



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

«ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ:

**ΔΙΟΙΚΗΣΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

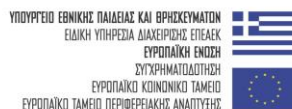
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕ ΘΕΜΑ:**

**« ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HEAT SHOCK PROTEINS)
ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ. »**

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ

ΡΑΠΗ ΣΤΕΛΛΑ

ΑΓΡΙΝΙΟ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ:
ΔΙΟΙΚΗΣΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕ ΘΕΜΑ:
«ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HEAT SHOCK PROTEINS)
ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.»

ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ
ΡΑΠΤΗ ΣΤΕΛΛΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΑ
ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ
ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

AGPINIO 2009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της έρευνας και της συλλογής του υλικού που απαιτήθηκε για τη παρούσα μελέτη, καθοριστικό ρόλο σημείωσε η καθοδήγηση και η ενθάρρυνση της επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου. Γι' αυτό και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την κα. Βεζυράκη Πάτρα, Επίκουρη καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που με επέλεξε γι' αυτήν τη μελέτη.

Θέλω να την ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις της κατά την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να της εκφράσω τις απεριόριστες ευχαριστίες μου για την επίβλεψη, το ενδιαφέρον και την επιστημονική καθοδήγησή της κατά την πορεία εξέλιξης αυτής της εργασίας καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε τόσο κατά το συγγραφικό μέρος όσο και κατά την διαμόρφωση της παρουσίασης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....σελ. 5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ

- 1.1 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins).....σελ. 6
- 1.2 Η απόκριση σε θερμικό σοκ.....σελ.7
- 1.3 Η ρύθμιση της σύνθεσης των Hsp.....σελ.9
 - 1.3.1 Μεταγραφική ρύθμιση.....σελ.9
 - 1.3.2 Ορμονική ρύθμιση.....σελ.10
- 1.4 Έκφραση της Hsp70.....σελ.10
 - 1.4.1 Δομή.....σελ.13
 - 1.4.2 Λειτουργία και Ρύθμιση.....σελ.14
 - 1.4.5 Μέλη που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με την Hsp70.....σελ.15
- 1.5 Κλινική σημασία των Hsp.....σελ.15
 - 1.5.1 Hsp και νεοπλασία.....σελ.15
 - 1.5.2 Προγνωστική σημασία των Hsp σε κακοήθη νεοπλάσματα.....σελ.16
 - 1.5.3 Φαρμακευτική αντίσταση νεοπλασμάτων.....σελ.17
 - 1.5.4 Ανοσολογική απάντηση σε νεοπλάσματα.....σελ.17
- 1.6 Hsp70 και ασθένειες.....σελ.18
 - 1.6.1 Hsp70 και καρκίνος.....σελ.19
 - 1.6.2 Ο ρόλος της Hsp70 στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην καρκινογένεση
σελ.20
- 1.7 Ο ρόλος της Hsp70 σε ισχαιμικές, φλεγμονώδεις καταστάσεις και στην ανάπτυξη
του καρκίνου.....σελ.20
- 1.8 Πρόκληση καρκίνου από μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό
Πολλαπλασιασμό.....σελ.23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΥΝΟΔΕΣ ΚΑΙ ΟΜΟΣΥΝΟΔΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

- 2.1 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ και η Hsp70 πρωτεϊνικές μηχανές.....σελ.24
- 2.2 Κυτταρικός θάνατος-Απόπτωση και Νέκρωση.....σελ.30
- 2.3 Ρύθμιση της απόπτωσης.....σελ.32
- 2.4 Hsp70 και απόπτωση.....σελ.33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ Hsp70

- 3.1 Η επαγωγή της Hsp70 σε σχέση με την ηλικία-Μελέτη των επιπέδων της Hsp70
σε ορό και σε λεμφοκύτταρα.....σελ.34
- 3.2 Η ηλικίωση μειώνει την έκφραση της Hsp70 στο συκώτι έπειτα από θερμικό
στρες.....σελ.36
 - 3.2.1 Αυξημένη υπατική βλάβη σε σχέση με την ηλικία.....σελ.37
 - 3.2.2 Η επαγωγή της Hsp70.....σελ.38
- 3.3 Συσχέτιση της επαγωγής της Hsp70 και της γονοτοξικής βλάβης στα λεμφο-
κύτταρα ανθρώπων που εκτείνονται σε εκπομπές αερίων.....σελ.39
- 3.4 Η επαγωγή της Hsp70 σε φαρμακο-ανθεκτικά κύτταρα λόγω χορήγησης
αντι-καρκινικών φαρμάκων και της υπερθερμίας.....σελ.40

- 3.5 Η επαγωγή της Hsp70 gene promoter μέσω διάφορων αντι-καρκινικών φαρμάκων
Σελ.41
- 3.6 Η αναπτυγμένη τοξικότητα και οι αποκρίσεις των στρες πρωτεϊνών σε έμβρυα του ιχθύος Zebrafish έπειτα από έκθεση σε diclofenac και σε DMSO.....σελ.41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ, Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ.

- 4.1 Ταξινόμηση και θεωρίες των χημειοπροληπτικών.....σελ.43
- 4.2 Τα πολλαπλά βήματα της καρκινογένεσης.....σελ.44
- 4.3 Η θεωρία των βιοδεικτών και ο ρόλος τους στην καρκινογενετική επιδημιολογία.
Σελ.44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΙ ΣΤΡΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

- 5.1 Ο εξελικτικός και ο οικολογικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.....σελ.47
 - 5.1.1 Καθορισμός του Stressσελ.49
 - 5.1.2 Η απάντηση των κυττάρων σε έκθεσή τους σε στρες.....σελ.49
 - 5.1.3 Σύστημα ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών.....σελ.49
 - 5.1.4 Το στρες ως οικολογική και εξελικτική δύναμη.....σελ.50
 - 5.1.5 Επιδράσεις του στρες στους ρυθμούς εξέλιξης.....σελ.50
 - 5.1.6 Κόστος έκφρασης των πρωτεϊνών.....σελ.51
- 5.2 Οι πρωτεΐνες θερμικού, οι μοριακοί και η απόκριση σε στρες.....σελ.51
 - 5.2.1 Ποικιλομορφία της απόκρισης σε στρες μέσω των στοιχείων στρες του περιβάλλοντος.....σελ.52
- 5.3 Η απόκριση σε θερμικό σοκ: Ο ρόλος της Hsp70 στην παρακολούθηση του περιβάλλοντος.....σελ.54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

- 6.1 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως μοριακοί βιοδείκτες της τοξικότητας του περιβάλλοντος.....σελ.57
- 6.2 Οι βιοδείκτες ως βιολογικοί δείκτες κατά την έκθεση σε ξενοβιοτικά.....σελ.59
- 6.3 Μέθοδοι εντοπισμού των στρες πρωτεϊνών και η χρήση τους ως βιοδείκτες του περιβάλλοντος.....σελ.61
- 6.4 Παραδείγματα βιοδεικτών έκθεσης-επίδρασης.....σελ.63
- 6.5 Εφαρμογές Βιοδεικτών.....σελ.64
- 6.6 Εντοπισμός των βιοδεικτών.....σελ.65
- 6.7 Αναφορές των HSPs ως βιοδείκτες τοξικότητας.....σελ.66
 - 6.7.1 Μέθοδοι προσδιορισμού της Hsp70.....σελ.66
- 6.8 Οι στρες πρωτεΐνες ως κατάλληλοι βιοδείκτες για την ρύπανση του περιβάλλοντος.
Σελ.68
- 6.9 Χρήση των βιοδεικτών σε υδρόβιους οργανισμούς.....σελ.71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΡΥΠΟΓΟΝΑ

- 7.1 Οι πρωτεΐνες Hsp32, Hsp70 ως βιοδείκτες πρώιμης προειδοποίησης. Η επαγωγή των Hsps in vitro έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε καρκινογενή σκευάσματα. Σελ.73
- 7.2 Η επαγωγή της Hsp70 ως αποτέλεσμα της έκθεσης των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα.....σελ.75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ Hsp70 ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ Cd,Cr, Ni ΣΤΗΝ ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ *Oreochromis Mossambicus*.

- 8.1 Τα μέταλλα ως ρυπογόνα και η αξία των βιοδεικτών.....σελ.79
- 8.1.1 Κάδμιο.....σελ.79
- 8.1.2. Χρόμιο.....σελ.80
- 8.1.3 Νικέλιο.....σελ.80
- 8.3 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ.....σελ.81
- 8.3.1 Παράγοντες που ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ στους ιχθύες.....σελ.81
- 8.4 Η κορτιζόλη.....σελ.82
- 8.5 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κορτιζόλης και των Πρωτεϊνών θερμικού σοκ σελ.83
- 8.6 Η συσσώρευση των Heat shock proteins 70 family memberσελ.85
- 8.6.1 Σύγκριση της συσσώρευσης της Hsp70 μεταξύ των συστημάτων έκθεσης.....σελ.85
- 8.7 Η συγκέντρωση της κορτιζόλης.....σελ.86
- 8.8 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κορτιζόλης και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. σελ.87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

- 9.1 Οι μηχανισμοί των κυττάρων για την αποτοξικοποίηση και την ανοχή τους στα βαρέα μέταλλα.....σελ.90
- 9.2 Η ενεργοποίηση της Hsp70 promoter από ανόργανα/οργανικά χημικά του Περιβάλλοντος, Σχέση μεταξύ της κυτοτοξικότητας και της λιποφιλικότητας. Σελ.93
- 9.3 Τα βαρέα μέταλλα ως οι ισχυρότεροι αναστολείς της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σελ.94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

- 10.1 Η παραγωγή των μεταλλοθειονεϊνών και οι Hsps σε απόκριση στα μέταλλα.σελ.96
- 10.2 Η αποκλίνουσα κινητική της επαγωγής της Hsp70 στα Ισόποδα(*Oniscus asellus*) σε απόκρισή τους σε 4 οργανικά χημικά (B[a] P, PCB52, γ-HCH, PCP) του περιβάλλοντος: Η καταλληλότητα και οι περιορισμοί ενός βιοδείκτη.....σελ.97
- 10.3 Η αναπτυγμένη τοξικολογία του Cd σε έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς του Zebrafish.*Danio reiro*.....σελ.98
- 10.4 Το Sodium Arsenite AP-1 and NF κB DNA Binding επάγει την έκφραση των στρες πρωτεϊνών στα Precision-Cut Rat Lung Slices.....σελ.99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

- 11.1 Η τοξικολογία του Diazinon.....σελ.101
- 11.2 Η ενεργοποίηση της επαγωγής του στρες γονιδίου μέσω των εντομοκτόνων στο *Chironomus yoshimatsui*.....σελ.103
- 11.3 Η τοξικότητα του cypermethrin:η Hsp70 ως βιοδείκτης απόκρισης στην διαγονιδιακή *Drosophila*.....σελ.104
- 11.4 Η επαγωγή της Hsp70 διαγονιδιακή *Drosophila*:ως βιοδείκτης έκθεσης σε Phthalimide ομάδα χημικών.....σελ.106
- 11.5 Η επαγωγή της Hsp70 σε γαρίδες γλυκέων υδάτων (*Macrobrachium Malcoimsonii*) κατά την έκθεσή τους σε endosulfan-carbaryl.....σελ.107
- 11.6 Τα επίπεδα της Hsp70 σε πρωτογενείς επιδερμικές καλλιέργειες του Rainbow trout σε απόκριση κατά την έκθεση σε 2, 4- dichloroaniline.Ένας καινούργιος in vitro δείκτης τοξικότητας του υδρόβιου περιβάλλοντος.....σελ.108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

- 12.1 Η επαγωγή της Hsp70 σε γαρίδες γλυκέων υδάτων (*Macrobrachium Malcoimsonii*) κατά την έκθεσή τους σε διάφορες θερμοκρασίες-εγκλιματισμός. Σελ.109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΤΡΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.

- 13.1 Οι στρες πρωτεΐνες και η ρυθμισή τους.....σελ.110
- 13.2 Η ευαισθησία σε ρυπογόνα του περιβάλλοντος.....σελ.112
- 13.3 Η επίκτητη ανοχή και η βιοπαρακολούθηση.....σελ.113
- 13.4 Η επιμονή της απόκρισης σε στρες.....σελ.114
- 13.5 Συμπέρασμα.....σελ.115

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ 116

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή γίνεται προσπάθεια να περιγραφεί η καλή εφαρμογή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins) ως βιοδείκτες τοξικότητας για την παρακολούθηση των οργανισμών, προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος της προσβολής ή ο βαθμός επίδρασης λόγω της έκθεσής τους σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες.

Έτσι ώστε, τα προβλήματα που προκύπτουν από την έκθεση των οργανισμών σε εσωτερικής και εξωτερικής φύσεως στρες, να μπορούν να αναγνωριστούν πιο αποτελεσματικά και με μεγαλύτερη ευαισθησία, επιτρέποντας έτσι τον πιο γρήγορο εντοπισμό τους.

Δεδομένου, ότι η λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα με μηχανισμό που δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

- Η επισκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας ως προς την χρήση-συμπεριφορά των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως βιοδείκτες τοξικότητας.
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους υπό εξέταση οργανισμούς, η παρακαλούθηση των πιθανών αλλαγών των συγκεντρώσεών τους καθώς και η εξακρίβωση της πιθανής σχέσης αυτών των συγκεντρώσεων με τους ξеноβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες.
- Μελέτη της επαγωγής της hsp70 ως προειδοποιητικός δείκτης κακοήθων όγκων.

Για τους παραπάνω λόγους εξετάστηκε η επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και συγκεκριμένα της Hsp70 στους εξής οργανισμούς:

1. *Drosophilla melanogaster*
2. Centipede *Lithobius mutabilis*, Chilopoda, housefly *Musca domestica*, *Lubrinus terrestris*, σε νηματώδεις *C.elegans*.
3. Πλατύψαρα (*Pleuronectes vetulus*, *Lepidopsetta bilineata*, και *Platichthys stellatus*), σε ψάρι *Oreocromis Mossambicus*, African catfish (*Clarias gariepinus*), σε υδρόβιους οργανισμούς (ιχθύων medaka), *Oniscus assellus* (Isopoda), σε zebrafish κυτταρικές σειρές, *Chironomus yoshimatsui*.
4. Σε γαρίδες γλυκέων υδάτων (*Macrobrachium Malcoimsonii*)
5. Asian clam
- 6 Σε γαιοσκώληκα *Lubrinus terrestris*
7. Ποντίκια (Fischer 344), Sprague-Dawley
8. Σε ανθρώπους
9. Βαρέα μέταλλα, ξеноβιοτικά, εκπομπές αερίων.
10. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα
11. Αντι-καρκινικά φάρμακα
12. Αυξημένες θερμοκρασίες.

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HEAT SHOCK PROTEINS) ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Όλοι οι οργανισμοί είναι εφοδιασμένοι με μηχανισμούς προκειμένου να μπορέσουν να αντιμετωπίσουν τις αλλαγές στο εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον τους, να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν. Το στρες προκαλεί μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, ιδιαίτερα ως αποτέλεσμα της αύξησης της έκφρασης των επιλεκτικών γονιδίων. Αυτά τα γονίδια συμπεριλαμβάνουν εκείνα τα οποία αποκωδικοποιούν τις επαγόμενες στρες πρωτεΐνες γνωστές ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ, HSPs.

1.1.Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins)

Ο Ferruccio Ritossa ήταν ο πρώτος που ανέφερε ότι η παροδική αύξηση της θερμοκρασίας ενεργοποιεί την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως απόκριση της προστασίας των κυττάρων στην *Drosophila* το 1962 (Ritossa, 1962). Έπειτα από αυτό, ανακαλύφθηκαν πολλές διαφορετικές HSP οικογένειες οι οποίες χαρακτηρίστηκαν σε ποικιλία οργανισμών. Οι HSPs είναι υψηλά συντηρούμενες, το οποίο αποδεικνύει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες των κυττάρων (Kregel, 2002).

Επίσης, είναι πανταχού παρούσες και βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι τους ανθρώπους ενώ απαντούν επίσης ακόμη και σε μη στρεσογόνες συνθήκες, όπου απλά ελέγχουν τις πρωτεΐνες του κυττάρου. Παράδειγμα αυτού του είδους παρακολούθησης είναι η μεταφορά των γηρασμένων πρωτεϊνών στο κυτταρικό σύστημα ανακύκλωσης και η συμβολή τους στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες Hsp ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε έξι ομάδες: Την ομάδα Hsp100 με μοριακό βάρος 100-110 kDa, την ομάδα πρωτεϊνών Hsp90 με μοριακό βάρος 83-90 kDa, την ομάδα Hsp70 με μοριακό βάρος 66-78 kDa, την ομάδα Hsp60 με μοριακό βάρος 54-61.05 kDa, την ομάδα Hsp40 με μοριακό βάρος 38-41.1 kDa και την ομάδα Hsp27 με μοριακό βάρος 15-30 kDa.

Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές παράγονται σε σταθερά επίπεδα και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ενδοκυττάρια μεταφορά διαφόρων πολυπεπτιδικών συμπλεγμάτων, η τρισδιάστατη δόμηση των πρωτεϊνών καθώς επίσης συμβάλλουν στην λειτουργικότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, ενώ άλλες παράγονται αποκλειστικά ή σε αυξημένα επίπεδα σε καταστάσεις ανάγκης, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το είδος του ερεθίσματος (Leppa S & Sistonen L, 1997). (Πίνακας 1)

Τα πολυπεπίδια θεωρητικά μπορούν να αποκτήσουν τη χωροταξική δομή τους αυτόματα σύμφωνα με την αλληλουχία τους, αυτό όμως στο μη ιδανικό περιβάλλον του κυττάρου με τις υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα δύσκολο.

Για το λόγο αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύστημα διαφόρων προστατευτικών μορίων (Molecular chaperones), με την βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η κατάλληλη τρισδιάστατη πτύχωση και μεταφορά των πρωτεϊνών, καθώς και η αποφυγή μη ειδικών συναθροίσεων των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων (Sistonen L, 1997).

Τα σημαντικότερα από αυτά τα μόρια ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών Hsp.

Η προστατευτική αυτή λειτουργία των Hsp είναι ιδιαίτερα σημαντική σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου ευνοείται η δημιουργία και η συνάθροιση αλλοιωμένων πολυπεπτιδίων, και επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση δημιουργίας μη ειδικών συμπλεγμάτων ή με την διάσπαση αυτών και έτσι με αυτόν τον τρόπο ελαττώνεται η τελική κυτταρική διαταραχή.

Επομένως, οι HSPs έχουν ρόλο μοριακής συνοδού δεσμεύουν τις αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες και τις βοηθούν να αναδιπλωθούν σε φυσική (μη μετουσιωμένη) λειτουργική κατάσταση (Palleros et al., 1991, Wang & Spector, 2000).

Ακόμη, αποτρέπουν την συσσώρευση των άλλων πρωτεϊνών κατά την διάρκεια του στρες, βοηθούν στον καταβολισμό των κατεστρεμμένων πρωτεϊνών (Fernando & Heikkila, 2000, Abdulle et al., 2002), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε όγκους και εμπλέκονται στους προστατευτικούς μηχανισμούς των κυττάρων σε ισχαιμικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις.

1.2.Η απόκριση σε θερμικό σοκ

Ο όρος 'απόκριση σε θερμικό σοκ' είναι λίγο παραπληνητικός, εφόσον η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ έχει τεκμηριωθεί ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες εκτός του θερμικού σοκ. Οι περιβαλλοντικές στρεσογόνες συνθήκες συμπεριλαμβάνουν την θερμότητα, το κρύο, τα βαρέα μέταλλα, την υπερδιώδη ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα παράγωγα αμινοξέων, τα οξειδωτικά μέσα, την αφυδάτωση καθώς και τους τοξικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου το αρσενικό, το νάτριο, την αιθανόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Darasch et al., 1988, Nowack et al., 1990, Muller et al., 2004, Gauley & Heikkila, 2006).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν επίσης να επαχθούν μέσω παθοφυσιολογικών καταστάσεων όπως είναι η ηλικία, οι μολύνσεις, οι λοιμώξεις, ο λιμός και η υποξία (Ciocca et al., 1993, Giffard et al., 2004, Njemini et al., 2007). Στα φυτά η ανεπάρκεια αζώτου ή η ανεπάρκεια νερού μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή των HSPs. Η έκθεση σε στρες προκαλεί την αποδιάταξη, ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών. Επομένως, η απόκριση σε στρες είναι απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί η κατάλληλη δομή των πρωτεϊνών και εν συνεχεία της καλής λειτουργίας των κυττάρων.

Ο μηχανισμός με τον οποίο το κύτταρο εντοπίζει το στρες παραμένει ακόμη άγνωστος, ωστόσο θεωρείται ότι η παρουσία των μη φυσικών πρωτεϊνών ή των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών προκαλεί την απόκριση σε θερμικό σοκ. Δεν έχει δηλαδή πλήρως διευκρινιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο οι HSPs προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα.

Συνεπώς, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αναφέρονται και ως στρες πρωτεΐνες, και η θετική τους ρύθμιση περιγράφεται σε ορισμένες περιπτώσεις ως τμήμα της απόκρισης σε στρες. Ιογενείς ή μικροβιακές λοιμώξεις και καταστάσεις ανοξίας ή έλλειψης γλυκόζης, διεγείρουν επίσης την παραγωγή των Hsp. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες θερμικού shock σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση και εκφράζονται επιλεκτικά σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου κάτω από τη ρυθμιστική δράση ορμονών και αυξητικών παραγόντων.

Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές και ιδιαίτερα εκείνες που αποκαλούνται πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs:Heat Shock Proteins) εμπλέκονται σε μια σειρά προστατευτικών επιδράσεων για τα κύτταρα. Υπό την επίδραση ισχυρών ερεθισμάτων (περιβαλλοντικά ερεθίσματα ή ιϊκές μολύνσεις) τα κύτταρα ωθούνται σε κυτταρικό θάνατο (απόπτωση ή νέκρωση μετά από στρες) ή σε αυξημένη κυτταρική επιβίωση (μετά από ιϊκή μόλυνση και μετασχηματισμό των κυττάρων).

Σημαντικό ρόλο στην απόφαση των κυττάρων και την ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών οι οποίες και επηρεάζουν σημαντικά την πορεία ενός κυττάρου προς τον κυτταρικό θάνατο ή την αυξημένη επιβίωση κατέχει η Hsp70 και οι συνεργάτες της.

Έτσι, η Hsp70 αφ' ενός είναι υπεύθυνη της προστατευτικής λειτουργίας και αφ' ετέρου κάτω από συνθήκες από-ρύθμισής της φαίνεται να ενισχύει την διαδικασία του κυτταρικού μετασχηματισμού.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση των Hsp90, Hsp70, Hsp60, και πιθανώς και της Hsp27 με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών.

Οι πρωτεΐνες Hsp μπορούν να τροποποιήσουν τη δραστηριότητα των υποδοχέων δεδομένου ότι συνδεόμενες με τους υποδοχείς επιτυγχάνουν τη διατήρησή τους σε ανενεργό κατάσταση (Sherrer et al., 1990, Pratt WB, 1990, Kontogeorgos et al., 1995).

Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των Hsp επιτυγχάνεται με την βοήθεια ειδικών παραγόντων ελέγχου μεταγραφής επί θερμικού shock (HSF), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με μια καλά διατηρούμενη περιοχή ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων των Hsp, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας AGAA και αποτελεί βασικό τμήμα της απόκρισης στο θερμικό σοκ.

Οι πρωτεΐνες Hsp27 και Hsp70 σχετίζονται με την παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε καρκινώματα μαστού και φαίνεται να έχουν αρνητική προγνώστική σημασία σε αυτά με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Πίνακας 1. Υποκυτταρική εντόπιση και λειτουργία των διαφόρων ομάδων Hsp.

Πρωτεΐνη	Υποκυτταρική εντόπιση	Λειτουργία
Hsp100	Πυρήνιο	Προστασία επί Stress Θερμοαντοχή
Hsp90	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορά και στεροδιάταξη πρωτεϊνών. Δέσμευση υποδοχέων στεροειδών ορμονών και πρωτεϊνικών κινασών.
Hsp70	Κυτταρόπλασμα / πυρήνας Ενδοπλασματικό δίκτυο	Αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Σύνθεση ολιγομερών συμπλεγμάτων.
Hsp60	Κυτταρόπλασμα	Στεροδιάταξη πρωτεϊνών.
Hsp40	Κυτταρόπλασμα	Στεροδιάταξη πρωτεϊνών. Ρύθμιση λειτουργίας Hsp70.

Hsp27	Κυτταρόπλασμα	Σύνθεση / αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Θερμοαντοχή Δέσμευση στεροειδών ορμονών. Κυτταρικός κύκλος.
--------------	---------------	---

1.3.Ρύθμιση της Σύνθεσης των HSP

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εκφράζονται με ένα χαρακτηριστικό τρόπο επαγωγής και καταστολής ο οποίος εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, το στάδιο της ανάπτυξης, την ένταση και την διάρκεια του στρες (Heikkila et al., 1987a, Darasch et al., 1998, Lang et al., 1999).

1.3.1. Μεταγραφική ρύθμιση

Για να επιτευχθεί η ταχύτερη επαγωγή των πρωτεϊνών Hsp σε καταστάσεις θερμικού stress, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ευρύτατο σύστημα παραγόντων που δρουν σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Κοινοί αποδέκτες όλων των ρυθμιστικών μηχανισμών στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι οι παράγοντες ελέγχου μεταγραφής επί θερμικού shock (HSFs-Heat shock transcription factors), οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων θερμικού stress. Οι παράγοντες HSF σε κατάσταση ηρεμίας ευρίσκονται υπό λανθάνουσα μορφή, η οποία δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με το DNA και ενεργοποιούνται με την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων.

Πρόσφατα έγινε δυνατή η κλωνοποίηση του cDNA των HSF και η απομόνωσή τους από πολλά είδη οργανισμών, με αποτέλεσμα να διευκρινισθεί ο μηχανισμός δράσης σε ορισμένους από αυτούς. Δύο από αυτούς τους παράγοντες (HSF1 και HSF2) μελετήθηκαν αναλυτικά σε μοριακό επίπεδο στη *Drosophila* και μας δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την αντίστοιχη δράση των παραγόντων HSF στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Wu, 1995).

Συγκεκριμένα οι παράγοντες HSF αλληλεπιδρούν με μια καλά διατηρούμενη περιοχή ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων των HSP, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας AGAA. Οι παράγοντες αυτοί ευρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας υπό αδρανή μορφή μονομερών (HSF1) ή διμερών (HSF2) και υπό την επίδραση ερεθισμάτων θερμικού stress σχηματίζουν ενεργείς τριμερείς μορφές, οι οποίες μεταναστεύουν στον πυρήνα και υπερφωσφορυλιούνται σε κατάλοιπα σερίνης. Με τη μορφή αυτή έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τις θέσεις ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων θερμικού shock και να επάγουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών Hsp (Leppa S & Sistonen L, 1997, Sherrer et al., 1990, Pratt WB, 1990, Wu C, 1995).

1.3.2. Ορμονική ρύθμιση

Η Hsp27 αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ορμονικής επίδρασης στη ρύθμιση της παραγωγής της. Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε αρχικά σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7 και παρατηρήθηκε ότι η σύνθεση της αυξάνεται όταν τα κύτταρα αυτά εκτεθούν σε οιστρογόνα και μάλιστα με ρυθμό ανάλογο με τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης (Edwards et al., 1981). Στη μύγα *Drosophila* έχει παρατηρηθεί εξάλλου ότι τα γονίδια των χαμηλού μοριακού βάρους Hsp ενεργοποιούνται σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ανάλογα με τα επίπεδα αύξησης της ορμόνης β-εκδυσόνη (Thomas & Lengyel, 1986).

Κλινικές μελέτες που βασίστηκαν σε βιοψίες ενδομητρίου σε διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου έδειξαν μεγάλες διαφορές στην εντόπιση και τη συγκέντρωση της Hsp27. Ειδικότερα στο επιτολής επιθήλιο του ενδομητρίου η HSP27 εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης. Στο αδενικό επιθήλιο παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση της Hsp27 κατά το μέσον του κύκλου και κατά την προεμμηνορρυσιακή φάση.

Ακόμη παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της Hsp27 στις προσεκβολές του επιθηλίου του ενδομητρίου κατά την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, εύρημα που υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης αυτής κατά την προσκόλληση της βλαστοκύστης στο τοίχωμα της μήτρας (Ciocca et al., 1983).

Στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση της Hsp27 κατά τις διάφορες φάσεις του κύκλου (Ciocca et al., 1986). Επομένως, είναι πιθανό ότι οι Hsps ευρίσκονται κάτω από ορμονική ρύθμιση σε ορισμένους ιστούς και κάτω από ορισμένες συνθήκες, ενώ σε άλλους ιστούς ή καταστάσεις, η έκφραση των Hsp δεν επηρεάζεται από την επίδραση των ορμονών.

1.4 Heat Shock Protein μοριακού βάρους 70 kDa, Hsp70-Έκφραση

Είναι γεγονός πως οι οργανισμοί θα πρέπει να είναι ικανοί να αποκρίνονται και να ενσωματώνονται ταχέως στις περιβαλλοντικές συνθήκες με σκοπό να επιβιώσουν. Μια από τις καλύτερα μελετημένες αποκρίσεις είναι η απάντηση στο θερμικό σοκ, η οποία και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού shock (heat shock proteins, Hsps).

Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, η πρωτεΐνη Hsp70 συνιστά τα τελευταία χρόνια μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες η οποία κατατάσσεται στις συνοδές πρωτεΐνες (Chaperones) και στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins).

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ ή Hsp70 συνιστά μια πρωτεΐνη η οποία σαν κύριο στόχο της φαίνεται να έχει την προστασία των κυττάρων από περιβαλλοντικά στρες (Angelidis et al., 1991).

Η Hsp70 είναι η πιο σημαντική και εμπλέκεται σε έναν αριθμό κυτταρικών διεργασιών τέτοιων όπως η πρωτεϊνική μετακίνηση (Chirico et al., 1988, Imamoto et al., 1992, Shi et al., 1992), ο πρωτεϊνικός καταβολισμός (Chiang et al., 1989, Terlecky et al., 1992) και η θερμοαντίσταση (Angelidis, C., et al., 1991, 1996, Li et al., 1991). Επίσης, σχετίζεται με ασθένειες ή παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η μυϊκή ατροφία του προμήκη και νωτιαίου μυελού (Adachi H, et al., 2003, σε

συνεργασία με την ομάδα του κ Αγγελίδη) και την προστασία από ισχαιμία του εγκεφάλου (Plumier et al., 1995, σε συνεργασία με την ομάδα του κ Αγγελίδη).

Σε μοριακό επίπεδο αποτελεί μια πρωτεΐνη συνοδό η οποία αντιδρά με αδίπλωτες πρωτεΐνες και νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια και βοηθά στην απόκτηση της σωστής αναδίπλωσης εμποδίζοντας έτσι την δημιουργία λανθασμένων μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Beckman et al., 1990, Frydman et al., 1994, Rudiger et al., 1997).

Επειδή η πρωτεϊνική αστάθεια είναι το κύριο πρόβλημα των κυττάρων μετά από την έκθεσή τους σε στρες, πολλές εκ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μεταξύ αυτών και η Hsp70 συνιστούν μοριακούς συνοδούς που συνεισφέρουν στην αναδίπλωση και στην πρωτεϊνική ευστάθεια των πρωτεϊνών (reviewed in Lindquist & Graig, 1988, Morimoto et al., 1994, Feldman & Frydman, 2000).

Η δράση της Hsp70 φαίνεται να διέρχεται μέσα από την δημιουργία μοριακών νανομηχανών οι οποίες σχετίζονται με την πρωτεϊνική αναδίπλωση ή τον καταβολισμό των πρωτεϊνών. Είναι αποδεκτό ότι οι μοριακοί πρωτεϊνικοί συνοδοί (Chaperones) και ομοσυνοδοί (Co-chaperones) συγκροτούν μοριακές νανομηχανές οι οποίες επιδιορθώνουν (μέσω της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης ή απομακρύνουν από το κύτταρο (μέσω μηχανισμών καταβολισμού) λανθασμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα.

Μέσω αυτών των μηχανισμών το κύτταρο αυξάνει την ικανότητα επιβίωσής του διότι αφενός μεν αυξάνει τα φυσιολογικά μόριά του και αφετέρου απομακρύνει τα κατεστραμμένα και μη-λειτουργικά πρωτεϊνικά υποστρώματα.

Σε περιπτώσεις στρες τα μη φυσιολογικά υποστρώματα αυξάνονται και εμπλέκονται στον δρόμο των φυσιολογικών μορίων εμποδίζοντας έτσι τα μεταβολικά μονοπάτια να προσφέρουν τα προϊόντα τους, να επιτευχθεί η ομοιοστασία των κυττάρων και το κύτταρο να αποφύγει τον κυτταρικό θάνατο και να επιβιώσει.

Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα είναι το θερμικό σοκ ή ιϊκή μόλυνση τότε το κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει τις εξής διαδικασίες: την απόπτωση, την επαναφορά σε φυσιολογική λειτουργία ή τον μετασχηματισμό.

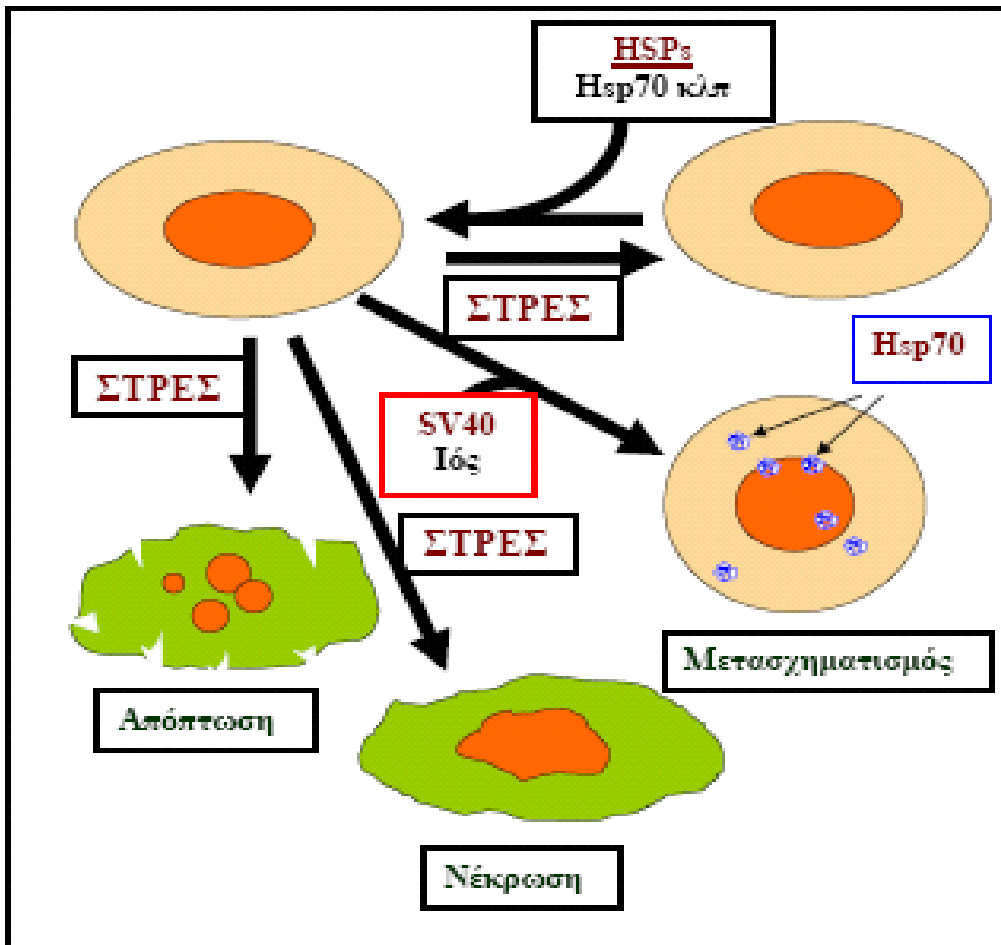
Σε όλες τις περιπτώσεις έχουμε επαγωγή της Hsp70 πρωτεΐνης η οποία ίσως να παρεμβαίνει τροποποιώντας τα αποπτωτικά μονοπάτια ή τις διαδικασίες του μετασχηματισμού των κυττάρων από τον SV40 ογκογόνο ιό.(*)

Μερικές από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, όπως η Hsp70, αποτελούν μέρος ομάδας πρωτεϊνών που είναι καρκινο-σχετιζόμενες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες με μία ικανότητα να αναστέλουν την αποδοτικότητα κάθε προσπάθειας θεραπείας του καρκίνου.

Αυτό συμβαίνει γιατί η Hsp70 ανήκει στις πρωτεΐνες που ωθούν τα καρκινικά κύτταρα, που τις υπερκφράζουν, προς επιβίωση αρνούμενα ακόμα και να ακολουθήσουν έστω την φυσιολογική λειτουργία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που είναι η απόπτωση. Επομένως, το τελευταίο διάστημα έχει αρχίσει να γίνεται αποδεκτό ότι η Hsp70 είναι μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη που παρεμβαίνει δηλαδή στα αποπτωτικά μονοπάτια και προσπαθεί να αντιστρέψει την πορεία των κυττάρων προς τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ελαττώματα στην σηματοδότηση των μονοπατιών της αποπτωτικής διαδικασίας εμφανίζονται συχνά στα κύτταρα τα οποία έχουν ξεφύγει από τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιου είδους ελαττώματα μπορούν να διαδραματίσουν σπουδαίο ρόλο στην έναρξη της υπερπλασίας ενός ιστού επειδή η απόπτωση, κατά φυσιολογικό τρόπο, απομακρύνει κύτταρα με κατεστραμμένο DNA, ή με απορυθμισμένο κυτταρικό κύκλο.

Η εντατική έρευνα της απόπτωσης κατά την τελευταία δεκαετία είχε σαν αποτέλεσμα την εύρεση αρκετών πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να υποκινήσουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αναστολής της απόπτωσης. Μεταξύ των πρωτεϊνών οι οποίες τηρούν αυτά τα κριτήρια συμπεριλαμβάνονται και τα αντι-αποπτωτικά μέλη όπως η Hsp70 καθώς και η Bcl-2. Έχει υπολογιστεί ότι αυξημένα επίπεδα της Bcl-2 μπορούν να ανιχνευθούν σε περίπου 50% των ανθρώπινων καρκίνων δίνοντας παραιτέρω έμφαση στην σπουδαιότητα της απορυθμισμένης απόπτωσης σαν ένα θεμελιώδες στάδιο στην ανθρώπινη καρκινογένεση (Reed, JC., 1997).

Όπως είναι γνωστό, τόσο η Hsp70 όσο και η Bcl-2 αποτελούν μέρος ομάδας πρωτεϊνών που είναι αντι-αποπτωτικές με μία ικανότητα να αναστέλλουν κάθε απόπειρα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η αναστολή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, Hsps) προκαλεί σε ορισμένες περιπτώσεις την αυθόρμητη αποπτωση των καρκινικών κυττάρων (Jaattela M., et al., 1998).



Εικόνα 1: Τα κύτταρα όταν υφίστανται εξωτερικά προθήματα (stress) τότε υπάρχουν οι παρακάτω δυνατότητες: Να πεθάνουν τυχαία με νέκρωση, να πεθάνουν προγραμματισμένα με απόπτωση, να απιβιάνουν ξαπρώνοντας το σπρος μέσα από την βοήθεια κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών ή να μετασχηματισθούν μετά από μία σκληή μάχηση.

Όλα αυτά υποδεικνύουν ότι η παρουσία της Hsp70 στα κύτταρα μπορεί να δράσει προς δύο κατευθύνσεις, μία ωφελιμιστική που είναι η προστασία των κυττάρων από περιβαλλοντικά στρες και μία επιβλαβή που βοηθά τα κύτταρα να μετασχηματιστούν. Αναλυτικότερα, θα λέγαμε ότι η ρύθμιση της Hsp70 στα κύτταρα επηρεάζει μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με 1) ανθεκτικότητα στο στρες, 2) ευαισθησία στο στρες, 3) την αύξηση της ογκογενετικότητας και 4) την αναστολή της ογκογενετικότητας. Επιπρόσθετα, πρωτεΐνες με παρόμοια δομή υπάρχουν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Ωστόσο, η Hsp70 πρωτεΐνη αποτελεί σημαντικό κομμάτι του κυτταρικού μηχανισμού για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών ενώ ακόμη, βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από στρεσογόνους παράγοντες. Μέλη της Hsp70 οικογένειας ενεργοποιούνται έντονα όταν εκτίθενται σε θερμικό στρες και σε τοξικά χημικά, ιδιαίτερα σε βαρέα μέταλλα όπως για παράδειγμα είναι το αρσενικό, το κάδμιο, ο υδράργυρος κ.α.



Εικόνα 2: Η ρύθμιση της Hsp70 στα κύτταρα επηρεάζει μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο στρες (1), ευαισθησία στο στρες (2), την αύξηση της ογκογενικότητας (3) και την αναστολή της ογκογενικότητας (4).

(*) Ο ιός SV40 προέρχεται από τον πράσινο Αφρικανικό πίθηκο του γένους κερκοπίθηκος. Είναι DNA ογκογόνος ιός και μπορεί να μετασχηματίσει κύτταρα ποντικού ή να επάγει όγκους σε νεογέννητα Hamster.

1.4.1 Δομή

Όλες οι Hsp70 πρωτεΐνες έχουν τρεις κύριες περιοχές, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω:

- Μια αμινοτελική περιοχή ATPάσης, η οποία προσδένει ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) το οποίο και υδρολύει σε ADP (διφωσφορική αδενοσίνη). Η ανταλλαγή του ATP επάγει μεταβολές στη χωροδιάταξη δύο άλλων περιοχών.
- Μια περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος που περιέχει μια αύλακα με συγγένεια για ουδέτερα, υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα. Η αύλακα είναι αρκετά μακριά ώστε να μπορεί να αλληλεπιδράσει με πεπτιδία μήκους έως επτά καταλοιπίων.

- Μια καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε δομές α-έλικας, η οποία δρα ως κάλυμμα για την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Όταν μια πρωτεΐνη Hsp70 έχει προσδεδεμένο ATP, το κάλυμμα είναι ανοικτό και τα πεπτίδια προσδένονται και απελευθερώνονται σχετικά γρήγορα. Όταν οι πρωτεΐνες Hsp70 έχουν προσδεδεμένο ADP, το κάλυμμα είναι κλειστό, και τα πεπτίδια προσδένονται ισχυρά στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος.

1.4.2 Λειτουργία και ρύθμιση

Όταν δεν αντιδρά με πεπτιδικό υπόστρωμα, η Hsp70 έχει συνήθως προσδεδεμένο ATP. Από μόνη της, η Hsp70 χαρακτηρίζεται από πολύ ασθενή ενεργότητα ATPάσης, έτσι που αυθόρμητη υδρόλυση του ATP δεν θα συμβεί για αρκετά λεπτά. Καθώς οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες εξέρχονται από τα ριβοσώματα, η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος της Hsp70 αναγνωρίζει αλληλουχίες υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων, και αλληλεπιδρά με αυτά. Αυτή η αυθόρμητη αντίδραση είναι αντιστρεπτή, και η Hsp70 που έχει προσδεδεμένο ATP μπορεί σχετικά ελεύθερα να προσδέσει και να απελευθερώνει πεπτίδια.

Ωστόσο, η παρουσία πεπτιδίων στην περιοχή πρόσδεσης υποκινεί την ενεργότητα ATPάσης της Hsp70, αυξάνοντας το φυσιολογικά χαμηλό ρυθμό υδρόλυσης του ATP. Όταν το ATP υδρολύεται σε ADP, η αύλακα πρόσδεσης της Hsp70 κλείνει, δεσμεύοντας ισχυρά την παγιδευμένη πεπτιδική αλυσίδα. Η υδρόλυση του ATP αυξάνεται περαιτέρω από τις λεγόμενες J-domain co-chaperones: κυρίως της Hsp40 στα ευκαρυωτικά και την DnaJ στα προκαρυωτικά κύτταρα. Αυτές οι co-chaperones αυξάνουν δραματικά την ενεργότητα ATPάσης της Hsp70 παρουσία των αλληλεπιδρώντων πεπτιδίων. Δεσμεύοντας ισχυρά τις μερικώς συντεθειμένες πεπτιδικές ακολουθίες (ατελείς πρωτεΐνες), η Hsp70 αποτρέπει τη συσσώρευσή τους και την ερμηνεία τους ως μη λειτουργικές. Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση της πρωτεΐνης, ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου (ο BAG-1 και ο Hsp BP1 είναι μεταξύ αυτών που έχουν αναγνωριστεί) υποκινεί την απελευθέρωση του ADP και την δέσμευση ενός νέου μορίου ATP, ανοίγοντας την αύλακα πρόσδεσης.

Έτσι η πρωτεΐνη είναι ελεύθερη να αναδιπλωθεί μόνη της ή να μεταφερθεί σε άλλες συνοδούς πρωτεΐνες για περαιτέρω επεξεργασία. Η HOP (Πρωτεΐνη Οργάνωσης των Hsp70/ Hsp90 [Hsp70/Hsp90 Organizing Protein]) προσδέεται ταυτόχρονα και στην Hsp70 και στην Hsp 90, και μεσολαβεί τη μεταφορά πεπτιδίων από την Hsp70 στην Hsp90. Η Hsp70 βοηθά επίσης, στην διαμεμβρανική μεταφορά των πρωτεϊνών, μέσω της σταθεροποίησής τους σε κατάσταση μερικής αναδίπλωσης. Η δράση των Hsp70 πρωτεϊνών συντελεί στην προστασία των κυττάρων από το θερμικό και το οξειδωτικό στρες.

Αυτού του είδους τα στρες, δρουν καταστρέφοντας τις πρωτεΐνες, προκαλώντας μερική αποδιάταξη και πιθανή συσσωμάτωση (ή κροκίδωση). Προσδένοντας προσωρινά τα υδρόφοβα κατάλοιπα που εκτείνονται από το στρες, η Hsp70 αποτρέπει τη συσσωμάτωση αυτών των μερικά αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, και επιτρέπει την αναδίπλωσή τους. Τέλος, η Hsp70 φαίνεται να συμμετέχει στην απόρριψη των κατεστραμμένων ή ελαττωματικών πρωτεϊνών.

Η αλληλεπίδραση με την CHIP (Carboxyl –terminus of Hsp70 Interactive Protein) – μια E3 λιγάση ουβικιτίνη – επιτρέπει στην Hsp70 να μεταφέρει πρωτεΐνες στα κυτταρικά μονοπάτια ουβικιτίνωσης και πρωτεόλυσης.

1.4.5. Μέλη που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με την Hsp70.

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί εκφράζουν αρκετές πρωτεΐνες που διαφέρουν ελάχιστα από την Hsp70, οι οποίες παρ'ότι έχουν την ίδια δομή περιοχών, κάθε μία έχει μοναδικό πρότυπο έκφρασης ή υποκυτταρικής εντόπισης.

