



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Μελέτη του Φλεγμονώδους πόνου σε αγρίου τύπου και
διαγονιδιακά ζώα”*

Στοιχεία Εκπόνησης Διπλωματικής Εργασίας

Τμήμα Εκπόνησης Διπλωματικής Εργασίας
Τομέας Εκπόνησης Διπλωματικής Εργασίας

Υπεύθυνη Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας
Υπεύθυνο Μέλος ΔΕΠ για την Διπλωματική Εργασία

Στοιχεία Φοιτήτριας

Όνομα / Επώνυμο Φοιτήτριας
Αριθμός Μητρώου
Ακαδημαϊκό Έτος
Εξάμηνο Εγγραφής

Ιατρική
Εργαστηριακή Ιατρική
Κλινική Χημεία
Μαρία Βενυχάκη
Δημήτριος Γανωτάκης

Ειρήνη Βασιλακάκη
1752
2017-2018
Χειμερινό 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| ΕΝΟΤΗΤΑ | ΣΕΛΙΔΑ |
|--|--------------|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 4 |
| 1.0. ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| 2.0. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 6-17 |
| 2.1. Ο ΠΟΝΟΣ | |
| 2.2. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ ΚΑΙ Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ | |
| 2.2.1. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ | |
| 2.2.2. Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ | |
| 2.3. ΤΥΠΟΙ ΠΟΝΟΥ | |
| 2.3.1. ΑΛΓΑΙΣΘΗΤΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ | |
| 2.3.2. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ | |
| 2.3.3. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΠΟΝΟΣ | |
| 2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (Heat Shock Protein) | |
| 2.4.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ | |
| 2.4.2. HSP70 (ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ~70 ΚΙΛΟΔΑΛΤΟΝ) | |
| 2.5. ΠΟΝΤΙΚΙΑ Hsp70 ^{-/-} : ΜΟΝΤΕΛΟ & ΦΛΕΓΜΟΝΗ | |
| 2.5.1. ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ Hsp70 ^{-/-} | |
| 2.5.2. Η ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ Hsp70 ^{-/-} | |
| 3.0. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 18 |
| 4.0. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 19-46 |
| 4.1. ΦΥΛΑΞΗ, ΕΠΙΛΟΓΗ, ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ (ΠΟΝΤΙΚΙΑ) | |
| 4.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΠΟΝΟΥ | |
| 4.2.1. ΣΥΣΚΕΥΗ PLANTAR (ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΟΝΟΥ) | |
| 4.2.2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΜΕΤΡΟ (ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ) | |
| 4.3. ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΡΙΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ | |
| 4.4. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ | |
| 4.4.1. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA | |
| 4.4.2. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ | |
| 4.5. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADOFRD | |
| 4.6. ΕΝΖΥΜΟ-ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ: ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ (ELISA) | |
| 4.6.1. BIOLEGEND ELISA IL6 | |
| 4.6.2. MABTECH ELISA TNF-α | |
| 4.6.3. R&D ELISA για IL6 , TNF-α&IL10 | |
| 4.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA | |
| 4.8. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ RNA | |
| 4.9. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA | |
| 4.10. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) | |
| 4.11. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ | |
| 4.12. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ | |
| 4.13. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΠΛΗΝΑ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | |
| 4.13.1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ | |
| 4.13.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | |

- 4.13.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
- 4.13.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
- 4.14. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

| | |
|--|--------------|
| 5.0. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 47-52 |
| 5.1. ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ: ΠΟΝΟΥ ΚΑΙ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ | |
| 5.2. ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ | |
| 5.3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ | |
| 5.4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ cDNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΠΕΛΜΑΤΟΣ | |
| 5.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΣΠΛΗΝΑ | |
| 6.0. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 53-54 |
| 7.0. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 55-56 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης στο οποίο φιλοξενήθηκα και μου δόθηκε η ευκαιρία να διεκπεραιώσω την παρούσα διπλωματική εργασία. Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Μαρία Βενυχάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε, για το χρόνο που αφιέρωσε και τις γνώσεις που έλαβα από εκείνη.

Ευχαριστώ πολύ και τα παιδιά του εργαστηρίου για την συμβολή του και τις ποικίλες στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί.

Ένα εξίσου σημαντικό ευχαριστώ οφείλω στο τμήμα Χημείας από όπου ξεκίνησα την σταδιοδρομία μου, καθώς και στον κύριο Δημήτριο Γανωτάκη για την συνεργασία, το χρόνο, τις συμβουλές, τις ευκαιρίες και τις γνώσεις που έχω λάβει χάρη στον ίδιο.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου και τους φίλους μου που ήταν και είναι δίπλα μου σε κάθε απόφαση που λαμβάνω, καθώς εκτιμώ αρκετά την επένδυση χρόνου που έχουν κάνει σε εμένα και τις στιγμές που έχουμε περάσει μαζί.

1.0. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης της έλλειψης της πρωτεΐνης θερμικού στρες HSP70 στο φλεγμονώδη πόνο σε ποντίκια, με τη χρήση δύο διαφορετικών γονότυπων: φυσιολογικό (wildtype ή *Hsp70^{+/+}*) και γονότυπο όπου έχει πραγματοποιηθεί γενετική απαλοιφή του γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη HSP70 (*Hsp70^{-/-}*). Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί ο μηχανισμός αντίδρασης των ποντικών *Hsp70^{-/-}* όταν, υπό την επίδραση του ανοσοενισχυτικού διαλύματος αντιγόνου Freund (CFA), εκτίθονταν σε εξωτερικό θερμικό ερέθισμα (ακτινοβολία IR) που προκαλεί πόνο.

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (HSPs) - όπως είναι γνωστές και ως πρωτεΐνες στρες- είναι μία από τις πιο συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών στη φύση. Μελέτες τόσο από τους προκαρυωτικούς όσο και από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν αποδείξει τη μεγάλη σημασία τους και το ρόλο τους σε φυσιολογικές και σε συνθήκες στρες. Ειδικότερα, η οικογένεια πρωτεϊνών Hsp70 αποτελείται από μέλη που καθιστούν δυνατή την αναδίπλωση και τη συναρμολόγηση των νέων συνθετικών πρωτεϊνών και την αναδίπλωση των λανθασμένων και / ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών. Τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη δεν διαθέτουν την πρωτεΐνη HSP70, μια πρωτεΐνη που προστατεύει τον εκάστοτε οργανισμό από την προσβολή τους σε εξωτερικά ερεθίσματα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα HSP70 ποντίκια 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. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν το ρόλο των Hsp70 πρωτεϊνών στην αντίδραση του οργανισμού στο στρες. Παρόλα αυτά καμία μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί για το ρόλο των HSP70 στο φλεγμονώδη πόνο.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τα ποντίκια χωρίζονταν σε ξεχωριστά κλουβιά και προσαρμόζονταν στο πλαστικό δοκιμαστικό μέσο για μέτρηση πόνου (Plantar Test) για τριάντα λεπτά. Η προσαρμογή πραγματοποιούνταν για πέντε ημέρες. Αμέσως μετά ακολουθούσαν οι μετρήσεις βασικού πόνου (δεν χορηγείται βακτήριο) σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα: 3 ώρες, 6 ώρες και 24 ώρες. Μετά το πέρας των μετρήσεων αυτών, γινόταν ένεση με ανοσοενισχυτικό διάλυμα αντιγόνου Freund (CFA) στο πέλμα (20 μ L) και ξεκινούσε ο νέος κύκλος μετρήσεων, όπως αυτός του βασικού πόνου. Επιπλέον, πραγματοποιούνταν παράλληλα μετρήσεις οιδήματος. Για τη μέτρηση του οιδήματος χρησιμοποιείται το πληθυσμόμετρο. Τέλος, σε όλα τα ζώα πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις παραγόντων που διαμεσολαβούν τη φλεγμονώδη αντίδραση όπως κυτοκίνες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* έχουν ελλιπή μηχανισμό αντίδρασης έναντι του φλεγμονώδους πόνου καθώς παρατηρείται μειωμένος ουδός πόνου όταν είναι εκτίθενται σε εξωτερικό θερμικό ερέθισμα (ακτινοβολία IR) ανεξάρτητα από την επίδραση του φλεγμονώδους στρες. Παραδόξως, το οίδημα του φλεγμαίνοντος πέλματος των ποντικών *Hsp70^{-/-}* είναι μικρότερο από εκείνο των φυσιολογικών ποντικών. Καμία διαφορά δε βρέθηκε στα επίπεδα των κυτοκινών μεταξύ των δύο γονοτύπων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η HSP70 ασκεί προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό έναντι του φλεγμονώδους πόνου, ενώ η δράση της αναφορικά με τη φλεγμονώδη αντίδραση όπως προκύπτει από το βαθμό του οιδήματος είναι αντιφλεγμονώδης. Περαιτέρω πειράματα είναι σε εξέλιξη για να διαπιστωθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκεί τη δράση της.

2.0. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1. Ο ΠΟΝΟΣ

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Μελέτης του Πόνου (IASP) (ιδρύθηκε το 1973), 'ο πόνος είναι μια δυσάρεστη αισθητική και συναισθηματική εμπειρία που σχετίζεται με πραγματική ή πιθανή βλάβη των ιστών' (ο ορισμός προέρχεται από τον Harold Merskey, 1964). Η αντίληψη του πόνου προκαλείται από βλαβερά ερεθίσματα, όπως είναι ο τραυματισμός, κάποια ασθένεια ή βλάβες στο κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα. Η οδύνη είναι μια αρνητική αντίδραση του πόνου, η οποία συνοδεύεται από το φόβο και το άγχος, οδηγώντας τον εκάστοτε ασθενή να αντιδράσει, έτσι ώστε να απομακρύνει το αλγογόνο ερέθισμα.

2.2. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ ΚΑΙ Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ

2.2.1. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ

Οι υποδοχείς του πόνου είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις, οι οποίες βρίσκονται (σε μεγάλο βαθμό) στις διάφορες στιβάδες του δέρματος και σε ορισμένους ιστούς (περιόστεο), σε επιφάνειες των αρθρώσεων και σε δρεπανοειδείς συνδέσμους.

Τα ερεθίσματα που διεγείρουν τους υποδοχείς του πόνου είναι: (α) υπέρμετρη μηχανική τάση ή μηχανική βλάβη των ιστών, (β) ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας (έντονα θερμό κλίμα ή έντονα ψυχρό κλίμα) και (γ) έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες, όπως είναι: η ισταμίνη, η βραδυκινίνη, τα ιόντα καλίου, τα οξέα κ.α. Οι τύποι υποδοχέων που δέχονται τα προαναφερθέντα ερεθίσματα ονομάζονται (αντίστοιχα): (α) μηχανοευαίσθητοι υποδοχείς, (β) θερμοευαίσθητοι υποδοχείς και (γ) χημειευαίσθητοι υποδοχείς. (A. GUYTON, (1990))

2.2.2. Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ

Οι ώσεις του πόνου μεταβιβάζονται με μικρές ίνες τύπου Αδ (ταχύτητα: 6-30 m/sec) και με ίνες τύπου C (ταχύτητα: 0.5-2 m/sec). Όταν ένα άτομο εκτίθεται σε αλγογόνο ερέθισμα, προκαλείται αίσθημα "διπλού" πόνου: ένα αίσθημα γρήγορου διαξιφιστικού πόνου και, αμέσως μετά, ένα αίσθημα αργού και καυστικού πόνου. Ο διαξιφιστικός πόνος ενημερώνει εγκαίρως το εκάστοτε άτομο για την βλαπτική επίδραση ενός ερεθίσματος, με αποτέλεσμα το άτομο να αντιδρά άμεσα με σκοπό την απομάκρυνσή του. Το καυστικό αίσθημα γίνεται (με την πάροδο του χρόνου) όλο και πιο οδυνηρό και προκαλεί την αφόρητη κατάσταση του πόνου.

Οι ίνες του πόνου εισέρχονται στο νωτιαίο μυελό από τις οπίσθιες ρίζες, ανεβαίνουν ένα με δύο νευροτόμια και καταλήγουν σε νευρώνες των οπίσθιων κεράτων της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού, δηλαδή στις ίνες Αδ, στα πέταλα I και V και στις ίνες C, στα πέταλα II και III. Η περιοχή ονομάζεται πηκτωματόδης ουσία. Έπειτα, οι ώσεις περνούν από ένα ή και περισσότερους νευρώνες με βραχείς ίνες και, τελικά, με μακριές ίνες. Έπειτα χιάζονται αμέσως, περνούν στην άλλη πλευρά του νωτιαίου μυελού και φτάνουν στον εγκέφαλο.

Καθώς περνούν από το εσωτερικό του εγκεφάλου, χωρίζονται σε δύο ξεχωριστές οδούς:

- στην οδό του διαξιφιστικού πόνου, η οποία αποτελείται από μικρές ίνες τύπου Αδ και
- στην οδό του καυστικού πόνου η οποία αποτελείται από μικρές ίνες τύπου C.

Η οδός του διαξιφιστικού πόνου καταλήγει στο κοιλιοβασικό σύμπλεγμα, πολύ κοντά στις περιοχές που καταλήγουν οι ίνες των απτικών αισθημάτων των συστημάτων: οπίσθιο δεματιο-λημνίσκο και νωτιοθαλαμικό. Από εκεί μεταβιβάζονται σε άλλες περιοχές του θαλάμου και στο σωματοαισθητικό φλοιό (σωματική περιοχή Ι). Οι ώσεις που κατευθύνονται στο φλοιό έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον εντοπισμό του πόνου.

Η οδός του καυστικού πόνου καταλήγει στο δικτυωτό σχηματισμό του εγκεφαλικού στελέχους και στους ενδοπεταλιακούς πυρήνες του θαλάμου. Τα μέρη αυτά συντελούν το δικτυωτό ενεργοποιητικό σύστημα, το οποίο μεταβιβάζει ενεργοποιητικές ώσεις σε όλα τα τμήματα του εγκεφάλου, ιδιαίτερα διαμέσου του οπτικού θαλάμου προς τον εγκεφαλικό φλοιό (ανοδική πορεία),

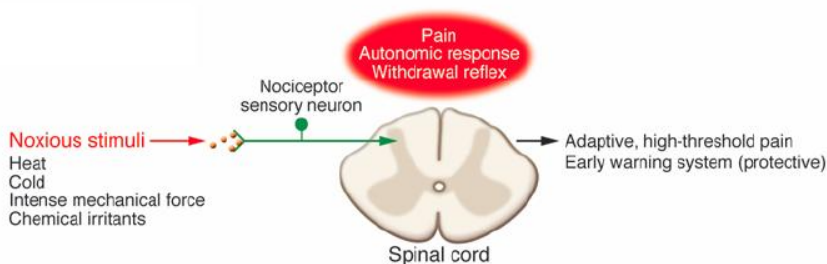
στις περιοχές της βάσης του εγκεφάλου (πλάγια πορεία) και προς τον υποθάλαμο. Έτσι, ενεργοποιείται όλο το νευρικό σύστημα και προκαλούνται αντιδράσεις άμυνας με σκοπό να απαλλαγεί το εκάστοτε άτομο από το οδυνηρό ερέθισμα. (A. GUYTON, (1990))

2.3. ΤΥΠΟΙ ΠΟΝΟΥ

2.3.1. ΑΛΓΑΙΣΘΗΤΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ

Αποτελεί σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης που εκδηλώνεται όταν το εκάστοτε άτομο έρχεται σε επαφή με κάτι πολύ ζεστό, πολύ κρύο ή αιχμηρό.

Είναι ο τύπος πόνου που αποτελεί ένα πρόωρο-προειδοποιητικό φυσιολογικό προστατευτικό σύστημα, απαραίτητο να ανιχνεύσει και να ελαττώσει την επαφή με το καταστρεπτικό ή βλαβερό ερέθισμα. Ο προστατευτικός ρόλος του απαιτεί άμεση προσοχή και δράση, τα οποία συμβαίνουν εξαιτίας του αντανάκλαστικού απομάκρυνσης που ενεργοποιεί, την εσωτερική δυσάρεστη αίσθηση και το συναισθηματικό άγχος που περιλαμβάνει. (Woolf, 2010)

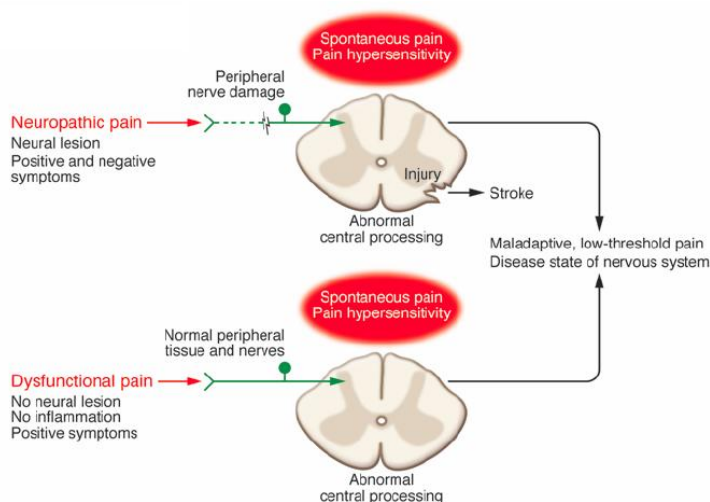


Εικόνα 1. Αλγαισθητικός πόνος (Woolf, 2010)

2.3.2. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ

Αντιπροσωπεί μια κατάσταση που αφορά τη δυσλειτουργία του νευρικού συστήματος.

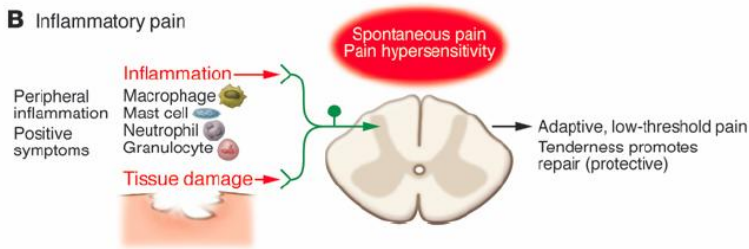
Η κατάσταση αυτή αφορά την σημαντική βλάβη που υφίσταται το νευρικό σύστημα (νευροπαθητικός πόνος) καθώς και την κατάσταση κατά την οποία υπάρχει δυσλειτουργία (δυσλειτουργικός πόνος) εξαιτίας κάποιου συνδρόμου (ινομυαλγία, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, πονοκέφαλος τάσης, ενδιάμεση κυστίτιδα, κλπ) ή κάποια παθολογική κατάσταση μειωμένης ισχύος. (Woolf, 2010)



Εικόνα 2. Παθολογικός πόνος (Woolf, 2010)

2.3.3. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΠΟΝΟΣ

Ο φλεγμονώδης πόνος έχει προστατευτικό χαρακτήρα. Όταν καταστρέφεται κάποιος ιστός, ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα, με σκοπό την επούλωση του τραυματισμένου ιστού.



Εικόνα 3. Φλεγμονώδης Πόνος (Woolf, 2010)

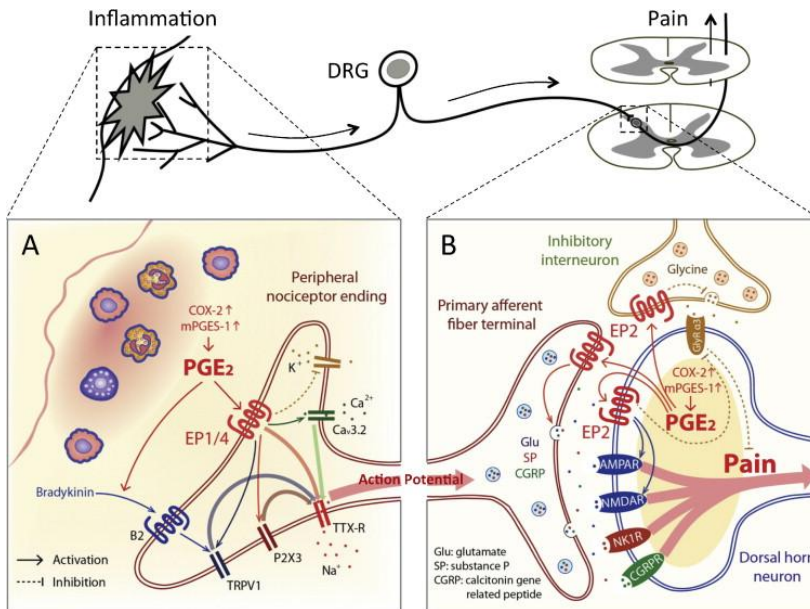
Μόλις τραυματιστεί κάποιος ιστός, ξεκινάει η έκκριση χημικών μεσολαβητών από τα τραυματισμένα κύτταρα, οι οποίοι είναι:

- οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες: η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α)
- Χημειοκίνες [όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (MCP-1)]
- Προσταγλανδίνες [όπως η προσταγλαδίνη (PG) E2 και η προστακυκλίνη (PGI2)]
- Πεπτίδια που ενεργοποιούνται PKC, ενεργοποίησις TrkA από το Νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF), καθώς επίσης και ελεύθερες ρίζες [ROS], αλδεϋδες.

