνεχεία, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 1800rpm για 20 λεπτά στους 22°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσοχή και στο ίζημα προστέθηκαν 500μL NucleoZOL κάνοντας ταυτόχρονα καλή ομογενοποίηση (απέκτησε γαλάζιο χρώμα). Τέλος τα φιαλίδια αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωση RNA.

Απομόνωση RNA από κύτταρα

Υλικά

- Διάλυμα NucleoZOL (Macherey Nagel)
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- 75% αιθανόλη (φυλάσσεται στους -20°C)
- Στείρο H₂O
- Φυγόκεντρος (Hettich Mikro 22R)
- Πιπέτες Gilson 200 και 1000μL
- Αποστειρωμένα φιαλίδια Eppendorf 1,5mL
- Πάγος

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη χρήση της ισοθιακυανικής γουανιδίνης, της φαινόλης και του χλωροφορμίου. Πιο συγκεκριμένα, το θειακυανικό άλας της γουανιδίνης προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των ριβονουκλεοπρωτεασών (RNases), οι οποίες καταλύουν την διάσπαση του RNA σε μικρότερα τμήματα και απομακρύνουν το ριβοσωμικό RNA από τα ριβοσώματα. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα να απομονωθεί ολόκληρο το RNA που έχει προκύψει από τη μεταγραφή.

Μέθοδος

Πριν την έναρξη της διαδικασίας προετοιμάστηκε η φυγόκεντρος στους 4°C. Τα δείγματα που απομονώθηκαν για απομόνωση RNA αποψύχθηκαν και σε κάθε ένα προστέθηκαν 0,1mL χλωροφόρμιο με σκοπό να διαχωριστούν οι φάσεις, κάνοντας καλή ανάδευση. Αφέθηκαν για 15 λεπτά σε πάγο και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Στην συνέχεια, παρατηρήσαμε ότι δημιουργήθηκαν τρεις φάσεις όπου κάτω βρίσκονταν οι πρωτεΐνες, στην μέση το DNA και πάνω το RNA, το οποίο λήφθηκε με προσοχή και τοποθετήθηκε σε νέα αποστειρωμένα και επισημασμένα φιαλίδια Eppendorf. Στα φιαλίδια αυτά προστέθηκαν 500μL ισοπροπανόλη/ml NucleoZOL ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Αφέθηκαν στον πάγο για 5-10 λεπτά και ύστερα για 30 λεπτά στους -80°C. Εν συνεχεία, φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Κρατώντας από ψηλά τα φιαλίδια Eppendorf, ώστε να μην διαλυθούν τα ιζήματα, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500μL 75% αιθανόλη κάνοντας καλή ανάδευση. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C (οι εκπλύσεις με αιθανόλη 75% επαναλήφθηκαν τουλάχιστον δύο φορές). Εν συνεχεία, απομακρύνονται τα υπερκείμενα και τα φιαλίδια τοποθετούνται ανάποδα και σε καθαρό μέρος ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια της αιθανόλης. Τέλος προστέθηκαν 30μL στείρο H₂O και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Διαδικασία φωτομέτρησης

Υλικά

- Αποστειρωμένα ρύγχη
- Πιπέτες Gilson 10μL

- Στείρο H₂O
- Μηχάνημα Nano-Drop
- Heat block

Μέθοδος

Αρχικά, ρυθμίζεται η θερμοκρασία του οργάνου Heat block στους 65°C, ενώ τα δείγματα αφήνονται να αποψυχθούν εντός πάγου. Τα δείγματα από την διαδικασία «RNA extraction» τοποθετήθηκαν στο Heat block για 10 λεπτά. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο για 3 λεπτά και έγινε σύντομη φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12.000rpm. Στην συνέχεια έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων στο όργανο Nano-drop, μέσω την οποίας προσδιορίστηκε η ποσότητα του RNA σε ng/μl καθώς και οι λόγοι 260/280 (εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος) και 260/230.

Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDna) από ολικό RNA με την μέθοδο RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Υλικά

- Ολικό ώριμο RNA
- Θερμοκυκλωτής: Thermal cycler, DNA engine (Mj Research, ΗΠΑ)
- Θερμοάντοχα αποστειρωμένα σωληνάρια των 200μL
- Takara Invitrogen kit για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA που περιέχει:
 - i. Τυχαία εξαμερή: Random Hexamers
 - ii. Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H₂O)
 - iii. Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5x buffer
 - iv. Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων : dNTPs
 - v. Αναστολείς RNAσών: RNase inhibitors
 - vi. Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης : RNase

Διαλύματα

Μείγμα 1

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο αναμειγνύονται 1μL Random Hexamers και 0,5μL μείγματος ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs). Οι ποσότητες αυτές πολλαπλασιάζονται με τον αντίστοιχο αριθμό δειγμάτων.

Μείγμα 2

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο αναμειγνύονται 2μL ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA (5x buffer), 0,25μL αναστολείς RNAσών (RNase inhibitors) και 0,5μL ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης (RNase). Οι ποσότητες αυτές πολλαπλασιάζονται με τον αντίστοιχο αριθμό δειγμάτων.

Μείγμα port

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο αναμειγνύονται 2μL ρυθμιστικού διαλύματος για cDNA (5x buffer), 0,25μL αναστολείς RNAσών (RNase inhibitors) και 0,5μL νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H₂O).

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (RT-PCR, Reverse Transcription PCR) αποτελεί μέθοδο ενίσχυσης, απομόνωσης ή αναγνώρισης μιας γνωστής αλληλουχίας κυτταρικού ή RNA ιστού. Για την παρασκευή μιας cDNA βιβλιοθήκης, ολικό mRNA απομονώνεται από τα κύτταρα και κατόπιν, χρησιμοποιώντας το θερμοαντοχο ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση συντίθενται DNA αντίγραφα των μορίων των mRNA.

Μέθοδος

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία έγιναν υπολογισμοί της ποσότητας κάθε δείγματος που θα χρειαστεί, με βάση τις τιμές συγκέντρωσης που προέκυψαν από την διαδικασία της «Φωτομέτρησης». Επίσης, τοποθετήθηκαν μέσα σε πάγο, ώστε να αποψυχθούν, τα

δείγματα που προέκυψαν από την διαδικασία του «RNA extraction». Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η διαδικασία έλαβε χώρα κάτω από αυστηρά στείρες συνθήκες.

Αρχικά, στα φιαλίδια των δειγμάτων και του port μοιράστηκαν συνολικά 1,5μL από το μείγμα 1 και η ποσότητα του νερού και του δείγματος του απομονωμένου RNA που προέκυψε από τους υπολογισμούς της διαδικασίας της «Φωτομέτρησης». Το port στην πραγματικότητα αποτελεί ένα αρνητικό control, το οποίο δεν περιέχει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η χρησιμότητα του εντοπίζεται στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, στην οποία εάν εμφανιστεί κάποια ζώνη αυτό σημαίνει ότι υπάρχει κάποια μόλυνση στο δείγμα. Στο φιαλίδιο του port λοιπόν προστέθηκε η μικρότερη υπολογισμένη ποσότητα RNA. Το μείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 65°C, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή και στην συνέχεια ψύχθηκε στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο καταστράφηκαν τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν τον σχηματισμό του cDNA. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκαν δύο ακόμα μείγματα, το μείγμα 2 που μοιράστηκε στα δείγματα, και ένα μείγμα port το οποίο προστέθηκε στο φιαλίδιο για το port. Ακολουθεί τοποθέτηση τους στο μηχάνημα της PCR για περίπου τρεις ώρες στο αντίστοιχο πρόγραμμα πρόγραμμα.

Πρόγραμμα σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA) από ολικό RNA με την μέθοδο RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

| Αριθμός κύκλων | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|----------------|-------------|----------|
| 1 | 30,0° | 10 λεπτά |
| 2 | 42,0° | 1 ώρα |
| 3 | 95,0° | 5 λεπτά |

Τέλος τα cDNA είτε χρησιμοποιούνται αμέσως στην μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσονται στους -20°C.

Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction)

Υλικά

- Συμπληρωματικό DNA (cDNA)
- Platinum taq polymerase kit που περιέχει:
 - i. Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού: 10X Buffer
 - ii. Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων : dNTPs
 - iii. Platinum Taq DNA polymerase
- Θερμοάντοχα αποστειρωμένα σωληνάκια των 200μl
- Θερμοκυκλωτή: Thermal cycler, DNA engine (Mj Research, ΗΠΑ)

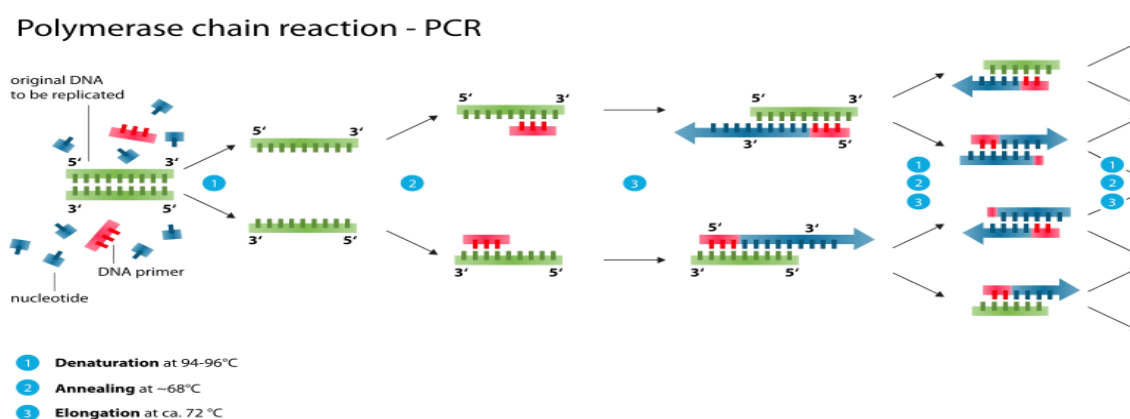
Αρχή της μεθόδου

Η PCR αποτελεί μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

- 1) **Αποδιάταξη** : Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
- 2) **Υβριδισμός εκκινητών** : Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
- 3) **Επιμήκυνση** : Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72°C, την βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), μία συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα η οποία μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους.



Εικόνα 9 : Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
(https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

Μέθοδος

Αρχικά παρασκευάζεται ένα μείγμα σύμφωνα με τις ακόλουθες ποσότητες:

- 0,1μL Platinum Taq DNA polymerase
- 2μL ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού (10X Buffer)-
- 0,4μL μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- 0,4μL primer F
- 0.4μL primer R
- 15,7μL H₂O

Το μείγμα αυτό έχει τελικό όγκο 19μL. Οι παραπάνω ποσότητες πολλαπλασιάζονται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 19μL του μείγματος σε κάθε σωληνάριο δείγματος, αλλά και σε ένα φιαλίδιο για το port και σε ένα φιαλίδιο για το H₂O. Ακολουθεί προσθήκη 1μL των cDNA που είχαν σχηματιστεί σε κάθε

δείγματος και στο port. Στο φιαλίδιο το οποίο προοριζόταν για το H₂O προστέθηκε 1μL H₂O. Τοποθετήθηκαν στην συσκευή της PCR και ενεργοποιείται το πρόγραμμα για τους αντίστοιχους primers. Η χρήση του φιαλιδίου με H₂O μας επιτρέπει να εξακριβώσουμε κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης εάν υπάρχει κάποια μόλυνση στα υλικά.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι πριν την έναρξη της PCR για την IL-6 και τον NGF προηγήθηκε η PCR ακτίνης. Η ακίνη χαρακτηρίζεται ως ένα “housekeeping gene”, καθώς εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, μας επιτρέπει να ελέγξουμε αν έχουν σχηματιστεί ορθά όλα τα cDNAs, καθώς επίσης συμβάλλει στην διαδικασία της ποσοτικοποίησης.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

| Γονίδιο | Αλληλουχία εκκινητή νοηματικού κλώνου (Forward) (5'-3') | Αλληλουχία εκκινητή μη νοηματικού κλώνου (Reverse) (5'-3') | Θερμοκρασία Υβριδισμού | Μήκος Προϊόντος (ζεύγη βάσεων) | Κύκλοι |
|----------------|---|--|------------------------|--------------------------------|--------|
| mbActin | Tctctttgatgtcacgcacg | tcagaaggactcctatg tgg | 55 | 500 | 25 |
| mIL6 | Ccagaacagatttgagag | ctacattgcccgaaga gc | 60 | 252 | 35 |
| mNGF | Caccaccagctcttcc | ctcggcattggtctca aa | 58 | 173 | 38 |

Τα προγράμματα PCR που ακολουθήθηκαν για την κυτοκίνη IL-6 (mIL-6) και το νευροπεπτίδιο NGF (mNGF) είναι τα ακόλουθα.

| Στάδια | Θερμοκρασία | Χρόνος |
|--------------|--------------------------------|-----------------|
| mIL-6 | | |
| 1 | 69,0° | 5 λεπτά |
| 2 | 96,0° | 30 δευτερόλεπτα |
| 3 | 56,0° | 30 δευτερόλεπτα |
| 4 | 72,0° | 30 δευτερόλεπτα |
| 5 | Επανάληψη 40 φορές (40 κύκλοι) | |
| 6 | 72,0° | 5 λεπτά |

| mNGF | | |
|---------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | 95.0° | 5 λεπτά |
| 2 | 95,0° | 15 δευτερόλεπτα |
| 3 | 58,0° | 20 δευτερόλεπτα |
| 4 | 72,0° | 20 δευτερόλεπτα |
| 5 | Επανάληψη 40 φορές (40 κύκλοι) | |
| 6 | 72,0° | 10 λεπτά |
| mActin | | |
| 1 | 96.0 ^p | 3 λεπτά |
| 2 | 94,0° | 1 λεπτό |
| 3 | 55,0° | 1 λεπτό |
| 4 | 72,0° | 1 λεπτό |
| 5 | Επανάληψη 40 φορές (40 κύκλοι) | |
| 6 | 72,0° | 3 λεπτά |

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2%

Υλικά

- Αγαρόζη (NIPPON Genetics Europe)
- Διάλυμα TAE 50x
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma, ΗΠΑ)
- Gel tray

Διαλύματα

Διάλυμα TAE 50x

Σε σκοτεινό μπουκάλι αναμειγνύονται τα εξής αντιδραστήρια:

- i. Tris (pH 8) 10nM
- ii. EDTA 10mM
- iii. Οξικό ασβέστιο 5nM

iv. Χλωριούχο Νάτριο 10nM

Το διάλυμα αναδεύτηκε επαρκώς και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Επειδή κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης το διάλυμα TAE πρέπει να είναι 2x, με κατάλληλους υπολογισμούς προσδιορίστηκε ότι σε 100mL απιονισμένο νερό έπρεπε να προστεθούν 2ml TAE 50x.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml

Το διάλυμα παρασκευάστηκε διαλύοντας δισκίο βάρους 10mg σε 1mL απιονισμένου νερού. Φυλάχτηκε στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο διότι είναι φωτοευαίσθητο.

Μέθοδος

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η διαδικασία έλαβε χώρα σε απαγωγό και κρίθηκε απαραίτητη χρήση γαντιών και εργαστηριακής ποδιάς εξαιτίας της επικινδυνότητας του βρωμιούχου αιθιδίου.