- Η Hsc70 ή Hsp73 είναι μια συνοδός πρωτεΐνη που εκφράζεται συνεχώς. Τυπικά, αποτελεί το 1% με 3% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου.
- Η Hsp70 ή Hsp72 είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από το στρες. Υψηλά επίπεδα αυτής, μπορούν να παραχθούν από τα κύτταρα ως απάντηση σε περιπτώσεις υπερθερμίας, οξειδωτικού στρες και αλλαγών του pH.
- Η BiP ή Grp78 είναι μια πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συμμετέχει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και ρυθμίζεται θετικά σε απάντηση σε στρες ή σε λιμό.
- Η mtHsp70 ή Grp75 αποτελεί τη μιτοχονδριακή Hsp70.

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί εκφράζουν μόνο μία Hsp70 πρωτεΐνη, την DnaK.

1.5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ HSP

1.5.1. Hsp και νεοπλασία

Τα νεοπλασματικά κύτταρα σε έναν όγκο εκτίθενται σε διάφορες καταστάσεις βιολογικού stress, όπως π.χ. ανοξία και μεταβολές του pH λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης, με αποτέλεσμα να διεγείρεται η σύνθεση των Hsp. Η υψηλού βαθμού έκφραση ορισμένων από τα μέλη των ομάδων Hsp27, Hsp70 και Hsp90 σε διάφορους τύπους κακοήθων όγκων θα μπορούσε να επιτρέψει στους όγκους αυτούς να αποκτήσουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε διάφορα βλαπτικά για τα κύτταρα ερεθίσματα και επομένως μεγαλύτερη αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθώς και ταχύτερο ρυθμό αύξησης.

Τα φαινόμενα αυτά έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων αυτών. Επιπρόσθετα, ορισμένα μέλη της ομάδας Hsp70 φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του ογκογονιδίου c-myc και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και επί αυξημένης έκφρασής τους να συμβάλλουν στην κακοήθη κυτταρική εξαλλαγή (Pinasi-Kihmi et al., 1986).

Όσον αφορά το γονίδιο p53 έχει περιγραφεί ότι οι μεταλλάξεις του προκαλούν στερεοδομικές μοριακές μεταβολές της παραγόμενης πρωτεΐνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλέγματος με την Hsp70. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και με ανοσοϊστοχημικές μελέτες όπου βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της εντόπισης των δύο πρωτεϊνών επί παρουσίας μεταλλάξεων του p53 και αντίστοιχη ανίχνευση του συμπλέγματος τους (Iwawa et al., 1995).

1.5.2. Προγνωστική σημασία των Hsp σε κακοήθη νεοπλάσματα

Η προγνωστική σημασία των Hsp και ιδίως των Hsp27 και Hsp70 έχει διερευνηθεί σε διάφορους τύπους κακοήθων όγκων και κυρίως στον καρκίνο του μαστού. Η πρωτεΐνη Hsp27, ανακαλύφθηκε αρχικά στην κυτταρική σειρά του καρκινώματος μαστού MCF-7 ως πρωτεΐνη που εξαρτάται από τη δράση των οιστρογόνων (Edwards et al., 1981).

Σε μελέτες που ακολούθησαν βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκινώματα μαστού και ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως προβλεπτικός δείκτης ανταπόκρισης στην ορμονική θεραπεία (Ciocca et al., 1990, Love & King, 1994).

Σε άλλες κλινικές μελέτες αναφέρθηκε ότι η υψηλού βαθμού έκφραση της Hsp27 σχετίζεται με βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση σε καρκινώματα μαστού με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, αλλά όχι σε καρκινώματα με μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (Love & King, 1994, Tetu et al., 1995).

Αντίθετα σε μελέτη 51 ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με όγκους θετικούς στην Hsp27 είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και σχετικά μεγαλύτερη επιβίωση (Seymour et al., 1990).

Παρόμοια προγνωστική σημασία έχει και η έκφραση της Hsp70 όπου έχει βρεθεί με τη μέθοδο Western blot ότι οι ασθενείς με καρκίνωμα μαστού χωρίς μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης είχαν βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση. Στην ίδια μελέτη δημοσιεύθηκε ότι στην ομάδα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή η Hsp70 ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης (Ciocca et al., 1993).

Στον καρκίνο του ενδομητρίου η παρουσία Hsp27 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και την παρουσία οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων. Σε υπερπλασίες του ενδομητρίου χωρίς ατυπία παρατηρείται αύξηση έκφρασης της Hsp27, ενώ σε αδενωματώδη και άτυπη υπερπλασία σημειώνεται ελάττωση των επιπέδων της, εύρημα που υποδηλώνει ότι οι πρώτες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στη δράση των οιστρογόνων (Ciocca et al., 1985 MC Guire et al., 1986).

Όσον αφορά τον τράχηλο της μήτρας, η πρωτεΐνη Hsp27 ανιχνεύεται σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες χωρίς όμως η έκφρασή της να εμφανίζει σχέση με τους διάφορους βαθμούς της νόσου. Στα πλακώδη καρκινώματα τραχήλου μήτρας, παρόλο που η έκφραση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων είναι αρνητική, η έκφραση της Hsp27 είναι συχνή και αποτελεί δείκτη καλής διαφοροποίησης (Puy et al., 1989).

Από τις μελέτες αυτές φαίνεται επομένως ότι αν και η Hsp27 σε μεγάλο βαθμό ρυθμίζεται ορμονικά, σε ορισμένους μόνο ιστούς (μαστός, ενδομήτριο) σχετίζεται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και επομένως δεν μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ορμονικής ανταπόκρισης ή παρουσίας ορμονουποδοχέων. Στον καρκίνο του στομάχου, που επίσης η παρουσία οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων θεωρείται περιορισμένη (Singh et al., 1997), μελετητές περιέγραψαν την παρουσία της Hsp27 στο 50% περίπου των περιπτώσεων και ανέφεραν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής αποτελεί παράγοντα που σχετίζεται με σημαντικά βραχύτερη επιβίωση (Harrison et al., 1991).

1.5.3. Φαρμακευτική αντίσταση νεοπλασμάτων

Σύμφωνα με συνεχώς αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα οι πρωτεΐνες θερμικού shock φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία για την αντίσταση των κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Σε παλαιότερες μελέτες είχε βρεθεί ότι η ταυτόχρονη επίδραση υπερθερμίας και χημειοθεραπευτικών αυξάνει το ρυθμό εξάλειψης των νεοπλασματικών κυττάρων. Εν τούτοις, αν πριν από την χορήγηση χημειοθεραπευτικών επιδράσει στα κύτταρα θερμικό ερέθισμα ή έκθεση σε κάδμιο ή αιθανόλη, τότε επάγεται η σύνθεση των Hsp και η δράση των χημειοθεραπευτικών γίνεται λιγότερο αποτελεσματική (Wallner & Li, 1986).

Σημαντική πειραματική ένδειξη για τη σημασία των Hsp στην φαρμακευτική αντίσταση προέρχεται από τη μελέτη ερευνητών οι οποίοι μετέφεραν το ανθρώπινο γονίδιο της Hsp27 σε κύτταρα ωοθήκης ποντικών και παρατήρησαν ότι τα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η ομόλογη πρωτεΐνη, παρουσίαζαν αυξημένη αντίσταση στη δοξορουβισίνη, κολχικίνη και βινκριστίνη αλλά όχι στην 5-φθοριοουρακίλη και τις νιτροζουρίες (Huot et al, 1991).

Σε άλλη μελέτη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού βρέθηκε ότι η Hsp27 και σε μικρότερο βαθμό η Hsp70 σχετίζονται με αυξημένη αντίσταση έναντι της δοξορουβισίνης (Ciocca et al., 1992), η οποία αναστέλλεται όταν στα κύτταρα αυτά εισαχθούν αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια των αντίστοιχων Hsp (Oestereich et al., 1993). Από τις παρατηρήσεις αυτές φαίνεται επομένως ότι οι Hsp και κυρίως οι Hsp27 εμπλέκονται σε ορισμένες μορφές μη-ανταπόκρισης των όγκων σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, γεγονός που έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι η γνώση της έκφρασης ή μη των παραγόντων αυτών σε διάφορους τύπους όγκων θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή και να επιτρέψει πλέον επιτυχείς θεραπευτικές παρεμβάσεις.

1.5.4. Ανοσολογική απάντηση σε νεοπλάσματα

Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Hsp90 έχουν ανιχνευθεί με τη μέθοδο ELISA στο 37% γυναικών με καρκίνο μαστού, τα οποία βρέθηκαν ότι σχετίζονται σημαντικά με μεγαλύτερη πιθανότητα μετάστασης ακόμη και σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες (Cornoy et al., 1995). Η παρουσία αντισωμάτων αντι-Hsp90 στον ορό των γυναικών δείχνει ότι η Hsp90 μεταφέρει πεπτίδια στην επιφάνεια των κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων έναντι αυτών. Το γεγονός της συχνότερης εμφάνισης μεταστάσεων στις ασθενείς με αντισώματα αντι- Hsp90 πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία περισσότερων νεοπλασματικών κυττάρων με επιφανειακή Hsp90 ή την ανοσολογική ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος κατά τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων από το μαστό στη θέση μετάστασης. Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχει παρατηρηθεί παρουσία πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp90 στην επιφάνεια των κυττάρων, τόσο σε ανθρώπινους καρκίνους όσο και αντίστοιχες κυτταρικές σειρές (Ferraniri et al., 1992, Tsuboi et al., 1994, Multhoff et al., 1995).

Το εύρημα αυτό δείχνει ότι οι πρωτεΐνες Hsp, με άγνωστο ακόμη μηχανισμό και πιθανόν παθητικά από άλλες συμπλεκόμενες πρωτεΐνες, μεταφέρονται στην επιφάνεια των κυττάρων και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσολογικοί καρκινικοί δείκτες.

1.6 HSP70 ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Τα εξελικτικά ανώτερα ζώα, έχουν την ικανότητα κινητοποίησης πληθώρας ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι αποσκοπούν στην διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού ο οποίος έχει εκτεθεί σε διάφορες μεταβολές του περιβάλλοντος.

Ανάλογα με την θερμοκρασία έκθεσης τα ομοιόθερμα ζώα επιτυγχάνουν την προσαρμογή με την συντονισμένη κινητοποίηση εκτελεστικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν μεταβολές στον ρυθμό έκκρισης διαφόρων ορμονών και του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Vezyraki P, et al., 1999, Vezyraki P, et al., 2000).

Μεταξύ των μηχανισμών που κινητοποιούνται σε επίπεδο κυττάρου όταν εκτεθούν γενικά σε stress, είναι και ο μηχανισμός επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων από το στρες, πρωτεϊνών ο οποίος στηρίζεται στη δημιουργία μοριακών νανομηχανών που δημιουργούνται από συνοδές (Georgopoulos, C., et al., 1993) και ομο-συνοδές πρωτεΐνες (Ohtsuka, K., 1993, Bozidis, P., et al., 1998).

Είναι πλέον γενικά παραδεκτό ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό ασθενειών όπως σε μολυσματικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια, τρομάδη νόσο ή scrapie, ασθένεια Creutzfeld-Jakob και ασθένεια Alzheimer), σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες, σε ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη και στον καρκίνο. Επίσης μια αυξημένη έκφραση των hsps παρατηρείται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως της ισχαιμίας, της καρδιακής υπερτροφίας, του πυρετού, των διαφόρων φλεγμονών και των διαφόρων βακτηριακών και παρασιτικών μολύνσεων.

1.6.1 Hsp70 και καρκίνος

Η Hsp70 αποτελεί μία άφθονα και κατά προτίμηση εκφραζόμενη πρωτεΐνη στους κακοήθεις όγκους. Αρκετές κλινικοπαθολογικές μελέτες έδειξαν μία κατά προτεραιότητα έκφραση της Hsp70 σε άριστης ποιότητας κακοήθεις όγκους συγκρινόμενη με αυτήν που παρατηρείται σε κακής ποιότητας κακοήθεις όγκους και στους γειτονικούς περιβάλλοντες ιστούς (Jaattela M., 1999).

Στον καρκίνο του μαστού η έκφραση της Hsp70 αποτελεί έναν χρήσιμο παράγοντα πρόγνωσης συσχετιζόμενου με σημαντικά μικρότερης επιβίωσης, αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μετάστασης στους λεμφαδένες (Ciocca, D.R., et al., 1993, Lazaris, A.C., et al., 1997, Vargas-Roig, L.M., et al., 1998).

Επιπλέον, τα κλινικά δεδομένα υποθέτουν ότι η Hsp70 συσχετίζεται αντιστρόφως με την απάντηση του καρκίνου του μαστού σε συνδυασμένη χημειοθεραπεία, ακτινοβολία και υπερθερμία, ενώ αντιθέτως δεν έχει βρεθεί συσχετισμός με την απάντηση στην ταμοξιφένη (Tamoxifen) (Ciocca, DR., et al., 1998).

Επίσης ασθενείς με Hsp70 θετικούς ενδομητρικούς όγκους έδειξαν σημαντικά μικρότερους χρόνους επιβίωσης από ασθενείς με Hsp70 αρνητικούς όγκους (Nanbu, K., et al., 1998).

Κατά παράδοξο τρόπο, όμως η έκφραση της hsp70 στο κακοήθες οστεοσάρκωμα και στα κύτταρα νεφρικών όγκων συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση ή με καλύτερη ανταπόκριση σε νεοενισχυτική χημειοθεραπεία (Trieb, K., et al., 1998).

Η χρησιμοποίηση της Hsp70 chaperone μηχανής εφαρμόζεται αφενός μεν για την εύρεση καινούργιων θεραπευτικών στρατηγικών στις ανθρώπινες ασθένειες και αφετέρου για την εύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων και για την παραγωγή ειδικών θεραπευτικών βιομορίων.

Ελλατώματα στην σηματοδότηση των μονοπατιών της αποπτωτικής διαδικασίας εμφανίζονται συχνά στα καρκινικά κύτταρα. Τέτοιου είδους ελλατώματα μπορούν να παίξουν έναν σπουδαίο ρόλο στην έναρξη του όγκου επειδή η απόπτωση κατά φυσιολογικό τρόπο απομακρύνει κύτταρα με κατεστραμμένο DNA ή με απορυθμισμένο κυτταρικό κύκλο δηλαδή κύτταρα με αυξημένο ενδεχόμενο κακοήθειας.

Εκτός των παραπάνω, η εξασθενημένη απόπτωση μπορεί να αυξήσει την προώθηση της ογκογενετικότητας και να υποκινήσει την μετάσταση. Η εντατική έρευνα της απόπτωσης κατά την τελευταία δεκαετία είχε σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση αρκετών πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να υποκινήσουν την ογκογενετικότητα μέσω της αναστολής της απόπτωσης.

Ιδιαίτερης σημασίας στον καρκίνο του ανθρώπου αποτελούν εκείνες οι οποίες εκφράζονται κατά κύριο λόγο στους πρωτογενείς όγκους και που λειτουργούν στο κοινό μέρος των σηματοδοτημένων μονοπατιών που οδηγούν στην απόπτωση.

Μεταξύ των πρωτεϊνών που τηρούν αυτά τα κριτήρια συμπεριλαμβάνονται και τα αντιαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) όπως η hsp 70 και η Hsp27.

Η προσπάθεια κατανόησης του μοριακού μηχανισμού δράσης αυτών των πρωτεϊνών είναι ικανή να υποδείξει έναν νέο τρόπο χειρισμού της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων με στόχο την θεραπεία. Είναι γεγονός, ότι οι πρωτεΐνες επιβίωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν στόχοι για την θεραπεία του καρκίνου. Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, η Bcl-2 και η hsp70 αποτελούν μέρος ομάδας πρωτεϊνών που είναι καρκινο-σχετιζόμενες αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες με μία ικανότητα να αναστέλουν την αποδοτικότητα κάθε απόπειρας θεραπείας του καρκίνου.

Έτσι, είναι προφανές ότι χρειάζεται να βρεθούν τρόποι ή για την αναστολή της έκφρασής τους, για παράδειγμα με την αντι-νοηματική τεχνολογία (anti-sense technology), για την αδρανοποίηση της αντιαποπτωτικής τους ενεργότητας με ανταγωνιστικές πρωτεΐνες (όπως η Bax) και ειδικά πεπτιδία (όπως η J-δομή των DnaJs) ή με τον σχεδιασμό ειδικών φαρμακευτικών συστατικών που συνδέονται στις ενεργές θέσεις των πρωτεϊνών αυτών.

Η χρήση αντι-νοηματικής τεχνολογίας ενάντια στην Bcl-2 και την hsp70 έδειξε ότι τα καρκινικά κύτταρα γίνονται περισσότερο ευαίσθητα στα αντικαρκινικά φάρμακα (Wei, Y., et al., 1995, Reed, J.C., 1997).

Ακόμη πιο εντυπωσιακά, η αναστολή των Hsps προκαλεί σε ορισμένες περιπτώσεις την αυθόρμητη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Με Bcl-2 αντινοηματικά ολιγονουκλεοτίδια έχουν ήδη αρχίσει κλινικές δοκιμές με ενθαρρυντικά όχι όμως πολύ καλά αποτελέσματα σε ασθενείς με λέμφωμα Hodgkin (Webb, A., et al., 1997).

Ενώ η anti-Bcl-2 θεραπεία μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στα λεμφώματα, άλλες πρωτεΐνες επιβίωσης μπορούν να αποτελέσουν πιο αποτελεσματικούς στόχους σε άλλου είδους καρκίνους.

Έτσι η anti-hsp70 ή η anti-Bcl-2/anti-hsp70 θεραπεία συνδυαζόμενη με παραδοσιακά αντικαρκινικά φάρμακα ή πρωτεϊνικούς παράγοντες ή αντισώματα θα αποτελούσε αφενός μεν μία αποδοτικότερη πιθανόν θεραπευτική προσέγγιση αφετέρου δε μία θεραπεία με χαμηλότερες δόσεις τοξικών τοξικών φαρμάκων.

1.6.2 Ο ρόλος της hsp70 στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην καρκινογένεση.

Οι πρωτεΐνες hsp70 και η Bcl-2 ως πρωτεΐνες επιβίωσης ή αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα όπου παράγονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η παρουσία των πρωτεϊνών αυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων και πιθανόν για τον μετασχηματισμό τους.

Δεδομένου του ότι οι hsp70 και Bcl-2 είναι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες θεωρούμε ότι προσδίδουν αυξημένη βιωσιμότητα στα κύτταρα που εκφράζονται. Επομένως, η αδρανοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών στα μετασχηματισμένα και καρκινικά κύτταρα θα τροποποιούσε αφενός μεν την ικανότητα επιβίωσής τους αφετέρου δε την διατήρηση του φαινοτύπου τους.

Θεωρούμε δηλαδή ότι η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών θα καταστήσει τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα από τα φυσιολογικά δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν υψηλές ποσότητες των πρωτεϊνών επιβίωσης, όπως για παράδειγμα είναι η hsp70 τις οποίες φαίνεται ότι τις χρειάζονται για να επιβιώσουν, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία παράγουν ελάχιστες ποσότητες της hsp70. Οι πρωτεΐνες επιβίωσης εκφράζονται συνήθως σε υψηλά ποσά στα καρκινικά κύτταρα για λόγους που ίσως να σχετίζονται με την υψηλή ικανότητα αυτών προς επιβίωση. Άρα, ρυθμίζοντας αρνητικά αυτές τις πρωτεΐνες μειώνουμε την ικανότητα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και αυτό μεταφράζεται σε αύξηση της ευαισθησίας τους όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε αποπτωτικούς παράγοντες (φυσικούς, χημικούς ή βιολογικούς) ή φάρμακα.

Αυτό σημαίνει ότι μπορούμε να βρούμε συνθήκες τέτοιες που να ωθούμε κατά προτεραιότητα τα καρκινικά κύτταρα στον θάνατο. Από την άλλη πλευρά κύτταρα ή πειραματόζωα στα οποία έχουμε μεταφέρει μία από τις πρωτεΐνες επιβίωσης, όπως για παράδειγμα την hsp70, θα πρέπει να παρουσιάζουν μία αυξημένη τάση προς επιβίωση και ίσως τάση προς ογκογενετικότητα. Άρα, λοιπόν σε όποια κύτταρα μειώσουμε κάποιες από τις πρωτεΐνες επιβίωσης τότε αναμένουμε να στείλουμε τα κύτταρα αυτά μαζί προς τον θάνατο ευκολότερα από τα φυσιολογικά κύτταρα.

1.7.Ο ρόλος των HSPs σε ισχαιμικές, φλεγμονώδεις καταστάσεις και στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Οι πολλαπλές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν εκτείνονται από την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση μέχρι τη λειτουργικότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και τον κυτταρικό κύκλο, ενώ φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ισχαιμικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις, στην ανοσολογική απάντηση, φαρμακευτική αντίσταση και πρόγνωση των νεοπλασμάτων.

- **Ισχαιμία μυοκαρδίου**

Η ισχαιμία του μυοκαρδίου έχει ως συνέπεια σοβαρό stress στα μυϊκά κύτταρα λόγω της προκαλούμενης ανοξίας, ελάττωσης της ATP και της γλυκόζης, αύξησης της εισροής ιόντων ασβεστίου, ελάττωσης του pH και συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών. Μερικές από αυτές τις διαταραχές έχουν ως συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης των Hsp, ώστε τα κύτταρα να προσπαθήσουν να επανορθώσουν και να περιορίσουν τις προκαλούμενες μοριακές αλλοιώσεις.

Η άποψη αυτή ενισχύεται από πειραματικές μελέτες στις οποίες η αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος στους 42° C για 15 min προ της προκλήσεως ισχαιμίας είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη προστασία του μυοκαρδίου έναντι των συνεπειών της ισχαιμίας. Παρόμοια προστατευτική δράση είχε και η πρόκληση μικρής χρονικής διάρκειας ισχαιμικών επεισοδίων πριν την επίδραση παρατεταμένης ισχαιμίας (Marber et al., 1993 Donnelly et al., 1992).

Από τις διάφορες ομάδες πρωτεϊνών Hsp στην προστασία του μυοκαρδίου έναντι της ισχαιμίας, μεγαλύτερη σημασία φαίνεται να έχει η Hsp70. Σε καλλιέργειες μυοκυττάρων καρδιάς ποντικού έχει παρατηρηθεί ότι τα μυοκύτταρα που υπερεκφράζουν την Hsp70 έχουν μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης στην επίδραση ισχαιμίας (Mestril et al., 1994). Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία είχαν διεγερθεί να παράγουν υψηλά επίπεδα Hsp70 παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη ικανότητα αντιμετώπισης προκλητών ισχαιμικών επεισοδίων χωρίς καμία επίπτωση στην γενική κατάσταση και ανάπτυξη των οργανισμών αυτών (Plumier et al., 1995).

Αν και από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα καθίσταται φανερό ότι οι αντιϊσχαιμικές ιδιότητες της Hsp70 ενδέχεται να έχουν θεραπευτικές εφαρμογές, δεν έχουν διευκρινισθεί οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η προστατευτική δράση της σε ισχαιμικές καταστάσεις. Κατά την επικρατέστερη υπόθεση η Hsp70 συμβάλλει αφ'ενός στην επαναδιάταξη των αλλοιωμένων και ανωμάτων συσσωρευμένων πρωτεϊνών και αφ' ετέρου αλληλεπιδρά με διάφορα στοιχεία του κυτταροσκελετού και εμποδίζει την καταστροφή του από την επίδραση της ισχαιμίας.

- **Φλεγμονώδεις αντιδράσεις**

Η φλεγμονώδης αντίδραση των ιστών σε περιπτώσεις κυτταρικής ή ιστικής βλάβης βασίζεται στην ενεργοποίηση του αραχιδονικού οξέος και των μεταβολιτών του, η οποία οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών της οξείας φάσης και κυτταροκινινών.

Οι πρωτεΐνες Hsp συσχετίστηκαν αρχικά με τη μεταβολική οδό του αραχιδονικού οξέος από μελέτες που έδειξαν ότι οι προσταγλανδίνες A1, A2, και J2, οι οποίες είναι μεταβολικά παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, επάγουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού shock (Santoro et al., 1989). Σε μελέτες που ακολούθησαν διευκρινίστηκε ο μηχανισμός δράσης των προσταγλανδινών στην ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής HSF1 (Amici et al., 1992).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το σαλικυλικό νάτριο και η ινδομεθακίνη, μπορούν να αυξάνουν την ικανότητα σύνδεσης του παράγοντα HSF1 με το DNA χωρίς όμως να εκλύουν πλήρη αντίδραση θερμικού stress (Juvirich et al., 1992).

Όταν όμως τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα συνδυασθούν με την επίδραση ελαφρά αυξημένης θερμοκρασίας τότε προκαλείται πλήρης ενεργοποίηση και φωσφορυλίωση του παράγοντα HSF1 και ολοκληρωμένη αντίδραση έναντι του θερμικού ερεθίσματος. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η ασπιρίνη (οξικό σαλικυλικό οξύ) όταν χορηγηθεί κατά ή μετά την επίδραση θερμικού ερεθίσματος ενισχύει το αποτέλεσμα της υπερθερμίας αυξάνοντας το χρόνο μεταγραφής του γονιδίου της Hsp70 από τον ενεργοποιημένο από τη δράση της παράγοντα HSF1 (Amici et al., 1995). Επομένως τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα μπορούν, κάτω από ορισμένες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως πυρετός, φλεγμονές και ισχαιμία, να ενισχύσουν σημαντικά τον προστατευτικό για τα κύτταρα ρόλο των πρωτεϊνών θερμικού shock, γεγονός ιδιαίτερης θεραπευτικής αξίας.

- **Καρκίνος**

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, ο καρκίνος σχετίζεται με αλλαγές στο γενετικό υλικό. Εντούτοις δεν κληρονομείται ως απλός Μενδελικός χαρακτήρας, αλλά είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Η πολυπλοκότητα της ασθένειας αυτής σχετίζεται με τα παρακάτω αίτια: 1) Ο καρκίνος σε αντίθεση με τις κληρονομικές ασθένειες, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, δεν προκαλείται από μία μετάλλαξη αλλά από τη συσσώρευση αρκετών γενετικών αλλαγών στα κύτταρα. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι αποτέλεσμα διαφορετικών περιβαλλοντικών μεταλλαξογόνων παραγόντων όπως η ακτινοβολία ή χημικές ουσίες. 2) Στη δημιουργία κάθε είδους καρκίνου συμμετέχουν συνήθως τόσο τα ογκογονίδια όσο και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέως εντέρου έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν αρκετά γονίδια και των δύο τύπων. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, ενέχουν πιθανό ενδιαφέρον για ερευνητές στο πεδίο του καρκίνου, με βάση έρευνες που έχουν δείξει ότι πειραματόζωα μπορεί να αποκρίνονται σε εμβολιασμούς έναντι του καρκίνου. Εξασθενημένα καρκινικά κύτταρα εμβολιάστηκαν σε μικρές ποσότητες σε ένα τρωκτικό, προκαλώντας ανοσία σε μελλοντικούς εμβολιασμούς με πλήρως ενεργά καρκινικά κύτταρα.

Παρόλο που δεν έχει καθιερωθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της έρευνας που διεξάγεται σε πειραματόζωα και του ανθρώπου, είναι πιθανό τα παραπάνω δεδομένα να ισχύουν και σε άλλα είδη. Ορισμένοι ερευνητές ερευνούν την χρήση των Hsps στη θεραπεία του καρκίνου. Πιθανολογείται ότι οι Hsps συμμετέχουν στη δέσμευση πρωτεϊνικών τμημάτων από νεκρά κακοήθη κύτταρα, τα οποία και παρουσιάζουν στο ανοσοποιητικό σύστημα.

1.8. Πρόκληση καρκίνου από μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Αποτελέσματα μελετών έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις καρκίνου προέρχονται από μεταλλάξεις γονιδίων σωματικών κυττάρων.

Οι κακοήθεις καρκινικοί όγκοι μπορεί να δημιουργηθούν ως αποτέλεσμα μετάλλαξης σε τρεις βασικούς τύπους κυττάρων: **τα γονίδια επιδιορθωτικού μηχανισμού του DNA, τα ογκοκατασταλτικά και τα πρωτοογκογονίδια.** Μια μετάλλαξη δεν είναι ικανή να προκαλέσει τη δημιουργία καρκίνου. Αντίθετα, πολλές μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια ενός ή περισσότερων κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση.

Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι σωματικές. Ελάχιστες μεταλλάξεις πραγματοποιούνται στα γεννητικά κύτταρα (κληρονομούμενες μορφές καρκίνου) και προκαλούν προδιάθεση ορισμένων ατόμων σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Υπάρχουν δύο τύποι γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Σχετικές έρευνες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο καρκίνος σε γενετικό επίπεδο είναι το αποτέλεσμα:

- Μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια
- Απουσίας λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και
- Αδρανοποίησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Α. ΣΥΝΟΔΕΣ και ΟΜΟ-ΣΥΝΟΔΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.

2.1 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins: Hsps) και Hsp70 πρωτεϊνικές νανομηχανές.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, αποτελούν μοριακούς συνοδούς για πρωτεϊνικά μόρια. Συνήθως είναι κυτοπλασματικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν σε ποικίλες ενδοκυτταρικές διαδικασίες. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, όπως είναι η αναδίπλωση, υποβοηθούν στην καθιέρωση της σωστής στερεοδιάταξης, στην αποτροπή της συσσώρευσης των μη επιθυμητών πρωτεϊνών και βοηθούν στην διαμεμβρανική μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο μέσω της σταθεροποίησης των μερικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

Για παράδειγμα, τα ομοιόθερμα ζώα ανάλογα με την θερμοκρασία έκθεσης επιτυγχάνουν την προσαρμογή με την συντονισμένη κινητοποίηση εκτελεστικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν μεταβολές στον ρυθμό έκκρισης διαφόρων ορμονών του αυτόνομου νευρικού συστήματος καθώς επίσης και ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυτταρικών μηχανισμών. Μεταξύ των μηχανισμών που κινητοποιούνται σε επίπεδο κυττάρου είναι και ο μηχανισμός επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων από το στρες πρωτεϊνών.

Πρόσφατες παρατηρήσεις απέδειξαν ότι κατά την διάρκεια της έκθεσης κυττάρων σε "stress" αυξάνεται το επίπεδο συσσώρευσης των λανθασμένα αναδιπλωμένων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών και αυτό θεωρείται σαν ένα σήμα για την πυροδότηση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Georgopoulos, C., et al., 1993, Beckmann, R.P., et al., 1990).

Αυτό ενισχύεται και από προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η μικροένωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών μέσα στα ωκύτταρα *Xenopus* έχει σαν αποτέλεσμα τον ερεθισμό της σύνθεσης hsps αποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών δρά σαν ένα σήμα για την επαγωγή των hsps και της στρες απάντησης (Anathan, 1986). Σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αυτόν φαίνεται ότι έχει η Hsp70 (heat shock protein 70) (Morimoto R.L., et al., 1990, Lindquist, S., et al., 1988, Sainis, I., et al., 1994).

Τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός εργασιών έδειξαν ότι η hsp70, η οποία επάγεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή ασθένειες προσδίδει στα κύτταρα αυξημένη θερμοανθεκτικότητα. Επίσης η δημιουργία διαγονιδιακού κλώνου ποντικών που υπερεκφράζουν την hsp70, έδωσε την δυνατότητα για την διευκρίνιση της προστατευτικής λειτουργίας της hsp70 στο επίπεδο του οργανισμού.

Πρωτογενείς καλλιέργειες από έμβρυα 10 ημερών των διαγονιδιακών ποντικών, έδειξαν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα (Angelidis, Ch. et al., 1991). Επίσης αποδείχθηκε (συνεργασία Angelidis, C., et al., 1996 με Dr. Currie, Dalhousie University, Canada) ότι το μυοκάρδιο των ποντικών αυτών προστατεύεται κατά την επανακυκλοφορία μετά από ισχαιμικό "shock" (Plumier, J-CL., et al., 1995).

Από τα προηγούμενα μπορούμε να υποθέσουμε ότι κάτω από δυσμενείς συνθήκες (stress) τα κύτταρα στρατολογούν την Hsp70, η οποία μέσα από κάποιον μηχανισμό αναστέλει τις μη αναστρέψιμες βλάβες και κατά επέκταση τον κυτταρικό θάνατο.

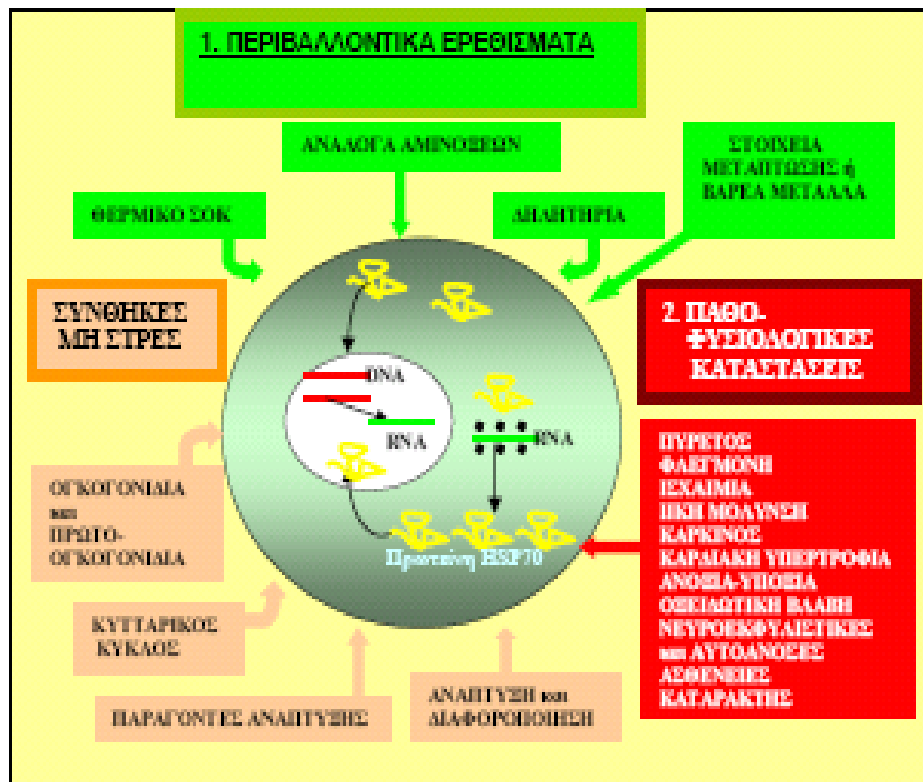
Το τελευταίο διάστημα άρχισαν να συσσωρεύονται δεδομένα σχετικά με την ανεύρεση πρωτεϊνικών παραγόντων οι οποίοι μπορούν να τροποποιούν αρνητικά ή θετικά την δράση των hsp70s. Μέχρι στιγμής δύο κατηγορίες τροποποιητών της hsp70 λειτουργίας

έχουν ανιχνευθεί.α) οι **επαγωγείς** των πρωτεϊνικών συνοδών (chaperones). Τέτοιοι παράγοντες είναι η Hίρ,η οποία ερεθίζει την hsp70 ενεργότητα σαν πρωτεϊνικού συνοδού και την συγκρότηση της hsp70 σε μακρομοριακά συμπλέγματα που περιέχουν chaperones και η Hdj-1 (Hsp40) η οποία ερεθίζει την ATPase ενεργότητα της hsp70(Freeman et al., 1995, Hohfeld et al., 1995).

β) Οι **αναστολείς** των πρωτεϊνικών συνοδών. Τέτοιος παράγοντας είναι η BAG-1 η οποία αρχικά χαρακτηρίστηκε σαν ρυθμιστής της Bcl-2 εξαρτώμενης απόπτωσης και τώρα σαν αρνητικός ρυθμιστής του Hsp70/HdJ-1 κύκλου ενεργότητας.

Πρόσφατα επίσης έχει αποδειχθεί ότι πρωτεϊνικοί παράγοντες, όπως μέλη της DnaJ οικογένειας και η Hίρ, Hor και Har (Cyr, et al., 1994, Hohfeld, et al., 1995, Gebaver, et al., 1997), ρυθμίζουν την μορφή σύνδεσης των hsp70s καταλύοντας την μετάπτωση από ATP-hsp70 σε ADP-hsp70.

Τρεις πρωτεΐνες που ανήκουν στην hsp40 (DnaJ) οικογένεια έχουν βρεθεί στο κυτταρόπλασμα των θηλαστικών, η HSJ-1 (Cheetham, et al., 1992)ή hdJ-1 ή hsp40(Ohtsuka, et al., 1993) και η hdJ-2(Oh, et al., 1993, Bozidis, P., et al., 1998).



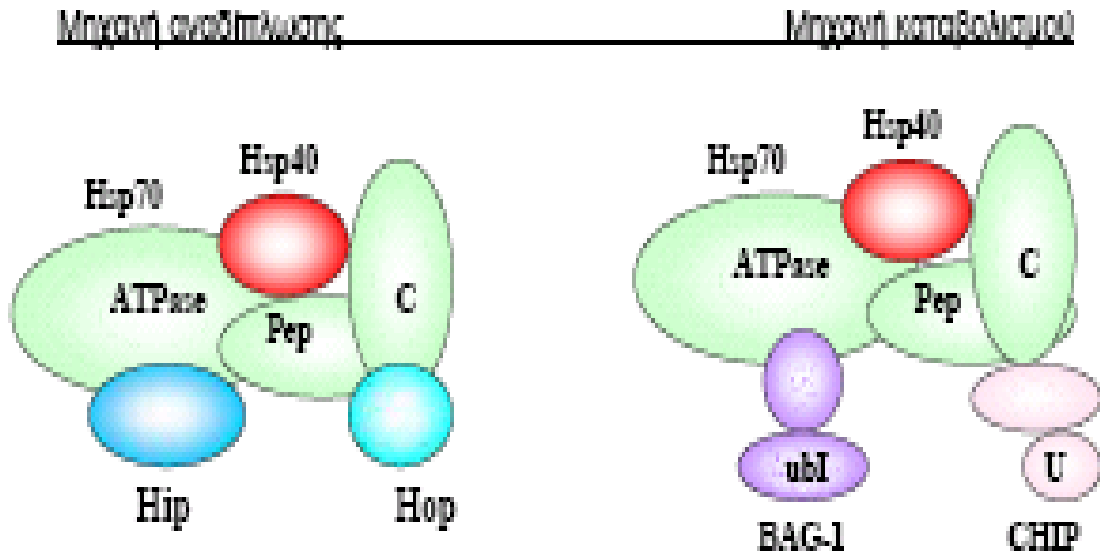
Εικόνα 3 Παράγοντες που προκαλούν την επαγωγή του κύριου μέλους Hsp70 των πρωτεϊνών θερμικού shock (Hsps: heat shock proteins)

Ομως παρά την πληθώρα των εργασιών που αναφέρονται στην συνεργιστική δράση των chaperones (hsp70, hsc70) με τα co-chaperones (DnaJs, Hίρ, Hor, Bag-1) ακόμη δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως ποιές ομάδες chaperones /co-chaperones συνδιάζονται μεταξύ τους κάθε φορά και ο συνδιασμός αυτός ρυθμίζεται και από το είδος του υποστρώματος που είναι προς επιδιόρθωση.

Ο καθορισμός της σύστασης των μελών μιας νανομηχανής παραμένει υπό καθορισμό αυτό όμως που είναι εξακριβωμένο είναι ότι η hsp70 πρωτεΐνη δεν δρα από μόνη της. Η δράση της στηρίζεται σε δημιουργία μοριακών νανομηχανών που δημιουργούνται από συνοδές (chaperones) (Georgopoulos, C., et al., 1993) και ομοσυνοδές (co-chaperones) πρωτεΐνες (Ohtsuka, K., 1993, Bozidis, P., et al., 1998, Hohfeld, J., et al., 2001).

Η Hsp70 αποτελεί το κεντρικό συστατικό μίας νανομηχανής η οποία συμπληρώνεται και από άλλους πρωτεϊνικούς συνεργάτες όπως πρωτεΐνες της DnaJ οικογένειας (DnaJ-1 ή DnaJ-2) την Hip και την Bag-1 (Zeiner, M., et al., 1997, Takayama, S., et al., 1997, Cheetham, M.E., et al., 1994, Hohfeld, J., et al., 1995) οι οποίες και αποτελούν θετικούς ή αρνητικούς επηρεαστές της hsp70 ενεργότητας.

Επίσης κάποιοι επιπλέον παράγοντες, όπως οι πρωτεΐνες CHIP, Hop και P23 (Ballinger, CA., et al., 1999) παίζουν ρόλο στην αποδοτικότητα της hsp 70-chaperone νανομηχανής. Η μηχανή αυτή παίζει ρόλο σε πολλά και σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια όπως για παράδειγμα την πρωτεϊνική αναδίπλωση, την μεταφορά των πρωτεϊνών στους στόχους των, τον καταβολισμό κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την ρύθμιση μίας ποικιλίας μορίων μετάδοσης σημάτων (Hightower, LE., 1991, Geotopoulos, C., Welch, WJ., 1993).



Εικόνα 4. Προτεινόμενο μοντέλο για τις Hsp70 μοριακές μηχανές (Hohfeld J., et al., 2001).

Η σύνδεση διαφορετικών παραγόντων ομο-συνοδών στο N-άκρο της ATPase δομής της Hsp70(ATPase) και στο C-άκρο(C) μπορεί να δημιουργήσει συνοδές μηχανές (chaperone machines) που συμμετέχουν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση ή στον πρωτεϊνικό καταβολισμό αντίστοιχα. Οι ομοσυνοδοί παράγοντες (co-chaperones) Hip και Bag-1 ανταγωνίζονται για την σύνδεσή τους στην ATPase δομή, ενώ η Hop και η CHIP συσχετίζονται με το C-άκρο κατά έναν ανταγωνιστικό τρόπο. Κατά την διάρκεια της αναδίπλωσης και του καταβολισμού, η Hsp70 φαίνεται να συνεργάζεται με ομο-παραγόντες της Hsp40 πρωτεϊνικής οικογένειας.

Pep:Peptide binding domain, Ubl:Ubiquitin-like domain of Bag-1, U:U-box of CHIP.

Πίνακας 2. Αναστολείς(inhibitors) και διεγέρτες(inducers) των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε οικοτοξικολογικές μελέτες.

Διεγέρτες	Αναστολείς
Θερμικό σοκ	Ξενοβιοτικά όπως Fluorathene, glycerol.
Βαρέα μέταλλα (Zn, Cd, Pb, As, Cr, Ni, Ag, Se, Cu, Hg, Mg, Fe), PCBs, TMTD, Co(Carbon monoxide), κ.α.)	Παροδική απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες.
Εκπομπές αερίων	Ηλικίωση (σε επιμύες, ανθρώπους)
Αυξημένες/ χαμηλές θερμοκρασίες	Το στάδιο ανάπτυξης των οργανισμών.
Ξενοβιοτικά	Παρουσία της Κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος.
Χημειοθεραπευτικά φάρμακα	Εντομοκτόνα όπως(Cypermethrin)
Παθοφυσιολογικές καταστάσεις (πυρετός, ισχαιμία, φλεγμονή, μόλυνση, ιογενείς ή μικροβιακές, βακτηριακές λοιμώξεις, κακοήθης νεοπλασίες, υπερτροφία, σε μολυσματικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια, τρομώδη νόσο ή scrapie, ασθένεια Creutzfeld-Jakob και ασθένεια Alzheimer).	Η BAG-1 η οποία αρχικά χαρακτηρίστηκε σαν ρυθμιστής της Bcl-2 εξαρτώμενης απόπτωσης και τώρα σαν αρνητικός ρυθμιστής του Hsp70/HdJ-1 κύκλου ενεργότητας.
Έκθεση σε pro-inflammatory mediators όπως ο tumor necrosis factor (TNF), interferon-γ (INF-γ).	Βαρέα μέταλλα όπως Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺ μπορούν να θεωρηθούν ως οι ισχυρότεροι αναστολείς της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών.
Θεραπεία με μη-στεροειδή αντι-φλεγμονώδη φάρμακα.	
Οξειδωτικό στρες	
Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (lindane, endosulfan, chlordpyrifos, diazinon, carbaryl, carbamate pesticides κ.α.)	
Δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες	
Περιβαλλοντικά ρυπογόνα	
Βιομηχανικά απόβλητα	
Περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες (για υδρόβιους οργανισμούς) (pH, αλατότητα, συγκέντρωση τοξικών ουσιών, πυκνότητα)	
Γενετικοί στρεσογόνοι παράγοντες (συγγενομιξία(inbreeding), η καθήλωση επιβλαβών μεταλλάξεων(fixation of deleterious mutations), η ηλικίωση)	
Βλάβη στο DNA	
Λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Protein misfolding)	
Καταστάσεις ανοξίας ή έλλειψης γλυκόζης, Υποξίας	

Υπερθερμία	
Περιορισμός των θερμίδων(Caloric restriction), λιμός.	
Ανεπάρκεια αζώτου(φυτά), ανεπάρκεια νερού	
Παρασιτισμός	
Αποξήρανση	
Ωσμωτική ανισορροπία	
Οργανικές και ανόργανες χημικές ενώσεις	
Πολυαρωματικοί υδρογάνθρακες	
Λιπίδια	
Φυσική δραστηριότητα	
Έκθεση σε τοξίνες (αιθανόλη, αρσενικό)	
Μεταλλοθειονεΐνες	
Ξηρασία (αβιοτικός στρεσογόνος παράγοντας)	
Αυξημένη αλατότητα (αβιοτικός στρεσογόνος παράγοντας)	
Ηλικίωση	
Κυτοκινίνες, ελεύθερες ρίζες	
Οργανικά ρυπογόνα	
Όξινη βροχή	
Ρύπανση των αυτοκινήτων	
Χουμικά οξέα, τα νιτρώδη , οι φωσφατάσες, pH	
Υπεριώδη ακτινοβολία, UV	
Φυσιολογικοί παράγοντες (η ανάπτυξη των κυττάρων, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η ορμονική διέγερση/ ανάπτυξη των ιστών)	
Αστικά ρυπογόνα του αέρα (όζον, νιτρικό οξύ)	
Φυτοχημικά ρυπογόνα του αέρα	
Ανάλογα αμινοξέων	

Πίνακας 3: Μοριακοί Συνοδοί και Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ

Οι κυριότερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ οι οποίες παίζουν ρόλο μοριακής συνοδού ανήκουν στις εξής κατηγορίες: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP33 καθώς και οι sHSPs (small heat shock proteins).