Μόλις εκκριθούν, ξεκινά η ρύθμιση των υποδοχέων του πόνου και η μεταγωγή των σημάτων.

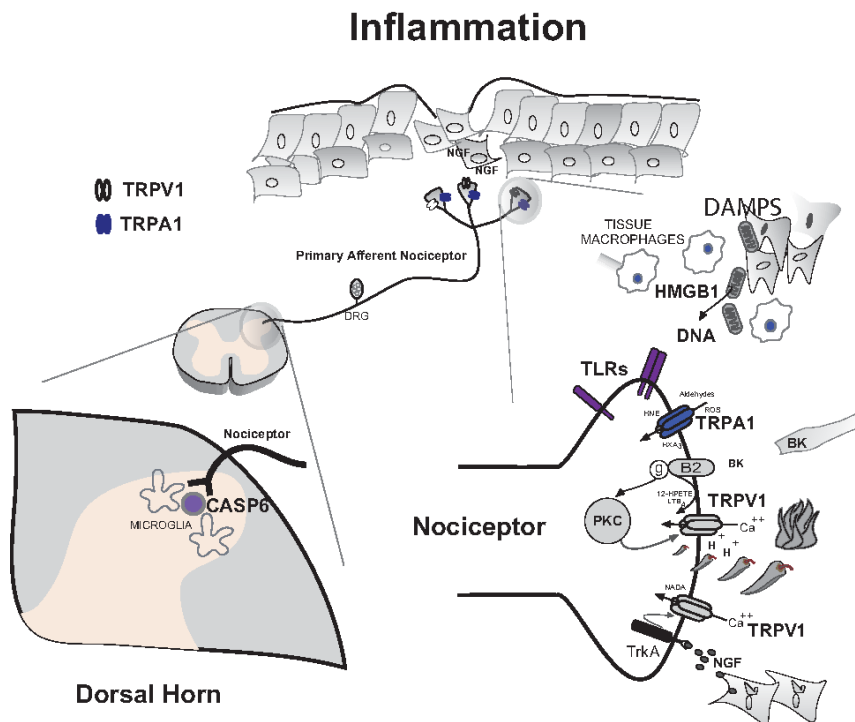
Επίσης διεγείρεται η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (για παράδειγμα: γλουταμικό, ουσία P) με αποτέλεσμα την αύξηση των εκκρινόμενων προφλεγμονώδων κυτοκινών και διεγείρεται η παραγωγή της PGE2 στο νωτιαίο μυελό.

Αυτό προκαλεί επιπλέον διέγερση και δυσαναστολή των νευρώνων του νωτιαίου κέρατου και ξεκινά μη φυσιολογικές ανταποκρίσεις σε αισθητικά σήματα από την περιφέρεια.



Εικόνα 4. Μηχανισμός φλεγμονώδους πόνου (α) (Chen, (2013))

Μόρια όπως εκείνα που σχετίζονται με καταστροφή (DAMPs , HMGB1) και μιτοχονδριακής προέλευσης DNA δεσμεύονται και ενεργοποιούν υποδοχείς toll-like (TLRs) που εκφράζονται σε αλγαισθητικές νευρικές ίνες γεγονός οδηγεί σε υπεραλγησία. (J Guan, (2016); Chen, (2013); Woolf, 2010)



Εικόνα 5. Μηχανισμός Φλεγμονώδους πόνου (β) (J Guan, (2016))

Οι χημικοί μεσολαβητές (όπως αναφέρονται παραπάνω) που εκκρίνονται από τα τραυματισμένα κύτταρα συμβάλλουν στην απελευθέρωση μορίων σηματοδότησης (CASP6) τα οποία ενεργοποιούν την φλεγμονώδη υπεραλγησία.

2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (Heat Shock Protein)

2.4.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ

Η παρατήρηση ότι μια αύξηση της θερμοκρασίας λίγων βαθμών πάνω από το φυσιολογικό επίπεδο προκαλεί τη σύνθεση ενός μικρού αριθμού πρωτεϊνών στους σιελογόνους αδένες της *Drosophila* οδήγησε στην ανακάλυψη ενός καθολικού προστατευτικού μηχανισμού που τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν για τη διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας και ομοιόστασης. Αυτός ο σύνθετος μηχανισμός φυσιολογικής άμυνας, γνωστός ως αντίδραση θερμικού σοκ, περιλαμβάνει την ταχεία επαγωγή ενός ειδικού συνόλου γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες θερμικού σοκ, HSP). (Schlesinger, 1990). Το 1962, ο γενετιστής Ferruccio Ritossare υποστήριξε ότι η θερμότητα και η μεταβολική μη συζευγμένη 2,4-δινιτροφαινόλη προκάλεσαν το χαρακτηριστικό μοτίβο "διογκώσεων" στα χρωμοσώματα της *Drosophila*. Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP) ή πρωτεϊνών στρες.

Η αυξημένη σύνθεση επιλεγμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα της *Drosophila* υπό συνθήκες πίεσης, ήταν η πρώτη ανακάλυψη που αναφέρθηκε το 1974 από τους: Alfred Tissières, Herschel K. Mitchell & Ursula M. Tracy. (Tissières, (1974))

Ξεκινώντας στα μέσα της δεκαετίας του 1960, οι ερευνητές αναγνώρισαν ότι πολλές πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως συνοδευτικά μόρια και διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην αναδίπλωση πρωτεϊνών, στην ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών και στην αντιμετώπιση μετουσιωμένων πρωτεϊνών υπό συνθήκες θερμότητας και άλλων καταπονήσεων ή δυσφορών συνθηκών. Σε κύτταρα θηλαστικών, αρκετές πρωτεΐνες θερμικού που λειτουργούν ως συνοδευτικά μόρια είναι απαραίτητες για τη σωστή αναδίπλωση, συναρμολόγηση και ενδοκυτταρική μετατόπιση πρωτεϊνών και εκφράζονται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών ανάπτυξης, καθώς μπορούν να προκληθούν από βιολογικώς δραστικά μόρια, ενώ άλλες εκφράζονται με ενεργοποιημένη τασεοελεγχόμενη ρύθμιση μεταγραφικών και μεταφραστικών μορίων. (Ayesha Murshid, 2012) Η παροδική έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες έχει προστατευτική επίδραση έναντι των παρατεταμένων, συνήθως θανατηφόρων εκθέσεων σε άλλες μορφές στρες. Η παραγωγή υψηλών επιπέδων πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί επίσης να προκληθεί από την έκθεση σε διαφορετικά είδη περιβαλλοντικών συνθηκών στρες, όπως είναι: μόλυνση, φλεγμονή, άσκηση, έκθεση του κυττάρου σε τοξίνες (αιθανόλη, αρσενικό, ιχνοστοιχεία και υπεριώδες φως, μεταξύ πολλών άλλων), λιμοκτονία, υπό συνθήκες στέρησης οξυγόνου, ανεπάρκειας αζώτου (σε φυτά) ή στέρησης νερού.

Ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται το θερμικό σοκ συνάδει με τον συντελεστή θερμικού σοκ που προσδιορίζεται σε βακτήρια. Κατά τη θερμική καταπόνηση, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) δεν διπλώνουν και δεν μπορούν να εισαχθούν σωστά στην εξωτερική μεμβράνη. (Santoro, 1999) Συσσωρεύονται στο περίβλημα του πλασματικού χώρου. Οι OMP ανιχνεύονται από DegS, μια πρωτεάση εσωτερικής μεμβράνης, που μεταφέρει το σήμα (μέσω της μεμβράνης) στη μεταγραφική περιοχή sigmaE. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αύξηση των βλαβερών ή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

Μεγάλο μέρος της αρχικής μοριακής βιολογίας και βιοχημείας του θερμικού σοκ συνίστατο στην κλωνοποίηση των γονιδίων, στον προσδιορισμό των πρωτογενών αλληλουχιών των πρωτεϊνών και στην ανίχνευση των ρυθμιστικών παραγόντων που ευθύνονται για την επαγωγή τους. Από αυτές τις μελέτες, συμπεραίνεται ότι η αλληλουχία DNA που είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίου θερμικού σοκ στο ευκαρυωτικό κύτταρο ήταν αμετάβλητη κατά την εξέλιξη (από ζυμομύκητες έως τους ανθρώπους). Η πιο πρόσφατη ανάλυση αυτού του στοιχείου υποδηλώνει ότι είναι μια ανεστραμμένη επανάληψη του ζεύγους βάσεων 5'-νουκλεοτιδίων (nGAAn).

Η παρουσία αυτού του στοιχείου που βρίσκεται περίπου 80-150 ζεύγη βάσεων πριν από την θέση έναρξης της μεταγραφής του RNA είναι η πιο ορθή απόδειξη ότι το γονίδιο κωδικοποιεί μία

πρωτεΐνη θερμικού σοκ. (Chebotareva, Bobkova, & Shilov, 2017) Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που συνδέεται με το θερμικό σοκ έχει κλωνοποιηθεί από ζύμη και έχει αποδειχθεί ότι είναι ουσιώδες για τη βιωσιμότητα αυτού του οργανισμού. Αυτή η πρωτεΐνη των ζυμομυκήτων υπάρχει σε κύτταρα κάτω από κανονικές συνθήκες ανάπτυξης και συνδέεται με το DNA υπό συνθήκες ανύπαρκτου στρες. Ωστόσο, η κατάσταση της φωσφορυλίωσης αλλάζει με την αύξηση του επιπέδου θερμοκρασιακής τάσης.

Σε ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς, ο παράγοντας δεν συνδέεται κανονικά με το DNA αλλά το κάνει ταχέως μετά το στρες και ανιχνεύεται επιπρόσθετη φωσφορυλίωση του παράγοντα.

Τα μόρια mRNA από τα γονίδια του θερμικού σοκ έχουν δομές που επιτρέπουν την εκλεκτική τους μετάφραση σε ένα κύτταρο. Αυτές περιλαμβάνουν έλλειψη ιντρονίων, περιοχές στις 5'-μη μεταφραζόμενες περιοχές που προσδίδουν απόδοση μετάφρασης και περιοχές στις 3'-αμετάφραστες περιοχές που παρέχουν αυξημένη σταθερότητα.

Αρκετές πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως ενδοκυτταρικά συνοδευτικά μόρια για άλλες πρωτεΐνες. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης όπως η αναδίπλωση και η καθήλωση κατάλληλης διαμόρφωσης πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ βοηθούν στη μεταφορά πρωτεϊνών μέσω των μεμβρανών, στο εσωτερικό του κυττάρου. Ορισμένα μέλη της οικογένειας HSP εκφράζονται σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα σε όλους τους οργανισμούς καθώς έτσι διατηρείται η πρωτεΐνη σε καλύτερο επίπεδο.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ονομάζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Για παράδειγμα: HSP60, HSP70 και HSP90 (η οι ευρέως μελετημένες HSPs) αναφέρονται σε οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ της τάξης των 60, 70 και 90 kilodaltons ως προς το μέγεθος, αντίστοιχα. Άλλα μέλη της οικογένειας αποτελούν: η μικρή πρωτεΐνη ουκυκτινής (sHSP) 8 kilodalton, η οποία σηματοδοτεί πρωτεΐνες για αποικοδόμηση (έχει και εκείνη χαρακτηριστικά πρωτεΐνης θερμικού σοκ). (MJ, (July 1990).)

| Βάρος Πρωτεΐνης (kDa) | Πρωτεΐνες σε Προκαρυωτικό κύτταρο | Πρωτεΐνες σε Ευκαρυωτικό κύτταρο |
|------------------------------|--|---|
| 10 | GroES | Hsp10 |
| 20-30 | GrpE | Hsp27, HspB6, HspB1 |
| 40 | DnaJ | Hsp40 |
| 60 | GroEL | Hsp60 |
| 70 | DnaK | Hsp71, Hsp72, Hsp70 |
| 90 | HtpG, C62,5 | Hsp90, Grp94 |
| 100 | ClpB, ClpA, ClpX | Hsp104, Hsp110 |

Πίνακας 1. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Schlesinger, 1990)

2.4.2. HSP70 (ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ~70 KILODALTON)

Μια από τις πιο μελετημένες οικογένειες HSP είναι η οικογένεια HSP70, της οποίας η δομή έχει διατηρηθεί ευρέως μέσω της εξέλιξης από τα βακτήρια στον άνθρωπο, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο της στην επιβίωση του οργανισμού. (Bukau, 2005) Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν την οικογένεια HSP70 μοιράζονται κοινές πρωτεϊνικές αλληλουχίες, αλλά συντίθενται υπό διαφορετικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη των 73 kDa (HSP73 ή HSC70) παράγεται συνεχώς, ενώ η πρωτεΐνη 72-kDa (HSP72 ή HSP70) είναι εξαιρετικά επαγωγίμη και η σύνθεση της αυξάνεται με απόκριση σε πολλαπλούς στρεσογόνους παράγοντες.

Το γονίδιο *hsp70* είναι ένα γονίδιο 2,440 βάσεων που περιέχει μια ακολουθία 212 βάσεων ή 5α-μη μεταφραζόμενη περιοχή και μια ακολουθία 242 βάσεων ή 3α-μη μεταφραζόμενη περιοχή. Το γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 64 αμινοξέων, την 70-kDa έχοντας ομολογία 91%-95% με το ανθρώπινο γονίδιο *hsp70*. Ενώ δεν υπάρχει ομολογία μεταξύ των 5'- και 3'-μη μεταφραζόμενων περιοχών, οι υποκινητές του γονιδίου *hsp70* του ανθρώπου και του ποντικού έχουν ομολογία 65%. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο ρυθμιστικά στοιχεία στην 5α-περιοχή που αλληλεπιδρούν με παράγοντες μεταγραφής του θερμικού σοκ (HSFs). Δεσμεύονται στον εκκινητή κατά τη διάρκεια του στρες και είναι επαρκείς για να επάγουν την μεταγραφή της HSP70. Εκτός από την υπερθερμία, είναι γνωστό ότι ένας αριθμός ερεθισμάτων προκαλεί την μεταγραφή της HSP70. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν: εξάντληση ενέργειας, υποξία, οξέωση, ισχαιμία-επαναιμάτωση, δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), δραστικά είδη αζώτου. Μια σημαντική σκέψη σχετικά με τη ρύθμιση της HSP70 περιλαμβάνει την εμφανή αντίφαση μεταξύ της μεταγραφής του μηνύματος και της μετάφρασης της HSP70. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *Hsp70* είναι ανεξάρτητη από τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 είναι μια οικογένεια καλά συντηρημένων και ευρύτατα εκφραζόμενων πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Πρωτεΐνες με παρόμοια δομή υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. (Jens Luders, 2000) Οι πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 διαθέτουν ένα σημαντικό μέρος του μηχανισμού αναδίπλωσης πρωτεϊνών και βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από το στρες. Συγκεκριμένα ρυθμίζονται πολύ έντονα από την θερμική καταπόνηση και τις τοξικές χημικές ουσίες, ιδιαίτερα τα βαρέα μέταλλα όπως το αρσενικό, το κάδμιο, ο χαλκός, ο υδράργυρος κλπ.

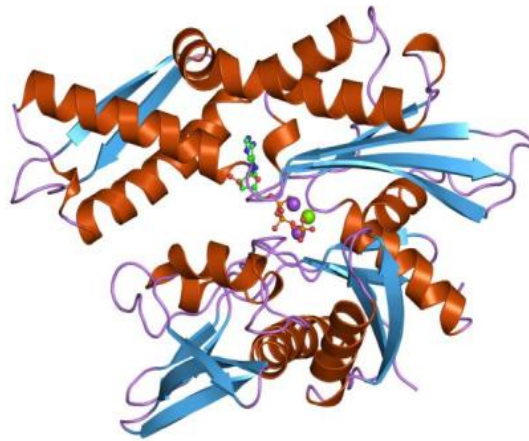
Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας HSP70 περιγράφεται παρακάτω:

Αποτελείται από δύο λειτουργικούς τομείς: ο Ο-τερματικός τομέας δέσμησης υποστρώματος πρωτεΐνης και μια Ν-τερματική περιοχή δέσμησης του ATP.

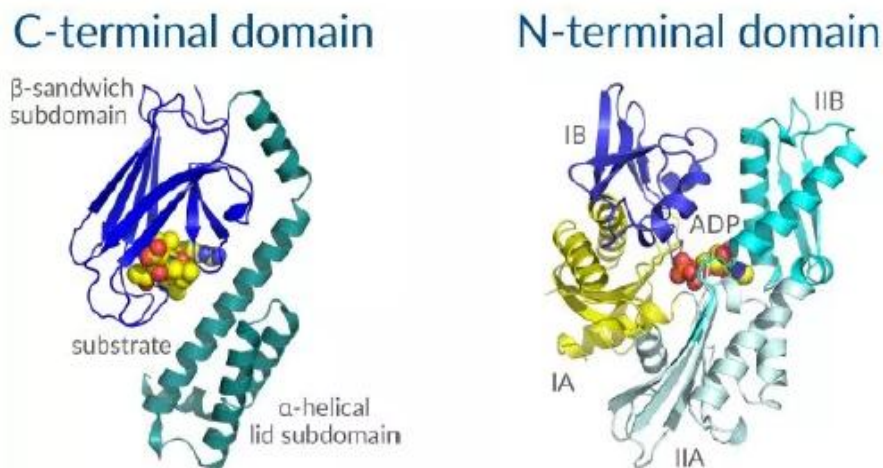
Ο τομέας δέσμησης υποστρώματος αποτελείται από δύο υποτομείς: έναν υποτομέα β-σάντουιτς δύο στρωμάτων, ο οποίος περιέχει σημείο σύνδεσης πεπτιδίου και έναν α-ελικοειδή υποτομέα, ο οποίος χρησιμεύει ως κάλυμμα για την κάλυψη της σχισμής για τη σύνδεση του υποστρώματος. (Masison, 2009)

Ο τομέας σύνδεσης του ATP αποτελείται από τέσσερις υποτομείς και χωρίζεται σε δύο λοβούς από μια κεντρική υποδοχή σύνδεσης του ATP/ADP. Οι δύο τερματικοί τομείς συνδέονται με έναν σύνδεσμο, ο οποίος είναι κρίσιμος για την αλλοστερική επικοινωνία μεταξύ των τομέων.

Μία μεταβλητή περιοχή (αλληλουχία EEVD) στο άκρο της C-τελικής περιοχής δρα σαν σημείο σύνδεσης για συν-συνοδούς με τη βοήθεια των βοηθητικών πρωτεϊνών. Η HSP70 δεσμεύεται σε σύντομες υδροφοβικές περιοχές νεοσχηματιζόμενων ή μη πτυχωμένων πολυπεπτιδίων, διαμέσου του πεδίου δέσμησης υποστρώματος, σε εξαρτώμενο (από ATP) μέλος. Η υδρόλυση του ATP ενεργοποιεί μια νέα διαμόρφωση για να προκαλέσει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και την απελευθέρωση του υποστρώματος. Οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEFs) διευκολύνουν την ανταλλαγή ADP με ATP, επιτρέποντας στην HSP70 να δεσμεύεται σε ένα νέο υπόστρωμα και να επαναλαμβάνει τον κύκλο.



Εικόνα 6. Δομή της πρωτεΐνης θερμικής καταπηλξίας Hsp70 (70K) (Flaherty, (1990).)



Εικόνα 7. Λειτουργικοί τομείς της πρωτεΐνης Hsp70 ("Molecular Chaperones in Control of the Heat Shock Response," (2017))

Το σύστημα λειτουργίας της HSP70 αλληλεπιδρά με εκτεταμένα πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνών καθώς και με μερικώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, για να επιτευχθεί η πρόληψη της συσσωμάτωσης, η αναδιαμόρφωση των οδών αναδίπλωσης και η ρύθμιση της δραστηριότητας. (Bukau, 2005) Όταν δεν αλληλεπιδρά με κάποιο πεπτιδίο υποστρώματος, η HSP70 είναι συνήθως σε μια συνδεδεμένη (με ATP) κατάσταση.