Αρχικά ζυγίστηκαν, σε ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων, 2g αγαρόζης, τα οποία μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 250mL και προστέθηκαν 100mL διαλύματος TAE 1x. Η κωνική τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 3 λεπτά, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το διάλυμα αφέθηκε για μερικά λεπτά να κρυώσει και προστέθηκαν 10μL βρωμιούχου αιθιδίου (το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στο DNA και δίνει ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα όταν εκτεθεί σε φως UV) και έγινε καλή ανακίνηση του διαλύματος. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο (gel tray) στο οποίο ενσωματώθηκαν χτένια για το σχηματισμό οπών-πηγαδιών. Αφέθηκε να στερεοποιηθεί και στη συνέχεια όταν πλέον είχε σχηματιστεί το πήκτωμα αγαρόζης αφαιρέθηκαν τα χτένια και το πήκτωμα μαζί με το εκμαγείο τοποθετήθηκαν στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 10: Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης σε λάμπα UV

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_gel_with_UV_illumination_-_Ethidium_bromide_stained_DNA_glow_orange_\(close-up\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_gel_with_UV_illumination_-_Ethidium_bromide_stained_DNA_glow_orange_(close-up).jpg))

Ηλεκτροφόρηση

Υλικά

- Διάλυμα TAE 50x
- Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (LifeTechnologies, ΗΠΑ)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης : E431 (Consort, Βέλγιο)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Loading buffer)
- Πήκτωμα αγαρόζης 2%
- Συσκευή UV/κάμερα: Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Molecular Analyst, version 1.4.4 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Tina Scan, version 2.07d (Raytest, isotopenmessgerate, Γερμανία)
- Πιπέτες Gilson 20μL

Διαλύματα

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

Σε ποτήρι ζέσεως αναμείχθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- i. Tris (pH 8) 10nM
- ii. EDTA 60mM
- iii. Γλυκερόλη 60%(v/v)
- iv. Πορτοκαλί της ακριδίνης (OrangeG) 0,15%(w/v)

Αφού το διάλυμα ομογενοποιήθηκε πλήρως, και απέκτησε ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα διηθήθηκε και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA). Βασίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, που βρίσκονται εντός υδατικού διαλύματος και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Δηλαδή, τα κατιόντα (+) κινούνται προς τη κάθοδο (αρνητικός πόλος) και τα ανιόντα (-) κινούνται προς την άνοδο (θετικός πόλος). Υπό την προϋπόθεση ότι το ηλεκτρικό πεδίο διακόπτεται πριν τα ιόντα φθάσουν τα ηλεκτρόδια, τότε τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή μάλιστα εξαρτάται σημαντικά από: α) την σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου, β) το pH και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), γ) την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, δ) τη θερμοκρασία, καθώς επίσης και ε) τη φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν επίσης την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, μέσω παρατήρησης των πηκτωμάτων σε λάμπα UV.

Μέθοδος

Η διαδικασία αυτή αποτέλεσε το επόμενο βήμα μετά την «Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 2%».

Σε κάθε δείγμα που προέκυψε από την διαδικασία της PCR προστέθηκαν 4μL από το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Loading buffer), κάνοντας καλή ομογενοποίηση. Πριν την φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, προηγήθηκε η φόρτωση 5μL του δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (ladder) στο πρώτο πηγαδάκι και στην συνέχεια ακολούθησε η φόρτωση 12μL από κάθε δείγμα στα επόμενα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Εν συνεχεία, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με το τροφοδοτικό το οποίο

εφάρμοξε τάση 100V στην πηκτή. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης «εμφανίστηκε» σε λάμπα UV (το DNA γίνεται εμφανές λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου) και αποτυπώθηκε με το πρόγραμμα Molecular Analyst. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA έγινε εφικτός εξαιτίας της χρήσης του δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (ladder) που ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα και λόγω χρήσης του προγράμματος ανάλυσης Tina Scan.

Υπολογισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Υλικά

- Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 : Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Life Technologies)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)
- Μικροπλάκες 96 οπών με επίπεδο πυθμένα (Costal, ΗΠΑ)
- Φωτόμετρο για μέτρηση πλακών (Microplate Reader, Model 550, Biorad)
- Φίλτρα μεγέθους οπών 0,45μm
- Πιπέτες Gilson 200μL
- Υπολογιστικό πρόγραμμα Microsoft Excel

Διαλύματα

Λευκωματίνη ορού βόας (BSA) 1mg/ml

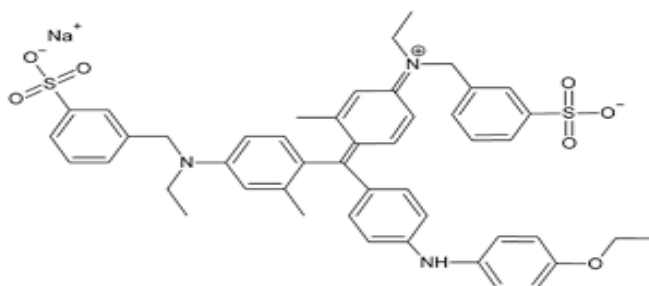
Σε 10ml απιονισμένο νερό προστέθηκαν 10mg BSA. Το μείγμα αναδεύτηκε επαρκώς, φιλτραρίστηκε, μέσω φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45μm, και διαχωρίστηκε σε φιαλίδια Eppendorf 1,5mL. Αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

Σε 200mL απιονισμένο νερό διαλύθηκε μία κάψουλα PBS (σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή).

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια φασματοσκοπική αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού κυτταρικών πρωτεϊνών. Βασίζεται στην χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία διαθέτει αρνητικό φορτίο. Η χρωστική αυτή, στην κανονική της μορφή εμφανίζει χρώμα κόκκινο και μέγιστο απορρόφησης στα 465nm. Όταν όμως, η χρωστική αλληλεπιδράσει με τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης σχηματίζει σύμπλοκο μπλε χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Για την χρήση της μεθόδου κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη με την βοήθεια πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, και μετράμε τη οπτική πυκνότητα στα 595nm.



Εικόνα 11: Δομή της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250

(<http://nptel.ac.in/courses/102103047/5>)

Μέθοδος

Σε μικροπλάκα 96 οπών με επίπεδο πυθμένα τοποθετήθηκαν 160μl ανά οπή από κάθε γνωστό και άγνωστο δείγμα εις τριπλούν (δηλαδή στο πιάτο υπήρχαν 3 οπές για PBS και BSA και 3 οπές για τα δείγματα) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

| PBS | BSA | Coomassie Br. Blue | V _{τελ} |
|-------|-----|--------------------|------------------|
| 160 | - | 40 | 200 |
| 159,5 | 0,5 | 40 | 200 |
| 159 | 1 | 40 | 200 |
| 158 | 2 | 40 | 200 |
| 155 | 5 | 40 | 200 |
| 150 | 10 | 40 | 200 |
| 145 | 15 | 40 | 200 |
| 140 | 20 | 40 | 200 |

Στις οπές που τοποθετήθηκαν τα δείγματα προστέθηκαν 158μL/οπή PBS και 2μL/οπή δείγματος. Αφού λοιπόν προστέθηκαν οι ποσότητες των PBS, BSA και των δειγμάτων ακολούθησε η προσθήκη της χρωστικής Coomassie Br. Blue G-250, κάνοντας καλή ομογενοποίηση κάθε φορά. Τέλος το πιάτο φωτομετρήθηκε σε φωτόμετρο ELISA στα 595nm. Με την βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Excel κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 12: Απεικόνιση μικροπλάκας για την μέθοδο Bradford, ένα στάδιο πριν την διαδικασία φωτομέτρησης

Ανοσοπροσοφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay-ELISA)

Υλικά

- Μικροπλάκες 96 οπών για ELISA (Quantikine, R&D Systems)
- Το mouse IL-6 ELISA Kit (BioLegend) το οποίο περιείχε:
 - i. Αντίσωμα εναντίον της IL-6 mouse 200X (Capture Antibody)
 - ii. Βουτυνυλιωμένο αντίσωμα IL-6 mouse 200X (Detection Antibody)
 - iii. Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη IL-6 mouse (Standard)
 - iv. Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση 1000X (Avidin-HRP)
- Το Elisa development Kit-Mouse TNF-α το οποίο περιείχε:
 - i. Μονοκλωνικά αντίσωμα mABSMT1C8|23C9 εναντίον του TNF-α mouse (0.5mg/mL)
 - ii. Μονοκλωνικά βουτυνυλιωμένα αντισώματα MT11B10 TNF-α mouse (0.5mg/ml)
 - iii. Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TNF-α mouse 0.5mg (Standard)
 - iv. Στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με υπεροξειδάση (Avidin-HRP)
- Διάλυμα H₂SO₄ 2N
- Φωτόμετρο ELISA

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων (wash buffer)

- **Για IL-6 mouse**

Μία ταμπλέτα PBS σε 200mL απιονισμένο H₂O, στο οποίο προστίθενται 0,05% διαλύματος μη ιοντικού απορρυπαντικού Tween-20.