Μοριακό βάρος (kDa)	Προκαρυωτικές πρωτεΐνες	Ευκαρυωτικές πρωτεΐνες	Λειτουργία
40 kDa	DnaJ	Hsp40	
60 kDa	GroEL, 60 kDa αντιγόνο	Hsp60	Εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών έπειτα από την μετα-μεταφραστική είσοδο στα μιτοχόνδρια/γλωροπλαστίδια.
70 kDa	DnaK	Η ομάδα HspA της Hsp συμπεριλαμβάνοντας την Hsp71, Hsc70, Hsp72, Grp78, BiP, Hsx70 βρίσκονται μόνο στα πρωτεύοντα.	Εμπλέκεται στην αναδίπλωση/αποδιάταξη των πρωτεϊνών, παρέχει στα κύτταρα θερμοανεκτικότητα όταν εκτίθενται σε θερμικό στρες. Αποτρέπει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών κατά την διάρκεια της μετα-μεταφραστικής εισόδου στα μιτοχόνδρια/γλωροπλαστίδια.
90 kDa	HtpG, C62,5	Η ομάδα HspC της Hsp συμπεριλαμβάνοντας την Hsp90, Grp94	Εμπλέκεται στην διατήρηση των στεροειδών υποδοχέων και των μεταγραφικών παραγόντων.
100 kDa	ClpB, ClpA, ClpX	Hsp104, Hsp110	Ανοχή σε υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 4. Heat Shock Protein Chaperone Complexes

Chaperone Family	Οργανισμός	Chaperone	Co-chaperone	Εντόπιση	Δραστηριότητα	Σχετιζόμενες ασθένειες
Hsp70	Bacterial	DnaK	DnaJ, GrpE, ClpB	Διαλυτό κυταρόπλασμα.	Πτύχωση, εξαγωγή των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων, κύριος ρυθμιστής της από- κρίσης σε θερμικό σοκ, συντονίζει την επανενεργοποίηση, τον καταβολισμό, την μη συσσώρευση της επαγόμενης μη -πτύχωσης λόγω του στρες.	Περιορίζει τον σχηματισμό της ινώδους πολυγλουταμίνης, απορύθμιση των Hsp70, συνοδεύεται από
	Mammalian	Hsc70(Hsp73), Hsp70(Hsp72)	Hsp40, Hop, Bag1-5, Hip, HspBP1, CHIP, SGT, Hsp110 homologs, Tom70, TPR1	Διαλυτό κυταρόπλασμα.	Ομοειδής μορφή (Hsp70/Hsp73) βοηθά στην ιδιοσυστατική πτύχωση και μεταφορά των πρωτεϊνών στα οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και το ενδοπλασματικό δίκτυο, η Hsp70/Hsp72 επάγεται από το θερμικό σοκ και δια-μεσολαβεί σε	ασθένειες όπως Νόσος του Alzheimer's Πολλαπλή σκλήρυνση Νόσος του Parkinson's σχιζοφρένεια,

Hsp70	Mammalia n				παρόμοιες λειτουργίες σε απόκριση σε στρες-αυξάνοντας την μη-πτύχωση και συσσώρευση των πρωτεϊνών.	Νόσος του Crohn's φυματίωση.
		Hsp110	Hsp70	Διαλυτό κυταρρόπλασμα.	Ανταποκρίνεται σε στρες, αποτρέπει την συσσώρευση των πρωτεϊνών.	
		Hsp70L1	MPP11	Διαλυτό κυταρρόπλασμα.	Mammalian homolog of yeast Ssz1, βοηθά στην πτύχωση των νέων πρωτεϊνών στο ριβόσωμα.	
		Bip/Grp78	DnaJ-like ER proteins (e.g., Grp170, Sil1/Sls1)	Ενδοπλασματικό δίκτυο(ER)	Περιορίζει την πτύχωση και την μετατόπιση, σχετίζεται με την ομοιόσταση του Ca ²⁺ , την μετατόπιση, την πτύχωση, την μεταφορά και την ρετρομετατόπιση των πολυπεπτιδίων, ρυθμιστής της απόκρισης των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών.	
		mtHsp70(Grp75/Mortalin)		Μιτοχόνδρια	Πρωτεϊνική στερεοδιάταξη και στην μετατόπιση στα μιτοχόνδρια.	

B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

2.2 Απόπτωση και Νέκρωση

Η **απόπτωση** και η **νέκρωση** αποτελούν δύο τρόπους κυτταρικού θανάτου με διαφορετικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά.

Η απόπτωση είναι μία ενεργή πορεία που χαρακτηρίζεται από κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνική και κυτταροπλασματική συμπύκνωση, τεμαχιοποίηση της χρωματίνης και φαγοκύτωση. Η πυρηνική συμπύκνωση συνήθως συνοδεύεται από ενεργοποίηση νουκλεασών οι οποίες σε πρώτη φάση καταβολίζουν το χρωμοσωμικό DNA σε μεγάλες υπομονάδες των 50-300 kb και στην συνέχεια σε μικρότερες μονάδες των 180 περίπου ζεύγη βάσεων.

Σε αντίθεση η νέκρωση αποτελεί έναν παθητικό τύπο κυτταρικού θανάτου που σχετίζεται με ερεθισμό που προέρχεται από κυτταρικό ή οργανιδιακό πρήξιμο, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και άδειασμα του κυτταρικού χυμού σε εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Η απόπτωση είναι μια έμφυτη και αναπτυξιακά συντηρημένη διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα κατά συστηματικό τρόπο αδρανοποιούν και αποσυγκροτούν τα δομικά και λειτουργικά τους συστατικά για να επιφέρουν τον θάνατό τους.

Η απόπτωση γίνεται φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των πολυκυττάρων οργανισμών δια μέσου ενός γενετικά ρυθμιζόμενου προγράμματος ή κατά την διάρκεια μιας ανοσοποιητικής απάντησης όταν ανεπιθύμητα ή μολυσμένα κύτταρα απομακρύνονται κατά επιλεκτικό τρόπο.

Ο όρος της απόπτωσης χρησιμοποιείται για να περιγράψει έναν θάνατο επιθυμητό ή προγραμματισμένο ο οποίος παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ο κυτταρικός θάνατος πραγματοποιείται σε κάποιο σημείο της μέγιστης διάρκειας ζωής του οργανισμού και αναπαριστά την τελευταία απόφαση διαφοροποίησης του κυττάρου.

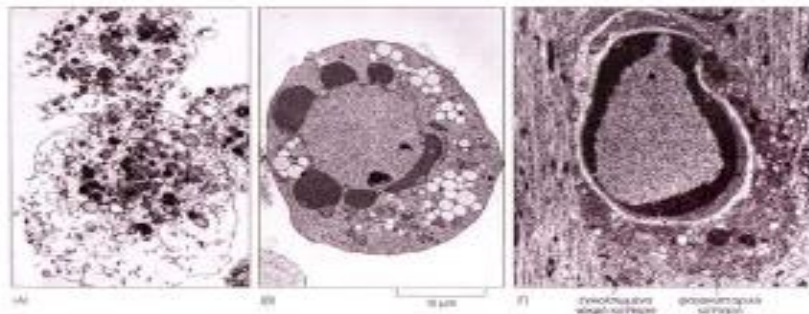
Η απόφαση αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό η ομοιόσταση των ιστών του στηρίζεται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Kerr et al., 1972, Nagata et al., 1997).

Η απόπτωση μπορεί να διαιρεθεί σε τρία ξεχωριστά στάδια:

α) **Την δέσμευση.** Κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού ένα κύτταρο λαμβάνει ένα αποπτωτικό ερέθισμα και γίνεται αμετάκλητα δεσμευμένο με τον θάνατο.

β) **Την εκτέλεση.** Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει γρήγορες αλλαγές μέσα στο κύτταρο συμπεριλαμβανομένων της συμπύκνωσης της χρωματίνης, της συρρίκνωσης του κυτταροπλάσματος, την κυστοποίηση της μεμβράνης, τον τεμαχισμό του πυρήνα και την δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων. Αυτές οι αλλαγές είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ποικίλων ενζύμων (πρωτεάσες, λιπάσες και νουκλεάσες) δια μέσου ενός συνεργαζόμενου δικτύου σηματοδοτούντων οδών.

γ) **Το καθάρισμα ή την απομάκρυνση.** Περιλαμβάνει την φαγοκύτωση και την αποικοδόμηση των αποπτωτικών σωματιδίων από τα μακροφάγα ή τα γειτονικά κύτταρα. Όταν ένα κύτταρο αποφασίζει να ακολουθήσει την αποπτωτική πορεία λόγω οποιουδήποτε επιβλαβούς ή μη ερεθισμού, ένα ή περισσότερα παράλληλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways) ξεκινούν και καταλήγουν σε ένα κοινό μονοπάτι θανάτου που είναι είτε στο μιτοχονδριακό επίπεδο με την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (X.Liu et al., 1996, Bossy-Wetzel et al., 1998), είτε στο επίπεδο ενεργοποίησης ειδικών πρωτεασών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις κασπάσες (Alnemri, 1996). Ενεργές κασπάσες μπορούν να κόψουν έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 5: Νέκρωση(A): Το κύτταρο έχει εκραγεί.(B) Το κύτταρο έχει συμπυκνωθεί.(Γ) Το κύτταρο ενός ιστού πέθανε και εγκοιλώθηκε από ένα γειτονικό κύτταρο.

Το κόψιμο πρωτεϊνών από τις κασπάσες συχνά αναστέλει την λειτουργία των υποστρωμάτων. Όμως μερικά ένζυμα όπως για παράδειγμα η πρωτεϊνική κινάση δ (PKCδ)(Ghayur et al., 1996), MEKK1 (Cardone et al.,1997), ο παράγοντας κατατεμαχισμού DNA (Liu et al., 1997), οι κινάσες PITSLRE (Beyaer et al., 1997) , η p21 ενεργοποιούμενη κινάση hPAK65 (Lee et al., 1997), η Mst1 κινάση (Graves, 1998) και η κυτοσολική φωσφολιπάση A2 (cPLA2)(Wissing et al., 1997), ενεργοποιούνται από τις κασπάσες άμεσα μετά το κόψιμο από το ενζύμο ή έμμεσα μέσω ενεργοποίησης/αδρανοποίησης ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Αυτά και πιθανόν και άλλα άγνωστα ακόμη ένζυμα που ενεργοποιούνται από τις κασπάσες θα μπορούσαν να είναι οι καθοδικοί επηρεαστές της απόπτωσης, των οποίων η ενεργοποίηση μπορεί να προκαλέσει την τυπική αποπτωτική μορφολογία όπως την κυστοποίηση της μεμβράνης, την πυρηνική συμύκνωση και την κυτταρική συρρίκνωση.

Όταν αναφερόμαστε στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο-PCD- τότε εννοούμε την φυσιολογική εκείνη πορεία μέσω της οποίας τα εμπύρηννα ευκαρυωτικά κύτταρα αυτοκαταστρέφονται όταν δεν χρειάζονται περαιτέρω ή όταν έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες.

Η πορεία αυτή συχνά αναφέρεται σαν απόπτωση και χρησιμοποιείται στην βιβλιογραφία για όλες τις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που γίνονται κατά την διάρκεια του PCD. Όμως αλλαγές στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο γίνονται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις τέτοιες όπως ο καρκίνος, οι μολύνσεις και η χρόνια φλεγμονή (Core et al., 1991, Zyclinsky et al., 1992). Επιπρόσθετα, το αποπτωτικό πρόγραμμα μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απάντηση συνθηκών "stress" όπως του θερμικού σοκ, της ιονίζουσας ακτινοβολίας, της υποξίας, των οξειδωτικών, της αιθανόλης και των βαρέων μετάλλων (Dyson, J.E., 1986, Ohyama, H., 1985, Lennon, S.Y., 1991, Allan, D.J., 1986) ή σε επίδραση διαφόρων αντιδραστηρίων όπως είναι τα διάφορα χημειοθεραπευτικά αντιδραστήρια (Arends et al., 1991) ή από την στέρηση διαφόρων ενδογενών ουσιών όπως είναι οι λεμφοκίνες(Cohen et al., 1992).

2.3 Ρύθμιση της απόπτωσης

Η ρύθμιση της απόπτωσης περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό από γονίδια τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες :

A) Γονίδια που καταστέλουν την απόπτωση, όπως κάποια από τα μέλη της bcl-2 οικογένειας (bcl-2, bcl-xL), mcl-1, A1, ced-9, οι ιϊκές πρωτεΐνες BHRF-1 και μέλη της hsp70 οικογένειας (hsp70).

B) Γονίδια τα οποία δρουν σαν δράστες της απόπτωσης, όπως η ICE: (Interleukin-1 β Converting Enzyme) οικογένεια, μέλη της bcl-2 οικογένειας (bcl-xs, bax. και bak).

Γ) Γονίδια ενδιάμεσα, τέτοια όπως Fas/Fas ligand, p53, myc και W AF 1. Τα Fas/Fas ligand γονίδια εκτελούν κρίσιμες λειτουργίες σε αποπτωτικά δεδομένα απαραίτητα για την ανάπτυξη, λειτουργία και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Μεταγραφικοί παράγοντες όπως, myc fos, jun και p53 συσχετίζονται καθαρά με τον πολλαπλασιασμό αλλά είναι ταυτόχρονα σπουδαία και στην απόπτωση.

2.4 HSP70 και απόπτωση

Η απόπτωση είναι μία έμφυτη και αναπτυξιακά συντηρημένη διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα κατά συστηματικό τρόπο αδρανοποιούν και αποσυγκροτούν τα δομικά και λειτουργικά τους συστατικά για να επιφέρουν τον θάνατό τους.

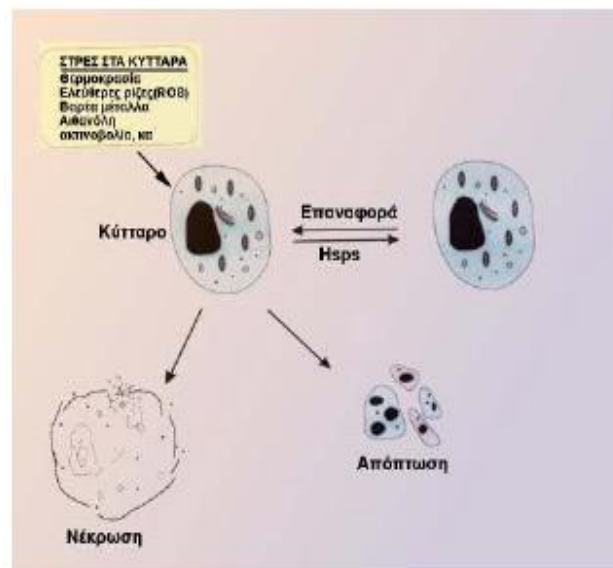
Η απόπτωση γίνεται φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των πολυκυττάρων οργανισμών δια μέσου ενός γενετικά ρυθμιζόμενου προγράμματος ή κατά την διάρκεια μιας ανοσοποιητικής απάντησης όταν ανεπιθύμητα ή μολυσμένα κύτταρα απομακρύνονται κατά επιλεκτικό τρόπο.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η hsp70, αποτελεί μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη. Επίσης πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η hsp 70 καθιστά τα κύτταρα πολύ ανθεκτικά στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τον TNF, τα μονοκύτταρα, το κεραμίδιο, την UV ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες, την υπερέκφραση της κασπάσης-3, και αρκετά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Jaatella M., et al., 1992, Mosser D., et al., 1997, Jaatella M., et al., 1998, Karlseder, J., et al., 1996).

Αν σταθούμε στην περίπτωση της προστασίας των κυττάρων από την hsp70 ενάντια στο θερμικό σοκ (Angelidis CE, et al., 1991) μπορούμε να πούμε ότι η δράση της μπορεί να οφείλεται κυρίως στην λειτουργία της σαν πρωτεϊνικός "συνοδός (chaperone) μειώνοντας την καταστροφή των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Προς αυτήν την κατεύθυνση συμπορεύεται και μία πρόσφατη εργασία που υποδεικνύει ότι η αντι-αποπτωτική δράση της hsp70 γίνεται μέσω της «chaperone» ενεργότητάς της (Mosser, D., et al., 2000).

Βέβαια είναι γνωστό ότι η hsp70 ενεργότητα δεν στηρίζεται μόνο στην hsp70 πρωτεΐνη. Η hsp70 αποτελεί το κεντρικό συστατικό μίας "chaperone" μηχανής (συνοδός μηχανή) η οποία συμπληρώνεται και από άλλους πρωτεϊνικούς συνεργάτες όπως πρωτεΐνες της DnaJ οικογένειας (DnaJ -1 ή DnaJ-2) την HIP και την Bag-1 (Takayama, S., et al., 1997, Cheetham, M.E. et al., 1994, Hohfeld, J., et al., 1995) οι οποίες και αποτελούν θετικούς ή αρνητικούς επηρεαστές της hsp70 ενεργότητας.

Επίσης, κάποιοι επιπλέον παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες CHIP, Hop και P23 (Ballinger, CA., et al., 1999) παίζουν ρόλο στην αποδοτικότητα της hsp70-chaperone μηχανής.



Εικόνα 6: Απεικόνιση της επιλογής ενός κυττάρου προς επιβίωση απόπτωση ή νέκρωση.

Η μηχανή αυτή παίζει ρόλο σε πολλά και σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια όπως για παράδειγμα την πρωτεϊνική αναδίπλωση, την μεταφορά των πρωτεϊνών στους στόχους των, τον καταβολισμό κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την ρύθμιση μίας ποικιλίας μορίων μετάδοσης σημάτων (Hightower, LE., 1991, Welch, WJ., 1993, Hartl, F-U, 1996).

Τέλος, ανεξάρτητα από τις πολλές εργαστηριακές μελέτες που αφορούν τις προστατευτικές λειτουργίες των hsps, οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους οι Hsps τροποποιούν αρνητικά την αποπτωτική διαδικασία δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως.

Το ίδιο ισχύει και για την υπερέκφραση και τον τρόπο δράσης της hsp70 στα καρκινικά κύτταρα (Jaattella, M., et al., 1992) που θεωρείται ότι προσδίδει σε αυτά αντίσταση στην απόπτωση. Ο ρόλος της hsp70 στην προώθηση του καρκίνου καθώς και των μοριακών μηχανισμών της δράσης της είναι από τα πιο προσφιλή θέματα των τελευταίων χρόνων.

Η προώθηση σε αυτό το τελευταίο στάδιο δημιουργείται από συσσωρευμένες αλλαγές οι οποίες καθιστούν τα κύτταρα του όγκου πιο κινητικά και διεισδυτικά καθώς επίσης ανθεκτικότερα στην απόπτωση. Αυτό ακριβώς το εύρημα της αναστολής της απόπτωσης μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας σημαντικός μηχανισμός της έναρξης του καρκίνου .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η επαγωγή της Hsp70 σε σχέση με την ηλικία

3.1 Μελέτη των επιπέδων της Hsp70 σε ορό και λεμφοκύτταρα.

Όπως αναφέραμε και νωρίτερα, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παίζουν πολύ σπουδαίο ρόλο σε φυσιολογικές (ανάπτυξη, ηλικίωση) και παθολογικές διαδικασίες (πυρετός, μόλυνση, ισχαιμία) όπως επίσης και στην χρήση τους ως βιοδείκτες προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος της προσβολής ή ο βαθμός επίδρασης λόγω της έκθεσης των οργανισμών σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες.

Στους ανθρώπους, η ηλικίωση συχνά συνδέεται με την αυξανόμενη συχνότητα των μολύνσεων, την νοσηρότητα και την θνησιμότητα (Jones et al., 1982, Lithgow & Kirkwood, 1996) ενώ ακόμη η ηλικία και το φύλο αποτελούν σημαντικοί παράγοντες για την αξιολόγηση των ασθενειών. Ωστόσο, η ηλικίωση συνοδεύεται από την αποσύνθεση των αυτοαμυντικών μηχανισμών του οργανισμού και από την συσσώρευση βλαβών σε μοριακό, κυτταρικό και σε οργανικό επίπεδο ως αποτέλεσμα της συνεχούς έκθεσης σε δυσμενείς περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες (Sherman & Goldberg, 2001, Söti & Csermely, 2002).

Η μελέτη σε 327 υγιείς, άνδρες εθελοντές της Κεντρικής Κίνας ηλικίας 15 και 50 χρόνων έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, hsp70 στον ορό συνδέονται θετικά με την ηλικία των ατόμων μεταξύ 15 και 30 χρόνων ενώ αντίθετα αρνητικά συνδέονται με την ηλικία των ατόμων μεταξύ 30 και 50 χρόνων. Δηλαδή, τα επίπεδα της hsp70 σε δείγμα ορού ήταν μεγαλύτερα σε άτομα ηλικίας μεταξύ 25-30 χρόνων σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικίες των ατόμων.

Συνοπτικά θα λέγαμε,ότι σε ασθενείς με μεγάλη ηλικία με ασθένειες που επάγονται από οξύ θερμικό σοκ παρατηρήθηκε να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης hsp70 σε σύγκριση με ασθενείς σε νεαρή ηλικία. Αντίθετα, αυξημένα ήταν τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 σε ορό ασθενών που είχαν υποστεί κάποιο σοβαρό τραύμα.

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 εξετάστηκαν στα λεμφοκύτταρα ατόμων μιας άλλης ομάδας που περιείχε 80 άτομα ηλικίας μεταξύ 40 και 77 χρόνων και αναλύθηκε η σχέση των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 με την ηλικία και το φύλο των ατόμων (Bonassi & Au, 2002). Η μελέτη έδειξε ότι υπάρχει σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 στα άτομα ηλικίας μεταξύ 40 και 77 χρόνων καθώς και όσο αυξάνεται η ηλικία, με αποτέλεσμα στην περίπτωση αυτή τα επίπεδα της hsp70 να συνδέονται με την ηλικία αλλά όχι με το φύλο του ατόμου.Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν από την πιθανή λειτουργία και των ρόλων της πρωτεΐνης hsp70, ιδιαίτερα στην προστασία των κυττάρων ενάντια σε στρεσογόνους παράγοντες (Angelidis et al., 1991, Li et al., 1991, Plumier et al., 1995, 1997).

Ωστόσο, θεωρείται ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της ηλικίωσης επειδή μερικά απο τα ισχυρότερα γονίδια που επηρεάζουν την ηλικίωση και την μακροζωία είναι γονίδια που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της σωματικής διατήρησης και επιδιόρθωσης, όπως είναι η απάντηση σε στρεσογόνο παράγοντα (Lithgow & Kirkwood, 1996).

Ο ακριβής μηχανισμός από τον οποίο η hsp70 μπορεί να απελευθερωθεί σε ορό είναι ακόμη άγνωστος. Έτσι, ορισμένες πρωτεΐνες μπορούν να απελευθερώνονται σε κύτταρα που έχουν υποστεί στρες, και αυτές οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ να μπορούν να απορροφούνται από γειτονικά κύτταρα (Hightower & Guidon, 1989).

Συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ποικιλομορφία των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 σε ορό και σε λεμφοκύτταρα μεταξύ ατόμων διαφορετικής ηλικίας αλλά και μεταξύ ατόμων της ίδιας ηλικίας, θεωρώντας ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 σε ορό και σε λεμφοκύτταρα μπορεί να συνδέονται με την ηλικία και την ηλικίωση.

- **Τα επίπεδα της Hsp70 σε ορό ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία.**

Ο ορός των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και τα αντισώματα αυτών χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες,όπως επίσης και ως δείκτες για περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες (Wu et al., 1998,2001b, Xu et al., 1999,Pittet et al., 2002).

Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 ήταν υψηλότερα σε άτομα ηλικίας μεταξύ 25-30 χρόνων και χαμηλότερα σε άτομα ηλικίας μεταξύ 45-50 χρόνων. Επιπλέον, υπήρξε μια μικρή μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 σε άτομα ηλικίας 30-34, 35-39 χρόνων σε σύγκριση με άτομα ηλικίας 25-29 χρόνων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Hsp70 διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία των ατόμων.

- **Τα επίπεδα της Hsp70 στα λεμφοκύτταρα μειώνονται με την ηλικία**

Η έκφραση των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αποτελεί κριτήριο για την μελέτη του ανθρώπινου στρες.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 ήταν υψηλότερα στα άτομα ηλικίας 40-49 χρόνων, μειώθηκαν στα άτομα 50 -54 χρόνων ενώ αντίθετα ήταν χαμηλότερα στα άτομα πάνω από 60 χρόνων.

Αν και υπήρξε ποικιλομορφία των επιπέδων της πρωτεΐνης hsp70 στα λεμφοκύτταρα ατόμων της ίδιας ηλικίας, της ίδιας ομάδας αλλά και μεταξύ διαφορετικών ομάδων, παρόλ' αυτά υπάρχει τάση για μείωση των επιπέδων στα ηλικιωμένα άτομα.

Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρατηρήθηκε στα νεαρής ηλικίας άτομα, ενώ η χαμηλότερη παρατηρήθηκε στα μεγαλύτερης ηλικία άτομα.

Ωστόσο, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των φύλων των ατόμων που εξετάστηκαν.

3.2 Η ηλικίωση μειώνει την έκφραση της hsp70 στο συκώτι έπειτα από θερμικό στρες.

Η ηλικίωση μειώνει την ικανότητα και την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στο συκώτι έπειτα από θερμικό στρες. Μειωμένη ικανότητα του οργανισμού να ανταπεξέλθει σε στρεσογόνο παράγοντα, μέσω της έντονης απάντησης της έκφρασης των πρωτεϊνών μπορεί να συμβάλλει στην μη ανεκτικότητα του σε στρεσογόνο παράγοντα σε σχέση με την ηλικία. Σκοπός δηλαδή είναι ο καθορισμός των επιδράσεων της έκθεσης σε επαναλαμβανόμενο θερμικό στρες στους ρυθμούς θνησιμότητας και της συσσώρευσης της 70-kDa πρωτεΐνης θερμικού σοκ (hsp70) σε επιμύες νεαρής και μεγάλης ηλικίας.

Σε μελέτη που έγινε σε δυο διαφορετικές ομάδες επίμυων είδους Fisher 344, νεαρής ηλικίας 6 μηνών και μεγαλύτερης ηλικίας 24 μηνών ερευνήθηκε η επίδραση της ηλικίας σε σχέση με την ανοχή του οργανισμού σε στρες καθώς επίσης και η ικανότητά του να συνθέτει την 70-kDa πρωτεΐνη όταν αυτά εκτείνονται σε περιβαλλοντικό θερμικό στρες.

Η έρευνα αυτή εστιάστηκε στο ήπαρ εξαιτίας της ευαισθησίας του στο θερμικό στρες (Flanagan SW. et al., 1995, Hall DM. et al., 2000), καθώς αποτελεί κύριο στόχο όταν οι ιστοί υποστούν βλάβη σε φυσιολογικές προκλήσεις όπως για παράδειγμα είναι η θερμοπληξία (Kew M et al., 1970, Moseley PL & Gisolfi CV, 1993).

Παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή της 70-kDa πρωτεΐνης θερμικού σοκ (hsp70) στο κυτόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων μειωνόταν σημαντικά με την ηλικία σε πολλά σημεία κατά την 48ωρη περίοδο ανάκτησης, αν και οι μεγαλύτερης ηλικίας επιμύες παρουσίαζαν χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (hsp70) κατά την περίοδο αυτή, καθώς η βλάβη εστιάστηκε εκτενέστερα στο ήπαρ, η οποία συντέλεσε στην ελάττωση της απόκρισης της hsp70 καθώς και στην ελάττωση της ικανότητας για επιβίωση έπειτα από έκθεση σε θερμικό στρες σε σύγκριση με τους νεαρότερης ηλικίας επιμύες.

Η διαδικασία της ηλικίωσης συνδέεται άμεσα με αυξημένους ρυθμούς νοσηρότητας και θνησιμότητας κατά την έκθεση των οργανισμών σε θερμικό στρες (Henschel M. Et al., 1969, Kregel KC. et al., 1990, Semenza JC. et al., 1996), καθώς και με μειωμένη ανεκτικότητα σε αυτό με την πάροδο της ηλικίας.

Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα θανάτων που σημειώθηκαν σε επιμύες μεγάλης ηλικίας που εκτέθηκαν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε θερμικό στρες (Henschel M. Et al., 1969, Semenza JC. et al., 1996). Μόνο το 60% των επιμύων μεγαλύτερης ηλικίας επέζησαν έπειτα από έκθεση σε θερμικό στρες. Αντίθετα, η βλάβη στο ήπαρ ήταν ιδιαίτερα μειωμένη στους επιμύες νεότερης ηλικίας.

Οι επιμύες της νεότερης ηλικίας ανταποκρίθηκαν στην έκθεσή τους σε θερμικό σοκ με εύρωστη την πυρηνική και κυτοπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, η οποία διατηρήθηκε για διάρκεια 48 ωρών στα ηπατοκύτταρα που βρίσκονται περιφερειακά στην κεντρική φλέβα.

Επιπλέον, το μέγεθος της έκφρασης της μοριακής συνοδού hsc70 ήταν χαμηλότερο και με μικρότερη διάρκεια στους νεότερης ηλικίας επιμύες. Με την ηλικίωση, η πυρηνική και κυτοπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 καθυστερείται και μειώνεται ενώ οι μεγαλύτερης ηλικίας επιμύες προσπαθούν να αντισταθμίσουν την έλλειψη της έκφρασης της hsp70 αυξάνοντας στο κυτόπλασμα την έκφραση της μοριακής συνοδού στην περιοχή της κεντρικής φλέβας.

Συνεπώς, καταλήγουμε πρώτον στο συμπέρασμα ότι οι μεγάλης ηλικίας επιμύες είναι λιγότερο θερμοανεκτικοί και έχουν αυξημένους ρυθμούς θνησιμότητας σε σχέση με τους νεαρότερης ηλικίας επιμύες όταν εκτίθενται σε επαναλαμβανόμενο θερμικό στρες. Και δεύτερον ότι η επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης σε ιστούς που έχουν υποστεί την μεγαλύτερη κυτταρική βλάβη από την έκθεσή τους σε στρεσογόνους παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα η υπερθερμία.

3.2.1 Αυξημένη ηπατική βλάβη με την ηλικία.

Η βλάβη που παρατηρήθηκε στους επιμύες μεγαλύτερης ηλικίας έπειτα από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ δείχνει ότι το ήπαρ δεν αντέχει σε επαναλαμβανόμενο θερμικό στρες, λόγω της ανικανότητας των μεγαλύτερης ηλικίας επιμύων να παράγουν επαρκή πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι οι πρώτες πρωτεΐνες που παράγονται από το ήπαρ σε απάντηση στο αιμορραγικό σοκ (Buchman TG et al., 1989). Επίσης πρόσφατα παρατηρήθηκε πως ο περιορισμός των θερμίδων για μεγάλο χρονικό διάστημα μειώνει την βλάβη στα κύτταρα και βελτιώνει την θερμική ανοχή στους επιμύες μεγαλύτερης ηλικίας, μειώνοντας την παραγωγή ενεργού οξυγόνου και διατηρώντας την ικανότητα των κυττάρων να προσαρμόζονται σε στρεσογόνους παράγοντες μέσω της επαγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων (Hall DM. et al., 2000). Η θνησιμότητα στους μεγαλύτερης ηλικίας επιμύες αποδεικνύει ότι η διατήρηση της λειτουργίας του ήπατος καθορίζει την επιβίωση του οργανισμού. Για παράδειγμα, δεδομένα στους ανθρώπους αποδεικνύουν ότι ο θάνατος από θερμοπληξία (heat stroke) σε ασθενείς συνδέεται άμεσα με την δυσλειτουργία του ήπατος και την πρόκληση ενδοαγγειακής θρόμβωσης (Kew M et al., 1970).

3.2.2 Η επαγωγή της HSP70

Μελέτες έχουν δείξει ότι μεγάλης ηλικίας ευκαρυωτικοί οργανισμοί παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα να παράγουν πρωτεΐνες θερμικού σοκ σε απάντηση σε έκθεσή τους σε στρεσογόνους παράγοντες (Blake MJ et al., 1991, Kregel KC. et al., 1995). Αυτά τα ευρήματα προτείνουν μια πιθανή εξήγηση σχετικά με την μειωμένη θερμική ανοχή που παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς μεγαλύτερης ηλικίας (Henschel M. Et al., 1969, Semenza JC. et al., 1996). Μολονότι, η έλλειψη της απόκρισης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ μπορεί να ερμηνευτεί με την ανικανότητα να παράγουν και να συσσωρεύσουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, η οποία σχετίζεται άμεσα με την ηλικία.

Στο εργαστήριο αποδείχτηκε πρόσφατα ότι όταν η άσκηση συνδυάζεται με την απόκριση σε ερέθισμα, οι επιμύες μεγαλύτερης ηλικίας παράγουν το ίδιο μέγεθος έκφρασης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 όπως συμβαίνει επίσης και στους επιμύες νεότερης ηλικίας (Kregel KC&Moseley PL,1996). Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι η ηλικίωση μειώνει αλλά δεν εξαλείφει την ικανότητα των κυττάρων να εκφράσουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ σε απάντηση σε έκθεσή τους σε περιβαλλοντικό στρεσογόνο παράγοντα και επιπλέον, προτείνεται ότι η ηλικίωση συντελεί σε σημαντικές μεταβολές στο είδος ή στην ένταση του στρεσογόνου παράγοντα που απαιτείται για την συσσώρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Η συσσώρευση της επαγόμενης πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, η οποία έχει συνδεθεί με την ανοχή σε ποικιλία από στρεσογόνους παράγοντες, όπως είναι η υπερθερμία (Li GC,1985), το οξειδωτικό στρες Polla BS et al., 1996), η ισχαιμία (Marbet MS et al., 1995), και η έκθεση σε κυτοκίνες πχ tumor necrosis factor-α (TNF-α) (Jööttelö M &Wissing D. 1993), περιγράφεται να έχει μειωμένο ρυθμό επαγωγής με την ηλικία (Blake MJ et al., 1991, Kregel KC. et al., 1995).

Η έκφραση της θερμικού σοκ μοριακού συνοδού hsc70 αποκρίνεται σε ποικιλία κυτταρικών σημάτων, όπως είναι οι παράγοντες ορού και η ιογενής ενεργοποίηση, και χρησιμοποιείται ως μοριακός συνοδός στον σχηματισμό των πρωτεϊνών και στην ενδοκυτταρική μεταφορά των μεμβρανών (Welch WJ, 1992).

Ωστόσο, λίγες είναι οι μελέτες που έχουν άμεσα εξετάσει την ρύθμιση και την παραγωγή της θερμικού σοκ μοριακού συνοδού hsc70 σε επιμύες μεγαλύτερης ηλικίας σε κανονικές και στρεσογόνες συνθήκες. Στα κύτταρα επιμύων μεγαλύτερης ηλικίας, υπάρχει αυξημένη συσσώρευση των αποδιατεταγμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών. Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις είναι ορθό να πάρουμε σαν δεδομένο ότι η έκφραση της θερμικού σοκ μοριακού συνοδού hsc70 σε κανονικές και στρεσογόνες συνθήκες μπορεί να μεταβληθούν με την ηλικία του οργανισμού μέσω της συσσώρευσης αυτών των τροποποιημένων και αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών. Ακόμη βοηθά στην προστασία των κυττάρων κατά την διάρκεια συνθηκών όπως είναι το ισχυρό στρες και η μειωμένη έκφραση της hsp70 στα κύτταρα.

Η έκφραση της θερμικού σοκ μοριακού συνοδού hsc70 στην παρούσα μελέτη υποστηρίζει αυτήν την απαίτηση. Στους νεότερης ηλικίας επιμύες παρατηρήται στο ήπαρ αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 ενώ αντίθετα στους μεγαλύτερης ηλικίας επιμύες παρατηρήται μειωμένη απόκριση της hsp70.

Συνεπώς, στους επιμύες μεγαλύτερης ηλικίας παρατηρήθηκαν σημαντικοί ρυθμοί θνησιμότητας καθώς και εκτενή βλάβη στο ήπαρ, ενώ αντίθετα στους επιμύες νεότερης ηλικίας παρατηρήθηκε ανοχή σε έκθεσή τους σε στρεσογόνους παράγοντες.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην ηλικία και στην μειωμένη έκφραση της hsp70 καθώς και των παθοφυσιολογικών αποκρίσεων στο θερμικό σοκ.

3.3 Συσχέτιση της επαγωγής της hsp70 και της γονοτοξικής βλάβης στα λεμφοκύτταρα ανθρώπων που εκτίθενται σε εκπομπές αερίων.

Η μελέτη των επιπέδων της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ και της γονοτοξικής βλάβης στα λεμφοκύτταρα ανδρών έγινε σε δύο ομάδες ατόμων που εκτέθηκαν σε εκπομπές άνθρακα, και οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε μια ομάδα ατόμων που δούλευαν σε μονάδα παραγωγής αερίου άνθρακα με αποτέλεσμα να εκτείνονται σε καθημερινή βάση σε θερμότητα, μονοξείδιο του άνθρακα και σε εκπομπές άνθρακα και σε μια άλλη ομάδα οι οποίοι δεν εκτείνονταν σε καθημερινή βάση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως αναφέραμε προηγουμένως.

Τα άτομα και των δύο ομάδων που συγκρίθηκαν ήταν υγιή, είχαν την ίδια ηλικία, δούλευαν την ίδια εργασιακή περίοδο και κατανάλωναν τις ίδιες ποσότητες καπνού. Οι εκπομπές των αερίων περιείχαν πολλά τοξικά χημικά όπως είναι το βενζόλιο, το μεθυλοβενζόλιο και οι πολυκυκλικοί αριλουδρογονάνθρακες (polycyclic aryl hydrocarbons, PAHs) οι συγκεντρώσεις των οποίων μετρήθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (Shanghai Analytical Instrument General Factory, Model 106, Shanghai, Peoples Republic of China).

Οι PAHs, είναι ισχυρά προκαρκινογόνα και μεταλλαξιογόνα, οι οποίοι μπορούν να επάγουν τον μετασχηματισμό πολλών κανονικών κυττάρων και να προκαλέσουν κακοήθης όγκους στα πειραματόζωα (reviewed in Heidelberger, 1975). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι η έκθεση σε τοξικά χημικά προκαλεί μειωμένη αλλά παρόλ' αυτά σημαντική αύξηση των επιπέδων της hsp70 στα άτομα που εκτέθηκαν άμεσα σε σύγκριση με αυτούς που δεν εκτέθηκαν.

Επιπλέον, εξετάστηκε εάν υπήρχε σχέση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, της γονοτοξικής βλάβης και του ρυθμού των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των ατόμων που εκτέθηκαν σε τοξικά χημικά προκειμένου να αξιολογηθεί περισσότερο ο πιθανός ρόλος των επιπέδων της hsp70 στην γονοτοξικότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε αρνητική σχέση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, της βλάβης του DNA και του ρυθμού των μικροπυρήνων στα λεμφοκύτταρα των ανθρώπων που εκτέθηκαν σε εκπομπές άνθρακα.

Αντίθετα, στα άτομα που δεν εκτέθηκαν σε τοξικά χημικά διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 δεν συνδέονται με την βλάβη του DNA και των ρυθμό των μικροπυρήνων. Τα περισσότερα άτομα με χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 παρουσίαζαν την μεγαλύτερη βλάβη του DNA. Βασίζόμενοι στα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 σχετίζεται με την προστασία του DNA από γονοτοξική βλάβη η οποία επάγεται εξαιτίας των εκπομπών άνθρακα. Οι κύριες λειτουργίες των Hsps περιλαμβάνουν έναν ενδοκυτταρικό ρόλο μοριακής συνοδού στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στην διαμεμβρανική μεταφορά και στην προστασία των κυττάρων από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Hightower 1991, Muchowski et al., 2000).

Αυτό αρχικά τεκμηριώθηκε από την απόδειξη του ρόλου των διάφορων Hsps στην απόκτηση παροδικής θερμοανεκτικότητας σε καλλιέργειες κυττάρων (Landry et al.,

1989, Angelidis et al., 1991, Li et al., 1991, Rollet et al., 1992, Parsel and Lindquist 1994) καθώς και στην παροδική προστασία από την βλάβη της ισχαιμίας σε όλα τα όργανα όπως στην καρδιά, στον εγκέφαλο, και στους νεφρούς (Currie et al., 1993, Marber et al., 1995, Plumier et al., 1995, 1997).

Πολλές παρατηρήσεις στους ανθρώπους έχουν δείξει ότι η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σχετίζεται με καταστάσεις διαφόρων ασθενειών (Minowada and Welch 1995). Παρόλ'αυτά, δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία σχετικά με την έκφρασή τους, την σχέση τους με την γονοτοξικότητα που προκαλείται λόγω των περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων καθώς και με την βιοφαρμακευτική τους σημασία σε ανθρώπινες παθογενετικές καταστάσεις.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι πολυσύνθετοι περιβαλλοντικοί παράγοντες στο εργασιακό περιβάλλον μπορούν να επάγουν την σύνθεση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 καθώς και να ρυθμίσουν την απόκριση σε θερμικό σοκ (Wu et al, 1996, Bartosiewicz et al., 2001). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι το βενζένιο και οι μεταβολίτες του μπορεί να προκαλέσει γονοτοξικότητα (Smith et al., 1989, Beland et al., 1994, Speit et al., 1996, Hanelt et al., 1997, Wu et al., 1998, Vayssier-Taussat et al., 2001).

Τα δεδομένα δείχνουν επίσης ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 με την βλάβη του DNA και των ρυθμών των μικροπυρήνων στα εκτειθέμενα άτομα. Παρόμοια σχέση παρατηρήθηκε και στα άτομα (μάρτυρες) σε εκπομπές άνθρακα, παρόλ αυτά δεν είχε στατιστική σημασία. Ωστόσο η σχέση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 και της βλάβης του DNA παραμένει αμφιλεγόμενη.

Επειδή η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 μπορεί να έχει ρόλο μοριακού συνοδού, η επαγωγή της μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα από τις βλάβες. Για αυτό τα άτομα με υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 παρουσιάζουν μικρότερη βλάβη σε σχέση με τους άλλους.

Η ποικιλομορφία στην γονιαδιακή έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και του πολυμορφισμού μπορεί να συντελέσει στην διαφοροποίηση της δεκτικότητας των ασθενειών και της ανοχής σε στρεσογόνους παράγοντες (Favatier et al., 1997). Έτσι, βασιζόμενοι σε αυτήν την εκδοχή εξηγούνται οι διαφορές των ατόμων στην ευαισθησία και στην ανοχή τους σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες.

3.4. Η επαγωγή της hsp70 σε φαρμακο-ανθεκτικά κύτταρα λόγω των αντι-καρκινικών φαρμάκων και της υπερθερμίας.

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (hsp70) καθώς και η επαγωγή των πρωτεϊνών αυτών μέσω της έκθεσης των καρκινικών κυττάρων στην περιοχή του αυχένα και του λάρυγγα σε δυο αντικαρκινικά φάρμακα και στην υπερθεμία, απέδειξε ότι τα επίπεδα της hsp70 ήταν παρόμοια στα πατρικά και φαρμακο-ανθεκτικά κύτταρα (drug-resistant) αποδεικνύοντας έτσι ότι η hsp70 δεν σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα.

Η κατάσταση της υπερθερμίας μπορούσε να επάγει την σύνθεση της hsp70 σε όλα τα εξεταζόμενα κύτταρα αλλά με διαφορετική κινητική μεταξύ των φαρμακο-ανθεκτικών και γονικών κυττάρων. Στην θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα, η hsp70 μπορούσε να εκφραστεί μόνο σε cisplatin-resistant laryngeal κύτταρα.

Η κινητική της επαγωγής της hsp70 ήταν διαφορετική στα φαρμακο-ανθεκτικά κύτταρα σε σχέση με τα γονικά. Οι παρατηρούμενες αυτές μετατροπές της επαγωγής της hsp70 στα φαρμακο-ανθεκτικά και γονικά κύτταρα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν σχεδιάζονται συνδυαζόμενες θεραπείες όπως για παράδειγμα είναι η υπερθερμία και τα αντικαρκινικά φάρμακα.

3.5. Η επαγωγή της hsp70 Gene Promoter μέσω διάφορων αντι-καρκινικών φαρμάκων.

Τρία είναι τα χημικά που είναι γνωστά ότι παράγουν τα reactive oxygen species, ROS και επάγουν την απόπτωση. Δεν εντοπίστηκε επαγωγή του υποκινητή της hsp70 μαζί με τα άλλα κυτταροστατικά σκευάσματα τα οποία εξετάστηκαν όπως τα ανάλογα βάσεως (5-fluorouracil, cytosine arabinose 3'-MP), οι αναστολείς της σύνθεσης του DNA (amethopterin, aminopterin), τα αντι-μιτωτικά/antimitotics (vinblastine, colchicines), και τους αλκυλιωτικούς παράγοντες (streptozotocine, carboplatin, melphalan) ή τους παράγοντες παρεμβολής (bleomycin).

Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι τα συγκεκριμένα γονοτοξικά σκευάσματα δεν είναι ικανά να επάγουν τον υποκινητή της hsp70 καθώς και ότι συμφωνούν με την θεωρία ότι η διέγερση της σύνθεσης της hsp70 συμβαίνει μέσω των βιοχημικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων και της πρωτεοτοξικότητας.

3.6. Η αναπτυγμένη τοξικότητα και οι αποκρίσεις των στρες πρωτεϊνών σε έμβρυα του ιχθύος Zebrafish έπειτα από έκθεση σε diclofenac και στον διαλύτη του DMSO.

Ένα από τα περισσότερο εντοπίσιμα φαρμακευτικά στο υδάτινο περιβάλλον είναι το αντι-ρευματικό φάρμακο *diclofenac* (Weigel et al., 2002, Kooutsouba et al., 2003). Το *diclofenac* ανήκει στα μη-στεροειδή αντι-διεγερτικά φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS), ευρέως χρησιμοποιούμενα για την θεραπεία πολλών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων τον έμμηνο πόνο, την δυσκαμψία που προκαλείται από την αρθρίτιδα και την ουρική αρθρίτιδα (ποδάγρα) ή τον πόνο έπειτα από χειρουργική επέμβαση ή από τον τοκετό (Chan et al., 2001).

Εκτός από την χρήση του σε θεραπείες για τον άνθρωπο, το συγκεκριμένο φάρμακο βρίσκεται εφαρμογή και στα απόβλητα των φυτών (sewage treatment plants, STPs) όπου δεν αποβάλλονται πλήρως με αποτέλεσμα να απεκκρίνονται ως ρύποι στο υδάτινο περιβάλλον. Δεδομένου της μεγάλης σημασίας του για το περιβάλλον, δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες που να εξετάζουν τις επιδράσεις αυτού του φαρμάκου στα πρώτα στάδια ανάπτυξης διαφόρων οργανισμών που διαβιούν στο υδρόβιο περιβάλλον.

Τα πρώτα στάδια ανάπτυξης (early life stage, ELS) του zebrafish embryos αποτελούν ένα από τα περισσότερο ευρέως χρησιμοποιημένα εργαλεία για την ερεύνηση των επιζήμιων επιδράσεων των υδάτινων ρυπογόνων στους ιχθύες. Το zebrafish, *Danio reio* είναι ένα μικρό είδος των γλυκέων υδάτων, με μικρό χρόνο αναπαραγωγής και ευκολία ανάπτυξης και διατήρησης σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Οι οργανισμοί αποκρίνονται στην πρωτεοτοξικότητα μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για να καθοριστούν οι αντιδράσεις του βιόκοσμου σε περιβαλλοντικούς και φυσιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες (Hightower, 1991, Sanders, 1993, Triebkorn et al., 1997).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθούν οι επιδράσεις του *diclofenac* στην επιβίωση, στην εκκόλαψη και στην επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsp70) των εμβρύων zebrafish. Έγινε δηλαδή προσπάθεια να καθοριστεί εάν το *diclofenac* επιδρά στην ανάπτυξη του δείκτη *Danio reiro* και να ερευνηθεί η πιθανή πρωτεοτοξική δυναμικότητα αυτού του φαρμάκου στην ανάπτυξη των εμβρύων.

