



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΠΛΗΓΜΑΤΟΣ 70 (Hsp70) ΣΤΟ
ΣΤΡΕΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΘΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της παρούσας πτυχιακής εργασίας στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που με βοήθησαν σε αυτή μου την προσπάθεια. Κατ'αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου κ.Βενυχάκη Μαρία τόσο για την εμπιστοσύνη και την κατανόηση που μου έδειξε καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Στάθηκε δίπλα μου σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπιζα και προσπαθούσε να με καθυσηχάσει και να λύσει κάθε μου απορία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ.Θερμού και τον λέκτορα κ.Χαραλαμπίδου που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή μου επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις κοπέλες του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που φρόντιζαν να προσφέρουν. Πιο αναλυτικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Καραγιάννη Εφη, Ολγα Ρασσούλη, Κατερίνα Ρομανού, Χριστίνα Δοξάκη και Ελένη Βεργαδή. Πολλά ευχαριστώ επίσης στην Ελευθερία Ιερωνυμάκη και την Κλαίρη Ψυλάκη για τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε όλον αυτόν τον καιρό.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στο Γιάννη που τα τελευταία χρόνια δέχεται με υπομονή τις ψυχολογικές μου μεταπτώσεις και με κάνει να θέλω να γίνομαι καλύτερη.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου για όσα μου έχουν προσφέρει τα τελευταία 25 χρόνια και κυρίως γιατί πιστεύουν σε μένα περισσότερο απ'ότι εγώ στον εαυτό μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|---|-----------|
| 1.1 ΕΝΝΟΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ | ΣΕΛ. 7-8 |
| 1.1.1 ΑΞΟΝΑΣ ΥΓΕ-ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ- ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΠΟΝΟΣ | ΣΕΛ.8-9 |
| 1.1.2 ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ | ΣΕΛ.9 |
| 1.1.3 ΥΠΟΦΥΣΗ | ΣΕΛ.10 |
| 1.1.4 ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ | ΣΕΛ.10 |
| 1.1.5 ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH) | ΣΕΛ.10-11 |
| 1.1.5.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRF ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ) | ΣΕΛ.11 |
| 1.1.6 ΦΛΟΙΟΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ (ΑCΤΗ) | ΣΕΛ.12 |
| 1.1.7 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ | ΣΕΛ.12-13 |
| 1.2 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΠΛΗΓΜΑΤΟΣ (HEAT SHOCK PROTEINS-HSPs) | ΣΕΛ.14-15 |
| 1.2.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΠΛΗΓΜΑΤΟΣ (HSPs) | ΣΕΛ.15-17 |
| 1.2.2 ΠΡΩΤΕΙΝΗ Hsp70 | ΣΕΛ.17-18 |
| 1.2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ HSP70 | ΣΕΛ.18-19 |
| 1.2.4 ΥΓΕ ΑΞΟΝΑΣ ΚΑΙ HSPs | ΣΕΛ.19 |
| 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | |
| 2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ | ΣΕΛ.24 |
| 2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RESTRAINT) | ΣΕΛ.25 |
| 2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΠΟΝΟΥ | ΣΕΛ.25-26 |
| 2.4 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ | ΣΕΛ.26-27 |

| | |
|---|------------------|
| 2.5 ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ (RadiolimmunoAssay) ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ | ΣΕΛ.27-28 |
| 2. 6 ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ | ΣΕΛ.28 |
| 2. 7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA | ΣΕΛ.28-29 |
| 2.8 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | ΣΕΛ.29 |
| 2.9 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) | ΣΕΛ.29-30 |
| 2. 10 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR) | ΣΕΛ.30-31 |
| 2. 11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ | ΣΕΛ.31-33 |
| 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | |
| 3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ HSP70 ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΥΕ ΑΞΟΝΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΑΤΑΤΕΤΑΜΕΝΟ ΣΤΡΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ | ΣΕΛ.35 |
| 3.1.1 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.35-36 |
| 3.1.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRF1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.36-37 |
| 3.1.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ POMC ΣΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.37-38 |
| 3.1.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ StAR ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.38-39 |
| 3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ | ΣΕΛ.39-40 |
| 3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΖΩΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ 15 ΛΕΠΤΑ | ΣΕΛ.40-41 |
| 3.4 ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ | ΣΕΛ.41 |
| 3.4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.41-42 |
| 3.4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRF1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.42-43 |

| | |
|--|-------------------|
| 3.4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΡΟΜC ΣΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.43-44 |
| 3.4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ StAR ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ | ΣΕΛ.44-45 |
| 3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ | ΣΕΛ.45-46 |
| 3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ HSP70 ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΣΤΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΠΟΝΟΥ | ΣΕΛ.47 |
| 3.6.1 ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA | ΣΕΛ.48 |
| 3.6.2 ΕΞΙ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA | ΣΕΛ.48-49 |
| 3.6.3 ΕΙΚΟΣΙ ΤΕΣΣΕΡΕΙΣ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA | ΣΕΛ.49-50 |
| 3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΖΩΑ 6 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ | ΣΕΛ.50 |
| 3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ | ΣΕΛ.50 |
| 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ | ΣΕΛ. 52-55 |
| 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | ΣΕΛ.56-58 |

ABSTRACT

Hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis is the main endocrine axis regulating the stress response including inflammation. Heat Shock protein (HSP) expression is vital to cellular and tissue protection after stress or injury. The 70-kDa heat shock protein (HSP70) family is a group of proteins that are critical for protein assembly, folding, and transport. Furthermore, HSP70 are involved in the inflammatory stress. Based on the above, the aim of the present study was to evaluate the role of HSP70 on the hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis during stress. For our studies we used the *Hsp70* deficient mice (*Hsp70*^{-/-}) and their wildtype littermates (*Hsp70*^{+/+}) which were subjected to restraint and inflammatory pain. Our results showed that *Hsp70*^{-/-} mice had lower levels of CRH and POMC mRNA levels compared to *Hsp70*^{+/+} mice under basal conditions and following restraint for 3 hrs. However, plasma glucocorticoid levels did not differ between the two genotypes under basal conditions and following stress. Similarly no differences were observed between the two genotypes following 15 min of restraint. Moreover, six hours after injection with CFA, pain threshold was reduced in *Hsp70*^{-/-} mice in contrast to wildtype mice. Corticosterone levels, at the same time point, were reduced in *Hsp70*^{-/-} mice compared to their wildtype littermates. Our results indicate a role of HSP70 on the activation of the HPA axis during stress. The mechanism of action of HSP70 on the HPA axis activity is under investigation.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποθαλαμικός-υποφυσικός επινεφριδιακός άξονας αποτελεί το κυριότερο ενδοκρινικό άξονα που εμπλέκεται στην απόκριση του οργανισμού στο στρες αλλά και στη φλεγμονή. Η έκφραση των Hsp πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για την επιβίωση των κυττάρων ύστερα από την έκθεση σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Η οικογένεια των Hsp70 αποτελείται από πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση, τη σταθεροποίηση και τη μεταφορά άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών. Βασισμένοι σε όλα τα παραπάνω σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξακριβώσουμε το ρόλο των Hsp70 πρωτεϊνών στον υποθαλαμικό-υποφυσικό-επινεφριδιακό άξονα κατά τη διάρκεια του στρες. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά ζώα Hsp70 -/- και αγρίου τύπου (Hsp70 +/-), στα οποία πραγματοποιήθηκαν πειράματα περιορισμού και φλεγμονώδους πόνου. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα Hsp70 -/- ζώα εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα CRH και POMC σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου, τόσο σε κανονικές συνθήκες όσο και ύστερα από τρίωρο πείραμα περιορισμού. Αντίθετα, τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στον ορό του αίματος δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο γονοτύπων, τόσο σε κανονικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των γονοτύπων μετά από 15λεπτο πείραμα περιορισμού. Επίσης, έξι ώρες μετά την ένεση με CFA, ο χρόνος αντίδρασης είχε μειωθεί στα Hsp70 -/- σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών την ίδια χρονική στιγμή. Όλα τα παραπάνω προτείνουν την εμπλοκή των Hsp70 πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του υποθαλαμικού-υποφυσικού-επινεφριδιακού άξονα κατά τη διάρκεια του στρες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΝΝΟΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ

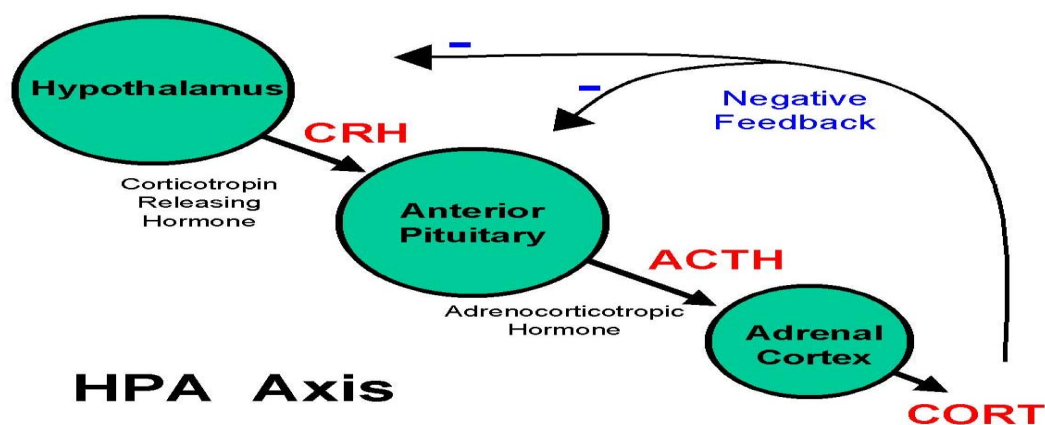
Το στρες αποτελεί μία θεμελιώδη διεργασία που επηρεάζει όλους τους οργανισμούς, από τα απλούστερα βακτήρια και πρωτόζωα, έως τους πιο πολύπλοκους ευκαρυώτες όπως τα θηλαστικά. Ο όρος στρες αναφέρεται σε μία τυπική αμυντική αντίδραση η οποία επιτελείται κάθε φορά που ένας οργανισμός βρίσκεται σε μία κρίσιμη κατάσταση είτε **ψυχολογική** (πχ λύπη,) ή **οργανική (σωματική)** (πχ Ασθένεια, τραύμα). ή τέλος συνδυασμός και των δύο (ο πόνος και άλλες οργανικές συνέπειες μιας αρρώστιας συνδυάζονται με στενοχώρια και ανησυχία). Συμπερασματικά το στρες αποτελεί τη μη ειδική απόκριση του σώματος σε κάθε απαίτηση.

Η πιο άμεση απόκριση του οργανισμού απέναντι στο στρες είναι η ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.[1]. Πράγματι, στρεσογόνες καταστάσεις ενεργοποιούν στο εγκέφαλο νεύρα που ξεκινούν από το εγκεφαλικό στέλεχος με τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωση επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης από τα επινεφρίδια. Η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών αυτών ελέγχει την αντίδραση του οργανισμού, είτε για μάχη είτε για φυγή, ως απόκριση στον κίνδυνο. Η κατάσταση αυτή γίνεται αντιληπτή από το άτομο ως εφίδρωση, μούδιασμα, αύξηση των παλμών και της αρτηριακής πίεσης και ένα γενικευμένο αίσθημα φόβου. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν λόγω ενεργοποίησης υποδοχέων στα αιμοφόρα αγγεία, προκαλώντας τη συστολή τους και επομένως την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Η ενεργοποίηση του «κυκλώματος» που συνδέει τη περιφέρεια με τον εγκέφαλο και ονομάζεται υποθαλαμικός- υποφυσιακός- επινεφριδιακός άξονας (ΥΥΕ) αποτελεί τη νευροενδοκρινική απόκριση του οργανισμού στο στρες. [2] Ο ΥΥΕ άξονας συνδέει, όπως διαφαίνεται από το όνομά του, τον **υποθάλαμο**, την **υπόφυση** και το **φλοιό των επινεφριδίων** και μέσω της αιματικής ροής μεταφέρει εξειδικευμένες ορμόνες.

Κύριο ρόλο στον ΥΥΕ άξονα κατέχει ο υποθάλαμος, ο οποίος ελέγχει την σύνθεση πολλών ορμονών. Δέχεται σημαντικές προβολές από περιοχές που επεξεργάζονται την πληροφορία σχετικά με το συναίσθημα, όπως η αμυγδαλή και από περιοχές του στελέχους που ελέγχουν απαντήσεις του συμπαθητικού συστήματος και εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (corticotrophin-releasing hormone or factor **CRH** ή **CRF**) και την αντιδιουρητική ορμόνη (AVP). Συνοπτικά, το στρες χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης

(CRH) από τον υποθάλαμο η οποία στη συνέχεια μέσω της έκκρισης της αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) από την υπόφυση οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια (κορτικοστερόνης στα τρωκτικά και κορτιζόλης στα πρωτεύοντα). Ο ρόλος τους συνίσταται στην προετοιμασία του οργανισμού για την ανάπτυξη ομοιοστατικών μηχανισμών για την επιβίωση του. Επιπρόσθετα, τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν στην υπόφυση αναστέλλοντας την έκκριση της ACTH, συμμετέχοντας στη λειτουργία ενός συστήματος παλίνδρομης αλληλορύθμισης. [3]



ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική αναπαράσταση του υποθαλαμικού-υπόφυσικού-επινεφριδιακού άξονα (HPA)

1.1.1 ΑΞΟΝΑΣ ΥΓΕ-ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ-ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΠΟΝΟΣ

Ο έλεγχος της φλεγμονώδους αντίδρασης που απαιτεί τη συνεργασία νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος γίνεται μέσω κοινών μορίων όπως νευροπεπτίδια, κυτοκίνες και υποδοχείς[4]. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, ο ΥΓΕ αποτελεί το σημαντικότερο ενδοκρινικό άξονα για την απόκριση του οργανισμού στο στρες αλλά και για τη φλεγμονώδη διαδικασία. Τελικό προϊόν του άξονα του στρες είναι η έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια, τα οποία αποτελούν τον κυριότερο ενδογενή αντιφλεγμονώδη παράγοντα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν αρνητικά ένα μεγάλο αριθμό προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, κυτοκίνες, ενώ έχει δειχθεί ότι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο

TNF-α και οι ιντερλευκίνες 1 (IL-1) και 6 (IL-6) ενεργοποιούν απευθείας τον ΥΥΕ άξονα προκαλώντας αύξηση της έκκρισης της CRH, της ACTH και των γλυκοκορτικοειδών [5].

Τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια, όπως οι ενδορφίνες, μειώνουν την αίσθηση του πόνου μέσω αλληλεπίδρασης τους με ειδικούς οπιοειδείς υποδοχείς εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ τα οπιοειδή πεπτίδια που απελευθερώνονται στην περιφέρεια κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, επάγουν την αναλγησία μετά από πρόσδεση σε υποδοχείς περιφερικών αισθητικών νευρών.

1.1.2 ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ

Από ανατομική άποψη, ο υποθάλαμος βρίσκεται κάτω από το θάλαμο, όπου μαζί σχηματίζουν το διεγκέφαλο. Αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό πυρήνων με μια ποικιλία λειτουργιών. Μια από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του είναι η σύνδεση του νευρικού συστήματος με το ενδοκρινικό σύστημα μέσω της υπόφυσης. Είναι υπεύθυνος για ορισμένες διεργασίες του μεταβολισμού και του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Συνθέτει και εκκρίνει ορισμένες ορμόνες που ονομάζονται υποθαλαμικές-εκλυτικές ορμόνες, όπου με τη σειρά τους ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκκριση των ορμονών της υπόφυσης.

Οι κύριες λειτουργίες του υποθαλάμου είναι :

- Ρύθμιση του μεταβολισμού του σώματος
- Έλεγχος αισθήματος δίψας, πείνας και θερμοκρασίας
- Συμβολή στο κερκάρδιο ρυθμό
- Έλεγχος αυτόνομου νευρικού συστήματος
- Έλεγχος της υπόφυσης

1.1.3 ΥΠΟΦΥΣΗ

Η υπόφυση είναι ένας ενδοκρινής αδένας στο κάτω μέρος του υποθαλάμου και χωρίζεται στην αδενουπόφυση και την νευρουπόφυση. Ελέγχει την έκκριση εννέα διαφορετικών ορμονών. Από την αδενουπόφυση εκκρίνονται οι ορμόνες : θυρεοτρόπος ορμόνη που ελέγχει το θυρεοειδή, κορτικοτρόπος ορμόνη που ελέγχει τα επινεφρίδια, αυξητική ορμόνη που ελέγχει τα οστά, γοναδοτροπίνες που ελέγχουν τους όρχεις και τις ωοθήκες και προλακτίνη που ελέγχει τους μαστικούς αδένες. Από την νευρουπόφυση εκκρίνονται οι ορμόνες ωοκυτίνη που ελέγχει τη λειτουργία της μήτρας και η αντιδιουρητική ορμόνη που ελέγχει τους νεφρούς.

1.1.4 ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ

Πρόκειται για ένα ζεύγος αδένων με βάρος 4-6 γραμμάρια ο καθένας που βρίσκονται στο πάνω μέρος των νεφρών. Το σχήμα τους είναι ακανόνιστα τριγωνικό. Η κεντρική τους μοίρα αποτελεί το μυελό και η περιφερική το φλοιό. Ο φλοιός των επινεφριδίων διαιρείται σε τρεις ζώνες (σπειροειδής, στηλιδωτή και δικτυωτή ζώνη) και είναι υπεύθυνος για τη βιοσύνθεση των κορτικοειδών κι ανδρογόνων και ο μυελός των επινεφριδίων παράγει κατεχολαμίνες. Σχεδόν όλο το ποσό της επινεφρίνης (ορμόνη) προέρχεται από το μυελό των επινεφριδίων, ενώ μόνο το 2% της νορεπινεφρίνης (νευροδιαβιβαστής) εκκρίνεται από το μυελό και το υπόλοιπο 98% από τις απολήξεις των γαγγλιακών νευρώνων.

1.1.5 ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRH)

Είναι γνωστή και σαν εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (corticotrophin releasing factor- CRF). Ανήκει στην CRH-σχετιζόμενη οικογένεια νευροπεπτιδίων (CRH-related family) μαζί με την ουροκορτίνη (Ucn), ουροκορτίνη II (Ucn II) και ουροκορτίνη III (UcnIII) και εμπλέκονται σε διεργασίες όπως το στρες, η φλεγμονή, η λιπογένεση και η αγγειογένεση.[6] Το υποθαλαμικό αυτό πεπτίδιο που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το 1981, αποτελείται από 41 αμινοξέα. Μελέτες τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον άνθρωπο, έχουν δείξει ότι η CRH ρυθμίζει εκτός από την έκκριση της ACTH και τις συμπεριφορικές επιδράσεις του στρες. [7] Αν και η κυριότερη πηγή για την έκκριση του CRH είναι ο παρακοιλιακός πυρήνας του

υποθαλάμου (PVN), εντούτοις η σύνθεσή του έχει εντοπιστεί και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως η αμυγδαλή, ο υπομέλανας τόπος και ο φλοιός. Σε περιφερειακούς ιστούς η CRH έχει εντοπιστεί στα επινεφρίδια, στις ωοθήκες, στους όρχεις, στο έντερο, στη καρδιά, στους πνεύμονες, στον σπλήνα (κυρίως στα T-λεμφοκύτταρα) αλλά και στον πλακούντα [8].

1.1.5.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ (CRF ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ)

Η CRH και τα συγγενή προς αυτή πεπτίδια ασκούν τις δράσεις τους μέσω της αλληλεπίδρασης τους με δύο τύπους υποδοχέων, τους CRF1 και CRF2, οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτείνες (G-protein coupled receptor) και αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Οι δύο αυτοί τύποι υποδοχέων μοιράζονται 70% ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων κυρίως στις θέσεις σύζευξης με τις G-πρωτείνες και της μεταγωγή σήματος. [6]

Ο CRF1 τύπος υποδοχέα είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 415 αμινοξέα ευρέως κατανομημένη τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) όσο και στην περιφέρεια. Υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές του CRF1 υποδοχέα (CRF1 a-h) οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα της CRF1 a ισομορφής. Η λειτουργία αυτών των διαφορετικών ισομορφών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Ο CRF1 τύπος υποδοχέα συνδέεται με την CRH και την ουροκορτίνη I (Ucn) με μεγάλη συγγένεια αλλά δεν αναγνωρίζει την ουροκορτίνη II (UcnII) και την ουροκορτίνη III (UcnIII). [6]

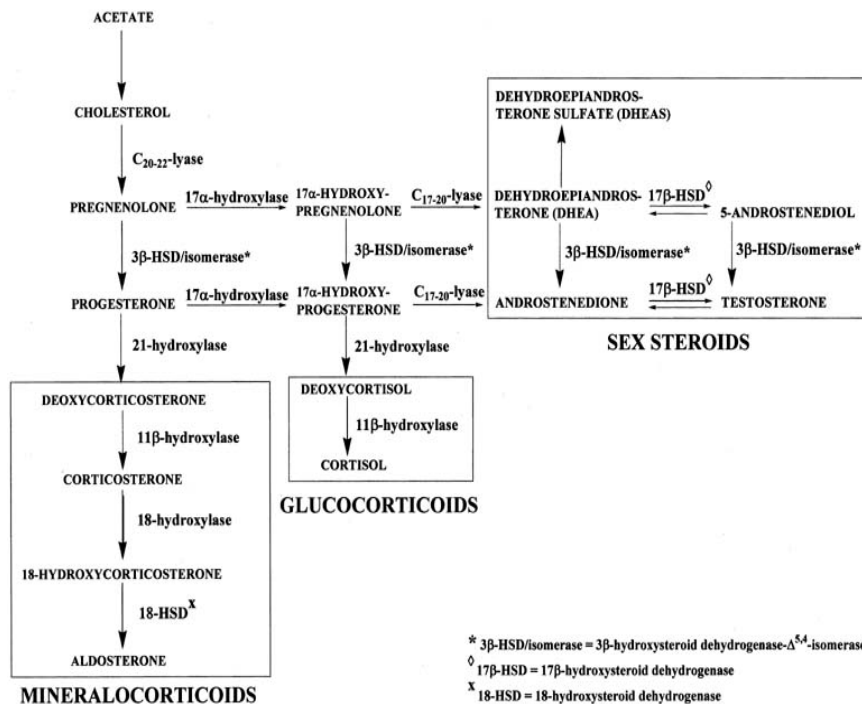
Ο δεύτερος τύπος υποδοχέα, ο CRF2 κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο σε σχέση με τον CRF1. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές του συγκεκριμένου υποδοχέα οι οποίοι έχουν μοναδική κατανομή στους ιστούς. Σε αντίθεση με τον CRF1, δεσμεύει με μεγαλύτερη συγγένεια τις ουροκορτίνες (Ucn, UcnII, UcnIII) από ότι την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). [6]

1.1.6 ΦΛΟΙΟΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ (ACTH)

Η ACTH αποτελείται από 39 αμινοξέα και αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα διάσπασης ενός μεγαλύτερου πεπτιδίου, της προοπιμελανοκορτινής (POMC). Παράγεται από τα κορτικοφόρα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, ως αποτέλεσμα της διέγερσης από την CRH, αλλά και στον πλακούντα, τα λεμφοκύτταρα και τους όρχεις. Ενεργοποιεί τους μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου 2 της μελανοκορτινής (MC2) στον φλοιό των επινεφριδίων διεγείροντας την παραγωγή και έκκριση γλυκοκορτικοειδών. Η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες, ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση παρατηρείται στο μέσο περίπου της νύκτας. Σε ορισμένες καταστάσεις όπως το στρες, η μυική εξάντληση, ο πυρετός και ο πόνος αυξάνεται η έκκριση της ACTH. Στις καταστάσεις αυτές, η παραγόμενη κορτιζόλη κινητοποιεί τον οργανισμό προς την κατεύθυνση της προσαρμογής προς το στρεσογόνο παράγοντα.[9]

1.1.7 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ

Οι ενδοκρινείς αδένες και κάποιοι περιφερικοί ιστοί (μη ενδοκρινείς ιστοί πχ. ήπαρ, έντερο νεφροί) αποτελούν τις κύριες πηγές για την παραγωγή στεροειδών ορμονών. Οι ενδοκρινείς αδένες στις γυναίκες είναι τα επινεφρίδια, οι ωοθήκες και ο πλακούντας, ενώ στους άνδρες τα επινεφρίδια και οι όρχεις. Το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών στα επινεφρίδια, στις ωοθήκες και στους όρχεις είναι η χοληστερόλη. Μπορεί είτε να συντεθεί *de novo* από το οξικό μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας είτε να προσληφθεί από την κυκλοφορία. Παρά το ότι τα επινεφρίδια, οι ωοθήκες και οι όρχεις συνθέτουν ανδρογόνα, μόνο τα επινεφρίδια συνθέτουν κορτικοειδή. Ωστόσο, μόνο οι όρχεις και οι ωοθήκες και όχι τα επινεφρίδια παράγουν οιστρογόνα.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Σχηματική αναπαράσταση των βιοσυνθετικών οδών των στεροειδών ορμονών στα επινεφρίδια.

Το πρώτο βήμα στο βιοσυνθετικό αυτό μονοπάτι είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη (pregnenolone). Πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία στα μιτοχόνδρια με τη συμμετοχή του ενζύμου C 20-22 lyase. Καθοριστικό βήμα είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από το εξωτερικό περιβάλλον στη μιτοχονδριακή μήτρα. Μόλις σχηματιστεί η πρεγνενολόνη συνεχίζεται το μονοπάτι για την παραγωγή προγεστερόνης, ανδρογόνων και κορτικοειδών. Στην παρούσα εργασία δεν θα αναφερθούμε στη βιοσύνθεση των ανδρογόνων.

Το μονοπάτι των αλατοκορτικοειδών ξεκινάει με την μετατροπή της προγεστερόνης σε δεοξυκορτικοστερόνη και στη συνέχεια σε κορτικοστερόνη με τη δράση της 11β-υδροξυλάσης. Στη συνέχεια, υδροξυλιώνεται ο 18 άνθρακας και σχηματίζεται η 18-υδροξικορτικοστερόνη, η οποία τέλος μετατρέπεται σε αλδοστερόνη με την αφαίρεση δύο υδρογόνων από τον 18^ο άνθρακα.

Το μονοπάτι για τη βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών ξεκινάει με την μετατροπή της 17^α-υδροξυπρογεστερόνης σε δεοξυκορτιζόλη και τέλος σε κορτιζόλη. Καταλύεται από τα ένζυμα 21-υδροξυλάση και 11β-υδροξυλάση αντίστοιχα με τρόπο παρόμοιο με αυτό που η προγεστερόνη μετατρέπεται σε κορτικοστερόνη.

1.2 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΠΛΗΓΜΑΤΟΣ (HEAT SHOCK PROTEINS-HSPs)

Οι πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος (HSPs) είναι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια και το ζαχαρομούκητα μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.[10] Ανακαλύφθηκαν το 1962 στη *Drosophila melanogaster* και πήραν το όνομά τους από την ικανότητά τους να εκφράζονται μετά από την έκθεση του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες.[11] Πολλές HSPs διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στις φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου σε καταστάσεις μη στρες επίσης. Υπάρχουν αποδείξεις ότι αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες και βοηθούν στη συναρμολόγηση, τη σταθεροποίηση και τη μεταφορά τους. Για αυτό το λόγο είναι γνωστές και σαν μοριακοί-συνοδοί ή «συνοδές-πρωτεΐνες». [12] Οι HSPs χωρίζονται σε οικογένειες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (MB 8-110kDa) και τη λειτουργία τους και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρήνα. Οι πιο καλά μελετημένες είναι αυτές με μοριακά βάρη 60, 70, 90 και 110 kDa, οι οποίες εκφράζονται τόσο σε κανονικές για το σώμα θερμοκρασίες (37°C), όσο και σε καταστάσεις στρες. [10]

Οι μικρού-μοριακού βάρους HSPs παρουσιάζουν συγκεκριμένη έκφραση ανάλογα με τον ιστό και περιλαμβάνουν τις HSP32, HSP27, αB-κρυσταλλίνη και HSP20. [10]

Η οικογένεια των HSP70 αποτελείται από πιο ευαίσθητες στη θερμοκρασία καθώς και πιο καλά συντηρημένες μεταξύ των υπολοίπων HSPs πρωτεΐνες και έχουν 60-80% ομοιότητα σε νουκλεοτίδια ανάμεσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα.[10] Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 (DnaK, HscA και HscC). Αντίθετα στους ευκαρυώτες εντοπίζονται τουλάχιστον τέσσερις ελαφρώς διαφορετικές πρωτεΐνες (**HSP72, HSP73, HSP75, HSP78**), οι οποίες μοιράζονται κοινή δομική περιοχή αλλά η καθεμία χαρακτηρίζεται από διαφορετικό πρότυπο έκφρασης ή υποκυτταρικό εντοπισμό.

