

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ

ΕΥΓΕΝΙΑ ΦΩΤΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I \Omega A N N I N A 2022$



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ

ΕΥΓΕΝΙΑ ΦΩΤΟΥ ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I \Omega A N N I N A 2022$

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 923^Α/29-1-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Επιβλέπων: Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Μέλη: Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δημοσθένης Γκιώκας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11 - 03 - 2016

Θέμα: «Ανάπτυξη Τεχνικών και Βιοαντιδραστηρίων Ανίχνευσης της Τροπονίνης για τη Διάγνωση Καρδιαγγειακών Παθήσεων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1055^A/11–03-2022

- 1. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 2. Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 3. Δημοσθένης Γκιώκας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 4. Λάμπρος Μιχάλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 5. Χρήστος Κατσούρας, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 6. Παναγιώτης Κούκλης, Επ. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 7. Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό « ΑΡΙΣΤΑ » στις 11 - 04 - 2022

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας	Η Γραμματέας του Τμήματος	
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια	Ξανθή Τουτουνζόγλου	

Ιωάννινα, 11 Απριλίου 2022

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ 45110 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

 Καθηγητής Βασίλειος ΤΣΙΚΑΡΗΣ

 E-mail:
 <u>btsikari@cc.uoi.gr</u>

 Τηλ.:
 +2651008383

Προς το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

> Θέμα: «Απονομή Διδακτορικού Διπλώματος στην κ. Ευγενία Φώτου»

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Φώτου Ευγενίας, συνήλθε σε δημόσια συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις **11 Απριλίου 2022**, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της Διατριβής με τίτλο : «**Ανάπτυξη Τεχνικών και Βιοαντιδραστηρίων Ανίχνευσης της Τροπονίνης για τη Διάγνωση Καρδιαγγειακών Παθήσεων**». Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η Διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η επιτροπή αποφάσισε να απονείμει στην κ. **Φώτου Ευγενία** το Διδακτορικό Δίπλωμα Χημείας με βαθμό « *ΑΡΙΣΤΑ*» *L ΔΕΥ Δ*

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων Καθηγητής

 Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

3. Δημοσθένης Γκιώκας, Αν. Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

4. Λάμπρος Μιχάλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

5. Χρήστος Κατσούρας, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

6. Παναγιώτης Κούκλης, Επ. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής
 Επιτροπής

Στους γονείς μου Ελευθέριο & Χριστίνα

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων & Πρωτεϊνών του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής έγινε από τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συμβολή του στην έως τώρα ερευνητική μου πορεία. Η συνεργασία μου μαζί του ξεκίνησε στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής μου διατριβής, κατά την οποία αποτέλεσε για εμένα έμπνευση και πρότυπο τόσο για το επιστημονικό του υπόβαθρο όσο και για το ήθος του. Επίσης, τον ευχαριστώ για την παρότρυνσή του να συνεργαστώ με εξαίρετους ερευνητές στο Εργαστήριο Μακρομοριακής Φυσικοχημείας του Εθνικού Κέντρου Επιστημονικών Ερευνών, του Πανεπιστημίου της Λωρραίνης, κατά τη διάρκεια της συμμετοχής μου στο Erasmus+ Trainment. Τέλος, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συνεισφορά του στην υλοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής και την επιστημονική του καθοδήγηση, αλλά και τη συμβολή του στις πολύτιμες συνεργασίες που προέκυψαν με επιστήμονες διαφορετικών πεδίων, γεγονός που με έκανε να δω τον μικρόκοσμο με άλλη οπτική.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Μαρία Λουλούδη για τη συνεργασία της και τις επιστημονικές της συμβουλές καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ και τους συνεργάτες της, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Δελιγιαννάκη και την Δρ. Παναγιώτα Στάθη για τη συνεργασία τους και τη διεξαγωγή πειραμάτων στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας Υλικών & Περιβάλλοντος (Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα τόσο για τη συνεργασία του κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής όσο και για τις γνώσεις που μου προσέφερε ήδη από την αρχή της ερευνητικής πορείας μου ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κούκλη για την άψογη συνεργασία του και τις πολύτιμες επιστημονικές συζητήσεις κατά την εκπόνηση της διατριβής. Η παρουσία του ήταν πάντα ευχάριστη και ο ίδιος πρόθυμος να δώσει απλόχερα τις συμβουλές του και τη βοήθειά του.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Λάμπρο Μιχάλη, τον συνεργάτη του κ. Λάμπρο Λάκκα, αλλά και το προσωπικό του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι., που ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν όταν απαιτήθηκαν οροί ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου για τη διεκπεραίωση ορισμένων πειραμάτων. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον ομότιμο Καθηγητή κ. Δημόκριτο Τσουκάτο για την πολύπλευρη συνεργασία που μου προσέφερε, και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν ώστε να εξετάσουν αυτήν την εργασία και να συμμετάσχουν στην διαδικασία της δημόσιας υποστήριξής της.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες μου στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων & Πρωτεϊνών. Ευχαριστώ τον Βασίλειο Μούση για τις προοπτικές που δημιούργησε και συνεχίζει να δημιουργεί για το εργαστήριό μας και τη συμπαράστασή του κατά τη συγγραφή της διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τον Δημήτρη Κρικοριάν για τις επιστημονικές συζητήσεις. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτωρα Βασιλική Μουλασιώτη που αποτέλεσε στήριγμα όλα αυτά τα χρόνια με τη συνεργασία της και την παρουσία της. Τέλος, ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους Δρ. Κωνσταντίνο Υψηλάντη, Ανδρέα Μάζη και Δήμητρα Κυριάκου για τις ξέγνοιαστες και όμορφες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις φίλες μου Αλεξία Αθανασούλια, Ελένη Παχατουρίδου και Φαίη Γκανιάτσου για την πολύτιμη φιλία τους που αν και ήταν μακριά ήταν πάντα δίπλα μου. Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω τον Χρήστο Μπάρμπα που αποτέλεσε στήριγμα στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω τη συγγραφή αυτής της εργασίας, αλλά περισσότερο γιατί το ήθος και το χιούμορ του με έκαναν να συνεχίσω να πιστεύω πως ο κόσμος παραμένει όμορφος.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου Ελευθέριο & Χριστίνα και τον αδερφό μου Γιώργο, που με στηρίζουν διαρκώς με κάθε τρόπο και με παροτρύνουν να κυνηγάω τους στόχους μου και να ξεπερνάω τα όριά μου. Τους ευχαριστώ που πιστεύουν στις δυνατότητές μου και είναι πάντα δίπλα μου στις όμορφες και στις δύσκολες στιγμές.

Ευγενία Φώτου Ιωάννινα, 21/3/2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩ	ΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1	Καρδιοαγγειακές παθήσεις - Πρόληψη και διάγνωση	3
1.1	Καρδιοαγγειακές παθήσεις και οξέα στεφανιαία σύνδρομα	3
1.2	Παράγοντες που επηρεάζουν τα καρδιοαγγειακά νοσήματα-Μέτρα πρόληψηα	ç4
1.3	Διάγνωση καρδιοαγγειακών παθήσεων	4
1.3.1	Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις	5
1.3.2	Εξετάσεις αίματος και βιοχημικοί δείκτες	5
1.4	Μυοκαρδιακή βλάβη και τροπονίνες	7
1.5	Δοκιμασίες ανίχνευσης τροπονινών	8
1.6	Καθορισμένα όρια ανίχνευσης cutoffs και ευαισθησία	8
1.7	Παράγοντες που επηρεάζουν τη μέτρηση της τροπονίνης	9
1.8	Λειτουργία και σύσταση καρδιακού μυός	14
1.9	Σύσπαση μυοκαρδίου- κύκλος εγκάρσιας γέφυρας	15
1.10	Τροπονίνες: ισομορφές, χαρακτηριστικά, δομή και λειτουργία	17
Βιβλι	ογραφία 1°υ Κεφαλαίου	23
2	Παραγωγή αντισωμάτων και ανοσοχημικοί προσδιορισμοί	29
2.1	Αντιγόνο και αντίσωμα	29
2.2	Ανοσοσφαιρίνη IgY	30
2.3	Πλεονεκτήματα IgY αντισωμάτων όρνιθας	30
2.4	Παραγωγή αντισωμάτων – Ανοσοποιήσεις	32
2.5	Απτένια	33
2.6		
	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC	34
2.7	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας	34 35
2.7 2.7.1	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού	34 35 35
2.7 2.7.1 2.7.2	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY	34 35 35 36
2.7 2.7.1 2.7.2 2.7.3	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY Καθαρισμός IgY	34 35 35 36 36
2.7 2.7.1 2.7.2 2.7.3 2.8	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY Καθαρισμός IgY Αποθήκευση και σταθερότητα των IgY	34 35 35 36 36 38
2.7 2.7.1 2.7.2 2.7.3 2.8 2.9	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY Καθαρισμός IgY Αποθήκευση και σταθερότητα των IgY Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί	34 35 36 36 38 39
2.7 2.7.1 2.7.2 2.7.3 2.8 2.9 2.10	Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY Καθαρισμός IgY Αποθήκευση και σταθερότητα των IgY Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	34 35 36 36 38 39 40

3	Πεπτιδική Σύνθεση & Χημειοεκλεκτικές Αντιδράσεις	.45
3.1	Πρωτεΐνες – Πεπτίδια & Αμινοξέα	.45
3.2	Χημική σύνθεση πεπτιδίων	.46
3.3	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	.47
3.3.1	Στερεό Πολυμερικό Υπόστρωμα	.48
3.3.2	Προστατευτικές ομάδες	.48
3.3.3	Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού-Αντιδραστήρια Σύζευξης	.49
3.3.3.1	. Καρβοδιϊμίδια	.50
3.3.3.2	Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα	.51
3.3.4	Αποκοπή Πεπτιδίου Από τη Ρητίνη- Παραλαβή στερεού πεπτιδίου	.52
3.4	Χημειοεκλεκτικές Αντιδράσεις – Θειοαιθερικός δεσμός	.53
3.5	Τεχνικές Απομόνωσης και Ταυτοποίησης Πεπτιδίων & Πρωτεϊνών	.56
3.5.1	Φασματομετρία μάζας	.56
3.5.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	.56
Βιβλιο	ργραφία 3ου Κεφαλαίου	.58
4	Αντικείμενο και Σκοπός Διατριβής	.61
ΠΕΙΕ	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	.65
ПЕ I Р 5	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι	.65 ικά
ПЕН 5	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια	.65 ικά .67
ΠΕΙΗ 5 5.1	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων	.65 ικά .67 .67
ΠΕΙΕ 5 5.1 5.1.1	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών	.65 ικά .67 .67
ΠΕΙΗ 5 5.1 5.1.1 5.1.2	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι	.65 ικά .67 .67 .67
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι	.65 ικά .67 .67 .67 .67
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών	.65 ικά .67 .67 .67 .67 .68
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3	ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών	.65 ικά .67 .67 .67 .67 .68 .69 .69
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4	 ΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών 	.65 ικά .67 .67 .67 .68 .69 .69 .69
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός του φορέα αντιγονικών επίτοπων Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών 	.65 іка́ .67 .67 .67 .68 .69 .69 .69
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1 5.4.2	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δυσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων, ανοσογονικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση- Στρατηγική Fmoc/tBu Σύνθεση συμπλεγμάτων με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού 	.65 .67 .67 .67 .68 .69 .69 .69 .69 .69
TIEIF 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1 5.4.2 5.4.3	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλυ και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων, ανοσογονικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση- Στρατηγική Fmoc/tBu Σύνθεση συμπλεγμάτων με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού. 	.65 .67 .67 .67 .68 .69 .69 .69 .69 .69 .72
TIEIE 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1 5.4.2 5.4.3 5.4.3 5.4.4	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δυτιδραστήρια και διαλύτες Σύνθεση πεπτιδίων, ανοσογονικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση- Στρατηγική Fmoc/tBu Σύνθεση συμπλεγμάτων με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού Καθαρισμός πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με RP-HPLC 	.65 .67 .67 .67 .67 .67 .69 .69 .69 .69 .72 .72 .72
TIEIE 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1 5.4.2 5.4.3 5.4.3 5.4.4 5.4.5	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δυροφέα αντιγονικών επίτοπων Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Καθαρισμός πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με ESI-MS Σύνθεση του υλικού Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ 	.65 .67 .67 .67 .67 .69 .69 .69 .69 .72 .72 .73 .73
TIEIE 5 5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.2 5.3 5.4 5.4.1 5.4.2 5.4.3 5.4.3 5.4.4 5.4.5 5.4.6	 ΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλι και αντιδραστήρια Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών Δντιδραστήρια και διαλύτες Σύνθεση πεπτιδίων, ανοσογονικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση- Στρατηγική Fmoc/tBu Σύνθεση συμπλεγμάτων με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού Καθαρισμός πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με RP-HPLC Ταυτοποίηση πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με ESI-MS Σύνθεση του υλικού SiO₂@12peptide 	.65 .67 .67 .67 .68 .69 .69 .69 .69 .72 .72 .73 .73 .73

5.4.8	Ταυτοποίηση του SiO ₂ @12peptide με φασματοσκοπία EPR	5
5.4.9	Ταυτοποίηση του SiO ₂ @12peptide με θερμοβαρυμετρία	6
5.4.10	Σύνθεση του TCDA@12peptide	6
5.5	Ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων & δοκιμασιών για την ανίχνευση της cTnI 76	6
5.5.1	Ανοσοποιήσεις σε όρνιθες με τα ανοσογονικά συμπλέγματα	6
5.5.2	Απομόνωση αντισωμάτων72	7
5.5.3	Καθαρισμός IgY ανοσοσφαιρινών	B
5.5.4	Δοκιμασίες έμμεσης ELISA για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων	9
5.5.5	Δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα αντισώματα 82	2
5.5.6	Δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της cTnI χρησιμοποιώντας το 12peptide 82	2
5.5.7	Δοκιμασία ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας το SiO ₂ @12peptide82	2
5.5.8	Δοκιμασία ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας το TCDA@12peptide83	3
Βιβλιο	ργραφία 5°υ Κεφαλαίου84	4
6	Αποτελέσματα	7
6.1	Μελέτες ομολογίας	7
6.2	Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης89	9
6.3	Σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων και συμπλεγμάτων92	2
6.3.1	Πεπτιδικός φορέας CPSOC(3,9-Acm)92	2
6.3.2	Πεπτίδιο IAc-Ahx-cTnI ¹⁹⁻³¹	3
6.3.3	Πεπτίδιο IAc-cTnI ⁶⁶⁻⁷⁷ 95	5
6.3.4	Σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI ⁶⁶⁻⁷⁷)	6
6.3.5	Πεπτίδιο IAc-cTnI ¹¹⁰⁻¹²² 98	B
6.3.6	Σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI ¹¹⁰⁻¹²²)	9
6.3.7	Πεπτίδιο IAc-12peptide	1
6.3.8	Σύνθεση του υλικού TCDA@12peptide102	2
6.4	Σύνθεση του υλικού SiO ₂ @12peptide	3
6.5	Σύνθεση του υλικού Seph@Ahx-cTnI ¹⁹⁻³¹	5
6.6	Έλεγχος Εξειδίκευσης Αντισωμάτων105	5
6.6.1	Ανοσοποιήσεις έναντι ενός επίτοπου	5
6.6.1.1	Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων	5
6.6.1.2	Σύγκριση των πρωτόκολλων απομόνωσης IgY αντισωμάτων: PEG vs NaCl 106	6
6.6.1.3	Σύγκριση εξειδίκευσης crude και καθαρισμένων αντισωμάτων με διαπίδυση έναντ	l
	του SOC-cTnI ¹⁹⁻³¹ και του SOC-cTnI ¹¹⁸⁻¹³¹	7
6.6.1.4	Σύγκριση των συνθηκών αποθήκευσης/συντήρησης των αντισωμάτων108	3

6.6.1.5 Επίδραση θερμοκρασίας στις δοκιμασίες ELISA109
6.6.1.6 Έλεγχος παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων μετά τις ανοσοποιήσεις110
6.6.1.7 Έλεγχος δραστικότητας αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης111
6.6.1.8 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων στη Seph@Ahx-cTnI ¹⁹⁻³¹ 112
6.6.2 Ανοσοποιήσεις με το μίγμα των τεσσάρων επίτοπων της cTnI113
6.6.2.1 Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων113
6.6.2.2 Έλεγχος της δραστικότητας των παραχθέντων αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου
αποθήκευσής τους115
6.6.2.3 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία
συγγένειας115
6.6.2.4 Σύγκριση αντισωμάτων καθαρισμένων με διαπίδυση και χρωματογραφία
συγγένειας117
6.6.2.5 Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα117
6.7 Ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης της cTnI118
6.7.1 Ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες ανίχνευσης της cTnI
6.7.1.1 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων για την cTnI118
6.7.1.2 Σύγκριση αντισωμάτων καθαρισμένων με διαπίδυση και χρωματογραφία
συγγένειας
6.7.1.3 Ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα IgY έναντι του μίγματος επίτοπων
χρησιμοποιώντας το 12peptide120
6.7.1.4 Ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα IgY έναντι του μίγματος επίτοπων
χρησιμοποιώντας ως αντισώματα σύλληψης IgG anti-cTnI121
6.7.2 Μη ενζυμικές τεχνικές ανίχνευσης της τροπονίνης-Εφαρμογή έξυπνων υλικών122
6.7.2.1 Χρήση των νανοσωματιδίων SiO ₂ @12peptide122
6.7.2.2 Χρήση του υλικού TCDA@12peptide123
7 Συζήτηση-Συμπεράσματα125
ПЕРІЛНΨН
ABSTRACT137
ПАРАРТНМА141
Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις Σε Συνέδρια & Περιοδικά

Θεώρητικο Μέρος

1 Καρδιοαγγειακές παθήσεις - Πρόληψη και διάγνωση

1.1 Καρδιοαγγειακές παθήσεις και οξέα στεφανιαία σύνδρομα

Οι καρδιοαγγειακές παθήσεις (CardioVascular Diseases) περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, που αφορούν την καρδιά ή τα αιμοφόρα αγγεία και είναι η κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας παγκοσμίως με εξαίρεση την Αφρική. Η στεφανιαία νόσος και το εγκεφαλικό επεισόδιο αντιπροσωπεύουν το 75% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα στις γυναίκες και το 80% στους άνδρες.¹ Στην Ελλάδα αποτελούν περίπου το 25% του συνόλου της θνησιμότητας.²

Η αθηροσκλήρωση είναι ο πρόδρομος για πολλές καρδιοαγγειακές παθήσεις, ανάλογα με το ποιες αρτηρίες επηρεάζονται.³ Στα καρδιοαγγειακά νοσήματα που οφείλονται στην αθηροσκλήρωση συγκαταλέγονται η στεφανιαία νόσος, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και η περιφερική αρτηριακή νόσος.¹

Η δημιουργία των αθηρωματικών πλακών μπορεί να ξεκινήσει από την παιδική ηλικία και επιδεινώνεται μετά την ενηλικίωση. Η πλάκα εναποτίθεται στο εσωτερικό των τοιχωμάτων των αρτηριών και αποτελείται από λίπος, χοληστερόλη και τους εστέρες της, ασβέστιο και άλλες ουσίες που βρίσκονται στο αίμα.^{3,4} Η σταδιακή ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών, στις στεφανιαίες αρτηρίες, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση (στένωση αρτηρίας) ή την πλήρη διακοπή (απόφραξη αρτηρίας) της ροής του αίματος και του οξυγόνου προς το μυοκάρδιο και τελικά την εμφάνιση οξέων καρδιακών επεισοδίων,^{3,5}



Εικόνα 1.1. Βλάβη στο μυοκάρδιο: Στένωση/απόφραξη αρτηρίας εξαιτίας του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας.

Η στεφανιαία νόσος ταξινομείται α) στα οξέα στεφανιαία ή ισχαιμικά σύνδρομα, τα οποία περιλαμβάνουν την ασταθή στηθάγχη και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου^{1,3} και β) στη χρόνια στεφανιαία νόσο,³ η οποία είτε είναι συμπτωματική και παρουσιάζεται στηθάγχη, είτε ασυμπτωματική. Η στεφανιαία νόσος εξασθενεί το μυοκάρδιο προκαλώντας καρδιακή ανεπάρκεια, κατά την οποία η καρδιά αδυνατεί να αποστείλει αίμα στα διάφορα μέρη του σώματος⁶ και αρρυθμίες, δηλαδή μη φυσιολογικό καρδιακό ρυθμό.⁷

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τα καρδιοαγγειακά νοσήματα-Μέτρα πρόληψης

Τα καρδιοαγγειακά νοσήματα ανήκουν στις «ασθένειες του τρόπου ζωής», που αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου και σχετίζονται με τις επιλογές του τρόπου ζωής ενός ατόμου. Για αυτές τις ασθένειες υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι διακρίνονται σε μεταβλητούς (χρήση καπνού, σωματική αδράνεια, υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, ανθυγιεινή διατροφή, παχυσαρκία, αυξημένη χοληστερόλη αίματος και αρτηριακή πίεση, ατμοσφαιρική ρύπανση) και αμετάβλητους (ηλικία, φύλο, γενετική προδιάθεση και ιστορικό καρδιαγγειακών παθήσεων και ψυχοκοινωνικοί παράγοντες).¹

Μελετώντας τους μεταβλητούς παράγοντες κινδύνου, εκτιμάται ότι το 90% των καρδιαγγειακών νοσημάτων μπορεί να προληφθεί,⁸ ακολουθώντας έναν υγιεινότερο τρόπο ζωής. Στην πρόληψη περιλαμβάνονται η αποφυγή του καπνίσματος, ο έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης,^{1,5} της υπερχοληστερολαιμίας και του διαβήτη,⁹ η τακτική σωματική άσκηση, η υγιεινή διατροφή και η διατήρηση κανονικού βάρους σώματος,^{1,5,10} η μείωση κατανάλωσης αλκοόλ, αλατιού, ζάχαρης και τροφών υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λίπη,¹¹ ο έλεγχος του στρες και της κατάθλιψης.^{1,5,12}

Παρά τη συνεχή βελτίωση στην πρόληψη των καρδιοαγγειακών παθήσεων, η αθηροσκλήρωση σε ασυμπτωματικό πληθυσμό, ήταν μειωμένης προσοχής και η διάγνωση και πρόληψη εκδήλωσης καρδιακών παθήσεων καθίσταται δύσκολη.¹³ Από τους ασυμπτωματικούς ενήλικες, οι γυναίκες είναι περισσότερες συγκριτικά με τους άνδρες.¹⁴ Έτσι οι επιστήμονες εξετάζουν πλέον την εύρεση βιοχημικών δεικτών εξειδικευμένων μόνο για τις γυναίκες. Ωστόσο, στους ασυμπτωματικούς ενήλικες μπορούν να γίνουν δύο προληπτικά τεστ ώστε να αξιολογηθεί το ποσοστό αθηρωμάτωσης: i) ασβέστιο στεφανιαίων αρτηριών (υπολογίζεται με αξονική τομογραφία), ii) πάχος του αγγειακού τοιχώματος των καρωτίδων (εκτιμάται με υπερηχογράφημα καρωτίδων).¹⁵

1.3 Διάγνωση καρδιοαγγειακών παθήσεων

Η απόφραξη ενός στεφανιαίου αγγείου δημιουργεί ισχαιμία προκαλώντας ταχύτατα νεκρωτικές βλάβες στον καρδιακό ιστό, γεγονός που συνεπάγεται την άμεση απειλή της ζωής του ασθενούς. Έτσι, στην αντιμετώπιση των καρδιοαγγειακών παθήσεων η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση είναι ζωτικής σημασίας,¹ για να εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία.

1.3.1 Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις

Οι κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις διακρίνουν δυσλειτουργίες του μυοκαρδίου που σχετίζονται με τα καρδιοαγγειακά νοσήματα και σε αυτές περιλαμβάνονται οι εξής:

α) Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ): καταγράφει την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς και χρησιμεύει στην ανίχνευση i) διαταραχών του καρδιακού ρυθμού και ii) της ανεπαρκούς παροχής αίματος στην καρδιά.^{16–18}

β) Δοκιμασία κοπώσεως: διερευνά την ύπαρξη δυσαναλογίας μεταξύ απαιτούμενου και προσφερόμενου Ο₂ στο μυοκάρδιο.¹⁶ Υποδεικνύει μη φυσιολογικές αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό ή την αρτηριακή πίεση, δυσκολία στην αναπνοή ή πόνο στο στήθος.¹⁷

γ) Ακτινογραφία θώρακος: απεικονίζει το μέγεθος της καρδιοαγγειακής σκιάς, την ενεργητική (αρτηριακή) και παθητική αιμάτωση του πνεύμονα, την εναπόθεση ασβεστίου στην περιοχή των βαλβίδων της καρδιάς και του περικαρδίου και αξιολογεί την αορτή.^{16,18}

δ) Υπερηχοκαρδιογραφία: μη επεμβατική μέθοδος που καταγράφει την κίνηση των καρδιακών τοιχωμάτων και των βαλβίδων. Δίνει πληθώρα πληροφοριών όπως το μέγεθος της καρδιάς, των καρδιακών κοιλοτήτων και των μεγάλων αγγείων, το πάχος των τοιχωμάτων της καρδιάς και η κινητικότητά της, η λειτουργία των βαλβίδων, κ.α.¹⁶⁻¹⁸

ε) Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων: απεικονίζει τη μυοκαρδιακή αιμάτωση και εκτιμά τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας.^{16,19}

στ) Τομογραφία μαγνητικού συντονισμού: η πλέον ακριβής και αναπαραγώγιμη, μη επεμβατική, τεχνική για τη μορφολογική απεικόνιση της καρδιάς. Αξιολογεί τη λειτουργία του μυοκαρδίου, την αιμάτωση, τη βιωσιμότητα των ιστών, τη στεφανιαία ανατομία και τη ροή του αίματος.^{16–18}

1.3.2 Εξετάσεις αίματος και βιοχημικοί δείκτες

Οι εξετάσεις αίματος παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και αντιμετώπιση των καρδιοαγγειακών παθήσεων, καθώς βοηθούν στην κατανόηση γενικών προβλημάτων υγείας και κινδύνου ενός ατόμου. Στις αιματολογικές εξετάσεις περιλαμβάνονται και εξειδικευμένες εξετάσεις βιοχημικών δεικτών. Ως βιοδείκτης ορίζεται κάθε μετρήσιμη ένδειξη μιας βιολογικής κατάστασης (φυσιολογικής ή παθολογικής), ή μίας θεραπευτικής απόκρισης.^{20,21} Στους βιοδείκτες για τα καρδιοαγγειακά νοσήματα ανήκουν:

α) Τροπονίνη (cardiac Troponin): η προτιμότερη δοκιμασία για τον προσδιορισμό της βλάβης του μυοκαρδίου σε σχέση με άλλες εξετάσεις, εξαιτίας της μεγαλύτερης ευαισθησίας και ειδικότητας για το μυοκάρδιο.^{22–27} Οι καρδιακές ισομορφές Ι και Τ του

συμπλέγματος της τροπονίνης ανιχνεύουν μικρές βλάβες σε ασθενή υψηλού κινδύνου με ευάλωτη αθηρωματική πλάκα. Οι τροπονίνες απελευθερώνονται 3-6 ώρες μετά τον τραυματισμό και φτάνουν το μέγιστο σε 12-24 ώρες.^{27–30} Σε άτομα με ΟΣΣ, η μυοκαρδιακή νέκρωση μπορεί να ανιχνευτεί μέσω των τροπονινών ακόμη και σε περιπτώσεις που η CK-MB είναι φυσιολογική ή ελαφρώς αυξημένη.^{31,32}

β) Μυοκαρδιακή ισομορφή της κινάσης της κρεατίνης (Creatinine Kinase-MB): δείκτης βλάβης μυοκαρδιακού ή σκελετικού ιστού. Χρησιμοποιείται στη διάγνωση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (OEM) και αυξάνεται σε 4-8 ώρες, ενώ επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα σε 2-3 ημέρες.³³ Καθιστά αδύνατη την ανίχνευση μικρών επαναλαμβανόμενων εμφραγμάτων γιατί δεν είναι εξειδικευμένη για το μυοκάρδιο.²²

γ) Μυοσφαιρίνη: ο πρώτος βιοδείκτης που αυξάνεται στο αίμα ως αποτέλεσμα μυοκαρδιακής βλάβης.³⁴ Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, ενώ η απουσία της στο αίμα 4-8 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων αποκλείει την περίπτωση νέκρωσης μυοκαρδιακών ιστών.^{35,36} Όμως, δεν είναι εξειδικευμένη για τον καρδιακό μυ, καθώς έχει ίδια ομολογία με αυτή του σκελετικού μυός.³⁴

δ) Αντιδρώσα πρωτεΐνη C (C Reactive Protein): δείκτης φλεγμονώδους αθηρωμάτωσης.³⁷ Αυξημένα επίπεδα CRP σημαίνουν αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας και ρήξης αθηρωματικής πλάκας,³⁸ εμφάνισης OEM,³⁹ υπέρτασης και καρδιοαγγειακής νόσου.⁴⁰

ε) Νατριουρητικό πεπτίδιο του εγκεφάλου (**B**rain Natriuretic **P**eptide) και NT-proBNP (Nterminal prohormone BNP): Το BNP είναι εξειδικευμένος βιοδείκτης για την καρδιακή ανεπάρκεια,¹⁸ ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σχετίζονται με πάθηση της στεφανιαίας αρτηρίας και ισχαιμία του μυοκαρδίου.^{41,42} Αυξημένες συγκεντρώσεις του NTproBNP συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιοαγγειακή νόσο και θνησιμότητα,⁴³ ενώ είναι καλύτερος βιοδείκτης συγκριτικά με την CRP.⁴⁴

στ) Ισχαιμικά-τροποποιημένη αλβουμίνη (Ischemia Modified Albumin): δείκτης ισχαιμικής μυοκαρδιακής βλάβης,⁴⁵ που μετρά την ισχαιμία στα αιμοφόρα αγγεία. Το ACB (albumin cobalt-binding) τεστ έχει χαμηλή εξειδίκευση αλλά υψηλή ευαισθησία.⁴⁶ Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ισχαιμίας σε συνδυασμό με το ΗΚΓ και τις τροπονίνες, με σκοπό τον αποκλεισμό ΟΣΣ σε άτομα με θωρακικό άλγος.^{45,47}

ζ) cMyB-Protein C (cardiac Myosin-Binding Protein C): εκφράζεται στον καρδιακό μυ⁴⁸ και διακρίνεται από τις ισομορφές των σκελετικών μυών. Η αυξημένη συγκέντρωση δείχνει χρόνια βλάβη του μυοκαρδίου.⁴⁹ Έχει διαγνωστική και προγνωστική χρησιμότητα συμπληρωματικά/εναλλακτικά στον προσδιορισμό των καρδιακών τροπονινών Ι και T.⁵⁰

1.4 Μυοκαρδιακή βλάβη και τροπονίνες

Ως δείκτης νέκρωσης του μυοκαρδίου αρχικά προτάθηκε η τροπονίνη cTnT,⁵¹ ενώ την ίδια περίπου περίοδο περιεγράφηκε η πρώτη ανοσοδοκιμασία της cTnI.⁵² Σήμερα, τόσο η cTnT όσο και η cTnI χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη διάγνωση οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων και θεωρούνται διαγνωστικά πρότυπα^{42,53,54} επιβεβαιώνοντας τη μυοκαρδιακή βλάβη. Όμως αυξημένα επίπεδα τροπονινών στο αίμα, μπορεί να οφείλονται και σε άλλες ασθένειες όπως: πνευμονική αρτηριακή εμβολή, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιομυοπάθειες, μυοκαρδίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια, αρρυθμίες, καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από αντικαρκινική θεραπεία, ακόμη και σε έντονη άσκηση σε υγιή άτομα.⁵⁵

Η πλειονότητα του συμπλόκου της τροπονίνης βρίσκεται στο σαρκομερές εντός των καρδιομυοκυττάρων,⁵⁶ ενώ ένα πολύ μικρό κλάσμα cTnT (6-8%) και cTnI (3-6%) παραμένει ελεύθερο στο κυτοσόλιο^{57,58} και μιμείται την κινητική εμφάνισης άλλων κυτοσολικών πρωτεϊνών, όπως η κρεατινική κινάση (CK). Κατά τη διάρκεια του εμφράγματος η τροπονίνη απελευθερώνεται από το κυτοσόλιο των μυοκυττάρων, ενώ τα επίπεδά της παραμένουν αυξημένα στο αίμα, λόγω της αργής απελευθέρωσης και αποικοδόμησής της.^{57,59} Το ποσοστό της απελευθερωμένης τροπονίνης στο αίμα, είναι μεγαλύτερο από αυτό της CK-MB^{60,61} και τα αυξημένα επίπεδά της επιτρέπουν μεγαλύτερη κλινική ευαισθησία.⁶² Οι τροπονίνες που απελευθερώνονται από το νεκρωτικό μυοκάρδιο σε απόκριση της ισχαιμίας,⁵² υφίστανται τόσο ως άθικτα μόρια (ελεύθερα ή σύμπλοκα) όσο και ως αποικοδομημένες πρωτεΐνες (Εικόνα 1.2) με πρωτεόλυση της cTnI και της cTnT από πρωτεάσες που υπάρχουν τόσο στο μυοκάρδιο όσο και στο αίμα.^{52,63,64}



Εικόνα 1.2. Κυρίαρχες και δευτερεύουσες μορφές της καρδιακής τροπονίνης που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά από βλάβη στο μυοκάρδιο.

Η τιμή της τροπονίνης και η μεταβολή της με την πάροδο του χρόνου, χρησιμεύουν στη διάγνωση ή τον αποκλεισμό εμφράγματος του μυοκαρδίου. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή κοινότητα καρδιολογίας προτείνεται η τροπονίνη να αξιολογείται δύο φορές, μία κατά τη διάρκεια της παρουσίασης των συμπτωμάτων και άλλη μία μέσα σε 3 ώρες,^{65,66} ενώ σύμφωνα και με την αμερικανική ένωση καρδιάς η δεύτερη μέτρηση πρέπει να γίνεται μέσα σε 3-6 ώρες.⁶⁷ Τα επίπεδα των τροπονινών επανέρχονται σε φυσιολογικές τιμές 1-2 εβδομάδες μετά το επεισόδιο.^{45,47}

Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, η τιμή της cTn έχει ένα τυπικό μοτίβο ανύψωσης και πτώσης. Αυτή η χαρακτηριστική αλλαγή στην τιμή της, βοηθάει στον αποκλεισμό μη ισχαιμικών αιτιών. Η τροπονίνη παραμένει αυξημένη 7-14 ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων.⁵⁶ Εάν οι πρώτες μετρήσεις δεν παρουσιάζουν αυξημένη cTn και η κλινική υποψία είναι υψηλή, πρέπει να υπάρχει ένα επιπλέον δείγμα που λαμβάνεται στις 12-24 ώρες. Μια δοκιμή τροπονίνης υψηλής ευαισθησίας είναι σε θέση να αποκλείσει μια καρδιακή προσβολή εφόσον το ΗΚΓ είναι φυσιολογικό.^{68,69}

Η αξιολόγηση της τροπονίνης μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη και στη διάγνωση του επανεμφράγματος. Εάν υπάρχει υποψία υποτροπιάζουσας μυοκαρδιακής νέκρωσης, απαιτούνται τόσο οι άμεσες (αρχή συμπτωμάτων) όσο και οι δεύτερες μετρήσεις (3-6 ώρες μετά). Μια αύξηση κατά 20% στη δεύτερη μέτρηση, διαγιγνώσκει υποτροπιάζον έμφραγμα του μυοκαρδίου.⁵⁶

1.5 Δοκιμασίες ανίχνευσης τροπονινών

Στις κλινικές αναλύσεις, η πιο διαδεδομένη δοκιμασία για την ανίχνευση των καρδιακών τροπονινών βασίζεται στην τεχνική της E.L.I.S.A. τύπου Sandwich. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται δύο εξειδικευμένα αντισώματα.^{70–72} Η παραγωγή αντισωμάτων έπειτα από ανοσοποίηση καθώς και οι ανοσοενζυμικές τεχνικές περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.

1.6 Καθορισμένα όρια ανίχνευσης cutoffs και ευαισθησία

Σύμφωνα με τον ορισμό του OEM,⁴² η αύξηση και πτώση των τιμών των cTns με τουλάχιστον μία τιμή πάνω από το cutoff και ευρήματα από τουλάχιστον μία κλινική εξέταση ή/και τα συμπτώματα ισχαιμίας, πιστοποιεί τη μυοκαρδιακή βλάβη.⁴³

Η τιμή του ορίου ανίχνευσης cutoff ορίζεται ως το 99° εκατοστημόριο του ανώτερου ορίου αναφοράς (Upper Reference Limit) υγιούς πληθυσμού και απαιτεί δοκιμασίες με

συντελεστή διακύμανσης (Coefficient of Variation) <10% σε αυτή τη συγκέντρωση.⁵⁶ 24 εμπορικές δοκιμασίες τροπονίνης εξετάστηκαν για την ακρίβειά τους και αποδείχτηκε ότι οι περισσότερες δεν διέθεταν αυτό το επίπεδο ακρίβειας και χαρακτηρίστηκαν ως «μη αποδεκτές» (CV>20%), ενώ οι αποδεκτές ήταν λίγες (~1/3).^{56,73} Για την cTnI κανένας προσδιορισμός δεν πέτυχε 10% CV σε ποσοστό μικρότερο από το 99° εκατοστημόριο. Αυτή η απαίτηση προκάλεσε την ανάπτυξη υψηλότερης ευαισθησίας δοκιμασιών.⁵⁶

Οι επόμενες γενιές των εμπορικών προσδιορισμών είχαν αναλυτική ευαισθησία 100 φορές υψηλότερη (1 έναντι 100 ng/L) από εκείνη των αρχικών πειραματικών και εμπορικών προσδιορισμών.⁷³ Οι σύγχρονες γενιές εμφανίζουν ακόμα υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία (high, ultra sensitivity) και αποτελούν τροποποίηση των προηγούμενων αναπτυγμένων μεθόδων. Από το 1995 έως το 2007, το όριο ανίχνευσης της τροπονίνης μειώθηκε από 0,5 ng/mL σε 0,006 ng/mL (TnIUltra), μια εκατονταπλάσια βελτίωση στην αναλυτική ευαισθησία.⁵⁵ Αξιοσημείωτο είναι ότι οι δοκιμασίες υψηλής ευαισθησίας ανιχνεύουν χαμηλά επίπεδα τροπονίνης ακόμη και στο πλάσμα υγιών ατόμων,⁵⁵ γεγονός που δημιουργεί σύγχυση στην κλινική ερμηνεία των αποτελεσμάτων και καθιστά επιτακτική την εκ νέου οριοθέτηση της συγκέντρωσης για ένα θετικό αποτέλεσμα.

Με βάση τον κανόνα του 99^{ου} εκατοστημορίου, τα όρια απόφασης για την τροπονίνη σε προσδιορισμούς υψηλής ευαισθησίας ορίστηκαν σε 0,01 ng/ml,⁵⁵ επιτρέποντας την ταυτοποίηση ασθενών με ΟΣΣ έγκαιρα και την εφαρμογή κατάλληλης θεραπείας. Ωστόσο, ενώ βελτιώνεται η κλινική ευαισθησία για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η αυξημένη αναλυτική ευαισθησία συνδέεται με μειωμένη ειδικότητα, παρουσιάζοντας έτσι μια πρόσθετη διαγνωστική πρόκληση για τους κλινικούς ιατρούς.

1.7 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μέτρηση της τροπονίνης

Παρά τις συνεχείς εξελίξεις στις δοκιμασίες τροπονίνης, υπάρχουν σημαντικά περιθώρια βελτίωσης ιδιαίτερα στην τυποποίηση των ποσοτικών προσδιορισμών και της εξάλειψης των παρεμβολών των διαφόρων παραγόντων.⁷⁴ Οι μετρήσεις της cTnI και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επηρεάζονται από πολλαπλούς παράγοντες.⁷⁵

Προαναλυτικοί παράγοντες:

1. Τύπος σωλήνα: Οι διαφορές που παρουσιάζουν οι σωλήνες συλλογής δειγμάτων οδηγούν σε ασυνεπή αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι σωλήνες που περιέχουν ηπαρίνη ή EDTA, ευθύνονται για ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα καθώς η ηπαρίνη δεσμεύει τη cTn και

καλύπτει ορισμένους επιτόπους,^{56,64} ενώ το EDTA δεσμεύει ασβέστιο και επηρεάζει το σχηματισμό συμπλόκου cTn.⁶⁴ Επίσης οι σωλήνες ταχέος ορού (Rapid serum tubes, RSTs) σε αναλύσεις ρουτίνας, έχουν δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.⁷⁵ Επί του παρόντος, δεν υπάρχει ιδανικός τύπος σωλήνα.

2. Σταθερότητα δείγματος: Η σταθερότητα της τροπονίνης θα πρέπει να αξιολογείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στην οποία γίνεται η ανάλυση, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις η cTn αποδείχτηκε ασταθής δίνοντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επίσης η βραχυπρόθεσμη σταθερότητα των αναλυτών σε θερμοκρασία ≤ 4 °C είναι καλύτερη όταν διαχωρίζονται από τα κύτταρα του αίματος.⁷⁵

3. Παρεμβολές από βιολογικά συστατικά: Ανάλογα με τις συγκεντρώσεις διάφορων βιολογικών συστατικών και της αναλυόμενης τροπονίνης, μπορούν να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, όπως στην περίπτωση της αιμόλυσης (από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη) ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, όπως στην περίπτωση του ίκτερου (υψηλές συγκεντρώσεις χολερυθρίνης, > 10 mg/dL), της λιπαιμίας (τα πλεονάζοντα λιπίδια αποτρέπουν την κατάλληλη αναρρόφηση, οδηγώντας σε ανεπαρκή όγκο δείγματος. Επίσης προκαλούν μετατόπιση του όγκου με την κατοχή μεγαλύτερου ποσοστού όγκου πλάσματος), της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης, της φωσφορυλίωσης και της σύμπλεξης με άλλα μόρια π.χ. TnC.⁶⁴

4. Παραγγελία εργαστηριακών δοκιμασιών: Η υπερβολική παραγγελία εξετάσεων οδηγεί σε υπερβάλλον κόστος και περιττή επεξεργασία, δηλαδή ενδεχόμενες καθυστερήσεις στην κατάλληλη διάγνωση και διαχείριση του ασθενούς, οδηγώντας σε ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα.⁷⁵ Επίσης τα διαστήματα ανάμεσα στις δοκιμασίες θα πρέπει να είναι σταθερά καθώς τα μεταβλητά διαστήματα περιπλέκουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των σειριακών δοκιμασιών.

Αναλυτικοί παράγοντες:

1. Αντισώματα παρεμβολής: τα ετερόφιλα αντισώματα (με υψηλή συγγένεια κατά των ανθρώπινων αντισωμάτων) και τα αυτο-αντισώματα έναντι της τροπονίνης, μπορούν να δημιουργήσουν ψευδή θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Τα ετερόφιλα αντισώματα (ανθρώπινα αντι-ζωικά αντισώματα (HAAA))^{64,74} παρουσιάζουν αντιδραστικότητα με τα τμήματα Fc των αντισωμάτων άλλων ζωικών ειδών (τα οποία είναι συχνά η πηγή των αντισωμάτων της ανάλυσης). Τέτοια αντισώματα δημιουργούν συχνότερα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα ζεσμεύουν ορισμένους επιτόπους της cTnI δίνοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση αληθώς θετικού, ψευδώς θετικού και ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος λόγω των αντισωμάτων παρεμβολής.