- **Για TNF-α mouse**

0,05% διαλύματος μη ιοντικού απορρυπαντικού Tween-20 σε PBS

Και τα δύο διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (coating buffer) για IL-6 mouse

Το αρχικό stock βρίσκεται σε συγκέντρωση 5X. Ανάλογα με την ποσότητα των οπών που θέλουμε να συμπληρώσουμε στις πλάκες ELISA κάνουμε την κατάλληλη αραίωση με απιονισμένο H₂O.

Διάλυμα αντισώματος (Capture antibody solution)

- **Για IL-6 mouse**

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit, σε 12mL Coating buffer περιέχονται 60μl Capture antibody. Ανάλογα με τον αριθμό των οπών στις πλάκες ELISA προσδιορίζεται και η ποσότητα του αντισώματος που πρέπει να διαλυθεί στο Coating buffer.

- **Για TNF-α mouse**

Το αρχικό stock έχει συγκέντρωση 0,5mg/mL και θέλουμε να γίνει 0,002mg/mL. Ανάλογα με τον αριθμό των οπών στις πλάκες ELISA προσδιορίζεται και η ποσότητα του αντισώματος mABSMT1C8|23C9 που πρέπει να διαλυθεί στο διάλυμα PBS.

Διάλυμα αραίωσης (Assay Diluent) για IL-6 mouse

Το αρχικό stock βρίσκεται σε συγκέντρωση 5x. Ανάλογα με την ποσότητα των οπών που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε στις πλάκες ELISA κάνουμε την κατάλληλη αραίωση με PBS.

Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (Incubation buffer) για TNF-α mouse

Σύμφωνα με το χαρτί οδηγιών του Kit σε 100mL διαλύματος PBS περιέχονται 50μL Tween-20 και 0,1g BSA. Επομένως, ανάλογα με την ποσότητα των οπών που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε στις πλάκες ELISA κάνουμε την κατάλληλη ανάμειξη του PBS, του Tween-20 και της BSA κάνοντας καλό vortex.

Διάλυμα αντισώματος ανίχνευσης (Detection antibody) για IL-6 mouse

Σύμφωνα με το χαρτί οδηγιών του Kit σε 12mL Assay Diluent A περιέχονται 60μL Detection antibody. Ανάλογα με τον αριθμό των οπών στις πλάκες ELISA προσδιορίζεται και η ποσότητα του αντισώματος που πρέπει να διαλυθεί στο Assay Diluent.

Διάλυμα βουτυλυλιωμένου αντισώματος

- **Για IL-6 mouse**

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit, σε 12mL Assay Diluent περιέχονται 12μL Avidin-HRP. Ανάλογα με τον αριθμό των οπών στις πλάκες ELISA προσδιορίζεται και η ποσότητα του

αντισώματος που πρέπει να διαλυθεί στο Assay Diluent. Επειδή είναι φωτοεαίσθητο, η χρήση του γίνεται υπό συνθήκες σκότους.

- **Για TNF- α mouse**

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit, σε 1000mL Incubation buffer περιέχονται 1μL Avidin-HRP. Ανάλογα με τον αριθμό των οπών στις πλάκες ELISA προσδιορίζεται και η ποσότητα του αντισώματος που πρέπει να διαλυθεί στο Incubation buffer.

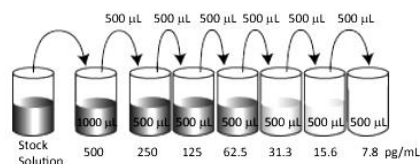
Διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution)

Διάλυμα που αποτελείται από ίσους όγκους υπεροξειδίου του υδρογόνου (Color Reagent A) και τετραμεθυλβενζιδίνης (Color Reagent B). Μετά την ανάμειξη αποθηκεύεται σε σωλήνα που φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.

Παρασκευή standards για τον σχηματισμό πρότυπης καμπύλης

- **Για IL-6 mouse**

Σε σωλήνα Eppendorf προστέθηκαν 1000μL Assay Diluent, αφαιρέθηκαν 3,6μL και αντικαταστάθηκαν από 3,6μL του διαλύματος για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης. Στην συνέχεια σε έξι νέα φιαλίδια Eppendorf προστέθηκαν 500μL Assay diluent και έγιναν σταδιακά αραιώσεις από τα πυκνά διάλυμα, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:



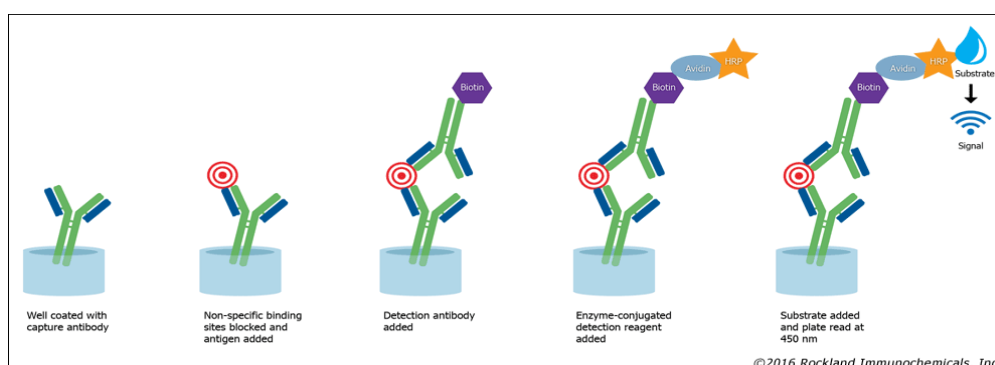
- **Για TNF- α mouse**

Σε σωλήνα Eppendorf προστέθηκαν 1000μL Incubation buffer, αφαιρέθηκαν 1,2μL και αντικαταστάθηκαν από 1,2μL του διαλύματος για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης. Στην συνέχεια σε έξι νέα φιαλίδια Eppendorf έγιναν σταδιακές αραιώσεις όπως προηγουμένως.

Στις οπές όπου τοποθετήθηκαν τα δείγματα προσθέσαμε 100μL από τα φιαλίδια Eppendorf που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C κατά τη λήψη κυττάρων από καλλιέργεια για την μέθοδο ELISA.

Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ιντερλευκίνης IL-6 και του TNF- α (mIL-6, mTNF- α) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που βασίζεται στον ποσοτικό ανοσοενζυματικό προσδιορισμό τύπου “sandwich”. Γενικά η μέθοδος ELISA αποτελεί μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών κ.α., καθώς επίσης δεν απαιτεί επεξεργασία του δείγματος πριν την έναρξη της.



Εικόνα 12: Αρχή λειτουργίας ELISA
(<http://www.rockland-inc.com/ELISA-Kits.aspx>)

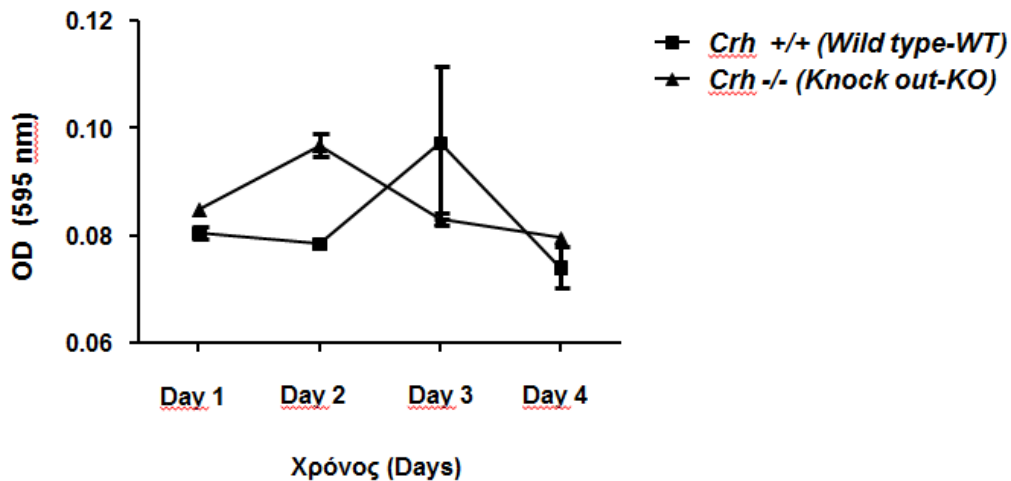
Η μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση μονοκλωνικού αντισώματος, που είναι ειδικό για το αντιγόνο που ενδιαφερόμαστε να προσδιορίσουμε στα δείγματα μας. Έτσι λοιπόν, την πρώτη ημέρα, πλάκες ELISA 96 οπών επικαλύπτονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα, του εξεταζόμενου παράγοντα, και αφήνονται να επωαστούν στους 4°C για μία νύχτα (overnight). Την δεύτερη ημέρα ακολουθεί πλύσιμο των πλακών με wash buffer και επώαση για μία ώρα (σε shaker) με διάλυμα που περιείχε ποσότητα μη ειδικής πρωτεΐνης, με σκοπό να αποφευχθεί πιθανή μη ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών με το πλαστικό των οπών της πλάκας ELISA και να σχηματιστεί σύμπλοκο μεταξύ του ακινητοποιημένου αντισώματος και την υπό μελέτη ουσία. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί ξανά πλύσιμο των πλακών ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και τα αντισώματα που δεν είναι ειδικά δεσμευμένα. Ακολουθεί προσθήκη των γνωστών και άγνωστων δειγμάτων τα οποία αφήνονται να επωαστούν για μία νύχτα (overnight) στους 4°C. Την τρίτη ημέρα, πραγματοποιείται ξανά έκπλυση των πλακών με wash buffer και προστίθεται ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ανίχνευσης, που είναι σημασμένο με βιοτίνη, και το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο μορφής “sandwich” με το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου. Το