Για να καθοριστεί η αναπτυξιακή τοξικότητα καθώς και πρωτεοτοξικότητα αυτού του φαρμάκου στην ανάπτυξη των εμβρύων ιχθύων, αυγά του zebrafish εκτέθηκαν σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις από το *diclofenac* (0,1,20,100, 500,1000, και 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$) χρησιμοποιώντας το DMSO ως διαλύτη.

Παράμετροι των πρώτων βιολογικών σταδίων όπως τα αυγά, η εμβρυική θνησιμότητα, η γαστρίδιωση, ο σχηματισμός του σωμίτη, η κίνηση, η αποκόλληση της ουράς, η μελάγχρωση, ο καρδιακός παλμός και η επιτυχία της εκκόλαψης μελετήθηκαν κατά την έκθεση σε χρονικό διάστημα μεταξύ 48 και 96h.

Έπειτα από έκθεση για 96h, τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (hsp70) μετρήθηκαν στα είδη που εκτέθηκαν σε *diclofenac* αλλά και σε αυτά που δεν εκτέθηκαν (DMSO controls-δείγματα αναφοράς). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντική αναστολή της ανάπτυξης μέχρι το τέλος των 96h για όλες τις εκτεθειμένες ομάδες. Ωστόσο, υπήρξε καθυστέρηση στον χρόνο εκκόλαψης μεταξύ των εμβρύων που εκτέθηκαν σε 1000 και 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Στα έμβρυα τα οποία η εκκόλαψη έγινε καθυστερημένα (108h) παρατηρήθηκε ότι δεν διέφεραν μορφολογικά από τα έμβρυα στα οποία η εκκόλαψη έγινε κανονικά.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην θνησιμότητα και στην μέση τιμή του καρδιακού παλμού μεταξύ των εμβρύων που εκτέθηκαν σε *diclofenac* αλλά και σε αυτά που δεν εκτέθηκαν (DMSO controls-δείγματα αναφοράς).

Επίσης δεν βρέθηκαν σημαντικές δυσπλασίες μεταξύ όλων των αναπτυξιακών εμβρύων κατά την διάρκεια της έκθεσης. Αυτό υποδεικνύει ότι ακόμη και οι ελάχιστες συγκεντρώσεις του *diclofenac*, οι οποίες θα μπορούσαν πιθανόν να προκαλέσουν τερατογενείς και κυτοτοξικές επιδράσεις, παρόλ' αυτά δεν παρουσιάστηκαν σύμφωνα με την παρούσα μελέτη (Mc Kim, 1985, von Westernhagen, 1988). Όπως επίσης δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (hsp70). Καμία δηλαδή ένδειξη πρωτεοτοξικότητας δεν παρατηρήθηκε στα έμβρυα ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε *diclofenac* και ίσως έτσι να υποδεικνύεται ότι τα επίπεδα του *diclofenac* που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη δεν ήταν αυτά τα οποία θα μπορούσαν να εξάγουν αποκρίσεις των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Αν και τα DMSO controls-δείγματα αναφοράς έδειξαν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και της αύξησης των επιπέδων της hsp70.

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι εφόσον, τα παρόν δεδομένα δεν υποδηλώνουν σημαντική εμβρυοτοξικότητα καθώς και πρωτεοτοξικότητα λόγω της έκθεσης σε *diclofenac* και πως εξαιτίας του γεγονότος ότι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν 2000-fold υψηλότερες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που εντοπίστηκαν στο περιβάλλον, διαπιστώνεται ότι είναι απίθανο το συγκεκριμένο φάρμακο να εναποθέσει κάποιον κίνδυνο για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του zebrafish.

Τέλος, φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του ανθρώπου όπως valpromide, methylhexanoic acid, pentenoic acid και diethylacetic acid βρέθηκαν επίσης να έχουν παρόμοια συμπεριφορά με το *diclofenac* (ασθενής αναστολή ή καμία επίδραση στην ανάπτυξη των εμβρύων zebrafish) (Herrmann, 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ, Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

4.1 Ταξινόμηση και θεωρίες των χημειοπροληπτικών.

Τα χημειοπροληπτικά με βάση την χημική τους δομή μπορούν να ταξινομηθούν σε πολλές κατηγορίες, όπως για παράδειγμα είναι τα καρωτινοειδή και τα ρετινοειδή τα οποία ανήκουν στα ισοπρωτεϊνοειδή (Wattenberg, 1992, Rodriguez et al., 1994, Greenwald et al., 1995).

Μια κοινή θεωρία για τα χημειοπροληπτικά είναι η ικανότητα των χημικών παραγόντων να λειτουργήσουν ως παράγοντες μείωσης, ως αντιοξειδωτικά ή ως οξειδωτικοί παράγοντες (προ-οξειδωτικά). Ο χημικός χαρακτήρας ενός χημειοπροληπτικού εξαρτάται από την μερική πίεση του οξυγόνου και από το επίπεδο των οξειδωτικών μεταβολιτών που παράγονται μέσα στο κύτταρο.

Η β-καρωτίνη ως καρωτινοειδές δρα ως αντιοξειδωτικό, μπορεί όμως να δράσει και ως προ-οξειδωτικό, εξαρτώμενη από την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου (Burton & Ingold, 1989, Schwartz et al., 1992 a,b). Επιπρόσθετα, η β-καρωτίνη αποτελεί καρκινογενή παρεμποδιστικό παράγοντα (cancerogen blocking agent) το οποίο είτε καταστέλλει την προαγωγή ή δρα ως αντιοξειδωτικό, η οποία αποτελεί παράγοντα μείωσης. Η δράση αυτού του μηχανισμού είναι άγνωστη, παρόλ' αυτά οι παρεμποδιστικοί παράγοντες αποτρέπουν τις καρκινογενετικές συνθέσεις από την αντίδρασή τους με στόχους του DNA (critical target sites) περιορίζοντας την μεταβολική δράση των καρκινογόνων που καταλύονται από το κυτόχρωμα P450 (Phase I enzymes) (Wattenberg, 1983, Mukhtar et al., 1984).

Άλλοι χημειοπροληπτικοί παράγοντες όπως η βιταμίνη E, η οποία αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό, ενθαρρύνει την κυτταρική αποτοξίκωση, αυξάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης (glutathione S transferases) (Phase II enzymes) (Schwartz et al., 1992b, Wattenberg, 1992, Lippman et al., 1995a).

Η δράση αυτών των ενζύμων μπορεί ακόμη να οδηγήσει στην παγίδευση των ενεργών καρκινογόνων μεταβολιτών, όπως επίσης και στην έναρξη της απόπτωσης.

Τα χημειοπροληπτικά μπορούν να καταστρίλλουν την προαγωγή του καρκίνου καθώς και τον μετασχηματισμό των προ-κακοήθων κυττάρων μεταβάλλοντας την διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, τα ρετινοειδή ενθαρρύνουν την διαφοροποίηση ενώ επιδρούν στα γονίδια βασικών λειτουργιών και στην ογκογενετική έκφραση (Smith et al., 1992, Lippman et al., 1995a).

Τα κύτταρα προστατεύονται από τις ενεργές οξυγονούχες ουσίες (reactive oxygen substances, ROS) ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικούς οδούς καθώς και μοριακά συστήματα τα οποία χρησιμοποιούν τα ένζυμα.

Ίσως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των chemopreventives είναι η ικανότητά τους να εκκινούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) στα μετασχηματισμένα κύτταρα (Schwartz, 1994). Τα ρετινοειδή, τα καρωτενοειδή, οι τοκοφερόλες, οι πολυφαινόλες επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Κλινικά υπάρχει ένα πλεονέκτημα στον συνδυασμό των chemopreventives με χημειοθεραπευτική ιδιότητα, ιδιαίτερα με τους παράγοντες αλκυλίωσης. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι ο συνδυασμός της β-carotene και ενός παράγοντα αλκυλίωσης, πχ του melphalan αύξησε σημαντικά την καταστολή της ανάπτυξης του φολιδωτού καρκινώματος σε σχέση με την ανάπτυξη που παρατηρήθηκε με ένα μόνο χημειοθεραπευτικό φάρμακο (Teicher et al., 1994).

4.2 Τα πολλαπλά βήματα της καρκινογένεσης

Τα πολλαπλά βήματα της καρκινογένεσης οριοθετούνται από την ανάπτυξη του στοματικού καρκινώματος ως αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών γεγονότων κατά την διάρκεια της έναρξης ή της προαγωγής του κακοήθη μετασχηματισμού.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, είτε βιολογικοί είτε χημικοί μπορούν να δράσουν ως προαγωγοί. Οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες όπως 7,12dimethylbenz(a)anthracene, (DMBA) ή το βενζοπυρένιο benz(a)pyrene,(BP) αποτελούν καρκινογενετικούς παράγοντες που εκκινούν και προάγουν την ανάπτυξη του όγκου.

Άλλοι παράγοντες όπως είναι ο ιός HPV, (human papilloma virus), τα χημικά που εξάγονται από τον καπνό ή τα προϊόντα καπνού ή τα προϊόντα του αλκοόλ έχουν παρατηρηθεί να εκκινούν ή να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου. Είναι γεγονός, πως για την μελέτη ανάπτυξης ενός όγκου και για την περαιτέρω μελέτη της διαδικασίας της καρκινογένεσης έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά πειραματόζωα όπως είναι οι επιμύες και τα ποντίκια. Το περισσότερο όμως χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο για την μελέτη της στοματικής καρκινογένεσης είναι το hamster cheek pouch (Gimenez-Conti & Slaga, 1993), το οποίο παρέχει μεγάλη επιφάνεια του στοματικού βλεννογόνου για την ανάπτυξη του καρκινώματος σε αντίθεση με ανθρώπινα κύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν αυτού του τύπου της βλεννογόνου δομής (Odukoya & Shklar, 1982).

4.3 Η θεωρία των Βιοδεικτών και ο ρόλος τους στην Καρκινογενετική επιδημιολογία.

Οι βιοδείκτες ταξινομούνται σε ομάδες που εντοπίζουν α) την έκθεση, β) την εξέλιξη, γ) την επιδεκτικότητα στα καρκινογόνα και/ή τις απαντήσεις των κυττάρων στόχων πληθυσμών (McMichael, 1994, Rothman et al., 1995).

Επιδημιολογικά, οι παραγόμενοι δείκτες μπορούν ακόμη να ερμηνεύσουν τις περιβαλλοντικές επιδράσεις (πχ. Κάπνισμα, χρήση αλκοόλ, μόλυνση από ιούς όπως είναι ο ιός HPV) οι οποίες εκδηλώνονται ως συνέπεια της επιδεκτικότητας των εγγενών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά ασθενώς εκφράζονται στον καρκίνο του στόματος, και παρόλα αυτά σήμερα συμβάλλουν στην διαδικασία της καρκινογένεσης (Rothman et al., 1995).

Οι βιοδείκτες παρέχουν πληροφορίες:

1. Για την αιτιολογία και
2. Την διαδικασία της καρκινογένεσης. Ο κύριος σκοπός της χρήσης τους σε πρώιμο, ενδιάμεσο και σε τελικό στάδιο είναι ο προσδιορισμός των ατόμων καθώς και το επίπεδο του κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου.
3. Η λειτουργία των βιοδεικτών είναι να προβλέψει την βιολογική πορεία του καρκίνου του στόματος και να διαχωρίσει τα άτομα σε ομάδες υψηλού και χαμηλού κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου.

Για την απομόνωση ενός βιοδείκτη ως αποτέλεσμα μέτρησης, απαιτούνται πληροφορίες για 1.το φύλο, 2.την ηλικία, 3.τις συνήθειες και 4.της κατάστασης της υγείας των ατόμων που εμφανίζουν υψηλό ή χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου (Hulka & Margolin, 1992). Το κριτήριο για την επιλογή ενός δείκτη εξαρτάται:

- 1.Από την ευαισθησία και την αξιοπιστία του,
- 2.Το επίπεδο της σχέσης του μεταξύ του δείκτη και του στοματικού καρκινώματος
- 3.και από αιτιολογικούς παράγοντες όπως ιοί, καρκινογόνα.

Βιοψία σε πληθυσμό με προ-κακοήθειες και κακοήθειες αλλοιώσεις είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση ενός βιοδείκτη.

Επιπρόσθετα, οι βιοδείκτες βοηθούν στην αξιολόγηση της πρόληψης ή στην χρήση θεραπειών και στον εντοπισμό σε πρώιμο στάδιο του μετασχηματισμού του κακοήθη βλεννογόνου του στόματος. Αποκαλύπτουν τις γενετικές και μοριακές αλλαγές που σχετίζονται σε πρώιμο, ενδιάμεσο και τελικό στάδιο στην διαδικασία της στοματικής καρκινογένεσης. Καθώς επίσης βοηθούν στην πρόγνωση, στην διάγνωση και στην θεραπεία του στοματικού καρκινώματος (Daly, 1993, Page, 1994, Greenwald et al., 1995).

Η χρησιμοποίηση των βιοδεικτών είναι απαραίτητη σε δοκιμές μεγάλου χρονικού διαστήματος, των οποίων το κόστος είναι μεγάλο. Μειώνοντας τον αριθμό των ατόμων καθώς και τον χρόνο που απαιτείται για να καθοριστεί το όφελος ή η βλάβη που προκαλείται από ένα φάρμακο ή από ένα χημειοπροληπτικό μέσο, μειώνεται το κόστος των δοκιμών (Shin et al., 1994a, Rothman et al., 1995). Η μείωση του κόστους των κλινικών δικιμών αποτελεί συντελεί σημαντικά στην ανάπτυξη των βιοδεικτών.

Μπορούν επίσης, να προσδιορίσουν τους τύπους, τις δόσεις, τις συχνότητες και τις θεραπευτικές αγωγές που απαιτούνται για να επιτευχθεί ένα μέγιστο επίπεδο της ωφέλειας από την χρήση των χημειοπροληπτικών.

Επιπρόσθετα, βοηθούν να καθοριστούν οι αλλαγές σε πρώιμο, ενδιάμεσο και τελικό στάδιο των προ-κακοήθη και κακοήθη ιστών.

Οι γενετικοί και μοριακοί βιοδείκτες μπορούν ακόμα να καθορίσουν την αποτελεσματικότητα, την λειτουργία και την ασφάλεια που παρέχουν τα χημειοπροληπτικά καθώς επίσης και τις διαδικασίες του καρκίνου, όπως είναι για παράδειγμα η στοματική καρκινογένεση.

Ενώ, δεν μπορούν να παρέχουν όλες τις πληροφορίες που απαιτούνται για την εκτίμηση του κινδύνου καθώς επίσης και την πιθανή ενεργότητα των χημειοπροληπτικών.

Άλλες μέθοδοι, όπως είναι οι επιδημιολογικές αναλύσεις και τεχνικές πρέπει να χρησιμοποιούνται για να ενισχύουν την κατανόησή μας για τον κίνδυνο του καρκίνου του στόματος σε ανθρώπινους πληθυσμούς.

Μια συνήθη επιδημιολογική μέθοδος (the questionnaire), βοηθά στον προσδιορισμό της χρήσης του καρκινογενετικού δυναμικού του καπνού και του αλκοόλ κατά την διάρκεια της στοματικής καρκινογένεσης (Schwartz, 1999).

Γενετικές και μοριακές αλλαγές σε ασθενείς μπορεί να προκαλέσουν μείωση του αριθμού και της λειτουργίας του όγκου των κατασταλτικών γονιδίων. Εάν αυτές οι αλλαγές μπορεί να εκτιμηθούν, οι ιστοί (πχ.στοματικός βλεννογόνος) πρέπει να προσεγγίζονται με αξιόπιστο και σταθερό τρόπο για την απόκτηση του DNA, mRNA και των πρωτεϊνών. Οι στοματικοί ιστοί παρέχουν επαρκείς ποσότητες αυτών των μοριακών ειδών.

Από κοινού με τις επιδημιολογικές τεχνικές, διάφοροι γενοτυπικοί πολυμορφισμοί όπως είναι η γλουταθειώνη, glutathione S transferases(GSTM1) ή το κυτόχρωμα P₄₅₀ (CYP_{450A1}) έχουν ενδείξει μείωση της καρκινογενετικής αποτοξίκωσης.

Οι βιοδείκτες συντίθενται από ένα μεγάλο σύνολο γενετικών και μοριακών δομών. Μερικοί από αυτούς τους βιοδείκτες αποτελούν δείκτες του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PCD), ενώ άλλοι περιγράφουν την κακοήθη ανάπτυξη του όγκου (Schwartz, 1999, 1996a). Ελπίζεται, πως με μια πλήρη λεπτομερή γνώση των διαδικασιών που σχετίζονται με την κακοήθη μεταφορά, μπορεί καλύτερα να προσδιορίσει τους βιοδείκτες-εργαλεία διαλογής (screening tools) για τον καρκίνο του στόματος. Έτσι, ενισχύεται η ικανότητά μας να προβλέψουμε την περίπτωση του καρκίνου, να εντοπίσουμε σε πρώιμο στάδιο την κακοήθη αλλαγή και να ποσοτικοποιήσουμε την πρόληψη από τα χημικά κατά την διάρκεια της στοματικής καρκινογένεσης.

Χημειοπροληπτικά όπως τα ρετινοειδή έχουν ήδη αποδείξει την ικανότητά τους να καταστέλλουν πιθανές κακοήθεις αλλαγές σε πρώιμο στάδιο της λευκοπλακίας του στόματος καθώς και να μειώσουν την περίπτωση της second head and neck cancer primaries(Smith et al., 1992).

❖ Καθορισμός του relative risk μέσω ενός βιοδείκτη

Το βασικότερο κριτήριο για να καθοριστεί η χρησιμότητα ενός βιοδείκτη είναι η ικανότητα αυτού να καθορίσει τον σχετικό κίνδυνο, relative risk (RR). Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός ο δείκτης θα πρέπει να δοκιμαστεί σε πειραματόζωα για την στοματική καρκινογένεση. Η έκφραση του δείκτη σε ανάλυση που έγινε σε πρωτογενή κύτταρα που βρίσκονταν σε μετασχηματισμένο στάδιο ενθαρρύνει περισσότερο την αξιοπιστία του δείκτη και την συνδέει με τον κακοήθη μετασχηματισμό (Meyskens, 1992, Swanson & Ward, 1995).

Η έκφραση του δείκτη σε βιοψία ατόμου υψηλού κινδύνου που βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο ενός προ-κακοήθη όγκου αυξάνει περισσότερο το ενδεχόμενο εμπλοκής του δείκτη στην ανάπτυξη του στοματικού καρκινώματος.

Ο διαχωρισμός ενός πληθυσμού ογκογενή και μη ογκογενή σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου ενθαρρύνει περισσότερο την παρατήρηση για ένα νέο γενετικό, μοριακό και/ή επιδημιολογικό προφίλ.

Σε μελέτες της καρκινογένεσης του στόματος είναι δύσκολο να αποκτηθεί επαρκής αριθμός ασθενών για να ελεγχθούν και να μελετηθούν εκτενέστερα προκειμένου να καθοριστεί αναλυτικότερα για το μέλλον ο κίνδυνος ανάπτυξης του καρκίνου(Wynder et al., 1957).

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση-Χρησιμότητα Βιοδεικτών.

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ					
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ			ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ		
	Παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή ενός βιοδείκτη	Για την απομόνωση ενός βιοδείκτη απαιτούνται πληροφορίες για	Ταξινόμηση	Παρέχουν πληροφορίες	Παρέχουν βοήθεια
1	Ευαισθησία-Αξιοπιστία του βιοδείκτη	Φύλο	Έκθεση σε καρκινογόνα	Αιτιολογία εμφάνισης του καρκίνου	Αξιολόγηση της πρόληψης
2	Το επίπεδο σχέσης μεταξύ του δείκτη και του καρκινώματος	Ηλικία	Εξέλιξη σε καρκινογόνα	Διαδικασία της καρκινογένεσης	Χρήση θεραπειών
3	Αιτιολογικοί (ιοί,καρκινογόν)	Συνήθειες	Επιδεκτικότητα στα καρκινογόνα	Βιολογική πορεία του καρκίνου	Στην πρόγνωση, στην διάγνωση και στην θεραπεία του καρκινώματος,Εντοπισμό σε πρώιμο στάδιο του μετασχηματισμού του κακοήθη καρκινώματος
4		Κατάσταση της υγείας των ατόμων που εμφανίζουν υψηλό ή χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου.		Διαχωρισμό των ατόμων σε ομάδες υψηλού και χαμηλού κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου.	Στον καθορισμό των μοριακών –γενετικών αλλαγών σε πρώιμο, ενδιάμεσο και τελικό στάδιο των προ-κακοήθη και κακοήθη ιστών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

5.1 Ο εξελικτικός και ο οικολογικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Όλοι οι οργανισμοί εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες για την διατήρηση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την σύνθεσή τους από άλλα απαραίτητα βιομόρια. Ενώ αντίθετα, η βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών εξαρτάται από τον σχηματισμό/ αποσύνθεση των ασθενών χημικών δεσμών (Hochacha & Somero, 1984, Somero, 1995). Αυτή η απαίτηση αναπότρεπτα ευαισθητοποιεί τους οργανισμούς σε έκθεσή τους σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (πχ.θερμότητα, τοξικά χημικά κ.α.), η οποία επιδρά στους ασθενείς χημικούς δεσμούς. Εάν αυτοί, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες βρίσκονται σε επαρκή ή σε ανεπαρκή ποσότητα τότε το αποτέλεσμα αυτών είναι η απόκλιση των πρωτεϊνών από την φυσική τους δομή, με τις έσχατες δυσμενείς συνέπειες για την λειτουργία των πρωτεϊνών (Hochacha & Somero, 1984, Somero, 1995).

Οι περισσότερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί οι οποίοι βοηθούν τους οργανισμούς να αντιμετωπίσουν το εσωτερικής και εξωτερικής φύσεως στρες. Τα γονίδια θερμικού σοκ αποτελούν υποκατηγορία ενός μεγαλύτερου συνόλου

γονιδίων που κωδικοποιούν τους μοριακούς συνοδούς. Ο όρος μοριακός συνοδός οφείλεται σε μια από τις λειτουργίες του, που είναι η προστασία των πρωτεϊνών από την μετατροπή τους σε συνάθροιση μη ακατάλληλων πρωτεϊνών.

Εκτός από αυτού του είδους την λειτουργία, οι μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται στην μεταφορά, στην αναδίπλωση και μη, στην συγκρότηση και αποσυγκρότηση των πολυδομημένων μονάδων και στην αποικοδόμηση των μη αναδιπλωμένων ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών.

Αυτές οι λειτουργίες είναι απαραίτητες κάτω από κανονικές κυτταρικές συνθήκες, ωστόσο, η ανάγκη για μοριακούς συνοδούς επιταχύνεται υπό συνθήκες στρες, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή στην μοριακή και κυτταρική δομή των κυττάρων.

Οι μοριακοί συνοδοί, όπως αναφέραμε και προηγουμένως αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες λειτουργούν ελαχιστοποιώντας τα προβλήματα που εμφανίζονται όταν οι άλλες πρωτεΐνες βρίσκονται σε μη φυσική χωροδιάταξη (Nover, 1991, Gething & Sambrook, 1992, Morimoto et al., 1994, Feder et al., 1995, Hartl, 1996, Gething, 1997, Feder & Hofmann, 1998, 1999). Επιπρόσθετα, αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς μοριακούς μηχανισμούς της ανοχής των οργανισμών σε στρεσογόνους παράγοντες.

Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, ωστόσο δεν είναι μόνο ωφέλιμη.

Πολλές μελέτες (Krebs & Feder, 1997a, Feder & Hofmann, 1999, Krebs & Bettencourt, 1999) αναφέρουν τις δυσμενείς επιδράσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, χαρακτηριστικό γνώρισμα αποτελούν οι εξής μηχανισμοί: πρώτον, η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η οποία μπορεί να είναι μαζική, μπορεί να συντελέσει στην κατανάλωση βιοσυνθετικού υποστρώματος καθώς και στην ενασχόληση μεγάλης ποσότητας της εκφραζόμενης πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να μην υπάρχει αρκετό απόθεμα των εκφραζόμενων πρωτεϊνών για άλλη σημαντική βιοσύνθεση (Heckathorn et al., 1996a,b). Δεύτερον, δεσμεύοντας άλλες πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορεί να γίνουν τοξικές (Feder et al., 1992, Krebs & Feder, 1997a).

Είναι γεγονός, ότι ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ σε διάφορους οργανισμούς από διαφορετικά περιβάλλοντα, και πως αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται με την λειτουργία τους, αποτελεί εστία έρευνας για τους μοριακούς συνοδούς. Ως μοριακοί συνοδοί, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν διάφορους κυτταρικούς ρόλους, χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ελαχιστοποίηση της δισλειτουργίας, η οποία συμβαίνει όταν οι άλλες πρωτεΐνες βρίσκονται σε μη φυσική χωροδιάταξη.

Οι καθιερωμένες απόψεις αυτών των ρόλων *in vitro*, σε απομονωμένα κύτταρα, και σε μοντέλο οργανισμών στο εργαστήριο είναι καλά αναπτυγμένες, καθώς είναι πανταχού παρούσες στους οργανισμούς, αποτελούν ποικιλία στρεσογόνων παραγόντων που επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, αποτελούν τις κύριες οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, καθώς αποτελούν επίσης και τις μεταβολές της διαβάθμισης των στρεσογόνων παραγόντων.

Η συχνότητα της φυσικής έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος στην ανοχή σε στρεσογόνους παράγοντες σε επίπεδα βιολογικής οργάνωσης προπαντός στο κύτταρο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω των οποίων η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθώς και η λειτουργία τους έχουν γίνει το επικρατέστερο επίπεδο των στρεσογόνων παραγόντων του περιβάλλοντος, και οι συνέπειες της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στην φύση αποτελούν θέματα τα οποία δεν έχουν πλήρως επιλυθεί.

5.1.1 Καθορισμός του stress

Γενικά θα λέγαμε πως το στρες ορίζεται ως μια κατάσταση η οποία διαταράσσει την κανονική λειτουργία ενός βιολογικού συστήματος ή μιας κατάστασης η οποία μειώνει την προσαρμοστικότητα του (Hoffmann & Parsons, 1991, Bijlsma & Loeschke, 1997). Συνήθως το στρες μπορεί να προέρχεται από εξωτερικούς (περιβαλλοντικούς) ή εσωτερικούς παράγοντες όπως το γενετικό στρες (συγγενομιξίες, επιβλαβής μεταλλάξεις) και της ηλικίας.

5.1.2 Η απάντηση των κυττάρων σε έκθεσή τους σε stress

Στο εργαστήριο, χρησιμοποιούνται διάφορες θεραπείες και διαδικασίες για να μελετηθούν οι φυσιολογικές απαντήσεις των κυττάρων έναντι στο στρες.

Ο εγκλιματισμός είναι μια διαδικασία που συμβαίνει κατά την διάρκεια μεγάλων περιόδων (μέρες ή βδομάδες). Αντίθετα, η σκλήρυνση είναι τυπικά μια μικρότερη διαδικασία αλλά και μη θανατηφόρος στρεσογόνος κατάσταση. Οι αλλαγές που επιφέρει η σκλήρυνση είναι αρχικά αντίστροφες, ενώ ο εγκλιματισμός και ιδιαίτερα ο εγκλιματισμός ανάπτυξης οδηγεί σε μη αντιστρεπτές αλλαγές. Η σκλήρυνση ή ο εγκλιματισμός είναι γνωστό ότι επιδρούν στην σύσταση της μεμβράνης των λιπιδίων, στην αποταμίευση της ενέργειας και ιδιαίτερα στην σκλήρυνση προκαλούν απάντηση στο στρες συμπεριλαμβάνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Lindquist 1986, Ohtsu et al, 1998,1999). Αυτές οι φυσιολογικές αλλαγές ωστόσο επιδρούν στην γονιμότητα, στην μακροζωία και στην αντίσταση κατά του στρες (Krebs & Loeschke 1994).

5.1.3 Σύστημα Ποιοτικού ελέγχου των Πρωτεϊνών,(PQC).

Οι κυτταρικές λειτουργίες των μοριακών συνοδών συντέλεσαν στην δημιουργία ενός συστήματος ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών, protein quality control system (PQC).

Η σημασία αυτού του συστήματος αυξάνεται κατά την έκθεση σε περιβαλλοντικά και γενετικά στρες σαν αποτέλεσμα των αυξανόμενων επιπέδων δυσλειτουργιών των πρωτεϊνών αναδίπλωσης (Ananthan et al., 1986, Lindquist, 1986, Gething & Sambrook, 1992, Gregersen et al., 2001).

Η γενική λειτουργία αυτού του συστήματος είναι δισδιάστατη: α) η εξασφάλιση της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και β) η αποικοδόμηση των μετουσιωμένων ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών.

Πρόσφατα, έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία σε ανθρώπινες αρρώστιες (Bukau et al., 2000, Gregersen et al., 2001). Η παθολογία πολλών μεταλλακτικών ανθρώπινων ασθενειών, όπως είναι το Alzheimer, Creutzfeldt-Jacob, α₁-antitrypsin ανεπάρκεια, οι ασθένειες του ήπατος οι οποίες προκαλούνται από λανθασμένη αναδίπλωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Gregersen et al., 2003). Επιπρόσθετα, ο πυρετός που προκαλείται από λοίμωξη και ισχαιμία, υποξία, οξειδωτική βλάβη και ενδοτοξμία φαίνονται να αυξάνουν το κυτταρικό επίπεδο των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οδηγώντας έτσι στην απορρύθμιση των πρωτεϊνών του συστήματος ποιοτικού ελέγχου (Favatier et al., 1997, Sherman & Goldberg, 2001, Snoeckx et al., 2001).

Η ποικιλομορφία στην απάντηση φαίνεται να συνδέονται με συγκεκριμένη ποικιλομορφία στο σύστημα ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών (Favatier et al., 1997, Hansen et al., 2002). Ωστόσο, η ποικιλομορφία στην αποτελεσματικότητα του συστήματος ποιοτικού ελέγχου αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην ικανότητα να αντισταθούν σε ασθένειες και σε περιβαλλοντικές προκλήσεις (Favatier et al., 1997, Feder & Hofmann, 1999, Gregersen et al, 2001, Slavotinek & Biesecker, 2001). Ακόμη, πιθανολογείται να είναι απαραίτητο στην διατήρηση της ομοιόστασης σε φυσικούς πληθυσμούς.

5.1.4 Το Stress ως οικολογική και εξελικτική δύναμη

Όταν τα άτομα ενός πληθυσμού εκτίθενται σε στρεσογόνες συνθήκες, τότε τρεις είναι οι πιθανότητες που μπορούν να συμβούν (Hoffmann & Parsons, 1991): α) τα άτομα του πληθυσμού να προσπαθήσουν να αποφύγουν το στρες, β) να προσαρμοστούν σε αυτές τις συνθήκες και γ) να αποτύχουν στα προηγούμενα και να εξαφανιστούν.

Οι στρεσογόνες συνθήκες μπορούν να δράσουν και ως εξελικτικές δυνάμεις με τις οποίες οι πληθυσμοί απαντούν με προσαρμογή. Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες πιθανόν να επηρεάζουν την διανομή και την αφθονία των ειδών και των πληθυσμών στην φύση. Ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν μεγάλη σημασία είναι τα χημικά, τα βαρέα μέταλλα (Macnair, 1997), ο παρασιτισμός (Davis et al., 1998), η θερμοκρασία και η υγρασία (David et al., 1983, Cossins & Bowler, 1987, Hoffmann & Parsons, 1991, Lee & Denlinger, 1991, Loeschke et al., 1994, Hoffmann & Parsons 1997b, Huey & Berrigan, 2001).

Επίσης, μεγάλη σημασία έχουν και οι γενετικοί στρεσογόνοι παράγοντες όπως η ομομιξία και η καθιέρωση επιβλαβών μεταλλάξεων (Bijlsma et al., 1997, Hoffmann & Parsons 1997b).

Οι περιβαλλοντικοί και οι γενετικοί παράγοντες προβλέπεται στο μέλλον να επηρεάζουν τους μελλοντικούς πληθυσμούς. Σύμφωνα με την ανθρωπογενετική ενεργότητα, πχ η υπερθέρμανση του πλανήτη, η μόλυνση και η εκδάσωση, οι περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να είναι πιο δραστικές και απρόβλεπτες στο μέλλον από ότι είναι σήμερα.

Ο περιορισμός του φυσικού περιβάλλοντος οδηγεί στην απομόνωση και η μείωση του μεγέθους του πληθυσμού αυξάνει τον βαθμό της ομομιξίας και της γενετικής παρέκκλισης. Ωστόσο, ακόμη και χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση, οι περιβαλλοντικοί και οι γενετικοί παράγοντες αλλάζουν και θα επηρεάζουν την οικολογία και την εξέλιξη των ειδών.

5.1.5 Επιδράσεις του στρες στους ρυθμούς της εξέλιξης

Μελέτες που έγιναν στην *Drosophila* και σε ένα αυτογονιμοποιημένο φυτό *Arabidopsis thaliana* αποδείχτηκε ο βασικός ρόλος της Hsp90 στην έκφραση της γενετικής ποικιλομορφίας (Rutherford & Lindquist, 1998). Στις μύγες και στα στελέχη των φυτών με εξασθενημένη παραγωγή της Hsp90, συμβαίνουν συχνά ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη. Η λειτουργική Hsp90 πρωτεΐνη φαίνεται να ρυθμίζει την υπάρχουσα ποικιλομορφία, η οποία φαινοτυπικά δεν εκφραζόταν υπό κανονικές συνθήκες. Υπό στρεσογόνες θερμοκρασίες οι πρωτεΐνες καταστρέφονται και συναγωνίζονται για διαθέσιμη Hsp90 πρωτεΐνη, ενώ ελαττούμενη παραγωγή της Hsp90 οδηγεί λόγω του

στρες σε περισσότερο καταστροφικές συνέπειες (Rutherford & Lindquist, 1998, Queitsch et al., 2002). Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν και από την έκφραση της hsp70 πρωτεΐνης στην *Drosophila* (Roberts & Feder, 1999).

5.1.6 Κόστος έκφρασης των πρωτεϊνών

Στην *D.melanogaster*, το επαναλαμβανόμενο ισχυρό στρες προκαλεί επιζήμια αποτελέσματα στην γονιμότητα και στην αναπαραγωγική ικανότητα μόνο όταν οι μύγες εκτίθενται σε στρες και όχι κατά την διάρκεια της υπόλοιπης ζωής τους (Hercus et al., 2003). Έχει αποδειχθεί ότι όταν τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης που επάγεται έπειτα από θερμικό σοκ επιστρέφουν στα κανονικά, ότι στην επιβίωση από το θερμικό σοκ το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ουσιαστικό και οφέλιμο.

Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε το κόστος της έκφρασης των πρωτεϊνών, καθώς η οικολογική σημασία των πρωτεϊνών που επάγονται εξαρτώνται από την ισορροπία ανάμεσα στα κόστη και στα οφέλη. Το κόστος της έκφρασης των πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την γονιμότητα/αναπαραγωγική ικανότητα, την ενέργεια, την ανάπτυξη και την επιβίωση. Το κόστος φαίνεται να αυξάνει όταν σταματήσουν οι κανονικές κυτταρικές λειτουργίες κατά την διάρκεια της απάντησης σε στρες, από την εκτενή χρήση της ενέργειας και τις τοξικές επιδράσεις των υψηλών συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ κατά την παρέμβασή τους στην κανονική λειτουργία των κυττάρων (Feder & Hofmann, 1999). Πολλές εκθέσεις σε θερμότητα μειώνουν την επιβίωση αλλά δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη.

Παρόλ' αυτά υπάρχουν και άλλες επιδράσεις που σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των hsp70 πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Τα υψηλά επίπεδα μειώνουν η ακόμη μπορεί να επιβραδύνουν την ανάπτυξη, την διαίρεση των κυττάρων (Feder et al., 1992, Krebs & Feder 1997), και την αναπαραγωγή (Krebs & Loeschcke, 1994, Silbermann & Tatar, 2000). Σε προχωρημένες ηλικίες τα επίπεδα της επαγόμενης hsp70 πρωτεΐνης στην *D.melanogaster* είναι χαμηλά.

Φαίνεται να υπάρχει μια γενική σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών της αντίστασης κατά του στρες και των χαρακτηριστικών της μακροζωίας ή της προχωρημένης ηλικίας. Μελέτες σε πολλούς οργανισμούς έδειξαν ότι η έκθεση σε διάφορα θερμικά στρες αυξάνει την μακροζωία.

5.2. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, οι μοριακοί συνοδοί και η απόκριση σε στρες.

Στην παρούσα μελέτη αποκαλύπτεται: α) η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ η οποία συμβαίνει στην φύση β) ότι όλα τα είδη οργανισμών διαθέτουν γονίδια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ τα οποία διαφέρουν στον τρόπο έκφρασή τους γ) η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί να συνδέεται με την αντίσταση κατά του στρες και δ) η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ συνδέεται με τα επίπεδα των στρεσογόνων παραγόντων τα οποία οι οργανισμοί υφίστανται. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως μοριακοί συνοδοί παίζουν διάφορους ρόλους, ακόμα και σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επίδραση από στρεσογόνους παράγοντες, στην επιτυχή πτύχωση, στην συγκρότηση, στην ενδοκυτταρική εντόπιση των γονιδίων, στην έκκριση, στην ρύθμιση καθώς και στην αποικοδόμηση των άλλων πρωτεϊνών (Gething MJ, 1997). Αποτυχία των παραπάνω

δραστηριοτήτων μπορεί να συντελέσει στην εμφάνιση αριθμού σημαντικών ασθενειών στον άνθρωπο (Thomas et al., 1995).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί διότι: αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες και έτσι ελαχιστοποιούν την πιθανότητα οι άλλες πρωτεΐνες να αλληλεπιδράσουν ακατάλληλα η μία με την άλλη. Επιπλέον, αναγνωρίζουν και προσδένονται σε άλλες πρωτεΐνες όταν αυτές οι άλλες πρωτεΐνες βρίσκονται σε μη φυσική χωροδιάταξη, είτε οφειλόμενοι λόγω του στρες σε αποδιάταξη των πρωτεϊνών ή επειδή τα πεπτίδια που περιέχουν δεν έχουν ακόμη πλήρως συνθεθεί, πτυχωθεί, συγκροτηθεί, ή εντοπιστεί σε κατάλληλη κυτταρική διαμερισματοποίηση. Πρόσδεση ή/και αποδεύσμευση αυτών των άλλων πρωτεϊνών συχνά ρυθμίζεται μέσω της συνένωσης και/ή την υδρόλυση των νουκλεοτιδίων.

Τυπικά, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως ολιγομερή, εάν όχι ως σύμπλεγμα πολλών διαφορετικών μοριακών συνοδών, ομο-συνοδών και/ή παραγόντων ανταλλαγής των νουκλεοτιδίων. Η αλληλεπίδραση των μοριακών συνοδών είναι υπεύθυνη για α) την διατήρηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, β) την εντόπιση των οργανιδίων, εισαγωγή, και /η εξαγωγή, γ) την ελαχιστοποίηση της συσσώρευσης των μη-φυσικών πρωτεϊνών και δ) την επίτευξη του στόχου των μη-φυσικών ή συσσωρευμένων πρωτεϊνών για αποικοδόμηση και απομάκρυνση από το κύτταρο.

Εξαιτίας της απάντησης σε διάφορα είδη στρες, η εφαρμογή της θερμικού σοκ απόκρισης είναι πολύ διαδεδομένη στην παρακολούθηση και στην τοξικολογία του περιβάλλοντος (de Pomerai, 1996, Sanders & Dyer, 1994, Ryan & Hightower, 1996).

Είναι γεγονός, πως η χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι πολύ διαδεδομένη και ιδιαίτερα στην υδάτινη τοξικολογία. Βασιζόμενοι στην βιβλιογραφία, αποδεικνύεται ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ή επαγωγή τους είναι αυξημένη υπό συνθήκες εργαστηρίου για τον λόγο αυτό οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ προτείνονται ως πιθανοί δείκτες ρυπογόνων ή τοξινών στο περιβάλλον.

5.2.1 Η ποικιλομορφία της απόκρισης σε στρες μέσω των στοιχείων στρες του περιβάλλοντος.

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η δράση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε σχέση με την ανοχή σε στρεσογόνους παράγοντες σε οργανικό επίπεδο, πολλοί ερευνητές χαρακτήρισαν την απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες μέσω της πυκνότητας της συγκέντρωσης των στοιχείων που υπάρχουν στην φύση. Σύμφωνα, όμως με τα στοιχεία της παρούσας μελέτης αποδεικνύεται ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, της ανοχής σε στρεσογόνους παράγοντες και των στοιχείων που υπάρχουν στο περιβάλλον.

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες εστιάζονται: στις ελάχιστες και μέγιστες θερμοκρασίες στις οποίες εκφράζονται οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ και/ή είναι παρούσες στα κύτταρα, στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στα κύτταρα καθώς και στην ανομοιότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών θερμικού σοκ που εκφράζονται.

Γενικότερα, θα λέγαμε πως η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία επάγονται οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ συνδέεται με την συνήθη θερμοκρασία στην οποία τα διάφορα είδη ζουν, με τα θερμοφιλά είδη να κατέχουν υψηλότερη ελάχιστη θερμοκρασία απ'ότι κατέχουν τα ψυχρόφιλα είδη.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μύδια ψυχρού νερού του είδους *Mytilus trossulus* τα οποία παρουσιάζουν χαμηλότερη ελάχιστη θερμοκρασία για την επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε σχέση με συγγενή μύδια του θερμού νερού του είδους *M.galloprovincialis* (Hofmann & Spmero, 1996).

Πίνακας 6 : Φαινότυποι των πολυκύτταρων ευκαρυωτικών, τα κύτταρα και οι ιστοί που περιέχουν, για τα οποία οι Hsps είναι απαραίτητες και/ή επαρκείς.

Πρωτεΐνη	Φαινότυπος
Hsp10	Κυτταρικό: ανοχή στην ισχαιμία(χωρίς φαινότυπο) ανοχή στην ισχαιμία όταν εκφράζεται με την Hsp60.
Hsp27	Κυτταρικό: αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αντοχή σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, αντοχή σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (χωρίς φαινότυπο), αντοχή σε U.V. (χωρίς φαινότυπο), αντοχή των ογκογενών κυττάρων στα μονοκύτταρα, ευαισθησία στα lymphokine-activated killer cells (χωρίς φαινότυπο), αντοχή στην υπερθερμία, αντοχή στον tumor necrosis factor, ανοχή στην ισχαιμία, αντοχή σε actin polymers to cytochalasin ,επιτάχυνση της συσσώρευσης της πυρηνικής πρωτεΐνης, επιτάχυνση της μείωσης της θερμικής ραδιοευαισθητοποίησης..
Crystallin	Κυτταρικό: ανοχή στην υπερθερμία, ανοχή στην ισχαιμία, αντοχή στον tumor necrosis factor, αντοχή σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.
Hsp60	Κυτταρικό: ανοχή στην υπερθερμία (χωρίς φαινότυπο), ανοχή στην ισχαιμία (χωρίς φαινότυπο), ανοχή στην ισχαιμία όταν εκφράζεται με την Hsp60.
Hsp65	Κυτταρικό: υποτροπή όγκου, απώλεια ογκογένεσης. Ιστός/όργανο: υποτροπή κακοήθη όγκων.
Hsp70	Κυτταρικό: ανοχή στην υπερθερμία , ανοχή σε ισχαιμία/υποξία, ανάκτηση της μεταφραστικής, μεταγραφικής αναστολής που ακολουθεί το θερμικό σοκ ,ρύθμιση της απόκρισης του θερμικού σοκ, ανοχή στην ενδοτοξίνη, μειωμένη αποδιάταξη της πρωτεΐνης έπειτα από έκθεση σε θερμικό σοκ, ογκογένεση, πολ/σμός κυττάρων, αντοχή σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, αντοχή των ογκογενών κυττάρων στα μονοκύτταρα, ευαισθησία στα lymphokine-activated killer cells (χωρίς φαινότυπο), γλυκοζυλίωση πρωτεΐνης, ανοχή σε U.V., απόπτωση, αντοχή στην απόπτωση(χωρίς φαινότυπο). Ιστός/όργανο: ανάκτηση της συσταλτικότητας μετά από την ισχαιμία (μείωση του μυοκαρδιακού επεισοδίου (μείωση της υπερθερμικής βλάβης στο μεσοέντερο, αντοχή της καρδιάς σε ισχαιμική βλάβη, αντοχή στην βλάβη από ισχαιμία. Οργανικό: ανοχή στην υπερθερμία, αύξηση, ανάπτυξη, ρύθμιση της απόκρισης του θερμικού σοκ.
Hsc70	Οργανικό: ανοχή στην υπερθερμία.
Hsp72	Κυτταρικό: απόπτωσης (χωρίς φαινότυπο), προστασία από την θερμότητα-επαγωγή της συσσώρευσης της πυρηνικής πρωτεΐνης, προστασία από την υποξία, προστασία από την θερμική ραδιοευαισθητοποίηση. Ιστός/όργανο: μείωση του μυοκαρδιακού επεισοδίου.
Grp78	Κυτταρικό: έκκριση πρωτεΐνης.
Hsp90	Κυτταρικό: ανοχή στην υπερθερμία, ανοχή σε ισχαιμία (χωρίς φαινότυπο), απόπτωση, απόπτωση (χωρίς φαινότυπο), πολ/σμός κυττάρων, έλεγχος κυτταρικού κύκλου, λειτουργία γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα.

Hsp100	Οργανικό: λοίμωξη Leishmania
Many Hsps	Κυτταρικό: ανάκτηση κυτταρικού πολ/μού έπειτα από θερμικό σοκ, ανάκτηση από την βλάβη στα χρωμοσώματα έπειτα από θερμικό σοκ, ανοχή σε υπερθερμία, ανοχή στην ισχαιμία.
HSF	Οργανικό: ωογένεση και ανάπτυξη,θερμοανεκτικότητα.

Παρόλ'αυτά, αρκετά είναι τα ερωτήματα που παραμένουν αναπάντητα για τον ρόλο των πρωτεϊνών θερμικού σοκ όπως για παράδειγμα, ο τρόπος με τον οποίο δραστηριοποιούνται οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ σε μοριακό και οργανικό επίπεδο, πως δραστηριοποιούνται τα γονίδια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η ρύθμισή τους, οι λειτουργίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν και τα περιβάλλοντα που παρίσταται αντιμετωπίζονται από τους οργανισμούς παραμένουν θέματα τα οποία δεν έχουν ακόμη επιλυθεί.

5.3.Η απόκριση σε θερμικό σοκ: ο ρόλος της hsp70 στην παρακολούθηση του περιβάλλοντος.

Από τις οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η οικογένεια της hsp70 είναι υψηλά συντηρούμενη και η περισσότερο διαδεδομένη. Εκτός από τον κυριότερο ρόλο των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στην άμυνα των κυττάρων υπό συνθήκες στρες, πρόσφατα αριθμός μελετών έχει δείξει το πολύ καλό δυναμικό της χρήσης της πρωτεΐνης hsp70 στην παρακολούθηση της μόλυνσης χρησιμοποιώντας είτε διαγονιακή προσέγγιση in vivo και in vitro.