2. Ενδογενείς μορφές των συστατικών ανάλυσης: ειδικά αντιδραστήρια προσδιορισμού όπως η βιοτίνη (θεραπευτική χορήγησή της) καθώς και ένζυμα που παράγουν σήματα όπως η αλκαλική φωσφατάση (καταλύει την παραγωγή σήματος) και το ινώδες, επηρεάζουν την ακριβή μέτρηση της τροπονίνης,⁷⁵ δίνοντας ψευδώς αυξημένα αποτελέσματα.⁷⁶

3. Δυσλειτουργία του οργάνου: Η μη ορθή λειτουργία του οργάνου οδηγεί σε μη αναπαραγώγιμα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που αρχικά είναι σημαντικά αυξημένα πάνω από το ανώτερο όριο αναφοράς, αλλά σε επανάληψη έχουν μη ανιχνεύσιμες ή σημαντικά μειωμένες συγκεντρώσεις cTn.⁷⁶

4. Διαφορετική βαθμονόμηση: Η μεταβλητότητα των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων από παρτίδα σε παρτίδα και η επαναβαθμονόμηση, μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές των αποτελεσμάτων δίνοντας μη αναπαραγώγιμα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.⁷⁶

5. *Εργαστηριακό σφάλμα*: λάθος χειρισμός των οργάνων και των αντιδραστηρίων από το εργαστηριακό προσωπικό, οδηγεί σε ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα.⁷⁵

6. Έλλειψη εναρμόνισης: Η μεγάλη ποικιλία προσδιορισμών και αντισωμάτων που υπάρχουν για την ανίχνευση της cTnI, δηλαδή η ανεπαρκής τυποποίηση και εναρμόνιση, καθιστά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.⁷⁶ Τα διαφορετικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις διαφορετικές εμπορικές δοκιμασίες, στοχεύουν διαφορετικούς επίτοπους και αυτό μεταφράζεται σε σημαντική αναλυτική μεταβλητότητα,⁷⁴ δίνοντας διαφορετικά αποτελέσματα για το ίδιο αναλυόμενο δείγμα.⁷⁵

7. Διαφορετική αναλυτική ευαισθησία: Η αναλυτική ευαισθησία είναι κρίσιμος παράγοντας για τη μέτρηση της cTnI, όταν η τιμή προσεγγίζει τα όρια αναφοράς. Η διαφορά στην ευαισθησία οδήγησε στη μελέτη του ποσοστού υγιών ατόμων με ανιχνεύσιμη cTn. Ο ορισμός της «υψηλής ευαισθησίας» για τον προσδιορισμό της τροπονίνης, που ισχύει επί του παρόντος, περιλαμβάνει την ανίχνευση της cTn σε ποσοστό ≥ 50% του πληθυσμού.⁷⁵

Μετααναλυτικοί Παράγοντες:

1. Διαγνωστικό όριο εμφράγματος του μυοκαρδίου: Το 99° εκατοστημόριο του ανώτερου ορίου αναφοράς ενός υγιούς πληθυσμού, θεωρείται χρυσό πρότυπο. Ωστόσο, υπάρχουν παράγοντες που μεταβάλλουν το 99° URL του υγιούς πληθυσμού και παράγουν διαφορετικά αποτελέσματα, όπως το μέγεθος του στατιστικού δείγματος και οι διαφορετικές στατιστικές μέθοδοι. Επίσης υπάρχει σημαντική διακυτταρική μεταβλητότητα στις συγκεντρώσεις cTn, η οποία σχετίζεται με ποικίλες δημογραφικές και κλινικές μεταβλητές.⁷⁵

2. Ανίχνευση αλλαγής (δηλ. του Delta): Δυστυχώς, η χρήση του 99^{ου} εκατοστημορίου για διαγνωστική ερμηνεία δεν αρκεί. Η σύγκριση μίας μόνο μέτρησης cTn με ένα μοναδικό διαγνωστικό όριο δεν επαρκεί για την ταχεία και ακριβή διάγνωση του ΑΜΙ. Ένας λόγος είναι ότι ορισμένοι ασθενείς με καρδιακές δομικές ανωμαλίες που σχετίζονται με καρδιακή ανεπάρκεια ή νεφρική νόσο έχουν συγκεντρώσεις cTn αρχικής τιμής πάνω από το 99° εκατοστημόριο. Ένας άλλος λόγος είναι ότι σε μερικούς ασθενείς με ΑΜΙ χρειάζονται μέχρι 6 ώρες για να αυξηθεί η συγκέντρωση της cTn πάνω από το 99° εκατοστημόριο. Έτσι, η σειριακή εξέταση βελτιώνει τη διάγνωση του ΑΜΙ. Οι συμβατικές στρατηγικές σειριακής δοκιμής μετρούν τις συγκεντρώσεις cTn στο αίμα σε διάστημα 3-6 ωρών, ενώ οι σύγχρονοι προσδιορισμοί συντομεύουν τα διαστήματα δοκιμών και επιτρέπουν πιο γρήγορη διάγνωση, εξαιτίας της βελτιωμένης αναλυτικής ακρίβειας, βοηθώντας στην καλύτερη διάκριση των κλινικά σημαντικών μεταβολών cTn από τον αναλυτικό θόρυβο. Η ερμηνεία των μεταβολών είναι περίπλοκη επειδή η αναλυτική μεταβλητότητα των αναλύσεων και η βιολογική μεταβλητότητα εξαρτώνται από τη συγκέντρωση. Εάν ένα αγγείο είναι πλήρως αποφραγμένο, η cTn του περιφερικού αίματος δεν μπορεί να αυξηθεί γρήγορα λόγω αιμόστασης. Επίσης, υπάρχει η περίπτωση μικρότερων μεταβολών cTn, λόγω της ποικιλομορφίας που υπάρχει στο χρονοδιάγραμμα των σειριακών εξετάσεων (δηλ. η μεταβολή μεταξύ 0 και 3 ωρών θα είναι διαφορετική από μια αλλαγή μεταξύ 0 και 9 ωρών). Οι κλινικές συνέπειες της απώλειας μικρότερου ΑΜΙ, με μέγιστες συγκεντρώσεις cTn μόλις πάνω από το 99° εκατοστημόριο, μπορεί να περάσουν απαρατήρητες από τον ιατρό οξείας περίθαλψης επειδή η επίπτωση στη νοσηρότητα είναι μήνες έως χρόνια αργότερα. Η αναφορά ή επισήμανση με βάση μια μεταβολή της συγκέντρωσης του cTn έχει προταθεί αλλά δεν υιοθετείται ευρέως. Επί του παρόντος, τα κριτήρια αλλαγής ή τα delta για τη cTn εξαρτώνται από τον προσδιορισμό και τον χρόνο μεταξύ μετρήσεων. Ευτυχώς, αρκετές κλινικές μελέτες έχουν αξιολογήσει τα κριτήρια αλλαγής για τη διάγνωση του ΑΜΙ, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως αναφορά για περιοχές που χρησιμοποιούν συγκεκριμένους προσδιορισμούς και πρωτόκολλα παραγγελιών, αν και η απόδοση αυτών των αλγορίθμων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό που αξιολογείται.⁷⁵

3. Μονάδες αναφοράς: Η χρήση διαφορετικών μονάδων μέτρησης προκαλεί σύγχυση και επηρεάζει την αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, αν και 200 ng/L και 0.2 ng/mL είναι πανομοιότυπα ευρήματα, η πρώτη επιλογή μονάδας κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται υψηλό, ενώ το δεύτερο κάνει το αποτέλεσμα να φαίνεται φυσιολογικό ή χαμηλό. Επιπλέον, οι τιμές με αριθμούς που περιλαμβάνουν δεκαδικά ψηφία υπόκεινται σε υψηλότερα ποσοστά σφάλματος. Η αναφορά των αποτελεσμάτων cTn υψηλής ευαισθησίας πρέπει να γίνεται σε ng/L, διότι έτσι αποφεύγονται τα σφάλματα και προσδίδεται μεγαλύτερη σημασία σε αποτελέσματα όπως τα 200 ng/L.⁷⁵

4. Κατώτατο όριο του εύρους αναφοράς: Η χρήση του ορίου ποσοτικοποίησης παρεμποδίζει την ανίχνευση των πρώιμων αλλαγών. Τιμές μικρότερες από αυτό το όριο αναφέρονται ως π.χ. <0.03 ng/mL, αντί ως πραγματικοί αριθμοί π.χ., 0.023 ng/mL. Συχνά, τα εργαστήρια χρησιμοποιούν το όριο του τυφλού (LoB), το όριο ανίχνευσης (LoD) ή το όριο ποσοτικοποίησης (LoQ). Εφαρμογή του LoD εξασφαλίζει ότι τα αριθμητικά αποτελέσματα αναφέρονται μόνο όταν υπάρχει μεγάλη εμπιστοσύνη ότι η αναλυόμενη ουσία είναι πραγματικά παρούσα. Μια απλούστερη προσέγγιση μπορεί να είναι το LoB, το οποίο μπορεί να ληφθεί με τη χρήση νερού ή άλλου «τυφλού». Το LoQ εξασφαλίζει ότι το όριο του των αποτελέσματα είναι απαραίτητη. Ωστόσο, το μειονέκτημα της χρήσης του LoQ είναι ότι όλα τα αποτελέσματα μεταξύ του LoD ή του LoB και του LoQ ομαδοποιούνται. Έτσι, μειώνεται η ανίχνευση των πρώιμων αλλαγών ενός ΑΜΙ και παρεμποδίζεται η εφαρμογή διαγνωστικών πρωτόκολλων.⁷⁵

Συμπερασματικά, η τροπονίνη είναι ο προτιμώμενος βιοδείκτης για τη νέκρωση του μυοκαρδίου. Είναι σαφές ότι οι δοκιμασίες υψηλής ευαισθησίας ανιχνεύουν την απελευθέρωση της cTn νωρίτερα από ότι παλαιότερες μέθοδοι. Ωστόσο η αυξημένη τροπονίνη πρέπει να ερμηνευθεί στο πλαίσιο της κλινικής κατάστασης και του ιστορικού ενός ασθενούς για να καθοριστεί η σωστή διάγνωση. Ένα θετικό αποτέλεσμα τροπονίνης δεν υποδεικνύει πάντα ένα στεφανιαίο γεγονός, όμως η αύξηση ή η πτώση των επιπέδων των σειριακών δοκιμών της τροπονίνης υποστηρίζει έντονα μία οξεία εξελισσόμενη καρδιακή βλάβη όπως ΟΕΜ. Τέλος, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη όλες οι πηγές σφαλμάτων και μεταβλητότητας των τιμών, ώστε να βελτιστοποιηθεί η χρήση της δοκιμής της τροπονίνης.

1.8 Λειτουργία και σύσταση καρδιακού μυός

Το κυκλοφορικό ή καρδιοαγγειακό σύστημα, είναι ένα σύστημα οργάνων υπεύθυνο για την εύρυθμη λειτουργία των έμβιων οργανισμών. Πρωταρχική λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος είναι η μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών ουσιών και ορμονών στους ιστούς, και η ταυτόχρονη απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα και αποβλήτων από το σώμα.^{77,78} Έτσι εξασφαλίζεται η διανομή των θρεπτικών συστατικών, και επιτυγχάνεται η καταπολέμηση ασθενειών, η σταθεροποίηση της θερμοκρασίας και του pH, και η διατήρηση της ομοιόστασης.³⁹ Πρόκειται για ένα κλειστό σωληνωτό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει: α) την καρδιά, ως αντλία, β) το αίμα, ως αγώγιμο μέσο και γ) τα αιμοφόρα αγγεία, ως αγωγός μέσω του οποίου ρέει το αίμα.⁷⁸

Η καρδιά είναι το κεντρικό όργανο της κυκλοφορίας, αντλεί ή κυκλοφορεί οξυγονωμένο αίμα στο σώμα και αποξυγονωμένο αίμα στους πνεύμονες.^{77,79} Η διαδικασία κατά την οποία η καρδιά συστέλλεται και χαλαρώνει με κάθε καρδιακό παλμό, ονομάζεται καρδιακός κύκλος.⁷⁹ Η χρονική περίοδος που οι κοιλίες συστέλλονται ωθώντας το αίμα προς τα έξω (στην αορτή και την κύρια πνευμονική αρτηρία) είναι γνωστή ως συστολή, ενώ αυτή που οι κοιλίες χαλαρώνουν και επαναπληρώνουν την καρδιά με αίμα είναι γνωστή ως διαστολή.⁷⁷

Ο φυσιολογικός καρδιακός ρυθμός, οφείλεται στα βηματοδοτικά κύτταρα, τα οποία ανταποκρίνονται σε σήματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ANS). Τα κύτταρα αυτά δημιουργούν ένα δυναμικό δράσης, το οποίο προκαλείται από τη μεταφορά ηλεκτρολυτών (Ca²⁺, Na⁺, K⁺) μέσα και έξω από αυτά, ενώ στη συνέχεια εξαπλώνεται σε γειτονικά κύτταρα.⁷⁹ Τα βηματοδοτικά κύτταρα δε συστέλλονται, αλλά ρυθμίζουν το ρυθμό σύσπασης άλλων μυοκαρδιακών κυττάρων. Αντίθετα, τα συσταλτά καρδιομυοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία στον καρδιακό μυ και είναι σε θέση να συστέλλονται.⁸⁰

Ο καρδιακός μυς είναι γραμμωτός και αποτελείται από σωληνοειδή μυϊκά κύτταρα, συσσωρευμένα σε περίβλημα πυκνού συνδετικού ιστού (Εικόνα 1.4). Κάθε καρδιακό κύτταρο έχει έναν πυρήνα και περισσότερα μιτοχόνδρια από άλλα είδη μυϊκών κυττάρων, επειδή οι συσπάσεις της καρδιάς απαιτούν σταθερή παροχή ATP.⁷⁸ Η λειτουργική μονάδα των μυϊκών κυττάρων είναι το σαρκομερές, αποτελούμενο από μακριές, ινώδεις πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν τα πυκνά και τα λεπτά νημάτια. Τα παχιά νημάτια συνίστανται από μόρια της κινητής πρωτεΐνης μυοσίνη, με σχήμα ράβδου που φέρει μια κεφαλή.⁸¹ Τα λεπτά νημάτια απαρτίζονται από πολυμερισμένα μόρια της σφαιρικής πρωτεΐνης ακτίνη, δημιουργώντας μία διπλή ελικοειδή δομή.⁸²

1.9 Σύσπαση μυοκαρδίου- κύκλος εγκάρσιας γέφυρας

Η μελέτη της σύσπασης του καρδιακού μυός ξεκίνησε με την αναγνώριση της επίδρασης του Ca²⁺ στη συστολή της καρδιάς.⁸³ To Ca²⁺ δίνει το έναυσμα για την ενδοκυτταρική συσταλτικότητα,⁸⁴ ενεργοποιώντας τις συσταλτές πρωτεΐνες⁸⁵ του μυός, όπως περιγράφεται στο μοντέλο του συρόμενου νήματος.^{86–88} Ο μοριακός μηχανισμός της συστολής των μυών, δηλαδή τα μηχανικά και ενεργειακά συμβάντα, καλείται κύκλος εγκάρσιας γέφυρας (crossbridge cycle)^{87,89} και χαρακτηρίζεται από δύο κύριες καταστάσεις: προσκόλληση και αποκόλληση της μυοσίνης από την ακτίνη, ενώ χωρίζεται σε 4 στάδια (Εικόνα 1.5).⁸⁹



Εικόνα 1.4. Απεικόνιση του μηχανισμού του κύκλου εγκάρσιας γέφυρας κατά τη σύσπαση του μυός.

Παρουσία χαμηλών ενδοκυττάριων συγκεντρώσεων Ca^{2+} (διαστολή-χαλάρωση μυών), η cTnC υφίσταται στην «κλειστή» της διαμόρφωση, και η cTnI δεσμεύει την ακτίνη ισχυρά, αναστέλλοντας τη δραστικότητα της ATPάσης της ακτινομυοσίνης και τελικά την αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης (Εικόνα 1.6A).⁹⁰ H Tm βρίσκεται σε μία μπλοκαρισμένη θέση, στην εξωτερική περιοχή της ακτίνης, που συγκρατείται από τη δράση της περιοχής T1 της cTnT και από την C-τελική περιοχή της cTnI (TnI_C),⁹¹ η οποία προσδένεται στο λεπτό νήμα από ένα ανασταλτικό πεπτίδιο (Inhibition peptide, Ip).⁵⁶ H cTnT αλληλεπιδρά τόσο με την cTnI όσο και με την cTnC, καθώς και με την Tm, ώστε να προσκολληθεί το σύμπλοκο cTn στην ακτίνη.⁵⁶

Βήμα 1° - Δυναμικές και δομικές μεταβολές στα λεπτά και πυκνά μυονημάτια: Αλλαγές στα λεπτά μυονημάτια: Κατά την έναρξη της συστολής, η αποπόλωση των μεμβρανών των καρδιομυοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση Ca²⁺ από το σαρκοπλασματικό

δίκτυο (SR). Με τη σειρά του, η άνοδος του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση Ca^{2+} στο N-τελικό άκρο της $cTnC^{56,90}$ (θέση II, Εικόνα 1.6) και αυτό προκαλεί μια αλυσιδωτή σειρά συμβάντων που περιλαμβάνει δυναμικές και δομικές μεταβολές σε cTn, Tm, ακτίνη και μυσσίνη.⁹⁰ 1) αυξάνεται η αλληλεπίδραση της cTnC («ανοιχτή» διαμόρφωση) με το πεπτίδιο μεταγωγής (switch-peptide) της cTnI 2) ελαττώνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ του (παρακείμενου) ανασταλτικού πεπτιδικού πεδίου (Ip) της cTnI με την ακτίνη και έτσι επάγεται η απελευθέρωση cTnI-Ip από την ακτίνη⁹⁰ και 3) η περιοχή TnI_C χάνει την επαφή της με την τροπομυσσίνη στην ανοιχτή κατάσταση και η θέση της τροπομυσσίνης στο λεπτό νήμα καθίσταται σταθερότερη.⁹¹ 4) Η Tm κινείται, εκθέτοντας τις θέσεις δέσμευσης μυσσίνης στα μόρια ακτίνης, επιτρέποντας στη συνέχεια το σχηματισμό εγκάρσιας γέφυρας (αλληλεπίδραση ακτίνης-μυσσίνης) (Εικόνα 1.6 C) και τη συστολή του μυός.^{90,92} Γενικά, όσο περισσότερο Ca²⁺ δένεται στην cTnC στα λεπτά νήματα, τόσο μεγαλύτερη είναι η δύναμη συστολής.

Αλλαγές στα πυκνά μυονημάτια: Για να ξεκινήσει ο κύκλος, πρέπει πρώτα η κεφαλή μυοσίνης να ενεργοποιηθεί στην ανορθωμένη της θέση. Η ενεργοποίηση συμβαίνει όταν απελευθερώνεται ενέργεια κατά την πρόσδεση ενός μορίου ATP στην κεφαλή μυοσίνης και υδρολυθεί σε ADP και ανόργανο φωσφορικό άλας από το ένζυμο ATPάση,⁹² τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα σε αυτήν.⁸¹



Εικόνα 1.5. Διαμορφωτικές μεταβολές στο σύμπλοκο της τροπονίνης και των συσταλτών πρωτεϊνών κατά τον κύκλο συστολής-διαστολής.

Βήμα 2^o - Σχηματισμός της εγκάρσιας γέφυρας: Η ενεργοποιημένη κεφαλή μυοσίνης προσδένεται στην ακτίνη, σε άλλη θέση πρόσδεσης εκτός του ATP, σχηματίζοντας μία εγκάρσια γέφυρα (σύμπλοκο ακτινομυοσίνης).^{81,93,94} Το ανόργανο φωσφορικό άλας απελευθερώνεται και ο δεσμός μεταξύ της μυοσίνης και της ακτίνης γίνεται ισχυρότερος.⁸¹ *Βήμα 3^o - "Power Stroke":* Το ADP απελευθερώνεται και η κεφαλή μυοσίνης στρέφεται, μετατοπίζοντας το λεπτό μυονημάτιο προς κέντρο του σαρκομερούς.⁸¹

Βήμα 4° - Αποσύνδεση της εγκάρσιας γέφυρας: Όταν ένα άλλο μόριο ATP δεθεί στην κεφαλή μυοσίνης, ο δεσμός μεταξύ της κεφαλής μυοσίνης και της ακτίνης γίνεται ασθενής (αποδυναμώνεται) και η κεφαλή μυοσίνης αποσυνδέεται από την ακτίνη και αποκτά την αρχική της θέση.⁸¹ Ο κύκλος Crossbridge είναι σε θέση να συνεχίσει όσο υπάρχουν επαρκείς ποσότητες ATP και Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα⁹⁴ και οι θέσεις πρόσδεσης στην ακτίνη ακτίνη παραμένουν εκτεθειμένες. Οι κεφαλές μυοσίνης επανενεργοποιούνται με την εκ νέου υδρόλυση του ATP σε ADP και ανόργανο φωσφορικό άλας, ενώ προσδένονται σε άλλη θέση πρόσδεσης στην ακτίνη και ούτω καθεξής.⁸¹ Όσο ο κύκλος επαναλαμβάνεται, τα λεπτά μυονημάτια ωθούνται το ένα προς το άλλο και το σαρκομερές συμπτύσσεται. Αυτή η σύμπτυξη προκαλεί τη συστολή όλου του μυ.

Ο κύκλος τελειώνει όταν τα Ca²⁺ μεταφέρονται ενεργά πίσω στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Απουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca²⁺ στην cTnC: η τροπονίνη και η τροπομυοσίνη επιστρέφουν στην αρχική τους διαμόρφωση και το σύμπλοκο τροπομυοσίνης-τροπονίνης καλύπτει και πάλι τις θέσεις πρόσδεσης στα νημάτια ακτίνης⁹⁴ και η καρδιά χαλαρώνει, επιτρέποντας στις κοιλίες να γεμίσουν με αίμα και να ξεκινήσουν πάλι τον καρδιακό κύκλο.

1.10 Τροπονίνες: ισομορφές, χαρακτηριστικά, δομή και λειτουργία

Αρχικά η τροπονίνη είχε χαρακτηριστεί ως θέση πρόσδεσης του Ca²⁺ στο λεπτό νήμα των μυοϊνιδίων,⁸⁵ ενώ αργότερα αποδείχτηκε ότι το σύμπλεγμα τροπονίνης περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές πρωτεΐνες⁹⁵ (Εικόνα 1.6): τροπονίνη C (TnC) (18 kDa),⁵⁶ που εμφανίζει μεγάλη χημική συγγένεια με τα ιόντα ασβεστίου, τροπονίνη Ι (TnI) (23-24 kDa),^{56,64} που έχει μεγάλη χημική συγγένεια με την ακτίνη και τροπονίνη Τ (TnT) (31-36 kDa),^{56,90} που παρουσιάζει μεγάλη χημική συγγένεια με ται τονγένεια με την τροπομυσσίνη. Οι τρεις υπομονάδες είναι διατεταγμένες 1:1:1 στοιχειομετρικά και συνδέονται στα λεπτά νημάτια κάθε επτά μονομερή μόρια ακτίνης των ραβδωτών μυών.^{56,82}

Κάθε μία από τις υπομονάδες υφίσταται ως ένας αριθμός διαφορετικών ισομορφών, που σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους μυών: γρήγορους (fast skeletal, fsTn) και αργούς (slow skeletal, ssTn) σκελετικούς μύες και καρδιακός μυς (cardiac, cTn).^{90,96} Tα γονίδια που κωδικοποιούν τις διαφορετικές ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους.⁹⁰ Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου, οι κύριες ισομορφές των τροπονινών στην καρδιά είναι οι σκελετικές, ενώ η μετάβαση στις καρδιακές ισομορφές συμβαίνει τη στιγμή της γέννησης.^{56,96} Η αποκλειστική έκφραση των καρδιακών ισομορφών στην καρδιά είναι οι σκελετικές του έματο μεταγεννητικό μήνα, ενώ η έκφραση των σκελετικών ισομορφών στην καρδιά είναι αυ συνεχίζεται από τον ένατο μεταγεννητικό μήνα, ενώ η έκφραση των σκελετικών ισομορφών συνεχίζεται στους αργούς σκελετικούς μύες των ενηλίκων.⁵⁶ Ωστόσο, η καρδιακή ισομορφή της TnC παρουσιάζει κοινή ομολογία με τους σκελετικούς μύες βραδείας σύσπασης και για αυτό δεν είναι χρήσιμη στη διάγνωση της καρδιακής βλάβης. Αντίθετα, οι καρδιακές ισομορφές των τροπονινών αμινοξικών αλληλουχιών, καθώς και κατάλοιπα σερίνης τα οποία φωσφορυλιώνονται, που δεν υπάρχουν στις σκελετικές ισομορφές τους, γεγονός που υποδηλώνει μοναδική λειτουργία της cTnI και cTnT στην καρδιά.⁵⁶

Η Τροπονίνη C, ανήκει στις ασβεστιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες και διαθέτει σφαιρικά Nκαι C-τελικά άκρα, αποτελούμενα από δύο μοτίβα έλικας-βρόχου-έλικας που δεσμεύουν δισθενή ιόντα μετάλλων.^{90,91,97} Η δομή της TnC, σε αντίθεση με τις άλλες υπομονάδες, είναι σταθερή έξω από το ετεροτριμερές σύμπλεγμα της τροπονίνης.⁹¹ Τα κατιόντα δεσμεύονται σε 6 αμινοξικά κατάλοιπα σε άτομα οξυγόνου που ανήκουν στις ομάδες καρβοξυλίου ή υδροξυλίου των αμινοξικών καταλοίπων, στο οξυγόνο της ομάδας καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού ή στο οξυγόνο ενός μορίου νερού που έχει στερεωθεί εντός του βρόχου. Η εξειδίκευση και η συγγένεια για τη δέσμευση Ca²⁺/Mg²⁺ οφείλεται στην (εξαιρετικά συντηρητική) πρωτοταγή δομή του βρόχου⁹⁸ και των ελίκων που πλαισιώνουν το βρόχο,⁹⁹ στις έλικες που βρίσκονται κοντά στο βρόχο, καθώς και στην αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών βρόχων.⁹⁰

Η C-τελική περιοχή της TnC (TnC_c) έχει δύο θέσεις πρόσδεσης Ca^{2+}/Mg^{2+} υψηλής συγγένειας (θέση III και θέση IV, Εικόνα 1.6), οι οποίες κατά κύριο λόγο καταλαμβάνονται από το Mg^{2+} όταν τα μυϊκά κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία.^{91,97} Η συγγένεια αυτών των θέσεων για το Ca^{2+} είναι υψηλότερη από εκείνη για το Mg^{2+} , αλλά τα μεγαλύτερα επίπεδα ενδοκυτταρικού Mg^{2+} (0,5-5 mM), σε σύγκριση με το Ca^{2+} (<100 nM) στο χαλαρό μυοκάρδιο, εξασφαλίζουν ότι κυρίως το Mg^{2+} συνδέεται στις θέσεις III και IV (Εικόνα 1.6). Κατά τη διάρκεια της καρδιακής συστολής, όταν τα επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{2+} μπορούν

18
να ανέλθουν σε 1-10 μM, υπάρχει πιθανά κάποια προσωρινή αντικατάσταση του Mg²⁺ από Ca^{2+} . Η περιοχή TnC_C πρωτίστως διαδραματίζει ένα δομικό ρόλο στην αγκύρωση των πρωτεϊνών του συμπλέγματος τροπονίνης στο λεπτό νήμα.⁹⁰

Η Ν-τελική περιοχή της TnC (cTnC_N), που βρίσκεται στον καρδιακό και στον βραδείας σύσπασης σκελετικό μυ, έχει μόνο μία ενεργή (εξειδικευμένη) θέση δεσμεύσεως Ca²⁺ (θέση II, Εικόνα 1.6), σε σύγκριση με δύο ενεργές θέσεις στην ταχείας σύσπασης σκελετική TnC. Η δέσμευση του Ca²⁺ στη Ν-τελική περιοχή, θέση II (εκτός από τη θέση Ι), είναι κρίσιμη για τη ρυθμιστική λειτουργία της cTnC και είναι υπεύθυνη για την έναρξη της ενεργοποίησης του λεπτού νήματος και την επακόλουθη συστολή.⁹⁰ Στην κατάσταση apo (πρωτεΐνη χωρίς δεσμευμένο υποκαταστάτη), η ρυθμιστική περιοχή παραμένει σε κλειστή διαμόρφωση με τα περισσότερα από τα υδρόφοβα κατάλοιπα να έχουν καλυφθεί.^{90,91} Όταν το Ca²⁺ συνδέεται με την cTnC_N, επάγει μια μεταβολή στη διαμόρφωση του υδρόφοβου τμήματος (έλικες A και B) (ανοιχτή διαμόρφωση), αυξάνοντας τη συγγένεια αυτής της περιοχής για το πεπτίδιο μεταγωγής της cTnI. Για τη διατήρηση της cTnC_N σε σταθερή ανοιχτή κατάσταση, απαιτούνται τόσο η δέσμευση Ca²⁺ στη θέση II όσο και η αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο μεταγωγής cTnI.⁹⁰

Η τροπονίνη Ι υφίσταται τις μεγαλύτερες διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη ρύθμιση του Ca²⁺ της μυϊκής συστολής.⁹¹ Η τροπονίνη Ι είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη πρωτεΐνη που είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με την TnC, την TnT, καθώς και με την ακτίνη, ενώ ο κύριος ρόλος της είναι να αναστέλλει τη δραστικότητα της ATP-άσης της ακτινομυοσίνης.^{90,97} Η αναστολή ενισχύεται παρουσία της τροπομυσσίνης και καταργείται εντελώς όταν η τροπονίνη C είναι πλήρως κορεσμένη σε Ca²⁺.⁹⁰ Η τροπονίνη I αποτελείται από 181-211 αμινοξικά κατάλοιπα με εύρος μοριακού βάρους 23-24 kDa^{56,64} και η καρδιακή ισομορφή είναι μεγαλύτερη λόγω της παρουσίας μίας επιπρόσθετης N-τελικής αμινοξικής αλληλουχίας.⁹⁰

Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, στο εσωτερικό του συμπλέγματος της τροπονίνης, ελέγχονται όχι μόνο από το Ca²⁺, αλλά μπορούν επίσης να διαμορφωθούν και με τη φωσφορυλίωση της τροπονίνης Ι. Το μόριο cTnI περιέχει 2 υπολείμματα σερίνης που μπορούν να φωσφορυλιωθούν *in vivo* από την πρωτεϊνική κινάση A.^{64,90,92} Έτσι, τέσσερις μορφές της πρωτεΐνης μπορούν να συνυπάρχουν στο κύτταρο: μία αποφωσφορυλιωμένη, δύο μονοφωσφορυλιωμένες και μία διφωσφορυλιωμένη.⁶⁴ Η φωσφορυλίωση είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική για την καρδιακή τροπονίνη Ι και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής συστολής.⁹⁷

Κεφάλαιο 1°

Από την άποψη της σχέσης δομής-λειτουργίας, η ανθρώπινη cTnI μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε λειτουργικές περιοχές.⁹⁰

1) <u>Η καρδιακή ειδική επέκταση του Ν-τερματικού</u>: Σε αυτήν την αλληλουχία (κατάλοιπα 1-33) υπάρχουν δύο θέσεις φωσφορυλίωσης εξαρτώμενες από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) που δεν υπάρχουν στην ταχεία και στην αργή σκελετική TnI. Από δεδομένα NMR βρέθηκε ότι απουσία φωσφορυλίωσης η Ν-τελική επέκταση είναι λιγότερο δομημένη και αλληλεπιδρά με το NcTnC. Κατά τη δι-φωσφορυλίωση στις Ser-23/Ser-24, η C-τελική αέλικα (κατάλοιπα 21-30) σταθεροποιείται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης φωσφορυλιωμένης σερίνης και των γειτονικών βασικών καταλοίπων. Αυτό αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της cTnI₁₋₃₂ και της NcTnC, επιτρέποντάς της να είναι πιο ευέλικτη και αυξάνοντας την πιθανή αλληλεπίδρασή με άλλες περιοχές της cTn.⁹⁰

2) <u>Η περιοχή του βραχίονα I-T</u>: Η αλληλουχία αυτή (κατάλοιπα 40-136) αποτελείται από δύο α-έλικες που αλληλεπιδρούν με τις α-έλικες του C-τελικού τμήματος της TnT και του C-λοβού της TnC. Η χρωματογραφία συγγένειας και ο κυκλικός διχρωϊσμός έδειξαν ότι η περιοχή του βραχίονα I-T (cTnI₄₀₋₁₃₆), η οποία θεωρείται ότι έχει μια πιο δομική και όχι ρυθμιστική λειτουργία στην αγκύρωση του συμπλόκου της τροπονίνης πάνω στο λεπτό νήμα, μπορεί να σχηματίσει μία ελικοειδή σπείρα με ένα τμήμα της C-τελικής περιοχής της TnT. Αναλύσεις NMR έδειξαν ότι το πρώτο μισό μέρος της περιοχής του βραχίονα I-T (cTnI₄₀₋₈₀) δεσμεύεται με την υδρόφοβη σχισμή του C-λοβού της cTnC.⁹⁰

3) <u>Η περιοχή του ανασταλτικού-πεπτιδίου</u>: Η περιοχή αυτή (κατάλοιπα 137-146) αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο ακτίνη-Tm και ίσως με τον C-λοβό της TnC. Η περιοχή του ανασταλτικού πεπτιδίου (cTnI₁₃₇₋₁₄₆) αλληλεπιδρά έντονα με την ακτίνη απουσία Ca²⁺ και σταθεροποιεί την Tm σε μια θέση που εμποδίζει την ισχυρή δέσμευση της μυοσίνης στην ακτίνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη συστολή. Παρά τη γνώση για τη λειτουργία της, η δομική ανάλυση της περιοχής δεν είναι καλά καθορισμένη. Από αναλύσεις με SDSL-EPR βρέθηκε ότι η περιοχή cTnI₁₂₉₋₁₃₇ σχηματίζει μία κανονική α-έλικα (3,6 κατάλοιπα/στροφή) και η επόμενη περιοχή cTnI₁₃₈₋₁₄₅ δεν εμφανίζει δευτεροταγή δομή. Επίσης με τη χρήση FRET βρέθηκε ότι η ανασταλτική περιοχή έχει δομή β-φουρκέτας. Αντίθετα η ανάλυση με NMR της cTnI₁₂₈₋₁₄₇ με τη cTnC₈₉₋₁₆₁, έδειξε ότι η cTnI₁₃₄₋₁₃₉ σχηματίζει δομή α-έλικας και η cTnI₁₄₀₋₁₄₇ εμφανίζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση που δυνητικά αλληλεπιδρά με τον Cλοβό της cTnC.⁹⁰ 4) <u>Η περιοχή του πεπτιδίου-διακόπτη</u>: Η αλληλουχία αυτή (κατάλοιπα 147-163) αλληλεπιδρά με το υδρόφοβο τμήμα της NcTnC. Η περιοχή του πεπτιδίου-διακόπτη (cTnI₁₄₇₋₁₆₃) εντοπίζεται ακριβώς δίπλα στην περιοχή του ανασταλτικού-πεπτιδίου και είναι η περιοχή που σταθεροποιεί τη NcTnC στην «ανοιχτή» διαμόρφωση. NMR δεδομένα έδειξαν ότι το N-τελικό άκρο της cTnI₁₄₇₋₁₆₃ δεσμεύεται στο υδρόφοβο τμήμα της NcTnC, σταθεροποιώντας έτσι την «ανοιχτή» διαμόρφωσή της. Παρά το γεγονός ότι η σχετική θέση της περιοχής του πεπτιδίου-διακόπτη σε αυτό το δυαδικό σύμπλοκο cTn είναι διαφορετική από εκείνη στην τριπλή κρυσταλλική δομή cTn (PDB: 1J1E), ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση του πεπτιδίου-διακόπτη σε σχέση με το NcTnC βρίσκονται σε πολύ καλή συμφωνία.⁹⁰

5) <u>Η κινητή περιοχή του C-τελικού άκρου</u>: Αυτή η περιοχή (κατάλοιπα 164-210) έχει μια δεύτερη θέση σύνδεσης ακτίνης-Tm. Η περιοχή C-τελικού άκρου (cTnI₁₆₄₋₂₁₀), επίσης γνωστή ως κινητή περιοχή, χρησιμεύει ως δεύτερη θέση σύνδεσης ακτίνης-τροπομυοσίνης. Αυτή η περιοχή είναι το πιο συντηρημένο τμήμα της TnI μεταξύ διαφορετικών ειδών και ισομορφών. Σύμφωνα με δεδομένα ακτίνων X, το C-τελικό άκρο έχει δομή α-έλικας και δεν αλληλεπιδρά με την cTnC και την cTnT.⁹⁰

Η τροπονίνη Τ είναι μία εξαιρετικά ασύμμετρη πρωτεΐνη με ~ 250-300 αμινοξέα με εύρος μοριακού βάρους 31-36 kDa.^{56,90} Τα δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι στην απομονωμένη κατάσταση ή μέσα στο λεπτό νήμα (που περιέχει ακτίνη και τροπομυοσίνη), η τροπονίνη Τ έχει τη μορφή κόμματος ή ράβδου μήκους 185-205 Å.¹⁰⁰ H τροπονίνη Τ βρίσκεται στην αυλάκωση της έλικας της ακτίνης και εκτείνεται κατά μήκος του νήματος. Αυτή η επιμήκης ελικοειδής πρωτεΐνη διαθέτει δύο λειτουργικά διακριτές περιοχές, τη Ν-τελική περιοχή Τ1 και τη σφαιρική C-τελική περιοχή Τ2. Η ΤηΤ1 προσδένει το σύμπλοκο στο νήμα ακτίνης και βοηθά στη ρύθμιση της θέσης της τροπομυοσίνης. Η TnT2 είναι ενσωματωμένη στο σύμπλοκο τροπονίνης, σχηματίζει ένα ελικοειδές συσπειρωμένο μοτίβο με την cTnI (βραχίονας I-T), το οποίο συνδέεται με την TnC για τη δημιουργία του σταθερού πυρήνα της τροπονίνης και τη σταθεροποίησή του πάνω στο λεπτό νήμα.^{90,91} Ουσιαστικά η cTnT κρατάει το σύμπλοκο τροπινίνη-τροπομυοσίνη-ακτίνη μαζί⁹⁰ και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συστολής των μυών. Οι αλληλουχίες των μεσαίων και C-τελικών τμημάτων της TnT είναι εξαιρετικά διατηρημένες μεταξύ των ειδών για όλες τις ισομορφές. Ωστόσο το μήκος της Ν-τελικής περιοχής είναι παραλλαγμένο μεταξύ των ειδών και των ισομορφών. Δεν υπάρχει καθορισμένη κρυσταλλική/NMR δομή για ολόκληρη την TnT, και μόνο περιορισμένα δομικά δεδομένα είναι διαθέσιμα για

Κεφάλαιο 1°

τμηματικές περιοχές της.⁹⁰ Η δομή υψηλής ανάλυσης της περιοχής T2 είναι παρούσα στις δομές του συμπλόκου Tn, υποδεικνύοντας ότι η κύρια διεπαφή TnI-TnT είναι η ελικοειδής συσπειρωμένη σπείρα α-ελίκων που περιέχει τα κατάλοιπα Phe⁹⁰-Arg¹³⁶ της cTnI και τα κατάλοιπα Leu²²⁴-Val²⁷⁴ της cTnT στο ανθρώπινο σύμπλοκο cTn.⁹⁰

Βιβλιογραφία 1° Κεφαλαίου

- 1. Mendis, S. *et al*. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. (2011).
- 2. Roger, V. L. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2012 Update. *Circulation* **125**, e2–e220 (2012).
- 3. Libby, P. et al. Atherosclerosis. Nat. Rev. Dis. Prim. 5, 56 (2019).
- 4. McGill Jr., H. C. *et al.* Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* **72**, 1307s-1315s (2000).
- 5. World Health Organization. Cardiovascular diseases(CVDs) Fact Sheet. (2017).
- 6. Spencer, F. A. *et al.* Twenty year trends (1975-1995) in the incidence, in-hospital and long-term death rates associated with heart failure complicating acute myocardial infarction: a community-wide perspective. *J Am Coll Cardiol* **34**, 1378–1387 (1999).
- 7. De Mello, W. C. Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. *J Mol Med* **79**, 103–108 (2001).
- 8. McGill Jr., H. C., McMahan, C. A. & Gidding, S. S. Preventing heart disease in the 21st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study. *Circulation* **117**, 1216–1227 (2008).
- 9. Einarson, T. R., Acs, A., Ludwig, C. & Panton, U. H. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc. Diabetol.* **17**, 83 (2018).
- 10. Becerra-Tomás, N. *et al.* Mediterranean diet, cardiovascular disease and mortality in diabetes: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies and randomized clinical trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 1207–1227 (2020).
- 11. Stewart, J., Manmathan, G. & Wilkinson, P. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **6**, 2048004016687211 (2017).
- 12. Hare, D. L., Toukhsati, S. R., Johansson, P. & Jaarsma, T. Depression and cardiovascular disease: a clinical review. *Eur. Heart J.* **35**, 1365–1372 (2013).
- 13. Sun, X. & Jia, Z. A brief review of biomarkers for preventing and treating cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **3**, 251–254 (2012).
- 14. Brewer, L. C., Svatikova, A. & Mulvagh, S. L. The Challenges of Prevention, Diagnosis and Treatment of Ischemic Heart Disease in Women. *Cardiovasc. drugs Ther.* **29**, 355–368 (2015).
- 15. Naghavi, M. *et al*. From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol* **98**, 2h-15h (2006).
- 16. Ashley EA; Niebauer J. *Cardiology Explained*. (Remedica, 2004).
- 17. Moore, Keith L.; Dalley, Arthur F.; Agur, A. M. R. *Clinically Oriented Anatomy*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2010).
- 18. Davidson, S. S. Davidson 's Medicine. Davidson's principles and practice of medicine (2010).
- 19. Rudd, J. H. F. *et al.* Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* **105**, 2708–2711 (2002).
- 20. Atkinson A; Colburn W; DeGruttola V; DeMets D; Downing G; Hoth D; Oates J; Peck C; Schooley R; Spilker B; Woodcock J; Zeger S. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
- 21. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? Curr. Opin. HIV AIDS 5, 463–466 (2010).