- HSP73 (Hsc70): Πρωτεΐνη συνοδός η οποία εκφράζεται διαρκώς και αποτελεί το 1-3% των κυτταρικών πρωτεϊνών
- HSP72 (Hsp70): Πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση επάγεται ύστερα από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα (υπερθερμία, οξειδωτικό στρες, αλλαγές στο pH)
- HSP78 (Grp78): Πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου που συμμετέχει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και αυξάνεται σε απόκριση στο στρες και την πείνα

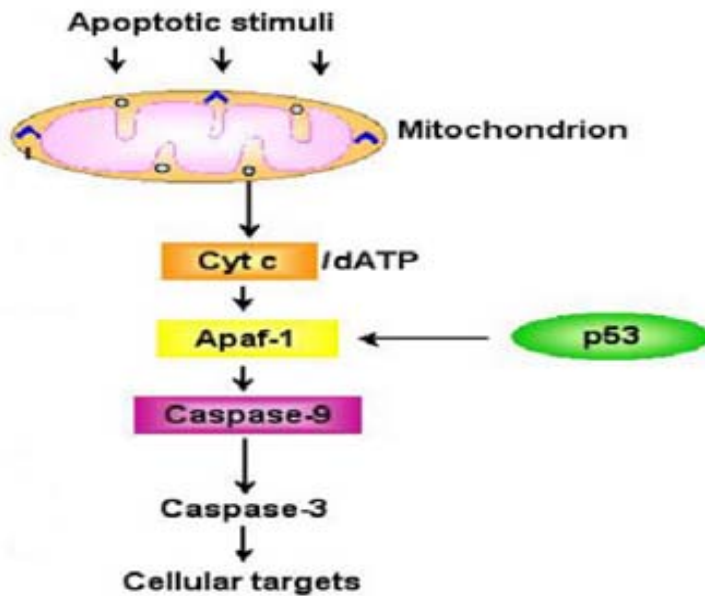
- HSP75 (mHSP70): Πρωτεΐνη συνοδός των μιτοχονδρίων

1.2.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΠΛΗΓΜΑΤΟΣ (HSPs)

Ο υψηλός βαθμός διατήρησης των HSPs σε όλα τα είδη σε συνδυασμό με την επιβίωση των κυττάρων σε διάφορες συνθήκες αποδεικνύει τη σημαντικότητά τους για διάφορες φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες καθώς και για την επιβίωση των κυττάρων μετά από στρεσογόνα ερεθίσματα όπως, θερμοκρασία, υποξία, ανοξία, ισχαιμία, υπεριώδης ακτινοβολία, νικοτίνη, τοξίνες, ιικοί παράγοντες.[10] Κατά συνέπεια αυτού, οι HSPs αναφέρονται σαν πρωτεΐνες του στρες και η αύξηση της έκφρασης τους περιγράφεται μερικές φορές ως μέρος της απόκρισης σε αυτό.[13]

Πιο αναλυτικά, οι HSPs και κυρίως οι Hsp60, Hsp70 και Hsp90 κατέχουν έναν «κυτταροπροστατευτικό ρόλο» κάτω από συνθήκες θερμικού στρες, ενώ παράλληλα προσδιορίζουν και τα ανώτερα όρια αντοχής των οργανισμών.[14] Έχει αποδειχθεί μια στενή σχέση μεταξύ της έκφρασης των HSPs και της θερμοανθεκτικότητας.[15] Το φαινόμενο της επίκτητης θερμοανθεκτικότητας είναι παροδικής φύσεως και εξαρτάται από τη σοβαρότητα του αρχικού στρες. Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική έκθεση, τόσο μεγαλύτερη είναι και η διάρκεια της θερμοανθεκτικότητας.[10]

Οι στρεσογόνοι παράγοντες που αναφέραμε παραπάνω δύναται να καταστρέφουν πρωτεΐνες προκαλώντας εν μέρει ξεδίπλωμα και συσσώρευσή τους. Οι HSP70 με την προσωρινή δέσμευσή τους σε υδροφοβικά κατάλοιπα, που εκτίθενται από το στρεσογόνο παράγοντα, επιτρέπουν στις πρωτεΐνες αυτές να αναδιπλωθούν. Εκτός όμως από τη βελτίωση της συνολικής πρωτεϊνικής ακεραιότητας, χαρακτηριστικό γνώρισμα των HSP70 είναι και η άμεση αναστολή της απόπτωσης μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων και τις κασπάσες.



ΕΙΚΟΝΑ 3: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης.

Κάτω από μη στρεσογόνες συνθήκες ορισμένες HSPs, αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου και συμμετέχουν σε διεργασίες όπως αναδίπλωση, σταθεροποίηση, μεταφορά και πρόληψη της ανεπιθύμητης συσσώρευσης τους. Το γεγονός ότι πολλές HSPs εκφράζονται σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα σε όλους τους οργανισμούς δηλώνει τη σημασία της συμβολής τους στη διατήρηση των πρωτεϊνών του κυττάρου.[16]

Αν και οι περισσότερες μελέτες για τις HSPs επικεντρώνονταν στην ικανότητά τους να συσσωρεύονται στο εσωτερικό του κυττάρου σε απόκριση στο στρες, νεότερες μελέτες αποδεικνύουν ότι οι HSPs χρησιμεύουν ως ρυθμιστικά σήματα για ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Αυξήσεις των ενδοκυττάρων επιπέδων των HSPs έχει δειχθεί ότι βελτιώνουν την αντοχή των κυττάρων σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνη-1 και TNFα. Αντίθετα, όταν οι HSPs είναι παρούσες στην επιφάνεια των κυττάρων ή απελευθερώνονται σε τοπικό εξωκυττάριο περιβάλλον επάγουν ανοσολογική απόκριση κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων. [10]

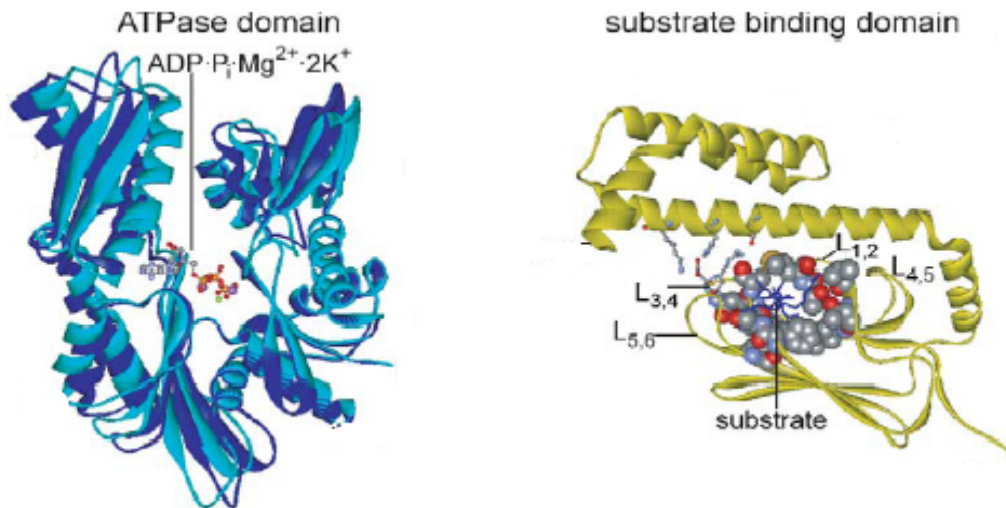
Γενικότερα, έχει αποδειχθεί ότι οι HSP70 έχουν την ικανότητα να διευκολύνουν την παρουσία του αντιγόνου σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. Επίσης με την παρουσία τους στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων λειτουργούν σαν αναγνωριστικά μόρια για μια κατηγορία κυττάρων που ονομάζονται «φυσικοί δολοφόνοι» (natural killer cells). Όλες οι παραπάνω μελέτες αναδεικνύουν τη σημαντικότητα των HSPs στην αντιγονική παρουσίαση, την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών συμβάλλοντας στις ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας αποκρίσεις στο φυσιολογικό στρες.

Τέλος, μελέτες αποδεικνύουν τη σημαντικότητα των HSPs και ιδιαίτερα των HSP20 στην ομαλή ανάπτυξη του φαινοτύπου των μυών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, στην πρόληψη συσσώρευσης αιμοπεταλίων καθώς και στην καρδιομυική λειτουργία.[17]

1.2.2 ΠΡΩΤΕΙΝΗ Hsp70

Η Hsp70 πρωτεΐνη που αναφέραμε και παραπάνω αποτελεί μέλος της μεγάλης οικογένειας των HSP70 και εκφράζεται συχνότερα σε συνθήκες θερμικού πλήγματος. Σημαντικός είναι ο ρόλος της τόσο στην αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων όσο και τη αποδόμηση λανθασμένα μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται συχνά και σαν βιολογικός δείκτης του στρες.[10] Ωστόσο για τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών απαιτείται η συνεργασία της Hsp70 με άλλες HSPs και ιδιαίτερα με την Hsp90. Απαραίτητη είναι και η συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις ATPασες των HSPs, οι οποίες απαιτούν υδρόλυση ATP για τη λειτουργία τους.

Τα μέλη της οικογένειας των HSP70 πρωτεϊνών αποτελούνται σε γενικές γραμμές από την αμινοτελική περιοχή (44-kDa) , την περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα (18-kDa) και την καρβοξυτελική περιοχή (10-kDa). Η αμινοτελική περιοχή δεσμεύει ATP και το υδρολύει σε ADP προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση των δύο άλλων περιοχών (εικόνα 4, αριστερά). Η περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα περιέχει ένα «κοίλωμα» και έχει αυξημένη συγγένεια για υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα (εικόνα 4, δεξιά). Η τρίτη περιοχή είναι πλούσια σε δομές α-έλικας και λειτουργεί σαν «κάλυμμα» για την περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα. Γενικά όταν μια Hsp70 προσδέσει ATP το «κάλυμμα» είναι ανοιχτό και έτσι τα πεπτίδια δεσμεύονται και απελευθερώνονται σχετικά γρήγορα. Όταν όμως γίνει η υδρόλυση σε ADP το «κάλυμμα» είναι κλειστό και τα πεπτίδια είναι στενά συνδεδεμένα με την περιοχή σύνδεσης.[18]



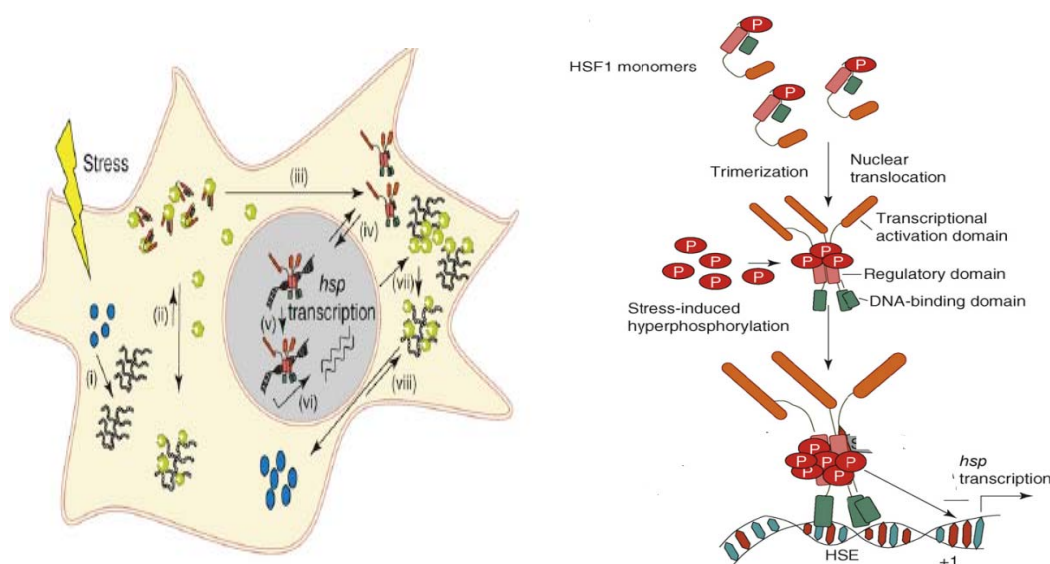
ΕΙΚΟΝΑ 4 : Τρισδιάστατη δομή της Hsp70 πρωτεΐνης στην οποία φαίνεται στην αριστερή εικόνα η περιοχή δέσμευσης του ATP και η περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα στη δεξιά.

1.2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ HSP70

Η ανάλυση των γονιδίων των HSPs σε διάφορους οργανισμούς οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός στοιχείου του θερμικού στρες (HSE-heat shock element). Το HSE βρίσκεται στον προαγωγέα των HSPs και είναι υψηλά διατηρημένο ανάμεσα στα είδη. Η επαγωγή των HSPs οφείλεται στη σύνδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα του στρες (HSF-heat shock factor) σε μια αλληλουχία HSE. Σε οργανισμούς όπως ο άνθρωπος, το ποντίκι και το κοτόπουλο έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν περισσότεροι από δύο HSF αν και μόνο ο HSF1 είναι ικανός να ρυθμίζει την έκφραση των Hsp γονιδίων.[19]

Η ρύθμιση της έκφρασης των HSPs εμπλέκει τόσο μεταγραφικούς όσο και μεταφραστικούς μηχανισμούς. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μη-στρες στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο HSF1 υπάρχει στο κυτταρόπλασμα σαν ανενεργό μονομερές συνδεδεμένο τόσο με τις HSP70 όσο και τις HSP90 πρωτεΐνες. Υπό την επίδραση στρεσογόνων ερεθισμάτων αυξάνεται η ποσότητα των κατεστραμμένων ή αποδιαταγμένων πρωτεϊνών γεγονός που αποτελεί το έναυσμα για την επαγωγή της απόκρισης. Οι πρωτεΐνες αυτές διασπούν το μεταγραφικό παράγοντα HSF1, ο οποίος στη συνέχεια τριμερίζεται, φωσφορυλιώνεται, μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται με το HSE των HSPs. Η ενέργεια αυτή μαζί με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγεί στη συνεχή μεταγραφή των HSPs με αποτέλεσμα την αύξηση των κυτταρικών επιπέδων τους. Όλα αυτά οδηγούν στην αποκατάσταση της κυτταρικής πρωτεϊνικής ομοιόστασης μέσω πολλών διαδικασιών όπως, επιλεκτική υποβάθμιση ή αναδίπλωση λανθασμένων

πρωτεϊνών (εικόνα 5).[20] Καθώς τα επίπεδα των HSPs αυξάνονται, επανασυνδέονται με τον HSF1 προκαλώντας έτσι την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων τους.



ΕΙΚΟΝΑ 5 : Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των Hsp70 πρωτεϊνών σε κατάσταση στρες.

