



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Μέταλλα και μεταλλικές ενώσεις στον νευρικό ιστό.

**Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη λειτουργία των προστατευτικών
συστημάτων στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων ριζών**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Μέταλλα και μεταλλικές ενώσεις στον νευρικό ιστό.

**Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη λειτουργία των προστατευτικών
συστημάτων στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων ριζών**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Δεληγιάννη Ιωάννη -Κωνσταντίνου: 22-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623^α/18-12-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κονιτσιώτης Σπυρίδων Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 5-2-2008

«Μέταλλα και μεταλλικές ενώσεις στο νευρικό ιστό. Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη λειτουργία των προστατευτικών συστημάτων στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων ριζών»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 735^α/8-5-2012

| | |
|----------------------|--|
| Ευαγγέλου Άγγελος | Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Στεφάνου Δημήτριος | Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Αγγελίδης Χαράλαμπος | Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Καλφακάκου Βασιλική | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Κονιτσιώτης Σπυρίδων | Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Μπατιστάτου Άννα | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Αντωνίου Αικατερίνη | Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-12-2012

Ιωάννινα 25-5-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Στην οικογένεια μου: Ελένη, Μανώλη, Κατερίνα, Χρύσα και Ελένη.

«the man who raises a problem is not entirely the same one who solves it»

(S. Ramon y Cajal, *Los tónicos de la voluntad*, 1897).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ευεργετική δράση του Zn σε δερματικά σκευάσματα αναφέρεται σε Αιγυπτιακούς πάπυρους του 2000 π.Χ και χρησιμοποιείται θεραπευτικά έκτοτε έως και σήμερα. Είναι αξιοπερίεργο το γεγονός πως ο Zn εντάχθηκε στο ‘πάνθεον’ των σηματοδοτικών ιόντων της ιατρικής και βιολογίας τόσο καθυστερημένα. Ο αριθμός των βιολογικών δράσεων, των φαρμακολογικών στόχων και των επιπτώσεων στην υγεία του Zn μπορούν να τον χαρακτηρίσουν ως το ‘ασβέστιο του 21ου αιώνα’. Για τους διαιτολόγους αποτελεί ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, για τους βιοχημικούς βασικό δομικό λίθο των ενζύμων, για τους περιβαλλοντολόγους τοξικό ρύπο, ενώ για τους νευροεπιστήμονες ο Zn εκτός των άλλων είναι ένα πολυδύναμο ιοντικό σήμα.

Αρχικά η μελέτη μας επί αυτού του τόσο ενδιαφέροντος μετάλλου έγινε σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος (PC12) παρουσία του νευροτροφικού παράγοντα NGF που τα διαφοροποιεί προς νευρικά. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η προσθήκη διαφόρων αλάτων Zn ασκούσε προστατευτική δράση έναντι των τοπικών αναισθητικών (ροπιβακαΐμη, λεβοβουπιβακαΐνη) σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η παρούσα διατριβή στράφηκε στην έρευνα των προστατευτικών δράσεων του Zn σε κυτταρικό μοντέλο πρωτογενών νευρώνων οπισθίων ριζών (DRG). άμεσα συνδεδεμένο με την μετάδοση του πόνου και συγχρόνως ιδανικό για μελέτη της δράσης νευροπεπτιδίων, μεταλλοπρωτεϊνών και μηχανισμών νευροτοξικότητας.

Στις απαιτήσεις της καλλιέργειας DRG νευρώνων που λαμβάνονται από ποντίκια και σε μεθόδους κυτταρικής φθορισμομετρίας εκπαιδεύτηκα κατά την μετακίνηση μου, μέσω Erasmus, επί 5μηνο στο Πανεπιστήμιο Burjassot της Βαλένθια, κάτω από τις οδηγίες της καθηγήτριας I. Farinas. Οι νέοι κανονισμοί της Ε.Ε μας ώθησαν επίσης στην απόκτηση διπλώματος του διεθνή οργανισμού διαχείρισης και προστασίας πειραματικών ζώων - FELASA, από το ινστιτούτο Fleming της Αθήνας. Η σύγχρονη εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής του επίσης υποψήφιου διδάκτορα κ. Π. Λέκκα στη μονάδα περιβαλλοντικής φυσιολογίας πρόσφερε την δυνατότητα να εξετάσουμε εκτός από την *in vitro* επίδραση του Zn στα DRG και την σε *in vivo* μοντέλο διαγονιδιακών πειραματοζώων που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 που διατέθηκαν από τον αναπληρωτή καθηγητή. Βιολογίας κ. Χ. Αγγελίδη.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν *in vitro* οι επιδράσεις του Zn στην επιβίωση και απόπτωση των DRG, στην έκφραση πρωτεϊνών διακίνησης και ομοιόστασης του μετάλλου, και η αλληλεπίδραση με την ομοσυνοδό προστατευτική πρωτεΐνη HSP70. *In vivo* μελετήθηκαν οι επιδράσεις του Zn στην έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών, στις μεταβολές αντιοξειδωτικών παραγόντων και στην αντίληψη του πόνου σε διαγονιδιακά HSP70-υπερεκφράζοντα ποντίκια που εκτέθηκαν σε stress δίαιτας υψηλών λιπαρών (HFD) με στόχο να διευκρινιστεί ο ρόλος του Zn στην λειτουργία των DRG νευρώνων και την αντίληψη του πόνου

Μελέτες βασικής έρευνας όπως η παρούσα ελπίζουμε ότι στο άμεσο μέλλον θα συνεισφέρουν στην έρευνα των νευροεκφυλιστικών και νευροπαθητικών ασθενειών στις οποίες η δυσομοιόσταση του Zn διαδραματίζει κεντρικό ρόλο.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στη μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της υπεύθυνης της μονάδας, αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Β. Καλφακάκου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί χωρίς την υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχαν αρκετοί άνθρωποι.

Αρχικά επιθυμώ να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Βασιλική Καλφακάκου για την ευκαιρία που μου έδωσε να μελετήσω ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, τη συνεχή υποστήριξη, τη γενικότερη συμπαράσταση, καθοδήγηση, επίβλεψη και υπομονή κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Οι πολύτιμες συμβουλές της με ενέπνευσαν όχι μόνο όσον αφορά στην εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής μου αλλά και στη ζωή μου γενικότερα. Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Αν. καθηγητή νευρολογίας κ. Σ. Κονιτσιώτη και τον καθ. παθολογοανατομίας κ. Δ. Στεφάνου για την πνευματική και επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχαν στη διάρκεια της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου που μου επέτρεψε να ολοκληρώσω το έργο μου στο εργαστήριο φυσιολογίας, καθώς και την επίκουρη καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Π. Βεζυράκη για την πολύτιμη βοήθειά της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον αναπληρωτή καθηγητή Βιολογίας κ. Χ. Αγγελίδη τόσο για την χορήγηση του διαγονιδιακού πειραματικού μοντέλου πειραματοζώων, όσο και για την καθοδήγησή του στην λήψη και επεξεργασία του φωτογραφικού υλικού. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές

ευχαριστίες μου στην επίκουρη καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Α. Αντωνίου για τις πολύτιμες συμβουλές της, εποικοδομητικά σχόλια της και την βοήθεια της στην συμπεριφορική μελέτη των πειραματοζώων, που δεν περιελήφθη στην διατριβή, διότι αποτελεί στην ουσία μια ξεχωριστή ολοκληρωμένη μελέτη.

Ακόμη ευχαριστίες οφείλω στην καθηγήτρια I. Farinas και την συνεργάτιδά της L. Munoz του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Παρασιτολογίας του Πανεπιστημίου της Βαλένθια (Burjassot) για την καθοδήγησή τους στις τεχνικές καλλιέργειας και σήμανσης των νευρικών κυττάρων. Ευχαριστίες επιθυμώ να απευθύνω και σε ένα πλήθος ανθρώπων που με βοήθησαν άμεσα ή έμμεσα στην εκπόνηση αυτής της εργασίας: Την αναπληρώτρια καθηγήτρια Παθολογοανατομίας κ. Α. Μπατιστάτου στο εργαστήριο της οποίας προετοιμάστηκαν οι τομές παραφίνης. Τους συνεργάτες κ.κ. Π. Λέκκα, Ε. Κονταργύρη και Σ. Ζερικιώτη για την συνεχή βοήθεια και στήριξη σε επαγγελματικό αλλά και προσωπικό επίπεδο. Τους κ.κ. Ν. Γκάλκο και Π. Γρίβα που κοπιάζουν για την ορθή λειτουργία του χώρου του εργαστηρίου. Τον καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Ι. Λεονάρδο και τον κ. Ρ. Λιασκό για την πολύτιμη βοήθειά τους. Τους υπεύθυνους του εργαστηρίου πειραματοζώων, Θ. Βέρο και Α. Μπίλη. Οφείλω επιπλέον να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Φυσιολογίας κ. Δ. Φίλιου και τον συνεργάτη του εργαστηρίου Δρ. κ. Ε. Παλαιολόγο που στήριξαν δραστικά την εργασία μου με τις μετρήσεις των μετάλλων σε ιστικά δείγματα, στο Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης της Φυσιολογίας.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στους γονείς μου και τις αδερφές μου για τη συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια της διατριβής μου. Εξίσου σημαντική ήταν η συντροφιά των φίλων που βοήθησαν σε πολλές δύσκολες στιγμές με τη στήριξή τους και την αισιοδοξία τους.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η καθημερινή επαφή μαζί τους με έκανε καλύτερο άνθρωπο, σωστότερο επιστήμονα και πιο ανήσυχο ερευνητή.

Τους ευχαριστώ όλους!

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

| Abbreviations | Full Name |
|---------------|---|
| AD | Alzheimer Disease |
| AE | Acrodermatitis Enteropathica |
| AIF | Apoptosis Inducing Factor |
| Akt | Serine/threonine protein kinase |
| ALP | Alkaline Phosphatase |
| ALS | Amyotrophic lateral sclerosis |
| Apaf-1 | Apoptotic protease activating factor |
| ARE | Antioxidant Response Element |
| ASK-1 | Apoptosis signal-regulating kinase 1 (MAP3K5) |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| Bax | Bcl-2-associated X protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BDNF | Brain Derived Neurotrophic Factor |
| Bid | BH3 interacting-domain death agonist |
| Brn3a | Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A |
| CCD | Chronic Compression |
| CDF | Cation Diffusion Facilitator |
| CGN | Cerebellar Granule Neurons |
| CGRP | Calcitonin Gene Related Peptide |
| CTD | Metallochaperone-like Carboxy-Terminal Domain |
| Cys | Cysteines |
| Cyt-c | Cytochrome c |
| DISC | Death Inducing Complex |
| DRG | Dorsal Root Ganglion |
| EGR1 | Early Growth Response Protein 1 |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| Fas | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 |
| FRAP | Fluoride-Resistant Acid Phosphatase Positive |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid |

| | |
|--------------|--|
| GAP43 | Growth Associated Protein 43 |
| GDNF | Glial cell Derived Neurotrophic Factor |
| GIF | Growth Inhibitory Factor |
| Gln | Glutamine |
| GPCRs | G protein coupled receptors |
| GRE | Glucocorticoid responsive Element |
| GSH | Glutathione (tripeptide) |
| GSSG | Glutathione disulfide |
| Hip | Hsp- interacting protein |
| His | Histidine |
| Hop | Hsp-organizing protein |
| HSE | Heat Shock Element |
| HSF1 | Heat Shock transcription Factor 1 |
| Hsp | Heat Shock Proteins |
| HSR | Heat Shock Response |
| IAPs | Inhibitor of Apoptosis Proteins |
| IB4 | Isolectin 4 |
| IGT | Impaired glucose tolerance |
| IKK β | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta |
| IL-2 | Interleukine |
| JNK | c-Jun-N-terminal kinase |
| Klf7 | Kruppel-like factor 7 |
| LDLReceptors | Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor |
| LTCC | L-type calcium channel |
| MAPK | Mitogen-activated protein (MAP) kinases |
| MRE | Metal Responsive Element |
| MTF1 | Metal Response Element- Binding Transcription factor 1 |
| MTs | Metallothioneins |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NAV1 | Neuron navigator 1 |
| nF-kB | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NGF | Nerve Growth Factor |

| | |
|--------|--|
| NMDA | N-Methyl-D-aspartic acid |
| NT-3 | Neurotrophin-3 |
| oxLDL | Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) |
| P2X3 | P2X purinoreceptor |
| PARP | Poly ADP-ribose polymerase |
| PD | Parkinson Disease |
| PDN | Diabetic Peripheral Neuropathy |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PKA | Protein kinase A |
| PKC | Protein kinase C |
| PMP22 | Peripheral myelin protein 22 |
| PolyQ | Polyglutamine |
| RNS | Reactive nitrogen species |
| ROS | Radical Oxygen Species |
| SCN9A | Gene expressing the Nav1.7 sodium ion channel |
| SLC | Solute Carrier group of membrane transport proteins |
| Smac | Second mitochondria-derived activator of caspases |
| SNAP | Sensory nerve action potentials |
| SOD | Superoxide Dismutases |
| SP | Substance P |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| Thr | Threonine |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TPEN | N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine |
| TrKA | Neurotrophic tyrosine kinase receptor type A |
| TRPV | Transient receptor potential caution channel subfamily V |
| VDCC | Voltage-dependent calcium channels |
| VPL | Ventral Poterolateral Nucleus |
| Zeb2 | Zinc finger E-box-binding homeobox 2 |
| Zif268 | Early growth response protein 1 (EGR-1) |
| ZIP | Zn ⁺² - Regulated Metal Transporter |
| ZnT | Zn ²⁺ Transporter |

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|---|----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 1 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 13 |
| Α. ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΤΟΥ | 13 |
| 1. Ψευδάργυρος - Zn | 13 |
| 2. Μεταφορείς Ψευδαργύρου | 19 |
| Β. ΜΕΤΑΛΛΟΘΕΙΟΝΙΝΕΣ | 26 |
| 1. Γενικά Χαρακτηριστικά | 26 |
| 2. Δράση των MTs στο νευρικό σύστημα | 35 |
| Γ. HEAT SHOCK PROTEINS | 38 |
| 1. Γενικά | 38 |
| 2. Hsp70 | 40 |
| Δ. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟ STRESS | 47 |
| 1. Δίαιτα υψηλών λιπαρών και Zn | 48 |
| 2. Δίαιτα υψηλών λιπαρών και Hsp70 | 49 |
| Ε. ΓΑΓΓΛΙΑ ΤΩΝ ΟΠΙΣΘΙΩΝ ΡΙΖΩΝ-DRG | 51 |
| 1. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά | 51 |
| 2. Αισθητικές Οδοί του Πόνου | 54 |
| 3. Δράσεις του Zn στα DRG | 62 |
| 4. Πόνος και Hsp70 | 66 |
| 5. Διατροφικό stress και DRG νευρώνες | 67 |
| ΣΚΟΠΟΣ | 69 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 71 |
| In vitro Πειράματα | 71 |
| Α. Κυτταροκαλλιέργειες Εμβρυϊκών DRG | 71 |
| Β. Ανοσοφθορισμός | 76 |
| Γ. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής επιβίωσης MTT | 80 |
| Δ. Μεθοδολογία υπολογισμού κυτταρικής απόπτωσης με χρήση κυτταρομέτρου ροής | 81 |

| | |
|---|-----|
| In vivo Πειράματα | 85 |
| A. Ομάδες και χειρισμοί πειραματοζώων- | 85 |
| B. Τεστ Πόνου | 87 |
| Γ. Τομές των DRG από τα ενήλικα ζώα σε κρυοστάτη και σήμανσή τους | 88 |
| Δ. Τομές Παραφίνης και Ιστοχημεία των DRG ενήλικων πειραματοζώων | 91 |
| E. Ατομική Απορρόφηση | 95 |
| ΣΤ. Αναλύσεις Οξειδωτικού Προφίλ Αίματος | 96 |
| Κατάλογος Υλικών | 98 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 99 |
| A. Αποτελέσματα in vitro | 99 |
| 1. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής επιβίωσης MTT | 99 |
| 2. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής απόπτωσης με χρήση κυτταρομέτρου | 100 |
| 3. Ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών MT3, ZnT7 και cGRP μετά από επώαση εμβρυϊκών κυττάρων FRG σε συγκεντρώσεις Zn 15 και 30 μ M | 103 |
| 4. Απεικόνιση σημασμένων κυττάρων με μικροσκοπία συνεστιασμού (confocal) | 109 |
| B. Αποτελέσματα του in vivo πειραματικού μέρους | 110 |
| 1. Ζυγίσεις Πειραματοζώων ανά εβδομάδα | 110 |
| 2. Μετρήσεις Συγκέντρωσης Zn και Cu στους ιστούς με τη μέθοδο Ατομικής Απορρόφησης | 112 |
| 3. SOD Activity | 115 |
| 4. Ολική αντιοξειδωτική Ικανότητα – TAC | 116 |
| 5. Αποτελέσματα Ανοσοφθορισμομετρικών Τεχνικών στους Ιστούς Γαγγλίων Οπισθίων Ριζών | 117 |
| 6. Μορφομετρικές μετρήσεις από τις εικόνες ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης | 125 |
| 7. Τεστ Πόνου | 126 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 129 |
| Συζήτηση In Vitro Αποτελεσμάτων. | 129 |
| Συζήτηση In Vivo αποτελεσμάτων. | 139 |
| Συμπεράσματα | 147 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 151 |
| ABSTRACT | 155 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 159 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΤΟΥ

1. Ψευδάργυρος - Zn

Είναι γνωστό ότι τα βαρέα μέταλλα ασκούν τοξικές δράσεις στα διάφορα βιολογικά συστήματα (Nordberg, 1984, Revis, 1978). Επιπρόσθετα, εξαιτίας του μεγάλου χρόνου ημιζωής τους, τα βαρέα μέταλλα επάγουν φαινόμενα συσσώρευσης, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν εκθετική αύξηση της συγκέντρωσής τους στο αίμα και τους ιστούς. Εκτός από τις καρκινογόνες επιδράσεις των ενώσεων αυτών ή την συμμετοχή τους σε χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις, πολλά από αυτά έχουν δράσεις ισχυρών νευροτοξινών. Μέταλλα όπως το Cd, ο Cu, το Cr, ο Zn και άλλα είναι συχνά στόχοι έρευνας για την αξιολόγηση των επιτρεπτών, επωφελών και τοξικών τους συγκεντρώσεων σε διάφορα βιολογικά συστήματα και κυτταρικές σειρές. Σήμερα η έλλειψη ή η περίσσεια μεταλλικών στοιχείων αναγνωρίζεται σε πολλές ασθένειες γι' αυτό και ο ακριβής τους προσδιορισμός στο ανθρώπινο σώμα, την διατροφή και το περιβάλλον είναι απαραίτητος.

Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι ένα μέταλλο με σπουδαίο διατροφικό ρόλο και απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλες τις μορφές ζωής. Η διατροφική έλλειψη του αναγνωρίστηκε ως εξαιρετικής σημαντικότητας παράγον για την δημόσια υγεία [Prasad AS, 1998]. Ο ρόλος του Zn συνδέεται με την ανάπτυξη, την εξέλιξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανοσολογική απόκριση, την νευρική και την αναπαραγωγική λειτουργία και καθημερινά αναγνωρίζεται η συμμετοχή του στην γενετική και βιοχημική ταυτότητα πολλών κυτταρικών συστημάτων.

1.1 Χημικές Ιδιότητες Zn

Ο ψευδάργυρος είναι μέταλλο μετάπτωσης της ομάδας IIB των στοιχείων του περιοδικού πίνακα, το 27ο μέταλλο στη σειρά, όσον αφορά την αφθονία, στο φλοιό της γης και το πιο άφθονο ιχνοστοιχείο στο ανθρώπινο σώμα, απαραίτητο για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Πραγματοποιεί σταθερούς δεσμούς με τα μόρια και ταυτόχρονα η στερεοχημική ευελιξία του τον κάνει ευπροσάρμοστο στις ανάγκες των πρωτεϊνών και των ένζυμων (Vallee B.L. and D.S. Auld. 1989, Vallee B.L. and D.S. Auld. Biochemistry 1990, and Vallee B.L. and D.S. Auld Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν υφίσταται αναγωγή ή οξείδωση και αυτό τον καθιστά

ιδιαίτερα σταθερό σε βιολογικά περιβάλλοντα. Ο Zn δεν συναντάται ελεύθερος στους οργανισμούς. Η στερεοχημική του προσαρμοστικότητα οδηγεί σε πολλαπλά γεωμετρικά σχήματα, τα οποία αριθμούν από το 2 έως το 8 δηλ. τετράπλευρα, τριγωνικά, οκτάεδρα, πυραμίδες (Cotton F.A. and G. Wilkinson 1988) από αυτά τα 4, 5 και 6, είναι αυτά που πιο συχνά παρατηρούνται στις βιολογικές λειτουργίες του ψευδαργύρου.

1.2 Δράση του ψευδαργύρου στα βιολογικά συστήματα και την υγεία.

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη και την υγεία των οργανισμών. Το δισθενές κατιόν του Zn^{2+} διαδραματίζει έντονο καταλυτικό, λειτουργικό και δομικό ρόλο σε ένα πλήθος πρωτεϊνών και γι' αυτό επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα μεταβολικών μονοπατιών. Περισσότερα από 500 ένζυμα και μεταγραφικοί παράγοντες εξαρτώνται από τον Zn για την ολοκλήρωση μεταβολικών αντιδράσεων και είναι γνωστό ότι ψευδαργυροεξαρτώμενα ένζυμα βρίσκουμε σε όλες τις γνωστές κλάσεις των ενζύμων [National Academy Press 2001]. Επίσης το 3-10% των συνολικών πρωτεϊνών των θηλαστικών περιέχει Zn [Valee BL 1993]. Έχει φανεί σε καλλιέργειες κυττάρων, ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις του κατιόντος του Zn η σύνθεση DNA σταματάει και ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται [B.L. Valee 1993]. Σημαντικός είναι επίσης ο δομικός του ρόλος στο ισχυρά αντιοξειδωτικό-προστατευτικό ενζυμικό σύστημα της υπεροξειδισμούτάσης του Cu-Zn (SOD1), καθώς και σε ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Ιδιαίτερα σπουδαία είναι επίσης η δράση του Zn στους πρωτεϊνικούς μεταγραφικούς παράγοντες με δομή «Zinc finger» που ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων και προσδένονται στο DNA.

Το ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 2 gr ψευδαργύρου ο οποίος είναι κατανεμημένος κυρίως στο αίμα, τα νεφρά, το ήπαρ, τα οστά και τον εγκέφαλο.

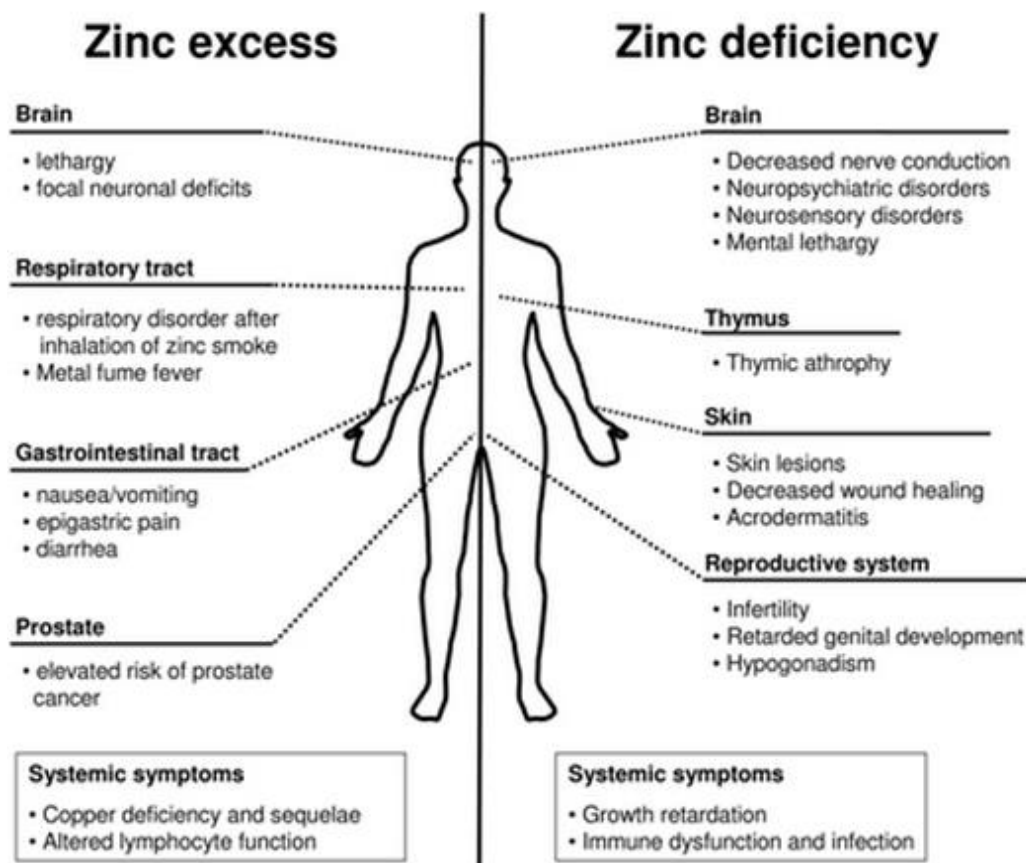
Το 30-40% του ολικού ψευδαργύρου βρίσκεται στους πυρήνες, περίπου 50% στο κυτταρόπλασμα και στα οργανίδια, και το υπόλοιπο στην κυτταρική μεμβράνη [Smeyers-Verbeke J. et al 1977]. Στα κύτταρα ο ψευδάργυρος είναι με τη μορφή ψευδαργυρικών πρωτεϊνών και ενζύμων, μεταλλοθειονινών ή νουκλεοτιδίων RNA και DNA.

Κλινικές κυρίως μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη Zn διακρίνεται σε χρόνια, οξεία και υποξεία έως και θανατηφόρα. Είναι χαρακτηριστικό ότι το 1990, 4 εκατομμύρια Αμερικανοί χαρακτηρίστηκαν με (υποξεία) ελαφριά έλλειψη Zn με κύριο αρχικό σύμπτωμα την δυσλειτουργία της γεύσης και της όσφρησης [Prasad 1988]. Μια σαφώς αναγνωρισμένη (αυτοσωμική υπολειπόμενη) γενετική ασθένεια είναι η εντεροπαθική

ακροδερματίτιδα (acrodermatitis enteropathica, ΑΕ), όπου λόγω μη επαρκούς πρόσληψης και μεταβολισμού του Zn, παρουσιάζεται πρόβλημα στο δέρμα, το εντερικό επιθήλιο, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα [Krieger I. 1982]. Σε σοβαρό έλλειμμα Zn εμφανίζονται νοητικές δυσλειτουργίες, αναστολή της σωματικής ανάπτυξης, διαταραχή της όρασης και υπογοναδισμός στους άνδρες [Hambridge 2000]. Ακόμη και η ελαφριά-οριακή έλλειψη φαίνεται να προκαλεί συμπτώματα ολιγοσπερμίας, μείωσης τεστοστερόνης στο πλάσμα, μεταβολές στο πληθυσμό των T λευκοκυττάρων και τη συγκέντρωση της ιντερλευκίνης (IL-2), μειωμένη κάθαρση αιθανόλης και διαταραχή στις νευροφυσιολογικές λειτουργίες [Milne DB 1991, Hambridge 2000].

Ο Zn θεωρείται γενικά μη τοξικό μέταλλο κι αυτή η κατηγοριοποίηση του αν και δεν είναι απόλυτα ευρέως αποδεκτή οφείλεται στις ιδιότητες που κατέχει καθώς:

- είναι σχετικά άφθονο στο περιβάλλον,
- δεν έχει αναγνωρισθεί καμία γενετική ασθένεια που να παράγει συσσώρευση του στο σώμα όπως για τον χαλκό ή το σίδηρο (Wilson's disease και αιμοχρωμάτωση αντίστοιχα,
- η προτεινόμενη ημερήσια δόση του (RDA) είναι πολύ υψηλότερη από τα υπόλοιπα μέταλλα (8-15 mg),
- είναι δομικό και λειτουργικό στοιχείο για πλήθος πρωτεϊνών και η πρόσληψη του είναι απαραίτητη για την καλή υγεία και τη λειτουργία πολλαπλών βιολογικών λειτουργιών,
- η πρόσληψη πάνω από τα προτεινόμενα δεν είναι τοξική,
- ενώ η πρόσληψη 100 φορές και περισσότερο από τα όρια στην διατροφή ζώων δεν προκαλεί παθολογικές καταστάσεις.



Σχήμα 1: Σύγκριση της υπερφόρτωσης και έλλειψης ψευδαργύρου. Η αυξημένη πρόσληψη (Zn) και η στέρηση του λόγω κακής διατροφής ή διαταραγμένης απορρόφησης του (δεξιά), έχουν επιβλαβή αποτελέσματα σε διαφορετικά όργανα [L.M Plum, 2010].

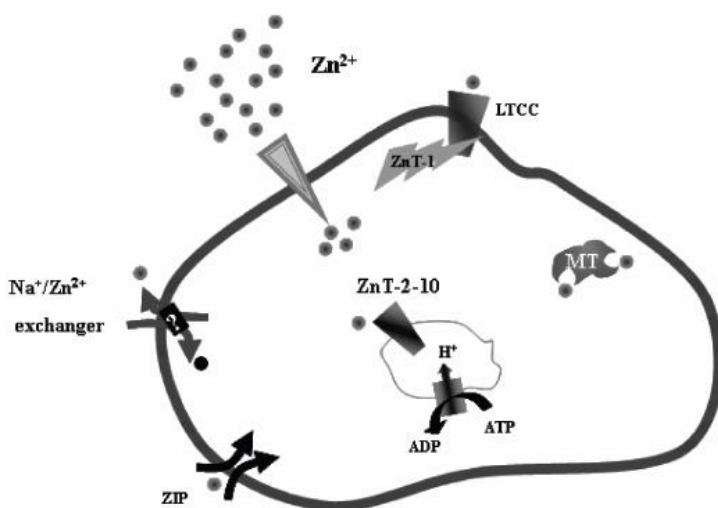
Κλινικά επομένως ο Zn παρουσιάζεται σπανιότατα ως υπαίτιος τοξικότητας. Τρεις είναι οι οδοί εισόδου του Zn στο σώμα, μέσω της αναπνοής, μέσω του δέρματος, είτε μέσω κατάποσης. Άλατα του Zn όπως το χλωριούχο φαίνεται ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις να προκαλούν βλάβη στον επιθηλιακό ιστό, ενώ υπερβολικές συγκεντρώσεις του επηρεάζουν παγκρεατικά ένζυμα, τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, τον μεταβολισμό του χαλκού και σιδήρου και μεταβάλλουν την ανοσοποιητική λειτουργία [Simon SR, Hoffman HF 1988]. (Σχήμα 1). Τακτική λήψη Zn για μεγάλα χρονικά διαστήματα συχνά προκαλεί έλλειψη χαλκού. Αυτό οφείλεται στις ανταγωνιστική σχέση των 2 μετάλλων ως προς την απορρόφηση τους από τα εντεροκύτταρα, με τις μεταλλοθειονίνες (MTs) να διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο [Ogiso T. 1974]. Αντίθετα με τον σίδηρο, η απορρόφηση ψευδαργύρου επηρεάζεται από τη διατροφική περιεκτικότητα κι όχι από την κατάσταση του (Zn status). Όταν η διαιτητική συγκέντρωση Zn αυξάνεται, η συνολική πρόσληψη

αυξάνει αλλά το ποσοστό απορρόφησης μειώνεται. Ο γαστρεντερικός σωλήνας διατηρεί τη ολική ομοιόσταση του Zn ρυθμίζοντας της απώλειες ενδογενούς Zn ανάλογα προς τον απορροφώμενο. Σε ποσότητες μικρότερες των 9 mg/ημέρα, η απορρόφηση γίνεται με κορεσμένη μεταφορά από τους ZIP4 και ZnT1 κυρίως μεταφορείς. Τα αποθέματα Zn δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη διαδικασία, αντίθετα, κύριος παράγοντας φαίνεται ότι είναι η εκάστοτε ποσότητα εισόδου του μετάλλου στον οργανισμό [King JC 2010].

1.3 Ο Ψευδάργυρος στο κύτταρο και οι μηχανισμοί μεταφοράς του

Η μοναδικότητα του Zn, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μεταβατικά (transition) μέταλλα στο σώμα (π.χ. Cu^{2+} , Fe^{3+}), έγκειται στο ότι δεν διαθέτει έντονες οξειδοαναγωγικές ιδιότητες. Έχει προταθεί ότι στην πρόιμη εξέλιξη ο Fe^{3+} είχε το ρόλο του Zn^{2+} σαν συμπάραγοντας στις προγονικές μορφές των δομών Zn-fingers (δάκτυλοι ψευδαργύρου) [Berg JM 1996]. Σήμερα ο Zn είναι απαραίτητος για τη σωστή αναδίπλωση, διαμόρφωση και δράση πολλών πρωτεϊνών.

Παρ' όλα αυτά ο ελεύθερος ή ελαφρά δεσμευμένος ιοντικός Zn είναι ιδιαίτερα τοξικός για τα κύτταρα [Frederickson CJ 2005], καθώς η ενδοκυττάρια αύξηση του έχει



Σχήμα 2: Μηχανισμοί ομοιόστασης του Zn σε κύτταρα θηλαστικών. Ο Zn εμφανίζει βαθμίδωση στην κυτταρική μεμβράνη και στις μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων, αυτό γίνεται εφικτό μέσω του πλήθους των μεταφορέων Zn [Israel Sekler et.al. 2007]

αναγνωριστεί ως σημείο 'κλειδί' στο νευρωνικό θάνατο και το ισχαιμικό επεισόδιο [Lee JM, 2002. Choi DW, 1998] και η απορρύθμιση του σχετίζεται με την δημιουργία β-αμυλοειδών στη νόσο Alzheimer [Cherny RA, 2001].

Καθώς μεγάλες συγκεντρώσεις του ιόντος είναι απαραίτητες για τις κυτταρικές λειτουργίες, η συγκέντρωση του πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά μεταξύ των διαμερισμάτων και των

μεμβρανών του κυττάρου για να αποφευχθεί συσσώρευση. Σύμφωνα με τους Vogt et al. (2000) η σημασία της βαθμίδωσης του Zn στην πλασματική μεμβράνη συναγωνίζεται

αυτή του Ca. Οι συγκεντρώσεις του ιόντος ποικίλουν ιδιαίτερα στο χώρο των συνάψεων με την διαβάθμιση από τα εκκριτικά κυστίδια, τον προσυναπτικό χώρο και την συναπτική σχισμή να κυμαίνεται κατά περιπτώσεις από millimolar, picomolar, έως και micromolar [Bozym 2006].

Η πολυπλοκότητα και σπουδαιότητα της ομοιόστασης του Zn αποτυπώνεται στον μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που είναι αφιερωμένες στην μεταφορά και δέσμευση του. Τουλάχιστον 10 μέλη της οικογένειας των

ZnT (Zn²⁺Transporter) [Liuzzi JP, 2004] μεταφορέων έχουν αναγνωρισθεί και 15 από την οικογένεια των ZIP (Zn²⁺-regulated metal transporter) [Eide DJ, 2004] και 3 διακριτές ισομορφές των μεταλλοθειονινών [Maret W. 2003]. (Σχήμα 2).

1.4 Ενεργή μεταφορά Zn μέσω της κυτταρικής μεμβράνης

Η βαθμίδωση ιόντων δημιουργείται κυρίως με 2 μηχανισμούς, είτε μέσω αντλιών που υδρολύουν ATP, είτε με ένα ενεργό σύστημα μεταφοράς που χρησιμοποιεί βαθμίδωση ιόντων, όπως Na⁺, για να δημιουργήσει βαθμίδωση Zn²⁺. Αντλία Zn²⁺ έχει ήδη χαρακτηριστεί σε βακτηριακά στελέχη, όπου ATPάσες τύπου-p καταλύουν την ενεργή μεταφορά [Banci L, 2002], ενώ παρόμοια αντλία αναγνωρίστηκε και στο φυτό *Arabidopsis* [Eren E 2006]. Στα κυτταρικά συστήματα των θηλαστικών ή των μυκήτων κάτι τέτοιο δεν έχει ταυτοποιηθεί, παρά μόνο μια αντλία Cu η οποία συνδέεται με την μεταφορά ιόντων βαρέων μετάλλων [Petrukhin K. 1994].

Έχει προταθεί ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας για την βαθμίδωση ιόντων Zn²⁺, που αρχικά θεωρείτο ότι δρα μέσω του μηχανισμού ανταλλαγής ιόντων Na⁺/Ca⁺ [Sensi SL. 1997]. Πιο πρόσφατες έρευνες όμως έδειξαν ότι αυτός ο υποτιθέμενος ανταλλαγέας ιόντων Na⁺ / Zn²⁺ υπάρχει και ανήκει στην οικογένεια Na⁺ / Ca⁺ καναλιών. Μάλιστα ανταλλάσσει στοιχειομετρικά 3 Na⁺ / 1Zn²⁺ διατηρώντας ακόμη και 500 φορές διαφορά διαμεμβρανικής βαθμίδωσης [Ohana E. 2004]. Το εάν αυτός ο μηχανισμός είναι ο μόνος και κύριος για την εισροή του Zn²⁺ μέσω της πλασματικής μεμβράνης είναι ακόμη υπό έρευνα.

2. Μεταφορείς Ψευδαργύρου

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι πρωτεΐνες SLC (solute carrier) αποτελούν την δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα μεμβρανικών πρωτεϊνών μετά τους g-πρωτεΐνης συζευγμένους υποδοχείς (GPCRs) [Gloriam et.al. 2007]. Συνολικά 400 ανθρώπινα γονίδια κατανέμονται στις 47 οικογένειες των SLC που λειτουργούν ως ανταλλαγείς, συνδεδεμένοι με μεταφορείς ή σαν παθητικοί μεταφορείς [Fredrikson 2008, Schlessinger et.al. 2010]. Δυο ξεχωριστές οικογένειες, οι SLC30 και οι SLC39, συμβάλλουν στην κυτταρική ομοίωση του Zn, μεταφέροντας τον εκτός και

Πίνακας 1: Οι πρωτεΐνες μεταφοράς ZnT-η έκφρασή τους και ο ρόλος τους. Israel Sekler et.al. 2007]

| | Expression pattern | Cellular distribution | Disease model | Altered expression phenotype |
|-------|--|---|--|---|
| ZnT-1 | Ubiquitous | Plasma membrane | | Overexpression: reduced (Zn ²⁺) _i and enhanced resistance against Zn ²⁺ toxicity. KO: Lethal at embryonic stage. |
| ZnT-2 | small intestine, kidney, placenta, pancreas, testis, seminal vesicles, and mammary gland | Vesicles, lysosomes | | Overexpression: enhanced lysosomal and vesicular Zn ²⁺ accumulation |
| ZnT-3 | brain | Synaptic vesicles (Glutamatergic and GABAergic) | | KO: synaptic Zn ²⁺ deficiency, enhanced susceptibility to seizure, loss of gender specific Alzheimer's disease plaque formation in a mouse model, decreased susceptibility to amyloid angiopathy |
| ZnT-4 | mammary gland, brain, small intestine and mast cells | Intracellular compartments | Lethal milk syndrome in mice, Asthma (mice), Alzheimer's disease | |
| ZnT-5 | Pancreatic β-cells, intestine, heart, brain, liver, kidney | Insulin secretory vesicles, Golgi Spliced isoform: plasma membrane Complexed with ZnT-6 | | KO: poor growth, osteopenia, male specific fatal arrhythmias. Essential for folding and secretion of Zn ²⁺ -binding enzymes. |
| ZnT-6 | liver, brain, and small intestine | Complexed with ZnT-5 | Alzheimer's disease (mice) | |
| ZnT-7 | small intestine, liver, retina, spleen, kidney, and lung | Golgi | | Essential for folding and secretion of Zn ²⁺ -binding enzymes. |
| ZnT-8 | Pancreatic β-cells | Insulin secretory vesicles | Polymorphism marker in diabetes type II | Overexpression: enhances glucose dependent insulin secretion |

εντός του κυτταροπλάσματος αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι τα γονίδια του διευκολυντή διάχυσης κατιόντων (Cation Diffusion Facilitator, CDF) στον άνθρωπο ή αλλιώς τα SLC30 γονίδια, κωδικοποιούν 10 μεταφορείς ψευδαργύρου, ZnT1-10 [Cousins

RJ. 2006]. Ο ρόλος των περισσότερων ZnT (Zinc-Transporters) πρωτεϊνών ως μεταφορέων Zn έχει αναγνωρισθεί έμμεσα με επιβίωση κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με υψηλές συγκεντρώσεις Zn και άμεσα με μετρήσεις εισροής Zn ή συσσώρευσής του σε γονιδιακά μεταλλαγμένες σειρές ευαισθητοποιημένων σε Zn μυκήτων και ωοκυττάρων *Xenopus* [Blasie CA. 2002, Eide DJ. 2004]. Ο μηχανισμός της μεταφοράς των ZnT δεν είναι διασαφηνισμένος ακόμη. Ομόλογοι πρωτεϊνικοί σχηματισμοί δρουν σαν αντιμεταφορείς για το H και το K [Guffanti AA. 2002, Chao Y. 2004]. Αναλύσεις σε βακτηριακά ομόλογα των ZnT (ZitB πρωτεΐνες) υποδεικνύουν ότι καταλύουν την ανταλλαγή H^+/Zn^{2+} [Chao Y. 2004]. Η δομή των ZnT πρωτεϊνών έχει όμοια χαρακτηριστικά, με 6 διαμεμβρανικές μονάδες /έλικες και μια πλούσια σε ιστιδίνη θηλειά, όπου θεωρείται ότι δεσμεύεται ο Zn για να μεταφερθεί. Παρότι παρουσιάζουν παρόμοια αλληλουχία και δομικές ομοιότητες, διανέμονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και ιστούς, υποδηλώνοντας πολλαπλούς ρόλους στην ομοιόσταση του Zn [Yu YY. 2007]. (Πίνακας 1).

Οι μεταφορείς 2 έως 8 εμπλέκονται στην μεταφορά Zn από το κυτόπλασμα προς τα κυτταρικά οργανίδια, ενώ ο ZnT1 προς τους εξωκυτταρικούς χώρους [Paulsen IT. 1997]. Ο ZnT1 είναι παρών σε όλες τις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και υπερεκφράζεται με αύξηση του εξωκυττάρου Zn, μέσω του MTF-1 [Liuzzi P. 2001]. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι επηρεάζει άμεσα την λειτουργία των καναλιών Ca^+ L-τύπου (LTCC) καθώς αποσιώπηση του siRNA του προκαλεί αυξημένη είσοδο ιόντων Ca και Cd στο κύτταρο με αποτέλεσμα εκδήλωση τοξικότητας Cd [Ohana E. 2006]. Παρόλα αυτά αναλύσεις συν-ανοσοφθορισμού των LTCC-ZnT1 δεν αποδεικνύουν άμεσο συσχετισμό.

Οι ZnT2,3 και 4 ομοιάζουν ως προς την τοποθέτησή τους στις μεμβράνες κυτταρικών οργανιδίων και δρουν βοηθώντας την είσοδο του Zn εντός των κυστιδίων. Έλλειψη διαιτητικού Zn σε αρουραίους έδειξε ότι ο ZnT2 που εκφράζεται στο συκώτι και το πάγκρεας και το λεπτό έντερο μειώθηκε δραστικά [Palmiter RD, 1996]. Ο ZnT3, ίσως ο πιο μελετημένος μεταφορέας της οικογένειας εμπλέκεται έντονα με τη νόσο Alzheimer και εντοπίζεται μόνο στη μεμβράνη των συναπτικών κυστιδίων των γλουταμεργικών νευρώνων του εγκεφάλου [Palmiter RD 1996]. Σήμερα έρευνες με διαγονιδιακά ποντίκια μη-εκφράζοντα τον ZnT3 χρησιμοποιούνται για το συσχετισμό του Zn με την συναπτική πλαστικότητα και τη μνήμη, καθώς εμφανίζουν υπερβολικά μειωμένο στον εγκεφαλο ιστοχημικά ενεργό - ελεύθερο Zn [Cole TB. 1999].

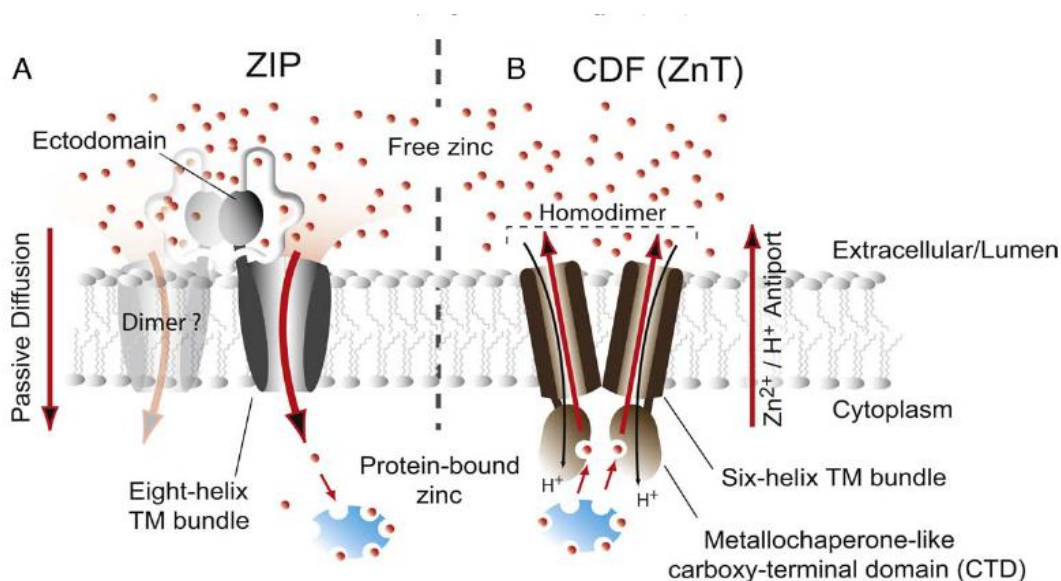
Ο εντοπισμός του ZnT4 είναι κυρίως στο μαστικό αδένα και τον εγκέφαλο, και σε αυτόν οφείλεται η περιεκτικότητα Zn στο μητρικό γάλα. Έλλειψη του σε ποντίκια προκαλεί την περίπτωση ‘θανατηφόρο γάλα’ (lethal milk) που οδηγεί, λόγω έλλειψης Zn, σε θάνατο στα νεογνά που θηλάζουν από ZnT4-/- μητέρες [Huang L. 1997]. Ο 5 μεταφορέας ψευδαργύρου εμφανίζεται κυρίως στο πάγκρεας, στις μεμβράνες των πλούσιων σε Zn εκκριτικών κυστιδίων, στα ινσουλινο-περιέχοντα β-κύτταρα [Kambe N. 2002]. Διαγραφή του ZnT5 γονιδίου οδηγεί σε ανωμαλίες της ανάπτυξης του ερειστικού και καρδιακές δυσλειτουργίες [Innoue K. 2002]. Ο ZnT6, που σε πολλές μελέτες η δράση του συνδέεται με αυτή του 5, [Ishihara P. 2006], βρίσκεται κυρίως σε ηπατικά κύτταρα και μεταφέρει κυτταροπλασματικό Zn προς την trans-Golgi περιοχή-δίκτυο (TGN) και το εσωτερικό κυστιδίων [Huang L. 2002].

Τα περισσότερα μέλη των μεταφορέων Zn έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση και την έκκριση της ινσουλίνης, ο ZnT8 όμως εντοπίζεται μοναδικά στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Μάλιστα γενετική προδιάθεση προς τον τύπο –II διαβήτη έχει συσχετισθεί με τον πολυμορφισμό του Znt8 γονιδίου [Sladek R. 2007]. Οι ZnT9 και 10 είναι ελάχιστα μελετημένοι, ο ZnT9 εμφανίζεται στον πυρήνα κατά τη μείωση, ενώ ο 10 ίσως να βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη [Sim D. 1999].

Τα τελευταία χρόνια ο ZnT7 έχει εντοπιστεί κυρίως στον εγκέφαλο, τον αμφιβληστροειδή, τον πνεύμονα, το σπύκι και λεπτό έντερο. Εντοπίστηκε πρώτη φορά σε κύτταρα ωοθηκών από χάμστερ το 2002 [Kirschke C.]. Ανοσο-εντοπιστικές μέθοδοι εμφανίζουν τον μεταφορέα στην συσκευή Golgi και πιθανότερα μεταφέρει κυτταροπλασματικά ιόντα Zn εντός αυτού [Chi ZH. 2006]. Οι T. Suzuki et.al (2005) υποστηρίζουν ότι ο ZnT7, καθώς και ο ZnT5, είναι υπεύθυνοι για την προσθήκη Zn στα ψευδάργυρο- εξαρτώμενα ένζυμα και συγκεκριμένα στην αλκαλική φωσφατάση (ALP: Alkaline phosphatase), όπου φαίνεται να συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση της άπο-ALP μορφής της, πριν μεταφερθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ακόμη σε Znt7-/- διαγονιδιακά ποντίκια, που δεν εκφράζανε τον μεταφορέα, εμφανίζεται χαμηλή συγκέντρωση Zn στο σώμα και μειωμένη αύξηση βάρους [Huang L. 2007]. Πρόσφατα μόλις, αποδείχθηκε ότι ο μεταφορέας ZnT7 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση της ινσουλίνης στα παγκρεατικά β-κύτταρα, μέσω της ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του MTF1 [Huang L. 2010].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τις SLC39 πρωτεΐνες βρέθηκε σε όλους τους μέχρι σήμερα μελετημένους οργανισμούς, από τα αρχαία βακτήρια έως τους ευκαρυώτες [Gaither, Eide 2001]. Ιστορικά αναφερόταν ως Zrt-, Irt-like (ZIP) [Guerinot 2000] και αποτελεί μια διατηρημένη εξελικτικά οικογένεια πρωτεϊνών που με 8 διαμεμβρανικές υπομονάδες, δημιουργεί ένα κανάλι ενεργητικής μεταφοράς δισθενών κατιόντων.

Τα 14 SLC39 ανθρώπινα γονίδια έχουν εντοπιστεί (-χαρτογραφηθεί) σε 12 διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ μόνο το ZIP4, έχει μελετηθεί υπό μετάλλαξη και βρέθηκε ότι προκαλεί την κληρονομική ασθένεια της ανεπαρκούς πρόσληψης Zn, AE (acrodermatitis enteropathica). Επίσης ZIP4 knockout ποντίκια από ετερόζυγους γονείς πεθαίνουν κατά τη 10η μέρα κύησης τους ακόμη και μετά από αύξηση της δοσολογίας Zn στις μητέρες, γεγονός που φανερώνει την σημαντικότητα αυτού του μεταφορέα στην εντερική πρόσληψη [Duffner-Beattie, 2007]. Τελευταίες έρευνες συνδέουν τις ZIP πρωτεΐνες με τις prion (PrP), αποδεικνύοντας εξελικτικά κοινό προγονικό γονίδιο καθώς και λειτουργικές σχέσεις σε επιθηλιακά-μεσεγχυματικά γεγονότα μεταφοράς [Ehsani S. 2011].



Σχήμα 3: Οι ZIP και ZnT μεταφορείς ψευδαργύρου. A) Είσοδος ιόντων Zn μέσω του ZIP μεταφορέα, B) αντιμεταφορά Zn από το μηχανισμό των ZnT (ή CDF) [S. Ehsani et al. 2011]

2.2 Ψευδάργυρος κι απόπτωση

Ο ρόλος του Zn στην ρύθμιση της απόπτωσης είναι διφορούμενος αφού, σύμφωνα με πολλές μελέτες, ανάλογα με τη συγκέντρωση του μπορεί να είναι προ- ή αντί-αποπτωτικός, ενώ έλλειψη ή υπερβολική παρουσία του οδηγεί, στις ίδιες κυτταρικές σειρές προς απόπτωση [Cummings JE. 2009].

Η έλλειψη Zn στο κύτταρο έχει φανεί ότι αυξάνει το οξειδωτικό stress [Cui L. 2000]. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του Zn περιλαμβάνουν τόσο προστασία των σουλφυδρυλίων (θειόλες) [Williams RJP 1987] αλλά και των λιπιδίων και πρωτεϊνών πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες. Η διαθεσιμότητα του Zn μέσα στο κύτταρο είναι ο κύριος ρυθμιστής της επίδρασης του στην οξειδωτική ομοιόσταση καθώς μπορεί να είναι προστατευτικός ή προαγωγός για το οξειδωτικό stress [Maret W 2006].

Η επαγωγή απόπτωσης από υψηλές δόσεις Zn έχει μελετηθεί σε πολλά ιστικά και κυτταρικά συστήματα [Watjen W.2002]. Φαίνεται να ενεργοποιούνται προ-αποπτωτικά μόρια όπως η p38 και τα κανάλια K [Wiseman D.A. 2006], ή να αναστέλλονται μηχανισμοί του ενεργειακού μεταβολισμού (inhibition of glycolysis) [Sheline CT. 2000], οδηγώντας σε θάνατο. Τοξικές δόσεις Zn επίσης αυξάνουν την έκφραση της Bax (προ-αποπτωτική – ανταγωνιστής της αντί-αποπτωτικής Bcl-2) μειώνοντας έτσι το κλάσμα Bcl-2/Bax και οδηγώντας το κύτταρο προς απόπτωση [Feng P. 2008]. Η μεταβολή των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Bcl-2-like και Bax-like proteins) οδηγεί σε μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού της και απελευθέρωση κυτοχρώματος -c στο κυτταρόπλασμα [Bitanhirwe KY. 2009].

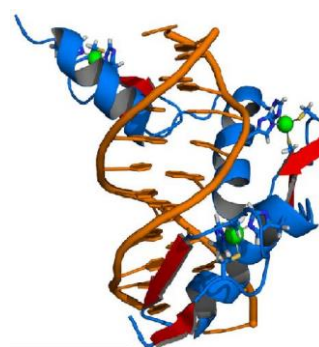
Ο Zn έχει βρεθεί να ρυθμίζει πολλές αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Δρα σαν αναστολέας κασπασών και κυρίως της κασπάσης -3 (με IC₅₀<10 nm) [Perry DK. 1997] αλλά και ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλει τις κασπάσες -6, -7 και -8 [Stennicke HR 1997]. Χαμηλή περιεκτικότητα Zn στο κύτταρο οδηγεί σε απόπτωση λόγω αποδιοργάνωσης των σηματοδοτικών πρωτεϊνικών μακρομορίων ERK (Extracellular signal-regulated kinase) και Akt (serine/threonine protein kinase) [Clegg MS. 2005]. Σε αντιπαράθεση με τα ανωτέρω, ο Zn σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις έχει φανεί ότι αυξάνει το λόγο Bcl-2/Bax, αυξάνοντας έτσι την αντίσταση του κυττάρου στην απόπτωση. Συγκεκριμένα έρευνα έδειξε ότι προσθήκη Zn αντιρροπεί την απόπτωση που προκαλείται σε προμονοκύτταρα (προμορφές μονοκυττάρων του αίματος) από το υπεροξειδίου του υδρογόνου, αυξάνοντας την Bcl-2 και αναστέλλοντας την ενεργή κασπάση-3 [Zalewski PD. 1991].

Η επίδραση του Zn στην απόπτωση είναι πολύπλοκη και πολλές μελέτες αντικρούονται. Αυτή η πολυφωνία αποτελεσμάτων οφείλεται στους διαφορετικούς παράγοντες που επηρεάζουν, όπως ο ιστός και ο κυτταρικός τύπος, οι συγκεντρώσεις Zn, η έκφραση των μεταφορέων και δεσμευτικών πρωτεϊνών και μια ποικιλία μοριακών στόχων με αντίθετες λειτουργίες.

2.3 Δομή “Δάκτυλος” Zn (Zn finger)

Ο βαθμός έκφρασης, όλων των γονιδίων σε όλα τα κύτταρα, ελέγχεται από μεταγραφικούς ενεργοποιητές ή καταστολείς, που συνδέονται σε συγκεκριμένα σημεία στο γονιδίωμα. Μεταγραφικοί παράγοντες με διάφορα μοτίβα πρωτεϊνικών αναδιπλώσεων μπορούν να δεσμευτούν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, όπως η έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix), το φερμουάρ λευκίνης (leukine zipper) και οι δάκτυλοι Zn (zinc fingers). Ο τελευταίος αποτελείται συνήθως από 20-30 αμινοξέα, με 2 κυστεΐνες και 2 ιστοδίνες (Cys2/His2 motif) να συνδέονται-συντονίζονται με ένα άτομο Zn [Klug A 1995]. Από τους πρώτους τέτοιου μοτίβου μεταγραφικούς παράγοντες που αναγνωρίστηκαν, ήταν ο EGR1 (early growth response protein 1) ή Zif268 [Pavletich NP. 1991] που ελέγχει γονίδια υπεύθυνα για την διαφοροποίηση των κυττάρων και εμπλέκεται στην καταστολή όγκων [Liu J. 2001]. Στην κρυσταλλική δομή του EGR1 ποντικού, περιέχονται 3 πεπτίδια δακτύλων Zn το καθένα από τα οποία σχηματίζει 2 β-αντιπαράλληλες πτυχωτές επιφάνειες και μία α-έλικα και δεσμεύει συγκεκριμένα (3) νουκλεοτίδια στην μεγάλη αύλακα του DNA [Pavletich NP 1991]. (Σχήμα 4).

Έως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πολλές δομές δακτύλων Zn εκτός από την Cys2/His2, όπως η Zn2/Cys4 ή Zn2/Cys6 και η ‘κορδέλα Zn’ [Krishna SS, 2002]. Η κατηγοριοποίηση τους γίνεται εκτός από τη τεταρτοταγή δομή τους και με βάση τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν, όπως DNA, RNA, πρωτεϊνικά μόρια και μικρότερες ενώσεις. Σήμερα κατασκευασμένοι ‘δάκτυλοι’ Zn χρησιμοποιούνται στην βιοτεχνολογία για τη δημιουργία πρωτεϊνών που δεσμεύουν επιθυμητές θέσεις πάνω στο γονιδίωμα και κυρίως έχουν το μοτίβο C2/H2 του Zif268, αν και κάποιες ομάδες χρησιμοποιούν και τη συστοιχία του ανθρώπινου μεταγραφικού παράγοντα SP1.



Σχήμα 4: Απεικόνιση της πρωτεΐνης EGR1 (μπλέ) συνδεδεμένη στην έλικα του DNA (πορτοκαλί). Τα ιόντα Zn είναι χρωσμένα πράσινα [Pavletich NP 1991]

2.4 Μεταγραφικοί Παράγοντες

Η κυτταρική ισορροπία του Zn διατηρείται με την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από τον Zn. Η δυσομοιόστασή του στην αιτιοπαθογένεση ασθενειών όπως τη νόσο Alzheimer, ο τύπου II διαβήτης και ο καρκίνος δείχνει τη σημαντικότητα των γονιδίων που ρυθμίζονται από Zn. Στα θηλαστικά, ένας μηχανισμός μεταγραφικής ρύθμισης, ευαίσθητος στον Zn, που μεσολαβεί αυξάνοντας την γονιδιακή έκφραση και περιλαμβάνει τον μεταγραφικό παράγοντα MTF1 (metal response element-binding transcription factor 1) μελετάται έντονα [Jackson KA 2008]. Μείωση της έκφρασης γονιδίων (μειωμένο mRNA) σε αύξηση του κυτταρικού Zn έχει παρατηρηθεί, αλλά ο υπεύθυνος μηχανισμός μεταγραφικής ρύθμισης δεν έχει χαρακτηριστεί.

Η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων των μεταλλοθειονινών (MTs) και του μεταφορέα Zn 1 (ZnT1) ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα MTF1. Η αντίδραση του MTF1 προς την συσσώρευση βαρέων μετάλλων δεν είναι πλήρως κατανοητή. Η ξεχωριστή δομή του με τους 6 δάκτυλους Zn είναι καθοριστική για την δράση του ως μεταλλο-εξαρτώμενου μεταγραφικού παράγοντα και την σύνδεση του στο DNA. Ο τρίτος και τέταρτος 'δάκτυλος' Zn είναι σημαντικοί για την πυρηνική τοποθέτηση του MTF1, ενώ εκτός από τον τελευταίο, οι υπόλοιποι θεωρούνται ενεργοποιητές-κλειδιά της μεταγραφικής του δράσης [Otsuka F 2006]. Η δομική μορφολογία που έχει το ενδιαφέρον αυτό μόριο μεταβάλλεται χάρη στους 6 δακτύλους Zn, δίνοντας έτσι ένα μηχανισμό απάντησης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στο κύτταρο.

Η μετατόπιση του MTF1 στον πυρήνα παρατηρείται σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες. Συνθήκες υποξίας και επίδραση οξειδωτικών όπως το H₂O₂ φαίνεται να αυξάνουν τη δέσμευση του MTF1 στον προμότορα της MT. Φαίνεται ότι η απελευθέρωση ασταθής (labile) Zn από μεταλλοθειονίνες (MT) ή από θειόλες και δέσμευση του στον MTF1 ή και άλλες πρωτεΐνες με 'δάκτυλους' Zn, συνεισφέρει στην ρύθμιση των μεταλλο-ανταποκρινόμενων γονιδίων (metal-responsive genes), συμπεριλαμβανομένου των Zip και ZnT [Cousins RJ. 2011].

B. ΜΕΤΑΛΛΟΘΕΙΟΝΙΝΕΣ

1. Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins, MTs) αρχικά αναγνωρίστηκαν ως μικρού μοριακού βάρους, πλούσιες σε κυστεΐνη πρωτεΐνες που δεσμεύουν Zn. Από το 1957 που ανακαλύφθηκαν [M. Margoshes, 1957] έως και σήμερα, αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος αλλά ο ρόλος τους στα μεταβολικά μονοπάτια παραμένει αρκετά απροσδιόριστος. Η δέσμευση των ιόντων Zn φανερώνει ένα σημαντικό ρόλο των MTs στον κυτταρικό οξειδοαναγωγικό μεταβολισμό καθώς και την κατανομή και την ομοιοστάση του Zn.

