

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

***ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ PC12***

**ΕΙΡΗΝΗ ΧΑΤΖΑΚΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Ερευνητικός σκοπός.....	1
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	2
2.1. Βιολογικά υλικά.....	2
Κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυττώματος επίμυων PC12.....	2
2.2. Μέθοδοι.....	3
2.2.1. Ξεπάγωμα κυτταρικής σειράς PC12.....	3
Υλικά και συσκευές.....	3
Διάλυμα.....	3
Μέθοδος.....	3,4
2.2.2. Καλλιέργεια (ανακαλλιέργεια) κυτταρικής σειράς PC12.....	4
Υλικά και συσκευές.....	4
Διάλυμα.....	4
Μέθοδος.....	4,5
2.2.3. Μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC12 με: (α) χρήση trypan blue (αιματοκυτταρομετρία) και (β) χρήση MTT.....	5,6,7,8
Υλικά και συσκευές.....	5
Διαλύματα.....	6
(α) Μέθοδος.....	7
(β) Μέθοδος.....	7,8
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	9,10

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Ερευνητικός σκοπός.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε βιολογικά υλικά. Για τη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν τα νευροενδοκρινικά κύτταρα PC12, ως *in vitro* μοντέλο. Η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC12 έγινε σε βασικές και επαγόμενες συνθήκες (συνθήκες έλλειψης τροφικών παραγόντων, επίδραση νευροπεπτιδίων). Τα νευροπεπτίδια που επιλέχθηκαν ήταν η CRH, η UCN (νευροπεπτίδιο της οικογένειας της CRH), καθώς και συνδυασμός αυτών, σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC12 με χρήση της trypan blue (αιματοκυτταρομετρία) και του 3-(4,5-διμεθυλ θιαζολ-2-yl),-2,5-διφαινυλ τετραζολίου (MTT). Πρόκειται για αρκετά διαδεδομένες πειραματικές μεθόδους. Η παρούσα εργασία, θα εξετάσει αν η επίδραση των παραπάνω νευροπεπτιδίων της οικογένειας της CRH μεταβάλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων PC12.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Βιολογικά υλικά.**

#### **Κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυττώματος επίμυος (PC12).**

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά PC12. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καλά διαφοροποιημένο φαιοχρωμοκύττωμα επίμυων (όγκος της μυελώδους μοίρας των επινεφριδίων) που καλλιεργήθηκε αρχικά *in vivo* και έπειτα *in vitro* μέχρι την απομόνωση ενός κλώνου των κυττάρων, που ονομάστηκε PC12 (Greene & Tischler, 1976). Τα κύτταρα PC12 διατηρούν αρκετά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών χρωμιόφιλων κυττάρων του μυελού των επινεφριδίων (Venihaki, Gravanis & Margioris, 1997). Για παράδειγμα, συνθέτουν κατεχολαμίνες, κυρίως νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη, που τις αποθηκεύουν σε εκκριτικά κοκκία. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα PC12, όπως και τα ανθρώπινα φαιοχρωμοκυττώματα, καθώς ωριμάζουν εν απουσία NGF, παραμένουν μικρότερα από τους νευρώνες και δεν εμφανίζουν νευρικές απολήξεις. Αντιθέτως, με την παρουσία NGF διαφοροποιούνται σε πληθυσμό νευρικών συμπαθητικών κυττάρων μη πολλαπλασιαζόμενων, με δημιουργία νευραξόνων, δενδριτικών προεκβολών και ψευδοσυνάψεων. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος (PC12) αποτελεί ένα εδραιωμένο μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στον πολλαπλασιασμό, τόσο σε φυσιολογικά, όσο και σε νεοπλασματικά χρωμιόφιλα κύτταρα.

## **2.2. Μέθοδοι.**

### **2.2.1. Ξεπάγωμα κυτταρικής σειράς PC12.**

#### **Υλικά και συσκευές**

RPMI (GIBCO-BRL Co, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FCS ( GIBCO, USA)

Ορός αλόγου: Horse Serum (GIBCO, USA)

Πενικιλίνη/Στρεπτομικίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO, USA)

L-γλουταμίνη: L-Glutamine (GIBCO, USA)

N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ: HEPES (GIBCO, USA)

Πλαστικό καλλιέργειών: Φλάσκα καλλιέργειας: 25 cm<sup>2</sup>

Tubes των 15ml

Φυγόκεντρος

#### **Διάλυμα**

##### Θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς PC12:

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται περιέχει RPMI, 10% ορό αλόγου, 5% ορό εμβρύου βοός (FCS), 2 mM L-γλουταμίνη, 15 mM N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2- αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομικίνη).