Κεφάλαιο 1°

- 22. Reed, G. W., Rossi, J. E. & Cannon, C. P. Acute myocardial infarction. *Lancet (London, England)* **389**, 197–210 (2017).
- 23. O'Gara, P. T. *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **127**, e362-425 (2013).
- 24. Thygesen, K., Alpert, J. S. & White, H. D. Universal definition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2173–2195 (2007).
- 25. Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **33**, 2551–2567 (2012).
- 26. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2231 LP 2264 (2018).
- 27. Han, X., Li, S., Peng, Z., Othman, A. M. & Leblanc, R. Recent Development of Cardiac Troponin i Detection. *ACS Sensors* **1**, 106–114 (2016).
- 28. Bersten, A. Oh's Intensive Care Manual. (Elsevier Health Sciences, 2013).
- 29. Lindahl, B. Detection of Myocardial Damage are the Troponins the Ultimate Solution? *Scand. Cardiovasc. J.* **35**, 229–232 (2001).
- 30. Shi, Q. *et al.* Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. *Clin. Chem.* **45**, 1018–1025 (1999).
- 31. Katus, H. A. *et al.* Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* **83**, 902–912 (1991).
- 32. Apple, F. S., Falahati, A., Paulsen, P. R., Miller, E. A. & Sharkey, S. W. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin. Chem.* **43**, 2047–2051 (1997).
- 33. Kasper, D. L. et al. Harrison's principles of internal medicine. (2015).
- 34. Kemp, M., Donovan, J., Higham, H. & Hooper, J. Biochemical markers of myocardial injury. *Br. J. Anaesth.* **93**, 63–73 (2004).
- 35. Tucker, J. F. *et al.* Value of Serial Myoglobin Levels in the Early Diagnosis of Patients Admitted for Acute Myocardial Infarction. *Ann. Emerg. Med.* **24**, 704–708 (1994).
- 36. Montague, C. & Kircher, T. Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain. *Am. J. Clin. Pathol.* **104**, 472–476 (1995).
- 37. Rifai, N. & Ridker, P. M. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin. Chem.* **47**, 403–411 (2001).
- 38. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 340, 115–126 (1999).
- 39. Ridker, P. M., Buring, J. E., Cook, N. R. & Rifai, N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* **107**, 391–397 (2003).
- 40. St-Onge, M.-P., Zhang, S., Darnell, B. & Allison, D. B. Baseline serum C-reactive protein is associated with lipid responses to low-fat and high-polyunsaturated fat diets. *J. Nutr.* **139**, 680–683 (2009).
- 41. Atisha, D. *et al.* A prospective study in search of an optimal B-natriuretic peptide level to screen patients for cardiac dysfunction. *Am. Heart J.* **148**, 518—523 (2004).
- 42. Nakamura, T. *et al.* Increased plasma brain natriuretic peptide level as a guide for silent myocardial ischemia in patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1657–1663 (2002).
- 43. Geng, Z., Huang, L., Song, M. & Song, Y. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiovascular or all-cause mortality in the general population: A meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 41504 (2017).

- 44. Wannamethee, S. G. *et al.* N-terminal pro-brain natriuretic Peptide is a more useful predictor of cardiovascular disease risk than C-reactive protein in older men with and without preexisting cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 56–64 (2011).
- 45. Bar-Or, D., Lau, E. & Winkler, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J. Emerg. Med.* **19**, 311–315 (2000).
- 46. Bar-Or, D. *et al.* Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I. *Am. Heart J.* **141**, 985–991 (2001).
- 47. Worster, A. *et al.* Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. *C. Can. Med. Assoc. J.* = *J. l'Association medicale Can.* **172**, 1685–1690 (2005).
- 48. Fougerousse, F. *et al.* Cardiac myosin binding protein C gene is specifically expressed in heart during murine and human development. *Circ. Res.* **82**, 130–133 (1998).
- 49. Anand, A. *et al.* Cardiac myosin-binding protein C is a novel marker of myocardial injury and fibrosis in aortic stenosis. *Heart* **104**, 1101—1108 (2018).
- 50. Kaier, T. E. *et al.* Direct Comparison of Cardiac Myosin-Binding Protein C With Cardiac Troponins for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **136**, 1495–1508 (2017).
- 51. Katus, H. A. *et al.* Increased specificity in human cardiacmyosin radioimmunoassay utilizing two monoclonal antibodies in a double sandwich assay. *Mol. Immunol.* **19**, 451–455 (1982).
- 52. Cummins, B., Auckland, M. L. & Cummins, P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **113**, 1333–1344 (1987).
- 53. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **21**, 1502–1513 (2000).
- 54. Apple, F. S. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* **53**, 547–551 (2007).
- 55. S., M. V. & Petr, J. How to Interpret Elevated Cardiac Troponin Levels. *Circulation* **124**, 2350–2354 (2011).
- 56. Vasatova, M., Pudil, R., Horacek, J. M. & Buchler, T. *Current Applications of Cardiac Troponin T for the Diagnosis of Myocardial Damage. Advances in Clinical Chemistry* **61**, (Elsevier Inc., 2013).
- 57. Katus, H. A., Remppis, A., Scheffold, T., Diederich, K. W. & Kuebler, W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **67**, 1360–1367 (1991).
- 58. Adams, J. E. 3rd, Schechtman, K. B., Landt, Y., Ladenson, J. H. & Jaffe, A. S. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin. Chem.* **40**, 1291–1295 (1994).
- 59. Jaffe, A. S. *et al.* Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* **42**, 1770–1776 (1996).
- 60. Tamaki, S. *et al.* Effects of coronary artery reperfusion on relation between creatine kinase-MB release and infarct size estimated by myocardial emission tomography with thallium-201 in man. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2**, 1031–1038 (1983).

Κεφάλαιο 1°

- 61. Tanaka, H. *et al*. Serum levels of cardiac troponin I and troponin T in estimating myocardial infarct size soon after reperfusion. *Coron. Artery Dis.* **8**, 433–439 (1997).
- 62. Babuin, L. & Jaffe, A. S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* **173**, 1191–1202 (2005).
- 63. Adams, J. E. 3rd *et al*. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* **88**, 101–106 (1993).
- 64. Apple, F. S. & Collinson, P. O. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin. Chem.* **58**, 54–61 (2012).
- 65. Steg, P. G. *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* **33**, 2569–2619 (2012).
- 66. Neumann, J. T. *et al.* Diagnosis of myocardial infarction using a high-sensitivity Troponin i 1-hour algorithm. *JAMA Cardiol.* **1**, 397–404 (2016).
- 67. Carlton, E. *et al.* Evaluation of high-sensitivity cardiac Troponin i levels in patients with suspected acute coronary syndrome. *JAMA Cardiol.* **1**, 405–412 (2016).
- Pickering, J. W. *et al.* Rapid Rule-out of Acute Myocardial Infarction With a Single High-Sensitivity Cardiac Troponin T Measurement Below the Limit of Detection. *Ann. Intern. Med.* 166, 715–724 (2017).
- 69. Chapman, A. R. *et al.* Association of High-Sensitivity Cardiac Troponin I Concentration With Cardiac Outcomes in Patients With Suspected Acute Coronary Syndrome. *JAMA* **318**, 1913–1924 (2017).
- 70. Venge, P., Lagerqvist, B. o., Diderholm, E., Lindahl, B. & Wallentin, L. Clinical performance of three cardiac troponin assays in patients with unstable coronary artery disease (a FRISC II substudy). *Am. J. Cardiol.* **89**, 1035–1041 (2002).
- 71. C., H., A., D., L., L., B.U., G. & C.W., H. Analytical and diagnostic performance of troponin assays in patients suspicious for acute coronary syndromes. *Clin. Biochem.* **33**, 359–368 (2000).
- 72. Uettwiller-Geiger, D. *et al.* Multicenter evaluation of an automated assay for troponin I. *Clin. Chem.* **48**, 869–876 (2002).
- 73. Apple, F. S. A new season for cardiac troponin assays: It's time to keep a scorecard. *Clin. Chem.* **55**, 1303–1306 (2009).
- 74. Melanson, S. E. F., Tanasijevic, M. J. & Jarolim, P. Cardiac troponin assays: A view from the clinical chemistry laboratory. *Circulation* **116**, 501–504 (2007).
- 75. Herman, D. S., Kavsak, P. A. & Greene, D. N. Variability and error in cardiac troponin testing: An ACLPS critical review. *Am. J. Clin. Pathol.* **148**, 281–295 (2017).
- 76. Zaidi, A. & Cowell, R. False positive cardiac troponin elevation due to heterophile antibodies: more common than we recognise? *BMJ Case Rep.* **2010**, (2010).
- 77. Herring, N., Paterson, D. J. & Levick, J. R. Levick's introduction to cardiovascular physiology. 69 (2018).
- 78. Humphrey, J. D. & McCulloch, A. D. The Cardiovascular System Anatomy, Physiology and Cell Biology BT - Biomechanics of Soft Tissue in Cardiovascular Systems. in (eds. Holzapfel, G. A. & Ogden, R. W.) 1–14 (Springer Vienna, 2003). doi:10.1007/978-3-7091-2736-0_1
- 79. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. (Elyse O'Grady).
- 80. *The European Society of Cardiology Series The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine.* (Oxford University Press, 2009).
- 81. Starr, C., Evers, C. & Starr, L. Biology: Today and Tomorrow with Physiology. (2009).

- 82. Parmacek, M. S. & Solaro, R. J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **47**, 159–176 (2004).
- 83. Ringer, S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J. Physiol.* **4**, 29-42.3 (1883).
- 84. Heilbrunn, L. V. The Action of Calcium on Muscle Protoplasm. *Physiol. Zool.* **13**, 88–94 (1940).
- 85. EBASHI, S. Calcium Ions and Muscle Contraction. *Nature* **240**, 217–218 (1972).
- 86. Huxley, A. THE HISTORY OF TENSION. Ann. N. Y. Acad. Sci. 67, 675–684 (1957).
- 87. Huxley A.F. A Theory of Muscular Contraction. Prog. Biophys. Biophys. Chem 7, (1957).
- 88. Shur, M. *The 1957 HUXLEY'S MODEL EXPLAINS ALL MECHANICAL 46 PROPERTIES OF MUSCLE.* (2015).
- 89. Lymn, R. W. & Taylor, E. W. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617–4624 (1971).
- 90. Cheng, Y. & Regnier, M. Cardiac troponin structure-function and the influence of hypertrophic cardiomyopathy associated mutations on modulation of contractility. *Arch. Biochem. Biophys.* **601**, 11–21 (2016).
- 91. Metskas, L. A. & Rhoades, E. Order–Disorder Transitions in the Cardiac Troponin Complex. *J. Mol. Biol.* **428**, 2965–2977 (2016).
- 92. Streng, A. S., de Boer, D., van der Velden, J., van Dieijen-Visser, M. P. & Wodzig, W. K. W. H. Posttranslational modifications of cardiac troponin T: An overview. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63, 47–56 (2013).
- 93. Wood, A. W. Physiology, biophysics, and biomedical engineering. Physiology, Biophysics, and Biomedical Engineering (2016). doi:10.1201/b11558
- 94. Widmaier, E., Raff, H., Strang, K. & Shoepe, T. VANDER'S Human Physiology (Fifteenth edition). 53, (2013).
- 95. Greaser, M. L. & Gergely, J. Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* **246**, 4226–4233 (1971).
- 96. Sasse, S. *et al.* Troponin I gene expression during human cardiac development and in endstage heart failure. *Circ. Res.* **72**, 932–938 (1993).
- 97. Gordon, A. M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853–924 (2000).
- 98. Kawasaki, H. & Kretsinger, R. H. Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein Profile* **1**, 343–517 (1994).
- 99. Trigo-Gonzalez, G., Awang, G., Racher, K., Neden, K. & Borgford, T. Helix variants of troponin C with tailored calcium affinities. *Biochemistry* **32**, 9826–9831 (1993).
- 100. Flicker, P. F., Phillips, G. N. & Cohen, C. Troponin and its interactions with tropomyosin: An electron microscope study. *J. Mol. Biol.* **162**, 495–501 (1982).

2 Παραγωγή αντισωμάτων και ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

2.1 Αντιγόνο και αντίσωμα

Αντιγόνο (Antibody generator) ονομάζεται κάθε ουσία που διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα (ανοσοαπόκριση), ενεργοποιώντας τα λεμφοκύτταρα και προκαλώντας την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων.^{1–3} Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιγόνων: 1) τα εξωγενή αντιγόνα (ή ετεροαντιγόνα), τα οποία προέρχονται από ιούς ή μικροοργανισμούς, δηλητήριο ζώων, πρωτεΐνες τροφίμων, διάφορα χημικά και τα συστατικά του ορού και των ερυθρών αιμοσφαιρίων άλλων ατόμων και 2) τα ενδογενή αντιγόνα (ή αυτοαντιγόνα), τα οποία προέρχονται από ιούς δεν είναι σε θέση να αναγνωρίσει τις δικές του φυσιολογικές ουσίες προκαλώντας την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και οδηγώντας σε αυτοάνοσες διαταραχές.¹ Τα τμήματα του αντιγόνου που συνδέονται με τα αντισώματα ονομάζονται αντιγονικοί καθοριστές ή επίτοποι⁴ και ο αριθμός τους εξαρτάται από την πολυπλοκότητα της δομής τους και το μοριακό τους βάρος.

Τα αντισώματα (**Antibodies**) ή ανοσοσφαιρίνες (**I**mmuno**g**lobulins) είναι ειδικές πρωτεΐνες που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού όταν αυτό διεγερθεί από την παρουσία ενός ξένου προς τον οργανισμό παράγοντα (ανοσογόνου αντιγόνου), με σκοπό την εξουδετέρωσή του.^{1,3}

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα συνίστανται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (Heavy) και δύο όμοιες ελαφριές αλυσίδες (Light). Οι τέσσερις αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δισουλφιδικούς δεσμούς, δίνοντας στο μόριο της ανοσοσφαιρίνης τη χαρακτηριστική μορφή του σχήματος Y (Εικόνα 2.1).⁴



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός αντισώματος θηλαστικού IgG και ενός αντισώματος όρνιθας IgY.

Κεφάλαιο 2°

Οι ανοσοσφαιρίνες των θηλαστικών κατατάσσονται σε πέντε διαφορετικές τάξεις με βάση τον τύπο των βαριών αλυσίδων γ, α, δ, ε και μ σε IgG, IgA, IgD, IgE και IgM αντίστοιχα. Οι διάφορες τάξεις των ανοσοσφαιρινών έχουν κοινή βασική δομή, αλλά κάθε τάξη έχει χαρακτηριστική λειτουργία.³

Οι βαριές και ελαφριές αλυσίδες περιλαμβάνουν περιοχές που διαφέρουν ελάχιστα ως προς τη δομή τους και χαρακτηρίζονται ως σταθερές περιοχές (Constant) και περιοχές που διαφέρουν σημαντικά και χαρακτηρίζονται ως μεταβλητές (Variable). Οι μεταβλητές περιοχές βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο των Η και L αλυσίδων και σχηματίζουν τις δύο θέσεις δέσμευσης του αντιγόνου, που ονομάζονται παράτοποι.^{3,4} Οι σταθερές περιοχές, οι οποίες περιλαμβάνουν τα καρβοξυλικά άκρα,⁴ σχηματίζουν την «ουρά» του μορίου της ανοσοσφαιρίνης και παρόλο που δεν συμβάλλουν στη δέσμευση του αντιγόνου, συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση μέσω δευτερευουσών αντιδράσεων, όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η σύνδεση στα φαγοκύτταρα,⁵ και παρέχουν δομική σταθερότητα.⁶ Οι σταθερές περιοχές των Η αλυσίδων ορίζονται ως CH1-CH2-CH3 για τις IgG, IgA και IgD με μία επιπλέον CH4 περιοχή για τις IgM και IgE.⁴

2.2 Ανοσοσφαιρίνη IgY

Η ανοσοσφαιρίνη IgY (Εικόνα 2.1) απαντάται στα πτηνά, στα αμφίβια και στα ερπετά ^{7,8} και θεωρείται ως διάδοχη των IgM και IgA ⁸ και ως πρόδρομη των IgG και IgE των θηλαστικών.^{8,9} H IgY των πτηνών θεωρείται ως η αντίστοιχη IgG των θηλαστικών. Ωστόσο, διαφέρουν ως προς τη δομή τους καθώς η IgY διαθέτει μία επιπλέον σταθερή περιοχή στη βαριά αλυσίδα ⁷ και το Fc τμήμα της περιέχει δύο πλευρικές αλυσίδες υδατανθράκων. Επίσης, η IgY στερείται μία εύκαμπτη περιοχή (hinge) μεταξύ των σταθερών τμημάτων CH1 και CH2, καθιστώντας τη λιγότερο ευέλικτη,⁷ αν και έχει βρεθεί μία παραλλαγή της IgY που διαθέτει την εύκαμπτη περιοχή (platypus IgY/IgO),⁸ ενώ μία άλλη διαθέτει μία περιοχή.¹⁰

2.3 Πλεονεκτήματα IgY αντισωμάτων όρνιθας

Η IgY είναι μία πολύ σημαντική ανοσοσφαιρίνη τόσο για διαγνωστικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς.⁸ Η εξελικτική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών πτηνών και θηλαστικών συνεπάγεται μη ανοσολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross reactivity) ανάμεσα στα αντισώματα IgY και IgG, καθώς και μη πρόσδεση στους Fc υποδοχείς των θηλαστικών, στον ρευματοειδή παράγοντα (RF), στις πρωτεΐνες A και G,¹¹ γεγονότα που συνεπάγονται τόσο μείωση στις παρεμβολές (background) όσο και στις ψευδώς θετικές αντιδράσεις.^{8,11,12} Επιπλέον, τα IgY αντισώματα συνδέονται με περισσότερους αλλά και διαφορετικούς επίτοπους σε μια πρωτεΐνη θηλαστικού από το αντίστοιχο IgG αντίσωμα θηλαστικών. Κατά συνέπεια οι όρνιθες είναι καλύτερη επιλογή από π.χ. τα κουνέλια για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των διατηρημένων πρωτεϊνών των θηλαστικών και η IgY έχει προταθεί ως υποκατάστατο της IgG για τις ανοσολογικές δοκιμασίες στον ανθρώπινο ορό.¹³

Η χρήση του κρόκου αυγού όρνιθας ως πηγή παραγωγής αντισωμάτων είναι πολύ σημαντική στη μείωση της χρήσης πειραματόζωων, καθώς οι όρνιθες παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες αντισωμάτων από τα εργαστηριακά τρωκτικά ή τα κουνέλια,^{7,14} ενώ το 2-10% αναμένεται να είναι ειδικό για το αντιγόνο.⁷ Επίσης, καθιστά δυνατή την αποφυγή της συλλογής αίματος (επεμβατική δειγματοληψία), η οποία είναι οδυνηρή για το ζώο. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) συνιστά να χρησιμοποιούνται αντισώματα IgY κρόκου αντί αντισωμάτων θηλαστικών για λόγους ευζωίας των ζώων.^{11,14} Επιπλέον, η IgY έχει το πλεονέκτημα των σταθερών χημικών ιδιοτήτων, της υψηλής απόδοσης και του χαμηλού κόστους παραγωγής.^{7,11,13,14}

Οι ανοσοσφαιρίνες μεταφέρονται στα αυγά των ορνίθων με διάφορους τρόπους (Εικόνα 2.2). Οι IgA και IgM μαζί με άλλες πρωτεΐνες του ωαρίου, μεταφέρονται στο λευκό μέρος του αυγού σε μικρές ποσότητες.¹⁴ Οι IgY υποδοχείς στο ωάριο προσδένουν επιλεκτικά και μεταφέρουν όλες τις IgY από τον ορό της όρνιθας στον κρόκο του αυγού.¹⁴ Η συγκέντρωση της IgY στον κρόκο (10-20 mg) είναι συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη από αυτήν στον ορό. Η αναλογία IgY_{κρόκου}/IgY_{ορού} είναι 1,23.^{11,12,14}



Εικόνα 2.2. Μεταφορά των αντισωμάτων από την όρνιθα στα αυγά και κατανομή των αντισωμάτων στα μέρη του αυγού.

Κεφάλαιο 2°

2.4 Παραγωγή αντισωμάτων - Ανοσοποιήσεις

Η παραγωγή αντισωμάτων σε πειραματόζωα προκύπτει από τη διαδικασία της ανοσοποίησης των ζώων και περιλαμβάνει την ένεση του ανοσογόνου (υποδερμικά, ενδοδερμικά ή ενδομυϊκά) σε δόσεις ανά διαστήματα.¹⁴ Στις όρνιθες η ανοσοποίηση μπορεί να γίνει ενδομυϊκά, υποδόρια, ενδοφλέβια, ως ρινική σταγόνα, αεροζόλ, κλπ.¹¹ Ωστόσο, η υποδόρια ανοσοποίηση δίνει υψηλότερα επίπεδα ειδικής IgY σε σύγκριση με την ενδομυϊκή ανοσοποίηση, αν και η ενδομυϊκή είναι η πιο συνήθης.^{11,14} Επίσης, ο συνδυασμός ενδομυϊκής και ενδοφλέβιας ανοσοποίησης συχνά οδηγεί σε υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων.¹¹ Πρέπει να τονιστεί ότι η ενδοφλέβια ανοσοποίηση γίνεται χωρίς τη χρήση ανοσοενισχυτικών και εκτελείται πολύ αργά (500 μl ανά 15 min) για την αποφυγή αναφυλακτικής αντίδρασης.¹⁴

Η πρώτη χορήγηση του ανοσογόνου προκαλεί την πρωτογενή ανοσολογική απόκριση, κατά την οποία παράγονται μικρές ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgM. Η δευτερογενής απόκριση ακολουθεί με τις επόμενες χορηγήσεις του ανοσογόνου και οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανοσοσφαιρινών IgG/IgY.¹⁴

Η ανάπτυξη και παραγωγή αντισωμάτων ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησης δεν μπορεί να προβλεφθεί. Οι μεταβλητές που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση της ανοσοποιημένης όρνιθας είναι: το αντιγόνο (τύπος, δόση, MW, τρόπος χορήγησης), το ανοσοενισχυτικό (adjuvant), η ίδια η όρνιθα (συνθήκες εκτροφής, ηλικία, ράτσα, ικανότητα ωοτοκίας) και τα διαστήματα μεταξύ των ανοσοποιήσεων.^{11,14}

Πηγή αντιγόνου σε μία ανοσοποίηση αποτελούν ολόκληροι ιοί ή βακτήρια, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ιοσώματα, προϊόντα εμβολίων, κλπ.^{11,15} Ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές στην παραγωγή αντισωμάτων. Ωστόσο, η δυσκολία στην παραγωγή και στον καθαρισμό τους έστρεψε το ενδιαφέρον στην αξιοποίηση αντιγόνων μικρού μοριακού βάρους (έως 10 kDa), τα οποία ονομάζονται απτένια.¹¹ Επιπλέον, η δόση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση μπορεί να επηρεάσει την ανοσοαπόκριση και τον τίτλο των αντισωμάτων. Έχει αποδειχτεί ότι η συγκέντρωση αντιγόνου 0,1-1 mg είναι ευνοϊκή για την ανοσοποίηση των ορνίθων.^{11,14}

Η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων βελτιώνεται με τη χρήση ανοσοενισχυτικών αυξάνοντας τη συνολική ποσότητα των αντισωμάτων, μειώνοντας την απαιτούμενη ποσότητα του υπό χορήγηση αντιγόνου και τον αριθμό των επαναληπτικών δόσεων, και αυξάνοντας την ταχύτητα και τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης.¹⁴ Τα ανοσοενισχυτικά που

χρησιμοποιούνται πιο συχνά στα ζώα εφαρμόζονται ως γαλακτώματα νερού σε έλαιο. Σε αυτά τα γαλακτώματα το αντιγόνο βρίσκεται στην υδατική φάση. Ο μηχανισμός δράσης των ανοσοενισχυτικών στηρίζεται στην δημιουργία μιας «δεξαμενής» του αντιγόνου στο σημείο χορήγησης, με αργή αποδέσμευση του αντιγόνου και την διέγερση των λεμφοκυττάρων.

Υπάρχουν πολλά ανοσοενισχυτικά, τα οποία διαφέρουν ως προς τα χημικά χαρακτηριστικά, την αποτελεσματικότητα στην ανοσοδιέγερση και τις δευτερογενείς παρενέργειες στις ανοσοποιημένες όρνιθες.¹¹ Το πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Freund's Complete Adjuvant) λογίζεται ως ο «χρυσός κανόνας» και είναι αυτό που χρησιμοποιείται συχνότερα, καθώς είναι ισχυρό ανοσοδιεγερτικό παρέχοντας καλή ανοσοαπόκριση ακόμη και σε ασθενή αντιγόνα. Όμως, αυτό το πλεονέκτημα συνδέεται με την πιθανότητα βλάβης του ιστού των θηλαστικών (τοπική ή συστηματική κυτταροτοξικότητα και φλεγμονή).¹¹ Στις όρνιθες ωστόσο δεν παρατηρείται τοπική φλεγμονή.^{12,14} Το μη πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Freund's Incomplete Adjuvant) είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το FCA, αλλά έχει λιγότερες παρενέργειες.¹⁴

Επίσης, το διάστημα μεταξύ πρώτης, δεύτερης αλλά και των επακόλουθων ανοσοποιήσεων αποτελεί σημαντική παράμετρο για την επιτυχή παραγωγή αντισωμάτων. Διατίθενται πολλά πρωτόκολλα ανοσοποίησης που περιλαμβάνουν έναν εμβολιασμό ανά εβδομάδα, για 3 ή 7 συνεχόμενες εβδομάδες, ή έναν εμβολιασμό ανά 10 ημέρες.¹⁴ Γενικά συνιστάται το διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης χορήγησης του αντιγόνου να είναι 4 εβδομάδες.^{11,14} Οι συχνές ανοσοποιήσεις σε σύντομο χρόνο πιθανά να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή και όχι ανοσοαπόκριση.^{11,14}

2.5 Απτένια

Όπως προαναφέρθηκε, η δυσκολία στην παραγωγή και στον καθαρισμό αντιγόνων μεγάλου μοριακού βάρους έδωσε έδαφος στην αξιοποίηση αντιγόνων μικρού μοριακού βάρους, τα οποία ονομάζονται απτένια.¹¹ Τα απτένια είναι οργανικά ή ανόργανα μικρά μόρια (π.χ. μικρά πεπτίδια που μπορούν να μιμηθούν επίτοπους) με χαμηλή ή καθόλου ανοσογονικότητα, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε τεχνητά αντιγόνα όταν προσδεθούν σε έναν πρωτεϊνικό φορέα.^{11,15} Επίσης, ένα πλεονέκτημα των απτενίων είναι ότι εφόσον παραχθούν εξειδικευμένα αντισώματα για αυτά, δίνουν μία πολύ σημαντική πληροφορία για την ακριβή θέση δέσμευσης του αντιγόνου,¹⁵ μιας και τα αντισώματα αναγνωρίζουν 5-6 αμινοξέα σε κάθε ανοσογονικό μόριο.

Κεφάλαιο 2°

2.6 Ολιγοπεπτιδικοί συνθετικοί φορείς αντιγόνων: SOC και CPSOC

Δεδομένου ότι κατά την ανοσολογική απόκριση τα Β-κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα ανάλογα με τη διαμόρφωσή τους, εκτός από την επιλογή των απτενίων που πρέπει να γίνεται με βάση το μέγεθος και τη φύση τους, εξίσου σημαντική είναι η επιλογή και ο σχεδιασμός των φορέων. Οι φορείς θα πρέπει να εκθέτουν και να παρουσιάζουν τα αντιγόνα-απτένια στα Β- και Τ-κύτταρα, ώστε να διεγερθεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένας επιτυχημένος φορέας πρέπει να διαθέτει κατάλληλες λειτουργικές ομάδες για σύζευξη με τα απτένια, να προσδίδει καλή διαλυτότητα, αν και αυτό δεν αποτελεί απόλυτη απαίτηση καθώς μόρια που καθιζάνουν μπορεί να είναι ανοσογόνα, και να μην παρουσιάζει τοξικότητα.¹⁵

Οι πιο διαδεδομένοι φορείς είναι πρωτεϊνικής φύσης, όπως η αιμοκυανίνη (Key-hole Lympet Haemocyanin) και η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA),^{14,15} όμως χρησιμοποιούνται και φορείς λιπιδικής φύσης (λιποσώματα), συνθετικά ή φυσικά πολυμερή και συνθετικά οργανικά μόρια.¹⁵

Οι συνθετικοί φορείς ανοσογονικών ουσιών σχεδιάζονται ούτως ώστε να διαθέτουν κατάλληλες λειτουργικές ομάδες για να μπορούν να προσδέσουν ομοιοπολικά τα απτένια. Συνθετικοί φορείς είναι απλά πολυμερή όπως η πολυ-L-λυσίνη, το πολυ-L-γλουταμινικό οξύ, το πολλαπλό αντιγονικό πεπτίδιο (**M**ultiple **A**ntigenic **P**eptide), η δεξτράνη, η πολυαιθυλενογλυκόλη, τα δενδριμερή¹⁵ και οι επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (**S**equential **O**ligopeptide **C**arrier).

Ο φορέας SOC (Ac-(Lys-Aib-Gly)₄-OH) (Εικόνα 2.3 A) αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων Lys-Aib-Gly, τα οποία προσδίδουν συγκεκριμένες ιδιότητες στον πεπτιδικό φορέα. Η λυσίνη, μέσω της αμινομάδας στην παράπλευρη αλυσίδα της, επιτρέπει την πρόσδεση του αντιγονικού πεπτιδίου. Το αμινο-ισοβουτυρικό οξύ (Aib) ευνοεί ιδιαίτερα την επαγωγή ελικοειδούς δομής στον πεπτιδικό σκελετό, λόγω των στερεοχημικών περιορισμών που προκύπτουν από τις δυο μεθυλομάδες στον αάνθρακα.^{16–18} Επιπλέον, το Aib δεν ανήκει στα φυσικά αμινοξέα, με αποτέλεσμα να αυξάνει την ανθεκτικότητα της πεπτιδικής αλληλουχίας, στην ενζυμική αποικοδόμηση που αποτελεί συχνό πρόβλημα των πεπτιδίων *in vivo*. Τέλος, η γλυκίνη επιλέχτηκε για τον μικρό στερεοχημικό όγκο που καταλαμβάνει. Από μελέτες NMR και μοριακής δυναμικής διαπιστώθηκε ότι ο φορέας SOC υιοθετεί μια διαμόρφωση 3₁₀-έλικας με ελαφρώς καμπυλωτό άξονα,¹⁹ η οποία διατηρείται ακόμη και μετά την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων. Επίσης, βρέθηκε ότι τα προσδεμένα αντιγονικά πεπτίδια δεν αντιδρούν μεταξύ τους ή με το φορέα διατηρώντας έτσι την «ενεργή» τους διαμόρφωση και ο φορέας SOC επιβάλλει σε μερικές περιπτώσεις την επικράτηση ενός μόνο διαμορφωμερούς.^{17,20}.¹⁸

Μία παραλλαγή του SOC, ο φορέας CPSOC, Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂ (Εικόνα 2.3 B), σχεδιάστηκε για τη σύζευξη βιολογικά δραστικών πεπτιδίων ή φαρμάκων μέσω του σχηματισμού θειοαιθερικών ή δισουλφιδικών δεσμών. Η λυσίνη και το αμινο-ισοβουτυρικό οξύ, χρησιμοποιήθηκαν για τους ίδιους λόγους όπως και στον φορέα SOC, ενώ η κυστεΐνη αντικατέστησε τη γλυκίνη ώστε να είναι δυνατό να σχηματιστούν οι επιθυμητοί θειοαιθερικοί και δισουλφιδικοί δεσμοί.



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής των φορέων SOC (**A**) και CPSOC (**B**).

Τα συμπλέγματα SOC/CPSOC-δραστικών ουσιών έχουν χρησιμοποιηθεί είτε ως αντιγονικά υποστρώματα σε ανοσοχημικές μελέτες είτε ως ανοσογόνα με αρκετά καλά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, αξιόπιστες και επαναλήψιμες διαγνωστικές δοκιμασίες αναπτύχθηκαν με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και τα παραχθέντα αντισώματα αναγνωρίζουν όχι μόνο τα συμπλέγματα, αλλά και όμοιες πρωτεΐνες.^{20–22}

2.7 Απομόνωση και καθαρισμός IgY αντισωμάτων από αυγά όρνιθας

2.7.1 Διαχωρισμός του κρόκου από το ασπράδι του αυγού

Τα αυγά των ανοσοποιημένων ορνίθων συλλέγονται, πλένονται προσεχτικά με νερό και σκουπίζονται. Το κέλυφος σπάει προσεκτικά και το ασπράδι αφαιρείται αρχικά χρησιμοποιώντας ένα διαχωριστικό αυγού.¹¹ Για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα ασπραδιού, ο κρόκος ξεπλένεται με νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί, όπου αφήνεται να κυλήσει προσεχτικά. Το περιεχόμενο του κρόκου απελευθερώνεται τρυπώντας τη μεμβράνη βιτελίνης που τον περιβάλλει, η οποία συγκρατείται στο διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια ο κρόκος συλλέγεται και καταγράφεται ο όγκος του.^{11,16}

Κεφάλαιο 2°

2.7.2 Απολιπίδωση κρόκου και εκχύλιση IgY

Μέθοδος πολυαιθυλενογλυκόλης

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), ένα πολυμερές αιθυλενοξειδίου με γενικό τύπο H(OCH₂CH₂)_nOH, χρησιμοποιείται για την καταβύθιση και πήξη λιποπρωτεϊνών,^{11,13} όπου τα λιπίδια διαχωρίζονται από το διάλυμα και απομακρύνονται με φυγοκέντρηση.¹¹ Η εκχύλιση των IgY από το απολιπιδωμένο διάλυμα επιτυγχάνεται μέσω δύο περαιτέρω σταδίων προσθήκης PEG. Ενώ η αρχική συγκέντρωση PEG που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων είναι χαμηλή, για την καταβύθιση πρωτεϊνών απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις, ώστε οι πρωτεΐνες να μην μπορούν να διαλυθούν λόγω του μεγαλύτερου όγκου που καταλαμβάνουν τα μόρια PEG και ως αποτέλεσμα να καθιζάνουν όταν ξεπεραστεί το όριο διαλυτότητάς τους.¹¹ Όμως δεν προτιμάται για παραγωγή μεγάλης κλίμακας λόγω περιβαλλοντικών και οικονομικών παραγόντων.¹³

Αραίωση με νερό και καθίζηση με άλας

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη συσσωμάτωση των λιποπρωτεϊνών του κρόκου σε χαμηλές ιοντικές δυνάμεις με αποτέλεσμα να είναι αδιάλυτες στο νερό.^{11,16,17} Επιπλέον, με μείωση του pH (5-5,2), αυξάνεται η ικανότητα δέσμευσης των λιπιδίων, η ανάκτηση των IgY αυξάνεται και η ποσότητα των λιποπρωτεϊνών στο υδατοδιαλυτό κλάσμα (Water Soluble Fraction) μειώνεται.¹¹ Επίσης, η κατάψυξη του αραιωμένου κρόκου οδηγεί σε δομικές αλλαγές στα σωματίδια της λιποπρωτεΐνης, λόγω της μικρότερης διαθεσιμότητας νερού και οδηγεί στο σχηματισμό λιπιδικών συσσωματωμάτων, που είναι αρκετά μεγάλα για να απομακρυνθούν με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας.^{11,13} Το WSF διαχωρίζεται από τα λιπιδικά συστατικά με φυγοκέντρηση ή/και διήθηση. Η εκχύλιση των IgY επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος NaCl υψηλής συγκέντρωσης, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων οι πρωτεΐνες φορτίζονται, συσσωματώνονται και καθιζάνουν.¹¹ Η μέθοδος αυτή παρέχει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς δεν περιλαμβάνονται τοξικά προϊόντα, είναι γρήγορη, αποδοτική και κατάλληλη για παραγωγή μεγάλης κλίμακας.¹¹

2.7.3 Καθαρισμός IgY

Μέθοδος διαπίδυσης

Η διαπίδυση (Dialysis) χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών, αλάτων και του τυχόν υπολειπόμενου PEG.²⁶ Στηρίζεται στη χρήση ειδικών ημιπερατών μεμβρανών²⁶ (φυσικές, π.χ. κυτταρίνη, ή συνθετικές, π.χ. πολυπροπυλένιο), οι οποίες διαθέτουν πόρους διαφόρων διαστάσεων και επιλέγονται βάσει μεγέθους του υπό διαχωρισμό μακρομορίου.

Τα μικρά μόρια έχουν υψηλότερο συντελεστή διάχυσης σε σχέση με τα μεγαλύτερα και έτσι περνούν σταδιακά τη μεμβράνη και αναδύονται στο διάλυμα έξω από αυτήν.²⁸ Μόρια που έχουν μέγεθος σημαντικά μεγαλύτερο από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης διατηρούνται μέσα σε αυτήν. Έτσι, πρωτεΐνες και πεπτίδια μεγάλου μεγέθους διαχωρίζονται από ουσίες μικρότερου μεγέθους (Εικόνα 2.4).²⁷ Τα δείγματα διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη και τοποθετούνται στο εσωτερικό της μεμβράνης, η οποία εμβαπτίζεται σε ποτήρι ζέσης που περιέχει κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ή H₂O και αφήνεται υπό ανάδευση.^{26 25} Η διαπίδυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση αλάτων και μικρών μορίων από το πρωτεΐνικό μίγμα, αλλά δε διαχωρίζει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες.^{25,27}



Α. Στην αρχή της διαπίδυσης Β. Στην ισορροπία

Εικόνα 2.4. Απεικόνιση διαπίδυσης: Μεγάλα μόρια (κόκκινο) διατηρούνται μέσα στη μεμβράνη, ενώ τα μικρά (μπλε) διαχέονται στο περιβάλλον μέσο.²⁵

Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος για τον καθαρισμό και τη λήψη εξειδικευμένων αντισωμάτων, καθώς εκμεταλλεύεται τις υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεις ενός συγκεκριμένου συνδέτη (π.χ. πρωτεΐνη/πεπτίδιο) με ένα αντίσωμα.^{24,29} Έτσι, το εξειδικευμένο αντίσωμα προσδένεται εκλεκτικά, έναντι ενός μίγματος πρωτεϊνών, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα καθαρότητας σε ένα μόνο βήμα.^{11,26,31} ^{25,27,30} Η πρόσδεση του υποκαταστάτη στο πολυμερικό υπόστρωμα (π.χ. αγαρόζη, σεφαρόζη)^{29,31} πραγματοποιείται με ομοιπολικούς δεσμούς και το προϊόν αποτελεί τη σταθερή φάση της στήλης, ^{26,31} ενώ στη συνέχεια το υπό καθαρισμό δείγμα προστίθεται στη στήλη με τη βοήθεια της κινητής φάσης η οποία είναι συνήθως ένα

Κεφάλαιο 2°

πρωτεΐνη με συγγένεια για αυτόν τον υποκαταστάτη συνδέεται με τα σφαιρίδια του στερεού υποστρώματος.^{27,31} Τα ειδικά αντισώματα συγκρατούνται στη σταθερή φάση λόγω συγγένειας αντιγόνου-αντισώματος, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες του μίγματος δεν συγκρατούνται και απομακρύνονται με εκπλύσεις.^{29,31,32} Στη συνέχεια οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούονται, είτε με ανταγωνιστικά ανάλογα και παράγοντες μετουσίωσης, είτε μεταβάλλοντας το pH (π.χ. Tris-HCl pH 2,2-2,8), την ιοντική ισχύ ή την πολικότητα.^{25,30,31}



Εικόνα 2.5. Απεικόνιση του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας. Οι μη ειδικές πρωτεϊνες (μωβ και κίτρινο) δεν προσδένονται στη στήλη και απομακρύνονται με διήθηση και εκπλύσεις, ενώ τα μόρια με συγγένεια για τη στήλη (κόκκινο) εκλούονται με μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους.

2.8 Αποθήκευση και σταθερότητα των IgY

Τα αντισώματα ως πρωτεΐνες είναι ευαίσθητα στη μετουσίωση, όμως τα IgY είναι αρκετά σταθερά στη θερμότητα (15 λεπτά στους 70 °C, ή παστερίωση στους 60 °C για 3,5 λεπτά). Σε pH >4 είναι αρκετά σταθερά, αλλά σε pH 2 και 37 °C η δραστικότητα μειώνεται γρήγορα, πιθανώς λόγω διαμορφωτικών αλλαγών καθώς η πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν διασπάται, όπως αποδεικνύεται από πειράματα SDS-PAGE.¹² Επίσης, η αναστολή της δραστικότητας δεν επιβεβαιώθηκε στη χρωματογραφία συγγένειας κατά την έκλουση των αντισωμάτων με το διάλυμα Gly/HCl pH 2.3-2.5.²³ Τα αντισώματα IgY σε διάλυμα μπορούν να αποθηκευτούν για μήνες έως χρόνια στους 4 °C, με ή χωρίς την προσθήκη αναστολέων αντισώματα πρόκειται να επισημανθούν με υπεροξειδάση HRP (Horseradish Peroxidase) τότε πρέπει να καθαριστούν με διαπίδυση, καθώς μπορεί να ανασταλεί η δραστικότητά τους σε αραιώσεις πρωτογενούς αντισώματος μικρότερες από 1:1000. Επίσης, στην περίπτωση που τα αντισώματα αποθηκεύονται στους -20 °C ή -70 °C θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη-απόψυξη καθώς η δραστικότητα μειώνεται κατά 50%, γεγονός που μπορεί να αποφευχθεί είτε με την προσθήκη γλυκερίνης,¹¹ ή με αποθήκευση των δειγμάτων σε μικρότερα κλάσματα (aliquots).^{11,23} Επιπλέον, η μακροπρόθεσμη αποθήκευση αντισωμάτων σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας γίνεται συνήθως με λυοφιλιοποίηση.¹¹ Τα IgY είναι σταθερά σε εύρος pH 4-9 και θερμοκρασία έως 65 °C. Το εύρος pH και θερμοκρασίας μπορεί να επεκταθεί αν προστεθούν σταθεροποιητές όπως σάκχαρα, πολυόλες, κα.¹³

Τα IgY σε διάλυμα τείνουν να αυτοσυσσωματώνονται, αλλά αυτό δεν επηρεάζει τη συνολική δραστικότητά τους, ενώ η δραστικότητα των υψηλής καθαρότητας αντισωμάτων μειώνεται ταχύτερα από αυτή των μερικώς καθαρισμένων.¹¹

2.9 Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

Ανοσοχημικές θεωρούνται οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμεύουν στον ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό βιολογικών μορίων, συνήθως πρωτεϊνών (αντιγόνων και αντισωμάτων).^{5,33,34} Οι ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αναλυτών διακρίνονται σε: i) ιχνηθετημένες, (π.χ. χρωματομετρικές και φθορισμομετρικές τεχνικές), και ii) μη ιχνηθετημένες (π.χ. συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου, ηλεκτροχημικές τεχνικές, κα). ^{34–36 39} Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, το κόστος και την ευκολία χρήσης.³⁹

Οι ιχνηθετημένες ανοσοδοκιμασίες, χωρίζονται σε ετερογενείς και ομογενείς. Στις ομογενείς, τα αντισώματα αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα σε διάλυμα και τα δεσμευμένα αντισώματα διακρίνονται από τα μη δεσμευμένα βάσει φυσικοχημικών αλλαγών που προκύπτουν από την πρόσδεση αντισώματος-αντιγόνου.^{38,39} Μετά την ανοσοαντίδραση, δεν απαιτείται διαχωρισμός των ανοσοσυμπλεγμάτων από τις ελεύθερες μορφές αντισώματος ή αντιγόνου γιατί το αναλυτικό σήμα τροποποιείται κατά τη δέσμευση του αντιγόνου από το αντίσωμα.⁴⁰ Στις ετερογενείς, τα αντισώματα ακινητοποιούνται σε ένα στερεό υπόστρωμα και εν συνεχεία αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα.^{38,39} Μετά την ανοσοαντίδραση, το επισημασμένο μόριο διατηρεί το αναλυτικό σήμα αμετάβλητο και απαιτείται διαχωρισμός

Κεφάλαιο 2°

των ανοσοσυμπλεγμάτων από τις ελεύθερες μορφές.⁴⁰ Οι ομογενείς ανοσοδοκιμασίες προτιμώνται για τη μέτρηση μορίων μικρού μοριακού βάρους, ενώ οι ετερογενείς για μεγαλύτερα μόρια που διαθέτουν περισσότερους επίτοπους.