- **Η απόκριση σε θερμικό σοκ.**

Ο κυριότερος ρόλος των ζωντανών οργανισμών είναι η επιβίωσή τους. Συνεπώς πολύ μηχανισμοί συνάδουν στην επιβεβαίωση της επιβίωσης των κυττάρων κατά την διάρκεια δυσμενών συνθηκών. Τα κύτταρα για να μπορούν να ανταπεξέλθουν επαρκώς ενάντια στις δυσμενείς συνθήκες, προικοδοτούνται από την φύση με «στρες γονίδια» προκειμένου να αντιδράσουν με τοξικές ουσίες είτε αποτοξικοποιώντας τις είτε αντικαθιστώντας την κυτταρική βλάβη που προκαλείται εξαιτίας τους (Lindquist S., 1986, Welch WJ.,1992, Dietz TJ et al., 1993, Parsell DA et al., 1993, Bensaude O. et al., 1996, Lindquist S.,1996).

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εμφανές ότι υπό στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι η έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες, σε ξενοβιοτικά, σε βαρέα μέταλλα, σε ελεύθερες ρίζες, σε υπερϊώδη ακτινοβολία, όλοι οι οργανισμοί μοιράζονται έναν κοινό μοριακό μηχανισμό απόκρισης στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, ο οποίος περιλαμβάνει την δραματική αλλαγή του προτύπου γονιδίου έκφρασης και την γρήγορη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες αναφέρονται ως στρες πρωτεΐνες ή αλλιώς ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ. (Schlesinger MJ et al., 1982, Schlesinger MJ, 1986, Hofmann GE,1999, Lakhotia SC,Prasanth KV, 2002).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αρχικά φαίνονται να εκφράζονται σε απόκριση σε θερμότητα αλλά έπειτα από παρατηρήσεις ότι εκφράζονται σε απόκριση και σε άλλους στρεσογόνους παράγοντες όπως της ωσμωτικής ανισορροπίας, της καταστροφής του DNA, της πρωτεϊνικής αποδιάταξης, καθώς και των παθοφυσιολογικών καταστάσεων όπως του πυρετού, της μόλυνσης, της ισχαιμίας, της κακοήθους νεοπλασίας, της

υπερτροφίας κ.α. εισήχθηκε ο πιο κοινός όρος των «στρες πρωτεϊνών» (Nover L.1984,1991).

Από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ η πιο ευρέως διαδεδομένη είναι η οικογένεια της hsp70, η οποία αυξάνει υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και αναλαμβάνει καινούργιους αλλά σχετικούς ρόλους για την προστασία των κυττάρων από την πρωτεϊνοτοξικότητα (Hightower LE, 1991, Feder ME et al., 1996, De Maio A.,1999, Beere HM et al., 2000, Rockett JC. et al., 2001, Altschuler RA et al., 2002, Barnes JA et al., 2002, Karunanithi S et al., 2002). Η πλήρης κατανόηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί. Παρόλ'αυτά, ερευνητές προσπαθούν να βρουν νέους τρόπους προκειμένου η απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες να χρησιμοποιηθεί στην τοξικολογία.

- **Ο ρόλος της hsp70 στην παρακολούθηση του περιβάλλοντος.**

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παρέχουν πληροφορίες της βιολογικής επίδρασης των τοξικών χημικών στους οργανισμούς καθώς επίσης προβλέπουν και τις δυσμενείς συνέπειες αυτής της έκθεσης.

Εκτενείς μελέτες αποκαλύπτουν ουσιαστικά ότι οποιοσδήποτε μη θερμικός στρεσογόνος παράγοντας μπορεί να επάγει τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Feder ME et al., 1995, Li GC et al., 1996, Kregel KC 2002).

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 αποτελεί μόριο στόχος ή μόριο υπό ερεύνηση επειδή ταυτόχρονα λαμβάνει μέρος σε μηχανισμό άμυνας, επιδιόρθωσης ή αποτοξίκωσης του κυττάρου και επειδή μπορεί να αποτελέσει ως άμεσος και ειδικός δείκτης του κυτταρικού στρεσογόνου παράγοντα (Bierkens JGEA, 2000, Li GC et al., 1991, Williams RS et al., 1993, Heads RJ et al., 1994, Schroder HC et al., 2000).

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 μπορεί να παρέχει επιπλέον αξία στην περιβαλλοντική ανάλυση κινδύνου συμπληρώνοντας τις ήδη υπάρχουσες αναλύσεις, οι οποίες μετρούν συγκεκριμένους τρόπους της τοξικής δράσεως.

Η αποτελεσματικότητα της έκφρασης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 ως βιοδείκτης της περιβαλλοντικής μόλυνσης αποδίδεται από μελέτες διαφόρων ερευνητών (Ryan JA et al., 1996, Dumlap DY et al., 1997, Bierkens J et al., 1998, Werner I et al., 1999, Nadeau D et al., 2001, Varo I et al., 2002, Washburn BS et al., (2002). Πρόσφατα, έγιναν μελέτες προκειμένου να συμπεριληφθούν όλο και περισσότερα ρυπογόνα του περιβάλλοντος έτσι ώστε να αξιολογηθεί αυτή η υπόθεση.

Η έκθεση σπόγγων γλυκέων υδάτων σε ρυπογόνα τα οποία εκχυλίστηκαν από νερό ποταμού, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, τα οποία αυξάνονται περισσότερο όταν επηρεάζονται και από θερμικούς στρεσογόνους παράγοντες (Muller WEG et al., 1995).

Σε χερσαίο περιβάλλον, όπου η μόλυνση από βαρέα μέταλλα, η συσσώρευση από φυτοφαρμακευτικά προϊόντα και ζιζανιοκτόνα μπορούν να αποτελέσουν σοβαρά προβλήματα, συνήθεις οργανισμοί εδάφους, όπως είναι τα ασπόνδυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρωτεϊνών θερμικού σοκ για την παρακολούθηση των τοξικών ουσιών (Kohler HR et al., 1992).

Για παράδειγμα, στα centipedes *Lithobius mutabilis* προερχόμενα από περιοχές μολυσμένες με βαρέα μέταλλα τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης ήταν αυξημένα σε σχέση με εκείνα που συλλέχτηκαν από περιοχές καθαρές, μη μολυσμένες, επιλεγμένα σε διαφορετικές περιόδους (Pyza E et al., 1997).

Ενδεχομένως, οι συνδυασμοί των βαρέων μετάλλων να μπορούν να επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε νηματώδεις εδάφους και συνεπώς αυτή η έκφραση να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό αποτύπωμα για συγκεκριμένες τοξικές ουσίες του εδάφους.

Μειονεκτήματα

Εκτός από τις αναφορές που αναφέρθηκαν προηγουμένως σχετικά με την χρησιμότητα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 στην παρακολούθηση του περιβάλλοντος, υπάρχουν ωστόσο ακόμα ορισμένα μειονεκτήματα ή όρια που περιορίζουν την χρησιμότητά της.

Ο έλεγχος μιας συγκεκριμένης κατηγορίας πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μπορεί να μην παρέχει επαρκώς τον βιοδείκτη για ποικιλία ρυπογόνων και αυτό γιατί διαφορετικοί παράγοντες επάγουν διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ και με διαφορετική αποτελεσματικότητα (de Pomerai D, 1996).

Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές διαφωνούν πως τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ δεν μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλα σημάδια για την παρουσία των ρυπογόνων, εξαιτίας της προσαρμογής σε φυσικού χαρακτήρα διακυμάνσεις υπό συνθήκες περιβάλλοντος (Sanders BM.1993, de Pomerai D,1996).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα συμβαίνει στα καβούρια ακτής προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές μολυσμένες από βαρέα μέταλλα, στα οποία τα επίπεδα των βαρέων μετάλλων που μετρήθηκαν σε ιστούς βραγχίων ήταν αυξημένα, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα επίπεδα αυτά δεν συνδέονται με τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70. Και επομένως, τα αυξημένα επίπεδα των βαρέων μετάλλων στα βράγχια ίσως να μην αποτελούν τοξική απειλή ή εναλλακτικά η απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες να είναι τόσο παροδική ή μεταβλητή ώστε να παρέχει εκ των έσω την έκταση της διαταραχής της κυτταρικής λειτουργίας όταν μετρείται ως μέρος σε μελέτη πεδίου (Pederson SN et al., 1997).

Συνεπώς, η έκφραση των «στρες γονιδίων» και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ευαισθησίας οποιασδήποτε χημικής ουσίας ή φυσικής προσβολής. Πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί και ως βιοδείκτες επίδρασης, οι οποίοι λέγονται επίσης και βιοδείκτες Tier 1 για την εκτίμηση των χημικών ουσιών του περιβάλλοντος. Ωστόσο, απαιτείται επιπλέον έρευνα για να εξακριβωθούν τα ήδη υπάρχοντα μειονεκτήματα της χρήσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 ως βιοδείκτες σε στρεσογόνους παράγοντες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως μοριακοί βιοδείκτες της τοξικότητας του περιβάλλοντος.

Είναι γεγονός ότι συχνά γίνεται η χρήση των στρες πρωτεϊνών ως μοριακοί βιοδείκτες για την παρακολούθηση του περιβάλλοντος, εκτιμώντας τις περιβαλλοντικές εκθέσεις σε τοξικά χημικά και εντοπίζοντας τη ζημιά ως αποτέλεσμα αυτών των εκθέσεων. Χρησιμοποιώντας βιοδείκτες σε μοριακό επίπεδο, ελπίζεται ότι τα προβλήματα που συνδέονται με την έκθεση σε χημικά να μπορούν να αναγνωριστούν πιο αποτελεσματικά και με μεγαλύτερη ευαισθησία, επιτρέποντας έτσι πιο γρήγορο εντοπισμό σε σχέση με την μέτρηση των βιοδεικτών σε ανώτερα επίπεδα ζωής (ιστοπαθολογία, αδυναμία αναπαραγωγής, μαζική θνησιμότητα, έλλειψη ποικιλομορφίας μέσα σε οικολογικές κοινότητες). Αυτή η νέα προσέγγιση παρακολούθησης μπορεί να ενσωματωθεί σε πιο κλασσικές μεθόδους (φυσικές, βιολογικές, χημικές) και να παρέχει περισσότερο αποτελεσματικά την παρακολούθηση και διαχείριση του περιβάλλοντος.

Οι βιοδείκτες είναι μετρήσεις που εφαρμόζονται σε οποιοδήποτε επίπεδο της βιολογικής οργάνωσης είτε σε άγριους πληθυσμούς που ζουν σε -βεβαρυμένα από ρύπους- φυσικά περιβάλλοντα είτε οργανισμοί (περιλαμβάνοντας καλλιεργημένα κύτταρα και ιστούς) εργαστηριακά εκτεθειμένοι σε φυσικούς ή χημικούς στρεσογόνους παράγοντες οι οποίοι παρέχουν δείκτη ευαισθησίας αυτών των εκθέσεων ή δυσμενή μη θανατηφόρα αποτελέσματα των τοξικών χημικών.

Σε υψηλότερα επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης (ιστός, όργανο και οργανισμός), αυτοί οι βιοδείκτες περιλαμβάνουν αλλαγές στον μεταβολισμό, στην φυσιολογία, στην μορφολογία, στην ιστολογία και στην ανοσολογία. Σε χαμηλότερα μοριακά και υποκυτταρικά επίπεδα της οργάνωσης, οι βιοδείκτες κυρίως βασίζονται στις αλλαγές των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών (Fossi & Leonzio, 1994, Huggett et al., 1992, McCarthy & Shugart, 1990).

Προκειμένου οι βιοδείκτες που θα χρησιμοποιηθούν να είναι αποτελεσματικοί και αξιόπιστοι, υπάρχουν ορισμένες απαιτήσεις και όρια που θα πρέπει να γίνουν κατανοητά.

1. Οι βιοδείκτες πρέπει να έχουν βιολογική σημασία: Θα πρέπει να συσχετίζονται με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο ή τη δόση/συγκέντρωση με τις βλάβες που προκαλούνται λόγω στρες ή με άλλες επιδράσεις στον οργανισμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί συγκρίνοντας διαφορές στην συμπεριφορά των βιοδεικτών σε πληθυσμούς από μολυσμένες περιοχές με βιοδείκτες σε αντίστοιχους πληθυσμούς από καθόλου ή ελάχιστα μολυσμένες περιοχές.

Σε επίπεδο εργαστηρίου προσεκτικές μελέτες πάνω στη σχέση δόσης/αποτελέσματος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επίπεδο ολόκληρου ζώου ή κυτταρικής καλλιέργειας συνδέοντας τις εξαρτώμενες από τη δόση μεταβολές με τις μεταβολές σε βιοδείκτες λόγω ειδικού στρεσογόνου παράγοντα.

2. Πρέπει να είναι πιο ευαίσθητοι από ότι στα συμβατικά ορατά αποτελέσματα όπως η αύξηση, η επιβίωση, η αναπαραγωγικότητα, αλλά ακόμη συνδεδεμένοι με τις επιδράσεις στον πληθυσμό και στα επίπεδα του οικοσυστήματος. Είναι πολύ σημαντικό να μπορέσουμε να συνδέσουμε τις αλλαγές σε μοριακό επίπεδο με το κυτταρικό και με τα υψηλότερα επίπεδα των επιδράσεων.

3. Οι βιοδείκτες πρέπει να ευαίσθητοι σε πολλούς διαφορετικούς μολυσματικούς παράγοντες και να μπορούν εύκολα χωρίς μεγάλο κόστος να μετρηθούν και να εντοπιστούν σε ποικιλία οργανισμών.

Πρέπει να γνωρίζουμε αρκετά για τους βιοδείκτες για να προσδιορίσουμε την διαφοροποίηση μεταξύ της φυσιολογικής ποικιλομορφίας (σε ανάπτυξη, αναπαραγωγή, διατροφή, εποχιακές μεταβολές, κτλ.) και τις επιπτώσεις των ανθρωπογενών στρεσογόνων παραγόντων (Depledge, 1994, Stegeman et al., 1992).

Εφόσον, όλοι οι περιβαλλοντικοί ρυπογόνοι παράγοντες επάγουν ή αρχίζουν τις βλαβερές ή τις παθολογικές διαδικασίες τους σε μοριακό ή σε υποκυτταρικό επίπεδο, οι αλλαγές που υφίστανται οι πιθανοί βιοδείκτες σε αυτά τα επίπεδα θα πρέπει να είναι πιο ευαίσθητες από ότι σε υψηλότερα επίπεδα, καθώς με αυτόν τον τρόπο προσδίδουν πολύ γρήγορα τα σημάδια της έκθεσης ή της βλάβης που υπέστησαν (Moore et al., 1994).

Οι αντιδράσεις σε στρεσογόνους παράγοντες σε οργανικό και κυτταρικό επίπεδο μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: 1) αντιδράσεις προσαρμογής για την αποτροπή της βλάβης, 2) αντιδράσεις σε μη θανατηφόρα βλάβη, και 3) αντιδράσεις σε θανατηφόρα βλάβη. Οι πρώτες δυο κατηγορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να χωριστούν οι βιοδείκτες σε δυο υποκατηγορίες:

α) στους βιοδείκτες της επίδρασης και

β) στους βιοδείκτες της έκθεσης (Sanders, 1990).

- (1) **Αντιδράσεις προσαρμογής**, ως αποτέλεσμα της επαφής με πιθανόν τοξικούς στρεσογόνους παράγοντες είναι χρήσιμες ως βιοδείκτες της έκθεσης, λέγονται επίσης και βιοδείκτες Tier 2. Σε μοριακό επίπεδο, οι αντιδράσεις προσαρμογής προτίθενται να αποτρέψουν ή να προστατέψουν τα κύτταρα από την καταστροφή μέσω της αποτοξίκωσης, της δέσμευσης, ή της έκκρισης στρεσογόνων παραγόντων προτού προκαλέσουν βλάβη. Οι περισσότεροι βιοδείκτες συμπεριλαμβάνονται σε αυτήν την κατηγορία, προβάλλοντας την έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες παρά τις επιδράσεις αυτών από ότι τις επιδράσεις τους (Depledge, 1994). Το κυτόχρωμα P450s είναι καλό παράδειγμα των μοριακών βιοδεικτών της έκθεσης.
- (2) **Φυσιολογικές αντιδράσεις σε μη θανατηφόρα βλάβη**, από την οποία ένας οργανισμός ή ένα κύτταρο μπορεί να επανέλθει, είναι χρήσιμες ως βιοδείκτες της επίδρασης, λέγονται επίσης και βιοδείκτες Tier 1. Σε κυτταρικό επίπεδο, η μη θανατηφόρα βλάβη συμβαίνει στην περίπτωση όπου οι άμυνες του οργανισμού δεν είναι επαρκείς, ή μη ικανές να διαχειριστούν την πηγή του στρες, τότε συστήματα μεσολαβούν για να ρυθμίσουν, να επιδιορθώσουν ή να απομακρύνουν την βλάβη ως αντίδραση σε στρεσογόνο παράγοντα. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) και ιδιαίτερα η οικογένεια της hsp70 αποτελεί καλό παράδειγμα των μοριακών δεικτών του επιπέδου Tier 1.
- (3) Η τελευταία κατηγορία, **αντιδράσεις σε θανατηφόρα βλάβη** από την οποία ο οργανισμός ή το κύτταρο δεν μπορεί να επανέλθει (πχ. απόπτωση, νέκρωση) ως αποτέλεσμα της αποτυχημένης λειτουργίας των προστατευτικών μέτρων, συμπεριλαμβάνοντας τους Tier 1 και Tier 2 βιοδείκτες. Αυτές οι αντιδράσεις έχουν μικρή ή καθόλου σημασία ως βιοδείκτες εφόσον συμβαίνουν πολύ αργά για να είναι χρήσιμοι.

Επομένως είναι πολύ σημαντικό να κατηγοριοποιηθεί η αντίδραση, έτσι η πιθανή χρησιμοποίηση της ως βιοδείκτη να μπορεί ακριβώς να καθοριστεί (Depledge, 1994, Mayer et al., 1992).

Υπάρχουν ήδη πολλά στοιχεία για την επαγωγή των πρωτεϊνών του στρες από περιβαλλοντικούς ρυπαντές ή στρεσογόνους παράγοντες (Sanders, 1993, Stegeman et al., 1992).

Όλοι οι οργανισμοί από τα βακτήρια μέχρι και τους ανθρώπους, απαντούν σε πολλούς φυσικούς και χημικούς στρεσογόνους παράγοντες σε κυτταρικό επίπεδο αυξάνοντας έτσι την σύνθεση μιας ομάδας πρωτεϊνών, που καλούνται πρωτεΐνες του στρες. Αυτές οι στρες πρωτεΐνες έχουν δυο κυρίως ρόλους: ο πρώτος είναι η αποτροπή της βλάβης λόγω του στρες και ο δεύτερος εάν ο πρώτος υπερκεραστεί είναι η επιδιόρθωση, ο περαιτέρω περιορισμός και η αποτροπή της βλάβης.

Η πιο ευρέως μελετημένη ομάδα συσχετιζόμενη με το στρες πρωτεϊνών, η οικογένεια Hsp70, αρχικά ταυτοποιήθηκε ως HSPs, τώρα όμως πιστεύουμε ότι επάγονται από μεγάλη γκάμα παραγόντων και συνθηκών που είτε καταστρέφουν τις πρωτεΐνες άμεσα είτε έμμεσα προκαλώντας την κυτταρική παραγωγή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών). Υπάρχουν αρκετές κύριες οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι ακόλουθες hsp70, hsp60, Small HSPs όμως είναι τρεις από τις κύριες ευκαρυωτικές οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ οι οποίες δείχνουν καλή εφαρμογή στην χρησιμοποίησή τους ως περιβαλλοντικοί βιοδείκτες (Sanders 1990, Hightower, 1991).

6.2 Οι βιοδείκτες ως βιολογικοί δείκτες κατά την έκθεση σε ξενοβιοτικά

Η παρουσία των ξενοβιοτικών στο περιβάλλον αποτελεί κίνδυνο για τους ζωντανούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, όσον αφορά την γονιμοποίηση απαιτείται ο εντοπισμός των τοξικών ουσιών στον οργανισμό, της δηλητηρίασης που σχετίζεται με τις αλλοιώσεις σε συγκεκριμένα όργανα καθώς και των κλινικών συμπτωμάτων.

Επιπλέον, η σχέση μεταξύ των επιπέδων των τοξικών ουσιών εντός του οργανισμού και της τοξικής απόκρισης είναι πολύπλοκη και δύσκολο να προγνωστεί εφόσον εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι οι τοξικοκινητικοί και οι γενετικοί παράγοντες.

Μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί ποσοτικά η έκθεση σε ξενοβιοτικά καθώς και η πιθανή επίδρασή τους στους ζωντανούς οργανισμούς, συμπεριλαμβάνοντας και τους ανθρώπους είναι η παρακολούθηση μέσω της χρησιμοποίησης των βιοδεικτών.

Ως βιοδείκτης καθορίζεται η βιολογική απόκριση σε μια χημική ουσία ή σε ομάδα χημικών παραγόντων αλλά όχι η παρουσία του παράγοντα ή των μεταβολιτών του εντός του οργανισμού (εσωτερική δόση) (Walker et al., 1996). Ωστόσο, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η μέτρηση των ξενοβιοτικών σε ένα βιολογικό σύστημα ή δείγμα αποτελεί βιοδείκτη της έκθεσης και γι αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως βιοδείκτης.

Η βιολογική παρακολούθηση έχει πλεονεκτήματα πέραν της περιβαλλοντικής παρακολούθησης διότι μετρά την εσωτερική δόση ενός σκευάσματος/μίγματος. Διαφορές στην απορρόφηση, στην βιοδιαθεσιμότητα, στην απέκκριση και στην επιδιόρθωση του DNA θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη καθώς επίσης και διαφορές ως συνέπεια συγκεκριμένων φυσιοπαθολογικών μετατροπών που συμβαίνουν σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο (Lauwerys, 1993).

➤ Η εξειδίκευση των βιοδεικτών

Ο ιδανικός βιοδείκτης θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά. (Grandjean et al., 1994):

- 1) Να είναι συγκεκριμένος για συγκεκριμένο τύπο έκθεσης.
- 2) Να ανακλά μόνο σε υποκλινική και αντιστρεπτή αλλαγή.
- 3) Η συλλογή του δείγματος και της ανάλυσης θα πρέπει να είναι απλή και αξιόπιστη.

➤ Κατηγοριοποίηση των Βιοδεικτών

Οι βιοδείκτες διαχωρίζονται στις εξής τρεις κατηγορίες:

Βιοδείκτες έκθεσης: επιτρέπουν την μέτρηση της εσωτερικής δόσης ενός ξеноβιοτικού παράγοντα, ο οποίος αλληλεπιδρά με κάποιο μόριο στόχο ή κύτταρο μέσω της χημικής ανάλυσης των τοξικών σκευασμάτων ή των μεταβολιτών τους σε σωματικό υγρό ή σε απεκκρίματα όπως αίμα, ουρία (Repetto M, Van Cauteren et al., 1996).

Βιοδείκτες επίδρασης: αποτελούν ένδειξη των βιοχημικών αλλαγών σε έναν οργανισμό ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε ξеноβιοτικά. Οι ιδανικοί βιοδείκτες είναι αυτοί που μπορούν να εντοπίζονται πρώιμα και να δείχνουν τις δυσμενείς επιδράσεις προτού γίνουν αντιστρεπτές.

Βιοδείκτες επιδεκτικότητας-ευαισθησίας: αποτελούν δείκτες της έμφυτης ή της αποκτούμενης ικανότητας ενός οργανισμού να ανταποκρίνεται στην πρόκληση της έκθεσης σε ένα συγκεκριμένο ξеноβιοτικό.

(Silbergeld & Davis, 1994, Walker et al., 1996, Derosa et al., 1993, Repetto M.).

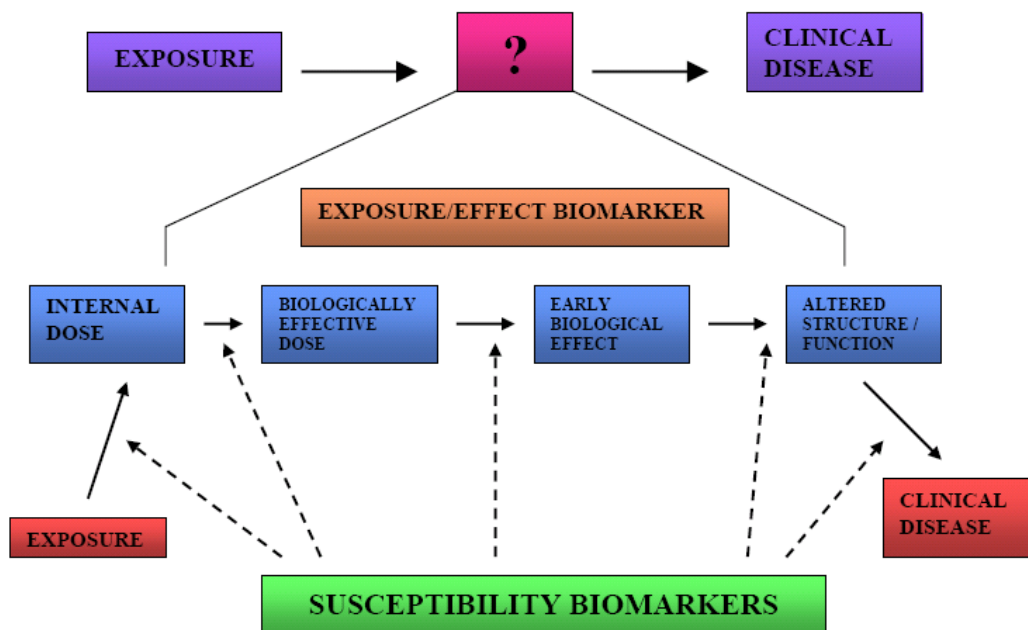


Figure 2.1: Paradigm and role of specific biomarker classes from exposure to disease (adapted from Schlenk, 1999).

➤ **Βιοδείκτες γονιδιακής έκφρασης (Biomarkers of gene expression)**

Η ανάπτυξη πολλών όγκων που σχετίζεται με τα ξеноβιοτικά συνδέεται με την έκφραση των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτή η έκφραση μπορεί να περιλαμβάνει μια ποσοτική διαφορά (υπερέκφραση της πρωτεΐνης) και μια ποιοτική διαφορά (έκφραση μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης).

Έχει αναφερθεί ότι σε υποκείμενα ανάπτυξης καρκίνου, κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της ασθένειας, διακρίνεται σημαντική αύξηση των βιοδεικτών γονιδιακής έκφρασης οι οποίοι σχετίζονται με συγκεκριμένο είδος καρκίνου.

➤ **Βιοδείκτες που προκαλούν οξειδωτική βλάβη**

Ρυπογόνα όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), οι αλογονούχοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, το σελήνιο, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και βιομηχανικά απόβλητα είναι ικανά να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη, ιδιαίτερα από τις ελεύθερες ρίζες. Σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες, ίσως να υπάρχουν προσαρμοσμένες αποκρίσεις των αντιοξειδωτικών συστημάτων, τροποποίηση των κυτταρικών μακρομορίων και στο τέλος βλάβη στους ιστούς.

Οι αλλαγές των αντιοξειδωτικών συστημάτων καθώς και τροποποιημένα μακρομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για ποικιλία ξеноβιοτικών. Τα προστατευτικά συστήματα περιλαμβάνουν την οξειδωμένη γλουταθειόνη/ανηγμένη γλουταθειόνη, γλουταθειόνη αναγωγή, την καταλάση, την υπεροξειδωμένη δισμουτάση κ.α. Τα μακρομόρια τα οποία ίσως να επηρεαστούν από την βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα (Hoffman et al., 1989, Di Giulio et al., 1989, Hogson & Levi, 1994).

Ως συμπέρασμα καταλήγουμε ότι οι δείκτες της βιολογικής τοξικότητας αποτελούν σημαντικό εργαλείο στην τοξικολογία για τους εξής λόγους:

- Επιτρέπουν να εκτιμηθεί η βιολογική επίδραση στον συγκεκριμένο ιστό-στόχο
- Αποτελούν δείκτες υποκλινικών μετατροπών, δείκτες ευαισθησίας στην παθολογία και μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν σε διαγνωστικές και προληπτικές αναλύσεις.

Οι βιοδείκτες λαμβάνουν υπόψην τους την εσω και ενδο-ατομική μεταβλητότητα σε απόκριση στα ξеноβιοτικά

6.3. Μέθοδοι εντοπισμού των στρες πρωτεϊνών και η χρήση τους ως βιοδείκτες του περιβάλλοντος.

Για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών θερμικού σοκ οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η western blot ανάλυση και η slot blot ανάλυση, η radioimmunoassay (RIAs)-ραδιοανοσοδοκιμασία και η enzyme linked immunosorbant assay (ELISAs).

Ο σκοπός του ποσοτικού προδιορισμού των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι η παρατήρηση των πιθανών αλλαγών των συγκεντρώσεων τους καθώς και η εξακρίβωση της πιθανής σχέσης αυτών των συγκεντρώσεων με τους ξеноβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες.

Οι αλλαγές στην δραστηριότητα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση των αλλαγών στο περιβάλλον πχ. της θερμοκρασίας καθώς και της μόλυνσης του οικοσυστήματος με ρυπογόνα.

- **Υπόστρωμα για την ανάλυση της hsp70**

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ απαιτούνται ιστοί από το ίδιο όργανο από κάθε πειραματόζωο. Διαφορετικά είδη ιστών έχουν δείξει να είναι περισσότερο ή λιγότερο χρήσιμα κατά την παρακολούθηση των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ, hsp70 βρίσκεται στον εγκέφαλο, στους ιστούς των μυών, στα βράγχια των ιχθύων και στο ήπαρ. Ανάλογα με το είδος του ιστού η hsp70 επάγεται με διαφορετικούς ρυθμούς και έχει διαφορετική δραστηριότητα. Ο εγκέφαλος μπορεί να συνθέτει λιγότερο την πρωτεΐνη hsp70 συγκριτικά με τους μύες κατά την διάρκεια έκθεσης σε θερμικό στρες (Dyer et al., 1993b).

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη hsp70 δεν επάγεται αναλογικά σε όλους τους οργανισμούς.

Πίνακας 7: Ορισμένες γημικές ενώσεις – περιβαλλοντικές επιδράσεις οι οποίες επάγουν την σύνθεση των Stress πρωτεϊνών.

<u>Περιβαλλοντικό stress</u>	<u>Είδη που μελετήθηκαν</u>
Χαλκός, copper	Mussel (<i>Mytilus edulis</i>) ^a , algae (<i>Enteromorpha compressa</i>) ^{b,c} , Shore crab (<i>Carcinus maenas</i>) ^d , Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^e .
Αρσενικό, As	Xenopus ^f , Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) ^g , <i>Tetrahymena pyriformis</i> ^h , Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^e .
Μίγματα τοξικών μετάλλων	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ^l , Shore crab ^j
Θερμικό stress	Teleost fish (<i>Gillichthys mirabilis</i>) ^{k,l} , rainbow trout ^m , salamanders & freshwater turtles ⁿ , rat ^o , Mussel (<i>Mytilus trossulus</i>) ^p
Υπεριώδη ακτινοβολία, UV radiation	Bacteria (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>) ^q
Μόλυβδος, Pb	Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^e , Rat ^r
Κάδμιο, Cd	Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^e , Amphipods (<i>A. abdita</i> , <i>R. abronius</i> , <i>H. azteca</i>) ^s , rat ^t , fish cell lines ^u
Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα	Amphipods (<i>A. abdita</i> , <i>R. abronius</i> , <i>H. azteca</i>) ^s
Fluorothene (PAH)	Amphipods (<i>A. abdita</i> , <i>R. abronius</i> , <i>H. azteca</i>) ^s
Tributyl tin	Mussel (<i>Mytilus edulis</i>) ^{v,w}
Υδράγυρος, Hg	Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^e
Άργυρος, silver	<i>Daphnia magna</i> ^x

^a Sanders et al., 1990, ^b Reed and Moffat, 1983, ^c Lewis et al., 1998, ^d Vedel and Depledge, 1995, ^e Strigham and Candido, 1994, ^f Ali et al., 1996, ^g Dyer et al., 1993a, ^h Amaral et al., 1988, ⁱ Williams et al., 1994, ^j Pedersen and Lundbye, 1996, ^k Dietz, 1994, ^l Kultz, 1996, ^m Currie and Tufts, 1997, ⁿ Yu et al., 1994, ^o Mestril et al., 1994, ^p Hofmann and Somero, 1995, ^q Neple and Bachofen, 1997, ^r Groering, 1993, ^s Werner and Nagel, 1997, ^t Groering et al., 1993, ^u Ryan et al., 1995, ^v Lundbye et al., 1996, ^w Steinert and Pickwell, 1993, ^x Bradley, 1993.

6.4 Παραδείγματα βιοδεικτών έκθεσης-επίδρασης

- **Η hsp70 ως βιοδείκτης επίδρασης ρυπογόνων σε γαιοσκώληκα *Lumbricus terrestris*.**

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ, hsp70 ανήκει σε πολυγονιδιακή οικογένεια. Σε μοριακό επίπεδο αποτελεί μια πρωτεΐνη συνοδό η οποία αντιδρά με αδίπλωτες πρωτεΐνες και νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια και βοηθά στην απόκτηση της κατάλληλης τρισδιάστατης χωροδιάταξης εμποδίζοντας έτσι την δημιουργία λανθασμένων μη λειτουργικών πρωτεϊνών ενώ ακόμη εμπλέκονται στην μεταφορά ή στην επιδιόρθωση των πρωτεϊνών (Lindquist & Craig, 1988, Schlesinger, 1990, Becker & Craig, 1994, Morimoto et al., 1994, Hartl, 1996, Fink, 1999).

Σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε στρεσογόνους παράγοντες ο κύριος ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ της οικογένειας hsp70 είναι ο επανασχηματισμός των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών αποτρέποντας την συσσώρευση των μη επιθυμητών πρωτεϊνών και βοηθούν στην διαμεμβρανική μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο μέσω της σταθεροποίησης των μερικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

Επιπρόσθετα, βοηθούν στην επαναδιάταξη των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών έπειτα από επίδραση θερμικού σοκ ή έκθεση σε πρωτεοτοξικούς στρεσογόνους παράγοντες.

Επειδή αυτές οι πρωτεΐνες είναι καλά διατηρούμενες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της επίδρασης, οι οποίοι λέγονται επίσης και βιοδείκτες Tier 1 δείχνοντας έτσι ότι τα κύτταρα έχουν υποστεί υποθανατηφόρα βλάβη ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε περιβαλλοντικά στρες.

Συγκεκριμένα, σε μελέτη που έγινε, εξετάστηκαν με την μέθοδο της western blot ανάλυσης οι ιστοί του μέσου εντέρου ενός γαιοσκώληκα του *Lumbricus terrestris* οι οποίοι έδειξαν ότι εκφράζει την πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 έπειτα από έκθεσή του σε θερμικό σοκ *in vitro* καθώς και έπειτα από έκθεσή του σε διάφορα τοξικά του εδάφους *in vivo*.

Οι γαιοσκώληκες αποτελούν κύρια ασπόνδυλα της βιομάζας του εδάφους, είναι τα πρώτα είδη «ζώων» που επηρεάζονται από τα ρυπογόνα του εδάφους, ενώ ο τρόπος της διατροφής τους και η μεγάλη τους επιφάνεια διευκολύνει την αφομοίωση καθώς και την γρήγορη κατανομή των τοξικών στους ιστούς.

Κύριος στόχος είναι οι ιστοί του μέσου εντέρου εφόσον αποτελούν ιστοί-κλειδιά για την αφομοίωση των στοιχείων του εδάφους (Prento, 1987). Τα ρυπογόνα του εδάφους μπορεί να προκαλέσουν παθοφυσιολογικές επιδράσεις στο όργανο του μέσου εντέρου (Yongcan et al., 1998) για το λόγο αυτό πολλοί μηχανισμοί αποτοξίκωσης συνδέονται με τους ιστούς του (Ireland, 1978, Stenersen, 1984, Prento, 1987, Morgan et al., 1993, Prento, 1994).

Η έκθεση του γαιοσκώληκα σε χημικά τοξικά όπως είναι α) pentachlorophenol (PCP) και β) chloroacetamine (CLA) καθώς και σε βαρέα μέταλλα (Pb, Cd, Cu, και Hg) για μικρό χρονικό διάστημα (24-72 ώρες) και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (14-16 ημέρες) έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 σε ιστούς του μέσου εντέρου.

Η επαγωγή πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 στους γαιοσκώληκες αντιπροσωπεύει όχι μόνο έναν καλό ευρέως φάσματος βιοδείκτη έκθεσης αλλά ακόμη και ενός βιοδεικτη επίδρασης εφόσον τα τοξικά χημικά τροποποιούν την έκφραση των γονιδίων στους

ιστούς των πειραματόζωων, συγκριτικά με μια απλή συσσώρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Επιπρόσθετα, ο εντοπισμός της επαγωγής της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 στους γαιοσκώληκες συνιστά σε πρώιμο στάδιο προειδοποιητικό δείκτη της παρουσίας πιθανών δηλητηριωδών παραγόντων στο έδαφος.

- **Η Hsp60 ως βιοδείκτης επίδρασης σε γημικά**

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ, Hsp60 εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και εντοπίζεται στην περιοχή των μιτοχονδρίων. Εξαιτίας αυτής της υποκυτταρικής θέσης, η Hsp60 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης επίδρασης των χημικών, τα οποία προκαλούν διαταραχή στα μιτοχόνδρια.

- **Small HSPs ως βιοδείκτες επίδρασης του στρες**

Οι Small HSPs αποτελούν μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού σοκ 15-30 kDa. Ο ρόλος τους σε κυτταρικό επίπεδο δεν είναι τόσο κατανοητός, παρόλ' αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην δέσμευση της ακτίνης προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα μικρονημάτια. Μπορούν να λειτουργήσουν ως μοριακοί συνοδοί (Arrigo & Landry, 1994), όπως επίσης και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες των επιδράσεων των στρεσογόνων παραγόντων σε συγκεκριμένα σηματοδοτούμενα μονοπάτια, ή ως στόχοι όπως είναι ο κυτταροσκελετός, ωστόσο απαιτείται εκτενέστερη μελέτη των κυτταρικών ρόλων τους για να αξιολογηθεί η χρήση τους ως βιοδείκτες.

Επιπλέον, μπορούν να αποτελέσουν μαζί με τις άλλες πρωτεΐνες καλή εφαρμογή στην χρησιμοποίησή τους ως περιβαλλοντικοί βιοδείκτες (Sanders, 1990, Stegeman et al., 1992).

6.5 Εφαρμογές Βιοδεικτών

Οι μοριακοί βιοδείκτες ενδεχομένως να είναι χρήσιμοι σε αριθμό σημαντικών περιβαλλοντικών εφαρμογών. Ως δείκτες ευαισθησίας της έκθεσης και της επίδρασης, έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να συγκρίνουν οργανισμούς από περιοχές μολυσμένες με εκείνους τους οργανισμούς από περιοχές μη μολυσμένες. Στο εργαστήριο, οι βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί με *in vitro* βιοαναλύσεις για την εκτίμηση πιθανών περιβαλλοντικών επιδράσεων διαφόρων σκευασμάτων ξεχωριστά, και για να εξακριβωθεί η παρουσία ρυπογόνων σε δείγματα που έχουν εκτεθεί, ως μέρος προγραμμάτων περιβαλλοντικών ελέγχων.

Μια εναλλακτική προσέγγιση της περιβαλλοντικής παρακολούθησης είναι να χρησιμοποιηθούν εκτός από πειραματόζωα και καλλιέργειες κυττάρων. Έτσι, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κυττάρων παρέχεται ένας πιο γρήγορος, αποτελεσματικός και οικονομικός τρόπος για την διαλογή πιθανών περιβαλλοντικών παραγόντων του στρες, όπως επίσης για τον έλεγχο δειγμάτων από μολυσμένες περιοχές προκειμένου να αξιολογηθούν τα επίπεδα ή το είδος της μόλυνσης. Για τον εντοπισμό ή τον ποσοτικό προσδιορισμό μοριακών βιοδεικτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά η καλλιέργεια κυττάρων, αντί δύσκολων ενζυμικών αναλύσεων, η οποία μέσω της

γενετικής μηχανικής μπορεί να εκφράσει ποικιλία γονιδίων αναφοράς των οποίων τα προϊόντα είναι εύκολο να μετρηθούν.

Όταν μελετούνται οι βιοδείκτες επίδρασης είναι πολύ σημαντικό να συνδέουμε τις αλλαγές που επάγονται λόγω των στρεσογόνων παραγόντων στα επίπεδα των βιοδεικτών αντίστοιχα με τις αλλαγές που επάγονται (λόγω των στρεσογόνων παραγόντων) σε φυσιολογική κατάσταση ή υγεία του κυττάρου ή του οργανισμού.

Η καλλιέργεια κυττάρων μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την αξιολόγηση πιθανών μοριακών βιοδεικτών υπό ελεγχόμενες συνθήκες προτού ξεκινήσουν οι μελέτες πεδίου. Οι Ryan & Hightower, 1994 ανέπτυξαν ένα απλό in vitro σύστημα σε καλλιέργειες κυττάρων ιχθύων που εκτέθηκαν σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες προκειμένου να προσδιοριστούν ως πιθανοί βιοδείκτες.

Χρησιμοποιήθηκε η SDS-PAGE για να εντοπιστούν οι στρεσογόνοι παράγοντες που επάγονται, η συγκέντρωση η οποία είναι εξαρτώμενη από τις αλλαγές στα επίπεδα των stress πρωτεϊνών ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση neutral red cytotoxicity για να προσδιοριστούν τα αποτελέσματα αυτών των στρεσογόνων παραγόντων στην κυτταρική φυσιολογία.

Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση εξαρτάται από την σχέση μεταξύ των μη-θανατηφόρων κυτοτοξικών αποτελεσμάτων και της αύξησης των επιπέδων των stress πρωτεϊνών (hsp70 και hsp27) σε κυτταρική σειρά που προέρχεται από ηπάτωμα του *Pleuroctes americanus* της ερήμου η οποία είναι λειτουργικά όμοια με του ανθρώπου HepG2. Αυτές οι αυξήσεις στα επίπεδα των πρωτεϊνών ήταν αντιστρεπτές, όταν οι στρεσογόνοι παράγοντες απομακρύνθηκαν από τις καλλιέργειες κυττάρων και τα κύτταρα αφέθηκαν να επανακτήσουν την φυσιολογική τους λειτουργικότητα για μερικές ημέρες, τα επίπεδα των stress πρωτεϊνών ταχύτατα επέστρεψαν στα κανονικά τους επίπεδα.

6.6 Εντοπισμός των βιοδεικτών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών μελετητές (Hahn et al.1993, Collier et al., 1995) χρησιμοποίησαν την ενζυμική δραστηριότητα και τις ανοσολογικές αναλύσεις (Western blotting, dot blotting, και Elisa), εφόσον η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να τροποποιηθεί κατά την διάρκεια της διαδικασίας ή να περιοριστεί από στρεσογόνους παράγοντες.

Συνεπώς η ποσότητα και η δραστηριότητα των στρες πρωτεϊνών στο κύτταρο και όχι οι ρυθμοί της σύνθεσης και της αποικοδόμησης, ή η ποσότητα των επιπέδων mRNA, είναι αυτοί που καθορίζουν την φυσιολογική τους επίδραση,άρα οι stress πρωτεΐνες φαίνονται να είναι πολύ καλοί πιθανοί βιοδείκτες, οι περισσότερες από αυτές έχουν αξιολογηθεί ως βιοδείκτες έκθεσης. Παρόλα αυτά είναι δύσκολο να συνδεθούν άμεσα με την φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου ή του οργανισμού.

Είναι όμως ακόμη πιθανό να συνδεθούν άμεσα και ως βιοδείκτες επίδρασης με δυσμενή φυσιολογικές καταστάσεις σε κυτταρικό και οργανικό επίπεδο.

6.7. Αναφορές των Πρωτεϊνών Θερμικού σοκ ως Βιοδείκτες Τοξικότητας

6.7.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της Hsp 70.

Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp), παίζουν προστατευτικό ρόλο στα κύτταρα που εκτείνονται σε στρες. Ωστόσο, ουσιαστικά εκφράζονται (heat shock cognates, hsc) ακόμη και υπό κανονικές συνθήκες (Ashburner, 1982).

Εως τώρα, δεν ήταν πιθανό να διευκρινιστεί ακριβώς πιο συγκεκριμένο γονίδιο ενεργοποιείται κατά την διάρκεια και μετά την έκθεση σε στρες, ποια συγκεκριμένη πρωτεΐνη από την οικογένεια της hsp70 εκφράζεται και ποιος ο κυτταρικός τους ρόλος.

Ακόμη βέβαια πιο δύσκολο είναι να ερμηνευτεί ποσοτικά η ανάλυση της hsp70, ειδικά σε όλο τον οργανισμό.

Πρόσφατα, η έκφραση της hsp70 έχει προταθεί ως βιοδείκτης τοξικότητας σε οικοτοξικολογικές μελέτες (Sanders, 1990, Köhler et al., 1992). Υπάρχουν όμως ορισμένες δυσκολίες, στην χρησιμοποίηση της hsp70 πρωτεΐνης ως βιοδείκτη τοξικότητας.

Πρώτον, υπό κανονικές μη στρεσογόνες συνθήκες οι θερμικού σοκ μοριακοί συνοδοί, hsc αποκωδικοποιούνται από γονίδια παρόμοια με την αλληλουχία του DNA και έχουν παρόμοια λειτουργία με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, Hsp στα κύτταρα (Craig, 1985).

Το ποσοστό των μοριακών συνοδών θερμικού σοκ, Hsc δεν είναι γνωστό και ίσως να διαφέρει στα κύτταρα και καθώς ακόμη σε διαφορετικές ομάδες οργανισμών. Επιπλέον, οι περισσότερες μέθοδοι εντοπισμού των πρωτεϊνών θερμικού σοκ βασίζονται σε δοκιμές με μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία δεν διακρίνουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (hsp) από τους θερμικού σοκ μοριακούς συνοδούς (hsc) (Yu et al., 1994).

Δεύτερον, η έκφραση και η συσσώρευση της hsp70 ρυθμίζονται σε πολλαπλά επίπεδα και εκθέτουν διαφορές σε διαφορετικά είδη κυττάρων (Velazquez & Lindquist, 1984, Lindquist, 1993).

Τρίτον, η έκφραση της hsp70 εξαρτάται από συγκεκριμένους παράγοντες, δύσκολο να ελεγχθούν εφόσον άτομα του ίδιου είδους, της ίδιας ηλικίας, και όταν έχουν υποστεί θερμικό σοκ κάτω από τις ίδιες εργαστηριακές συνθήκες αποκαλύπτουν διαφορές στην έκφραση της hsp70 πρωτεΐνης (Feder et al., 1996).