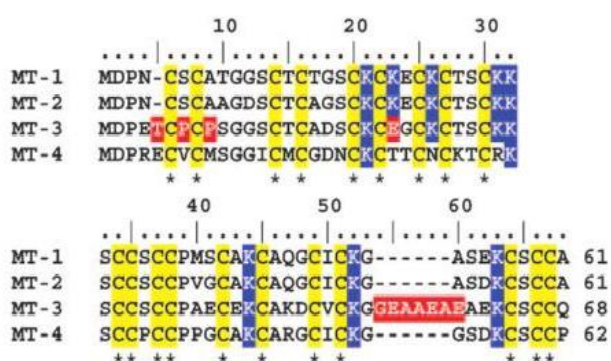
Οι Μεταλλοθειονίνες φαίνεται να διανέμουν τον ενδοκυττάριο ψευδάργυρο κατά την ταχεία μεταφορά του από και προς τα ένδο- και έξω-κυττάρια πρωτεϊνικά συμπλέγματα [Krezel A, et.al., 2007]. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες τους και η δράση τους στην ομοιοστάση του Zn είναι καίριες στον προστατευτικό τους ρόλο έναντι παρουσίας ιονίζουσων και UV ακτινοβολιών, τοξικών βαρέων μετάλλων (Hg και Cd), υπεροξειδωσής των λιπιδίων και ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) [Sato M. et.al., 2002].

1.1 Δομή

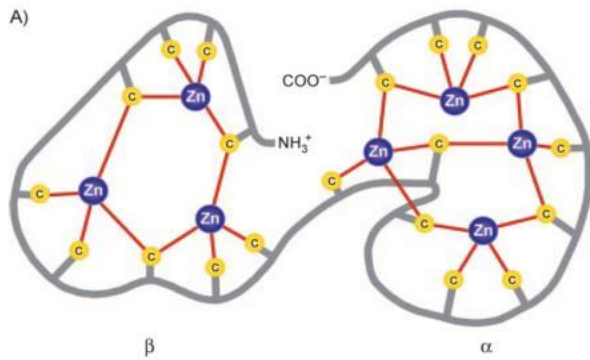
Σήμερα 4 ισομορφές των μεταλλοθειονινών είναι ταυτοποιημένες (MT-1/MT-4), από τις οποίες οι 1 και 2 βρίσκονται σε όλα τα όργανα, η MT-3 στο ΚΝΣ, ενώ η λιγότερο γνωστή MT-4 είναι κυρίως εντοπισμένη στους 'στρωματοποιημένους' (stratified) ιστούς (δέρμα και έντερο) [M. Vasak, 2005]. Η δομή των

MTs είναι μοναδική και για πολλούς συναρπαστική. Με ιδιαίτερα μικρό μοριακό βάρος ~7kDa, οι 4 ισομορφές αποτελούνται από 61-68 αμινοξέα, με 20 διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και τουλάχιστον 5 λυσίνης (8 στις MT-1 και 2) (Σχήμα 5).

Αν και δεσμεύουν κυρίως Zn έχει βρεθεί ότι μπορούν να συνδεθούν με μια μεγάλη γκάμα ιόντων μετάλλων όπως Cd, Cu,



Σχήμα 5: Στοιχισμός αλληλουχίας των τεσσάρων ισομορφών μεταλλοθειονινών. Επάνω φαίνεται η β-υπομονάδα και κάτω η α-υπομονάδα. Τα διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (*) και λυσίνης είναι φανερά με κίτρινα και μπλέ φόντο αντίστοιχα. Σε κόκκινο οι διαφορές της MT3. (S.G.Bell, 2009)



Σχήμα 6: Οι α και β υπομονάδες των μεταλλοθειονίνων. (S.G. Bell)

Hg, Ag, Au, Bi, As, Co, Fe, Pb και Pt [K. E. Duncan, 2006]. Μόλις το 1991 με χρήση φασματομετρίας NMR και κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X φάνηκε ότι η πρωτεϊνική τους διάταξη αποτελείται από 2 δομικές περιοχές (α και β domains) με τις κυστεΐνες να δημιουργούν ένα «σύμπλεγμα» (cluster) γύρω από τα άτομα των μετάλλων [N. Romero-Isart, 2002].

Στην α περιοχή (C terminal) 4 άτομα Zn δεσμεύονται σε 11 κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys), ενώ στην β (N terminal) 3 άτομα Zn σε 9 Cys κατάλοιπα. (Σχήμα 6). Η διαμόρφωση αυτή περιέχει συνολικά 28 ενδομοριακούς δεσμούς Zn-S και είναι υπεύθυνη για την ισχυρή δέσμευση του Zn στις 2 περιοχές καθώς και για τις ιδιότητες των MTs ως δότες Zn. Οι α και β υπομονάδες δεν παρουσιάζουν ίδια συγγένεια προς τον Zn, καθώς η β φαίνεται να αντιδρά ταχύτερα με οξειδωτικούς παράγοντες. [Stephen G. Bell, 2009].

*Στη συνέχεια σαν MTs αναφερόμαστε και στις 4 ισομορφές έστω και τις λιγότερο μελετημένες MT-3 και 4.

1.2 Γονιδιακή-Έκφραση

Στον άνθρωπο τα γονίδια των MT συγκεντρώνονται στην περιοχή q13 του χρωμοσώματος 16 [Karin et al., 1984; Palmiter et al., 1992; Quaipe et al., 1994] και συμπεριλαμβάνουν 7 γονίδια για την έκφραση της MT-1 και ένα μοναδικό που κωδικοποιεί καθεμία από τις υπόλοιπες τρεις ισομορφές. Αντίθετα τα ποντίκια εμφανίζουν πιο απλή δομή, με 1 γονίδιο για κάθε ισομορφή, ενώ όλα εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 8 [Cox and Palmiter, 1983]. Τα γονίδια Mt1 και Mt2 εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ΚΝΣ [Campagne et al., 2000], αντίθετα με αυτά των Mt3 και Mt4 που περιορίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Η γονιδιακή εξελικτική διατήρηση όλων των MTs φανερώνει το πόσο σημαντικές είναι για το κύτταρο ακόμη κι αν δεν είναι πλήρως ξεκάθαρες οι λειτουργίες τους.

Είναι γνωστό από μελέτες κυρίως στις ισομορφές 1 και 2, ότι οι MTs εκφράζονται σαν απάντηση σε πλήθος ερεθισμάτων όπως τα μέταλλα, οι ορμόνες, οι κυτοκίνες, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και το στρες [Sato and Bremner, 1993]. Η έκφραση από

μέταλλα έχει ως εκκινητή τον MRE (Metal Responsive Element) που είναι παρόν στην περιοχή του προμότορα όλων των MT γονιδίων και ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα MTF-1 [Jackson KA 2008]. Ενδιαφέρον έχει ότι ο GRE (Glucocorticoid Responsive Element) βρέθηκε να είναι υπεύθυνος για την έκφραση των MTs από τα γλυκοκορτικοειδή [Kelly et al., 1997]. Επίσης η γονιδιακή έκφραση των MTs ρυθμίζεται από τον εκκινητή στοιχείων αντοξειδωτικής απάντησης ARE (Antioxidant Response Element) παρά το γεγονός ότι και ο MRE απαντά σε οξειδωτικά σήματα μέσω του MTF-1 [Samson and Gedamu, 1998].

Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των 1 και 2 ισομορφών σε φλεγμονές πιστεύεται ότι επηρεάζονται από κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη (IL-6) και παράγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής όπως ο STAT, αλλά και πλήθος άλλων σηματοδοτικών μορίων [Lee et.al., 1999]. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των MT3/4 δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

1.3 Ισομορφές των MTs και λειτουργίες τους

Για να κατανοήσουμε τις φυσιολογικές λειτουργίες της οικογένειας των μεταλλοθειονινών είναι απαραίτητο να λάβουμε υπόψη κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα η ομολογία στην γονιδιακή αλληλουχία που παρουσιάζουν σε όλο το εξελικτικό φάσμα, από τους απλούστερους μονοκύτταρους οργανισμούς έως τον άνθρωπο είναι εντυπωσιακή. Κάτι που αντικατοπτρίζεται άλλωστε και στον όμοιο γεωμετρικά μηχανισμό δέσμευσης μετάλλων που εμφανίζουν [Kagi JH et.al., 1988]. Οι κύριες λειτουργίες φαίνεται να σχετίζονται με την ρύθμιση του μεταβολισμού του ψευδαργύρου, καθώς αύξηση του προσλαμβανόμενου από την τροφή Zn επαυξάνει την εντερική έκφραση MTs [R. J. Cousins et.al. 1992]. Ο ενδοκυττάριος ψευδάργυρος και η δράση των μεταφορέων του (ZnTs και ZIPs) φαίνεται να είναι οι κύριοι ρυθμιστές των επιπέδων όλων των ισομορφών των MTs, οι οποίες ποικίλουν σε αναλογία και συγκέντρωση στα κύτταρα διαφορετικών ιστών. Όμως η ρύθμιση της έκφρασης των MTs ανταποκρίνεται σε μια πληθώρα άλλων παραγόντων που σχετίζονται με την ενδο- και έξω-κυτταρική μεταφορά μετάλλων.

Οι πιο πιθανές έως τώρα λειτουργίες των μεταλλοθειονινών περιλαμβάνουν την ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού των μετάλλων και την αποθήκευσή τους, την μεταφορά μετάλλων σε απο-μεταλοπρωτεΐνες στόχους (όπως πρωτεΐνες με δακτύλους Zn και ένζυμα), την αποτοξίνωση από μέταλλα και προστασία των κυττάρων από

οξειδωτικούς παράγοντες και ηλεκτρόφιλα [S. R. Davis et.al. 2000]. Αποδείξεις για τα παραπάνω φαίνονται από έρευνες *in vivo* σε φυσιολογικά και διαγονιδιακά ζώα αλλά και σε *in vitro* κυτταρικά μοντέλα.

Πειραματικά μοντέλα ποντικών με έλλειψη του γονιδίου των MT 1 και 2 (Mt -/-) απορροφούν λιγότερο Zn στον άνω γαστρεντερικό σωλήνα ακόμη και με δίαιτες υψηλής συγκέντρωσης Zn [C. D. Tran et. al 1998]. Επιπρόσθετα τα επίπεδα Zn που αποβάλλονται (στα ούρα) από ποντίκια Mt -/-, έπειτα από δίαιτες ελλειμματικές σε Zn είναι αυξημένα σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών (MT+/+) [M. Sato et.al., 2002]. Ακόμη ελλείπει του γονιδίου Mt τα πειραματόζωα εμφανίζουν μειωμένο Zn σε όλους τους ιστούς και είναι πιο ευαίσθητα σε επιπλοκές εγκυμοσύνης (τερατογεννέσεις) [G. K. Andrews et. al,1999] καθώς και ανωμαλίες στα νεφρά όταν οι δίαιτες δεν είναι πλούσιες σε Zn [E. J. Kelly et.al.,1996]. Ο καταλυτικός αυτός ρόλος των MTs στον φυσιολογικό μεταβολισμό του Zn φαίνεται και από διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες, καθώς αντιστέκονται στις ανωμαλίες που προκαλεί η έλλειψη του στο διαιτητικό επίπεδο [T. Dalton, et.al., 1996].

Οι ισομορφές 1 και 2 των μεταλλοθειονινών είναι παρούσες σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους στο σώμα. Εκτός της ρύθμισης των επιπέδων Cu και Zn, εμπλέκονται στη μεταγραφή, την αποτοξίνωση των κυττάρων από βαρέα μέταλλα, την ομαλή δράση του ανοσοποιητικού και σε ένα πλήθος γαστρεντερικών λειτουργιών. Η ισομορφή 4 εντοπίζεται σε δερματικά κύτταρα και στην άνω γαστρεντερική οδό (upper G.I. tract). Βοηθά στη ρύθμιση του pH του στομάχου, στη διαφοροποίηση της γεύσης και της υφής στη γλώσσα και βοηθά στην προστασία του δέρματος [N Thirumoorthy, et.al. 2011].

1.4 MT-III

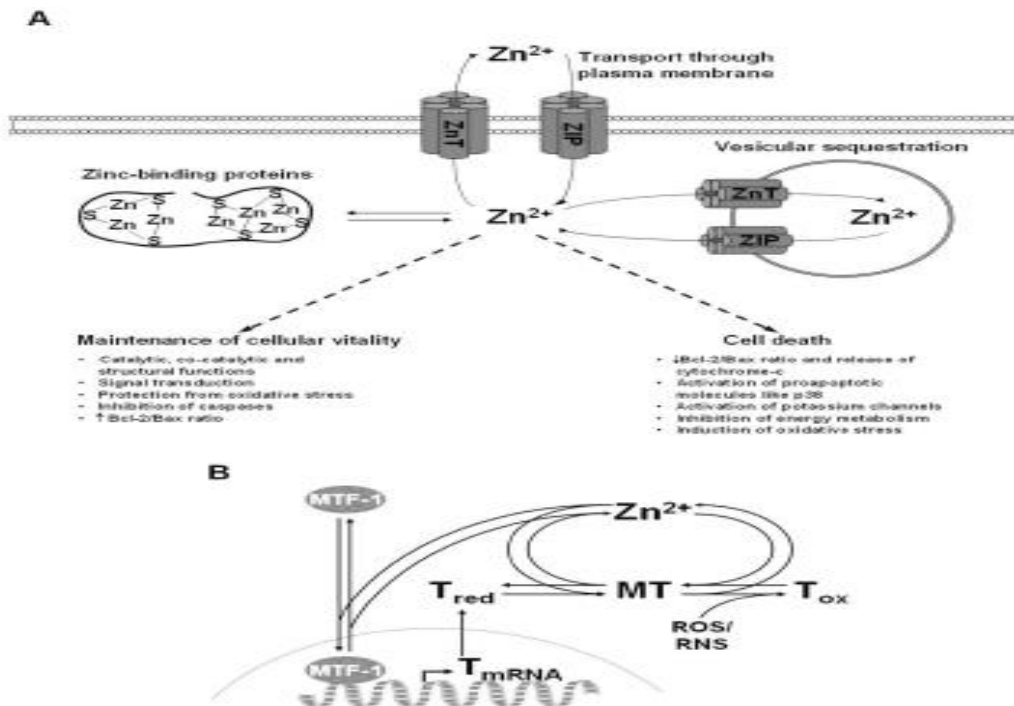
Το μόριο της μεταλλοθειονίνης 3 βρέθηκε απροσδόκητα το 1991 στον εγκέφαλο ασθενών που έπασχαν από νόσο Alzheimer (AD) και χαρακτηρίστηκε ως παράγοντας αναστολής αύξησης (Growth Inhibitory Factor-GIF) [Uchida Y.1991]. Ως μέλος της οικογένειας των μεταλλοθειονινών η MT-III (ή κατά κάποιους GIF) παρουσιάζει 70% ίδια αλληλουχία με τις περισσότερο μελετημένες MT-I και II. Οι κύριες διαφορές στην αμινοξική αλυσίδα είναι η ένταξη 6 αμινοξέων στην α και μίας θρεονίνης (Thr-5) στην β-υπομονάδα της μεταλλοθειονίνης 3.

Αν και αρχικά ο συσχετισμός της MT-III με τη νόσο Alzheimer έδειχνε ότι η έλλειψη αυτού του μορίου σχετίζεται άμεσα με την ασθένεια, πλήθος μελετών αντιδικούν υπέρ και κατά [Amoureux M.1997, Carrasco J. 1999, Uchida Y. 1994, Yu. 2001]. Τα τελευταία 20 χρόνια πραγματοποιούνται πολλές έρευνες με γνώμονα τις ιδιότητες και λειτουργίες αυτού του τόσο πρωτότυπου και ενδιαφέροντος μορίου, με πολλές φορές μη συμβατά αποτελέσματα. Σε αναλογία με τα ασαφή συμπεράσματα στην πάθηση του Alzheimer, η έκφραση της MT-III αυξάνεται ή μειώνεται σε ασθένειες όπως το σύνδρομο Down [Arai. 1997], το σύνδρομο Creutzfeld-Jakob [Kawashima, 2000], τη νόσο του Parkinson, τη μνιγγίτιδα και την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) [Uchida, 1994].

Εκτός του εγκεφάλου η MT-III εκφράζεται έντονα σε γευστικά κύτταρα της γλώσσας, σε Leydig και Sertoli κύτταρα των όρχεων και σε επιθηλιακά κύτταρα του οπισθοπλάγιου λοβού του προστάτη [I. Hozumi 2008]. Οι ιστοί αυτοί, καθώς και ο ιππόκαμπος στον οποίο η MT-III βρίσκεται σε αφθονία, περιέχουν αυξημένες ποσότητες Zn δεσμευμένο κυρίως σε μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα. Απομονωμένη MT-III παρατηρήθηκε ότι αναστέλλει την αύξηση των αξόνων και των δενδριτών εμβρυικών νευρώνων του φλοιού ανθρώπου *in vitro*, χαρακτηριστικό που δεν μοιράζονται οι υπόλοιπες ισομορφές [Z.C Ding, 2008]. Η ισομορφή 3 των μεταλλοθειωνινών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την οργάνωση και τον προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων του εγκεφάλου [N Thirumoorthy, et.al. 2011].

1.5 MTs και μεταφορά Zn

Όπως έχει προαναφερθεί η κυτταρική ομοίωση του Zn ελέγχεται από τους μεταφορείς ιόντων Zn (Zip-ZnT) και τις πρωτεΐνες που τον δεσμεύουν και τον διακινούν. Η αρχική είσοδος στο κύτταρο γίνεται με τους 'εισαγωγείς' Zip μεταφορείς, ενώ την έξοδο των ιόντων Zn ελέγχουν οι ZnT πρωτεΐνες. Έπειτα ο Zn συνδέεται σε ψευδάργυρο-δεσμευτικές πρωτεΐνες, όπως οι MTs, είτε μεταφέρονται σε ενδοκυτταρικά οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό, το Golgi και τα λυσοσώματα.



Σχήμα 7: Η κυτταρική ομοιόσταση του Zn και ο ρόλος των μεταλλοθειονινών [L.M.Plum, 2010]

Ο έλεγχος των επιπέδων Zn και της ομοιόστασης του είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επιβίωση του κυττάρου καθώς απορρύθμιση του οδηγεί σε θάνατο [Σχήμα 7 (A)].

Το σύστημα μεταλλοθειονινών/θειονινών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο την ομοιόσταση του Zn. Ελεύθερα ιόντα Zn δεσμεύονται από θειονίνες (T_{red}-αναγομένη μορφή θειονίνης) προς σχηματισμό μεταλλοθειονίνης (MT). Αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ιόντων Zn δεσμεύονται στις δομές «δακτύλων-ψευδαργύρου» του υπεύθυνου για τη ρύθμιση μετάλλων μεταγραφικού παράγοντα (MTF-1), αυξάνοντας την έκφραση αναγμένων θειονινών (T_{red}). Επιπλέον η οξείδωση των MTs από ROS ή RNS οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων των οξειδωμένων θειονινών (T_{ox}) με σύγχρονη απελευθέρωση Zn [Σχήμα 7 (B)].

1.6 Αντιοξειδωτικές Ικανότητες των MTs

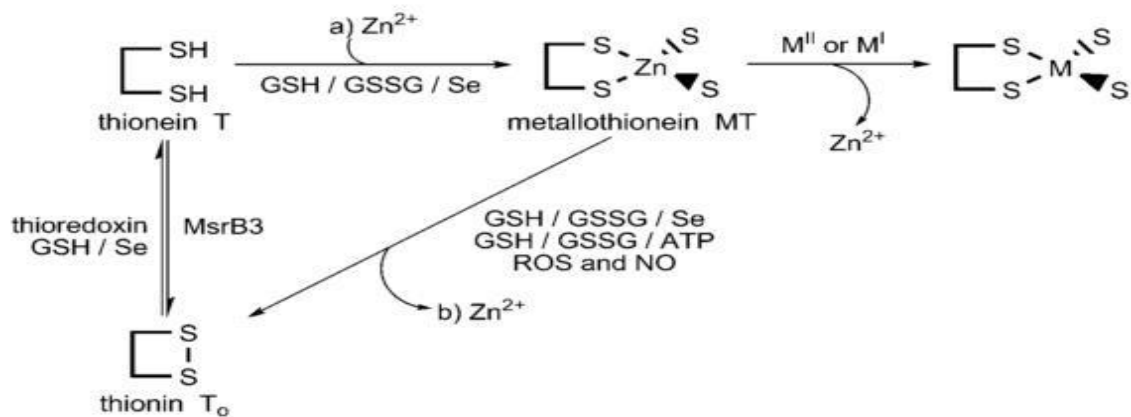
Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Radical Oxygen Species-ROS) αποτελούν χημικά ενεργά μόρια που περιέχουν οξυγόνο (π.χ. ιόντα οξυγόνου, υπεροξειδία) και είναι ισχυρά αντιδρόντα εξ' αιτίας της παρουσίας ελεύθερου ηλεκτρονιακού φορτίου. Τα ROS δημιουργούνται φυσιολογικά στον μεταβολισμό του οξυγόνου και διαδραματίζουν

σημαντικό ρόλο στη κυτταρική ομοίωση και επικοινωνία. Όταν επιδρούν εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες (π.χ. UV ή θερμικό σοκ) τα επίπεδα ROS μπορεί να αυξηθούν δραματικά με αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες και καταστροφή κυτταρικών δομών [Devasagayam, 2004]. Οι βασικές επιβλαβείς επιδράσεις των ROS στο κύτταρο είναι η καταστροφή στο DNA, η υπεροξειδωση των λιπιδίων, η οξείδωση αμινοξέων στις πρωτεΐνες και συμπαραγόντων ενζύμων. Φυσιολογικοί μηχανισμοί άμυνας των κυττάρων έναντι των ROS είναι ένζυμα όπως το υπεροξειδίου της δισμουτάσης, η καταλάση, η γλουταθειόνη και μικρά αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ουρικό οξύ.

Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες που φαίνεται να έχουν οι μεταλλοθειονίνες έχουν γίνει αντιληπτές σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών [K.-S. Min et.al., 1992] καθώς και *in vitro* σε σειρές ηπατικών κυττάρων [T. Dalton et.al., 1994]. Έχει αποδειχθεί ότι οι ισομορφές 1 και 2 των MT είναι ικανές να δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα ROS μεταξύ άλλων υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου και οξείδια του νατρίου [M. V. R. Kumari et.al., 1998]. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι οι MT έχουν την ιδιότητα να ‘φυλακίζουν’ ρίζες υδροξυλίου, που είναι από τους κυρίως υπαίτιους για το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου και μάλιστα, 300 φορές ισχυρότερα από την γλουταθειόνη [M. Sato et.al., 2002]. Οι συνδέσεις κυστεΐνης – θείου στις οποίες είναι πλούσιες οι MTs παρουσιάζουν την ικανότητα οξείδωσης ή αναγωγής με τη σύγχρονη απελευθέρωση ή δέσμευση Zn και την δημιουργία ή σχάση δισουλφιδικών δεσμών. Αυτός ο οξειδοαναγωγικός μηχανισμός προσδίδει αντιοξειδωτικές ικανότητες στις MTs, με κύριο ρυθμιστή τον κυτταρικό Zn. Καθώς το αναγωγικό δυναμικό των MTs είναι ιδιαίτερα χαμηλό (λιγότερο από -366mV), ένας αριθμός από φυσιολογικούς οξειδωτικούς παράγοντες όπως δισουλφίδια και ενώσεις σεληνίου μπορούν να επηρεάσουν την οξείδωση των MTs [A. Krezel et.al., 2007].

Οι MTs αντιδρούν με τα δισουλφίδια της γλουταθειόνης (GSSG) απελευθερώνοντας Zn. Στις αντιδράσεις μεταφοράς Zn, οι MTs δεν απελευθερώνουν και τα 7 ιόντα Zn. Η ανηγμένη δομή της GSSG, το τριπεπίδιο της γλουταθειόνης (GSH), αποτελεί ένα ισχυρό κυτταρικό αντιοξειδωτικό παράγοντα και τα 2 αυτά μόρια περιλαμβάνουν το 90% του μη δεσμευμένου σε πρωτεΐνες κυτταρικού θείου. Το κλάσμα GSH/GSSG θεωρείται σημαντικός αντιοξειδωτικός δείκτης. Η GSSG οξειδώνει την MT, προκαλώντας την απελευθέρωση και μεταφορά του Zn, ενώ η GSH μεσολαβεί στην μεταφορά του από ένζυμα σε θειόλες (T). Η συγκέντρωση του GSSG είναι καθοριστική για την αντίδραση

της ταχύτητας, ενώ η GSH απουσία της πρώτης αποτρέπει την MT να απελευθερώσει ιόντα Zn. Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε ως ο πιο ολοκληρωμένος σχετικά πρόσφατα [Bell et.al., 2009] [Σχήμα 8].



Σχήμα 8: Ο οξειδοαναγωγικός κύκλος των MTs και η σύνδεσή τους με την ομοιοστάση του Zn, υπό τον έλεγχο των GSH/GSSH και της ATP

Οι σταθερές ταχύτητας K για τα περισσότερα ψευδαργυροένζυμα είναι 10³ μικρότερες (3 τάξεις μεγέθους) από την K των MTs (περίπου 10¹² με 10¹³ M⁻¹), γεγονός που κάνει την μεταφορά του Zn θερμοδυναμικά δυσμενή. Αν και τα 7 άτομα Zn φαίνεται να έχουν όμοιο περιβάλλον δέσμευσης, τα 4 πρώτα ιόντα (Zn1-4) δεσμεύονται πολύ ισχυρότερα απ' ό,τι τα 2 επόμενα (Zn5,6) και το Zn7 ιόν εμφανίζει σταθερά δέσμευσης K (2.1x10⁸) αρκετά χαμηλότερη ώστε να επιτρέπεται θερμοδυναμικά η μεταφορά του προς άλλες ψευδαργυροπρωτεΐνες [A. Krezel et.al 2007]. Σε φυσιολογικές in vivo συνθήκες, οι MTs δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς έπειτα από την οξειδωτική απελευθέρωση Zn, ενώ οι δεσμοί αυτοί αυξάνονται σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού stress [W. Feng et.al.,2006]. Ο ακριβής μηχανισμός της δημιουργίας των δεσμών αυτών δεν έχει εξακριβωθεί.

Η ισομορφή MT-2 έχει βρεθεί ότι αντιδρά σε αναλογία 1:1 με μόρια ATP και GTP με σκοπό την μεταφορά Zn σε απεμπλουτισμένα σε Zn ένζυμα δευδρογονάσης της σορβιτόλης [Καταλύει την αντίδραση σορβιτόλης προς φρουκτόζη με τη βοήθεια NAD⁺ και απαιτεί για την ομαλή κατάλυση ένα ιόν Zn]. Φαίνεται ότι το ATP ρυθμίζει την ανταλλαγή των ιόντων Zn από τις MTs με τρόπο παρόμοιο με αυτό του συστήματος γλουταθειόνης (GSH/GSSG) [K. Zangger et.al., 2000]. Πιο πρόσφατα φάνηκε ότι το GSH (τριπεπτιδίο της γλουταθειόνης) αποτρέπει την δέσμευση των MTs στο ATP ενώ το GSSG

(δισουλφίδιο της γλουταθειόνης) την διευκολύνει, καθορίζοντας έτσι μέσω του συστήματος GSH/GSSG το ποσοστό ATP που δεσμεύεται στις MTs και επομένως την απελευθέρωση ιόντων Zn [W. Maret et.al, 2002].

Τόσο οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) όσο και αζώτου (RNS) είναι γνωστό ότι προκαλούν οξειδωτικές βλάβες και εμπλέκονται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων των: πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS), Parkinson και νόσο Alzheimer, καθώς και καρδιαγγειακές παθήσεις, ρευματοειδείς παθήσεις, αθηροσκληρώσεις, διαβήτη, μυϊκές δυστροφίες και γήρας. Η παραγωγή ROS και RNS είναι συνδεδεμένη με το μεταβολισμό και την αναπνοή και στο μεταβολισμό τους εμπλέκονται ένζυμα όπως η καταλάση, το σουπεροξειδίου της δυσμουτάσης και πεπτίδια όπως η γλουταθειόνη (GSH) [A. Y. Andreyev, et.al. 2005].

In vitro, οι MTs αλληλεπιδρούν με πλήθος ROS (σουπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου, νιτρικό οξύ και υπεροξυνιτρικό) με επακόλουθη απελευθέρωση Zn [Y. J. Kang, et.al. 2006]. Τα ROS και το οξειδωτικό στρες αυξάνουν την έκφραση των MTs μέσω του MTF-1 (metal response element-binding transcription factor-1) που είναι η κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη για την έκφραση των MTs. Η επαγωγή των MTs μέσω της δέσμευσης του Zn στον MTF-1 έχει γίνει αντιληπτή in vivo σε συνθήκες οξειδωτικού στρες αλλά και υπό την παρουσία τοξικών μετάλλων [M. S. Stitt, et.al. 2006]. Ο εκτεταμένος ρόλος των MTs και του Zn στον έλεγχο του οξειδωτικού προφίλ φαίνεται από την απελευθέρωση του Zn σε συνθήκες οξειδωτικού στρες αλλά και την αλληλεπίδραση τους με ένα πλήθος οξειδοαναγωγικών μορίων σημαντικών για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων.

1.7 MTs και αναπνοή και Zn

Η διακοπή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από τον Zn είναι γνωστή από χρόνια. Από τα 4 συμπλέγματα της αναπνευστικής αλυσίδας η λειτουργία των I και III αναστέλλονται έντονα από Zn [K. E. Dineley, et.al., 2003]. Επώαση μιτοχονδρίων με φυσιολογικά επίπεδα MTs προκαλεί την είσοδο των MTs μέσα στα μιτοχόνδρια κάτι που έχει φανεί να επηρεάζει αρνητικά την κατανάλωση οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια [C. Simpkins et.al., 1998]. Έρευνες δείχνουν ότι οι MTs μπορεί να εντοπιστούν στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σε κύτταρα ήπατος αλλά όχι σε καρδιακά, ενώ ο τόπος διακοπής της αναπνοής είναι απευθείας στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πάνω στην μιτοχονδριακή μεμβράνη [B. Ye et.al., 2001].

Ο ελεύθερος Zn αναστέλει την αναπνοή σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που ο Zn απαντάται στις MTs. Επομένως οι MTs μπορεί να ελευθερώνουν τον Zn που απαιτείται για την διακοπή της αναπνευστική αλυσίδας. Αντίθετα η αναπνοή αποκαθίσταται με την προσθήκη θειονινών (T) [B. Ye et.al., 2001]. Τέτοιες παρατηρήσεις τοποθετούν τον Zn και τις MTs στοιχεία «κλειδιά» στην κυτταρική παραγωγή ενέργειας και το σύστημα MT/T πιθανό ρυθμιστή λειτουργία της κυτταρικής αναπνοής.

2. Δράση των MTs στο νευρικό σύστημα

Ο Zn λειτουργεί σαν παράγοντας μετάδοσης σήματος στα συναπτικά σωμάτια και μαζί με το γλουταμινικό απελευθερώνεται επιλεκτικά από τα εγκεφαλικά νεύρα [C.J. Frederickson et.al. 2005]. Φαίνεται να ρυθμίζει την ολική ευερεθιστότητα και την συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων στον εγκέφαλο μέσω της δράσης του σε κυτταρικούς υποδοχείς και ιοντικά κανάλια, αλλά η υπεραύξηση του είναι τοξική [Y. Zhang et.al.2007]. Ένας άλλος ρυθμιστής της νευροδιαβίβασης και της κυτταρικής επικοινωνίας το NO, αλληλεπιδρά συνεργιστικά με τον Zn και τις MTs, προς οξείδωση του και απελευθέρωση Zn, δείχνοντας ότι η MT έχουν την δυνατότητα να μετατρέπουν το σήμα NO σε σήμα Zn [S. C. Burdette et.al., 2003].

Σε σύγκριση της MT-3 που της αποδίδεται δράση αναστολέα της νευρικής αύξησης, με τις ισομορφές MT-1 και MT-2, φαίνεται το δυναμικό αυτό μόριο να είναι πιο περίπλοκο [P. Palumaa et.al., 2005]. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι προσπάθειες να χαρακτηριστεί λεπτομερώς με ανάλυση NMR η β-υπομονάδα της MT-3 δεν έχουν καρποφορήσει όπως για τις α και β υπομονάδες των άλλων MT ισομορφών, λόγω των ταχέων δυναμικών της αλλαγών [G. Oz et.al., 2001]. Η δυναμική αυτή οφείλεται στις γρήγορες εναλλαγές Cu/Zn στην β-υπομονάδα της MT -3 και θεωρείται υπεύθυνη για τις τόσο χαρακτηριστικές της λειτουργίες. Η MT-3 αλλά όχι οι άλλες 2 έχει βρεθεί να προστατεύουν από το τοξικό αποτέλεσμα των αμυλοειδών β-πεπτιδίων και η δράση τους αυτή στηρίζεται στην διαφορετική οικοδόμηση της β-υπομονάδας (επιπλέον κατάλοιπα Thr5, Pro7, Pro9 και Gln23) [Y. Irie et.al., 2003].

Τόσο ο Cu όσο και ο Zn έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις καθώς και με τη βλάβη από ελεύθερες ρίζες. Ο Cu στη νόσο Alzheimer (AD) συνδέεται με τα β-πεπτιδία, ενώ στο Parkinson (PD) με τις πρωτεΐνες α-συνουκλεΐνης [D. R. Brown et.al., 2004]. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μορφή Zn7MT3

(περιέχει 7 ιόντα Zn) αντιδρά με το ιόντα του Cu που είναι συνδεδεμένα στα διαλυτά αλλά και στα συσσωρευμένα αμυλοειδή β-πεπτίδια, απελευθερώνοντας Zn [G. Melon, 2008]. Συγχρόνως όμως τα ιόντα Cu/Zn προστατεύουν από τα ROS μέσω της ψευδαργυροπρωτεΐνης Cu/Zn-SOD (Superoxide dismutases 1). Οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου αποτελούν μια ομάδα ενζύμων υπεύθυνων για την κατάλυση της αυτοξειδωαναγωγής του σουπεροξειδίου (O₂⁻) σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου προκαλεί πρωτεϊνική συσσώρευση κατά την νευρολογική πάθηση ALS [B.F. Shaw et.al., 2007]. Στις προαναφερόμενες νευροεκφυλιστικές ασθένειες καθώς και στο Creutzfeldt–Jakob, τα επίπεδα των MT-1 και -2 αυξάνονται ενώ στις περισσότερες μελέτες αυτά των MT-3 μειώνονται [J. Hidalgo et.al, 2006, R. D. Palmiter et.al., 1998].

Έχει αποδειχθεί ότι αντίθετα με την MT-3, η MT-2 έχει την ικανότητα να επηρεάζει θετικά την αύξηση των νευριτών σε νευρικά κύτταρα φλοιού επίμυος [Chung et al., 2003], κύτταρα ιππόκαμπου και μέλαινας ουσίας [Kohler et al., 2003]. In vivo όμως οι MT1/2 δεν εκφράζονται στους νευρώνες αλλά κυρίως στα κύτταρα γλοίας και καθώς ελλείπονται σηματοδοτικών πεπτιδίων θεωρείται ότι η δράση τους είναι κυρίως ενδοκυτταρική. Ενδιαφέρον είναι ότι έπειτα από νευρικό τραυματισμό τα κοντινά αστροκύτταρα φαίνεται να αναγνωρίζουν το τραύμα και εκλύουν εξωκυττάρια αυξημένα επίπεδα MT1/2 με σκοπό την νευρική αύξηση και αναγέννηση [Chung et al., 2008]. Αν και ο μηχανισμός εισόδου των MTs στα νευρικά κύτταρα δεν είναι ακόμη ταυτοποιημένος, έχει προταθεί ότι οι μεμβρανικοί υποδοχείς χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDLReceptors) αποτελούν την οδό εισόδου τους καθώς οι MT-2 έχει φανεί να συνδέονται μαζί τους in vitro σε νεφρικά κύτταρα [Wolff et al., 2006]. Ακόμη πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι στα κοκκιώδη νευρικά κύτταρα παρεγκεφαλίδος CGN (cerebellar granule neurons) η αυξητική δράση των MT1/2 εξαρτάται από τους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCR) και εκκινούν ένα καταρράκτη ενδοκυτταρικών κινασών [J. W. Asmussen et.al.,2009].

Η έκφραση των μεταλλοθειονινών στο ΚΝΣ είναι σχετικά τεκμηριωμένη με τις 1 και 2 ισομορφές να εκφράζονται μειωμένα, εκτός από περίπτωση τραυματισμού και την MT-3 να εμφανίζεται σε όλους τους τύπους νευρικού ιστού με τα αστροκύτταρα αλλά και τους νευρώνες να συμμετέχουν στη παραγωγή τους [Hidalgo et al., 2001]. Οι συγκεντρώσεις αυτές μεταβάλλονται διαφορετικά σε κάθε ξεχωριστή παθολογική κατάσταση του ΚΝΣ. Στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο Alzheimer τα επίπεδα των MT3 μειώνονται [Errikson

et.al., 1994] ενώ αυξάνονται σε άλλα προβλήματα του ΚΝΣ όπως εγκεφαλική ισχαιμία [S Yanagitani,1999] και εγκεφαλικές κακώσεις από μηχανικό τραύμα [I. Hozumi et.al., 1995].

Ο φαινότυπος των διαγονιδιακών ποντικών που δεν εκφράζει MT-3 δεν παρουσιάζει κάποια ανωμαλία, όταν όμως χορηγηθεί καϊνικό οξύ (ανάλογο του γλουταμινικού) παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία και θνησιμότητα. Συγκεκριμένα φάνηκε εκτεταμένη καταστροφή νευρικών κυττάρων στην CA3 πυραμιδική περιοχή του ιπποκάμπου (περιοχή που σχετίζεται με τη μνήμη και μάθηση), αλλά μεγαλύτερη επιβίωση στην CA1 περιοχή σε σχέση με τα control [Erickson et al., 1997]. Αντίθετα η διαγονιδιακή υπερέκφραση τους δίνει τα αντίθετα αποτελέσματα προστατεύοντας από νευρωνικό θάνατο. Παρόμοια συμπεράσματα έδωσαν μετέπειτα *in vitro* μελέτες σε πρωτογενή εγκεφαλικά κύτταρα, όπου η MT-3 προστατεύει από τα νευροτοξικά αποτελέσματα του γλουταμινικού [Montoliu et al., 2000].

Όταν το πειραματικό μοντέλο ποντικών για ALS (ονόματι G93A) που περιέχει μια μετάλλαξη στο γονίδιο της SOD1 (Cu/Zn δισμουτάση του σουπεροξειδίου) διασταυρώθηκε με ποντίκια MT-3^{-/-} στους απογόνους ενισχύθηκε η βλάβη και ο κυτταρικός θάνατος των κινητικών νευρώνων [Puttapparthi et al., 2002]. Σύμφωνα μ' αυτό το αποτέλεσμα έδωσε και έρευνα που χρησιμοποίησε σε επίμυες στέλεχος αδενοϊού για υπερέκφραση των MT3 και φάνηκε να δρουν προστατευτικά σε τραυματισμένους κινητικούς νευρώνες [Sakamoto et al., 2003]. Παρόλα αυτά η αρχική ονομασία των MT3 ως GIF (Growth Inhibitory Factor) φαίνεται να είναι βάσιμη, καθώς σε *in vivo* απουσία τους αυξάνεται η έκφραση αυξητικών παραγόντων και νευροτροφινών (π.χ. GAP43) [Bibel and Barde, 2000] που είχε αρχικά φανεί και *in vitro* [Erickson et al., 1994]. Το ίδιο αποτέλεσμα έδωσαν και πιο σύγχρονες μελέτες σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων του φλοιού [Z.C Ding et.al.,2008]. Πιθανώς ο μη καθιερωμένος ακόμη ρόλος της ισομορφής 3 των μεταλλοθειονινών να εξυπηρετεί διαφορετικές λειτουργίες σε περιοχές του ΚΝΣ, ενισχύοντας την νευρική επιβίωση (CA3) ή ίσως και θνησιμότητα (CA1) και αποτρέποντας την νευρωνική αύξηση (sprouting). Αν και η βιβλιογραφία στηρίζει τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες των MT3, οι μηχανισμοί που θα πιστοποιήσουν κάτι τέτοιο δεν είναι ξεκάθαροι και αρκετά αποτελέσματα φαίνεται να αντικρούονται.

Γ. HEAT SHOCK PROTEINS

1. Γενικά

Κατά την μετάφραση των πρωτεϊνών, καθώς όλα τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα δεν είναι ακόμη παρόντα, δεν είναι δυνατό οι νέες πολυπεπτιδικές αλυσίδες να σχηματίσουν όλους τους απαραίτητους δεσμούς που σταθεροποιούν την τελική πρωτεϊνική δομή. Ο κορεσμός του ένδο- και έξω-κυττάριου περιβάλλοντος σε πρωτεΐνες διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σταθερά αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων. Οι πρωτεΐνες μοριακοί «συνοδοί» (chaperones) έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν και επιλεκτικά να δεσμεύουν μη ενσωματωμένες πρωτεΐνες και να τις μετατρέπουν σε σταθερά μόρια [R. J. Ellis, 1990]. Τα πρωτεϊνικά μόρια συνοδοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο αποτρέποντας λάθη στην πρωτεϊνική δόμηση και συσσωρευση μη-αναδιπλωμένων ενδιάμεσων.

Σήμερα είναι γνωστό ότι οι μοριακοί πρωτεϊνικοί συνοδοί (Chaperones) και ομο-συνοδοί (Co-chaperones) συγκροτούν μοριακές νανομηχανές οι οποίες επιδιορθώνουν (μέσω πρωτεϊνικής αναδίπλωσης) ή απομακρύνουν από το κύτταρο (μέσω μηχανισμών καταβολισμού) λανθασμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Μέσω αυτών των μηχανισμών το κύτταρο αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης διότι αφενός μεν αυξάνει τα φυσιολογικά μόριά του και αφετέρου απομακρύνει τα κατεστραμμένα και μη-λειτουργικά πρωτεϊνικά υποστρώματα. Σε περιπτώσεις στρες τα μη-φυσιολογικά υποστρώματα αυξάνονται και εμπλέκονται στον δρόμο των φυσιολογικών μορίων εμποδίζοντας έτσι τα μεταβολικά μονοπάτια να προσφέρουν τα προϊόντα τους και να επιτευχθεί ομοιοστασία των κυττάρων [F.U. Hartl, 1996]. Οι μοριακοί συνοδοί αποτελούνται από ποικίλες εξελικτικά διατηρημένες πρωτεΐνες, οι περισσότερες των οποίων ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των Hsp.

1.1 Οικογένεια Heat Shock Proteins

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp (Heat shock proteins) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα. Οι Hsps ταξινομούνται σε διαφορετικές οικογένειες με βάση το μοριακό τους βάρος: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 και τις μικρότερες ομάδες των Hsps. Θεωρείται ότι εξελικτικά πιο διατηρημένες είναι οι πρωτεΐνες συνοδοί της οικογένειας των Hsp70 [P. J. Muchowski, et al. 2005].

Πίνακας 2: Υποκυτταρική εντόπιση και λειτουργίες των ομάδων Hsp [Muchowski et.al 2005].

| Πρωτεΐνη | Υποκυτταρική εντόπιση | Λειτουργία |
|----------|--|---|
| Hsp100 | Πυρήνιο | Προστασία επί Stress Θερμοαντοχή |
| Hsp90 | Κυτταρόπλασμα | Μεταφορά και στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Δέσμευση υποδοχέων στεροειδών ορμονών και πρωτεϊνικών κινασών |
| Hsp70 | Κυτταρόπλασμα/πυρήνας Ενδοπλασματικό δίκτυο | Αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Σύνδεση ολιγομερών συμπλεγμάτων |
| Hsp60 | Κυτταρόπλασμα | Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών |
| Hsp40 | Κυτταρόπλασμα | Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Ρύθμιση λειτουργίας Hsp70 |
| Hsp27 | Κυτταρόπλασμα | Σύνδεση /αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Θερμοαντοχή Δέσμευση στεροειδών ορμονών Κυτταρικός κύκλος |

Σχεδόν όλες οι ομάδες των Hsp έχουν τουλάχιστον ένα μέλος τους εκφρασμένο σε σταθερά επίπεδα που συμμετέχει σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ενδοκυττάρια μεταφορά και η τρισδιάστατη δόμηση των πρωτεϊνών (housekeeping role), ενώ άλλες πρωτεΐνες συνοδοί των Hsp παράγονται αποκλειστικά ή σε αυξημένα επίπεδα σε καταστάσεις ανάγκης ανάλογα με τον τύπο και το είδος του ερεθίσματος. Το κοινό χαρακτηριστικό στις σταθερά εκφραζόμενες και στις επαγόμενες Hsps είναι ότι δεσμεύονται εκτεθειμένα υδροφοβικά τμήματα των μη αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων, ώστε να επιτραπεί η δόμηση, η μεταφορά και η συνδεσμολογία του πολυπεπτιδίου, μέσω ενός κύκλου δέσμευσης και απελευθέρωσης [B. Bukau, et al., 2006].

1.2 Μεταγραφική ρύθμιση

Ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των Hsp είναι ο HSF1 (Heat Shock transcription Factor1) [L. Pirkkala et al., 2001]. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο HSF1 βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση συνδεδεμένος με τις Hsp90, Hsp40 και Hsp70 [R. I. Morimoto et al., 1998]. Υπό στρεσογόνα ερεθίσματα, ο HSF1 απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα και εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται στον υποκινητή-προμώτορα των Hsps, HSE (Heat Shock Element) προκαλώντας την έκφρασή τους [R. Voellmy, 2004]. Ο άμεσος έλεγχος του HSF1 από τις Hsps σε φυσιολογικές συνθήκες έχει ως πλεονέκτημα την ταχύτατη (εντός λίγων λεπτών) γονιδιακή έκφραση σε

συνθήκες κυτταρικού στρες. Πολλά γονίδια των Hsps περιέχουν επιπρόσθετα εναλλακτικούς προμότερες που επιτρέπουν γονιδιακή έκφραση μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών και σε αναλογία με το κυτταρικό περιβάλλον.

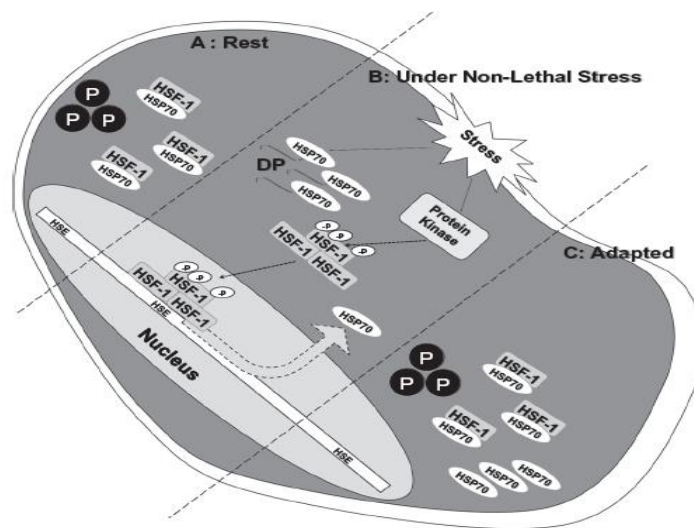
Επιπλέον του μεταγραφικού ελέγχου μέλη από την οικογένεια των Hsp ρυθμίζονται και με μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις όπως δέσμευση με νουκλεοτίδια, προσθήκες άνθρακα, φωσφορυλίωση, ολιγομεροποίηση και αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η δραστηριότητα στις Hsp70 και -90 οικογένειες ρυθμίζεται από την δράση άλλων ομο-συνοδών πρωτεϊνών όπως την DNAJ/Hsp40 οικογένεια, τους HspH/Hsp110 παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων και μικρότερες ομο-συνοδές πρωτεΐνες (BAG, Hop: Hsp-organizing protein και Hip: Hsp-interacting protein) [Brinker et al., 2002]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις και οι μετα-μεταγραφικές μετατροπές βοηθούν τις Hsp να ανταποκρίνονται με ταχύτητα και ευαισθησία στις περίπλοκες αλλαγές του κυτταρικού περιβάλλοντος, βοηθώντας σε πολλές περιπτώσεις στην επιβίωση του.

2. Hsp70

2.1 Γενικά

Η οικογένεια των Hsp70 κυμαίνεται σε μεγέθη από 70 έως 78 kDa και έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο άφθονα εκφρασμένη Hsp στα κύτταρα, φθάνοντας έως και 1-2% των κυτταρικών πρωτεϊνών [Madden LA et al., 2008]. Οι πιο μελετημένες Hsp72 και Hsp73 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, εμφανίζουν όμοια χαρακτηριστικά, με κύρια διαφορά την εύκολη επαγωγή της Hsp72 από το στρες [Noble EG et al. 2008]. Σαν ομο-συνοδοί πρωτεΐνες οι Hsp70 αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων και να βοηθήσουν στην σωστή αναδίπλωση τους. Στις σημαντικές λειτουργίες των Hsp συμπεριλαμβάνονται η μετατόπιση πρωτεϊνών, η αντι-αποπτωτική τους δράση και η αντι-φλεγμονώδης τους απόκριση. Η αντιφλεγμονώδης δράση των Hsp70 στηρίζεται στην αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον πυρηνικό παράγοντα j-B (NF-jB), διακόπτοντας την μεταφορά του στον πυρήνα και συνεπώς την φλεγμονώδη αντίδραση [Homem de Bittencourt Jr PI et al., 2007]. Σχετικά πρόσφατα οι Hsp βρέθηκε να επηρεάζουν την κυτταρική επικοινωνία [Calderwood SK. et al, 2007], την ανοσοποιητική απάντηση [Johnson JD et al. 2006] και να εμπλέκονται σε καταστάσεις χρόνιων παθήσεων [Kampinga HH et al., 2007].

Η ρύθμιση της έκφρασης των Hsp γίνεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες HSF και τα στοιχεία HSE στην περιοχή του προμότορα του Hsp γονιδίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο HSF είναι ανενεργός και μονομερώς συνδεδεμένος με τις κυτταροπλασματικές Hsp70, χάνοντας την ικανότητα δέσμευσης στο DNA. Σε συνθήκες στρες του κυττάρου ή παρουσία ξεδιπλωμένων πρωτεϊνών, οι Hsp70 απελευθερώνουν τον HSF και δεσμεύουν τις μη φυσιολογικές πρωτεΐνες (δράση συνοδών). Ο απελευθερωμένος HSF έπειτα από συγκεκριμένες φωσφορυλιώσεις, τριμερίζεται (trimerisation) και μπορεί να συνδεθεί ισχυρά με τις περιοχές HSE του DNA, εκκινώντας έτσι την μεταγραφή των Hsp mRNA [Noble E.G. et.al. 2008]. Οποιαδήποτε μη θανατηφόρα έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες προκαλεί την εμφάνιση των Hsp70 στο κυτταρόπλασμα [Madden LA et.al., 2008].



Σχήμα 9: Ενεργοποίηση της απόκρισης του θερμικού σοκ. Α) Σε ηρεμία ο HSF-1 είναι ανενεργός και συνδεδεμένος με την HSP70. Β) Σε συνθήκες μη θανατηφόρου στρες και υπό την παρουσία μεταουσιωμένων πρωτεϊνών (DP) η HSP70 συνδέεται με αυτές ελευθερώνοντας την HSF-1 η οποία εκκινεί την μεταγραφή του Hsp70 mRNA. C) Μετά την προσαρμογή στο στρεσογόνο παράγοντα τα επίπεδα HSP70 στο κύτταρο είναι υψηλότερα και συνδέονται με τον HSF-1 διακόπτοντας την περαιτέρω παραγωγή HSP70 [M. Krause et.al., 2011]

Η παρουσία και η αύξηση των Hsp είναι σημαντική για την προσαρμογή του κυττάρου στο στρες. Σε περιπτώσεις αναστολής ή απουσίας τους το αποτέλεσμα είναι αυξημένη ευαισθησία του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα [Rubio E et.al., 2002]. Έπειτα από μια στρεσογόνα κατάσταση στο κύτταρο ο Hsp70 συνδέεται και πάλι με τον HSF, αποτρέποντας έτσι την δέσμευση του στο HSE και την παραγωγή περαιτέρω Hsp70. Τελικά τα αυξημένα επίπεδα των Hsp70 επιφέρουν προσαρμογή του κυττάρου στον στρεσογόνο παράγοντα.

2.2 Hsp70 και απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια συνεχής φυσιολογική διαδικασία μη φλεγμονώδους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με χαρακτηριστικά μιας αυτοκατευθυνόμενης κυτταρικής αυτοκτονίας. Αποτελεί μία ενεργή πορεία που χαρακτηρίζεται από κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνική και κυτταροπλασματική συμπύκνωση, τεμαχιοποίηση της χρωματίνης και φαγοκύτωση [Kerr et.al.,1972].Υπό την επίδραση διαφόρων στρεσογόνων ερεθισμάτων όπως έκθεση σε φυσικούς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία και η υπερθερμία, καθώς και τοξικούς, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το κύτταρο μπορεί να ενταχθεί στην διαδικασία της απόπτωσης μέσω 2 βασικών οδών: την ενδογενή ή οδό μιτοχονδριακού θανάτου και την εξωγενή ή προκαλούμενη απ' τους υποδοχείς. Η μία οδός επηρεάζεται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και είναι εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει βιοχημικό σήμα το οποίο προέρχεται από υποδοχείς θανάτου κυρίως της οικογένειας TNF. Τα 2 αυτά μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο [Budihardjo et al 1999].

Κατά τη διαδικασία της «ενδογενούς» (intrinsic) αποπτωτικής οδού, έπειτα από σήματα θανάτου, η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη γίνεται διαπερατή, ελευθερώνοντας προνεκρωτικά μόρια (κυτόχρωμα c και Smac ή Diablo) στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c ενώνεται με τον παράγοντα Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) προς δημιουργία ενεργού αποπτωσώματος και την δέσμευση της προκασπάσης-9. Με τη σειρά της η Smac πρωτεΐνη (Second mitochondria-derived activator of caspases) αναστέλλει τις IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), το αποπτώσωμα ενεργοποιεί την προκασπάση-9, η οποία τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω της ενεργής κασπάσης-3.

Οι κυτταρικοί υποδοχείς που δεσμεύουν τα «εξωκυτάρια σήματα θανάτου» (όπως TNF-α, Fas Ligand) ενεργοποιούν την «εξωγενή» (extrinsic) αποπτωτική οδό μέσω σχηματισμού του συμπλέγματος DISC (Death Inducing Signal Complex). Έπειτα το DISC ενεργοποιεί την προκασπάση-8, η οποία οδηγεί σε θανάτωση του κυττάρου μέσω της κασπάσης-3 [Yan and Shi 2005].

Οι κασπάσες ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης και αποτελούν ένα πρωτεολυτικό σύστημα απαραίτητο για το μηχανισμό της απόπτωσης. Οι κασπάσες που δρουν στην καταστροφή του κυττάρου ονομάζονται «δραστικές» (effectors ή executioners), όπως είναι οι κασπάση-3, ενώ αυτές που δρουν στην έναρξη της καταστροφής του κυττάρου ως απάντηση στα αποπτωτικά σήματα ονομάζονται «πρόδρομοι» (initiator), όπως είναι οι κασπάσες -8, -9 [Shi Y. 2002].

Το κυτταρικό στρες και ο κυτταρικός θάνατος είναι συνδεδεμένα γεγονότα και οι Hsp που επάγονται βοηθούν το κύτταρο να επιβιώσει παίζοντας σημαντικό ρόλο στους προστατευτικούς μηχανισμούς. Σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται οι Hsp και οι αποπτωτικές πρωτεΐνες να έχουν αντίθετους ρόλους. Τόσο οι Hsp90 άλλα και οι Hsp70 ομάδες έχει φανεί να έχουν κυρίως αντι-αποπτωτικό ρόλο σε σημεία-κλειδιά των αποπτωτικών οδών. Προστατεύουν από κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τον TNF (Tumor Necrosis Factor), μονοκύτταρα, οξειδωτικό στρες, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και ακτινοβολία [Jaattela and Wissing 1993; Simon et.al 1995; Mosser et al 1997; Arya R, 2007] (Σχήμα 10).

Η αποπτωτική οδός που ενεργοποιείται από νιτρικό οξύ και θερμικό σοκ επιφέρει την μετακίνηση του Bax (προαποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2) από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, αλλά διακόπτεται όταν υπερεκφράζεται Hsp70 [Gotoh et.al. 2004]. Επίσης στην «ενδογενή» αποπτωτική οδό η Hsp70 αναστέλλει την δημιουργία λειτουργικού αποπτωσώματος αλληλεπιδρώντας με το Araf-1/cyto-c σύμπλεγμα και μην επιτρέποντας την προ-κασπάση-9 να δεσμευτεί [Beere et.al 2004]. Εκτός από την λειτουργία της σαν chaperone (συνοδός) η Hsp70 βρέθηκε ότι αποτρέπει την φωσφορυλίωση της JNK (c-Jun-N-terminal kinase) βοηθώντας στην επιβίωση του κυττάρου [Mosser et.al 1997].

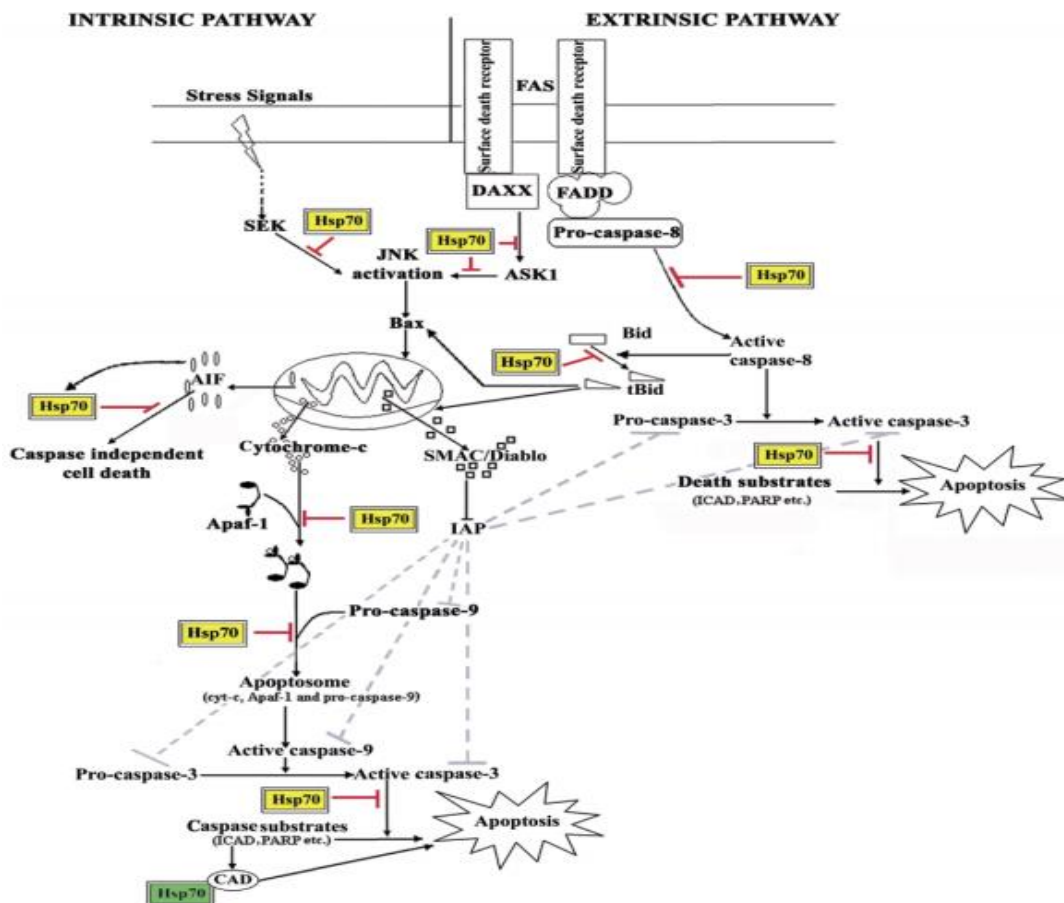
Ο 'κρίκος' μεταξύ της ενδο- και εξωγενούς αποπτωτικής οδού θεωρείται η ενεργοποίηση του Bid (προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2) από την κασπάση-8, που επιτρέπει στην Bax να μεταβεί στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και να εκκινήσει την απελευθέρωση διαφόρων παραγόντων θανάτου. Η Hsp70 ελέγχει την ενεργοποίηση του Bid, έχοντας έτσι την ικανότητα να ρυθμίζει και τις 2 οδούς [Gabai et.al., 2002]. Επιπλέον διάφορα ερεθίσματα θανάτου όπως από TNF-α και Fas διακόπτονται καθώς παρεμποδίζεται η λειτουργία του ASK-1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1 γνωστή και ως MAP3K5) [Park et.al 2002].

Η Hsp70 παίζει επίσης αντι-αποπτωτικό ρόλο μέσω της σύνδεσης της με τον AIF (Apoptosis Inducing Factor) που ελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια έπειτα από σήματα θανάτου και τον οποίο αποτρέπει να μεταβεί στον πυρήνα [Gurbuxani et al 2003]. Έχει ακόμη βρεθεί ότι η Hsp70 εμποδίζει την κυτταρική οδό θανάτου που εκκινεί από τα λυσοσώματα διατηρώντας την ακεραιότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης και αποτρέποντας την απελευθέρωση καθεψίνης στο κυτόπλασμα [Nylandsted et al 2004].

Αντίθετα μ' όλα τα παραπάνω έχει φανεί σε Jurkat T λεμφοκύτταρα ότι η Hsp70 ενισχύει το αποπτωτικό αποτέλεσμα των Fas/Apo-1 πιθανώς με αλληλεπίδραση με την ενδονουκλεάση DNAση, που ενεργοποιείται από κασπάσες (CAD) [Liou et al 1997].

Εκτός όμως της Hsp70 οικογένειας σημαντικό ρόλο στην απόπτωση διαδραματίζουν και κυρίως οι Hsp90 και Hsp27. Συνοπτικά, για τις Hsp90 έχει βρεθεί ότι η αντι-αποπτωτική τους δράση αποτρέπει την ενεργοποίηση του καταράκτη των κασπασών από τον Araf1 και την σταθεροποίηση πρωτεϊνών επιβίωσης (Rip, Akt, Bcl-2). Οι Hsp27 επίσης λειτουργούν αντι-αποπτωτικά αποτρέποντας τον Bid, τα ROS και το κυττόχρωμα c να εκκινήσουν τις κασπάσες [Lanneau D. 2007].

Οι Hsp αποτελούν ένα από τους πιο διατηρημένους εξελικτικά αμυντικούς μηχανισμούς σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τα βακτήρια έως τα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η προσαρμογή τους στους νέους εξελικτικά κυτταρικούς μηχανισμούς τους έδωσε σε πολλές περιπτώσεις, όπως στις αποπτωτικές οδούς, τον ρόλο του ρυθμιστή στα μοριακά μονοπάτια. Τα επίπεδα έκφρασής τους μπορεί να καθορίσουν τον θάνατο ή επιβίωση ενός κυττάρου.