1.2.4 ΥΓΕ ΑΞΟΝΑΣ ΚΑΙ HSPs

Παρόλο που ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε φλεγμονώδες στρες, οι αναφορές για το ρόλο τους σε ψυχοσωματικό στρες είναι περιορισμένες. Σε μία πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι επίμυες που είχαν εκτεθεί σε τεστ απομόνωσης (ψυχοσωματικό στρες) είχαν μειωμένες αποκρίσεις στα επίπεδα των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και HSP70 στον ιππόκαμπο [21].

Hsp70^{-/-} ΜΥΕΣ

Οι μύες με γενετική έλλειψη στην *Hsp70^{-/-}* που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διπλωματικής εργασίας δημιουργήθηκαν με στοχευμένη διαταραχή των εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Hunt et al και η οποία

είχε ως αποτέλεσμα τη διαγραφή 12 kb από τις περιοχές κωδικοποίησης των Hsp70a1a και Hspa1b και εισαγωγή της κασέτας νεομυσίνης. Τα ζώα με γενετική έλλειψη στην Hsp70 είναι βιώσιμα και γόνιμα, αλλά παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε παγκρεατίτιδα, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, οσμωτικό στρες και ισχαιμία (εγκέφαλος), και ελαττωμένη ικανότητα να αναπτύσσουν αντίσταση σε φλεγμονώδες στρες [22]. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν το ρόλο των Hsp70 πρωτεϊνών στην αντίδραση του οργανισμού στο στρες.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ενεργοποίηση του υποθαλαμικού-υποφυσικού-επινεφριδιακού άξονα (ΥΥΕ) αποτελεί την κυριότερη απόκριση του οργανισμού στο στρες η οποία επιτυγχάνεται μέσω της δράσης ειδικευμένων ορμονών. Μετά την επίδραση ενός ερεθίσματος, ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Η CRH προσδέεται στους κατάλληλους υποδοχείς, CRHF1 στην πρόσθια υπόφυση και ενεργοποιεί το επόμενο τμήμα του άξονα –την υπόφυση. Με τη σειρά της, η υπόφυση απελευθερώνει τη φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH) που οδηγεί στην παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από το φλοιό των επινεφριδίων. Ο ρόλος τους συνίσταται στην προετοιμασία του οργανισμού για την ανάπτυξη ομοιοστατικών μηχανισμών για την επιβίωσή του.

Εκτός όμως από την επιβίωση του οργανισμού ενάντια στο στρες, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ένα ισχυρό αντιφλεγμονώδη παράγοντα και ρυθμίζουν αρνητικά ένα μεγάλο αριθμό προφλεγμονωδών παραγόντων όπως τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ και τις κυτοκίνες. Επιπρόσθετες μελέτες σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες 1 (IL-1) και 6 (IL-6) ενεργοποιούν επίσης τον ΥΥΕ άξονα προκαλώντας αύξηση της έκκρισης της CRH, της ACTH και των γλυκοκορτικοειδών.

Η ενεργοποίηση του άξονα επιπρόσθετα έχει σαν αποτέλεσμα και την έκκριση ενδορφινών από την προοπιομελανοκορτίνη (POMC). Οι ενδορφίνες συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος και μειώνουν την αίσθηση στο πόνο.

Οι πρωτεΐνες θερμικού στρες (HSPs) είναι μια μεγάλη υπεροικογένεια πρωτεϊνών που διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στις διεργασίες του κυττάρου τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις, όσο και σε συνθήκες στρες. Πολλές HSPs και κυρίως οι Hsp60, Hsp70 και Hsp90 διαδραματίζουν κυτταροπροστατευτικό ρόλο κάτω από συνθήκες θερμικού στρες, ενώ παράλληλα προσδιορίζουν και τα ανώτερα όρια αντοχής των οργανισμών. Εκτός όμως από το θερμικό στρες, ευθύνονται και για την επιβίωση των κυττάρων μετά από άλλα στρεσογόνα ερεθίσματα όπως, ανοξία, ισχαιμία, υπεριώδης ακτινοβολία, νικοτίνη και διάφορους χημικούς παράγοντες.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση πιθανής εμπλοκής των Hsp70 πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του υποθαλαμικού-υποφυσιακού-επινεφριδιακού άξονα του στρες (ΥΥΕ) τόσο σε επίπεδο ορμονών όσο και σε επίπεδο mRNA.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας, τα ποντίκια στεγάζονταν σε ειδικά κλουβιά σε κατάλληλο δωμάτιο στο οποίο είναι ρυθμισμένη η αλλαγή φωτός-σκότους κάθε 12ώρες. Τα φώτα ανοίγουν στις 7:30 πμ και η θερμοκρασία του δωματίου διατηρείται στους $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Η διαθεσιμότητα φαγητού και νερού γινόταν κατά βούληση. Η καθαριότητα των κλωβών γινόταν μια φορά την εβδομάδα. Ο απογαλακτισμός των απογόνων των διασταυρώσεων γινόταν την 21η ημέρα μετά τη γέννηση, ημέρα κατά την οποία διαχωρίζονταν οι αρσενικοί από τους θηλυκούς απογόνους σε διαφορετικούς κλωβούς.

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα περιορισμού (restraint) που θα περιγραφούν παρακάτω ήταν ενήλικα αρσενικά και θηλυκά ποντίκια (WT και HSP70 KO) ηλικίας 4-5 μηνών. Κάθε ζώο που συμμετείχε στην πειραματική διαδικασία απομονώνονταν σε ξεχωριστό κλωβό 24 ώρες πριν το πείραμα, με σκοπό να εγκλιματιστεί στο νέο περιβάλλον. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μόνο πρωινές ώρες μεταξύ 9-11 π.μ. και 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.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μύες δύο διαφορετικών γονοτύπων: αγρίου τύπου (wild type, Wt ή *Hsp70*^{+/+}) και ανεπαρκείς για την *Hsp70* (*Hsp70*^{-/-}). Το γενετικό υπόβαθρο τόσο των ανεπαρκών όσο και των αγρίου τύπου μύων ήταν C57BL6x1291SvJ.

***Hsp70*^{-/-} μύες**

Η δημιουργία των *Hsp70*^{-/-} μύων βασίστηκε στη στοχευμένη διαταραχή των εμβρυϊκών βλαστικών κύτταρων με τη χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Clayton R. Hunt et al [23]. Το στέλεχος διατηρήθηκε με διασταυρώσεις ομόζυγων αδερφών (διασταυρώσεις *Hsp70*^{-/-} γονέων). Η φροντίδα των ζώων ακολούθησε τις κλασικές επιταγές ενός τυπικού εργαστηριακού χώρου. Οι μύες με ανεπάρκεια στη HSP70 ελήφθησαν από την εταιρεία MMRRC (Mutan Mouse Regional Resource Centers supported by NIH, <http://www.mmrrc.org/>)

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (RESTRAINT)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Σωληνάρια των 50 ml

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εξεταστεί η απόκριση του υποθαλαμο-υποφύσο-επινεφριδιακού άξονα των πειραματοζώων σε ψυχοσωματικό stress. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα ένας επαρκής αριθμός πειραματοζώων τόσο αγρίου τύπου όσο και *Hsp70*^{-/-}, δεν υποβάλλονταν σε restraint καθώς αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (control). Την ημέρα της πειραματικής διαδικασίας, τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε σωληνάρια των 50 ml, στα οποία προηγουμένως είχε κοπεί λίγα εκατοστά το εμπρόσθιο μέρος. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ως προς το χρόνο πειράματα restraint, ένα διάρκειας τριών ωρών και ένα διάρκειας δεκαπέντε λεπτών. Για τα ζώα που συμμετείχαν στο πείραμα των τριών ωρών αναμένονται διαφορές σε επίπεδο mRNA ενώ στα υπόλοιπα στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα. Μετά το πέρας της διαδικασίας γινόταν αιμοληψία από τα πειραματόζωα και στη συνέχεια αυτά θυσιάζονταν με αποκεφαλισμό και λαμβάνονταν ιστοί (υποθάλαμος, υπόφυση, επινεφρίδια), τα οποία φυλάσσονταν στους -80 °C για περαιτέρω επεξεργασία.

2.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΠΟΝΟΥ

- Συσκευή Plantar Test (Hargreaves Apparatus)

Με σκοπό να μελετηθεί εάν υπάρχουν διαφορές στο φλεγμονώδη πόνο μεταξύ αγρίου τύπου και *Hsp70*^{-/-} ζώων χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ποντίκια τα οποία εγκλιματίστηκαν για 4 συνεχόμενες ημέρες στο μηχάνημα μέτρησης του πόνου. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η Plantar Test (Hargreaves Apparatus). Πιο συγκεκριμένα, η συσκευή αποτελείται από μία κινητή πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας η οποία τοποθετείται κάτω από μία γυάλινη βάση πάνω στην οποία τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις τα πειραματόζωα ανάμεσα στις οποίες υπάρχουν διαχωριστικά ώστε να μην έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Την ημέρα της πειραματικής διαδικασίας, στα ζώα προκλήθηκε φλεγμονή ύστερα από ένεση με 20μl CFA (C=1μg/ml) στο πίσω δεξί τους πόδι. Το πίσω αριστερό πόδι χρησιμοποιήθηκε σαν control του πειράματος. Στη συνέχεια και μετά από χρονικά διαστήματα 3 και 6 ωρών τα ζώα τοποθετήθηκαν στο ειδικό μηχάνημα και έγιναν μετρήσεις του φλεγμονώδη πόνου ύστερα από έκθεση και των δύο ποδιών σε ακτινοβολία (IR30). Η απόκριση στον πόνο μετρείται σε sec από τη στιγμή που θα τοποθετηθεί η

ακτινοβολία στο πόδι του ζώου μέχρι τη στιγμή που θα σηκώσει το πόδι του. Την επόμενη μέρα, 24 ώρες μετά την πρόκληση της φλεγμονής έγιναν ξανά μετρήσεις πόνου και τα ζώα θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν ιστοί (υποθάλαμος, υπόφυση, επινεφρίδια, τοπικός φλεγμονώδης ιστός) και αίμα για περαιτέρω επεξεργασία.

2.4 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

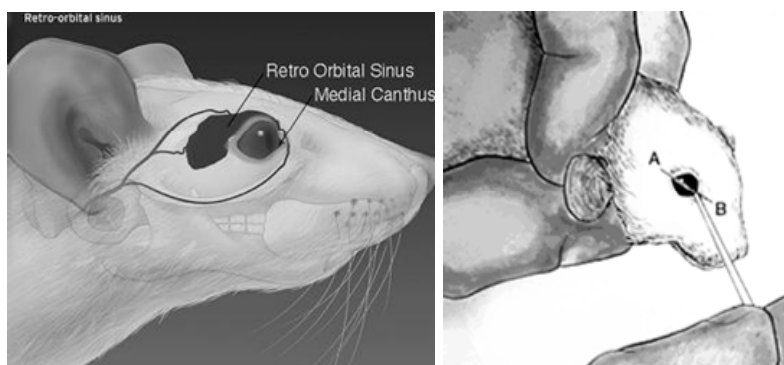
Υλικά και συσκευές

- Ηπαρινισμένοι τριχοειδείς σωλήνες: Micro Haematocrit Tubes, Soda lime glass, Na-Heparinized, 80μl/ml (Vitrex, Modulohm A/S, Δανία)

Υπάρχουν αρκετές οδοί μέσω των οποίων μπορεί να γίνει συλλογή αίματος (πχ. Ουραία, πρόσθια ποδική, σφαγίτιδα, οπισθιο-οφθαλμική φλέβα). Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η οπισθιο-οφθαλμική οδός καθώς ικανοποιούσε τις παρακάτω παραμέτρους :

- Γρήγορη συλλογή αίματος (20 περίπου δευτερόλεπτα μετά την ακινητοποίηση του ζώου) ώστε να είναι μειωμένη σχετικά η ενεργοποίηση του άξονα του στρες (HPA)
- Συλλογή μεγάλης ποσότητας αίματος σε σχέση με άλλες μεθόδους
- Άσηπτες συνθήκες

Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε μετά τα restraint πειράματα λίγο πριν τη θυσία των ζώων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στην εικόνα παρακάτω (εικόνα 2.1). Στη συνέχεια, το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και αφού συλλέχθηκε ο ορός, αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.



ΕΙΚΟΝΑ 2.1 : Σχηματική αναπαράσταση συλλογής αίματος από την οπισθιο-οφθαλμική οδό.

2.5 ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ (RadioImmunoAssay)

ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Υλικά και συσκευές

- ☞ Immuchem™ Corticosterone⁻¹²⁵I RIA kit, (MP Biomedicals, ΗΠΑ) το οποίο περιέχει:
 - Διαλύτη στεροΐδων: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος ζελατίνης που περιέχει γ-σφαιρίνες κουνελιού (Steroid diluent)
 - Αντιγόρο κορτικοστερόνης που έχει παραχθεί σε κουνέλι (Anti-corticosterone)
 - Έξι διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων κορτικοστερόνης (25, 50, 100, 250, 500 και 1000ng/ml) (Corticosterone calibrators)
 - Διάλυμα κατακρήμνισης: Μείγμα πολυαιθυλενογλυκόλης και αντισώματος έναντι των γ-σφαιρίνων που έχουν παραχθεί σε κατσίκια. (Precipitant solution)
 - Παράγωγο κορτικοστερόνης σημασμένο με ραδιενεργό ιώδιο (¹²⁵I) (Corticosterone⁻¹²⁵I derivative)
 - Δύο δείγματα ελέγχου, ένα υψηλής και ένα χαμηλής συγκέντρωσης κορτικοστερόνης (Corticosterone controls)
- ☞ Μετρητής γ-ακτινοβολίας: 1275 Minigamma (LKB Wallac, Inc., Turku, Φινλανδία)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη τεχνική αυτή, 5μl ορού αραιώθηκαν με 1ml διαλύματος στεροειδών. Στη συνέχεια, αραιώθηκαν τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης με σκοπό την κατασκευή

πρότυπης καμπύλης (25, 50, 100, 250, 500, 1000ng/ml). Μετά την προσθήκη σημασμένης κορτικοστερόνης και αντισώματος, τα δείγματα επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα κατακρήμνισης και ακολούθησε φυγοκέντρηση 1000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Τέλος, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η συνολική ποσότητα κορτικοστερόνης σε κάθε δείγμα μετρήθηκε σε μg/dl και υπολογίζεται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

2. 6 ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Ομογενοποιητής: Turrax 25 T-25 (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Γερμανία)
- Διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης: TRIzol Reagent (Invitrogen, ΗΠΑ)

Οι ιστοί που συλλέχθηκαν μετά τα πειράματα restraint και φυλλάσσονταν στους -80°C, μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf. Στους ιστούς προστέθηκαν 500μl Trizol και ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση του ομογενοποιητή Turrax 25T-25.