Η στερεή επιφάνεια στις ετερογενείς ανοσοδοκιμασίες μπορεί να είναι: πλαστικό υλικό (π.χ. πολυστυρένιο), μεμβράνη, νανοσωματίδια, κλπ. Η πρόσδεση στη στερεή επιφάνεια επιτελείται είτε μέσω προσρόφησης, είτε μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης. Οι τεχνικές προσρόφησης απαιτούν προσεκτική επιλογή των συνθηκών υπό τις οποίες εφαρμόζονται, καθώς επηρεάζονται από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς, κλπ. Επιπλέον, οι τεχνικές προσρόφησης εμφανίζουν ορισμένες φορές υψηλές τιμές μη ειδικής δέσμευσης, επηρεάζουν τη χημική ισορροπία της ειδικής αντίδρασης ιδιαίτερα όταν η σταθερά σύνδεσης αντιγόνου-ειδικού αντισώματος είναι μικρή, ενώ απαιτούν μεγάλες ποσότητες αντιδραστηρίων.

2.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) είναι τεχνική υψηλής ευαισθησίας, που επιτρέπει τον ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό κυρίως αντισωμάτων και αντιγόνων σε ένα δείγμα, κάνοντας χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.^{5,37} Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός του δείγματος και τη σύγκρισή της με μία πρότυπη καμπύλη, ενώ η ποιοτική ανάλυση παρέχει ενδείξεις για αρνητικό ή θετικό αποτέλεσμα στο δείγμα. Η ELISA ταξινομείται σε:

Άμεση ELISA (Εικόνα 2.7 Α): Η πλάκα επιστρώνεται απευθείας με το υπό προσδιορισμό αντιγόνο ή το αντίσωμα, ενώ για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιείται ένα συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα.³⁹ Η άμεση ELISA εμφανίζει μικρότερο ποσοστό λάθους εξαιτίας της εφαρμογής μικρότερου αριθμού σταδίων σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ELISA.

Έμμεση ELISA (Εικόνα 2.7 B): Η πλάκα επιστρώνεται αρχικά με το αντιγόνο, στη συνέχεια επωάζεται με το υπό προσδιορισμό αντίσωμα και για την ανίχνευση χρησιμοποιείται δευτερογενές ενζυμο-συζευγμένο αντίσωμα.^{5,39} Η έμμεση ELISA παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία δεδομένου ότι χρησιμοποιεί ενζυμο-συζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αλληλεπιδρά με το πρωτογενές αντίσωμα.

ELISA Sandwich (Εικόνα 2.7 Γ): Η πλάκα επιστρώνεται αρχικά με το αντίσωμα σύλληψης, στη συνέχεια επωάζεται με το υπό προσδιορισμό αντιγόνο, έπειτα με το αντίσωμα ανίχνευσης και τέλος με το ένζυμο-συζευγμένο αντίσωμα για την ανίχνευση. Η ELISA τύπου Sandwich είναι η πλέον ευαίσθητη τεχνική,^{5,39} καθώς κάθε αντίσωμα είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο έναντι του επιτόπου ενός αντιγόνου και είναι κατάλληλη για αντιγόνα που έχουν πολλούς επίτοπους.

Ανταγωνιστική ELISA (Εικόνα 2.7 Δ): Η πλάκα επιστρώνεται με το αντιγόνο, ενώ ταυτόχρονα το αντίσωμα επωάζεται παρουσία του αντιγόνου και στη συνέχεια το μίγμα επώασης προστίθεται στην πλάκα που φέρει το αντιγόνο. Τέλος, γίνεται επώαση με ενζυμοσυζευγμένο αντίσωμα. Η ανταγωνιστική ELISA χαρακτηρίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεή επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση με το αντίσωμα. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση αντιγόνου στο δείγμα, τόσο λιγότερο ελεύθερο αντίσωμα θα δεσμευθεί στην επικαλυμμένη με αντιγόνο πλάκα και έτσι η απορρόφηση θα είναι χαμηλότερη.⁵



Εικόνα 2.6. Απεικόνιση των τεσσάρων βασικών τύπων ELISA.

Βιβλιογραφία 2°υ Κεφαλαίου

- 1. Starr, C., Evers, C. & Starr, L. Biology: Today and Tomorrow with Physiology. (2009).
- 2. The nature of immunogens, antigens, and haptens. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* **15**, 39–41 (1985).
- 3. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. (Elyse O'Grady).
- 4. Schroeder, H. W. J. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41-52 (2010).
- 5. *Immunology: An introductory textbook.* (Pan Stanford Publishing, 2019).
- 6. Actor, J. Introductory immunology, 2nd: Basic concepts for interdisciplinary applications. (Academic Press, 2019).
- 7. Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S. & Azhar, E. I. A. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum. Vaccines Immunother*. **15**, 264–275 (2019).
- 8. Zhang, X., Calvert, R. A., Sutton, B. J. & Doré, K. A. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biol. Rev.* **92**, 2144–2156 (2017).
- 9. Schaerlinger, B. & Frippiat, J. P. IgX antibodies in the urodele amphibian Ambystoma mexicanum. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 908–915 (2008).
- 10. Warr, G. W., Magor, K. E. & Higgins, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* **16**, 392–398 (1995).
- 11. Zhang, X., Vieira-pires, R. S. & Morgan, P. M. *IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies*. *IgY-Technology: Production and Application of Egg Yolk Antibodies* (2021). doi:10.1007/978-3-030-72688-1
- 12. Carlander, D. Avian IgY Antibody. In Vitro (2002).
- 13. Kovacs-Nolan, J. & Mine, Y. Using egg IgY antibodies for health, diagnostic and other industrial applications. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products 2, (Woodhead Publishing Limited, 2011).
- 14. Schade, R. *et al.* Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. 1–26 (2005).
- 15. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (Elsevier Science & Technology, 2008).
- 16. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M. & Sakarellos-Daitsiotis, M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers* **38**, 291–293 (1996).
- 17. Tsikaris, V. *et al.* Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC(n)) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Int. J. Biol. Macromol.* **19**, 195–205 (1996).
- 18. Sakarellos-Daitsiotis, M. *et al.* Peptide carriers: A helicoid-type sequential oligopeptide carrier (SOC(n)) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides. *Methods* **19**, 133–141 (1999).
- 19. Sakarellos-Daitsiotis, M., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E. & Sakarellos, C. Artificial carriers: a strategy for constructing antigenic/immunogenic conjugates. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 1715–1735 (2006).
- 20. Tsikaris, V. *et al.* Use of sequential oligopeptide carriers (SOCn) in the design of potent Leishmania gp63 immunogenic peptides. *Pept. Res.* **9**, 240–247 (1996).
- 21. Mezö, G. *et al.* Synthesis and Comparison of Antibody Recognition of Conjugates Containing Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D Epitope VII. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1260–1269 (2003).

- 22. Jezek, J. *et al.* Fasciola gigantica cathepsin L proteinase-based synthetic peptide for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Biopolymers* **90**, 349–357 (2008).
- 23. Staak, C. *et al.* Isolation of IgY from Yolk. *Chick. Egg Yolk Antibodies, Prod. Appl.* 65–107 (2001). doi:10.1007/978-3-662-04488-9_4
- 24. De Meulenaer, B. & Huyghebaert, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. *Food Agric. Immunol.* **13**, 275–288 (2001).
- 25. Harcum, S. W. Purification of protein solutions. Biologically Inspired Textiles: A volume in Woodhead Publishing Series in Textiles (Woodhead Publishing Limited, 2008). doi:10.1533/9781845695088.1.26
- 26. Goldfingle, G. Putting it all together. Drapers 2017-Augus, 30–31 (2017).
- 27. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Lehninger's principles of biochemistry. Journal of Chemical Information and Modeling 53, (2013).
- 28. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Jr., G. J. G. & Stryer, L. Biochemistry, Ninth Edition. Biochemistry textbook (2019).
- 29. Bahadir, O., Saltan, G., Ozbilgin, S. & Ergene, B. Affinity chromatography and importance in drug discovery. in *Column Chromatography* (eds. Martin, D. F. & Martin, B. B.) (InTech, 2013). doi:10.5772/55781
- 30. Arora, S., Ayyar, B. V. & Kennedy, R. O. Chapter 35 Affi nity Chromatography for Antibody Purifi cation. **1129**, 497–516 (2014).
- 31. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. & Sharma, P. High performance liquid chromatography: A short review. *J. Glob. Pharma Technol.* **2**, 22–26 (2010).
- 32. Van Emon, J. M., Gerlach, C. L. & Bowman, K. Bioseparation and bioanalytical techniques in environmental monitoring. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **715**, 211–228 (1998).
- 33. Avrameas, S. Immunological techniques based on non-radioactive markers: past, present and future. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **330**, 303 (1988).
- Schwickart, M. & Vainshtein, I. Immunoassays. in *Nijkamp and Parnham's Principles of Immunopharmacology* (eds. Parnham, M. J., Nijkamp, F. P. & Rossi, A. G.) 243–253 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-10811-3_15
- 35. Wu, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **369**, 119–124 (2006).
- 36. Slagle, K. M. & Ghosn, S. J. Immunoassays: Tools for sensitive, specific, and accurate test results. *Lab. Med.* **27**, 177–183 (1996).
- 37. Kapoor, A. & Prabhakar, S. Immunoassays applications. *Green Sustain. Process Chem. Environ. Eng. Sci.* 161–173 (2021). doi:10.1016/b978-0-12-821883-9.00008-4
- 38. Ng, A. H. C., Uddayasankar, U. & Wheeler, A. R. Immunoassays in microfluidic systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 991–1007 (2010).
- 39. Deshpande, S. S. Immunoassay Classification and Commercial Technologies. *Enzym. Immunoassays* 231–274 (1996). doi:10.1007/978-1-4613-1169-0_8
- 40. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).

3 Πεπτιδική Σύνθεση & Χημειοεκλεκτικές Αντιδράσεις

3.1 Πρωτεΐνες – Πεπτίδια & Αμινοξέα

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια είναι πολύ σημαντικά βιομόρια, καθώς συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και βιολογικές διαδικασίες των ζωντανών οργανισμών.¹⁻³ Η βασική δομική μονάδα των φυσικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων, είναι το αμινοξύ (Εικόνα 3.1).^{2,4} Ένα α-αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα (Ca) που συνδέεται με 4 διαφορετικές ομάδες (μια αμινομάδα, μία καρβοξυλομάδα, μία παράπλευρη αλυσίδα R χαρακτηριστική για κάθε αμινοξύ και ένα άτομο υδρογόνου), σχηματίζοντας τετραεδρική γεωμετρία και ένα ασύμμετρο χειρόμορφο κέντρο (Ca).³ Τα



Εικόνα 3.1. L και D ισομερή αμινοξέων, S διαμόρφωση.

20 φυσικά αμινοξέα είναι L-χειρόμορφα, ενώ τα D-εναντιομερή τους δεν συναντώνται στις πρωτεΐνες. Τα L-αμινοξέα έχουν διαμόρφωση S (δηλαδή η φορά από τον υποκαταστάτη υψηλότερης προτεραιότητας σε αυτόν χαμηλότερης είναι αριστερόστροφη), εκτός από την κυστεΐνη που έχει R διαμόρφωση (δεξιόστροφη) και τη γλυκίνη που δεν είναι χειρόμορφη.^{1,3} Τα αμινοξέα ταξινομούνται, βάσει της παράπλευρης αλυσίδας τους, σε ουδέτερα, όξινα, βασικά, αρωματικά, θειούχα, μονο-άμινο ή μονο-καρβοξυλικά, υδρόξυ-αμινοξέα και ένα ίμινο οξύ (Εικόνα 3.2).²



Εικόνα 3.2. Ονομασία, συντακτικοί τύποι και ταξινόμηση των αμινοξέων βάσει των ιδιοτήτων τους.

Κεφάλαιο 3°

Τα πεπτίδια διακρίνονται από τις πρωτεΐνες βάσει του μικρότερου αριθμού αμινοξέων που διαθέτουν ^{2,5} και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά μόρια σε θεραπευτικές εφαρμογές (π.χ. αντιμικροβιακά, αντιθρομβωτικά, αντιοξειδωτικά, κλπ.), καθώς επίσης και ως υλικά σε διαγνωστικές εφαρμογές (χαρτογράφηση επιτόπων, παραγωγή αντισωμάτων και σχεδιασμό εμβολίων).^{1,5–10} Είναι επομένως λογική η αυξανόμενη ζήτηση στη διαθεσιμότητα των πεπτιδίων.

Τα πεπτίδια λαμβάνονται με χημική σύνθεση, με απομόνωση από φυσικές πηγές και με ανασυνδυασμένες τεχνικές πρωτεϊνικής έκφρασης.^{1,10} Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια είναι γραμμικά πολυμερή που δημιουργούνται με ομοιοπολική σύνδεση της α-καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος, σχηματίζοντας έναν πεπτιδικό (ή αμιδικό) δεσμό, που συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού. Η βιοσύνθεση των πεπτιδικών δεσμών είναι ενδόθερμη και απαιτεί ενέργεια (~4 kcal/mol) για να πραγματοποιηθεί.² Έτσι, ο *in vitro* σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού γίνεται αυξάνοντας την ενέργεια της α-καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος με χρήση αντιδραστηρίων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου.

3.2 Χημική σύνθεση πεπτιδίων

Η χημική σύνθεση των πεπτιδίων, ανάλογα με τη φάση στην οποία πραγματοποιούνται οι διάφορες διεργασίες, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: 1. Σύνθεση σε διάλυμα (Liquid-Phase Peptide Synthesis) κατά την οποία όλες οι διεργασίες γίνονται σε υγρή φάση.^{6,7} Τα ενδιάμεσα προϊόντα μπορούν να καθαριστούν με εκχύλιση, κρυστάλλωση και χρωματογραφία, μειώνοντας όμως σημαντικά την τελική απόδοση.¹¹ 2. Σύνθεση σε στερεή φάση (Solid-Phase Peptide Synthesis), κατά την οποία ένα αμινοξύ μπορεί να συνδεθεί πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα, όπου και πραγματοποιούνται στη συνέχεια όλες οι διεργασίες επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας.^{7,12,13} Η σύνθεση στερεάς φάσης χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της καλύτερης απόδοσης, των λιγότερων παραπροϊόντων και της εύκολης απομάκρυνσης αντιδραστηρίων και διαλυτών.^{5,6} Στην SPPS χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές η Fmoc/tBu και η και Boc/Bzl. Από τις δύο στρατηγικές που πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων (TFA αντί HF).^{7,8,14}

3.3 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης (Solid-Phase Peptide Synthesis) πραγματοποιείται σε ειδικό γυάλινο σωλήνα με ηθμό (vessel), ώστε να συγκρατεί το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα ενώ οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια απομακρύνονται εύκολα με διήθηση υπό κενό. Στην Fmoc/tBu στρατηγική, οι κόκκοι του πολυμερούς διογκώνονται με κατάλληλους διαλύτες (π.χ. DMF/DCM) και έπειτα απομακρύνεται η Fmoc προστασία της δραστικής ομάδας της ρητίνης σε βασικές συνθήκες. Στη συνέχεια, αφού πρώτα γίνει ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του πρώτου αμινοξέος με το κατάλληλο αντιδραστήριο σύζευξης (καρβοδιϊμίδιο ή φωσφονικό/ουρονικό παράγωγο), αυτό συνδέεται ομοιοπολικά στο στερεό πολυμερικό υπόστρωμα (αμιδικός δεσμός). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ της δραστικής ομάδας της ρητίνης και της α-καρβοξυλομάδας του αμινοξέος.^{1,5,14–16} Η Ν^α-Fmoc προστασία του πρώτου αμινοξέος απομακρύνεται και προστίθεται το επόμενο ενεργοποιημένο αμινοξύ με αντίδραση της Ν^α-αμινομάδας του πρώτου αμινοξέος και της ακαρβοξυλομάδας του επόμενου.

Ενδιάμεσα από κάθε σύζευξη ή απομάκρυνση της N^α-Fmoc προστατευτικής ομάδας, γίνονται εκπλύσεις με κατάλληλους διαλύτες (DMF, DCM) για την απομάκρυνση περίσσειας αντιδραστηρίων, παραπροϊόντων και διαλυτών. Ο κύκλος αυτών των διεργασιών επαναλαμβάνεται έως ότου σχηματιστεί το επιθυμητό πεπτίδιο.⁸ Ακολουθεί ο διαχωρισμός του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων (Σχήμα 3.1),^{1,5,14} ενώ το τελευταίο στάδιο είναι ο καθαρισμός και η απομόνωση του επιθυμητού πεπτιδίου.



Σχήμα 3.1. Πορεία SPPS με Fmoc/tBu στρατηγική. R: παράπλευρη αλυσίδα και P: προστασία παράπλευρης αλυσίδας.

Κεφάλαιο 3°

3.3.1 Στερεό Πολυμερικό Υπόστρωμα

Τα στερεά πολυμερικά υποστρώματα (ή ρητίνες), πάνω στα οποία λαμβάνει χώρα η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας, ποικίλλουν και επιλέγονται ανάλογα με την τελική επιθυμητή μορφή του πεπτιδίου (ελεύθερο καρβοξύλιο ή αμίδιο). Οι δύο ρητίνες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η Wang και η Rink Amide, οδηγώντας σε ελεύθερο καρβοξύλιο και αμίδιο, αντίστοιχα.^{5,8,14} Παραλλαγή της Rink Amide αποτελεί η Rink Amide AM, η οποία εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα στις ισχυρά όξινες συνθήκες.¹⁷

3.3.2 Προστατευτικές ομάδες

Η προστασία των αμινοξικών τμημάτων είναι απαραίτητη για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων και πρέπει να είναι ορθογωνική. Αυτό σημαίνει ότι η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας της Να-αμινομάδας δεν επηρεάζει τις προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων. Ορθογωνική προστασία παρέχουν οι στρατηγικές Fmoc/tBu και Boc/Bzl.^{1,5,8,14} Οι προστατευτικές ομάδες θα πρέπει να μειώνουν τη δραστικότητα της υπό προστασία ομάδας, να είναι σταθερές στις συνθήκες της σύνθεσης και να απομακρύνονται εύκολα. Ανάλογα με τη δραστική ομάδα που προστατευτικές (aπαραίτητες κυρίως στην υγρή φάση) και σε προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων (π.χ. Lys (ε-NH₂), Asp (β-COOH), Cys (-SH), κλπ.). Ορισμένες προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων που χρησιμοποιούνται στην Fmoc-SPPS φαίνονται στον Πίνακα 3.1.^{1,8,14}

Προστατευτικές ομάδες	Αμινοξέα	Απομάκρυνση
tBu	Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu	TFA
Trt	Cys, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr	TFA
Mmt, Mtt	Cys, Lys, His	Αραιό διάλυμα TFA
Acm	Cys	I_2 , $Tl(TFA)_3$
Boc	Lys, Trp	TFA
Pbf	Arg	TFA

Πίνακας 3.1. Προστατευτικές ομάδες παράπλευρων αλυσίδων και συνθήκες απομάκρυνσης.

Η Fmoc-N^α προστασία απομακρύνεται σε βασικές συνθήκες (π.χ. 20% πιπεριδίνη ή 4μεθυλ-πιπεριδίνη/DMF) σε δύο στάδια (Σχήμα 3.2).⁶ Η πιπεριδίνη αποσπά το όξινο υδρογόνο της Fmoc, σχηματίζοντας ένα δραστικό ενδιάμεσο (διβενζοφουλβένιο, DBF) που παγιδεύεται από τη δευτεροταγή αμίνη. Η N^α πρωτονιώνεται και σχηματίζεται μια -NH₂ ομάδα. Η αντίδραση λειτουργεί καλύτερα σε έναν πολικό διαλύτη, δότη ηλεκτρονίων (π.χ. DMF), συγκριτικά με έναν μη πολικό (π.χ. DCM).¹⁸



Σχήμα 3.2. Μηχανισμός απομάκρυνσης της Fmoc- προστατετυτικής ομάδας σε βασικές συνθήκες.

Για την ταυτοποίηση της απομάκρυνσης της Fmoc πραγματοποιούνται δοκιμές χρωματομέτρησης της ρητίνης, όπως είναι το Test Kaiser,¹⁹ το οποίο ανιχνεύει πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες. Όταν η ρητίνη που φέρει μια αμινομάδα κατεργαστεί με νινυδρίνη, τότε το διάλυμα παίρνει ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα για πρωτοταγείς αμίνες ή καφέ χρώμα που αντιστοιχεί σε μη κλασικά προϊόντα για τις δευτεροταγείς αμίνες.⁶ Η δοκιμή βασίζεται στην αντίδραση τρανσαμίνωσης-αποκαρβοξυλίωσης της νινυδρίνης με τα αμινοξέα (Σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3. Μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης με ελεύθερες αμινομάδες (test Kaiser).

3.3.3 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού-Αντιδραστήρια Σύζευξης

Για την αντίδραση σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση μιας από τις δραστικές ομάδες, συνήθως της καρβοξυλομάδας, η οποία μετατρέπεται σε κάποιο παράγωγο καρβοξυλικού οξέος. Η μετατροπή αυτή γίνεται με αντικατάσταση της καρβοξυλομάδας από έναν υποκαταστάτη, ο οποίος έλκει ηλεκτρόνια και αυτό προκαλεί

Κεφάλαιο 3°

την αύξηση της πολικότητας της καρβοξυλομάδας και κατά συνέπεια του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου του άνθρακα. Έτσι διευκολύνεται η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να ακυλιωθεί.

Οι κυριότερες μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού είναι οι εξής: i) Μέθοδος χλωριδίων, ii) Μέθοδος αζιδίων, iii) Μέθοδος ανυδριτών, iv) Μέθοδος ενεργών εστέρων, v) Αντιδραστήρια σύζευξης.²⁰ Η προτιμότερη μέθοδος είναι αυτή των αντιδραστηρίων σύζευξης, καθώς προστίθενται στο μίγμα του καρβοξυλο- και του αμινο-συστατικού, ώστε η ενεργοποίηση και η σύζευξη να προχωρούν ταυτόχρονα (in situ). Οι κυριότερες κατηγορίες αντιδραστηρίων σύζευξης είναι τα καρβοδιιμίδια και τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα.^{3,5,21}

3.3.3.1 Καρβοδιϊμίδια

Η αντίδραση των αμινοξέων με τα καρβοδιϊμίδια περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ηλεκτρονιόφιλου άνθρακα του καρβοδιϊμιδίου από την καρβοξυλομάδα του αμινοξέος που πρόκειται να εισαχθεί στην πεπτιδική αλυσίδα.⁶ Το ενδιάμεσο της αντίδρασης, Ο- ακυλισοουρία, υφίσταται πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινο-συστατικό (αμινομάδα ρητίνης ή αμινοξέος) οδηγώντας στο επιθυμητό πεπτίδιο (Σχήμα 3.4).⁶



Σχήμα 3.4. Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού με χρήση καρβοδιϊμιδίων, σχηματισμός Ν-ακυλο-ουρίας και δράση βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt προς αποφυγή ρακεμοποίησης.

Όμως, η Ο-ακυλισοουρία τείνει να σχηματίζει οξαζολόνη, που συνεπάγεται ρακεμοποίηση προς σχηματισμό της Ν-ακυλοουρίας,⁸ η οποία απομακρύνεται δύσκολα. Προς αποφυγή της ρακεμοποίησης χρησιμοποιούνται πυρηνόφιλα υδροξυπαράγωγα, από τα οποία το πιο διαδεδομένο είναι το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt) (Σχήμα 3.4).^{5,6} Το HOBt μειώνει το χρόνο ζωής του ενδιάμεσου παραγώγου της Ο-άκυλο-ισοουρίας και επομένως το σχηματισμό των παραγώγων της Ν-ακυλοουρίας. Επίσης, συμβάλλει στην οπτική

καθαρότητα των αμινοξέων, καθώς ως ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα και βοηθάει στη δημιουργία ενός πιο δραστικού και ισχυρού ακυλιωτικού μέσου, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση σύζευξης και αποτρέπει το σχηματισμό ανεπιθύμητων αντιδράσεων.²¹

Στην BOC/Bzl στρατηγική χρησιμοποιείται το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC), ενώ στην Fmoc/tBu στρατηγική χρησιμοποιείται το N,N'-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), το οποίο αντιδρά με το HOBt ταχύτερα και με καλύτερες αποδόσεις.

3.3.3.2 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα μετατρέπουν τα Fmoc-αμινοξέα στους αντίστοιχους εστέρες, παρουσία μιας τριτοταγούς οργανικής βάσης, όπως της N,N-διισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA) σε DMF, η οποία απομακρύνει το όξινο πρωτόνιο του Fmoc-αμινοξέος.^{6,21} Στη συνέχεια, το αποπρωτονιωμένο Fmoc-αμινοξύ προστίθεται στο φωσφονικό/ουρονικό παράγωγο, προάγοντας την αποβολή ενός παραγώγου τριαζολίου. Τέλος, το παράγωγο υδροξυβενζοτριαζολίου προστίθεται στην καρβονυλομάδα του Fmoc-αμινοξέος, και με πυρηνόφιλη υποκατάσταση σχηματίζεται το ενεργοποιημένο Fmoc-αμινοξύ (Σχήμα 3.5).⁶



Σχήμα 3.5. Μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού με το HBTU και αποφυγή ρακεμοποίησης με το βοηθητικό πυρηνόφιλο HOBt.

Κεφάλαιο 3°

Όμως, εξαιτίας των βασικών συνθηκών αυξάνεται ο κίνδυνος της ρακεμοποίησης, μέσω οξαζολόνης, η οποία μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση HOBt που αποπρωτονιώνει τη σχηματιζόμενη οξαζολόνη.^{6,21} Στα φωσφονικά παράγωγα ανήκει το 1-Η-βενζοτριαζολυλο-N-οξυ-τρι(πυρρολιδινο) φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP), ενώ στα ουρονικά παράγωγα ανήκουν το εξαφωσφορικό άλας της 2-(1Η-βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3τετραμεθυλουρίας (HBTU), το τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1Η-βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3τετραμεθυλουρίας (TBTU) και το εξαφωσφορικό άλας της Ο-(7-αζοβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3τετραμεθυλουρίας (HATU).^{5,6}

3.3.4 Αποκοπή Πεπτιδίου Από τη Ρητίνη- Παραλαβή στερεού πεπτιδίου

Για το διαχωρισμό του πεπτιδίου από το πολυμερικό υπόστρωμα, απαιτούνται όξινες συνθήκες, στις οποίες είναι δυνατή και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων.⁶ Στη στερεή φάση με την Fmoc/tBu στρατηγική, η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με TFA¹¹ (Σχήμα 3.6).

Ωστόσο αυτή η διαδικασία δημιουργεί καρβοκατιόντα, που είναι επιρρεπή σε αλκυλίωση και έχει ως αποτέλεσμα παραπροϊόντα, μικρή απόδοση και καθαρότητα του επιθυμητού μορίου.^{5,6} Για την αποφυγή όλων αυτών, συνιστάται η χρήση μίγματος πυρηνόφιλων «δεσμευτών» (scavengers) κατιόντων, παρέχοντας εκλεκτική προστασία έναντι συγκεκριμένων παράπλευρων αντιδράσεων (Σχήμα 3.6).⁶ Τέτοιες ενώσεις είναι το H₂O, η ανισόλη, η θειοανισόλη, η 2-μερκαπτοαιθανόλη, η 1,2-αιθανοδιθειόλη, η διθειοθρεϊτόλη και το τριισοπροπυλοσιλάνιο.^{5,6,22} Συνήθως χρησιμοποιούνται περισσότεροι του ενός «δεσμευτές». Εκτός από τους «δεσμευτές» κατιόντων, χρήσιμη αποδεικνύεται και η προσθήκη DMB που προστατεύει τη ρητίνη από αποικοδόμηση.¹⁷



Σχήμα 3.6. Μηχανισμός αποκοπής πεπτιδίου από τη ρητίνη και δράση των δεσμευτών κατιόντων.

Μετά την αντίδραση αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη, ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών, έκπλυση σε διισοπροπυλ-αιθέρα, εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα οξέος (για τη διατήρηση του πεπτιδίου υπό ελαφρά όξινη κατάσταση) και λυοφιλιοποίηση.⁶

Η SPPS έχει αποδειχτεί η καλύτερη μέθοδος για τη σύνθεση μικρών πεπτιδίων, ωστόσο για τη σύνθεση πρωτεϊνών ή μεγαλύτερων πεπτιδίων μπορεί να εφαρμοστεί είτε η συμπύκνωση πεπτιδικών τμημάτων είτε οι χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις πεπτιδίων.^{1,8} Από τις δύο προσεγγίσεις, οι χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις υπερτερούν καθώς δεν απαιτούν αντιδραστήρια σύζευξης και προστασία στις παράπλευρες αμινοξικές αλυσίδες.¹

3.4 Χημειοεκλεκτικές Αντιδράσεις – Θειοαιθερικός δεσμός

Οι χημειοεκλεκτικές (chemoselective) αντιδράσεις είναι αντιδράσεις κατά τις οποίες μία λειτουργική ομάδα αντιδρά κατά προτίμηση έναντι μίας άλλης.²³ Για τη δημιουργία αμιδικού δεσμού υπάρχουν πολλές μέθοδοι σύνδεσης πεπτιδικών τμημάτων, όπως η φυσική χημική σύνδεση (Native Chemical Ligation) και η σύνδεση σερίνης/θρεονίνης (STL), κλπ.¹ Ωστόσο χρήσιμες αποδεικνύονται και οι μη φυσικές χημικές συνδέσεις που οδηγούν σε μη αμιδικούς δεσμούς, όπως ο δεσμός θειοεστέρα, θειοαιθέρα, δισουλφιδίου, υδραζόνης, οξίμης και ψευδοπρολίνης.^{3,11}

Ο θειοαιθερικός δεσμός είναι ιδανικός για τις πειραματικές μελέτες πεπτιδίων και για το σχεδιασμό φαρμακευτικών πεπτιδικών αναλόγων, καθώς εμφανίζει σταθερότητα *in vivo*, δηλαδή είναι ανθεκτικός στην ενζυμική αποικοδόμηση και επιπλέον δεν επηρεάζεται από ενδοκυττάριες και εξωκυττάριες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπως συμβαίνει με τον δισουλφιδικό δεσμό.²⁴

Στη σύνθεση πεπτιδικών μακρομορίων, για το σχηματισμό διαμοριακού θειοαιθερικού δεσμού, απαιτείται μία ελεύθερη θειολομάδα (-SH) σε ένα πεπτίδιο και μία αλογονο- ακετυλιωμένη αμινομάδα σε ένα άλλο πεπτίδιο.

Η αλογονο-ακετυλίωση συνήθως γίνεται σε στερεή φάση όπου οι δραστικές ομάδες του πεπτιδίου είναι προστατευμένες για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Ο μηχανισμός (Σχήμα 3.7) περιλαμβάνει την προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα του αλογονο-οξικού παραγώγου από την ελεύθερη αμινομάδα του πεπτιδίου.



Σχήμα 3.7. Μηχανισμός ιωδοακετυλίωσης της Να-αμινομάδας.

Υπάρχουν διάφορα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό ενός αλογονο-ακετυλιωμένου πεπτιδίου, όπως τα αλογονοακέτυλο αλογονίδια (XCOCH₂X),²⁵ τα αλογονοξέα (XCH₂COOH)²⁴ και οι αλογονοξικοί ανυδρίτες (XCH₂CO)₂O²⁶. Τα αντιδραστήρια αυτά χρησιμοποιούνται σε περίσσεια ισοδυνάμων αλογονιδίου για κάθε αμινομάδα.²⁴ Η αλογονοακετυλίωση με αλογονοξέα, απαιτεί την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης και το σχηματισμό του αντίστοιχου ανυδρίτη μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αντίδραση. Συνήθως χρησιμοποιείται το DIC ως αντιδραστήριο σύζευξης.^{28,29} Για την διεξαγωγή της αντίδρασης χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMF ή DCM ή μίγμα αυτών. Η αντίδραση γίνεται υπό αδρανείς συνθήκες, καθώς τα αντιδραστήρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στον ατμοσφαιρικό αέρα και στο φως.²⁴ Το αλογονοξικό οξύ διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και προστίθεται το DIC. Η αναλογία των αντιδραστηρίων XCH₂COOH/DIC μπορεί να είναι 1/1 ή 2/1.

Ο θειοαιθερικός δεσμός σχηματίζεται σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες με την προσβολή του άνθρακα (XCH₂-) του αλογονο-ακετυλιωμένου πεπτιδίου από την ελεύθερη θειολομάδα της κυστεΐνης του άλλου πεπτιδίου, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου HX (Σχήμα 3.8).



Σχήμα 3.8. Μηχανισμός σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού.

Ο σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού, μεταξύ μίας θειολομάδας και ενός ιωδοακετυλιωμένου πεπτιδίου, λαμβάνει χώρα σε σχετικά μη παρεμποδισμένες θέσεις και εξαρτάται από:

1. Τη δραστικότητα του πυρηνόφιλου: τα θειολικά ανιόντα ανήκουν στα πιο δραστικά πυρηνόφιλα υπερβαίνοντας σε μεγάλο βαθμό τη δραστικότητα οποιουδήποτε άλλου πυρηνόφιλου στις πρωτεΐνες (~7 φορές δραστικότερα από τα - OH) και έτσι οι αποδόσεις σε S_N2 αντιδράσεις είναι πολύ υψηλές.²⁷ Δεδομένου ότι σε αλκαλικό περιβάλλον οι ελεύθερες σουλφιδρυλομάδες μπορούν να σχηματίσουν δισουλφιδική γέφυρα (δηλαδή διμερές πεπτίδιο), συνιστάται η χρήση πυκνών διαλυμάτων ιωδοακετυλιωμένου πεπτιδίου, καθώς η δραστικότητα της αλογονοακετυλο ομάδας είναι μεγαλύτερη από αυτή της
σουλφιδρυλομάδας και αυτό συνεπάγεται την ταχύτερη αντίδραση σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού. Όμως, η περίσσεια της ιωδοακετυλομάδας μπορεί να αντιδράσει με τις παράπλευρες αμινοξικές αλυσίδες (π.χ. αμινομάδες, ιμιδαζολυλικά άζωτα), με χαμηλή κινητική ωστόσο, για αυτό ο χρόνος της αντίδρασης είναι σημαντικός.

2. Την αποχωρούσα ομάδα: όσο πιο εύκολα αποχωρεί η αλογονομάδα, τόσο αυξάνεται η ταχύτητα της αντίδρασης, καθώς σταθεροποιείται καλύτερα το αρνητικό φορτίο. Δεδομένου ότι το ιώδιο είναι το μεγαλύτερο αλογονίδιο (F⁻<Cl⁻<Br⁻<I⁻), αναμένεται να είναι η καλύτερη αποχωρούσα ομάδα και να σταθεροποιείται καλύτερα το σχηματιζόμενο ανιόν και τα ιωδοακέτυλο-πεπτίδια να είναι πιο δραστικά.²⁷

3. Το pH: για το σχηματισμό του θειοαιθερικού δεσμού απαιτούνται ήπιες αλκαλικές συνθήκες (pH 7-9).²⁷ Όσο αυξάνεται η τιμή του pH, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση του θειοανιόντος στο διάλυμα της αντίδρασης και επομένως η πυρηνόφιλη προσβολή της σουλφιδρυλομάδας γίνεται ταχύτατα. Η ρύθμιση και παρακολούθηση του pH κρίνεται απαραίτητη διότι i) κατά την αντίδραση ελευθερώνεται οξύ, το οποίο μπορεί να μειώσει το pH, ii) όταν το pH της αντίδρασης υπερβαίνει το 9 υπάρχει κίνδυνος διμερισμού του πεπτιδίου (δισουλφιδική γέφυρα). Το ευνοϊκότερο pH είναι το 8.2 (pKa θειολομάδας κυστεΐνης: 8.2).²⁷ Η αντίδραση τερματίζεται μειώνοντας το pH.

4. Το διαλύτη: ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης πρέπει να διαλύει πλήρως τα αντιδρώντα. Ορισμένα πεπτίδια δεν έχουν καλή διαλυτότητα στα ρυθμιστικά διαλύματα. Η χρήση οργανικών διαλυτών, που να αναμιγνύονται πλήρως με υδατικά διαλύματα (π.χ. ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, DMF), αυξάνει τη διαλυτότητα των πεπτιδίων, οδηγώντας σε πιο ολοκληρωμένες αντιδράσεις. Επιπλέον, η χρήση πολικών ή/και πρωτικών διαλυτών επιβραδύνει την S_N2 αντίδραση, διότι επιδιαλυτώνουν και σταθεροποιούν καλύτερα το ανιονικό πυρηνόφιλο -σε σχέση με τη μεταβατική κατάσταση- και έτσι δεν ευνοείται η S_N2 αντίδραση. Αντιθέτως, η παρουσία πολικών απρωτικών διαλυτών (π.χ. DMSO, DMF, CH₃CN) στο διάλυμα της αντίδρασης μειώνει το ενεργειακό φράγμα της μεταβατικής κατάστασης και επιταχύνει το σχηματισμό θειοαιθερικού δεσμού.

5. Ατμοσφαιρικές συνθήκες: Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό τη συνεχή παροχή ενός αδρανούς αερίου, για την αποφυγή σχηματισμού διμερών παραπροϊόντων οξείδωσης.

3.5 Τεχνικές Απομόνωσης και Ταυτοποίησης Πεπτιδίων & Πρωτεϊνών

3.5.1 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ανόργανων και οργανικών ενώσεων, μεταξύ των οποίων τα πεπτίδια.^{10,30,31} Οι χημικές και δομικές πληροφορίες της αναλυόμενης ουσίας λαμβάνονται μετρώντας τις τιμές του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) των φορτισμένων μορίων και την αφθονίας τους. Ο λόγος m/z είναι χαρακτηριστικός για κάθε μόριο και η μέτρηση εμφανίζει μεγάλη ακρίβεια.^{30,32}

Συνοπτικά, η διαδικασία για τη λήψη ενός φάσματος μάζας είναι η εξής: Το δείγμα εισάγεται στην πηγή ιονισμού, η οποία παράγει ιόντα σε αέρια φάση.^{10,30,33–36} Η καλύτερη μέθοδος ιονισμού για τα πεπτίδια είναι ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization), κατά τον οποίο το δείγμα ψεκάζεται και διέρχεται από έναν τριχοειδή σωλήνα.^{10,34} Μεταξύ του σωλήνα και ενός βοηθητικού ηλεκτροδίου εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού ώστε να προκύψει το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο και κατά συνέπεια η μετατροπή των εισερχόμενων συστατικών σε ιόντα (θετικά ή αρνητικά φορτισμένα). Έπειτα, καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια κινούνται προς το βοηθητικό ηλεκτρόδιο, ο διαλύτης εξατμίζεται, εξαιτίας της εφαρμοζόμενης θερμοκρασίας. Τα ιόντα επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο m/z, σε θάλαμο κενού.^{10,30,31,34,35,37} Ένας από τους πιο διαδεδομένους αναλυτές είναι ο γραμμικός τετραπολικός αναλυτής.^{31,37} Τα διαχωρισμένα ιόντα λαμβάνονται από τον ανιχνευτή και προσδιορίζονται ανάλογα με τη σχετική αφθονία τους.^{30,31,33,34,37} Το ηλεκτρικό σήμα καταγράφεται και τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως γράφημα της έντασης του σήματος έναντι του λόγου m/z (φάσμα μάζας).³³ Ο λόγος m/z υπολογίζεται από τον τύπο: m/z = $(m\pm nH^+)/n$, όπου m: η μοριακή μάζα του δείγματος, n: ο αριθμός των θετικών ή αρνητικών φορτίων και Η⁺: η μάζα του πρωτονίου.^{10,33,34}

3.5.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Οι μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των πεπτιδίων είναι κυρίως χρωματογραφικές και εκμεταλλεύονται τις διαφορές στο μέγεθος, την πολικότητα, τη χημική/βιολογική συγγένεια ή άλλες ιδιότητές τους.^{2,10,38,39} Μία βελτιωμένη χρωματογραφία στήλης είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**H**igh **P**erformance **L**iquid Chromatography, HPLC).^{2,10,40} Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στη διαφορά των συντελεστών κατανομής των δύο φάσεων. Ανάλογα με το υπόστρωμα (στατική φάση) και τη σχέση της πολικότητας στατικής-κινητής φάσης, η HPLC ταξινομείται σε:

- ΗΡLC κανονικής φάσης (Normal phase): Η στατική φάση είναι πολική (π.χ. silica) και η κινητή φάση είναι μη πολική (π.χ. εξάνιο, διαιθυλαιθέρας).^{40,41} Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ικανότητα της αναλυόμενης ουσίας να εμπλέκεται σε πολικές αλληλεπιδράσεις (π.χ., δεσμούς υδρογόνου ή αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου) με την επιφάνεια της στατικής φάσης. Οι πολικές ενώσεις προσροφώνται ισχυρότερα στο πυρίτιο, συγκριτικά με τις μη πολικές, δηλαδή εκλούονται πιο αργά από τη στήλη.^{39,41}
- 2. HPLC ανάστροφης φάσης (Reversed phase): Είναι η πιο διαδεδομένη για τα πεπτίδια.⁴¹ Η κινητή φάση είναι μέτρια πολική, αποτελούμενη από μίγμα διαλυτών (π.χ. ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό), ενώ η στατική φάση είναι μη πολική (π.χ. πολυμερή σίλικας) και διαθέτει αλειφατικές ομάδες που αποτελούνται από 4, 6, 8 και 18 άτομα άνθρακα και οι αντίστοιχες στήλες ονομάζονται C4, C6, C8 και C18 αντίστοιχα.⁴¹ Η RP-HPLC βασίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δηλαδή τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ ενός πολικού μέσου έκλουσης, του αναλύτη και της μη πολικής στατικής φάσης.³⁹ Οι μη πολικές ενώσεις είναι λιγότερο διαλυτές στην κινητή φάση, ενώ έλκονται από τις ομάδες υδρογονανθράκων της στατικής φάσης λόγω δυνάμεων van der Waals. Ως εκ τούτου, το πέρασμά τους από τη στήλη επιβραδύνεται, δηλαδή έχουν μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης.^{40,41}

Συνοπτικά η διαδικασία καθαρισμού με HPLC περιλαμβάνει τα εξής: Το προς ανάλυση δείγμα (όγκου 0,1-100 ml) διαβιβάζεται υπό υψηλή πίεση στην HPLC με το σύστημα έγχυσης που παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης.^{40,41} Το δείγμα εισάγεται στο βρόγχο (loop) και μεταφέρεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στη στήλη.⁴⁰ Το δείγμα εισάγεται στο σύστημα έκλουσης, το οποίο διαβιβάζεται συνεχόμενα με σταθερή ροή και υπό υψηλή πίεση στη στήλη με τη βοήθεια της αντλίας.^{2,10,39–41} Ορισμένες αντλίες συνδυάζουν πολυάριθμους διαλύτες, σε αναλογίες μεταβαλλόμενες στο χρόνο, δημιουργώντας μία βαθμιδωτή σύνθεση κινητής φάσης.⁴⁰ Καθώς διέρχεται η κινητή φάση από τη στήλη, κάθε συστατικό του δείγματος εκλούεται και ανιχνεύεται από έναν κατάλληλο ανιχνευτή που προσδιορίζει τους μοριακούς χρόνους κατακράτησης, βάσει ιδιοτήτων απορρόφησης, φθορισμού, μάζας, κα.^{39–41} Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας που διέρχεται από τον ανιχνευτή.^{39,40}

Βιβλιογραφία 3°υ Κεφαλαίου

- 1. Jaradat, D. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids* **50**, 39–68 (2018).
- 2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Jr., G. J. G. & Stryer, L. *Biochemistry, Ninth Edition. Biochemistry textbook* (2019).
- 3. Benoiton, N. L. *et al. C Hemistry of P Eptide. Nanomedicine* **2**, (2014).
- 4. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (Elsevier Science & Technology, 2008).
- 5. Petrou, C. & Sarigiannis, Y. *Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges. Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (Elsevier Ltd, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-100736-5.00001-6
- 6. Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P. & Do Nascimento, C. J. Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **20**, 53–69 (2014).
- 7. Isidro-Llobet, A. *et al.* Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production. *J. Org. Chem.* **84**, 4615–4628 (2019).
- 8. Hansen, P. R. & Oddo, A. Chapter 5 Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. **1348**, (2015).
- 9. Behrendt, R., White, P. & Offer, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **22**, 4–27 (2016).
- 10. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Lehninger's principles of biochemistry. Journal of Chemical Information and Modeling 53, (2013).
- 11. Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 211–221 (2004).
- 12. Fields, G. B. & Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161–214 (1990).
- 13. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
- 14. Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **33**, 239–254 (2006).
- 15. Miranda, L. P. & Alewood, P. F. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 1181 LP 1186 (1999).
- 16. Hudson, D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.* **53**, 617–624 (1988).
- 17. Stathopoulos, P., Papas, S. & Tsikaris, V. C-terminal N-alkylated peptide amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. A new cleavage mixture prevents their formation. *J. Pept. Sci.* **12**, 227–232 (2006).
- 18. Luna, O. F. *et al.* Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: Moving away from piperidine? *Molecules* **21**, 1–12 (2016).
- 19. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595–598 (1970).
- 20. Bodansky, M. In search of new methods in peptide synthesis. *Int. J. Pept. Res.* **25**, 449–479 (1985).
- 21. Al-Warhi, T. I., Al-Hazimi, H. M. A. & El-Faham, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **16**, 97–116 (2012).
- 22. Chan, W. C. & White, P. Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. in (2000).