Σχήμα 10: Η Hsp70 σε κίτρινο φόντο δρά αντι-αποπτωτικά αναστέλλοντας (κόκκινη γραμμή) την αποπτωτική διαδικασία. Σε πράσινο φόντο η Hsp70δρά προ-αποπτωτικά καθώς είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της DNAσης (δεσοξυριβονουκλεάση) από την κασπάση [Arya R, 2007].

Δεν είναι τυχαίο ότι οι Hsp είναι πρωτεΐνες έντονης ερευνητικής μελέτης ανά τον κόσμο καθώς οι θέσεις «κλειδιά» που ελέγχουν στα βιοχημικά μονοπάτια των κυττάρων και οι μεταβολές έκφρασής τους σε παθολογικές και καρκινικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να εγείρουν νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

2.3 Hsp70 στο νευρικό σύστημα

Η ικανότητα του κυττάρου να εκκινήσει μια απόκριση σε συνθήκες στρες είναι καίρια για την επιβίωση του. Σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, τα επίπεδα των μη-φυσιολογικά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών μπορεί να ξεπεράσουν τις δυνατότητες των προστατευτικών μηχανισμών του κυττάρου οδηγώντας σε δυσλειτουργία και θάνατο. Σε χρόνιες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (όπως ALS, PD και AD), η αδυναμία ενεργοποίησης του απαιτούμενου μηχανισμού απάντησης (heat shock response) προκαλεί συσσώρευση μη-φυσιολογικών πρωτεϊνών [Adachi H et.al., 2009]. Σε διαφορετικές περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών παθήσεων έχουμε και διαφορετικές ομάδες νευρικών κυττάρων που επηρεάζονται. Στη νόσο Alzheimer (AD) η μείωση στους νευρώνες του ιππόκαμπου και του ενδορινικού φλοιού (ρινικός εγκέφαλος) οδηγούν σε άνοια και φαίνεται να εμφανίζουν συγκριτικά μειωμένα επίπεδα Hsp70. Αντίθετα στην αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (ALS) ο βαθμιαίος θάνατος των κινητικών νευρώνων στον νωτιαίο σωλήνα και τον κινητικό φλοιό συνοδεύεται με υψηλά επίπεδα Hsp70 [S. Chen et.al, 2007]. Σε μοντέλα τρωκτικών έχει φανεί ότι οι διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται κατά τις πολυγλουταμινικές νευροεκφυλίσεις (polyQ: polyglutamine, π.χ. Huntingtons disease) εμφανίζουν μεταβλητές συγκεντρώσεις Hsp70 [Y. Nagai et.al., 2010]. Στην απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στις περιοχές της μέλαινας ουσίας στην ασθένεια του Parkinson οι συγκεντρώσεις των Hsp70 δεν παρουσιάζουν μείωση ή αύξηση [A.H.V. Schapira et.al., 2004].

Είναι γνωστό ότι τα νευρικά κύτταρα λόγω έλλειψης κυτταρικής διαίρεσης εμφανίζουν ευαισθησία στην δημιουργία μη-φυσιολογικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Σε όλες τις παραπάνω νευροεκφυλιστικές ασθένειες οι κύριοι θεραπευτικοί στόχοι είναι οι συσσωρευμένες λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα πολλές μελέτες να εστιάζουν στον νευροπροστατευτικό ρόλο των Hsp. Η ενεργοποίηση της απάντησης θερμικού σοκ (HSR: Heat Shock Response) αυξάνει τα επίπεδα Hsp70, προστατεύοντας τα νευρικά κύτταρα σε διάφορα μοντέλα νευροεκφύλισης. In vitro και in vivo έρευνες

φανερώνουν ότι η συσσώρευση παθολογικών πρωτεϊνών διακόπτεται όταν μέλη των Hsp70 και Hsp40 συνοδών υπερέκφραζονται μαζί και δρουν συνεργατικά [P.J. Muchowski et.al.,2000]. Σε μοντέλα *Drosophila* και ποντικών της εκφυλιστικής νόσου Parkinson φάνηκε ότι υπερέκφραση Hsp70 μειώνει τα επίπεδα συστάδων α -Syn που οδηγούν στην παθολογία της νόσου [J. Klucken et.al., 2004]. Έπειτα από πολλές μελέτες, η πιο επικρατής υπόθεση είναι ότι η Hsp70 διαλυτοποιεί την α -Syn και εκκινεί την καταστροφή της αδιάλυτης μορφής της μέσω αυτοφαγίας, παρουσία συνοδών πρωτεϊνών και πρωτεοσώματος [S. N. Witt et.al., 2010].

Τουλάχιστον το 20% των περιπτώσεων ALS οφείλεται σε μια μεταλλαγμένη μορφή του SOD1 ανθρώπινου γονιδίου. Σε αναλογία με άλλες παθήσεις που οφείλονται σε συγκέντρωση λανθασμένα-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, η υπερέκφραση Hsp (40 και 70) μειώνει αποτελεσματικά τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων σε διαγονιδιακά μοντέλα που εκφράζουν την παθολογική SOD1 [Z. Batulan et.al.,2006].

Συγχρόνως σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι Hsps φαίνεται να προστατεύουν το νευρικό σύστημα μέσω ενός μηχανισμού μη-σχετιζόμενου με την ιδιότητά τους ως συνοδών πρωτεϊνών. Οι Hsp70 αποτρέπουν την επαγωγή απόπτωσης στον εγκέφαλο, αυξάνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα μέσω ρύθμισης αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα ο p53 και ο AIF. Σε μοντέλα για τη μελέτη της ισχαιμίας, διαγονιδιακή υπερέκφραση των Hsp70 πρωτεϊνών μειώνει την απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (πρωτεΐνη μεταφοράς e- στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, η απελευθέρωση της εκκινεί αποπτωτικές διαδικασίες) [Y. Matsumori et.al., 2005]. Επίσης υπερέκφραση τους οδηγεί σε δέσμευση τους με τον AIF (Apoptosis Inducing Factor) και αποτροπή μετακίνησης του στον πυρήνα [Sun, Y et.al.,2006].

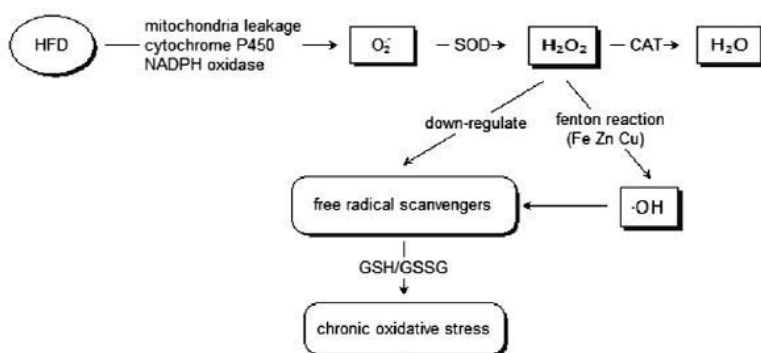
Οι λειτουργίες των Hsp αντικατοπτρίζονται σε ένα πλήθος κυτταρικών μηχανισμών, πολύ περισσότερους από την πρωτεϊνική αναδίπλωση και τον ρόλο των ομο-συνοδών. Οι διάφορες ομάδες των Hsp έχει βρεθεί σήμερα να εμπλέκονται εκτός των άλλων, σε διαδικασίες συναπτικής διαβίβασης, αυτοφαγίας, πρωτεϊνικών κινασών και σηματοδότησης του κυτταρικού θανάτου [Stetler, R et.al.,2010]. Τα επίπεδα των Hsp σε νευρολογικές κι όχι μόνο παθήσεις φαίνεται να είναι καίρια για την μοίρα των κυττάρων.

Α. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟ STRESS

Η παχυσαρκία είναι ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας που συνδέεται άμεσα με καρδιαγγειακές και μεταβολικές παθήσεις και δευτερογενώς με νευρικές βλάβες. Τα τελευταία χρόνια οι περιπτώσεις παχυσαρκίας στις βιομηχανικές (δυτικές) χώρες αυξάνονται. Τα στατιστικά αποτελέσματα εμφανίζουν ότι πάνω από το 17% των παιδιών και 32% των ενηλίκων στις Ηνωμένες Πολιτείες θεωρούνται παχύσαρκοι. Άλλωστε και η χώρα μας δεσπόζει στις πρώτες θέσεις της παιδικής παχυσαρκίας στην Ευρώπη.

Η παχυσαρκία και οι επιπλοκές που συνδέονται με αυτήν όπως ο διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία, η αθηροσκλήρυνση και κάποιες μορφές καρκίνου μελετώνται όλο και εντονότερα τα τελευταία χρόνια με την βοήθεια νέων αναλυτικών τεχνικών. Πρόσφατα με τη χρήση διατροφογενετικής (nutrigenomics) ανάλυσης μελετήθηκαν 31 γονίδια που εμπλέκονται με την παχυσαρκία σε πειραματικό μοντέλο ποντικών (C57Bl/6J) που έλαβαν δίαιτα υψηλών λιπαρών. Τα αποτελέσματα εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την β-οξείδωση και σύνθεση των λιπαρών οξέων και παράλληλη μείωση σε αυτά που σχετίζονται με την βιοσύνθεση στερολών και αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών [E. Kim et.al., 2010].

Το οξειδωτικό stress και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προτείνονται συχνά σαν κεντρικοί μηχανισμοί σε διάφορους ιστούς παχύσαρκων μοντέλων και σχετίζονται με την εμφάνιση διαβητικών επιπλοκών όπως χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και διαβητική νευροπάθεια. Αυξημένες εκπομπές H₂O₂ από τα μιτοχόνδρια κυττάρων νεφρού συγκαταγορούν στην μεταβολή την οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και την παραγωγή ROS σε πειραματικά ποντίκια υπό δίαιτα υψηλών λιπαρών [C. Ruggerio et.al. 2011].



Σχήμα 11: Λήψη δίαιτας υψηλών λιπαρών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα οδηγεί στην ενδοκυτταρική συσσώρευση ROS, μειώνει την μεταγραφική έκφραση των δεσμευτών ελευθέρων ριζών (free radical scavengers) καθώς και την ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων [Jue Cui et.al. 2009]

Επιπρόσθετα, μελέτη σε νευρικά κύτταρα φλοιού του εγκεφάλου επίμυων έδειξαν ότι διατροφή υψηλών λιπαρών προκαλεί νευρικό οξειδωτικό stress, φλεγμονή και ενεργοποίηση του παράγοντα nF-κB μέσω της βιοχημικής οδού της NADPH οξειδάσης [X. Zhang et.al. 2005].

1. Δίαιτα υψηλών λιπαρών και Zn

Πρώτη φορά το 1930 ο ψευδάργυρος αποδείχθηκε ότι αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της κρυσταλλικής δομής της ινσουλίνης και από τότε πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να φωτίσουν τη σχέση μεταξύ του ψευδαργύρου και της δράσης της ινσουλίνης. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι ο ψευδάργυρος είναι σε θέση όχι μόνο να σταθεροποιήσει τη δημιουργία των εξαμερών ινσουλίνης, μια μορφή αποθήκευσης της ινσουλίνης στα β-κύτταρα, αλλά και να βελτιώσει επίσης τη δέσμευση της ινσουλίνης στους υποδοχείς του ήπατος και να αναστείλει την αποδόμησή της [Arquilla ER 1978]. Σε μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τρωκτικά, συμπληρωματική χορήγηση ψευδαργύρου εξασθένησε την υπεργλυκαιμία και την υπερινσουλιναιμία σε αυτά [Simon SF et.al 2001].

Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας Zn ο οργανισμός είναι πιο ευπαθής σε οξειδωτικό stress και υπεροξείδωση των λιπιδίων. Ενώ αντίθετα η παρουσία του Zn αποτρέπει την λιπιδιακή υπεροξείδωση και πιθανώς δρα σαν αναστολέας της NADPH οξειδάσης [Tarieto H, 2003].

Συμπληρώματα Zn έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τον γλυκαιμικό έλεγχο σε διαβήτη τύπου 1 και 2 αλλά ο μοριακός μηχανισμός δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ο Zn παρουσιάζει ινσουλινομιμητικά αποτελέσματα μειώνοντας την παραγωγή κυτοκινών και ενισχύοντας την μεταγωγή του σήματος ινσουλίνης. Οι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) σε γονιδιακούς τόπους πρωτεϊνικών και ενζυμικών ψευδαργυρομόριων είναι ελάχιστα μελετημένοι, αλλά φαίνεται να είναι σημαντικοί για τον μεταβολισμό των λιπιδίων [Lietz G, 2009]. Μελέτες δείχνουν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 έχει συσχετιστεί με γονιδιακούς πολυμορφισμούς στα γονίδια τόσο του μεταφορέα του Zn ZNT-8 που είναι υπεύθυνος για τροφοδότηση Zn στα β-παγκρεατικά κύτταρα, όσο και στο γονίδιο της μεταλλοθειονίνης 1 [Jansen J.et.al 2009]. Επιπρόσθετα SNP στην περιοχή του προμότορα της IL-6 (-174/G/C) φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση των MTs αλλά και την διαθεσιμότητα Zn [Mocchegiani E, 2008].

Οι πολυπαραγοντικές αλληλεπιδράσεις του ψευδαργύρου σε γονιδιακούς τόπους δεν είναι πλήρως αναγνωρισμένες. Όπως προαναφέρθηκε περισσότερα από 500 ένζυμα και μεταγραφικοί παράγοντες έως τώρα είναι αποδεδειγμένο ότι εξαρτώνται από τον Zn και οι μορφές «δακτύλου» Zn, που έχουν την ικανότητα σύνδεσης με DNA, RNA, πρωτεΐνες και με μικρά σηματοδοτικά μόρια είναι απαραίτητες για πλήθος φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών και έκφραση γονιδίων. Η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζει ορισμένες κυτοκίνες (IL-6 και TNF- α) και πρωτεΐνες του στρες (HSP70-2) και επιδρά στην επιτυχία

γήρανση και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, όπως ο διαβήτης τύπου 2, η αθηροσκλήρωση και διάφορες λοιμώξεις [E. Mocchegiani, 2010].

Η ινσουλίνη είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού των λιπών και υδατανθράκων και έχει φανεί ότι η ρύθμιση και έκκριση της συνδέεται άμεσα με τον Zn. Μάλιστα ο προμώτορας των γονιδίων της (Ins1 και Ins2) βρέθηκε ότι περιέχει περιοχές ευαίσθητες σε μέταλλα (MRE) στις οποίες συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας Mtf-1 και ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση της ινσουλίνης στα παγκρεατικά-β κύτταρα. Πρόσφατη μάλιστα έρευνα έδειξε ότι ο μεταφορέας ψευδαργύρου ZnT7 παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των επιπέδων ινσουλίνης, ρυθμίζοντας την δράση του Mtf-1. Η υπερέκφραση δε του ZnT7 σε παγκρεατικά κύτταρα στην ίδια μελέτη έδειξε υψηλά επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης [L. Huang. 2010].

2. Δίαιτα υψηλών λιπαρών και Hsp70

Προαναφέρθηκε ότι οι Hsps έχουν μελετηθεί ευρέως ως προς τις ικανότητες τους να συμβάλουν στην σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση, την κυτταρική προστασία σε στρες και την συνολική ομοιόσταση του κυττάρου. Πρόσφατα φάνηκε ότι σε επίμυες υπό δίαιτα υψηλών λιπαρών (HFD), θερμική θεραπεία μπορεί να βελτιώσει την ανοχή στη γλυκόζη και την ευαισθησία των μυών στην ινσουλίνη, μειώνοντας την ενεργοποίηση των στρες κινασών [Gurte AA et.al 2009]. Συγκεκριμένα η Hsp70 φαίνεται να δρα ως αναστολέας της JNK ενώ η Hsp25 της IKKβ [Alford K. et.al., 2007]. Σε άλλη in vivo μελέτη σημειώθηκε ότι έκφραση της Hsp70 προστατεύει από αντίσταση ινσουλίνης που προκαλείται σε παχυσαρκία μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης της JNK [Chung J et.al.,2008]. Η ενεργοποίηση των κυττοκινών εξ' αιτίας χαμηλών επιπέδων Hsp στους ιστούς με ινσουλινο-αντίσταση είναι σχετικά νέα θεωρία στις μελέτες μεταβολικών παθήσεων και διαβήτη και σύμφωνα με τον Chung J. η πρόκληση έκφρασης Hsp θα μπορούσε να αποτελέσει ελπιδοφόρα νέα θεραπευτική προσέγγιση στην θεραπεία της αντίστασης ινσουλίνης.

Πιο πρόσφατη μελέτη σε μοντέλο πειραματοζώων υπό υψηλή δίαιτα λιπαρών και με διαβήτη τύπου-2 έδειξε ότι η φαρμακευτική αύξηση των επιπέδων των Hsp27 και 70 μειώνει την αντίσταση ινσουλίνης, την δυσλιπιδαιμία, την δυσλειτουργία των β-κυττάρων και μερικώς ρυθμίζει το οξειδωτικό stress [Sharma AK et.al 2011]. Σύγχρονη κλινική μελέτη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 ίδιας ηλικίας έδειξε ότι ενώ τα επίπεδα του

αντιοξειδωτικού συστήματος της γλουταθειόνης (GSSG) μειώνονται, τα επίπεδα των Hsps αυξάνονται στο πλάσμα. Η αυξημένη έκφραση τους θεωρείται ότι έχει διατηρηθεί έπειτα από το αρχικό συστηματικό οξειδωτικό stress [Calabrese V et.al 2012].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει έρευνα που εξέτασε την επίδραση της αυξημένης πρόσληψης διατροφικών λιπαρών και την ηλικία στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Hsp70. Έχει παρατηρηθεί ότι σε μεγαλύτερες ηλικίες η Hsp70 μειώνεται, ενώ τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται με σύγχρονη εμφάνιση αντίστασης της ινσουλίνης. Παρόλα αυτά η έρευνα αυτή, με χρήση πειραματικών πιθήκων που υποβλήθηκαν σε δίαιτα υψηλών λιπαρών έως και για 6 χρόνια, έδειξε ότι η διατροφή είναι ίσως πιο σημαντικός παράγοντας απ' ότι η ηλικία για να καθοριστούν τα επίπεδα της Hsp70 [Kavanagh K et al 2012].

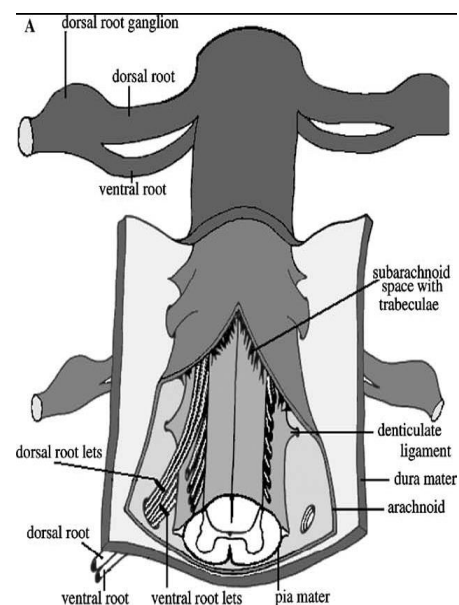
Ε. ΓΑΓΓΛΙΑ ΤΩΝ ΟΠΙΣΘΙΩΝ ΡΙΖΩΝ-DRG

1. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Τα γάγγλια των οπίσθιων ριζών (Dorsal Root Ganglion-DRGs) είναι ένα άθροισμα πρωτογενών αισθητικών νευρώνων. Οι κεντρικές και περιφερειακές απολήξεις των κυτταρικών τους σωμάτων δημιουργούν την αισθητική σύνδεση μεταξύ της περιφέρειας και του νωτιαίου μυελού.

1.1 Βασική ανατομία

Κάθε οπίσθια ρίζα του νωτιαίου μυελού περιέχει στο επίπεδο του μεσοσπονδύλιου τρήματος μια επιμήκη πάχυνση, που ονομάζουμε γάγγλιο της οπίσθιας ρίζας (DRG). Αυτή η πάχυνση περιβάλλεται από την συνέχεια των μεμβρανών του μυελού μεταξύ του επινεύριου και το περινεύριου των περιφερικών ινών και περιέχει αρχικά δίπολα κύτταρα που γρήγορα μεταπίπτουν σε ψευδο-μονόπολα. Ο μοναδικός τους άξονας διαχωρίζεται σε μια σχήματος T διακλάδωση προς το περιφερικό κλάδο που συνδέεται με τους σωματικούς και τους σπλαχνικούς υποδοχείς και τον κεντρικό κλάδο που εισέρχεται στον μυελό (Σχήμα 12). Η συνέχεια των περιφερικών και κεντρικών κλάδων αποτελεί την κυρίως αισθητική οδό προς τον νωτιαίο μυελό. Η αξονική δεσμίδα προβάλλει στην οπίσθια νωτιαία ρίζα μέσω του μεσοσπονδύλιου τρήματος και μαζί με την κοιλιακή νωτιαία ρίζα δημιουργεί το νωτιαίο νεύρο.



Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση του νωτιαίου σωλήνα, των γαγγλίων και των μεμβρανών που τους περιβάλλουν [F.A. Mettler, Neuroanatomy].

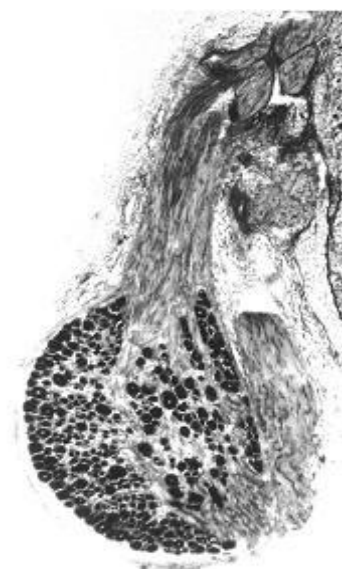
1.2 Ιστολογικά στοιχεία

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι DRG νευρώνες φαίνονται σαν κυτταρικές ομάδες και δέσμες νευραξόνων, ενώ ο πληθυσμός των κυττάρων τους υποδιαιρείται σε μεγάλους και μικρούς ψευδο-μονόπολους νευρώνες, οι οποίοι διακρίνονται στις χρώσεις Nissl. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 10 έως 100 μm και κατά τη γήρανση εναποτίθεται λιποφουσκίνη. Επίσης ανώμαλα πολύπολα γαγγλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν δενδριτικές εκβολές, το

οποίο είναι περίεργο καθώς τα κύτταρα των γαγγλίων δεν σχηματίζουν φυσιολογικά συναπτικές εισόδους.(synaptic inputs). Αυτή η ανακάλυψη της σπάνιας υπερδομής συνάψεων οφείλεται πιθανόν σε προβολές από τον νωτιαίο μυελό, αλλά μπορεί επίσης να ερμηνευτεί ως πιθανότητα αυτό το είδος κυττάρων να είναι εμβόλιοι αυτόνομοι νευρώνες. Μέσα στο ίδιο το γάγγλιο οι μικροί και μεγάλοι νευρώνες δεν έχουν καθορισμένη χωροθέτηση. Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από δορυφορικά κύτταρα, τα οποία θεωρούνται τροποποιημένα κύτταρα Schwann. Αρχικά τα κύτταρα βρίσκονται αμύελα μέσα σε αυτή τη κάψουλα των δορυφορικών κυττάρων. Επιπρόσθετα στα δορυφορικά και τα κοινά Schwann κύτταρα, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανιχνεύθηκαν κάποια λεμφοκύτταρα και κύτταρα Leydig (απελευθερώνουν τεστοστερόνη) μέσα στα γάγγλια των οπισθίων ριζών.

Ιστοχημικά τα DRG περιέχουν μια πληθώρα νευρικών πρωτεϊνών, νευροδιαβιβαστών και ουσιών που σχετίζονται με την επικοινωνία των νευρώνων και την μεταγωγή του πόνου. Νευρικές πρωτεΐνες που εμπεριέχονται τόσο στα μικρά όσο και στα μεγάλα νεύρα είναι η συνταξίνη, η στοματίνη, η περιφερίνη και ο υποδοχέας της κινάσης της τυροσίνης A (ο μεγάλης συγγένειας υποδοχέας του NGF-nerve growth factor).

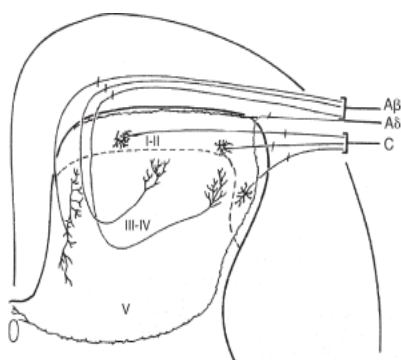
Νευροδιαβιβαστές οι οποίοι παρατηρούνται είναι σίγουρα το γλουταμινικό, το ασπαρτικό και πιθανώς το γ-αμινοβουτιρικό οξύ, η σεροτονίνη (Ser), το πεπτίδιο γονιδιακά σχετιζόμενο με την καλσιτονίνη CGRP (calcitonin gene-related peptide-CGRP), η χολοκυστοκίνη (CCK), η ουσία P (substance P-SP), η σωματοστατίνη (GHIH), το νευροπεπτίδιο Y (NPY) και το αγγειοκινητικό εντερικό πεπτίδιο (VIP). Οι ουσίες που έχουν να κάνουν με τον πόνο και τον τραυματισμό των νεύρων, βρίσκονται κυρίως στα μικρής διαμέτρου κύτταρα των DRG και είναι η ουσία P, η CGRP, η γαλανίνη, το νευροπεπτίδιο Y και το νευροπεπτίδιο FF (δρα στον υποδοχέα των οπιοειδών). Συνεντοπισμός του γλουταμινικού και της ουσίας P έχει περιγραφεί στα κύτταρα των μικρών νευρώνων των DRG. Μια ποικιλία ενζύμων έχει μελετηθεί στα γάγγλια αυτά και τα πιο γνωστά αυτών είναι η ακετυλ-χολινεστεράση και η δεϋδρογονάση του NADPH (Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο του νικοτιναμιδίου της αδενίνης) το οποίο έχει σχετιστεί με την δράση του NO (μονοξειδίου του αζώτου) σαν νευροδιαβιβαστής (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Ιστοχημικά σημασμένο DRG προς την NADPH δεϋδρογονάση [Encyclopedia of the Neurological Sciences]

Τα δομικά στοιχεία που παρατηρούνται στα DRG περιλαμβάνουν πρωτεϊνικά νευρονημάτια και ακτίνη. Πρωτεάση της νεξίνης II και αμυλίνη εντοπίστηκαν στα γάγγλια ασθενών με νόσο Alzheimer κατά την έναρξη της πάθησης. Τα DRG μπορεί να προσβληθούν από ιούς όπως αυτούς του συμπλέγματος του κοινού έρπη και του έρπη ζωστήρος.

1.3 Συνδέσεις



Σχήμα 14. Οι προσαγωγές ίνες της οπίσθιας ρίζας και οι απολήξεις τους στο οπίσθιο κέρατο [Snow and Wilson, 1991]

Οι κεντρικές αποφυάδες των αισθητικών νευρώνων α΄ τάξης που βρίσκονται στα γάγγλια των οπισθίων ριζών, αφού δώσουν ίνες σε ανώτερα και κατώτερα (ένα έως δύο) νευροτόμια, εισέρχονται στα οπίσθια κέρατα του ΝΜ με τη δέσμη του Lissauer. Καταλήγουν σε συνάψεις με τους νευρώνες β΄ τάξης των οπισθίων κέρατων, οι οποίοι ανατομικά σχηματίζουν τα πέταλα (Lamina) I, II, III, IV, V και VI κατά Rexed. Η φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού χωρίζεται σε 10 πέταλα με βάση την κατανομή των νευρικών σωμάτων και του ποσοστού των εμύλων ινών που περιέχουν. Το πρώτο από αυτά (το οποίο περιέχει 10% νευρώνες νευροκινίνης NK1) καταλήγει σε ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα. Το πέταλο II το οποίο λόγω της υφής του ονομάζεται πηκτωματώδης ουσία, είναι η κύρια θέση επεξεργασίας των επώδυνων ερεθισμάτων. Συγκεκριμένα, οι κλάδοι των μικρών αισθητικών νευρώνων των αμύελων ινών τύπου C καταλήγουν στη ζώνη I και των λεπτών εμύλων (Aδ) νευρικών ινών στη ζώνη II και V/VI. Οι μεγαλύτερες Aα και Aβ νευρικές ίνες καταλήγουν στα πέταλα V/VI και II/III/IV αντίστοιχα.

1.4 Ανάπτυξη

Τα νωτιαία γάγγλια γεννώνται και διαφοροποιούνται από τη νευρική ακρολοφία υπό την επίδραση του αυξητικού παράγοντα των νευρών (NGF). Η νευρική ακρολοφία παρουσιάζεται μεταξύ της νευρωνικής πλάκας και του εκτοδέρματος κατά τη δημιουργία της νευρωνικής αύλακας. Αν και αρχικά είναι ένα σύνολο κυττάρων στην περιοχή του κορμού, στη συνέχεια διαφοροποιείται σε ξεχωριστές ομάδες κυττάρων παράλληλες προς τον νωτιαίο σωλήνα. Στα αρχικά τους στάδια τα εμβρυικά νευρικά κύτταρα

(νευροβλάστες) των μελλοντικά νωτιαίων γαγγλίων, κινητοποιούν τις διαδικασίες αύξησης περιφερικά (δερμοτόμια, μυοτόμια και σκληροτόμια) και κεντρικά για τη διαίρεση του νωτιαίου σωλήνα.

1.5 Λειτουργικές προεκτάσεις

Η λειτουργική σημασία των DRG κυττάρων μπορεί να επεκταθεί πέρα από τον κλασικό ρόλο μιας μεταβολικής αποθήκης που υποστηρίζει τον άξονα και τις περιφερικές και κεντρικές απολήξεις του. Φαίνεται ότι τα DRG κυτταρικά σώματα είναι ηλεκτρικά ευερέθιστα, στερούνται αίματο-νευρικού φραγμού και μερικά είναι ικανά να εκπολώνονται κατ' επανάληψη. Το πρώτο χαρακτηριστικό γνώρισμα ίσως είναι βασικό και για τη διάδοση της ώσης κατά μήκος της T-σύνδεσης και την ανατροφοδοτική ρύθμιση της αισθητικής απόληξης. Το δεύτερο χαρακτηριστικό προτείνει ένα ρόλο χημικού αισθητήρα, ενώ η τρίτη αναφέρεται πιθανά στην ικανότητα του να παράγει αισθητικότητα υποβάθρου για την αντίληψη του σχήματος του σώματος.

Η λειτουργικότητα των DRG νευρώνων συνδέεται άμεσα με ένα πλήθος ιοντικών διαύλων που τα κύτταρα αυτά διαθέτουν. Τα ιοντικά κανάλια αποτελούν έναν από τους κύριους στόχους της σύγχρονης έρευνας για την δημιουργία νέων αναισθητικών. Τα γάγγλια των οπισθίων ριζών, σε συνθήκες καλλιέργειας, παραχωρούν πολλές δυνατότητες στην διερεύνηση της λειτουργίας διαύλων ιόντων που ευθύνονται στην μετάδοση σημάτων πόνου. Λόγω της ανατομικής τους τοποθέτησης οι αισθητικοί νευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων είναι από τους πιο προσβάσιμους νευρικούς πληθυσμούς για έρευνα τόσο *in vitro* όσο *in vivo*. Ο αριθμός των νευρώνων είναι σχετικά σταθερός (σε πειραματικά μοντέλα ποντικών (~14.000/γάγγλιο) και μπορεί να καθοριστεί κάτω από διαφορετικές γενετικές και πειραματικές μεταβλητές.

2. Αισθητικές Οδοί του Πόνου

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες η γνώση μας για το πώς ο εγκέφαλος αποκτά και επεξεργάζεται την οπτική, ακουστική, γευστική, ακουστική και σωματοαισθητική πληροφορία έχει πολλαπλασιασθεί. Παρόλα αυτά, η διαδικασία κατανόησης του πολυπαραγοντικού μηχανισμού της μετάδοσης του πόνου εξελίσσεται καθημερινά μέσω όλο και πιο σύγχρονων προσεγγίσεων στην νευροβιολογία, την ανάλυση της συμπεριφοράς, τη γενετική και τις κυτταρικές και μοριακές τεχνικές.

Το αίσθημα του πόνου κινητοποιεί αμυντικούς μηχανισμούς και είναι αναγκαίο για την διατήρηση της ακεραιότητας ενός οργανισμού, αντίθετα ο χρόνιος πόνος προκαλεί εξάντληση των ομοιοστατικών μηχανισμών, συνοδεύεται από άγχος και κατάθλιψη και υποβαθμίζει την ποιότητα ζωής ενός ατόμου. Η πληροφορία του πόνου φθάνει στον εγκέφαλο από το σημείο τραυματισμού μέσω πολλαπλών νευρικών οδών (Bernard J.F & Bandler R. 1998). Οι οδοί του πόνου καταλήγουν σε συγκεκριμένες περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου, που επεξεργάζονται το αρχικό ερέθισμα και οι οποίες παρουσιάζουν αξιοσημείωτη πλαστικότητα. Βλαβερά ερεθίσματα συχνά έχουν σαν αποτέλεσμα αλλαγή στην έκφραση γονιδίων στο κεντρικό νευρικό σύστημα και διάφορες καταστάσεις χρόνιου πόνου επιφέρουν αντίστοιχες τροποποιήσεις στη νευροχημική ταυτότητα του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Κάθε νευρώνας στην ανερχόμενη αλγαισθητική οδό είναι πιθανό να αλλάξει το φαινότυπο του έπειτα από περιφερικό τραυματισμό, ενώ όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι ο ρόλος κάποιων νευρικών υποσυστημάτων μπορεί να εξεταστεί μόνο κάτω από συνθήκες τραυματισμού και επούλωσης. (Honore P. 2000, Hokfelt T. et.al 1994).

2.1 Αισθητικές οδοί πόνου

Τα δυναμικά ενεργείας μεταδίδονται από το περιφερικό προς το κεντρικό νευρικό σύστημα, μέσω του άξονα του πρώτου αισθητικού νευρώνα, των γαγγλίων των οπίσθιων ριζών και των οπίσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού, όπου πραγματοποιείται η σύναψη του με τον δεύτερο αισθητικό νευρώνα. Τα ερεθίσματα μεταφέρονται από την περιφέρεια στο κέντρο, κυρίως με τις Αδ και C αισθητικές σωματικές και συμπαθητικές ίνες.

Οι μεγαλύτερης διαμέτρου, λεπτές εμύελες, Αδ ίνες:

- διεγείρονται με ερέθισμα μικρής έντασης
- μεταφέρουν το ερέθισμα με μεγάλη ταχύτητα (5-25 m/sec)
- διεγείρουν την πηκτωματώδη ουσία, δηλαδή νευρώνες που αναστέλλουν τη μετάδοση του ερεθίσματος

Οι μικρής διαμέτρου, αμύελες, C ίνες:

- διεγείρονται με ερέθισμα μεγάλης έντασης
- μεταφέρουν το ερέθισμα με μικρή ταχύτητα (<2 m/sec)
- αναστέλλουν τη δραστηριότητα της πηκτωματώδους ουσίας, δηλαδή επιτρέπουν τη μετάδοση του ερεθίσματος.

Οι ίνες C διεγείρονται/μεταφέρουν μηχανικά, θερμικά και χημικά υψηλής έντασης ερεθίσματα (πολύτροπες, polymodal), έχουν μεγάλο δεκτικό πεδίο και ευαισθητοποιούνται από επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα. Όπως περιγράφηκε μπορεί να συνδέονται με έναν από τους δύο άνω νευρικούς αυξητικούς παράγοντες και φαίνεται να διαφέρουν στον τρόπο δράσης τους καθώς στις IB4 θετικές (GDNF) οφείλεται ο νευροπαθητικός πόνος ενώ στην CGRP (NGF) ο φλεγμονώδης πόνος [Marmigere and Ernfors 2007], ενώ και οι δύο τύποι απαντούν στα θερμικά ερεθίσματα.

Οι Αδ μεταφέρουν τον οξύ πόνο και διεγείρονται από μηχανικά κυρίως ερεθίσματα, ενώ οι C τον βύθιο και αμβλύ πόνο και διεγείρονται από ουσίες που παράγονται κατά την καταστροφή των ιστών.

Καθώς οι ίνες αυτών των δύο τύπων μπαίνουν στην σπονδυλική στήλη, διαχωρίζονται, έτσι ώστε οι ίνες του τύπου Αδ διεγείρουν νευρώνες της ζώνης I του οπισθίου κέρατος, ενώ οι ίνες C σχηματίζουν συνάψεις με νευρώνες της πηκτωματώδους ουσίας. Οι τελευταίοι προβάλλουν στη συνέχεια βαθύτερα στη φαιά ουσία και ενεργοποιούν νευρώνες κυρίως της ζώνης V, αλλά και των VI και VII. Οι νευρώνες, που δέχονται ερεθίσματα από ίνες Αδ, αποτελούν αρχή της νεονωτιαιοθαλαμικής οδού, ενώ αυτές που σχετίζονται με ίνες C σχηματίζουν την παλαιονωτιαιοθαλαμική οδό.

Η νεονωτιαιοθαλαμική οδός συμβάλει καθοριστικά στον εντοπισμό του πόνου. Οι άξονες των νευρώνων της ζώνης I, που αποτελούν την νεονωτιαιοθαλαμική οδό, τέμνουν την μέση γραμμή κοντά στο σημείο έκφυσής τους και ανέρχονται την σπονδυλική στήλη σαν μέρος του προσθιοπλάγιου συστήματος. Ορισμένες από τις ίνες αυτές καταλήγουν στον δικτυωτό σχηματισμό του εγκεφαλικού στελέχους, οι περισσότερες, όμως, προβάλλονται τελικά στον οπίσθιο έξω κοιλιακό πυρήνα (VPL) του θαλάμου. Από εδώ, οι θαλαμικοί νευρώνες προβάλλονται στον πρωτεύοντα αισθητικό φλοιό. Το σύστημα αυτό χρησιμεύει, κατά πρώτο λόγο, για την χωρική εντόπιση ερεθισμάτων πόνου. Η δραστηριότητα του παλαιονωτιαιοθαλαμικού συστήματος μπορεί να εκκλύει το δυσάρεστο αίσθημα που συνοδεύει το πόνο.

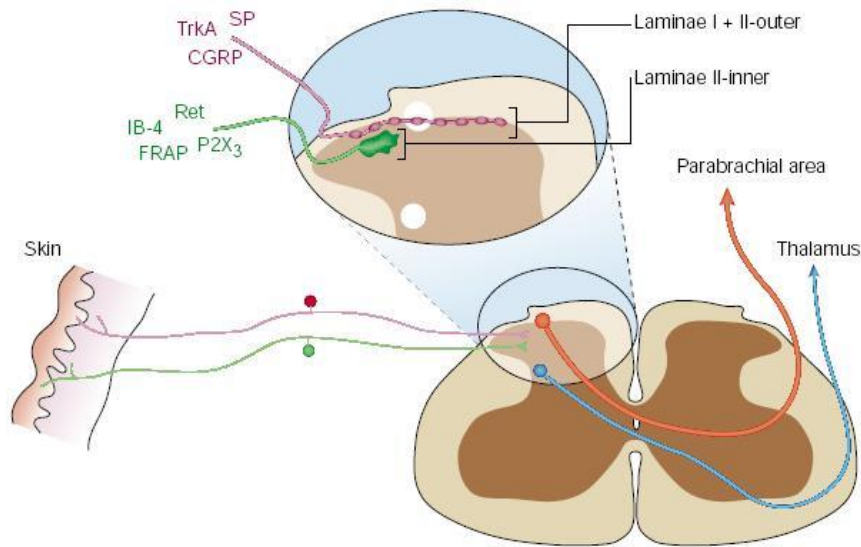
Η παλαιονωτιαιοθαλαμική οδός είναι φυλογενετικά παλαιότερη από τις δύο οδούς πόνου. Οι άξονες των κυττάρων της ζώνης V, όπως και αυτοί της ζώνης I, χιάζονται άμεσα στον τόπο προέλευσής τους και ανέρχονται ως μέρος του προσθιοπλάγιου συστήματος. Οι άξονες της ζώνης V τερματίζουν σχεδόν αποκλειστικά στο εγκεφαλικό στέλεχος, παρά στον θάλαμο, όπου οι ίνες αυτές διεγείρουν τον δικτυωτό σχηματισμό, τα πρόσθια διδύμια και την κεντρική φαιά ουσία. Ένα σύνολο ανερχόμενων ινών, κυρίως από τον δικτυωτό

σχηματισμό, προσανατολίζεται πρόσθια προς τους ενδοπεταλιακούς πυρήνες και οπίσθιους πυρήνες του θαλάμου, καθώς και προς ορισμένα μέρη του υποθαλάμου. Τα μεταδιδόμενα με αυτή την οδό σήματα πόνου εντοπίζονται τυπικά μόνο σε εκτεταμένα μέρη του σώματος. Για παράδειγμα, εάν τα σήματα προέρχονται από το χέρι, αυτά γίνονται αντιληπτά σαν να εντοπίζονται ‘κάπου’ στο άνω άκρο. (Hall, 2006, Rhodes and Pflanzner, 1996).

Ο πόνος μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει αισθητικά και συναισθηματικά χαρακτηριστικά και συνήθως κατηγοριοποιείται ως οξύς ή χρόνιος ανάλογα με τη διάρκεια και σαν νευροπαθητικός όταν προέρχεται από γνωστές ή άγνωστες βλάβες του ΚΝΣ. Οι ποικίλες καταστάσεις πόνου επιβάλλουν και διαφορετικές φαρμακευτικές αγωγές, δίνοντας έτσι έναυσμα στην όλο και εντονότερη διερεύνηση της φυσιολογίας και μοριακής αποκωδικοποίησης του αλγαισθητικού συστήματος.

2.2 Φυσιολογία και βιοχημεία των αλγαισθητικών ινών.

Οι αισθητικές ίνες μεταφέρουν ερεθίσματα από το δέρμα και τα περισσότερα εσωτερικά όργανα προς τον νωτιαίο μυελό και διαχωρίζονται σ' ένα μεγάλο αριθμό υπο-ομάδων, οι οποίες απαντούν σε συγκεκριμένους τύπους ερεθισμάτων. Ανατομικά υπάρχουν 2 αδρές κατηγορίες αισθητικών νευρώνων: οι εμμύελες Α ίνες και οι μικρότερης διαμέτρου, αμύελες C ίνες. Οι μικρής διαμέτρου δερματικές ίνες –ίνες C και λεπτές εμμύελες ίνες Αδ-είναι αλγαισθητικές, αν και περίπου το 10% των C ινών λαμβάνει μέρος και στην μεταγωγή αβλαβών θερμικών σημάτων. Η πλειοψηφία των C ινών είναι πολυλειτουργικοί βλάβουποδοχείς και απαντούν σε χημικά, μηχανικά και θερμικά ερεθίσματα, μολονότι με διαφορετική ευαισθησία. Οι C ίνες μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες ανάλογα με τα περιεχόμενα πεπτίδια και τους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών καθώς και το σημείο απόληξής τους εντός του οπίσθιου κέρατος. (Hunt S&Rossi J. 1985). Η μια ομάδα εκφράζει τον υποδοχέα της πουρίνης P2X3 (FRAP: fluoride-resistant acid phosphatase), το δεσμευτικό τόπο της IB4-λεκτίνης και υποδοχείς Ret για τους νευροτροφικούς παράγοντες παραγόμενους από γλοιακά κύτταρα (GDNF: Glial cell Derived Neurotrophic Factor). Αυτές οι ίνες τερματίζουν αποκλειστικά στα πιο βαθιά στρώματα της πηκτωματώδους ουσίας του νωτιαίου μυελού με συναπτική απόληξη σπειραματικής μορφής (Bennet D. 1998).



Σχήμα 15: C ίνες στο οπίσθιο κέρατο του νωτιαίου μυελού. Οι καταλήξεις των 2 κυριότερων ομάδων των αλγαισθητικών C ιών. Διαφέρουν ως προς τα πεπτίδια που περιέχουν, τους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και το σημείο απόληξης τους εντός του οπίσθιου κέρατος [Stephen P. Hunt, 2001].

Οι υπόλοιπες C ίνες συνθέτουν πεπτίδια όπως η ουσία P και το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP: calcitonin gene related peptide) καθώς και τον υποδοχέα TrkA (κινάσης της τυροσίνης A) που εμφανίζει υψηλή δέσμευση προς τον αυξητικό παράγοντα των νεύρων (NGF: Nerve Growth Factor) (Cuello A.C et.al 1999) [Σχήμα 15]. Περίπου οι μισοί από όλους τους μικρούς νευρώνες των γαγγλίων και το ~70% των σπλαχνικών αισθητικών νευρώνων είναι CGRP θετικοί και εκφράζουν NGF και TrkA [Zylka 2005, Koltzenburg, M.,1999].

2.3 Αυξητικοί παράγοντες νευρικών κυττάρων

Η ποικιλία των πρωτοταγών νευρικών κυττάρων που βρίσκεται στα γάγγλια των οπισθίων ριζών, από τους μεγάλους ιδιοδεκτικούς, τους μεσαίους μηχανοαισθητικούς και τους μικρούς βλαβοαισθητικούς νευρώνες, οφείλεται στα σήματα (-οδηγίες) που λαμβάνουν κατά την ανάπτυξη. Αυτή η ποικιλία κυττάρων επέρχεται έπειτα από συνεχείς συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν κάθε νευρικό υποπληθυσμό [Hippenmeyer 2004]. Έχει φανεί ότι το γονίδιο Brn3a και το Zn-finger γονίδιο Klf7 απαιτούνται για τη διατήρηση του TrkA υποδοχέα (Lei et al, 2006). Μεταλλάξεις του υποδοχέα TrkA, του παράγοντα ανάπτυξης των νεύρων (NGF) όπως και του γονιδίου

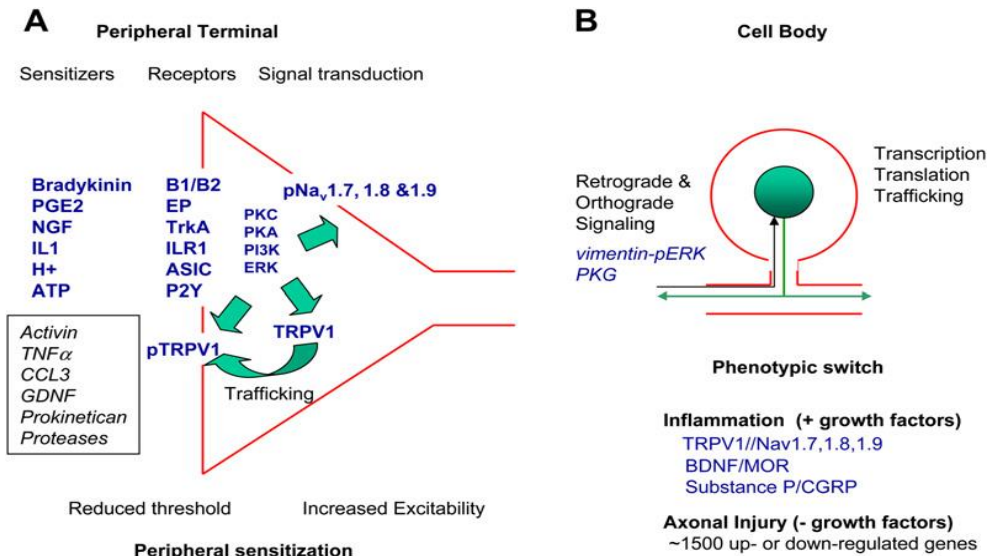
SCN9A που κωδικοποιεί την α -υπομονάδα του τασεοελεγχόμενου καναλιού του νατρίου Nav1,7, οδηγούν σε εμβρυϊκή απώλεια των βλαβοαισθητικών νευρώνων και καταλήγουν σε συγγενή υποαισθητικότητα του πόνου (Verrooten et al, 2006). Τα κανάλια Na^+ άλλωστε εντοπίζονται κυρίως στα αισθητικά γάγγλια του συμπαθητικού και είναι απαραίτητα για την έκκλιση του δυναμικού ενέργειας και τη μεταγωγή της ώσης. Η νευρογένεση ακολουθείται από μια διαδικασία επιλογής και διαφοροποιήσεων, όπου συμμετοχοί είναι νευροτροφικοί παράγοντες της οικογένειας των GDNF και NGF και όπου πλήθος αρχικών νευρικών κυττάρων απορρίπτονται [Kirstein and Farinas 2002].

Η δράση των νευροτροφικών παραγόντων δεν περιορίζεται στον καθορισμό των τύπων νευρώνων κατά την εμβρυογένεση, ρυθμίζουν επίσης την φυσιολογία των ωρίμων αισθητικών νευρώνων. Την τελευταία δεκαπενταετία αποκαλύφθηκε ότι το φυσιολογικό και βιοχημικό προφίλ των αισθητικών νευρώνων ρυθμίζεται από τους αυξητικούς παράγοντες που είναι ο GDNF, ο BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) και ο NT-3 (neurotrophin-3) και επακόλουθα και ο φαινότυπος των νευρώνων. Για παράδειγμα, έπειτα από περιφερική νευροαξονοτόμηση, τα επίπεδα κάποιων υποδοχέων και πεπτιδίων στα σώματα των τραυματισμένων αισθητικών νευρώνων μεταβάλλονται με αναμενόμενο τρόπο [Chizh, B. 1999]. Η επακόλουθη μείωση των επιπέδων κάποιων πεπτιδίων και άλλων δεικτών μπορεί να αντιστραφεί με ενδοραχιαία ή περιφερική έκχυση NGF ή GDNF [Bennet D. 1998].

Εντός των ζωνών τερματισμού τους, μετά από τοπικό αλγογόνο ερέθισμα, οι αισθητικές ίνες που απελευθερώνουν CGRP/ουσία P προκαλούν εξαγγείωση πλάσματος (προς τους εξωτριχοειδικούς χώρους-γνωστό ως οίδημα) και αγγειοδιαστολή [Bozic 1996]. Πιο πρόσφατα αποδείχτηκε ότι ο NGF είναι ο κύριος ρυθμιστής του φλεγμονώδους πόνου σε ώριμα ζώα και της έκφρασης μορίων βασικών για την νευροδιαβίβαση [Pezet, McMahon 2006].

Σήμερα γνωρίζουμε ότι αν ο περιφερικός άξονας του υποδοχέα τμηθεί η έλλειψη σημάτων μεταβάλει την μεταγραφή περισσότερων των 1000 γονιδίων (Xiao et al, 2002). Στην περίπτωση περιφερικής ιστικής βλάβης ή φλεγμονής το τοπικό χημικό περιβάλλον μεταβάλλεται έντονα λόγω καταστροφής των κυττάρων, αποκοκκίωσης των μαστοκυττάρων και εκκρίσεων από τα φλεγμονώδη κύτταρα ενζύμων όπως κύκλοξυγενάση-2 και ένα ευρύ φάσμα ουσιών (sensitizers) που ευαισθητοποιούν τους υποδοχείς όπως κινίνες, αμίνες, προστανοειδή, αυξητικούς παράγοντες, χυμοκίνες, κυτοκίνες. (Woolf, Ma, 2007). Αυτοί οι ευαισθητοποιητές συνδέονται στην μεμβράνη του

υποδοχέα και ενεργοποιούν πολλές ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής σήματος στην περιφερική απόληξη, που περιλαμβάνουν κυρίως πρωτεϊνικές κινάσες (όπως: PKC και PKA, PI3K και MAPK)* (Woolf, Ma, 2007) [Σχήμα 16].



Σχήμα 16: Α) Περιφερική ευαισθητοποίηση προκαλεί μείωση της ουδού και μεταβολή μέσω φωσφορυλίωσης, των ιδιοτήτων των μεταγωγών σήματος και τον καναλιών Na⁺, σαν απόκριση σε σήματα φλεγμονής.

Β) Φαινοτυπικές μετατροπές συμβαίνουν στους αλγαισθητικούς νευρώνες σε απόκριση φλεγμονής ή τραυματισμού του νευράξονα ή πιθανή επιστροφή (retrograde) αγωγίμου σήματος [Clifford J. Woolf, 2007].

Αυτοί οι καταρράκτες προκαλούν φωσφορυλίωση των TRP και τασεοεξαρτώμενων καναλιών Na και μεταβάλλουν την ουδό και τις κινητικές αντιδράσεις επάγοντας περιφερική ευαισθητοποίηση. Συνεπώς ανταγωνιστές των TRP υποδοχέων και εκλεκτικών αναστολέων των καναλιών Na είναι πιθανά μια καλή προσέγγιση μείωσης της περιφερικής ευαισθητοποίησης και του φλεγμονώδους πόνου (Jarvis et al 2007).

* Οι κινάσες είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση άλλων πρωτεϊνών μέσω στοχευμένης φωσφορυλίωσης αμινοξέων τους, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η λειτουργικότητα τους, η ενζυμική τους δραστηριότητα, η κυτταρική τους εντόπιση και η αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες. Έτσι οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών λειτουργιών και βιοχημικών οδών όπως η κυτταρική επιβίωση, η έκφραση γονιδίων, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μίτωση και η απόπτωση.

2.4 CGRP

Το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης ή CGRP αποτελεί μέλος της οικογένειας νευροδιαβιβαστών και ορμονών όπως η αδρενομεδουλίνη, η αμυλίνη και η καλσιτονίνη. Η CGRP αλλά και ο υποδοχέας της έχουν εντοπιστεί στο οπίσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού και πλήθος μελετών έχουν γίνει για να ταυτοποιηθεί ο ρόλος της στην ρύθμιση και μεταγωγή του αισθήματος του πόνου. Αρχικές έρευνες έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα καθώς εξωγενής έγχυση (5nmol) CGRP στον νωτιαίο σωλήνα βρέθηκε να προκαλεί μηχανική υπεραλγησία [Oku et al., 1987] αλλά και να μην έχει κανένα αποτέλεσμα στον πόνο (1-10nmol) [Yu et al. 1994]. Αργότερα με την τεχνολογία απαλοιφής γονιδίων σε πειραματόζωα, μύες που υπολείπονταν της έκφρασης της CGRP εμφάνισαν απώλεια της αίσθησης του πόνου σε hot-plate τεστ υπό συνθήκες οξείας φλεγμονής [Zhang et al., 2001]. Επίσης ιοντοφορική εφαρμογή (iontophoretic) CGRP προκαλεί αργή και παρατεταμένη διέγερση των νευρώνων στο οπίσθιο κέρασ επάγωντας την μεταγωγή του αλγογόνου ερεθίσματος [Bird et al., 2006].

Το πεπτίδιο CGRP εκφράζεται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα με αυξημένη έκφραση στα DRG και στους νευρώνες του τρίδυμου γαγγλίου. Στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων ριζών το πεπτίδιο εκφράζεται κυρίως στους μικρούς αμύελους C νευρώνες και μερικώς στους λεπτά μυελινομένους Αδ [Wimalawansa, 1997]. Για την ταυτοποίηση των πληθυσμών των αισθητικών νευρώνων έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς πλήθος ιστοχημικών δεικτών που χαρακτηρίζουν το μέγεθος, την μυελινίωση, τους υποδοχείς, τα πεπτίδια ή τα νευροϊνίδια (neurofilaments). Σήμερα οι κύριοι δείκτες πληθυσμών των DRG είναι τα νευροπεπτίδια CGRP και SP, οι υποδοχείς καψαϊκίνης και TRPV1 και η ισολεκτίνη B4 (IB4). Οι πεπτιδεργικοί βλάβοϋποδοχείς εκφράζουν τις CGRP και SP και πρωτίστως νευρώνουν μυϊκούς και σπλαχνικούς στόχους. Οι IB4 θετικοί θεωρούνται μη –πεπτιδεργικοί νευρώνες και νευρώνουν κυρίως δερμικές περιοχές. Οι βλάβοϋποδοχείς που εκφράζουν τον TRPV1 ενεργοποιούνται κυρίως από έντονα θερμικά ή χημικά ερεθίσματα και εμπλέκονται στην εμφάνιση φλεγμονώδους υπεραλγησίας [Lotfi P et. al 2011]. Στα ποντίκια οι αισθητικοί υποδοχείς TRPV1 εκφράζονται μόνο στους πεπτιδεργικούς νευρώνες [Woodbury CJ et al 2004].

Παρά το γεγονός ότι οι πεπτιδεργικές ίνες προσάγουν το αίσθημα του πόνου από την περιφέρεια φαίνεται να «επάγουν» κι ένα τοπικό αγγειοδιασταλτικό ρόλο καθώς χορήγηση ανταγωνιστή του υποδοχέα της CGRP αυξάνει την αρτηριακή πίεση,

δίνοντας στο νευροπεπίδιο ρόλο ρυθμιστή της υπέρτασης [Ditting T et.al 2008]. Μελέτες που επικεντρώνονται στην νεφρική ανεπάρκεια θεωρούν ότι η απελευθέρωση του CGRP είναι κάτω από τον έλεγχο των TRPV1 υποδοχέων στα νεφρά και κατά την νεφρική φλεγμονή απελευθερώνεται από τις προσαγωγές νευρικές ίνες και αποδίδει τις προστατευτικές αγγειοδιασταλτικές του ιδιότητες [Supowit SC et.al 2005, Ditting T et al 2009].

3. Δράσεις του Zn στα DRG

Το κυτταρικό σώμα των πρωτοταγών αισθητικών νευρώνων στα γάγγλια των οπισθίων ριζών έχει νευροφυσιολογικά το ρόλο ενός μεταβολικού κέντρου και του καταλογίζεται η υποστήριξη της περιφερικής αισθητικής ελεύθερης απόληξης, του νευράξονα-αγωγού σήματος και των τελικών συναπτικών κομβίων. Η αίσθηση του πόνου εκκινεί από το αλγογόνο ερέθισμα και την δημιουργία και αγωγή της ώσης μέσω εξειδικευμένων ιοντικών διαύλων και κυτταρικών υποδοχέων πάνω στην μεμβράνη των DRG. Ο μοριακός μηχανισμός που συντονίζει την έκφραση και λειτουργία των ιοντικών διαύλων που σχετίζονται με την επεξεργασία του πόνου είναι ελάχιστα ξεκαθαρισμένος. Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι ένας μεταγραφικός παράγοντας με μορφή διπλού «δακτυλίου» Zn, ονόματι Smad-αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη 1 (ή Sip1 /ή Zfhx1b /ή Zeb2 => 2-handed zinc finger –DNA δεσμεύουσα) και γνωστός για το ρόλο του στην ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου, να είναι σημαντικός στην αλγαισθητική ευαισθησία και στην νευρική διεγερσιμότητα [Jeub et.al.,2011]. Συμπέραναν με χρήση διαγονιδιακών ζώων που δεν εξέφραζαν τον Sip1 ότι, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας, μέσω συντονισμένων αλλαγών στα τασοεξαρτώμενα ιοντικά κανάλια των DRG (αντλίες ιόντων K/Na), αυξάνει την ουδό ενεργοποίησης μπλοκάροντας σε συγκεκριμένους νευρώνες (Capsaicin sensitive /υπεύθυνοι για το θερμικό ερέθισμα) την μετάδοση του δυναμικού ενεργείας. Επαληθευτικές είναι και οι αποκρίσεις των συγκεκριμένων ζώων σε θερμικά τεστ πόνου, καθώς όντως εμφανίζουν μειωμένη αντίδραση αντίθετα με την φυσιολογική αντίδραση τους στα μηχανικά τεστ πόνου.

3.1 Ψευδαργυροενεργοί ή Γλουταμινο-ψευδαργυροενεργοί νευρώνες [Zincergic / Gluzinergic].

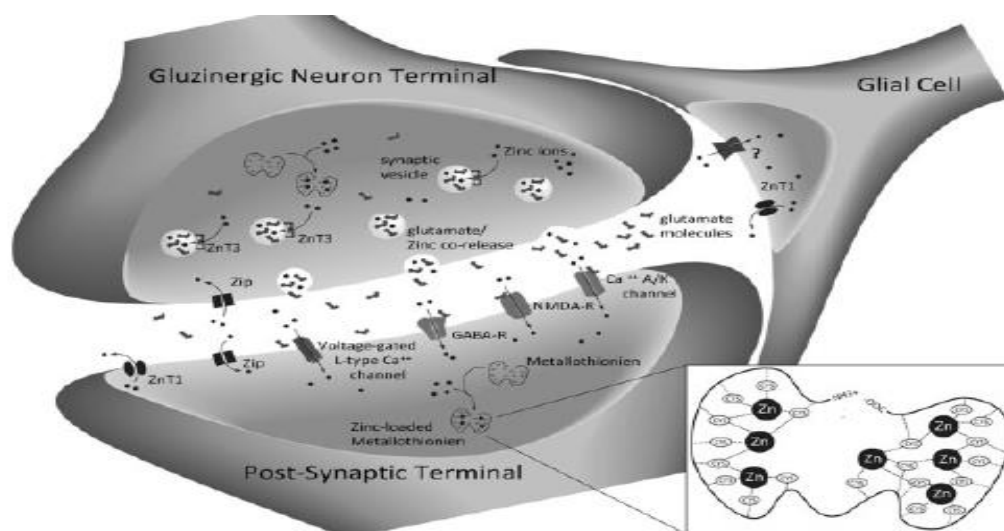
Εκτός όμως από την επίδραση του Zn στην γονιδιακή έκφραση των νευρώνων είναι πλέον γνωστό ότι απελευθέρωση του στο εξωκυττάριο υγρό του νωτιαίου μυελού έχει προταθεί ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην αίσθηση του πόνου [F.E. Dudek, 2001]. Τόσο ο ελεύθερος Zn όσο και οι MT3 έχουν εντοπιστεί στους μεγάλους και μικρούς νευρώνες των DRG κυττάρων και οι μικρότερες ίνες τύπου C φαίνεται να είναι ψευδαργυρο-εργικοί (zincergic), εμπλέκοντας έντονα τα ιόντα Zn στην μετάδοση του πόνου [Z.Y. Wang et.al 2001].

Η MT3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιοδιαθεσιμότητα του Zn όπως αποδεικνύεται από τον συνεντοπισμό της σε περιοχές του εγκεφάλου που συγκεντρώνουν και απελευθερώνουν Zn, όπως μεγάλα εγκεφαλικά νευρικά σωματίδια στον εγκέφαλο και περιοχές του υπόκαμπου [Masters et.al.1994].