ένζυμο το οποίο δεσμεύεται στο δεύτερο αντίσωμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ποσοτική ανάλυση. Ακολουθεί ξανά έκπλυση με wash buffer και πραγματοποιείται προσθήκη στρεπταβιδίνης συνδεδεμένης με φυτική υπεροξειδάση (με σβηστά τα φώτα γιατί είναι φωτοευαίσθητη) η οποία δεσμεύεται στο βιοτυνλιωμένο δεύτερο αντίσωμα και αφήνουμε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (σε shaker), έχοντας καλυμμένες τις πλάκες με αλουμινόχαρτο. Πραγματοποιείται για ακόμη μία φορά έκπλυση με wash buffer και γίνεται προσθήκη χρωμογόνου (TMB Substrate Solution), που αποτελεί ένα άχρωμο υπόστρωμα (τετραμεθυλβενζιδίνη) επάνω στο οποίο δρα το ενζυμικό τμήμα της στρεπταβιδίνης για να παραχθεί ένα έγχρωμο μπλε προϊόν, ανάλογο της ποσότητας αντιγόνου του δείγματος. Αφού επωαστεί κάθε πλάκα για λίγη ώρα σε σκοτεινό δωμάτιο και καλυμμένη με αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε να αποκτήσει ένα έντονο μπλε χρώμα, προστίθεται διάλυμα θειικού οξέος για διακοπή η αντίδραση και να παραχθεί ένα κίτρινο προϊόν. Τέλος, η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος μετράται εκτιμώντας την ποσότητα του εγχρώμου τελικού προϊόντος με άμεση σάρωση της οπτικής πυκνότητας του πλακιδίου στα 450nm. Η ποσοτική εκτίμηση κάθε δείγματος μπορεί να επιτευχθεί με χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβάνεται από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του προς μέτρηση παράγοντα.

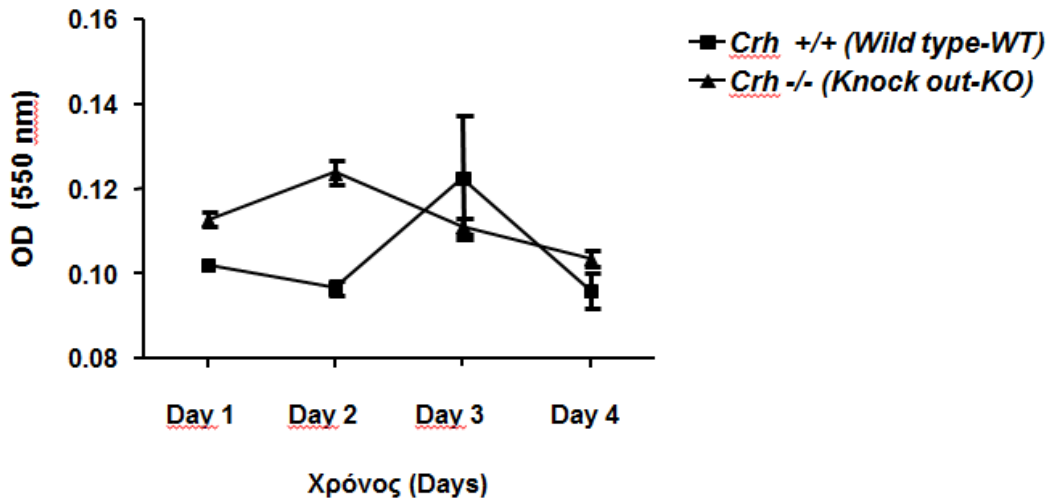
Αποτελέσματα

Επίδραση της ανεπάρκειας CRH στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες σπληνοκυττάρων

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων προερχόμενων από πρωτογενείς καλλιέργειες σπληνοκυττάρων, από μύες Αγρίου τύπου ως προς την CRH (*Crh* +/+) και μύες με ανεπάρκεια της CRH (*Crh* -/-) προσδιορίστηκε με την μέθοδο του MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», η διαδικασία του MTT αποτελεί μία χρωματομετρική μέθοδο που διήρκησε στα πειράματά μας συνολικά τέσσερις ημέρες και βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (κίτρινη χρωστική) σε αδιάλυτους πορφυρούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Η μέθοδος περιλαμβάνει φωτομέτρηση σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, στα 550nm και 595nm. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων ημερών στα δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism και Microsoft Excel, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean±SEM.



Διάγραμμα 1: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων ανά μέρα του πειράματος, με φωτομέτρηση στα 595nm στους δύο διαφορετικούς γονότυπους (*Crh* +/+, WT / *Crh* -/-, KO), n=8 σπές /ομάδα/πείραμα



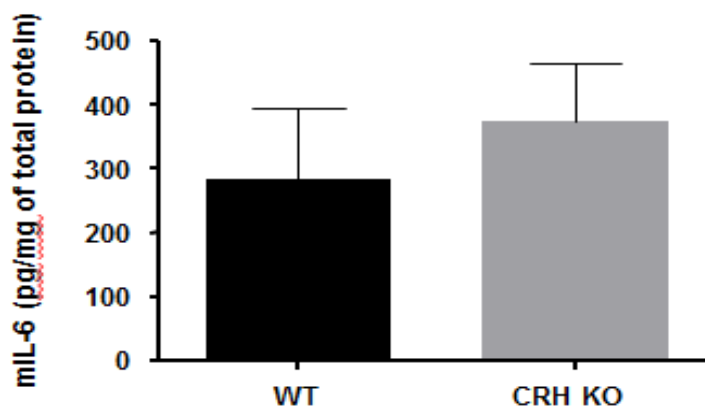
Διάγραμμα 2: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων ανά μέρα του πειράματος, με φωτομέτρηση στα 550nm στους δύο διαφορετικούς γονότυπους (*Crh* +/+, WT / *Crh* -/-, KO), n=8 οπές /ομάδα/πείραμα

Τα παραπάνω δεδομένα έχουν εκφραστεί ως προς τις απορροφήσεις που προέκυψαν κατά την διάρκεια των φωτομετρήσεων τις τέσσερις διαφορετικές μέρες του πειράματος, σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (550 και 595nm). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό, ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών μηκών κύματος. Όσον αφορά τα κύτταρα μυών *Crh* +/+, και στα δύο μήκη κύματος αρχικά εμφανίζεται μείωση (Day 2), που ακολουθείται από απότομη αύξηση (Day 3) και εν τέλει ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων τείνει να φθίνει την τελευταία μέρα του πειράματος (Day 4). Όσον αφορά τα κύτταρα μυών *Crh* -/-, και στα δύο μήκη κύματος πρωταρχικά παρατηρείται αύξηση (Day 2) η οποία καταλήγει σε σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Day 3,4). Εξαίρεση βέβαια αποτελούν η δεύτερη και η τρίτη πειραματική ημέρα αφού, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην περίπτωση των μυών *Crh* -/- παρατηρείται αρχικά αύξηση και έπειτα μείωση, ενώ στην περίπτωση των μυών *Crh* +/+ ισχύει το αντίστροφο.