- 23. The International Union of Pure Applied Chemistry (iupac), chemoselectivity (chemoselective). in *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014). doi:10.1351/goldbook.c01051
- 24. Papadopoulos, C. *et al*. Intracellular targets: A multiple cargo transporting molecule. *J. Pept. Sci*. 1–12 (2021). doi:10.1002/psc.3359
- 25. Gazal, S., Gellerman, G., Glukhov, E. & Gilon, C. Synthesis of novel protected Nalpha(omega-thioalkyl) amino acid building units and their incorporation in backbone cyclic disulfide and thioetheric bridged peptides. *J. Pept. Res.* **58**, 527–539 (2001).
- Shogren-Knaak, M. A., McDonnell, K. A. & Imperiali, B. α-Chloroacetyl capping of peptides: an N-terminal capping strategy suitable for Edman sequencing. *Tetrahedron Lett.* 41, 827–829 (2000).
- 27. Brunel, F. M. & Dawson, P. E. Synthesis of constrained helical peptides by thioether ligation: Application to analogs of gp41. *Chem. Commun.* 2552–2554 (2005). doi:10.1039/b419015g
- 28. Bonnet, D., Thiam, K., Loing, E., Melnyk, O. & Gras-Masse, H. Synthesis by chemoselective ligation and biological evaluation of novel cell-permeable PKC-ζ pseudosubstrate lipopeptides. *J. Med. Chem.* **44**, 468–471 (2001).
- 29. Koniev, O. & Wagner, A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 5495–5551 (2015).
- 30. Awad, H., Khamis, M. M. & El-Aneed, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Appl. Spectrosc. Rev.* **50**, 158–175 (2015).
- 31. Gross, J. H. Jürgen H. Gross Mass Spectrometry. (2004).
- 32. Garrett, R. H. & Grisham, C. M. Biochemistry. (Brooks/Cole, 2010).
- 33. Sengupta, P., Khanra, K., Chowdhury, A. R. & Datta, P. *Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications. Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices Fabrication, Applications and Reliability* (Elsevier Ltd, 2019). doi:10.1016/B978-0-08-102420-1.00004-2
- 34. Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 1–40 (2012).
- 35. Noda, M., Fukui, K. & Uchiyama, S. Mass Spectrometry. in *Springer Protocols Handbooks* (eds. Senda, T. & Maenaka, K.) 185–198 (Springer Japan, 2016). doi:10.1007/978-4-431-56030-2_11
- 36. Chen, T., Yao, Q., Nasaruddin, R. R. & Xie, J. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Powerful Platform for Noble-Metal Nanocluster Analysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **58**, 11967–11977 (2019).
- 37. Ashcroft, A. E. & Barnett, N. W. *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*. (The Royal Society of Chemistry, 1997). doi:10.1039/9781847551191
- 38. Arora, S., Ayyar, B. V. & Kennedy, R. O. Chapter 35 Affi nity Chromatography for Antibody Purifi cation. **1129**, 497–516 (2014).
- 39. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. & Sharma, P. High performance liquid chromatography: A short review. *J. Glob. Pharma Technol.* **2**, 22–26 (2010).
- 40. Thammana, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Res. Rev. J. Pharm. Anal.* **5**, 1–7 (2016).
- 41. Sarker, S. D. & Nahar, L. *Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800874-4.00019-2

4 Αντικείμενο και Σκοπός Διατριβής

Οι καρδιοαγγειακές παθήσεις (CVDs) αποτελούν διαταραχές της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων. Η καρδιακή προσβολή και το εγκεφαλικό επεισόδιο είναι συνήθως οξέα συμβάντα και προκαλούνται κυρίως από απόφραξη που εμποδίζει τη ροή του αίματος στην καρδιά ή στον εγκέφαλο. Δεδομένου ότι έγκαιρη διάγνωση των καρδιοαγγειακών νοσημάτων αποτελεί επιτακτική ανάγκη, καθώς αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας στον ανεπτυγμένο κόσμο, η πρόκληση για τους ερευνητές στον τομέα νέων διαγνωστικών προσεγγίσεων είναι η ανάπτυξη διαγνωστικών μέσων που να λειτουργούν αποτελεσματικά (χωρίς να είναι θετικά/αρνητικά ψευδή), γρήγορα, εύκολα και να έχουν χαμηλό κόστος. Στη διάγνωση των καρδιοαγγειακών παθήσεων χρησιμοποιούνται κλινικές διαγνωστικές και αιματολογικές εξετάσεις όπου ελέγχονται διάφοροι βιοχημικοί δείκτες όπως οι τροπονίνες (cardiac troponin, cTn), η κρεατινική κινάση (CK-MB), η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), κ.α.

Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, είτε πρόκειται για ισχαιμία είτε για νέκρωση, ο σημαντικότερος βιοχημικός δείκτης είναι η τροπονίνη, καθώς μπορεί να ανιχνεύει μικρές βλάβες που πιθανά υπάρχουν σε έναν ασθενή υψηλού κινδύνου με ευάλωτη αθηρωματική πλάκα, απουσία μυοκαρδιακής νέκρωσης. Η τροπονίνη αποτελεί σύμπλεγμα πρωτεϊνών τριών υπομονάδων (TnI, TnT, TnC), οι οποίες απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από τον καρδιακό μυϊκό ιστό που βρίσκεται υπό συνθήκες ισχαιμικού στρες και έτσι μπορούν να ανιχνευθούν στο πλάσμα του αίματος. Το σύμπλοκο της τροπονίνης εδράζεται στα λεπτά νημάτια των σκελετικών και καρδιακών μυών και φυσιολογικά ρυθμίζει τη σύσπασή τους. Σε αυτόν το βιοχημικό κύκλο κάθε ισομερές έχει διαφορετική βιολογική λειτουργία. Αν και οι τροπονίνες των καρδιακών μυϊκών ιστών κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια από αυτές των σκελετικών, η μεταξύ τους ομολογία είναι υψηλή. Ωστόσο, η καρδιακή τροπονίνη Ι (cTnI) έχει την μικρότερη ομολογία συγκριτικά με τις άλλες δύο και αυτό συνεπάγεται υψηλότερη εξειδίκευση για τον μυοκαρδιακό ιστό. Έτσι, δεδομένου ότι η τιμή των καρδιακών τροπονινών αυξάνεται ταχύτατα από την έναρξη του προκάρδιου άλγους, και δεδομένης της μεγαλύτερης εξειδίκευσης της τροπονίνης Ι για τον καρδιακό μυ, η cTnI καθίσταται ιδανικός βιοχημικός δείκτης για τη διάγνωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.

Στις κλινικές αναλύσεις, το τεστ τροπονίνης βασίζεται στην τεχνική της E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) τύπου Sandwich με τη χρήση δύο εξειδικευμένων αντισωμάτων (σύλληψης και ανίχνευσης) έναντι της τροπονίνης και ενός αντι-αντισώματος

επισημασμένου με χρωμοφόρο ουσία. Η ELISA παρέχει μεγάλη ευαισθησία όμως υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανίχνευση της τροπονίνης και σε αυτούς περιλαμβάνονται 1) η διαφορά ως προς την εξειδίκευση και την ευαισθησία των εμπορικώς διαθέσιμων βιο-αντιδραστηρίων, δηλαδή των αντισωμάτων σύλληψης και ανίχνευσης έναντι διαφορετικών αντιγονικών περιοχών της τροπονίνης ή και ολόκληρης της πρωτεΐνης, 2) η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινοξικών κατάλοιπων της τροπονίνης, όπως η σερίνη και η συμπλοκοποίηση της cTnI με άλλα μόρια, 3) η ύπαρξη ειδικών anticTnI αυτο-αντισωμάτων (IgG σφαιρίνες) στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών, τα οποία παράγονται έπειτα από διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος από την απελευθέρωση των τροπονινών στο αίμα, γεγονός που δυσχεραίνει την κατάταξη των ασθενών σε υποψήφιους ή μη για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Έτσι λαμβάνονται θετικά ή αρνητικά ψευδή αποτελέσματα.

Τα πολλά διαφορετικά διαθέσιμα βιο-αντιδραστήρια οδήγησαν στην ανάγκη για τον ορισμό του ορίου ανίχνευσης cutoff το οποίο πρέπει να παρουσιάζει συντελεστή διακύμανσης μικρότερο από 10% σε ορισμένη συγκέντρωση της τροπονίνης. Αυτός ο περιορισμός οδήγησε στην ανάπτυξη δοκιμασιών υψηλότερης αναλυτικής ευαισθησίας, η οποία βελτιώθηκε σημαντικά, από τα 100 ng/ml των αρχικών δοκιμασιών σε 0,006 ng/ml των σύγχρονων δοκιμασιών (high- και ultra- sensitive), δίνοντας τη δυνατότητα καλύτερης παρακολούθησης της τιμής της τροπονίνης για την έγκαιρη διάγνωση μίας πιθανής βλάβης. Όμως, ενώ αυξήθηκε η κλινική ευαισθησία για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η αυξημένη αναλυτική ευαισθησία συνδέθηκε με μειωμένη ειδικότητα, δημιουργώντας έτσι μια πρόσθετη διαγνωστική πρόκληση.

Οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στην κλινική πράξη, είναι κυρίως χρωματομετρικοί και φωτομετρικοί που ανιχνεύουν την τροπονίνη με υψηλή ευαισθησία, απαιτούνται όμως πολλά πειραματικά βήματα, τα οποία συνεπάγονται σχετικά μεγάλο χρόνο αλλά και κόστος. Στη βιβλιογραφία γίνονται αναφορές και σε άλλου είδους προσδιορισμούς όπως ηλεκτροχημικοί, παραμαγνητικοί και συντονισμού επιφανειακού πλασμονίου. Με αυτές τις εξελίξεις στην τεχνολογία, δημιουργούνται νέες προοπτικές για την ανίχνευση της τροπονίνης όπως: 1) σμίκρυνση των φορητών, ευαίσθητων, εξειδικευμένων βιοαισθητήρων, δηλαδή Point of care tests (POCTs), 2) συντομότερος αναλυτικός χρόνος αξιολόγησης, 3) χαμηλό κόστος. Παρά τις συνεχείς εξελίξεις, υπάρχουν σημαντικά περιθώρια βελτίωσης στις δοκιμασίες της τροπονίνης ιδιαίτερα στον τομέα της τυποποίησης των ποσοτικών προσδιορισμών και της εξάλειψης παρεμβολών των διαφόρων παραγόντων.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την αναγκαιότητα βελτίωσης του προσδιορισμού της καρδιακής τροπονίνης, **αντικείμενο και σκοπός** της παρούσας διατριβής είναι η παραγωγή εξειδικευμένων βιο-αντιδραστηρίων για την ανάπτυξη ευαίσθητων και εξειδικευμένων διαγνωστικών εργαλείων και τεχνικών προσδιορισμού της καρδιακής τροπονίνης Ι.

Για την επίτευξη του στόχου της παρούσας διδακτορικής διατριβής ακολουθήθηκε η παρακάτω προσέγγιση:

- 1. Σχεδιασμός των ανοσογονικών μακρομορίων, ο οποίος στηρίχθηκε i) στην ικανότητα του φορέα Sequential Oligopeptide Carrier (SOC) να προβάλλει τους επιτόπους για καλύτερη ανοσολογική απόκριση των πειραματόζωων, καθώς και καλύτερη αναγνώριση του επιτόπου από το αντίσωμα κατά την πρόσδεση στο ELISA plate, ii) τον βαθμό αντιγονικότητας και υδροφιλικότητας των αλληλουχιών της καρδιακής τροπονίνης I, και iii) την ομολογία τους με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές ταχείας (fs-TnI) και βραδείας (ss-TnI) σύσπασης και τις καρδιακές τροπονίνες T και C.
- Πεπτιδική σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής της καρδιακής τροπονίνης Ι.
- Σύνθεση του πεπτιδίου FYSHSFHENWPS (12-peptide) που βιβλιογραφικά υποστηρίζεται ότι αναγνωρίζει την καρδιακή τροπονίνη Ι.
- 4. Παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι των επιλεγμένων επιτόπων της cTnI μέσω ανοσοποιήσεων σε πειραματόζωα (όρνιθες).
- 5. Σύνθεση συμπλεγμάτων σεφαρόζης-πεπτιδίου (Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹) και νανοσωματιδίων σίλικας-πεπτιδίου (SiO₂@12peptide) με χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις θειοαιθερικού δεσμού.
- 6. Δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα αντισώματα.
- 7. Δοκιμασίες ανίχνευσης της cTnI με εφαρμογή των έξυπνων υλικών (Smart Materials and Structure): i) νανοσωματίδια σίλικας-12πεπτίδιο (SiO₂@12peptide) και ii) συζευγμένα πολυμερή (TCDA@12peptide).
- **8.** Συγκριτική αποτίμηση των προτεινόμενων βιο-αντιδραστηρίων και τεχνικών με τις αντίστοιχες κλασικές μεθόδους που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της cTnI.

Τα υλικά που συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και οι συντμήσεις τους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πεπτίδιο / πεπτιδικό σύμπλεγμα / υλικό	Σύντμηση
CH ₃ CO-[K-Aib-C(1,3-CH ₂ CONH ₂)] ₄ -NH ₂	CPSOC(3,9-Acm)
ICH ₂ CO-Ahx-R ¹⁹ RRSSNYRAYATE ³¹ -NH ₂	IAc-Ahx-cTnI ¹⁹⁻³¹
ICH ₂ CO-E ⁶⁶ RRGEKGRALST ⁷⁷ -NH ₂ *	IAc-cTnI ⁶⁶⁻⁷⁷
ICH ₂ CO-R ¹¹⁰ YDIEAKVTKNIT ¹²² -NH ₂ *	IAc-cTnI ¹¹⁰⁻¹²²
CH ₃ CO-[(K-Aib-C(3,9-CH ₂ CONH ₂ ; 6,12-CH ₂ CO- E ⁶⁶ RRGEKGRALST ⁷⁷ -NH ₂)] ₄ -NH ₂ *	CPSOC(3,9-Acm; 6,12-cTnI ⁶⁶⁻⁷⁷)
CH ₃ CO-[K-Aib-C(3,9-CH ₂ CONH ₂ ; 6,12-CH ₂ CO- R ¹¹⁰ YDIEAKVTKNIT ¹²² -NH ₂)] ₄ -NH ₂ *	CPSOC(3,9-Acm; 6,12-cTnI ¹¹⁰⁻¹²²)
CH ₃ CO-[K(R ¹⁹ RRSSNYRAYATE ³¹)-Aib-G] ₄ -NH ₂ **	SOC-cTnI ¹⁹⁻³¹
CH ₃ CO-[K(T ¹¹⁸ KNITEIADLTQKI ¹³)-Aib-G] ₄ -NH ₂ **	SOC(cTnI ¹¹⁸⁻¹³¹)
ICH2CO-(FYSHSFHENWPS)-NH2	IAc-12peptide
CH ₃ CO-(FYSHSFHENWPS)-NH ₂	Ac-12peptide
(SiO ₂)-C ₃ H ₆ -S-CH ₂ CO-FYSHSFHENWPS-NH ₂	SiO ₂ @12peptide
Sepharose-C ₃ H ₆ O-S-CH ₂ CO-Ahx- R ¹⁹ RRSSNYRAYATE ³¹ -NH ₂	Seph@Ahx-cTnI ¹⁹⁻³¹
C ₂₃ H ₃₈ O ₂ -FYSHSFHENWPS-NH ₂	TCDA@12peptide

Πίνακας 4.1. Πεπτίδια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν & οι συντμήσεις τους.

Συντέθηκαν σε συνεργασία με την Βασιλική Μουλασιώτη
 ** Συντέθηκαν στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής του Κ. Στρογγύλη

•

Πειραματικό Μερός

5 Σχεδιασμός, σύνθεση και χρήση πεπτιδίων και έξυπνων υλικών: Τεχνικές, υλικά και αντιδραστήρια

5.1 Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων

Η επιλογή για τη σύνθεση των πεπτιδικών αλληλουχιών της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι, έγινε με στόχο την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων καθώς και τη χρήση τους ως αντιδραστήρια σε διάφορες δοκιμασίες ELISA. Για το σχεδιασμό των πεπτιδικών αναλόγων λήφθηκαν υπ' όψιν τα εξής: 1. Η ελάχιστη δυνατή ομολογία μεταξύ καρδιακών και σκελετικών τροπονινών, ώστε τα παραγόμενα αντισώματα να είναι όσο το δυνατό πιο εξειδικευμένα για τον καρδιακό μυ. 2. Η υδροφιλικότητα και η αντιγονικότητά τους, ώστε να ληφθούν όσο το δυνατόν υψηλότερου τίτλου αντισώματα. 3. Το μικρό μήκος των πεπτιδικών αναλόγων, το οποίο είναι ανασταλτικός παράγοντας για την ανοσολογική απόκριση και την παραγωγή αντισωμάτων, επομένως απαιτείται ένα μόριο-φορέας στο οποίο μπορούν να προσδεθούν οι εκάστοτε επίτοποι με ένα σταθερό χημικό δεσμό. Έτσι σχεδιάστηκε και συντέθηκε ένας ολιγοπεπτιδικός φορέας για την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδικών. Επιπλέον, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν υλικά βασισμένα στην πεπτιδική αλληλουχία FYSHSFHENWPS, η οποία σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα αναγνωρίζει την καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης Ι.¹

5.1.1 Μελέτες ομολογίας των αλληλουχιών των τροπονινών

Για την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι, έλαβε χώρα η μελέτη και η σύγκριση της ομολογίας των αλληλουχιών μεταξύ των σκελετικών ισομορφών των τροπονινών αργής και ταχείας σύσπασης (slow skeletal, fast skeletal) με την καρδιακή ισομορφή (cardiac), καθώς και σύγκριση της ομολογίας των καρδιακών ισομορφών των τροπονινών Ι, C και Τ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι ομολογίας BLASTP και FASTA,^{2–11} οι οποίοι συγκρίνουν τις πρωτοταγείς δομές των υπό διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλουχιών, σε διαδικτυακά υπολογιστικά προγράμματα^{12–15} ενώ μελετήθηκαν και αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα.^{16–19}

5.1.2 Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης Ι

Για την παραγωγή αντισωμάτων ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός των αντιγονικών περιοχών της καρδιακής τροπονίνης Ι. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης αντιγονικότητας,²⁰ τα οποία μπορούν να προβλέψουν τις

ανοσογονικές περιοχές μιας πρωτεΐνης βάσει δεδομένων: 1) υδροφιλικότητας,²¹ τα οποία έχουν εξαχθεί από τους χρόνους κατακράτησης πεπτιδίων σε HPLC, 2) προσβασιμότητας επιφάνειας,^{22,23} 3) κλίμακας ευελιξίας, δηλαδή κινητικότητα των πρωτεϊνικών τμημάτων²⁴ και 4) ανοσογονικότητας^{25–27} των 20 φυσικών αμινοξέων, καθώς επίσης και βάσει 5) της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών²⁸ και συγκεκριμένα την ικανότητα σχηματισμού β-στροφής, 6) των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αμινοξέων και τη συχνότητα εμφάνισής τους σε πειραματικά γνωστούς επίτοπους,²⁹ 7) του μοντέλου Markov σε συνδυασμό με τη μέθοδο κλίμακας τάσης που προβλέπουν τη θέση γραμμικών επιτόπων Β-κυττάρων^{30–32} και του αλγόριθμου Random Forest³³, προσαρμοσμένο για επιτοπικά και μη επιτοπικά αμινοξέα χαρακτηρισμένα από κρυσταλλικές δομές,³⁴ που προβλέπει επιτόπους Β-κυττάρων από μία ακολουθία πρωτεϊνών.

5.1.3 Σχεδιασμός του φορέα αντιγονικών επίτοπων

Η πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων σε μία πρωτεΐνη-φορέα είναι πολύ σημαντική, επειδή όπως προαναφέρθηκε, τα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια δεν μπορούν να προκαλέσουν την ανοσολογική απόκριση. Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτό και αξιοποιώντας τον ολιγοπεπτιδικό φορέα CPSOC, ο οποίος αναπτύχθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και Πρωτεϊνών (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), σχεδιάστηκε ο φορέας CPSOC(3,9-Acm), ως φορέας αντιγονικών πεπτιδίων, με σκοπό την αύξηση της ανοσογονικότητας των επιλεγμένων πεπτιδικών αλληλουχιών της τροπονίνης Ι και της προσρόφησής τους στα ELISA plates. Δεδομένης της δύσκολης σύνθεσης των τετραεπιτοπικών συμπλεγμάτων, δηλαδή της πρόσδεσης τεσσάρων επιτοπικών αντίγραφων, ο φορέας CPSOC τροποποιήθηκε κατάλληλα με παράπλευρη προστασία των δύο εκ των τεσσάρων κυστεϊνών με την ακεταμιδομέθυλο-ομάδα, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση δύο επιτοπικών πεπτιδικών αντίγραφων στις μη προστατευμένες κυστεΐνες (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1. Απεικόνιση του φορέα CPSOC(3,9-Acm) Χ: ανοσογονικό πεπτίδιο.

5.2 Σχεδιασμός πεπτιδικών αναλόγων και έξυπνων υλικών

Δεδομένου ότι η πεπτιδική αλληλουχία (FYSHSFHENWPS) βρέθηκε ότι αναγνωρίζει την τροπονίνη Ι, από πειράματα χαρτογράφησης πεπτιδικών αλληλουχιών σε βακτηριοφάγους,¹ συντέθηκαν: 1) το ιωδοακετυλιωμένο πεπτιδικό ανάλογο αυτής με σκοπό τη χρήση του για τη σύνθεση του υλικού SiO₂@12peptide και 2) το πεπτιδικό ανάλογο που φέρει την τρικοσαδιινοϊκή-ακέτυλο ομάδα στο N-τελικό άκρο, δηλαδή το υλικό TCDA@12peptide, στοχεύοντας στην ανίχνευση της cTnI με μη ενζυμικές τεχνικές και 3) το ακετυλιωμένο πεπτιδικά ανάλογο για την ανίχνευση της cTnI με ELISA. Τα έξυπνα υλικά i) νανοσωματίδια σίλικας και ii) συζευγμένα πολυμερή, επιλέχθηκαν εξαιτίας των ιδιοτήτων τους που αλλάζουν παρουσία βιολογικών αντιδράσεων, όταν φέρουν κατάλληλα βιο-υλικά. Τα έξυπνα υλικά σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να διαθέτουν δραστικές ομάδες για την ομοιοπολική πρόσδεση του 12peptide με i) θειοαιθερικό και ii) αμιδικό δεσμό, αντίστοιχα.

5.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Τα αντιδραστήρια, οι διαλύτες και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση, τον καθαρισμό, την ταυτοποίηση των υλικών, καθώς και στις ανοσοποιήσεις, την απομόνωση των αντισωμάτων και τις ανοσοδοκιμασίες παρουσιάζονται στο Παράρτημα. Οι συντμήσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι σύμφωνες με τον Jones.³⁵

5.4 Σύνθεση πεπτιδίων, ανοσογονικών συμπλεγμάτων και έξυπνων υλικών

5.4.1 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση- Στρατηγική Fmoc/tBu

Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων και του πεπτιδικού φορέα έγινε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση (SPPS) κατά Merrifield. Ως στρατηγική ακολουθήθηκε η Fmoc/tBu. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η Rink Amide AM για τη δημιουργία αμιδικού δεσμού στο C-τελικό άκρο των πεπτιδίων.^{36–38}

Όλα τα αμινοξέα εισήχθησαν ως N^α-Fmoc παράγωγα με προστατευμένες τις παράπλευρες αλυσίδες τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Trp(t-BOC)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH,

Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH. Ως αντιδραστήρια σύζευξης των αμινοξέων για την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας χρησιμοποιήθηκαν είτε το DIC ή τα HBTU, TBTU, HATU.

Συνοπτικά η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε ως εξής (Σχήμα 5.2): Το πολυμερές τοποθετήθηκε σε κατάλληλο δοχείο (vessel) και έγινε διόγκωση με τους διαλύτες DMF/DCM/DMF (1 x 15', 1 x 15', 1 x 15'). Ακολούθησε απομάκρυνση της Fmoc- με 20% πιπεριδίνη/DMF (v/v) και εκπλύσεις με τους διαλύτες DMF και DCM (3 x 1').

Για την ταυτοποίηση της απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χρωματομέτρησης της ρητίνης (Test Kaiser).³⁷ Για το test Kaiser απαιτούνται ελάχιστοι κόκκοι πεπτιδορητίνης, που τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα, στους οποίους προστίθενται λίγες σταγόνες 5% (w/v) νινυδρίνη/αιθανόλη, 2% (v/v) KCN (0,01 M)/πυριδίνη, 0,4/1 (w/v) φαινόλη/αιθανόλη. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο (100 °C) ~30΄΄. Όταν οι κόκκοι της ρητίνης χρωματίζονταν μπλε ή καφέ, αυτό σηματοδοτούσε την απομάκρυνση της Fmoc-N^α προστατευτικής ομάδας (θετικό test).

Οι δραστικές καρβοξυλομάδες του πρώτου αμινοξέος ενεργοποιήθηκαν με το αντιδραστήριο σύζευξης DIC, ενώ προς αποφυγή ρακεμοποίησης προστέθηκε το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt anhydrous). Το DIC, το HOBt, το εκάστοτε αμινοξύ και η ρητίνη χρησιμοποιήθηκαν σε μοριακή αναλογία 3:3:3:1 και διαλύθηκαν σε μίγμα διαλυτών DMF/DCM (1:1, v/v). Το διάλυμα αυτό προστίθετο στο vessel που περιείχε τη ρητίνη και αναδεύτηκαν για 3 h. Για την ταυτοποίηση της σύζευξης του αμινοξέος στη ρητίνη πραγματοποιήθηκαν Test Kaiser, στα οποία δεν αναμενόταν χρωματισμός των κόκκων της ρητίνης (αρνητικό test). Σε περίπτωση που το Test Kaiser ήταν θετικό, γινόταν επανάληψη της σύζευξης του αμινοξέος με το DIC ή με κάποιο ουρονικό παράγωγο. Ακολούθησαν εκπλύσεις με τους διαλύτες DMF και DCM (3 x 1').

Μετά τη σύζευξη του πρώτου αμινοξέος στη ρητίνη, γινόταν ακετυλίωση των πιθανών ελεύθερων αμινομάδων της ρητίνης, για την αποτροπή σχηματισμού παραπροϊόντων, με οξικό ανυδρίτη με παρουσία DIEA σε αναλογία 1:1 και σε περίσσεια 15 ισοδύναμα των mmol του κάθε πεπτιδίου σε μίγμα διαλυτών DMF/DCM.

Ομοίως ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων αμινοξέων για την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας. Αφού συνδέθηκε και το τελευταίο αμινοξύ στην πεπτιδική αλυσίδα, ακολούθησε η συλλογή της πεπτιδορητίνης με διήθηση σε διαιθυλαιθέρα και αποθήκευση σε ξηραντήρα κενού μέχρι σταθερού βάρους για τον υπολογισμό της απόδοσης σύνθεσης.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων έγινε με προσθήκη μίγματος

αντιδραστηρίων και δεσμευτών κατιόντων (TFA, Tis, H₂O, DMB και DODT) σε διάφορους συνδυασμούς ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα αμινοξικά κατάλοιπα. Η κάθε πεπτιδορητίνη αφέθηκε για 3-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση με το κατάλληλο μίγμα αντιδραστηρίων.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και εκπλύσεις με μίγμα διαλυτών DCM/εξάνιο 1:1 (v/v). Το διάλυμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη και τοποθετήθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή (flash evaporator) μέχρι να σχηματιστεί ελαιώδες προϊόν και να απομακρυνθεί το TFA. Στη συνέχεια προστέθηκε στη φιάλη παγωμένος διισοπροπυλ-αιθέρας και η φιάλη τοποθετήθηκε στην κατάψυξη, ώστε το πεπτίδιο να καταβυθιστεί. Ακολούθησε η διήθηση του πεπτιδίου, εκπλύσεις με παγωμένο διαιθυλαιθέρα και εκχύλισή του σε υδατικό διάλυμα οξέος. Το διάλυμα συλλέχθηκε ποσοτικά σε ειδική φιάλη με H₂O και τοποθετήθηκε στη συσκευή λυοφυλιοποίησης. Αφού ελήφθη το πεπτίδιο σε στερεή μορφή, καθαρίστηκε και ταυτοποιήθηκε με κατάλληλες μεθόδους.



Σχήμα 5.2. Διαγραμματική πορεία SPPS σύνθεσης των πεπτιδίων με την Fmoc/tBu στρατηγική.

5.4.2 Σύνθεση συμπλεγμάτων με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού

Τα ανοσογονικά συμπλέγματα προέκυψαν από τη χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού διαμοριακού θειοαιθερικού δεσμού, σε υγρή φάση, μεταξύ του φορέα CPSOC(3,9-Acm) και των επιλεγμένων ιωδοακετυλιωμένων πεπτιδικών αναλόγων. Η απαιτούμενη ελεύθερη θειολομάδα (-SH) προσφέρθηκε από τις κυστεΐνες του πεπτιδικού φορέα, ενώ η αλογονο-ακετυλο-ομάδα από τα ιωδοακετυλιωμένα πεπτίδια.

Ο θειοαιθερικός δεσμός σχηματίστηκε σε υγρή φάση, υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες και σε παγόλουτρο. Αρχικά, το ιωδοακετυλιωμένο πεπτίδιο διαλύθηκε σε μίγμα διαλυτών H_2O/CH_3CN σε αναλογία 1:1 (v/v). Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,2 με μικροποσότητα DIEA και ελεγχόταν σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι υπό σταθερή παροχή αέριου αζώτου. Σταδιακά και σε μικρές ποσότητες, προστέθηκε ο πεπτιδικός φορέας σε στερεή μορφή. Η προσβολή του άνθρακα (XCH₂-), του ιωδο-ακετυλιωμένου πεπτιδίου, από την ελεύθερη θειολομάδα της κυστεΐνης του πεπτιδικού φορέα, ελεγχόταν με φασματοσκοπία ESI-MS. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 0,1% TFA/H₂O (έως pH 3).

5.4.3 Καθαρισμός πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με RP-HPLC

Για τον έλεγχο της καθαρότητας κάθε πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC (Agilent). Το σύστημα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν H₂O/0,1%TFA και CH₃CN/0,1%TFA για 30'. Οι διαλύτες έκλουσης αναμίχθηκαν με γραμμική μεταβολή (gradient) σε διάφορες αναλογίες, ανάλογα με το πεπτίδιο. Η ταχύτητα ροής ήταν 1 ml/min και το μήκος κύματος 214 nm. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η C₁₈ Supelco 25 cm x 3 mm, 5 μm. Οι ποσότητες που απαιτήθηκαν για τις αναλυτικές RP-HPLC κυμάνθηκαν από 0,1 έως 0,3 mg και διαλύθηκαν σε H₂O/0,1%TFA όγκου 1 ml.

Το σύστημα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των πεπτιδίων ήταν ίδιο με αυτό της αναλυτικής RP-HPLC. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό με ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC ήταν η C₁₈ Discovery 25 cm x 10 mm, 5 μm και η C₁₈ Interchrom 25 cm x 21,2 mm αντίστοιχα. Η ταχύτητα ροής ήταν 5 ml/min και 20 ml/min, για την ημιπαρασκευαστική και την παρασκευαστική RP-HPLC αντίστοιχα.

Το κάθε πεπτίδιο διαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο H₂O/0,1%TFA και έπειτα εισήχθη στην HPLC. Τα κλάσματα που ελήφθησαν, συλλέχθηκαν σε ειδικά φιαλίδια τα οποία τοποθετήθηκαν στη λυοφυλιοποίηση.

5.4.4 Ταυτοποίηση πεπτιδίων και πεπτιδικών συμπλεγμάτων με ESI-MS

Η φασματομετρία μάζας ESI-MS χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση όλων των πεπτιδίων και των πεπτιδικών συμπλεγμάτων που συντέθηκαν. Το κάθε δείγμα διαλύθηκε στον καταλληλότερο διαλύτη (C=0,1 mg/ml) σύμφωνα με την πολικότητα του μορίου, ενέθηκε στο MS (Waters) και καταγράφηκε το φάσμα μάζας. Ο λόγος m/z υπολογίστηκε από τον τύπο: m/z = (m±nH⁺)/n, όπου m: η μοριακή μάζα του δείγματος, n: ο αριθμός των θετικών ή αρνητικών φορτίων και H⁺: η μάζα του πρωτονίου. Το μοριακό βάρος προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ESIprot.³⁹

5.4.5 Σύνθεση του υλικού Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹

Για τη σύνθεση του υλικού Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ απαιτήθηκαν δύο στάδια:

Ο Στάδιο 1° - Απομάκρυνση της θειοπυριδινικής ομάδας (Σχήμα 5.3).

Η σεφαρόζη (Thiopropyl Sepharose 6B) τοποθετήθηκε σε falcon όπου έγινε η διόγκωσή της με H₂O (200 ml/g) και ελήφθη η επιθυμητή μορφή (gel). Το H₂O απομακρύνθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε 5 φορές ανά 5'. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (3000 g, 5', 10 °C) και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος με πιπέτα. Έγινε αναδιασπορά του gel με διάλυμα 1% (w/v) DTT σε 0,3 M NaHCO₃, το οποίο περιείχε 1 mM tetrasodium EDTA (pH 8,4) [Διάλυμα 1],⁴⁰ τόσο ώστε να καλυφθεί πλήρως το gel και αφέθηκε για ανάδευση 45' σε RT. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (3000 g, 10 °C, 10') και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος με πιπέτα. Έγινε αναδιασπορά και έκπλυση του gel με διάλυμα 0,1 M CH₃COOH



Σχήμα 5.3. Απεικόνιση της αντίδρασης της thiopropyl sepharose 6B με το DTT και σχηματισμός της 2θειοπυριδόνης.

που περιείχε 0,5 M NaCl και 1mM tetrasodium EDTA [Διάλυμα 2] (400 ml διαλύματος/g σεφαρόζης). Η αντίδραση ελέγχθηκε με φασματοσκοπία UV (343 nm) για την ανίχνευση του προϊόντος 2-θειοπυριδόνη.

Ο Στάδιο 2° - Σύζευξη του πεπτιδίου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ στη σεφαρόζη (Σχήμα 5.4).

To gel εκπλύθηκε με διάλυμα 0,05 M Tris Buffer με 5 mM EDTA (pH 8,5) [Διάλυμα 3] (15 x $V_{\sigma tήλης}$) και φυγοκεντρήθηκε για απομάκρυνση του διαλύματος έκπλυσης. Στη συνέχεια προστέθηκε το πεπτίδιο IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί στο Διάλυμα 3 σε συγκέντρωση 5 mg/ml. Ακολούθησε επώαση για 1 h σε RT. To gel εκπλύθηκε με το Διάλυμα 3 (5 x $V_{στήλης}$). Το προκύπτον υλικό αποθηκεύτηκε στο διάλυμα έκπλυσης στους 4 °C.



Σχήμα 5.4. Απεικόνιση της σύζευξης του πεπτιδίου στη σεφαρόζη μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού.

5.4.6 Σύνθεση του υλικού SiO₂@12peptide

Η σύνθεση του συζυγούς SiO₂-πεπτιδίου έγινε σε δύο στάδια (Σχήμα 5.5).

Στάδιο 1°: Επιφανειακή τροποποίηση των νανοσωματιδίων σίλικας (Σχήμα 5.5 A).

Τα σωματίδια SiO₂ τροποποιήθηκαν με ομάδες θειόλης με αντίδραση 1 g SiO₂ με κατάλληλη ποσότητα μερκαπτοσιλανίου. Το εναιώρημα θερμάνθηκε υπό κάθετο ψυκτήρα για 24 h στους 60 °C σε 50 ml μεθανόλης. Το στερεό ελήφθη με φυγοκέντρηση, ξεπλύθηκε αρκετές φορές με μεθανόλη και ακετόνη και ξηράνθηκε στους 60°C σε ξηραντήρα περιστρεφόμενου κλιβάνου.⁴¹

Στάδιο 2°: Σύζευξη του πεπτιδίου IAc-12peptide στα νανοσωματίδια (Σχήμα 5.5 B).

Η ομοιοπολική ακινητοποίηση του 12-πεπτιδίου στα σωματίδια (SiO₂@SH) επιτεύχθηκε μέσω σχηματισμού θειοαιθερικών δεσμών μεταξύ των ομάδων θειόλης του SiO₂@SH και των ιωδοακετυλ-ομάδων του πεπτιδίου. Η αντίδραση σύζευξης έλαβε χώρα σε μεθανόλη στους 30 °C υπό αναρροή. Η μοριακή αναλογία θειόλης-πεπτιδίου ήταν 1,5:1. Το υλικό ταυτοποιήθηκε με θερμοβαρυμετρία και φασματοσκοπίες IR και EPR. Η σύνθεση των υβριδικών υλικών και ο χαρακτηρισμός τους με EPR έγιναν από την Π. Στάθη (Εργαστήριο Φυσικοχημείας Υλικών & Περιβάλλοντος, Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).



Σχήμα 5.5. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των νανοσωματιδίων SiO₂@SH (A) και ακινητοποίηση των πεπτιδίων στα νανοσωματίδια μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού (B).

5.4.7 Ταυτοποίηση του SiO₂@12peptide με FT-IR

Τα FT-IR των υλικών καταγράφηκαν σε σύστημα Spectrum GX Perkin Elmer FT-IR. Τα σφαιρίδια KBr παρασκευάστηκαν με ανάμιξη 2 mg σε NPs με KBr.⁴¹ Τονίζεται ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί χαμηλό ποσοστό υλικού:KBr προκειμένου να αποφευχθεί η παραμόρφωση ορισμένων ζωνών, π.χ. ισοπέδωση της ταινίας Si–O–Si στα 1100 cm⁻¹.

5.4.8 Ταυτοποίηση του SiO₂@12peptide με φασματοσκοπία EPR

Η χημική οξείδωση της τυροσίνης έγινε με διάλυμα 10 mM KMnO₄ (pH 11), ρυθμισμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα (βορικό οξύ/τετραβορικό νάτριο). Το δυναμικό λύσης ήταν Eh=+900 mV έναντι SHE, μετρούμενο με ένα ηλεκτρόδιο Pt. Σε κάθε πείραμα, ένα κλάσμα που περιείχε το πεπτίδιο ή το υβριδικό υλικό σε βορικό-ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάστηκε σε ένα γυάλινο φιαλίδιο και προστέθηκε κατάλληλος όγκος οξειδωτικού KMnO₄. Το δυναμικό οξείδωσης του διαλύματος ρυθμίστηκε στο εύρος +100 έως +900 mV ανάλογα με τη συγκέντρωση KMnO₄. Το δυναμικό διαλύματος και το pH παρακολουθήθηκαν in-situ με ένα ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής (6.0434.110 Metrhom). Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η οξείδωση της τυροσίνης από το KMnO₄, και ένα κλάσμα προστέθηκε σε σωλήνα χαλαζία 5 mm (Willmad Glass) που

καταψύχθηκε ταχέως σε υγρό N₂. Τα φάσματα EPR συνεχούς κύματος καταγράφηκαν σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K) με φασματόμετρο Bruker EPR200D με μετρητή συχνοτήτων Agilent 5310A.⁴¹ Μετά την καταγραφή κάθε φάσματος EPR, το δείγμα αποψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και η διαδικασία οξείδωσης αφέθηκε να προχωρήσει.

5.4.9 Ταυτοποίηση του SiO₂@12peptide με θερμοβαρυμετρία

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) έγινε χρησιμοποιώντας μια συσκευή Schimadzu DTG-60. Το πρωτόκολλο ήταν T αρχικό =30 °C, T τελικό, 700 °C, υπό αέρα, t_{TOTAL} = 48'.⁴¹

5.4.10 Σύνθεση του TCDA@12peptide

Έχοντας συνθέσει το 12peptide με την SPPS και μετά την απομάκρυνση της N^απροστασίας, προστέθηκε στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου το 10,12-τρικοσαδιϊνοϊκό οξύ (10,12-TCDA). Το 10,12-TCDA (0,1 M) διαλύθηκε σε μίγμα διαλυτών DCM/DMF (1/1, v/v), προστέθηκε το DIC και αφέθηκε 20' υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα προστέθηκε στην πεπτιδορητίνη και αφέθηκε για ανάδευση 3 h. Η αντίδραση ελέγχθηκε με Test Kaiser. Ακολούθησε η αποκοπή από τη ρητίνη όπως περιγράφεται στην § 5.4.1.

5.5 Ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων & δοκιμασιών για την ανίχνευση της cTnI

5.5.1 Ανοσοποιήσεις σε όρνιθες με τα ανοσογονικά συμπλέγματα

Η παραγωγή των αντισωμάτων επιτεύχθηκε έπειτα από ανοσοποιήσεις σε πειραματόζωα (όρνιθες) με την ένεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων σε δόσεις ανά διαστήματα και με τη χρήση ανοσοενισχυτικών. Ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα:

<u>1° Πρωτόκολλο</u>: Πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις έναντι ενός ανοσογονικού συμπλέγματος σε κάθε ζώο. Η συγκέντρωση του ανοσογονικού συμπλέγματος ορίστηκε στη μέγιστη δυνατή για την ανοσοποίηση σε όρνιθες, δηλαδή 1 mg/ml. Το κάθε ανοσογονικό σύμπλεγμα διαλύθηκε αρχικά σε 0,5 ml H₂O, προστέθηκε 0,5 ml ανοσοενισχυτικού και μετά από την ανάμιξή τους με vortex προέκυψε το επιθυμητό γαλάκτωμα. Για την πρώτη ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκε το Complete Freunds Adjuvant και για τις επόμενες ανοσοποιήσεις σε κάθε ζώο, ενώ το διάστημα μεταξύ των ανοσοποιήσεων ήταν δέκα ημέρες. Οι ανοσοποιήσεις έγιναν ενδομυϊκά σε τέσσερα σημεία του στήθους των ζώων.