Η παρουσία σε φυσιολογικές συνθήκες ιστοχημικά ενεργού Zn εντοπίζεται στο ραβδωτό σώμα, στην χρωστική ουσία του αμφιβληστροειδούς, στον οσφρητικό λοβό, τον πυρήνα του κοχλίου, τον νωτιαίο μυελό [Bitanibirwe B et.al 2009] και τα γάγγλια των οπισθίων ριζών (DRG) [Velazquez R A 1999]. Φαίνεται λοιπόν ότι η νευρο-ρυθμιστική δράση του Zn επηρεάζει τον κινητικό συντονισμό, την όσφρηση, την όραση, την επεξεργασία του ακουστικού σήματος και την αίσθηση του πόνου αντίστοιχα καθιστώντας τον απαραίτητο στην σωματοαισθητική λειτουργία. Στα ανωτέρω συμμαρτυρεί και το γεγονός ότι έλλειψη διατροφικού Zn ή έπειτα από χυλοποίησή-δέσμευσή του (π.χ. με TPEN) ή σε κλινικές περιπτώσεις δυσαπορρόφησης του, εμφανίζονται βλάβες στην αντίληψη της αίσθησης τόσο με διαταραχή της γεύσης, της όσφρησης [Alpers DH., 1994] και της όρασης, όσο και με εμφάνιση αδυναμίας χωρικής μάθησης και απώλεια ενεργής μνήμης [Daumas et al., 2004].

Σημαντικότερη είναι και η *in vitro* πρόσφατη παρατήρηση ότι τα ιόντα Zn σε πρωτογενείς αισθητικούς DRG νευρώνες ρυθμίζουν την απελευθέρωση της P πρωτεΐνης (substance P), ενός βασικού νευροδιαβιβαστή του πόνου [He-Bin Tang et.al., 2009]. Συγκεκριμένα μείωση των ιόντων Zn εξωκυττάρια των νευρώνων προκαλεί εισροή ιόντων Ca²⁺ μέσω των L-,N- και T-τύπων VDCC (Voltage-dependent calcium channels) αυξάνοντας την απελευθέρωση πρωτεΐνης P. Αντίθετα αύξηση των Zn ιόντων διακόπτει την ενεργοποίηση των VDCC καναλιών, αποτρέποντας την εισροή ιόντων Ca²⁺ και την απελευθέρωση του P νευροδιαβιβαστή.

Τα ιόντα Zn που απελευθερώνονται μαζί με τα συναπτικά αμινοξέα δρουν ανασταλτικά στους υποδοχείς GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) και NMDA (N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ) [Celestiano JJ et.al., 1991] με άμεση αλληλεπίδραση στο σημείο σύνδεσης των υποδοχέων. Είναι πλέον γνωστό ότι ιόντα Zn εντός κυστιδίων συνεντοπίζονται με το γλουταμινικό (Glu) στις απολήξεις πολλών γλουταμινεργικών νευρώνων και η συγκέντρωσή τους εντός αυτών των κυστιδίων μπορεί να φθάσει τα επίπεδα του millimolar [Qian J et.al., 2005]. Εντύπωση κάνει το γεγονός ότι τα μη-NMDA σήματα στην περιοχή του ιπποκάμπου ενισχύονται υπό την παρουσία Zn, υποστηρίζοντας ότι η αύξηση του ιόντος είναι νευροτοξική [Weiss et al., 1993]. Έτσι μετά από προσυναπτική απελευθέρωση ο Zn μπορεί να καταστήσει τους νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου (forbrain) πιο ευερέθιστους [Lin et al., 2001], λιγότερο ευερέθιστους [Draguhn et al., 1990] ή να μην έχει καμία επιρροή [Smart TG et.al., 1994]. Αντίθετα χηλοποίηση του ενδογενούς ψευδαργύρου μπορεί να προκαλέσει παροξυσμική τάση επιληψίας στον εγκέφαλο και να μειώσει την ουδό/κατώφλι (threshold) για έκλυση εγκεφαλικών σπασμών (brain seizure induction) [Dominguez et al., 2003] ή να προκαλέσει ώσεις-σήματα μέσω των NMDA υποδοχέων [Kim et.al 2002]. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι η παρουσία του Zn είναι απαραίτητη για να μειωθεί η διεγερσιμότητα (brain excitability) του εγκεφάλου, δρώντας έτσι σαν ενδογενές αντισπασμωδικό (anticonvulsant).

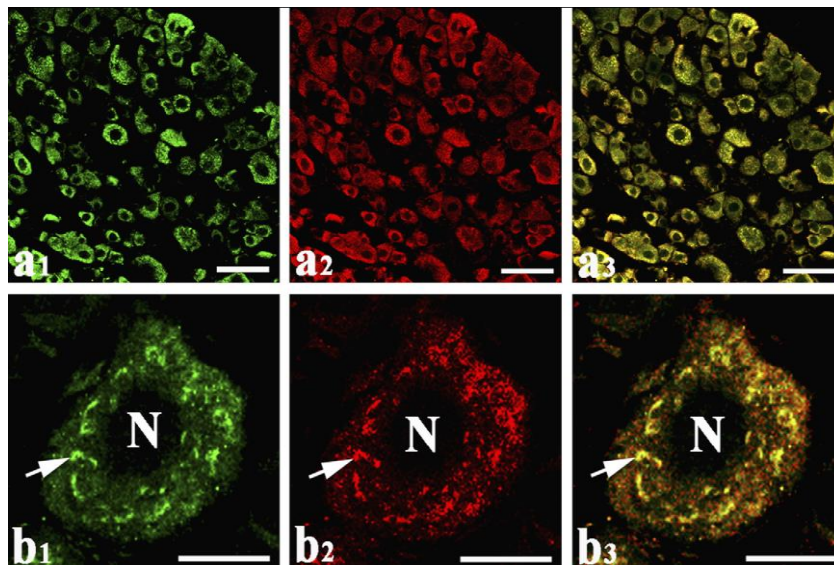


Σχήμα 17 : Η μεταφορά Zn στην ψευδαργυροενεργή σύναψη. Ο Zn βρίσκεται στα προσυναπτικά κυστίδια μαζί με γλουταμικό. Σε φυσιολογική διέγερση, ο Zn ελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή όπου μπορεί να δρα σε μετασυναπτικές πρωτεΐνες υποδοχείς (GABA ή NMDA υποδοχείς), σε κανάλια VDCC και σε ένα πλήθος ιοντικών καναλιών επηρεάζοντας την δράση τους. Οι MTs είναι οι πρωταρχικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες δέσμευσης Zn και ρυθμίζουν την διαθεσιμότητα του στα προσυναπτικά και μετασυναπτικά κομβία [B.K.Y. Bitanhirwe, 2009]

Οι ψευδαργυροενεργοί (zincergic ή gluzinergic) νευρώνες συγκεντρώνουν ιόντα Zn στο προσυναπτικό κομβίο με τη βοήθεια του μεταφορέα ZnT-3 ενώ οι μεταλλοθειονίνες είναι ο κύριος ρυθμιστής της διαθεσιμότητας των ιόντων Zn.

Ακόμη όπως προαναφέρθηκε και φαίνεται και στο άνωθεν σχήμα η είσοδος και έξοδος των ιόντων Zn διευκολύνεται αντίστοιχα από τους ZIP και ZnT1 μεταφορείς που όπως και οι MTs εξαρτώνται από τον μεταγραφικό παράγοντα MTF-1.

Τα διάφορα μέλη των ZnT πρωτεϊνών εδρεύουν σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα [Kambe et.al., 2004]. Σε κύτταρα DRG αλλά και σε εγκεφαλικά νεύρα, ο μεταφορέας ZnT7 εντοπίστηκε με ανοσοφθορισμομετρικές μεθόδους εντός των συσκευών Golgi μαζί με ελεύθερα (chelatable) ιόντα Zn [Zhang L et.al., 2007]. Η συσκευή Golgi αποτελεί το κέντρο μετατροπών, σύνθεσης και συσκευασίας των πρωτεϊνών. Είναι πολύ πιθανή επομένως η συνεργασία του ZnT7 στην απομάκρυνση ιόντων Zn από το κυτόπλασμα των DRG και γλοιακών κυττάρων και ενσωμάτωσή τους σε νέα συναπτικά κυστίδια ή στις πληθώρες των ψευδαργυροπρωτεϊνών, στα νευρικά κύτταρα. (Σχήμα 18).



Σχήμα 18: Φωτογραφία από μικροσκόπιο συνεντοπισμού σε τομή DRG ποντικού. Οι τομές έχουν σμυνηθεί με αντισώματα για τον μεταφορέα ZnT7 (a1-b1) και τον TGN38 (a2-b2) ο οποίος αποτελεί ανοσοφθοριστικό δείκτη της συσκευής Golgi [Li Zhang et.al, 2009].

4. Πόνος και Hsp70

Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF- α και IL-6 προωθούν και συντηρούν την φλεγμονή αλλά συνεισφέρουν και στη δημιουργία του αισθήματος του φλεγμονώδους πόνου στα αισθητικά νευρικά κύτταρα. Άλλωστε ένα μεγάλο ποσοστό των DRG εκφράζουν TNF και IL-6 υποδοχείς και *in vivo* αποκλεισμός αυτών (με ενδο-αρθρική παροχή του αναστολέα τους etanercept) έδειξε ότι η απόκριση των C-ινών σε ερεθίσματα φλεγμονώδη πόνου και μόνο (όχι σε φυσιολογικά μηχανικά ερεθίσματα) μειώθηκε [Schaible HG et.al., 2010]. Επίσης στο *in vitro* μέρος της ίδιας μελέτης φάνηκε ότι σε καλλιέργεια DRG νευρώνων ο TNF- α αύξησε το ποσοστό των νευρώνων που εκφράζουν τους TRPV1 υποδοχείς (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 /ή υποδοχείς καψαϊκίνης) που συνεισφέρουν στην φλεγμονώδους αιτιολογίας γέννηση θερμικής υπεραλγησίας.

Τα TRP κανάλια ή κανάλια παροδικού δυναμικού είναι μια ομάδα ιοντικών διαύλων (33 γονίδια αναγνωρισμένα) που έχει συσχετιστεί με πλήθος αισθητικών σημάτων όπως τον πόνο, τη θερμότητα, το κρύο, την πίεση, την γεύση και την όραση [Islam MS, 2011]. Όπως ο ανωτέρω TRPV (ομάδα Vanilloid channel/receptor, ενεργοποίηση από βαλινοειδή π.χ. καψαϊκίνη που περιέχεται στις πιπεριές chilli) σε ένα ποσοστό από τα DRG κύτταρα εκφράζεται και ο TRPA (από Ankyrin), ο οποίος δρα σαν αισθητικός υποδοχέας σε ερεθίσματα από χαμηλή θερμοκρασία και σε ερεθίσματα οξειδωτικού στρες (καθώς και σε ενώσεις αντιδρώντες μεθειόλες) [Bessac BF et.al.,2008]. Τα κανάλια αυτά διεγείρονται από νανομοριακές (nanomolar) συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού Zn²⁺ και είναι απαραίτητα για την μηχανική υπεραλγησία και το άλγος κρύου (cold allodynia) σε συνθήκες τοξικών συγκεντρώσεων Zn (ή του Zn ιονοφόρου Clloquinol), όπως φαίνεται από *in vivo* μοντέλα πειραματικών ποντικών που δεν εκφράζουν το TRPA1 γονίδιο [Andersson DA et.al.,2009].

Οι Hsp έχει σημειωθεί ότι έχουν την ικανότητα να επιδρούν στην δράση του TNF διακόπτοντας το αποπτωτικό μονοπάτι, ενώ προστατεύουν τα κύτταρα και από το οξειδωτικό άγχος, έχοντας μια έμμεση προστατευτική λειτουργία συνολικά στα DRG άλλα πιθανώς και στα TRP κανάλια προστατεύοντας τα από το στρες από τοξικότητα αυξημένων ιόντων Zn. Αυτοί οι έμμεσοι πιθανοί συσχετισμοί των Hsp στα μοριακά μονοπάτια του πόνου χρειάζονται περαιτέρω μελέτη.

Η Hsp70 έχει άμεσα συνδεθεί με την νευροπροστατευτικότητα αισθητικών νευρώνων, καθώς αυξάνεται η έκφρασή της στα DRG έπειτα από μηχανική χρόνια συμπίεση (CCD: chronic compression) σε αισθητικά νεύρα, σε έρευνα σε επίμυες για τον παθολογικό πόνο

[Zhang Y et.al., 2008]. Επίσης η σημασία της οικογένειας των Hsp στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες της αισθητικής οδού υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι αύξηση των επιπέδων των ομοσυνοδών αυτών πρωτεϊνών σε κύτταρα Schwann βελτιώνει την μυελίνωση των DRG νευρώνων σε καλλιέργεια από νευροπαθολογικά ποντίκια, μέσω της ιδιότητας τους να αποτρέπουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων, της σημαντικής για τη δόμηση της μυελίνης, πρωτεΐνης PMP22 [Rangaraju S et.al. 2008].

5. Διατροφικό stress και DRG νευρώνες

Έχει γίνει γνωστό εδώ και 50 χρόνια ότι άτομα με παχυσαρκία και αυτά που είναι σε πρώιμα στάδια διαβήτη εμφανίζουν νευροπάθεια, δηλαδή βλάβη στα νεύρα του περιφερικού νευρικού συστήματος [Ellenberg, 1958]. Σήμερα γνωρίζουμε ότι περίπου το 50% των ασθενών που έχουν ιδιοπαθή αισθητική νευροπάθεια (IGT) έχουν διαταραγμένη πρόσληψη γλυκόζης ή αδυναμία ρύθμισή της [Singleton et al. 2003].

Πρώτη φορά φάνηκε ότι η λιπιδιακή περιεκτικότητα αλλά και το ποσοστό πολυακόρεστων / κορεσμένων λιπιδίων, επηρεάζουν έντονα το μεμβρανικό δυναμικό και τη μετάδοση δυναμικού ενέργειας κυττάρων DRG in vitro το 1989 [Scott B. et.al.].

Πειραματικά ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα υψηλή σε λιπαρά θεωρείται ότι εμφανίζουν σύντομα συμπτώματα παχυσαρκίας και αποτελούν ιδανικό μοντέλο έρευνας για παθήσεις του μεταβολισμού και μορφών διαβήτη. Συγχρόνως φάνηκε να αναπτύσσουν και λειτουργικές (αλλά όχι ανατομικές) μεταβολές στους μεγάλους κινητικούς και στους αισθητικούς νευρώνες. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα ζώα αυτά εμφανίζουν στο προ-διαβητικό στάδιο περιφερική διαβητική νευροπάθεια (PDN) και αυξάνεται η λειτουργία της οδού της σορβιτόλης, το νιτρογενές οξειδωτικό στρες καθώς και η ενεργοποίηση της PARP στο ισχιακό νεύρο και τα DRG κύτταρα (Poly (ADP-ribose) polymerase) [I. G. Obrosova et.al 2007].

Άλλες μελέτες σε διαβητικά μοντέλα επίμυων (ZDF-N rats) επιβεβαιώνουν αισθητική νευροπάθεια με μειωμένα δυναμικά ενέργειας (SNAP) και ταχύτητα αγωγής του ισχιακού νεύρου [J.W.Russel et.al. 2008] όπως και θερμική και μηχανική αλλοδυνία (allodynia) με μείωση του νευροδιαβιβαστή της cGRP [Li et al., 2006]. Η αιτία της νευροπάθειας σε περιπτώσεις διαταραχής ρύθμισης της γλυκόζης (IGT) δεν είναι ξεκάθαρη. Φαίνεται ότι η ινσουλίνη ή ο αυξητικός παράγοντας ομοιάζον της ινσουλίνης αναστρέφει την διαβητική νευροπάθεια σε μοντέλο επίμυων διαβήτη τύπου 1. Άλλωστε η μείωση των επιπέδων

ινσουλίνης προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη σε αισθητικά νεύρα και συνδέεται με εκκίνηση αξονικής νευροπάθειας [Brussee et al., 2004]. Στο διαβήτη 1 και 2 η νευροπάθεια συσχετίζεται με συστηματικό οξειδωτικό στρες [Maiese et al., 2007].

Σε υπεργλυκαιμικές συνθήκες, αυξημένη μεταβολική ροή στα μιτοχόνδρια με σύγχρονη απώλεια της μιτοχονδριακής αντλίας πρωτονίων, οδηγεί στην εμφάνιση ROS [Brownlee, 2005]. Η μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη, ελλείψει νευροτροφικής υποστήριξης προκαλεί μιτοχονδριακή εκπόλωση στη μιτοχονδριακή μεμβράνη των DRG κυττάρων, απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c και ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών [Vincent et al., 2004]. Ενδιαφέρον έχει ότι μικτοί νευρικοί πληθυσμοί DRG, παρουσία ROS, είναι μερικώς προστατευμένοι από κυτταρική βλάβη και απόπτωση είτε από αυξημένες γλουταθιόνες (συνδεδεμένες με MTs) [Berent-Spillson and Russell, 2007] είτε με ρύθμιση σημαντικών πρωτεϊνών στο αποπτωτικό μονοπάτι όπως η οικογένεια των Bcl (αλληλεπίδραση με Hsp70) [Delaney et al., 2001].

Πειραματικά ποντίκια C57BL/6J που τρέφονται με διαίτα υψηλή σε περιεκτικότητα λιπαρών έχει αποδειχτεί ότι εμφανίζουν παχυσαρκία και διαβήτη [Petro AE. Et.al 2004]. Φάνηκε *in vivo* ότι τα ζώα αυτά παρουσιάζουν νευροπάθεια λόγω οξειδωτικού στρες στα DRG νευρικά κύτταρα. Στην ίδια μελέτη *in vitro* καλλιέργειες DRG νευρώνων υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης στο θρεπτικό, αποδείχτηκε ότι εκφράζουν τον υποδοχέα oxLDL (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ή LOX-1), η ενεργοποίηση του οποίου από οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας οδηγεί σε εκκίνηση της NAD(P)H οξειδάσης* και γένεση οξειδωτικού στρες [Vincent AM et.al 2009].

* Η NAD(P)H οξειδάση αυξάνει τα επίπεδα σουπεροξειδίου μεταφέροντας από το NADPH ηλεκτρόνια εντός της κυτταρικής μεμβράνης και ένωση τους με μοριακό οξυγόνο.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη,

A. σε εμβρυϊκούς νευρώνες των οπισθίων γαγγλίων- DRG

- α. των επιδράσεων του Zn στην κυταρική επιβίωση και απόπτωση
- β. των επιδράσεων του Zn στους κυταρικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς του μετάλλου
- γ. των μεταβολών της ομοιοστατικών μηχανισμών του Zn λόγω υπερέκφρασης της hHSP70.
- δ. των επιδράσεων του Zn και της hHSP70. στην έκφραση πεπτιδίων που συνδέονται με μηχανισμούς αλγαισθησίας

B. σε πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε δίαιτα υψηλών λιπαρών- HFD

των επιδράσεων του Zn και της υπερέκφρασης της hHSP70

- α. στην ανάπτυξη
- β. στο αντιοξειδωτικό προφίλ
- γ. στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς του Zn σε DRG νευρώνες
- δ. στην αλγαισθησία

Τα παρακάτω ερωτήματα τέθηκαν προς απάντηση

A. σε κυτταρικό επίπεδο

1. Πως επιδρά ο Zn στην κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση εμβρυϊκών νευρώνων DRG και κατά πόσο προστατεύει από την απόπτωση η Hsp70;
2. Τα επίπεδα της μεταλοθειονίνης -MT3 μεταβάλλονται με την αύξηση Zn ? Πως επηρεάζει η hHsp70 την έκφραση της MT3 στα DRG;
3. Τα επίπεδα του ZnT7 μεταφορέα μεταβάλλονται με την αύξηση Zn? Πως επηρεάζει η hHsp70 την έκφραση του ZnT7 στα DRG;
4. Επηρεάζεται η έκφραση του πεπτιδίου που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης- CGRP από τα επίπεδα Zn;

B. σε επίπεδο πειραματόζων

Ποιές είναι οι επιδράσεις:

1. Του διατροφικού Zn στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην έκφραση του CGRP και την αλγαισθησία
2. Της υπερέκφρασης της h-HSP70 στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην έκφραση του CGRP και την αλγαισθησία
3. Της δίαιτας υψηλών λιπαρών (HFD) στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην αλγαισθησία και στην έκφραση του CGRP ;

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

In vitro Πειράματα

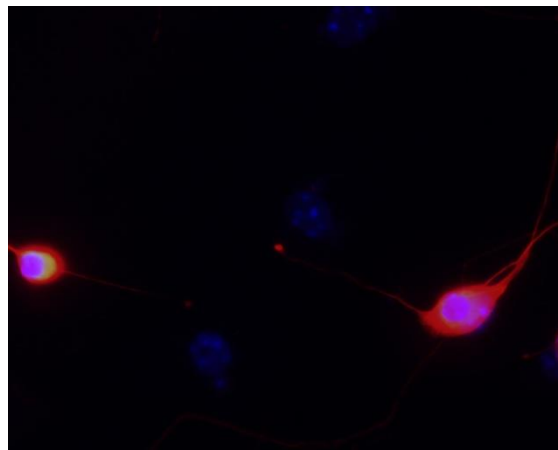
A. Κυτταροκαλλιέργειες Εμβρυϊκών DRG

Περιγραφή χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καλλιεργούμενων DRG

Οι πρωτογενείς αισθητικοί νευρώνες έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμοι στη μελέτη της νευρικής διαφοροποίησης in vivo και in vitro. Τα κύτταρα των DRG σε καλλιέργεια μοιράζονται σχεδόν τα ίδια χαρακτηριστικά με τους βλάβοϋποδοχείς in vivo και συχνά χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση των ιοντικών διαύλων που μεταφέρουν το ερέθισμα του πόνου. Οι νευρώνες της οσφυϊκής μοίρας είναι οι λιγότερο διαφοροποιήσιμοι στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης, αποτελώντας ιδανικό μοντέλο ως σχετικά αδιαφοροποίητη καλλιέργεια για ανάλυση κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών.

Οι διαχωρισμένοι εμβρυϊκοί DRG νευρώνες μπορούν να ληφθούν από έμβρυα, νεογέννητα ή και ενήλικα ζώα, παρόλα αυτά οι εμβρυϊκές καλλιέργειες δίνουν πιο καθαρές από γλοία αρχικές καλλιέργειες, με λιγότερα συσσωματώματα και αποτελούν το ιδανικότερο in vitro πειρατικό μοντέλο. Η in vitro καλλιέργειες τους χρειάζονται σχολαστικούς χειρισμούς. Τις πρώτες 2-3 ημέρες στο τρυβλίο εάν λάβουν τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες (νευροτροφίνες και NGF) τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν εντυπωσιακή νευρωνική και δενδριτική αύξηση, ενώ μετά το πέρας της 9ης ημέρας θεωρούνται ωριμασμένα. Στην 4η ημέρα της καλλιέργειας γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού και ανανέωση των νευροτροφικών παραγόντων. Οι απαιτήσεις των κυττάρων σε BDNF και GDNF καλύπτονται από την παραγωγή τους απ τα στηρικτικά κύτταρα γλοίας και τα ίδια τα DRG με ενδοκρινικό/παρακρινικό τρόπο [Farinas I, 2010]. Η συγκεκριμένη σειρά κυττάρων απαιτεί για την συγκράτηση των κυττάρων στο τρυβλίο την επίστρωση λαμινίνης ή κολλαγενάσης. Τα κύτταρα αυτά χωρίζονται κυρίως σε 2 πληθυσμούς με βάση το μέγεθός τους και τη μορφολογία τους αν και συχνά τα μεγέθη αυτά επικαλύπτονται. Τα μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα αντιπροσωπεύουν τους Α-τύπου μηχανοϋποδοχείς και θερμοϋποδοχείς, ενώ τα μικρότερα θεωρούνται πολύτροπες (μηχανικά, χημικά και θερμικά ερεθίσματα) C ίνες.

Χαρακτηριστικό των πρωτογενών καλλιέργειών DRG κυττάρων είναι ότι θεωρούνται μεικτές καλλιέργειες, καθώς μαζί με τα αισθητικά νευρικά κύτταρα, εξάγονται από τα έμβρυα και στηρικτικά νευρικά κύτταρα γλοίας. Σε κάποιες μεθοδολογίες μάλιστα η πρώτη σπορά δεν είναι πάντα βιώσιμη, εξ' αιτίας του χαμηλού αριθμού των στηρικτικών γλοιακών κυττάρων και απαιτείται 2η σπορά DRG στα ήδη καλλιεργημένα τρυβλία που περιέχουν γλοία. Τα γλοιακά κύτταρα στηρίζουν, θρέφουν και προστατεύουν τα αισθητικά νεύρα *in vivo* αλλά και *in vitro* (Εικόνα 1). Η καλλιέργειες μπορούν να αντέξουν περί των 20 ημερών στις συνθήκες της μεθόδου μας, ενώ βιβλιογραφικά υποστηρίζεται ότι είναι δυνατή η επιβίωση και για 30 ημέρες.



Εικόνα 1: Νέοι νευράξωνες "οδηγούμενοι" από γλοιακά κύτταρα. Χρώση TuJ1/Dapi.

Εξαγωγή και Καλλιέργεια Εμβρυϊκών Πρωτογενών Γαγγλιακών Νευρώνων Οπισθίων Ριζών (DRG)

Τα πειραματικά ζώα με γονότυπο γονιδιακής υπερέκφρασης της Hsp70 δωρίστηκαν από το εργαστήριο του καθηγητή Ε. Αγγελίδη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) και η δημιουργία τους και ο γενότυπος τους είναι γνωστός [Plumier JC, 1995]. Ο γονιδιακός τους έλεγχος και η συντήρηση και αναπαραγωγή τους, καθώς και των control- φυσιολογικών C57Bl/6J πειραματικών ποντικών, έγινε στο εκτροφείο πειραματόζωων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν οι διεθνείς οδηγίες χειρισμού και στέγασης πειραματόζωων σύμφωνα με τη FELASA (2007/526/EC). Η εμβρυϊκή ηλικία καθορίζεται από την ημέρα διασταύρωσης του θηλυκού σε οίστρο (Vaginal plug) με το αρσενικό (Embryonic Day 0, E0). Τα εγκυμονούντα θηλυκά θανατώνονταν κατά την 14η ημέρα (E14) και τα έμβρυα αφαιρούνταν εντός τρυβλίου με L15 διάλυμα σε δοχείο με πάγο.

Συλλογή Γαγγλίων

Μεταφέρουμε κάθε φορά ένα έμβρυο σε νέο τρυβλίο που περιέχει διάλυμα L15 και τοποθετούμε το τρυβλίο κάτω από το στερεοσκόπιο. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα πάντα εργαλεία που συνεχώς ξεπλένονται σε ποτήρι ζέσεως με αιθανόλη 70%,

αφαιρούνται προσεκτικά οι εξωτερικοί μαλακοί ιστοί και τα όργανα, έως να παραμείνει μόνο ο εμβρυϊκός νευρικός σωλήνας. Από κάθε έμβρυο 30 έως 40 γάγγλια συλλέγονται με τη χρήση μικρο-λαβίδας και εναποτίθενται σε τρυβλίο με διάλυμα L15.

Μεθοδολογία Καλλιέργειας DRG νευρώνων

Για την μεταφορά, εναιώρηση και χειρισμό των γαγγλίων προετοιμάζονται αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur με επικάλυψη διαλύματος σιλκόνης σε επτάνιο (Sigmacote). Αφού συγκεντρωθεί επαρκής αριθμός εμβρυϊκών γαγγλίων, αυτά μεταφέρονται σε σωλήνες Falcon με F12 διάλυμα. Οι ιστοί επεξεργάζονται σταδιακά με 2mg/ml κολλαγενάσης και εν συνεχεία με θρυψίνη 0.05% στους 37°C. Αφού μετρήσουμε σε πλάκα Neubauer το πλήθος των κυττάρων, καλλιεργούμε περίπου 4.000 κύτταρα ανά ml του προετοιμασμένου διαλύματος για καλλιέργεια και σπείρουμε τα πρωτογενή νευρικά κύτταρα σε προεπεξεργασμένο πολυτρυβλίο.

Υλικά Αναλώσιμα -Πιπέτες Pasteur, πούαρ, μεγάλα και μικρά Petri καλλιέργειας, ψαλίδια, λαβίδες μικροχειρουργικής, νυστέρι μικροχειρουργικής, βαμβάκι, μπουκάλια ζέσεως 500 και 250ml, πιπέτες από 2μl έως 1ml, ρύγχη πιπτετών, υδροβολέας, σύριγγες 25ml, σωλήνες Falcon, eppendorfs, φίλτρα σύριγγας 0.22mm, φίλτρα δ/των, πολυτρυβλία.

Συσκευές - Στερεοσκόπιο / Επωαστικός θάλαμος / Φυγοκεντρητής / Θάλαμος Κυτταροκαλλιιεργειών?!

Διαλύματα -Δ/μα βορικού οξέως (0.5mg/ml) -Δ/μα Ορνιθίνης με pH 8.4 (0.15M Poly-D-Ornithine σε δ/μα βορικού οξέως) -Δ/μα Hanks Balanced Salt Solution (HBSS 1x με προσθήκη 0.2% NaHCO₃) -Δ/μα HS-HI (Horse Serum Heat Inactivated) -Δ/μα Λαμινίνης (Laminine 20μg/ml σε HBSS) -Δ/μα L15 για εμβρυονικές καλλιέργειες (14 mg/ml) -Δ/μα F12 (12 mg/ml με προσθήκη 0.2% NaHCO₃ και 0.6% αντιβιοτικό/αντιμυτοτικό) -Δ/μα F12 + SATO (το SATO περιέχει 2 mM γλουταμίνη, 0,35% BSA, 60ng/ml προγεστερόνη, 16 μg/ml πουτρεσκίνη, 400 ng/ml L-θυροξίνη, 38 ng/ml σεληνιώδες νάτριο, 340 ng/ml TIT)

*Όλα τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα και συντηρούνται πάντα αποστειρωμένα και στις κατάλληλες θερμοκρασίες συντήρησής τους.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Προετοιμασία τρυβλίων καλλιέργειας

- Εντός του απαγωγού κυτταροκαλλιεργειών, προσθέτουμε σε 24-wells τρυβλία 500μl δ/τος ορνιθίνης ανά πηγαδάκι και αφήνουμε έως την επόμενη μέρα (overnight) στον επωαστικό θάλαμο.
- Αφαιρούμε με αποστειρωμένα Pasteur και ξεπλένουμε 3 φορές με δις-απεσταγμένο (ddH₂O) τα πηγαδάκια. Αφήνουμε 10-15 λεπτά ανοιχτό το τρυβλίο εντός του απαγωγού για να στεγνώσει.
- Προσθέτουμε 300μl φρέσκου δ/τος λαμινίνης και αφήνουμε για 3 ώρες εντός του επωαστικού.
- Αφαιρούμε πάλι με Pasteur την λαμινίνη και ξεπλένουμε 2 φορές με δ/μα F12.
- Αναρροφούμε το F12 και προσθέτουμε 1 ml F12+SATO ώστε τα τρυβλία να είναι έτοιμα για σπορά.

*Η επεξεργασία αυτή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των νευρώνων στο τρυβλίο.

Επεξεργασία πιπτετών Pasteur για χειρισμό των εμβρυϊκών γαγγλίων

Οι πιππέτες αυτές χρησιμοποιούνται για την μεταφορά και εναιώρηση των κυττάρων κατά την επεξεργασία τους πριν την καλλιέργεια.

- Αρχικά με χρήση φλόγας καίμε το ρύγχος ώστε να έχουμε 3 αποστειρωμένες πιππέτες Pasteur με κλιμακωτά μειούμενη διάμετρο σπής.
- Στη συνέχεια με τη βοήθεια ενός πουαρ αναρροφούμε πάνω-κάτω 8 με 10 φορές το δ/μα του Sigmacote ώστε να επικαλυφθεί η εσωτερική επιφάνεια και αφήνουμε 10-15 λεπτά τις πιππέτες ανάποδα σε ένα στατό να στεγνώσουν.
- Επαναλαμβάνουμε το ίδιο για κάθε πιπέτα με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο και αφήνουμε πάλι να στεγνώσουν.
- Τέλος γίνεται η ίδια διαδικασία με δ/μα HS-HI και οι πιππέτες είναι έτοιμες για τον χειρισμό των εμβρυϊκών ιστών.

Καλλιέργεια κυττάρων DRG

- Τα γάγγλια που συλλέχθηκαν εντός μικρού τρυβλίου με δ/μα L15 προσροφούνται με την βοήθεια της μεγαλύτερης σε διάμετρο επεξεργασμένης Pasteur και μεταφέρονται εντός σωλήνα Falcon μαζί με 2 ml του δ/τος L15.
- Προσθέτουμε 8 ml F12 έως όγκου 10 ml και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 1800g.

- Αφαιρούμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο χωρίς να αναρροφήσουμε το ίζημα των γαγγλίων.
- Προσθέτουμε 1ml δ/τος κολλαγενάσης (0.2%) και ανακινούμε ελαφρά ώστε να αιωρηθεί το ίζημα. Αφήνουμε τους ιστούς για 30 λεπτά στους 4°C και έπειτα για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο (37°C).
- Προσθέτουμε 9 ml F12 και φυγοκεντρούμε και πάλι για 2 λεπτά στα 1800g και απομακρύνουμε το υπερκείμενο (πλύση).
- Επαναλαμβάνουμε με 10 ml F12 δεύτερη πλύση και αφού αφαιρέσουμε όλο το υπερκείμενο προσθέτουμε 1 ml δ/τος θρυψίνης (0.05%). Αφήνουμε το ίζημα για 14 λεπτά (αυστηρά) στο υδατόλουτρο (37°C), ενώ ανακινούμε ελαφρά ανά τακτά διαστήματα.
- Προσθέτουμε πρώτα 1 ml HS-HI και έπειτα 8 ml F12 και αφού ανακινήσουμε ελαφρά τα κύτταρα φυγοκεντρούμε.
- Αναρροφούμε προσεκτικά το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε 2 πλύσεις με δ/μα F12.
- Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο, πάντα χωρίς να επηρεάζουμε το ίζημα των κυττάρων και προσθέτουμε 1 ml δ/τος F12 + SATO.
- Με την επεξεργασμένη πιπέτα Pasteur και χρήση πουαρ επαναιωρούμε προσεκτικά το ίζημα ε (5-10 επαναλήψεις) και επαναλαμβάνουμε με την μικρότερης διαμέτρου πιπέτα.
- Συλλέγουμε 10 μl από το ομοιογενές κυτταρικό δ/μα και τα μεταφέρουμε σε erpedorf μαζί με 10 μl Trypan Blue. Καταμετρούμε σε πλάκα Neaubauer.
- Υπολογίζουμε τους όγκους που απαιτούνται από το δ/μα για σπορά καλλιέργειας 4000 κυττάρων ανά θέση του πολυτρυβλίου.
- Τέλος προσθέτουμε 1μl από τις απαραίτητες για τα πρωτογενή νευρικά κύτταρα νευροτροφίνες NT3 και NGF (σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml).
- Τα κύτταρα τοποθετούνται για επώαση σε επωαστικό θάλαμο υπό συνθήκες 5% CO₂ και 37°C.

Συνολικά θανατώθηκαν περίπου 30 θηλυκά ποντίκια (Tg και Wt) από τα οποία λήφθησαν 6 έως 10 έμβρυα.

Σημαντική παρατήρηση είναι πως το F12 θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των νευρώνων της Gibco περιέχει 3μM Zn, σαν ένυδρο ZnSO₄ και θα αποτελεί την control ομάδα μας στα in vitro πειράματα.

B. Ανοσοφθορισμός

Όταν οι καλλιέργειες προορίζονται για μέθοδο ανοσοφθορισμού, πριν την σπορά τοποθετούνται αποστειρωμένες αντικειμενοφόρες καλυπτρίδες 12-mm. Μετά το πέρας τεσσάρων ωρών από την σπορά των κυττάρων, μετρούνται κάτω από το μικροσκόπιο τα προσκολλημένα κύτταρα με μορφολογία νευρώνων, κατά μήκος του κάθετου και οριζόντιου άξονα της καλυπτρίδας, ώστε να χρησιμοποιούνται για την ανοσοφθοριστική μέτρηση μόνο καλλιέργειες με παρόμοιο αρχικό αριθμό κυττάρων. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειραματικά πρωτόκολλα ήταν άνω των 9 ημερών, ομαλής επιβίωσης και είχαν δημιουργήσει επαρκή νευρωνική και δενδριτική αύξηση.

Ο ανοσοφθορισμομετρία είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Ως φθορισμός ορίζεται η εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μια ουσία η οποία ακτινοβολείται από φως μικρότερου μήκους κύματος. Στον φθορισμό χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος, αυτά διεγείρονται και απελευθερώνουν με τη μορφή φωτονίων την ενέργεια που προσέλαβαν. Οι φθορίζοντες δείκτες έχουν την ιδιότητα να απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με τη μορφή του ορατού και του υπεριώδους φωτός. Η ακτινοβολία που απορροφάται προκαλεί διέγερση του μορίου των δεικτών αυτών με συνέπεια την εκπομπή ακτινοβολίας σε μεγαλύτερο μήκος κύματος μέσα στο φάσμα του ορατού φωτός (400-760nm). Την παραπάνω ιδιότητα την εκμεταλλευόμαστε στα μικροσκόπια φθορισμού.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι τα ακόλουθα:

1) Το πρώτο αντίσωμα αναγνωρίζει την υπό εξέταση ουσία και δεσμεύεται στις ειδικές αντιγονικές θέσεις του ιστού ή κυττάρων. 2) Το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό εναντίον των ανοσοσφαιρινών IgG του ζώου που παρήγαγε το πρώτο αντίσωμα, δεσμεύεται στο σύμπλεγμα αντιγόνου-πρώτου αντισώματος. Το αντίσωμα αυτό είναι συνδεδεμένο με έναν φθορίζοντα δείκτη όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC - ο οποίος έχει μέγιστο απορρόφησης στα 490nm και μέγιστο εκπομπής στα 525nm - ακτινοβολία πράσινου χρώματος) ή η σουλφοροδαμίνη (Texas Red - η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm και μέγιστο εκπομπής στα 620nm - ακτινοβολία κόκκινου χρώματος). Κατά την διπλή σήμανση με φθορισμό είναι πολύ σημαντικό το φάσμα εκπομπής του ενός δείκτη να μην επικαλύπτει, ούτε και μερικώς, το φάσμα διέγερσης του άλλου, γι' αυτό ένα από τα καταλληλότερα ζευγάρια θεωρούνται οι δείκτες FITC και Texas Red.

Υλικά -Coverslip slides 11mm (καλυπτρίδες), πιπέτες και ρύγχη, γαμψή λεπτή λαβίδα, αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες αντικειμενοφόρων, πουαρ, σωλήνες Falcon, erpedorf, αλουμινόχαρτο, κουτί αποθήκευσης αντικειμενοφόρων.

Διαλύματα -Δ/μα F12 (12 mg/ml) - Δ/μα παραφολμαδεΰδης 8% (PFA) -Δ/μα φωσφορικών αλάτων 0.1 M (Phosphate Buffer) -Δ/μα Blocking Buffer (9ml PB + 1ml FBS + 20μl triton x 0.2% και φιλτράρισμα) -Δ/μα Dapi 1:1000

Πρωτόκολλο έμμεσου ανοσοφθορισμού καλλιεργημένων εμβρυϊκών νευρικών κυττάρων DRG

- Πριν την επεξεργασία του πολυτρυβλίου μας με τη λαμινίνη και την ορνιθίνη προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι αποστειρωμένη γυάλινη καλυπτρίδα (coverslip slide) 11mm στην οποία επικάθονται κατά την σπορά τα νευρικά κύτταρα.
- Έπειτα από την πάροδο 9 ημερών, επιλέγουμε προσεκτικά υπό το μικροσκόπιο τους καταλληλότερους πληθυσμούς κυττάρων για ανοσοφθορισμομετρικό προσδιορισμό και μετακινούμε τις καλυπτρίδες αυτών που επιλέξαμε σε νέο πολυτρυβλίο.
- Προσθετικά και ποτέ απ ευθείας πάνω στα κύτταρα, προσθέτουμε 500μl δ/τος F12 και 250μl φρέσκου δ/τος PFA και αφήνουμε 15 λεπτά.
- Αφαιρούμε το δ/μα και ξεπλένουμε τα τρυβλία με 500μl δ/τος PB για 10 λεπτά, αφήνοντας κάθε φορά το πολυτρυβλίο σε πλατφόρμα ανακίνησης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές (πλύση).
- Αφαιρούμε το δ/μα PB και προσθέτουμε 300 μl δ/τος blocking buffer και αφήνουμε για μία ώρα πάντα στην πλατφόρμα ανακίνησης.
- Εντός δοχείου με πάγο τοποθετούμε erpedorfs εντός των οποίων προετοιμάζουμε τα δ/τα με τα πρωτοταγή αντισώματα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους σε blocking buffer. Αναλυτικά χρησιμοποιήσαμε τις εξής διαλύσεις για τα παρακάτω αντισώματα: anti- MT3 1:300, anti-ZnT7 1:500, anti-cGRP 1:1200, anti-Hsp70 1:200 και anti-Tuj1 1:1000, σύμφωνα με της οδηγίες της κάθε εταιρείας κατασκευής.
- Αφαιρούμε το δ/μα blocking buffer και προσθέτουμε 300μl των αντίστοιχων πρωτοταγών αντισωμάτων ανάλογα αν είναι μονός ή διπλός ανοσοφθορισμός σε κάθε πειραματική περίπτωση. Αφήνουμε το τρυβλίο υπό ανάδευση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή έως την επόμενη ημέρα (overnight) στους 4°C.
- Συλλέγουμε τα δ/τα των αντισωμάτων για άμεση επαναχρησιμοποίηση και ακολουθούν 2-3 πλύσεις με δ/μα PB.

- Ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα (π.χ. rabbit anti-MT3) ετοιμάζουμε σε eppendorfs εντός δοχείου πάγου τα δ/τα που περιέχουν το φθορίζον δεύτερο αντίσωμα στην ανάλογη συγκέντρωση (π.χ. texas red mouse anti-rabbit 1:400) σε blocking buffer. Αφαιρούμε το δ/μα PB και προσθέτουμε 250-300μl των δ/των με τα δεύτερα αντισώματα και αφήνουμε υπό ανακίνηση για 1 ώρα.

*Επειδή τα 2^α αντισώματα φθορίζουν είναι αναγκαίο να έχουμε συνεχώς καλυμμένο το πολυτρυβλίο με αλουμινόχαρτο.

- Έπειτα από το πέρας μίας ώρας ξεπλένουμε πάλι 2-3 φορές με PB, καλύπτοντας πάντα το πολυτρυβλίο με αλουμινόχαρτο.
- Απομακρύνουμε το δ/μα PB και προσθέτουμε για διάρκεια 5 λεπτών 300μl δ/τος Dapi 1% για χρώση των πυρήνων των κυττάρων.
- Επαναλαμβάνουμε 2-3 πλύσεις των 10 λεπτών με PB δ/μα. Αφού αφαιρέσουμε το δ/μα PB και πριν στεγνώσουν οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα, με πολύ προσεκτικούς χειρισμούς τοποθετούμε με μια λεπτή λαβίδα τις καλυπτρίδες πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με μια σταγόνα μέσου φόρτωσης (Mounting medium: Flurosave reagent). Εναλλακτικά χρησιμοποιούμε δ/μα κυτταρίνης.

*Προσοχή η επιφάνεια της καλυπτρίδας με τα κύτταρα να στρέφεται προς τα κάτω. Είναι πολύ σημαντικό να μην παγιδεύονται φυσαλίδες αέρα μεταξύ της καλυπτρίδας και της αντικειμενοφόρου καθώς και το να απομακρύνεται η περίσσεια του μέσου φόρτωσης. Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες μαρκάρονται και αποθηκεύονται σε κουτί που δεν επιτρέπει να περνάει φως και φυλάσσονται εντός ψυγείου έως την παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού ή συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal). Η φωτογράφιση και οι μετρήσεις των κυττάρων είναι θεμιτό να γίνονται όσο το ταχύτερο γιατί ο φθορισμός αδυνατίζει με το χρόνο.

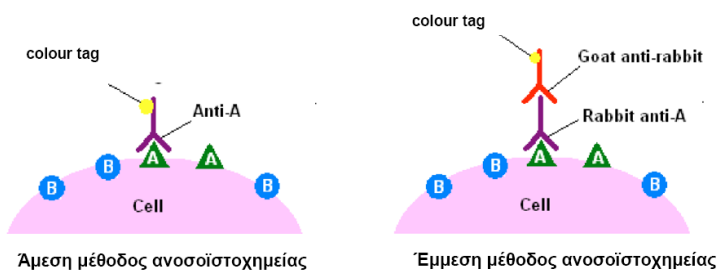
Ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών MT3, ZnT7 και cGRP μετά από επώαση των κυττάρων με συγκεντρώσεις άλατος Zn 15 και 30 μM

Θέλοντας να διαλευκάνουμε τις μεταβολές που μπορεί να προκαλούν υπο-τοξικές συγκεντρώσεις Zn σε καλλιεργημένα εμβρυϊκά DRG κύτταρα, αποφασίσαμε να εξετάσουμε την κατανομή και έκφραση των άμεσα σχετιζόμενων με την συγκέντρωση Zn πρωτεϊνών: MT3 και ZnT7. Παράλληλα χρησιμοποιούμε αντι-cGRP σημασμένο αντίσωμα σε συνδυασμό με αντίσωμα της β- τουμπουλίνης (Tuj1) για να καταμετρήσουμε με ανοσοφθορισμομετρία το ποσοστό των νευρώνων που εκφράζει αυτό το νευροπεπτίδιο.

Στα ποντίκια (αντίθετα με τους αρουραίους) τα ιοντικά κανάλια TRPV, που πιθανώς επηρεάζονται από την έκφραση της Hsp70, εκφράζονται στους πεπτιδεργικούς (cGRP+) νευρώνες [Woodbury CJ et.al., 2004].

Στα πολυτροβλία με τις καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για την μέθοδο μας, την 9η ημέρα προστίθενται στο 1ml του θρεπτικού των κυττάρων μας, δ/μα άλατος ZnSO₄ έως τελικής συγκέντρωσης 15 και 30 μM και αναδεύουμε ελαφρά. Αφήνουμε τα πολυτροβλία στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες και στην συνέχεια μετακινούμε τις καλυπτρίδες και ακολουθούμε την μέθοδο ανοσοφθορισμού όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η επιλογή των τροβλίων που σημάνθηκαν για το ίδιο αντιγόνο στις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις γίνεται πάντα με ίδιο προφίλ σποράς, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα πεδία μετρήσεων σε κάθε περίπτωση. Όλα τα 2α αντισώματα ελέγχθησαν για «παρεμβολή» φθορισμού (fluorescent interference), απουσία του 1ου αντισώματος.

*Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: της ισομορφής 3 της μεταλλοθειονίνης (MT3), της ισομορφής 7 του μεταφορέα του ψευδαργύρου (ZnT7), του πεπτιδίου που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (cGRP) και της β-III ισομορφής της τουμπουλίνης (Tuj1). Η Tuj1 είναι συνδεδεμένη με χρωμογόνο (AlexaFluor/ FITC) από τον κατασκευαστή και δεν απαιτεί 2^ο αντίσωμα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα αντισώματα είναι αυτές που προτείνονται από τον κατασκευαστή.



Σχήμα 1: Εκτός της Tuj1 που είναι άμεση, οι υπόλοιπες 3 πρωτεΐνες συμένονται με έμμεση ανοσοϊστοχημεία

*Το αντίσωμα της τουμπουλίνης-3 δεν αναγνωρίζει την πρωτεΐνη των γλοιακών κυττάρων και είναι αντίσωμα ενός βήματος χρώσης, δηλαδή είναι συνδεδεμένο με το δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα εκ των προτέρων.

*Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε διπλό ανοσοφθορισμό ήταν η cGRP με την Tuj1, ώστε να υπολογισθεί το ποσοστό των νευρικών κυττάρων που είναι πεπτιδεργικά.

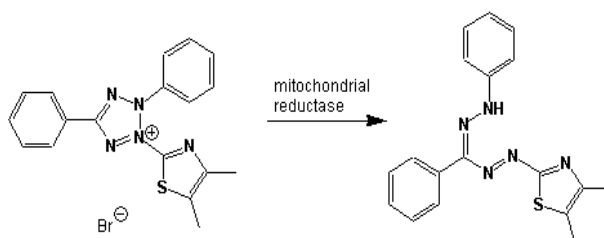
Μεθοδολογία Υπολογισμού της Τοξικότητας Zn²⁺ σε εμβρυϊκούς νευρώνες DRG

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή μας τα ιόντα Zn²⁺ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro [Frederickson et al., 2005] όπως άλλωστε και η ομοσυνοδός πρωτεΐνη Hsp70 με την

συμμετοχή της στο πλήθος κομβικών σημείων της απόπτωσης [Arya R.J et al. 2007]. Με σκοπό να ερευνήσουμε την αποπτωτική δράση του Zn σε εμβρυϊκά DRG κύτταρα σε συσχέτισμό με την προστατευτική έναντι τοξικότητας πρωτεΐνη Hsp70, επώασαμε τα κύτταρα από φυσιολογικά έμβρυα και διαγονιδιακά Hsp70- υπερεκφράζοντα έμβρυα, σε ένα φάσμα συγκεντρώσεων άλατος Zn. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε το άλας ZnSO₄, το οποίο και θεωρείται υψηλά τοξικό για καλλιέργειες νευρικών κυττάρων [Pavlica S, 2009], ενώ ο χρόνος των επώασεων επιλέχθηκε 24 ώρες με βάση τη βιβλιογραφία παρόμοιων πειραμάτων με Zn [Adamo AM et al., 2010- Morley SNet al., 2007].

Γ. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής επιβίωσης MTT

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT



(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και έτσι 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. Συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη DMSO (dimethylsulphoxide) και η συγκέντρωση των ζώντων κυττάρων υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm (φίλτρο αφαίρεσης υπόβαθρου στα 670nm) με τη βοήθεια φωτόμετρου ELISA.

Με τη μέθοδο αυτή καθορίζουμε και το IC₅₀, το μισό της μέγιστης συγκέντρωσης αναστολής μιας ουσίας για να διακόψει μία βιολογική διαδικασία, δηλαδή στην περίπτωση του πειράματος μας, το μισό της συγκέντρωσης του ZnSO₄ που χρειάζεται για να θανατώσει όλα τα κύτταρα DRG στο τρυβλίο μας.

Μεθοδολογία:

- Καλλιέργεια των κυττάρων σε πολυτρυβλίο για ELISA. Όμοια με την καλλιέργεια των DRG εμβρυϊκών κυττάρων σε 24ων θέσεων πολυτρυβλίο, από την προηγούμενη μέρα της σποράς το 96-well πολυτρυβλίο επεξεργάζεται με δ/μα ορνιθίνης και έπειτα λαμινίσης.

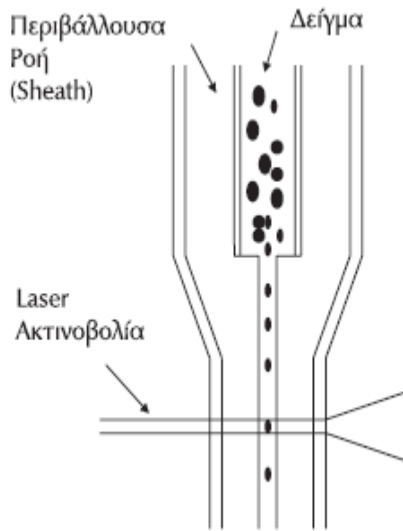
Την ημέρα της συλλογής των κυττάρων και έπειτα από την επεξεργασία των γαγγλίων με τα ένζυμα αποχωρισμού (κολλαγενάση και θρυψίνη), κάνουμε σπορά 1000 κυττάρων σε τελικό όγκο 200μl θρεπτικού δ/τος F12+SATO ανά πηγαδάκι του πολυτρυβλίου.

- Οι εμβρυϊκοί νευρώνες αφήνονται για διάστημα 9 ημερών με μία αλλαγή θρεπτικού υλικού και έπειτα αναρροφούμε όλο το θρεπτικό και προσθέτουμε 200μl F12+SATO με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $ZnSO_4$ (15-500μM) τα οποία προετοιμάζονται με διαδοχικές αραιώσεις. Μία σειρά κυττάρων αφήνεται χωρίς προσθήκη του άλατος σαν control. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα (σε απόλυτη θερμοκρασία 37 οC και ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 5 % σε CO₂) και αφήνονται για διάρκεια 6 ωρών.
- Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προσθέτουμε σε κάθε μικροκυψελίδα του πολυτρυβλίου 20μl φρέσκου δ/τος MTT και αφήνουμε για 3 ώρες και πάλι το πολυτρυβλίο για επώαση. Το διάλυμα MTT είναι 5mg/ml διαλυμένο σε PBS.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Δείκτη του ικανοποιητικού μεταβολισμού του MTT στη μικροκυψελίδα αποτελεί ο σχηματισμός κρυστάλλων φορμαζάνης στο εσωτερικό των κυττάρων. Επομένως, η μετατροπή του MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης αποτελεί ένδειξη για τη κατάσταση των κυττάρων.
- Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου που βρίσκεται στις μικροκυψελίδες με κίτρινο ρύγχος πιπέτας υπό κενό από όλα τα μικροπηγαδάκια, με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αναρροφήσουμε το ίζημα.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 200 μl δ/τος DMSO και επαναιωρούμε με την πολυπιπέτα ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι.
- Τέλος φωτομετρούμε στα 560 nm, χρησιμοποιώντας φωτόμετρο για ELISA. Από τις απορροφήσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων και το IC₅₀ λογαριθμικά σε πρότυπη καμπύλη.

Δ. Μεθοδολογία υπολογισμού κυτταρικής απόπτωσης με χρήση κυτταρομέτρου ροής.

Κυτταρόμετρο ροής

Η Κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία γρήγορη τεχνική, ποσοτική και πολυπαραμετρική και βασίζεται στην ανάλυση κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονιακής ανίχνευσης και στηρίζεται στην ενίσχυση φθορίζοντων ιχνηθετών και υποστρωμάτων.

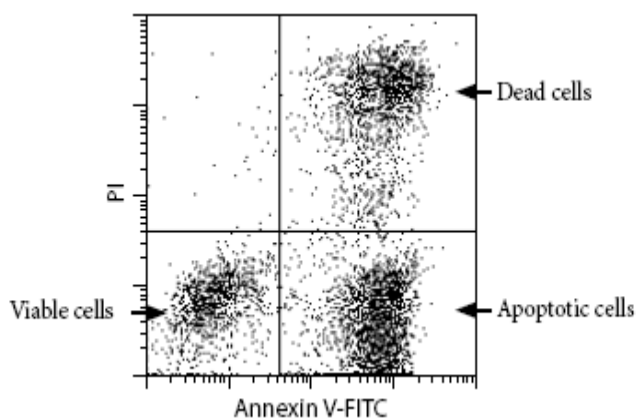


Δέσμη λέιζερ μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, ενώ ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150μm που αιωρείται στο υγρό και διαπερνά τη δέσμη, σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα οι φθορίζοντες ιχνηθέτες που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να

εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός ανιχνεύεται και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον μέγεθος του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).

Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής απόπτωσης από Zn και αντι-αποπτωτικής δράσης της Hsp70 σε DRG εμβρυικών νευρώνων με χρήση κυτταρομέτρου.

Με σκοπό να ερευνήσουμε την αντι-αποπτωτική ισχύ της Hsp70, η οποία υπερεκφράζεται στα νευρικά κύτταρα των γαγγλίων οπισθίων ριζών των διαγονιδιακών πειραματόζων μας, χρησιμοποιήσαμε κυτταρόμετρο ροής. Αρχικά έγινε επώαση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (24 ώρες) και σε συγκεντρώσεις ZnSO₄ από 0 έως και 100μM προκαλώντας μικρότερου βαθμού stress στα κύτταρα.



Έπειτα οι πληθυσμοί κυττάρων των φυσιολογικών (WT-control) και των διαγονιδιακών (Tg) ζώων ιχνηθετούνταν με ανεξίνη (Annexin) και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide-PI) για να εξακριβωθεί ο αριθμός των κυττάρων που είναι σε νεκρωτική ή αποπτωτική κατάσταση.

Στα περισσότερα ζωντανά ευκαρυωτικά κύτταρα το αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο φωσφατυδιλσφαιρίνη (PS) εντοπίζεται εντός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μετακινείται στην επιφάνεια του κυττάρου κατά την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης. Το PS λειτουργεί σαν σηματοδότης για την αφαίρεση των αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα και η ανεξίτη συνδέεται ισχυρά με αυτό υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} . Έτσι ο εντοπισμός των αποπτωτικών κυττάρων γίνεται με την χρήση σημασμένης ανεξίτης, ενώ όταν τα κύτταρα είναι φθορίζοντα και από PI καταμετρούνται ως νεκρωτικά καθώς η χρώση αυτή δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη.

Μεθοδολογία:

- Για κάθε μια από τις 4 συγκεντρώσεις $ZnSO_4$ (0-15-30-100 μ M) που χρησιμοποιήσαμε κάναμε σπορά 50.000 κυττάρων χωρισμένα σε 10 (x5.000) πηγαδάκια σε πολυτρυβλίο 24ων θέσεων. Τα κύτταρα διατηρούνται 9 μέρες για επώαση στον επωαστικό θάλαμο (37 °C, 5%CO₂) και την 4η μέρα πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού F12+SATO.
- Την ημέρα του πειράματος προσθέτουμε στο θρεπτικό τις αντίστοιχες ποσότητες του άλατος Zn για κάθε μια από τις συγκεντρώσεις μας και μετά από ελαφριά ανακίνηση αφήνουμε στον επωαστικό για διάστημα 24 ωρών.
- Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από κάθε τρυβλίο σε σωλήνες falcon, για να διατηρήσουμε και τα κύτταρα που ενδεχομένως έχουν αποκολληθεί από το ταπήτιο. Κατόπιν προστίθενται 1,5ml Trypsin και τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστίθενται 4,5ml PBS και τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με τη χρήση πιπέττας. Αφού αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα συλλέγονται στα αντίστοιχα falcon.
- Τα falcon φυγοκεντρώνονται στις 3.000 rpm για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναιωρούνται τα κυτταρικά ιζήματα σε 100 μ l δ/τος Calcium Buffer 1x.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σκοτεινό θάλαμο όπου σε κάθε δείγμα προστίθενται 5 μ l Annexin και 5 μ l Propidium Iodide. Όλα τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 15 λεπτών προστίθενται επιπλέον 1ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1.1ml). Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow®ML, Partec) όπου πραγματοποιείται ανάλυση και προσδιορισμός του % ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

In vivo Πειράματα

A. Ομάδες και χειρισμοί πειραματοζώων-

Συνολικά 85 ενήλικα αρσενικά πειραματικά ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για το in vivo πειραματικό κομμάτι. Όλα τα ζώα ήταν διασταύρωση C57Bl/6x CBA [J.C Plumier et.al 1995] (wild type – control animals) ενώ τα μισά ήταν τα υπερεκφράζοντα την ανθρώπινη Hsp70 πρωτεΐνη διαγονιδιακά ζώα (Tg). Έλεγχος του γονιδιακού προφίλ έγινε πριν την έναρξη του πειραματικού με PCR από δείγματα ουράς κάθε ζώου. Κάθε πληθυσμός από αυτά χωρίστηκε σε 4 ομάδες, από 9 έως 12 ζώα σε κάθε ομάδα, ανάλογα με την διατροφή που έλαβαν. Οι 4 διατροφές περιλάμβαναν την καθιερωμένη διατροφή του εκτροφείου πειραματοζώων (Chow Diet) και 3 διατροφές υψηλής δίαιτας λιπαρών (55% του συνόλου των θερμίδων) με διαφορετικές περιεκτικότητες σε Zn, μια χαμηλή (3), μια κανονικής συγκέντρωσης (30) και μια με αυξημένη συγκέντρωση (300). Όλες οι διατροφές δίνονταν σε επάρκεια (ad libitum). Στην ομάδα με την ελλιπή διατροφή Zn το νερό είχε πριν φιλτραριστεί για κατακράτηση του Zn και το κλουβί, τα κάγκελα και η ποτίστρα οξινίστηκαν με δ/μα νιτρικού για μείωση των καταλοίπων του μετάλλου.

| Διατροφή | Αριθμός Wild Type | Αριθμός Transgenic |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| Chow Diet (30 Zn) | 10 | 11 |
| High Fat Diet (3 Zn) | 12 | 10 |
| High Fat Diet (30 Zn) | 10 | 11 |
| High Fat Diet (300 Zn) | 10 | 11 |

Οι πατρικές γενεές που χρησιμοποιήθηκαν για αναπαραγωγή ελέγχθηκαν με PCR ώστε όλα τα πειραματοζώα του πειράματος μετά τις 20 πρώτες ημέρες από τη γέννα τους, διαχωρίστηκαν από τα κλουβιά με τους γονείς τους (απογαλακτισμός) και αφού αναγνωρίστηκαν σε φύλο, μόνο τα αρσενικά, χωρίστηκαν ανά 4 ή 5 σε ένα κλουβί. Έως την ηλικία του ενός μηνός έλαβαν διατροφή εκτροφείου και έπειτα εντάχθηκαν στις αντίστοιχες διατροφές ανά κάθε ομάδα για διάρκεια 10 εβδομάδων. Την πρώτη εβδομάδα τα νεαρά ζώα αριθμούνται με τη χρήση μαρκαρίσματος του αυτιού, χωρίς να προκαλείται αιμορραγικός τραυματισμός. Κάθε εβδομάδα τα ζώα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας και γίνονταν παρατηρήσεις για την ποιότητα του τριχώματος και την ολική εμφάνιση και

κατάσταση τους. Παράλληλα έγινε μέτρηση πόνου σε όλα τα ζώα την τελευταία εβδομάδα πριν την θανάτωση τους καθώς και σειρά τεστ συμπεριφοράς. Σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους οι χειρισμοί γίνονταν με γνώμονα το λιγότερο άγχος για τα ζώα και την όσο το δυνατό μεγαλύτερη εξοικείωση τους με το ανθρώπινο χέρι, ώστε να μειωθεί η παρεμβολή λάθους στα αποτελέσματα συμπεριφορών.

Θανάτωση – Συλλογή ιστών και αποθήκευσή τους.

Μετά την συμπλήρωση της 10^{ης} εβδομάδας συγκεκριμένου τύπου διατροφής για κάθε ομάδα, τα πειραματικά ποντίκια θυσιάζονταν. Πριν την διαδικασία θανάτωσης προηγήτο μέτρηση βάρους και μήκους σώματος. Αρχικά τα ζώα αναισθητοποιούνταν με μείγμα αναισθητικών (κεταμίνης) περιτοναϊκά και ενώ ακόμη είχαν καρδιακό παλμό γινόταν συλλογή του αίματος από το μάτι σε eppendorf. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε ώστε να μην υπάρχει αιμόλυση εξ' αιτίας της χρήσης βελόνης και συγχρόνως δίνει την μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα αίματος. Στη συνέχεια τα ζώα θανατώνονταν με αποκεφαλισμό.