Η HSP70(ως ανεξάρτητο μόριο) χαρακτηρίζεται ως δραστικώς ασθενής ATPάση, έτσι ώστε να μην συμβεί αυθόρμητη υδρόλυση για αρκετό χρόνο. Καθώς οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες αναδύονται από τα ριβοσωμάτια, η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος της HSP70 αναγνωρίζει αλληλουχίες των υδρόφοβων υπολειμμάτων των αμινοξέων και αλληλεπιδρά άμεσα με αυτά. Αυτή η αυθόρμητη αλληλεπίδραση είναι αναστρέψιμη και στην συνδεδεμένη (με ATP) κατάσταση, η HSP70 μπορεί να δεσμευτεί (σχετικά) και να απελευθερώσει πεπτιδία. Ωστόσο, η παρουσία ενός πεπτιδίου στην περιοχή δέσμευσης διεγείρει τη δραστικότητα της ATPάσης της HSP70, αυξάνοντας τον αργό

ρυθμό της υδρόλυσης του ATP. Όταν το ATP υδρολύεται σε ADP, ο θύλακας δέσμευσης της HSP70 κλείνει, δεσμεύοντας στενά την πεπτιδική αλυσίδα που παγιδεύεται.

Η HSP70 εξυπηρετεί την διαμεμβρανική μεταφορά πρωτεϊνών, σταθεροποιώντας τις σε μια μερικώς διπλωμένη κατάσταση. Είναι επίσης γνωστό ότι εφόσον είναι φωσφορυλιωμένη, ρυθμίζει πολλές από τις λειτουργίες της.

Οι πρωτεΐνες HSP70 μπορούν να δράσουν για την προστασία των κυττάρων από το θερμικό ή το οξειδωτικό στρες. Αυτές οι καταστάσεις φυσιολογικά δρουν για να επιφέρουν επιβλαβείς επιπτώσεις στις πρωτεΐνες, προκαλώντας μερική εκτύλιξη και πιθανή συσσωμάτωση. Με προσωρινή δέσμευση σε υδρόφοβα υπολείμματα που εκτίθενται από το στρες, η HSP70 αποτρέπει αυτές τις μερικώς μετουσιωμένες πρωτεΐνες από τη συσσωμάτωση και τους επιτρέπει να αναδιπλωθούν. Το χαμηλό ποσοστό του ATP είναι χαρακτηριστικό του θερμικού σοκ και η παρατεταμένη δέσμευση θεωρείται καταστολή της συσσωμάτωσης, ενώ η ανάκτηση από το θερμικό σοκ συνεπάγεται με δέσμευση υποστρώματος και κύκλωμα των νουκλεοτιδίων.

Εκτός από τη βελτίωση της συνολικής ακεραιότητας της πρωτεΐνης, η HSP70 αναστέλλει άμεσα την απόπτωση. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης είναι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο στη συνέχεια προσλαμβάνει το Apaf-1 και το dATP / ATP σε ένα αποτοτικό σύμπλεγμα. Αυτό το σύμπλοκο διασπά την προκάσπαση-9, ενεργοποιώντας την κασπάση-9 και προκαλώντας απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Η HSP70 αναστέλλει αυτή τη διαδικασία, παρεμποδίζοντας την πρόσληψη της προκάσπασης-9 στο σύμπλεγμα: Apaf-1 / dATP / κυτοχρωμικό c.

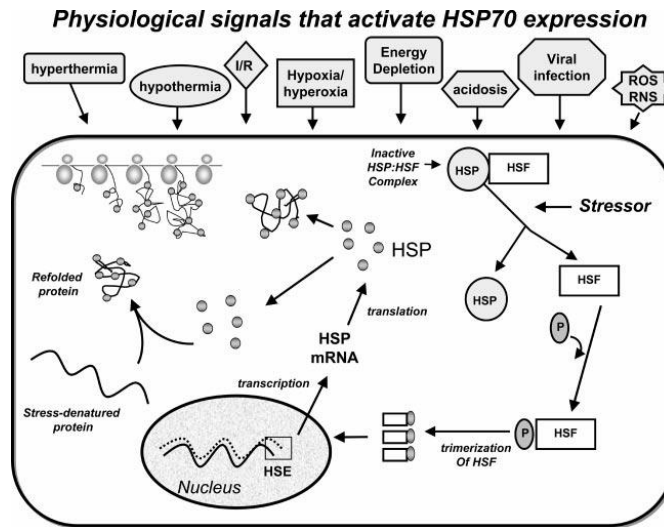
Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η HSP70 όχι μόνο εξοικονομεί σημαντικά συστατικά του κυττάρου (τις πρωτεΐνες) αλλά και προστατεύει άμεσα το κύτταρο στο σύνολό του. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πρωτεΐνες απόκρισης στο στρες (όπως η HSP70) εξελίχθηκαν πριν από τον αποπτωτικό μηχανισμό, ο άμεσος ρόλος της HSP70 στην αναστολή της απόπτωσης παρέχει μια ενδιαφέρουσα εξελικτική εικόνα για το πώς οι πιο πρόσφατοι (αποπτωτικοί) μηχανισμοί δέχονταν προηγούμενα μέσα (HSPs), ευθυγραμμίζοντας έτσι τη βελτιωμένη ακεραιότητα των πρωτεϊνών του κυττάρου με τις βελτιωμένες πιθανότητες επιβίωσης του συγκεκριμένου κυττάρου.

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί εκφράζουν τρεις πρωτεΐνες HSP70: DnaK, HscA (Hsc66) και HscC (Hsc62). Η HSP70 (HSP73 / HSPA8) είναι μια συσταλτικώς εκφρασμένη πρωτεΐνη του οπερονίου. Συνήθως αποτελεί ένα έως τρία τοις εκατό της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης. (Craig, 1988) Υψηλά επίπεδα της HSP70 μπορούν να παραχθούν από τα κύτταρα υπό συνθήκες: υπερθερμίας, οξειδωτικού στρες και μεταβολών στο pH. Η δεσμευτική πρωτεΐνη ανοσοσφαιρίνης (BiP ή Grp78) είναι μια πρωτεΐνη εντοπισμένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συμμετέχει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και ρυθμίζεται για την απόκριση στο στρες ή στην πείνα. Οι υδροφοβικές περιοχές που είναι εκτεθειμένες κατά τη διάρκεια της μετουσίωσης ή της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι περιοχές στόχοι για την αλληλεπίδραση με την HSP70. Η σύνδεση της HSP70 με ασταθείς πρωτεΐνες εμποδίζει την εμφάνιση δυσμενών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν τα κύτταρα σε δυσλειτουργία και θάνατο, εάν έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια της ενδοκυτταρικής πίεσης.

Ο κυτταροπροστατευτικός ρόλος των HSP70 είναι πιθανώς μια επέκταση της δυνατότητάς τους να συνοδεύουν προσβληθέντα πρωτεϊνικά μόρια ως απάντηση στο ενδοκυτταρικό στρες.

Η συσσώρευση των HSP70 στα καρδιακά κύτταρα υπό το θερμικό στρες είναι γνωστό ότι προστατεύει τον καρδιακό μυ από την ισχαιμική βλάβη. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της αλληλεπίδρασης δεν έχει ανακαλυφθεί μέχρι τώρα. Οι πρωτεΐνες υποβοηθούν επίσης τη διακίνηση των πολυπεπτιδίων μεταξύ διαφόρων διαμερισμάτων του κυττάρου. Διευκολύνουν την ανασύσταση των πρωτεϊνών, ώστε να επιτραπεί η είσοδος μέσω των πυρηνικών πόρων ή των κυτταρικών μεμβρανών. Μόλις η πρωτεΐνη διαπεράσει κάποια μεμβράνη, τα μόρια της HSP70 βοηθούν στην αναδίπλωσή της.

Στην παρακάτω σχηματική αναπαράσταση απεικονίζεται η δράση μερικών φυσιολογικών σημάτων που ενεργοποιούν την επαγωγική μορφή της σύνθεσης της HSP70 και έναν προτεινόμενο μηχανισμό για αυξημένη έκφραση της HSP70 εντός του κυττάρου. (Kregel, 2002).



Εικόνα 8. Εξωτερικά ερεθίσματα που ενεργοποιούν την επαγωγική μορφή της σύνθεσης της HSP70 (Kregel, 2002)

2.5. ΠΟΝΤΙΚΙΑ *Hsp70*^{-/-}: ΜΟΝΤΕΛΟ & ΦΛΕΓΜΟΝΗ

2.5.1. ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ *Hsp70*^{-/-}

Τα ποντίκια *Hsp70*^{-/-} έχουν υποστεί γενετική απαλοιφή του γονιδίου της HSP70. Τα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια δημιουργήθηκαν με ομόλογο ανασυνδυασμό του DNA από εμβρυικά βλαστοκύτταρα 129Sv. Για την αποφυγή επιδράσεων από το γενετικό περιβάλλον, κάθε στέλεχος *Hsp70*^{-/-} ποντικού διασταυρώθηκε με ποντίκια από το στέλεχος C57BL/16 για 9 γενεές για να ληφθούν ομογενή ζώα. (Lowe & Moran, 1986) Οι προκύπτοντες απόγονοι διασταυρώθηκαν έτσι ώστε να ληφθούν τα *Hsp70* ετερόζυγα ποντίκια. Μετά από οκτώ γενιές επαναδιασταύρωσης με ποντίκια C57BL/6J, δημιουργήθηκαν τα *Hsp70* ομόζυγα ποντίκια, από διασταύρωση μεταξύ ετεροζυγίων. Οι γονότυποι *Hsp70*: ^{+/+}, ^{+/-}, ^{-/-} δημιουργήθηκαν σύμφωνα με τις αναμενόμενες αναλογίες κατά Mendel 1:2:1. (Sarah M. Senf April 23, 2013)

Από τις τρεις κυτταρικές σειρές ποντικών που μελετήθηκαν, οι δύο εξέφραζαν το mRNA 3,1- έως 3,5 kb κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ. Μία σειρά εξέφρασε επίσης ένα επιπλέον, μικρότερο 2,6 kb mRNA, το οποίο μεταγράφηκε από ένα ξεχωριστό γονίδιο. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κυτταρική σειρά κατέχει σημαντική επίδραση στην κυτταρική απόκριση υπό συνθήκες θερμικού σοκ και η απόκριση δεν είναι καθολική σε όλους τους τύπους κυττάρων.

2.5.2. Η ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ *Hsp70*^{-/-}

Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούν τα ποντίκια *Hsp70*^{-/-} και παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον, τόσο για τον ίδιο τον γονότυπο όσο και για την έκφραση της πρωτεΐνης HSP70.

Υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η ικανότητα παραγωγής και έκφρασης της HSP70 μπορεί να εξασθενήσει σημαντικά την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και συστηματικής φλεγμονής μετά από σηπτική προσβολή, ανεξάρτητα από άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επαγωγική έκφραση της HSP70 μπορούν να επηρεάσουν τη θνησιμότητα και την εμφάνιση του ARDS. Τα ευρήματα της μελέτης καθορίζουν ένα δυνητικά ζωτικό μηχανισμό με τον οποίο οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν να προστατεύσουν τον εκάστοτε οργανισμό από σηπτικό τραυματισμό. Επειδή η καταστολή του NF-κB συσχετίζεται με αντιφλεγμονώδη δράση, υπάρχει ένδειξη ότι η έκφραση της HSP70 θα μπορούσε να μεσολαβήσει στην εξασθένηση της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών μέσω της καταστολής του NF-κB. Η ενεργοποίηση του NF-κB εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση του IκB, ενός ενδογενούς ανασταλτικού μορίου που δεσμεύεται με το NF-κB στο κυτταρόπλασμα. Αποδεικνύεται ότι η έκφραση της HSP70 μπορούσε να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κB, και να αναστείλει σημαντικά την φωσφορυλίωση της ιντερλευκίνης, προκαλώντας αποικοδόμηση στον κυτταροπλασματικό ιστό του πνεύμονα. (Wischmeyer, December 16, 2005)

Ωστόσο, όταν το γονίδιο για την HSP70 διαγράφεται, αυτά τα αποτελέσματα αντιστρέφονται. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η προστασία από τραυματισμό που επιτυγχάνεται από την επαγωγή HSP70 δρα μέσω της οδού NF-κB.

Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ μπορούν να απελευθερώσουν HSP70 όταν απομονώνονται σε καλλιέργεια. Όταν τα μονοκύτταρα επωάζονται με τα ρυθμισμένα με την HSP70 μέσα και εκτίθενται σε ενδοτοξίνη, αναστέλλεται η ενεργοποίηση και δεσμεύεται το DNA του NF-κB. Όταν το αντι-HSP70 προστίθεται στο μέσο, αυτό αναστρέφει την ανασταλτική επίδραση των ρυθμισμένων με HSP70 μέσων στην επαγόμενη από ενδοτοξίνη ενεργοποίηση του NF-κB. Μετά το σοκ, εμφανίζονται οξείες αυξήσεις της επαγομένης HSP70. Αυτή η πρωτεΐνη δεν

αλλάζει σε απόκριση του στρες αλλά έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης της πρωτεΐνης. Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχουν ειδική εξάλειψη των γονιδίων για την επαγωγίμη μορφή της HSP70. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση της επαγωγίμης HSP70 είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία από την προφλεγμονώδη απόκριση και τον τραυματισμό του πνεύμονα. Φαίνεται ότι η έκφραση της επαγωγίμης HSP70 μπορεί να έχει θεραπευτικό επίδραση για ασθένειες που προκαλούνται από την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών. (Wischmeyer, December 16, 2005) Η επίδραση της HSP70 στη συστηματική φλεγμονή μπορεί να εφαρμοστεί όχι μόνο για τη θεραπεία της σήψης αλλά και για άλλες φλεγμονώδεις ασθένειες.

Σε άλλη μελέτη, η παρουσία της απόπτωσης μετά από εγκεφαλική ισχαιμία παραμένει αμφιλεγόμενη. Έχει αναφερθεί ότι η ισχαιμική βλάβη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μετά από παροδική ή μόνιμη απόφραξη του MCA. (Seung-HoonLee) Η HSP70 εκφράζεται εντατικά έπειτα από εγκεφαλική ισχαιμία και από θερμικό σοκ καθώς σχετίζεται με μετουσίωση πρωτεΐνης στην περιοχή που πραγματοποιήθηκε βλάβη. Μετά από εστιακή ισχαιμία, η HSP70 εκφράζεται κυρίως σε αιμοφόρα αγγεία και σε περιοχές εντός ενός εμφράγματος και εκφράζεται σε νευρώνες εκτός των περιοχών εμφράγματος. Η νευρωνική έκφραση της HSP70 μπορεί να ερμηνευθεί μοριακά, καθώς προσδιορίστηκε η μεμβράνη μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματά έδειξαν προφανή έκφραση της HSP70 κυρίως στον φλοιό, αν και παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στην ένταση έκφρασης μεταξύ των ποντικών *Hsp70^{-/-}* και των φυσιολογικών (WT) ποντικών. Όταν ληφθούν υπόψη οι ιδιότητες της HSP70, η HSP70 μπορεί να προστατεύει τους νευρώνες από ερεθίσματα μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* ανέδειξαν 22,7% περισσότερο έμφραγμα από τα ποντίκια φυσιολογικού γονοτύπου (WT) και τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες. (Seung-HoonLee) Η αύξηση του όγκου του εμφράγματος που προκαλείται από τη διαγραφή γονιδίου *hsp70* ήταν σημαντική. Αυτό συμβαίνει διότι μπορεί να σχετίζεται με τον μηχανισμό της πρωτεΐνης HSP70 που δεν λειτουργεί στην περιοχή του ισχαιμικού πυρήνα.

Επιπλέον, παρόλο που οι λειτουργίες των γονιδίων *hsp70.1* και *hsp70.3* δεν έχουν τεκμηριωθεί, η διαγραφή του γονιδίου *hsp70.1* οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης HSP70 μετά από εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία, έναντι των ποντικών φυσιολογικού γονοτύπου (WT). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *hsp70.1* μπορεί να είναι πιο σημαντικό (λειτουργικά) στην νευροπροστασία, ιδιαίτερα στην αναστολή της απόπτωσης, μετά από εγκεφαλική ισχαιμία, από ότι το γονίδιο *hsp70.3*. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι η έκφραση του mRNA του γονιδίου *hsp70.3* είναι επίσης χαμηλότερη σε knockout ποντίκια από ότι σε wildtype ποντίκια. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι τα γονίδια *hsp70.1* και *hsp70.3* συσχετίζονται λειτουργικά στην απόκριση σε ισχαιμικά ερεθίσματα.

Σε άλλη πειραματική μελέτη που αφορά την αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) αποδεικνύεται ότι τα ποντίκια *Hsp70.1^{-/-}* ήταν σημαντικά πιο ανθεκτικά στην ανάπτυξη EAE σε σύγκριση με τα φυσιολογικά – αρσενικού φύλου – ποντίκια (WT). (M. José Mansilla, 2014). Τα ποντίκια *Hsp70.1^{-/-}* που ανέπτυξαν κλινικά συμπτώματα της EAE παρουσίασαν την ίδια κλινική πορεία και τα ίδια ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά με τα ποντίκια φυσιολογικού γονοτύπου. Συνεπώς, η HSP70.1 φαίνεται να είναι σχετική, αλλά όχι κρίσιμη, για την έκβαση της EAE. Επιπλέον, η εξωκυτταρική HSP70 μπορεί να δράσει ως ανοσοενισχυτικό που προάγει προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις έναντι ειδικών αντιγόνων. Τα σπληνοκύτταρα που δεν διαθέτουν το γονίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης HSP70.1 ήταν ικανά να επάγουν αντιγόνο-ειδική πολλαπλασιαστική απόκριση και τα ποντίκια *Hsp70.1^{-/-}* με EAE παρουσίασαν υψηλότερη πολλαπλασιαστική απόκριση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια. Παρόλα αυτά, η υψηλή πολλαπλασιαστική απόκριση που παρατηρήθηκε στα ποντίκια *Hsp70.1^{-/-}* δεν συσχετίστηκε με αυξημένη παραγωγή κυτοκινών είτε στη φλεγμονώδη είτε στη χρόνια φάση της νόσου. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση των επιπέδων ης ιντερλευκίνης 2 στα σπληνοκύτταρα των *Hsp70.1^{-/-}* σε σύγκριση με τα κύτταρα των ποντικών του φυσιολογικού γονοτύπου.

3.0. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της έλλειψης της πρωτεΐνης HSP70, στον επαγόμενο από φλεγμονή πόνο χρησιμοποιώντας και συγκρίνοντας το φυσιολογικό γονότυπο ποντικού (WT ή *Hsp70*^{+/+}) που διαθέτει το γονίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη HSP70 με το γονότυπο ποντικού στο οποίο απουσιάζει το γονίδιο έκφρασης της HSP70 (*Hsp70*^{-/-}). Επίσης θεωρήθηκε αναγκαίο να μελετηθεί ο μηχανισμός αντίδρασης των ποντικών *Hsp70*^{-/-} έναντι εξωτερικών ερεθισμάτων. Για την επίτευξη του στόχου αυτού καταγράφηκαν οι παρατηρήσεις που αφορούν τους μηχανισμούς αντίδρασης έναντι του χορηγούμενου ανοσοενισχυτικού διαλύματος αντιγόνου του Freund (CFA) και μελετήθηκαν οι παραγόμενες πρωτεΐνες (κυτοκίνες), ο χρόνος απόκρισης στο πόνο που προκαλείται από πηγή ακτινοβολίας IR καθώς και το οίδημα που δημιουργείται από τη δράση του CFA.

4.0. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΦΥΛΑΞΗ, ΕΠΙΛΟΓΗ, ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ (ΠΟΝΤΙΚΙΑ)

Τα ποντίκια φυλάσσονται σε συγκεκριμένα δωμάτια φύλαξης, όπου επικρατούν προγραμματισμένες συνθήκες φωτός (8:00 – 20:00) και κλιματισμού (20 ± 2 °C). Είναι χωρισμένα σε κλουβιά, ανάλογα με το γονότυπο τους. Σε κάθε κλουβί υπάρχουν καταγεγραμμένα στοιχεία, που αφορούν: τον αριθμό, το φύλο, την ημερομηνία γέννησης, την ημερομηνία εισαγωγής και τη φυλή από όπου προήλθαν. Κάθε εβδομάδα πραγματοποιείται έλεγχος που αφορά την ανανέωση ως προς το καθαρισμό και τη τροφοδοσία των ποντικιών. Επιπλέον, από κάθε γένος πραγματοποιούνται απογαλακτισμοί των απογόνων μετά την 21η ημέρα της γέννησής τους. Κατά την περίοδο αυτή είναι εύκολος ο διαχωρισμός μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών απογόνων, οι οποίοι μεταφέρονται σε ξεχωριστά κλουβιά.