2. 7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Μετά την ομογενοποίηση των ιστών (υποθάλαμος, υπόφυση, επινεφρίδια) συνεχίστηκε η κυρίως επεξεργασία των δειγμάτων με την απομόνωση του RNA. Τα ομογενοποιημένα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 15 λεπτά με σκοπό να αποφευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 200μl χλωροφορμίου ανά 1ml Trizol, και μετά από έντονη ανάδευσή τους για 15 δευτερόλεπτα (vortex), φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 15 λεπτά στα 12.000 x g. Μετά τη φυγοκέντρηση, η υδατική φάση που περιείχε το RNA μεταφέρθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες (erpendorfs) όπου και προστέθηκαν 500μl ισοπροπυλικής αλκοόλης ανά 1ml Trizol. Έπειτα, μετά την παραμονή των δειγμάτων για 30 λεπτά στον πάγο, έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις 12.000xg για 10 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 500μl 75% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000xg για 10 λεπτά στους 4°C. Τέλος, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από τα δείγματα, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε με 50μl απιονισμένου νερού (wfi). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν και πάλι στους -80°C για μεταγενέστερη χρήση.

2.8 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Nano-drop: σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

Ύστερα από την απομόνωση του RNA από τα δείγματα, έγινε η εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του. Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν υπόψιν τόσο οι απορροφήσεις στα 260nm όσο και στα 280nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων δίνει την καθαρότητα του RNA και πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 1,5 με 2, ενώ η ποσότητα υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του διαλύματος έγινε με τη χρήση του Nano-drop σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.9 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Υλικά και συσκευές

- Ολικό ώριμο mRNA
- Thermoscript RT kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:
 - Τυχαία εξαμερή: random hexamers
 - Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H₂O)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer
 - Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM
 - Διθειοθρεϊτόλη: DTT, 0.1 M
 - Διάλυμα αναστολέων RNασών: RNaseOUT, 40 U/μL
 - Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT
- Θερμοκυκλωτής: Thermal cycler, DNA engine (MJ Research, ΗΠΑ)
- Θερμοάντοχα σωληνάρια των 200μl (Corning Inc, ΗΠΑ)

Η μέθοδος της RT-PCR είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον καθορισμό του μοτίβου έκφρασης ενός γονιδίου. Πρόκειται για μια αντίδραση σχηματισμού συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το ολικό RNA, που έχουμε προηγουμένως απομονώσει, με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης.

Η αρχική αντίδραση εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA περιλάμβανε την ανάμειξη 1 μg ολικού RNA, 1 μl τυχαία εξαμερή νουκλεοτίδια και DEPC-H₂O σε ποσότητα τέτοια ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 10 μl. Το μείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 65°C προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή και στη συνέχεια ψύχθηκε στους 4°C. Κατόπιν προετοιμάζονταν το κύριο μείγμα της αντίδρασης το οποίο προστίθεντο στο αρχικό. Για κάθε δείγμα απαιτούνταν 4 μl cDNA buffer (5x), 1 μl DTT, 1 μl RNase OUT, 1 μl DEPC-H₂O, 2 μl dNTPs και 1 μl ενζύμου Thermoscript. Ακολουθούσε επώαση του δείγματος για 60 min στους 50°C, οπότε υβριδοποιούνταν ο εκκινητής και δρούσε η αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση τερματίζονταν με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C όποτε και αποδιατάσσονταν τα υβρίδια και απενεργοποιούνταν η αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA είτε χρησιμοποιούνταν αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσονταν στους -20°C.

2. 10 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Υλικά και συσκευές

- Συμπληρωματικό DNA (cDNA)
- Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού: 10X PCR buffer
 - Χλωριούχο μαγνήσιο: 50mM MgCl₂
 - Ένζυμο πολυμεράσης: Platinum Taq DNA polymerase, 5 u/μl

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR) αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA in vitro. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αλυσίδων δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων να αποδιατάσσονται και να υβριδίζονται όταν επωάζονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Το προϊόν ταυτοποιείται ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η μέθοδος της PCR αποτελείται από τα εξής βήματα: **1)** Αποδιάταξη του cDNA στους 95°C, **2)** Υβριδοποίηση των εκκινητων με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-68°C και **3)** Πολυμερισμός και σύνθεση της αλληλουχίας DNA στους 72°C. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές ούτως ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του γονιδίου.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

| ΓΟΝΙΔΙΟ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΗΜΑΤΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ (5'-3') | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΜΗ ΝΟΗΜΑΤΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ (5'-3') | ΜΗΚΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ (ΖΕΥΓΗ ΒΑΣΕΩΝ) | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ | ΚΥΚΛΟΙ |
|----------|---|---|---|---------------------------|--------|
| mCRH | agcccttgaatttct tgca | aacacgcggaaa aagtta | 201 | 62 | 40 |
| mPOMC | cagcgagagtcga gtttgc | ctgcttcagacct cctagatgtg | 125 | 60 | 40 |
| mStAR | agctcaactggag agcactg | gtggaacctctgc gcttgg | 493 | 60 | 25 |
| mActin b | tctctttgatgtcac gcacg | tcagaaggactcc tatgtgg | 500 | 55 | 25 |

2. 11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Υλικά και συσκευές

- Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (Life Technologies, ΗΠΑ)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης : E431 (Consort, Βέλγιο)
- Αγαρόζη (Sigma, USA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma, ΗΠΑ)
- Συσκευή UV /Κάμερα: Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Molecular Analyst, version 1.4.1 (Bio-Rad Laboratories, ΗΠΑ)
- Λογισμικό: Tina scan, version 2.07d (Raytest, isotopenmessgeräte, Γερμανία)

2.11.1 2% (w/v) Πήκτωμα αγαρόζης

Αφού προστεθούν 2g αγαρόζης σε 100ml 1x TAE, το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται έως ότου μετατραπεί σε διαυγή διάλυμα. Στη συνέχεια, παγώνουμε το διάλυμα σε τρεχούμενο νερό και προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 500ng/ml. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη συσκευή (gel tray) στην οποία ενσωματώνονται χτένια και αφήνεται έως ότου στερεοποιηθεί. Μόλις πολυμεριστεί το gel, αφαιρούνται τα χτένια και τοποθετείται σε δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.

2.11.1.1 Διάλυμα TAE 50x

| <i>Υλικά</i> | <i>Τελική Συγκέντρωση</i> |
|----------------|---------------------------|
| Tris (pH 8) | 10nM |
| EDTA (pH 8) | 10mM |
| Οξικό Ασβέστιο | 5nM |
| NaCl | 10nM |

Τα παραπάνω υλικά αναμειγνύονται και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί πλήρως η χρωστική. Στη συνέχεια, διηθείται και φυλάσσεται στους 4°C.

2.11.1.2 Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 10mg/ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται με τη διάλυση δισκίου βάρους 10mg σε 1 ml dH₂O και αποθηκεύεται στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο.

2.11.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, 4μl ειδικής χρωστικής Orange G προστίθενταν στο προϊόν της PCR, και 12μl από αυτό τοποθετούνταν στις οπές του πηκτώματος αγαρόζης. Στη συνέχεια στη συσκευή εφαρμοζόταν σταθερή τάση ώστε να διαχωριστεί το DNA. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεντο κάτω από λάμπα UV (το DNA είναι ορατό σε αυτήν την περίπτωση με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου), φωτογραφιζόταν με το πρόγραμμα Molecular Analyst και αναλύονταν με το πρόγραμμα Tina scan. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA ήταν εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που ηλεκτροφορούσαν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

2.12 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία απλής ανάλυσης της μεταβλητότητας (one-way ANOVA). Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Excel και SPSS. Τα error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τα MEAN (\pm) SEM.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ HSP70 ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΕ

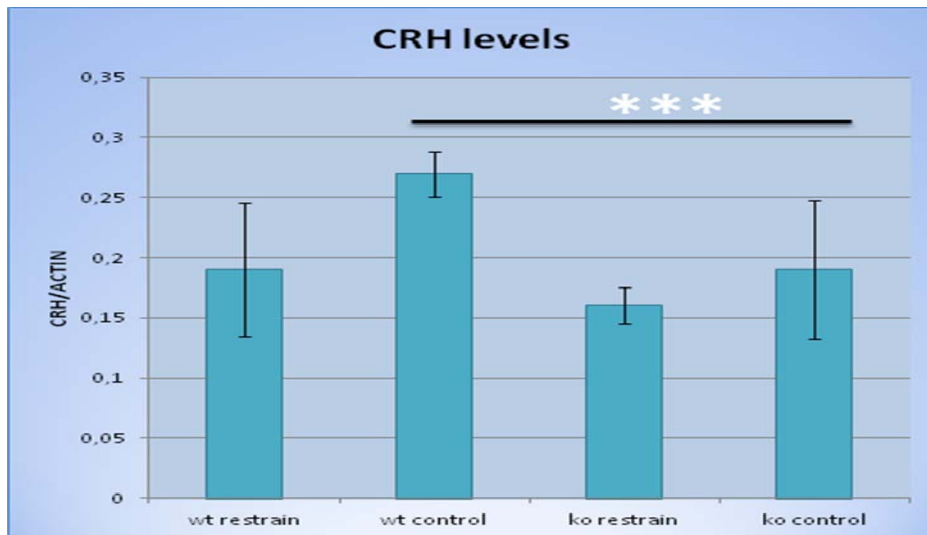
ΑΞΟΝΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΑΤΑΤΕΤΑΜΕΝΟ ΣΤΡΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Με σκοπό να μελετηθεί ο ρόλος της γενετικής έλλειψης των HSP70 πρωτεϊνών στο στρες, πραγματοποιήθηκε τεστ περιορισμού για τρεις ώρες (restraint, ψυχοσωματικό στρες) τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά ποντίκια. Μετά το τέλος των πειραμάτων, τα ζώα θυσιάστηκαν, απομονώθηκαν οι κύριοι ιστοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την απόκριση του οργανισμού στο στρες (υποθάλαμος, υπόφυση, επινεφρίδια) και μελετήθηκε η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε αυτούς (CRF-CRHF1, POMC, StaR αντίστοιχα) με τη μέθοδο της εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης και στη συνέχεια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (RT-PCR).

ΘΗΛΥΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

3.1.1 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

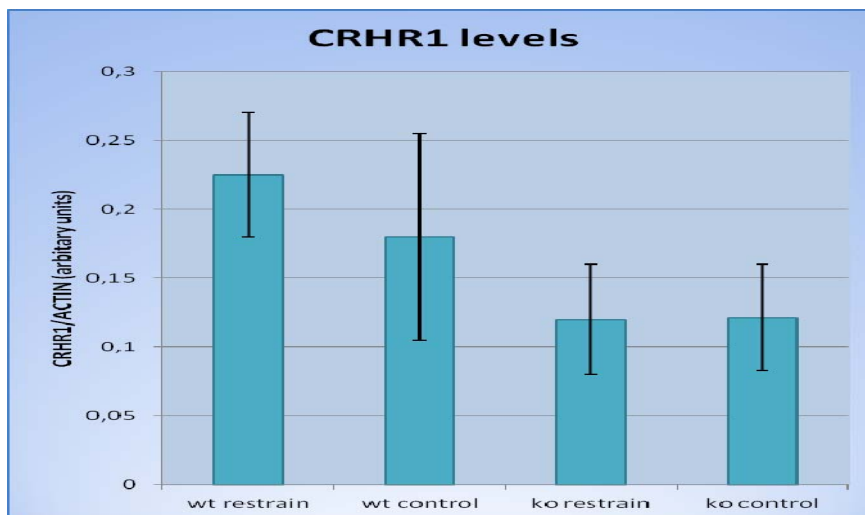
Αρχικά μελετήθηκαν τα επίπεδα της έκφρασης της CRH στον υποθάλαμο μετά την έκθεση των ζώων για τρεις ώρες σε τεστ περιορισμού (tríωρο restraint). Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ομάδες ζώων: wt restraint/wt control και *Hsp70*^{-/-} restraint/ *Hsp70*^{-/-} control. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του mRNA της CRH ήταν στατιστικά χαμηλότερη στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί το restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.001$). Παραδόξως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε WT και KO ζώα που είχαν υποστεί restraint. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα έκφρασης της CRH τόσο στα WT όσο και στα *Hsp70*^{-/-} ζώα μετά την επίδραση του restraint (WT control-WT restraint και KO control-KO restraint, εικόνα 3.1).



ΕΙΚΟΝΑ 3.1: Επίπεδα mRNA του CRH στον υποθάλαμο μετά από τρίωρο restraint σε θηλυκά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA του CRH (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του CRH στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.001$) ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.1.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRF1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

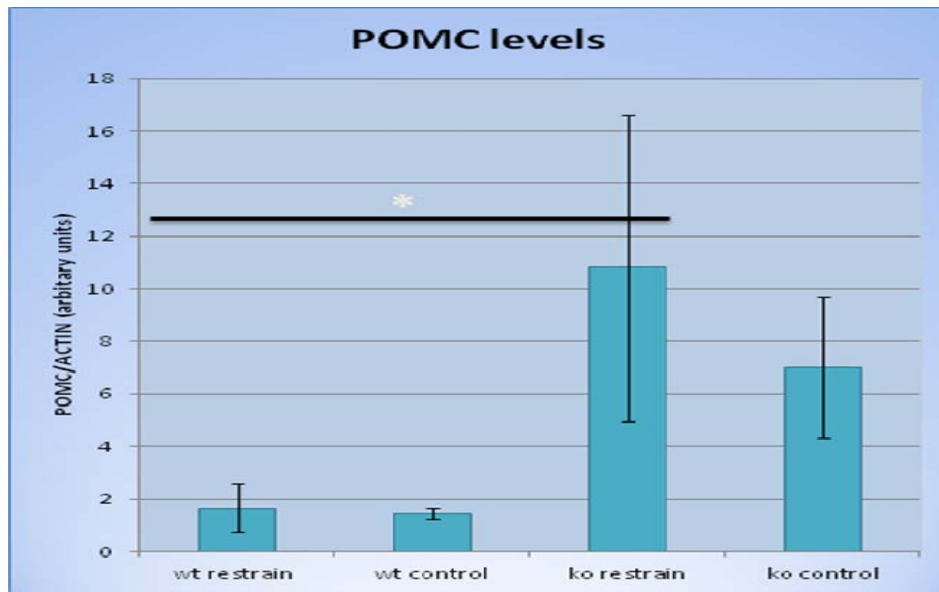
Τα επίπεδα της έκφρασης του CRF1 υποδοχέα στον υποθάλαμο μελετήθηκαν μετά από τρίωρο restraint με τη μέθοδο της RT-PCR. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του υποδοχέα μετά την εφαρμογή του τεστ τόσο σε WT όσο και σε *Hsp70*^{-/-} ζώα. Παρόμοια, καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ζώων ελέγχου και των δύο γονοτύπων (εικόνα 3.2).