Για την συλλογή των ιστών ανοιγόταν η κοιλιακή χώρα και με προσεκτικές κινήσεις αφαιρούνταν τα οστά του θώρακα. Η καρδιά ξεπλενόταν *in situ* με PBS και απομακρυνόταν για περαιτέρω ξέπλυμα μέσα σε ποτήρι ζέσεως με PBS, καθώς και το συκώτι. Οι ιστοί ζυγίζονταν, ψύχονταν απευθείας σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονταν αριθμημένοι για κάθε ζώο. Στη συνέχεια η σπονδυλική στήλη καθαριζόταν από τους περιβάλλοντες ιστούς και μεταφερόταν σε τρυβλίο με δ/μα L15 για να αφαιρεθούν κάτω από στερεοσκόπιο ο νωτιαίος μυελός και γάγγλια. Οι ιστοί των νωτιαίων αποθηκεύονταν στους 4°C αριθμημένοι για κάθε ζώο. Τα γάγγλια των οπισθίων ριζών στο ύψος της οσφυϊκής (lumbar) μοίρας συλλέγονται από κάθε ζώο ξεχωριστά μέσα σε δ/μα L15.

Είναι σημαντικό όλα τα χειρουργικά εργαλεία να είναι πάντα καθαρά, ενώ πρέπει να χρησιμοποιείτε άλλο σετ για την αρχική λήψη των ιστών και διαφορετικό, συνεχώς αποστειρωμένο για την εξαγωγή των γαγγλίων. Ο χειρουργικός πάγκος καλύπτεται με χειρουργικό πεδίο και λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα προστατευτικά μέτρα (γάντια, ποδιές, μάσκες). Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε από γνώστες των κανόνων ασφαλείας και καλής πειραματικής αντιμετώπισης των ζώων, με σεβασμό προς αυτά, όπως ορίζουν οι διεθνείς κανόνες (FELASA).

B. Τεστ Πόνου

Οι δοκιμασίες πόνου (nociception assays) αξιολογούν την ικανότητα ενός πειραματόζωου να αναγνωρίζει ένα αλγογόνο ερέθισμα που παράγεται με ελεγχόμενα προκλητή διεγερση των περιφερικών υποδοχέων. Τα τεστ αυτά στηρίζονται στην αναγνώριση συμπεριφορών αντίδρασης πόνου όπως γλείψιμο του σημείου ερεθισμού, τίναγμα των άκρων και άλλα ανάλογα την πηγή του αλγογόνου ερεθίσματος.

Μεθοδολογία Hot Plate Test

Η δοκιμασία του Hot Plate ή δοκιμασία θερμής πλατφόρμας, μετράει τον χρόνο αντίδρασης του υπό εξέταση πειραματόζωου σε θερμικό ερέθισμα στις περιοχές των άκρων. Πρόκειται για μια επιφάνεια στρογγυλού σχήματος 22x22 cm από μέταλλο ή πορσελάνη, η οποία θερμαίνεται έως θερμοκρασία 50-54 οC και περικλείεται από ένα διαφανές κύλινδρο από plexiglass, μέσα στον οποίο περιορίζεται το ζώο. Η συσκευή περιέχει ψηφιακό χρονόμετρο το οποίο συνδέεται με διακόπτη ποδιού. Το ζώο τοποθετείται πάνω στην προθερμασμένη επιφάνεια και μετράται ο χρόνος αντίδρασης του με βάση την συμπεριφορά αντίδρασης στο ερέθισμα. Οι συνήθεις αντιδράσεις στο Hot Plate είναι το άλμα από την ζεστή επιφάνεια, το γλείψιμο των πίσω άκρων και το έντονο τίναγμα των άκρων [Cirulli et al., 2000]. Το τεστ αυτό μαρτυρεί την άρτια λειτουργία ή όχι μόνο του ΠΝΣ με το χρόνο αντίληψης του ερεθίσματος, όσο και του ΚΝΣ καθώς η αντίδραση είναι περιπλοκότερη από ότι ένα αντανακλαστικό.

Τα ζώα αφήνονταν μέσα στον κύλινδρο πάνω σε διαχωριστικό από τη ζεστή επιφάνεια πριν από κάθε μέτρηση τουλάχιστον για 5 λεπτά για εξοικείωση στο χώρο και μείωση του λάθους αντιδράσεων εξαιτίας άγχους. Τη στιγμή επαφής του ζώου με την πλάκα εκκινείται το χρονόμετρο και διακόπτεται με την εμφάνιση της αντίδρασης πόνου. Το πειραματόζωο απομακρύνεται απευθείας από την θερμή επιφάνεια, ενώ σαν μέγιστος χρόνος ορίστηκαν τα 40 secs, έτσι σε περίπτωση μη εμφάνισης αντίδρασης σ το χρόνο αυτό το ζώο απομακρυνόταν από την πλάκα για αποφυγή τραυματισμού του. Όλες οι μετρήσεις έγιναν «τυφλά» από τον παρατηρητή της αντίδρασης πόνου ώστε να μη γνωρίζει κάθε φορά ποια ομάδα πειραματοζώων ήταν υπό εξέταση. Όλες μας ο μετρήσεις έγιναν στους 51+ 0.1 οC για όλες τις ομάδες.

Μεθοδολογία Tail Flick Test

Η μέθοδος του τεστ Tail Flick χρησιμοποιείται για την μελέτη του αντανακλαστικού της ουράς των πειραματόζωων. Αντιστοιχία φυσικά του αντανακλαστικού της ουράς δεν εμφανίζεται στον άνθρωπο, αλλά η μελέτη του δείχνει συνολικά την κατάσταση ομαλής λειτουργίας των αντανακλαστικών του περιφερικού νευρικού συστήματος του ζώου που ελέγχονται από τα γάγγλια των οπισθίων ριζών.

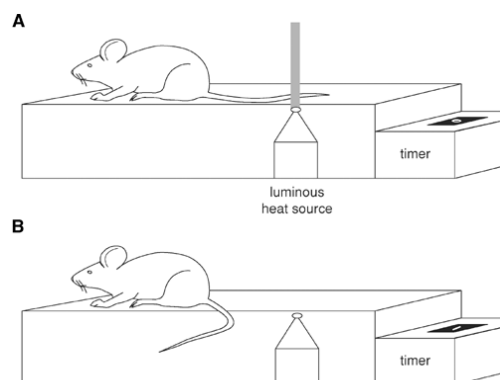
Η διάταξη του Tail flick τεστ χρησιμοποιεί για την έκκληση του αλγογόνου ερεθίσματος μια υψηλής έντασης δέσμη φωτός στοχευμένα πάνω στην ουρά του πειραματόζωου. Η φυσιολογική απόκριση είναι η απομάκρυνση της ουράς από την πηγή του θερμικού ερεθίσματος, με μια χαρακτηριστική αντανακλαστική κίνηση από όπου και παίρνει την ονομασία η μέθοδος (flick-πέταγμα). Η συσκευή περιέχει αυτόματο διακόπτη φωτοκύτταρου και χρονόμετρο για την καταγραφή των χρόνων αντίδρασης (+ 0.01sec). Η δέσμη φωτός είναι πάντα ρυθμισμένη στα 150 watts.

Τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε θάλαμο σχετικής ακινητοποίησης και αφήνονται να ηρεμήσουν περίπου 5 λεπτά. Η ουρά τους τοποθετείται πάνω από τη δέσμη φωτός μέσα σε μια εγκοπή 0.5cm και χωρίς να είναι σε επαφή με την πηγή ώστε να αποφεύγονται εγκαύματα. Ο μέγιστος χρόνος διακοπής (cut-off time) για την απόκριση ήταν τα 15sec. Οι καταγραφές που λήφθηκαν υπ' όψη ήταν αυτές που είχαν την χαρακτηριστική κίνηση αντανακλαστικού του πόνου με ένα απότομο πέταγμα της ουράς.

Η διαδικασία του Tail Flick την 10η εβδομάδα. Οι 2 συσκευές μεταφέρθηκαν στον χώρο του εκτροφείου των ζώων για να μην απαιτείται μεγάλος χρόνος εξοικείωσης των πειραματόζωων σε νέο περιβάλλον.

Γ. Τομές των DRG από τα ενήλικα ζώα σε κρυοστάτη και σήμανσή τους

Τα γάγγλια των οπισθίων ριζών από τις ομάδες πειραματόζωων μας στη συνέχεια επεξεργάστηκαν για να ακολουθήσει ανοσοφθορισμομετρικός τους έλεγχος ώστε να δούμε την διανομή στις πρωτεΐνες υπό εξέταση ανάλογα με τις 4 διαφορετικές διατροφές και την υπερέκφραση ή όχι της Hsp70. Τουλάχιστον 2 μη-διαδοχικές τομές από 2 ξεχωριστά DRG μετρήθηκαν από 6-7 ζώα κάθε ομάδας (2x2x6x8=192 τομές)



I- Τομές Κρυοστάτη

Η μέθοδος της κοπής ιστών με κρυοστάτη είναι σχετικά γρήγορη και αποτελεί καλό εργαλείο για την οπτικοποίηση λεπτομερειών των ιστών. Αν και οι τομές κρυοτόμου είναι λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις τομές παραφίνης, θεωρούνται ανώτερες για την συντήρηση της αντιγονικότητας και τον έλεγχο των αντιγόνων σε φθοριστική μικροσκοπία. Δεν απαιτούνται μακροχρόνια στάδια αφυδάτωσης των ιστών και για αυτό οι τομές τους και η τεχνική ανοσοφθορισμού τους μπορεί να πραγματοποιηθεί την ίδια ημέρα.

Μεθοδολογία:

- Οι ιστοί των γαγγλίων που συλλέχθηκαν μεταφέρονται για μία ώρα από το δ/μα L15 σε δ/μα φρέσκιας παραφορμαλδεΐδης 4% και αφήνονται για μία ώρα στους 40°C.
- Στη συνέχεια ξεπλένονται με φωσφορικό δ/μα (PB 0,1 M) 3 φορές και για αποφυγή δημιουργίας κρυσταλλικών δομών στις χαμηλές θερμοκρασίες παγώματος (cryoprotection) αφήνονται σε δ/μα σουκρόζης (30%) έως να βυθιστούν.
- Οι ιστοί βυθίζονται σε ζελατινώδες υλικό έγκλισης OCT (compound embedding medium for Optimal Cutting Temperature) σε ειδικές θήκες (cryomolds) ώστε να ψυχθούν ομοιόμορφα σε υγρό άζωτο. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να συντηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -70°C.
- Την μέρα που πραγματοποιούνται οι τομές των γαγγλίων, τα δείγματα στερεώνονται στις ειδικές κυκλικές βάσεις του κρυοστάτη με πρόσθεση υλικού OCT και αφήνονται να εξισορροπηθούν με την θερμοκρασία του θαλάμου. Ο κρυοστάτης χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία -21°C και ρυθμίζεται σε τομές πάχους 10μm. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τις τομές ήταν το Leica CM1900 με δυνατότητα πάχους τομών από 40 έως 5 μm.
- Κάθε τομή συλλέγεται σε ειδικά προεπεξεργασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα (microscope slides Super Frost) στην οποία τοποθετούνται 4-5 διαδοχικές τομές γαγγλίων.
- Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές φυλάσσονται σε θήκη και μπορούν να συντηρηθούν στους -20°C έως την ημέρα της σήμανσης τους.

II-Ανοσοφθορισμός δειγμάτων DRG

Η ανοσοϊστοχημεία συνδυάζει ανοσολογικές και βιοχημικές μεθόδους. Στοχεύει στην εντόπιση και την μελέτη κατανομής των διαφόρων πρωτεϊνών κυττάρων αλλά και ιστών. Βασική της αρχή αποτελεί η ειδική σύνδεση αντισώματος-αντιγόνου. Από το 1942 οπότε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η μέθοδος έως σήμερα έχουν γίνει πολλές αλλαγές και διορθώσεις όσον αφορά την σύνδεση της πρωτεΐνης, την μονιμοποίηση του ιστού, τις μεθόδους ανίχνευσης και τους τρόπους παρατήρησης του σήματος. Σήμερα οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι ανίχνευσης είναι με την χρήση συνδετών που φέρουν είτε κάποιο ένζυμο είτε κάποιο φθορόχρωμα. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού είναι στην ουσία μια τεχνική ανοσοϊστοχημείας όπου αυτό που αλλάζει είναι ο τρόπος ανίχνευσης του σήματος. Στην περίπτωση λοιπόν αυτή το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα φθοριόχρωμα το οποίο όταν ακτινοβοληθεί με μία δέσμη φωτός, συγκεκριμένου μήκους κύματος, εκπέμπει με τη σειρά του φως, σε μήκος κύματος διαφορετικό από το μήκος απορρόφησης. Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια με την χρώση των κυττάρων από τις καλλιέργειες πάνω στις καλλυπτρίδες, ενώ χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια αντισώματα για έλεγχο.

Μεθοδολογία:

- Αρχικά η περιοχή γύρω από τις τομές των ιστών στις αντικειμενοφόρες πλάκες μαρκάρεται με ειδικό μαρκαδοράκι (dakopen) που εμποδίζει την διαφυγή των δ/των που τοποθετούνται πάνω σε αυτήν.
- Ξεπλένουμε 3 φορές με 1 ml δ/τος. PB 0.1M, 5 min την κάθε φορά.
- Προσθέτουμε πάνω στις τομές 1 ml δ/τος blocking buffer (0.3% triton X) για 1 ώρα. Με την χρήση αυτού του δ/τος ανοίγουμε τις μεμβράνες των κυττάρων έτσι ώστε αργότερα να μπορεί εύκολα το αντίσωμα να συνδεθεί στον επιθυμητό ενδοκυτταρικό στόχο.
- Ξεπλένουμε και πάλι με χρήση PB 3 φορές.
- Προσθήκη blocking για 3 h.
- Προσθήκη 500μl δ/τος blocking και πρώτου αντισώματος στην ανάλογη συγκέντρωση. Σημειώνεται ότι στο πλακάκι που θα χρησιμοποιηθεί ως control δεν τοποθετείται αντίσωμα παρά μόνο blocking buffer. Αφήνουμε για μια ώρα.

- Στην συνέχεια πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με PB, 5 min την κάθε φορά.
- Προσθήκη δεύτερου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι αρκετά φωτοευαίσθητο. Έτσι τόσο το erpendorf στο οποίο το τοποθετείται όσο και τα πλακάκια πρέπει να είναι καλυμμένα από φωτεινές πηγές. Σημειώνεται ότι στο πλακάκι που θα χρησιμοποιηθεί ως control προστίθεται δεύτερο αντίσωμα. Αφήνουμε για μία ώρα.
- Επαναλαμβάνουμε 3 ξεπλύματα των αντικειμενοφόρων με PB.
- Απομακρύνεται το δ/μα PB από το πλακάκι και προσθέτουμε για 5 λεπτά δ/μα Dapi.
- Ξεπλένουμε τις τομές με δ/μα PB 3 φορές για 5 λεπτά και πριν στεγνώσουν οι αντικειμενοφόροι προσθέτουμε 2-3 σταγόνες mounting medium για φθορισμό (Fluorsave reagent) και τις σκεπάζουμε με καλυπτρίδα (coverglass) αποφεύγοντας να παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα.
- Οι αντικειμενοφόρες συντηρούνται πάντα σε κλειστό κουτί για να μην έρχονται σε επαφή με το φως και σε θερμοκρασίες από -4oC ή -20oC για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

*Τα διαλύματα με τα αντισώματα επανασυλλέγονται σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ προαιρετικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως σταθεροποιητικό λίγο βερνίκι νυχιών.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: της ισομορφής 3 της μεταλλοθειονίνης (MT3), της ισομορφής 7 του μεταφορέα του ψευδαργύρου (ZnT7), του πεπτιδίου που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (cGRP) και της β-III ισομορφής της τουμπουλίνης (Tuj1). Η Tuj1 είναι συνδεδεμένη με χρωμογόνο (AlexaFluor/ FITC) από τον κατασκευαστή και δεν απαιτεί 2ο αντίσωμα. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα αντισώματα είναι αυτές που προτείνονται από τον κατασκευαστή.

Δ. Τομές Παραφίνης και Ιστοχημεία των DRG ενήλικων πειραματόζωων

Με τον όρο ανοσοϊστοχημεία εννοούμε μια ομάδα ανοσοσημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να καταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Ίσως η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα από οποιαδήποτε άλλη διαγνωστική μέθοδο ή τεχνική.

Παρουσιάζει πολύ ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα, δυνατότητα εφαρμογής και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, υψηλή επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης με βάση τις μορφολογικές παραμέτρους.

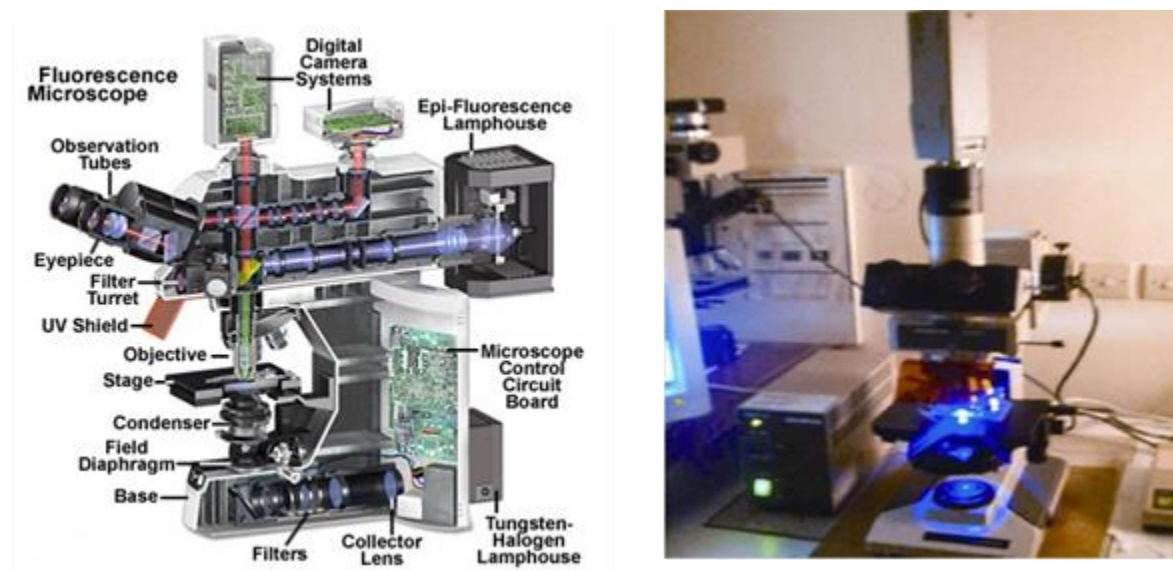
Οι ιστοί που έχουν ληφθεί από τα πειραματόζωα παραμένουν στο δ/μα παραφορμαλδεΐδης. Οι ιστοχημικές αναλύσεις έγιναν μόνο μεταξύ των control ομάδων διατροφής των φυσιολογικών και διαγονιδιακών ζώων. Τα δείγματα που συλλέγονται για αυτή τη διαδικασία συντηρούνται σε δ/μα παραφορμαλδεΐδης (4%) έως ότου εκκινήσει η διαδικασία επεξεργασίας τους και παραφिनοποίησης τους ώστε να κοπούν στον μικροτόμο. Οι ιστοί αρχικά περνάνε από στάδιο αφυδάτωσης με διαδοχικά βαπτίσματα σε βαθμιαίες συγκεντρώσεις δ/των αιθανόλης (50-100%) και εν συνεχεία καθαρίζονται (διαύγαση) συνήθως με δ/μα ξυλόλης. Τέλος τοποθετούνται σε λιωμένη στους 50-60 οC παραφίνη (σκλήνωση) ώστε να σταθεροποιηθούν για τομές στον μικροτόμο. Οι τομές πάχους (2μm) συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με αιματοξυλίνη και ιωσίνη για παρατήρηση και εκτίμηση του ιστού. Οι χρώσεις αυτές (Haematoxylin-Eosin) είναι από τις πιο διαδεδομένες στην ιστοπαθολογία. Η Αιματοξυλίνη προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και χρωματίζει μπλε περιοχές όπως ο πυρήνας και τα ριβοσώματα, ενώ η ιωσίνη προσδένεται σε πρωτεΐνες και χρωματίζει ροζ το κυτταρόπλασμα. Παράλληλα έγινε χρώση NF (neurofilament) νευροινιδίων για συγκρίσεις μεταξύ των ιστών των δύο τύπων ζώου. Τα νευροινίδια εντοπίζονται στους νευρώνες του περιφερικού και κεντρικού Ν.Σ, με την σύνθεσή τους να πραγματοποιείται στα κυτταρικά σώματα και να ακολουθεί στη συνέχεια η μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα των νευραξόνων.

*Η διαδικασία της ιστοχημικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της παθοφυσιολογίας.

Ποσοτική και Ποιοτική Ανάλυση Ψηφιακών Εικόνων Μικροσκόπιο Φθορισμού

Στη μικροσκοπία φθορισμού, το δείγμα διεγείρεται με φως, που προέρχεται από μία λάμπα φθορισμού. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα αφού περάσει μέσα από φίλτρα εκπομπής ανιχνεύεται άμεσα από τον παρατηρητή ή έμμεσα από φωτογραφική ή ψηφιακή κάμερα.

Τα έτοιμα δείγματα ιστών ή κυττάρων μεταφέρονται στο δωμάτιο μικροσκοπίας για ποιοτική παρατήρηση και ποσοτικές μετρήσεις. Κατά τις πειραματικές μας μεθόδους στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Nikon Eclipse για την φωτογράφιση και καταμέτρηση των ανοσοθετικών-φθορίζοντων κυττάρων και συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) για τον ενδο-κυτταρικό εντοπισμό και την αξιολόγηση ορθού ανοσοεντοπισμού των εκάστοτε υπό εξέταση πρωτεϊνών (π.χ. ZnT7 και MT3).



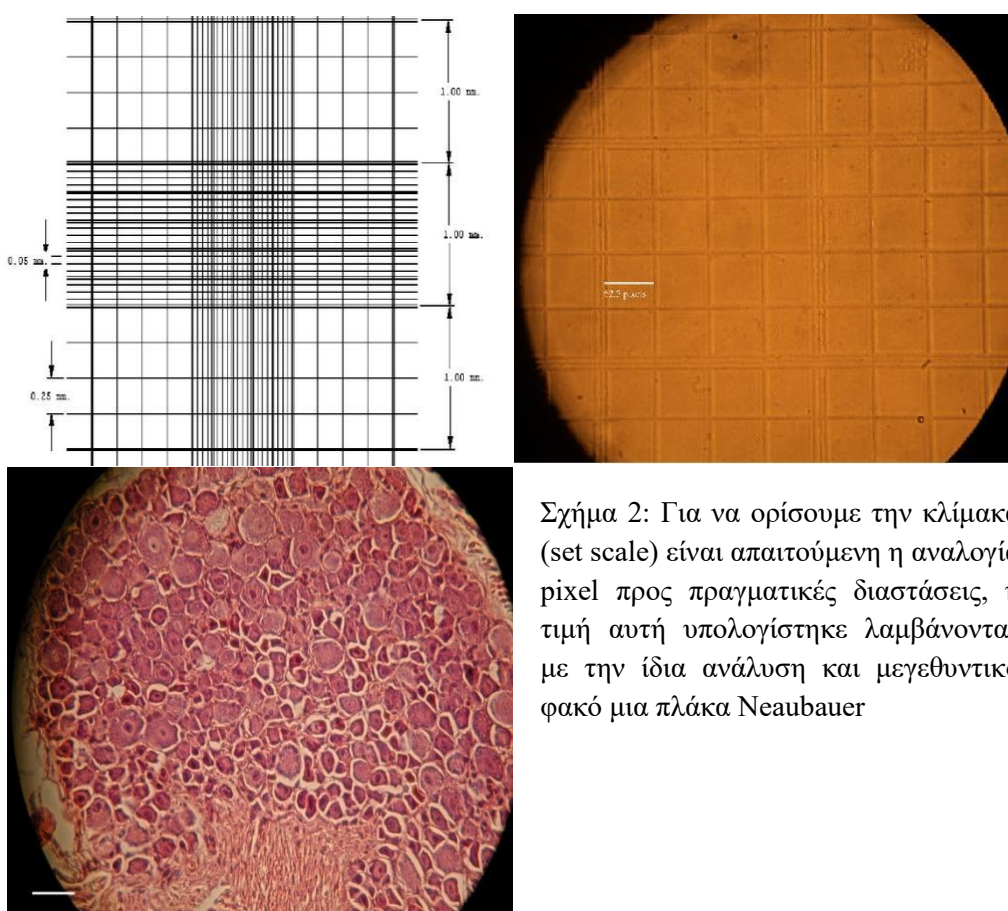
Καταμέτρηση Ανοσοθετικών Νευρικών Κυττάρων με χρήση προγράμματος ανάλυσης εικόνας ImageJ

Το πλήθος των ψηφιακών φωτογραφιών που παράγεται πλέον στο ερευνητικό επίπεδο τόσο στις ιατρικές και βιολογικές, όσο και σε άλλες επιστήμες, με την ραγδαία βελτίωση των μέσων μικροσκοπίας, επιβάλλει την σύγχρονη εμφάνιση όλο και πιο βελτιωμένων προγραμμάτων ανάλυσης των ψηφιακών εικόνων. Το πρόγραμμα ImageJ εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα για τον σύγχρονο ερευνητή καθώς εμφανίζει πλήθος εφαρμογών και παράλληλα είναι ελεύθερης πρόσβασης σε όλους τους χρήστες και ικανό να λειτουργήσει σε οποιοδήποτε λογισμικό περιβάλλον (<http://www.ansci.wisc.edu/equine/parrish/index.html>).

Έπειτα από τη φωτογράφιση των δειγμάτων μας, οι φωτογραφίες μεταφέρονται σε ψηφιακή μορφή σε υπολογιστή για την ποσοτική μέτρηση των θετικά σσημασμένων κυττάρων με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος επεξεργασίας εικόνων ImageJ.

Μορφομετρικές μετρήσεις από τις εικόνες ανοσοιστοχημείας σε τομές παραφίνης

Αρχικά για να έχουμε σταθερή επιφάνεια μέτρησης και κλίμακα σύγκρισης για όλες τις φωτογραφίες, γίνεται λήψη με την ίδια ψηφιακή κάμερα που είναι συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο και τον ίδιο φακό στο μικροσκόπιο που λήφθηκαν οι φωτογραφίες (40x), η περιοχή μέτρησης κυττάρων μιας πλάκας Neubauer. Έχοντας σαν οδηγό την κλίμακα 1mm x 1mm του μεγάλου τετραγώνου του αιμοκυτταρόμετρου επιλέγουμε πάντα για τις μετρήσεις και συγκρίσεις μας μια ίδια σε διαστάσεις τετράγωνη περιοχή (crop) στις φωτογραφίες με τους πληθυσμούς των κυττάρων.



Σχήμα 2: Για να ορίσουμε την κλίμακα (set scale) είναι απαιτούμενη η αναλογία pixel προς πραγματικές διαστάσεις, η τιμή αυτή υπολογίστηκε λαμβάνοντας με την ίδια ανάλυση και μεγεθυντικό φακό μια πλάκα Neubauer

Το ImageJ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με 2 τρόπους για την μέτρηση των πληθυσμών κυττάρων. Είτε με την προσθήκη του μετρητή κυττάρων (plugin: cell counter) τον οποίο χρησιμοποιεί ο χειριστής για απευθείας μέτρηση πάνω στην εικόνα πολλών τύπων κυττάρων, είτε με τον αυτόματο μετρητή κυττάρων μονού χρώματος (Automated counting of single color).

Ε. Ατομική Απορρόφηση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων Zn και Cu τόσο στον ορό αίματος αλλά και στους συλλεγμένους ιστούς από τις διάφορες ομάδες των πειραματικών ζώων. Συγκεκριμένα όλα τα βιολογικά δείγματα ακολουθούν αρχικά μια διαδικασία πέψης ώστε να απελευθερωθούν τα μέταλλα από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών τους. Η διαδικασία αυτή λέγεται «πέψη» των ιστών και επιτρέπει την υγροποίηση οποιονδήποτε ιστών. Το δείγμα φέρεται προς μέτρηση σε υγρή κατάσταση και μετατρέπεται σε αερόλυμα με τη βοήθεια νεφελοποιητή και μετά τη μίξη του με τα αέρια της φλόγας καίγεται και ατομοποιείται.

I-Πέψη ιστών

Όλοι οι ιστοί που συλλέχθηκαν κατά τα προηγούμενα στάδια (αίμα, νωτιαίος μυελός και συκώτι) συντηρήθηκαν στους -20°C σε ερμητικά κλειστά σωλήνες Falcon έως την χρήση τους. Την ημέρα των πέψεων τα δείγματα ζυγίζονται και τοποθετούνται σε οβίδες πέψης από Teflon, μαζί με 5 ml δ/μα NO προς H₂O₂ 4:1. Οι οβίδες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε φούρνο μικροκυμάτων εντός απαγωγού για 15 λεπτά ώστε υπό συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας να γίνει απόλυτη πέψη των ιστών.

Το κάθε διάλυμα που περιέχει πλέον απελευθερωμένα από τα πρωτεϊνικά τους σύμπλοκα τα μέταλλα των ιστών, μαρκάρεται, μεταφέρεται σε σωλήνα Falcon και αφού καταγραφεί ο όγκος του για τυχόν απώλειες συμπληρώνεται με δις-απεσταγμένο ddH₂O έως τον όγκο των 10 ml. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται για την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης και τις διαδικασίες πέψης των ιστών είναι επεξεργασμένα με δ/μα 10% νιτρικού οξέος για απομάκρυνση υπολειμμάτων μετάλλων (διαδικασία οξύνισης).

II-Μέτρηση μετάλλων με τη Μέθοδο της Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα

Στη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης οι βασικές αρχές είναι οι ακόλουθες:

Τα προς ανάλυση μεταλλικά άλατα, που προκύπτουν μετά την όξινη πέψη των δειγμάτων, φέρονται σε ατομική κατάσταση και παρεμβάλλονται στην διαδρομή της εκπεμπόμενης φωτεινής συχνότητας του φωτόμετρου. Για κάθε μέταλλο χαρακτηριστικά φάσματα φωτεινών συχνοτήτων ενεργοποιούνται στη πηγή του φωτόμετρου με τη βοήθεια μιας κοίλης λυχνίας καθόδου (hollow cathode lamp). Τα άτομα του μετάλλου τότε απορροφούν επιλεκτικά την ακτινοβολία που εκπέμπεται και η απορρόφηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση του μετάλλου σύμφωνα με τον τύπο: $A = \log P_0/P = a b c$ (όπου A η απορρόφηση, P₀ η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, a η απορροφητικότητα

(σταθερά), b το μήκος της διαδρομής που διανύθηκε και c η συγκέντρωση). Ένα σταθερό σήμα, του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου, καταγράφεται κατά το χρονικό διάστημα που το δείγμα εκτίθεται στη φλόγα.

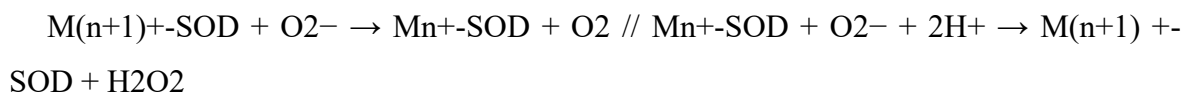
Για τις μετρήσεις των μετάλλων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (AAS) Perkin- Elmer. 560, με φλόγα και φούρνο γραφίτη HGA- 400. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές. Τυφλά διαλύματα καθώς και πρότυπα διαλύματα μετάλλων χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του φωτόμετρο. Τα πρότυπα αναλύονται στην αρχή και στο τέλος μιας σειράς αναλύσεων και περιοδικά όταν υπάρχουν πολλά δείγματα, ενώ τα τυφλά ανάμεσα σε κάθε δείγμα ή πρότυπο για την επαλήθευση της σταθερότητας των μετρήσεων. Η βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται έτσι ώστε να δίνονται απευθείας μετρήσεις συγκέντρωσης, εάν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και των προτύπων είναι μέσα στο γραμμικό εύρος της καμπύλης, με την χρήση ενός τυφλού και ενός προτύπου στο ανώτερο άκρο του γραμμικού εύρους της καμπύλης.

ΣΤ. Αναλύσεις Οξειδωτικού Προφίλ Αίματος

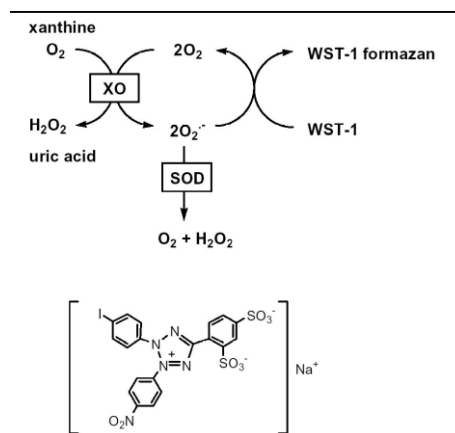
Το αίμα από όλα τα πειραματόζωα συλλέχθηκε και επεξεργάστηκε για να διαχωριστούν το πλάσμα από τα ερυθρά, ώστε να χρησιμοποιηθούν ξεχωριστά σε κάθε μία από τις παρακάτω αναλυτικές μεθόδους. Τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 3500 στροφές για να γίνει πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ύστερα τοποθετήθηκαν (πλάσμα και ερυθρά σε ξεχωριστά μαρκαρισμένα eppendorf) στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

Μέτρηση δραστηριότητας της υπεροξειδάσης δισμουτάσης-SOD

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η οποία καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα έναντι του οξειδωτικού στρες. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν κυρίως ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου άλλα και τη σύνθεση των αμινοξέων, τον αριθμό των υπομονάδων τους και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZn-SOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Η SOD καταστρέφει τις ρίζες οξυγόνου με απίστευτα υψηλές ταχύτητες αντίδρασης με τη διαδοχική οξείδωση και την αναγωγή του μετάλλου του ενεργού της κέντρου.



Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου στηρίζεται στην χρώση ενός υδατοδιαλυτού άλατος του τετραζολίου (WST-1), το οποίο παρουσία ανιόντων υπεροξειδίου δημιουργεί υδατοδιαλυτή πορφυρή χρώση φορμαζάνης. Ο ρυθμός μείωσης του O₂ σχετίζεται γραμμικά με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και η οποία αναστέλλεται από την υπεροξειδάση της δισμουτάσης (Σχήμα 3). Έτσι δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού της δραστηριότητας της SOD με μέτρηση της απορρόφησης με φωτόμετρο ELISA.



Σχήμα 3: Αρχή μεθόδου μέτρησης της SOD

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης δισμουτάσης χρησιμοποιήθηκε το ίδιο kit με αυτό για το κυτταρικό εκχύλισμα. Η δραστηριότητα της SOD μετράται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Για να σπάσουν τα κυτταρικά τοιχώματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και να απελευθερωθούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκε υποτονικό δ/μα NaCl (φυσιολογικός ορός). Συγκεκριμένα, το διάλυμα NaCl 0.9% αραιώθηκε κατά 50% με ddH₂O (αναλογία 1:1). Σε 250μL ερυθρών αιμοσφαιρίων προστέθηκαν 750μL δ/τος NaCl 0.45%. Τα ερυθρά αναδεύτηκαν με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur για να σπάσουν τα τοιχώματα και αναδεύτηκαν σε Vortex. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 3500 στροφές και το χωρίς κυτταροσκελετικά κατάλοιπα υπερκείμενο συλλέχθηκε για να μετρηθεί σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας παραγωγής του kit μέτρησης.

Μέθοδος μέτρησης Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-TAC

Μια επιπρόσθετη μέθοδος για να εκτιμήσουμε το οξειδωτικό προφίλ στις ομάδες των πειραματόζωων μας είναι η TAC (Total Antioxidant Capacity assay ή Blue CrO₅). Η τεχνική είναι νέα και απλή στη χρήση. Το υπεροξείδιο του χρωμίου παράγεται από διχρωμικό αμμώνιο σε όξινο περιβάλλον παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι ένα δραστικό οξειδωτικό συστατικό, αναμίξιμο και σχετικά σταθερό σε οργανικούς διαλύτες, με βαθύ μπλε χρώμα και μπορεί να φωτομετρηθεί εύκολα σε φασματοφωτόμετρο. Η μείωση του από αντιοξειδωτικά (π.χ. α-τοκοφερόλη) χρησιμεύει σαν μάρτυρας για οποιαδήποτε αντιοξειδωτική ικανότητα άλλων διαλυμάτων [Charalampidis PS, 2009].

Με την παραπάνω μέθοδο εκτιμάται η αντιοξειδωτική ικανότητα του συνόλου των αντιοξειδωτικών παραγόντων (π.χ. ασκορβικό οξύ ή γλουταθειόνες) που μπορεί να υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος των ζώων που χρησιμοποιήσαμε. Σαν δ/μα μάρτυρα για το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιήσαμε γνωστής συγκέντρωσης (0,1M) βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) διαλυμένη σε ισοβουτανόλη. Η αναλογία των αντιδραστηρίων σε κάθε καλυπτρίδα ήταν: 480μl ισοβουτανόλης/160μl H₂SO₄ / 160μl διχρωμικού αμμωνίου και 8μl ορού δείγματος. Το κάθε δείγμα μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο μετά το πέρας 3 λεπτών (χρόνος αντίδρασης) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμάται από τον τύπο: TAC= Τιμή blank – Τιμή δείγματος / Τιμή blank – Τιμή μάρτυρα. Για τις μετρήσεις το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται σε φάσμα απορρόφησης 569nm.

Κατάλογος Υλικών

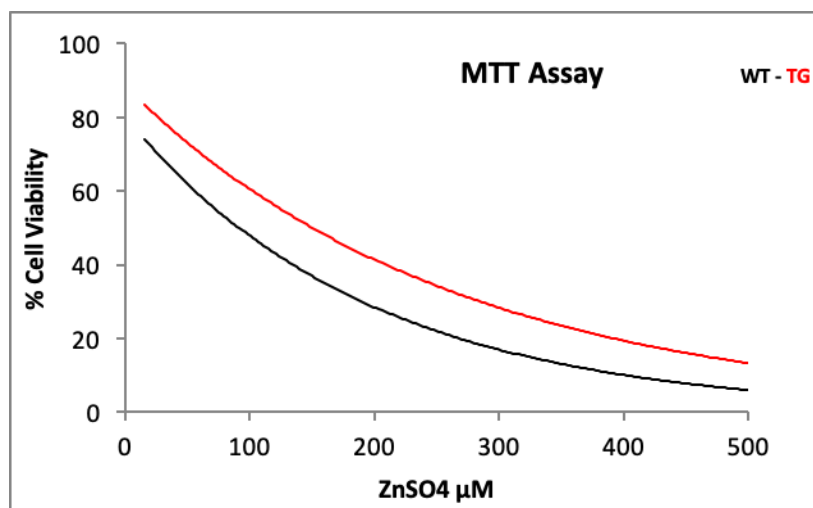
| | |
|---|---|
| Σωλήνες φυγοκέντρησης 50ml Greiner | |
| Σωλήνες erpedorf 0.5ml Aptaca | Λαμινική L2020 Sigma |
| Cryoboxes 100 θέσεων | Horse serum -heat inactivated 14175 Gibco |
| Σωλήνες falcon 15ml orange | Hanks Balanced salt Solution PAA H15-009 |
| Όξινο ανθρακικό νάτριο-NaHCO ₃ S6014 SIGMA-ALDRICH | 100x Pen/Strep P11-010 |
| Πολυτρυβλία 24-θέσεων Falcon 353047 | Πουτρεσκίνη P7505 Sigma |
| Καλυπτρίδες 12 mm FL Medical | L-Θυροξίνη T0397 Sigma |
| Anti- CGRP rabbit polyclonal IgG sc-28920 Santa Cruz | Προγεστερόνη P6149 Sigma |
| Goat anti-rabbit IgG-TR sc2780-Santa Cruz | Σεληνιώδες νάτριο S9133 Sigma |
| DAPI D9564 SIGMA-ALDRICH | Bovine serum albumine A2153 Sigma |
| Anti-ZnT7 Goat polyclonal IgG sc-160946 Santa Cruz | (TSQ) 115530 |
| Donkey anti-goat IgG-FITC sc-2024 Santa Cruz | MTT assay kit M2128 Sigma |
| Tissue-tec cryomold 25608-916 | DMSO 131954 pancreac |
| Neuronal class III b-tubulin monoclonal A488-435L Covance | Πολυτρυβλία 96 θέσεων falcon |
| Γάντια Animex pf | Δ/μα ZnSO ₄ 32047 Sigma |
| Πουαρ για πιππέτες pasteur | Ανεξίνη V-Cy3 ApoAc |
| Duramesser 12.5cm Lawton | Propidium Iodide P4170 Sigma |
| Microscissors 11cm Lawton | Calcium Buffer 10x 05673 |
| Αιθανόλη 99% A4930/AppliChem | OCT medium Tissue-Tek |
| Anti-MT3 rabbit polyclonal antibody ab76618 Abcam | Triton-X 100 Sigma |
| Αλκαλική φωσφατάση P0114 Sigma | SuperFrost αντικειμενοφόρους |
| Παραφορμαλδεΐδη Z272736 Sigma | Φωσφορικό δ/μα PB PBS1 Sigma |
| Καλυπτρίδες 24x50 mm Knittel | Οβίδες Πέψης Teflon |
| Fluopreserve Reagent Calbiochem | SOD assay kit 19160 Sigma |
| Κεταμίνη K2753 Sigma | α-τοκοφερόλη |
| Κολλαγενάση C0130 Sigma | Ισοβουτανόλη |
| Culture medium F-12 21700 Gibco | Sigmacote δ/μα σιλικόνης |
| Tissue collecting medium L15 41300 Gibco | Πλάκα Neaubauer |
| Θρυψίνη T4799/ Sigma | Πιππέτες 5ml Costar/ 4051 |
| Neuronal Growth factor 450-01 PetroTech | Πιππέτες 10ml Costar/ 4101 |
| Νευροτροφίνη 3 450-03 PetroTech | tips Aptaca |
| Βορικό οξύ B67-68 Sigma | Διπτανθρακικό νάτριο 25080 Gibco |
| Πολυ-D-ορνιθίνη P8638 Sigma | Φίλτρα Καλλιέργειας Whatman 6780-2502 |

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Αποτελέσματα in vitro

1. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής επιβίωσης MTT

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις μετρήσεων με τη μέθοδο MTT για κάθε ένα από τους 2 τύπους κυττάρων (φυσιολογικά Wt και hHsp70 overexpressing Tg), περιλαμβάνοντας κάθε φορά σε 3 επαναλήψεις την εκάστοτε συγκέντρωση. Επομένως η επιβίωση σε κάθε συγκέντρωση του άλατος ZnSO₄ υπολογίστηκε 9 φορές για μεγαλύτερη πιστότητα.



Διάγραμμα 1: Ποσοστό % επιβίωσης DRG νευρώνων σε διάφορες συγκέντρωσεις ZnSO₄ (0-500μM) με MTT. WT: C57Bl/6xDBA μύες, Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70.

Το 50% της μέγιστης συγκέντρωσης αναστολής για το άλας ZnSO₄ στα DRG κύτταρα φυσιολογικών και διαγονιδιακών κυττάρων υπολογίστηκε από τις αντίστοιχες εξισώσεις επιβίωσης και είναι:

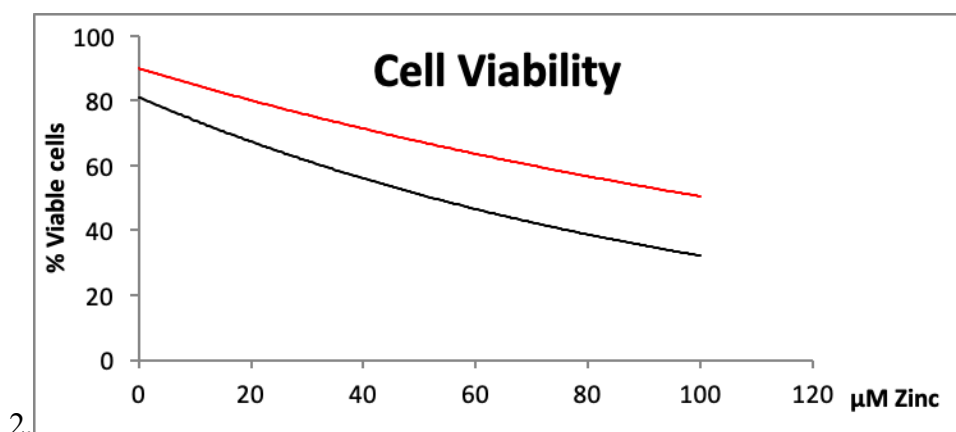
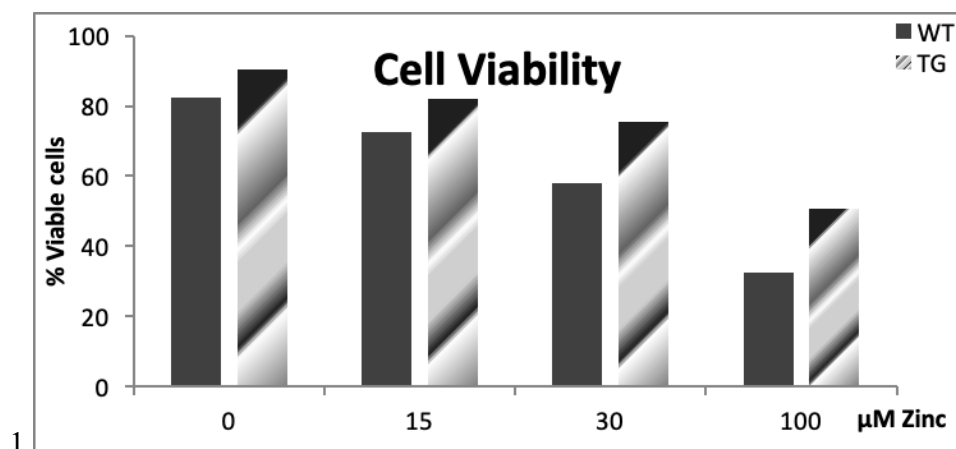
IC₅₀ WT: 100.5 μM ZnSO₄ και IC₅₀ Tg: 145.37 μM ZnSO₄

Φαίνεται ότι η αυξημένη παρουσία της ομοσυνοδού πρωτεΐνης Hsp70 στα νευρικά κύτταρα προσφέρει αυξημένη προστασία έναντι σε θάνατο από το άλας Zn κατά 44,6% σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Παρόμοια ανθεκτικότητα εμφανίζουν τα Tg και στο άλας του νιτρικού Zn (Zn(NO₃)₂).

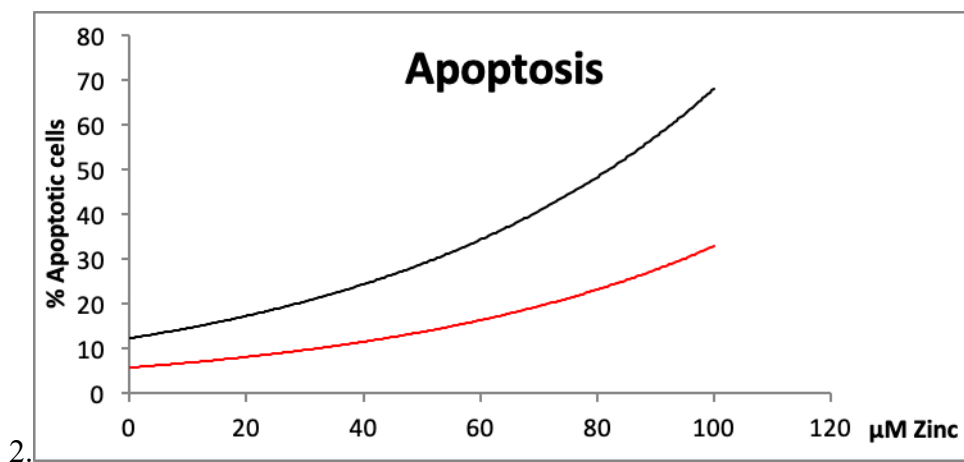
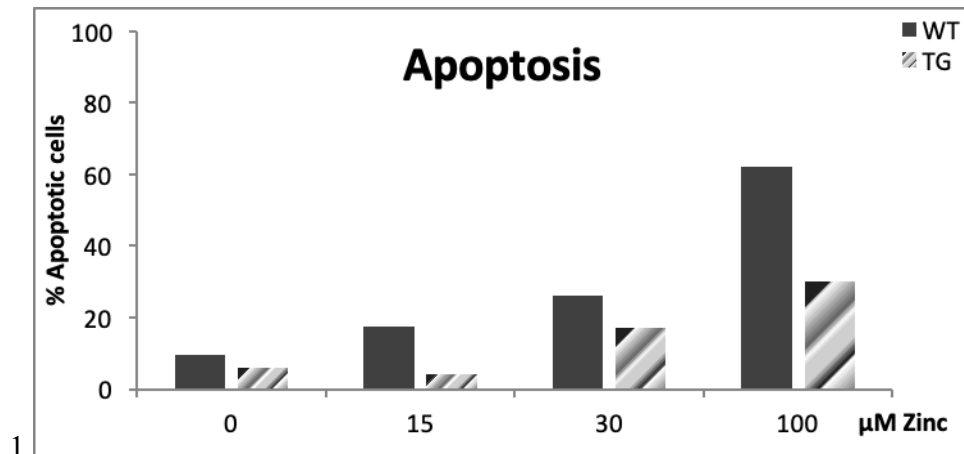
IC₅₀ WT: 90 μM Zn(NO₃)₂ και IC₅₀ Tg: 113.9 μM Zn(NO₃)₂

2. Μέθοδος υπολογισμού κυτταρικής απόπτωσης με χρήση κυτταρομέτρου.



Διάγραμμα 2.1 & 2.2: Ποσοστό % επιβίωσης DRG νευρώνων σε συγκεντρώσεις ZnSO₄ (0-100μM) με μέτρηση κυτταρομέτρου ροής. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι και μαύρη γραμμή), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι και κόκκινη γραμμή)

Όμοια με το MTT οι μετρήσεις επιβίωσης των DRG εμβρυϊκών νευρώνων εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις συγκεντρώσεις Zn, όταν υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70.

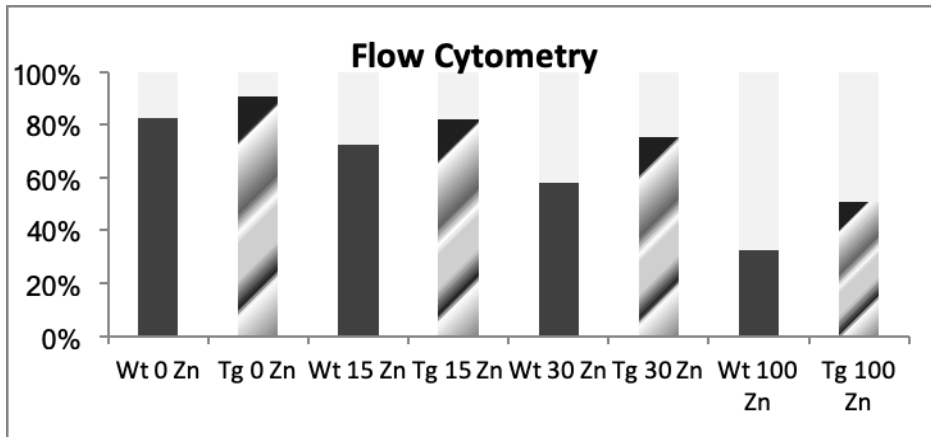


Διάγραμμα 3.1 & 3.2: Ποσοστό % απόπτωσης DRG νευρώνων σε συγκέντρωσεις ZnSO₄ (0-100μM) με μέτρηση κυτταρομέτρου ροής. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι και μαύρη γραμμή), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι και κόκκινη γραμμή)

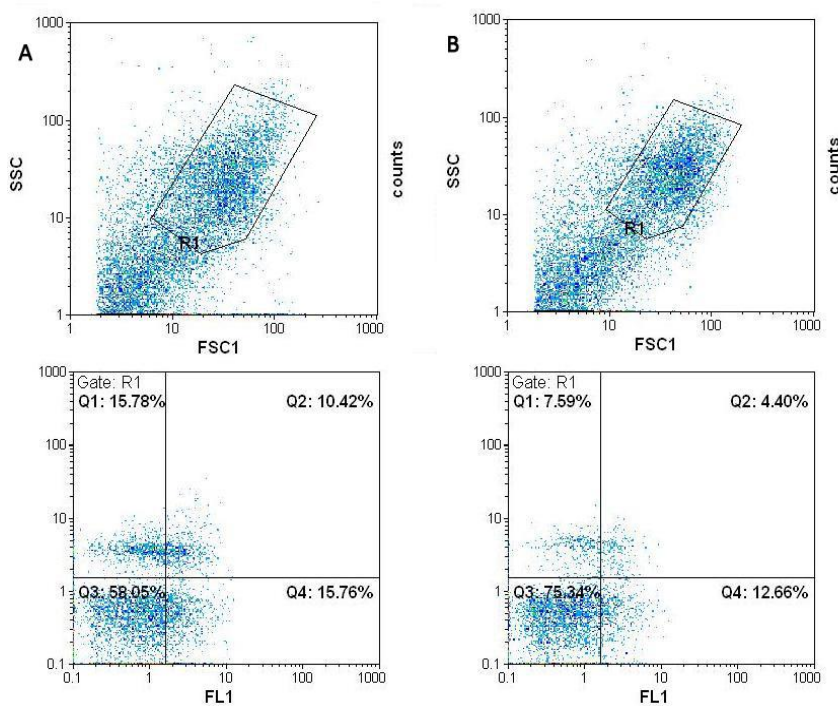
Το άθροισμα του ποσοστού επί τις εκατό των αποπτωτικών κυττάρων σε αρχικά και τελικά στάδια απόπτωσης υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής.

Πίνακας 1: Πίνακας μετρήσεων του ποσοστού % ζωντανών και αποπτωτικών κυττάρων στην καλλιέργεια έπειτα από επώαση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις Zn.

| DRG cells | Zinc μM | % Viable | %Apoptotic |
|-----------|---------|----------|------------|
| TG | control | 90.54 | 6.12 |
| | 15 | 82.02 | 4.18 |
| | 30 | 75.34 | 17.06 |
| | 100 | 50.58 | 30.1 |
| WT | control | 82.45 | 9.42 |
| | 15 | 72.49 | 17.5 |
| | 30 | 58.05 | 26.18 |
| | 100 | 32.6 | 62.28 |



Διάγραμμα 4: Γραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων κυτταρομέτρου ροής για εμβρυϊκούς DRG νευρώνες σε διάφορες συγκεντρώσεις ZnSO₄ (0-100μM. Οι κάτω στήλες αντιπροσωπεύουν τα ζωντανά κύτταρα, ενώ οι επάνω (ανοιχτό γκρι) το άθροισμα των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντας το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι)



Εικόνα 1: Αποτελέσματα απόπτωσης των εμβρυϊκών DRG νευρώνων από φυσιολογικά (WT) και hHsp70 υπερεκφράζοντα (Tg) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Zn με κυτταρομετρία ροής.

A. (WT) Φυσιολογικά κύτταρα

B. (Tg) Hsp70 υπερεκφράζοντα

*Συγκέντρωση 30 μM ZnSO₄

3. Ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών MT3, ZnT7 και cGRP μετά από επώαση εμβρυϊκών κυττάρων FRG σε συγκεντρώσεις Zn 15 και 30 μ M

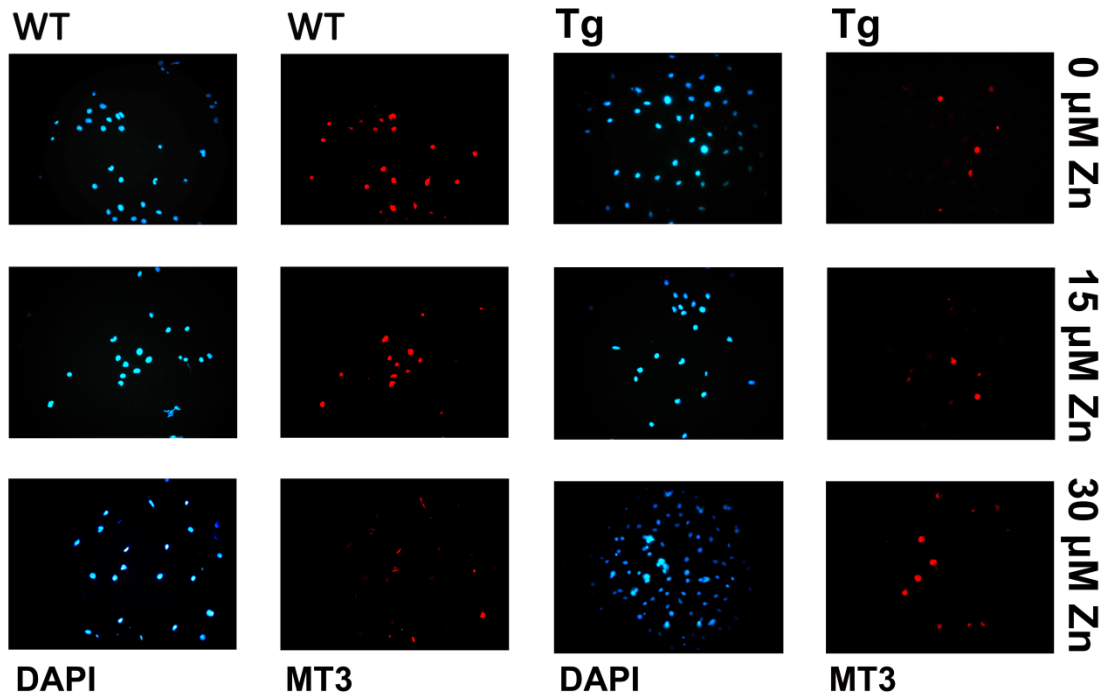
Από τον ανοσοφθορισμό των εμβρυϊκών κυττάρων καταμετρήθηκαν τα σημασμένα κύτταρα. Η καταμετρήσεις γίνανε σε τυχαία ξεχωριστά πεδία ανά καλυπτρίδα και για κάθε ομάδα μέτρησης παρατηρήθηκαν 6 ξεχωριστές καλυπτρίδες (n=6). Ανάλυση μεταβλητότητας με 2 παράγοντες (γονίδιο Hsp70 και ψευδάργυρος) έδειξε ότι οι τιμές των μεταβλητών επηρεάζονται και από τους 2 παράγοντες (in between subject effect) και επομένως είναι επιτρεπτό να συνεχίσουμε σε ξεχωριστή στατιστική επεξεργασία. Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS-13 για Windows.

I. Έκφραση της μεταλλοθειονίνης III

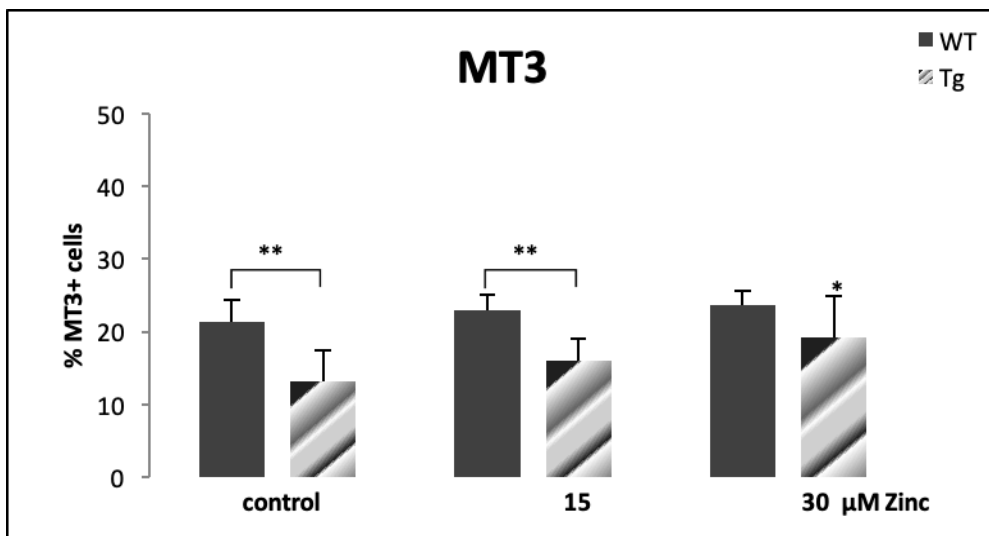
Όσον αφορά της μεταβολές των επιπέδων της πρωτεΐνης MT3 ανάλυση μεταβλητότητας ως προς τον παράγοντα της έκφρασης της hHsp70 έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και διαγονιδιακών κυττάρων στις συγκεντρώσεις Zn control (F12 περιέχει 3 μ M Zn) και 15 (control, F=15, p=0.003/ Zn15, F=21.3, p=0.001). Παράλληλα ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση ως προς τις συγκεντρώσεις Zn στα 30 μ M στα Tg έδειξε σημαντική αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MT3 σε σχέση με την control ομάδα (p=0.036).

Πίνακας 2: Πίνακας μετρήσεων του ποσοστού % θετικών σε MT3 κυττάρων προς το σύνολο των κυττάρων της καλλιέργειας από Wt και Tg έμβρυα.

| MT3 | control Zn | 15 μ M Zn | 30 μ M Zn |
|-----|------------------|----------------|------------------|
| WT | 21.375 \pm 2.9 | 22.985 \pm 2 | 23.607 \pm 2 |
| Tg | 13.256 \pm 4.2 | 16.025 \pm 3 | 19.175 \pm 5.7 |



Εικόνα 1: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού των DRG νευρώνων από φυσιολογικά και διαγονιδιακά ζώα, σημασμένοι για Dapi και MT3 στις 3 συγκεντρώσεις Zn.