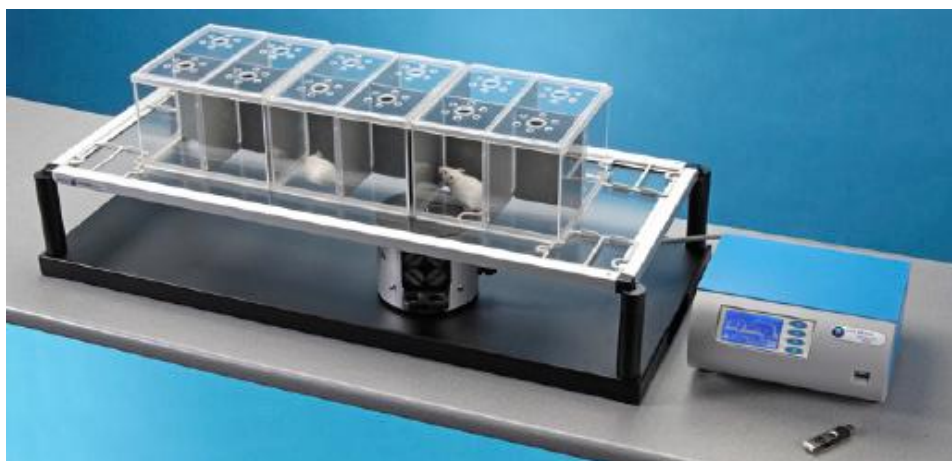
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα τρωκτικά που συμμετείχαν στις πειραματικές διαδικασίες ήταν ποντίκια, ηλικίας άνω των δύο μηνών και αρσενικού φύλου. Οι γονότυποι που μελετώνται είναι: *Hsp70*^{+/+} (wildtype) και *Hsp70*^{-/-} (knockout).

Όλα τα πειράματα 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.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΠΟΝΟΥ

4.2.1. ΣΥΣΚΕΥΗ PLANTAR (ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΟΝΟΥ)

Το δοκιμαστικό μέσο μετρήσεων πόνου (Plantar Test) χρησιμοποιείται για να ληφθούν οι μετρήσεις πόνου για κάθε ζώο. Διαθέτει τζάμι και πάνω του τοποθετείται πλαστικό συγκρότημα 12 θέσεων, στις οποίες φυλάσσονται τα ποντίκια και καλύπτονται με πλαστικά καπάκια. Η λάμπα IR τοποθετείται κάτω από το τζάμι και συνδέεται (μέσω καλωδίου) με τον καταγραφέα χρόνου. (Basile)



Πλαστικό δοκιμαστικό μέσο για μετρήσεις πόνου (PlantarTest) (Basile)

Υλικά και Αντιδραστήρια

- πλαστικό δοκιμαστικό μέσο για μέτρηση πόνου (UGO BASILE Plantar Test 37379)
- καταγραφέας χρόνου (UGO BASILE Plantar Test 37379)
- λάμπα IR (UGO BASILE Plantar Test 37379)

- ανοσοενισχυτικό διάλυμα αντιγόνου Freund (CFA)
- αιθανόλη 75% (Fisher Scientific UK)
- απορροφητικό χαρτί

Μέθοδος

Η μέτρηση του πόνου στα ποντίκια γίνεται με τη χρήση 3 σκευών και σε 3 διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Καταγράφονται τιμές 3 μετρήσεων και ακολουθεί η στατιστική τους ανάλυση. Το πρώτο βήμα είναι η προσαρμογή των ποντικών για πέντε ημέρες στη συσκευή. Την έκτη ημέρα ενίεται ανοσοενισχυτικό διάλυμα αντιγόνου Freund (CFA) στο πέλμα. Ακολουθούν οι μετρήσεις πόνου και οιδημάτος σε τρία χρονικά διαστήματα: 3 ώρες, 6 ώρες και 24 ώρες μετά την ένεση. Επισημαίνεται ότι τα ποντίκια μεταφέρονται στο Plantar 30 λεπτά πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις, καθώς θα πρέπει να προσαρμόζονται. Με τη χρήση της λάμπας IR, στοχεύεται προσεκτικά η πελματιαία επιφάνεια στην οποία είχε ενεθεί το βακτήριο και καταγράφεται ο χρόνος αντίδρασης προς την ακτινοβολία στη οποία εκτίθεται το πέλμα. Μόλις ολοκληρωθούν οι μετρήσεις, τα ποντίκια επιστρέφονται πίσω στους κλωβούς τους και το plantar καθαρίζεται αρκετά καλά με αιθανόλη 75%.

4.2.2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΜΕΤΡΟ (ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ)

Το πληθυσμόμετρο χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το οίδημα που δημιουργείται στο φλεγμαίνον πέλμα του εκάστοτε τρωκτικού. (Basile)

Υλικά και Αντιδραστήρια

- πληθυσμόμετρο (UGO BASILE 7140 PLETHYSMOMETER)
- νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)
- χλωριούχο νάτριο (PENTA, s.r.o.)
- αντιμικροβιακό διάλυμα για μετρήσεις οιδημάτων (Aquanul Special (N4))

Μέθοδος

Αμέσως μετά την κάθε μέτρηση πόνου (υπό τη χορήγηση του βακτηρίου), πραγματοποιούνται μετρήσεις οιδημάτος. Το οίδημα είναι αποτέλεσμα της φλεγμονής που υφίσταται ο οργανισμός του εκάστοτε τρωκτικού. Αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα. Πριν την έναρξη των μετρήσεων, μεταφέρεται ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος στο δοχείο του οργάνου και ρέει στο εσωτερικό της στήλης. Μόλις φτάσει στην υποδοχή μέτρησης οιδημάτος, ρυθμίζεται ο όγκος 0,5 mL και βυθίζεται ειδικό βαρίδιο συγκεκριμένης μάζας για να εξακριβωθεί η ακρίβεια του οργάνου. Εφόσον η ρύθμιση είναι επιτυχής, επιλέγεται η ένδειξη 'ZERO' και το όργανο είναι έτοιμο για μετρήσεις. Κάθε ποντίκι ακινητοποιείται κατάλληλα, έχοντας το φλεγμαίνον πέλμα αποδεσμευμένο. Βυθίζεται μέχρι ένα σημείο στο εσωτερικό του δοχείου, σταθεροποιείται και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου. Η ένδειξη αφορά τη μεταβολή του όγκου που υφίσταται το υγρό στο εσωτερικό του δοχείου. Η τιμή αυτή αντιπροσωπεύει το μέγεθος του οιδημάτος που έχει το φλεγμαίνον πέλμα του ποντικίου τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

4.3. ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΡΙΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, λαμβάνεται αίμα από το μάτι του τρωκτικού και συγκεκριμένοι ιστοί για περαιτέρω επεξεργασία. Η συλλογή του αίματος από την οπισθο-οφθαλμική οδό εξυπηρετεί αρκετά καθώς είναι γρήγορη και συλλέγεται αρκετή ποσότητα αίματος,

χωρίς την παρουσία αποστειρωμένων συνθηκών. Οι ιστοί που λαμβάνονται: σπλήνας και μέρος οιδήματος του φλεγμαινοντος πέλματος είναι εκείνοι που αφορούν την παραγόμενη φλεγμονή στον οργανισμό. Επίσης λαμβάνεται και μικρό μέρος ουράς, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση DNA, σε περίπτωση ανάγκης ταυτοποίησης.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- τριχοειδείς σωλήνες αιματοληψίας (Vitrex, Modulohm)
- αποστειρωμένα ψαλίδια
- αποστειρωμένες λαβίδες
- σωληνάριατων 1,5 mL (Greiner Bio-One)
- πάγος
- φυγόκεντρος (Hettich, MIKRO 22R)

Μέθοδος

Μετά το πέρας των μετρήσεων πόνου και οιδήματος, ακολουθεί η λήψη αίματος από την οπίσθιο οφθαλμική οδό του ματιού. Έπειτα το ποντίκι θυσιάζεται και λαμβάνονται οι ιστοί: σπλήνας, μικρό μέρος ουράς και ιστός πέλματος. Το αίμα που συλλέγεται παραμένει στο πάγο έως τη φυγοκέντρωση του. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται για 10 λεπτά, στους 4°C και στις 3000 στροφές. Λαμβάνεται το πλάσμα σε νέα σειρά σωληναρίων, καθώς και 5 μL πλάσμα σε ξεχωριστή σειρά σωληναρίων, η οποία προορίζεται για μελέτη με κορτικοστερόνη. Οι ιστοί φυλάσσονται σε ξεχωριστά σωληνάρια με καταγεγραμμένα στοιχεία, στους -80°C.

4.4. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ

4.4.1. Ομογενοποίηση ιστών για Απομόνωση RNA

Η ομογενοποίηση ιστού για την απομόνωση του RNA αποτελεί πρωταρχικό βήμα για την μετέπειτα δημιουργία του συμπληρωματικού DNA (cDNA) το οποίο χρησιμοποιείται για την εύρεση και μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- ομογενοποιητής (JANKE & KUNKEL - ULTRA TURRAX T25, Germany)
- μικρά πλαστικά σωληνάρια
- σωληνάριατων 15 mL (Greiner Bio-One)
- σωληνάριατων 1,5 mL (Greiner Bio-One)
- πάγος
- αντιδραστήριο μίγμα φαινόλης με ισοθειακινική γουανιδίνη (Nucleozol) (Macherey-Nagel)
- NaOH 10N
- Απιονισμένο νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)

Μέθοδος

Ο ομογενοποιητής αποστειρώνεται με τα εξής αντιδραστήρια (με τη σειρά):

NaOH 1N, (A) νερό στήλης, (B) νερό στήλης και τέλος με Nucleozol.

Μεταφέρονται 500 μL Nucleozol σε πλαστικό σωληνάριο και ακολουθεί η μεταφορά του ιστού απευθείας από τους -80°C στο εσωτερικό του. Ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται για κάθε δείγμα. Μόλις ολοκληρωθεί η ομογενοποίηση για όλους τους ιστούς, ο ομογενοποιητής αποστειρώνεται με τα προαναφερθέντα αντιδραστήρια, συμπληρώνοντας και αιθανόλη 75%.

Τα διαλύματα μεταφέρονται σε πρώτη σειρά σωληναρίων των 1,5 mL και φυγοκεντρώνται υπό τις συνθήκες: 20 λεπτά , 4°C και 12000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σειρά σωληναρίων των 1,5 mL και αποθηκεύεται στους -80°C.

4.4.2. Ομογενοποίηση ιστών για Απομόνωση Πρωτεϊνών

Η ομογενοποίηση των ιστών εξυπηρετεί στην δημιουργία ομογενούς διαλύματος, το οποίο περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν συλλεχθεί στον συγκεκριμένο ιστό εξαιτίας της φλεγμονής. Το δείγμα που προκύπτει χρησιμοποιείται περαιτέρω για τον προσδιορισμό του συνόλου των πρωτεϊνών αλλά και τον προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- ομογενοποιητής (JANKE & KUNKEL - ULTRA TURRAX T25, Germany)
- μικρά πλαστικά σωληνάρια
- σωληναρίων 15 mL (Greiner Bio-One)
- σωληναρίων 1,5 mL (Greiner Bio-One)
- πάγος
- απιονισμένο νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (Gibco, life technologies)
- αναστολείς πρωτεάσης (P.I.) 50X ή 25X (roche diagnostics, USA)

Μέθοδος

Ο ομογενοποιητής αποστειρώνεται με τα εξής αντιδραστήρια (με τη σειρά):

(A) dH₂O, (B) dH₂O και Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS).

Μεταφέρονται 500μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (PBS) σε πλαστικά σωληνάρια και ακολουθεί η μεταφορά του ιστού απευθείας από τους -80°C στο εσωτερικό του. Ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται για κάθε δείγμα. Μόλις ολοκληρωθεί η ομογενοποίηση για όλους τους ιστούς, ο ομογενοποιητής αποστειρώνεται με τα προαναφερθέντα αντιδραστήρια, συμπληρώνοντας και αιθανόλη 75%. Τα διαλύματα μεταφέρονται σε πρώτη σειρά σωληναρίων των 1,5 mL και φυγοκεντρώνται υπό τις συνθήκες: 20 λεπτά , 4°C και 12000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σειρά σωληναρίων των 1,5 mL και αποθηκεύεται στους -80°C.

4.5. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADOFRD

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια σύντομη, ευαίσθητη και αξιόπιστη τεχνική προσδιορισμού του συνόλου της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Βασίζεται κυρίως στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250, η οποία απορροφάει στα 465 nm, υπό όξινες συνθήκες. Όμως όταν είναι προσδεμένη με πρωτεΐνη, δημιουργούνται υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία νέα ιονική μορφή, η απορρόφησή της οποίας καταγράφεται στα 595nm.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Πλαστική πλάκα 96 οπών, ειδική για την μέθοδο Bradford
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (gibco, life technologies) ή Νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)
- Αλβουμίνη βοοειδών (BSA) 1 mg/mL (Sigma, Life Science)
- Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο χρωστικής για πρωτεΐνες (BIO-RAD)
- Πιπέτες Gilson με ρυθμισμένους όγκους: 10μL, 20μL, 200μL, 1mL
- Φασματοφωτόμετρο (BIORAD, MODEL 680)

Μέθοδος

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην κατασκευή πρότυπης καμπύλης, βασιζόμενη στα στοιχεία του παρακάτω πίνακα:

| | PBS ή H₂O (μL) | BSA (μL) | Coomassie Blue |
|----------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|
| A | 160 | 0 | 40 |
| B | 159,5 | 0,5 | 40 |
| C | 159 | 1 | 40 |
| D | 158 | 2 | 40 |
| E | 155 | 5 | 40 |
| F | 150 | 10 | 40 |
| G | 145 | 15 | 40 |
| H | 140 | 20 | 40 |

Η πρότυπη πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται (BSA) θα πρέπει να έχει συγκέντρωση 1 μg/mL ή 1 mg/mL ή 1 ng/mL. Για το κάθε δείγμα, μεταφέρονται στο πηγάδι 2 μL δείγμα, 158 μL PBS και 40 μL Coomassie Blue. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 3 πηγάδια. Για κάθε ποσότητα πρότυπης πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται 3 πηγάδια. Τέλος, το πιάτο μεταφέρεται σε φασματοφωτόμετρο, όπου λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης στα 595nm. Τα αποτελέσματα εξάγονται και αποθηκεύονται σε αρχείο MicrosoftExcel, όπου μελετώνται περαιτέρω.

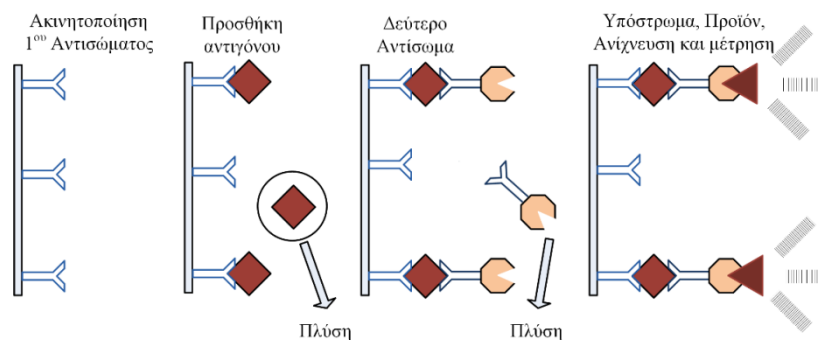
4.6. ENZYMO-ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ: ENΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ (ELISA)

Η ανοσοχημική μέθοδος ανάλυσης του τύπου: ενζυμική ανοσοπροσρόφηση χρησιμοποιεί αντισώματα (antibody, Ab) ως αντιδραστήρια μοριακής αναγνώρισης για να επιτύχουν βιοειδική δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων (antigen, Ag). Ως αντιγόνο θεωρείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό, αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα και/ή Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας (adaptive ή specific immunity). Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες του αμυντικού μηχανισμού των θηλαστικών, καλούνται ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) και συμβολίζονται ως Ig. (Chiu N.H.L., (2012))

Η γενική αρχή της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης είναι η εξής: γίνεται προσρόφηση των αντισωμάτων ή αντιγόνων σε τοιχώματα πλαστικών πλακών 96 θέσεων. Μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και σύνδεση Ag-Ab, ακολουθεί διαχωρισμός φάσεων. Στη συνέχεια ανάλογα με τις παραλλαγές προστίθεται δεύτερο αντίσωμα και ακολουθεί ενζυμική αντίδραση για τη μέτρηση. Μεταξύ των διάφορων σταδίων, το υγρό το οποίο βρίσκεται στην πλάκα 96 θέσεων, απορρίπτεται και η πλάκα πλένεται, ώστε να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια που δεν είναι δεσμευμένα με δεσμό Ag-Ab.

Πιο συγκεκριμένα, η ELISA τύπου Sandwich (Kemenuy D.M., (1988)) που πραγματοποιείται λειτουργεί ως εξής: Αρχικά ακινητοποιείται το 1ο αντίσωμα στην πλάκα. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο και γίνεται δέσμευση στο αντίσωμα. Μετά από πλύσεις για απομάκρυνση των μη-δεσμευμένων αντιδραστηρίων προστίθεται 2ο ειδικό αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει άλλο επιτοπικό κέντρο στην αναλυόμενη ένωση και δεσμεύεται πάνω από το ακινητοποιημένο σύμπλοκο. Το 2ο αντίσωμα είναι ενζυμικά επισημασμένο και με την προσθήκη υποστρώματος παράγεται χρωματισμένο προϊόν. Στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων το 2ο αντίσωμα θα δεσμευθεί μόνο εφόσον βρει στην πλάκα το αντιγόνο του. Έτσι η ένταση του σήματος σχετίζεται με τη

συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης στο δείγμα. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη μόνο για μεγάλα μόρια π.χ. πρωτεΐνες, καθώς απαιτείται το αναλυόμενο μόριο να έχει μεγάλο όγκο. Επίσης, απαιτείται ικανή απόσταση μεταξύ των δύο επιτοπικών κέντρων, ώστε να μπορεί να γίνει ταυτόχρονη δέσμευση σε δύο αντισώματα. Η πορεία της ανάλυσης δίνεται στο επόμενο σχήμα:



Πορεία ανάλυσης της ELISA τύπου Sandwich. (John M. Clark)

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια διαφορετικών εταιριών, συνοδευόμενα με διαφορετικά πρωτόκολλα. Παρακάτω καταγράφονται οι εταιρίες και τα πρωτόκολλα που πραγματοποιήθηκαν για κάθε μελετώμενη πρωτεΐνη.

4.6.1. BIOLEGEND ELISA IL6

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Πλάκα ανοσολογικής μελέτης 96 οπών (SPL LIFE SCIENCE)
- Πιπέτες Gilson με ρυθμισμένους όγκους: 10μL, 20μL, 200μL, 1mL
- Πολυπιπέτα με υποδοχείς 8 ρυγχών
- Φασματοφωτόμετρο (BIORAD, MODEL 680)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (gibco)
- Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween 20) (Sigma Aldrich)

Απαραίτητοι υπολογισμοί Αντιδραστηρίων

Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης 1X

$$5X * V = 1X * V (\text{τελ})$$

αραίωση σε αποσταγμένο νερό.

Αντίσωμα Ακίνητοποίησης

$$200X * V = 1X * V (\text{τελ})$$

αραίωση σε Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης 1X

Αντίσωμα Ανίχνευσης

$$200X * V = 1X * V (\text{τελ})$$

αραίωση σε Διαλύτη Ανάλυσης A.

Αβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$$1000X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε Διαλύτη Ανάλυσης

Διάλυμα Υποστρώματος

$$50\% * V(\text{τελ}) \rightarrow \text{Διάλυμα Υποστρώματος A}$$

$$50\% * V(\text{τελ}) \rightarrow \text{Διάλυμα Υποστρώματος B}$$

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

$$V(\text{τελ}) \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 2N}$$

Διαλύτης Ανάλυσης A

$$5X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε PBS 1X.

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween 20)

Μέθοδος

Οι υπολογισμοί γίνονται βάσει:

του αριθμού πηγαδιών που αφορούν την καμπύλη (8)

του αριθμού πηγαδιών που αφορούν τα δείγματα (#)

+2 για περίσσεια

ΣΥΝΟΛΙΚΑ: (8+#+2) οπές

$$V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 100 \mu\text{L}$$

$$*V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 200 \mu\text{L} \text{ (στην περίπτωση του Assay Diluent A 1X)}$$

Η μέθοδος διαρκεί 3 ημέρες.

• ΗΜΕΡΑ 1η

Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης

$$5X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε αποσταγμένο νερό.

Αντίσωμα Ακινητοποίησης

$$200X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε CoatingBuffer 1X.

1. παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων
2. προσθήκη 100μL/οπή στο πιάτο.
3. Φύλαξη στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

- **ΗΜΕΡΑ 2η**

Διαλύτης Ανάλυσης A

$5X * V = 1X * V(\text{τελ})$

αραίωση σε PBS 1X.