Το πρώτο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹. Τα ανοσογονικά συμπλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν συνθέσεις του Κ. Στρογγύλη.⁴²

<u>2° Πρωτόκολλο</u>: Πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις έναντι μίγματος τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων σε ένα ζώο. Η συγκέντρωση του κάθε ανοσογονικού συμπλέγματος ήταν 0,3 mg/ml για την πρώτη ένεση και 0,1 mg/ml για τις επακόλουθες ανοσοποιήσεις. Κάθε ανοσογονικό σύμπλεγμα διαλύθηκε αρχικά σε 0,5 ml H₂O και έπειτα προστέθηκαν 0,5 ml Complete Freunds Adjuvant για την πρώτη ανοσοποίηση και ίδια ποσότητα Incomplete Freunds Adjuvant για τις επόμενες ανοσοποιήσεις. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις ανοσοποιήσεις. Το διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ανοσοποίησης ήταν τρεις εβδομάδες, ενώ μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης ανοσοποίησης μεσολάβησαν πέντε εβδομάδες. Οι ανοσοποιήσεις έγιναν ενδομυϊκά σε τέσσερα σημεία στο στήθος του ζώου.

Το δεύτερο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) και CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²), ως μίγμα.

5.5.2 Απομόνωση αντισωμάτων

Μετά από τις ανοσοποιήσεις ακολούθησε η συλλογή αυγών και μία σειρά πειραματικών σταδίων για την απομόνωση των αντισωμάτων.

<u>1° Στάδιο</u>: Αρχικά καθαρίστηκε το εξωτερικό κέλυφος των αυγών προσεκτικά, ακολούθησε το σπάσιμο του κελύφους και ο διαχωρισμός του κρόκου από το λευκό μέρος του αυγού σε ειδικό κουτάλι. Για την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων του λευκού μέρους έγινε πλύσιμο του κρόκου με H₂O και έπειτα ο κρόκος κυλίστηκε σε διηθητικό χαρτί. Εν συνεχεία αφαιρέθηκε η βιτελίνη (εξωτερικό περίβλημα κρόκου) τρυπώντας την με βελόνα και η οποία συγκρατείται στο διηθητικό χαρτί. Ακολούθησε η συλλογή του κρόκου σε falcon και σημειώθηκε ο όγκος του.

<u>2° Στάδιο</u>: Η απολιπίδωση του κρόκου και η εκχύλιση των IgY ανοσοσφαιρινών έγινε με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα.

1° Πρωτόκολλο PEG 6.000:⁴³ Στον κρόκο που συλλέχθηκε στο falcon προστέθηκε διάλυμα PBS (pH 7,2) σε όγκο διπλάσιο του κρόκου και στη συνέχεια 3,5% (w/v) PEG. Έγινε ανάμιξη με vortex και το falcon τοποθετήθηκε σε κυλιόμενο αναδευτήρα σε ψυχρό θάλαμο (4 °C) για

10'. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 20', 4 °C) και διήθηση για απομάκρυνση του ιζήματος, ενώ στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε εκ νέου 8,5% (w/v) PEG και ομογενοποιήθηκε με vortex. To falcon τοποθετήθηκε σε κυλιόμενο αναδευτήρα σε ψυχρό θάλαμο (4 °C) για 10'. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (10.000 rpm, 20', 4 °C), το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε και το ίζημα διαλύθηκε σε 1 ml PBS και ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και vortex και συμπληρώθηκε PBS μέχρι όγκο 10 ml. Προστέθηκε 12% PEG (w/v), έγινε ανάμιξη με vortex και το falcon τοποθετήθησε φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 20', 4 °C), και απόρριψη του υπερκείμενο διαλύματος, ενώ το ίζημα διαλύθηκε με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και νοτεκείμενο διαλύματος, ενώ το ίζημα διαλύθηκε με 800 μl PBS και ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και νοτεκείμενο διαλύματος, ενώ το ίζημα διαλύθηκε με τος τέθηκαν επιπλέον 400 μl PBS. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε eppendorf στους -20 °C.

 2° Πρωτόκολλο NaCl:⁴³ Στον κρόκο που συλλέχθηκε στο falcon προστέθηκε H₂O σε όγκο εφταπλάσιο του κρόκου και έγινε ανάμιξη με vortex. Μετρήθηκε το pH και ρυθμίστηκε στην τιμή 5 με προσθήκη 0,5 M HCl. Το ομογενές διάλυμα τοποθετήθηκε στους -20 °C για 24 h. Έπειτα αφέθηκε να ξεπαγώσει (RT) και έγινε διήθηση. Το ίζημα απορρίφθηκε ενώ το διήθημα συλλέχθηκε σε falcon και προστέθηκε άλας NaCl (s) τόσο ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 1,5 M. (~ 8,8 % w/v). Ακολούθησε ανάμιξη με vortex και ρύθμιση του pH στην τιμή 4 με 0,5 M HCl. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε RT για 2 h και φυγοκεντρήθηκε (3700 g, 15', 4 °C). Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα διαλύθηκε σε 3 ml PBS και αποθηκεύτηκε σε eppendorf στους -20 °C.

5.5.3 Καθαρισμός IgY ανοσοσφαιρινών

Ο καθαρισμός των αντισωμάτων έγινε αρχικά με διαπίδυση, ενώ ακολούθησε και ο καθαρισμός τους με χρωματογραφία συγγένειας με το ειδικό υλικό προσρόφησης (Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹) του οποίου η σύνθεση περιγράφεται στην § 5.4.5.

Μέθοδος διαπίδυσης

Τα απομονωμένα αντισώματα καθαρίστηκαν με τη μέθοδο της διαπίδυσης για την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών, αλάτων και του υπολειπόμενου PEG στο δείγμα. Αρχικά τα δείγματα αραιώθηκαν με H₂O και τοποθετήθηκαν σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (cutoff 50 kDa). Εν συνεχεία, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ποτήρι ζέσης που περιείχε H₂O και μαγνητάκι και αφέθηκε για ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 h. Έπειτα απομακρύνθηκε το H₂O από το ποτήρι ζέσεως και η διαδικασία επαναλήφθηκε μία φορά για ανάδευση 24 h και άλλη μία για 2 h. Τέλος η μεμβράνη κόπηκε προσεκτικά, το περιεχόμενο διάλυμα αφαιρέθηκε με τη βοήθεια πιπέτας και τοποθετήθηκε σε eppendorf είτε για αποθήκευση στους -20 °C είτε για να λυοφιλιοποιηθεί και να αποθηκευτεί σε στερεή μορφή.

Χρωματογραφία συγγένειας

Τα παραχθέντα αντισώματα καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας για να ληφθούν τα εξειδικευμένα αντισώματα έναντι του επίτοπου cTnI¹⁹⁻³¹. Αυτό πραγματοποιήθηκε σε στήλη σεφαρόζης, η οποία τροποποιήθηκε επιφανειακά με πρόσδεση του πεπτιδίου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ με σταθερό θειοαιθερικό δεσμό. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- Ο Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης: 0,605 g Tris base, 1,17 g NaCl, 0,0037 g EDTA διαλύθηκαν σε 250 ml H₂O (pH 7).
- Ο Αλκαλικό Ρυθμιστικό Διάλυμα: 12,11 g Tris base διαλύθηκαν σε 250 ml H₂O (pH 8,5).
- Ο Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκλουσης: 0,75 g Gly διαλύθηκαν σε 250 ml H₂O (pH 2,8).

Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο προσθέτοντας HCl/NaOH, ενώ τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

Το τροποποιημένο gel σεφαρόζης τοποθετήθηκε σε ειδικό πλαστικό σωλήνα με ηθμό με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (5 φορές ανά 5'), ενώ το διάλυμα απορρίφθηκε με διήθηση. Ταυτόχρονα 1 mg λυοφιλιοποιημένου αντισώματος διαλύθηκε σε 1 ml του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος και διηθήθηκε. Το διάλυμα προστέθηκε στο gel, αφέθηκε σε ηρεμία και ακολούθησε διήθηση. Το διάλυμα περάστηκε από τη στήλη 5 φορές. Έπειτα το διάλυμα διηθήθηκε και συλλέχθηκε σε κατάλληλο πλαστικό σωλήνα (falcon), ενώ γρήγορα προστέθηκε στη στήλη κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (5 x V_{στήλης}). Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος έκλουσης και τα κλάσματα συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά eppendorf που περιείχαν αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 1/10 V_{στήλης} (ροή 1 ml/min). Ακολούθησε η έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα αιθανόλης 20%. Τα κλάσματα αραιώθηκαν με H₂O (1/5, v/v) και φωτομετρήθηκαν σε UV (280 nm).

5.5.4 Δοκιμασίες έμμεσης ELISA για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων

Η τεχνική της ELISA χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, όσο και για την ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης Ι. Σε όλες τις ELISA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα Επώασης (Coating Buffer): 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ και 0,20 g NaN₃ διαλύθηκαν σε 1 L H₂O (pH 9,6).
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης Stock PBS: 160 g NaCl, 4 g KCl, 4 g KH₂PO₄, 24g Na₂HPO₄ x 2H₂O (ή 48g Na₂HPO₄ x 12H₂O) διαλύθηκαν σε 2 L H₂O (pH 7,2).
- Ο Διάλυμα εργασίας PBS: To stock solution PBS αραιώθηκε με H₂O (1/10, v/v).
- Διάλυμα 3% γάλα σε PBS (διάλυμα έκπλυσης): Σε ορισμένο όγκο διαλύματος εργασίας
 PBS προστέθηκε 3% (w/v) σκόνη γάλακτος Regilait και αναδεύτηκε.
- Διάλυμα A: Peroxidase Substrate TMB/H₂O (1:1, v/v)
- Ο Διάλυμα B: Peroxide Solution H_2O_2/H_2O (1:1, v/v)
- Διάλυμα ανοσογονικού συμπλέγματος (Stock Solution): 1 mg συμπλέγματος διαλύθηκε σε
 1 ml H₂O και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.
- Ο Διάλυμα H₂SO4 2M: 54 ml πυκνού H₂SO₄ αραιώθηκαν με 446 ml H₂O. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε γυάλινο μπουκάλι (RT).

Η ρύθμιση του pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο προσθέτοντας HCl/NaOH. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στις δοκιμασίες έμμεσης ELISA ήταν τα εξής:

- ① Προσρόφηση του πεπτιδικού συμπλέγματος στα wells: Ετοιμάστηκε το διάλυμα πεπτιδικού συμπλέγματος (C=5 μg/ml) σε Coating Buffer από το αντίστοιχο Stock Solution. Το διάλυμα προστέθηκε στο plate (100 μl/well) και επωάστηκε στους 4 °C για 24 h.
- ② Εκπλύσεις: Το διάλυμα απομακρύνθηκε από τα wells τινάζοντας το plate και ακολούθησαν οι εκπλύσεις με 3% γάλα σε PBS (4 x 200 μl/well και 1 x 400 μl/well). Έπειτα το διάλυμα έκπλυσης απορρίφθηκε.
- ③ Κάλυψη μη ειδικών θέσεων: Επώαση με 3% γάλα/PBS (200 μl/well) (2 h, RT).
- ④ Εκπλύσεις: Το διάλυμα απομακρύνθηκε και τα wells εκπλύθηκαν με 3% γάλα σε PBS (4 x 200 µl/well και 1 x 400 µl/well). Έπειτα το διάλυμα έκπλυσης απορρίφθηκε.
- ⑤ Επίστρωση των αντισωμάτων: Τα αρχικά δείγματα των παραχθέντων αντισωμάτων διαλύθηκαν σε διάλυμα 3% γάλα/PBS και ακολούθησαν σειριακές αραιώσεις. Τα αραιωμένα διαλύματα επωάστηκαν στα wells (100 μl/well) (4 °C, 24h).
- ⑤ Εκπλύσεις: Το διάλυμα απομακρύνθηκε και τα wells εκπλύθηκαν με 3% γάλα σε PBS (4 x 200 μl/well και 1 x 400 μl/well). Έπειτα το διάλυμα έκπλυσης απορρίφθηκε.

- ⑦ Επίστρωση του συζευγμένουν με υπεροξειδάση (HRP) anti-IgY αντισώματος: Σε ορισμένο όγκο διαλύματος 3% γάλα/PBS προστέθηκε το anti-IgY*HRP αντίσωμα (αραίωση 1/2000). Τα wells επωάστηκαν με το anti-IgY*HRP (100 μl/well) (37 °C, 1½ h).
- ⑧ Εκπλύσεις: Το διάλυμα απομακρύνθηκε και τα wells εκπλύθηκαν με το διάλυμα εργασίας PBS (4 x 200 µl/well και 1 x 400 µl/well). Έπειτα το διάλυμα έκπλυσης απορρίφθηκε.
- ⑨ Ενζυμική αντίδραση: Το διάλυμα Α επιστρώθηκε στο plate (50 μl/well) και κατευθείαν προστέθηκε το διάλυμα B (50 μl/well). Το plate αφέθηκε στο σκοτάδι (10-15', RT).
- Tερματισμός ενζυμικής αντίδρασης: Στα wells προτέθηκε H₂SO₄ 2M (100 µl/well).
- * Φωτομέτρηση δειγμάτων: Το plate τοποθετήθηκε σε ELISA reader (BIOTEK) και καταγράφηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (450 nm).

Οι επωάσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων έγιναν είτε στους 4 °C για 24 h, όπως περιγράφεται παραπάνω, είτε για 2 h στους 37 °C και έγινε σύγκριση των δύο διαδικασιών.

Επίσης συγκρίθηκαν τα δύο πρωτόκολλα απομόνωσης των αντισωμάτων (PEG και NaCl) ως προς την αποδοτικότητά τους με δοκιμασίες έμμεσης ELISA.

Στη συνέχεια τα αντισώματα καθαρίστηκαν με διαπίδυση και συγκρίθηκαν με τα crude αντισώματα ως προς την ικανότητά τους να προσδένονται στα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα έναντι των οποίων παρήχθησαν με δοκιμασίες έμμεσης ELISA.

Η ικανότητα πρόσδεσης των αντισωμάτων σε ολόκληρη την πρωτεΐνη (cTnI) ελέγχθηκε με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Σε αυτές τις δοκιμασίες τα επιμέρους αντιδραστήρια επωάστηκαν με τη σειρά: 1) cTnI, 2) παραχθέντα αντισώματα, 3) anti-IgY*HRP.

Τα αντισώματα που επιλέχθηκαν για καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας ήταν αυτά που παρήχθησαν έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και αυτά έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων (SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷), CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹)). Το υλικό πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλη ήταν το Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹. Εν συνεχεία τα καθαρισμένα αντισώματα ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να προσδένονται τόσο στο ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ όσο και στην cTnI με δοκιμασίες έμμεσης ELISA.

Τα αντισώματα που καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας έναντι του επίτοπου cTnI¹⁹⁻³¹ ελέγχθηκαν για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τον επίτοπο cTnI⁶⁶⁻⁷⁷ με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Στις δοκιμασίες αυτές τα επιμέρους αντιδραστήρια επωάστηκαν με τη σειρά: 1) σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm; 6,12- cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) και SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, 2) καθαρισμένα αντισώματα από τη στήλη Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹, 3) anti-IgY*HRP.

5.5.5 Δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα αντισώματα

Η αναγνώριση της cTnI από τα παραχθέντα αντισώματα ελέγχθηκε με μία σειρά προσδιορισμών ELISA τύπου Sandwich. Η γενική πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή της § 5.4.4. Η διαφορά έγκειται στα αντιδραστήρια που επωάστηκαν σε κάθε βήμα στα wells. Σε αυτές τις δοκιμασίες τα επιμέρους αντιδραστήρια επωάστηκαν με την εξής σειρά: 1) αντισώματα σύλληψης έναντι της cTnI (anti-cTnI, IgG), 2) cTnI, 3) παραχθέντα ΙgY αντισώματα, 4) ενζυμο-συζευγμένο anti-IgY*HRP αντίσωμα.

5.5.6 Δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση της cTnI χρησιμοποιώντας το 12peptide

Η γενική πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την έμμεση ELISA όπως περιγράφεται στην § 5.4.4. Στις δοκιμασίες αυτές τα επιμέρους αντιδραστήρια επωάστηκαν ως εξής: 1) πεπτίδιο Ac-12peptide, 2) cTnI, 3) παραχθέντα IgY αντισώματα, 4) ενζυμοσυζευγμένο anti-IgY αντίσωμα.

5.5.7 Δοκιμασία ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας το SiO₂@12peptide

Το SiO₂@12peptide (5 mg) προστέθηκε σε eppendorfs που περιείχαν ορούς ασθενών με επιβεβαιωμένο έμφραγμα. Η συγκέντρωση της καρδιακής τροπονίνης Ι στους ορούς των ασθενών είχε προσδιοριστεί με πρότυπη διαδικασία που ακολουθείται στο νοσοκομείο (Βιοχημικό εργαστήριο, Π.Γ.Ν.Ι.) και ήταν ίση με 100 ng/ml και 50 ng/ml. Τα eppendorf τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για 20'. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (6000 rpm, 2') και αποθήκευση των υπερκείμενων διαλυμάτων (4 °C), ενώ τα ιζήματα επανεναιωρήθηκαν και εκπλύθηκαν με 500 μl PBS Wash Buffer (το buffer ήταν ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμασίες ELISA § 5.5.4, pH 7,2). Συνολικά έγιναν τρεις εκπλύσεις, ενώ μετά την τελευταία φυγοκέντρηση τα ιζήματα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα κενού, ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης.

Ακολούθησε θερμοβαρυμετρική ανάλυση κατά την οποία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή Schimadzu DTG-60. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε υπό αέρα με $T_{\alpha \rho \chi w \delta} = 30$ °C και $T_{\tau \epsilon \lambda u \kappa \delta} = 700$ °C, ενώ ο συνολικός χρόνος ήταν 48'.⁴¹ Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχη ποσότητα από το SiO₂@12peptide το οποίο δεν κατεργάστηκε με ορούς ασθενών. Από τα αποτελέσματα εξήχθη το ποσοστό (%) φόρτωσης των νανοϋλικών.

Τέλος έγινε ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR σε σύστημα Spectrum GX Perkin Elmer FTIR.⁴¹

5.5.8 Δοκιμασία ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας το TCDA@12peptide

Το υλικό TCDA@12peptide διαλύθηκε σε H₂O (1 mg/ml) και ορισμένη ποσότητα διαλύματος προστέθηκε στα wells δύο ELISA plate (50 μl/well). Το ένα plate τοποθετήθηκε σε θάλαμο UV για να πολυμεριστούν τα δείγματα. Στη συνέχεια και στα δύο plates προστέθηκαν 1) H₂O και 2) ορός υγιούς ατόμου ως αρντηικά controls και 3) ορός ασθενούς με επιβεβαιωμένο έμφραγμα (C_{τροπονίνης} 80 ng/ml). Τα δείγματα αφέθηκαν να αντιδράσουν με το TCDA@12peptide για μικρό χρόνο (20') και καταγράφηκαν οι χρωματικές αλλαγές.

Βιβλιογραφία 5°υ Κεφαλαίου

- 1. Park, J. P., Cropek, D. M. & Banta, S. High affinity peptides for the recognition of the heart disease biomarker troponin I identified using phage display. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 678–686 (2010).
- 2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
- 3. Altschul, S. F. & Gish, W. Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* **266**, 460–480 (1996).
- 4. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
- 5. Altschul, S. F. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**, 5101–5109 (2005).
- 6. Johnson, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**, W5-9 (2008).
- 7. Lipman, D. J. & Pearson, W. R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**, 1435–1441 (1985).
- 8. Pearson, W. R. & Lipman, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2444–2448 (1988).
- 9. Pearson, W. R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**, 63–98 (1990).
- 10. Pearson, W. R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms. *Genomics* **11**, 635–650 (1991).
- 11. Papadopoulos, J. S. & Agarwala, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **23**, 1073–1079 (2007).
- 12. BLASTp. Available at: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.
- 13. FASTA. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/fasta.shtml.
- 14. COBALT. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi.
- 15. Clustal Omega. Available at: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/.
- 16. Vasatova, M., Pudil, R., Horacek, J. M. & Buchler, T. *Current Applications of Cardiac Troponin T for the Diagnosis of Myocardial Damage. Advances in Clinical Chemistry* **61**, (Elsevier Inc., 2013).
- 17. Cheng, Y. & Regnier, M. Cardiac troponin structure-function and the influence of hypertrophic cardiomyopathy associated mutations on modulation of contractility. *Arch. Biochem. Biophys.* **601**, 11–21 (2016).
- 18. Sasse, S. *et al.* Troponin I gene expression during human cardiac development and in endstage heart failure. *Circ. Res.* **72**, 932–938 (1993).
- 19. UniProtKB. Available at: https://www.uniprot.org/help/uniprotkb.
- 20. Antibody Epitope Prediction. IEDB Analysis Resource. Available at: http://tools.immuneepitope.org/bcell/.
- 21. Parker, J. M., Guo, D. & Hodges, R. S. New hydrophilicity scale derived from highperformance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425–5432 (1986).
- 22. JANIN, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 277, 491–492 (1979).
- 23. Emini, E. A., Hughes, J. V, Perlow, D. S. & Boger, J. Induction of hepatitis A virusneutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* **55**, 836–839 (1985).

- 24. Karplus, P. A. & Schulz, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* **72**, 212–213 (1985).
- 25. Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee, R. & Welling-Wester, S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **188**, 215–218 (1985).
- 26. Hopp, T. P. & Woods, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3824 LP 3828 (1981).
- 27. Pettersson, I. Methods of epitope mapping. *Mol. Biol. Rep.* **16**, 149–153 (1992).
- 28. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **47**, 45–148 (1978).
- 29. Kolaskar, A. S. & Tongaonkar, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* **276**, 172–174 (1990).
- 30. Larsen, J. E. P., Lund, O. & Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res.* **2**, 2 (2006).
- 31. Ponomarenko, J. V. & Bourne, P. E. Antibody-protein interactions: Benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct. Biol.* **7**, (2007).
- 32. Haste Andersen, P., Nielsen, M. & Lund, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci.* **15**, 2558–2567 (2006).
- 33. Ho, T. K. Random decision forests. *Proc. Int. Conf. Doc. Anal. Recognition, ICDAR* **1**, 278–282 (1995).
- 34. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. BepiPred-2.0: Improving sequencebased B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* **45**, W24– W29 (2017).
- 35. Jones, J. H. Abbreviations and symbols in peptide science: A revised guide and commentary. *J. Pept. Sci.* **12**, 1–12 (2006).
- 36. Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P. & Do Nascimento, C. J. Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **20**, 53–69 (2014).
- 37. Papadopoulos, C. *et al*. Intracellular targets: A multiple cargo transporting molecule. *J. Pept. Sci*. 1–12 (2021). doi:10.1002/psc.3359
- Bapas, S. *et al.* Synthesis and antitumor activity of peptide-paclitaxel conjugates. *J. Pept. Sci.* 13, 662–671 (2007).
- 39. Winkler, R. ESIprot: a universal tool for charge state determination and molecular weight calculation of proteins from electrospray ionization mass spectrometry data. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 285–294 (2010).
- 40. GE Healthcare. Affinity Chromatography: Principles and Methods. GE HealtCare Handbooks (2007). doi:18-1132-29
- 41. Bletsa, E., Stathi, P., Dimos, K., Louloudi, M. & Deligiannakis, Y. Interfacial Hydrogen Atom Transfer by nanohybrids based on Humic Acid Like Polycondensates. *J. Colloid Interface Sci.* **455**, 163–171 (2015).
- 42. Στρογγύλης, Κ. Μελέτη και ανάπτυξη αντιδραστηρίων ανίχνευσης δεικτών διάγνωσης καρδιαγγειακών παθήσεων. (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2008).
- 43. Staak, C. *et al.* Isolation of IgY from Yolk. *Chick. Egg Yolk Antibodies, Prod. Appl.* 65–107 (2001). doi:10.1007/978-3-662-04488-9_4

6 Αποτελέσματα

6.1 Μελέτες ομολογίας

Από τη συστοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των τριών ισομορφών (ss, fs, c) της τροπονίνης Ι, όπως περιγράφεται στην § 5.1.1, προέκυψε ότι η cTnI έχει ομολογία 63% με την ss-TnI και 57% με την fs-TnI (Εικόνα 6.1, Πίνακας 6.1. Α).

cTnI	1	MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSKISASRKLQLKTLLLQIAKQE	60
ssTnI	1	MEVER.PTLS.M.AKEC	29
fsTnI	1	MGDEE.RNRAITA.RQHSVMAT.	29
cTnI	61	${\tt LEREAEERRGEKGRALSTRCQPLELAGLGFAELQDLCRQLHARVDKVDEERYDIEAKVTK}$	120
ssTnI	30	W.Q.HEAV.Y.AE.IPT.QTRSLSAEK.EVCLH	89
fsTnI	30	K.ESR.EAQNY.AEH.PHIPSMS.V.EKKI.AAEKM.VR.Q.	88
cTnI	121	NITEIADLTQKIFDLRGKFKRPTLRRVRISADAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKED	180
ssTnI	90	.TRKKL.VMPVLRSKH.V.MNS	149
fsTnI	89	TSK.LE.MNL	148
cTnI	181	TEKENREVGDWRKNIDALSGMEGRKKKFES 210	
ssTnI	150	R-PVVE.MM.DAAKSPTSQ 187	
fsTnI	149	RDLRDEEKMES 182	

Εικόνα 6.1. Συστοίχιση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι (cTnI) με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές, αργής (ssTnI) και ταχείας (fsTnI) μυϊκής σύσπασης. Οι ομόλογες περιοχές των τριών υπομονάδων επισημαίνονται με τελείες, ενώ με παύλες επισημαίνονται οι ομόλογες περιοχές των δύο εκ των τριών πρωτεϊνών.

Επίσης οι σκελετικές τροπονίνες Τ παρουσιάζουν ομολογία 74%-94% με τις καρδιακές τροπονίνες Τ, ενώ οι σκελετικές τροπονίνες C έχουν ομολογία 88%-100% με τις καρδιακές τροπονίνες C (Εικόνες 6.2 και 6.3, Πίνακας 6.1. Α).

cTnT	1	MSDIEEVVEEYEEEEQEEAAVEEEEDWREDEDEQEEAAEEDAEAEAETEETRAEEDEE	58
ssTnT	1	$\texttt{M}.\texttt{DT}.\texttt{E}\texttt{QE}.\ldots\texttt{QPE}\texttt{E}.\texttt{A}.\texttt{E}.\texttt{E}\texttt{E}.\texttt{A}.$	24
fsTnT	1	M.DE.VEQVEEQEEAH.	28
cTnT	59	${\tt EEEAKEAEDGPMEESKPKPRSFMPNLVPPKIPDGERVDFDDIHRKRMEKDLNELQALIEA}$	118
ssTnT	25	$APEEP.PVAEPEE.RPKPSRPVV.P.IP.\ldots E\ldots R.\ldots.HRME\ldots L\ldots T\ldots DV$	84
fsTnT	29	EVHEP.EVQEDTA.EDAEEEKPR.K.TAEKQKQNMADS	88
cTnT	119	$\label{eq:heat} HFENRKKEEEELVSLKDRIERRRAERAEQQRIRNEREKERQNRLAEERARREEEENRRKA$	178
ssTnT	85	Q	144
fsTnT	89	AAEKI.A.K.RNRKA.RDAKRR.	148
cTnT	179	EDEARKKKALSNM-MHFGGYIQKQAQTERKSGKRQTEREKKKKILAERRKVLAIDHLNED	237
ssTnT	145	DAKVN.GAHFGG.LV.AEQ.RRGM.VRSK.P.DYMG.E	201
fsTnT	149	DLKAS.GANYSS.LA.ADQ.RKAM.KKAR.P.NHLG.D	205
cTnT	238	QLREKAKELWQSIYNLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLRNRINDN	281
ssTnT	202	Q ARSAWLPPSQPSCPAREK.Q SDWIHQ SE DLMA. L.Q E . NV. YN SHA	261
fsTnT	206	KDKKWETLHQIDEFGE.L.RD.TT.RSDQA	249
cTnT	282	QKVSKTRGKAKVTGRWK 298	
ssTnT	262	FR.GAG.GR.G 278	
fsTnT	250	HS.KAGTPA.GK.G 269	

Εικόνα 6.2. Συστοίχιση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης T (cTnT) με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές, αργής (ssTnT) και ταχείας (fsTnT) μυϊκής σύσπασης. Οι ομόλογες περιοχές των τριών υπομονάδων επισημαίνονται με τελείες, ενώ με παύλες επισημαίνονται οι ομόλογες περιοχές των δύο εκ των τριών πρωτεϊνών.



Εικόνα 6.3. Συστοίχιση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης C (cTnC) με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές, αργής (ssTnC) και ταχείας (fsTnC) μυϊκής σύσπασης. Οι ισομορφές είναι ομόλογες εξολοκλήρου.

Με την ίδια μεθοδολογία προέκυψε ότι η καρδιακή τροπονίνη Ι έχει 13% ομολογία με την καρδιακή τροπονίνη C και 17% ομολογία με την καρδιακή τροπονίνη T (Εικόνα 6.4, Πίνακας 6.1. B).

9	MADGSSDAA		cTnI
			cTnC
60	MSDIEEVVEEYEEEEQEEAAVEEEEDWREDEDEQEEAAEEDAEAEAETEETRAEEDEEEE	1	cTnT
63	REPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSKISASRKLQLKTLLLQIAKQELER	10	cTnI
35	MDDIYKAAVEQLTEEQKNEFKAAFDIFVLGA.DGC		cTnC
120	${\tt EAKEAEDGPMEESKPKPRSFMPNLVPPKIPDGERVDFDDIHRKRMEKDLNELQALI.AHF}$	61	cTnT
120	EAEERRGEKGRALSTRCQPLELAGLGFA-ELQDLCRQLHARVDKVDEERYDIEAKVTK	64	cTnI
95	ISTKELGKVMRM.GQNPTPEELQEMIDEVDEDGSGTVDFDEFLVMMVRCMKDDSKG.SEE	36	cTnC
180	ENRKKEEEELVS.KDRIERRRAERAEQQRIRNEREKERQNRLAEERARREEEENRR.AED	121	cTnT
169	NITEIADLTQKIFDLRGKFKRPTLRRVRISADAMMQALLGARAKESLDL	121	cTnI
146	ELSDLFRMFDKNAD.YIDLDELKIMLQATGETITEDDIEELMKDGDKNNDG	96	cTnC
239	${\tt EARKKKALSNM-MHFG.YIQKQAQTERKSGKRQTEREKKKKILAERRKVLAIDHLNEDQL$	181	cTnT
211	RAHLKQVKKEDTEKENREVGDWRKNIDALSGMEGRKKKFES	170	cTnI
161	.IDYDEFLEFMKGVE	147	cTnC
298	.EKAKELWQSIYNLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLRNRINDNQKVSKTRGKAKVTGRWK	240	cTnT

Εικόνα 6.4. Συστοίχιση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (cTnl) με τις καρδιακές ισομορφές της cTnC και cTnT. Οι ομόλογες περιοχές των τριών υπομονάδων επισημαίνονται με τελείες, ενώ με παύλες επισημαίνονται οι ομόλογες περιοχές των δύο εκ των τριών πρωτεϊνών.

Η συνολική ομολογία των τριών ισομορφών κάθε υπομονάδας της τροπονίνης και η ομολογία των καρδιακών τροπονινών C, I, T παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

Α. Συνολική ομολογία μεταξύ σκελετικών και καρδιακών ισομορφών των τροπονινών			τικών και νινών	Β. Συνολική ομολογία μεταξύ των καρδιακών ισομορφών των τροπονινών I-T-C	
	cTnI	cTnT	cTnC		cTnI
fs-TnI	57%			cTnT	17%
ss-TnI	63%			cTnC	13%
fs-TnT		74%			
ss-TnT		94%			
fs-TnC			88%		
ss-TnC			100%		

Πίνακας 6.1. Συνολική ομολογία μεταξύ σκελετικών και καρδιακών ισομορφών των τροπονινών (A) και των καρδιακών ισομορφών των τροπονινών C, I, T (B).

6.2 Μελέτη ανοσογονικότητας των καρδιακών ισομορφών της τροπονίνης

Παρατίθενται σχηματικά τα αποτελέσματα των μελετών (§ 5.1.2) της αντιγονικής χαρτογράφησης, της υδροφιλικότητας, της προσβασιμότητας επιφάνειας, της ευελιξίας και της δευτεροταγούς δομής της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι (Εικόνες 6.5-6.10).



Εικόνα 6.5. Σχηματική παρουσίαση των υδρόφιλων περιοχών της cTnI. Μέθοδος: Parker Hydrophilicity Prediction.



Εικόνα 6.6. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της cTnI. Μέθοδος: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity.



Εικόνα 6.7. Σχηματική παρουσίαση των επιφανειακά προσβάσιμων περιοχών της cTnI. Μέθοδος: Emini Surface Accessibility Prediction.



Εικόνα 6.8. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών κινητικά ευέλικτων περιοχών της cTnI. Μέθοδος: Karplus Chain flexibility.



Εικόνα 6.9. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών γραμμικών επιτόπων της cTnI. Μέθοδος: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.



Εικόνα 6.10. Σχηματική παρουσίαση των περιοχών της cTnI που μπορούν να εμφανίσουν δευτεροταγή δομή β-στροφής. Μέθοδος: Chou/Fasman.

Από το σύνολο των περιοχών που προσδιορίστηκαν με βάση τις παραπάνω υπολογιστικές μεθόδους (Εικόνες 6.5-6.10), καθώς και παλαιότερες μελέτες, επιλέχθηκαν τέσσερις
περιοχές της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι, οι οποίες ελέγχθηκαν εκ νέου για την ομολογία τους με τις αντίστοιχες περιοχές των σκελετικών fs-TnI και ss-TnI, όπως και με τις αντίστοιχες περιοχές των cTnT και cTnC (Πίνακας 6.2).

		cTnI ¹⁹⁻³¹	cTnI ⁶⁶⁻⁷⁷	cTnI ¹¹⁰⁻¹²²	cTnI ¹¹⁸⁻¹³¹
A	fs-TnI	0%	33%	39%	36%
	ss-TnI	0%	50%	62%	43%
В	cTnT	8%	17%	8%	7%
	cTnC	0%	25%	15%	7%

Πίνακας 6.2. Επιμέρους ομολογίες των επιλεγμένων αλληλουχιών της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι έναντι των αντίστοιχων (Α) σκελετικών και (Β) καρδιακών ισομορφών των τροπονινών Τ και C.

Οι περιοχές που επιλέχθηκαν για ανάπτυξη την αντισωμάτων είναι οι εξής:

1. Η αλληλουχία **R¹⁹RRSSNYRAYATE³¹** (cTnI¹⁹⁻³¹) δεν έχει ομολογία με τις σκελετικές ισομορφές, ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T είναι πολύ χαμηλή έως μηδαμινή (Πίνακας 6.2). Επίσης, παρουσιάζει υψηλή υδροφιλικότητα και επιφανειακή προσβασιμότητα, ενώ η αντιγονικότητα και η ευκαμψία της είναι ικανοποιητικές (Εικόνες 6.5-6.10).

2. Η αλληλουχία **E⁶⁶RRGEKGRALST⁷⁷** (cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) παρουσιάζει μεσαία ομολογία με την ss σκελετική και χαμηλή ομολογία με την fs σκελετική ισομορφή, ενώ με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T παρουσιάζει χαμηλή ομολογία (Πίνακας 6.2). Επίσης, είναι πολύ υδρόφιλη, εύκαμπτη και επιφανειακά προσβάσιμη. Ωστόσο, η αντιγονικότητά της δεν προβλέπεται ιδιαίτερα υψηλή (Εικόνες 6.5-6.10).

3. Η αλληλουχία **R**¹¹⁰**YDIEAKVTKNIT**¹²² (cTnI¹¹⁰⁻¹²²)έχει μέτρια και χαμηλή ομολογία με τις σκελετικές ισομορφές ss και fs αντίστοιχα, ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές τροπονίνες C και T είναι πολύ χαμηλή (Πίνακας 6.2). Επιπλέον προβλέπεται ότι έχει υψηλή υδροφιλικότητα και αντιγονικότητα, καθώς και αρκετά ικανοποιητική ευκαμψία και επιφανειακή προσβασιμότητα (Εικόνες 6.5-6.10).

4. Η αλληλουχία **T¹¹⁸KNITEIADLTQKI¹³¹** (cTnI¹¹⁸⁻¹³¹) εμφανίζει μεσαία προς χαμηλή ομολογία σε σχέση με τις σκελετικές ισομορφές της τροπονίνης Ι, ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T είναι ελάχιστη (Πίνακας 6.2). Παρά το γεγονός ότι δεν προβλέπεται υψηλή υδροφιλικότητα και επιφανειακή προσβασιμότητα για τη συγκεκριμένη αλληλουχία, η αντιγονικότητά της είναι υψηλή και η ευκαμψία της ικανοποιητική (Εικόνες 6.5-6.10).

6.3 Σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων και συμπλεγμάτων

6.3.1 Πεπτιδικός φορέας CPSOC(3,9-Acm)

Στο Σχήμα 6.1 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του φορέα CPSOC(3,9-Acm). Για τη σύνθεση του ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην § 5.4.1. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα διαλυτών TFA/TIS/H₂O/DODT (94/1/2,5/2,5, v/v/v/v). Η συνολική απόδοση που υπολογίστηκε ήταν ίση με 85%.



Σχήμα 6.1. Συντακτικός τύπος του CPSOC(3,9-Acm).

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως αποδίδεται στην § 5.4.3 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.11, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης ήταν (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA και είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ (B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 71%.



Εικόνα 6.11. Αναλυτική RP-HPLC του CPSOC(3,9-Acm).

Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.12, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 1466,81 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+1H^+]/1$, 2) 790,34 Da, που αντιστοιχεί στο $[(M+M_{TFA})+2H^+]/2$, 3) 733,28 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+2H^+]/2$, 4) 526,81 Da, που αντιστοιχεί στο $[(M+M_{TFA})+3H^+]/3$, 5) 488,77 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+3H^+]/3$.



Εικόνα 6.12. Φάσμα μάζας ESI-MS του CPSOC(3,9-Acm). Υπολογισθέν MB: 1466,9 Da. Ευρεθέν MB: 1464,55±1,26.

6.3.2 Πεπτίδιο IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹

Στο Σχήμα 6.2 φαίνεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹. Για τη σύνθεση του ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην § 5.4.1. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα διαλυτών TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, v/v/v). Η συνολική απόδοση που υπολογίστηκε ήταν ίση με 95%.



Σχήμα 6.2. Συντακτικός τύπος του IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹.

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην § 5.4.3 και παρατίθεται στην Εικόνα 6.13, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το καλύτερο σύστημα έκλουσης για το συγκεκριμένο πεπτίδιο αποδείχτηκε το εξής: (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA με γραμμική μεταβολή από (A) 80/ (B) 20 σε (A) 70/ (B) 30 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 57%.



Εικόνα 6.13. Αναλυτική RP-HPLC του πεπτιδίου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹.

Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη όπως αναφέρεται στην § 5.4.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.14, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 956,03 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+2H^+]/2$, 2) 675,73 Da, που αντιστοιχεί στο $[(M+M_{TFA})+3H^+]/3$, 3) 637,71 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+3H^+]/3$.



Εικόνα 6.14. ESI-MS του πεπτιδικού αναλόγου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹. Υπολογισθέν MB: 1909,84 Da. Ευρεθέν MB: 1910,07±0,03.

6.3.3 Πεπτίδιο IAc-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷

Στο Σχήμα 6.3 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷. Η σύνθεσή του πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την SPPS (§ 5.4.1). Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα διαλυτών TFA/TIS/H₂O/DMB/DODT (90/2,5/4/1/2,5, v/v/v/v).). Η συνολική απόδοση που υπολογίστηκε ήταν ίση με 70%.



Σχήμα 6.3. Συντακτικός τύπος του IAc-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷.

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.3 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.15, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 95/ (B) 5 σε (A) 60/ (B) 40 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 38%.



Εικόνα 6.15. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP- HPLC του πεπτιδίου IAc-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷.

Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη όπως αναφέρεται στην § 5.4.4 και παρατίθεται στην Εικόνα 6.16, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 763,01 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+2H^+]/2$, 2) 546,57 Da, που αντιστοιχεί στο $[(M+M_{TFA})+3H^+]/3$, 3) 508,5 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+3H^+]/3$, 4) 381,30 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+4H^+]/4$.

Κεφάλαιο 6°



Εικόνα 6.16. Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδικού αναλόγου IAc-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷. Αναμενόμενο MB:1526,44. Ευρεθέν MB: 1522,55±1,42.

6.3.4 Σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷)

Στο Σχήμα 6.4 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδικού συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷). Η σύνθεση του επιτεύχθηκε με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού, όπως αποδίδεται λεπτομερώς στην § 5.4.2. Η απόδοση σύνθεσης ήταν ίση με 92%.



Σχήμα 6.4. Συντακτικός τύπος του συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷).

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.3 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.17, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ (B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 50%.





Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.18, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 1066,5 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+4H^+]/4$, 2) 853,5 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+5H^+]/5$, 3) 711,5 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+6H^+]/6$, 4) 609,8 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+7H^+]/7$, 5) 533,7 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+8H^+]/8$.



Εικόνα 6.18. Φάσμα μάζας ESI του συμπλόκου CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷). Υπολογισθέν MB: 4263,96. Ευρεθέν MB:4262,10±0,61.

6.3.5 Πεπτίδιο IAc-cTnI¹¹⁰⁻¹²²

Στο Σχήμα 6.5 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-cTnI¹¹⁰⁻¹²². Η σύνθεσή του πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την SPPS (§ 5.4.1). Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα διαλυτών TFA/TIS/H₂O/DMB/DODT (90/2,5/4/1/2,5, v/v/v/v). Η απόδοση που υπολογίστηκε ήταν73%.



Σχήμα 6.5. Συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-cTnI¹¹⁰⁻¹²².

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως αναφέρεται στην § 5.4.3 και παρατίθεται στην Εικόνα 6.19, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ (B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 19%.



Εικόνα 6.19. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου IAc-cTnI¹¹⁰⁻¹²².

Το φάσμα μάζας του ESI-MS ελήφθη σύμφωνα με την § 5.4.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.20, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 858,70 Da, που αντιστοιχεί στο [M+2H⁺]/2, 2) 572,31 Da, που αντιστοιχεί στο [M+3H⁺]/3.



Εικόνα 6.20. Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδικού αναλόγου IAc-cTnI¹¹⁰⁻¹²². Υπολογισθέν MB: 1717,70. Ευρεθέν MB: 1714,65±1,04.

6.3.6 Σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²)

Στο Σχήμα 6.6 φαίνεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδικού συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²). Η σύνθεση του πραγματοποιήθηκε με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού, όπως αποδίδεται λεπτομερώς στην § 5.4.2. Η απόδοση σύνθεσης ήταν ίση με 70%.



Σχήμα 6.6. Συντακτικός τύπος του συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²).

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.3 και παρατίθεται στην Εικόνα 6.21, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ (B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 17%.



Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη όπως περιγράφεται στην § 5.4.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.22, όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 1162,2 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+4H^+]/4$, 2) 930,0 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+5H^+]/5$, 3) 795,2 Da, που αντιστοιχεί στο $[(M+M_{TFA})+6H^+]/6$, 4) 775,1 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+6H^+]/6$, 5) 664,6 Da, που αντιστοιχεί στο $[M+7H^+]/7$.