#### **Μέθοδος**

Το ξεπάγωμα των κυττάρων γίνεται μέσα σε hood, που παρέχει τις συνθήκες αποστειρωμένου περιβάλλοντος, ώστε να αποφεύγονται τυχόν μολύνσεις. Αρχικά, τα κύτταρα φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C, σε διάφορα stocks σε erpendorfs, πάνω στα οποία αναγράφεται η ημερομηνία παγώματος και το passage της κυτταρικής σειράς. Το erpendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για περίπου 1-2 λεπτά, προκειμένου να ξεπαγώσουν τα κύτταρα. Έπειτα, τοποθετούνται 10 ml θρεπτικού υλικού σε ένα tube των 15 ml και προστίθεται και το περιεχόμενο του erpendorf με τα κύτταρα. Το θρεπτικό υλικό είναι απαραίτητο για την αραιώση του DMSO -το οποίο εμπεριέχεται στο υλικό παγώματος- ώστε να μην είναι τοξικό για τα κύτταρα. Το παραπάνω διάλυμα περνά από φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση αδειάζουμε το υπερκείμενο

διάλυμα και προσθέτουμε 10-15 ml θρεπτικού υλικού στο ίζημα (κύτταρα). Το διάλυμα ανακινείται μέχρι να γίνει ομοιογενές. Κατόπιν το εναίωρημα των κυττάρων τοποθετείται σε φλάσκα των 25 cm<sup>2</sup>. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα και υγρασία 100% όπου παραμένουν για περίπου 1-2 εβδομάδες σε συνεχή καλλιέργεια.

### **2.2.2. Καλλιέργεια (ανακαλλιέργεια) κυτταρικής σειράς PC12.**

#### **Υλικά και συσκευές**

RPMI (GIBCO-BRL Co, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FCS (GIBCO, USA)

Ορός αλόγου: Horse Serum (GIBCO, USA)

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO, USA)

L-γλουταμίνη: L-Glutamine (GIBCO, USA)

N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ: HEPES (GIBCO, USA)

Πλαστικά καλλιέργειών: Φλάσκες καλλιέργειας: 75 cm<sup>2</sup>

Tubes των 50ml

Φυγόκεντρος

#### **Διάλυμα**

Θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς PC12:

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται περιέχει RPMI, 10% ορό αλόγου, 5% ορό εμβρύου βοός (FCS), 2 mM L-γλουταμίνη, 15 mM N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη).

#### **Μέθοδος**

Τα κύτταρα παραμένουν σε επωαστικό κλίβανο για 1-2 εβδομάδες πριν χρησιμοποιηθούν σε πείραμα. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες και τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε εβδομάδα. Προκειμένου να γίνει ανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς PC12, τα κύτταρα ανακινούνται ελαφριά στην φλάσκα καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με το πλαστικό, γι' αυτό και ξεκολλάει

εύκολα με απλή ανακίνηση. Το εναιώρημα που προκύπτει περνά από φυγοκέντρηση, στις 800 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά. Έπειτα, αδειάζουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα (κύτταρα) προσθέτουμε νέο θρεπτικό υλικό και αναδεύουμε καλά. Το διάλυμα με τα κύτταρα διαμοιράζεται σε φλάσκες καλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο. Το θρεπτικό τους υλικό συνεχίζει να ανανεώνεται, έως ότου τα κύτταρα φθάσουν τον αριθμό που απαιτείται για την πειραματική μας τεχνική. Πρέπει να σημειωθεί ότι με την ανακαλλιέργεια των κυττάρων αλλάζει και το passage τους κατά αύξοντα αριθμό.

### **2.2.3. Μέθοδος μέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC12 με:**

**(α) χρήση της trypan blue (αιματοκυτταρομετρία )**

**(β) χρήση του βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλ θιαζολ-2-yl)-2,5-διφαινυλ τετραζολίου (MTT).**

#### **Υλικά και συσκευές**

RPMI (GIBCO-BRL Co, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FCS (GIBCO, USA)

Ορός αλόγου: Horse Serum (GIBCO, USA)

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO, USA)

L-γλουταμίνη: L-Glutamine (GIBCO, USA)

N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ: HEPES (GIBCO, USA)

Αλβουμίνη ορού βοός: Albumin Bovine (BSA) (Sigma,USA)

Βρωμιούχο (3-(4,5-διμεθυλ θιαζολ-2-yl)-2,5-διφαινυλ τετραζόλιο): MTT (Sigma,USA)

Ισοπροπανόλη, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCL (Merk, Germany)

NaCl (Sigma,USA)

HCL (Sigma, USA)

Tubes των 50ml

96-wells plate

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή: Πλάκα Neubauer

Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

Φωτόμετρο: ELISA Reader (Anthos Reader 2001)

### **Διαλύματα**

#### **Θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς PC12 (με ορό):**

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται περιέχει RPMI, 10% ορό αλόγου, 5% ορό εμβρύου βοός (FCS), 2 mM L-γλουταμίνη, 15 mM N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2- αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομικίνη).