Σε μελέτη που έγινε εξετάστηκε εάν η συγκέντρωση της hsp70 πρωτεΐνης σε πειραματόζωα μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εντοπιστεί η κατάσταση του στρες που προκαλείται από τα παρασιτοκτόνα, τα απορρυπαντικά και τα βαρέα μέταλλα σε δύο είδη ασπόνδυλων: the centipede *Lithobius mutabilis*, Chilopoda, and the housefly *Musca domestica*. Στα centipedes συγκρίθηκαν τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης, τα οποία αντιμετωπίστηκαν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες με διαφορετικές δόσεις από dimethoate (DMT, εντομοκτόνο), linear alkilobenzene sulfonate (LAS, απορρυπαντικό) και χαλκό (Cu, μέταλλο).

Τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης μετρήθηκαν ακόμη σε centipedes εδάφους (field collected centipedes), προερχόμενα από περιοχές μολυσμένες με βαρέα μέταλλα και από περιοχές καθαρές, μη μολυσμένες, επιλεγμένα σε διαφορετικές περιόδους.

Ακόμη, εξετάστηκαν οι επιδράσεις των διαφορετικών θερμοκρασιών στα επίπεδα της hsp70 στα centipedes διατηρούμενα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, καθώς επίσης και επιδράσεις του DMT και του LAS στα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης στην housefly's pupae χρησιμοποιώντας την ως τροφή για τα εξεταζόμενα centipedes.

Το περιεχόμενο της hsp70 εξαρτάται από το στάδιο της ανάπτυξης του πειραματόζωου και την ηλικία), centipedes με παρόμοιο σωματικό βάρος και που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη, στην περίπτωση των ασπόνδυλων, σχετίζονται με το δικό τους στάδιο ανάπτυξης (Albert, 1983 Arrigo & Tanguay, 1991, Wheeler et al., 1995). Η διάρκεια ζωής του *Lithobius mutabilis* είναι περίπου στα 6 χρόνια, ωστόσο δεν ήταν πιθανό να προσδιοριστούν τα νεαρά και ηλικιωμένα άτομα που συλλέκθηκαν από το έδαφος.

Μια μικρή αύξηση στο περιεχόμενο της hsp70 διαπιστώθηκε στα χειριζόμενα με DMT centipedes, και ακόμα πιο αξιοσημείωτη είναι η τάση προς αύξηση στα πειραματόζωα που χειρίστηκαν με LAS αλλά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών που χειρίστηκαν με DMT, LAS και αυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς. Επίσης στα centipedes που εκτέθηκαν σε χαλκό (Cu) δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο περιεχόμενο της hsp70 μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και αυτών που χειρίστηκαν με χαλκό.

Τα επίπεδα της hsp70 των centipedes που συλλέκθηκαν την ίδια εποχή σε μολυσμένες περιοχές ήταν αυξημένο σε αντίθεση με αυτό στις μη μολυσμένες περιοχές. Εξαιτίας όμως της μεγάλης μεταβλητότητας η διαφορά αυτή δεν θεωρείται σημαντική.

Η μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα της hsp70 βρέθηκε στα centipedes που συλλέκθηκαν από ίδιες περιοχές αλλά σε διαφορετική όμως εποχή. Υπήρξε αύξηση της hsp70 σε δείγματα που συλλέκθηκαν τον Μάρτιο σε σύγκριση με αυτών που συλλέκθηκαν τον Σεπτέμβριο και η διαφορά αυτών ήταν αρκετά σημαντική. Επίσης, όταν τα δείγματα εξετάστηκαν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες σε θερμοκρασίες 5, 15, 25 °C βρέθηκε ότι το ποσοστό της hsp70 ήταν υψηλότερο σε δείγματα που διατηρήθηκαν στους 25 °C αντίθετα με αυτό που διατηρήθηκαν στους 5 °C. Η μεγαλύτερη μέση αριθμητική τιμή των επιπέδων της hsp70 βρέθηκε στους 15 °C και τα δείγματα που διατηρήθηκαν σε αυτή την θερμοκρασία παρουσίασαν επίσης την μεγαλύτερη μεταβλητότητα.

Με την ανοσοϊστοχημική χρώση, έντονη χρώση βρέθηκε σε ορισμένα κύτταρα του εγκεφάλου, στους οφθαλμούς στον πεπτικό σωλήνα, στους γενετικούς αδένες και στους μυες, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Συμπερασματικά η έκφραση της hsp70 είναι γνωστή σε απάντηση για στρες, στα κύτταρα και σε όλους τους οργανισμούς οι οποίοι έχουν εξεταστεί έως τώρα, διαπιστώθηκε ότι το επίπεδό τους πάντα αυξανόταν έπειτα από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ.

Σε αυτήν την μελέτη έγινε μια προσπάθεια να ανακαλυφθεί εάν διάφορα ανθρωπογενετικά χημικά μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της hsp70 στα centipedes και αν ακόμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στην περιβαλλοντική μόλυνση αυτών των ειδών.

Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν αποδεικνύουν ότι το περιεχόμενο της hsp70 σε σώμα ζώου δεν συνδέονται ξεκάθαρα με την έκθεση τους σε βλαβερά χημικά. Σε όλα τα δείγματα των centipedes που συλλέκθηκαν από μη μολυσμένες περιοχές η hsp70 πρωτεΐνη ήταν πάντα παρούσα σε ανιχνεύσιμες ποσότητες. Αυτό σημαίνει ότι το centipede *Lithobius mutabilis* ίσως να έχει υψηλά επίπεδα σε hsp70/hsc υπό κανονικές και μη στρεσογόνες συνθήκες ή υπάρχουν άλλοι παράγοντες δύσκολο να ελεγχθούν, οι οποίοι επάγουν την έκφραση της hsp70 σε πειραματόζωα χωρίς θεραπευτική αγωγή (μη μεταχειρισμένα ζώα -untreated animals).

Η πρώτη εξήγηση πιστεύεται να είναι πιθανή εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας ζωής του *Lithobius mutabilis* και των άλλων centipedes και καθ'όλη την διάρκεια της (Wignarajah

& Phillipson, 1977) δραστηριότητάς τους (their year-round activity) σε μια κλίμακα διαφόρων θερμοκρασιών.

Εποχικές αλλαγές στα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης που εντοπίστηκαν στα centipedes, τα οποία συλλέχτηκαν από την ίδια περιοχή αλλά σε διαφορετικές χρονικές περιόδους επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι τα επίπεδά τους ίσως να είναι σημαντικά για την προσαρμογή τους σε ένα περιοδικά αλλαγμένο περιβάλλον.

Σε πρόσφατες μελέτες που έγιναν, παρατηρήθηκε ότι το επίπεδο της hsp70 πρωτεΐνης ήταν το ίδιο σε centipedes τα οποία επιλέχτηκαν από περιοχή μολυσμένη με μόλυβδο και ψευδάργυρο (Tursman et al., 1994).

Η ανεκτικότητα αυτών των συγκεκριμένων ειδών μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας το περιεχόμενο της hsp σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, ιδιαίτερα για κάθε είδος, το οποίο διατηρείται σε ποικιλία μολυσμένων συγκεντρώσεων.

Δεν μπορεί όμως να αυξάνεται συνεχώς καθώς το κόστος της έκφρασης της hsp70 μπορεί να υπερβαίνει των οφελών.

Στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι σε εργαστηριακές δοκιμές τα πειραματόζωα, τα οποία εκτέθηκαν σε υψηλές ποσότητες βαρέων μετάλλων ή άλλων τοξικών χημικών συχνά παρουσιάζουν μείωση στο περιεχόμενο της hsp70 σε σύγκριση με αυτών που εκτέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Köhler et al., 1991).

Εργαστηριακές δοκιμές με Cu, Las και DMT που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξαν ότι η επίδραση αυτών των χημικών στο περιεχόμενο της hsp70 σε δείγμα του *Lithobius mutabilis* είναι ασθενής.

Ενώ, υπήρξε μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων των centipedes που υπέστησαν την ίδια θεραπεία, μικρές ή μη εντοπίσιμες διαφορές στο περιεχόμενο της hsp70 κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ουσιών, και υψηλά επίπεδα της hsp70 σε ελεγχόμενα centipedes χωρίς θεραπευτική αγωγή.

Παρόλ'αυτά, βρέθηκαν για μερικά είδη ασπόνδυλων (Köhler et al., 1992,1996) και σπονδυλωτών (Williams, 1996) σχέσεις μεταξύ της έκθεσης σε τοξικές ουσίες και της Hsp έκφρασης.

Μελέτη που έγινε στους ιστούς των centipedes προκειμένου να προσδιοριστεί η hsp απέδειξε ότι όλοι οι ιστοί πιθανόν να περιέχουν hsp/hsc. Αυτό αποδεικνύει ότι οι προσπάθειες που έγιναν για να προσδιοριστούν οι hsps σε μελέτες σε συγκεκριμένο ιστό δεν υπόσχονται περισσότερη επίλυση από εκείνη που αποκτήθηκε σε οργανικό επίπεδο.

Ακόμη, αυτό αποτελεί ένδειξη ότι σε οργανικό επίπεδο οι hsps πιθανόν να επάγονται σε όλους τους ιστούς, ανεξάρτητα της πραγματικής έκθεσης, ενός συγκεκριμένου ιστού σε στρεσογόνο παράγοντα.

Η απάντηση ενός πειραματόζωου σε στρεσογόνα χημικά είναι μια πολύπλοκη αντίδραση, η οποία εξαρτάται από το είδος του χημικού και επηρεάζεται από πολλούς εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες. Ακόμη και κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, το ποσοστό της hsp70 δεν αυξάνει πάντα κατά την διάρκεια του θερμικού σοκ και μειώνεται μετά από αυτό, αλλά σε ορισμένα είδη άτομα συνεχίζεται να αυξάνει ακόμη και μετά από διακοπή της θερμότητας (Feder et al., 1996).

Μικρή προμεταχείριση σε υψηλότερες από τις κανονικές συνθήκες αυξάνει την ανοχή των πειραματόζωων προς το επόμενο θερμικό σοκ χωρίς επιπλέον αύξηση του επιπέδου της hsp70.

Έτσι με αυτόν τον τρόπο, τα centipedes που συλλέχθηκαν από το έδαφος, και εκτέθηκαν σε άγνωστους παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα η εποχική μεταβλητότητα της θερμοκρασίας, μπορεί να εναποθέσουν μια ανοχή σε μια μεγάλη ποικιλία από στρεσογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανοντας τις πειραματικές δοκιμές στο εργαστήριο.

Η σύνθεση της hsp70 είναι κατά πολύ μεγαλύτερη σε απάντηση σε θερμικό σοκ απ'ότι σε απάντηση σε τοξικά χημικά. Έτσι, σε πειραματόζωα, ειδικά αυτών με μεγάλη διάρκεια ζωής που εκτέθηκαν σε υψηλά μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες, όπως τα centipedes, οποιαδήποτε απάντηση σε χημικά μέσω της hsp70 έκφρασης μπορούν να καλυφθούν από υψηλά επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών που επάγονται από μη επιθυμητές θερμικές συνθήκες (Sanders, 1990).

Άλλη αδυναμία της Hsp70 στην χρησιμοποίησή της ως στρες βιοδείκτη είναι το γεγονός ότι η έκφρασή τους εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης (Feder et al., 1996) και την ηλικία (Williams et al., 1996) του υπό εξέταση πειραματόζωου.

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ, hsp70 με βάση τα παραπάνω δεδομένα δεν μπορεί να θεωρηθεί ως γενικός βιοδείκτης σε οικοτοξικολογικές μελέτες. Παρόλ'αυτά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένα είδη, των οποίων τα αποτελέσματα δεν μπορούν να γενικοποιηθούν για όλα τα είδη των πειραματόζωων.

6.8. Οι στρες πρωτεΐνες ως κατάλληλοι βιοδείκτες για την ρύπανση του περιβάλλοντος.

Είναι γεγονός ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ρυπογόνων που απελευθερώνονται στο περιβάλλον: στα ανόργανα και οργανικά ρυπογόνα, στα οργανομεταλλικά σκευάσματα, τα ραδιενεργά ισότοπα καθώς και τα αέρια (Walker, 2003). Αυτά τα τοξικά στοιχεία εισβάλλουν στα διάφορα οικοσυστήματα εύκολα και οι επιδράσεις τους παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τα ρυπογόνα εισέρχονται στο οικοσύστημα του εδάφους με διάφορους τρόπους, όπως μέσω των βιομηχανικών αποβλήτων, των τοξικών χημικών, των αποβλήτων, των ραδιονουκλιδίων, των οργανικών ρυπογόνων, του αέρα και των ρυπογόνων των οχημάτων, με αποτέλεσμα να επιδρούν όχι μόνο στους ζωντανούς οργανισμούς του εδάφους αλλά και άμεσα τα φυτά, τα ζώα και έμμεσα τους ανθρώπους.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να εξεταστεί η χρησιμότητα και η εφαρμογή των στρες πρωτεϊνών των βακτηρίων εξαιτίας της ικανότητας των βακτηριακών κυττάρων να επιβιώνουν και να προσαρμόζονται σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες. Δείγματα εδάφους (0.5 Kg σε βάθος 5-10cm) συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και τον Αύγουστο (2005) από τρεις διαφορετικές αποστάσεις από τον δρόμο με την συμμόρφωση στο κέντρο του Λονδίνου (Ramford Road-Stratford).

- ❖ Το πρώτο δείγμα ήταν περισσότερο από 10 μέτρα πιο μακριά από τον δρόμο με την συμμόρφωση. Το χρώμα αυτού του εδάφους ήταν ελαφρώς καφέ.
- ❖ Το δεύτερο δείγμα ήταν λιγότερο από 1 μέτρο από τον δρόμο με την συμμόρφωση και το χρώμα του εδάφους ήταν σχεδόν μαύρο.
- ❖ Το τρίτο ήταν περισσότερο από 5 μέτρα πιο μακριά από τον δρόμο με την συμμόρφωση και το χρώμα του εδάφους ήταν σκούρο καφέ.

Τα πειράματα με βακτήρια έδειξαν ότι η αύξηση στην παραγωγή των στρες πρωτεϊνών μπορεί να προστατέψει τους οργανισμούς από την βλάβη που επάγεται λόγω της έκθεσης σε στρες, και ότι η λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών ως μέρος μηχανισμού άμυνας και επιδιόρθωσης των κυττάρων, καθώς και η απόκριση των κυττάρων σε στρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμη προειδοποίηση της ρύπανσης.

Η ρύπανση της κίνησης όχι μόνο δεν προκαλεί αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων του εδάφους κοντά στον δρόμο με συμφόρηση αλλά αυξάνει επίσης τον ρυθμό των στρες πρωτεϊνών και υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της αύξησης της ρύπανσης και των επιπέδων των στρες πρωτεϊνών, ενώ ακόμη διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση των στρες πρωτεϊνών έχει δυσμενή σχέση με την απόσταση των ξενοβιοτικών που επάγονται από στρεσογόνους παράγοντες όπως είναι η ρύπανση της συμφόρησης των οχημάτων.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι α) οι στρες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές του περιβάλλοντος (pH, συγκεντρώσεις μετάλλων) και ο προσδιορισμός αυτών των ποσοτήτων μπορεί να προταθεί ως ειδικός βιοδείκτης έκθεσης για την παρακολούθηση της ρύπανσης σε ένα οικοσύστημα, ενώ μπορεί ακόμη να αποτελέσει χρήσιμο σημείο στις οικοτοξικολογικές μελέτες και β) πως τα γενικά χαρακτηριστικά των στρες πρωτεϊνών για την χρήση τους ως βιοδείκτες της ρύπανσης θα πρέπει να είναι τα εξής:

- Αυτού του είδους οι πρωτεΐνες παρουσιάζονται σε όλα τα κύτταρα και σε όλες της μορφές ζωής από τα βακτήρια μέχρι στους ανθρώπους (Lindquist, 1986, Schlesinger, 1986). Όλα τα κύτταρα παράγουν μια συνηθισμένη ομάδα των στρες πρωτεϊνών σε απόκριση σε διάφορα είδη στρεσογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων την διακύμανση της θερμοκρασίας, το pH, την έκθεση σε τοξικά σκευάσματα κ.α.
- Η επαγωγή των στρες πρωτεϊνών είναι γενικότερα μια αργή διαδικασία, η οποίες όμως παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, ειδικότερα κατά την διάρκεια έκθεσης σε χημικά απ'ότι σε θερμικό στρες.
- Υπάρχει συγκεκριμένη αύξηση στην δραστηριότητά τους μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης έκθεσης στην ρύπανση του περιβάλλοντος ενώ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης των αλλαγών των συνθηκών ή της ποιότητας του περιβάλλοντος.
- Αποτελούν μέρος μηχανισμού άμυνας των κυττάρων.
- Οι στρες πρωτεΐνες είναι ισχυροί υποψήφιοι ως βιοδείκτες της ρύπανσης του περιβάλλοντος και δραστηριοποιούνται πρώιμα όταν τα κύτταρα εκτείνονται σε τοξικά και σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες της θνησιγόνου δόσεως.
- Ο πιο σημαντικός λόγος χρησιμοποίησης των στρες πρωτεϊνών ως βιοδείκτες της ανάλυσης του κινδύνου στο περιβάλλον είναι να αποδείξουν ότι μπορούν να δώσουν αρχικά πληροφορίες για τις επιδράσεις των ρυπογόνων σε μικρό χρονικό διάστημα.

6.9 Χρήση των βιοδεικτών σε υδρόβιους οργανισμούς

- **Ιχθύων medaka**

Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες μπορεί να προκαλέσει βιοχημικές, φυσιολογικές και ιστολογικές αλλοιώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς.

Σε υδρόβιο περιβάλλον, τέτοιου είδους στρεσογόνοι παράγοντες μπορεί να συνιστούν αλλαγές σε φυσικούς παραμέτρους όπως είναι η θερμοκρασία, το PH, η αλατότητα, οι τοξικές συγκεντρώσεις χημικών ρυπογόνων ή σε οποιαδήποτε συνδυασμό αυτών.

Ζώντας σε περιβάλλον το οποίο έχει σημαντικά μεταβληθεί από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, οι ιχθύες συχνά εκτίθενται σε πολλούς στρεσογόνους παράγοντες όπως για παράδειγμα είναι τα τοξικά μολύσματα και οι θρεπτικές ουσίες που εισβάλλουν στο νερό μέσω της βροχής (U.S. Geological Survey, 1998, Werner, Deanovic et al., 2000, Roth et al., 1996).

Ορισμένοι βιοδείκτες, όπως είναι η ενεργότητα των ενζύμων πχ. της ακετυλοχολινεστεράσης ή οι συγκεντρώσεις των μετάλλων που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες στο κύτταρο μπορούν να καθορίσουν εάν η έκθεση σε συγκεκριμένους στρεσογόνους παράγοντες προκαλεί στον οργανισμό βιοχημικές και κυτταρικές απαντήσεις.

Άλλοι βιοδείκτες, όπως είναι τα επίπεδα των στρες πρωτεϊνών στο κύτταρο δείχνουν πιθανόν τις δυσμενείς επιδράσεις που συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο ενεργοποιώντας τον μηχανισμό επιδιόρθωσης των κυττάρων.

Σε μελέτη που έγινε σε δείγμα ιχθύων medaka, έγινε προσπάθεια να διευκρινιστεί η χρήση των βιοδεικτών ως δείκτες έκθεσης σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες στην περιοχή του Νότιου Σαν Φρανσίσκο.

Διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία των εμβρύων ιχθύων σε τοξικά σκευάσματα εξαρτάται από την ηλικία και δεν συνδέεται με τις διαφορές με τον ρυθμό πρόσληψης ή την βιοδιαθεσιμότητα, η οποία καθορίζει την ποσότητα του χημικού που καταναλώθηκε από τον οργανισμό (UC Davis researchers, Marty et al., 1990, Hamm et al., 1998). Συχνά αυτή η ευαισθησία αποτελεί λειτουργία της ικανότητας του οργανισμού να μεταβολίζει το χημικό ή να ενεργοποιεί στο κύτταρο απαντήσεις λόγω του στρες, όπως επίσης και να ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης.

Η επαγωγή των στρες πρωτεϊνών προστατεύει τους οργανισμούς από την βλάβη των κυττάρων λόγω των περιβαλλοντικών παραγόντων. Η παρουσία ή απουσία αυτών των προστατευτικών πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης ίσως να επιδρά στον οργανισμό, που επηρεάζεται από την έκθεσή του σε φυσικές περιβαλλοντικές αλλαγές ή/και σε τοξικά χημικά.

Για να διευκρινιστεί ο προστατευτικός ρόλος των στρες πρωτεϊνών στην εμβρυοτική ανάπτυξη των ιχθύων medaka, όταν αυτά εκτείνονται σε θερμικό σοκ, θεωρήθηκε ως χαρακτηριστικό γνώρισμα η επαγωγή της Hsp70 πρωτεΐνης σε πολλά στάδια ανάπτυξης (Werner, Koger et al., 2001).

Στην παρούσα μελέτη έμβρυα του είδους medaka εξετάστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Σε κάθε ένα στάδιο το οποίο περιλάμβανε δείγμα 100 εμβρύων, τα έμβρυα υπέστησαν θερμικό σοκ για 30 λεπτά στους 104 °C και μετέπειτα διατηρήθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και δείγματα αναφοράς τα οποία διατηρήθηκαν στους 77 °C.

Δείγμα που περιείχε 10 έμβρυα του είδους medaka που υπέστησαν θερμικό σοκ και 10 δείγματα αναφοράς αναλύθηκαν για την ύπαρξη πρωτεϊνών θερμικού σοκ, έπειτα από έκθεση τους σε 1,2,3,6,12 και 24 ώρες σε θερμικό σοκ.

Επιπρόσθετα, για να μελετηθούν η επιτυχία της εκκόλαψης και τα αποτελέσματα της ανάπτυξης, δείγμα 50 εμβρύων από κάθε στάδιο υπέστησαν θερμικό σοκ όπως αναφέραμε και προηγουμένως και στην συνέχεια διατηρήθηκαν σε συνθήκες καλλιέργειας μέχρι την διαδικασία της εκκόλαψης. Η ανάπτυξη και η ζωτικότητα καταγραφόταν σε καθημερινή βάση.

Στα πρώτα στάδια των εμβρύων, οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών της οικογένειας Hsp70 δεν αυξήθηκαν σε απάντηση στο θερμικό σοκ, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα έμβρυα αυτά ήταν λιγότερο ανεκτικά στο θερμικό σοκ σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης όπου υπήρξε επαγωγή των πρωτεϊνών της οικογένειας Hsp70.

Από τα έμβρυα των πρώτων σταδίων όπου υπέστησαν θερμικό σοκ για χρονικό διάστημα 30 λεπτών στους 104 °C, το 22% απεβίωσε την πρώτη ημέρα, ακόμη 22% απεβίωσε την τρίτη ημέρα και το 28% την τέταρτη ημέρα έδειξε επιβραδυνόμενη ανάπτυξη συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς με αποτέλεσμα μόνο το 22% να αναπτυχθεί κανονικά.

Η εκκόλαψη ξεκίνησε έπειτα από επτά ημέρες και μέχρι την 14 ημέρα είχε εκκολαφθεί το 93% των κανονικά αναπτυγμένων εμβρύων.

Η απάντηση των στρες πρωτεϊνών είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς του κυττάρου που αποτρέπουν και επιδιορθώνουν τις δυσμενείς επιδράσεις του θερμικού σοκ (Feige et al., 1996). Οι υδρόβιοι οργανισμοί όταν εκτίθενται σε τοξικά χημικά καθώς και σε βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις απαντούν με αύξηση στα κύτταρά τους τις συγκεντρώσεις της hsp70 και άλλων συγγενών πρωτεϊνών (Zuegel & Kaufmann, 1999) Sanders, 1993, Iwama et al., 1998).

Στα τοξικά χημικά που επάγουν την σύνθεση της hsp70 συμπεριλαμβάνονται και οι διοξίνες (Soimasuo et al., 2001), τα βαρέα μέταλλα (Baumann et al., 1993) και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα) (Werner & Nagel, 1997).

• Ασιατικά μύδια και περιβαλλοντικό στρες

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγμα από Ασιατικά μύδια από τέσσερις διαφορετικές εποχές με διαφορετική αλατότητα έγινε προσπάθεια να συνδεθούν τα επίπεδα των στρες πρωτεϊνών με την βλάβη που προκαλείται στους ιστούς από τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων και πιο συγκεκριμένα του κάδμιου (Brown & Luoma, 1995, The et al., 1999).

Στο δείγμα που συλλέχτηκε από το έδαφος διαπιστώθηκε ότι στους ιστούς τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης ήταν υψηλότερα στις περιοχές με χαμηλές συγκεντρώσεις σε κάδμιο και με υψηλότερη αλατότητα σε σχέση με τις περιοχές με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε κάδμιο και με την χαμηλότερη αλατότητα.

Αντίθετα, στο δείγμα το οποίο εκτέθηκε σε διαλυμένο κάδμιο υπό συνθήκες εργαστηρίου, τα εργαστηριακά αποτελέσματα έδειξαν ότι στο δείγμα αυξήθηκαν τα επίπεδα επαγωγής της hsp70 πρωτεΐνης, όταν αυτό εκτέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις σε κάδμιο.

Η αντίφαση αυτή που προέκυψε εξηγείται από εργαστηριακά πειράματα που προτείνουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των επιπέδων των στρες πρωτεϊνών και της αλατότητας.

Για παράδειγμα, το δείγμα από τα μύδια που συλλέχτηκε από περιοχή με χαμηλή αλατότητα δεν ήταν ικανό να αυξήσει τα επίπεδα των πρωτεϊνών σε απάντηση στο θερμικό σοκ, σε αντίθεση με αυτά που συλλέχτηκαν από περιοχή με υψηλή αλατότητα, τα οποία μπορούσαν. Επιπρόσθετα, μύδια τα οποία εκτέθηκαν στο εργαστήριο σε χαμηλή αλατότητα (0,1ppt) είχαν στους ιστούς χαμηλότερες συγκεντρώσεις των στρες πρωτεϊνών από ότι είχαν τα μύδια που εκτέθηκαν σε μεσαία (10ppt) και σε υψηλή αλατότητα (27ppt).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι βιοδείκτες μπορεί να είναι χρήσιμοι ως δείκτες μη θανατηφόρων επιδράσεων ή σε απαντήσεις σε περιβαλλοντικά στρεσογόνους παράγοντες, ενώ η αδυναμία να αυξηθούν στο κύτταρο οι απαντήσεις λόγω του στρες μπορεί να προκαλέσει σοβαρές συνέπειες για την υγεία και την επιβίωση των οργανισμών.

Στη μέλετη σε δείγμα ιχθύων medaka, που αναφέραμε και προηγουμένως συμπεράναμε ότι στα πρώτα στάδια τα έμβρυα είναι περισσότερο ευαίσθητα σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες επειδή στερούνται την ικανότητα να αυξήσουν στο κύτταρο τις συγκεντρώσεις συγκεκριμένων στρες πρωτεϊνών.

Στη μελέτη που έγινε σε δείγμα από μύδια, συμπεράναμε ότι η ικανότητα να αυξηθούν στο κύτταρο οι απαντήσεις λόγω του στρες μπορεί να συμβιβαστεί όταν οι οργανισμοί εκτίθενται παρατεταμένα σε περιβαλλοντικές στεσογόνες συνθήκες, όπως είναι η αλατότητα. Ωστόσο, υπάρχει ακόμα έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις και τους μηχανισμούς που επηρεάζουν τις απαντήσεις των βιοδεικτών. Παρόλα αυτά, οι βιοδείκτες προσφέρουν αξιόλογες πληροφορίες προκειμένου να διευκρινιστούν οι πολύπλοκες συνδέσεις μεταξύ των περιβαλλοντικών συνθηκών, των απαντήσεων λόγω του στρες και της υγείας του οργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 Οι πρωτεΐνες Hsp32, Hsp70 ως βιοδείκτες πρώιμης προειδοποίησης. Η επαγωγή των Hsps in vitro έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε καρκινογενή σκευάσματα.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps) επάγονται σε απόκριση σε διάφορες μορφές στρες (θερμότητα, τοξικά χημικά, ασθένειες, αλλαγές στο pH κ.α.). Εξαιτίας της μεγάλης τους ευαισθησίας στις αλλαγές του περιβάλλοντος, αυτές οι πρωτεΐνες προτείνονται ως πιθανοί πρόωφοι βιοδείκτες έκθεσης σε οικοτοξικολογικές μελέτες.

Στο περιβάλλον υπάρχουν πολλά χημικά σκευάσματα που απειλούν την υγεία του ανθρώπου. Μεταξύ αυτών χημικών, τα καρκινογόνα παίζουν πολύ σποδαίο ρόλο. Πολλοί πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) σε διάφορες αναλύσεις με πειραματόζωα αποδείχτηκαν ως καρκινογόνα, το ίδιο επίσης μπορεί να συμβεί και με τους ανθρώπους (IARC, 1984, 1987).

Το dibenzo[α]pyrene (DB[α]P) βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον (έδαφος,υπολλείματα), στον καπνό των τσιγάρων κ.α. Αν και ο καρκινογόνος κίνδυνος για τους ανθρώπους δεν έχει πλήρως καθοριστεί, περιγράφεται ως το περισσότερο ισχυρό καρκινογόνο που έχει ελεγχθεί σε αναλύσεις με πειραματόζωα, επάγοντας τον σχηματισμό όγκου σε δέρμα ποντικού, σε μαστικό αδένες και στον πνεύμονα αρουραίου (A.K.Prahalad et al.,1997).Το 1-nitropyrene,(NP), το πιο γνωστό nitro-PAH, είναι ευρέως διαδεδομένο στο περιβάλλον, κυρίως μέσω των εκπομπών αερίων από τις μηχανές των αυτοκινήτων. Σχηματίζεται από μη ατελή καύση των οργανικών υλικών καθώς και από την έκθεση των πυρένιων (pyrenes) σε διοξείδιο του αζώτου. Είναι άμεσα-δραστικό πλακισιοτροποποιητικό μεταλλαξιγόνο το οποίο είναι καρκινογόνος για τα ζώα (H.Tokiwa, Y.Ohnishi,1986). Η διεθνή εταιρία έρευνας του καρκίνου (International Agency Research on Cancer, IARC) το κατατάσσει ως πιθανό καρκινογόνο και για τους ανθρώπους (IARC,1987).

Όσον αφορά το 4-aminobiphenil(ABP), είναι ένα περιβαλλοντικός ρύπος που προέρχεται κυρίως από τον καπνό των τσιγάρων, την ανάφλεξη της απολίθωσης των καυσίμων και από τα λάστιχα και από διάφορες βιομηχανίες όπως είναι η υφαντουργία. Η έκθεση σε αρωματικές αμίνες, συμπεριλαμβάνοντας την ABP, συνδέεται περισσότερο στους ανθρώπους με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (J.H.Weisburger, 2002).

Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί στο ACN κατά την παραγωγή και χρήση του, από τον καπνό των τσιγάρων ή από την μόλυνση του πόσιμου νερού. Χρόνια έκθεση των επιμύων σε ACN συντελεί στην αύξηση του αστεροειδή γλοιώματος του εγκεφάλου, στο Zymbal's καρκίνωμα των αδένων καθώς και σε όγκους στο στομάχι. Ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου ήταν αυξημένη, κυρίως στον πνεύμονα, στο αιμοποιητικό λεμφικό σύστημα σε ανθρώπους που εκτείθονταν εξαιτίας της εργασίας τους σε ACN. Σύμφωνα με την IARC, κατατάσσεται ως πιθανό καρκινογόνο για τους ανθρώπους(IARC,1987).

Στον αέρα, τα οργανικά ρυπογόνα που προσροφώνται μέσω των αερομεταφερόμενων σωματιδίων, είναι προϊόντα διαδικασιών ατελής καύσεως συμπεριλαμβάνοντας τις ευμετάβλητες πηγές(αυτοκίνητα) και τις στατικές πηγές (ενεργειακά φυτά, υπολειπόμενη θερμότητα). Έχει αποδειχθεί ότι, η μακροχρόνια έκθεση σε πολύπλοκα χημικά συνδέεται με τον αυξημένο ρυθμό καρδιαγγειακών και αναπνευστικών ασθενειών, όπως επίσης και με την αυξημένη θνησιμότητα (C.A. Pope III, 1996, G.J. Prescott et al., 1998, J.M Samet et al., 2000, D.M. Stieb et al., 2002).

Είναι γεγονός, ότι οι οργανισμοί προστατεύονται από τις δυσμενείς επιδράσεις του περιβάλλοντος μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, Hsps, που έχουν προταθεί ως ιδανικοί υποψήφιοι βιοδείκτες των επιδράσεων, δείχνοντας έτσι ότι τα κύτταρα έχουν υποστεί θνησιγόνο βλάβη ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε περιβαλλοντικό στρες.

Η πρωτεοτοξικότητα, ως αποτέλεσμα της hsp ενεργοποίησης μπορεί να αποτελέσει συνέπεια της τοξικολογικής βλάβης, όπου hsp επαγωγή μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητη ως βιοδείκτης σε σχέση με τις αναλύσεις που βασίζονται στον πρωτογενή στόχο. Οι Hsps δεν αποτελούν πάντοτε δείκτες του υποθνησιγόνου στρες, και σε ορισμένες περιπτώσεις ούτε ακόμη υπό θνησιγόνες συνθήκες.

Η επαγωγή της έκφρασης της hsp32 προήλθε από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες: από τους PAHs, τους ινοβλάστες της επιδερμίδας των ανθρώπων που εκτίθενταν σε UVA ακτινοβολία (S.M. Keyse et al., 1989, 1990, G.F.Vile et al., 1993), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (S.M. Keyse et al., 1989,1990), αρσενικόδες νάτριο (S.M. Keyse et al., 1989), τα κύτταρα καρδιάς νεογνών επιμύων κατά την έκθεσή τους σε βαρέα μέταλλα, το θερμικό σοκ, την ανοξία (R.Eyssen-Hernandez et al.,1996), ή στον πνεύμονα των επιμύων μέσω της ενδοτοξίνης (M.S. Garraway et al., 1998).

Η επώαση με DB[αI]P, NP, ABP και EOM δεν προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των hsp32 και hsp70. Αντίθετα, το ACN μπορούσε να επάγει την έκφραση της hsp32 όπως επίσης και της hsp70 στα HEL και στα THP-1 κύτταρα, τα οποία πιθανόν να ανακλούν την ικανότητά τους να επάγουν οξειδωτικό στρες. Συνοψίζοντας, η επαγωγή των hsp32 και hsp70 πρωτεϊνών παρατηρήθηκε στον άνθρωπο μέσω του ACN στους διπλοειδείς ινοβλάστες του πνεύμονα (HEL cells) καθώς και στα λευχαιμικά του μονοκύτταρα (THP-1 cells) in vitro.

Η εφαρμογή των dibenzo[αI]pyrene (DB[αI]P), 1-nitropyrene,(NP) και των EOM δεν είχε καμία επίδραση στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ που αναλύθηκαν, προτείνοντας έτσι ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλοι βιοδείκτες έκθεσης στα παραπάνω σκευάσματα, τουλάχιστον υπό αυτές τις συνθήκες που εξετάστηκαν.

7.2 Η επαγωγή της hsp70 ως αποτέλεσμα έκθεσης των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα επάγουν την έκφραση πολλών γονιδίων. Για παράδειγμα, η έκθεση σε κάδμιο ενεργοποιεί γονίδια που απαντούν σε στρες, περιλαμβάνοντας αυτών που κωδικοποιούν τις metallothioneins (MTs) και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), όπως επίσης και πολλά άλλα γονίδια (H.Yamada et al., 2002). Ωστόσο παραμένει αδιευκρίνιστο εάν αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται από συνήθη μηχανισμούς ή μέσω πολλών άλλων ανεξάρτητων οδών.

Τα γονίδια που χαρακτηρίζονται καλύτερα για τον ρυθμιστικό μηχανισμό των μετάλλων είναι αυτά που κωδικοποιούν τις metallothioneins (MTs), τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ομοίωση απαραίτητων μετάλλων όπως είναι ο ψευδάργυρος (Zn) και ο χαλκός (Cu) καθώς και στην αποτοξίκωση τοξικών βαρέων μετάλλων όπως είναι το κάδμιο (Cd) και ο υδράργυρος (Hg) (C.D. Klaassen, 1999).

Η μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70, ενεργοποιείται από το θερμικό σοκ καθώς επίσης και από την επαγωγή διαφόρων βαρέων μετάλλων περιλαμβάνοντας τον ψευδάργυρο, το κάδμιο, τον χαλκό, τον υδράργυρο και τον άργυρο. Η επαγωγή του γονιδίου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 μέσω των βαρέων μετάλλων, όπως επίσης και του θερμικού σοκ διαμεσολαβείται μέσω της δέσμευσης του παράγοντα θερμικού σοκ (HSF1) (M.Murata et al., 1999, G.T. Williams et al., 1990, D.D.Mosser et al., 1988).

- **Οι δυσμενείς επιδράσεις της διαγονιακής *Drosophila melanogaster* κατά την έκθεσή της σε βιομηχανικά απόβλητα.-Η επαγωγή της hsp70 ως δείκτης της καταστροφής των κυττάρων.**

Τα βιομηχανικά απόβλητα που απεκκρίνονται από την βιομηχανία επιμετάλλωσης χρωμίου περιέχουν μεγάλο αριθμό μετάλλων συμπεριλαμβάνοντας το χρώμιο, τον χαλκό, το νικέλιο, τον ψευδάργυρο, το μαγνήσιο και τον μόλυβδο. Η ιδιαίτερη δυσκολία αυτών των βιομηχανικών αποβλήτων είναι η διατήρησή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς και η μεταφορά τους σε σημαντικές αποστάσεις μέσω του αέρα, του νερού, ή μέσω της τροφικής αλυσίδας όπου μπορούν να συσσωρευτούν και να συνιστούν συγκεντρώσεις στο ανώτερο τροφικό επίπεδο με αποτέλεσμα να αποτελούν συνεχώς απειλή για τον βιόκοσμο (Edmund et al., 1976).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμο εργαλείο διάγνωσης των δυσμενών βιολογικών επιδράσεων που επάγονται από την έκθεση του οργανισμού σε περιβαλλοντικά χημικά γιατί αποτελούν μέρος μηχανισμού άμυνας, επιδιόρθωσης και της αποτοξίκωσης των κυττάρων με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ως άμεσοι και ειδικοί δείκτες έκθεσης και επίδρασης. Ομόλογα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ υπάρχουν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Feder and Hofman, 1999, Bierkens, 2000).

Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε η διαγονιακή *Drosophila melanogaster*, η οποία και αποτελεί πρότυπο μοντέλο οργανισμού εξαιτίας της καλής γενετικής και της ανάπτυξής της, προκειμένου να αξιολογηθούν οι δυσμενείς επιδράσεις των αποβλήτων από την βιομηχανία επιμετάλλωσης χρωμίου, στον τρόπο εκκόλαψης των ενηλικών μυγών, στην αναπαραγωγική ικανότητα και στην ανάπτυξη.

Η έκθεση έγινε σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.05, 0.1, 10.0 και 100.0 μl/ml) μέσω της διατροφής, αξιολογώντας έτσι τον κυτοπροστατευτικό ρόλο της επαγωγής της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ καθώς και την χρήση της ως περιβαλλοντικό βιοδείκτη για την ανάλυση κινδύνου.

Από τις υψηλές συγκεντρώσεις των αποκριμάτων επηρεάστηκε ο τρόπος εκκόλαψης των ενηλικών μυγών και ελαττώθηκε αισθητά η αναπαραγωγική τους ικανότητα. Ωστόσο, οι επιδράσεις ήταν περισσότερο έντονες στις αρσενικές από ότι στις θηλυκές μύγες. Η επίδραση των αποκριμάτων στην ανάπτυξη των ενηλικών μυγών συνέπιπτε χρονικά με την έκφραση του γονιδίου της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ στους ιστούς της προνύμφης καθώς και στα αναπαραγωγικά όργανα των μυγών.

Η έκφραση της hsp70 στο τρίτο προνυμφικό στάδιο των μυγών ήταν δοσο και χρονοεξαρτώμενη. Η απουσία της έκφρασης της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ σε προνύμφη που εκτέθηκε σε 0.1 μL/ml αποκρίματος έδειξε ότι η συγκέντρωση αυτή ήταν η υψηλότερη μη τοξική για την *Drosophila*. Η επαγωγή της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ βρέθηκε στους σιαλογόνους αδένες, στο γάγγλιο του μυελού, στον πρόλοβο και στο μέσο εντέρου της κάμπιας που εκτέθηκε.

Τα απόβλητα της βιομηχανίας επιμετάλλωσης χρωμίου βρέθηκαν λόγω της έκφρασης της hsp70, να είναι πολύ τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα να επιδρούν στην ανάπτυξη ολόκληρου του οργανισμού και έτσι να καθυστερείται ο τρόπος εκκόλαψης και να μειώνεται ο αριθμός εκκόλαψης των μυγών που εκτέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Η σύνθεση της hsp70 στα αναπαραγωγικά όργανα των αρσενικών μυγών αποδεικνύει την εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της δόσης και της σύνθεσης της πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αρσενικές μύγες είναι περισσότερο ευάλωτες σε σχέση με τις θηλυκές, που μας προτρέπουν να υποθέσουμε ότι το πρότυπο μοντέλο της μύγας μπορεί να είναι πολύτιμο στην ανάλυση κινδύνου της αναπαραγωγικής τοξικολογίας. Η προστασία των ιστών μέσω της έκφρασης της hsp70 από την καταστροφή στα αναπαραγωγικά αρσενικά όργανα, κατά μήκος των βοηθητικών αδένων όπου δεν υπάρχει η επαγωγή της hsp70, οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων, ενισχύει περισσότερο τον κυτοπροστατευτικό ρόλο της hsp70 και αποδεικνύει την χρήση της ως βιοδείκτη για την ανάλυση κινδύνου. Όμως χρειάζονται επιπλέον μελέτες για να καθοριστεί επίσημα η χρήση της hsp70 ως βιοδείκτη περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Πίνακας. 8 : Ανάλυση των μετάλλων από τα απεκκρίματα της βιομηχανίας χρωμίου.

Μέταλλα που εντοπίστηκαν	Συγκεντρώσεις (μg /mL)
Κάδμιο	ND
Χρώμιο	230.3
Ψευδάργυρος	204.5
Σίδηρος	175.9
Νικέλιο	120.8
Μαγνήσιο	43.6
Μόλυβδος	23.0
Χαλκός	83.6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Η γρήση της πρωτεΐνης hsp70 και της κορτιζόλης ως βιοδείκτες επίδρασης του καδμίου, χρωμίου και νικελίου στην μόλυνση του *OREOCHROMIS MOSSAMBICUS*

Είναι γεγονός ότι ρύπανση του περιβάλλοντος αποτελεί ένα από πιο σημαντικά προβλήματα του πλανήτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μόλυνση του νερού καθώς αποτελεί το μέσον από το οποίο οι περισσότεροι οργανισμοί ζούν και παίζει σπουδαίο ρόλο στην διαμόρφωση της επιφάνειας της γης μέσω των διαδικασιών της αποσύνθεσης, της διάβρωσης και της απόθεσης (ιζήματος) (Boynd, 2000).

Η μόλυνση του νερού επάγεται μέσω των φυτοπροστατευτικών προϊόντων λόγω της αλόγιστης χρήσης τους σε διάφορες γεωργικές διαδικασίες καθώς και από τα βαρέα μέταλλα προερχόμενα μέσω των βιομηχανικών αποβλήτων (Spellman, 1998, Heath & Claassen, 1999).

Τα βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο, το χρώμιο και το νικέλιο αποτελούν τα σημαντικότερα τοξικά ρυπογόνα σε όλον τον κόσμο.

Τα βαρέα μέταλλα δεν μπορούν να καταστραφούν μέσω της βιολογικής αποικοδόμησης και για αυτό έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται με ευκολία στο περιβάλλον (Barnhoorn, 1996). Πιθανόν όλα τα μέταλλα να είναι βλαβερά για τους περισσότερους οργανισμούς σε κάποιο επίπεδο έκθεσης και απορρόφησης, ακόμη σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, αλλά όταν οι συγκεντρώσεις των μετάλλων είναι υπερβολικές

(μεγαλύτερες από τα επιτρεπόμενα όρια) προκαλούν μετατροπές στις φυσιολογικές λειτουργίες σε όлон τον οργανισμό (Heath, 1991).

Οι υδρόβιοι οργανισμοί τείνουν να ενσωματώνουν όλους τους στρεσογόνους παράγοντες που υπάρχουν στο υδρόβιο περιβάλλον με αποτέλεσμα να υφίστανται τις επιδράσεις τους έπειτα από έκθεση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα οι υδρόβιοι οργανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιο-συσσωρευτές βαρέων μετάλλων και συνεπώς να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της μόλυνσης του υδρόβιου περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα.

Οι ιχθύες μπορούν να θεωρηθούν ιδανικά μοντέλα για την βιοπαρακολούθηση.

Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εκφράζονται στα κύτταρα προκειμένου να διατηρηθούν ορισμένες κυτταρικές διαδικασίες όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η ενδοκυτταρική μεταφορά (Iwama et al., 1998, Kiang & Tsokos, 1998).

Οι βιοδείκτες που ερευνούνται περιλαμβάνουν και τις ορμόνες του στρες. Αυτές οι ορμόνες συντίθενται από τα στεροειδή, την χοληστερόλη και έχουν όλα τους ίδιους χημικούς τύπους.

Η κορτιζόλη, γνωστή και ως ορμόνη που προκαλείται από το στρες, θεωρείται ότι μπορεί να καταστείλλει την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ αντικαθιστώντας την πρωτεΐνη θερμικού σοκ με τον γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα, με αποτέλεσμα τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στον οργανισμό να μειώνονται εξαιτίας ενός μηχανισμού αρνητικής δράσης. Αποτέλεσμα της επίδρασης της κορτιζόλης στο μεταβολικό σύστημα του σώματος είναι η μείωση των αποθεμάτων πρωτεΐνης σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού με εξαίρεση εκείνων που βρίσκονται ήπαρ. Αυτή η μείωση οφείλεται στην μειωμένη σύνθεση των πρωτεϊνών καθώς και στην αύξηση του καταβολισμού των πρωτεϊνών στα κύτταρα (Guyton & Hall, 1997).

Οι ορμόνες επιδρούν σε πλήθος φυσιολογικών συστημάτων, ενώ πρόσφατα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι μπορούν ακόμη να ρυθμίσουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους ιχθύες. Σειρά μελετών αποδεικνύουν ότι τα αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης μπορούν να καταστείλλουν την επαγωγή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, hsp70 σε ιστό βράγχιου ιχθύος του *Oreochromis mossambicus*.