Προσδιορισμός προφλεγμονωδών κυτοκινών στους δύο διαφορετικούς γονότυπους με την μέθοδο ELISA

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», η μέθοδος Ανοσοπροσοροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay-ELISA) αποτελεί σημαντικό εργαλείο που συμβάλλει στην προσδιορισμό των προφλεγμονωδών κυτοκινών, σε επίπεδο πρωτεϊνών, που εκλύονται έπειτα από σχηματισμό φλεγμονής με την χρήση ένεσης CFA (Complete Freund's Adjuvant) στους δύο διαφορετικούς γονότυπους μυών. (*Crh* *+/+*, *Crh* *-/-*). Οι κυτοκίνες που μελετήθηκαν ήταν η Ιντερλευκίνη 6 (mIL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism και Microsoft Excel, ενώ τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM.

- Ιντερλευκίνη 6 (mIL-6)

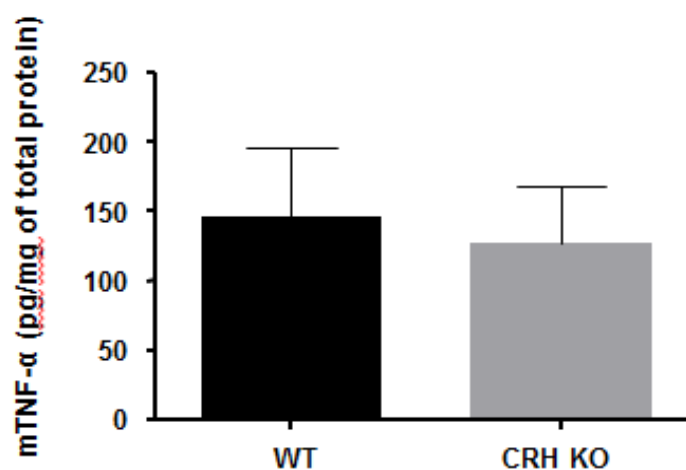


Διάγραμμα 3: Επίπεδα πρωτεΐνης mIL-6 στους δύο διαφορετικούς γονότυπους (*Crh* *+/+*, WT / *Crh* *-/-*, KO)

Σύμφωνα λοιπόν με το παραπάνω γράφημα γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα της προφλεγμονώδους κυτοκίνης mIL-6 εμφανίζει μικρή διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων. Οι μύες *Crh* *-/-* φαίνεται ότι σε περίπτωση φλεγμονώδους αντίδρασης, εκκρίνουν μεγαλύτερες ποσότητες Ιντερλευκίνης 6 (mIL-6), εν συγκρίσει με τους μύες *Crh* *+/+* όπου τα επίπεδα της IL-6 φαίνεται πως είναι χαμηλότερα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα

παραπάνω αποτελέσματα εκφράζονται ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, όπως αυτή προέκυψε μέσω της διαδικασίας Bradford.

- Παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor– TNF- α)



Διάγραμμα 3: Επίπεδα πρωτεΐνης mTNF- α στους δύο διαφορετικούς γονότυπους (*Crh* +/+ , WT / *Crh* -/- , KO)

Σύμφωνα λοιπόν με το παραπάνω γράφημα γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα του mTNF- α εμφανίζει μικρή διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων. Οι μύες *Crh* -/- φαίνεται ότι σε περίπτωση φλεγμονώδους αντίδρασης, εκκρίνουν χαμηλότερες ποσότητες mTNF- α , εν συγκρίσει με τους μύες *Crh* +/+ όπου τα επίπεδα του mTNF- α φαίνεται πως είναι υψηλότερα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα παραπάνω αποτελέσματα εκφράζονται ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, όπως αυτή προέκυψε μέσω της διαδικασίας Bradford.

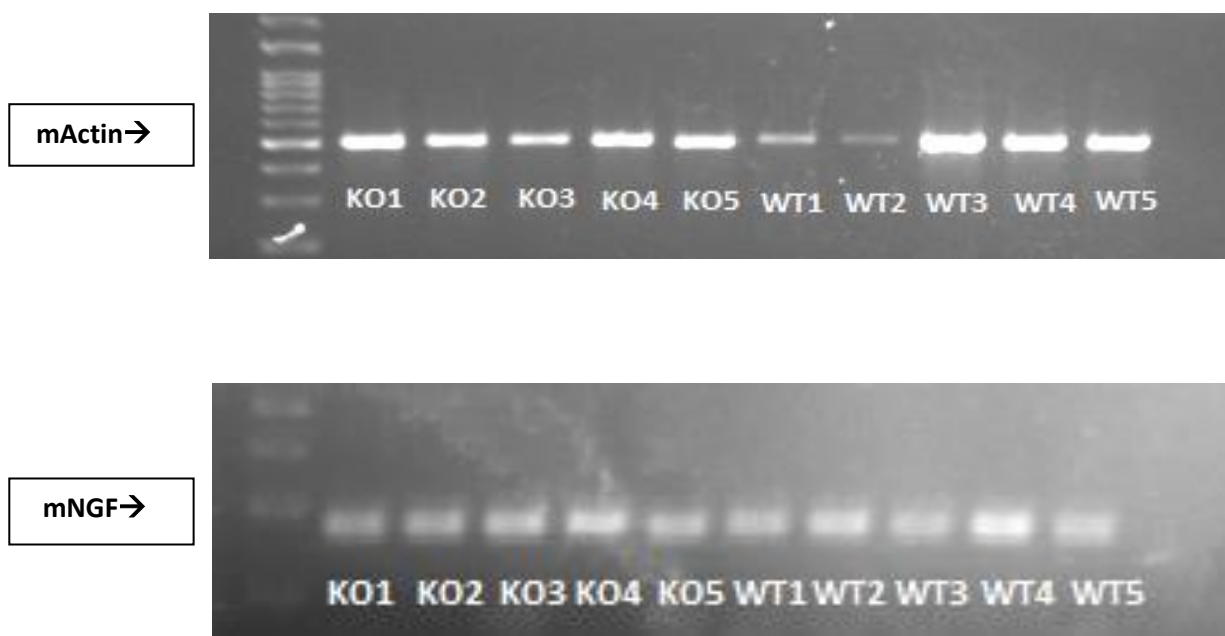
Επίδραση της ανεπάρκειας CRH στην σύνθεση κυτοκινών από T λεμφοκύτταρα προερχόμενα από πρωτογενείς καλλιέργειες σπληνοκυττάρων

Προτού ξεκινήσει η έκθεση των αποτελεσμάτων αξίζει να σημειωθεί ότι με την μέθοδο της ELISA υπήρχε η πιθανότητα να μην επιτευχθεί παρατήρηση κάποιας σημαντικής διαφοράς μεταξύ των δύο γονοτύπων (Wild type/Knock out). Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά

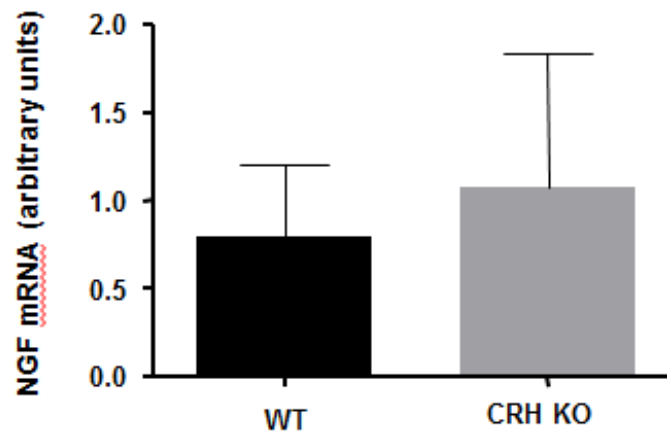
και Μέθοδοι», η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό φλεγμονής στους μύες περιελάμβανε την χρήση ένεσης CFA (Complete Freund's Adjuvant), που ακολουθούταν από εξάωρη αναμονή. Όμως, στο χρονικό διάστημα αυτό δεν ήταν ξεκάθαρο αν οι πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν με την μέθοδο ELISA είχαν φτάσει στη μέγιστη τιμή τους, καθώς υπήρχε η πιθανότητα τόσο να μην είχαν προφτάσει την τιμή αυτή, όσο και να την είχαν ξεπεράσει. Γι αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) και ακολούθησε μέτρηση των επιπέδων των mRNA των προφλεγμονωδών κυτοκινών, με σκοπό να εξεταστεί η έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών αυτών. Με την μέθοδο αυτή μελετήθηκαν ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve growth factor-NGF) και η Ιντερλευκίνη 6 (mIL-6). Η ανάλυση των δεδομένων περιλάμβανε τη χρήση του προγράμματος Tina Scan.