ΕΙΚΟΝΑ 3.2 : Επίπεδα mRNA του CRF1 στον υποθάλαμο μετά από τριώρο restraint σε θηλυκά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA του CRF1 (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος n=2-3 πειραματόζωα /γονότυπο/κατηγορία

3.1.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ POMC ΣΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

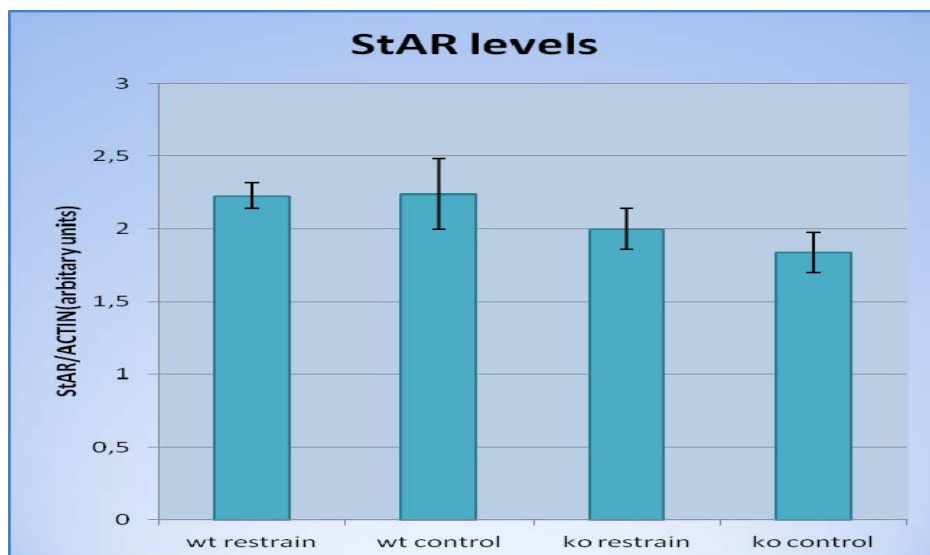
Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του mRNA της POMC στην υπόφυση μετά την επίδραση του στρες περιορισμού ακολουθήσαμε την ίδια μεθοδολογία. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της POMC μεταξύ των ζώων ελέγχου των δύο γονοτύπων έτειναν να διαφέρουν. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα επίπεδα της POMC στα ζώα αγρίου τύπου που είχαν υποβληθεί στη δοκιμασία ήταν σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τα επίπεδα των *Hsp70*^{-/-} ζώων (εικόνα 3.3).



ΕΙΚΟΝΑ 3.3 : Επίπεδα mRNA της POMC στην υπόφυση μετά από τριώρο restraint σε θηλυκά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA της POMC (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.046$) των επιπέδων έκφρασης του POMC στα WT ζώα που είχαν υποστεί το restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα Hsp70-/- ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.1.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ StAR ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

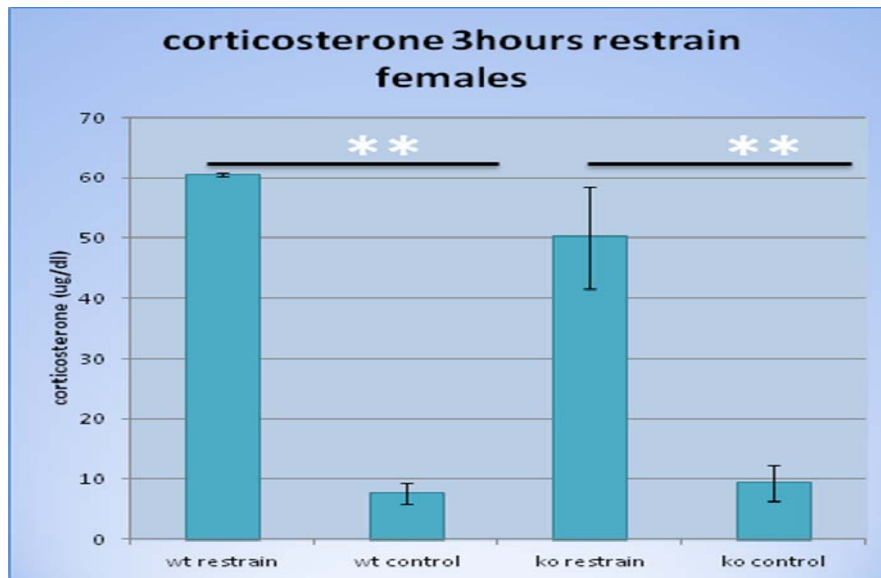
Προκειμένου να ανιχνεύσουμε διαφορές στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των γλυκοκορτικοειδών μεταξύ των δύο γονοτύπων μελετήσαμε την έκφραση του mRNA της StAR το οποίο αποτελεί ένα από τα καθοριστικά ένζυμα στην αλυσίδα της βιοσύνθεσης των επινεφριδιακών κορτικοστεροειδών. Προς έκπληξη μας καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε τόσο μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων όσο και μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων (εικόνα 3.4).



ΕΙΚΟΝΑ 3.4 : Επίπεδα mRNA της StAR στα επινεφρίδια μετά από τρίαωρο restraint σε θηλυκά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA της StAR (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

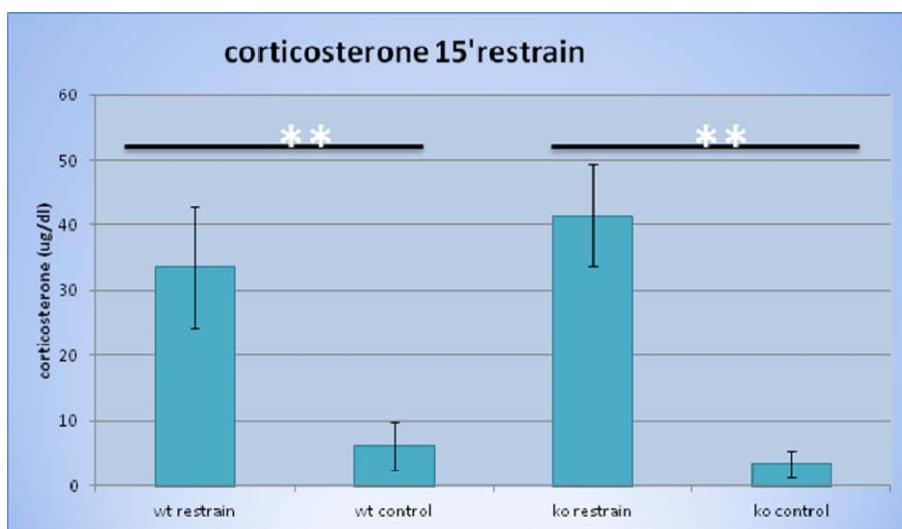
Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων πριν και μετά το τεστ περιορισμού μετρήσαμε με τη μέθοδο του ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού τα επίπεδα της κορτικοστερόνης. Όπως αναμενόταν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p=0.00064$) των επιπέδων της κορτικοστερόνης στα ζώα που είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα ζώα ελέγχου και στους δύο γονοτύπους. Παρόλα αυτά καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο γονοτύπων στην κάθε διαφορετική κατάσταση (εικόνα 3.5).



ΕΙΚΟΝΑ 3.5 : Επίπεδα κορτικοστερόνης σε θηλυκά ποντίκια μετά απο τρίωρο restraint. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης στα ζώα που είχαν υποστεί restraint και στους δύο γονότυπους ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΖΩΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ 15 ΛΕΠΤΑ

Τα πειράματα περιορισμού τριών ωρών είχαν ως σκοπό να ανιχνεύσουν πιθανές αλλαγές στην απόκριση του ΥΓΕ άξονα στα *Hsp70*^{-/-} κυρίως στο επίπεδο του mRNA των ορμονών. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση που παρατηρείται στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών είναι η μέγιστη και πιθανότατα να υπάρχει αδυναμία να εκτιμηθούν μικρές διαφορές στην απελευθέρωση της κορτικοστερόνης. Προκειμένου λοιπόν να μπορέσουμε να αντιμετωπίσουμε αυτή την τεχνική δυσκολία εφαρμόσαμε σε θηλυκά ποντίκια και των δύο γονοτύπων στρες περιορισμού 15 λεπτών και εκτιμήσαμε τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στο πλάσμα. Παρόμοια με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από το τρίωρο restraint, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων τόσο σε βασική κατάσταση (control) όσο και μετά την επαγωγή του άξονα (εικόνα 3.6).



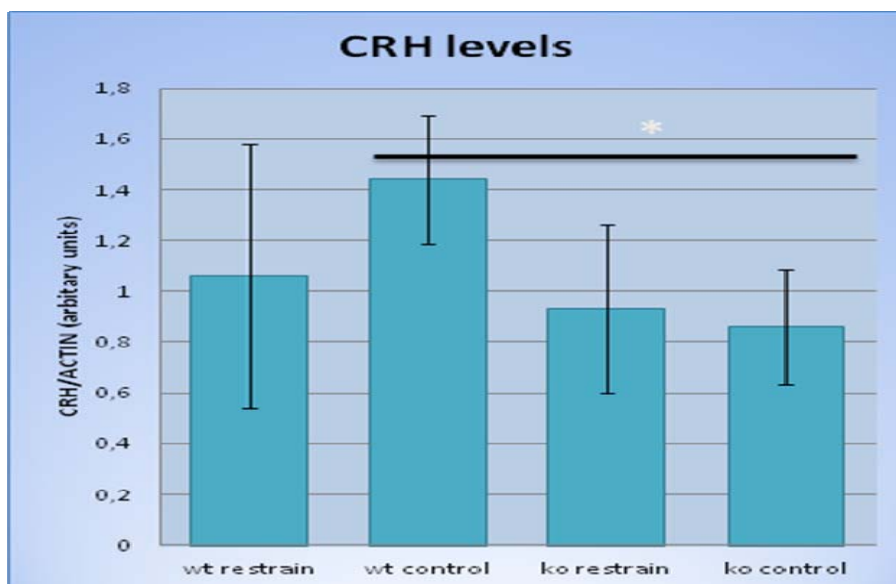
ΕΙΚΟΝΑ 3.6 : Επίπεδα κορτικοστερόνης σε θηλυκά ζώα μετά από restrain των 15 λεπτών. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων τόσο στα WT όσο και στα KO που είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα control ($p=0.009$ και $p=0.0014$ αντίστοιχα) ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.4 ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν παρουσιάζονται πιθανές φυλογενετικές διαφορές στην απόκριση του άξονα του στρες στα *Hsp70*^{-/-} ζώα όπως έχει περιγραφεί σε άλλα μοντέλα διαγονιδιακών ζώων τα παραπάνω πειράματα επαναληφθήκαν σε αρσενικούς μύες.

3.4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRH ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

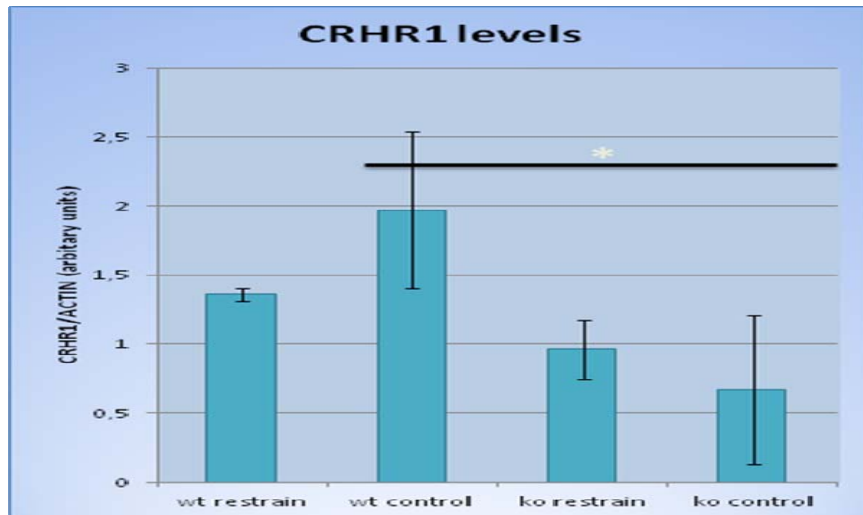
Παρόμοια με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στα θηλυκά ποντίκια καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση της CRH στον υποθάλαμο και στους δύο γονοτύπους μεταξύ των ζώων ελέγχου και εκείνων που είχαν υποβληθεί στο στρες περιορισμού για τρεις ώρες. Παρόλα αυτά τα επίπεδα της CRH ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί το στρες σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.03$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} ζώων που είχαν υποστεί το restraint (εικόνα 3.7).



ΕΙΚΟΝΑ 3.7 : Επίπεδα mRNA του CRF στον υποθάλαμο μετά από τρίαωρο restraint σε αρσενικά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA του CRF (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.03$) της έκφρασης στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRF1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

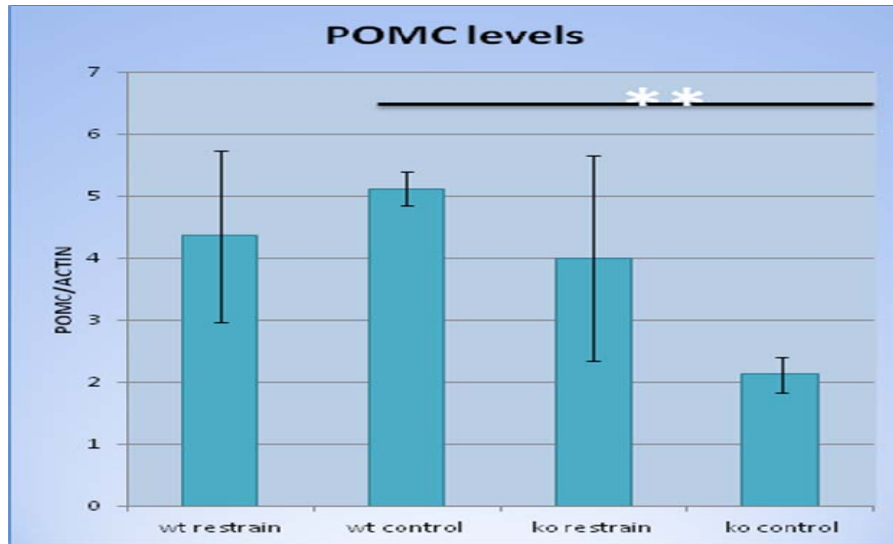
Σε αντίθεση με τα θηλυκά ποντίκια η έκφραση του υποδοχέα CRF1 στον υποθάλαμο στα αρσενικά ποντίκια ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποβληθεί σε στρες περιορισμού σε σύγκριση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.03$). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} που είχαν υποστεί το restraint. Παρόμοια καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε και στους δύο γονοτύπους στις διαφορετικές καταστάσεις (εικόνα 3.8).