#### **Θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς PC12 (χωρίς ορό):**

Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει RPMI, 2 mM L-γλουταμίνη, 15 mM N-2-υδροξυαιθυλπιπεραζίνη N-2- αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) και 1% αντιβιοτικό διάλυμα (100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομικίνη). Σε μια μικρή ποσότητα από το διάλυμα με τα παραπάνω συστατικά, διαλύεται BSA 0,1%. Είναι δύσκολο να διαλυθεί και γι' αυτό ανακινείται αρκετά (vortex). Έπειτα, περνά από φιλτράρισμα με μικρό φίλτρο και σύριγγα μέσα στην hood και τοποθετείται στο υπόλοιπο διάλυμα.

#### **Διάλυμα trypan blue:**

Για την παρασκευή του διαλύματος, 0,4g trypan blue διαλύονται σε H<sub>2</sub>O. Έπειτα, προστίθενται 0,81g NaCl και 0,06g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS):**

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl και 2,7 mM KCl διαλύονται σε H<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,4. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 25°C.

#### **Διάλυμα MTT:**

Το MTT διαλύεται σε PBS σε συγκέντρωση 5 mg/ml και στη συνέχεια διηθείται πριν τη χρήση του, για να αποστειρωθεί και να διαλυθούν τυχόν αδιάλυτα σωματίδια. Είναι φωτοευαίσθητο, γι' αυτό φυλάσσεται σε σκοτεινή φιάλη στους 4°C.

#### **Διάλυμα HCl/ισοπροπανόλης:**

Προστίθεται 1 ml HCl σε 250 ml ισοπροπανόλης. Δεν χρειάζεται αποστείρωση. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



### **(α) Μέθοδος**

Η μέθοδος της αιματοκυτταρομετρίας αποτελεί μια από τις συχνότερες μεθόδους προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας των ουσιών. Βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακέραιη την κυτταρική τους μεμβράνη, η οποία εμποδίζει την είσοδο χρωστικών ουσιών, συγκεκριμένα της trypan blue. Η μέθοδος έχει ως εξής: Αρχικά, τα κύτταρα -που καλλιεργούνται στον επωαστικό κλίβανο- ανακινούνται ελαφρά μέσα στην φλάσκα καλλιέργειας. Το εναιώρημα που προκύπτει περνά από σύριγγα, για να σπάσουν τα διάφορα συσσωματώματα μεταξύ των κυττάρων και να μπορέσουμε να τα μετρήσουμε με ευκολία. Το περιεχόμενο της σύριγγας τοποθετείται σε tube των 50 ml. Από αυτό παίρνουμε 10 μl σε ένα erpendorf και σε αυτήν την ποσότητα προσθέτουμε 90 μl trypan blue σε αραιώση 1:10. Αναδεύουμε το περιεχόμενο του erpendorf, από το οποίο θα πάρουμε μια ποσότητα, για να προσδιορίσουμε τον αριθμό των κυττάρων. Μικρή ποσότητα από το διάλυμα του erpendorf (10 μl κύτταρα και 90 μl trypan blue) τοποθετείται σε αιματοκυτταρομετρητή (πλάκα Neubauer). Οι μετρήσεις των ζωντανών κυττάρων γίνονται με τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγάλυνση 10x (τα βαμμένα κύτταρα είναι νεκρά). Ο αριθμός που προκύπτει από την μέτρηση των κυττάρων (μέσος όρος μετρήσεων), ανάγεται στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στο αρχικό μας διάλυμα με την εξής μαθηματική σχέση:

$$\text{Κύτταρα/ml} = \text{Μέσος όρος μετρήσεων} \times \text{συντελεστής αραιώσης} \times 10^4.$$

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{Κύτταρα/ml}) \times \text{όγκο αρχικού διαλύματος}.$$

### **(β) Μέθοδος**

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μικροκυψελίδες (wells) επίπεδου πυθμένα (96-wells plate), σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα ανά κυψελίδα. Τα κύτταρα παραμένουν στον επωαστικό κλίβανο για 1-2 ημέρες. Κατόπιν, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε νέο, το οποίο περιέχει ή όχι (κύτταρα αναφοράς) τις προς μέτρηση ουσίες. Τα κύτταρα επωάζονται στο κλίβανο από 1 έως 4 ημέρες. Η διαδικασία μέτρησης του πολλαπλασιασμού έχει ως εξής: Απομακρύνεται το υλικό καλλιέργειας και προστίθεται νέο (100 μl), το οποίο δεν περιέχει ορό αλλά BSA σε τελική συγκέντρωση 1%. Τα κύτταρα παραμένουν στον κλίβανο στους 37°C για ½ έως 1 ώρα. Έπειτα, προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα MTT (11 μl) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθεται διάλυμα HCl/ισοπροπανόλης σε κάθε μικροκυψελίδα και

αναδεύεται καλά για να διαλυθούν οι κρύσταλλοι. Το χρώμα μετράται σε φωτόμετρο ELISA, σε μήκος κύματος 600nm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις μέρες του πειράματος (1-4 ημέρες).

### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε γενικές γραμμές, η πειραματική μέθοδος του MTT που αναλύθηκε παραπάνω έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση του πολλαπλασιασμού πολλών κυτταρικών τύπων (Mosmann, 1983). Στηρίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου (MTT) σε κρυσταλλική ένωση. Ο μεταβολισμός γίνεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων με χρήση του ενζύμου σουκινική δεϋδρογενάση (succinate-dehydrogenase). Οι κρύσταλλοι που παράγονται, μετά την ενζυματική δραστηριότητα, μπορούν να διαλυθούν με HCl/ισοπροπανόλη, δίνοντας ένα διάλυμα κόκκινου χρώματος. Η ένταση του τελευταίου μετράται με φωτόμετρο ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη μέθοδο, δεν είναι η μοναδική για την μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Υπάρχουν και άλλες μέθοδοι για τον ίδιο ερευνητικό σκοπό. Μερικές από αυτές είναι οι αμέσως παρακάτω: Η χρήση του κυτταρομετρητή ροής, η μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού κυττάρων με τη χρήση της trypan blue (αναλύθηκε παραπάνω) και η μέθοδος μέτρησης με μεταβολισμό διαφόρων αλάτων του τετραζολίου, όπως: XTT, MTS και WST-1. Από τις παραπάνω μεθόδους, η μέθοδος της trypan blue είναι η πιο διαδεδομένη αλλά παρουσιάζει μικρή ευαισθησία.

Η μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού με χρήση του MTT έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί γιατί είναι απλή, τα υλικά που χρησιμοποιούνται δεν είναι αρκετά ακριβά και ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται για τις μετρήσεις είναι μικρός. Επίσης, είναι σχετικά γρήγορη, αν ληφθεί υπόψη ότι το χρονικό διάστημα επώασης με MTT δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο. Έχει καλή επαναληψιμότητα, δεδομένου ότι η τυπική απόκλιση (SD) της απορρόφησης κυμαίνεται στο  $\pm 5\%$ , μεγάλη ευαισθησία (Carmichael, DeGraff, Gazdar, Minna & Mitchell, 1987) και είναι αρκετά αξιόπιστη, διότι μετρά τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Mosmann, 1983). Για τους λόγους αυτούς, κυρίως, θα χαρακτηρίζαμε την πειραματική μέθοδο μέτρησης με επώαση MTT ως την πλέον κατάλληλη για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού κυττάρων PC12. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί και το αρνητικό της σημείο, το οποίο είναι το γεγονός ότι σε διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους δεν εμφανίζει

επαναληψιμότητα, αλλά μια αυξανόμενη ευαισθησία με την παρατεταμένη επώαση με MTT (Denizot & Lang, 1986). Βέβαια, γίνεται προσπάθεια για μελλοντική βελτίωση όλων των πειραματικών μεθόδων, ώστε τα αποτελέσματά τους να αποκτούν όλο και μεγαλύτερη αξιοπιστία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Carmichael, J., DeGraff, W., Gadzar, A., Minna, J., and Mitchell, J. (1987). Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing, *Cancer Res* 47, 936-942.
- Denizot, F., and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immun Meths*, 89, 271-277
- Greene, L., and Tischler, A. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.
- Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, Elsevier
- Venihaki, M., Gravanis, A., and Margioris, A. (1997). Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone, *Endocrinology* 138, 698-704.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- BSA:** Albumin Bovine (Αλβουμίνη ορού βοός)
- CRH:** Corticotropin Releasing Hormone (Εκλυτική Ορμόνη της Κορτικοτροπίνης)
- DMSO:** Dimethyl Sulfoxide (διμεθυλ σουλφοξείδιο)
- ELISA:** Enzyme-linked immynosorbet assay (Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση)
- FCS:** Fetal Calf Serum (Ορός εμβρύου βοός)
- HEPES:** 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ)
- MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλ-2-yl)-2,5-διφαινυλ τετραζόλιο)
- NGF:** Nerve Growth Factor (Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας)
- PBS:** Phosphate Buffer Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
- RPMI:** RPMI Medium 1640 (Θρεπτικό υλικό)
- SD:** Standard Deviation of means (Τυπική απόκλιση μέσων όρων)
- UCN:** Urocortin (Ουροκορτίνη)