- *Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve growth factor-NGF)*

Για να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, προηγήθηκε η πραγματοποίηση μίας PCR για το γονίδιο της Ακτίνης-β (βλ. ενότητα «Υλικά και μέθοδοι»). Τα πηκτώματα αγαρόζης που προέκυψαν είναι τα ακόλουθα.



Εικόνα: Επίπεδα έκφρασης mNGF όπως αυτά εμφανίστηκαν κατά σειρά στο πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από εμφάνιση σε UV (θέσεις 1-5 Crh $-/-$, KO/θέσεις 6-10 Crh $+/+$, WT)



Διάγραμμα 4: Επίπεδα έκφρασης mNGF

Σύμφωνα λοιπόν με το παραπάνω ραβδόγραμμα, οι μύες *Crh* $-/-$ φαίνεται πως εκλύουν περισσότερη ποσότητα του νευρικού αυξητικού παράγοντα mNGF σε κατάσταση φλεγμονώδους αντίδρασης, εν συγκρίσει με τους μύες *Crh* $+/+$, όπου τα επίπεδα του mNGF είναι χαμηλότερα.

- Ιντερλευκίνη 6 (mIL-6)

Δυστυχώς, η μέθοδος που προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκε επανειλημμένως για την προφλεγμονώδη κυτοκίνη Ιντερλευκίνη 6 (mIL-6) χωρίς όμως να επιτευχθεί απομόνωση ξεκάθαρων ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης.

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η διαδικασία απόκρισης του αγγειακού συνδετικού ιστού, που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση υγρών και λευκοκυττάρων σε εξωκυττάρους ιστούς καλείται ανοσοφλεγμονώδης απόκριση. Πιστεύεται ότι δρα ως προστατευτικός μηχανισμός του οργανισμού, και περιλαμβάνει ποικίλα κυτταρικά συστατικά, όπως τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Το σύνολο αυτών των κυττάρων συνεργάζονται χρησιμοποιώντας μοριακά σήματα συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών (ILs), τον TNF-α και τα νευροεπεπτίδια. Η ανοσοφλεγμονώδης απόκριση επηρεάζεται σημαντικά από τον εγκέφαλο, μέσω ρύθμισης της λειτουργίας του περιφερικού νευρικού συστήματος και της ενδοκρινολογικής απόκρισης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω ρύθμισης του HPA άξονα, από την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), που μεσολαβεί την απόκριση του οργανισμού στο στρες, συμπεριλαμβανομένης την φλεγμονής. Με αυτόν τον τρόπο, κατά την διάρκεια ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης προκαλείται διέγερση της CRH, που τελικά οδηγεί στην απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών (GC) από τα επινεφρίδια. Τα προϊόντα της ανοσοφλεγμονώδους απόκρισης (π.χ. κυτοκίνες) επηρεάζουν σημαντικά την λειτουργία του εγκεφάλου, ενώ τα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν έναν αριθμό ορμονών και νευροπεπτιδίων, την CRH και την ACTH, που δρουν τόσο στα πρώιμα όσο και τα τελικά στάδια της διαδικασίας (M. Nezi, G. Mastorakos & Z. Mouslech, 2015). Η CRH αποτελεί ένα νευροεπεπτίδιο που λειτουργεί ως το κύριο μέσο ενεργοποίησης του HPA άξονα, και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση ποικίλων νευροενδοκρινικών λειτουργιών. Μέσω πειραμάτων έχει αποδειχθεί ότι η CRH έχει την ικανότητα να εκφράζεται σημαντικά σε σπληνοκύτταρα, ενώ το *Crh mRNA* εκφράζεται σε ιστούς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ο θύμος αδένας, ο σπλήνας και τα Β λεμφοκύτταρα (Aird, 1993; Ekman, 1993; Muglia, 1994). Γι' αυτόν τον λόγο, για την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας απομονώθηκαν κύτταρα από σπλήνες μύων διαφορετικών γονότυπων, αφότου είχε προσομοιωθεί επαγωγή περιφερικής φλεγμονής μέσω ένεσης CFA (complete Freund's adjuvant) στο πόδι κάθε μύς. Επιπλέον για την διεξαγωγή των πειραμάτων που αναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένοι μύες, οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από ανεπάρκεια του γονιδίου της CRH (*Crh* *-/-*, Knock out), καθώς και μύες που ήταν φυσιολογικοί ως προς την CRH (*Crh* *+/+*, Wild type). Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της ανεπάρκειας της CRH στους δύο διαφορετικούς γονοτύπους μύων σε κατάσταση φλεγμονής.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων από πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων, που προήλθαν από επαγωγή φλεγμονής σε δύο διαφορετικούς γονότυπους μύων (*Crh* *-/-*, Knock out - *Crh* *+/+*, Wild type), με την μέθοδο

ΜΤΤ. Από τα διαγράμματα, που βρίσκονται στην ενότητα «Αποτελέσματα», δεν προκύπτει κάποια διαφορά μεταξύ των μετρήσεων στα δύο μήκη κύματος, τα 550nm και τα 595nm. Παρατηρώντας τα διαγράμματα γίνεται διακριτό ότι εντοπίζεται διαφορά στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων διαφορετικών γονοτύπων κατά την διάρκεια της δεύτερης (48h) και τρίτης (72h) ημέρας. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των *Crh* *+/+* μυών παρατηρείται αρχικά μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού την δεύτερη ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, η οποία ακολουθείται από μία απότομη αύξηση, η οποία εν τέλει καταλήγει σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Στην περίπτωση των *Crh* *-/-* μυών παρατηρείται αρχικά μία αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά την δεύτερη ημέρα, η οποία όμως τελικά τις επόμενες μέρες του πειράματος οδηγείται σε απότομη μείωση. Σύμφωνα με πειράματα που έχουν διεξαχθεί, έχει αποδειχθεί ότι η CRH τείνει να αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων (Benou, C., Wang, Y., Imitola, J., VanVlerken, L., Chandras, C., Karalis, K. P., 2005). Όμως, η παρούσα εργασία έδειξε ότι η ύπαρξη ή απουσία της CRH δεν επηρεάζει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων στους δύο γονότυπους. Βέβαια, θα μπορούσε να επισημανθεί ότι η ανεπάρκεια της CRH, στους *Crh* *-/-* μύες, προκαλεί πιο σύντομη αναστολή του πολλαπλασιασμού ήδη από την τρίτη ημέρα, εν αντιθέσει με τους μύες *Crh* *+/+* που ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων τους μειώνεται σημαντικά την τέταρτη ημέρα.