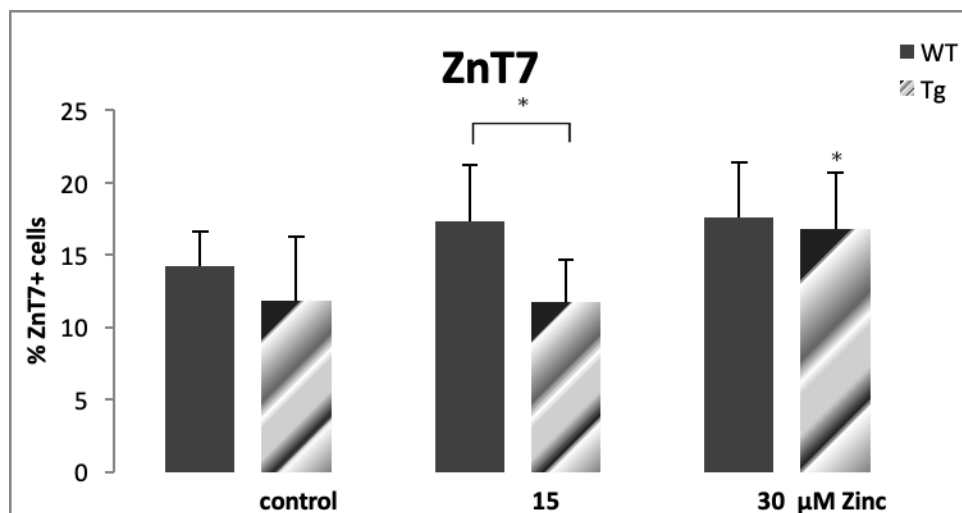


Διάγραμμα 5: Ποσοστό % θετικών σε MT3 DRG εμβρυϊκών νευρώνων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Zn.

WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι), ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

II. Έκφραση του μεταφορέα του ψευδαργύρου ZnT7

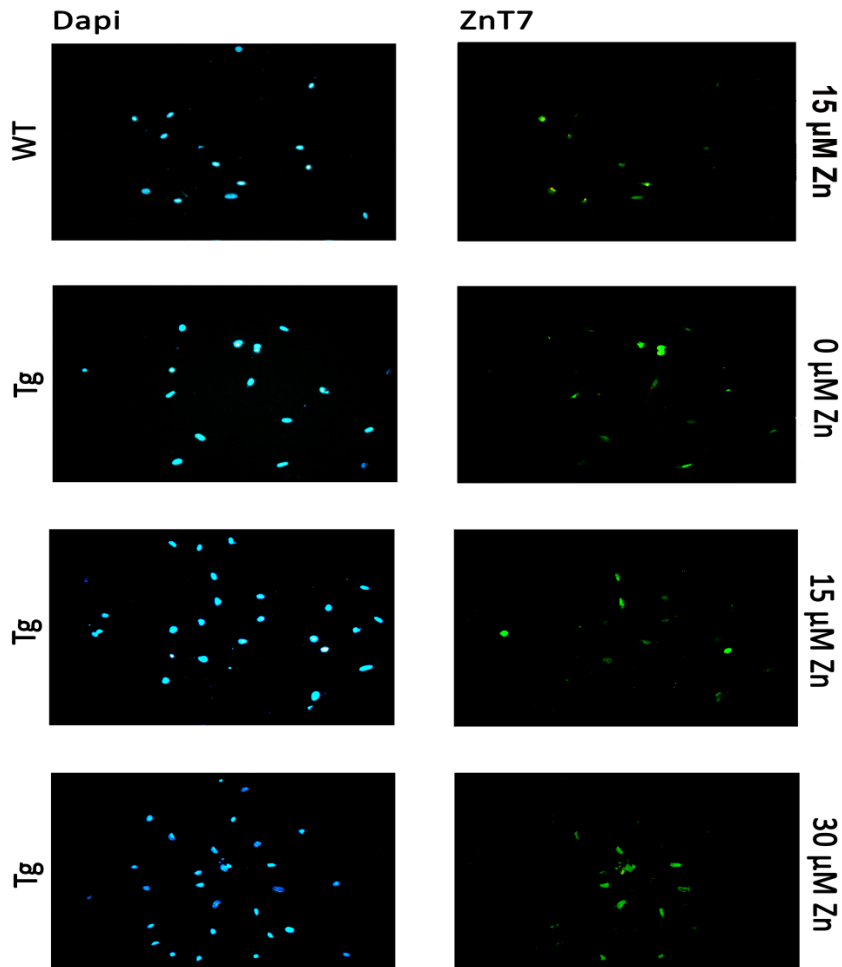
Ίδια στατιστική ανάλυση ANOVA ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και διαγονιδιακών κυττάρων στην συγκέντρωση Zn 15μM ($p=0.019$) καθώς και σημαντική αύξηση ($p=0.039$) του μεταφορέα ZnT7 στην συγκέντρωση Zn 30μM στα κύτταρα DRG από διαγονιδιακά υπερεκφράζοντα την hHsp70 έμβρυα.



Διάγραμμα 6: Ποσοστό % θετικών σε ZnT7 DRG εμβρυϊκών νευρώνων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Zn. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) * $p<0.05$

Πίνακας 3: Πίνακας μετρήσεων του ποσοστού % θετικών σε ZnT7 κυττάρων προς το σύνολο των κυττάρων της καλλιέργειας.

| ZnT7 | control Zn | 15 μM Zn | 30 μM Zn |
|------|-------------|-------------|-------------|
| WT | 14.19 + 2.9 | 17.3 + 3.9 | 17.55 + 3.8 |
| Tg | 11.8 + 4.4 | 11.71 + 2.9 | 16.78 + 3.9 |



Εικόνα 3: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού των DRG νευρώνων από φυσιολογικά και διαγονιδιακά ζώα, σημασμένοι για Dapi και τον μεταφορέα ψευδαργύρου ZnT7 στις 3 συγκεντρώσεις Zn.

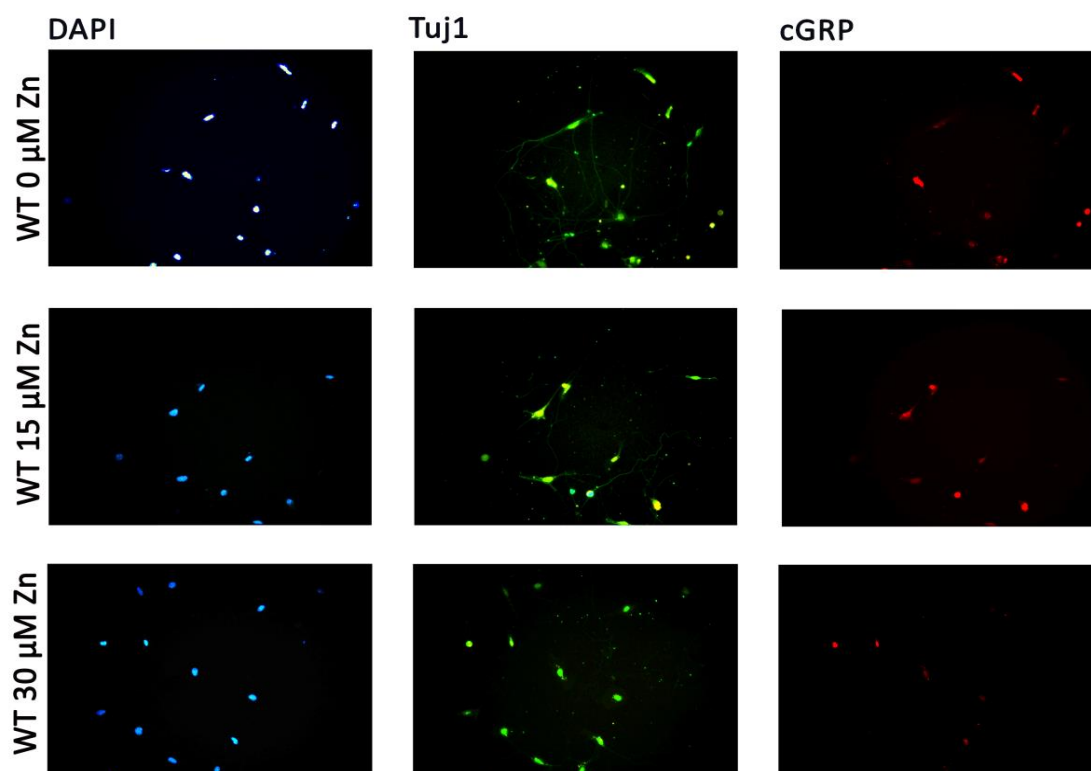
III. Έκφραση του πεπτιδίου που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (cGRP)

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων σημασμένων cGRP κυττάρων έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA) με παράγοντες τις συγκεντρώσεις Zn και το γονίδιο της Hsp70. Για τις διαφορές μεταξύ συγκεκριμένων ομάδων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA).

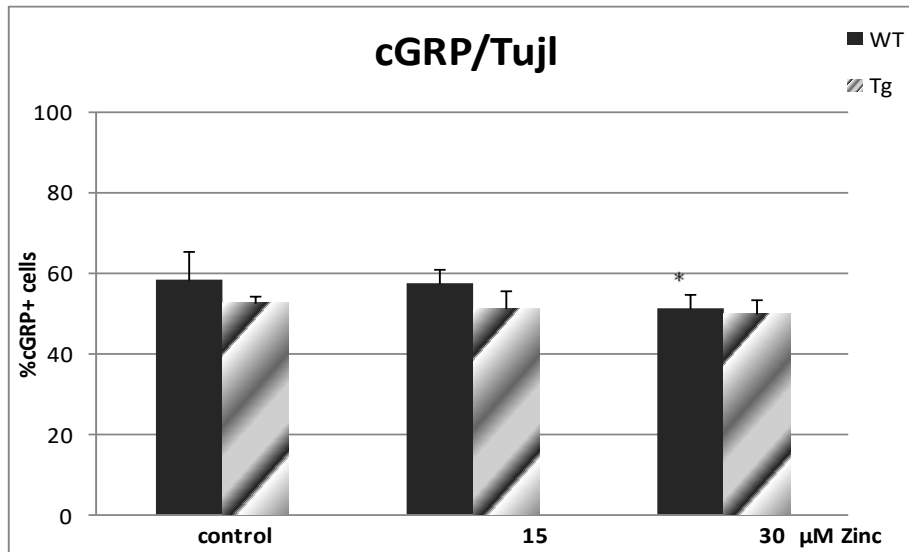
Πίνακας 4: Πίνακας μετρήσεων του ποσοστού % θετικών cGRP κυττάρων προς το σύνολο των νευρικών κυττάρων (Tuj1 θετικών).

| cGRP | control Zn | 15 μ M Zn | 30 μ M Zn |
|------|-----------------|------------------|------------------|
| WT | 58.368 \pm 7 | 57.248 \pm 3.8 | 51.083 \pm 3.5 |
| Tg | 52.45 \pm 1.9 | 51.21 \pm 4.4 | 49.8 \pm 3.8 |

Η ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε ότι τα DRG κύτταρα φυσιολογικών εμβρύων (wt) που υποβλήθηκαν σε συγκέντρωση Zn 30 μ M παρουσίασαν σημαντική μείωση των επιπέδων της CGRP πρωτεΐνης σε σχέση με τις 2 άλλες συγκεντρώσεις (control, F=6, p=0.024 και Zn15, F=6.4, p=0.03).



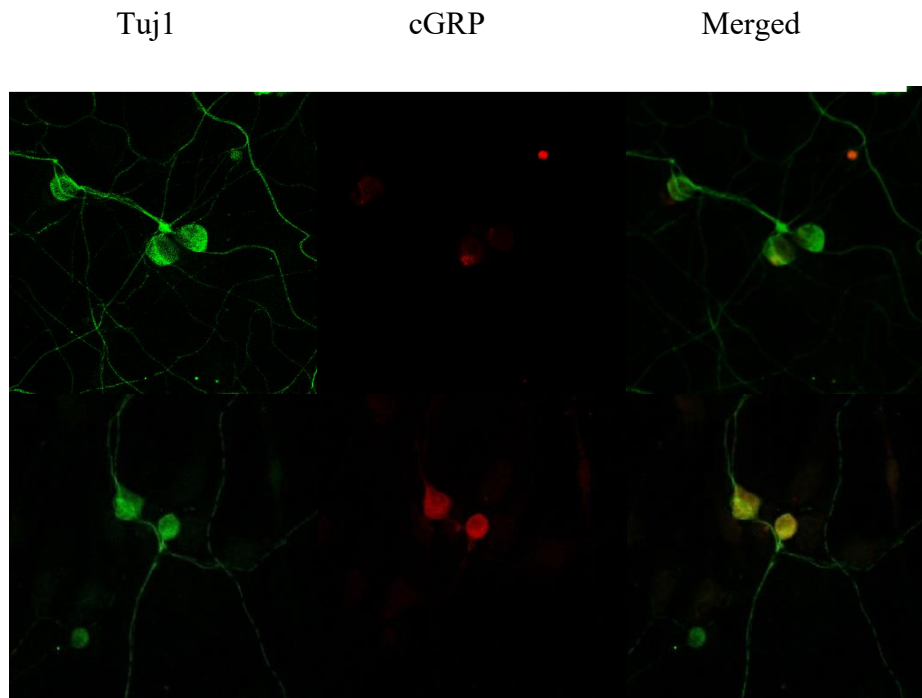
Εικόνα 4: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού των DRG νευρώνων από φυσιολογικά ζώα, σημασμένοι για Dapi, τουμπουλίνη-III και cGRP στις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Zn.



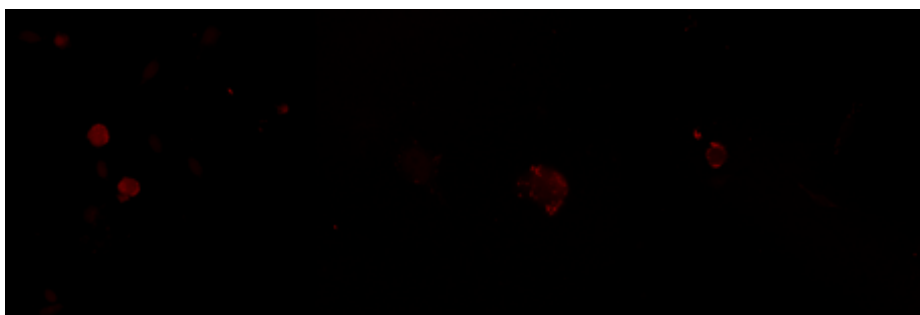
Διάγραμμα 7: Ποσοστό % θετικών σε cGRP DRG εμβρυϊκών νευρώνων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Zn. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) *p<0.05

Η στατιστική μελέτη δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των DRG εμβρυϊκών κυττάρων από διαγονιδιακά (Tg) ζώα, έπειτα από επώαση σε control, 15μM και 30 μM Zn. Σαν παρατήρηση μπορούμε να πούμε πως το ποσοστό των CGRP θετικών DRG κυττάρων από Tg εμφανίζεται να είναι ελαφρώς λιγότερο από αυτά των Wt εμβρύων.

4. Απεικόνιση σημασμένων κυττάρων με μικροσκοπία συνεστιασμού (confocal).



Εικόνα 5: Φαίνονται καθαρά τα νευρικά κύτταρα και οι νευρικές τους απολήξεις, ενώ τα κύτταρα γλοίας δεν αναγνωρίζονται από το αντίσωμα της τουμπουλίνης-III. Το έντονο ερυθρό χρώμα αποτελεί θετικό δείκτη cGRP κυττάρων καθώς σημαίνεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη.



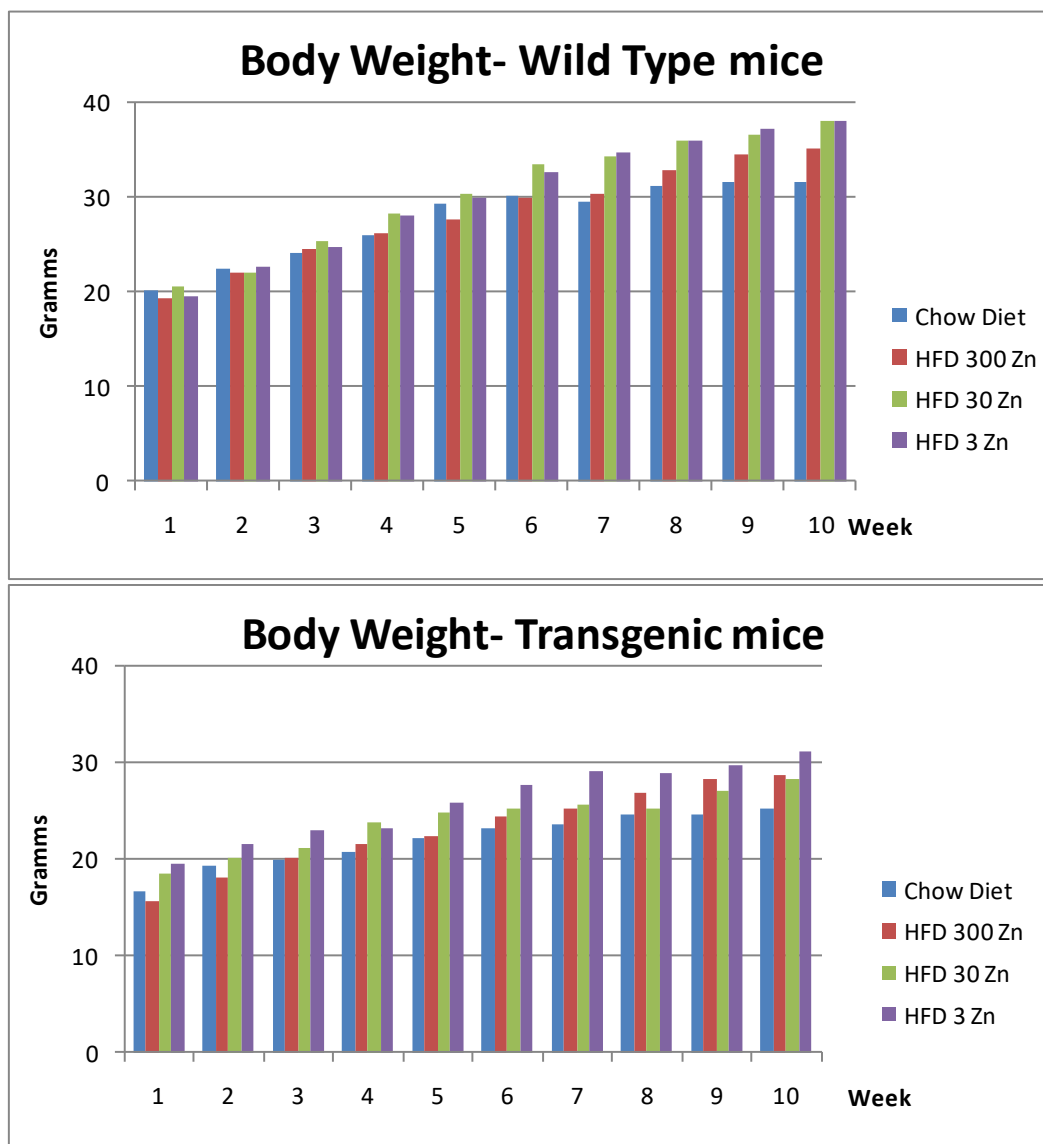
Εικόνα 6: Η πρωτεΐνη της MT3 εντοπίζεται πιο έντονα στο κυτταρόπλασμα κάποιων κυττάρων και εμφανίζει «κοκκιώδη» υφή φθορισμού.

B. Αποτελέσματα του in vivo πειραματικού μέρους

1. Ζυγίσεις Πειραματοζώων ανά εβδομάδα

Πίνακας 5: Ζυγίσεις των ομάδων των πειραματοζώων ανά εβδομάδα

| WT | Week 1 | Week 2 | Week 3 | Week 4 | Week 5 | Week 6 | Week 7 | Week 8 | Week 9 | Week 10 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Chow Diet | 20.19 | 22.41 | 24.20 | 26.06 | 29.33 | 30.05 | 29.59 | 31.28 | 31.52 | 31.60 |
| HFD 300 Zn | 19.41 | 22.11 | 24.44 | 26.23 | 27.55 | 29.88 | 30.44 | 32.90 | 34.48 | 35.16 |
| HFD 30 Zn | 20.67 | 22.12 | 25.29 | 28.18 | 30.31 | 33.52 | 34.38 | 35.97 | 36.60 | 38.08 |
| HFD 3 Zn | 19.50 | 22.65 | 24.72 | 28.08 | 29.92 | 32.67 | 34.72 | 36.03 | 37.14 | 38.15 |
| Tg | Week 1 | Week 2 | Week 3 | Week 4 | Week 5 | Week 6 | Week 7 | Week 8 | Week 9 | Week 10 |
| Chow Diet | 16.74 | 19.38 | 19.99 | 20.69 | 22.27 | 23.11 | 23.65 | 24.53 | 24.71 | 25.23 |
| HFD 300 Zn | 15.70 | 18.13 | 20.05 | 21.55 | 22.36 | 24.49 | 25.28 | 26.84 | 28.32 | 28.78 |
| HFD 30 Zn | 18.46 | 20.18 | 21.17 | 23.70 | 24.79 | 25.14 | 25.62 | 25.29 | 27.03 | 28.34 |
| HFD 3 Zn | 19.48 | 21.52 | 22.98 | 23.29 | 25.91 | 27.69 | 29.01 | 28.81 | 29.72 | 31.17 |



Διάγραμμα 8: Γραφική απεικόνιση της αύξησης του βάρους κατά την διάρκεια της λήψης της διατροφής.

Έπειτα από τις 10 εβδομάδες χορήγησης των αντίστοιχων διατροφών παρατηρούμε την τελική διαφορά σωματικού βάρους μεταξύ των 8 ομάδων (πίνακας 5). Γίνεται σαφές πως τα Tg είναι ελαφρύτερα, αν και ίδιας ηλικίας με τα Wt και όλες οι ομάδες τους είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες ομάδες στα Wt ($p < 0.005$). Στατιστική σύγκριση μεταξύ φυσιολογικής (Chow Diet) και HFD30Zn δίαιτας και στους 2 γονότυπους (Wt και Tg) εμφανίζει σημαντικά αυξημένα τα βάρη των πειραματοζώων που τράφηκαν με δίαιτα υψηλής θερμιδικής περιεκτικότητας λιπαρών (HFD30Zn) ($p < 0.005$). Επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση βάρους εμφανίζει η ομάδα των Tg που τράφηκε με HFD3Zn δίαιτα. Φαίνεται πως η χαμηλή σε Zn δίαιτα υψηλών λιπαρών προκαλεί την μεγαλύτερη αύξηση βάρους, καθώς στα Tg μεταξύ της HFD3Zn ομάδας και των HFD30Zn και HFD300Zn ομάδων εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση του ($p < 0.005$ και $p < 0.05$ αντίστοιχα). Στα Wt πειραματικά ποντίκια η δίαιτα HFD3Zn εμφανίζει την μεγαλύτερη αύξηση βάρους αλλά δεν εμφάνισε στατιστική διαφορά σε σχέση με τις άλλες 2 ομάδες που τράφηκαν με υψηλά σε λιπαρά δίαιτες.

2. Μετρήσεις Συγκέντρωσης Zn και Cu στους ιστούς με τη μέθοδο Ατομικής Απορρόφησης

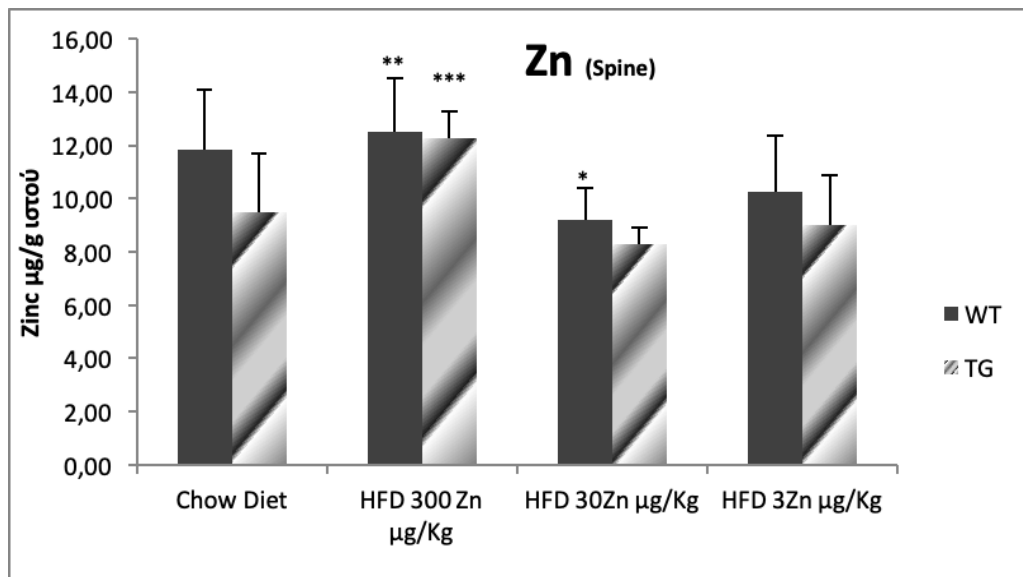
-Νωτιαίος μυελός

Ο νευρικός σωλήνας κάθε πειραματοζώου, μετά από επεξεργασία, αναλύθηκε για τις συγκεντρώσεις των μετάλλων ψευδαργύρου και χαλκού κάθε ομάδας με μέθοδο ατομικής απορρόφησης και οι συγκεντρώσεις των μετάλλων παρουσιάζονται παρακάτω στους πίνακες 6 και 7:

Ψευδάργυρος:

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων ατομικής απορρόφησης για τον Zn σε ιστό νωτιαίου μυελού.

| Zn µg/gr | WT | Tg |
|------------------|--------------|-------------|
| Chow Diet | 11.812 ± 2.3 | 9.5 ± 2.2 |
| HFD 300 Zn µg/Kg | 12.528 ± 2 | 12.266 ± 1 |
| HFD 30Zn µg/Kg | 9.189 ± 1.2 | 8.298 ± 0.6 |
| HFD 3Zn µg/Kg | 10.241 ± 2.1 | 8.991 ± 1.9 |

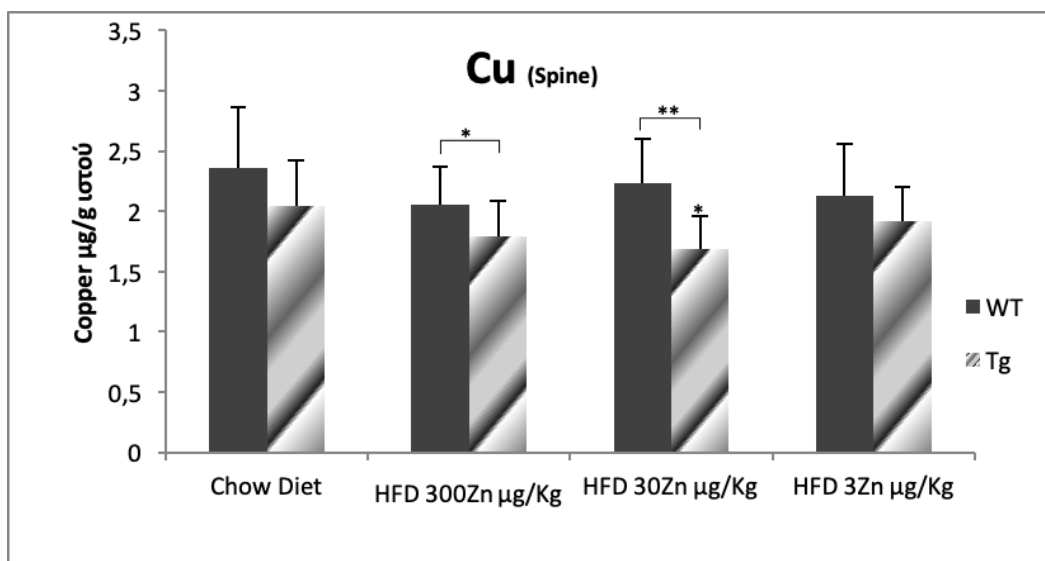


Διάγραμμα 9: Συγκεντρώσεις Zn στο νωτιαίο μυελό WT και Tg ζώων όπως μετρήθηκαν στην ατομική απορρόφηση. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) ***p<0.001, **p<0.005 και *p<0.05

Χαλκός:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων ατομικής απορρόφησης για τον Cu σε ιστό νωτιαίου μυελού.

| Cu $\mu\text{g}/\text{gr}$ | WT | Tg |
|-----------------------------------|--------------|--------------|
| Chow Diet | 2.364 + 0.49 | 2.048 + 0.37 |
| HFD 300Zn $\mu\text{g}/\text{Kg}$ | 2.053 + 0.31 | 1.792 + 0.29 |
| HFD 30Zn $\mu\text{g}/\text{Kg}$ | 2.23 + 0.36 | 1.682 + 0.27 |
| HFD 3Zn $\mu\text{g}/\text{Kg}$ | 2.126 + 0.43 | 1.916 + 0.28 |



Διάγραμμα 10: Συγκεντρώσεις Cu στο νωτιαίο μυελό WT και Tg ζώων όπως μετρήθηκαν στην ατομική απορρόφηση. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι), ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της συγκέντρωσης των 2 μετάλλων (Zn-Cu) έγινε με ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA) ως προς τους παράγοντες του γονιδίου (hHsp70) και την HFD διαίτα.

Zn) Ανάλυση μεταβλητότητας μίας κατεύθυνσης έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές των συγκεντρώσεων Zn στον νωτιαίο μυελό

- στα φυσιολογικά ποντίκια Wt HFD30Zn που έλαβαν αυξημένη σε λιπαρά διατροφή η συγκέντρωση Zn εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με Wt ChowDiet που έλαβαν συνηθισμένη διαίτα ($p=0.01$)

- στα φυσιολογικά ποντίκια WtHFD300Zn που τράφηκαν με δίαιτα υψηλών λιπαρών και αυξημένη συγκέντρωση Zn η συγκέντρωση Zn εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τα αντίστοιχα (HFD) που τράφηκαν με φυσιολογικά όρια Zn (30μg/Kg) ($p=0.004$).
- στα διαγονιδιακά ποντίκια Tg HFD300Zn που έλαβαν υψηλής συγκέντρωσης λιπαρών και αυξημένης συγκέντρωσης Zn διατροφή η συγκέντρωση Zn αυξήθηκε σε σχέση με αυτά που έλαβαν HFD30Zn ($p=0.001$).

* Αν και τα hHsp70 υπερεκφράζοντα ποντίκια φαίνεται να έχουν λίγο χαμηλότερη συγκέντρωση Zn, ο στατιστικός έλεγχος δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και διαγονιδιακών ζώων σε καμία από τις 4 διατροφικές ομάδες,

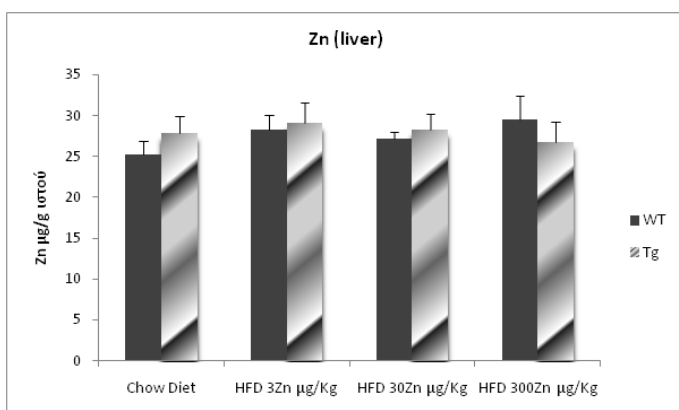
Cu) Η ανάλυση One-way anova ως προς το γονίδιο της hHsp70 στην συγκέντρωση του χαλκού στις διάφορες διαιτητικές ομάδες έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και διαγονιδιακών πειραματοζώων των ομάδων που έλαβαν υψηλή σε λιπαρά δίαιτα με φυσιολογικά και αυξημένα επίπεδα Zn (HFD 30 και 300 μg/Kg) με $p= 0.004$ και 0.048 αντίστοιχα.

Επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του Cu στην Tg ομάδα που τράφηκε με αυξημένα λιπαρά (HFD 30) ως προς αυτήν της φυσιολογικής διαίτας (Chow Diet) με $p=0.04$.

Επειδή το πηλίκo Zn/Cu αποτελεί δείκτη της ομοιοστασίας των μετάλλων, τα δείγματα του νωπιαίου μυελού αναλύθηκαν και για Cu. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των 2 μετάλλων είναι συμβατά.

-Συκώτι

Μετρήσεις με ατομική απορρόφηση στο ήπαρ των πειραματοζώων δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές της συγκέντρωσης Zn σε καμία από τις 8 διατροφικές ομάδες.

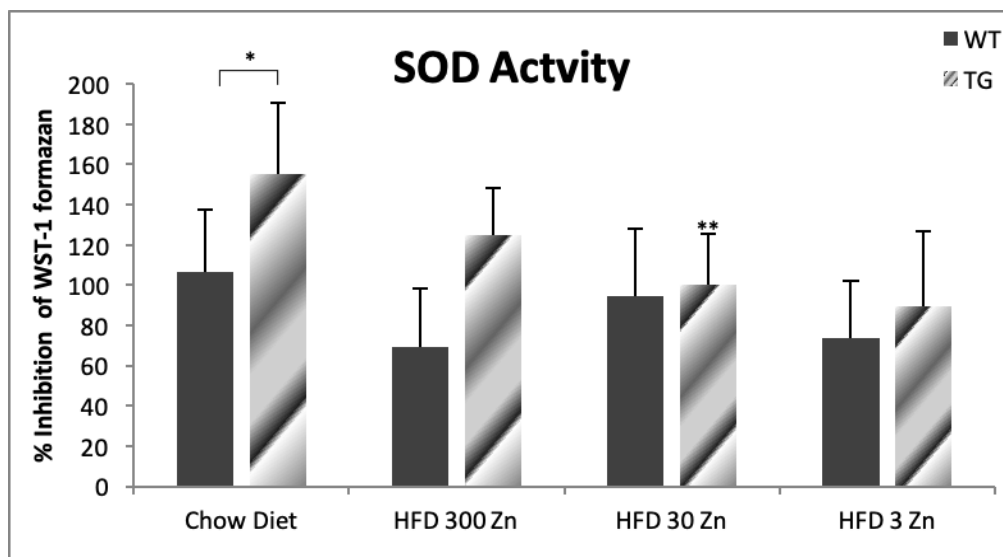


3.SOD Activity

Με την χρήση βιομηχανικού kit για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου της υπεροξειδάσης της δισμουτάσης σε ερυθροκύτταρα από τις ομάδες των πειραματικών μυών, βρέθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων της δραστικότητας του ενζύμου SOD σε ερυθρά αιμοσφαίρια Wt και Tg πειραματοζώων.

| SOD Activity | WT | Tg |
|--------------|------------|------------|
| Chow Diet | 106.4 ± 31 | 155.4 ± 35 |
| HFD 300 Zn | 69.2 ± 29 | 124.9 ± 23 |
| HFD 30 Zn | 94.7 ± 33 | 100.3 ± 25 |
| HFD 3 Zn | 74 ± 28 | 89.7 ± 37 |



Διάγραμμα 11: Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων δραστικότητας του ενζύμου SOD σε ερυθρά αιμοσφαίρια WT και Tg ζώων WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) **p<0.005 και *p<0.05

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δραστικότητας της SOD από τις 8 ομάδες των πειραματικών ποντικών φανέρωσε σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών (Wt) και διαγονιδιακών (Tg) ζώων που λάμβαναν τροφή εκτροφείου (p=0.03).

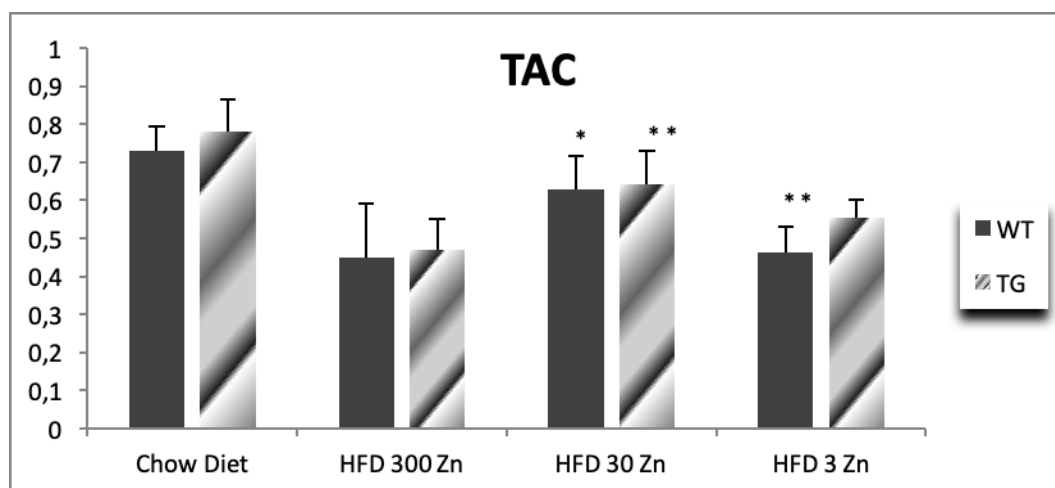
Επίσης τα διαγονιδιακά ποντίκια που έλαβαν δίαιτα υψηλών λιπαρών δίαιτα με φυσιολογική περιεκτικότητα Zn για 10 εβδομάδες εμφανίζουν σημαντική μείωση της δραστικότητας του ενζύμου ως προς τα όμοια τους στην control (Chow Diet) ομάδα (p=0.0012)

4. Ολική αντιοξειδωτική Ικανότητα – TAC

Από την μέτρηση με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο TAC στο πλάσμα του αίματος των διαφόρων ομάδων πειραματοζώων είχαμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 9: Αποτελέσματα μετρήσεων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος Wt και Tg πειραματοζώων.

| TAC in plasma | WT | TG |
|---------------|-------------|-------------|
| Chow Diet | 0.73±0.064 | 0.78±0.085 |
| HFD 300 Zn | 0.45±0.14 | 0.469±0.08 |
| HFD 30 Zn | 0.627±0.088 | 0.642±0.087 |
| HFD 3 Zn | 0.461±0.07 | 0.555±0.046 |



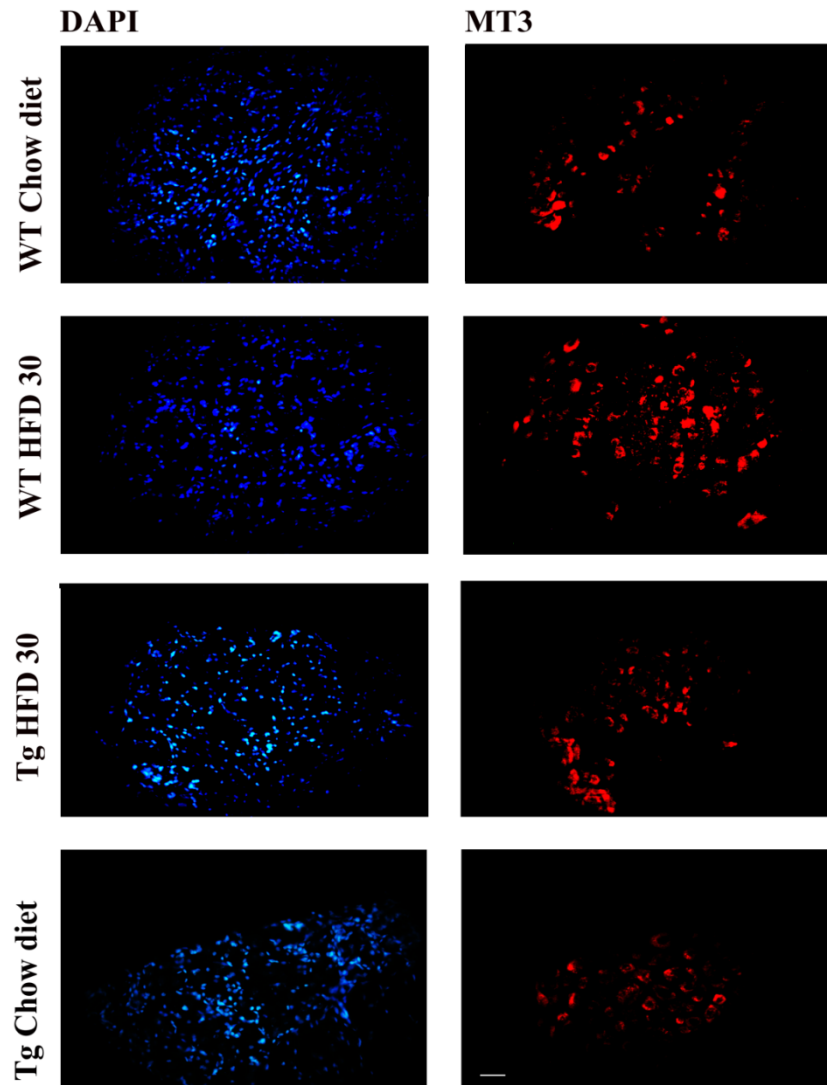
Διάγραμμα 12: Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα του αίματος WT και Tg ζώων WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) **p<0.005 και *p<0.05

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) από τις 8 ομάδες των πειραματικών ποντικών έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα φυσιολογικά (Wt) πειραματοζώα που έλαβαν HFD διατροφή σε σχέση με τα control (Chow Diet, p=0.025) αλλά και με αυτά που τράφηκαν με μειωμένη συγκέντρωση Zn HFD (0.005).

Επίσης τα διαγονιδιακά ποντίκια που έλαβαν υψηλών λιπαρών δίαιτα με φυσιολογική περιεκτικότητα Zn για 10 εβδομάδες εμφανίζουν σημαντική μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου ως προς τα όμοια τους στην control (Chow Diet) ομάδα (p=0.0018)

5. Αποτελέσματα Ανοσοφθορισμομετρικών Τεχνικών στους Ιστούς Γαγγλίων Οπισθίων Ριζών

MT3

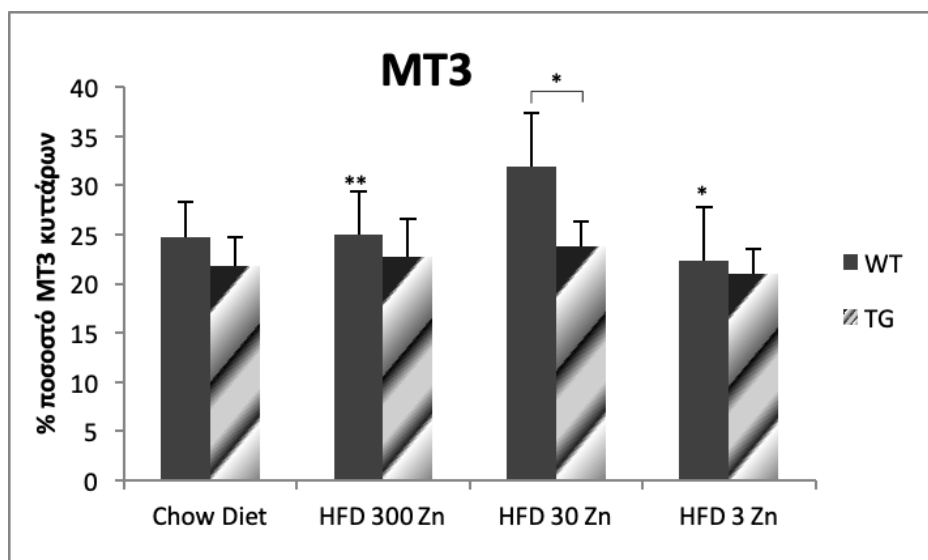


Εικόνα 7: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού ιστών DRG σε τομές από κρυοστάτη φυσιολογικών (WT) και διαγονιδιακών (Tg) πειραματοζώων, υπό φυσιολογική και υψηλή σε λιπαρά διαίτα. (scale bar=50μm).

Συνολικά μετρήθηκαν 6500 κύτταρα από όμοιες σε εμβαδό περιοχές των τομών γαγγλίων διαφορετικών ζώων φυσιολογικού (WT) και διαγονοδιακού γονότυπου υπό τις 4 διαφορετικές διατροφές.

Πίνακας 10: Ποσοστό % ανοσοθετικών σε MT3 κυττάρων στο σύνολο των κυττάρων ιστών DRG.

| %MT3 | Chow Diet | HFD300 Zn | HFD 30 Zn | HFD 3 Zn |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| WT | 24.7 ± 3.6 | 24.95 ± 4.4 | 31.9 ± 5.4 | 22.34 ± 5.4 |
| TG | 21.79 ± 2.9 | 22.74 ± 3.9 | 23.75 ± 2.6 | 21 ± 2.5 |

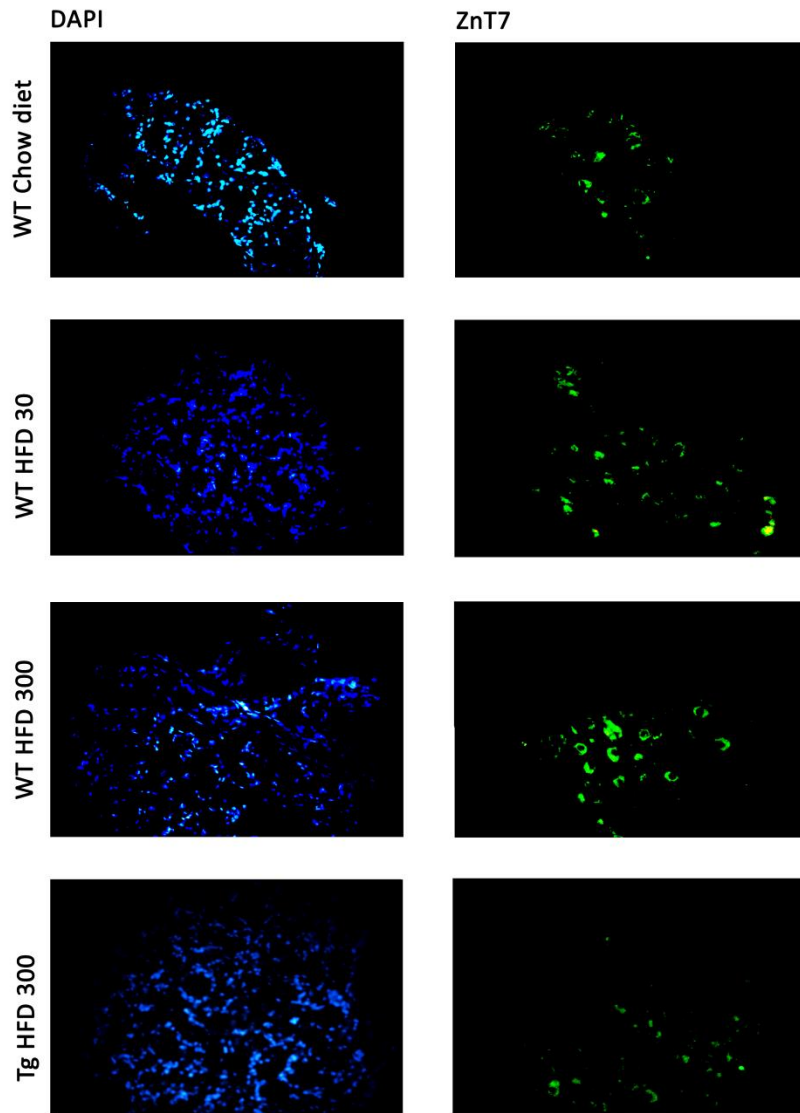


Διάγραμμα 13: Το επί τις εκατό ποσοστό των θετικά σημασμένων σε MT3 κυττάρων ανά ομάδα πειραματοζώων WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$.

Από τον ανοσοφθορισμό των κυττάρων των DRG ιστών καταμετρήθηκαν τα σημασμένα κύτταρα με χρήση του προγράμματος ImageJ. Οι καταμετρήσεις γίνανε σε όμοια σε εμβαδό πεδία ανά φωτογραφία και για κάθε διατροφική ομάδα μετρήθηκαν τουλάχιστον 36 ξεχωριστές φωτογραφίες από διαφορετικά πειραματόζωα. Ανάλυση μεταβλητότητας με 2 παράγοντες (hHsp70 και διαίτα) έδειξε ότι οι τιμές των μεταβλητών επηρεάζονται και από τους 2 παράγοντες (in between subject effect) και επομένως είναι επιτρεπτό να συνεχίσουμε σε ξεχωριστή στατιστική επεξεργασία. Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS-13 για Windows. Για τις μετρήσεις της cGRP πρωτεΐνης δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων των σημασμένων MT3 κυττάρων στους ιστούς DRG έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA). Για τις διαφορές μεταξύ συγκεκριμένων ομάδων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας μιας κατεύθυνσης (one-way ANOVA) και φάνηκε σημαντική διαφορά στην αύξηση του φθορισμού της πρωτεΐνης στα φυσιολογικά ποντίκια που έλαβαν δίαιτα υψηλών λιπαρών και φυσιολογική συγκέντρωση Zn προς τα αντίστοιχα διαγονιδιακά ($p=0.02$) και προς αυτά που έλαβαν φυσιολογική -control δίαιτα ($p=0.013$). Επιπρόσθετα οι μεταβολές στον Zn δίνουν σημαντική μείωση σε σχέση με αυτά που έλαβαν HFD με φυσιολογικό Zn (vs 300Zn $p=0.009$ και vs 3 HFDZn $p=0.003$). Αυτό δεν παρατηρείται στα DRG των Tg πειραματοζώων.

ZnT7

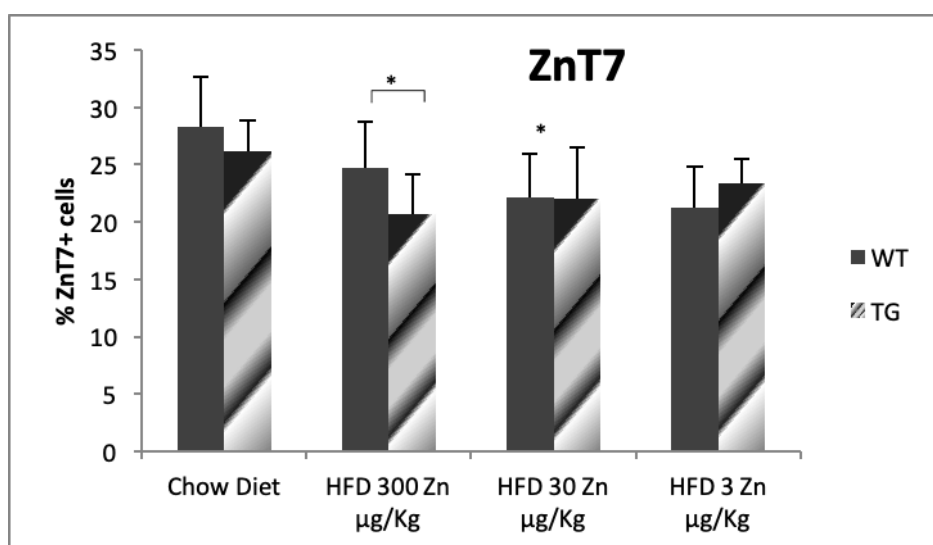


Εικόνα 8: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού ιστών DRG σε τομές από κρυοστάτη φυσιολογικών (WT) και διαγονιδιακών (Tg) πειραματοζώων, υπό διαφορετικές σε λιπαρά και συγκέντρωση Zn δίαιτες. Αριστερά σημαίνονται με DAPI όλοι οι πυρήνες και δεξιά φαίνονται τα κύτταρα που εκφράζουν εντονότερα τον ZnT7 μεταφορέα.

Συνολικά καταμετρήθηκαν στο υπολογιστικό πρόγραμμα ImageJ 4600 κύτταρα από όμοιες σε μέγεθος περιοχές των τομών γαγγλίων διαφορετικών ζώων φυσιολογικού (WT) και διαγονιδιακού (Tg) γονότυπου υπό τις 4 διαφορετικές διατροφές.

Πίνακας 11: Ποσοστό % ανοσοθετικών κυττάρων σε ZnT7 μεταφορέα στο σύνολο των κυττάρων των ιστών DRG

| Mice | Chow Diet | HFD300Zn $\mu\text{g/Kg}$ | HFD30Zn $\mu\text{g/Kg}$ | HFD3Zn $\mu\text{g/Kg}$ |
|------|-----------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| WT | 28.34 \pm 4.2 | 24.7 \pm 4.1 | 22.15 \pm 3.8 | 21.29 \pm 3.5 |
| TG | 26.14 \pm 2.7 | 20.69 \pm 3.4 | 22.03 \pm 4.4 | 23.36 \pm 2.1 |

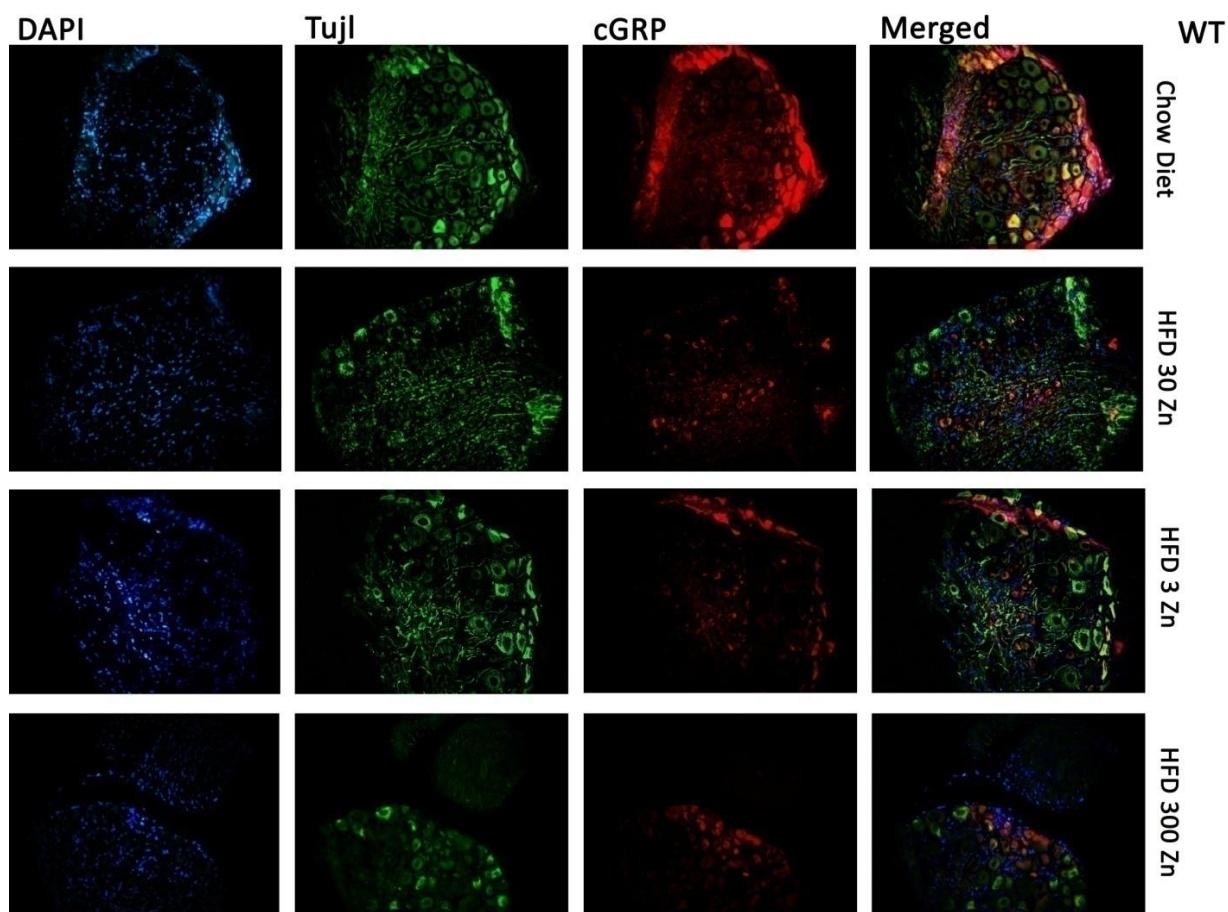


Διάγραμμα 14: Το επί τις εκατό ποσοστό των θετικά σημασμένων σε ZnT7 κυττάρων ανα ομάδα πειραματοζώων. WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι) * $p < 0.05$

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων έδειξε σημαντική μείωση φθορισμού των DRG κυττάρων στον ZnT7 μεταφορέα στην ομάδα των φυσιολογικών (WT) πειραματοζώων που έλαβαν διατροφή υψηλών λιπαρών ($p=0.018$) προς αυτά που έλαβαν control διατροφή. Επιπλέον στατιστικά σημαντική διαφορά φαίνεται να υπάρχει στην έκφραση του μεταφορέα ZnT7 στους ιστούς των DRG μεταξύ των διαγονιδιακών και φυσιολογικών ζώων που τράφηκαν με δίαιτα υψηλών λιπαρών και υψηλής συγκέντρωσης Zn ($p=0.02$, $F=7.89$).

cGRP

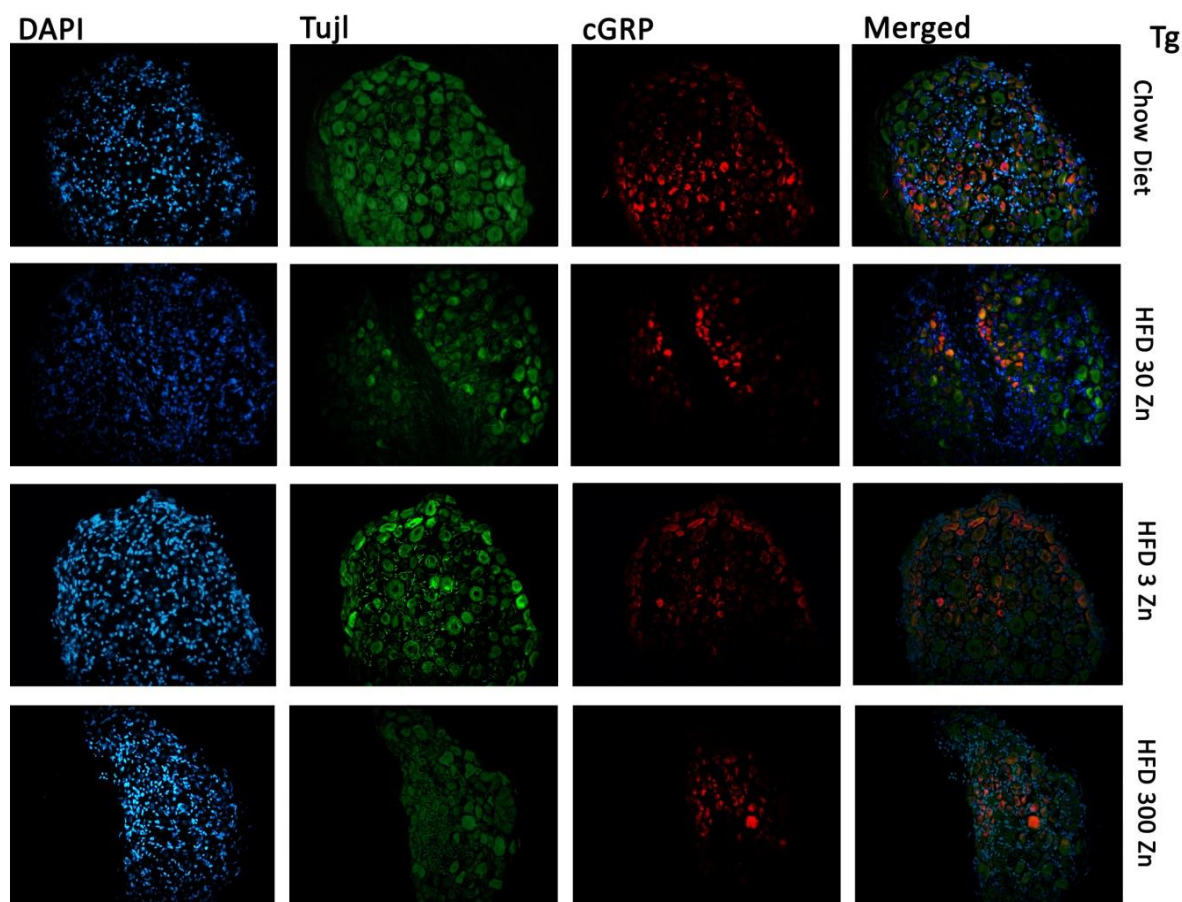
Wild Type ποντίκια



Εικόνα 9: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού ιστών DRG σε τομές από κρυοστάτη φυσιολογικών (WT) πειραματοζώων, υπό διαφορετικές σε λιπαρά και συγκέντρωση Zn δίαιτες. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται οι χρώσεις των πυρήνων με DAPI, των σωμάτων των νευρώνων με Tuj1 και των DRG νεωρώνων που περιέχουν το νευροπεπτίδιο CGRP. Οι merged εικόνες παραθέτονται μόνο για λόγους κατανόησης των 3 χρώσεων από τον παρατηρητή.

Συνολικά μετρήθηκαν 4164 κύτταρα από όμοιες σε μέγεθος περιοχές των τομών γαγγλίων διαφορετικών ζώων φυσιολογικού γονότυπου (WT) υπό τις 4 διαφορετικές διατροφές.

Hsp70 overexpressing mice

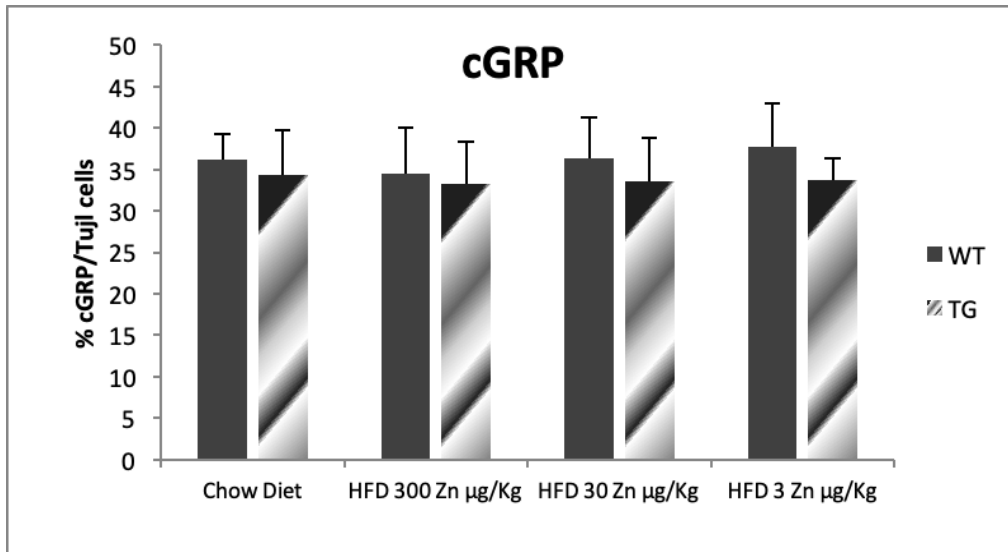


Εικόνα 10: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού ιστών DRG σε τομές από κρυοστάτη διαγονιδιακών (Tg) πειραματοζώων, υπό διαφορετικές σε λιπαρά και συγκέντρωση Zn δίαιτες. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται οι χρώσεις των πυρήνων με DAPI, των σωμάτων των νευρώνων με Tuj1 και των DRG νευρώνων που περιέχουν το νευροπεπτίδιο CGRP. Οι merged εικόνες παραθέτονται μόνο για λόγους κατανόησης των 3 χρώσεων από τον παρατηρητή.