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Καμπύλη

A → blank (100μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης)

B → πυκνό διάλυμα

υπολογιζόμενη ποσότητα πρότυπης πρωτεΐνης IL6 σε 500 μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επένδυσης

C → 1ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης+ 250 μL B

D → 2ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης + 250 μL C

E → 3ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης + 250 μL D

F → 4ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης + 250 μL E

G → 5ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης + 250 μL F

H → 6ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης + 250 μL G

Δείγματα

→ 100% (καμία αραιώση)

→ 50% (αραίωση σε Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης)

→ 25% (αραίωση σε Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις

2. Προσθήκη 200μL/οπή Ρυθμιστικό Διάλυμα επικάλυψης

3. Πλύσεις: 4 πλύσεις

4. Προσθήκη **Καμπύλης και Δειγμάτων**: 100μL/οπή

5. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

- **ΗΜΕΡΑ 3η**

Αντίσωμα Ακινητοποίησης

$200X * V = 1X * V(\text{τελ})$

αραίωση σε Coating Buffer 1X.

Αντισώμα Ανίχνευσης

$200X * V = 1X * V(\text{τελ})$

Αραίωση σε Assay Diluent A 1X.

Αβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$$1000X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε Assay Diluent A 1X.

Διάλυμα Υποστρώματος

50% * V(τελ) → Διάλυμα Υποστρώματος A

50% * V(τελ) → Διάλυμα Υποστρώματος B

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

V(τελ) → H₂SO₄ 2N

Διαλύτης Ανάλυσης A

$$5X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε PBS 1X.

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις
2. Προσθήκη 100μL/οπή Αντισώματος Ανίχνευσης και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
3. Πλύσεις: 4 πλύσεις
4. Προσθήκη 100μL/οπή Αβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
5. Πλύσεις: 5 πλύσεις με ενδιάμεσες αναμονές 30 δευτερολέπτων.
6. Προσθήκη 100μL/οπή Διάλυμα Υποστρώματος και παραμένει σε σκοτεινό χώρο για 20 λεπτά περίπου (γαλάζιο χρώμα)
7. Προσθήκη 100μL/οπή Διαλύματος Τερματισμού Υποστρώματος (το γαλάζιο χρώμα γίνεται κίτρινο)
8. Φωτομέτρηση στα 450nm

4.6.2. MABTECH ELISA TNFa

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Πλάκα ανοσολογικής μελέτης 96 πηγαδιών (SPL LIFE SCIENCE)
- Πιπέτες Gilson με ρυθμισμένους όγκους: 10μL, 20μL, 200μL, 1mL
- Πολυπιπέτα με θέσεις 8 ρυγχών
- Φασματοφωτόμετρο (BIORAD, MODEL 680)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (gibco)
- Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween 20) (Sigma Aldrich)

Απαραίτητοι υπολογισμοί Αντιδραστηρίων

Μονοκλωνικά Αντισώματα

αρχική συγκέντρωση: 0,5 mg/mL

αρχική συγκέντρωση: 2 μg/mL

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

Βιοτινυλιωμένα Μονοκλωνικά Αντισώματα

αρχική συγκέντρωση: 0,5 mg/mL

αρχική συγκέντρωση: 0,5 μg/mL

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης (Incubation Buffer)

Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$1000X * V = 1X * V(\text{τελ})$

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης (Incubation Buffer)

Διάλυμα Υποστρώματος

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο A

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο B

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

50 μL ανά πηγάδι H₂SO₄ 2N

Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Μέθοδος

Οι υπολογισμοί γίνονται βάσει:

- του αριθμού πηγαδιών που αφορούν την καμπύλη (8)
- του αριθμού πηγαδιών που αφορούν τα δείγματα (#)
- +2 ως περίσσεια

ΣΥΝΟΛΙΚΑ: (8+#+2) οπές

$V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 100 \mu\text{L}$

$*V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 200 \mu\text{L}$ (στην περίπτωση του Assay Diluent A 1X)

Το πείραμα διαρκεί 3 ημέρες.

• ΗΜΕΡΑ 1η

Μονοκλωνικά Αντισώματα

αρχική συγκέντρωση: 0,5 mg/mL

Αρχική συγκέντρωση: 2 μg/mL

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

1. παρασκευή του παραπάνω διαλύματος
2. προσθήκη 100μL/οπή στο πιάτο.

3. αποθήκευση στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

- **ΗΜΕΡΑ 2η**

Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

WashBuffer

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Καμπύλη

A → blank (100μL Assay Diluent A, 1X)

B → πυκνό διάλυμα

υπολογιζόμενη ποσότητα πρότυπης πρωτεΐνης TNF-α σε 1 mL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης

C → 1ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης+ 250 μL B

D → 2ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης+ 250 μL C

E → 3ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης + 250 μL D

F → 4ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης + 250 μL E

G → 5ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης + 250 μL F

H → 6ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης + 250 μL G

Δείγματα

Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα δειγμάτων, ακολουθείται μία από τις παρακάτω επιλογές:

→ 100% (καμία αραιώση)

→ 50% (αραιώση σε Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης)

→ 25% (αραιώση σε Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις

2. Προσθήκη 200μL/οπή Assay Diluent A, 1X

3. Πλύσεις: 4 πλύσεις

4. Προσθήκη **Καμπύλης και Δειγμάτων**: 100μL/οπή

5. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

- **ΗΜΕΡΑ 3η**

Βιοτινυλιωμένα Μονοκλωνικά Αντισώματα

αρχική συγκέντρωση: 0,5 mg/mL

αρχική συγκέντρωση: 0,5 μg/mL

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης (Incubation Buffer)

Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$1000X * V = 1X * V(\text{τελ})$

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης (Incubation Buffer)

Διάλυμα Υποστρώματος

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο A

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο B

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

50 μL ανά πηγάδι H₂SO₄ 2N

Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις
2. Προσθήκη 100μL/οπή Βιοτινυλιωμένα Μονοκλωνικά Αντισώματα και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
3. Πλύσεις: 4 πλύσεις
4. Προσθήκη 100μL/οπή Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
5. Πλύσεις: 5 πλύσεις με ενδιάμεσες αναμονές 30 δευτερολέπτων.
6. Προσθήκη 100μL/οπή Διάλυμα Υποστρώματος και παραμένει σε σκοτεινό χώρο για 20 λεπτά περίπου (γαλάζιο χρώμα)
7. Προσθήκη 100μL/οπή διάλυμα Τερματισμού Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N) (το γαλάζιο χρώμα γίνεται κίτρινο)
8. Φωτομέτρηση στα 450nm

4.6.3. R&DELISA για IL6 , TNFα

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Πλάκα ανοσολογικής μελέτης 96 πηγαδιών (SPL LIFE SCIENCE)
- Πιπέτες Gilson με ρυθμισμένους όγκους: 10μL, 20μL, 200μL, 1mL
- Πολυπιπέτα με θέσεις 8 ρυγχών
- Φασματοφωτόμετρο (BIORAD, MODEL 680)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (gibco)
- Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween 20) (Sigma Aldrich)

Απαραίτητοι υπολογισμοί Αντιδραστηρίων

| Αντίσωμα Ακίνητοποίησης | | | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Πρωτεΐνη | Αρχική Συγκέντρωση | Τελική Συγκέντρωση | Αραίωση σε: |
| IL6 | 240 µg | 2,00 µg/mL | Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) |
| TNFα | 50 µg | 800 ng/mL | |

| Αντισώμα Ανίχνευσης | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Πρωτεΐνη | Αρχική Συγκέντρωση | Τελική Συγκέντρωση | Αραίωση σε: |
| IL6 | 9,0 µg | 150 ng/mL | Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) |
| TNFα | 4,50 µg | 75,0 ng/mL | |

| Πρότυπη Πρωτεΐνη | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| Πρωτεΐνη | Αρχική Συγκέντρωση | Τελική Συγκέντρωση | Αραίωση σε: |
| IL6 | 50,0 ng | 1000 pg/mL | Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) |
| TNFα | 100 ng | 2000 pg/mL | |

Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$$40X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε: Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης (Incubation Buffer)

Έγχρωμο Αντιδραστήριο Υποστρώματος

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο A

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο B

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

50 µL ανά πηγάδι H₂SO₄ 2N

Αντιδραστήριο Διαλύτη

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Μέθοδος

Οι υπολογισμοί γίνονται βάσει:

του αριθμού πηγαδιών που αφορούν την καμπύλη (8)
του αριθμού πηγαδιών που αφορούν τα δείγματα (#)
+2 για περίσσεια

ΣΥΝΟΛΙΚΑ: (8+#+2) πηγάδια

$V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 100 \mu\text{L}$

* $V(\text{τελ}) = (\text{συνολικός αριθμός πηγαδιών}) * 200 \mu\text{L}$ (στην περίπτωση του AssayDiluentA 1X)

Το πείραμα διαρκεί 3 ημέρες.

• ΗΜΕΡΑ 1η

1. **Αντίσωμα Ακίνητοποίησης:** αραιώνεται όπως φαίνεται στην αρχή της παραγράφου 6.3, ανάλογα με τη μελετώμενη πρωτεΐνη.
2. προσθήκη 100μL/οπή στο πιάτο.
3. αποθήκευση στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

• ΗΜΕΡΑ 2η

Αντιδραστήριο Διαλύτη

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

Καμπύλη

A → blank (100μL Αντιδραστήριο Διαλύτη)

B → πυκνό διάλυμα

υπολογιζόμενη πρότυπη πρωτεΐνη σύμφωνα με παράγραφο 6.3, αραιωμένη σε 500 μL
Αντιδραστήριο Διαλύτη

C → 1ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη+ 250 μL B

D → 2ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη+ 250 μL C

E → 3ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη + 250 μL D

F → 4ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη + 250 μL E

G → 5ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη + 250 μL F

H → 6ο αραιωμένο διάλυμα

έχει 250μL Αντιδραστήριο Διαλύτη + 250 μL G

Δείγματα

→ 100% (καμία αραιώση)

→ 50% (αραιώση σε Αντιδραστήριο Διαλύτη)

→ 25% (αραιώση σε Αντιδραστήριο Διαλύτη)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις
2. Προσθήκη 200μL/οπή Αντιδραστήριο Διαλύτη
3. Πλύσεις: 4 πλύσεις
4. Προσθήκη **Καμπύλης και Δειγμάτων**: 100μL/οπή
5. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C) όλη νύχτα.

- **ΗΜΕΡΑ 3η**

Αντίσωμα Ανίχνευσης: αραιώνεται όπως φαίνεται στην αρχική σελίδα, ανάλογα με τη μελετώμενη πρωτεΐνη.

Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου

$$1000X * V = 1X * V(\text{τελ})$$

αραίωση σε: Αντιδραστήριο Διαλύτη

Έγχρωμο Αντιδραστήριο Υποστρώματος

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο A

50% * V(τελ) → έγχρωμο αντιδραστήριο B

Τερματισμός Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N)

50 μL ανά πηγάδι H₂SO₄ 2N

Αντιδραστήριο Διαλύτη

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

1% Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσεων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS)

0,05% Μονολαουρική πολυοξυαιθυλένο σορβατίνη (Tween20)

1. Πλύσεις: 4 πλύσεις
2. Προσθήκη 100μL/οπή Αντίσωμα Ανίχνευσης και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
3. Πλύσεις: 4 πλύσεις
4. Προσθήκη 100μL/οπή Στρεπταβιδίνη - Υπεροξειδάση χρένου και παραμένει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι για 30 λεπτά.
5. Πλύσεις: 5 πλύσεις με ενδιάμεσες αναμονές 30 δευτερολέπτων.
6. Προσθήκη 100μL/οπή Έγχρωμο Αντιδραστήριο Υποστρώματος και παραμένει σε σκοτεινό χώρο για 20 λεπτά περίπου (γαλάζιο χρώμα)
7. Προσθήκη 100μL/οπή διάλυμα Τερματισμού Υποστρώματος (H₂SO₄ 2N) (το γαλάζιο χρώμα γίνεται κίτρινο)
8. Φωτομέτρηση στα 450nm

4.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Σύμφωνα με την παράγραφο 4.4.1., τα δείγματα χρησιμοποιούνται με αποστειρωμένα μέσα για να απομονωθεί ορθά το RNA.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- πάγος
- δείγματα
- χλωροφόρμιο
- ισοπροπανόλη (Sigma-Aldrich)
- 75% Ethanol (Fisher Scientific UK)
- Σωληνάρια των 1,5 mL (Greiner Bio-One)
- φιλτραρισμένο νερό (Demo Pharmaceuticals)
- φυγόκεντρος (Hettich, MIKRO 22R)
- κατάψυξη των -80°C

Μέθοδος

Αρχικά λαμβάνονται από την κατάψυξη των -80°C τα δείγματα με το υπερκείμενο του πειράματος (παράγραφος 4.4.1). Σε κάθε δείγμα προστίθεται 100 μL χλωροφόρμιο, ανακινείται αρκετά και παραμένει στο δοχείο σε πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε στροφές 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C

Μετά τη φυγοκέντρηση, παρατηρούνται 3 στρώματα: κάτω είναι οι πρωτεΐνες, στο μεσαίο είναι το DNA και στο πάνω είναι το RNA. Το πάνω στρώμα μεταφέρεται προσεκτικά σε ξεχωριστή σειρά σωληναρίων των 1,5 mL. Στη συνέχεια, προστίθενται 250 μL ισοπροπανόλη, η οποία εξυπηρετεί τη κατακρήμνιση του RNA. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται έντονα, παραμένει για 5-10 λεπτά σε πάγο και τελικά μεταφέρεται για 30 λεπτά στην κατάψυξη των -80°C . Ακολουθεί φυγοκέντρηση με στροφές 12000 rpm για 20' στους 4°C . Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας του 1 mL. Έπειτα, προστίθενται 500 μL αιθανόλη 75%, ανακινείται έντονα και φυγοκεντρείται σε στροφές 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C . Η αιθανόλη 75% αφαιρείται με τη χρήση πιπέτας του 1 mL πολύ προσεκτικά. Το τελευταίο στάδιο (προσθήκη αιθανόλης 75%) πραγματοποιείται άλλη μία φορά.

Μετά το πέρας των παραπάνω σταδίων, τα σωληνάρια αφήνονται στο εσωτερικό εστίας, ούτως ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης 75% που υπάρχει στο εσωτερικό τους. Τέλος, προστίθενται 50 μL φιλτραρισμένο στείρο νερό σε κάθε σωληνάριο και φυλάσσονται σε κατάψυξη των -80°C .

4.8. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ RNA

Η φωτομέτρηση RNA είναι χρήσιμη καθώς προσδιορίζεται η συγκέντρωση του RNA που έχει απομονωθεί από τον εκάστοτε ιστό, η ποσότητα (λόγος: 260/230) του αντιδραστήριου μίγματος φαινόλης με ισοθαικινική γουανιδίνη (Nucleozol) και η τιμή (λόγος: 260/280) που αφορά την ποσότητα και την καθαρότητα του RNA.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- απομονωμένο RNA
- πάγος
- φωτόμετρο για RNA (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- φιλτραρισμένο νερό (Demo Pharmaceuticals)
- πιπέτα Gilson των 10 μL

Μέθοδος

Το απομονωμένο RNA που είναι αποθηκευμένο στους -80°C , μεταφέρεται σε δοχείο με πάγο όπου διατηρείται μέχρι το τερματισμό της μέτρησης. Μαζί με τα δείγματα, είναι και ένα σωληνάριο με φιλτραρισμένο νερό.

Στο μηχάνημα του φωτόμετρου ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή για να προετοιμαστεί κατάλληλα. Το πρόγραμμα που υποστηρίζεται είναι το Nanodrop 2000. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, λαμβάνονται 2μL φιλτραρισμένου νερού, μεταφέρονται στο όργανο και λαμβάνεται η καθαρή αρχική ένδειξη. Έπειτα, για κάθε δείγμα λαμβάνονται και καταγράφονται οι τιμές:

- 260/230 (τιμή που αφορά την ποσότητα NucleoZol)
- 260/280 (τιμή που αφορά την ποσότητα RNA)
- C (RNA) (συγκέντρωση του RNA σε ng/μl)

Μόλις ολοκληρωθούν οι απαραίτητες μετρήσεις, το μηχάνημα καθαρίζεται αρκετά καλά με φιλτραρισμένο νερό και τερματίζεται η λειτουργία του. Τα δείγματα επιστρέφονται στη κατάλυξη των -80°C .

4.9. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA

Το συμπληρωματικό DNA είναι μόριο το οποίο αποτελείται από τη θηγατρική αλυσίδα RNA και την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA. Συμβάλλει στην μελέτη των γονιδίων από τα οποία αποτελείται.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- αντιδραστήρια κιτ 'TAKARA'
- σωληνάριατων 200 μL (Kisker Biotech GmbH & Co. KG)
- πιπέτες Gilson των 10, 20, 200 μL
- δείγματα RNA
- μηχάνημα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PTC-200)

Μέθοδος

Για να παρασκευαστεί το δείγμα που πρόκειται να μελετηθεί, θα πρέπει να παρασκευαστούν τρία διαφορετικά διαλύματα αντίδρασης και να αραιωθεί (όπου είναι απαραίτητο) το δείγμα προς μελέτη.

Παρακάτω καταγράφονται τα διαλύματα αντίδρασης: μίγμα 1, μίγμα 2, μίγμα NC και αραιωμένο δείγμα.

| Μίγμα 1 | |
|----------------------------------|-----------------|
| Αντιδραστήριο | Ποσότητα |
| Τυχαία Εξαμερή oligονουκλεοτίδια | 1μL |
| dNTPs | 0,5μL |

| Μίγμα 2 | |
|----------------------|-----------------|
| Αντιδραστήριο | Ποσότητα |
| 5X Buffer | 2μL |
| Αναστολέας RNAase | 0,25 μL |
| RTase | 0,5 μL |

| Μίγμα NC | |
|----------------------|-----------------|
| Αντιδραστήριο | Ποσότητα |
| 5X Buffer | 2μL |
| Αναστολέας RNAase | 0,25 μL |
| dH2O | 0,5 μL |

- **Διάλυμα Δείγματος**

Το διάλυμα δείγματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει τελικό όγκο 5,75 μL. Από τη φωτομετρική μελέτη του RNA προκύπτει η συγκέντρωσή του, όπου σύμφωνα με αυτή τη τιμή, το δείγμα που πρόκειται να παρασκευαστεί θα πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση 900 ng/μL. Ο όγκος που προκύπτει σε συνδυασμό με τη προσθήκη νερού, δίνουν το διάλυμα δείγματος με τελικό όγκο 5,75 μL. Σε περίπτωση που η συγκέντρωση του RNA υπερβαίνει σημαντικά τη τιμή συγκέντρωσης 900 ng/μL, κρίνεται απαραίτητη η παρασκευή αραιωμένου δείγματος, από όπου λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα για τη παρασκευή διαλύματος δείγματος. Αρχικά θα πρέπει το αραιωμένο διάλυμα να έχει τελικό όγκο 10 μL και συγκέντρωση 500 ng/μL. Η αραιώση γίνεται με νερό. Έπειτα, από το αραιωμένο διάλυμα λαμβάνεται τόσος όγκος ώστε να εμπεριέχονται 1000 ngRNA. Ο όγκος αυτός αραιώνεται σε ποσότητα νερού τόση, ώστε να προκύπτει τελικός όγκος 5,75 μL, δηλαδή να προκύπτει το διάλυμα δείγματος.

Οι παραπάνω πληροφορίες αφορούν την παρασκευή ενός δείγματος.