Εικόνα 6.22. Φάσμα μάζας ESI του συμπλόκου CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²). Υπολογισθέν MB: 4646,48. Ευρεθέν MB: 4644,86±0,25.

6.3.7 Πεπτίδιο IAc-12peptide

Στο Σχήμα 6.7 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-12peptide. Για τη σύνθεση του ακολουθήθηκε η SPPS (§ 5.4.1). Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα διαλυτών TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, v/v/v). Η συνολική απόδοση που υπολογίστηκε ήταν 77%.



Σχήμα 6.7. Συντακτικός τύπος του πεπτιδίου IAc-12peptide.

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην § 5.4.3 και παρατίθεται στην Εικόνα 6.23, όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 95/ (B) 5 σε (A) 50/ (B) 50 για 30'. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 51%.



Εικόνα 6.23. Αναλυτική RP-HPLC του πεπτιδίου IAc-12peptide.

Το φάσμα μάζας ESI-MS ελήφθη σύμφωνα με την πρότυπη διαδικασία που περιγράφεται στην § 5.3.4 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.24, όπου διακρίνεται το μοριακό ιόν με Μοριακό Βάρος 852,13 Da, που αντιστοιχεί στο [M+2H⁺]/2.



Εικόνα 6.24. Φάσμα μάζας .ESI-MS του πεπτιδίου IAc-12peptide. Υπολογισθέν MB: 1704,54. Ευρεθέν MB: 1702,26.

6.3.8 Σύνθεση του υλικού TCDA@12peptide

Στο Σχήμα 6.8 παρατίθεται ο συντακτικός τύπος του TCDA@12peptide. Η σύνθεσή του έγινε όπως αποδίδεται λεπτομερώς στην § 5.4.10. Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη έγινε με μίγμα TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, v/v/v). Η απόδοση ήταν 48%. Το πεπτίδιο έλαβε ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα μετά τη σύζευξη του 10,12-TCDA (Εικόνα 6.26).



Σχήμα 6.8. Συντακτικός τύπος του υλικούTCDA@12peptide.



Εικόνα 6.25. Απεικόνιση του TCDA@12peptide σε στερεή μορφή (Α) και σε διάλυμα (Β).

6.4 Σύνθεση του υλικού SiO₂@12peptide

To SiO₂@12peptide συντέθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται εκτενώς στην § 5.4.6 και η δομή του απεικονίζεται στο Σχήμα. Η σύζευξη του IAc-12peptide στα νανοσωματίδια σίλικας ταυτοποιήθηκε με FTIR, όπως υποδεικνύεται στην § 5.4.7. Στην Εικόνα 6.26 φαίνεται το φάσμα FTIR του SiO₂@12peptide, καθώς και του 12peptide και του SiO₂ για σύγκριση. Τα 1540 cm⁻¹, 1430 cm⁻¹ και 1385 cm⁻¹ αποδίδονται στη δόνηση τάσης του δεσμού C=C, και στις αλειφατικές ομάδες (CH₂-CH₃) των αμινοξέων του πεπτιδίου. Οι πεπτιδικοί δεσμοί του 12peptide και του SiO₂@12peptide εμφανίζονται στα 1643 cm⁻¹ (τέντωμα του δεσμού C=O) και 1535 cm⁻¹ (δεσμός C-N). Στα 1159 cm⁻¹ εμφανίζεται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O των αμινοξέων που φέρουν ομάδες υδροξυλίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή 3300–3400 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις των δεσμών Ο-Η και N-H. Η παρουσία των χαρακτηριστικών πεπτιδικών δεσμών στο SiO₂@12peptide είναι η βασική απόδειξη ότι το πεπτίδιο προσδένεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων σίλικας.



Εικόνα 6.26. Φάσματα FT-IR του 12peptide και του SiO₂@12peptide. Οι κορυφές στα 1643 και 1535 cm⁻¹ που φαίνονται στο SiO₂@12peptide και το IAc-12peptide δεν υπάρχουν στο SiO₂ και αποδίδονται στους πεπτιδικούς δεσμούς.

Η επιτυχής σύνθεση του υλικού SiO₂@12peptide ταυτοποιήθηκε και με φασματοσκοπία EPR (όπως περιγράφεται στην § 5.4.8), καθώς το 12peptide διαθέτει το αμινοξικό κατάλοιπο της τυροσίνης, της οποίας η φαινολική υδροξυλομάδα μπορεί να οξειδωθεί και να ανιχνευτεί η ρίζα της. Τα φάσματα EPR του IAc-12peptide και του SiO₂@12peptide φαίνονται στην Εικόνα 6.27. Πριν από την προσθήκη του οξειδωτικού KMnO4, δεν ανιχνεύθηκε σήμα EPR.

Τα ριζικά σήματα αναπτύχθηκαν γρήγορα μετά την προσθήκη του οξειδωτικού στα πεπτιδικά διαλύματα, των οποίων το χρώμα άλλαξε αμέσως από μωβ σε σκούρο πράσινο, ενδεικτικό της αναγωγής του Mn κατά τη λήψη ηλεκτρονίων από τα οξειδωμένα οργανικά μόρια. Τα φάσματα EPR παρουσιάζονται σε κανονικοποιημένες εντάσεις, για καλύτερη σύγκριση σχήματος γραμμής και τιμής g.

Από τα φάσματα EPR βρέθηκε ότι ο χρόνος ζωής των ριζών τυροσίνης τόσο στο IAc-12peptide όσο και στο υβριδικό υλικό SiO₂@12peptide είναι σημαντικά μεγάλος για ένα μη βιολογικό σύστημα. Εξαιτίας αυτών των σημαντικών ευρημάτων, εκτός από το SiO₂@12peptide συντέθηκαν και μελετήθηκαν με τις ίδιες διαδικασίες επιπλέον ορισμένα υλικά, τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα διατριβή.



Εικόνα 6.27. Φάσματα EPR του 12peptide και του SiO₂@12peptide, όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των ριζών τυροσίνης.

Η ποσότητα του πεπτιδίου IAc-12peptide που προσδέθηκε στα σωματίδια SiO₂ προσδιορίστηκε με θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA), όπως περιγράφεται στην § 5.4.9. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 6.3. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα χαρακτηριστικά των ομάδων -OH των σωματιδίων A90 SiO₂, (0,5 mmol/g), τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι 1) οι «φορτωμένες» μερκαπτο-ομάδες αντιστοιχούν ~ στο 1/10 των διαθέσιμων θέσεων - OH και 2) η πλειονότητα των επιφανειακών θειολομάδων -SH συζεύχθηκε με το πεπτίδιο.

σύνθεσης του υβριδικού υλικού SiO2@12peptide.					
Φόρτωση νανοσωματιδίων (μmol/gr) ± 5					
	Μερκαπτο-ομάδα	Πεπτίδιο			
SiO ₂ @SH	48	-			
SiO ₂ @12-peptide	48	46			

Πίνακας 6.3. Φόρτωση των νανοσωματιδίων σίλικας σε κάθε στάδιο σύνθεσης του υβριδικού υλικού SiO₂@12peptide.

6.5 Σύνθεση του υλικού Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹

Η πρόσδεση του πεπτιδίου IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ στα σφαιρίδια thiopropyl Sepharose 6B, έγινε όπως περιγράφεται στην § 5.4.5. Η πορεία της αντίδρασης της σεφαρόζης με το DTT ελέγχθηκε με φασματοσκοπία UV (343 nm). Στην Εικόνα 6.29 φαίνεται η παραγωγή του προϊόντος 2-θειοπυριδόνη, που προέκυψε από τις δύο διαδοχικές αντιδράσεις θειόλης-δισουλφιδίου, γεγονός που πιστοποιεί τον επιτυχή σχηματισμό ελεύθερων θειολομάδων στην επιφάνεια των σφαιριδίων σεφαρόζης.



Εικόνα 6.28. Αναγωγή της thiopropyl Sepharose 6B με το DTT και παραγωγή της 2-θειοπυριδόνης.

6.6 Έλεγχος Εξειδίκευσης Αντισωμάτων

6.6.1 Ανοσοποιήσεις έναντι ενός επίτοπου

6.6.1.1 Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων

Πραγματοποιήθηκαν έμμεσες δοκιμασίες ELISA για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι των επίτοπων cTnI¹⁹⁻³¹ και cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4. Τα συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν στο plate σε συγκέντρωση 5 μg/ml, ενώ τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1/25 έως 1/400. Στα Διαγράμματα 6.1 και 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των επιμέρους ανοσοδοκιμασιών με αρνητικό Control αντισώματα από τις ίδιες όρνιθες πριν τις ανοσοποιήσεις. Στο Διάγραμμα 6.1 φαίνεται ότι υπάρχει εξειδίκευση των παραχθέντων αντισωμάτων για το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹. Από τη σύγκριση της οπτικής πυκνότητας στα δύο διαγράμματα, διαπιστώνεται ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹.



Διάγραμμα 6.1. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ που απομονώθηκαν από την ανοσοποιημένη όρνιθα (γαλάζιο) και των αντισωμάτων που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (Control-, μαύρο).



Διάγραμμα 6.2. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ που απομονώθηκαν από την ανοσοποιημένη όρνιθα (γαλάζιο) και των αντισωμάτων που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (Control-, μαύρο).

6.6.1.2 Σύγκριση των πρωτόκολλων απομόνωσης IgY αντισωμάτων: PEG vs NaCl

Με δοκιμασίες έμμεσης ELISA ελέγχθηκε η επιτυχής απομόνωση των IgY αντισωμάτων, συγκρίνοντας ταυτόχρονα την απόδοση των δύο διαφορετικών πρωτόκολλων που ακολουθήθηκαν, τα οποία περιγράφονται εκτενώς στην § 5.5.2. Τα συμπλέγματα SOCcTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν στο plate σε συγκέντρωση 5 μg/ml, ενώ τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1/25 έως 1/400. Σύμφωνα με τα Διαγράμματα 6.3 και 6.4, τα IgY αντισώματα απομονώθηκαν επιτυχώς και με τα δύο πρωτόκολλα. Παρόλο που εμφανίζονται κάποιες διαφορές δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές.



Διάγραμμα 6.3. Σχηματική παρουσίαση της απομόνωσης των IgY αντισωμάτων που παρήχθησαν έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹. Με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζονται τα απομονωμένα αντισώματα με το πρωτόκολλο PEG, ενώ με μαύρο με το NaCl.



Διάγραμμα 6.4. Σχηματική παρουσίαση της απομόνωσης των IgY αντισωμάτων που παρήχθησαν έναντι του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹. Με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζονται τα απομονωμένα αντισώματα με το πρωτόκολλο PEG, ενώ με μαύρο με το NaCl.

6.6.1.3 Σύγκριση εξειδίκευσης crude και καθαρισμένων αντισωμάτων με διαπίδυση έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹

Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA για τη σύγκριση των crude αντισωμάτων με τα αντίστοιχα καθαρισμένα αντισώματα με διαπίδυση, όπως αναφέρεται στην § 5.5.4. Τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml, ενώ τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις από 1 έως 1/100. Στα Διαγράμματα 6.5 και 6.6 φαίνεται ότι τα καθαρισμένα με διαπίδυση αντισώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τα crude αντισώματα.



Διάγραμμα 6.5. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των crude (μαύρο) και καθαρισμένων με διαπίδυση (γαλάζιο) αντισωμάτων έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.



Διάγραμμα 6.6. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των crude (μαύρο) και καθαρισμένων με διαπίδυση αντισωμάτων (γαλάζιο) έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹.

6.6.1.4 Σύγκριση των συνθηκών αποθήκευσης/συντήρησης των αντισωμάτων

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA για τη σύγκριση των μεθόδων αποθήκευσης των αντισωμάτων. Η μία μέθοδος ήταν η κλασματοποίηση και κατάψυξη των δειγμάτων στους -20 °C και η άλλη η λυοφιλιοποίηση. Τα συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις από 1/50 έως 1/200. Στα Διαγράμματα 6.7 και 6.8 φαίνεται ότι τα αποθηκευμένα αντισώματα στους -20 °C δίνουν καλύτερα αποτελέσματα από τα λυοφιλιοποιημένα, ωστόσο οι διαφορές δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές.



Διάγραμμα 6.7. Σχηματική παρουσίαση της δραστικότητας των αντισωμάτων (παραχθέντων έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹) που καταψύχθηκαν στους -20 °C (γαλάζιο) και των λυοφιλιοποιημένων (μαύρο).



Διάγραμμα 6.8. Σχηματική παρουσίαση της δραστικότητας των αντισωμάτων (παραχθέντων έναντι του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹) που καταψύχθηκαν στους -20 °C (γαλάζιο) και των λυοφιλιοποιημένων (μαύρο).

6.6.1.5 Επίδραση θερμοκρασίας στις δοκιμασίες ELISA

Δύο διαφορετικά πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στις ανοσοδοκιμασίες. Έτσι πραγματοποιήθηκαν ELISA με τα ίδια αντιδραστήρια και βήματα με τη διαφορά ότι στο ένα πρωτόκολλο τα αντιδραστήρια επωάστηκαν στους 4 °C για 24 h, ενώ στο άλλο οι επωάσεις των αντιδραστηρίων έγιναν στους 37 °C για 2 h. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOCcTnI¹⁹⁻³¹ και τα παραχθέντα αντισώματα έναντι αυτού. Η συγκέντρωση του ανοσογονικού συμπλέγματος ήταν 5 μg/ml και τα αντισώματα επιστρώθηκαν στη συγκέντρωση του

αρχικού stock διαλύματος ή αραιώθηκαν στο κατάλληλο διάλυμα σε αναλογία 1/25. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και δείγμα απομονωμένων αντισωμάτων μη εξειδικευμένων (απομονωμένα από μη ανοσοποιημένες όρνιθες) ως αρνητικό control. Στο Διάγραμμα 6.9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των δύο πρωτοκόλλων. Όπως παρατηρείται και με τα δύο πρωτόκολλα τα αντισώματα προσδέθηκαν εξειδικευμένα στο ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹. Επίσης, φαίνεται ότι το πρωτόκολλο κατά το οποίο τα αντιδραστήρια επωάζονται στους 37 °C για 2 h δείχνει καλύτερα αποτελέσματα έναντι του πρωτόκολλου των 4 °C για 24 h. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της καλύτερης προσρόφησης των επιμέρους αντιδραστηρίων στο plate.



Διάγραμμα 6.9. Σχηματική παρουσίαση της σύγκρισης των δύο πρωτόκολλων επώασης των αντιδραστηρίων. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του πρωτόκολλου επώασης στους 37 °C για 2 h, και με γκρι τα αντίστοιχα αποτελέσματα του πρωτόκολλου επώασης στους 4 °C για 24 h.

6.6.1.6 Έλεγχος παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων μετά τις ανοσοποιήσεις

Μετά την τελευταία ανοσοποίηση, η συλλογή των αυγών συνεχίστηκε για να διαπιστωθεί η διάρκεια παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων. Τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOCcTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα στη συγκέντρωση του αρχικού stock διαλύματος. Το Διάγραμμα 6.10 δείχνει ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ συνέχισε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα, η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό συμπλέγματα soc-cTnI¹⁹⁻³¹ συνέχισε να παράγει μετά από την τελευταία ανοσοποίηση. Αντίθετα, η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό συμπλέγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα τα το ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα τα το ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα του ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα τα το ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα τα το ανοσομαι τα τα αντισώματα έναντι αυτού σε ικανοποιητικό τίτλο έως και εννέα μήνες μετά από την τελευταία ανοσοποιήση. Αντίθετα, η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ σταμάτησε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα έναντι αυτού μεξειδικευμένα αντισώματα έναντι αυτού



Διάγραμμα 6.10. Σχηματική παρουσίαση της παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ (γαλάζιο) και του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ (μαύρο) συναρτήσει του χρόνου, έως και εννιά μήνες μετά το πέρας των ανοσοποιήσεων.

6.6.1.7 Έλεγχος δραστικότητας αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης

Τα παραχθέντα αντισώματα ελέγχθηκαν για τη δραστικότητά τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους με μία σειρά έμμεσων δοκιμασιών ELISA (§ 5.5.4). Τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν στη συγκέντρωση του αρχικού stock διαλύματος. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 6.11, τα παραχθέντα αντισώματα διατήρησαν τη δραστικότητά τους έως και δεκατέσσερις μήνες μετά την αποθήκευσή τους.



Διάγραμμα 6.11. Σχηματική παρουσίαση της δραστικότητας των αντισωμάτων έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται τα αντισώματα που αποθηκεύτηκαν για δεκατέσσερις μήνες, ενώ με γαλάζιο αυτά που χρησιμοποιήθηκαν σύντομα μετά την απομόνωσή τους και με γκρι τα αντισώματα που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις.

6.6.1.8 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων στη Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹

Ο καθαρισμός των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ με χρωματογραφία συγγένειας (§ 5.5.3) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη στήλη Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹. Ο καθαρισμός ελεγχόταν με φασματοσκοπία UV (280 nm) και τα εξειδικευμένα για τον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹ αντισώματα εντοπίστηκαν στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα (Διάγραμμα 6.12). Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA (§ 5.5.4) για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των καθαρισμένων αντισωμάτων για τον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹. Το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα είναι εξειδικευμένα για τον εξειδικευμένα για τον εξειδικευμένα και δείτερο κλάσμα (Διάγραμμα δ.13 φαίνεται ότι τα αντισώματα είναι εξειδικευμένα για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.



Διάγραμμα 6.12. Σχηματική παρουσίαση του καθαρισμού των αντισωμάτων, που παρήχθησαν έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, με χρωματογραφία συγγένειας.



Διάγραμμα 6.13. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας αντισωμάτων για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹. Η εξειδίκευση κάθε κλάσματος απεικονίζεται με διαφορετική απόχρωση.

6.6.2 Ανοσοποιήσεις με το μίγμα των τεσσάρων επίτοπων της cTnI

6.6.2.1 Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA (§ 5.5.4), για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος των τεσσάρων επίτοπων της cTnI. Τα συμπλέγματα (SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷), CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²), SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹) επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα σε αραιώσεις 1/10.000 έως 1/50.000. Ως αρνητικό Control χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από την ίδια όρνιθα πριν τις ανοσοποιήσεις. Στα Διαγράμματα 6.14-6.17 φαίνεται ότι παρήχθησαν αντισώματα έναντι όλων των επίτοπων.



Διάγραμμα 6.14. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος επίτοπων για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ (γαλάζιο) και των αντισωμάτων που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (control-, μαύρο).



Διάγραμμα 6.15. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος επίτοπων για το σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) (γαλάζιο) και των αντισωμάτων που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (control-, μαύρο).



Διάγραμμα 6.16. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος επίτοπων για το σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTn¹¹⁰⁻¹²²) (γαλάζιο) και αυτών που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (control-, μαύρο).



Διάγραμμα 6.17. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος επίτοπων για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ (γαλάζιο) και των αντισωμάτων που απομονώθηκαν πριν τις ανοσοποιήσεις (control-, μαύρο).

Από τη σύγκριση της οπτικής πυκνότητας διαπιστώνεται ότι η όρνιθα έδωσε υψηλότερου τίτλου αντισώματα για τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) από ότι για τα ανοσογονικά συμπλέγματα CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²) και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹.

6.6.2.2 Έλεγχος της δραστικότητας των παραχθέντων αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους

Τα παραχθέντα αντισώματα ελέγχθηκαν και για τη δραστικότητά τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους με μία σειρά έμμεσων δοκιμασιών ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4. Το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ επιστρώθηκε σε συγκέντρωση 5 μg/ml. Τα αντισώματα επιστρώθηκαν σε αραιώσεις 1/5 έως 1/1000 από αρχική συγκέντρωση 1 mg/ml. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αντισώματα ήταν αρχικά λυοφιλιοποιημένα. Ως αρνητικό Control χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από αυγά μη ανοσοποιημένης όρνιθας, ενώ ως θετικό Control χρησιμοποιήθηκε το anti-cTnI IgY αντίσωμα (Sanovo). Στο Διάγραμμα 6.18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA από τα οποία προκύπτει ότι τα παραχθέντα αντισώματα διατηρούν τη δραστικότητά τους για περισσότερο από δύο χρόνια μετά την αποθήκευσή τους σε λυοφιλιοποιημένη μορφή.



Διάγραμμα 6.18. Σχηματική παρουσίαση της δραστικότητας των παραχθέντων αντισωμάτων έναντι του μίγματος επίτοπων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα αντισώματα που αποθηκεύτηκαν για >2 χρόνια, ενώ με μωβ το θετικό control (IgY, anti-cTnI) και με μαύρο το αρνητικό control.

6.6.2.3 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας

Τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας το υλικό Seph@Ahx-cTnI19-31, του οποίου η σύνθεση περιγράφεται στην § 5.4.5 και η πορεία καθαρισμού των αντισωμάτων περιγράφεται στην § 5.5.3. Στο Διάγραμμα 6.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των κλασμάτων που συλλέχθηκαν

από τον καθαρισμό των αντισωμάτων. Σύμφωνα με το διάγραμμα τα εξειδικευμένα αντισώματα έναντι του επίτοπου cTnI¹⁹⁻³¹ εκλούστηκαν κυρίως στο 4° κλάσμα.



Διάγραμμα 6.19. Σχηματική παρουσίαση του καθαρισμού των αντισωμάτων, που παρήχθησαν έναντι του μίγματος ανοσογονικών συμπλεγμάτων, με χρωματογραφία συγγένειας. Η έκλουση κάθε κλάσματος απεικονίζεται με διαφορετική απόχρωση.

Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4, για την εξακρίβωση της εκλεκτικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹. Το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 5 μg/ml, ενώ τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1/5. Στο Διάγραμμα 6.20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, τα οποία δείχνουν ότι τα καθαρισμένα αντισώματα με χρωματογραφία συγγένειας είναι εξειδικευμένα για το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.



Διάγραμμα 6.20. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των καθαρισμένων αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας (Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹) για το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹. Η εξειδίκευση κάθε κλάσματος απεικονίζεται με διαφορετική απόχρωση.

6.6.2.4 Σύγκριση αντισωμάτων καθαρισμένων με διαπίδυση και χρωματογραφία συγγένειας

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4, για τη σύγκρισή των καθαρισμένων αντισωμάτων με διαπίδυση και αυτών με χρωματογραφία συγγένειας. Το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ επιστρώθηκε σε συγκέντρωση 5 μg/ml, και τα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/5 έως 1/10.000. Στο Διάγραμμα 6.21 φαίνεται ότι τα καθαρισμένα αντισώματα με χρωματογραφία συγγένειας αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα, όμως δεν μπορεί να γίνει σύγκριση καθώς η συγκέντρωση των αρχικών διαλυμάτων δεν μπορεί να θεωρηθεί ίδια.



Διάγραμμα 6.21. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των καθαρισμένων με διαπίδυση (γαλάζιο) και χρωματογραφία συγγένειας (γκρι) αντισωμάτων, έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.

6.6.2.5 Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων και καθαρίστηκαν με τη χρωματογραφία συγγένειας, ελέγχθηκαν για πιθανή διασταυρωτή αντίδραση με τον επίτοπο cTnI⁶⁶⁻⁷⁷ με έμμεση ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4. Τα ανοσογονικά συμπλέγματα συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1/5. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.22, τα καθαρισμένα αντισώματα με χρωματογραφία συγγένειας στη στήλη Seph@Ahx-cTnI1⁹⁻³¹ (4° κλάσμα) παρουσιάζουν εξειδίκευση για τον επίτοπο cTnI⁹⁻³¹ και δεν αντιδρούν διασταυρωτά με τον επίτοπο cTnI⁶⁶⁻⁷⁷.



Διάγραμμα 6.22. Σχηματική παρουσίαση του ελέγχου διασταυρούμενης αντιδραστικότητας των καθαρισμένων αντισωμάτων στη στήλη Seph@Ahx-cTnI1⁹⁻³¹, με τον επίτοπο cTnI⁶⁶⁻⁷⁷. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται το σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm; 6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) και με ροζ το SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.

6.7 Ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης της cTnI

Αναπτύχθηκαν ενζυμικές και μη ενζυμικές δοκιμασίες ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας τα αντισώματα και τα υλικά που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή.

6.7.1 Ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες ανίχνευσης της cTnI

6.7.1.1 Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων για την cTnI

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.4, για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των επιμέρους παραχθέντων αντισωμάτων για την cTnI. Η cTnI επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 1 ng/ml και τα αντισώματα σε αραίωση 1/1000. Ως αρνητικό Control χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από μη ανοσοποιημένες όρνιθες, καθώς επίσης και εμπορικά αρνητικά και θετικά Controls (Sanovo). Στο Διάγραμμα 6.23 φαίνεται ότι όλα τα παραχθέντα αντισώματα αναγνωρίζουν την cTnI. Ο βαθμός αναγνώρισης της τροπονίνης από τα επιμέρους παραχθέντα αντισώματα ακολουθεί την εξής σειρά: αντισώματα έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων > αντισώματα έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ > αντισώματα έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος των ανοσογονικών έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος των ανοσογονικών δοκιμασίες για τη σύγκριση των αντισωμάτων με τους υψηλότερους τίτλους, δηλαδή αυτών έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων. Η cTnI

επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 1 ng/ml και τα αντισώματα σε αραιώσεις 1/1000 έως 1/10.000. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από μη ανοσοποιημένες όρνιθες. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.24 τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων εμφανίζουν πολύ υψηλότερο βαθμό αναγνώρισης της cTnI σε σχέση με αυτά έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹.



Διάγραμμα 6.23. Σχηματική παρουσίαση της ανίχνευσης της cTnI από τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι ενός επίτοπου κάθε φορά (πρώτο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων) και έναντι του μίγματος των τεσσάρων επίτοπων (δεύτερο πρωτόκολλο). Με ροζ χρώμα απεικονίζονται τα αντισώματα έναντι του μίγματος ανοσογονικών συμπλεγμάτων, με μωβ έναντι του συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, με μπλε έναντι του SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, με γαλάζιο το θετικό control (IgY, anti-cTnI), ενώ με πορτοκαλί και γκρι τα αρνητικά controls.



Διάγραμμα 6.24. Σχηματική παρουσίαση της ανίχνευσης της cTnI από τα επιμέρους παραχθέντα αντισώματα. Με ροζ χρώμα παρουσιάζονται τα αντισώματα έναντι του SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και με γαλάζιο έναντι του μίγματος ανοσογονικών συμπλεγμάτων, ενώ με μαύρο τα αντισώματα από μη ανοσοποιημένη όρνιθα (αρνητικό control).

6.7.1.2 Σύγκριση αντισωμάτων καθαρισμένων με διαπίδυση και χρωματογραφία συγγένειας

Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA., όπως περιγράφεται στην § 5.5.4, για τη σύγκριση της αναγνώρισης της cTnI από τα καθαρισμένα αντισώματα με διαπίδυση και χρωματογραφία συγγένειας. Η cTnI επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 1 ng/ml και τα αντισώματα σε αραιώσεις 1/5 έως 1/5000. Ως θετικό control⁺ χρησιμοποιήθηκαν anti-cTnI IgY αντισώματα (Sanovo). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.25 τα καθαρισμένα αντισώματα και με τις δύο μεθόδους αναγνωρίζουν την cTnI εξίσου καλά με το control⁺.



Διάγραμμα 6.25. Σχηματική παρουσίαση της ανίχνευσης της τροπονίνης από τα αντισώματα καθαρισμένα με διαπίδυση (γαλάζιο) και με χρωματογραφία συγγένειας (γκρι). Με ροζ χρώμα απεικονίζονται τα αντισώματα IgY anti-cTnI που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control.

6.7.1.3 Ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα IgY έναντι του μίγματος επίτοπων χρησιμοποιώντας το 12peptide

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA, όπως περιγράφεται στην § 5.5.6, για τον έλεγχο της αναγνώρισης της τροπονίνης από το 12peptide, το οποίο βάσει βιβλιογραφίας αναγνωρίζει την cTnI. To Ac-12peptide επιστρώθηκε στο plate σε συγκέντρωση 5 μg/ml, η τροπονίνη σε συγκέντρωση 0,1 και 1 ng/ml και τα αντισώματα σε αραίωση 1/20.000. Ως αρνητικό Control χρησιμοποιήθηκαν 1) απομονωμένα αντισώματα από μη ανοσοποιημένες όρνιθες και 2) δείγμα απουσία cTnI. Στο Διάγραμμα 6.26 φαίνεται ότι το 12peptide αναγνωρίζει την cTnI εξίσου καλά και στις δύο συγκεντρώσεις. Επίσης, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση του 12peptide με τα παραχθέντα αντισώματα. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπήρξε επαναληψιμότητα σε επόμενες δοκιμασίες ELISA με τις ίδιες συνθήκες.



Διάγραμμα 6.26. Σχηματική παρουσίαση της ανίχνευσης της cTnI από τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος επίτοπων χρησιμοποιώντας το 12peptide για τη σύλληψή της. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα παραχθέντα αντισώματα και με γκρι τα αντισώματα από μη ανοσοποιημένη όρνιθα (control-).

6.7.1.4 Ανίχνευση της cTnI από τα παραχθέντα IgY έναντι του μίγματος επίτοπων χρησιμοποιώντας ως αντισώματα σύλληψης IgG anti-cTnI

Αναπτύχθηκε μία δοκιμασία ELISA τύπου Sandwich για την ανίχνευση της cTnI (§ 5.5.5). Στο plate επιστρώθηκαν IgG anti-cTnI (Santa Cruz) αντισώματα σε αραίωση 1/3000, έπειτα η cTnI σε συγκεντρώσεις 1 και 0,1 ng/ml, τα αντισώματα έναντι του μίγματος επίτοπων σε αραίωση 1/20.000 και τέλος το anti-IgY*HRP (IgG). Από το Διάγραμμα 6.27 συμπεραίνεται ότι τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των τεσσάρων επίτοπων λειτουργούν σε όλες τις περιπτώσεις ως αντισώματα ανίχνευσης της cTnI.



Διάγραμμα 6.27. Σχηματική παρουσίαση της ανίχνευσης της cTnI χρησιμοποιώντας ως αντισώματα σύλληψης IgG anti-cTnI και ως αντισώματα ανίχνευσης τα παραχθέντα αντισώματα από την ανοσοποιημένη όρνιθα έναντι του μίγματος επίτοπων.

6.7.2 Μη ενζυμικές τεχνικές ανίχνευσης της τροπονίνης-Εφαρμογή έξυπνων υλικών

6.7.2.1 Χρήση των νανοσωματιδίων SiO₂@12peptide

Για την ανίχνευση της τροπονίνης χρησιμοποιήθηκε το SiO₂@12peptide, του οποίου η σύνθεση περιγράφεται στην § 5.4.6, και οροί ασθενών με επιβεβαιωμένο έμφραγμα του μυοκαρδίου με συγκέντρωση cTnI 100 ng/ml και 35 ng/ml. Μετά τις αντιδράσεις των ορών με το νανοϋλικό, ακολούθησαν πειράματα θερμοβαρυμετρίας και φασματοσκοπίας FT-IR για τον έλεγχο της πρόσδεσης της cTnI στο SiO₂@12peptide (§ 5.5.7).

Όπως φαίνεται στα φάσματα IR (Εικόνα 6.29), στην περίπτωση του ασθενούς με C_{cTnI} 100 ng/ml διακρίνονται οι εξής κορυφές: i) 1600 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στο δεσμό C=C των αρωματικών ομάδων των αμινοξέων, ii) 997 cm⁻¹ που αποδίδεται στην κάμψη του δεσμού C-H (in plane bend) των αρωματικών αμινοξέων, iii) 844 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στο τέντωμα του δεσμού C-C των φαινυλομάδων, iv) 763 cm⁻¹ που μπορεί να αποδοθεί στα αρωματικά αμινοξέα ή στην κάμψη του δεσμού O-H (out of plane bend). Οι κορυφές αυτές εμφανίζονται μόνο στο υλικό που κατεργάστηκε με ορό ασθενούς με συγκέντρωση cTnI 100 ng/ml, γεγονός που αποδίδεται στην πληθώρα των αμινοξέων που διαθέτει η cTnI. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενδείξεις της πρόσδεσης της cTnI στο 12peptide.



Εικόνα 6.29. Φάσματα FTIR του νανοϋλικού SiO₂@12peptide και του ίδιου υλικού που κατεργάστηκε με ορούς ασθενών και υγιούς ατόμου.

Η πρόσδεση της καρδιακής τροπονίνης Ι στο νανοϋλικό προσδιορίστηκε με θερμοβαρυμετρική ανάλυση, όπως περιγράφεται στην § 5.5.7. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζεται το ποσοστό (%) φόρτωσης του νανοϋλικού με την cTnI. Το νανοϋλικό το οποίο προστέθηκε στον ορό ασθενούς με συγκέντρωση cTnI 100 ng/ml έδειξε μεγαλύτερη φόρτωση από αυτό που προστέθηκε στον ορό με συγκέντρωση cTnI 35 ng/ml και μεγαλύτερη από το SiO₂@12peptide, γεγονός που αποδίδεται στην πρόσδεση της cTnI.

Πίνακας 6.4. Φόρτωση (%) του νανοϋλικού με την cTnI από ορούς ασθενών.				
Υλικό	% Φόρτωση (w/w)			
SiO ₂ @12peptide	1%			
SiO ₂ @12peptide + cTnI (100 ng/ml)	4%			
SiO ₂ @12peptide + cTnI (35 ng/ml)	3.5%			

6.7.2.2 Χρήση του υλικού TCDA@12peptide

Για την ανίχνευση της τροπονίνης με μη ενζυμική τεχνική, χρησιμοποιήθηκε επίσης το υλικό TCDA@12peptide, όπως αναφέρεται στην § 5.5.8. Στην Εικόνα 6.28 παρουσιάζονται οι χρωματικές αλλαγές που εμφάνισε το πολυμερισμένο (Α) και μη πολυμερισμένο (Β) TCDA@12peptide μετά από την προσθήκη 1) H₂O, 2) ορού ασθενούς και 3) ορού υγιούς. Συγκρίνοντας τις φωτογραφίες, φαίνεται ότι ο πολυμερισμός μετέτρεψε το χρώμα του υλικού από γαλάζιο (Εικόνα 6.29 Β) σε μπλε σκούρο (Εικόνα 6.29 Α). Επίσης, το χρώμα του υλικού δεν άλλαξε παρουσία H₂O (Εικόνα 6.29 A.1 και B.1) και ορού υγιούς ατόμου (Εικόνα 6.29 Α.3 και Β.3), ενώ παρουσία της cTnI στον ορό ασθενούς το χρώμα άλλαξε από μπλε σε ροζ-μωβ (Εικόνα 6.29 Α.2 και Β.2). Η αλλαγή του χρώματος του πολυμερισμένου και του μη πολμερισμένου TCDA@12peptide σηματοδοτεί την αλλαγή της διάταξής του, η οποία φαίνεται να προκύπτει από την αναγνώριση της cTnI από το 12peptide. Ωστόσο, απαιτούνται διαδικασίες βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών.



Εικόνα 6.30. Φωτογραφική απεικόνιση του πολυμερισμένου (Α) και μη πολυμερισμένου (Β) υλικού TCDA@12peptide που κατεργάστηκε με (1) H₂O, (2) ορό ασθενούς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και (3) ορό υγιούς ατόμου.

7 Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν πεπτίδια και πεπτιδικά συμπλέγματα για την ανάπτυξη εξειδικευμένων βιο-αντιδραστηρίων, έξυπνων υλικών και ευαίσθητων τεχνικών με σκοπό την ανίχνευση της ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης Ι (cTnI). Η προσέγγιση του σκοπού έγινε με:

 Την επιλογή και σύνθεση των απτενίων και του φορέα των αντιγονικών επίτοπων, με σκοπό την ανάπτυξη ανοσογονικών συμπλεγμάτων.

Αυτό επιτεύχθηκε με τη σύγκριση της ομολογίας των αλληλουχιών των τριών ισομορφών i) σκελετική ταχείας σύσπασης (fast-skeletal), ii) σκελετική βραδείας σύσπασης (slow skeletal) και iii) καρδιακή (cardiac) για κάθε υπομονάδα του συμπλόκου της τροπονίνης (TnC, TnI, TnT), καθώς και ειδικότερη σύγκριση της ομολογίας των καρδιακών ισομορφών των τριών υπομονάδων (cTnC, cTnI, cTnT). Η μελέτη αυτή είχε απώτερο στόχο την ελάχιστη δυνατή ομολογία μεταξύ καρδιακών και σκελετικών τροπονινών, ώστε να αποφευχθούν διασταυρωτές αλληλεπιδράσεις κατά την ανίχνευση της τροπονίνης από ορούς ασθενών, καθώς και την υψηλότερη εξειδίκευση των παραγόμενων βιο-αντιδραστηρίων.

Οι αλληλουχίες της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης Ι μελετήθηκαν ως προς την αντιγονικότητα, την υδροφιλικότητα, την επιφανειακή προσβασιμότητα, την ευελιξία και τη δευτεροταγή δομή, καθώς και τη θέση και τη συχνότητα εμφάνισης επίτοπων (από δεδομένα γνωστών επίτοπων). Η μελέτη αυτή είχε σκοπό την επιλογή πεπτιδικών τμημάτων της καρδιακής τροπονίνης Ι για την ευκολότερη σύνθεσή τους και την παραγωγή υψηλότερου τίτλου βιο-αντιδραστηρίων (αντισωμάτων) δηλαδή την αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης των πειραματόζωων.

Τέλος, ο σχεδιασμός του φορέα των αντιγονικών επίτοπων (απτενίων) έγινε με βάση την ευκολία/δυσκολία της σύνθεσης των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, δηλαδή της πρόσδεσης των απτενίων σε αυτόν. Ο φορέας Sequential Oligopeptide Carrier (SOC) αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων -Lys-Aib-Gly- και έχει αποδειχτεί χρήσιμο εργαλείο για την παραγωγή αντισωμάτων και για την ανάπτυξη ανοσοδοκιμασιών ανίχνευσης διάφορων βιο-μορίων. Ωστόσο, η δυσκολία στη σύνθεση και τον καθαρισμό μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, με τη στρατηγική της Fmoc/tBu στρατηγικής σε στερεή φάση (δεδομένα από προηγούμενες μελέτες), ήταν καθοριστικά στοιχεία για το σχεδιασμό ενός πεπτιδικού φορέα βασισμένο στον SOC που να μπορεί να προσδένει απτένια πιο εύκολα και γρήγορα σε υγρή φάση. Έτσι, αντικαταστάθηκε το αμινοξικό κατάλοιπο της

γλυκίνης με την κυστεΐνη, ώστε να μπορούν να προσδεθούν τα απτένια μέσω σταθερού θειοαιθερικού δεσμού. Επίσης, λόγω της δύσκολης σύνθεσης των τετραεπιτοπικών συμπλεγμάτων, δηλαδή την πρόσδεση των επίτοπων σε τέσσερα αντίγραφα πάνω στον φορέα, οι δύο από τις τέσσερις κυστεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεσή του ήταν προστατευμένες με την ακεταμιδο-μέθυλο- ομάδα (Acm), καθώς αυτή η ομάδα παρέχει προστασία στις ευαίσθητες θειολομάδες της κυστεΐνης σε όλα τα στάδια της πεπτιδικής σύνθεσης με την Fmoc/tBu στρατηγική. Έτσι, η σύνθεση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) και CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²) έγινε μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, τα οποία συντέθηκαν στο πλαίσιο παλαιότερων διατριβών (Κ. Στρογγύλης) και ήταν προϊόντα σύνθεσης διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu και την Boc/Bzl στρατηγική.

Από τις αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν με βάση τις προαναφερθείσες παραμέτρους, επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη αντισωμάτων οι εξής περιοχές της cTnI:

1. Η επιλογή της αλληλουχίας R¹⁹RRSSNYRAYATE³¹ (cTnI¹⁹⁻³¹) στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I, το οποίο είναι μοναδικό και αποτελεί επέκταση των σκελετικών ισομορφών. Αυτό σημαίνει ότι δεν έχει ομολογία με τις σκελετικές ισομορφές, το οποίο αποδείχτηκε και από τις αντίστοιχες μελέτες, ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T (0% και ~8% αντίστοιχα) είναι πολύ χαμηλή. Επίσης, οι υπολογιστικές μελέτες έδειξαν ότι έχει υψηλή υδροφιλικότητα και επιφανειακή προσβασιμότητα, ενώ η αντιγονικότητα και η ευκαμψία της ήταν ικανοποιητικές. Η επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής στηρίχθηκε επίσης στα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Κ. Στρογγύλης) ανοσοποιήσεων σε κουνέλια, τα οποία έδειξαν την παραγωγή υψηλού τίτλου αντισωμάτων.

2. Η αλληλουχία E⁶⁶RRGEKGRALST⁷⁷ (cTnI⁶⁶⁻⁷⁷) παρουσίασε ομολογία 50% με την ss και 33% με την fs ισομορφή, ενώ με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T εμφάνισε χαμηλή ομολογία (25% και ~17% αντίστοιχα). Επίσης, βρέθηκε ότι είναι υδρόφιλη, εύκαμπτη και επιφανειακά προσβάσιμη. Ωστόσο, η αντιγονικότητά της δεν προβλέφθηκε ιδιαίτερα υψηλή.

3. Η αλληλουχία R¹¹⁰YDIEAKVTKNIT¹²² (cTnI¹¹⁰⁻¹²²) βρέθηκε να είναι ~62% ομόλογη με την ss και ~39% με την fs, ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές τροπονίνες C και T βρέθηκε ~15% και 8% αντίστοιχα. Επιπλέον, προβλέφθηκε ότι έχει υψηλή υδροφιλικότητα και αντιγονικότητα και ικανοποιητική ευκαμψία και επιφανειακή προσβασιμότητα.
4. Η αλληλουχία T¹¹⁸KNITEIADLTQKI¹³¹ (cTnI¹¹⁸⁻¹³¹) εμφάνισε μεσαία προς χαμηλή ομολογία σε σχέση με τις σκελετικές ισομορφές της τροπονίνης I (~43% ss και ~36% fs), ενώ η ομολογία της με τις καρδιακές ισομορφές των τροπονινών C και T ήταν ελάχιστη (~7%). Παρά το γεγονός ότι δεν προβλέφθηκε υψηλή υδροφιλικότητα και επιφανειακή προσβασιμότητα για τη συγκεκριμένη αλληλουχία, η αντιγονικότητά της ήταν υψηλή και η ευκαμψία της ικανοποιητική. Η επιλογή της περιοχής αυτής στηρίχθηκε επίσης στα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Κ. Στρογγύλης), τα οποία έδειξαν την παραγωγή υψηλού τίτλου αντισωμάτων σε κουνέλια έπειτα από τις αντίστοιχες ανοσοποιήσεις.

Τα πεπτίδια και τα πεπτιδικά συμπλέγματα συντέθηκαν επιτυχώς και ήταν υψηλής καθαρότητας. Οι αποδόσεις σύνθεσης και καθαρισμού ήταν ικανοποιητικές.

2. Τις ανοσοποιήσεις των πειραματόζωων με τα ανοσογονικά συμπλέγματα.

Για την παραγωγή αντισωμάτων επιλέχθηκαν ως πειραματόζωα οι όρνιθες, καθώς τα αντισώματά τους (IgY) προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης άλλων πειραματόζωων όπως τα τρωκτικά και τα κουνέλια. Επιγραμματικά, τα IgY μειώνουν τις παρεμβολές και τις ψευδώς θετικές/αρνητικές αντιδράσεις, αυξάνουν την ευαισθησία των ανοσοδοκιμασιών και εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στην πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, οι IgY ανοσοσφαιρίνες μεταφέρονται από τον ορό της όρνιθας στο αυγό και έτσι απομονώνονται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες, αποφεύγοντας την επεμβατική δειγματοληψία αίματος.