ΕΙΚΟΝΑ 3.8 : Επίπεδα mRNA του CRF1 στον υποθάλαμο μετά από τρίωρο restraint σε αρσενικά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA του CRF1 (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.03$) της έκφρασης στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ POMC ΣΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

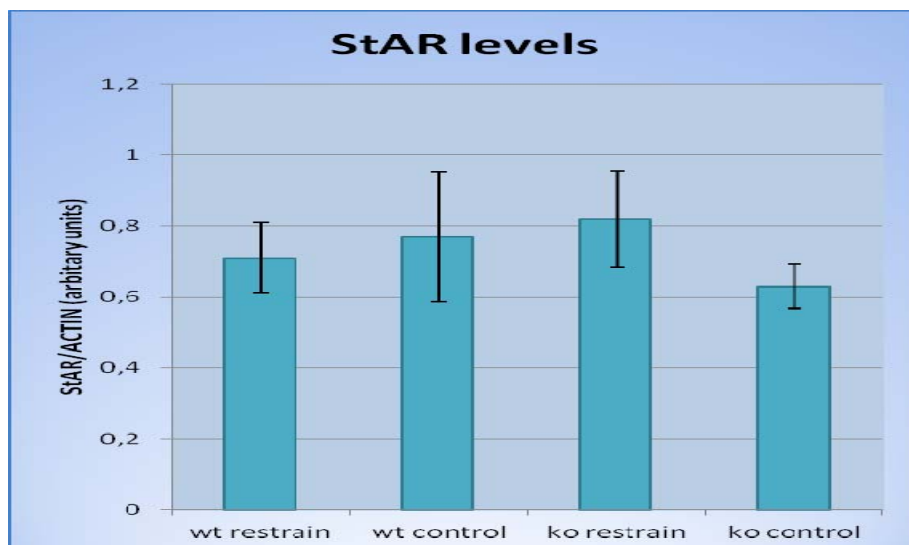
Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα στα θηλυκά ποντίκια, στα αρσενικά τα επίπεδα της έκφρασης της POMC στην υπόφυση στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που δεν είχαν υποστεί το στρες ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα WT ($p=0.001$)(εικόνα 3.9).



ΕΙΚΟΝΑ 3.9 : Επίπεδα mRNA της POMC στην υπόφυση μετά από τρίωρο restraint σε αρσενικά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA της POMC (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0.001$) των επιπέδων έκφρασης του POMC στα Hsp70-/- ζώα που δεν είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($n=2-3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ StAR ΣΤΑ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ RESTRAINT ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ

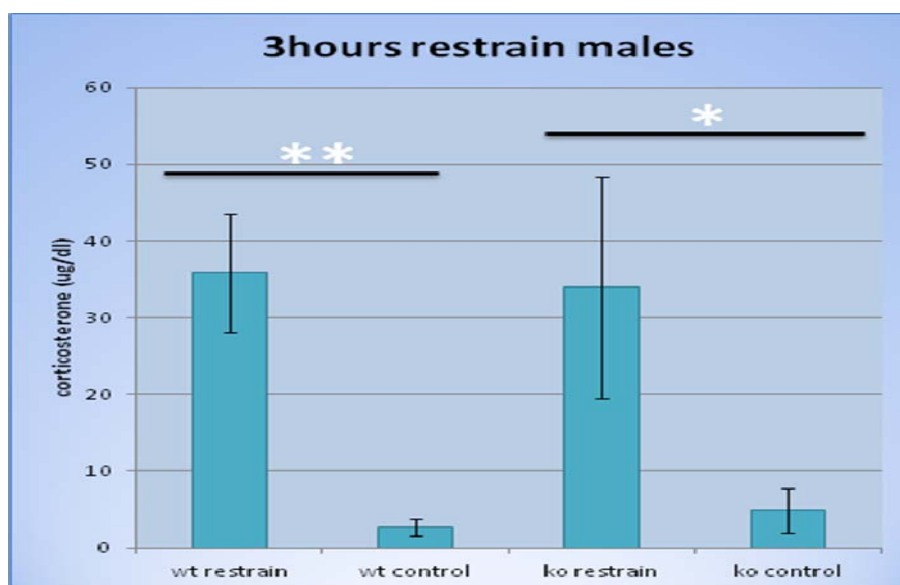
Όπως και στα θηλυκά ποντίκια καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα της έκφρασης του ενζύμου StAR στα επινεφρίδια μεταξύ των δύο γονοτύπων τόσο σε βασικές συνθήκες όσο μετά την επίδραση restraint για τρεις ώρες (εικόνα 3.10).



ΕΙΚΟΝΑ 3.10 : Επίπεδα mRNA της StAR στα επινεφρίδια μετά από τρίωρο restraint σε αρσενικά ποντίκια. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων του mRNA της StAR (arbitrary units: od-Bkg). Τα αποτελέσματα έχουν εκφραστεί ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος (n=2-3 πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Με τη μέθοδο του ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού μελετήθηκαν τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στο πλάσμα σε αρσενικά ποντίκια μετά από τρίωρο restraint, και στις 4 ομάδες ζώων (WT restrain – WT control – *Hsp70*^{-/-} restrain – *Hsp70*^{-/-} control). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης τόσο στα WT όσο και στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα control (p=0.002 και p=0.024 αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και KO ζώων σε βασικές συνθήκες και κατόπιν έκθεσης στο στρες περιορισμού (εικόνα 3.11).



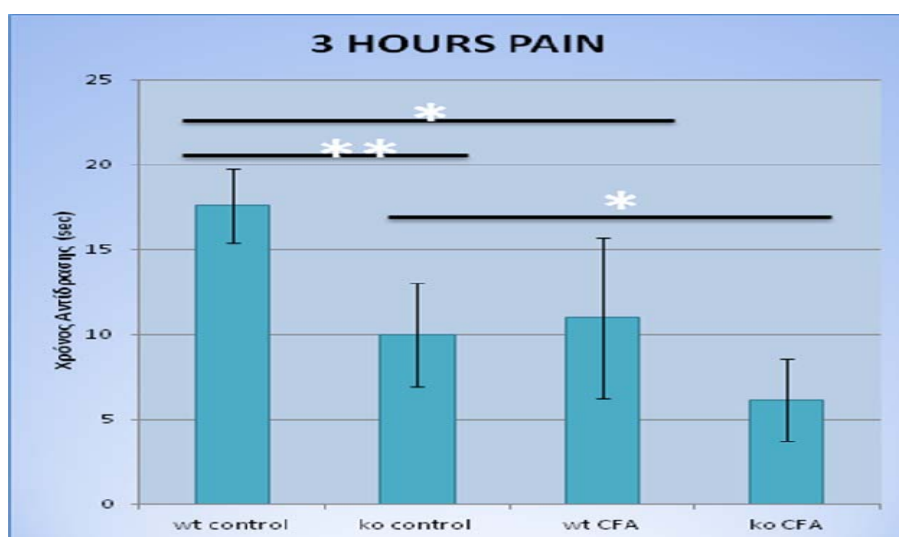
ΕΙΚΟΝΑ 3.11 : Επίπεδα κορτικοστερόνης σε αρσενικά ποντίκια μετά από τρίωρο restraint. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων τόσο στα WT όσο και στα *Hsp70*^{-/-} ζώα που είχαν υποστεί restraint σε σχέση με τα αντίστοιχα control (p=0.002 και p=0.024 αντίστοιχα) (n=2-3 πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ HSP70 ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΣΤΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΓΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΠΟΝΟΥ

Για να μελετηθεί αν υπάρχει διαφορετική απόκριση στο ΥΓΕ κατά τη διάρκεια του φλεγμονώδους πόνου μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} ζώων, αυτά ενέθησαν με complete Freund's adjuvant (CFA) για πρόκληση φλεγμονής και στη συνέχεια μετρήθηκε ο πόνος μετά από 3, 6 και 24 ώρες.

3.6.1 ΤΡΕΙΣ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA

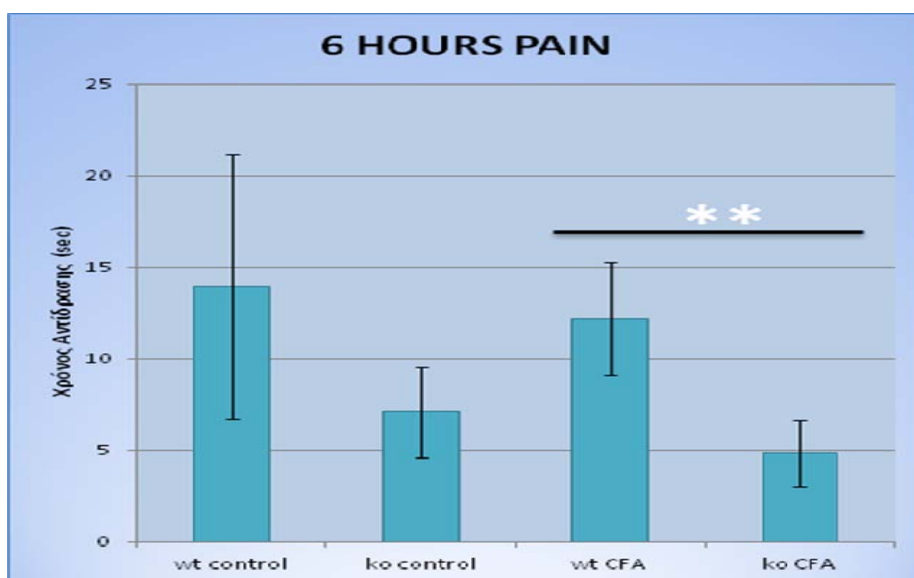
Οι μετρήσεις που έγιναν 3 ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής στα ζώα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης στα *Hsp70*^{-/-} ζώα στο πόδι όπου δεν είχε ενεθεί με CFA σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.001$). Επίσης, μείωση παρατηρήθηκε τόσο στα WT όσο και στα *Hsp70*^{-/-} ζώα στο πόδι όπου είχε γίνει ένεση με CFA σε σχέση με το αντίστοιχο που δεν είχε ενεθεί ($p=0.017$ για τα WT και $p=0.042$ για τα *Hsp70*^{-/-}). Ωστόσο, στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} στην αντίδραση στο πόδι που είχε υποστεί τη φλεγμονή (εικόνα 3.12).



ΕΙΚΟΝΑ 3.12 : Μέσοι όροι αποκρίσεων στον πόνο 3 ώρες μετά την ένεση με CFA σε sec (n=5 πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.6.2 ΕΞΙ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA

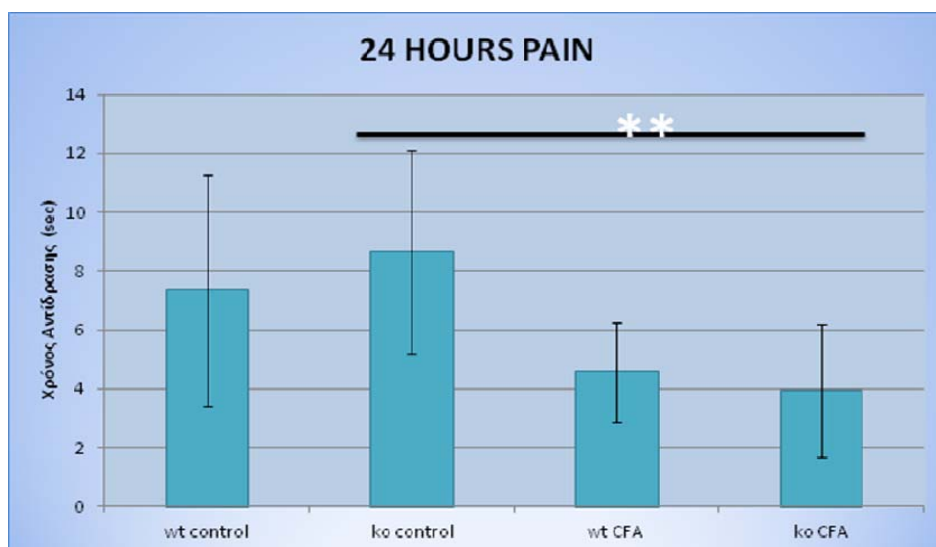
Οι μετρήσεις που έγιναν 6 ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής στα ζώα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης στα *Hsp70*^{-/-} στο φλεγμονώδες πόδι σε σχέση με το αντίστοιχο των WT ($p=0.0017$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} στο πόδι που δεν είχε ενεθεί (εικόνα 3.13).



ΕΙΚΟΝΑ 3.13 : Μέσοι όροι αποκρίσεων στον πόνο 6 ώρες μετά την ένεση με CFA σε sec ($n=5$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.6.3 ΕΙΚΟΣΙ ΤΕΣΣΕΡΕΙΣ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΕΣΗ ΜΕ CFA

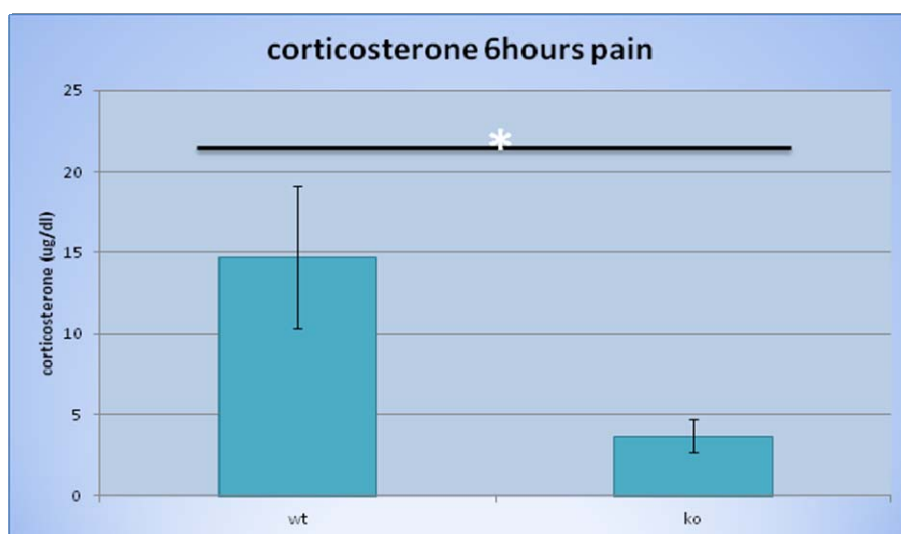
Οι μετρήσεις που έγιναν 24 ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης στα *Hsp70*^{-/-} ανάμεσα στο πόδι που είχε ενεθεί με CFA και το control ($p=0.025$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} τόσο στο φλεγμονώδες πόδι όσο και στο control (εικόνα 3.14).