Σε οποιαδήποτε περίπτωση πειράματος, λαμβάνονται υπόψη οι εξής προϋποθέσεις:

- οι τελικές ποσότητες μιγμάτων θα πρέπει να είναι ανάλογες του αριθμού δειγμάτων και συμπεριλαμβανόμενης περισσειας (λαμβάνεται υπόψη ένα ή δύο ακόμη δείγμα/δείγματα)
- πρώτα παρασκευάζεται το μίγμα 1 και αναμιγνύεται με το διάλυμα δείγματος. Προστίθεται πάντα 1,5 μL μίγμα 1. Επεξεργάζονται σε κατάλληλο πρόγραμμα του μηχανήματος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.
- Αμέσως μετά προστίθενται τα μίγματα: 2 και NC (2,75 μL από το καθένα) και συνεχίζεται η επεξεργασία έως τέλους

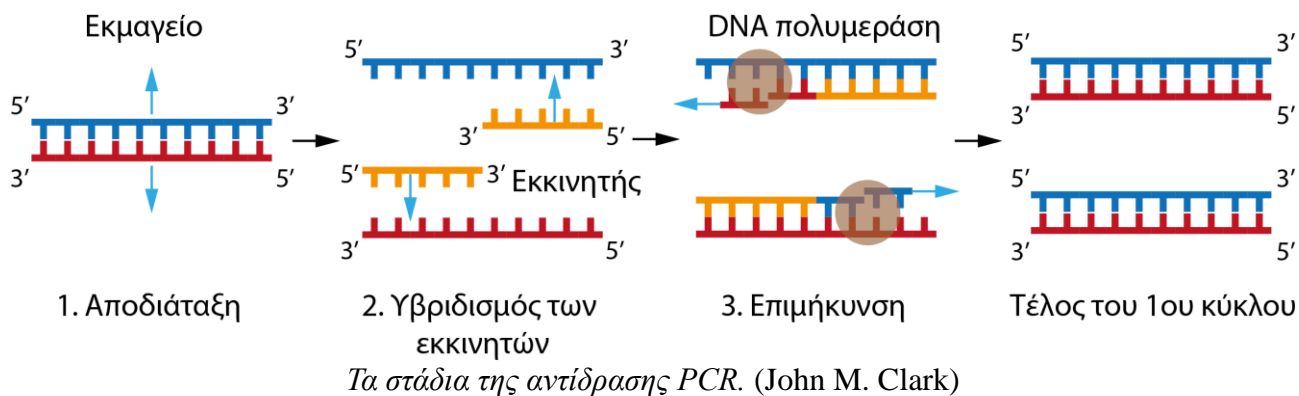
Τα νέα διαλύματα περιέχουν το συμπληρωματικό DNA και αποθηκεύονται στη κατάψυξη των -20°C.

4.10. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro. (Katoch) Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Τα στάδια της PCR

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (John M. Clark) :



1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.

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

Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR στον θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp φαίνεται στον επόμενο πίνακα:

| Στάδια της PCR | Θερμοκρασία (° C) | Χρόνος |
|---------------------------------------|-------------------|-----------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη | 95 | 2-5 min |
| 2. Αποδιάταξη | 95 | 30-45 sec |
| 3. Υβριδισμός εκκινητών | 55-65 | 30-45 sec |
| 4. Επιμήκυνση (1 kb/min) | 72 | 45 sec |
| Επανάληψη σταδίων 2-4 για 30-35 φορές | | |
| 5. Τελική επιμήκυνση | 72 | 5 min |

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό Διάλυμα
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια
- Εκκινητής #1
- Εκκινητής #2
- Πολυμεράση
- πλαστικά σωληνάρια PCR (200 μL) (Kisker Biotech Gmb H&Co. KG)

- πλαστικά σωληνάρια τύπου erpedorf (1,5 mL) (Greiner Bio-One)
- πιπέτες Gilson των 10, 20, 200 μL
- φιλτραρισμένο νερό (Demo Pharmaceuticals)
- δείγματα RNA
- χρωστική ανίχνευσης
- διάλυμα φόρτωσης
- μηχανήμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PTC-200)

Μέθοδος

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα αντιδραστηρίων. Οι παρακάτω ποσότητες αντιπροσωπεύουν τις απαραίτητες ενός δείγματος. Σε οποιαδήποτε περίπτωση πειράματος λαμβάνονται υπόψη: ο αριθμός των δειγμάτων προς μελέτη και περίσσεια ως προς το διάλυμα αντιδραστηρίων.

Ο αριθμός δειγμάτων για το παρόν πείραμα αφορά:

- τον αριθμό δειγμάτων του συμπληρωματικού DNA
- ένα δείγμα που δεν συμπεριλαμβάνει την πολυμεράση
- ένα δείγμα που ως δείγμα είναι το νερό.

Παρακάτω καταγράφονται οι ποσότητες που αφορούν τη παρασκευή του διαλύματος αντιδραστηρίων.

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα (μL) |
|-----------------------|----------------------------|
| Ρυθμιστικό Διάλυμα | 2 |
| Δεοξυριβονουκλεοτίδια | 0,4 |
| Εκκινητής #1 | 0,4 |
| Εκκινητής #2 | 0,4 |
| Πολυμεράση | 0,1 |
| φιλτραρισμένο νερό | 15,7 |

Σημειώνεται πως η πολυμεράση προστίθεται τελευταία.

Για κάθε τελικό δείγμα χρησιμοποιούνται:

- 1 μL δείγμα
- 19 μL διάλυμα αντιδραστηρίων

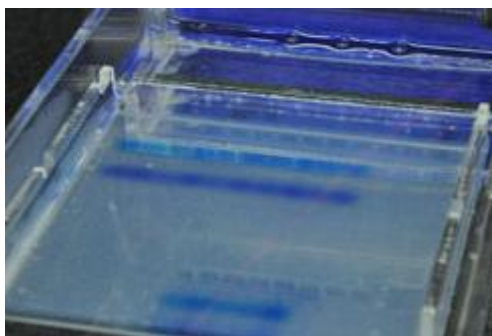
Τα σωληνάρια που περιέχουν τις παραπάνω ποσότητες επεξεργάζονται σε κατάλληλο πρόγραμμα της Αλυσιδωτής αντίδρασης Πολυμεράσης.

Μετά το πέρας της επεξεργασίας, τα δείγματα φυλάσσονται στη ψύξη, στους 4°C .

Διαφορετικά, προστίθεται ποσότητα 4 μL χρωστικής ανίχνευσης στο εσωτερικό τους και αναδεύονται αρκετά καλά. 12 μL από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε συγκεκριμένο πηγάδι στο πηκτώμα αγαρόζης 1,5%. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση και οι ζώνες κάθε δείγματος γίνονται ορατές με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους.

4.11. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης εξυπηρετεί στην ανάδειξη των γονιδίων που μελετώνται. Παρασκευάζεται πηκτώμα αγαρόζης το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο αποτελεί μέσο φθορισμού και συμβάλλει στην ανάδειξη των γονιδίων υπό την επίδραση της λάμπας UV. (Katoch)



Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Αγαρόζης (Katoch)

Η χρήση του πηκτώματος αγαρόζης εξυπηρετεί αρκετά καθώς έχει μεγάλους πόρους, με αποτέλεσμα να καθιστάται ιδανική για διαχωρισμό του DNA και του RNA.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- αγαρόζη (NIPPON GENETICS EUROPE GmbH)
- διάλυμα TAE 1X
- 2 χτένια
- ειδικό εκμαγείο
- βρωμιούχο αιθίδιο
- χρωστική ανίχνευσης
- διάλυμα φόρτωσης
- πιπέτα των 20 μ L
- συσκευή ηλεκτρόφορησης (CONSORT, E431)
- λάμπα υπεριώδους (Dutscher)
- ζυγός
- φούρνος μικροκυμάτων
- κωνική φιάλη των 250 mL
- ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL

Μέθοδος

Αρχικά ζυγίζονται 1,5 g αγαρόζης και διαλύονται σε 100 mL TAE 1X, στο εσωτερικό κωνικής φιάλης των 250 mL. Η κωνική φιάλη μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων όπου θερμαίνεται για πέντε λεπτά. Κατά αυτό το διάστημα, το διάλυμα γίνεται ομογενές και διάφανο.

Έπειτα, ανακινείται έντονα έτσι ώστε να απορριφθούν οι ατμοί που έχουν εγκλωβιστεί εξαιτίας της θέρμανσης. Προστίθενται 12 μ L βρωμιούχο αιθίδιο και αναδεύεται έντονα το προκύπτον διάλυμα. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό εκμαγείο, το οποίο έχει συναρμολογηθεί μαζί με χτένια, ειδικά για τη δημιουργία πηγαδιών στο πήκτωμα αγαρόζης.

Μόλις είναι έτοιμο το πήκτωμα, μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου φορτώνονται τα δείγματα σε ξεχωριστά πηγάδια. Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά, ρυθμισμένη στα 100 V. Μόλις ολοκληρωθεί, το πήκτωμα μεταφέρεται σε λάμπα υπεριώδους, όπου γίνονται ορατές και μελετώνται οι ζώνες κάθε δείγματος, βάσει του διαλύματος φόρτωσης.

4.12. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Η ιστολογική μελέτη χρησιμοποιείται για να μελετηθούν στο μικροσκόπιο τα κύτταρα των ιστών που έχουν υποστεί αλλαγές στη δομή τους.

Στο παρόν πείραμα, οι αντικειμενοφόρες πλάκες που φέρουν τα ιστοτεμάχια των ιστών από τα φλεγμονώδη πέλματα επεξεργάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο αιματοξυλίνης/εωσίνης. Το πρωτόκολλο χρησιμοποιείται με σκοπό τη μελέτη των βασικών μορφολογικών χαρακτηριστικών του ιστού. Συγκεκριμένα, η αιματοξυλίνη περιέχει μια μπλε χρώση για τους πυρήνες των κυττάρων, ενώ η εωσίνη ροζ ή κόκκινο για το κυτταρόπλασμα και το συνδετικό ιστό.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- πάραφορμαλδεΰδη (PFA) 4% (Thermo Scientific)
- σουκρόζη 30% (Applichem Biochemica)
- κρυοπροστατευτικό μέσο ιστών (Tissue-Tek, OCT)
- καταψύκτες των -80°C και των -20°C
- κρυοτόμος (LEICA CM1860 UV)
- λαβίδα
- κοπίδι
- αντικειμενοφόρες πλάκες (Thermo Scientific)
- καλυπτρίδες (knittel Glass)
- αιθανόλη 100% (Fisher Scientific UK)
- αιματοξυλίνη
- νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)
- ηωσίνη
- αιθανόλη 75% (Fisher Scientific UK)
- αιθανόλη 80% (Fisher Scientific UK)
- αιθανόλη 95% (Fisher Scientific UK)
- ξυλένιο
- entellan (Merck KGaA, Germany)
- Μικροσκόπιο (Leica)

Μέθοδος

Κατά τη διεξαγωγή ενός εκ των πειραμάτων, λαμβάνονται ιστοί φλεγμονώδους πέλματος και μεταφέρονται σε 1 mL πάραφορμαλδεΰδη και παραμένουν σε θερμοκρασία 4°C έως ότου να απορροφήσουν αρκετή ποσότητα πάραφορμαλδεΰδης, η οποία καθιστά τους ιστούς ανθεκτικούς σε αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες. Μόλις πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, μεταφέρονται σε διάλυμα 1 mL σουκρόζης 30%. Έπειτα, μεταφέρονται σε ειδικά εκμαγεία όπου υπάρχει μικρή ποσότητα κρυοπροστατευτικού μέσου, έχοντας κατάλληλο προσανατολισμό και φυλάσσονται στους -80°C επ' αόριστον (εάν χρειαστεί).

Τα παραπάνω ιστοτεμάχια πρόκειται να επεξεργαστούν με τη χρήση κρυοτόμου, όπου λαμβάνονται τομές πάχους 10 μm , οι οποίες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες και φυλάσσονται σε κατάψυξη των -20°C .

Επιπροσθέτως, οι τομές μπορούν να βαφούν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, έτσι ώστε να μελετηθούν οι τομές σε μικροσκόπιο ορατού φωτός.

Για τη χρώση των τομών ακολουθούνται με τη σειρά τα παρακάτω βήματα:

1. παραμονή για 2 λεπτά σε διάλυμα αιθανόλης 100%
2. 5 βυθίσεις σε νερό στήλης απιονισμού
3. 30 βυθίσεις σε διάλυμα Αιματοξυλίνης
4. 5 βυθίσεις σε νερό στήλης απιονισμού
5. 17 βυθίσεις σε διάλυμα Ηωσίνης

6. 5 βυθίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 75%
7. 5 βυθίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 80%
8. 5 βυθίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 95%
9. παραμονή για 5 λεπτά σε διάλυμα Ξυλένιου
10. κάλυψη τομών με καλυπτρίδα και entellan

Παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα σε χώρο όπου δεν έρχονται σε επαφή με άλλα αντικείμενα ή μέσα. Μελετώνται σε μικροσκόπιο ορατού φωτός από όπου λαμβάνονται φωτογραφίες των τομών για περαιτέρω χρήση.

4.13. ΛΗΨΗ ΣΠΛΗΝΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Δύο ποντίκια αρσενικού γένους που αντιπροσωπεύουν τους γονότυπους: φυσιολογικό γονότυπο (*Hsp70^{+/+}*) και γονότυπο με γενετική απαλοιφή του γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη HSP70 (*Hsp70^{-/-}*) υφίστανται φλεγμονή εξαιτίας της χορήγησης του CFA. 6 ώρες μετά την χορήγηση και την επίδραση, απομονώνεται ο σπλήνας για να ληφθούν και να διερευνηθούν τα T-λεμφοκύτταρα *in vitro*.

4.13.1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Υλικά και Αντιδραστήρια

- ανοσοενισχυτικό διάλυμα αντιγόνου Freund (CFA) (Sigma, LifeScience)
- αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) (gibco, life technologies)
- θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- τρυβλία καλλιέργειας 94/16 mm (GreinerBio-One)
- τρυβλία καλλιέργειας 60/15 mm (GreinerBio-One)
- 2 αντικειμενοφόρες πλάκες (Thermo Scientific)
- πλαστικές πιπέτες τύπου pasteur μη αποστειρωμένες, 1 mL
- πάγος
- Νερό στήλης (ZALION, ICNEL A.E.B.E.)
- Ρυθμιστικό διάλυμα I
- ζυγός ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων
- βαθμονομημένοι σωλήνες των 50 mL (Corning 430291 & Greiner Bio-One)
- βαθμονομημένοι σωλήνες των 15 mL (GreinerBio-One)
- υδατόλουτρο με ρυθμιζόμενο θερμομέτρο (Precitherm PFV)
- αναλώσιμες ορολογικές πιπέτες των: 1mL, 5mL, 10mL, 25mL (Costar, Corning Incorporated) & (Sarstedt, France)
- ηλεκτρονικός ελεγκτής πιπέτας
- θρεπτικό μέσο (BioSera RPMI 1640)
- ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) (BioSera)
- μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) (gibco)
- διάλυμα πυρουβικού νατρίου (Sodium Puruvate) (BioSera)
- κονκαναβαλίνη A (conA) (sigma)
- ιντερλευκίνη 2 (IL2) (sigma)
- φιάλες κυτταρικής καλλιέργειας των 75 cm² (Corning Flask)
- φιάλες κυτταρικής καλλιέργειας των 150 cm² (Corning Flask)
- Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής μικροβιολογικής ασφάλειας (BIOAIR, aura Vertical S.D.4.)
- Επωαστικός κλίβανος 37°C & 5%CO₂ (Thermo, Electron Corporation)
- φυγόκεντρος 4 θέσεων (eppeдорf, Centrifuge 5702)

- μικροσκόπιο ορατού φωτός (Nikon TMG)

Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Απαραίτητοι Υπολογισμοί

Παρασκευή Θρεπτικού Μέσου

- ✓ ο ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) μεταφέρεται από την κατάψυξη των -20°C σε υδατόλουτρο, σε συνθήκες 55°C για 30 λεπτά έτσι ώστε να απενεργοποιηθεί.
- ✓ προστίθεται 10% ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) σε τελικό όγκο 500 mL θρεπτικού μέσου
- ✓ προστίθεται 1% μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελικό όγκο 500 mL θρεπτικού μέσου
- ✓ προστίθενται 5 mL διάλυμα πυροβικού νατρίου (SodiumPyruvate)
- ✓ καλή ανακίνηση του τελικού διαλύματος

Παρασκευή Θρεπτικού Μέσου Μέτρησης των κυττάρων

- * ο ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) μεταφέρεται από την κατάψυξη των -20°C σε υδατόλουτρο, σε συνθήκες 37°C για 30 λεπτά έτσι ώστε να αποψυχθεί.
- * προστίθεται 1% ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) σε τελικό όγκο 30 mL θρεπτικού μέσου
- * προστίθεται 1% μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελικό όγκο 30 mL θρεπτικού μέσου
- * προστίθενται 5 mL διάλυμα πυροβικού νατρίου (SodiumPyruvate)
- * καλή ανακίνηση του τελικού διαλύματος

Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος I

Για τη παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος I, ζυγίζονται με ακρίβεια:

0,8 gr NH_4Cl

0.084g NaHCO_3

0.037g EDTA.

Μεταφέρονται σε ειδικό δοχείο αποθήκευσης και διαλύονται σε 100 mL απιονισμένο νερό.

Απαραίτητοι Υπολογισμοί

Κονκαναβαλίνη A (conA)

Αρχική συγκέντρωση: 5mg/mL

Τελική συγκέντρωση: 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Τελικός όγκος: 10mL

Υπολογισμός:

$$y * 5\text{mg}/\text{mL} = 4 \mu\text{g}/\text{mL} * 10\text{mL}$$

$$y * 5 * 10^3 \mu\text{g} / 10^3 \mu\text{L} = 4 \mu\text{g} / 10^3 \mu\text{L} * 10 * 10^3 \mu\text{L} \rightarrow$$

$$y * 5 * 10^3 \mu\text{g} * 10^3 \mu\text{L} = 4 \mu\text{g} * 10 * 10^3 \mu\text{L} * 10^3 \mu\text{L}$$

$$y = 8 \mu\text{L conA}$$

Ιντερνλευκίνη 2 (IL2)

Αρχική συγκέντρωση: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Τελική συγκέντρωση: 0,5ng/mL

Τελικός όγκος: 50mL

Υπολογισμός:

$$y * 10 \mu\text{g/mL} = 0,5\text{ng/mL} * 50\text{mL}$$

$$y * 10 \mu\text{g} / 10^3 \mu\text{L} = 50 * 10^3 \mu\text{L} * 0,5 * 10^{-3} \mu\text{g} / 10^3 \mu\text{L} \rightarrow$$

$$y * 10 \mu\text{g} * 10^3 \mu\text{L} = 0,5 * 10^{-3} \mu\text{g} * 50 * 10^3 \mu\text{L} * 10^3 \mu\text{L}$$

$$y = 2,5 \mu\text{L IL2}$$

Μέθοδος

Αρχικά χορηγείται ανοσοενισχυτικό διάλυμα αντιγόνου Freund (CFA) στο πέλμα του ποντικίου και παραμένει σε αναμονή για 6 ώρες έτσι ώστε να δημιουργηθεί φλεγμονή.

Μετά το πέρας των 6 ωρών, το ποντίκι θυσιάζεται και λαμβάνεται ο σπλήνας, ο οποίος φυλάσσεται σε μικρό τρυβλίο καλλιέργειας με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS). Με τη χρήση της αδρής επιφάνειας 2 αντικειμενοφόρων πλακών, ο σπλήνας ομογενοποιείται προσεκτικά σε μεγάλο τρυβλίο καλλιέργειας, έχοντας στο περιεχόμενό του 15 mL αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS).

Το προκύπτον διάλυμα κυττάρων μεταφέρεται σε βαθμονομημένο σωλήνα των 50 mL, όπου προστίθενται 3 mL ρυθμιστικό διάλυμα I, σφραγίζεται καλά και μεταφέρεται σε υδατόλουτρο των 37°C για 10 λεπτά.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1800rpm, για 25 λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Κατά αυτή τη διαδικασία απομακρύνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το υπερκείμενο που προκύπτει απορρίπτεται σε ειδικό δοχείο απορριμμάτων (περιέχει χλωρίνη).

Προστίθενται ξανά 15 mL αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) και 3 mL ρυθμιστικό διάλυμα I και ακολουθεί φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ξανά, ενώ στο βαθμονομημένο σωλήνα προστίθενται 10 mL θρεπτικού μέσου.

Με τη χρήση πιπέτας του 1 mL ή των 5 mL προκαλούνται έντονες αναδεύσεις του προκύπτοντος διαλύματος κυττάρων.

Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm, για 5 λεπτά σε συνθήκες δωματίου, από όπου το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Προστίθενται 20 mL θρεπτικού μέσου στο σωλήνα και πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενες αναδεύσεις. Έπειτα, η ποσότητα του παραπάνω διαλύματος χωρίζεται ισότιμα σε 2 τρυβλία καλλιέργειας. Σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κονκαναβαλίνη A (conA). Τέλος τα τρυβλία καλλιέργειας παρατηρούνται στο μικροσκόπιο ορατού φωτός και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για μία ημέρα.

Την επόμενη μέρα, σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας προστίθεται απαραίτητη ποσότητα ιντερλευκίνης 2 και το περιεχόμενό του μεταφέρεται σε φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας των 75 cm². Επιπλέον προστίθενται 40 mL θρεπτικού μέσου. Η φιάλη σφραγίζεται προσεκτικά και φυλάσσεται στον επωαστικό κλίβανο.

Τίθεται προσοχή στο βιδωτό πώμα που διαθέτει η φιάλη, καθώς:

- εάν διαθέτει ειδικό φίλτρο, συνιστάται η καλή σφράγιση της πριν την φύλαξή της στον επωαστικό κλίβανο
- εάν δεν διαθέτει ειδικό φίλτρο, θα πρέπει το βιδωτό πώμα να σφραγιστεί μερικά, έτσι ώστε να εισέρχεται διοξείδιο του άνθρακα στο εσωτερικό της φιάλης όταν παραμένει στον επωαστικό κλίβανο.