Σκοπός της μελέτης ήταν να καθοριστεί α) η επίδραση της έκθεσης σε κάδμιο, χρώμιο, νικέλιο στην απόκριση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, β) η επίδραση της έκθεσης σε κάδμιο, χρώμιο, νικέλιο στα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος και γ) η επίδραση των αυξημένων επιπέδων της κορτιζόλης στην σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Το πρώτο μέρος της μελέτης περιλάμβανε την έκθεση δυο διαφορετικών ομάδων για κάθε μέταλλο ξεχωριστά σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις χλωριδίου του καδμίου, διχρωμικού καλίου και σε χλωρίδιο του νικελίου. Στο δεύτερο μέρος, η μελέτη περιείχε την αξιολόγηση της απόκρισης της θερμικού σοκ πρωτεΐνης (first biomarker response) κατά την έκθεση σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις μετάλλων. Το τρίτο μέρος, περιλάμβανε την αξιολόγηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα έπειτα από έκθεση σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις μετάλλων και τέλος το τέταρτο μέρος της μελέτης περιείχε την αξιολόγηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα με την απόκριση της θερμικού σοκ πρωτεΐνης.

8.1 Τα μέταλλα ως ρυπογόνα και η αξία των βιοδεικτών.

Τα ρυπογόνα του νερού υπό μορφή ανόργανων χημικών και ορυκτών περιλαμβάνουν οξέα, άλατα, μέταλλα, φυτικές θρεπτικές ουσίες καθώς και ιζήματα (Spellman, 1998). Οι χημικές μορφές των μετάλλων επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα των ιόντων μετάλλων στους υδρόβιους οργανισμούς. Ενώ επίσης εξαρτώνται άμεσα από τα χαρακτηριστικά του νερού στο οποίο παρεβρίσκονται όπως για παράδειγμα είναι το pH, η αλατότητα, η σκληρότητα και η αλκαλικότητα του νερού (Barnhoorn, 1996).

8.1.1 Κάδμιο

Το κάδμιο, αποτελεί μη-απαραίτητο μέταλλο το οποίο αποτελεί ευρέως διαδεδομένο βιομηχανικό ρυπογόνο που χρησιμοποιείται στην κατασκευή μπαταριών, χρωμάτων, πλαστικών και λιπασμάτων (Urani et al., 2005). Σε επαρκείς συγκεντρώσεις είναι τοξικό σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς περιλαμβάνοντας τους μικροοργανισμούς, τα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Συνήθως, προέρχεται ως βιομηχανικό βιοπροϊόν από την παραγωγή ψευδαργύρου, χαλκού και μολύβδου.

Οι θνησιγόνες επιδράσεις του καδμίου προκαλούνται από τα ελεύθερα ιόντα καδμίου στο σώμα, γεγονός που αποδεικνύει ότι το κάδμιο δεν προσδένεται στις μεταλλοθειονεΐνες ή σε άλλες πρωτεΐνες. Τα ελεύθερα ιόντα καδμίου μπορεί να αδρανοποιούν διάφορα ένζυμα τα οποία εξαρτώνται από τα μέταλλα. Επιπλέον, ότι το κάδμιο δεν προσδένεται στις μεταλλοθειονεΐνες σημαίνει ότι έχει την ικανότητα να προκαλεί κατά την πρόσληψη βλάβη στο νεφρικό σωληνάριο των μεμβρανών (Eisler, 2000).

Ο θαλάσσιος βίοκοσμος περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων καδμίου σε σχέση με εκείνον των γλυκών υδάτων και του γήινου πιθανόν γιατί τα συνολικά επίπεδα του καδμίου είναι υψηλότερα στα θαλάσσια ύδατα.

Οι οργανισμοί των γλυκών υδάτων και της θάλασσας συσσωρεύουν το κάδμιο μέσω του μολυσμένου νερού με κάδμιο, του οποίου οι συγκεντρώσεις δεν είχαν θεωρηθεί ως δυσμενείς για την δημόσια υγεία καθώς και για πολλά είδη του υδρόβιου περιβάλλοντος (Eisler, 2000).

Το κάδμιο τείνει να συσσωρεύεται στα σπλάχνα των σπονδυλωτών οργανισμών, ιδιαίτερα στο ήπαρ και στα νεφρά. Μονολότι, το κάδμιο που συσσωρεύεται στους ιχθύες μέσω των κυττάρων στο ηπάτωμα είναι μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε σύγκριση με τα άλλα μέταλλα.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις καδμίου ήταν υψηλότερες σε μεγαλύτερης ηλικίας οργανισμούς σε σχέση με τους νεότερους και ότι υπό συνθήκες έκθεσης των ιχθύων σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου για μικρό χρονικό διάστημα, τα βράγχια είναι τα πρώτα όργανα στα οποία εστιάζεται η βλάβη (Eisler, 2000).

Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της οξείας τοξικότητας του καδμίου είναι άγνωστος, παρόλ'αυτά στους ιστούς των τελεόστεων εξαρτάται από το χρονικό διάστημα της έκθεσης, την συγκέντρωση του διαλυμένου και των ιόντων καδμίου, την θερμοκρασία και την αλατότητα του νερού (Eisler, 2000).

8.1.2.Χρώμιο

Το χρώμιο είναι ευρέως διαδεδομένο ως οικιακό και βιομηχανικό προϊόν και ανάλογα με την μορφή στην οποία βρίσκεται έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Όταν βρίσκεται υπό μορφή Cr^{+6} (εξασθενές χρώμιο) είναι τοξικό ενώ όταν βρίσκεται υπό μορφή Cr^{+3} (τρισθενές χρώμιο) αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό συστατικό το οποίο παρίσταται συχνά στο περιβάλλον. Υπό συνθήκες εργαστηρίου, το χρώμιο είναι μεταλλαξιγόνο, καρκινογενές και τερατογενές για μεγάλο πλήθος οργανισμών ενώ υπό μορφή Cr^{+6} (εξασθενές χρώμιο) έχει την μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα. Χρησιμοποιείται ευρέως στην επιμετάλλωση, στις βαφές, στις βιομηχανίες φωτογραφίας ενώ βρίσκεται και στο τσιμέντο με αποτέλεσμα να παράγουν μεγάλες ποσότητες τοξικών ρυπογόνων (Arıca & Bayramoglu, 2004). Επιπλέον, από τα υπόγεια απόβλητα των βιομηχανιών παραγωγής χρωμίου προκαλείται μόλυνση των υπόγειων υδάτων, ενώ από τα απεκκρίματα των αποβλήτων χρωμίου σε ρυάκια και λίμνες έχουν ως αποτέλεσμα να προκαλούν βλάβη στα υδρόβια οικοσυστήματα (Eisler, 2000).

Η τοξικότητα του χρωμίου στον υδρόβιο βιόκοσμο επηρεάζεται από την σκληρότητα, την θερμοκρασία, το pH και την αλατότητα του νερού καθώς και από τους βιολογικούς παράγοντες των ειδών όπως είναι το βιολογικό στάδιο στο οποίο βρίσκονται και από την ευαισθησία την οποία δείχνει ο κάθε οργανισμός ξεχωριστά. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, το Cr^{+6} (εξασθενές χρώμιο) συνδέεται με τις ανώμαλες δραστηριότητες των ενζύμων, την μειωμένη αντίσταση σε παθογενετικούς οργανισμούς, στον περιορισμό της φωτοσύνθεσης κ.α.

Στους οργανισμούς των γλυκέων υδάτων και της θάλασσας η υδρόλυση και η καθίζηση αποτελούν τις πιο σημαντικές διαδικασίες που καθορίζουν τις επιδράσεις του χρωμίου, ενώ αντίθετα ελάχιστα επιδρούν οι διαδικασίες της προσρόφησης και της βιοσυσσώρευσης. Παρόλ' αυτά, τα υδρόβια φυτά και οι θαλάσσιοι πολύχαιτοι σκώληκες φαίνονται να είναι οι περισσότερο ευαίσθητοι οργανισμοί που έχουν έως τώρα εξεταστεί (Eisler, 2000).

8.1.3 Νικέλιο

Το νικέλιο, αποτελεί στοιχείο που βρίσκεται στην βιόσφαιρα και συνίσταται στο περιβάλλον από φυσικές ή ανθρώπινες πηγές. Συσσωρεύεται στο σύστημα μέσω χημικών και φυσικών διαδικασιών καθώς και μέσω της βιολογικής μεταφοράς μηχανισμών των ζωντανών οργανισμών (Eisler, 2000).

Οι χημικές και φυσικές μορφές του νικελίου και των αλάτων του δεν επηρεάζουν έντονα την βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα. Παρόλ' αυτά, η τοξικότητα του νικελίου προκαλεί μείωση της φωτοσύνθεσης, της ανάπτυξης, του ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων θαλάσσης, του μεταβολισμού των βακτηρίων εδάφους, της ανάπτυξης των μυκηλίων κ.α. (Eisler, 2000).

Επιπλέον, οι φυσικές πηγές του αερομεταφερόμενου νικελίου, περίπου το 16% του ατμοσφαιρικού νικελίου περιλαμβάνει την σκόνη εδάφους, το αλάτι της θάλασσας, τα ηφαίστεια, τις φωτιές των δασών κ.α. Ενώ, το 84% του ατμοσφαιρικού νικελίου οφείλεται σε ανθρώπινες πηγές όπως είναι οι εκπομπές των ορυκτών νικελίου, οι δραστηριότητες διύλισης, η καύση απολιθωμένων καύσιμων υλών λόγω της θερμότητας, η καύση των αποβλήτων, η κατασκευή χημικών νικελίου, μπαταριών, τσιμέντου και της αβέστου (Eisler, 2000).

8.3 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Οι αποκρίσεις σε στρεσογόνους παράγοντες αποτελούν στρατηγική την οποία έχουν αποκτήσει οι οργανισμοί προκειμένου να προστατέψουν τους εαυτούς τους από τις μεταβολές του περιβάλλοντος.

Οι μελέτες για την επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους ιχθύες είναι ακόμη σε πρώιμα στάδια σε σχέση με εκείνες των βακτηρίων, των ζυμομύκητων και των θηλαστικών. Βρίσκονται δηλαδή σε στάδια περιγραφικά των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται σε διάφορους ιστούς λόγω της απόκρισης σε διάφορους βιολογικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Iwama et al., 1998).

Οι κλασικές μελέτες της επίδρασης των στρεσογόνων παραγόντων στους ιχθύες εστιάζονται στην απόκρισή τους σε οργανικό επίπεδο. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες σε οργανικό επίπεδο είναι η ταχύτατη απελευθέρωση των στρες ορμονών, συμπεριλαμβάνοντας την κορτιζόλη και τις κατεχολαμίνες ως αποτέλεσμα της κινητοποίησης της διατήρησης της ενέργειας στην προσπάθεια να ξανα-δημιουργηθεί η ομοιόσταση.

Επιπρόσθετα, σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχει ένα γενικοποιημένο σύστημα της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες το οποίο περιλαμβάνει την δράση και την λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Basu et al., 2002a).

8.3.1 Παράγοντες που ρυθμίζουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ στους ιχθύες.

- **Οι αβιοτικοί παράγοντες και οι επιδράσεις τους στην επαγωγή των Hsps**

Το μεγαλύτερο μέρος των μελετών των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους ιχθύες περιορίζεται σε in vitro αναλύσεις που διεξάγονται υπό συνθήκες εργαστηρίου.

Η έκθεση των ιχθύων σε ρυπογόνα του περιβάλλοντος όπως είναι τα βαρέα μέταλλα, τα βιομηχανικά απόβλητα, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων των διαφόρων πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

- **Ο τύπος του ιστού και του οργάνου που έχουν υποστεί τοξικότητα**

Η επαγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι ρυθμοί της σύνθεσής τους, η θερμοκρασία της επαγωγής και οι συγκεντρώσεις της Hsp70 και των μοριακών συνοδών εξαρτώνται από τον τύπο του ιστού. Αναλυτικότερα, οι ιστοί στα βράγχια επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ: hsp100, hsp90, hsp78, hsp70, hsp68 και την hsp60, ενώ οι ιστοί στους μύες επάγουν τις hsp100, hsp90, hsp78 και την hsp70. Διαφορές της έκφρασης σε συγκεκριμένο ιστό βρέθηκαν ακόμη κατά την έκθεση σε χημικούς στρεσογόνους παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να διευκολύνουν την αναγνώριση των ιστών που έχουν υποστεί τοξικότητα (Sanders, 1993).

- **Η επαγωγή της σύνθεσης των Hsps λόγω των στρεσογόνων παραγόντων του περιβάλλοντος.**

Η σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ που επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες διαφέρει ως προς τα χημικά και φυσικά τους χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβάνοντας ακόμη τα αυξημένα ίχνη των μετάλλων, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα τερατογόνα και την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ικανότητα ενός συγκεκριμένου χημικού να επάγει τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ διαφέρει μεταξύ των ειδών, τέτοιες διαφορές μπορεί απλά να είναι ο τρόπος πρόσληψης ή ικανότητα να αποτοξικοποιήσει ένα συγκεκριμένο ρυπογόνο. Επιπλέον, η δόση της απόκρισης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ διαφέρει μεταξύ των ειδών και εξαρτάται από την ικανότητα των ειδών να αποκλείουν, να απομακρύνουν ή να αποτοξικοποιούν το ρυπογόνο (Sanders, 1993).

Σειρά μελετών αποδεικνύει ότι τα αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης μπορούν να καταστείλουν την επαγωγή λόγω του θερμικού στρες της α) Hsp 30 σε ιστούς στα βράγχια του ιχθύος *Oncorhynchus clarki clarki* β) Hsp70 σε ηπατικούς και βραγχιακούς ιστούς του ιχθύος *O.mykiss* γ) Hsp70 σε ιστούς στα βράγχια του *O.mossambicus* και δ) Hsp 90 mRNA σε αρχέγονες καλλιέργειες ηπατοκύτταρων (Basu et al., 2002a).

8.4 Κορτιζόλη

Ο φλοιός των επινεφριδίων παράγει τρεις κατηγορίες στεροειδών ορμονών, ο οποίες ομαδοποιούνται ανάλογα με την κυρίαρχη δράση τους και είναι τα γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή και τα ανδρογόνα. Αυτές οι ορμόνες και ιδιαίτερα τα γλυκοκορτικοειδή θεωρούνται απαραίτητο συστατικό για την προσαρμογή σε οξύ στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν επιπλέον επιδράσεις στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και του λίπους ο οποίος είναι εξίσου σημαντικός και παίζουν σπουδαίο ρόλο στην αυξημένη απόκριση της γλυκόζης, η οποία θεωρείται κρίσιμη για την αντιμετώπιση της αυξανόμενης απαίτησης σε ενέργεια που συνδέεται με το στρες. Η κορτιζόλη είναι πολύ ισχυρή και αποτελεί περίπου το 95% της συνολικής δραστηριότητας των γλυκοκορτικοειδών. Η περισσότερο γνωστή μεταβολική επίδραση της κορτιζόλης και των άλλων γλυκοκορτικοειδών στον μεταβολισμό είναι η ικανότητά τους να διεγείρουν την γλυκονεογένεση (Guyton & Hall, 1997).

Η κορτιζόλη ρυθμίζει τον μεταβολισμό υδατανθράκων και των πρωτεϊνών στους ιχθύες και θεωρείται μια ορμόνη προσαρμόσιμη σε θαλάσσιο νερό, καθώς προωθεί την απέκκριση αλάτων στους υπο-ωσμωρυθμιζόμενους ιχθύες (Pelgrom et al., 1995, Lin et al., 1999).

Η έκθεση των ιχθύων σε βιοτικούς και αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες μπορεί να προκαλέσει φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές που μπορούν να μετρηθούν μέσω του νευροενδοκρινικού συστήματος, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις των στρες ορμονών (Basu et al., 2001, Vijayan et al., 1996, Vijayan et al., 2003, Deane et al., 1999).

Στρεσογόνοι παράγοντες όπως είναι τα οξέα, τα βαρέα μέταλλα, η διατροφή, οι αυξημένες θερμοκρασίες κ.α αυξάνουν τα επίπεδα της κορτιζόλης για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Sathiyaa et al., 2001, Sloman et al., 2002).

Τα αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης στους ιχθύες υπό στρεσογόνες συνθήκες διατηρούν την ομοιόσταση ενεργοποιώντας το κεντρικό νευρικό σύστημα, κινητοποιούν τα αποθέματα γλυκόζης και αυξάνουν την πίεση του αίματος (Basu et al., 2001).

Το κύριο μονοπάτι σηματοδότησης της κορτιζόλης είναι γονιδιακό και διαμεσολαβεί μέσω του κυτοπλασματικού γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα (glucocorticoid receptor, GR) ο οποίος λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας στην πρόσδεση των συνδεόμενων μορίων. Μια καλά μελετημένη μεταβολική δράση της κορτιζόλης κατά την διάρκεια του στρες περιέχει την παραγωγή γλυκόζης λόγω της επαγωγής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και αυτή η απόκριση δια-μεσολαβείται μέσω της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Boone & Vijayan, 2002, Basu et al., 2002b).

Συνεπώς, φυσιολογικές ή /και φαρμακολογικές συνθήκες, οι οποίες μειώνουν την ικανότητα του υποδοχέα συντελούν στις μειωμένες μεταβολικές αποκρίσεις λόγω του στρες, συμπεριλαμβάνοντας και την απόκριση σε θερμικό σοκ.

8.5 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κορτιζόλης και των Πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Είναι γεγονός ότι οι στεροειδείς ορμόνες έχουν άμεση επίδραση στην κυτταρική στρεσογόνο απόκριση σε κυτταρικές σειρές καθώς και σε όλους τους οργανισμούς (Basu et al., 2001, Basu et al., 2002b).

Αυξημένα επίπεδα αδρεναλίνης ή κορτιζόλης δείχνουν συσχετίσεις είτε με την αυξημένη ή είτε με την μειωμένη επαγωγή της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ, υποδεικνύοντας έτσι τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονών και των επιπέδων της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ (Mazur, 1996, De Boeck et al., 2002).

Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν την πιθανή σύνδεση μεταξύ της κορτιζόλης που επάγεται λόγω της απόκρισης σε στρες και της απόκρισης θερμικού σοκ των κυττάρων. Χρόνια μεταχείριση με γλυκοκορτικοειδή in vivo μειώνουν την επαγωγή της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ λόγω της έκθεσης των ιχθύων (τελεόστεων) σε θερμικό σοκ.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις της κορτιζόλης μειώνουν τα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ στο ήπαρ και στους ιστούς σε δείγμα από πέστροφα εξαιτίας της έκθεσής της σε στρεσογόνους παράγοντες. Αποδεικνύοντας έτσι, την σχέση μεταξύ των κυτταρικών και νευροενδοκρινικών αποκρίσεων που υπάρχει στους ιχθύες λόγω της έκθεσής τους σε στρεσογόνους παράγοντες (Basu et al., 2001).

Αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης στους ιχθύες μπορεί να μειορρυθμίσει τον αριθμό των κυτταρικών συμπλεγμάτων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που η ρύθμιση του γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα συνδέεται ισχυρά με την επάρκεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Vijayan et al., 2003).

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 προσδένεται στο μη- ενεργοποιημένο GR και ο GR σε αυτήν την φάση διαμεσολαβεί τις φυσιολογικές επιδράσεις της κορτιζόλης. Έπειτα από την δέσμευση της κορτιζόλης στον γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα, η hsp70 μετατοπίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα και η ελεύθερη hsp70 πρωτεΐνη θερμικού σοκ μπορεί να δράσει μέσω της αρνητικής παλίνδρομης δράσης της τριμερούς μορφής HSF παράγοντα θερμικού σοκ και ακολούθως της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν μια πρόωρη ένδειξη ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και των ορμονών που διαμεσολαβούν στις φυσιολογικές διαδικασίες όπως είναι η απόκριση σε στρες σε οργανικό επίπεδο (κορτιζόλη), η αύξηση (ορμόνες αυξήσεως) και η ωσμωρύθμιση (προλακτίνη-λακτογόνο ορμόνη, κορτιζόλη)(Basu et al., 2002a).

Για την μελέτη επιλέχτηκε ως αντιπροσωπευτικός ιχθύς του είδους *Oreochromis mossambicus* που μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες μικρότερες των 15 °C καθώς και σε υψηλότερες των 42 °C, να αναπτυχθεί γρήγορα, να ωριμάσει και αναπαραχθεί μέσα σε ένα χρόνο ενώ χρησιμοποιείται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια και στις αλιείες (Skelton, 1993).

Οι ιχθύες εκτέθηκαν σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις για το κάθε μέταλλο ξεχωριστά. Δηλαδή βασίστηκαν στο 10% και 20% των συγκεντρώσεων LC₅₀ του χλωριούχου καδμίου, χλωριούχου του χρωμίου και του διχρωμικού νικελίου (These values were obtained from Mance(1987) and the ECOTOX database of the USEPA(2004).

Σε κάθε έκθεση κάθε δεξαμενή των 100lit προμηθεύετο με συγκεκριμένη συγκέντρωση των παραπάνω μετάλλων, η συνολική περίοδο έκθεσης ήταν 96 ώρες και κάθε 24 ώρες λαμβάνονταν δείγμα προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση της περιόδου έκθεσης στις αποκρίσεις των πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθώς και της κορτιζόλης. Για κάθε ομάδα ιχθύων που εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις μετάλλων ορίστηκε το ποσοστό της βιοδιαθεσιμότητας, έτσι στην ομάδα των ιχθύων αναφοράς στους οποίους δεν υπήρξε χορήγηση μετάλλων το ποσοστό αυτό βρέθηκε να είναι 0%(De Boeck et al., 2002).

- **Έκθεση σε κάδμιο**

Το μέγιστο μέσο βάρος του ήπαρ ήταν 1.00(+/-0.29)g σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 10% για 96 ώρες, ενώ το ελάχιστο για 72 ώρες σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 10% ήταν 0.38(+/-0.11)g. Μεταξύ των 60 ιχθύων που εκτέθηκαν συνολικά μόνο ένα βρέθηκε νεκρό.

- **Έκθεση σε χρώμιο**

Το μέγιστο μέσο βάρος του ήπαρ ήταν 0.85(+/-0.12)g σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 10% για 96 ώρες, ενώ το ελάχιστο για 72 ώρες σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 10% ήταν 0.49 (+/-0.05)g.

- **Έκθεση σε νικέλιο**

Το μέγιστο μέσο βάρος του ήπαρ ήταν 1.20(+/-0.16)g σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 10% για 48ώρες, ενώ το ελάχιστο για 24 ώρες σε έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 20% ήταν 0.69(+/-0.13)g.

8.6 Η συσσώρευση των Hsp70 πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν περιγραφεί ως πιθανοί βιοδείκτες του υδρόβιου στρες εξαιτίας της απευθείας σύνδεσής τους με το στρες των κυττάρων και ωστόσο λόγω της αύξησης των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στα κύτταρα έπειτα από έκθεσή τους ρυπογόνα.

- **Κατά την έκθεση σε κάδμιο**

Σε ομάδα έκθεσης σε συγκεντρώσεις 10% του μετάλλου, η συγκέντρωση της Hsp70 ήταν αυξημένη σε σύγκριση με τους ιχθύες αναφοράς. Σημαντική στατιστική διαφορά ($p < 0.05$) της Hsp70 υπήρξε μεταξύ της έκθεσης σε χρονικό διάστημα 24 ωρών των συγκεντρώσεων 10 και 20% του μετάλλου.

Επιπλέον στην ομάδα έκθεσης σε συγκεντρώσεις 10% του μετάλλου, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης της Hsp74 σε περίοδο έκθεσης 96 ωρών, παρόλ' αυτά δεν υπήρξαν σημαντικές στατιστικές διαφορές.

Στην ομάδα έκθεσης σε συγκεντρώσεις 20% του μετάλλου, παρατηρήθηκε αρχικά αύξηση της συσσώρευσης της Hsp74 σε περίοδο έκθεσης 24 ωρών και έπειτα μείωση των επιπέδων κάτω από τα κανονικά.

Μεταξύ των ομάδων έκθεσης σε συγκεντρώσεις 10% και 20% του μετάλλου δεν βρέθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές. Ομοίως τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη συσσώρευση στους ιχθύες της hsp76.

- **Κατά την έκθεση σε χρώμιο**

Συσσώρευση της συγκέντρωσης της Hsp70 υπήρξε μόνο στην ομάδα έκθεσης σε συγκεντρώσεις 10% του χρωμίου έπειτα από 48 ώρες καθώς και στους ιχθύες αναφοράς. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της Hsp70 όταν συγκρίθηκε με τους ιχθύες αναφοράς.

- **Κατά την έκθεση σε νικέλιο**

Στην ομάδα έκθεσης νικελίου δεν παρατηρήθηκε συγκέντρωση συσσώρευσης νικελίου γεγονός που αποδεικνύει ότι η hsp70 επάγεται κατά την έκθεση σε συγκεκριμένα μέταλλα.

- **8.6.1 Σύγκριση της συσσώρευσης της Hsp70 μεταξύ των συστημάτων έκθεσης.**

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία εστιάζεται στις διαφορές της συσσώρευσης της hsp70 στους ιχθύες έπειτα από έκθεση σε υπο-θνησιγόνες συγκεντρώσεις καδμίου, χρωμίου και νικελίου σε διαφορετικό χρονικό διάστημα.

Η μεγαλύτερη συσσώρευση της hsp70 παρουσιάζεται στην ομάδα που εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις 20% του χρωμίου, ωστόσο παρουσιάζεται ακόμη στους ιχθύες αναφοράς και στους ιχθύες που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 10% του χρωμίου έπειτα από 48 ώρες ενώ έπειτα δεν υπήρξε επαγωγή της συσσώρευσης της hsp70 σε καμία άλλη ομάδα

έκθεσης. Έτσι αποδεικνύεται ότι υπάρχει η εξειδίκευση των μετάλλων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών.

Επιπλέον, αυτό αποδεικνύει ότι οι μικρότερες συγκεντρώσεις μετάλλων προκαλούν περισσότερο δυσμενείς επιδράσεις στην επαγωγή της hsp70 σε σχέση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και αυτό εξαιτίας πιθανόν της απόκρισης σε στρες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Η μεγαλύτερη επαγωγή της hsp74 παρουσιάζεται στην ομάδα που εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις 20% του καδμίου και όχι του χρωμίου και του νικελίου σε χρονικό διάστημα 24 ωρών. Αυτή η παρατήρηση πιθανόν να αποδεικνύει ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σε κάδμιο είναι περισσότερο τοξικές από ότι οι μικρότερες, καθώς και ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε χρώμιο και σε νικέλιο είναι λιγότερο τοξικές σε σχέση με τις μικρότερες εξαιτίας πιθανόν της απόκρισης σε στρες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα παραπάνω:

Συμπεραίνουμε είτε ότι το ψάρι του είδους *Oreochromis mossambicus* προσαρμόζεται πολύ εύκολα κατά την έκθεσή του στα διάφορα μέταλλα είτε ότι η επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, που συμβαίνει ακόμα και στα κύτταρα τα οποία δεν έχουν εκτεθεί σε στρεσογόνους παράγοντες, μπορεί να αποτρέψει τις δυσμενείς τοξικές επιδράσεις των περιβαλλοντικών τοξικών ουσιών.

Τέλος, η επαγωγή της συσσώρευσης της hsp76 είναι μεγαλύτερη στην ομάδα που εκτέθηκε σε συγκεντρώσεις 20% του καδμίου σε σχέση με τις ομάδες έκθεσης σε χρώμιο και νικέλιο. Αποδεικνύοντας έτσι, ότι η υψηλότερη συγκέντρωση σε κάδμιο είναι περισσότερο τοξική από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις χρωμίου και νικελίου.

8.7 Η συγκέντρωση της κορτιζόλης

Είναι γνωστό ότι οι διαδικασίες χειρισμού όπως η μεταφορά, η αιχμαλωσία, ο τοκετός, κ.α. επάγουν την έκκριση της κορτιζόλης στο κυκλοφοριακό σύστημα των ιχθύων (Toit et al., 1995).

- **Κατά την έκθεση σε κάδμιο**

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στο πλάσμα στην ομάδα έκθεσης σε συγκεντρώσεις 10% του χρωμίου σε χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών ήταν σταθερές ενώ αντίθετα έπειτα από 72 ώρες υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης και εν συνεχεία στις 96 ώρες υπήρξε μια μικρή αύξηση.

- **Κατά την έκθεση σε χρώμιο**

Στις ομάδες έκθεσης σε συγκεντρώσεις χρωμίου 10% και 20% οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης παραμένουν σταθερές, αποδεικνύοντας έτσι ότι το χρώμιο δεν έχει καμία επίδραση στην συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα.

- **Κατά την έκθεση σε νικέλιο**

Κατά την έκθεση σε συγκεντρώσεις 10% του νικελίου σε χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο πλάσμα η οποία αυξήθηκε έπειτα από 72 και 96 ώρες.

Επιπλέον, μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο πλάσμα παρατηρήθηκε κατά την έκθεση σε συγκεντρώσεις 20% του νικελίου αποδεικνύοντας έτσι ότι το μέταλλο του νικελίου έχει ελάχιστη επίδραση στην απόκριση σε στρες.

8.8 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κορτιζόλης και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Κατά την έκθεση σε κάδμιο παρατηρήθηκε μια αρνητική, αν και μη σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κορτιζόλης και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Αυτό αποδεικνύει ότι η αύξηση στην συγκέντρωση της κορτιζόλης συντελεί στην μείωση της συσσώρευσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Σύμφωνα με ερευνητή (De Boeck et al., 2002), η κορτιζόλη δεν επιδρά απευθείας στα επίπεδα της hsp70 σε ιστούς των ιχθύων, ωστόσο όμως σε πρωτογενή καλλιέργειες από ηπατοκύτταρα πέστροφας, η κορτιζόλη μειώνει τον στρεσογόνο παράγοντα που επάγει την αύξηση της hsp70.

Είναι γεγονός, ότι και η κορτιζόλη αλλά και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ σχετίζονται με τον γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα (glucocorticoid receptor, GR), επομένως τα αυξημένα επίπεδα της κορτιζόλης μπορούν να αντικαταστήσουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ από τον γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα (glucocorticoid receptor, GR) προκαλώντας έτσι μείωση της συσσώρευσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι η επαγωγή της κορτιζόλης ως απόκριση σε στρες μπορεί να εξαρτάται από το είδος του μετάλλου, και ότι μόνο συγκεκριμένα μέταλλα μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος, όπως φαίνεται και από την έκθεση σε κάδμιο.

Η εξέταση της επίδρασης του στρες στους ιχθύες είναι απαραίτητη για την εκτίμηση του κινδύνου στο περιβάλλον, για την διαχείριση της υγείας των ιχθύων και για την υδατοκαλλιέργεια.

Η μελέτη των βιοδεικτών επιτρέπει στους ερευνητές να αξιολογήσουν τις συνθήκες συγκεκριμένων τοξικών ουσιών ή συνδυασμού τοξικών ουσιών που επιδρούν στο φυσικό περιβάλλον. Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση μιας τοξικής ουσίας στο περιβάλλον είναι απαραίτητη η μελέτη των τοξικών ουσιών σε ελεγχόμενα περιβάλλοντα έτσι ώστε να καθοριστεί ακριβώς η επίδρασή τους σε συγκεκριμένες λειτουργίες των κυττάρων των υδρόβιων οργανισμών.

➤ **Η επίδραση της έκθεσης του Cd,Cr, Ni στην απόκριση σε στρες**

Η συσσώρευση της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ αρχικά φαίνεται να είναι η ίδια σε όλες τις ομάδες κατά την έκθεσή τους σε κάδμιο, χρώμιο και νικέλιο. Με μια όμως εκτενέστερη μελέτη παρατηρήται η απουσία της hsp70 στην ομάδα που εκτίθεται σε νικέλιο καθώς και σε εκείνη με την υψηλότερη συγκέντρωση σε χρώμιο.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η διάρκεια των εκθέσεων έχει περιορισμένες επιδράσεις στην συσσώρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η περισσότερο παρατηρήσιμη ήταν η αυξημένη συσσώρευση της hsp76 και της hsp74 κατά την έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις χρωμίου και νικελίου σε χρονικό διάστημα 72 ωρών, καθώς και η αυξημένη συσσώρευση της hsp76 και της hsp74 κατά την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου σε χρονικό διάστημα 24 ωρών.

Στατιστικά, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην συσσώρευση της hsp70, της hsp76 και της hsp74 κατά την έκθεση των ιχθύων σε διάφορα βαρέα μέταλλα, ήταν σημαντικές και μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλων έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην συσσώρευση και πιο συγκεκριμένα στην hsp70.

Αν και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην συσσώρευση της hsp76 και της hsp74, παρόλ'αυτά υπήρξαν βιολογικές αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο, οι οποίες πιθανόν να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην λειτουργία των κανονικών κυτταρικών λειτουργιών. Τέλος, η συσσώρευση της hsp70 μπορεί να επάγεται σε συγκεκριμένο χρόνο και να συνδέεται άμεσα με την εξειδίκευση των μετάλλων.

➤ **Η επίδραση της έκθεσης του Cd,Cr, Ni στα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος.**

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος φαίνονται να είναι παρόμοιες κατά την σύγκρισή τους μεταξύ των τριών μετάλλων. Με μια όμως εκτενέστερη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης ήταν υψηλότερες κατά την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου.

Αν και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος, παρόλ'αυτά η μεγαλύτερη διακύμανση παρατηρήθηκε κατά την έκθεση των ιχθύων σε συγκεντρώσεις 20% καδμίου. Αυξημένα ήταν επίπεδα της κορτιζόλης και στους ιχθύες που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 20% χρωμίου και νικελίου αποδεικνύοντας ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των μετάλλων μπορεί να έχουν επίδραση στα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος, παρόλ'αυτά δεν αναμένονται σημαντικές επιδράσεις.

➤ **Η επίδραση των αυξημένων επιπέδων της κορτιζόλης στην συσσώρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.**

Στους ιχθύες που εκτέθηκαν σε κάδμιο, υπήρξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της συσσώρευσης της hsp70, αποδεικνύοντας έτσι ότι η κορτιζόλη όντως επιδρά στην συσσώρευση της hsp76, hsp74 και της hsp70. Ωστόσο, αυτή η συσχέτιση δεν αποδεικνύεται στατιστικά σημαντική και επομένως η συσχέτιση δεν μπορεί να θεωρηθεί ως μοναδική.

Επιπρόσθετα, στους ιχθύες που εκτέθηκαν σε χρώμιο και νικέλιο υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της συσσώρευσης της hsp70, αποδεικνύοντας έτσι ότι η κορτιζόλη η οποία βρίσκεται στο πλάσμα αίματος δεν ασκεί καμία επίδραση στην σύνθεση της hsp70 στους ιστούς ήπατος των ιχθύων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η συσσώρευση της hsp70 διαφέρει ανάλογα με το χρονικό διάστημα έκθεσης καθώς και από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών.

Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι η hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης με μεγάλη αξιοπιστία κατά την έκθεση του ιχθύος *Oreochromis mossambicus* σε υπο-θνησιγόνες συγκεντρώσεις μετάλλων σε χρονικό διάστημα 96 ωρών, εφόσον παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της hsp70 σε διαφορετικό χρόνο.

Από την άλλη πλευρά, όμως από την παρούσα μελέτη συμπεραίνεται:

1. Η κορτιζόλη δεν αποτελεί τόσο αξιόπιστο βιοδείκτη όσο η hsp70 κατά την έκθεση των ιχθύων σε υπο-θνησιγόνες συγκεντρώσεις μετάλλων για μικρό χρονικό διάστημα. Και αυτό γιατί δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές που να συνδέονται με την έκθεση του ιχθύος *Oreochromis mossambicus* σε υπο-θνησιγόνες συγκεντρώσεις μετάλλων καθώς και με τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της hsp70.

2. Ο συνδυασμός της επίδρασης της κορτιζόλης και της πρωτεΐνης θερμικού σοκ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης με αξιοπιστία καθώς η επίδραση της κορτιζόλης στην απόκριση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ δεν είναι σημαντική, αλλά ωστόσο μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη της εξειδίκευσης των μετάλλων όταν οι ιχθύες εκτείνονται σε συγκεκριμένα μέταλλα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

9.1 Οι μηχανισμοί των κυττάρων για την αποτοξίκωση και την ανοχή τους στα βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο (Cd) και ο ψευδάργυρος (Zn) θεωρούνται απαραίτητα για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών εφόσον αποτελούν συστατικά πολλών ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών. Ωστόσο, αυξημένες συγκεντρώσεις και των δυο απαραίτητων και μη απαραίτητων βαρέων μετάλλων στο έδαφος μπορεί να οδηγήσουν σε συμπτώματα τοξικότητας καθώς επίσης και στην αναστολή της αύξησης των περισσότερων φυτών. Τα συμπτώματα της τοξικότητας λόγω των υπερβολικών ποσοτήτων των βαρέων μετάλλων ίσως να οφείλονται στις διάφορες αλληλεπιδράσεις σε μοριακό/κυτταρικό επίπεδο.

Η τοξικότητα μπορεί να προκληθεί από την δέσμευση των μετάλλων από την sulphhydryl ομάδα στις πρωτεΐνες, την αναστολή της δραστηριότητας ή την διάσπαση της δομής, ή από αντικατάσταση ενός απαραίτητου στοιχείου ως αποτέλεσμα της έλλειψης των επιδράσεων (Van Assche and Clijsters, 1990). Επιπρόσθετα, τα βαρέα μέταλλα μπορούν να διεγείρουν τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών καθώς και των reactive oxygen species (ελεύθερες ρίζες), προκαλώντας ίσως οξειδωτικό στρες (Dietz et al., 1999).

Τα φυτά εναποθέτουν διάφορους πιθανούς μηχανισμούς σε κυτταρικό επίπεδο, οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με την αποτοξίνωση και συνεπώς με την ανοχή των βαρέων μετάλλων στο στρες. Αυτοί περιλαμβάνουν ρόλους όπως οι παρακάτω: εξωκυτταρικά για τις μυκόρριζες, για το κυτταρικό τοίχωμα και για τα εκκρίματα.

Η ανοχή μπορεί ακόμη να περιλαμβάνει την πλασματική μεμβράνη, είτε μειώνοντας την πρόσληψη των μετάλλων ή διεγείροντας την εκροή της άντλησης των μετάλλων τα οποία είχαν εισέλθει στο κυτταρόπλασμα.

Μεταξύ του πρωτοπλάστη υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί, για παράδειγμα, για την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων από στρες πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνοντας τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ ή τις μεταλλοθειονεΐνες, και για την χήλωση των μετάλλων από οργανικά οξέα, αμινοξέα ή πεπτίδια όπως είναι οι φυτοχηλατίνες (phytochelatins), ή της διαμερισματοποίησης των μετάλλων μέσω της μεταφοράς τους μέσα στο χυμοτόπιο.

Η παρούσα μελέτη παρέχει μια αναφορά στους πιθανούς μηχανισμούς, οι οποίοι μπορούν να σχετίζονται με την αποτοξίνωση και την ανοχή των βαρέων μετάλλων σε κυτταρικό επίπεδο, κυρίως σε σχέση με τον χαλκό, το κάδμιο, το νικέλιο και τον ψευδάργυρο, εφόσον αυτά είναι τα περισσότερο ευρέως διαδεδομένα.

Μυκόρριζες

Οι μυκόρριζες και συγκεκριμένα οι εκτομυκόρριζες οι οποίες είναι χαρακτηριστικό των θάμνων και των δέντρων, μπορεί να είναι αποτελεσματικοί στην βελτίωση των επιδράσεων εξαιτίας της τοξικότητας των μετάλλων στο φυτό ξενιστή (Marschner, 1995, Huttermann et al., 1999, Jentschke and Godbold, 2000).

Οι μηχανισμοί που παρέχουν αυτήν την ανοχή και δείχνουν στα διάφορα είδη την εξειδίκευση των μετάλλων, έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές στην απόκριση στα μέταλλα, μεταξύ των ειδών όπως για παράδειγμα μεταξύ των μυκήτων και των διαφόρων μετάλλων (Hartley et al., 1997, Huttermann et al., 1999).

Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από τους μύκητες σε κυτταρικό επίπεδο για να ανεχθούν την επίδραση των βαρέων μετάλλων είναι πιθανόν παρόμοιοι με ορισμένους μηχανισμούς των ανώτερων φυτών, όπως είναι για παράδειγμα η δέσμευση των εξωκυτταρικών υλικών ή η απομάκρυνση αυτών στην περιοχή του χυμοτοπίου.

Αν και η ερεύνηση των μηχανισμών αυτών είναι σημαντική, παρόλ' αυτά, λίγες είναι οι μελέτες που αναφέρονται στον ρόλο των arbuscular μυκόρριζων στην ανοχή τους σχετικά με τα μέταλλα. Οι επιδράσεις στην ρίζα του καλομποκιού από τα arbuscular μυκόρριζα μπορεί είτε να μειώσουν το περιεχόμενο των βαρέων μετάλλων στα φυτά είτε να αυξήσουν την απορρόφηση των μετάλλων από τα μολυσμένα εδάφη, τα οποία εξαρτώνται από τις συνθήκες αύξησης, από τους μύκητες και από τα μέταλλα (Weissenhorn et al., 1995).

Το κυτταρικό τοίχωμα και τα ριζικά εκκρίματα.

Αν και το κυτταρικό τοίχωμα στην ρίζα είναι άμεσα συνδεδεμένο με τα μέταλλα μέσω του εδαφικού διαλύματος, η απορρόφηση στο κυτταρικό τοίχωμα θα πρέπει να είναι περιορισμένη έτσι ώστε να έχει περιορισμένη επίδραση στην δραστηριότητα των μετάλλων στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Ακόμη, είναι δύσκολο να εξηγηθεί η εξειδίκευση των μετάλλων στην ανοχή μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού (Ernst et al., 1992).

Τα ριζικά εκκρίματα παίζουν διάφορους ρόλους στην ανοχή των μετάλλων (Marschner, 1995) συμπεριλαμβάνοντας τους χηλικούς παράγοντες των μετάλλων οι οποίοι ίσως να ενισχύουν την πρόσληψη συγκεκριμένων μετάλλων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο ρόλος των Ni-χηλικών παραγόντων που εκκρίνονται στα Ni-υπερσυσσωρευμένα φυτά, στα οποία παρατηρήθηκε ότι η Ni-χηλική ιστιδίνη και το κιτρικό άλας συσσωρεύονται στα εκκρίματα της ρίζας των μη-υπερσυσσωρευμένων φυτών, και έτσι μπορούν να βοηθήσουν στην μείωση της πρόσληψης του νικελίου (Ni) και με αυτόν τον τρόπο παίζουν πολύ σπουδαίο ρόλο στην αποτοξικοποίηση του νικελίου (Salt et al., 2000).

Η πλασματική μεμβράνη

Η λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης μπορεί να επηρεάζεται άμεσα από τα βαρέα μέταλλα όπως φαίνεται από την αυξανόμενη διαρροή τους από τα κύτταρα στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων των μετάλλων και ιδιαίτερα του χαλκού. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το πως μπορεί αυτό να επιτευχθεί. Για παράδειγμα, τα φυτά που έχουν ανθεκτικότητα στα μέταλλα δεν εμφανίζουν ενισχυμένη ανοχή στις ελεύθερες ρίζες ή στα reactive oxygen species (ελεύθερες ρίζες), αλλά στηρίζονται στους βελτιωμένους μηχανισμούς για την ομοίωση των μετάλλων (Dietz et al., 1999).

Οι επιδράσεις των μετάλλων στις μεμβράνες εξαρτώνται από το μέταλλο, σε αντίθεση με τον χαλκό και τον ψευδάργυρο που προστατεύουν τις μεμβράνες κατά της οξειδωσης και γενικά δεν προκαλούν στις μεμβράνες διαρροή (Ernst et al., 1992, Cakmak, 2000).

Ένας άλλος παράγοντας που ίσως να σχετίζεται με την διατήρηση της πλασματικής μεμβράνης στην παρουσία των βαρέων μετάλλων μπορεί να είναι η επιδιόρθωση της μεμβράνης από την βλάβη (Salt et al., 1998). Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ ή τις μεταλλοθειονεΐνες.

Οι Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ.

Είναι φανερό, ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) εκφράζονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των φυτών. Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την αύξηση της έκφρασης των HSPs στα φυτά σε απόκριση στο στρες που προκαλούν τα βαρέα μέταλλα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αύξηση της hsp70 σε κυτταρικές σειρές του *Lycopersicon peruvianum* κατά την έκθεσή του σε κάδμιο (Neumann et al., 1994).

Ο εντοπισμός της hsp70 στον πυρήνα στο κυτόπλασμα, αλλά ακόμη και στην πλασματική μεμβράνη αποδεικνύει ότι η hsp70 μπορεί να σχετίζεται με την προστασία των μεμβρανών από την βλάβη που προκαλείται από την έκθεση σε κάδμιο. Επομένως, η ανοχή της πλασματικής μεμβράνης, η βελτίωση των μηχανισμών επιδιόρθωσης και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αποδεικνύεται ότι παίζουν πολύ σπουδαίο ρόλο στην ανθεκτικότητα των μηχανισμών.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι έκθεση σε θερμικό στρες για μικρό χρονικό διάστημα πριν την έκθεση σε βαρέα μέταλλα, επάγει ανοχή στην επίδραση εμποδίζοντας την δημιουργία βλάβης στην μεμβράνη (Neumann et al., 1994).

Η χήλωση των μετάλλων στο διαλυτό κυτταρόπλασμα μέσω της υψηλής συγγένειας των συνδεδεμένων μορίων αποτελεί πιθανόν έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό της αποτοξικοποίησης των βαρέων μετάλλων και της ανοχής.

Τα πιθανά συνδεδεμένα μόρια περιλαμβάνουν τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα καθώς και δυο κατηγορίες πεπτιδίων των φυτοχηλιδίων και των μεταλλοθειονεϊνών (Rausser, 1999, Clemens, 2001).

Τα ανώτερα φυτά περιέχουν δύο τύπους πεπτιδίων πλούσια σε κυστεΐνη, που δεσμεύουν τα μέταλλα, τις μεταλλοθειονεΐνες (MTs) καθώς και τις φυτοχηλιδίνες (PCs). Οι μεταλλοθειονεΐνες (MTs) έχουν αναγνωριστεί σε ποικιλία ανώτερων φυτών (Prasad, 1999) συμπεριλαμβανομένου και της *Arabidopsis*.

Οι φυτοχηλιδίνες (PCs), έχουν ευρέως μελετηθεί στα φυτά λόγω της επαγωγής κατά την έκθεση σε βαρέα μέταλλα και ιδιαίτερα σε σχέση με την ανοχή τους στο κάδμιο (Cobbett, 2000, Goldsbrough, 2000).

Στα φυτά, υπάρχει έλλειψη πληροφοριών των μετάλλων που δεσμεύονται από τις μεταλλοθειονεΐνες (MTs), αν και ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και το κάδμιο είναι τα περισσότερο μελετημένα (Tomsett and Thrurman, 1988, Robinson et al., 1993, Goldsbrough, 2000).

Οι μεταλλοθειονεΐνες (MTs) επάγονται από την έκθεση σε χαλκό και ενώ είναι γνωστός ο ρόλος τους στην ανοχή των βαρέων μετάλλων στους μύκητες και στα ζώα (Hamer, 1986), ο ρόλος τους στην αποτοξίκωση των βαρέων μετάλλων στα φυτά χρειάζεται εκτενέστερη μελέτη (Zhou and Goldsbrough, 1994, Zenk, 1996, Giritich et al., 1998, Schat et al., 2000).