Οι ανοσοποιήσεις των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη περίπτωση δύο όρνιθες ανοσοποιήθηκαν με διαφορετικά ανοσογονικά συμπλέγματα, το SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και το SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹, με σταθερή συγκέντρωση 1 mg/ml (συνολικά τέσσερις ανοσοποιήσεις). Στη δεύτερη περίπτωση μία όρνιθα ανοσοποιήθηκε με μίγμα τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων (SOC-cTnI¹⁹⁻³¹, CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷), CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁰⁻¹²²), SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹) με φθίνουσα συγκέντρωση από 0,3 mg/ml για την πρώτη ανοσοποίηση σε 0,1 mg/ml για τις επόμενες ανοσοποιήσεις (συνολικά τρεις ανοσοποιήσεις).

Όλες οι όρνιθες εμφάνισαν ανοσολογική απόκριση έναντι των ανοσογόνων που επιλέχθηκαν. Η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ είχε πολύ καλή ανοσολογική απόκριση, δίνοντας υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, ενώ αυτή που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ παρουσίασε χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων. Η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το μίγμα των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων έδωσε πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων.

Κεφάλαιο 7°

3. Την απομόνωση και τον καθαρισμό των αντισωμάτων.

Η απομόνωση των αντισωμάτων έγινε με την απομάκρυνση των λιπιδίων του κρόκου και εκχύλιση των IgY με τη χρήση 1) της πολυαιθυλενογλυκόλης και 2) των αλάτων NaCl. Ακολούθησε ο καθαρισμός των αντισωμάτων με 1) διαπίδυση, χρησιμοποιώντας μία ημιδιαπερατή μεμβράνη και 2) χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας το υλικό Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹, με σκοπό την εξειδικευμένη πρόσδεση των IgY ανοσοσφαιρινών στον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹. Για τη σύνθεση του υλικού αυτού, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης, τα οποία είχαν στην επιφάνειά τους τη θειοπρόπυλ-ομάδα. Έτσι, με κατάλληλες αντιδράσεις το πεπτίδιο IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ προσδέθηκε στη σεφαρόζη.

Η απομόνωση των αντισωμάτων και η εξειδίκευσή τους έναντι των επιλεγμένων ανοσογόνων ελέγχθηκαν με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Ως αρνητικό Control χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από μη ανοσοποιημένες όρνιθες. Τα αποτελέσματα των ανοσοδοκιμασιών έδειξαν ότι υπάρχει εξειδίκευση των παραχθέντων αντισωμάτων για τα ανοσογονικά συμπλέγματα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹. Ωστόσο, από τη σύγκριση της οπτικής πυκνότητας διαπιστώθηκε ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ έδωσε υψηλότερου τίτλου αντισώματα σε σχέση με αυτήν που ανοσοποιήθηκε με το SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹. Επίσης, από τα αντίστοιχα πειράματα ελέγχου της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι συ μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, συνήχθη ότι από την αντίστοιχη ανοσοποιήση παρήχθησαν πολύ υψηλού τίτλου αντισώματα έναντι όλων των ανοσογόνων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για κάθε ανοσογονικό σύμπλεγμα, συμπεραίνεται ότι η ανοσοποιημένη όρνιθα έδωσε πολύ υψηλότερου τίτλου αντισώματα έναντι του CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹⁹⁻³¹, ενώ ακολουθούν με υψηλούς τίτλους αυτά έναντι του CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹.

Τα καθαρισμένα αντισώματα με τη μέθοδο της διαπίδυσης συγκρίθηκαν με τα crude αντισώματα για την ικανότητά τους να προσδένονται εξειδικευμένα στα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα έναντι των οποίων παρήχθησαν. Αυτό έγινε με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα καθαρισμένα αντισώματα με τη μέθοδο της διαπίδυσης εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τα crude αντισώματα. Αυτό αποδείχτηκε ότι ισχύει για όλα τα επιμέρους παραχθέντα αντισώματα.

Τα αντισώματα που επιλέχθηκαν να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας ήταν αυτά έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και αυτά έναντι του μίγματος ανοσογονικών συμπλεγμάτων. Τα καθαρισμένα αντισώματα ελέγχθηκαν για την εξειδικευμένη πρόσδεσή τους στον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹ με δοκιμασίες έμμεσης ELISA, ενώ παράλληλα ελέγχθηκε και η πιθανή διασταυρωτή αντίδραση μεταξύ των καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας αντισωμάτων έναντι του επίτοπου cTnI¹⁹⁻³¹ και του ανοσογονικού συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-cTnI⁶⁶⁻⁷⁷). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα καθαρισμένα αντισώματα παρουσιάζουν εξειδίκευση για τον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹, ενώ δεν αντιδρούν διασταυρωτά με τον επίτοπο cTnI⁶⁶⁻⁷⁷.

Επιπλέον, ελέγχθηκε το χρονικό διάστημα που οι όρνιθες είναι ικανές να παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα έναντι των επίτοπων cTnI¹⁹⁻³¹ και cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ συνέχισε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα έναντι αυτού σε ικανοποιητικό τίτλο έως και εννιά μήνες μετά από την τελευταία ανοσοποίηση. Η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το SOC-cTnI¹⁸⁻¹³¹ σταμάτησε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα έναντι αυτού μέχρι τον 9° μήνα.

Με ανοσοδοκιμασίες έμμεσης ELISA μελετήθηκε η δραστικότητα των παραχθέντων αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους υπό στερεή μορφή (λυοφιλιοποιημένα αντισώματα). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι τα παραχθέντα αντισώματα έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ διατήρησαν τη δραστικότητά τους έως και 14 μήνες μετά την αποθήκευσή τους, ενώ αντίστοιχα τα αντισώματα έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων διατήρησαν τη δραστικότητά τους για περισσότερο από δύο χρόνια μετά την αποθήκευσή τους.

 Την ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων και τεχνικών ανίχνευσης της καρδιακής τροπονίνης Ι.

Αρχικά ο έλεγχος της αναγνώρισης των επιμέρους παραχθέντων αντισωμάτων από την καρδιακή τροπονίνη Ι έγινε με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Όλα τα παραχθέντα και καθαρισμένα με διαπίδυση αντισώματα αναγνωρίζουν την cTnI. Ωστόσο, μεγαλύτερη αναγνώριση φαίνεται να υπάρχει από τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, ενώ ακολουθεί η αναγνώριση από τα αντισώματα έναντι του συμπλέγματος SOC-cTnI¹⁹⁻³¹ και τέλος με αρκετά μικρότερη αναγνώριση ακολουθούν τα αντισώματα έναντι του συμπλέγματος SOC-cTnI¹¹⁸⁻¹³¹.

Στη συνέχεια μελετήθηκε με δοκιμασίες έμμεσης ELISA η αναγνώριση των καθαρισμένων αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας από την cTnI. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλό βαθμό αναγνώρισης.

Κεφάλαιο 7°

Ακολούθησε η ανάπτυξη δοκιμασιών ELISA τύπου sandwich χρησιμοποιώντας ως αντισώματα σύλληψης της cTnI τα εμπορικά anti-cTnI, IgG (G11 και C4, SantaCruz) και ως αντισώματα ανίχνευσης τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η cTnI ανιχνεύεται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις από τα παραχθέντα αντισώματα, δηλαδή λειτουργούν σε κάθε περίπτωση ως αντισώματα ανίχνευσης της cTnI.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε μία ανοσοδοκιμασία ELISA τύπου sandwich όπου το αντίσωμα σύλληψης της τροπονίνης αντικαταστάθηκε με το 12peptide (FYSHSFHENWPS), το οποίο βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων αναγνωρίζει την cTnI. Ως αντισώματα ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν τα καθαρισμένα με διαπίδυση αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 12peptide δεσμεύει και αναγνωρίζει την καρδιακή τροπονίνη Ι σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπήρξε καλή επαναληψιμότητα σε επόμενες δοκιμασίες ELISA με τις ίδιες συνθήκες.

Επιπλέον, δοκιμάστηκαν μη ενζυμικές τεχνικές για την ανίχνευση της cTnI σε ορούς ασθενών με επιβεβαιωμένο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Για το σκοπό αυτό συντέθηκε και χρησιμοποιήθηκε το ναναοϋλικό SiO₂@12peptide, το οποίο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία FTIR, TGA και EPR. Στα φάσματα IR εμφανίζονται οι χαρακτηριστικοί πεπτιδικοί δεσμοί από τους οποίους αποδεικνύεται η πρόσδεση του πεπτιδίου στα νανοσωματίδια σίλικας. Το SiO₂@12peptide αφέθηκε να αντιδράσει με ορούς ασθενών και μελετήθηκε με FTIR, όπου φαίνεται ότι η cTnI προσδένεται στο SiO₂@12peptide και TGA που έδειξε ότι το ποσοστό (%) φόρτωσης των νανοσωματιδίων αυξάνεται παρουσία της cTnI.

Μία ακόμη μη ενζυμική τεχνική δοκιμάστηκε για την ανίχνευση της cTnI σε ορούς ασθενών. Για αυτήν την τεχνική συντέθηκε το υλικό TCDA@12peptide, το οποίο αφέθηκε να αντιδράσει με τους ορούς των ασθενών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία της cTnI το χρώμα του TCDA@12peptide αλλάζει από μπλε σε μω/ροζ. Η αλλαγή του χρώματος σηματοδοτεί την αλλαγή της διάταξης του υλικού, το οποίο πιθανά συμβαίνει μετά από την εξειδικευμένη πρόσδεση της τροπονίνης.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των μεθόδων που ακολουθήθηκαν στην παρούσα διατριβή και η σύγκρισή τους με τις εμπορικές δοκιμασίες ανίχνευσης της καρδιακής τροπονίνης Ι πρέπει να γίνει σε πληθώρα ορών ασθενών και υγιών ατόμων, αντικείμενο που αποτελεί μελλοντική ερευνητική εργασία. Επίσης, παρόλο που υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η cTnI

προσδένεται στο SiO₂@12peptide και στο TCDA@12peptide, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών.

Τέλος, από τον χαρακτηρισμό του υλικού SiO₂@12peptide με φασματοσκοπία EPR, για την εξακρίβωση της πρόσδεσης του 12peptide στα νανοσωματίδια σίλικας, προέκυψαν σημαντικά ευρήματα για το χρόνο ζωής της ρίζας τυροσίνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διάρκεια ζωής της ρίζας τυροσίνης του SiO₂@12peptide, είναι η μακροβιότερη ρίζα τυροσίνης που έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα σε ένα μη βιολογικό σύστημα.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παρούσα διδακτορική διατριβή συνοψίζονται στα εξής:

- Τα πεπτιδικά ανάλογα και τα ανοσογονικά συμπλέγματα συντέθηκαν χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία και ήταν υψηλής καθαρότητας.
- 2. Παρήχθησαν υψηλού τίτλου αντισώματα και εξειδικευμένα έναντι των επίτοπων cTnI¹⁹⁻³¹, cTnI⁶⁶⁻⁷⁷, cTnI¹¹⁰⁻¹²² και cTnI¹¹⁸⁻¹³¹ της καρδιακής τροπονίνης Ι. Υψηλότερου τίτλου ήταν τα αντισώματα έναντι του επίτοπου cTnI¹⁹⁻³¹ και cTnI⁶⁶⁻⁷⁷. Ο φορέας δεν εμφάνισε ανοσογονικότητα.
- Τα αντισώματα από διαπίδυση είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό για την ανίχνευση της cTnI.
- 4. Τα ανοσογονικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό των αντισωμάτων σε στήλη με χρωματογραφία συγγένειας.
- 5. Τα αντισώματα από όρνιθες (IgY) είναι κατάλληλα εργαλεία για ανάπτυξη διαγνωστικών δοκιμασιών και είναι σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Επιβεβαιώνεται η χρησιμότητα των συνθετικών φορέων SOC και CPSOC(3,9-Acm) για την παραγωγή αντισωμάτων και την ανάπτυξη δοκιμασιών ELISA.
- Οι νέες προσεγγίσεις με τη χρήση του SiO₂@12peptide και του TCDA@12peptide μπορούν να βελτιστοποιηθούν για χρήση σε δοκιμασίες ανίχνευσης της cTnI.
- 8. Το FYSHSFHENWPS, που βιβλιογραφικά πιστεύεται ότι αναγνωρίζει την τροπονίνη Ι, στην παρούσα μελέτη έδειξε να υπάρχει πρόβλημα επαναληψιμότητας, πιθανά λόγω της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου με το plate. Ίσως το ενδιαφέρον χρήσης του πρέπει να στραφεί στα έξυπνα υλικά (νανοσωματίδια, NPs και συζευγμένα πολυμερή, CPs).

Κεφάλαιο 7°

Μελλοντικές Προοπτικές - Στόχοι

Πιθανούς μελλοντικούς στόχους αποτελούν τα εξής:

- 1. Μελέτη χρήσης των νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη εύχρηστων, γρήγορων και εξειδικευμένων δοκιμασιών ανίχνευσης της τροπονίνης.
- 2. Ανάπτυξη POCTs: στα υλικά SiO₂@12peptide και TCDA@12peptide μπορούν να προσδεθούν τα εξειδικευμένα IgY έναντι του κάθε επίτοπου με σκοπό τη μεγαλύτερη εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου ανίχευσης της cTnI σε ορό ασθενών και την ανάπτυξη δοκιμασιών σημείου φροντίδας.
- Σύζευξη ανοσογόνων σε νανοσωματίδια και χρήση αυτών στον καθαρισμό των αντισωμάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τροπονίνη είναι ένα σύμπλεγμα τριών πρωτεϊνικών υπομονάδων (Ι, Τ, C), που εδράζεται στους σκελετικούς (ταχείας και βραδείας σύσπασης) και καρδιακούς μύες και φυσιολογικά ρυθμίζει τη σύσπασή τους. Από τις τρεις υπομονάδες η καρδιακή τροπονίνη Ι (cTnI) έχει τη μικρότερη ομολογία με τις αντίστοιχες σκελετικές ισομορφές και αυτό συνεπάγεται υψηλότερη εξειδίκευση για το μυοκάρδιο. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η cTnI είναι περισσότερο εξειδικευμένη για την καρδιά συγκριτικά με ένα πλήθος άλλων εδραιωμένων βιοδεικτών, όπως η CK-MB.

Όταν δημιουργηθεί κάποια βλάβη στο μυοκάρδιο, η τροπονίνη απελευθερώνεται από το κυτοσόλιο των μυοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος μέσα σε δύο ώρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων (στηθάγχη) και διατηρείται στο αίμα για περίπου δύο εβδομάδες. Η κινητική της cTnI, συγκριτικά με των άλλων βιοδεικτών, επιτρέπει την ταχεία ανίχνευσή της στο αίμα των ασθενών και την καλύτερη παρακολούθηση της τιμής της ως ένδειξη της αρχικής ή πιθανής επόμενης βλάβης. Συνεπώς, η cTnI δικαίως αποτελεί τον σημαντικότερο βιοδείκτη στη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς μπορεί να ανιχνεύει μικρές βλάβες που πιθανά υπάρχουν σε έναν ασθενή υψηλού κινδύνου με ευάλωτη αθηρωματική πλάκα, απουσία μυοκαρδιακής νέκρωσης.

Δεδομένων αυτών, οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην ανίχνευση της τροπονίνης και την αξιοποίησή της ως ένα εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση μίας μυοκαρδιακής βλάβης, με σκοπό την πρόληψη και την καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς.

Στις κλινικές αναλύσεις, το τεστ τροπονίνης βασίζεται στην τεχνική της Ε.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) τύπου Sandwich. Αν και η ELISA παρέχει μεγάλη ευαισθησία, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανίχνευση της τροπονίνης, όπως: 1) η διαφορά στην εξειδίκευση και την ευαισθησία των εμπορικώς διαθέσιμων αντισωμάτων σύλληψης και ανίχνευσης της τροπονίνης, 2) η φωσφορυλίωση της σερίνης και η συμπλοκοποίηση της cTnI με άλλα μόρια, 3) η ύπαρξη ειδικών anti-cTnI αυτο-αντισωμάτων στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών, που παράγονται σε απόκριση της απελευθέρωσης της τροπονίνης στο αίμα και 4) η ύπαρξη αντισωμάτων παρεμβολής, δηλαδή ετερόφιλων αντιζωϊκών αντισωμάτων (HAA). Έτσι λαμβάνονται θετικά ή αρνητικά ψευδή αποτελέσματα, τα οποία δυσχεραίνουν την κατάταξη των ατόμων σε υποψήφιους ή μη για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Τα πολλά διαφορετικά διαθέσιμα βιο-αντιδραστήρια οδήγησαν στην ανάγκη για τον ορισμό του ορίου ανίχνευσης cutoff με συντελεστή διακύμανσης μικρότερο από 10% σε ορισμένη συγκέντρωση της τροπονίνης. Αυτό σταδιακά οδήγησε στην ανάπτυξη δοκιμασιών υψηλότερης αναλυτικής ευαισθησίας, δίνοντας τη δυνατότητα καλύτερης παρακολούθησης της τιμής της τροπονίνης για την έγκαιρη διάγνωση μίας πιθανής βλάβης. Ωστόσο η μεγάλη ευαισθησία των σύγχρονων δοκιμασιών συνδέθηκε με μειωμένη ειδικότητα, καθώς εκτός από τους ασθενείς τα χαμηλά επίπεδα της cTnI μπορούν να εντοπιστούν και σε άλλες ομάδες του πληθυσμού, οι οποίοι δεν έχουν κάποια βλάβη (π.χ. αθλητές), δημιουργώντας έτσι μια πρόσθετη διαγνωστική πρόκληση.

Οι σύγχρονες κλινικές πρακτικές ανίχνευσης της τροπονίνης είναι κυρίως ενζυμικοί ανοσοπροσδιορισμοί που ανιχνεύουν την cTnI με υψηλή ευαισθησία, όμως με σχετικά μεγάλο χρόνο και κόστος. Ωστόσο, οι εξελίξεις στην τεχνολογία επέτρεψαν την ανάπτυξη μη ενζυμικών προσδιορισμών, όπως είναι οι ηλεκτροχημικοί, παραμαγνητικοί και συντονισμού επιφανειακού πλασμονίου. Αν και οι νέες τεχνολογίες δύνανται να μειώσουν τις παρεμβολές στο σήμα, εντούτοις απαιτούν ογκώδη και ακριβό εξοπλισμό, καθώς και ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Όλα αυτά συνηγορούν στην αύξηση του τελικού κόστους της δοκιμασίας της τροπονίνης.

Παρά τις συνεχείς εξελίξεις, υπάρχουν σημαντικά περιθώρια βελτίωσης στις δοκιμασίες της τροπονίνης, ιδιαίτερα στον τομέα της τυποποίησης των ποσοτικών προσδιορισμών και της εξάλειψης των παρεμβολών. Νέες προοπτικές περιλαμβάνουν επίσης την ανάπτυξη μικρών, φορητών και ευαίσθητων βιο-αισθητήρων (Point of care tests, POCTs), που να επιτρέπουν την άμεση ανίχνευση της τροπονίνης από μη εξειδικευμένο προσωπικό, το σύντομο χρόνο ανάλυσης και το χαμηλό κόστος.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, **σκοπός** της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη βιο-αντιδραστηρίων και έξυπνων υλικών για τη χρήση τους σε ενζυμικές και μη ενζυμικές τεχνικές, ανίχνευσης της καρδιακής τροπονίνης Ι.

Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν ορισμένοι πιθανοί αντιγονικοί επίτοποι της cTnI, επιλεγμένοι βάσει δεδομένων ομολογίας, αντιγονικότητας, υδροφιλικότητας, επιφανειακής προσβασιμότητας, ευελιξίας, δευτεροταγούς δομής, θέσης και συχνότητας εμφάνισης επίτοπων. Επίσης, συντέθηκε ο πεπτιδικός φορέας αντιγονικών πεπτιδίων CPSOC(3,9-Acm) βάσει προηγούμενων μελετών του φορέα SOC, που έδειξαν ότι το μόριο αυτό είναι ικανό 1) να προβάλλει τους προσδεμένους αντιγονικούς επίτοπους και να προκαλεί την παραγωγή υψηλού τίτλου αντισωμάτων και 2) να χρησιμοποιείται ως υλικό προσρόφησης σε ELISA plate κατά τους ανοσοπροσδιορισμούς. Επιπλέον, συντέθηκαν πεπτιδικά ανοσογονικά συμπλέγματα που προέκυψαν από την πρόσδεση των απτενίων (αντιγονικών πεπτιδίων) στον πεπτιδικό φορέα CPSOC(3,9-Acm) με θειοαιθερικό δεσμό.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις σε πειραματόζωα (ωοτόκες όρνιθες) με τα ανοσογονικά συμπλέγματα, ακολουθώντας δύο πρωτόκολλα που διέφεραν ως προς τη συγκέντρωση του ανοσογόνου και τα διαστήματα μεταξύ των ανοσοποιήσεων. Τα αυγά των ανοσοποιημένων ζώων συλλέχθηκαν και από αυτά απομονώθηκαν τα IgY αντισώματα (ακολουθώντας δύο διαφορετικές τεχνικές), τα οποία στη συνέχεια καθαρίστηκαν με διαπίδυση.

Ακολούθησε μία σειρά ενζυμικών προσδιορισμών των αντισωμάτων, με την τεχνική της έμμεσης ELISA, για τον έλεγχο της εξειδίκευσή τους τόσο για τα ανοσογονικά συμπλέγματα όσο και για ολόκληρη την cTnI. Στο πλαίσιο αυτών των μελετών έγινε σύγκριση των επιμέρους παραχθέντων αντισωμάτων, ελέγχθηκε το χρονικό διάστημα που οι όρνιθες είναι ικανές να παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα, αλλά και η σταθερότητα των αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσής τους.

Στη συνέχεια τα αντισώματα καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, όπου ταυτόχρονα ελέγχθηκε και η εξειδικευμένη πρόσδεση των αντισωμάτων στον επίτοπο cTnI¹⁹⁻³¹. Για τη χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιήθηκε το ειδικό υλικό προσρόφησης Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹, το οποίο προέκυψε από τη σύζευξη επιφανειακά τροποποιημένων (με θειοπροπυλ-ομάδα) σφαιριδίων σεφαρόζης με το IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δύο ενζυμικές δοκιμασίες ELISA τύπου sandwich για την ανίχνευση της cTnI. Στη μία εξ' αυτών χρησιμοποιήθηκε το Ac-12peptide για τη σύλληψη της τροπονίνης και στην άλλη για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν anti-cTnI IgG εμπορικά αντισώματα, ενώ και στις δύο περιπτώσεις ως αντισώματα ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των τεσσάρων ανοσογονικών συμπλεγμάτων.

Αναπτύχθηκαν έξυπνα υλικά (Smart materials and structure, SmMaS) με σκοπό την ανίχνευση της cTnI με μη ενζυμικές τεχνικές. Με βάση το 12peptide (FYSHSFHENWPS), που προτάθηκε ότι αναγνωρίζει την cTnI, συντέθηκε 1) το SiO₂@12peptide, το οποίο αποτελείται από επιφανειακά τροποποιημένα νανοσωματίδια σίλικας συζευγμένα με το 12peptide και 2) το TCDA@12peptide, το οποίο αποτελείται από το πολυμερισμένο σύμπλεγμα 10,12-τρικοσαδιινοϊκού οξέος συζευγμένο με το 12peptide.

Ακολούθησε η ανάπτυξη δύο μη ενζυμικών τεχνικών ανίχνευσης της cTnI σε ορούς ασθενών και σε υγιείς. Στην πρώτη χρησιμοποιήθηκε το υλικό SiO₂@12peptide και μελετήθηκε με θερμοβαρυμετρία και φασματοσκοπία FTIR, ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε το TCDA@12peptide και μελετήθηκε η αλλαγή του χρώματός του.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι τα ανοσοποιημένα πειραματόζωα παρήγαγαν υψηλού τίτλου και εξειδικευμένα αντισώματα έναντι των ανοσογονικών συμπλεγμάτων, και ανιχνεύουν την cTnI. Επίσης τα παραχθέντα αντισώματα που καθαρίστηκαν μόνο με διαπίδυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό για την ανίχνευση της cTnI. Τα απτένια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά για τον καθαρισμό των αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας. Ο φορέας CPSOC(3,9Acm) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην παραγωγή αντισωμάτων. Τα απομονωμένα IgY αντισώματα από αυγά όρνιθας είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη διαγνωστικών δοκιμασιών και είναι σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα υλικά SiO₂@12peptide και TCDA@12peptide μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης της cTnI.

ABSTRACT

Troponin is a complex of three protein subunits (I, T, C), found in the skeletal (fast and slow contraction) and heart muscles and normally regulates their contraction. Among the three subunits, cardiac troponin I (cTnI) has the lowest homology to the corresponding skeletal isoforms, which implies increased myocardial specificity. It is also noteworthy that cTnI is more specific for the heart than other established biomarkers, such as CK-MB.

When myocardial damage occurs, troponin is released from the myocyte cytosol into the bloodstream within two hours of the onset of symptoms (angina) and retained in the blood for about two weeks. The kinetics of cTnI, compared to other biomarkers, allow its rapid detection in patients' blood and better monitoring of its value as an indication of initial or possible subsequent damage. Therefore, cTnI is rightly the most significant biomarker in acute myocardial infarction diagnosis, as it can detect minor injuries that may be present in a high-risk patient with a vulnerable atherosclerotic plaque in the absence of myocardial necrosis.

Given this, the researchers focused on detecting troponin and using it as a tool for early diagnosis of myocardial infarction to prevent and treat better the patient.

The troponin test in clinical trials relies on the highly-sensitive ELISA technique. However, various factors like the specificity and sensitivity differences of the commercially available anti-troponin antibodies, the serine phosphorylation and cTnI conjugation to other molecules, and the presence of anti-cTnI autoantibodies (produced in response to the release of troponin in the blood) and interfering antibodies (heterophilic anti-animal antibodies) could lead to positive or negative false results. Hence, it is hard to classify individuals as candidates or not for acute myocardial infarction.

The many different bio-reagents available have led to the need to set a cutoff detection limit with a coefficient of variation of less than 10% at a specific troponin concentration. This fact has gradually pushed to the development of higher analytical sensitivity tests, enabling better monitoring of the troponin value for the early diagnosis of a possible lesion. However, the high sensitivity of modern tests has been associated with reduced specificity. Except for patients, low levels of cTnI can be detected in other groups of the population, which do not have any damage (e.g. athletes), thus creating an additional diagnostic challenge.

Modern clinical practices for troponin detection are mainly enzymatic immunoassays that detect cTnI with high sensitivity but a relatively long time and cost. Technological advances

have allowed the development of non-enzymatic assays like electrochemical, paramagnetic, and surface plasmon. New technologies can reduce signal interferences, but they require bulky and expensive equipment and specially trained personnel. All these contribute to the increase in the final cost of the troponin test.

Despite ongoing developments, there is considerable room for improvement in troponin tests, particularly in the standardization of the assays and elimination of interferences. New prospects also include the development of small, sensitive and portable biosensors (Point of care tests, POCTs), which allow the immediate detection of troponin by unskilled personnel, short analysis time and low cost.

Given the above, the present dissertation aimed to develop enzymatic and non-enzymatic techniques, bio-reagents and materials for cardiac troponin I detection.

For this purpose, a series of possible cTnI antigenic epitopes were synthesized. The epitopes were selected based on the homology, antigenicity, hydrophilicity, surface accessibility, flexibility, secondary structure, location, and frequency of well-known epitopes. Also, the antigen peptide carrier CPSOC(3,9-Acm) was synthesized, based on previous studies, which showed that this molecule could project the bound antigen epitopes and cause the production of high antibody titers, but also be useable as an adsorbent on an ELISA plate during immunoassays. The antigenic peptides (epitopes) were conjugated to the carrier via thioether bonds to form immunogenic macromolecules.

Experimental animals (laying hens) were immunized with the conjugates, following two protocols that differed in immunogen concentration and the intervals between immunizations. The IgY antibodies were isolated from the collected immunized animals' eggs (following two different methods) and then purified by dialysis.

Indirect ELISA assays were performed for monitoring IgY specificity for the immunogenic conjugates and the entire cTnI, while the antibodies titers of each immunization were compared. Also, the immunized hens were examined as per the duration that can produce specific antibodies. The stability of the antibodies, as a function of their storage time, was monitored, too.

The antibodies were purified by affinity chromatography while their specificity for the cTnI¹⁹⁻³¹ epitope was being checked simultaneously. The material Seph@Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹ was used for affinity chromatography, which resulted from the coupling of surface-modified (thiopropyl-group) sepharose beads with IAc-Ahx-cTnI¹⁹⁻³¹.

Two ELISA sandwich-type assays were designed and performed to detect cTnI. In the one, Ac-12peptide was used to capture troponin, and in the other, for the same purpose, anticTnI IgG commercial antibodies were used, while in both cases, the antibodies produced against the mixture of the four immunogenic complexes were used as detection antibodies.

Two SmMas (Smart Materials and Structure) were developed for detecting the cTnI. Based on the 12peptide (FYSHSFHENWPS) proposed to recognize cTnI, they were synthesized the following: 1) SiO₂@12peptide, which consists of surface-modified silica nanoparticles coupled to 12peptide, and 2) TCDA@12peptide, which is composed of the 10,12-tricosadinoic acid conjugated to 12peptide.

Afterwards, two non-enzymatic cTnI detection techniques were developed and tested in patient and healthy sera. In the first one, the material SiO₂@12peptide was used and studied by thermogravimetry and FTIR spectroscopy. In the second one, the TCDA@12peptide was examined as per its colour change.

Briefly, the results of the present dissertation showed that the immunized experimental animals produced high titer and specific antibodies against the immunogenic conjugates, which can detect cTnI. Also, the produced antibodies purified only by dialysis can be utilized without further purification to detect cTnI. Haptens can be used as materials for antibodies purification by affinity chromatography. The CPSOC(3,9Acm) carrier is useful in antibodies production, confirming previous relative studies. The isolated IgY antibodies from hen eggs are suitable tools for developing diagnostic tests and are stable for a long time. The materials SiO₂@12peptide and TCDA@12peptide can be usable in the evolvent of cTnI detection assays.

ПАРАРТНМА

Αντιδραστήρια & Διαλύτες	Σύντμηση / Προμηθευτής
Να-Fmoc- και R – προστατευμένα αμινοξέα	Fmoc-AA(P)-OH [G.L. Biochem, China]
Βενζυλομάδα	Bzl
t-Βουτυλ-οξυ-καρβονυλομάδα	Boc
Διιδοπρόπυλο καρβοδιιμίδιο	DIC [Fluka, Germany]
τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1Η- βενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας	TBTU [Fluka, Germany]
εξαφωσφορικό άλας της Ο-(7- αζοβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας	HATU [Fluka, Germany]
εξαφωσφορικό άλας της 2-(1Η-βενζοτριαζολυλ)- 1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας	HBTU [Fluka, Germany]
Διισοπρόπυλ-αιθυλαμίνη	DIEA [Merck, Germany]
1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (άνυδρο)	HOBt [G.L. Biochem, China]
4-(2', 4'-διμεθοξυφαινυλο-αμινο μέθυλο)- φαινοξυ ρητίνη	Rink Amide AM [G.L. Biochem, China]
Διμέθυλο φορμαμίδιο	DMF [Fluka, Germany]
Διχλωρο-μεθάνιο	DCM [Fluka, Germany]
1,3-διμεθοξυβενζόλιο	DMB [Aldrich, China]
Διθειοθρεϊτόλη	DTT [Fluka, India]
Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ	EDTA [Sigma-Aldrich, USA]
Πιπεριδίνη	[Riedel-de Haen, Germany]
Νινυδρίνη	[Sigma, USA]
9-φλουορένυλο-μεθυλόξυ-καρβονυλομάδα	Fmoc-
Κυανιούχο κάλιο	KCN [Fluka, Switzerland]
Φαινόλη	[Fluka, Switzerland]
Πυριδίνη	[Merk, Darmstadt, Germany]
Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο	Tis [Acros Organics, USA]
Ιωδοξικό οξύ	ICH ₂ COOH [Sigma-Aldrich, Switzerland]
Τριφθοροξικό οξύ	TFA [Riedel, Germany]
Διεθυλ-αιθέρας	[Riedel, Germany]
Εξάνιο	n-Hexane [LAB-SCAN, Ireland]
Οξικός ανυδρίτης	Ac ₂ O [Merck, Germany]
2,2'-(Αιθυλενοδιοξυ)διαιθανοθειόλη	DODT [Sigma, USA]
Ακετονιτρίλιο	ACN [LAB-SCAN, Ireland]
Μεθανόλη	[LAB-SCAN, Ireland]
Freunds Adjuvant Complete/Incomplete	[Sigma-Aldrich, Germany]
Polyehtylenoglycol 6000	PEG [Sigma-Aldrich, Germany]
Χλωριούχο νάτριο	NaCl [Merck, Germany]
Υδροχλωρικό οξύ	HCl [Riedel-de Haen, Germany]
Ανθρώπινα αντι-ζωϊκά αντισώματα	НААА
Αποβουτυρωμένο γάλα	[Regilait]
αντι-IgY αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση	anti-IgY*HRP [Thermo Scientific, USA]
Αντίσωμα έναντι της cTnI	anti-cTnI, IgG [Santa Cruz, USA]

Αντιδραστήρια και διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν και οι συντμήσεις τους.

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	TMB [Thermo Scientific Pierce, USA]
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2 [Thermo Scientific Pierce, USA]
10,12-Tricosadiinoyc acid	10,12-TCDA [Sigma-Aldrich, Germany]
Thiopropyl Sepharose 6B	[Sigma-Aldrich, Switzerland]
Θειικό οξύ	H ₂ SO ₄ [Fluka, Germany]
Τριτυλομάδα	Trt
t-Βουτυλομάδα	tBu
2,2,4,6,7-πενταμεθυλ-διυδρο-βενζοφουραν-5- σουλφονυλομάδα	Pbf
4-μεθυλοτριτυλομάδα	Mtt
Βενζυλοξυ ομάδα	OBzl
t-Βουτόξυ-ομάδα	OtBu
Ημιδιαπερατή Μεμβράνη Spectra/Por 7 Dialysis Membrane	[SPECTRUMLABS, USA]
Όξινο ανθρακικό νάτριο	NaHCO3 [Ferak Berlin, West Germany]
Οξικό οξύ	CH₃COOH [Sigma-Aldrich, Germany]
Υπερμαγγανικό κάλιο	KMnO4 [Sigma-Aldrich, Germany]
Tris base	[Fluka, Switzerland]
Γλυκίνη	Gly [G.L. Biochem, China]
Ανθρακικό νάτριο	Na ₂ CO ₃ [Merck, Germany]
Χλωριούχο κάλιο	KCl [Sigma-Aldrich, Germany]
Αζίδιο του νατρίου	NaN ₃ [Sigma-Aldrich, Germany]
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	KH ₂ PO ₄ [Fluka, Switzerland]
Όξινο φωσφορικό νάτριο	Na ₂ HPO ₄ [Fluka, Switzerland]
Καρδιακή τροπονίνη Ι	cTnI [HyTest, Finland]
Αντίσωμα IgY έναντι της cTnI	anti-cTnI, IgY [Sanovo, Denmark]

Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις σε Συνέδρια και Περιοδικά

K. V. Englezopoulos, E. M. Stathopoulou, V. Moussis, V. G. Chantzichristos, N. D. Papamichael, P. T. Tatsidou, V. D. Roussa, M. E. Tsoumani, L. Lakkas, A. Rammos, C. S. Katsouras, <u>**E. Fotou**</u>, V. Tsikaris, A. D. Tselepis, L. K. Michalis. "The administration of the synthetic peptide YMESRADR with a low aspirin dose significantly augments its antiplatelet effect, in contrast to the highly constrained peptide (S,S) PSRCDCR-NH₂. An experimental study". Hellenic J Cardiol. 2022 Jan 29:S1109-9666(22)00017-3. doi: 10.1016/j.hjc.2022.01.002.

P. Stathi, <u>E. Fotou</u>; V. Moussis, V. Tsikaris, M. Louloudi, Y. Deligiannakis. "Control of Tyrosyl-Radical's Stabilisation by {SiO₂@Oligopetide} Hybrid Biomimetic Materials". (Υπό Δημοσίευση).

C. Papadopoulos, <u>E. Fotou</u>, V. Moussis, A. Ntoyhaniari, S. Zografou, V. Maltabe, P. Kouklis, S. Christoforidis, V. Tsikaris. "Intracellular targets: A multiple cargo transporting molecule". *J Pep Sci*. 2021; 27(11):e3359. <u>https://doi.org/10.1002/psc.3359</u>.

E. Fotou, V. Moulasioti, I. Angelis, V. Tsiouris, A. Patsias, C. Tellis, V. Moussis, M.E. Boti, D. Tsoukatos. "Influence of dietary olive paste flour on the performance and oxidative stress in chickens raised in field conditions", *J Hellenic Vet Med Soc*, vol. 72, no. 3, pp. 3239–3248, Oct. 2021.

O. Ovdiichuk, O. Hordiyenko, <u>E. Fotou</u>, C. Gaucher, A. Arrault, M. C. Averlant-Petit. Conformational studies of new pseudotripeptide with pyrazine amidoxime motif and simplified analogs using IR, NMR spectroscopy, and molecular dynamic simulations. Struct Chem 28, 813–822 (2017). <u>https://doi.org/10.1007/s11224-016-0870-2</u>.

<u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, V. Moussis, V. Tsikaris. "Development of innovative bio-tools for a cTnI-detection assay". 36th European Peptide Symposium and 12th International Peptide Symposium (2022), Barcelona, Spain.

<u>E. Fotou</u>, P. Stathi, V. Moussis, M. Louloudi, Y. Deligiannakis, V. Tsikaris. "Unusual longlived tyrosine radical: A study in liquid and solid phase". 36th European Peptide Symposium and 12th International Peptide Symposium (2022), Barcelona, Spain. **<u>E. Fotou</u>**, V. Moulasioti, V. Moussis, V. Tsikaris. "A multiple-cargo transporting molecule for intracellular targeting". 36th European Peptide Symposium and 12th International Peptide Symposium (2022), Barcelona, Spain.

V. Moulasioti<u>, **E. Fotou**</u>, V. Moussis, D. Sgouras, V. Tsikaris "IgY antibody production against phospholipases A₂ from Vipera berus and Vipera ammodytes snake species". 36th European Peptide Symposium and 12th International Peptide Symposium (2022), Barcelona, Spain.

<u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, I. Angelis, V. Tsiouris, A. Patsias, C. Tellis, V. Moussis, M.E. Boti, D. Tsoukatos. "Effect of Olive Paste Flour on α-tocopherol and performance in broilers of a poultry farm unit". 26th World's Poultry Congress, Paris, France (2022).

V. Moulasioti, <u>E. Fotou</u>, C. Tellis, D. Kyriakou, M. Papadami, A. Patsias, V. Moussis, M.E. Boti, I. Sarrigeorgiou, P. Lymberi, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos. "Growth performance, meat quality and organoleptic characteristics in chickens raised under commercial production systems". 26th World's Poultry Congress, Paris, France (2022).

E. Fotou, V. Moulasioti, C. Tellis, D. Kyriakou, M. Papadami, A. Patsias, V. Moussis, M.E. Boti, I. Sarrigeorgiou, P. Lymberi, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos. "Antioxidant status and growth performance of conventional, free-range, and free-range fed with aromatic plants broilers under industrial scale production". 26th World's Poultry Congress, Paris, France (2022).

C. Tellis, M. Papadami, V. Moulasioti, <u>E. Fotou</u>, D. Kyriakou, I. Sarrigeorgiou, A. Patsias,
V. Moussis, M.E. Boti, V. Tsiouris, V. Tsikaris, P. Lymberi, D. Tsoukatos. "The effect of oxidative stress at the warm season in free-range poultry chickens raised in field conditions".
26th World's Poultry Congress, Paris, France (2022).

I. Sarrigeorgiou, <u>**E. Fotou</u>**, V. Moulasioti, C. Tellis, V. Moussis, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos, P. Lymberi. "Development of a quantitative ELISA for a chicken specific Troponin-T peptide in skeletal muscle TCA extracts with potential use in food industry". 26th World's Poultry Congress, Paris, France (2022).</u>

<u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, V. Moussis, V. Tsikaris. "Cell Penetrating Sequential Oligopeptide Carrier: a multivalent molecule for intracellular targeting and biomedical applications". (Invited Speaker) Future Pharmaceutics (2022), Paris, France.

E. Fotou, V. Moulasioti, C. Tellis, D. Kyriakou, M. Papadami, A. Patsias, V. Moussis, I. Sarrigeorgiou, P. Lymberi, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos. "Comparison of the antioxidant status of conventional and free-range poultry production systems in industrial-scale production". 3rd International and 12th National Animal Science Conference, Turkey (2021).

<u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, C. Tellis, D. Kyriakou, M. Papadami, A. Patsias, V. Moussis, I. Sarrigeorgiou, P. Lymberi, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos. "Effect of olive paste flour on the performance and α -tocopherol plasma levels in broiler chicks". 3rd International and 12th National Animal Science Conference, Turkey (2021).

V. Moulasioti, <u>E. Fotou</u>, C. Tellis, D. Kyriakou, M. Papadami, A. Patsias, V. Moussis, I. Sarrigeorgiou, P. Lymberi, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos. "Growth performance, antioxidant status, and organoleptic characteristics in conventional vs slow-growing broiler chicks". 3rd International and 12th National Animal Science Conference, Turkey (2021).

I. Sarrigeorgiou, T. Stivarou, <u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, C. Tellis, V. Moussis, V. Tsikaris, V. Tsiouris, D. Tsoukatos, P. Lymberi. "Development of a sensitive ELISA for the quantification of a chicken specific Troponin-T peptide EPAPPPEEKPRIKLTAPKIPE in skeletal muscle TCA extracts". 3rd International and 12th National Animal Science Conference, Turkey (2021).

<u>E. Fotou</u>, V. Moulasioti, V. Moussis, V. Tsikaris, D. Tsoukatos. "Peptide derived from the intracellular tail of αIIb conjugated to a carrier peptide as platelet aggregation inhibitor". EMLTD & 26th Anniversary International Congress on Thrombosis, Athens, Greece (2019).

Ε. Φώτου, Π. Στάθη, Μ. Λουλούδη, Ι. Δεληγιαννάκης, Β. Μούσης, Β. Τσίκαρης. «Χρόνος Ζωής Ρίζας Τυροσίνης σε Πεπτίδια: Μελέτη Υγρής VS Στερεής Φάσης». 22° Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Θεσσαλονίκη (2016).

Ε. Φώτου, Σ. Παπάς, Β. Μούσης, Α. Γκεσούλη, Α. Γκουρογιάννη, Β. Χαντζηχρήστος, Η.Μοσχονάς, Α. Τσελέπης, Δ. Τσουκάτος, Β. Τσίκαρης. «Ανάπτυξη Αναστολέων της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων μέσω ενδοκυττάριας στόχευσης». 14° Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Ιωάννινα (2016).

E. E. Fotou, A. Gkesouli, V.Mousis, C. Papadopoulos, V. Chantzichristos, A. Tselepis, V. Tsikaris. «Redox Sensitive Molecular Transporters For Intracellular Drug Delivery». 33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgary (2014).