Η προσθήκη θρεπτικού μέσου που περιέχει ιντερλευκίνη 2 πραγματοποιείται σε καθημερινή βάση (εάν κριθεί απαραίτητο) μέχρι να διαπιστωθεί η ικανοποιητική ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Για την κάλυψη μεγαλύτερης επιφάνειας και περισσότερου προστιθέμενου όγκου θρεπτικού μέσου-ιντερλευκίνης 2, χρησιμοποιούνται φιάλες κυτταρικής καλλιέργειας των 150 cm².

4.13.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

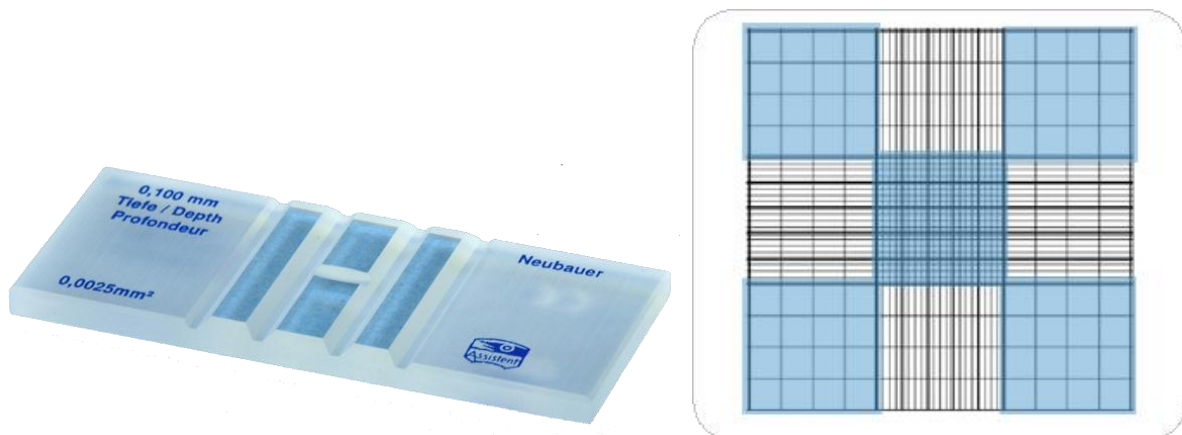
Υλικά και Αντιδραστήρια

- βαθμονομημένοι σωλήνες των 50 mL (Corning 430291 & Greiner Bio-One)
- αναλώσιμες ορολογικές πιπέτες των: 1mL, 5mL, 10mL, 25mL (Costar, Corning Incorporated) & (Sarstedt, France)
- ηλεκτρονικός ελεγκτής πιπέτας
- θρεπτικό μέσο (BioSera RPMI 1640)
- ορός εμβρύου βοοειδούς FBS (BioSera)
- μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) (gibco)
- διάλυμα πυρουβικού νατρίου (Sodium Pyruvate) (BioSera)
- κονκαναβαλίνη A (conA) (sigma)
- ιντερνλευκίνη 2 (IL2) (sigma)
- πλαστικά σωληνάρια τύπου erpedorf (1,5 mL) (GreinerBio-One)
- πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο)
- (3Z, 3'Z) -3,3' - [(3,3'-διμεθυλδιφαινυλ-4,4'-δυλ) δι (1Z) υδραζινο-2-υλ- 1- υλιδενο] δις - οξο-3,4-διϋδروναφθαλινο-2,7-δισουλφονικό οξύ) (TrypanBlue, gibco)
- καλυπτρίδες (knittel Glass)

Μέθοδος

Η ποσότητα διαλύματος κυττάρων που υπάρχει στη φιάλη κυτταρικής καλλιέργειας (των 150 cm²) χωρίζεται σε βαθμονομημένα σωληνάρια των 50 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800rpm, για 5 λεπτά σε συνθήκες δωματίου, από όπου το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα κυττάρων που απομένει προστίθενται 10 mL θρεπτικό μέσο για μέτρηση.

Σε σωληνάριο των 1,5 mL προστίθενται 90 μL TrypanBlue και 10 μL δείγματος κυττάρων. 10 μL του παραπάνω διαλύματος μεταφέρονται σε πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο), καλύπτεται με καλυπτρίδα η πλάκα και τοποθετείται στο κέντρο του μικροσκοπίου. (Celeromics)



Πλάκα Neubauer. Αριστερά φαίνεται η συνολική εικόνα της πλάκας και δεξιά φαίνεται το μέρος όπου μετρώνται τα κύτταρα. ("Cell Counting with Neubauer Chamber,")(Celeromics)

Μελετώντας προσεκτικά (τα κύτταρα που συνυπολογίζονται είναι μόνο αυτά που δεν έχουν μπλέ χρώμα στο εσωτερικό τους), γίνεται καταμέτρηση των υγιών κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Έπειτα, υπολογίζεται ο μέσος όρος (n) που προκύπτει από το σύνολο των τεταρτημορίων.

Ακολουθούν οι υπολογισμοί για το διαχωρισμό των κυττάρων.

ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Σε μία πλάκα κυτταροκαλλιέργειας, το ένα πηγάδι πρέπει να έχει 1 mL διαλύματος κυττάρων, το οποίο περιέχει 10^6 κύτταρα. Με βάση αυτό το πρωτόκολλο, χρησιμοποιείται ο μέσος όρος κυττάρων (n) κάθε σωληναρίου και προκύπτει ο όγκος που πρόκειται να ληφθεί από το αρχικό διάλυμα κυττάρων. Ο όγκος αυτός κατανέμεται σε αριθμό πηγαδιών που είναι σύμφωνος με τους υπολογισμούς που πραγματοποιούνται.

ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε μία πλάκα κυτταροκαλλιέργειας, το ένα πηγάδι πρέπει να έχει 1 mL διαλύματος κυττάρων, το οποίο περιέχει 250.000 κύτταρα. Με βάση αυτό το πρωτόκολλο, χρησιμοποιείται ο μέσος όρος κυττάρων κάθε σωληναρίου και προκύπτει ο όγκος που πρόκειται να ληφθεί από το αρχικό διάλυμα κυττάρων. Ο όγκος αυτός κατανέμεται σε αριθμό πηγαδιών που είναι σύμφωνος με τους υπολογισμούς που πραγματοποιούνται.

4.13.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Υλικά και Αντιδραστήρια

- βαθμονομημένοι σωλήνες των 50 mL (Corning 430291 & Greiner Bio-One)
- πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorf (1,5 mL) (GreinerBio-One)
- πιπέτες Gilson με ρυθμιζόμενο όγκο: 1 mL, 200μL, 20μL
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 πηγαδιών (Costar, Corning Incorporated & SPL LIFE SCIENCE)
- Διάλυμα Λύσης RIPA (Thermo Scientific)
- αναστολείς πρωτεασών (P.I.) (roche diagnostics, USA)
- φυγόκεντρος 4 θέσεων (eppendorf, Centrifuge 5702)
- μικροσκόπιο ορατού φωτός (Nikon TMG)
- κατάψυξη των -80°C

Μέθοδος

Οι πλάκες κυτταροκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν μεταφέρονται σε δοχείο με πάγο. Από κάθε πηγάδι τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλαστικό σωληνάριο τύπου eppendorf (1,5 mL) και ακολουθεί φυγόκεντρωση στους 1800 rpm και 22°C . Έπειτα, το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε νέα σειρά σωληναρίων και αποθηκεύεται στη κατάψυξη των -80°C . Στο κυτταρικό ίζημα που απομένει, προστίθενται 50 μL RIPA & αναστολείς πρωτεασών (P.I.) συγκέντρωσης 1X και αποθηκεύεται στη κατάψυξη των -80°C .

4.13.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο (MTT) - (ThermoScientific)] που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το

προϊόν της αντίδρασης διαλύεται όταν προστίθεται DMSO και το προκύπτον διάλυμα που παράγεται μεταφέρεται σε φασματοφωτόμετρο και λαμβάνονται τιμές απορρόφησης στα 550 nm.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- ηλεκτρονικός ελεγκτής πιπέττας
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 πηγαδιών (SPL LIFE SCIENCE)
- βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο (MTT) (Thermo Scientific)
- διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (gibco)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος Dulbecco (DPBS) (gibco)
- Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής μικροβιολογικής ασφάλειας (BIOAIR, aura Vertical S.D.4.)
- Επωαστικός κλίβανος 37°C & 5%CO₂ (Thermo, Electron Corporation)
- ηλεκτρονική συσκευή με προγραμματιζόμενη πλατφόρμα ανάδευσης (BIOSAN, Multi Bio-3D)
- αλουμινόχαρτο
- φασματοφωτόμετρο (BIO-RAD Model 680)

Μέθοδος

Εφόσον έχουν προετοιμαστεί οι πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 πηγαδιών με συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων/πηγάδι (250.000 κύτταρα/οπή), μελετάται ο ρυθμός πολλαπλασιασμός τους σε χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών.

Η παρακάτω διαδικασία ισχύει και για τις τέσσερις ημέρες.

Στη πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 πηγαδιών, στα πηγάδια όπου υπάρχουν στοιβάδες κυττάρων, προστίθενται 11 μ L βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο (MTT), συγκέντρωσης 10mM. Η πλάκα επώαζεται για 4 ώρες στον επωαστικό κλίβανο. Μετά το πέρας των 4 ωρών, προστίθενται 100 μ L/οπή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η πλάκα τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και παραμένει υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά. Το DMSO διαλύει τους κρυστάλλους που δημιουργήθηκαν από το MTT. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση σε δύο μήκη κύματος: 550 και 595 nm.

4.14. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στηρίχθηκε στα προγράμματα: SPSS, GraphPadPrism 6 και Excel. Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία απλής ανάλυσης της μεταβλητότητας (one-wayANOVA) για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν τις μετρήσεις πόνου και τις μετρήσεις οιδήματος. Από εκείνη προκύπτουν τα αποτελέσματα με βάση τη χρήση της επιλογής PostHoc, όπου επιλέγονται οι στατιστικές ποσότητες: LSD, Bonferroni και Scheffe. Στα σημεία που καταγράφεται στατιστικώς σημαντική διαφορά, σημειώνεται ότι: $P < 0,05$. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ανάλυσης δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (Independent Sample T-Test) για την επεξεργασία των κυτοκινών.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε κάθε γράφημα είναι ο μέσο όρος (Mean) \pm σταθερό σφάλμα μέσου όρου (SEM).

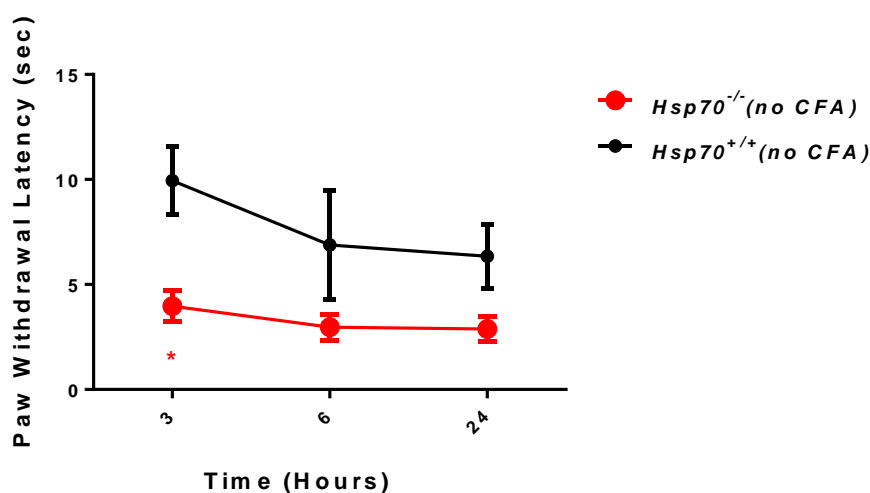
5.0. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επαγομένης από φλεγμονή αναλγησίας σε φυσιολογικά ζώα (WT ή $Hsp^{+/+}$) και σε ζώα τα οποία έφεραν γενετική απαλοιφή του γονιδίου της HSP70 ($Hsp70^{-/-}$). Πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, εκ των οποίων επιλέχθηκαν τα αποτελέσματα του τελευταίου, καθώς παρουσιάζουν ικανοποιητικότερη εικόνα της μελέτης.

5.1. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ: ΠΟΝΟΥ ΚΑΙ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ

Αρχικά ελήφθησαν οι μετρήσεις βασικού πόνου σε κάθε γονότυπο (χωρίς την χορήγηση CFA). Έπειτα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.1., χορηγήθηκε CFA, δημιουργήθηκε φλεγμονή και καταγράφησαν οι μετρήσεις πόνου 3, 6 και 24 ώρες μετά την χορήγηση.

- **5.1.1.** Οι μετρήσεις βασικού πόνου παρουσιάζονται στο γράφημα 1.

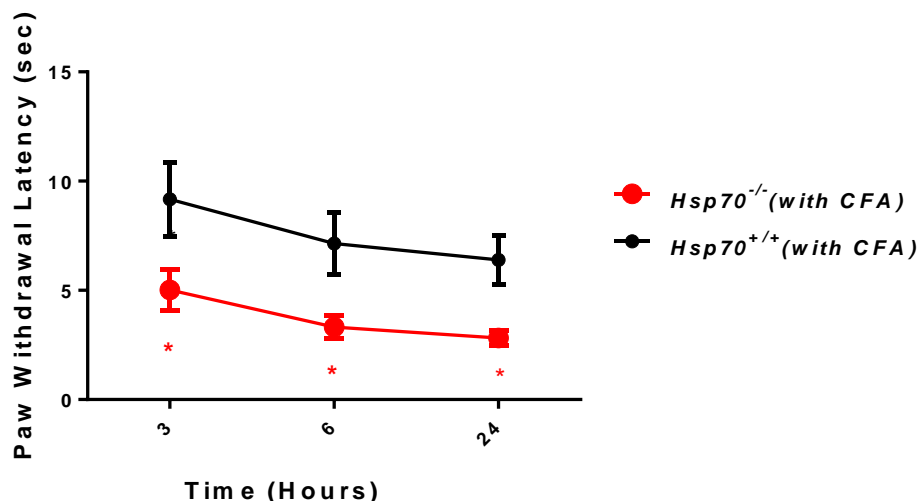


Γράφημα 1. Μετρήσεις Βασικού Πόνου σε αρσενικά $Hsp70^{+/+}$ και $Hsp70^{-/-}$ ποντίκια. Τα $Hsp70^{-/-}$ ποντίκια είχαν στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο χρόνο αντίδρασης συγκριτικά με τα ποντίκια αγρίου τύπου 3 ώρες μετά την έναρξη μέτρησης ($Hsp70^{+/+}$ n=5 ποντίκια και $Hsp70^{-/-}$ n=6, * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων, την ίδια χρονική στιγμή, $p < 0.05$).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα (1) τα $Hsp70^{-/-}$ ποντίκια παρουσίαζαν στατιστικώς σημαντικό χαμηλότερο ουδό πόνου (μικρότερο χρόνο αντίδρασης) στην εφαρμογή του θερμικού ερεθίσματος, τρεις ώρες μετά την έναρξη μέτρησης, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε κανένα άλλο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε.

- **5.1.2.** Οι μετρήσεις πόνου μετά τη χορήγηση του CFA παρουσιάζονται στο γράφημα 2.

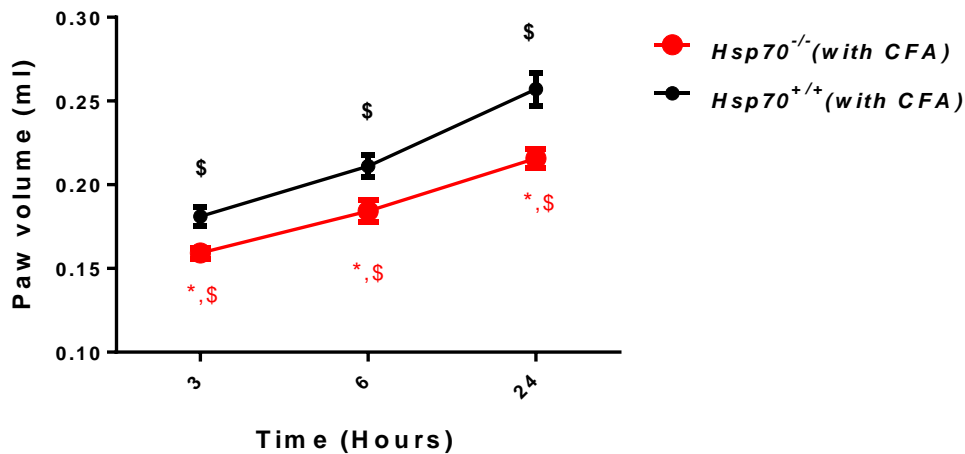
Τα πειράματα έδειξαν ότι τα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια είχαν μικρότερο χρόνο αντίδρασης μετά την χορήγηση του CFA και την εφαρμογή του θερμικού ερεθίσματος, συγκριτικά με τα ποντίκια αγρίου τύπου, σε όλα τα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στον ίδιο γονότυπο μεταξύ των διαφόρων χρονικών διαστημάτων που εξετάστηκαν.



Γράφημα 2. Μετρήσεις Πόνου μετά τη χορήγηση του CFA σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Τα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια είχαν στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο χρόνο αντίδρασης συγκριτικά με τα ποντίκια αγρίου τύπου 3, 6 και 24 ώρες μετά την ένεση με CFA (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6, * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων, την ίδια χρονική στιγμή, p<0.05).

- **5.1.3.** Οι μετρήσεις οιδήματος μετά τη χορήγηση του CFA παρουσιάζονται στο γράφημα 3.

Τα πειράματα μας έδειξαν ότι κατά τη βύθιση του φλεγμαίνοντος πέλματος, ο όγκος του υγρού που εκτοπίζονταν ήταν λιγότερος στα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια συγκριτικά με τον όγκο στα ποντίκια αγρίου τύπου (Γραφημα 3), γεγονός που υποδηλώνει ότι το οίδημα ήταν μικρότερο στα αντίστοιχα ποντίκια. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορά στο μέγεθος του οιδήματος μεταξύ των διαφόρων χρονικών στιγμών μέτρησης στον ίδιο γονότυπο και στους δύο τύπους ζώων.



Γράφημα 3. Μετρήσεις Οιδήματος μετά τη χορήγηση του CFA σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Τα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια είχαν στατιστικά σημαντικό μικρότερο μέγεθος οιδήματος συγκριτικά με τα ποντίκια αγρίου τύπου 3, 6 και 24 ώρες μετά την ένεση με CFA (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6, * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων, την ίδια χρονική στιγμή, p<0.05, και \$: υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά στον ίδιο γονότυπο μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών.

5.2. ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

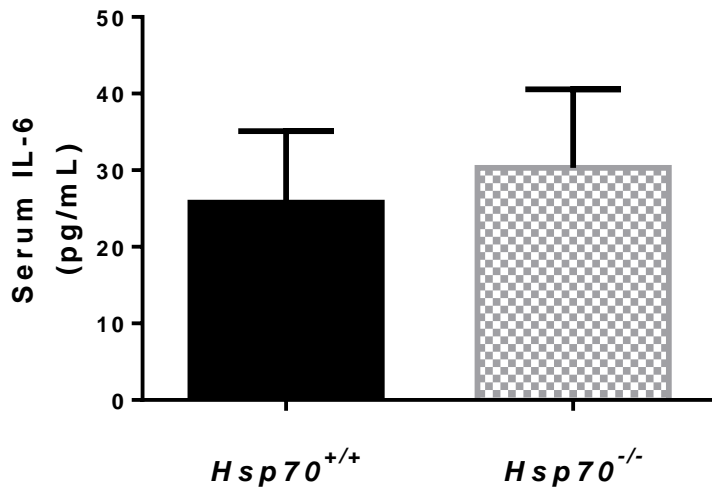
Η επίδραση του CFA οδηγεί στη ανάπτυξη τοπικής φλεγμονής στο πέλμα των ποντικών.

Η επαγόμενη φλεγμονή προκαλεί την απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι οι κυτοκίνες, οι οποίες παράγονται από ανοσοκύτταρα. Παράδειγμα τέτοιων παραγόντων αποτελούν οι κυτοκίνες: IL-6 και TNF-α οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

5.2.1. IL-6

- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης IL-6 στον ορό αίματος.