ΕΙΚΟΝΑ 3.14 : Μέσος όρος αποκρίσεων στον πόνο 24 ώρες μετά την ένεση με CFA σε sec (n=5 πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΖΩΑ 6 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

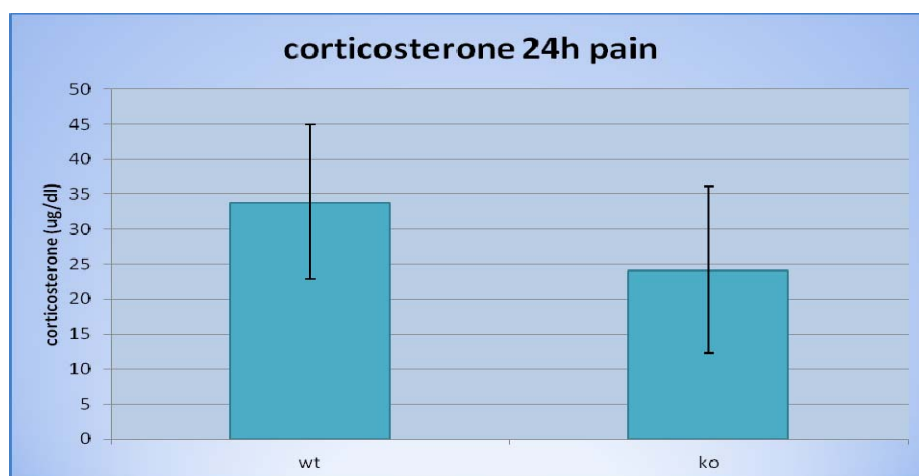
Έξι ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής με CFA τα ζώα θυσιάστηκαν, έγινε συλλογή αίματος και μετρήθηκαν τα επίπεδα της κορτικοστερόνης με τη μέθοδο του ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού, στις δύο ομάδες (WT και *Hsp70*^{-/-} ζώα). Τα επίπεδα της κορτικοστερόνης στα *Hsp70*^{-/-} ζώα (p=0.023) ήταν στατιστικά χαμηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (εικόνα 3.15).



ΕΙΚΟΝΑ 3.15: Επίπεδα κορτικοστερόνης σε θηλυκά ζώα 6 ώρες μετά την επαγωγή της φλεγμονής (ένεση με CFA). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων στα *Hsp70*^{-/-} ζώα σε σχέση με τα αντίστοιχα WT ($p=0.023$) ($n=3$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την πρόκληση φλεγμονής με CFA τα ζώα θυσιάστηκαν, και μετρήθηκαν ξανά τα επίπεδα της κορτικοστερόνης (WT και *Hsp70*^{-/-} ζώα). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ WT και *Hsp70*^{-/-} ζώων (εικόνα 3.15).



ΕΙΚΟΝΑ 3.16 : Επίπεδα κορτικοστερόνης σε θηλυκά ποντίκια 24 ώρες μετά την ένεση με CFA (επαγωγή φλεγμονής) ($n=5$ πειραματόζωα/γονότυπο/κατηγορία).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε προσπάθεια να απαντηθούν βασικά ερωτήματα γύρω από τη δράση των Hsp70, εκπροσώπου της υπερικογένειας των HSPs πρωτεϊνών στο ψυχοσωματικό στρες.

Το θερμικό πλήγμα το οποίο συνίσταται στη σύνθεση των Hsps πρωτεϊνών-στρες πρωτεϊνών ως απόκριση σε ένα ήπιο στρες επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμοστούν στις σταδιακές αλλαγές του περιβάλλοντος τους και να επιβιώσουν σε συνθήκες που θα μπορούσαν να ήταν θανατηφόρες. Πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο των Hsps σε καταστάσεις όπως καρδιακή και εγκεφαλική ισχαιμία και σήψη, ανοξία, υπεριώδη ακτινοβολία, τοξίνες. Παρόλα αυτά ο ρόλος τους στο ψυχοσωματικό στρες καθώς επίσης και στην διαδικασία προσαρμογής του οργανισμού μέσω της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα είναι άγνωστος.

Στο πρώτο μέρος της διπλωματικής αυτής εργασίας έγινε προσπάθεια μελέτης του ρόλου της γενετικής έλλειψης των Hsp70 πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα μετά από παρατεταμένο στρες περιορισμού (3 ώρες restraint) τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά ποντίκια. Το πειραματικό αυτό μοντέλο συνδυάζει τόσο ψυχολογικό όσο και σωματικό στρες. Το χρονικό διάστημα των τριών ωρών επιλέχθηκε για να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε διαφορές στην έκφραση του mRNA και στην έκκριση των αντίστοιχων ορμονών. Σε επίπεδο mRNA, μελετήθηκε και στις δύο ομάδες ζώων η έκφραση των υπεύθυνων για την απόκριση στο στρες γονιδίων, CRH (υποθάλαμος), POMC (υπόφυση) και του ενζύμου StAR (επινεφρίδια) το οποίο αποτελεί ένα από τα καθοριστικά στη βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών ένζυμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του CRH ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στα *Hsp70* ^{-/-} ζώα ελέγχου και στα δύο φύλα (ζώα που δεν είχαν υποστεί στρες) συγκριτικά με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Παρόλα αυτά καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο γονοτύπων που είχαν υποβληθεί σε στρες σε κανένα από τα δύο φύλα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη στην οποία είχε δειχθεί ότι η εφαρμογή στρες περιορισμού σε αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της Hsp70 σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές ταυτόχρονα με την αύξηση των γλυκοκορτικοειδών [21].

Τα επίπεδα έκφρασης του POMC στην υπόφυση που μελετήθηκαν στη συνέχεια οδήγησαν σε διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο φύλων. Στην περίπτωση των θηλυκών ζώων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης στα *Hsp70* ^{-/-} ζώα που είχαν υποστεί πείραμα περιορισμού σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου, αποτέλεσμα μη αναμενόμενο λόγω της έλλειψης αντίστοιχης διαφοράς στην

έκφραση του mRNA του CRH. Αντίθετα, στα αρσενικά ζώα η έκφραση του mRNA της POMC, ήταν σημαντικά μειωμένη στα *Hsp70* $-/-$ ζώα που δεν είχαν υποστεί πείραμα περιορισμού σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με την έκφραση του CRH που αναφέραμε παραπάνω. Ωστόσο και εδώ είναι φανερό πως το ψυχοσωματικό στρες που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν ικανό να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης του POMC, όπως αρχικά ήταν αναμενόμενο.

Οι αλλαγές των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου StAR στα επινεφρίδια δεν ήταν στατιστικά σημαντικές και στις δύο ομάδες ζώων. Μια προσπάθεια που έγινε να αλλαχθούν οι συνθήκες δεν οδήγησε σε διαφορετικά αποτελέσματα. Μια πιθανή λύση θα μπορούσε να αποτελέσει η χρήση της Real-Time PCR καθώς επίσης και η ανοσοιστοχημική ανάλυση των επινεφριδίων. Μη επιβεβαιωμένα αποτελέσματα από το εργαστήριο μας παρέχουν ένδειξεις ότι τα επινεφρίδια των *Hsp70* $-/-$ είναι μικρότερα σε μέγεθος από αυτά των αγρίου τύπου. Πειράματα σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας θα επιβεβαιώσουν την παρατήρηση αυτή.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια μελέτης της επίδρασης του τρίωρου ψυχοσωματικού στρες σε επίπεδο ορμονών. Για το λόγο αυτό, έγινε μέτρηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης τόσο σε αρσενικά όσο σε θηλυκά ζώα. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δυο φύλα μεταξύ των δύο γονοτύπων τόσο στη βασική όσο και στην επαγόμενη από στρες παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών. Πιθανότατα το αποτέλεσμα αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν ήπιες διαφορές στην παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών οι οποίες επικαλύπτονται από τη βαρύτητα του στρες. Προκειμένου να ξεπεράσουμε το πρόβλημα αυτό μετρήσαμε τα επίπεδα της κορτικοστερόνης μετά από την επίδραση στρες περιορισμού 15 λεπτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στο πείραμα αυτό αναμένονταν διαφορές σε επίπεδο ορμονών και όχι σε επίπεδο mRNA. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε και πάλι μεταξύ των δύο γονοτύπων είτε στην βασική ή στην επαγόμενη από στρες έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανά οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό των πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν. Εναλλακτικά πιθανότατα να έχουν αναπτυχθεί αντιρροπιστικοί μηχανισμοί στα *Hsp70* $-/-$ ζώα οι οποίοι συμβάλλουν στην έκκριση της κορτικοστερόνης.

Στη συνέχεια της διπλωματικής αυτής εργασίας έγινε προσπάθεια μελέτης της επίδρασης των *Hsp70* πρωτεϊνών στο φλεγμονώδη πόνο. Από βιβλιογραφικές αναφορές έχει προκύψει ότι πολλές HSPs κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Πειράματα σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι αυξήσεις των

ενδοκυττάρων επιπέδων των HSPs βελτιώνουν την αντοχή των κυττάρων σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ιντερλευκίνη-1 και TNFα.

Με σκοπό να δοθεί απάντηση, στο αν υπάρχει εμπλοκή των HSPs στον πόνο, προκλήθηκε φλεγμονή ύστερα από ένεση με CFA σε θηλυκά πειραματόζωα και μετρήθηκε ο φλεγμονώδης πόνος ύστερα από τρεις, έξι και εικοσιτέσσερις ώρες. Τρεις ώρες μετά την επαγωγή της φλεγμονής παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης στα *Hsp70* *-/-* ζώα, που δεν είχαν ενεθεί με CFA, σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι τα *Hsp70* *-/-* ζώα είναι πιο επιρρεπή στον πόνο σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην απόκριση μεταξύ *Hsp70* *-/-* και αγρίου τύπου που είχαν ενεθεί με CFA γεγονός που υποδεικνύει ότι το χρονικό διάστημα των τριών ωρών δεν ήταν αρκετό για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα.

Έξι ώρες μετά την επαγωγή της φλεγμονής, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης στα *Hsp70* *-/-* ζώα στο πόδι που είχε γίνει ένεση με CFA σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου γεγονός που προτείνει την άμεση εμπλοκή των *Hsp70* πρωτεϊνών στο φλεγμονώδη πόνο.

Επίσης, κατά τη διάρκεια της πειραματικής αυτής διαδικασίας παρατηρήθηκε πως η φλεγμονή που δημιουργήθηκε μετά την ένεση με CFA ήταν μεγαλύτερη στα *Hsp70* KO ζώα σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την ένεση η φλεγμονή είχε αρχίσει σε μεγάλο βαθμό να μειώνεται στα *Hsp70* *-/-* ζώα, ενώ στα αντίστοιχα αγρίου τύπου είχε υποχωρήσει τελείως. Η παρατήρηση αυτή επαληθεύει την αρχική υπόθεση για εμπλοκή των *Hsp70* στο φλεγμονώδη πόνο και στη φλεγμονώδη αντίδραση, γεγονός που έχει προταθεί και σε άλλα πειραματικά μοντέλα φλεγμονής στα ζώα αυτά [22].

Στο τελευταίο κομμάτι της διπλωματικής εργασίας μετρήθηκαν τα επίπεδα της κορτικοστερόνης σε θηλυκά ποντίκια έξι και εικοσιτέσσερις ώρες μετά την πρόκληση της φλεγμονής. Στις έξι ώρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της κορτικοστερόνης στα *Hsp70* *-/-* ζώα σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι τα *Hsp70* *-/-* έχουν μειωμένο χρόνο αντίδρασης μετά την ένεση με CFA στις έξι ώρες σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου.

Τέλος, μετρήσεις των επιπέδων της κορτικοστερόνης εικοσιτέσσερις ώρες μετά την ένεση με CFA δεν οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ *Hsp70* *-/-* και

αγρίου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μείωση της φλεγμονής τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή όπως αναφέραμε και παραπάνω.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Guilliams, T. *et al.* (2010) Chronic stress and the HPA axis: clinical assessment and the therapeutic considerations. *The standard*.
2. Kudielka, B. *et al.* (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological psychology*, 69, 113-132
3. Webster, JI. *et al.* (2004) Role of HPA, glucocorticoid and receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *Journal of Endocrinology*, 207-221
4. Bateman, A. *et al.* (1989) The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis.. *Endocr.Rev.*, p. 92-112.
5. Sapolsky, R. *et al* (1987) Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin- releasing factor. *Science*, p. 522-524.
6. Grammatopoulos, D. *et al.* (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH- receptor antagonists. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 436-444
7. Aguilera, G. *et al.* (2012) The molecular physiology of CRH neurons. *Neuroendocrinology*, 67-84
8. Muglia, L. *et al.* (1994) Expression of the mouse CRH gene in vivo and targeted inactivation in embryonic stem cells. *The journal of clinical investigation*, 2066-2072
9. Margioris, A. *et al.* Chapter 5- ACTH action on the adrenal
10. Kregel, K. *et al.* (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance . *Journal of Applied Physiology*, 2177-2186
11. Iwama, G. *et al.* (1998) Heat shock expression in fish. *Fish Biology and Fisheries*, 35-56

12. Udelsman, R. *et al.* (1993) Vascular Heat shock Protein expression in response to stress. *J.Clin. Invest* , 465-473
13. Santoro, MG. *et al.* (2000) Heat shock Factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology*, 55-63
14. Hochachka, PW. *et al.* (2002) Biochemical adaption. *N.J: Princeton University Press*
15. Tomaken, L. *et al.* (1999) Evolutionary and acclimation induced variation in Heat Shock responses of congeneric marine snails from different thermal habitats : Implications for limits of thermotolerance biogeography. *J. Exp. Biol.* , 2925-2936
16. Walter, S. *et al.* (2002) Molecular chaperones- cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie*, 1098-1113
17. Schmitt, E. *et al.* (2006) Intracellular and Extracellular function of Heat Shock Proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leucocyte Biology*, 15-27
18. Mayer, MP. *et al.* (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci*, 670-684
19. Sridhab, K. *et al.* (1991) Molecular cloning and expression of a human heat-shock factor, HSF1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 6906-6910
20. Prahlad, V. *et al.* (2008) Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from *C.elegans*. *Cell*
21. Dronjak, S. *et al* (2004) Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and puituitary adenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology and Behavior*, 409-415

22. Dugaard, M. *et al* (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 3702-3710.

23. Hunt, C. *et al* (2004) Genomic Instability and Enhanced Radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 899-911.