Συνολικά μετρήθηκαν 4435 ανοσοφθορισμένα κύτταρα από όμοιες σε μέγεθος περιοχές των τομών γαγγλίων διαφορετικών διαγονιδιακών ζώων (Tg) υπό τις 4 διαφορετικές διατροφές.

Πίνακας 12: Ποσοστό % ανοσοθετικών κυττάρων σε cGRP ανά Tuj1+ κύτταρο

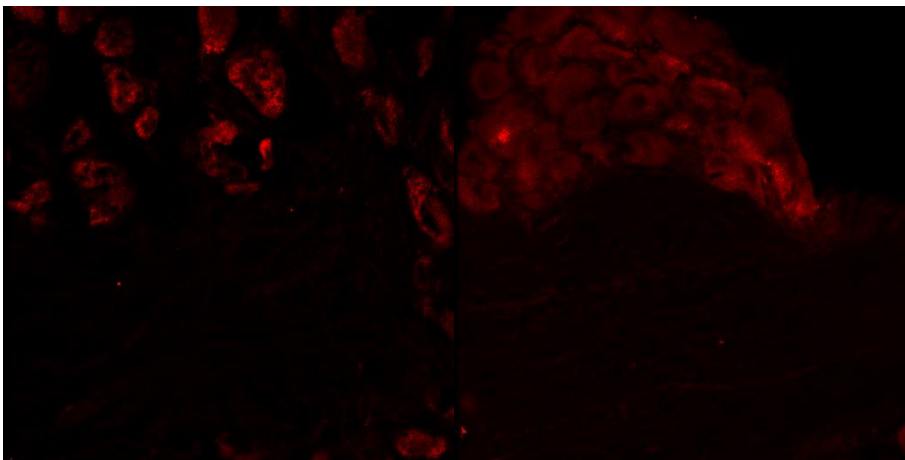
| Mice | Chow Diet | HFD 300 Zn μ g/Kg | HFD 30 Zn μ g/Kg | HFD 3 Zn μ g/Kg |
|------|-----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| WT | 36.12 \pm 3.1 | 34.56 \pm 5.4 | 36.36 \pm 4.9 | 37.8 \pm 5.2 |
| TG | 34.41 \pm 5.2 | 33.27 \pm 5 | 33.54 \pm 5.3 | 33.68 \pm 2.7 |



Διάγραμμα 15: Το επί τις εκατό ποσοστό των θετικά σημασμένων σε cGRP κυττάρων στο σύνολο των νευρικών κυττάρων (Tuji1+). WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι)

Οι μετρήσεις των πληθυσμών των κυττάρων που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης δεν απέδωσαν στατιστικά καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των 8 διαφορετικών ομάδων. Ούτε η υπερέκφραση της hHSP70, αλλά ούτε η διαφορετική λήψη διαίτας ως προς λιπαρά και Zn μετέβαλε την έκφραση της CGRP σε νευρώνες DRG από Wt ή Tg μύες στις πειραματικές μας συνθήκες.

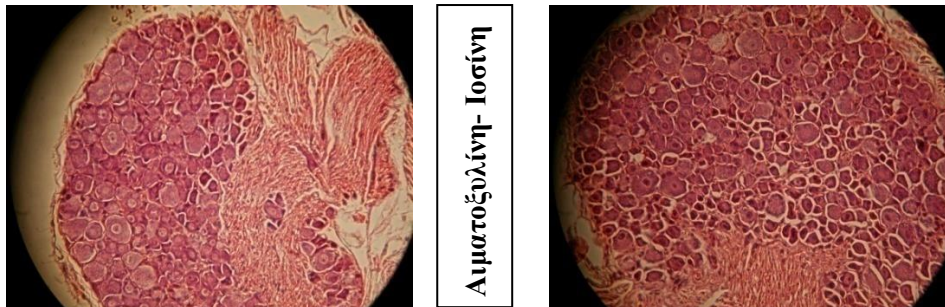
Ποιοτικός έλεγχος χρώσεων με τεχνολογία μικροσκοπίου συνεστιασμού



Εικόνα 11: Με χρήση μικροσκοπίου συνεστιασμού (confocal) έγινε πιο ακριβής απεικόνιση κάποιων χρώσεων στους ιστούς. Όπως και στις εικόνες από τα κύτταρα η MT3 εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα μερικών κυττάρων (διαφόρων μεγεθών) στις τομές των γαγγλίων.

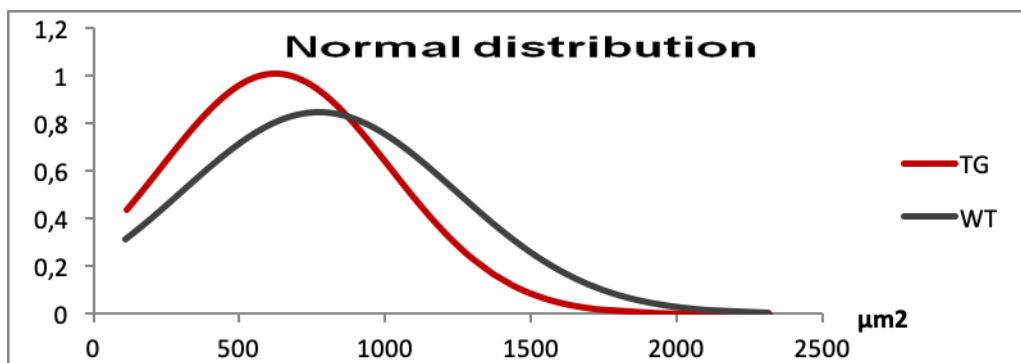
6. Μορφομετρικές μετρήσεις από τις εικόνες ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης

Με την χρήση του λογισμικού ImageJ και θέτοντας στις μετρήσεις μας ως μονάδα κλίμακας μήκους και ανάλυσης εικόνας (scale) 3.68 pixels/μm υπολογίζουμε τα μεγέθη των κυττάρων από τις τομές παραφίνης στα γάγγλια των οπισθίων ριζών από τα φυσιολογικά και διαγονιδιακά πειραματόζωα μας.



Εικόνα 12: Χρώσεις αιματοξυλίνης/ιοσίνης σε τομές παραφίνης από DRG ιστούς Wt (αριστερά) και Tg (δεξιά)

Από τις μετρήσεις διαμέτρων των κυττάρων προέκυψε ότι ο μέσος όρος μεγέθους (εμβαδό) των DRG νευρώνων μεταξύ των φυσιολογικών (WT) και διαγονιδιακών (Tg) πειραματόζωων διαφέρει σημαντικά ($p < 0.001$), καθώς βρέθηκαν $773.75 \mu\text{m}^2$ και $622.39 \mu\text{m}^2$ αντίστοιχα. Παρακάτω εμφανίζεται κατά η Gauss κατανομή (κανονική κατανομή) των κυττάρων.



Διάγραμμα 16: Κατανομή κατά Gauss του μεγέθους των DRG κυττάρων από φυσιολογικά και διαγονιδιακά πειραματικά ποντίκια σε φυσιολογικές συνθήκες. WT: C57Bl/6xDBA μύες (γκρι γραμμή), Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντες το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (κόκκινη γραμμή)

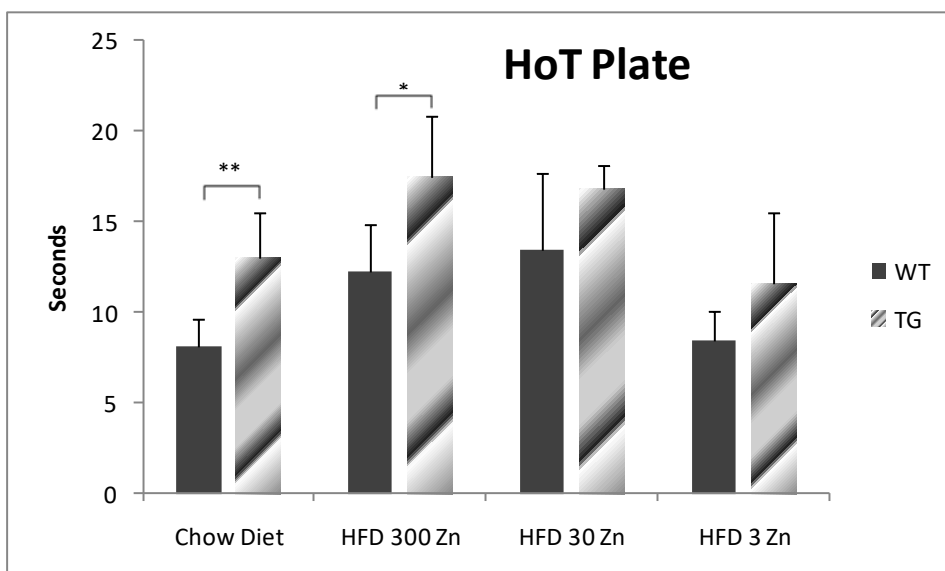
Ο αριθμός γαγγλίων που εξετάστηκαν ήταν περίπου 10 και λήφθηκαν από 2 πειραματικά ποντίκια υπό φυσιολογικές δίαιτες για κάθε γονιδιακό τύπο.

7. Τεστ Πόνου

Αποτελέσματα Hot Plate Δοκιμασίας

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων από το Hot Plate

| Hot Plate | Wt | Tg |
|------------|-----------|-----------|
| Chow Diet | 8.1±1.5 | 13.05±2.5 |
| HFD 300 Zn | 12.28±2.6 | 17.45±3.4 |
| HFD 30 Zn | 13.4±4.3 | 16.78±1.3 |
| HFD 3 Zn | 8.43±1.6 | 11.63±3.9 |



Διάγραμμα 17: Γραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων Hot Plate test για τις 8 ομάδες πειραματικών μών στις 4 διαφορετικές διατροφές. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι),

Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντας το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι)

Στατιστική ανάλυση (ANOVA) των αποτελεσμάτων του Hot Plate μεταξύ των τεσσάρων ομάδων των 2 διαφορετικών τύπων πειραματοζώων WT/Tg ως προς το γονίδιο εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ομάδα φυσιολογικής διαίτας (Chow Diet) $p=0.002$, $F=14.584$, αλλά και μεταξύ των Wt/Tg στην διατροφή HFD 300 Zn $p=0.043$, $F=4.623$.

Εκτός των 2 ανωτέρω στατιστικών αποτελεσμάτων που εμφανίζονται στο διάγραμμα 9, οι ακόλουθες σημαντικές μεταβολές δεν εμφανίζονται γραφικά για να είναι πιο ευδιάκριτο. Τα αποτελέσματα θα συζητηθούν κανονικά στην ανάλυση των αποτελεσμάτων μας.

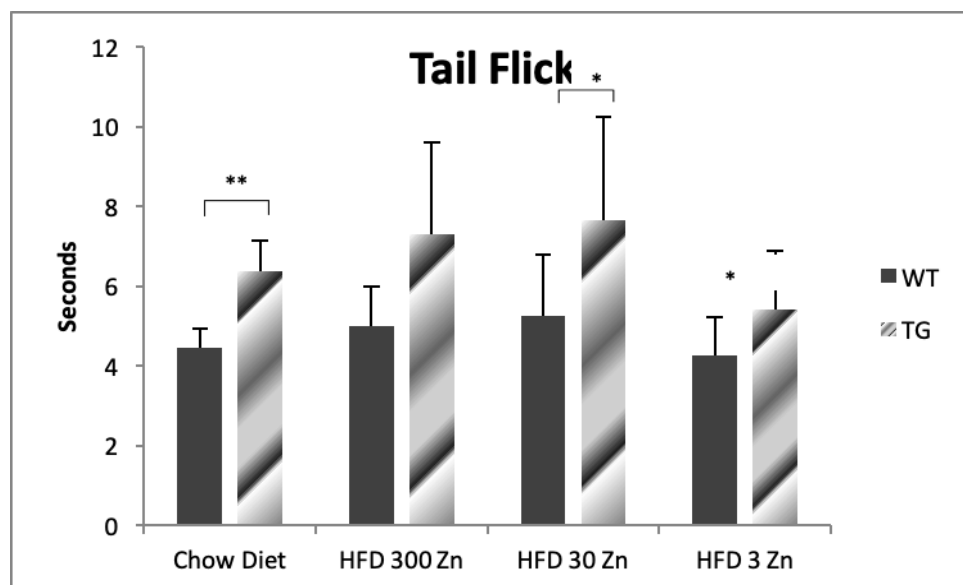
Significance-Σημαντικότητα διαφοράς αποτελεσμάτων του Hot Plate μεταξύ των διατροφικών ομάδων στα φυσιολογικά πειραματόζωα (Wt) εμφανίζεται μεταξύ HFD 30 Zn /HFD 3 Zn ($p=0.015$) και μεταξύ HFD 3 Zn/ HFD 300 Zn ($p=0.009$).

Significance-Σημαντικότητα διαφοράς αποτελεσμάτων του Hot Plate μεταξύ των διατροφικών ομάδων στα διαγονιδιακά πειραματόζωα (Tg) εμφανίζεται μεταξύ HFD 30 Zn /HFD 3 Zn ($p=0.03$) και μεταξύ HFD 3 Zn/ HFD 300 Zn ($p=0.007$).

Αποτελέσματα Tail Flick

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μετρήσεων από το Tail Flick

| Tail Flick | Wt | Tg |
|------------|------------|-----------|
| Chow Diet | 4.44± 0.49 | 6.36±0.49 |
| HFD 300 Zn | 4.99±1 | 7.29±2.3 |
| HFD 30 Zn | 5.24±1.5 | 7.64±2.59 |
| HFD 3 Zn | 4.25±0.96 | 5.4±1.48 |



Διάγραμμα 18: Γραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων Tail Flick test για τις 8 ομάδες πειραματικών μυνών στις 4 διαφορετικές διατροφές. * $p<0.05$, ** $p<0.005$

WT: C57Bl/6xDBA μύες (σκούρο γκρι),

Tg: C57Bl/6xDBA μύες, υπερεκφράζοντας το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 (ριγέ γκρι)

Στατιστική ανάλυση (ANOVA) των αποτελεσμάτων του Tail Flick μεταξύ των τεσσάρων ομάδων των 2 διαφορετικών τύπων πειραματοζώων WT/Tg ως προς το γονίδιο εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ομάδα Chow Diet $p=0.002$, $F=13.163$, αλλά και μεταξύ των Wt/Tg στην διατροφή HFD 300 Zn $p=0.011$, $F=8315$ και στη HFD 30 Zn $p=0.017$, $F=6.623$.

Significance-Σημαντικότητα διαφοράς αποτελεσμάτων του Tail Flick μεταξύ των διατροφικών ομάδων στα φυσιολογικά πειραματόζωα (Wt) εμφανίζεται μεταξύ HFD 30 Zn /HFD 3 Zn ($p=0.024$)

Significance-Σημαντικότητα διαφοράς αποτελεσμάτων του Tail Flick μεταξύ των διατροφικών ομάδων στα διαγονιδιακά πειραματόζωα (Tg) εμφανίζεται μεταξύ HFD 300 Zn/ HFD 3 Zn ($p=0.04$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συζήτηση In Vitro Αποτελεσμάτων.

1. Τοξικότητα Zinc και αντιαποπτωτική δράση της Hsp70 στους DRG νευρώνες

Η Τοξικότητα Zn σε καλλιέργεια εμβρυϊκών DRG κυττάρων.

Ο ακριβής ρόλος του ψευδαργύρου στην απόπτωση δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος με βάση τη βιβλιογραφία. Πλήθος μελετών δείχνουν ότι ο Zn μπορεί να είναι προ- ή αντι-αποπτωτικός ανάλογα με τις ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις και το είδος του ιστού και των κυττάρων, ενώ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που δεσμεύουν και μεταφέρουν Zn [The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health 2010]. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο ελεύθερος Zn «διαμερισματοποιείται» από το πλήθος των μεταφορέων του και ελέγχεται από τον μηχανισμό των MT/T [Maret, 2003].

Από τις μετρήσεις μας με την μέθοδο του MTT, προκύπτει ότι το IC_{50Zn} για εμβρυϊκούς DRG νευρώνες φυσιολογικών μυών είναι 100.5μM Zn (για το άλας ZnSO₄) μετά από 6 ώρες επώαση των κυττάρων. Ενώ από τον μέθοδο του κυτταρομέτρου ροής παρατηρούμε ότι συγκεντρώσεις 15 και 30μM Zn προκαλούν 8% και 17% αντίστοιχα αποπτωτικό θάνατο.

Στο νευρικό σύστημα η ρύθμιση της συγκέντρωσης του Zn, ειδικά κατά την ανάπτυξη, είναι επιτακτική και έχει φανεί ότι αρχικές μεταβολές του μπορεί να επηρεάσουν την ομαλή νευρική λειτουργία κατά την ενηλικίωση [Adamo et.al 2010]. Ο Zn αποθηκεύεται και ελευθερώνεται από τα προσυναπτικά κυστίδια, από μια συγκεκριμένη ομάδα γλουταμινο-ψευδαργυροενεργών νευρώνων (gluzinergetic), κατά την μετάδοση της ώσης. Κατά την παρατεταμένη συναπτική ενεργοποίηση (sustained synaptic activity) οι συγκεντρώσεις των ιόντων Zn²⁺ αυξάνονται από nano- σε micro-molar επίπεδα, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν τοξική δράση στους συναπτικούς νευρώνες [DD Mott, 2008, SL Selsi 2009]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η μελέτη σε νευρικά κύτταρα αμφιβληστροειδή που υποστηρίζει ότι αυξημένες συγκεντρώσεις Zn παρόμοιες με αυτές που εμφανίζονται στον συναπτικό χώρο (100μM) μπορούν να αποτρέψουν την δέσμευση του NGF στον υποδοχέα θανάτου p75^{NTR} και επομένως την απόπτωση [C Allington, 2001].

Οι τοξικές συγκεντρώσεις του Zn έχουν μελετηθεί σε αρκετές νευρικές κυτταρικές σειρές *in vitro*. Σε κύτταρα του φλοιού του εγκεφάλου αρουραίων οι τοξικές συγκεντρώσεις ZnCl₂ αρχίζουν στην συγκέντρωση 100μM [He K, Aizenman, 2010] έπειτα από 15 περίπου λεπτά, ενώ σε καλλιέργειες νευρώνων του ιπποκάμπου η αποπτωτική δράση του Zn εκκινεί σε συγκεντρώσεις 80μM έπειτα από έκθεση για 8 ώρες [Grabrucker AM, 2011]. Σε κυτταρικές σειρές νευρώνων της οπίσθιας ρίζας (DRG) από πτηνά (chicks), ο Zn βρέθηκε να σχετίζεται με τη δράση των νευροτροφινών στους υποδοχείς Trk και p75^{NTR} [Ross GM, 1997]. Μετέπειτα μελέτη σε DRG αρουραίων δείχνει ότι συγκεντρώσεις έως και 100μM ZnCl₂ για 30 λεπτά επηρεάζουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή P (substance P), χωρίς να θεωρείται ότι προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα [HB Tang, 2009]. Μελέτη με στόχο την διερεύνηση της τοξικότητας του Zn σε εμβρυϊκά κύτταρα DRG ποντικών έδειξε ότι 24 ώρες επώαση σε συγκεντρώσεις έως 100μM ZnCl₂ δεν είναι τοξικές εάν τα κύτταρα δεν επωαστούν με NGF σε υψηλή συγκέντρωση (50ng/ml) [SN. Morley, 2007]. Η ίδια μελέτη δείχνει πως έκθεση σε τοξικά επίπεδα Zn αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Zn εντός 10 λεπτών, γεγονός που οδηγεί σε αποπτωτικά σήματα. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήσαμε περιείχαν NGF σε μικρότερες όμως συγκεντρώσεις (5ng/ml) σύμφωνα με το πρωτόκολλο καλλιέργειας τους [Farinas I, 2010]. Αναλυτικά το πρωτόκολλο καλλιέργειας αναπτύσσεται στο 1^ο κεφάλαιο της μεθοδολογίας.

Η hHsp70 δρα νευροπροστατευτικά σε καλλιέργειες DRG εμβρυϊκών κυττάρων έναντι τοξικών συγκεντρώσεων Zn.

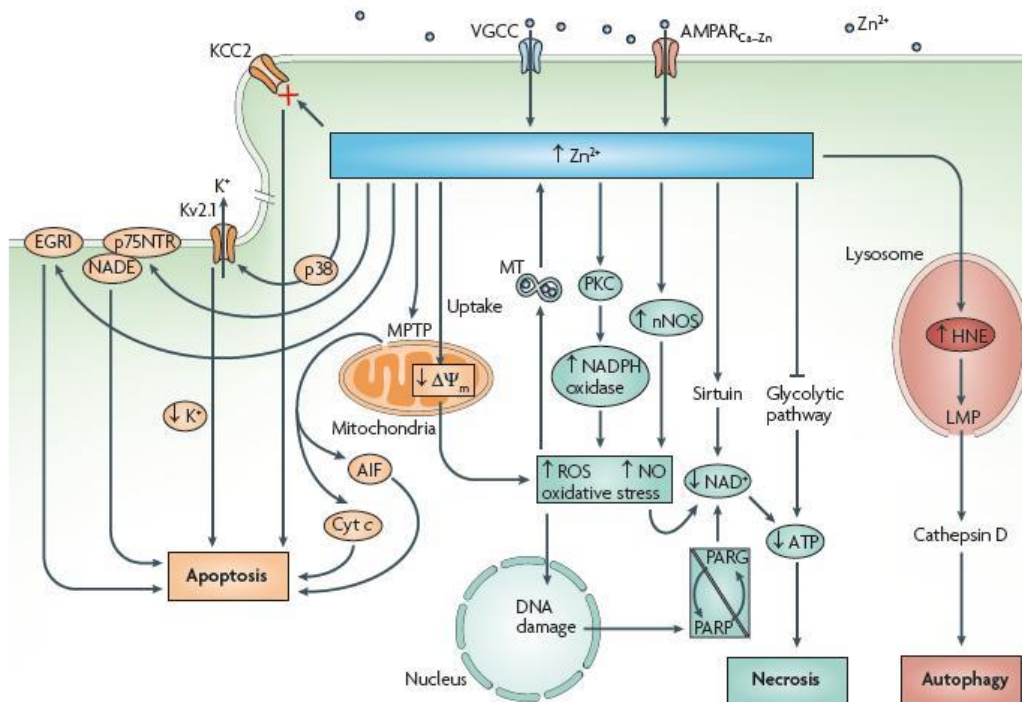
Δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με καλλιέργεια DRG νευρώνων που να υπερεκφράζουν την ομοσυννοδό πρωτεΐνη Hsp70. Τα αποτελέσματά μας στα διαγονιδιακά πειραματόζωα έδειξαν την προστατευτική ικανότητα της hHsp70 έναντι τοξικών δόσεων ZnSO₄ στις καλλιέργειες εμβρυϊκών αισθητικών κυττάρων. Τόσο η μέθοδος MTT, όσο και τα αποτελέσματα από το κυτταρόμετρο ροής δείχνουν ξεκάθαρα πώς η έκφραση της Hsp70 σ' αυτά τα κύτταρα μειώνει σημαντικά την απόπτωση που προκαλούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις Zn. Η μέτρηση απόπτωσης μετά από 6 ώρες επώασης με 0-500 μM Zn έδειξε ότι το IC₅₀ για τα διαγονιδιακά εμβρυϊκά κύτταρα είναι 145.37 μM, σχεδόν 50% περισσότερο από το αντίστοιχο IC₅₀ των φυσιολογικών (100.5μM ZnSO₄). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και έπειτα από επώαση με ZnSO₄ σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0-100 μM Zn) αλλά για περισσότερο χρόνο (24 ώρες) και μέτρηση της απόπτωσης με τη

μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Διάγραμμα 3.1 και 3.2).Μάλιστα το ποσοστό απόπτωσης που οφείλεται στον Zn μειώνεται στα DRG από διαγονιδιακά έμβρυα από 8% (Wt) σε 0% στην συγκέντρωση 15μM Zn και από 17% (Wt) σε 11% στα 30μM.

Η πρωτεΐνη Hsp70 υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται στους ιστούς και κύτταρα κάτω από συνθήκες stress ως προστατευτικός παράγοντας. Ενδιαφέρον έχει ότι σε κύτταρα ιππόκαμπου βρέθηκε πως ο ενδογενής συναπτικός Zn είναι απαραίτητος για την αύξηση των επιπέδων της Hsp70 και επακόλουθη νευροπροστασία μετά από εγκεφαλική βλάβη [Jeo W. Lee, 2000]. Σύμφωνα με μοντέλο που προτάθηκε αργότερα από τους Jin W.Lee et.al, (2008) υπόθανατηφόρες συγκεντρώσεις ιόντων Zn^{2+} προκαλούν μέσω του υποδοχέα $p75^{NTR}$ ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε επίπεδα που δεν προκαλεί απόπτωση και η οποία μαζί με την επαγόμενη Hsp70 είναι υπεύθυνες για την αναστολή της PARP και την νευροπροστασία. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται ισχαιμική προετοιμασία (ischemic preconditioning) και μαρτυρά μια προστατευτική αλληλεπίδραση του Zn και της HSP70 στα ιστικά συστήματα..

Οι Hsp70s έχουν εξαιρετικές κυτταρο-προστατευτικές ιδιότητες και είναι απαραίτητες για την απάντηση των κυττάρων σε στρεσογόνους παράγοντες (συμπεριλαμβανομένων των τοξικών δόσεων Zn) είναι γνωστό ότι στο ΚΝΣ οι δράσεις τους είναι ευεργετικές σε πλήθος ασθενειών που προκαλούνται από συσσώρευση μη-φυσιολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν πως τα DRG κύτταρα από τα διαγονιδιακά έμβρυα που υπερεκφράζουν την hHsp70 είναι πιο ανθεκτικά έναντι της τοξικότητας που προκαλούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις Zn. Αυτή η διαφορά φαίνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις Zn μεταξύ των φυσιολογικών και διαγονιδιακών κυττάρων έως και 500μM σύμφωνα με της μετρήσεις με MTT (Διάγραμμα 1).

Το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευτεί κυρίως μέσω της δράσης αναστολής της Hsp70 σε αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως ο AIF. Στο σχήμα 4 φαίνεται πως ο κυτταρικός ελεύθερος Zn^{2+} επηρεάζει ένα πλήθος βιοχημικών οδών και μοριακών μηχανισμών που μπορεί να οδηγήσουν σε 3 διαφορετικούς πιθανούς κυτταρικούς θανάτους.



Σχήμα 4: Μονοπάτια νευρωνικού θανάτου που ενεργοποιούνται από τον Zn^{2+} μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση, νέκρωση ή αυτοφαγία [SL. Sensi, 2009].

Μελέτη σε DRG κύτταρα όπου φαρμακευτικά αυξήθηκε η Hsp70, δείχνει ότι η έκφρασή της αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο αμύελων νευρώνων, την απομυελίνωση εμύελων αισθητικών νευρώνων και να αντιστρέψει την μείωση της αλγαισθησίας σε μοντέλο διαβητικής περιφερικής νευροπάθειας (DPN) ποντικών [MJ Urban, 2010]. Παλαιότερη έρευνα έδειξε πως η Hsp70 μπορεί να αυξήσει άλλωστε την επιβίωση νεογνικών κινητικών και αισθητικών νευρώνων μετά από αξοτόμηση του ισχιακού νεύρου [Tidwell et al., 2004].

2. Τα επίπεδα MT3 μεταβάλλονται με την αύξηση Zn ? Πως επηρεάζει η hHsp70 την έκφραση της MT3 στα DRG;

Έχει φανεί πως το μόριο της MT3 εντοπίζεται στο νωτιαίο μυελό και σε ορισμένους DRG νευρώνες. Μάλιστα σύμφωνα με τους Masters et.al (1994) η MT3 συντίθεται σε κύτταρα που περιέχουν και απελευθερώνουν αυξημένες συγκεντρώσεις Zn. Ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος της πρωτεΐνης δείχνει έντονο εντοπισμό της τόσο σε μικρούς όσο και σε ένα ποσοστό μεγαλύτερων αισθητικών DRG πιθανώς σε αυτούς που είναι ευαίσθητοι σε καφαϊκίνη [RA Velazquez et al 1999].

Στα αποτελέσματα μας δεν φαίνεται να μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά ο ανοσοφθορισμομετρικός εντοπισμός της MT3 στα καλλιεργούμενα εμβρυϊκά DRG από φυσιολογικά ποντίκια (Διάγραμμα 5). Το γεγονός ότι το ποσοστό των θετικών κυττάρων σε MT3 δεν μειώνεται αλλά δείχνει τάση αύξησης παρά το ότι εμφανίζεται απόπτωση στα κύτταρα στις συγκεντρώσεις 15 και 30 μM Zn^{2+} μαρτυρά την σημαντικότητα της πρωτεΐνης στην επιβίωση των κυττάρων. Άλλωστε οι MTs σαν οικογένεια πρωτεϊνών εντάσσονται στους μηχανισμούς προστασίας των κυττάρων έναντι σε τοξικότητα από μέταλλα ή ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά φθορισμού της MT3 στα DRG κύτταρα από φυσιολογικά με αυτά από διαγονιδιακά έμβρυα παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους τόσο στην control (0 συγκέντρωση Zn), όσο και στην συγκέντρωση 15 μM Zn. Τα θετικά σε MT3 κύτταρα στα hHSP70 υπερεκφράζοντα DRG νευρώνες είναι σημαντικά λιγότερα (38%) σε control καλλιέργεια αλλά και σε συγκέντρωση Zn στα 15 μM (30%). Τόσο in vitro όσο και in vivo όπως θα δούμε αργότερα τα πειραματόζωα με αυξημένη έκφραση hHsp70 φαίνεται να έχουν μειωμένα ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν την MT3. Στατιστικά σημαντική ωστόσο είναι η αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν την MT3 στους Tg νευρώνες στην συγκέντρωση 30 μM Zn σε σύγκριση με την control συγκέντρωση.

Τα γονίδια των MT επάγονται από μεταλλικά στοιχεία, οξειδοαναγωγικούς παράγοντες και σηματοδοτικούς παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες και οι στεροειδείς ορμόνες. Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) αυξάνουν τις MTs και ο υποδοχέας τους (GR) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με Hsp πρωτεΐνες σε ανενεργή μορφή [LD. Crocer et al 1999, F Haq et al 2003]. Κατά πόσο η ανθρώπινη HSP70 που υπερεκφράζεται στα πειραματόζωα μας δεσμεύει τα GC των ποντικών δεν μελετήθηκε. Είναι όμως γνωστό ότι οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου και του ποντικού εμφανίζουν πάνω από 90% ομολογία [πηγή: HomoloGene].

Τόσο οι MTs όσο και οι Hsps επάγονται από την επίδραση μεταλλικών ενώσεων μέσω των μεταγραφικών παραγόντων MTF-1 και HSF-1 αντίστοιχα, μέσω ανεξάρτητων μονοπατιών όπως ως πρόσφατα θεωρούταν. Μελέτη όμως έδειξε πως ο MTF-1 παράγοντας μείωσε την μεταγραφή της Hsp70 σε κύτταρα HeLa μέσω αλληλεπίδρασης με τον HSF-1 συνδέοντας τα 2 αυτά προστατευτικά μονοπάτια [R Uenishi et al 2006]. Αντίθετα ο HSF-1 δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των MTs, αλλά έκθεση κυττάρων σε θερμικό σοκ και μεταλλικά στοιχεία αύξησε την είσοδο μετάλλων στο κύτταρο και την μεταγραφή MTs [Saydam N et al 2003]. Οι προστατευτικές αυτές πρωτεΐνες δεν συνδέονται όμως μόνο στο

μεταγραφικό επίπεδο. Η Hsp70 και η MT3 φάνηκε επίσης να αποτελούν κοινό μέρος πρωτεϊνικού μηχανισμού προστασίας από NO σε μελέτη ανοσοφθοριστικού συνεντοπισμού σε κύτταρα εγκεφάλου ποντικών [IE Ghazi et al 2006].

Οι 2 προστατευτικοί μηχανισμοί των Hsps και των MTs έναντι σε στερεοσκόπιες καταστάσεις φαίνεται να συνδέονται. *Τα αποτελέσματά μας μαρτυρούν πως η ύπαρξη της hHsp70 στα εμβρυϊκά DRG μειώνει την ανοσοφθορισμομετρική εντόπιση της MT3 και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην δέσμευση της με μόρια που εκκινούν την μεταγραφή των MT3, όπως τα GC ή άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται από το κυτταρικό stress.*

3. Τα επίπεδα του ZnT7 μεταφορέα μεταβάλλονται με την αύξηση Zn? Πως επηρεάζει η hHsp70 την έκφραση του ZnT7 στα DRG;

Παρατηρώντας τα θετικά κύτταρα προς το αντίσωμα του μεταφορέα ZnT7 στους φυσιολογικούς DRG νευρώνες, φαίνεται χαρακτηριστικά πως η αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων Zn^{2+} προκαλεί αύξηση και στα επίπεδα των κυττάρων που εκφράζουν τον μεταφορέα. Ο μεταφορέας ZnT7 έχει εντοπιστεί στα σωμάτια Golgi και πιθανώς παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση ψευδαργυρο-πρωτεϊνών καθώς είναι υπεύθυνος για την είσοδο ιόντων Zn^{2+} στα Golgi [Wang X et al 2006]. Στις συγκεντρώσεις των 15 και 30 μM $ZnSO_4$ τα ζωντανά κύτταρα πιθανώς αυξάνουν την έκφραση των ZnT7 (Διάγραμμα 6) μεταφορέων τους ώστε να συνθέσουν προστατευτικές πρωτεΐνες όπως οι MTs. Άλλωστε η αύξηση των επιπέδων των μετάλλων προκαλεί την ενεργοποίηση του MTF-1 στα κύτταρα που εκτός από τις MTs, φαίνεται να είναι υπεύθυνος και για την έκφραση των μεταφορέων Zn [Langmade SJ et. al 2000].

Χαρακτηριστικό είναι πως οι 2 πρωτεΐνες που διαδραματίζουν τόσο σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του Zn και την μεταφορά του και οι οποίες στηρίζονται στην μεταγραφική δράση του MTF-1 για την έκφρασή τους έχουν ανάλογες μεταβολές στα Wt και Tg DRG κύτταρα υπό τις 3 συγκεντρώσεις Zn.

4. Επηρεάζεται η έκφραση της CGRP από τα αυξημένα επίπεδα Zn;

Η πρωτεΐνη CGRP έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην μετάδοση και μετατροπή της πληροφορίας του πόνου στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Κατά την αισθητική νευρογένεση, οι υποψήφιοι βλάβουποδοχείς οδηγούνται προς 2 επιλογές διαφοροποίησης, τους πεπτιδεργικούς SP και cGRP θετικούς και μη-πεπτιδεργικούς IB4 θετικούς. Οι αλλαγές αυτές ολοκληρώνονται σε μεγάλο βαθμό την εμβρυϊκή ημέρα 13 και διαγονιδιακά

πειραματόζωα που δεν εκφράζουν τους νευροτροφικούς παράγοντες NGF και NT3 χάνουν το 80% και 60% των αλγαισθητικών νευρώνων τους αντίστοιχα [I.Farinas, 2002]. Ταυτοποίηση και καταμέτρηση των ποσοστών των 2 πληθυσμών έδειξε ότι η ουσία P και η CGRP εκφράζονται σε 20% και 40% των DRG νευρώνων αντίστοιχα [Lee et. al, 1985]. Η CGRP είναι ο κύριος δείκτης των NGF εξαρτώμενων βλάβουποδοχέων καθώς όλοι σχεδόν την εκφράζουν. Ανοσοφθορισμομετρική καταμέτρηση σε νεώτερη μελέτη έδειξε ελαφρώς αυξημένα τα ανωτέρω ποσοστά 30% και 50% αντίστοιχα για SP και CGRP [Y. Aoki, 2004].

Μόλις το 1997 οι L. Yao et.al παρατήρησαν (Neuroscience) πως διαφορετικές νευροτροφίνες μεταβάλλουν την έκφραση των νευροπεπτιδίων όπως η SP στα DRG. Λίγο αργότερα φάνηκε ότι εξωγενώς προστιθέμενοι νευροτροφικοί παράγοντες προωθούν την αναγέννηση των αισθητικών νευρώνων σε μοντέλα νευρικού τραυματισμού και διαφορετικοί νευροτροφικοί παράγοντες επιλεκτικά διέσωσαν τους αντίστοιχους τύπους αισθητικών νευραξόνων [Bradbury EJ, 2000]. Σπουδαίας σημασίας είναι η ανακάλυψη ότι η βιοχημική και φυσιολογική κατάσταση των αισθητικών νευρώνων εξαρτάται από τις νευροτροφίνες που παράγονται από τους περιφερικούς ιστούς που νευρώνουν. Ενώ αλλαγές στους ιστούς αυτούς έπειτα από φλεγμονή ή τραυματισμό μεταβάλλουν τον φαινότυπο των αισθητικών κυττάρων [P. Hunt, Nature,2001].

Ο ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος των κυτταροκαλλιιεργειών εμβρυϊκών φυσιολογικών (Wt) κυττάρων DRG έδειξε πως η επώαση με 30μM ZnSO₄ μείωσε σημαντικά το νευροπεπτίδιο CGRP.

Η παρατήρηση αυτή πιθανώς αντικατοπτρίζει είτε την μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης λόγω της επίδρασης του Zn, είτε την αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων που την εκφράζουν απέναντι στον Zn. Είδαμε πως η συγκέντρωση αυτή του Zn για 24 ώρες επώασης είναι τοξική-αποπτωτική για σχεδόν το 30% των αισθητικών νευρώνων, ενώ η μέτρηση ανοσοφθορισμού δείχνει πως στο σύνολο (100%) των κυττάρων που επιβίωσαν, οι νευρώνες που εκφράζουν την CGRP έχουν μειωθεί (8.7%) (Διάγραμμα 7).

Είναι γνωστό πως στο σύνολο των γαγγλίων των οπισθίων ριζών ένα σύνολο νευρικών κυττάρων περιέχουν αυξημένες συγκεντρώσεις Zn, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της νευροδιαβίβασης [Velazquez R A, 1999]. Σε χαμηλά επίπεδα άλλωστε ο Zn έχει βρεθεί να επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης της ουσίας P πιθανώς μέσω καναλιών ασβεστίου [He B. Tang, 2009] αλλά και να ενεργοποιεί τους δίαυλους TRPA1 [Hongzhen Hu, 2009] τα οποία με τη σειρά μπορεί προκαλούν την απελευθέρωση CGRP [Kondo T. et.al, 2010].

Σε νευρικά κύτταρα από αμφιβληστροειδή πειραμοτόζων που επώαστηκαν με 100μM Zn²⁺, ο Zn απέτρεψε την δέσμευση του NGF στον p75NTR και αποκτώντας έναν προ- και αντι-αποπτωτικό ρόλο ανάλογα με το κυτταρικό μοντέλο [C Allington et.al, 2001]. Σε κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυττάρων από το μυελό επινεφριδίων ονόματι PC12 φάνηκε πως μετά από διαφοροποίηση τους με επώαση με NGF η επίδραση της τοξικότητας του Zn αυξήθηκε, οδηγώντας τα κύτταρα προς θάνατο [FJ Sánchez et.al, 2009]. Στα DRG είναι ευρέως αποδεκτό ότι ενεργοποίηση του υποδοχέα TrkA από τον NGF προκαλεί νευρική επιβίωση [Huang and Reichardt, 2003]. Φάνηκε όμως πως μετά από επώαση με τοξικά επίπεδα Zn ο TrkA κι όχι ο υποδοχέας «θανάτου» p75NTR είναι υπεύθυνος για την αύξηση των επιπέδων Zn ενδοκυττάρια και τον κυτταρικό θάνατο των DRG [SN Morley et.al.2007]. Επιπρόσθετα αναστολή της δράσης του NGF ή των υποδοχέων του με χρήση αντισωμάτων προκαλεί μείωση στα επίπεδα της CGRP των DRG σε μοντέλο που μελετήθηκε έπειτα από τραυματισμό στον μεσοσπονδύλιο δίσκο [S. Orita et.al. 2010].

Σύμφωνα με τα άνω η χαμηλή εντόπιση CGRP στο σύνολο των ζωντανών νευρώνων είναι πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη ευαισθησία στα τοξικά επίπεδα Zn στα κύτταρα που στηρίζονται στον NGF για επιβίωση τους. Είναι σημαντικό βέβαια να σημειωθεί ότι οι *in vivo* και *in vitro* μελέτες συχνά δίνουν μη συμβατά αποτελέσματα καθώς στην καλλιέργεια υπολείπεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και περιφερικών ιστών [I. Farinas et.al 2002].

Τα κύτταρα DRG που υπερεκφράζουν την hHsp70 διαφέρουν στα επίπεδα έκφρασης CGRP και πως επηρεάζονται από τον Zn?

Τα αποτελέσματά μας με βάση την στατιστική ανάλυση δεν αποδίδουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανοσοφθορισμού μεταξύ των DRG κυττάρων από Wt και Tg έμβρυα. Ο αριθμός των CGRP θετικών κυττάρων μειώνεται όταν αυξάνει η συγκέντρωση του Zn τόσο στα φυσιολογικά, όσο και στα διαγονιδιακά ποντίκια (Διάγραμμα 7). Η μείωση της CGRP είναι στατιστικά σημαντική μόνο στα DRG από φυσιολογικά ποντίκια που επώαστηκαν σε 30μM Zn σε σχέση με τα control και 15μM Zn. Όπως ήδη αναφέρθηκε τα Tg κύτταρα έχουν αυξημένες αντιαποπτωτικές δυνατότητες στο stress από Zn, κάτι που δικαιολογεί και την μη στατιστικά σημαντική μείωση CGRP+ κυττάρων καθώς τα επίπεδα απόπτωσης τους είναι χαμηλότερα.

In vitro έχει αποδειχθεί πως η υπερέκφραση της Hsp70 σε κυτταρικές σειρές προσφέρει προστασία έναντι ισχαιμικού και θερμικού σοκ [Amin et al., 1996] ενώ εξωγενώς χορηγούμενη Hsp70 στον νωτιαίο αυξάνει την επιβίωση αισθητικών νευρώνων μετά από τραυματισμό [Houenou LJ et.al,1996]. Επίσης φαρμακευτική απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 της Hsp70, προσφέρει προστασία σε νευρώνες DRG από μοντέλο επίμυων με διαβητική νευροπάθεια [MJ Urban,2010].

Μελέτη που έγινε σε ιστούς DRG έπειτα από θερμικό stress σε επίμυες, έδειξε αύξηση των επιπέδων της CGRP στο πλάσμα, ενώ χορήγηση του ψευδαργυρομορίου Zinc protoporphyrin 9 (ZPP-9: μόριο με δομή αίμης που δεσμεύει Zn αντί για Fe) μειώνει την έκφραση αυτή [J. Peng et.al. 2001]. Με βάση τα αποτελέσματα μας ωστόσο in vitro αλλά και in vivo δεν είναι στατιστικά σημαντικές ανοσοφθοριστικές διαφορές στους νευρώνες των DRG φυσιολογικών και hHsp70 υπερεκφράζοντων ποντικών.

Συνοψίζοντας τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μας από το in vitro πειραματικό μέρος προκύπτει ότι:

Επίδραση Zn σε καλλιέργεια εμβρυϊκών DRG νευρώνων

- Συγκεντρώσεις Zn πάνω από 30μM εμφανίζουν έντονη αποπτωτική δράση.
- Συγκεντρώσεις 15 και 30μM ZnSO₄ δεν επηρεάζουν τα επίπεδα της **MT3** πρωτεΐνης σε φυσιολογικά κύτταρα. Συγκέντρωση 30μM προκαλεί αύξηση της MT3 στα hHSP70 υπερεκφράζοντα κύτταρα.
- Συγκεντρώσεις 15 και 30μM ZnSO₄ δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του **ZnT7** μεταφορέα σε φυσιολογικά κύτταρα. Συγκέντρωση 30μM προκαλεί αύξηση του ZnT7 στα hHSP70 υπερεκφράζοντα κύτταρα.
- Επώαση των κυττάρων από φυσιολογικά ποντίκια με 30 μM ZnSO₄ φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του νευροπεπτιδίου **CGRP**.

Πίνακας 15.1 Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην ομάδα Wt μετά από σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων επώασης 15 και 30μM σε σχέση με την ομάδα ελέγχου control και εκτίμηση της επίδρασης των επιπέδων Zn στους DRG νευρώνες. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. **p*<0.05

| WT control | Apoptosis | MT3 | ZnT7 | CGRP |
|------------|-----------|-----|------|------|
| 15 μM Zn | 8% | ↔ | ↑ | ↔ |
| 30 μM Zn | 17% | ↑ | ↑ | * ↓ |

Πίνακας 15.2 Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην ομάδα Tg μετά από σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων επώασης 15 και 30μM σε σχέση με την ομάδα ελέγχου control και εκτίμηση της επίδρασης των επιπέδων Zn στους DRG νευρώνες. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. * $p < 0.05$

| Tg control | Apoptosis | MT3 | ZnT7 | CGRP |
|------------|-----------|-----|------|------|
| 15 μM Zn | 0% | ↑ | ↔ | ↔ |
| 30 μM Zn | 11% | * ↑ | * ↑ | ↔ |

Η υπερέκφραση της h-HSP70 σε καλλιέργεια DRG ποντικών E13.5:

- Προστατεύει τα κύτταρα από την τοξικότητα αυξημένων συγκεντρώσεων Zn αυξάνοντας το IC₅₀ και την **επιβίωση** των κυττάρων (MTT- Flow Cytometry)
- Μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης **MT3** σε σύγκριση με την Wt-control και Wt-15μM Zn.
- Μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα **ZnT7** όταν τα κύτταρα επωάζονται με 15 μM ZnSO₄.
- Δεν προκαλεί καμία μεταβολή στην έκφραση του νευροπεπτιδίου **CGRP** σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με control και 15μM συγκεντρώσεις ZnSO₄.

Πίνακας 16. Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μετά από σύγκριση μεταξύ των Tg σε σχέση με τα Wt της αντίστοιχης συγκέντρωσης επώασης και εκτίμηση της επίδρασης της υπερέκφρασης της ανθρώπινης HSP70 πρωτεΐνης στους εμβρυϊκούς DRG νευρώνες. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| Wt DRG cells | Apoptosis | MT3 | ZnT7 | CGRP |
|---------------|-----------|------|------|------|
| Tg control Zn | ↔ | ** ↓ | ↓ | ↓ |
| Tg 15μM Zn | ↓ | ** ↓ | * ↓ | ↓ |
| Tg 30μM Zn | ↓ | ↓ | ↔ | ↔ |

Συζήτηση In Vivo αποτελεσμάτων.

A. Επίδραση του διατροφικού Zn στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην αλγαισθησία και στην έκφραση του CGRP ποντικών WT και Tg, υπό δίαιτα υψηλών λιπαρών (HFD).

Πίνακας 17.1: Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην ομάδα Wt μετά από σύγκριση μεταξύ των HFD3Zn και HFD300Zn σε σχέση με την ομάδα ελέγχου HFD30Zn και εκτίμηση της επίδρασης των επιπέδων Zn σε HFD. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| WT HFD30Zn | Βάρος | Zn | Cu | SOD | TAC | MT3 | ZnT7 | CGRP | Hot Plate | Tail Flick |
|------------|-------|------|----|-----|------|------|------|------|-----------|------------|
| HFD3Zn | ↔ | ↔ | ↓ | ↓ | ** ↓ | * ↓ | ↔ | ↑ | ↓ | * ↓ |
| HFD300Zn | ↓ | ** ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ** ↓ | ↑ | ↓ | ↔ | ↔ |

Πίνακας 17.2: Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην ομάδα Tg μετά από σύγκριση μεταξύ των HFD3Zn και HFD300Zn σε σχέση με την ομάδα ελέγχου HFD30Zn και εκτίμηση της επίδρασης των επιπέδων Zn σε HFD. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| Tg HFD30Zn | Βάρος | Zn | Cu | SOD | TAC | MT3 | ZnT7 | CGRP | Hot Plate | Tail Flick |
|------------|-------|-------|----|-----|-----|-----|------|------|-----------|------------|
| HFD3Zn | ↑ | ↔ | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ↔ | ↔ | ↓ | ↓ |
| HFD300Zn | ↔ | *** ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ |

Περιορισμένη έλλειψη Zn προκαλεί συμπτώματα δυσλειτουργίας της γεύσης και της όσφρησης [Prasad 1988] ενώ σοβαρότερες ελλείψεις του προκαλούν αναστολή της σωματικής ανάπτυξης, [Hambridge 2000]. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο μειωμένος Zn στη διατροφή προκάλεσε τη μεγαλύτερη αύξηση βάρους. Πιθανή ερμηνεία αποτελεί το ότι ο Zn διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων και έλλειψη του μπορεί να προκαλεί δυσμεταβολική διαχείριση των λιπαρών. Άλλωστε η χορήγηση ψευδαργύρου εξασθενεί την υπεργλυκαιμία και την υπερινσουλιαιμία [Simon SF et.al 2001] ενώ άλλη μελέτη δείχνει πως έλλειψη Zn, μεταβάλλει τον λιπιδαιμικό μεταβολισμό και προτείνει αυξημένη διατροφική πρόσληψή του σε διαβητικές θεραπείες [Shen H, 2007].

Η μείωση του διατροφικού Zn δεν προκάλεσε μείωση του μετάλλου στο νωτιαίο μυελό (και στο συκώτι, αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Στην πραγματικότητα είναι ιδιαίτερα δύσκολο να μειωθούν δραστικά τα επίπεδα Zn στο περιβάλλον διαβίωσης πειραματοζώων για διάστημα 10 εβδομάδων. Το πόσιμο νερό υφίστατο φιλτράρισμα και ο κλωβός μέσω οξίνισης απαλλάγη από τα μεταλλικά στοιχεία. Ανάλογες παράδοξες μετρήσεις έχουν υπάρξει και σε άλλες μελέτες όπου οι μεταφορείς ZnT1 και 3 υπερεκφράζονται στο εντερικό επιθήλιο ώστε να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή πρόσληψη [Pfaffl MW, 2003 και Ryu MS, 2008]. Έτσι ενώ η αναμενόμενη αύξηση της συγκέντρωσης του ολικού Zn στον νωτιαίο μετά από λήψη 10πλάσιου διατροφικού Zn (HFD 300) φαίνεται, ο υποδεκαπλασιασμός του στην δίαιτα δεν δείχνει αντίστοιχη μείωση, τουλάχιστον όχι στον ιστό του νωτιαίου μυελού.

Η μείωση που παρατηρείται στις MT3 στις ακραίες τιμές διατροφής του Zn δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί. Πιθανά οι μεταβολές της διατροφικής συγκέντρωσης Zn σε συνδυασμό με τα υψηλά λιπαρά επιδρούν έμμεσα στον μηχανισμό έκφρασης των MT3, ίσως και μέσω της περιοχής απόκρισης του προμότορά τους στα γλουκοκορτικοειδή (GRE) [Sato M, 2002]. Πάντως ανάλογη μεταβολή με αυτή των μεταλλοθειονινών εμφανίζεται και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των αντίστοιχων ομάδων, αλλά και στην SOD για τις ομάδες των φυσιολογικών (Wt) πειραματοζώων. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν πόσο ο διατροφικός Zn επηρεάζει το αντιοξειδωτικό προφίλ στο in vivo επίπεδο, αλλά και ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι στενά συνδεδεμένοι για την διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων. Άλλωστε μείωση του διατροφικού Zn έχει φανεί πως μειώνει την SOD σε πειραματόζωα [Vasil'ev AV, 2008].

Ο μηχανισμός δράσης του Zn στα ιοντικά κανάλια που συμμετέχουν στην μεταγωγή της αίσθησης του πόνου είναι αρκετά περίπλοκος και επί χρόνια ερευνητικές ομάδες προσπαθούν να τον εξακριβώσουν πλήρως. Η απελευθέρωση Zn από τον προσυναπτικό νευρώνα μπορεί να δράσει σαν αναστολέας στους υποδοχείς NMDA, καϊνικού και GABA, ενώ ενεργοποιεί υποδοχείς AMPA σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Ο Zn φαίνεται να διαμορφώνει τη μεταγωγή του νευρικού σήματος και μέσω δράσης στα βιοχημικά κυτταρικά μονοπάτια στον μετασυναπτικό νευρώνα (π.χ. CaMKII, PKC, cAMP) [Nakashima A.S, 2009].

Τα αποτελέσματα μας ως προς την επίδραση της αύξησης ή μείωσης διαιτητικού Zn εμφανίζουν στις 2 δοκιμασίες πόνου διαφορές ως προς τις μεταβολές των χρόνων αντίδρασης. Τόσο το γεγονός ότι η HFD μπορεί να επηρεάζει τις μετρήσεις αλλά και το

ότι τα 2 τεστ εξετάζουν διαφορετική απόκριση (tail flick-αντανεκλαστικό ουράς και hot plate-σύνθετη απόκριση) δικαιολογούν τις διαφορές που εμφανίζονται σε κάποιες ομάδες. Τα αποτελέσματα από την ομάδα που τράφηκε με υψηλή σε Zn διατροφή (HFD 300) δεν μεταβάλλονται σε σχέση με τα control (HFD 30). Οι μεταβολές στην ομάδα έλλειψης Zn (HFD 3) ταιριάζουν στα 2 τεστ πόνου και δείχνουν πως έλλειψη Zn μπορεί να προκαλέσει υπεραλγησία. Το αποτέλεσμα αυτό ταιριάζει με τις πιο πρόσφατες μελέτες που τοποθετούν τον Zn σαν ένα από τους βασικούς αναλγητικούς παράγοντες στο μοριακό μονοπάτι του πόνου, μέσω της δράσης του στην υπομονάδα NR2A του NMDA υποδοχέα [C. Nozaki, 2011 Nature].

- Οι ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν χαμηλή σε Zn (3mg/Kg) διαίτα είχαν την μεγαλύτερη αύξηση **βάρους**, στην ομάδα των Tg η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική.
- Πρόσληψη διαίτας με αυξημένη περιεκτικότητα Zn (HFD300Zn) προκαλεί σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση **Zn** στον νωτιαίο μυελό και στις 2 ομάδες (Wt και Tg).
- Η **ενεργότητα της SOD** και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (**TAC**) φαίνεται να έχουν τάση μείωσης στις αλλαγές του διατροφικού Zn. Στην ομάδα των Wt που τρέφονται με μειωμένο Zn (HFD3 Zn) η μείωση της TAC είναι στατιστικά σημαντική.
- Τα επίπεδα των **MT3** μειώνονται και στις 2 μεταβολές του διατροφικού Zn, στην Wt ομάδα είναι στατιστικά σημαντική η μείωση.
- Οι μεταβολές του Zn (υπό συνθήκες HFD) δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών **ZnT7** και **CGRP** στις in vivo συνθήκες.
- Στις δοκιμασίες **πόνου** tail flick και hot plate φάνηκε πως μειωμένη πρόσληψη Zn στην διατροφή υψηλής περιεκτικότητας λιπαρών αντίθετα μειώνει τον χρόνο αντίδρασης και στις 2 ομάδες, στην Wt ομάδα η μείωση είναι στατιστικά σημαντική.

B. Επίδραση υπερέκφρασης της h-HSP70 στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην αλγαισθησία και στην έκφραση του CGRP σε ποντίκια υπό διαφορετικές διατροφές:

Πίνακας 18: Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων μετά από σύγκριση μεταξύ των Tg σε σχέση με τα Wt της αντίστοιχης διατροφικής ομάδας και εκτίμηση της επίδρασης της υπερέκφρασης της ανθρώπινης HSP70 πρωτεΐνης. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| WT x Diet | Βάρος | Zn | Cu | SOD | TAC | MT3 | ZnT7 | CGRP | Hot Plate | Tail Flick |
|--------------|-------|----|------|-----|-----|-----|------|------|-----------|------------|
| Tg Chow Diet | ** ↓ | ↓ | ↓ | * ↑ | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | ** ↑ | ** ↑ |
| Tg HFD3Zn | ** ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |
| Tg HFD30Zn | *** ↓ | ↔ | ** ↓ | ↔ | ↔ | * ↓ | ↔ | ↓ | ↑ | * ↑ |
| Tg HFD300Zn | ** ↓ | ↔ | * ↓ | ↑ | ↔ | ↓ | * ↓ | ↓ | * ↑ | ↑ |

Η υπερέκφραση της ανθρώπινης Hsp70 μεταβάλλει πλήρως το σωματικό βάρος των ποντικών. Το πλήθος των κυτταρικών μηχανισμών τους οποίους ρυθμίζει η HSP70 μας επιτρέπει να θεωρήσουμε πως μπορεί να επηρεάζει και αυξητικούς παράγοντες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη μελέτη που φανερώνει έντονη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού από την HSP70 πρωτεΐνη [Liangli Wang, 2012]. Συγκεκριμένα η μειωμένη παραγωγή ενδοκυττάριου ATP σε καλλιέργειες HeLa παρουσία υπερέκφρασης HSP70 δείχνει ότι το ενζυμικό σύστημα της αναπνευστικής αλυσίδας μειωρυθμίζεται. Εντούτοις τα επίπεδα ATP παραμένουν σταθερά, διότι η αυξορύθμιση της γλυκολυτικής οδού από τις HSP70 αντιρροπεί τις απώλειες σε κυτταρικό ATP. Πιθανώς ο ανωτέρω μηχανισμός να μην οδηγεί σε ομοιόσταση σε επίπεδο οργανισμού και λαμβάνοντας υπ' όψη πως πρόκειται για ανθρώπινη κι όχι ενδογενή υπερεκφραζόμενη HSP70 στα πειραματικά ποντίκια που εξετάζουμε. Σημαντική είναι η παρατήρηση πως η hHSP70 επηρεάζει την συγκέντρωση του Cu στον νωτιαίο μυελό αλλά όχι τον Zn.

Τα αποτελέσματα από τα πειραματόζωα δείχνουν πως η υπερέκφραση της ανθρώπινης ομο-συνοδού πρωτεΐνης HSP70 επηρεάζει στο σύνολο παραμέτρους της φυσιολογίας των ζώων. Έτσι αν και δεν φαίνεται να μεταβάλλεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των διαγονιδιακών πειραματοζώων στο πλάσμα του αίματος (TAC) μεταξύ των Wt και Tg ομάδων, τόσο τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις της SOD στα ερυθρά αλλά και των

επιπέδων της MT3 υπό HFD στα DRG κύτταρα δείχνουν πως ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των Hsps παίζει σημαντικό ρόλο και συνδέεται με άλλα αντιοξειδωτικά μονοπάτια.

Όπως ειπώθηκε παραπάνω είναι πιθανό ο μειωμένος ανοσοφθορισμός των DRG σε MT3 υπό stress υψηλών λιπαρών να οφείλεται σε σύνδεση των GCs με την hHSP70 αποτρέποντας την σύνδεση με τον ενδοπυρηνικό υποδοχέα τους και έκφραση της πρωτεΐνης [Sato M, 2002 και Ghoshal K, 2001]. Επίσης η MT3 δεν φαίνεται να αυξάνεται άμεσα από τα επίπεδα βαρέων μετάλλων στον νευρικό ιστό, αλλά επηρεάζεται από τα επίπεδα ROS, τα οποία αυξάνονται από την απελευθέρωση Zn στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η παρουσία της hHSP70 σε φυσιολογικές συνθήκες πιθανώς δεν καθιστά αναγκαία για την επιβίωση και ομοιόσταση των κυττάρων την αύξηση των MT3 στα DRG. Άλλωστε σε φυσιολογικές συνθήκες stress από βαρέα μέταλλα έχει φανεί πως οι MTs απαντούν αμέσως δρώντας σαν μεταλλοδεσμευτές, ενώ η HSP70 εκφράζεται με χρονοκαθυστέρηση και διορθώνει τις κατεστραμμένες και συσσωματωμένες πρωτεΐνες.

Παρατηρείται ότι αν και η συγκέντρωση Zn στην περιοχή του νωτιαίου μυελού δεν μεταβάλλεται σημαντικά μεταξύ των 2 φαινοτύπων (Wt-Tg), η παρουσία των μεταφορέων του ZnT7 είναι μειωμένη στη δίαιτα HFD 300. Στα *in vitro* πειράματα υπήρξαν ανάλογα αποτελέσματα. Ήπια αύξηση του Zn (15μM) στα κύτταρα αύξησαν τα επίπεδα του μεταφορέα. Πιθανά η παρουσία της hHSP70 επιδρά στον MTF-1 μεταγραφικό παράγοντα ρυθμιστικά. Η παρουσία της hHSP70 στο σύνολο της φαίνεται να διατηρεί τα επίπεδα έκφρασης των ομοιοστατικών πρωτεϊνών του Zn (MT3, ZnT7) σε σταθερά επίπεδα έναντι στρεσογόνων ερεθισμάτων τόσο δίαιτας υψηλών λιπαρών, αλλά και μεταβολών του μετάλλου (*in vitro* και *in vivo*).

Συγχρόνως φαίνεται να μειώνει την αλγαισθησία, όχι όμως μέσω μεταβολής της έκφρασης του νευροπεπτιδίου της CGRP ή της περιεκτικότητας του Zn στα DRG. Σε όλες τις μετρήσεις από τις δοκιμασίες πόνου τα Tg πειραματόζωα δείχνουν καθυστέρηση στον χρόνο αντίδρασης, ενώ σε δίαιτα εκτροφείου το αποτέλεσμα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό και στις 2 δοκιμασίες. Άμεση σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης HSP70 με τον πόνο σημειώνεται βιβλιογραφικά μόλις πρόσφατα [Chen YW, 2012], όπου φάνηκε έπειτα από τραυματισμό του ισχιακού νεύρου, ότι η αύξηση των επιπέδων της μειώνει τον περιφερικό νευροπαθητικό πόνο.