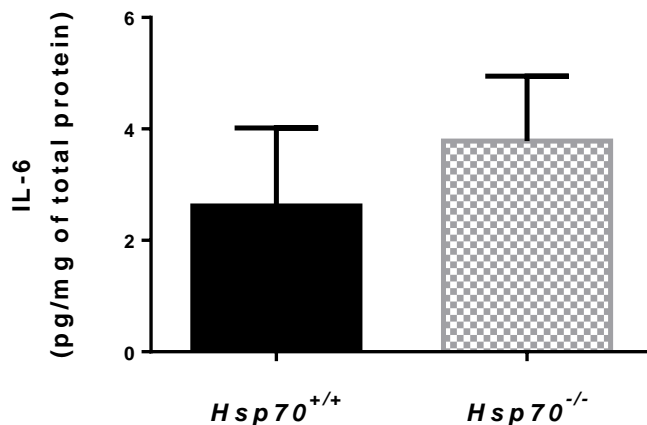
Μετά την τελευταία μέτρηση πόνου και οιδήματος (στις 24 ώρες μετά την ένεση με CFA), ελήφθη αίμα από τα ζώα όπως περιγράφεται στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ και τα ζώα θανατώθηκαν με αποδιάταξη της σπυλικής στήλης. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε και στον ορό που απομονώθηκε μετρήθηκαν IL-6 με ELISA. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκκριση της IL-6 μεταξύ των δύο γονοτύπων (Γραφημα 4).



Γράφημα 4. Επίπεδα παραγωγής της IL-6 σε ορό αίματος 24 ώρες μετά την χορήγηση του CFA σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6).

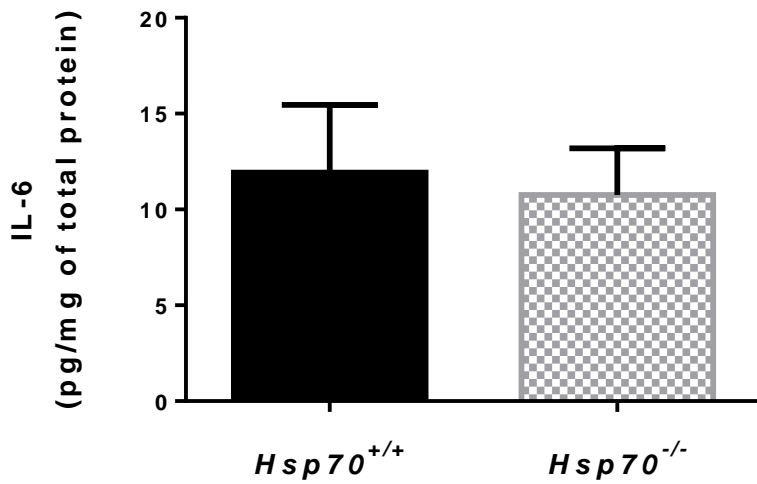
- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης IL-6 στο σπλήνα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μετά το τέλος του πειράματος τα ζώα θανατώθηκαν και απομονώθηκαν σπλήνες και φλεγμαίνοντα πέλματα τα οποία ομογενοποιήθηκαν με σκοπό τη μέτρηση των παραγόμενων κυτοκινών στους ιστούς αυτούς. Καμία διαφορά στην παραγωγή IL-6 από σπλήνες και φλεγμαίνοντα πέλματα και στην παραγωγή TNF-α από σπλήνες, δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο γονοτύπων (Γραφήματα 5, 6, 7 αντίστοιχα).



Γράφημα 5. Επίπεδα παραγωγής της IL-6 σε σπλήνα 24 ώρες μετά την χορήγηση του CFA, σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6).

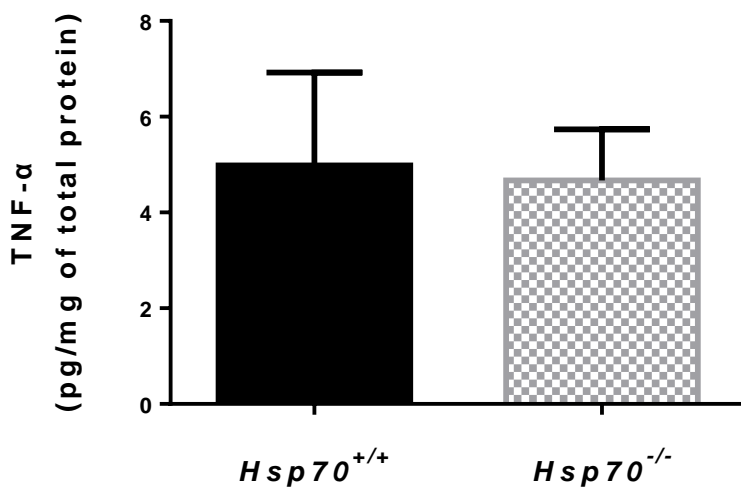
- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης IL-6 στο φλεγμαίνον πέλμα.



Γράφημα 6. Επίπεδα παραγωγής της IL-6 στο φλεγμαίνον πέλμα 24 ώρες μετά την χορήγηση του CFA, σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6).

5.2.2. ΠΡΩΤΕΙΝΗ TNF- α

- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TNF- α στο σπλήνα.



Γράφημα 7. Επίπεδα παραγωγής του TNF- α σε σπλήνα 24 ώρες μετά την χορήγηση του CFA, σε αρσενικά *Hsp70*^{+/+} και *Hsp70*^{-/-} ποντίκια. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (*Hsp70*^{+/+} n=5 ποντίκια και *Hsp70*^{-/-} n=6).

- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TNF-α στο φλεγμαίνον πέλμα.
Δεν πραγματοποιήθηκε μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης λόγω έλλειψης αντιδραστηρίου.

- Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TNF-α στον ορό του αίματος.
Πραγματοποιήθηκε μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλλά οι τιμές ήταν πολύ χαμηλές και δεν μπορούσαν να αξιολογηθούν.

5.3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Όπως περιγράφεται στη διαδικασία **4.11.**, είχαν ληφθεί τομές από το φλεγμαίνον πέλμα. Κατά τη διάρκεια της μελέτης τους στο μικροσκόπιο, παρατηρήθηκαν αναδιπλώσεις και ασυμμετρία ως προς τη γεωμετρία των τομών. Δεν υπήρχε ευκρίνεια και ασφαλές αποτέλεσμα από το συγκεκριμένο πείραμα.

5.4. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΦΛΕΓΜΑΙΝΟΝΤΟΣ ΠΕΛΜΑΤΟΣ

Έπειτα από την απομόνωση των RNA από ιστούς φλεγμαίνοντων πελμάτων, δεν πραγματοποιήθηκε σωστή δημιουργία συμπληρωματικού DNA, για αυτό το λόγο δεν αναφέρονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα.

5.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΣΠΛΗΝΑ

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα που αφορούσαν την απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων από σπλήνα, όμως δεν ελήφθησαν αποτελέσματα καθώς παρατηρήθηκαν επαναλαμβανόμενες μολύνσεις και δεν συνεχίστηκαν σε περαιτέρω μελέτη.

6.0. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας είχε ως σκοπό την μελέτη του φλεγμονώδους πόνου σε συνθήκες έλλειψης της πρωτεΐνης HSP70 χρησιμοποιώντας ποντίκια δύο διαφορετικών γονότυπων: του φυσιολογικού (WT ή *Hsp70^{+/+}*) και αυτού με γενετική απαλοιφή του γονιδίου έκφρασης της HSP70 (*Hsp70^{-/-}*). Με τη χρήση του ανοσοενισχυτικού διαλύματος αντιγόνου Freund (CFA), του δοκιμαστικού μέσου για την μέτρηση πόνου (Plantar Test) και του πλυθησομέτρου (Plethysmometer) ελήφθησαν οι απαραίτητες μετρήσεις πόνου και οιδήματος που δημιουργούνται εξαιτίας της παραγόμενης φλεγμονής. Μετά το πέρας 24 ωρών φλεγμονής, τα ζώα θυσιάστηκαν ελήφθησαν οι ιστοί: σπλήνας και μέρος οιδήματος του φλεγμαίνοντος πέλματος καθώς επίσης και ποσότητα αίματος από την οπίσθιο οφθαλμική οδό από το οποίο (έπειτα από φυγοκέντρηση) απομονώθηκε ο ορός.

Το πρώτο βήμα εκκίνησης των πειραμάτων είναι η λήψη μετρήσεων βασικού πόνου (χωρίς την χορήγηση του CFA). Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα, τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* είναι πιο ευαίσθητα ως προς την επίδραση της ακτινοβολίας IR, καθώς αντιδρούν πιο γρήγορα, σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια (WT). Φαίνεται ότι υπάρχει αυξημένη ευαισθησία των ποντικών *Hsp70^{-/-}* σε εξωτερικά ερεθίσματα, με αποτέλεσμα να αντιδρούν άμεσα και να διακρίνονται για τον ελλιπή μηχανισμό αντιμετώπισης τέτοιων περιπτώσεων. Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και στο επόμενο στάδιο, όπου υπό τη χορήγηση του CFA, οι μετρήσεις πόνου των *Hsp70^{-/-}*, είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με αυτών από τα WT ζώα, που υποδεικνύουν ότι τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* έχουν μειωμένο ουδό πόνου, μετά την ανάπτυξη φλεγμονής γεγονός που τα καθιστά επιρρεπή, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ποντίκια (WT) που ανέδειξαν αντοχή έναντι του πόνου. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη φύση της πρωτεΐνης HSP70, η οποία είναι αντιφλεγμονώδης και προστατεύει τον οργανισμό από εξωτερικά ερεθίσματα. Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και από άλλους ερευνητές, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μοντέλα (HJK, 2010) και επιβεβαιώνουν το παραπάνω αποτέλεσμα καταδεικνύοντας έτσι τον προστατευτικό ρόλο που κατέχει η πρωτεΐνη HSP70.

Παράλληλα, με τις μετρήσεις πόνου πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις οιδήματος του φλεγμαίνοντος πέλματος κάθε ζώου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το οίδημα στα φυσιολογικά ποντίκια είναι εντονότερο και πιο ογκώδες, σε σχέση με αυτό των *Hsp70^{-/-}*. Η διαφορά αυτή που παρατηρήθηκε είναι παράδοξη καθώς τα ποντίκια *Hsp70^{-/-}* δεν διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας και το οίδημα που δημιουργείται θα έπρεπε να είναι μεγαλύτερο. Σημειώνεται ότι σε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, η οποία αφορά την μέτρηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης σε φυσιολογικά ποντίκια και σε ποντίκια *Hsp70^{-/-}* (αρσενικού και θηλυκού γένους), μετά την επίδραση φλεγμονής προέκυψε ότι τα επίπεδα της κορτικοστερόνης για τα ποντίκια φυσιολογικού γονότυπου είναι υψηλότερα, σε αντίθεση με εκείνα των ποντικών *Hsp70^{-/-}*. Αυτό το γεγονός αποτελεί μια πιθανή εξήγηση που αφορά τον μειωμένο χρόνο αντίδρασης των ποντικών *Hsp70^{-/-}* υπό την έκθεσή τους στην ακτινοβολία IR καθώς η κορτικοστερόνη αποτελεί το κυριότερο ενδογενές αντιφλεγμονώδες μέσο. Το αποτέλεσμα των μειωμένων επιπέδων κορτικοστερόνης δεν εξηγεί παρόλα αυτά το μικρότερο οίδημα στα ποντίκια *Hsp70^{-/-}*. Επιπλέον, σε ιστολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από άλλες ερευνητικές ομάδες και αφορούν διάφορα είδη ισχαιμίας (Wang, 2011) δείχθηκε ότι τα ζώα αυτά παρουσίαζαν εντονότερο οίδημα. Πιθανότατα άλλα μόρια να ευθύνονται για το μικρότερο οίδημα στο δικό μας μοντέλο τα οποία είναι υπό διερεύνηση.

Μετά το πέρας των 24 ωρών υπό τη χορήγηση του CFA, ελήφθησαν και επεξεργάστηκαν κατάλληλα οι ιστοί που προαναφέρθηκαν (σπλήνας και μέρος οιδήματος του φλεγμαίνοντος πέλματος) και απομονώθηκε ο ορός του αίματος. Προσδιορίστηκαν οι κυτοκίνες: IL-6 & TNF- α , οι οποίες αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της παραγόμενης φλεγμονής. Καμία στατιστικώς

σημαντική διαφορά δεν ανεύρεθη μεταξύ των δύο γονοτύπων στις κυτοκίνες που μελετήθηκαν είτε στον ορό είτε στους ιστούς. Σε μελέτες άλλων ερευνητών έχει δειχθεί ότι τα *Hsp70*^{-/-} ποντίκια έχουν μεγαλύτερη έκφραση και παραγωγή κυτοκινών σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου γεγονός που είχε αποδοθεί σε χαμηλότερα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και είχε διατυπωθεί η υπόθεση ότι η HSP70 κατέχει αντιφλεγμονώδες ρόλο. Η έλλειψη στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δικά μας πειράματα πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι άλλες κυτοκίνες εμπλέκονται στο συγκεκριμένο μοντέλο όπως η IL-1β. Επιπλέον παραπάνω πειράματα και σε άλλα χρονικά διαστήματα είναι αναγκαία για να αποκλείσουμε το γεγονός ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε νωρίτερη ή αργότερη χρονική στιγμή.

Τέλος οφείλουμε να επισημάνουμε ότι τα μη αναμενόμενα αποτελέσματα θα μπορούσαν να οφείλονται σε ενδεχόμενα λάθη που ίσως πραγματοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της μελέτης. Συγκεκριμένα, υπάρχει πιθανότητα η χορήγηση του CFA να μην ήταν επαρκής ή όπως αναφέρθηκε νωρίτερα η επιλογή των χρονικών διαστημάτων θανάτωσης των να μην ήταν η κατάλληλη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν για πρώτη φορά ότι οι πρωτεΐνες της ομάδας HSP70 πιθανότατα εμπλέκονται στη ρύθμιση του μηχανισμού του φλεγμονώδους πόνου. Παρόλα αυτά, για την ακριβέστερη και σαφέστερη διεξαγωγή συμπερασμάτων προτείνεται η περαιτέρω μελέτη του φλεγμονώδους πόνου μεταξύ του φυσιολογικού γονότυπου (WT) και του γονότυπου με γενετική απαλοιφή του γονιδίου έκφρασης της HSP70 (*Hsp70*^{-/-}), χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο αριθμό ποντικών ανά γονότυπο, με σκοπό τον περιορισμό της διακύμανσης ιδιαίτερα στα επίπεδα των κυτοκινών. Επιπλέον, θα ήταν σκόπιμο να διεξαχθούν ομάδες πειραμάτων, οι οποίες μπορούν να τερματίζονται (και να επεξεργάζονται περαιτέρω) στις 6 ώρες, στις 24 ώρες καθώς και στις 36 ώρες υπό την χορήγηση του CFA. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να καταγραφούν μετρήσεις και δεδομένα ευρύτερου φάσματος, να παρατηρούνται περισσότερα γεγονότα και να αποδίδονται καταλυτικότερες εξηγήσεις.

7.0. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε καταγράφεται παρακάτω και έχει ενσωματωθεί με τη χρήση του προγράμματος EndNoteX9.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ayesha Murshid, J. G. a. S. K. C. (2012). *The role of heat shock proteins in antigen cross presentation*. Boston, MA, USA.
- Bukau, M. P. M. a. B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *62*, 670-684. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
- Chebotareva, N., Bobkova, I., & Shilov, E. (2017). Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress Chaperones*, *22*(3), 319-343. doi:10.1007/s12192-017-0790-0
- Craig, S. L. E. A. (1988). THE HEAT-SHOCK PROTEINS. *22*(6), 31-77.
- Jens Luders, J. D., and Jorg Hohfeld. (2000). The Ubiquitin-related BAG-1 Provides a Link between the Molecular Chaperones Hsc70/Hsp70 and the Proteasome. *275*(7), 4613-4617. doi:10.1074/jbc.275.7.4613
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, *92*(5), 2177-2186. doi:doi:10.1152/jappphysiol.01267.2001
- Masison, D. S. a. D. C. (2009). Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions. *16*(6), 571-581.
- MJ, S. ((July 1990).). "Heat shock proteins"*The Journal of Biological Chemistry*., *265* (21): 12111–4. .
- Santoro, M. G. (1999). Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. *Biochemical Pharmacology*, *59*, 55-63.
- Schlesinger, M. J. (1990). Heat Shock Protein. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *265* (21), 12111-12114.
- Lowe, D. G., & Moran, L. A. (1986). Molecular Cloning and Analysis of DNA Complementary to Three Mouse M, = 68,000 Heat Shock Protein mRNAs*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *261* (5)(February 15), 2102-2112.
- M. José Mansilla, C. C., Herena Eixarch, Vanja Tepavcevic, Mireia Castillo, Roland Martin, Catherine Lubetzki, Marie-Stéphane Aigrot, Xavier Montalban, Carmen Espejo. (August 25, 2014). Hsp70 Regulates Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105737
- Sarah M. Senf , T. M. H., Bumsoo Ahn, Leonardo F. Ferreira, Andrew R. Judge. (April 23, 2013). Loss of the Inducible Hsp70 Delays the Inflammatory Response to Skeletal Muscle Injury and Severely Impairs Muscle Regeneration. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062687
- Seung-Hoon Lee, M. H.-M. K., MD; Young-Ju Kim, BS; Kyung-Mi Lee, MS; Manho Kim, MD, PhD; Byung-Woo Yoon, MD, PhD. Effects of Hsp70.1 Gene Knockout on the Mitochondrial Apoptotic Pathway After Focal Cerebral Ischemia. 2195-2199. doi:DOI: 10.1161/01.STR.0000136150.73891.14
- Shien Hu, X. Z., Joseph R. Triggs, Yun Tao, Yunwei Wang, Lev Lichtenstein, Marc Bissonnette, Mark W. Musch, and Eugene B. Chang. (March 19, 2009). Inflammation-induced, 3'UTR-dependent translational inhibition of Hsp70 mRNA impairs intestinal homeostasis. *296*(5), 1003–1011. doi:doi: 10.1152/ajpgi.00027.2009

- Wim Van Molle, B. W., Tina Mahieu,, Masuhiro Takada, T. T., & Kenji Sekikawa, a. C. L. *HSP70 Protects against TNF-Induced Lethal Inflammatory Shock*. Retrieved from Department of Molecular Biology:
- Wischmeyer, K. D. S. a. P. E. (December 16, 2005). *Effects of HSP70.1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis.*, Department of Anesthesiology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado,
- Basile, U. *Plantar Test (Hargreaves Apparatus)*. In P. a. INFLAMMATION (Ed.). Retrieved from www.ugobasile.com
- Basile, U. *Plethysmometer*. In. Retrieved from <https://www.stoeltingco.com/paw-volume.html>
www.ugobasile.com
- Celeromics. Cell Counting with Neubauer Chamber. Retrieved from <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-counting.php>
- Cell Counting with Neubauer Chamber. Retrieved from <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-counting.php>
- Chiu N.H.L., C. T. K. ((2012)). *Advances in Immunoassay Technology. InTech*.
- JohnM. Clark, R. L. S. *Πειραματική Βιοχημεία*.
- Katoch, R. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Springer*.
- Kemeny D.M., C. S. ((1988)). *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects. John Wiley & Sons*.
- Wang, Z., Gall, J. M., Bonegio, R. G., Havasi, A., Hunt, C. R., Sherman, M. Y., ... Borkan, S. C. (2011). Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney International*, 79(8), 861-870. doi:10.1038/ki.2010.527
- Hyun Jeong Kim, Ji-In Jung, Youngkyung Kim, Jae-Seon Lee, Young Wook Yoon, and Junesun Kim. (June 2010). *Loss of hsp70.1 Decreases Functional Motor Recovery after Spinal Cord Injury in Mice*. (14), 157-161. doi:10.4196/kjpp.2010.14.3.157
- Woolf, C. J. (2010). "What is this thing called pain?" *J Clin Invest* **120(11)**: 3742–3744.
- Chen, L., Yang, G., & Grosser, T. ((2013)). "Prostanoids and inflammatory pain. Prostaglandins & Other Lipid Mediators." 104-105, 158-166.
-] Guan, Z., Hellman, J., & Schumacher, M. ((2016)). "Contemporary views on inflammatory pain mechanisms: TRPing over innate and microglial pathways." *F1000Research* **5**: 24-25.
- A. GUYTON, M. D. ((1990)). *Φυσιολογία του Ανθρώπου*. . ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΛΙΤΣΑΣ, Τρίτη έκδοση. p. 430-433.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., & McKay, D. B. ((1990)). "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. ." *Nature* **346(6285)** 623-628
- ((2017)). "Molecular Chaperones in Control of the Heat Shock Response." from <https://www.caymanchem.com/news/molecular-chaperones-in-control-of-the-heat-shock-response>.
- Tissières, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. ((1974)). "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs." *Journal of Molecular Biology* **84(3)** 389-398