Για την ενεργοποίηση της κεντρικής αντίδρασης του οργανισμού στην φλεγμονή συμμετέχουν μία πληθώρα πρωτεϊνών, όπως οι κυτοκίνες, καθώς και ένας μεγάλος αριθμός νευροπεπτιδίων. Οι κύριες κυτοκίνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) που εντοπίζονται κυρίως σε φλεγμονώδεις θέσεις και διαθέτουν προ-αναλγητική δράση, και οι οποίες είναι επίσης σε θέση να δράσουν είτε άμεσα είτε έμμεσα, με σκοπό να ενισχύσουν την σύνθεση και την έκκριση της CRH στο επίπεδο του υποθαλάμου (Κυρου Ι. & Tsigos C., 2005). Το νευροπεπτίδιο που μελετήθηκε στην εργασία αυτή ήταν ο νευρικός αυξητικός παράγοντας NGF, η σύνθεση του οποίου μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά σε κατάσταση φλεγμονής (Prencipe G., Minnone G., Strippoli R., De Pasquale L., Petrini S., Caiello I., Bracci-Laudiero L., 2014). Για τον λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να εξετασθούν τα επίπεδα κυτοκινών που παράγονται και εκκρίνονται από τα T λεμφοκύτταρα μετά την επαγωγή περιφερικής φλεγμονής στους δύο διαφορετικούς γονότυπους μυών. Οι παραπάνω κυτοκίνες και νευροπεπτίδια που αναφέρθηκαν, εξετάστηκαν λοιπόν σε επίπεδο πρωτεΐνης για την έκκριση τους με την μέθοδο ELISA αλλά και σε επίπεδο mRNA με την μέθοδο της RT-PCR. Αρχικά με την μέθοδο της RT-PCR εξετάστηκαν το νευροπεπτίδιο NGF και η IL-6, και τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι οι *Crh* $-/-$ μύες χαρακτηρίζονται από υψηλότερη έκλυση NGF, εν συγκρίσει με τους *Crh* $+/+$ μύες που εμφανίζουν μικρότερη έκκριση NGF. Αξίζει να τονιστεί σε αυτό το σημείο ότι η μέθοδος της RT-PCR δεν προσέφερε επιτυχή αποτελέσματα για την Ιντελευκίνη 6 (IL-6). Επιπλέον με την μέθοδο της ELISA μελετήθηκαν οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κατάσταση φλεγμονής οι *Crh* $-/-$ μύες εκλύουν μεγαλύτερες ποσότητες IL-6, εν συγκρίσει με τον TNF- α που παρατηρείται μεγαλύτερη έκκριση του σε *Crh* $+/+$ μύες. Προς έκπληξη μας δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ούτε στην έκκριση ούτε στην σύνθεση τους όπως ελπίζαμε ότι θα δούμε.

Συμπερασματικά λοιπόν με την παρούσα εργασία, και σε συνδυασμό με βιβλιογραφική έρευνα, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η επίδραση της CRH σε κατάσταση φλεγμονής εμφανίζει διαφορές μεταξύ των δύο γονότυπων μυών, αλλά δυστυχώς τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν απέδωσαν σαφείς πληροφορίες.

Βιβλιογραφία

- Aguilera, G.. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 7(2). **2011** doi:10.1515/hmbci.2011.123
- Aguilera G.; Nikodemova M.; Wynn, P. C.; Catt, K. J.. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25(3), 319-329. **2004** doi:10.1016/j.peptides.2004.02.002
- Aird F.; Clevenger C. V.; Prystowsky M. B.; Redei, E.. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7104-7108. **1993** doi:10.1073/pnas.90.15.7104
- Arai M. Characterization of Three Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Catfish: A Novel Third Receptor Is Predominantly Expressed in Pituitary and Urophysis. *Endocrinology*, 142(1), 446-454. **2001** doi:10.1210/en.142.1.446
- Baigent S.. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22(5), 809-820. **2001** doi:10.1016/s0196-9781(01)00395-3
- Benou C.; Wang Y.; Imitola J.; VanVlerken L.; Chandras C.; Karalis, K. P.; Khoury, S. J.. Corticotropin-Releasing Hormone Contributes to the Peripheral Inflammatory Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5407-5413. **2005** doi:10.4049/jimmunol.174.9.5407
- Bradley, J.. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2), 149-160. **2008** doi:10.1002/path.2287
- Elenkov I. J.; Webster E. L.; Torpy D. J.; Chrousos, G. P. Stress, Corticotropin-Releasing Hormone, Glucocorticoids, and the Immune/Inflammatory Response: Acute and Chronic Effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876(1 NEUROENDOCRIN), 1-13. **1999** doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07618.x
- Fekete É. M.; Zorrilla, E. P. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: Ancient CRF paralogs. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(1), 1-27. **2007** doi:10.1016/j.yfrne.2006.09.002
- Grammatopoulos, D. K. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 85-97. **2012** doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01631.x
- Im, E. Corticotropin-releasing Hormone and Its Biological Diversity toward Angiogenesis. *Intestinal Research*, 12(2), 96. **2014** doi:10.5217/ir.2014.12.2.96
- Karalis K.; Muglia L. J.; Bae D., Hilderbrand, H.; Majzoub, J. A. CRH and the immune system. *Journal of Neuroimmunology*, 72(2), 131-136. **1997** doi:10.1016/s0165-5728(96)00178-6
- Kyrou I.; Tsigos C. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Adrenal Glands*, 19-32. **2005** doi:10.1007/3-540-26861-8_3
- Lightman S. L.; Conway-Campbell B. L. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), 710-718. **2010** doi:10.1038/nrn2914
- Majzoub, J. A. Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*, 155(suppl_1), S71-S76. **2006** doi:10.1530/eje.1.02247

- Mastorakos G.; Karoutsou E. I.; Mizamtsidi, M. Corticotropin releasing hormone and the immune/inflammatory response. *European Journal of Endocrinology*, 155(suppl_1), S77-S84. **2006** doi:10.1530/eje.1.02243
- Markella Nezi; George Mastorakos; Zadalla Mouslech. Corticotropin Releasing Hormone And The Immune/Inflammatory Response. *Pub med*. **2015**
- Naugler W. E.; Karin, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 14(3), 109-119. **2008** doi:10.1016/j.molmed.2007.12.007
- Pallai P. V.; Mabilia M.; Goodman, M.; Vale W.; Rivier, J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(22), 6770-6774. **1983** doi:10.1073/pnas.80.22.6770
- Prencipe G.; Minnone G.; Strippoli R.; De Pasquale L.; Petrini S.; Caiello I.; Bracci-Laudiero L. Nerve Growth Factor Downregulates Inflammatory Response in Human Monocytes through TrkA. *The Journal of Immunology*, 192(7), 3345-3354. **2014** doi:10.4049/jimmunol.1300825
- Richards M.; Rademaker, M. Urocortins. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1428-1436. **2013** doi:10.1016/b978-0-12-385095-9.00194-9
- Rittner, H. L. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(6), 1215-1222. **2005** doi:10.1189/jlb.0405223
- Rittner, H.; Stein, C. Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. *European Journal of Pain*, 9(2), 109-112. **2005** doi:10.1016/j.ejpain.2004.05.009
- Sean M. Smith; Wylie W. Vale The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *European Journal of Endocrinology*. **2006** 155 S71–S76
- Silverman M. N.; Pearce B. D.; Biron C. A.; Miller, A. H. Immune Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Viral Infection. *Viral Immunology*, 18(1), 41-78. **2005** doi:10.1089/vim.2005.18.41
- Venihaki, M.; Majzoub, J. Lessons from CRH knockout mice. *Neuropeptides*, 36(2-3), 96-102. **2002** doi:10.1054/npep.2002.0906
- Venihaki, M., Sakihara, S., Subramanian, S., Dikkes, P., Weninger, S. C., Liapakis, G., ... Majzoub, J. A. Urocortin III, A Brain Neuropeptide of the Corticotropin-Releasing Hormone Family: Modulation by Stress and Attenuation of Some Anxiety-Like Behaviours. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(5), 411-422. **2004** doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01170.x
- Venihaki M.; Zhao J.; Karalis, K. P. Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, 141(1-2), 3-9. **2003** doi:10.1016/s0165-5728(03)00183-8
- Venihaki, M.; Zhao J.; Karalis, K. P. Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, 141(1-2), 3-9. **2003** doi:10.1016/s0165-5728(03)00183-8
- Webster E. L.; Torpy D. J.; Elenkov I. J.; Chrousos G. P. Corticotropin-Releasing Hormone and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840(1), 21-32. **1998** doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09545.x

Wu V.; Yuan P. ; Larauche M.; Wang, L.; Million, M. Urocortins. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1346-1353. **2013** doi:10.1016/b978-0-12-385095-9.00183-4

Xing Z.; Gauldie J.; Cox, G.; Baumann, H.; Jordana M.; Lei X. F. ; Achong, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*, 101(2), 311-320. **1998** doi:10.1172/jci1368

Βιβλία

Arthur P. Arnold; Donald W. Pfaff; Anne M. Etgen; Susan E. Fahrbach; Robert T. Rubin (2002). *Hormones, brain, and behavior*. Amsterdam: Academic Press.

Daniel C. Harris (2010), *Ποσοτική και χημική ανάλυση-Τόμος II*, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.