Η υπερέκφραση της ανθρώπινης Hsp70:

- **Μειώνει** στατιστικά σημαντικά το σωματικό **βάρος** και το μέγεθος των πειραματικών ποντικών που την υπερεκφράζουν.
- Η παρουσία της hHSP70 δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα του **Zn** στον νωτιαίο μυελό σε καμία από τις δίαιτες, αλλά **μειώνει** στατιστικά σημαντικά την συγκέντρωση του σε **Cu**
- **Αυξάνει** στατιστικά σημαντικά **την ενεργότητα της SOD** στα ερυθροκύτταρα αλλά δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (**TAC**) στο πλάσμα του αίματος.
- **Μειώνει** στατιστικά σημαντικά την έκφραση της **MT3** σε σχέση με τα φυσιολογικά, έπειτα από διατροφή (10 εβδομάδων) με HFD.
- **Μειώνει** το ποσοστό έκφρασης του **ZnT7** μεταφορέα σε συνθήκες HFD και αυξημένα επίπεδα πρόσληψης Zn (300Zn).
- Δεν επηρεάζει την έκφραση του νευροπεπτιδίου **CGRP** αν και έχει ελαφρώς μικρότερες τιμές ποσοστού έκφρασης στα Tg **Αυξάνει** το χρόνο αντίδρασης στις δοκιμασίες **πόνου** hot plate και tail flick, υπό συνθήκες φυσιολογικής διαίτας και HFD30Zn η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική.

Γ. Επίδραση της διαίτας υψηλών λιπαρών (HFD) στο βάρος, στα επίπεδα SOD και TAC του αίματος, στην έκφραση των MT3 και ZnT7, στην αλγαισθησία και στην έκφραση του CGRP σε ποντίκια:

Πίνακας 19.1: Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στα Wt μετά από σύγκριση μεταξύ της ομάδας που τράφηκε με HFD30Zn σε σχέση με την ομάδα που τράφηκε με τροφή εκτροφείου (Chow Diet) και εκτίμηση της επίδρασης του HFD σε ίδιες συγκεντρώσεις Zn. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| WT Chow Diet | Βάρος | Zn | Cu | SOD | TAC | MT3 | ZnT7 | CGRP | Hot Plate | Tail Flick |
|--------------|-------|-----|----|-----|-----|------|------|------|-----------|------------|
| HFD30Zn | ***↑ | * ↓ | ↔ | ↔ | * ↓ | ** ↑ | * ↓ | ↔ | ↑ | ↑ |

Πίνακας 19.2: Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στα Tg μετά από σύγκριση μεταξύ της ομάδας που τράφηκε με HFD30Zn σε σχέση με την ομάδα που τράφηκε με τροφή εκτροφείου (Chow Diet) και εκτίμηση της επίδρασης του HFD σε ίδιες συγκεντρώσεις Zn. ↑: Αύξηση, ↓: Μείωση, ↔: Καμία μεταβολή. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ και * $p < 0.05$

| Tg Chow Diet | Βάρος | Zn | Cu | SOD | TAC | MT3 | ZnT7 | CGRP | Hot Plate | Tail Flick |
|--------------|-------|----|-----|------|------|-----|------|------|-----------|------------|
| HFD30Zn | ** ↑ | ↓ | * ↓ | ** ↓ | ** ↓ | ↔ | ↓ | ↔ | ↑ | ↑ |

Η διατροφή με HFD αύξησε σε όλες τις ομάδες τα βάρη σε σχέση με τις control δίαιτες του εκτροφείου (Chow Diet), όπως ήταν αναμενόμενο.

Η επίδραση του HFD στον περιεχόμενο Zn και Cu φαίνεται επίσης να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς στατιστικά σημαντική μείωση του Zn παρατηρείται στο νωτιαίο μυελό από Wt ποντίκια και μείωση του Cu σε Tg. Ανάλογη μείωση έχει φανεί και σε πειραματικούς νεαρούς αρουραίους που τράφηκαν με HFD και εμφάνισαν μειωμένη συγκέντρωση Zn και Cu και αύξηση Fe στο συκώτι [Król E, 2011]. Το οξειδωτικό stress που προκαλείται στα πειραματόζωα αντικατοπτρίζεται στην μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος και στους 2 τύπους πειραματοζώων, αλλά και στην μείωση της δραστηριότητας της SOD στα Tg, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται στατιστικά σημαντική μείωση.

Επιπρόσθετα όπως αναφέρθηκε αυτό έχει σαν αποτέλεσμα στην αύξηση των MT3 πρωτεϊνών στα DRG των Wt ποντικών που απαντούν πιθανώς έναντι στο διατροφικό stress. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι ο ZnT7 έχει την τάση να μειώνεται στην ίδια

δίαιτα κατά αντιστοιχία με την συγκέντρωση του Zn στον νωτιαίο μυελό. Ο MTF-1 άλλωστε είναι ο υπεύθυνος μεταγραφικός παράγοντας για τον μεταφορέα ZnT7 αλλά όχι τόσο για την ισομορφή 3 των μεταλλοθειονινών.

Η δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας λιπαρών έχει φανεί ότι επηρεάζει άμεσα την αίσθηση του πόνου μεταβάλλοντας το ποσοστό πολυακόρεστων / κορεσμένων λιπιδίων και το μεμβρανικό δυναμικό στα DRG in vitro [Scott B. et.al. 1989]. Επίσης τα επίπεδα του νευροπεπτιδίου CGRP δεν μεταβάλλονται σημαντικά (μη –στατιστικά σημαντική μείωση) όπως έχει φανεί να συμβαίνει σε περιπτώσεις διαβητικών μοντέλων [Li et al., 2006]. Σε πολλές μεταβολικές παθήσεις παρατηρείται αισθητική νευροπάθεια όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι παρά την μεγάλη αύξηση βάρους των ζώων μετά την παρατεταμένη πρόσληψη δίαιτας αυξημένων λιπαρών στα όρια που αγγίζουν την παχυσαρκία, καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στην αίσθηση του πόνου δεν παρατηρήθηκε.

Λήψη δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας λιπαρών για 10 εβδομάδες:

- **Αυξάνει** στατιστικά σημαντικά το **βάρος** όλων των πειραματοζώων.
- Προκαλεί **μείωση** της συγκέντρωσης **Zn** στον νωτιαίο μυελό, στατιστικά σημαντική σε φυσιολογικά (Wt) πειραματικά ποντίκια. Ενώ στην Tg ομάδα παρατηρείται στατιστικά σημαντική **μείωση** του **Cu**.
- Προκαλεί στατιστικά σημαντική **μείωση** στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (**TAC**) και στις 2 ομάδες (Wt και Tg), ενώ μειώνει την **ενεργότητα της SOD** στα Tg πειραματοζώα.
- Προκαλεί **αύξηση** της έκφρασης της **MT3** σε γάγγλια οπισθίων ριζών Wt ποντικών, όχι όμως και σε αυτά που υπερεκφράζουν την hHSP70.
- Προκαλεί **μείωση** της έκφρασης του μεταφορέα **ZnT7** σε γάγγλια οπισθίων ριζών Wt ποντικών, όχι όμως και σε αυτά που υπερεκφράζουν την hHSP70.
- Δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα της **CGRP** στα DRG. Δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές στα αντανακλαστικά του **πόνου** σε καμία από τις 2 δοκιμασίες.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν έναν προστατευτικό ρόλο της υπερέκφρασης της ανθρώπινης ομο-συνοδού πρωτεΐνης HSP70 έναντι αυξημένων συγκεντρώσεων Zn στα κύτταρα των γαγγλίων των οπισθίων ριζών. Η απόπτωση μετά από 6 ώρες επώασης με 0-500 μM Zn έδειξε ότι το IC_{50} για τα διαγονιδιακά εμβρυϊκά κύτταρα είναι 145.37 μM , σχεδόν 50% περισσότερο από το αντίστοιχο IC_{50} των φυσιολογικών (100.5 μM ZnSO_4). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και έπειτα από επώαση με Zn σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0-100 μM Zn) αλλά για περισσότερο χρόνο (24 ώρες) και έλεγχο της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Η αύξηση του Zn σε εμβρυϊκές καλλιέργειες DRG κυττάρων δεν φαίνεται να προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταλλοθειονίνων MT3 και των μεταφορέων ZnT7, πρωτεϊνών σημαντικών για την ρύθμιση της ομοιοστασίας του μετάλλου. Αντίθετα η αύξηση του Zn (30 μM) φαίνεται να μειώνει τον ανοσοεντοπισμό του νευροπεπτιδίου CGRP σε DRG νευρώνες φυσιολογικών (Wt) εμβρύων. Η υπερέκφραση της hHSP70 σε DRG νευρώνες μειώνει την έκφραση των MT3 και ZnT7 όχι όμως την έκφραση του νευροπεπτιδίου CGRP.

Παράλληλα σε μοντέλο διατροφικού stress με δίαιτα υψηλών σε περιεκτικότητα λιπαρών (HFD) μελετήθηκε η επίδραση της μείωσης ή αύξησης του διαιτητικού Zn στην φυσιολογία, διαγονιδιακών (Tg) και μη (Wt), πειραματοζώων. Παρατηρήθηκε πως μείωση του διατροφικού Zn σε Wt-HFD ζώα, προκάλεσε σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), μείωση της ενεργότητας της SOD καθώς και του ανοσοεντοπισμού της MT3. Συγχρόνως μείωση του διαιτητικού Zn φαίνεται να προκαλεί μείωση του χρόνου αντίδρασης (υπεραλγησία) σε δοκιμασίες πόνου (hot-plate και tail-flick tests).

Η υπερέκφραση της hHSP70 φάνηκε στα πειράματα μας να μειώνει το μέγεθος των Tg μυών αλλά και των DRG νευρώνων τους. Αυξάνει σημαντικά την ενεργότητα του SOD ενζύμου, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης παρόμοια προς τα *in vitro* αποτελέσματα σε DRG νευρώνες, φαίνεται να μειώνει την έκφραση των MT3 και ZnT7 πρωτεϊνών. Αντίθετα το CGRP νευροπεπτίδιο δεν επηρεάζεται αλλά παρατηρείται αύξηση των χρόνων αντίδρασης (αντοχή στο άλγος) των Tg πειραματοζώων στις δοκιμασίες πόνου. Η δίαιτα υψηλών λιπαρών-HFD, φαίνεται να μειώνει την συγκέντρωση του Zn στον νωτιαίο σωλήνα και συγχρόνως να μειώνει τον μεταφορέα του ZnT7, αλλά παρουσιάζει σημαντική αύξηση των επιπέδων MT3 στα DRG κύτταρα φυσιολογικών μυών.

Μελλοντικοί στόχοι

Την τελευταία δεκαετία η μελέτη των ψευδαργυροεξαρτώμενων κυτταρικών συστημάτων και μηχανισμών προσφέρει νέες πληροφορίες και απαντήσεις για το πώς το ιχνοστοιχείο αυτό επηρεάζει διάφορα κυτταρικά συστήματα. Οι έρευνες πάνω στις εξελικτικά φυλογενετικές σχέσεις των μεταφορέων ZIP με τις πρωτεΐνες prion (PrP) [Ehsani S, 2011], αλλά και στην αλληλεπίδραση των ιόντων Cu/Zn στα β-αμυλοειδή στη νόσο Alzheimer αναμένεται να δώσουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της παθογένειας αυτών των ασθενειών. Η ακριβής περιεκτικότητα του Zn στα κυτταρικά διαμερίσματα και στις διάφορες συναπτικές διαδικασίες θα φέρει απαντήσεις στην μελέτη των δράσεων του στο πλήθος των ιοντικών διαύλων και υποδοχέων. Πρόσφατα άλλωστε δημοσιεύτηκε νέα μεθοδολογία για την διαμερισματοποίηση και καταγραφή της συναπτικής συγκέντρωσης του Zn στον ιστό του ιππόκαμπου από ασθενείς με νόσο Alzheimer [Bjorklund NL, 2012, Neuroscience Methods].

Ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο εμφανίζει και η βιοχημεία των ομοιοστατικών μηχανισμών του Zn, όπως οι ZnT και MT. Μόλις πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η λειτουργία των δύο υπομονάδων της MT3 σαν αντιτοξικού παράγοντα έναντι των συσσωματωμάτων Αβ-αμυλοειδών ($A\beta_{1-40}-Cu^{+2}$) και της δημιουργία ROS [Luo Y, Oct. 2012]. Το απλό δομικά αυτό πρωτεϊνικό μόριο φαίνεται ότι θα απασχολήσει ιδιαίτερα στο μέλλον την έρευνα νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καθώς σε μεγάλο πλήθος αυτών ο προστατευτικός του ρόλος ενισχύεται. Συγχρόνως φαίνεται ότι είναι επιτακτική ανάγκη η μελέτη των αλληλεπιδράσεων αντιοξειδωτικών κυτταρικών μηχανισμών μέσα σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως αυτό της Hsp70 και των MT3 [Ghazi I.E, 2006]. Άλλωστε οι 2 ιδιαίτεροι αυτοί μηχανισμοί μένει ακόμη να φανεί πως ακριβώς αλληλοεπηρεάζονται μέσω των μεταγραφικών παραγόντων τους MTF1 και HSF-1, τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*. Η ικανότητα φαρμακευτικού ελέγχου τέτοιων πρωτεϊνικών μορίων αποτελεί σημαντικό μελλοντικό στόχο. Τέλος το πρόσφατο χρονικό διάστημα αυξημένο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον προς το CGRP νευροπεπτίδιο, που φαίνεται να σχετίζεται, εκτός από τον πόνο και την φλεγμονώδη αντίδραση, με την κατάθλιψη και τις ημικρανίες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετά τις επιδράσεις του Zn και τους ομοιοστατικούς του μηχανισμούς, σε νευρώνες DRG κυττάρων. Στο πλαίσιο αυτό ερευνήθηκε η σχέση μεταξύ Zn και αλγαισθησίας καθώς και μεταξύ της πρωτεΐνης HSP70 και παραγόντων κυτταρικής προστασίας των DRG νευρώνων.

Ο Zn αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο σχεδόν στο 10% του συνόλου των πρωτεϊνών και των μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα των θηλαστικών. Η ομοιόσταση του στα κύτταρα είναι καθοριστική για την επιβίωση τους και ρυθμίζεται από πλήθος μεμβρανικών μεταφορέων (όπως οι ZnTs) και πρωτεΐνες δέσμησης και μεταφοράς του (όπως οι MTs). Ο Zn μπορεί να μεταβάλει τις κυτταρικές λειτουργίες και την πρωτεϊνοσύνθεση, επηρεάζοντας την βιοχημική έκφραση και «πλαστικότητα» του νεύρου. Σε ένα ποσοστό DRG νευρώνων (zincergic) ο Zn εντοπίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στα συναπτικά κυστίδια και η απελευθέρωση του φαίνεται να ρυθμίζει την απελευθέρωση της ουσίας P και να επηρεάζει τη δράση πλήθους υποδοχέων και ιοντικών διαύλων, δρώντας σαν νευρορρυθμιστής. Βασικό νευρορρυθμιστικό ρόλο φαίνεται να έχει και το πεπτίδιο του γονιδίου της καλσιτονίνης (CGRP), το οποίο απελευθερώνεται μαζί με την ουσία P από ένα ποσοστό των DRG νευρώνων. Η συγκέντρωση του ιόντος Zn μπορεί να ποικίλει ιδιαίτερα στο χώρο των συνάψεων και να κυμαίνεται (nM –mM), μετά από συνεχόμενη συναπτική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να δημιουργεί τοξικές ενδονευρικές συγκεντρώσεις που πιθανά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (απόπτωση, νέκρωση ή αυτοφαγία).

Βασικός κυτταρικός προστατευτικός μηχανισμός έναντι των βαρέων μετάλλων είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), οι οποίες επιδιορθώνουν ή απομακρύνουν από το κύτταρο λανθασμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα και έχουν έντονη αντι-αποπτωτική δράση. Η HSP70 έχει νευροπροστατευτικά χαρακτηριστικά καθώς έκφραση της έχει φανεί να σταματά τον θάνατο αμύελων νευρώνων, την καταστροφή μυελίνης από εμμύελες ίνες και να αντιστρέφει την αισθητική υποαλγησία. Ενδοκυττάρια αύξηση του Zn εκκινεί τους μηχανισμούς έκφρασης των HSP70 αλλά και των μεταλλοθειονινών (MTs) οι οποίοι έχει φανεί πως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των μεταγραφικών τους παραγόντων (MTF1 και HSF-1). Η πρόκληση έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών με θερμικό ή άλλο stress οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση μετάλλων ενδοκυττάρια η οποία όμως είναι ανεκτή και δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο λόγω της παρουσίας των HSPs. Ο Zn είναι απαραίτητος για

την φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού και δεν είναι απίθανο η πρόκληση πυρετού, σαν ένα φυσικό θερμικό σοκ, να βοηθάει την άμυνα έναντι μολύνσεων εκτός των άλλων, με την αύξηση των συγκεντρώσεων Zn ενδοκυττάρια.

Το διατροφικό stress υψηλών λιπαρών μπορεί να προκαλέσει μεταβολή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και να οδηγήσει στην παραγωγή ROS. Τόσο οι MTs άλλα και οι HSP70 έχουν έντονα προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού stress. Νευρικοί πληθυσμοί DRG, παρουσία ROS, είναι προστατευμένοι από κυτταρική βλάβη και απόπτωση είτε μέσω αυξημένων γλουταθειονών (συνδεδεμένων με MTs) είτε μέσω ρύθμισης των αποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-2) από την Hsp70.

Συγκεκριμένα μελετάται η τοξικότητα και η επίδραση του Zn σε εμβρυϊκούς DRG νευρώνες καλλιέργειας αλλά και σε DRG νευρώνες πειραματοζώων. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 μελετήθηκε η νευροπροστασία που προσφέρει στα κύτταρα αυτά έναντι αυξημένων συγκεντρώσεων Zn αλλά και διατροφικού stress. Ως δείκτες ομοιόστασης του μετάλλου ελέγχονται το προστατευτικό σύστημα των μεταλλοθειονινών (MT3) και το σύστημα μεταφοράς Zn (ZnT7) στις in vitro και in vivo πειραματικές συνθήκες. Συγχρόνως διερευνάται η έκφραση του νευρορυθμιστικού πεπτιδίου CGRP, στις διάφορες πειραματικές συνθήκες και η σχέση του με την απόκριση στα αλγογόνα ερεθίσματα. Εκτιμήθηκαν επίσης στοιχεία του οξειδωτικού προφίλ των πειραματοζώων, όπως η SOD και η TAC και η ιστική περιεκτικότητα του νευρικού σωλήνα σε μέταλλα, Zn και Cu.

Τα in vitro αποτελέσματα μας σχετικά με την αποπτωτική δράση του Zn, με τεχνικές MTT και κυταρομετρία ροής, δείχνουν ότι η συγκέντρωση IC_{50} $ZnSO_4 = 100.5 \mu M$ στους DRG νευρώνες. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι η υπερέκφραση της hHSP70 μειώνει την απόπτωση DRG νευρώνων που επώαστηκαν με $15 \mu M$ Zn, από 8% στα Wt σε 0% στα Tg και εκείνων που επώαστηκαν με $30 \mu M$ Zn, από 17% στα Wt σε 11% στα Tg. Ο ανοσοφθορισμομετρικός έλεγχος των μεταφορέων Zn (ZnT7) και των μεταλλοθειονινών (MT3) δείχνει σημαντικές μεταβολές στις τιμές τους. Τα αποτελέσματά μας μαρτυρούν πως η ύπαρξη της hHsp70 στα εμβρυϊκά DRG μειώνει την ανοσοφθορισμομετρική εντόπιση της MT3. Επίσης η αύξηση των εξωκυττάρων συγκεντρώσεων Zn^{2+} προκαλεί αύξηση και στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν τον μεταφορέα ZnT7, ενώ φαίνεται να μειώνει το νευροπεπτίδιο CGRP στα φυσιολογικά (Wt) DRG κύτταρα.

Τα *in vivo* πειραματικά αποτελέσματα μας εμφανίζουν διαφορές στους δείκτες ομοιόστασης του Zn, στην αντιοξειδωτική ικανότητα αλλά και στην αλγαισθησία, που οφείλονται στην επίδραση του διατροφικού Zn, της υπερέκφρασης της hHSP70 ή στην διατροφή HFD. Φάνηκε πως η δραστηριότητα της SOD στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται από την υπερέκφραση της hHSP70, ενώ η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) μειώνεται κυρίως από την διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα λιπαρών. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί η αύξηση των MT3 και η μείωση του ZnT7 σε φυσιολογικούς μύες που έλαβαν HFD. Μεταβολές στην ισορροπία του διατροφικού Zn προκαλούν μείωση της MT3 στα DRG των φυσιολογικών μυών. Ο νευρορυθμιστής CGRP δεν μεταβάλλεται σημαντικά σε κάποια από τις ομάδες αν και εμφανίζει τάση μείωσης όταν αυξάνει η συγκέντρωση του Zn, όπως παρατηρήθηκε και στα *in vitro* πειράματα. Αν και η έκφραση του CGRP δεν μεταβάλλεται, η απόκριση στις δοκιμασίες πόνου δείχνει ότι η υπερέκφραση της hHSP70 προκαλεί υποαλγησία ενώ η μείωση του διατροφικού Zn προκαλεί υπεραλγησία σε φυσιολογικούς μύες. Ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι ότι τα Tg ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο μέγεθος στους DRG νευρώνες.

Συμπεραίνουμε πως οι κυτταρικοί ομοιοστατικοί και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι ιδιαίτερα αλληλοεξαρτώμενοι και επηρεάζονται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Βασικά ιχνοστοιχεία, όπως ο Zn που φαίνεται να επιδρούν σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών είναι σημαντικό να ερευνηθούν περαιτέρω. Η νευρορυθμιστική δράση του Zn είναι βέβαιο πως θα αποτελέσει κύριο ερευνητικό στόχο τα επόμενα χρόνια.

ABSTRACT

This doctoral dissertation studies the effects of Zn and mechanisms of homeostasis in neurons of DRG cells. In this context the relationship between Zn and allodynia as well as between the Hsp70 protein and cell protection factors of DRG neurons was investigated.

Zn is a key building block in almost 10% of all proteins and transcription factors in mammalian cells. The homeostasis of Zn in cells is crucial to their survival and is regulated by a multitude of membrane carrier complexes (such as ZnTs) and proteins binding and transporting it (such as MTs). Zn can alter cellular functions and protein synthesis, affecting the biochemical expression and plasticity of the nerve.

In a percentage of DRG neurons (called zincergic), Zn is found in increased concentrations at the synaptic vesicles and its release seem to regulate the release of substance P and influence the action of a multitude of receptors and ionic channels, acting as neuromodulator. The calcitonin gene receptor peptide (CGRP) appears to have a key neuroregulatory role as it is released together with the substance P from a percentage of DRG neurons. The concentration of Zn ion may vary especially in the space of synapses and fluctuates from nM to mM after continuous synaptic activity, resulting in toxic neuronal concentrations, likely to lead to cell death (apoptosis, necrosis or autophagy).

Basic cellular protective mechanism against heavy metals are thermal shock proteins (HSPs), which repair or remove from the cell incorrectly protein substrates and have a pronounced anti-apoptotic effect. HSP70 has neuroprotective features as its expression has been shown to stop the death of unmyelinated neurons, the destruction of myelin fibers and reverse sensory hypalgesia.

Intracellular increase of Zn initiates the expression of HSP70 and metallothionines (MTS), which has been shown to interact with each other through their transcription factors (MTF1 and HSF-1). Inducing expression of these proteins with thermal or other stress leads in an increased concentration of intracellular metals, which, however, is tolerated and does not lead to cell death due to the presence of HSPs. Zn is necessary for normal immune functions and not unlikely that fever, like a natural heat shock, helps the defence against infections, by also increasing the concentrations of Zn intracellular. High-

fat dietary stress can cause a change in redox balance and lead to ROS production. Both MTs and HSPs have a strong protective effect against oxidative stress. Nervous DRG populations, in the presence of ROS, are protected from cell damage and apoptosis either through increased glutathiones (MTs-linked) or through regulation of apoptotic proteins (Bcl-2) by Hsp70.

In this thesis, the toxicity and effect of Zn on cultured fetal DRG neurons and in vivo in mice are studied. In transgenic mice overexpressing human HSP70 we addressed the level of neuroprotection to DRG cells against increased concentrations of Zn and nutritional stress. As homeostatic indicators of the metal we inspected the protective effect of metallothionine (MT3) and a Zn transport system (ZnT7) during in vitro and in vivo experimental conditions. At the same time, the expression of the neuromodulatory peptide CGRP is investigated, in the various experimental conditions and its relationship to the response of algogenic stimuli. In addition, we estimated the oxidative profile of experimental animals measuring markers such as SOD and TAC and the tissue content of the nervous system tube in the metals, Zn and Cu.

Our in vitro results on the apoptotic activity of Zn, using techniques as MTT and flow cytometry show that the IC₅₀ for ZnSO₄ concentration is 100.5 μ M for the DRG neurons. An important observation is that the overexpression of hHSP70 reduces DRG apoptosis of neurons incubated with 15 μ M Zn, from 8% in Wt to 0% in Tg and those incubated with 30 μ M Zn, from 17% in Wt to 11% in Tg originated neurons. The immunofluorescence signal of Zn transporter 7 (ZnT7) and metallothionine 3 (MT3) shows significant changes in their values between conditions. Our results point out that the existence of hHsp70 in fetal DRG neurons reduces immunofluorescence tracking of MT3. Also the rise in concentrations of Zn²⁺ causes increase in the number of cells expressing the ZnT7 carrier, while it appears to reduce CGRP neuropeptide in normal (Wt) DRG cells.

Our in vivo experimental results show differences in indicators of Zn homeostasis, in antioxidant capacity but also in allodynia, which they are due to the effect of dietary Zn, the overexpression of hHSP70 or the HFD diet. It seems that the activity of SOD in blood plasma increases from the overexpression of hHSP70, while the total antioxidant capacity (TAC) it is mainly reduced by the diet with a high fat content. Important observation is the observed increase of MT3 and the decrease of ZnT7 in Wt mice which were fed with HFD. Changes in the balance of dietary Zn cause a decrease in MT3 on the DRG of Wt mice. The CGRP neuromodulator is not altered significantly in any of the

groups although it shows a tendency to decrease when the concentrations of Zn increase, as observed in our *in vitro* experiments. The response to pain tests indicates that the overexpression of hHSP70 causes hypoalgesia, while reducing dietary Zn causes hyperalgesia in Wt mice. Lastly, an interesting result is that the Tg mice show significantly reduced size of the DRG neurons.

We conclude that the cellular homeostatic and antioxidant mechanisms are highly interdependent and affected in both the transcriptional and protein levels. Essential trace elements such as Zn have an important impact to a high number of cellular functions and need to be investigated further. The Zn's neuroregulatory activity is sure to be a main research target in the next few years.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

References:

- Adachi H, Katsuno M, Waza M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia* 2009;25:647–54.
- Adamo AM, Zago MP, Mackenzie GG, Aimo L, Keen CL, Keenan A, Oteiza PI. The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis *Neurotox Res.* 2010 Jan;17(1):1-14.
- Alford KA, Glennie S, Turrell BR, Rawlinson L, Saklatvala J, Dean JL. Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling. *J Biol Chem* 282: 6232–6241, 2007.
- Allington, C, IL Shamovsky, GM Ross and RJ Riopelle Zinc inhibits p75NTR-mediated apoptosis in chick neural retina, *Cell Death and Differentiation* (2001) 8, 451 ± 456
- Alpers DH. 1994. Zinc and deficiencies of taste and smell. *JAMA* 272:1233–1234.
- Amin V, Cumming DV, Latchman DS. Over-expression of heat shock protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neurosci Lett.* 1996 Mar 8;206(1):45-8.
- Amoureux M. C., Van Gool D., Herrero M. T., Dom R., Colpaert F. C. and Pauwels P. J. (1997) Regulation of metallothionein-III (GIF) mRNA in the brain of patients with Alzheimer disease is not impaired. *Mol. Chem. Neuropathol.* 32:101–121.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009.
- Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva, A. A. Starkov, *Biochemistry (Moscow)* 2005, 70, 200.
- Andrews, G. K. and J. Geiser, “Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency,” *Journal of Nutrition*, vol. 129, no. 9, pp. 1643–1648, 1999.
- Arquilla ER, Packer S, Tarmas W et al. The effect of zinc on insulin metabolism. *Endocrinology*103: 1440– 1449, 1978.

- Arya R, Mallik M and Lakhota S C 2007 Heat shock genes – integrating cell survival and death; *J. Biosci.* 32 595–610.
- Asmussen, J. W., MLVon Sperling, M Penkowa Intraneuronal Signaling Pathways of Metallothionein *Journal of Neuroscience Research* 87:2926–2936 2009
- Batulan, Z., D. M. Taylor, R. J. Aarons et al., “Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis,” *Neurobiology of Disease*, vol. 24, no. 2, pp. 213–225, 2006.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (August 2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome". *Nat. Cell Biol.* 2 (8): 469–75
- Bell, Stephen G. Vallee, Bert L. ‘The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link.’ *ChemBioChem*, 10, 55 – 62, 2009.
- Bessac BF, et al. (2008) TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 118:1899–1910.
- Bibel M, BardeY-A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 2000;14:2919–37
- Bird, G.C., Han, J.S., Fu, Y., Adwanikar, H., Willis, W.D., Neugebauer, V., 2006. Painrelated synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Mol. Pain* 2, 31–42.
- Bitanhirwe B. K.Y, and Cunningham M.G Zinc: “The Brain’s Dark Horse” *SYNAPSE* 63:1029–1049 (2009)
- Bjorklund NL, Sadagoparamanujam VM, Taglialatela G. Selective, quantitative measurement of releasable synaptic zinc in human autopsy hippocampal brain tissue from Alzheimer's disease patients. *J Neurosci Methods.* 2012 Jan 15;203(1):146-51.
- Bradbury EJ, McMahon SB, Ramer MS. Keeping in touch: sensory neurone regeneration in the CNS. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Oct;21(10):389-94.
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., Hartl, F.U., 2002. Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 Hop Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 19265–19275.

- Brown, D. R., H. Kozlowski, Dalton Trans. 2004, 1907
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625.
- Brussee, V., Cunningham, F.A., Zochodne, D.W., 2004. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* 53, 1824–1830.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X 1999 Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15 269–290.
- Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich, “Molecular chaperones and protein quality control,” *Cell*, vol. 125, no. 3, pp. 443–451, 2006.
- Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M, Scuto M, Rizza S, Zanolli L, Neri S, Castellino P. 2012 Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1822(5):729-36.
- Calderwood SK, Mambula SS, Gray Jr PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 2007;581:3689–94
- Campagne, MV, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Lowe DG. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 2000;20:5200–7.
- Carrasco J., Giralt M., Molinero A., Penkowa M., Moos T. and Hidalgo J. (1999) Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer’s disease brains. *J. Neurotrauma* 16: 1115
- Charalampidis PS, Veltsistas P, Karkabounas S, Evangelou A Blue CrO₅ assay: a novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances. *Eur J Med Chem.* 2009 Oct;44(10):4162-8. Epub 2009 May 21.
- Chen, S. and I. R. Brown, “Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative diseases,” *Cell Stress and Chaperones*, vol. 12, no. 1, pp. 51–58, 2007.

- Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg.* 2012 Jun;114(6):1330-7
- Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestril R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1739–1744, 2008.
- Chung RS, Penkowa M, Dittmann J, King CE, Bartlett C, Asmussen JW, Hidalgo J, Carrasco J, Leung YK, Walker AK, Fung SJ, Dunlop SA, Fitzgerald M, Beazley LD, Chuah MI, Vickers JC, West AK. 2008b. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astro- cyte- neuron response to injury. *J Biol Chem* 283:15349–15358
- Chung RS, Vickers JC, Chuah MI, West AK. 2003. Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci* 23:3336–3342.
- Cirulli F, Berry A, Alleva E. Intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behaviour but not memory retention in a Morris Water Maze task. *Neurosci Lett.* 2000 Jun 30;287(3):207-10.
- Cousins, R. J. and L. M. Lee-Ambrose, “Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats,” *Journal of Nutrition*, vol. 122, no. 1, pp. 56–64, 1992.
- Cox DR, Palmiter RD. The metallothionein-I gene maps to mouse chromosome 8: implications for human Menkes’ disease. *Hum Genet* 1983;64:61–4.
- Dalton, T., K. Fu, R. D. Palmiter, and G. K. Andrews, “Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency,” *Journal of Nutrition*, vol. 126, no. 4, pp. 825–833, 1996.
- Dumas S, Halley H, Lassalle JM. 2004. Disruption of hippocampal CA3 network: Effects on episodic-like memory processing in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci* 20:597–600.-Celestiano JJ, Gyenes M, Gibbs TT, Farb DH (1991) Negative modulation of the g-aminobutyric acid response by extracellular zinc. *Mol Pharmacol* 40:766 –773.

- Davis, S. R. and R. J. Cousins, "Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function," *Journal of Nutrition*, vol. 130, no. 5, pp. 1085–1088, 2000.
- Delaney, C.L., Russell, J.W., Cheng, H.L., Feldman, E.L., 2001. Insulinlike growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucosemediated apoptosis in Schwann cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60,147–160
- Devasagayam, TPA; Tilak JC, Bolor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S, Lele RD (October 2004). "Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects". *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)* 52: 796
- Di Croce, L., S. Okret, S. Kersten, J.A. Gustafsson, M. Parker, W. Wahli, M. Beato, Steroid and nuclear receptors. Villefranche-sur-Mer, France, May 25–27, 1999, *EMBO J.* 18 (1999) 6201–6210.
- Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One.* 2011;6(9):e24325. Epub 2011 Sep 16
- Dineley, K. E., T. V. Votyakova, I. J. Reynolds, *J. Neurochem.* 2003, 85, 563.
- Ding, Z.C, Q. Zheng, B. Cai, F.Y. Ni, W.H. Yu, X.C. Teng, Y. Gao, F. Liu, D. Chen, Y. Wang, H.M. Wu, H.Z. Sun, M.J. Zhang, X.S. Tan, Z.X. Huang, Study on structure-property-reactivity-function relationship of humanneuronalgrowth inhibitory factor (hGIF), *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1965–1972.
- Ditting T, Tiegs G, Rodionova K, Reeh PW, Neuhuber W, Freisinger W, Veelken R. Do distinct populations of dorsal root ganglion neurons account for the sensory peptidergic innervation of the kidney? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Nov;297(5):F1427-34.
- Ditting T, Veelken R, Hilgers KF. Transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in hypertensive renal damage: a promising therapeutic target? *Hypertension* 52: 213–214, 2008.
- Dominguez MI, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ. 2003. Zinc chelation during non-lesioning overexcitation results in neuronal death in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 116:791–806.
- Draguhn A, Verdorn TA, Ewert M, Seeburg PH, Sakmann B. 1990. Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn²⁺ *Neuron* 5:781–788.
- Dudek, F.E., Zinc and epileptogenesis, *Epilepsy Curr.* 1 (2001) 66–70.

- Duncan, K. E., T. T. Ngu, J. Chan, M. T. Salgado, M. E. Merrifield, M. J. Stillman, *Exp. Biol. Med.* (Maywood NJ U. S.) 2006, 231, 1488.
- Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):796-800
- El Ghazi I., B.Martin, and IM Armitage Metallothionein-3 Is a Component of a Multiprotein Complex in the Mouse Brain. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006 Oct;231(9):1500-6.
- Ellenberg M. Diabetic neuropathy precipitating after institution of diabetic control. *Am J Med Sci.* 1958 Oct;236(4):466-71.
- Ellis, R. J., "The molecular chaperone concept," *Seminars in Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 1–9, 1990.
- Eunjung Kim,² Eun-Young Kwon,¹ Hyun-Seo Jang,³ Cheol-Goo Hur,³ and Myung-Sook Choi¹ 2010 Network Analysis of Hepatic Genes Responded to High-Fat Diet in C57BL/6J Mice: Nutrigenomics Data Mining from Recent Research Findings *J Med Food.* Aug;13(4):743-56.
- Farinas Isabel, Marife Cano-Jaimez, Elena Bellmunt and Mario Soriano Regulation of neurogenesis by neurotrophins in developing spinal sensory ganglia *Brain Research Bulletin*, Vol. 57, No. 6, pp. 809–816, 2002
- Farzana Haq, Meghan Mahoney, James Koropatnick Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533 (2003) 211–226.
- Feng, W., F.W. Benz, J. Cai, W. M. Pierce, Y. J. Kang, *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 681.
- Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. *Psychopharmacology (Berl).* 2010 Jul;210(4):559-68. Epub 2010 Apr 27.
- Francisco J. Sánchez-Martína, Elvira Valeraa, Ilda Casimirob, Jaime M. Merinoa Nerve growth factor increases the sensitivity to zinc toxicity and induces cell cycle arrest in PC12 cells *Brain Research Bulletin* (2009).
- Frederickson, C.J. ~, E.J. Kasarskis 2 D. Ringo 2 and R.E. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *Frederickson Jourtlal ~I" Neurosci|Tce Methods.* 20 (1987) 91 - 103 91.

- Frederickson, J. Y. Koh, A. I. Bush, Neurobiology of zinc in health and disease Nat. Rev. Neurosci. 2005, 6, 449.
- Gabai V L, Mabuchi K, Mosser D D and Sherman M Y 2002 Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the biddependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis; Moll.Cell Biol;22 3415-3424.
- Gaither LA, Eide DJ. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. Biometals. 2001 Sep-Dec;14(3-4):251-70. Review.
- Ghoshal K, Jacob ST. Prog Regulation of metallothionein gene expression Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;66:357-84.
- Goo-Bo Jeong, Jelena Mojsilovic-Petrovic, Marco Boccitto, and Robert Kalb Signaling events in axons and/or dendrites render motor neurons vulnerable to mutant superoxide dismutase toxicity. J Neurosci. Author manuscript; available in PMC 2011 July 5.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S and Mori M 2004 hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria; Cell Death Differ. 11 390–402.
- Grabrucker AM, Garner CC, Boeckers TM, Bondioli L, Ruozi B, Forni F, Vandelli MA, Tosi G. Development of novel Zn²⁺ loaded nanoparticles designed for cell-type targeted drug release in CNS neurons: in vitro evidences. PLoS One. 2011 Mar 23;6(3):e17851.
- Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high fat diet. Diabetes 58: 567–578, 2009.
- Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G and Garrido C 2003 Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor; Oncogene 22 6669–6678.
- Hartl, F. U., “Molecular chaperones in cellular protein folding,” Nature, vol. 381, no. 6583, pp. 571–580, 1996.
- He-Bin Tang, Kanako Miyano, and Yoshihiro Nakata Modulation of the Substance P Release From Cultured Rat Primary Afferent Neurons by Zinc Ions J Pharmacol Sci (2009) 110, 397 – 400
- He-Bin Tang, K. Miyano, and Y. Nakata ‘Modulation of the Substance P Release From Cultured Rat Primary Afferent Neurons by Zinc Ions’ J Pharmacol Sci 110, 397 – 400 (2009).

- He K, Aizenman E. ERK signaling leads to mitochondrial dysfunction in extracellular zinc-induced neurotoxicity. *J Neurochem.* 2010 Jul;114(2):452-61. Epub 2010 Apr 20.
- Hidalgo, J., M. Penkowa, C. Espejo, E. M. Martinez-Caceres, J. Carrasco, A. Quintana, A. Molinero, S. Florit, M. Giralt, A. Ortega-Aznar, *Exp. Biol. Med.* (Maywood NJ U. S.) 2006, 231, 1450.
- Homem de Bittencourt Jr PI, Lagranha DJ, Maslinkiewicz A, Senna SM, Tavares AM, Baldissera LP, et al. LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2007;193:245–58.
- Hongzhen Hu, Michael Bandell, Matt J. Petrus, Michael X. Zhu, and Ardem Patapoutian. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels *Nat Chem Biol.* 2009 March ; 5(3): 183–190.
- Hozumi, I., T. Inuzuka, M. Hiraiwa, Y. Uchida, T. Anezaki, H. Ishiguro, H. Kobayashi, Y. Uda, T. Miyatake, S. Tsuji, Changes of growth inhibitory factor after stab wounds in rat brain, *Brain Res.* 688 (1995) 143–148
- Houenou LJ, Li L, Lei M, Kent CR, Tytell M. Exogenous heat shock cognate protein Hsc 70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Sep;1(3):161-6.
- Hozumi I, Suzuki JS, Kanazawa H, Hara A, Saio M, Inuzuka T, Miyairi S, Naganuma A, Tohyama C. *Neurosci Lett* Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat.. 2008 Jun 13;438(1):54-8. Epub 2008 Apr 18.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.
- Islam MS, ed (January 2011). *Transient Receptor Potential Channels. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 704. Berlin: Springer. pp. 700. ISBN 978-94-007-0264-6
- Jäättelä M, Wissing. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection 1997 D. *J Exp Med*;177(1):231-6.
- James W. Russell,a,b,c,* Alison Berent-Spillson,e Andrea M. Vincent,d Catherine L. Freimann,Kelli A. Sullivan,d and Eva L. Feldmand Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance *Neurobiology of Disease* 30 (2008) 420–429

- Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms *J Nutr Biochem*. 2009 Jun;20(6):399-417.
- Jeub M, Emrich M, Pradier B, Taha O, Gailus-Durner V, Fuchs H, de Angelis MH, Huylebroeck D, Zimmer A, Beck H, Racz I Epub 2011 Aug 20. The transcription factor Smad-interacting protein 1 controls pain sensitivity via modulation of DRG neuron excitability. *Pain*. 2011 Oct;152(10):2384-98.
- Jin-Yeon Lee, Yu-Jin Kim, Tae-Youn Kim, Jae-Young Koh and Yang-Hee Kim 2008 Essential Role for Zinc-Triggered p75NTR Activation in Preconditioning Neuroprotection *The Journal of Neuroscience*28(43):10919 –10927
- Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006;79:425–34.
- Joo-Yong Lee, Junehee Park, Yang-Hee Kim, Dong Hou Kim, Chul Geun Kim, and Jae-Young Koh (2000) Induction by Synaptic Zinc of Heat Shock Protein-70 in Hippocampus after Kainate Seizures, *Experimental Neurology* 161, 433–441
- Jue Cui, Guowei Le *, Ruili Yang, Yonghui Shi Cellular (2009) Lipoic acid attenuates high fat diet-induced chronic oxidative stress and immunosuppression in mice jejunum: A microarray analysis *Immunology* 260, 44–50.
- Kagi JH, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27: 8509-8515,1988.
- Kang, Y. J., *Exp. Biol. Med.* (Maywood NJ U. S.) 2006, 231, 1459.
- Karin M, Eddy RL, Henry WM, Haley LL, Byers MG, Shows TB. Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984a;81:5494–8.
- Kavanagh K, Wylie AT, Chavanne TJ, Jorgensen MJ, Voruganti VS, Comuzzie AG, Kaplan JR, McCall CE, Kritchevsky SB. Aging Does Not Reduce Heat Shock Protein 70 in the Absence of Chronic Insulin Resistance *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Mar 8.
- Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10045–50.

- Kelly, E. J., C. J. Quaife, G. J. Froelick, and R. D. Palmiter, "Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice," *Journal of Nutrition*, vol. 126, no. 7, pp. 1782–1790, 1996.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. Review.
- Klucken, J., Y. Shin, E. Masliah, B. T. Hyman, and P. J. McLean, "Hsp70 reduces α -synuclein aggregation and toxicity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 24, pp. 25497–25502, 2004.
- Kohler LB, Berezin V, Bock E, Penkowa M. 2003. The role of metallothionein II in neuronal differentiation and survival. *Brain Res* 992:128–136.
- Kondo T, Oshima T, Obata K, Sakurai J, Knowles CH, Matsumoto T, Noguchi K, Miwa H. Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception. *Digestion*. 2010;82(3):150-5.
- Kosari S, Badoer E, Nguyen JC, Killcross AS, Jenkins TA. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behav Brain Res*. 2012 Nov 1;235(1):98-103.
- Krause, M., J.C. Rodrigues-Krause (2011) Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment *Medical Hypotheses* 76 286–290
- Krezel A, Hao Q & Maret W (2007) The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 463, 188–200.
- Król E, Krejpcio Z, Chmurzynska A. Folic acid and protein content in maternal diet and postnatal high-fat feeding affect the tissue levels of iron, zinc, and copper in the rat. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Dec;144(1-3):885-93
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34803-9.
- Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*. 2007 Jan-Mar;1(1):53-60. Epub 2007 Jan 24.

- Lee, Y., Takami, K., Kawai, Y., Girgis, S., Hillyard, C.J., MacIntyre, I., Emson, P.C., Tohyama, M., 1985b. Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. *Neuroscience* 15 (4), 1227–1237.
- Li, F., Abatan, O.I., Kim, H., Burnett, D., Larkin, D., Obrosova, I.G., Stevens, M.J., 2006. Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker Diabetic Fatty rats. *Neurobiol. Dis.* 22, 669–676.
- Lietz G, Hesketh, J. A network approach to micronutrient genetics: interactions with lipid metabolism *Current Opinion in Lipidology*: April 2009 - Volume 20 - Issue 2 - p 112-120
- Liping Huang, Mi Yanb,, Catherine P. Kirschke (2010) Over-expression of ZnT7 increases insulin synthesis and secretion in pancreatic β -cells by promoting insulin gene transcription. *Exp. Cell Research* 316 2630 – 2643.
- Lotfi P, Garde K, Chouhan AK, Bengali E, Romero-Ortega MI 2011 Modality-specific axonal regeneration: toward selective regenerative neural interfaces. *Front Neuroeng.* 2011;4:11.
- Luo Y, Xu Y, Bao Q, Ding Z, Zhu C, Huang ZX, Tan X. The molecular mechanism for human metallothionein-3 to protect against the neuronal cytotoxicity of A β (1-42) with Cu ions. *J Biol Inorg Chem.* 2012 Oct 21.
- Madden LA, Sandstrom ME, Lovell RJ, McNaughton L. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids* 2008;34:511–6.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Shang, Y.C., 2007. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 14, 1729–1738.
- Margoshes, M. and B.L. Vallee (1957). "A cadmium protein from equine kidney cortex". *Journal of American Chemical Society* 79 (17): 4813 -M. Vasak, J. Trace, J. Trace *Elem. Med. Biol.* 2005, 19, 13.
- Masters BA, Quaipe CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD (1994) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 14:5844 –5857.
- Matsumori, Y., S. M. Hong, K. Aoyama et al., "Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 25, no. 7, pp. 899–910, 2005.

- McLaughlin B, Buendia MA, Saborido TP, Palubinsky AM, Stankowski JN, Stanwood GD. Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin ligase C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein (CHIP) produces specific behavioral impairments. *PLoS One*. 2012;7(5):/journal.pone.0036340. Epub 2012 May 11.
- McNeilly AD, Williamson R, Balfour DJ, Stewart CA, Sutherland C. A high-fat-diet-induced cognitive deficit in rats that is not prevented by improving insulin sensitivity with metformin. *Diabetologia*. 2012 Nov;55(11):3061-70. Epub 2012 Aug 18.
- Min K.-S., S. Mukai, M. Ohta, S. Onosaka, and K. Tanaka, "Glucocorticoid inhibition of inflammation-induced metallothionein synthesis in mouse liver," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 113, no. 2, pp. 293–298, 1992.
- Mocchegiani E., M. Malavolta, L. Costarelli, R. Giacconi, C. Cipriano, F. Piacenza, S. Tesei, A. Basso, S. Pierpaoli and F. Lattanzio Micronutrients and the immune system Zinc, metallothioneins and immunosenescence. *Proceedings of the Nutrition Society* (2010), 69, 290–299.
- Mocchegiani E, Malavolta M. Zinc-gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing. *Genes Nutr* 2008; 3:61-75.
- Montoliu C, Monfort P, Carrasco J, Palacios O, Capdevila M, Hidalgo J, et al. Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J Neurochem* 2000;75:266–73.
- Morimoto, R. I. and M. Gabriella Santoro, "Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection," *Nature Biotechnology*, vol. 16, no. 9, pp. 833–838, 1998.
- Morley SN, Power JM, Coulson EJ, Bartlett PF Zinc-mediated neuronal death is dependent on Trk activation *Exp Neurol*. 2007 Jun;205(2):360-6. Epub 2007 Feb 22.
- Moser V. C., Phillips P. M., Morgan D. L., Sills R. C. (1998) Carbon disulfide neurotoxicity in rats: VII. Behavioral evaluations using a functional observational battery. *Neurotoxicol* 19, 147–58.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Mol Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5317-27.

- Muchowski, P. J., G. Schaffar, A. Sittler, E.E. Wanker, M. K. Hayer-Hartl, and F.U.Hartl, "Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 14, pp. 7841–7846, 2000.
- Muchowski, P. J. and J. L. Wacker, "Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 1, pp. 11–22, 2005.
- Nakashima AS, Dyck RH Zinc and cortical plasticity. *Brain Res Rev.* 2009 Mar;59(2):347-73..
- Nagai, Y., N. Fujikake, H.A. Popiel, and K. Wada, "Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 188–197, 2010.
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M and Jaattela M 2004 Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization; *J. Exp. Med.* 200 425–435
- Obrosova Irina G., Olga Ilnytsky, Valeriy V. Lyzogubov, Ivan A. Pavlov, Nazar Mashtalir, Jerry L. Nadler and Viktor R. Drel High-Fat Diet–Induced Neuropathy of Pre-Diabetes and Obesity Effects of "Healthy" Diet and Aldose Reductase Inhibition *Diabetes* October 2007 vol. 56 no. 10 2598-2608.
- Oku R, Satoh M, Fujii N, Otaka A, Yajima H, Takagi H. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.* 1987 Feb 17;403(2):350-4.
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6333–7.
- Palmiter, R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 8428.
- Pan E, Zhang XA, Huang Z, Krezel A, Zhao M, Tinberg CE, Lippard SJ, McNamara JO. Vesicular zinc promotes presynaptic and inhibits postsynaptic long-term potentiation of mossy fiber-CA3 synapse. *Neuron.* 2011 Sep 22;71(6):1116-26. Epub 2011 Sep 21.
- Park H S, Cho S G, Kim C K, Hwang H S, Noh K T, Kim M S, Huh S H, Kim M J, Ryoo K, Kim E K, Kang W J, Lee J S, Seo J S, Ko Y G, Kim S and Choi E J 2002 Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1; *Mol. Cell Biol.* 22 7721-7730.

- Pavletich NP, Pabo CO (May 1991). "Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å". *Science* 252 (5007): 809–17.
- Pavlica S, Gaunitz F, Gebhardt R. Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicol In Vitro*. 2009 Jun;23(4):653-9. Epub 2009 Mar 21.
- Peng J, Lu R, Ye F, Deng HW, Li YJ. Induction of alpha-calcitonin gene-related peptide mRNA expression in rat dorsal root ganglia by heat stress involves the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway. *Neuropeptides*. 2001 Oct-Dec;35(5-6):297-302.
- Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism*. 2004 Apr;53(4):454-7.
- Pfaffl MW, Windisch W. Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *Trace Elem Med Biol*. 2003;17(2):97-106.
- Pirkkala, L., P. Nykänen, and L. Sistonen, "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond," *FASEB Journal*, vol. 15, no. 7, pp. 1118–1131, 2001.
- Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, Pagoulatos GN. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1854-60.
- Prat MD. Spectrofluorimetric Method for the Simultaneous Determination of Zinc and Cadmium. *J Fluorescence* (1991) 1:267-267.
- Puttaparthi K, Gitomer WL, Krishnan U, Son M, Rajendran B, Elliott JL. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci* 2002;22:8790–6.
- Qian J, Noebels JL. 2005 Visualization of transmitter release with zinc fluorescence detection at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 566:747–758.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, et al. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994;33: 7250–9.
- Rangaraju S, Madorsky I, Pileggi JG, Kamal A, Notterpek L. Pharmacological induction of the heat shock response improves myelination in a neuropathic model. *Neurobiol Dis*. 2008 Oct;32(1):105-15. Epub 2008 Jul 8.

- Richards, M. P. and R. J. Cousins, "Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 64, no. 4, pp. 1215–1223, 1975.
- Rie Uenishi, Pengfei Gong, Kaoru Suzuki, Shinji Koizumi Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341 (2006) 1072–1077.
- Romero, N., Isart, M. Vasak, J. Inorg. Biochem. 2002, 88, 388.
- Ross GM, Shamovsky IL, Lawrance G, SolcM, Dostaler SM, Jimmo SL, Weaver DF and Riopelle Zinc alters conformation and inhibits biological activities of nerve growth factor and related neurotrophins. *Nat.Med* (1997). 3:872 – 878
- Ruggiero C, Ehrenshaft M, Cleland E, Stadler K. High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Jun;300(6):E1047-58.
- Ryu MS, Lichten LA, Liuzzi JP, Cousins RJ Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency. *J Nutr.* 2008 Nov;138(11):2076-83.
- Samson SL, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;59:257–88.
- Samuel N. Morley, John M. Power, Elizabeth J. Coulson, Perry F. Bartlett Zinc-mediated neuronal death is dependent on Trk activation. *Experimental Neurology* 205 (2007) 360–366.
- Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 1993;14:325–37.
- Sato M & Kondoh M (2002) Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med* 196, 9–22.
- Saydam N, Steiner F, Georgiev O, Schaffner W. Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31879-83. Epub 2003 Jun 12.

- Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Bräuer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D, Natura G. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Apr;1193:60-9.
- Schapira, A. H. V. and C. W. Olanow, “Neuroprotection in parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 291, no. 3, pp. 358–364, 2004.
- Schmitt, E. M. Gehrmann, M. Brunet, G. Multhoff,¹ and C. Garrido Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy *Journal of Leukocyte Biology* Volume 81, January 2007
- Sharma AK, Bharti S, Ojha S, Bhatia J, Kumar N, Ray R, Kumari S, Arya DS. Up-regulation of PPAR γ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, β -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *Br J Nutr.* 2011 Dec;106(11):1713-23.
- Shaw, B. F., J. S. Valentine, *Trends Biochem. Sci.* 2007, 32, 78
- Shen H, MacDonald R, Bruemmer D, Stromberg A, Daugherty A, Li XA, Toborek M, Hennig B Zinc deficiency alters lipid metabolism in LDL receptor deficient mice treated with rosiglitazone. *J Nutr.* 2007 Nov;137(11):2339-45.
- Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9, 459-470.
- Shimshek DR, Mueller M, Wiessner C, Schweizer T, van der Putten PH. The HSP70 molecular chaperone is not beneficial in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *PLoS One.* 2010 Apr 2;5(4):e10014.
- Simon SF, Taylor CG. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 43– 51, 2001
- Simpkins, C., S. Balderman, E. Mensah, *J. Surg. Res.* 1998, 80, 16.
- Sindreu CB, Varoqui H, Erickson JD, Pérez-Clausell J. 2003. Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus. *Cereb Cortex* 13:823– 829.
- Singleton, J.R., Smith, A.G., Russell, J.W., Feldman, E.L., 2003. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52, 2867–2873.

- Smart TG, Xie X, Krishek BJ. 1994. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol* 42:393–441.
- Stephen G. Bell and Bert L. Vallee, The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. *ChemBioChem* 2009, 10, 55 – 62
- Stetler, R AnneGan, Yu Zhang, Wenting Liou, Anthony K Gao, Yanqin Cao, Guodong Chen, Jun, 2010. ‘Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. ‘*Progress in neurobiology* 92, 184-211.
- Stitt, M. S., K. J. Wasserloos, X. Tang, X. Liu, B. R. Pitt, C. M. St. Croix, *Vascul. Pharmacol.* 2006, 44, 149.
- Sumihisa Orita, Seiji Ohtori, Maiko Nagata, Manato Horii, Masaomi Yamashita, Kazuyo Yamauchi, Gen Inoue, Munetaka, Suzuki, Yawara Eguchi, Hiroto Kamoda, Gen Arai, Tetsuhiro Ishikawa, Masayuki Miyagi Nobuyasu Ochiai, Shunji, Kishida, Masashi Takaso, Yasuchika Aoki, Kazuhisa Takahasht (2010) Inhibiting Nerve Growth Factor or Its Receptors Downregulates Calcitonin Gene-Related Peptide Expression in Rat Lumbar Dorsal Root Ganglia Innervating Injured Intervertebral Discs. *Journal of orthopaedic research* December 2010
- Sun, Y., Ouyang, Y.B., Xu, L., Chow, A.M., Anderson, R., Hecker, J.G., Giffard, R.G., 2006. The carboxyl-terminal domain of inducible Hsp70 protects from ischemic injury in vivo and in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 937–950.
- Supowit SC, Rao A, Bowers MC, Zhao H, Fink G, Steficek B, Patel P, Katki KA, Dipette DJ. Calcitonin gene-related peptide protects against hypertension-induced heart and kidney damage. *Hypertension* 45: 109–114, 2005.
- Takeda A. Zinc signaling in the hippocampus and its relation to pathogenesis of depression. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26 (2012) 80– 84
- Tapiero H, Tew KD (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 57:399–411.
- Thirumoorthy, N, A Shyam Sunder, KT Manisenthil Kumar, M Senthil kumar, GNK Ganesh and Malay Chatterjee “A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology” *World Journal of Surgical Oncology* 2011, 9:54.
- Tidwell JL, Houenou LJ, Tytell M. Administration of Hsp70 in vivo inhibits motor and sensory neuron degeneration. *Cell Stress Chaperones.* 2004 Mar;9(1):88-98.

- Tran C. D., R. N. Butler, J. C. Philcox, A. M. Rofe, G. S. Howarth, and P. Coyle, "Regional distribution of metallothionein and zinc in the mouse gut: comparison with metallothionein-null mice," *Biological Trace Element Research*, vol. 63, no. 3, pp. 239–251, 1998.
- Uchida Y. Growth-inhibitory factor, metallothionein-like protein, and neurodegenerative diseases. *Biol Signals* 1994;3:211–5.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y. and Tomonaga M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothioneinlike protein. *Neuron* 7: 337–347
- .- Urban Michael J, Chengyuan Li, Cuijuan Yu, Yuanming Lu, Joanna M Krise, Michelle P McIntosh, Roger A Rajewski, Brian S J Blagg and Rick T Dobrowsky Inhibiting heat-shock protein 90 reverses sensory hypoalgesia in diabetic mice. *ASN Neuro* 2(4):10.1042/An 20100015
- Varea E, Ponsoda X, Molowny A, Danscher G, Lopez-Garcia C. Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 2001 Sep 30;110(1-2):57-63.
- Valdés-Sánchez T, Kirstein M, Pérez-Villalba A, Vega JA, Fariñas I. BDNF is essentially required for the early postnatal survival of nociceptors. *Dev Biol*. 2010 Mar 15;339(2):465-76. Epub 2010 Jan 11.
- Vasil'ev AV, Ivakhnenko VI, Khotimchenko SA, Korzh VV Influence of alimentary microelementosis on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities *Biomed Khim*. 2008 Mar-Apr;54(2):236-43.
- Velazquez R A., Y. Cai, Q Shi, and AA. Larson, The Distribution of Zinc Selenite and Expression of Metallothionein-III mRNA in the Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia of the Rat Suggest a Role for Zinc in Sensory Transmission. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19(6):2288–2300.
- Vincent, A.M., Feldman, E.L., 2004. New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Rev. Endo. Metabol. Dis.* 5, 227–236.
- Vincent AM, Hayes JM, McLean LL, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Feldman EL. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. *Diabetes*. 2009 Oct;58(10):2376-85. Epub 2009 Jul 10.
- Voellmy, R., "On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 9, no. 2, pp. 122–133, 2004.

- Wang, Z.Y., G. Danscher, S.M. Jo, Y.X. Shi, H.D. Schröder, Retrograde tracing of zinc-enriched (ZEN) neuronal somata in rat spinal cord, *Brain Res.* 900 (2001) 80–87.
- Wang X, Wang ZY, Gao HL, Danscher G, Huang L. Localization of ZnT7 and zinc ions in mouse retina--immunohistochemistry and selenium autometallography. *Brain Res Bull.* 2006 Dec 11;71(1-3):91-6. Epub 2006 Aug 31.
- Wang L., Uwe Schumann, Yuefei Liu, Olga Prokopchuk, and Jürgen M. Steinacker Heat shock protein 70 (Hsp70) inhibits oxidative phosphorylation and compensates ATP balance through enhanced glycolytic activity *Journal of Applied Physiology* December 1, 2012 vol. 113 no. 11 1669-1676
- Weiss JH, Hartley DM, Koh J, Choi DW (1993) AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron* 10:43– 49.
- Wimalawansa, S.J., 1997. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit. Rev. Neurobiol.* 11, 167–239.
- Witt, S. N., “Hsp70 molecular chaperons and Parkinson’s disease,” *Biopolymers*, vol. 93, no. 3, pp. 218–228, 2010.
- Wolff NA, Abouhamed M, Verroust PJ, Thevenod F. 2006. Megalin-dependent internalization of cadmium-metallothionein and cytotoxicity in cultured renal proximal tubule cells. *J Pharmacol Exp Ther* 318:782– 791.
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci.* 2004 Jul 14;24(28):6410-5.
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci.* 2004 Jul 14;24(28):6410-5.
- Xiaochun Zhang, Feng Dong, Jun Ren, Meghan J. Driscoll, Bruce Culver 2005, High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology* 191 318– 325.
- Yan N and Shi Y 2005 Mechanisms of apoptosis through structural biology; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 35–56
- Yanagitani, S., H. Miyazaki, Y. Nakahashi, K. Kuno, Y. Ueno, M. Matsushita, Y. Naitoh, S. Taketani, K. Inoue, Ischemia induces metallothionein III expression in neurons of rat brain, *Life Sci.* 64 (1999) 707–715.

- Yao L., D. Zhang and P. Bernd Differential regulation of substance P by all members of the nerve growth factor family of neurotrophins in avian dorsal root ganglia throughout development. (1997) *Neuroscience* Vol. 79, No. 4, pp. 1197–1206
- Yao S, Peng M, Zhu X, Cheng M, Qi X Heat shock protein72 protects hippocampal neurons from apoptosis induced by chronic psychological stress [*Int J Neurosci.* 2007 Nov;117(11):1551-64
- Yasuchika Aoki, Yuzuru Takahashi, Seiji Ohtori, Hideshige Moriya, Kazuhisa Takahashi Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: A review. *Life Sciences* 74 (2004) 2627–2642.
- Ye, B., W. Maret, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 2317.- C. J.
- Yu, L.C., Hansson, P., Lundeborg, T., 1994. The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses in rats. *Brain Res.* 653, 223–230.
- Yu W.H., Lukiw WJ, Bergeron C, Niznik HB, Fraser PE. Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2001;894:37–45.
- Zangger, K., G. Oz, I. M. Armitage, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 7534
- Zhang, Y., E. Aizenman, D. B. DeFranco, P. A. Rosenberg, *Mol. Med.* 2007, 13, 350.
- Zhang L, Chi ZH, Ren H, Rong M, Dahlstrom A, Huang L, Wang ZY. Immunoreactivity of zinc transporter 7 (ZNT7) in mouse dorsal root ganglia. *Brain Res Bull.* 2007 Sep 28;74(4):278-83. Epub 2007 Jul 23.
- Zhang, L., Hoff, A.O., Wimalawansa, S.J., Cote, G.J., Gagel, R.F., Westlund, K.N., 2001. Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity. *Pain* 89, 265–273.
- Zhang Y, Wang YH, Zhang XH, Ge HY, Arendt-Nielsen L, Shao JM, Yue SW. Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats. *Exp Brain Res.* 2008