Η εκροή των ιόντων στην πλασματική μεμβράνη ή η μεταφορά τους στο χυμοτόπιο αποτελούν δύο τρόπους μείωσης των επιπέδων των τοξικών μετάλλων στο διαλυτό κυτταρόπλασμα και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως σημαντικοί μηχανισμοί της ανοχής των βαρέων μετάλλων.

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι συγκεκριμένοι μηχανισμοί εφαρμόζονται σε συγκεκριμένα μέταλλα και είδη. Οι μηχανισμοί αυτοί, περιλαμβάνουν: την μείωση της πρόσληψης των βαρέων μετάλλων στο διαλυτό κυτταρόπλασμα μέσω της εγκλώβισής τους στον χώρο του αποπλάστη, την χήλωση των μετάλλων στο διαλυτό κυτταρόπλασμα μέσω διαφόρων συνδεδεμένων μορίων, ή μέσω της εκροής από το διαλυτό κυτταρόπλασμα, είτε μέσα στον αποπλάστη ή είτε μέσα στο χυμοτόπιο. Ακόμη, είναι πιθανό στην μείωση της τοξικότητας ενός συγκεκριμένου μετάλλου να παίρνουν μέρος περισσότερο από ένας μηχανισμοί.

9.2 Η ενεργοποίηση της Hsp70 promoter από ανόργανα/οργανικά χημικά του Περιβάλλοντος,

Σχέση μεταξύ της κυτοτοξικότητας και της λιποφιλικότητας

Η μελέτη της δραστηριότητας διάφορων οργανικών και ανόργανων χημικών του περιβάλλοντος, τα οποία επάγουν την έκφραση του δείκτη της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ, πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HeLa που περιέχουν το γονίδιο chloramphenicol acetyl transferase (CAT) υπό τον έλεγχο του υποκινητή της hsp70 (Kretz-Remy and Arrigo, 1994, Ait-Aissa et al., 1999b).

Έχει αποδειχθεί από άλλες μελέτες σε άλλους τύπους κυττάρων (Fishbach et al., 1993, Ryan and Hightower, 1994) ή οργανισμούς (Güven et al., 1994) ότι τα βαρέα μέταλλα μπορούν να επάγουν την έκφραση του γονιδίου της hsp70 σε υποθησιγόνες συγκεντρώσεις.

Τα τρία μέταλλα που εξετάστηκαν (κάδμιο, ψευδάργυρος και υδράργυρος), ήταν ικανά να επάγουν απόκριση σε στρες. Ορισμένα οργανοχλωριωμένα σκευάσματα (παράγωγα χλωροφαινόλης, tetrachlorohydroquinone, 3,4-dichloroaniline, ethyl parathion και 1-chloro-2,4-dinitrobenzene) μπορούσαν επίσης και αυτά να επάγουν απόκριση σε στρες, ενώ άλλα αλογονούχα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ή αρωματικοί υδρογονάνθρακες (benzo(a)pyrene, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, endosulfan, diuron, 4-nonylphenol) δεν μπορούσαν. Επιπλέον, οι χλωροφαινόλες μπορούσαν να επάγουν απόκριση μονάχα σε κυτοτοξικές συγκεντρώσεις.

Οι αναλύσεις κυτοτοξικότητας που έγιναν παράλληλα με την επαγωγή μετρήσεων έδειξαν ότι τα τρία μέταλλα επιδρούσαν σε μη κυτοτοξικές δόσεις ενώ όλα τα οργανικά σκευάσματα, εκτός από το tetrachlorohydroquinone και 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, μπορούσαν να επάγουν τον υποκινητή της hsp70 σε κυτοτοξικές δόσεις.

Για την μελέτη της δραστηριότητας της hsp70 μέσω των οργανικών ρυπογόνων, χρησιμοποιήθηκε το θερμικό στρες και χλωριούχο κάδμιο, ως θετικά δείγματα αναφοράς για την επαγωγή του υποκινητή της hsp70, καθώς και του PCP (pentachlorophenol) ως μοντέλο οργανικού σκευάσματος στο περιβάλλον.

Η επαγωγή του υποκινητή της hsp70 και από τα δύο χημικά σκευάσματα αποδείχτηκε ότι είναι χρονο και δοσο-εξαρτώμενη. Η μακροχρόνια έκθεση (16 ώρες) σε κάδμιο ή σε PCP προκάλεσε ενεργοποίηση του γονιδίου της hsp70 σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την βραχύβια έκθεση (5 ώρες). Εφόσον, οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν στο περιβάλλον είναι συνήθως χαμηλότερες, η έκθεση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα φαίνεται να είναι περισσότερο προσαρμόσιμη για να εντοπιστούν εκτενέστερα οι χαμηλές ποσότητες των ρυπογόνων.

Μεταξύ αυτών, το κάδμιο ήταν το ισχυρότερο και το περισσότερο ειδικό εφόσον μπορούσε να επάγει σημαντική απόκριση σε συγκεντρώσεις πιο κάτω από τις κυτοτοξικές.

Επομένως, το χλωριούχο κάδμιο, ο υδράργυρος και ο ψευδάργυρος μπορούσαν να επάγουν τον υποκινητή της Hsp70 σε συγκεντρώσεις οι οποίες δεν είχαν καμία επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων σύμφωνα με το περιεχόμενο του συνόλου της πρωτεΐνης.

Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η hsp70 επάγεται από διαφορετικούς μηχανισμούς τοξικότητας και ότι αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μηχανισμού για την εντόπιση των τοξικών επιδράσεων των συγκεκριμένων ρυπογόνων.

Στη σχέση μεταξύ της επαγωγής της hsp70 και της κυτοτοξικής επίδρασης, για συγκεκριμένα οργανικά χημικά, η απόκριση σε θερμικό σοκ συμβαίνει υπό συνθήκες οι οποίες περιορίζουν τον μεταβολισμό των κυττάρων, και έτσι δεν αντιπροσωπεύουν έναν ευαίσθητο βιοδείκτη της τοξικότητας σε σύγκριση με τις κλασικές ανάλυσεις των κυττάρων.

Συνεπώς, η HSP70 από μόνη της δεν μπορεί να θεωρηθεί ως γενικός δείκτης της τοξικότητας. Μπορεί ωστόσο να συμφωνηθεί ότι ορισμένα από τα χημικά που δεν προκαλούν επαγωγή της hsp70, και συγκεκριμένα το B(a)P και το 2,4-D ότι χρειάζονται να μεταβολιστούν για να εξάγουν την τοξικότητά τους.

Ωστόσο, το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε χρειάζεται εκτενέστερη αξιολόγηση με μελέτες που θα διεξαχθούν για να συγκριθούν τα *in vitro* hsp70-CAT αποτελέσματα με πρότυπες μελέτες που θα μετρούν τα τελικά σημεία της *in vivo* οικοτοξικότητας.

9.3 Τα βαρέα μέταλλα ως οι ισχυρότεροι αναστολείς της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών.

Η περιβαλλοντική και επαγγελματική έκθεση σε βαρέα μέταλλα όπως είναι το κάδμιο, ο υδράργυρος και ο μόλυβδος προκαλεί σοβαρούς κινδύνους στην υγεία συμπεριλαμβάνοντας τις ανωμαλίες σε προγεννητικό και αναπτυξιακό στάδιο.

Η οξεία και χρόνια τοξίκωση που προκαλείται από το κάδμιο, τον υδράργυρο και τον μόλυβδο είναι γνωστή σε κάθε μορφή ζωής (H.Hu, 2005, M.J. Kosnett, 2007). Επιπλέον, το κάδμιο και ο μόλυβδος είναι καρκινογόνα για τον άνθρωπο και ίσως να προκαλούν νευροεκφυλιστικές ασθένειες ((M. Waisberg et al., 2003, C.M. Bolin et al., 2006, F. Monnet-Tschudi et al., 2006).

Έχουν αναφερθεί δυο τρόποι σύμφωνα με τους οποίους επηρεάζονται οι πρωτεΐνες από τα ιόντα των βαρέων μετάλλων: τα ιόντα των μετάλλων είτε δεσμεύονται στην ελεύθερη θειόνη και στις άλλες λειτουργικές ομάδες συγκεκριμένων φυσικών πρωτεϊνών ή αντικαθιστούν τον ψευδάργυρο και τα άλλα απαραίτητα μέταλλα μέσω των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τα μέταλλα (metal-dependent proteins)(F.R.N.Gurd. et al., 1956, B.L.Vallee, et al., 1972, J.H.R.Kagi et al., 1984, J.JR. Frausto da Silva et al., 1993).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι κατά την αναδίπλωση οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο επιρρεπείς στα ιόντα των βαρέων μετάλλων σε σχέση με τις πρωτεΐνες οι οποίες είναι ήδη μη μετουσιωμένες.

Αυτή η μελέτη εξετάζει τις ανασταλτικές επιδράσεις των Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών με τρεις διαφορετικούς τρόπους: α) με την αυθόρμητη αναδίπλωση των χημικά αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, β) αναδιπλώνοντας τις χημικά αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες μέσω του ATP-driven Hsp70 chaperone συστήματος (DnaK/DnaJ/ GrpE of *Escherichia coli*), και γ) μέσω της chaperone-mediated disaggregation και της αναδίπλωσης των σταθερά συσσωρευμένων θερμικά-αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών.

Ερευνήθηκαν οι εξής πρωτεΐνες: α) η λουσιφεράση (Luciferase), β) η γαλακτική αφυδρογονάση (lactate dehydrogenase), γ) η μηλική αφυδρογονάση (Malate dehydrogenase) και δ) η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose-6-phosphate dehydrogenase).

Μεταξύ των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν, η σειρά των ιόντων των μετάλλων, σε σχέση με την δραστηριότητά τους στην αναστολή της αναδίπλωσης, με βάση την τιμή της LC_{50} ήταν $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$. Αυτή η σειρά σχετίζεται ποιοτικά με τις σχετικές σταθερές των πολύπλοκων αυτών ιόντων με τα συνδεδεμένα (μόρια) στις πρωτεΐνες όπως είναι η θειόλη (thiol), το ιμιδαζόλιο (imidazole) και η καρβοξυλική ομάδα..

Τα ξеноβιοτικά βαρέα μέταλλα Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} όπως επίσης και τα άλλα απαραίτητα μέταλλα σε υπερβολικές ποσότητες αναμένονται να εμποδίζουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Ανάλογα με την πρωτεΐνη που έχει υποστεί επίδραση και τον τύπο του μετάλλου, υπάρχουν διαφορετικές επιδράσεις στην κινητική και στην θερμοδυναμική των πρωτεϊνών που έχουν διπλωθεί.

Έτσι, η αναστολή της πτύχωσης των πρωτεϊνών γενικά μπορεί ίσως να συμβάλλει στην πλειοτροπική (metal-specific) συμπτωματολογία της δηλητηρίασης των βαρέων μετάλλων (H.Hu, 2005, M.J. Kosnett, 2007, M. Waisberg et al., 2003, US Department, 2005).

Αυτός ο τρόπος δράσης των τοξικών βαρέων μετάλλων μπορεί να μην είναι μόνο απαραίτητος στην παθογένεια της δηλητηρίασης των κλασικών βαρέων μετάλλων αλλά αναφέρει εώς τώρα άγνωστες ή ανεξήγητες συνέπειες της έκθεσης των ζωντανών οργανισμών στα βαρέα μέταλλα, συμπεριλαμβάνοντας συγκεκριμένες ασθένειες που προκαλούνται εξαιτίας της πτύχωσης των πρωτεϊνών (K.J.Barnham et al., 2004, F.Chiti et al., 2006), τις αυτοάνοσες αποκρίσεις (B. Rowley, M. Monestier, 2005).

Συνοψίζοντας στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε ότι δηλητηριώδεις επιδράσεις των ιόντων των βαρέων μετάλλων Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} αναστέλλουν αποτελεσματικά την αυθόρμητη αναδίπλωση των χημικά αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών σχηματίζοντας πολύπλοκα υψηλής συγγένειας με την θειόλη καθώς και με άλλες λειτουργικές ομάδες (LC_{50} in the nanomolar range).

Με την ίδια αποτελεσματικότητα, τα βαρέα μέταλλα αναστέλλουν την chaperone-assisted αναδίπλωση των χημικά αποδιατεταγμένων και θερμικά-αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών. Έτσι, οι τοξικές επιδράσεις των ιόντων των βαρέων μετάλλων μπορεί να προκληθούν επίσης από τις αλληλεπιδράσεις τους με τις περισσότερο εύκολα προσβάσιμες λειτουργικές ομάδες των πρωτεϊνών σε αρτιγέννητη και σε άλλη μη φυσική (μη μετουσιωμένη) δομή.

Και τέλος, τα βαρέα μέταλλα, προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός της ανασταλτικής αναδιάταξης των πολύπλοκων μεταλλο-πρωτεϊνών, συνδέονται σε πολυπριονωτή δομή σε πολλές κατάλληλα τοποθετημένες, συνδεδεμένες αλυσίδες των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

10.1. Η παραγωγή των μεταλλοθειονεϊνών και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε απόκριση στα μέταλλα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παραγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε απάντηση στα μέταλλα. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ηπατοκυττάρων επιμύων του είδους Sprague-Dawley βάρους 250-300 gr, για διάρκεια 22 ωρών και ακολούθως τους χορηγήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις μετάλλων για διάρκεια 4 ωρών, ή επώαστηκαν στους 43.5 °C για 15-60 λεπτά. καθώς και επιμύες στους οποίους χορηγήθηκε μόνο νερό, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων που χορηγήθηκαν βρέθηκαν να παρέχουν την υψηλότερη πιθανή τοξικότητα στα κύτταρα χωρίς όμως να καταστρέφουν όλα τα κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν την αύξηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθώς και της μεταλλοθειονεϊνης. Η περισσότερο επαγόμενη πρωτεΐνη θερμικού σοκ ήταν της οικογένειας hsp70 (εξαπλάσια αύξηση) και έπειτα της οικογένειας hsp90 (τριπλάσια αύξηση). Είναι γεγονός, πως τόσο τα βαρέα μέταλλα όσο και θερμότητα μπορούν σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων επιμύων να επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Klaassen & Stacey, 1897).

Από τα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν το στοιχείο του αρσενικού ήταν το περισσότερο δραστικό στην αύξηση των επιπέδων των hsp70 και hsp90 πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Κατά την έκθεση σε βαρέα μέταλλα όπως αρσενικό και ψευδάργυρος διαπιστώθηκε έλλειψη συνεργίας στην παραγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και της μεταλλοθειονεϊνης.

Πιο συγκεκριμένα το α) αρσενικό προκάλεσε την παραγωγή μόνο του 50% της αύξησης της μεταλλοθειονεϊνης, ενώ παρήγαγε εξαπλάσια αύξηση της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ και β) ο ψευδάργυρος προκάλεσε τριπλάσια αύξηση της hsp70 καθώς και 20πλάσια αύξηση της μεταλλοθειονεϊνης.

Κατά την έκθεση σε θερμότητα παρατηρήθηκε επαγωγή των hsp70 και hsp90 πρωτεϊνών θερμικού σοκ, ενώ τα επίπεδα της μεταλλοθειονεϊνης μειώθηκαν. Είναι γεγονός, ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ που επάγονται λόγω της έκθεσης των ηπατοκυττάρων σε μικρές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων δεν προκαλούν τοξικότητα στα κύτταρα. Μικρές συγκεντρώσεις καδμίου και αρσενικού επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ χωρίς να προκαλούν την έλλειψη του ενδοκυτταρικού καλίου.

Αυτό αποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες έκθεσης σε βαρέα μέταλλα.

Συνοπτικά, θα λέγαμε πως τόσο τα βαρέα μέταλλα όσο και η θερμότητα μπορούν να επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Ενώ παρατηρήθηκε έλλειψη συνεργίας μεταξύ των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και των επιπέδων της μεταλλοθειονεϊνης κατά την έκθεση των ηπατοκυττάρων σε βαρέα μέταλλα και σε θερμότητα.

Αν και υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και της μεταλλοθειονεϊνης, ωστόσο δεν είναι εφικτή η ύπαρξη μιας καλής σχέσης μεταξύ των στρεσογόνων παραγόντων που επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ καθώς και αυτών που επάγουν την μεταλλοθειονεϊνη (Wu et al., 1986).

Αποτελέσματα

Κατά την έκθεση των ηπατοκύτταρων σε α) **κάδμιο** παρατηρήθηκε:

- 1.διπλάσια αύξηση της hsp90 πρωτεΐνης θερμικού σοκ και
- 2.πενταπλάσια αύξηση της hsp70 και της μεταλλοθειονεΐνης ενώ
- 3.η υψηλότερη συγκέντρωση του καδμίου προκάλεσε τοξικότητα λόγω της μείωσης του ενδοκυτταρικού καλίου

β) **σε ψευδάργυρο** παρατηρήθηκε:

- 1.διπλάσια αύξηση της hsp90 πρωτεΐνης θερμικού σοκ,
- 2.τριπλάσια αύξηση της hsp70,
- 3.20πλάσια αύξηση της μεταλλοθειονεΐνης καθώς
- 4.μείωση του ενδοκυτταρικού καλίου στην υψηλότερη συγκέντρωση ψευδαργύρου,

γ) **σε αρσενικό** παρατηρήθηκε

- 1.διπλάσια αύξηση της hsp90 πρωτεΐνης θερμικού σοκ,
 - 2.εξαπλάσια αύξηση της hsp70 και 50% αύξηση της μεταλλοθειονεΐνης,
- η υψηλότερη συγκέντρωση του αρσενικού στην παρούσα μελέτη προκαλεί τοξικότητα λόγω της μείωσης του ενδοκυτταρικού καλίου

δ)σε **υδράργυρο**

- 1.παρατηρήθηκε διπλάσια αύξηση της hsp90 πρωτεΐνης θερμικού σοκ,
- 2.τριπλάσια αύξηση της hsp70,
- 3.μια μέγιστη αύξηση (εξαπλάσια) των επιπέδων της μεταλλοθειονεΐνης καθώς
- 4 μείωση του ενδοκυτταρικού καλίου κατά την έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση υδραργύρου και

ε) σε **θερμότητα** (43.5 °C) για διάρκεια 60 λεπτών παρατηρήθηκε

- 1.τριπλάσια αύξηση της hsp90,
 - 2.εξαπλάσια αύξηση της hsp70,
 - 3.20% μείωση των επιπέδων της μεταλλοθειονεΐνης,
- ενώ σε θερμοκρασία λιγότερη των 43.5 °C δεν υπήρξε αύξηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθώς και έλλειψη του ενδοκυτταρικού καλίου έπειτα από την πάροδο της έκθεσης των 60 λεπτών.

10.2. Η αποκλίνουσα κινητική της επαγωγής της Hsp70 στα Ισόποδα(Oniscus asellus) σε απόκρισή τους σε 4 οργανικά χημικά (B[a]P, PCB52, γ-HCH, PCP)του περιβάλλοντος: Η καταλληλότητα και οι περιορισμοί ενός βιοδείκτη.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί εάν η απόκριση της hsp70, η οποία έχει ήδη θεωρηθεί κατάλληλη για την παρακολούθηση των επιδράσεων των βαρέων μετάλλων στα ασπόνδυλα του εδάφους (Köhler et al., 1996, Eckwert et al., 1997, Köhler and Eckwert,1997), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της πρωτεοτοξικής επίδρασης που προκαλείται λόγω των οργανικών ξеноβιοτικών.

Σε δείγματα από τα Ισόποδα του είδους *Oniscus asellus*, τα οποία βρίσκονταν στο έδαφος καθώς και στα νεαρά φύλλα είχαν προστεθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις τεσσάρων οργανικών ξеноβιοτικών διαφορετικής φύσεως: του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα benzo(a)pyren,(B[a]P), του 2,2',5.5'-tetrachlorophenol (PCB52), δύο οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων, ένα αρωματικό (pentachlorophenol, PCP και ένα αλειφατικό (lindane, γ-HCH).

Οι συγκεντρώσεις των ξενοβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για την έκθεση του *Oniscus asellus* για 14 ημέρες ήταν 0, 0.5,1,3,7, για το γ-HCH, PCP, και 0, 1, 3 για το B[a]P, PCB52 αντίστοιχα.

Τα δύο εξεταζόμενα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στο περιβάλλον, το lindane ως εντομοκτόνο και ατμογόνο στα διάφορα φυτοφάγα είδη του εδάφους, και το PCP ως εντομοκτόνο και ως μυκητοκτόνο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της hsp70 ήταν ανάλογη του χρόνου, έπειτα από την έκθεση των Ισόποδων για 24 ώρες σε PCB52 ή σε B[a]P παρατηρήθηκε μια σημαντική αλλά παροδική επαγωγή της hsp70 απόκρισης. Παρ'όλη την συνεχή έκθεση, τα επίπεδα της hsp70 μειώθηκαν και ακολούθως πλησίασαν κοντά και κάτω των επιπέδων των δειγμάτων αναφοράς ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του PCB52 ή του B[a]P στο υπόστρωμα.

Από τις δοκιμές που έγιναν, παρατηρήθηκε ότι καμία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις δεν προκάλεσε θνησιμότητα στα Ισόποδα κατά την έκθεση και, έτσι όλες οι συγκεντρώσεις των χημικών βρέθηκαν να είναι υποθνησιγόνες κατά την διάρκεια της έκθεσης για 14 ημέρες.

Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του PCP ή του γ-HCH επίσης, συνετέλεσαν αρχικά σε μία αύξηση της απόκρισης της hsp70 έπειτα από 24 ώρες έκθεσης καθώς και σε μία δεύτερη αύξηση των επιπέδων της hsp70 έπειτα από πολλές ημέρες έκθεσης.

Τέλος, μολονότι οι οξείες συνθήκες του στρες εναποτίθενται από όλα τα τέσσερα οργανικά χημικά που εξετάστηκαν μέσω της παρακολούθησης της επαγωγής της στρες πρωτεΐνης, διαπιστώθηκε ότι η hsp70 μπορεί να δράσει ως βιοδείκτης χρόνιας έκθεσης και επίδρασης μόνο για το PCP και για το γ-HCH.

10.3. Η αναπτυγμένη τοξικολογία του Cd σε έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς του Zebrafish.

Οι τοξικές επιδράσεις του καδμίου και των άλλων βαρέων μετάλλων είναι ευρέως διαδεδομένες, και πολλά από αυτά τα ρυπογόνα του περιβάλλοντος είναι γνωστά ως εμβρυοτοξικά ή ως τερατογόνα.

Το κάδμιο σύμφωνα με την λίστα των κυριότερων ρυπογόνων της Environmental Protection Agency έχει χαρακτηριστεί ανάλογα με την απορρόφησή του, την κατανομή του στους ιστούς, τον μηχανισμό δράσης του και την εξάλειψη των σπονδυλωτών ειδών με μεγάλη χρονική διάρκεια ζωής (ATSDR,1999). Παρόλ'αυτά, οι πιθανές εμβρυονικές επιδράσεις αυτού του βαρέου μετάλλου δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί..

Στην παρούσα μελέτη αναφέρεται η ανάπτυξη ενός *in vitro* συστήματος, το οποίο χρησιμοποιεί την ενεργοποίηση του hsp70 γονιδίου ως μέτρηση της τοξικότητας του καδμίου σε ζωντανούς οργανισμούς που βρίσκονται σε πρόωρο στάδιο και συγκεκριμένα του διαγονιακού Zebrafish έχοντας μια σταθερή βαθμιαία προσέγγιση της hsp70-eGFP (enhanced green fluorescent protein) γονιδίου αναφοράς.

Χρησιμοποιήθηκαν Zebrafish με μεγάλη διάρκεια ζωής, τα οποία διατηρήθηκαν στους 28°C σε σύστημα νερού με 14-hr φωτοπερίοδο, τα έμβρυα συλλέκθηκαν μεταχειρίστηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπες μεθόδους (Kimmel CB et al., 1995, Westerfield M.,1995).

Προνύμφες εκτέθηκαν μέσω του συστήματος νερού/διαλυμάτων σε (0-125μM) συγκεντρώσεις καδμίου για 96 ώρες, ξεκινώντας 72 ώρες μετά την γονιμοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν επίσης και προνύμφες που δεν εκτέθηκαν σε κάδμιο, οι οποίες αποτέλεσαν ως δείγματα αναφοράς.

Η επαγωγή της έκφρασης της hsp70 θα πρέπει να εξαρτάται από την συγκέντρωση της τοξικής ουσίας καθώς και να είναι αρκετά ευαίσθητη για να προσδιορίσει τις υποθησιγόνες συγκεντρώσεις, οι οποίες θα μπορούν να συνδέονται με την θνησιμότητα και με τις δισμορφολογίες (τελικά σημεία τοξικότητας).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του hsp70 γονιδίου αναφοράς παρατηρήθηκε στις 0, 8, 16 και 24 ώρες έπειτα από την έκθεση σε κάδμιο. Οι κυρίες επιδράσεις της έκθεσης σε κάδμιο μετά από 96 ώρες ήταν η θνησιμότητα, το οίδημα και οι ανωμαλίες στον κορμό του ιχθύος όπως σπονδυλωτή κύρτωση, σκολίωση και λόρδωση.

Η έκθεση σε συγκέντρωση 125μM καδμίου προκάλεσε την έκφραση της hsp70 στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυσσόμενου δέρματος, των βραγχίων, των οσφρητικών οργάνων, του πεπτικού σωλήνα, του ήπατος, των προνεφρικών πόρων του πρόνεφρου, και της ετερόπλευρης σειράς των νευρωμάτων σε αντίθεση με τα δείγματα αναφοράς.

Επιπλέον, η έκφραση της hsp70 μετά την έκθεση σε συγκέντρωση 5μM καδμίου παρατηρήθηκε στους οσφρητικούς ιστούς, στα βράγχια και στο δέρμα, ενώ σε συγκέντρωση 0.2μM εντοπίστηκε μόνο στα κύτταρα των βραγχίων και του δέρματος σε αντίθεση με τα δείγματα αναφοράς. Η έκφραση της hsp70 στους ιστούς αποδεικνύει ότι εξαρτάται από την συγκέντρωση του καδμίου, συνεπώς η hsp70 εντοπίστηκε ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε ιστού με την παρακάτω σειρά: βράγχια > δέρμα > οσφρητικά όργανα > πεπτικός σωλήνας >> ήπαρ > πρόνεφρος.

Είναι γεγονός, ότι διάφοροι κυτοτοξικοί παράγοντες συμπεριλαμβάνοντας και το κάδμιο έχουν αποδειχθεί ότι απορρυθμίζουν την hsp70, και ότι η έκφραση της hsp70 έχει εξεταστεί ως πιθανός δείκτης σε τοξικολογική εξέταση σε διάφορα είδη σπονδυλωτών.

10.4 To Sodium Arsenite AP-1 and NF κB DNA Binding επάγει την έκφραση των στρες πρωτεϊνών στα Precision-Cut Rat Lung Slices.

Το αρσενικό είναι ένα πολύ γνωστό καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Η έκθεση σε αρσενικό μέσω της εισπνοής σχετίζεται με τις βιομηχανίες που ασχολούνται με το λιώσιμο του μολύβδου, του χαλκού και του αρσενικού, από την ανάφλεξη της απολίθωσης των καυσίμων στα ενεργειακά φυτά όπως επίσης και στην παραγωγή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ο άνθρωπος, μπορεί να εκτεθεί σε αρσενικό ακόμη και μέσω της πρόσληψης μολυσμένου φαγητού και νερού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι συγκεντρώσεις αρσενικού που βρέθηκαν στο πόσιμο νερό της Αλάσκας και στις δυτικές και στις βορειοδυτικές πολιτείες των U.S.

Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού μέσω της κατανάλωσης νερού μπορεί να προκαλέσει καρκίνο στον πνεύμονα, στο δέρμα, στο ήπαρ και στα νεφρά. Το μέγιστο επίπεδο μόλυνσης (maximum contaminant level, MCL) για το αρσενικό στο πόσιμο νερό είναι 50 μg/l (προτεινόμενο επίπεδο 5 μg/l), για μερικά μέρη, παρόλ' αυτά, στις παραπάνω περιοχές εντοπίστηκαν 50-100 μg/l (Davis et al., 1994). Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση του καρκίνου δεν είναι πλήρως γνωστοί, καθώς δεν είναι μεταλλαξιογόνοι στα βακτηριακά ή θηλαστικά κύτταρα (Lofroth and Ames, 1978, Rossman et al., 1980).

Το αρσενικό, ανήκει στην κατηγορία των άτυπων καρκινογόνων, εφόσον δεν ανήκει στην κατηγορία του εκκινήτηρα ή του υποκινήτη (Barret et al., 1989, Brown and Kitchin, 1996). Παρόλ'αυτά, νέες έρευνες αποκαλύπτουν ότι το αρσενικό ενεργοποιεί την NADH οξειδάση για να παράγει την υπεροξειδάση, προκαλώντας την ρήξη του DNA (Hei et al., 1998, Lynn et al., 2000). Μπορεί να προκαλέσει επίσης, αναστολή στην επιδιόρθωση του DNA, αναστέλλοντας την DNA λιγάση (Lynn et al., 1997).

Η έκθεση σε αρσενικό συντελεί στην ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτούντων μονοπατιών: την μιτογόνο-ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (the mitogen-activated protein kinase, MAPK), και των NFκB μονοπατιών σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών, η οποία οδηγεί στην έκφραση των στρες πρωτεϊνών, θεωρείται ως μια σημαντική απόκριση, καθώς δίνει στα κύτταρα την δυνατότητα να επιβιώσουν και βοηθά στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Baeurele, 1991, Karin, 1995, Lenardo and Baltimore, 1989).

Τα MAPK μονοπάτια ρυθμίζουν την έκφραση των παραγόντων μεταγραφής (transcription factors) όπως ο AP-1, ATH-2, ELK-1 (Karin, 1995), και HSF (Lee and Corry, 1998). Τα AP-1, ATH-2 είναι υπεύθυνα για την έκφραση των πρωτοογκογονιδίων c-jun (Karin et al., 1997).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η οξεία τοξικότητα των χαμηλών συγκεντρώσεων του αρσενικόδης νατρίου σε μικροτομές πνεύμονα, καθώς και να καθοριστεί εάν η έκθεση σε αρσενικό συντελεί στην έκφραση και στην ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής c-jun/ AP-1 και NFκB, οι οποίοι σχετίζονται με την ρύθμιση των γονιδίων που επάγονται υπό στρεσογόνες συνθήκες, όπως οι στρες πρωτεΐνες HSP-32 και HSP72.

Για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιήθηκαν επιμύες (male Sprague-Dawley) 275-300 gr, οι οποίοι εκτέθηκαν για 4 ώρες σε αρσενικόδης νάτριο σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,1, 1.0, και 100μM), καθώς και επιμύες που δεν εκτέθηκαν και που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς και υπολογίστηκαν τα επίπεδα των στρες πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα, έδειξαν αύξηση στην επαγωγή της HSP32 σε συγκεντρώσεις 0.1-10 μM αρσενικού, ενώ η HSP72 αυξήθηκε μόνο σε συγκεντρώσεις 100 μM αρσενικού. Οπότε η συγκεκριμένη συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην δομή των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Ενώ, στις HSP60 και HSP90 στρες πρωτεΐνες δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση έπειτα την έκθεση σε αρσενικό.

Επιπλέον, υπήρξε ενεργοποίηση και αυξημένη έκφραση των παραγόντων μεταγραφής AP-1 και NFκB. Αυτά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι μικρές σχετικά συγκεντρώσεις του αρσενικού στο περιβάλλον μπορούν να συντελέσουν στην ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής και στην αύξηση των επιπέδων των στρες πρωτεϊνών στον πνεύμονα.

Το γεγονός, ότι η επαγωγή της HSP32 έγινε λόγω έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις αρσενικού σε σύγκριση με την επαγωγή της HSP72, αποδεικνύει ότι η HSP32 είναι περισσότερο ευαίσθητη στην βλάβη που προκαλείται από το αρσενικό στα μακροφάγα.

Αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι οι μη-κυτοτοξικές συγκεντρώσεις σε αρσενικό είναι ικανές να επιδράσουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και έκφρασης των στρες γονιδίων στον πνεύμονα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11- ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

11.1. Η τοξικολογία του Diazinon

Το diazinon είναι ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν το οποίο ανήκει στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και χρησιμοποιείται συνηθέστερα για γεωργικές και οικιακές χρήσεις, με τις οικιακές χρήσεις να υπερισχύουν.

Οι καλλιέργειες στις οποίες χρησιμοποιείται το diazinon είναι στα νεκταρίνια, στα αμύγδαλα, στα μούρα και στα καρύδια (U.S.EPA.1999). Περισσότερο όμως χρησιμοποιείται στο γρασίδι και στον κήπο (U.S.EPA.1999).

Είναι πολύ τοξικό για το νευρικό σύστημα, με συμπτώματα της δηλητηρίασης τον πονοκέφαλο τη ναυτία, τη ζαλάδα και την εφίδρωση. Ορισμένα συμπτώματα, όπως οι πονοκέφαλοι, η δυσκολία της όρασης και τα προβλήματα μνήμης μπορούν να διαρκέσουν μήνες ή χρόνια. Τα παιδιά είναι περισσότερο ευαίσθητα κατά την έκθεσή τους σε diazinon σε σχέση με τους ενήλικες καθώς παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα του ενζύμου που διασπά το diazoxon, την ενεργή μορφή του diazinon. Επιπρόσθετα, 9-16% του πληθυσμού παρουσιάζει και αυτό μειωμένα επίπεδα ενός σημαντικού ενζύμου αποτοξίκωσης και επομένως είναι και αυτοί επιρρεπείς κατά την έκθεσή τους σε diazinon. Η έκθεση σε diazinon μπορεί ακόμη να προκαλέσει στα παιδιά καρκίνο του εγκεφάλου και στους ενήλικες γεωργούς τον καρκίνο non- Hodgkin's lymphoma.

Επιπλέον, το diazinon που μεταβολίζεται σε μόριο το οποίο ονομάζεται diazoxon έχει ως αποτέλεσμα το diazinon, και το περισσότερο ισχυρό diazoxon να καταστρέφουν τα έντομα παρεμποδίζοντας την λειτουργία του νευρικού συστήματος (U.S.Dept.1996).

- **Επιδράσεις της οξείας έκθεσης**

Στους ανθρώπους που εκτίθενται σε diazinon τα συμπτώματα της οξείας δηλητηρίασης (έκθεση για μικρό χρονικό διάστημα) είναι παρόμοια με όλα τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως είναι: ο πονοκέφαλος, η ναυτία, η ζάλη, η εφίδρωση, η υπνηλία, η ανάδευση κ.α. Τα συμπτώματα της έκθεσης για μεγάλο χρονικό διάστημα περιλαμβάνουν διαταραχές καρδιακού ρυθμού (βραδυκαρδία ή ταχυκαρδία) (Forbat & Skehan, 1992), καρδιακή ανακοπή (Wecker et al., 1985), αποπληξία (Halee & Sloas, 1987), αδυναμία των μυών, συμφόρηση στον πνεύμονα (Ryde et al., 1984) κ.α.

Επιπλέον, συμπτώματα που παρατηρήθηκαν κατά την έκθεση πειραματόζων σε diazinon υπό εργαστηριακές συνθήκες είναι το ανώμαλο περπάτημα, η μειωμένη δραστηριότητα (U.S.EPA.1998), η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Matin et al., 1990), η μειωμένη πίεση του αίματος (Kojimo et al., 1992) καθώς και η φλεγμονή στο πάγκρεας (Frick et al., 1987).

Τα συμπτώματα της έκθεσης σε diazinon για μικρό χρονικό διάστημα στα παιδιά είναι διαφορετικά από εκείνα που παρουσιάζονται στους ενήλικες. Η εφίδρωση, ο μειωμένος καρδιακός ρυθμός και η αδυναμία των μυών αποτελούν συμπτώματα που παρουσιάζονται συχνά στους ενήλικες και σπάνια στα παιδιά. Ενώ η αποπληξία είναι σύμπτωμα το οποίο είναι περισσότερο συνηθέστερο στα παιδιά απ' ότι στους ενήλικες (Zwiener et al., 1988). Η φλεγμονή του παγκρέατος είναι ένα άλλο σύμπτωμα το οποίο δεν είναι σπάνιο στα παιδιά κατά την δηλητηρίαση από diazinon. Τέλος, τα συμπτώματα μπορούν να επιμένουν για μήνες ή χρόνια έπειτα από την αρχική έκθεση (U.S.EPA.1998).

- **Επιδράσεις στην αναπαραγωγή**

Η έκθεση πειραματόζωων σε κυοφορούσα κατάσταση σε diazinon υπό εργαστηριακές συνθήκες αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο εντομοκτόνο προκαλεί διάφορα αναπαραγωγικά προβλήματα, όπως βλάβη στο υπό ανάπτυξη νευρικό σύστημα, την καθυστέρηση της γενετήσιας ανάπτυξης, την θνησιμότητα, τον θάνατο νεογέννητων απόγονων καθώς και τις γενετικές ανωμαλίες.

Στη χορήγηση diazinon μέσω της τροφής σε επιμύες που βρίσκονται σε κυοφορούσα κατάσταση, βρέθηκε ότι ο αριθμός των απογόνων οι οποίοι απεβίωσαν ήταν μεγαλύτερος στα νεογέννητα που προέρχονταν από μητέρες που εκτέθηκαν σε αντίθεση με εκείνα που προέρχονταν από μητέρες της ομάδος αναφοράς. Επίσης, τα νεογνά παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη.

- **Καρκινογενετικότητα**

Η ικανότητα του diazinon να προκαλεί την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου συνδέεται άμεσα με την έκθεση των ανθρώπων σε αυτό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μελέτη που έγινε σε παιδιά που προέρχονταν από την περιοχή του Missouri, στα οποία βρέθηκε ότι η οικιακή χρήση του diazinon από τους γονείς στον κήπο συνδέεται άμεσα με τον αυξανόμενο κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του εγκεφάλου στα παιδιά (Davis J.R. et al., 1993).

- **Οι οικολογικές επιδράσεις του Diazinon και η μόλυνση του περιβάλλοντος.**

Το diazinon είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο πολύ τοξικό για τα πουλιά, τους ιχθύες, τα ωφέλιμα έντομα και φυτά καθώς και του νερού και του αέρα.

Είναι πολύ γνωστό εξαιτίας της οξείας τοξικότητάς του στα πουλιά είτε βρίσκεται σε ρευστή ή κοκκώδη μορφή, καθώς σύμφωνα με την Environmental Protection Agency, EPA προκαλεί ευρέως και συνεχώς μεγάλη θνησιμότητα εξαιτίας των μειωμένων επιπέδων των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την διάσπασή του.

Επιπλέον, η έκθεση σε diazinon προκαλεί αναπαραγωγικά προβλήματα όπως είναι: η μείωση της επιτυχούς εκκόλαψης των αυγών, της επιβίωσης των πουλιών και του αριθμού των αυγών που ωοτοκούν (U.S.EPA.1998).

Επίσης το diazinon είναι πολύ τοξικό σε πολλά είδη ιχθύων, αφού σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί γενετική βλάβη, επιδρά στην αναπαραγωγή μέσω της διακοπής της και καταστρέφει τα υδρόβια ζώα από τα οποία οι ιχθύες εξαρτώνται για να επιζήσουν.

Η έκθεση σε diazinon προκαλεί ακόμη ανωμαλίες στην ανάπτυξη των νεογέννητων βατράχων, συμπεριλαμβάνοντας την ανακοπή ανάπτυξης της ουράς καθώς και την υποανάπτυξη των βραγχίων τους.

Αν και μη αναμενόμενο για ένα εντομοκτόνο, το diazinon μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη του φυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα αγγούρια κατά την έκθεσή τους σε μικρές συγκεντρώσεις diazinon, στα οποία διαπιστώθηκε μείωση στο ύψος του βλαστού (Novartis Crop Protection, 1997).

Επίσης μειώνει την ικανότητα των οργανισμών του εδάφους να μεταβάλλουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε μορφή η οποία είναι απαραίτητη για τα φυτά. Σύμφωνα με μελέτες το diazinon αποτελεί το εντομοκτόνο το οποίο εντοπίζεται πολύ συχνά σε γεωργικές και αστικές περιοχές.

Τα ποτάμια και τα ρυάκια συχνά μολύνονται από το diazinon. Έρευνα, που πραγματοποιήθηκε σε αυτά απέδειξε ότι έπειτα από τις εφαρμογές με diazinon υπήρχαν υπολείμματα, με αποτέλεσμα να μολύνουν την επιφάνεια του νερού αν και εφαρμογή τους έγινε σύμφωνα με της οδηγίες χρήσεως που αναγράφονταν στην ετικέτα του εντομοκτόνου. Τέλος, το diazinon συχνά μολύνει τον αέρα. Σύμφωνα με έρευνα διαπιστώθηκε ότι περίπου το 90% των δειγμάτων που ελέχθησαν παρουσίαζαν μόλυνση από το diazinon (Majewski et al., 1995).

11.2 Η ενεργοποίηση της επαγωγής του στρες γονιδίου μέσω των εντομοκτόνων στο Chironomus yoshimatsui.

Στην παρούσα μελέτη βασιζόμενοι στην έκφραση της hsp70 αξιολογήθηκε η επίδραση του περιβαλλοντικού στρες στην υδρόβια σκνίπα *Chironomus yoshimatsui*.

Η υδρόβια σκνίπα *Chironomus yoshimatsui* διενέμεται παγκοσμίως και ζει στα ιζήματα των γλυκών υδάτων του οικοσυστήματος. Οι σκνίπες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενέστερα στην εξέταση της τοξικότητας των ρυπογόνων σε ιζήματα και στα γλυκιά ύδατα. Διενέμεται άφθονα και έχει μεγάλη ικανότητα να επιβιώνει σε μολυσμένα περιβάλλοντα ακόμη και όταν πολλοί άλλοι οργανισμοί δεν μπορούν.

Η επίκτητη ανοχή τους στα ρυπογόνα τους επιτρέπει να αποτελούν οργανισμούς με κυριαρχία (Pinder LCV, 1986).

Τα κύρια αίτια μόλυνσεων των γλυκών υδάτων του οικοσυστήματος στις αγροτικές περιοχές είναι τα εντομοκτόνα, ιδιαίτερα το fenitrothion (F), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως όλο το χρόνο σε συγκεντρώσεις από 0.1 έως 1 μg/L (Iwakuma T. et al., 1993).

Συλλέκτηκαν προνύμφες από ρυάκια τα οποία ήταν μολυσμένα (στελέχη υπαίθρου) με το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, fenitrothion (F), καθώς και με το συνθετικό πυρεθροειδές εντομοκτόνο, ethofenprox (E). Ακόμη, συλλέκτηκαν στελέχη από περιοχές μη μολυσμένες (στελέχη επιδεκτικότητας) τα οποία παρουσίαζαν μειωμένη αντίσταση κατά την έκθεση στα εντομοκτόνα.

Η έκφραση του γονιδίου της hsp70 στις προνύμφες, οι οποίες συλλέκτηκαν από δυο διαφορετικές περιοχές τον Μάιο, περίπου 1 βδομάδα μετά τον ψεκασμό του αγρού με τα εντομοκτόνα και ήταν 2.3 ($p= 0.018$) με 3.3 μεγαλύτερη σε σχέση με τα στελέχη επιδεκτικότητας και επίσης η hsp70 ήταν 4.6 και 1.4 ($p= 0.033$) μεγαλύτερη σε σχέση με αυτά που συλλέκτηκαν τον Νοέμβριο 3 μήνες μετά την διακοπή του ψεκασμού με τα εντομοκτόνα.

Συνοπτικά, θα λέγαμε ότι η έκφραση της hsp70 ήταν μεγαλύτερη στα στελέχη υπαίθρου που συλλέκτηκαν τον Μάιο περίπου 1 βδομάδα μετά τον ψεκασμό του αγρού σε σχέση με τα στελέχη επιδεκτικότητας.

Προκειμένου να αναγνωριστούν οι πιθανοί διεγέρτες του γονιδίου της hsp70 σε στελέχη υπαίθρου, προνύμφες από τα στελέχη επιδεκτικότητας εκτέθηκαν στο (F fenitrothion) ή στο (E ethofenprox) για 24h έτσι ώστε να καθοριστούν τα hsp70 mRNA επίπεδα.

Η έκθεση στο (F) σε συγκέντρωση 0.4μg/L και στο (E) σε συγκέντρωση 1.1μg/L οδήγησε στην αύξηση των hsp70 mRNA επιπέδων 2.7 (p=0.049) και 4.4 (p=0.043) φορές σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς (controls) αντίστοιχα. Δηλαδή, τα hsp70 mRNA επίπεδα στα στελέχη υπαίθρου ήταν υψηλότερα τον Μάιο σε σχέση με τον Νοέμβριο.

Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι οι προνύμφες που συλλέχτηκαν από περιοχές μολυσμένες επηρεάζονται από στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος καθώς και ότι τα εντομοκτόνα που εξετάστηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί διεγέρτες της hsp70.

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ακόμη την πρόταση της έκφρασης του γονιδίου της hsp70 ως δείκτη ευαισθησίας κατά την έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων εντομοκτόνων. (2002 Wiley Periodicals, Inc. J. Biochem Mol Toxicol 16 : 10-17, 2002).

Συνεπώς επιβεβαιώνεται ότι υδρόβια σκνίπα *Chironomus yoshimatsui* εκφράζει το hsp70 γονίδιο κατά την έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις εντομοκτόνων και παρέχει απόδειξη ότι η έκφραση της hsp70 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί το περιβαλλοντικό φορτίο (environmental burden) των εντομοκτόνων.

Επίσης, η έκφραση της hsp70 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ευαισθησίας της έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων εντομοκτόνων, και μαζί με τους υπόλοιπους βιοδείκτες, μπορεί να είναι χρήσιμη προκειμένου να καθοριστεί η έκθεση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες στο οικοσύστημα των γλυκέων υδάτων.

11.3 Η τοξικότητα του cypermethrin: η Hsp70 ως βιοδείκτης απόκρισης στην διαγονιδιακή *Drosophila*.

Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει πολλές αναφορές που δείχνουν ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp70 είναι ένα από τα καλύτερα υποψήφια γονίδια για την πρόγνωση των κυτοτοξικών επιδράσεων των ρυπογόνων του περιβάλλοντος (Kohler *et al.* 1998, Nazir *et al.* 2001, Mukhopadhyay *et al.* 2002).

Τα συνθετικά πυρεθροειδή (synthetic pyrethroids) έχουν ευρέως αποκτήσει μεγάλη σημασία λόγω της χαμηλής θηλαστικής τοξικότητας καθώς και της υψηλής εντομοκτονικής δραστηριότητας (Elliott *et al.* 1978, Casida 1980).

Οι κύριοι λόγοι αυτής της μελέτης είναι: 1) η αξιολόγηση του κυτοτοξικού δυναμικού του cypermethrin και 2) η μελέτη της καταλληλότητας της επαγωγής της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 ως βιοδείκτη των ρυπογόνων του περιβάλλοντος στην διαγονιδιακή *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ)Bg⁹.

Στην μελέτη εξερευνήθηκε η πιθανότητα της χρησιμοποίησης της Hsp70 ως δείκτη τοξικότητας ενάντια στο πολύ γνωστό πυροθροοειδές εντομοκτόνο cypermethrin.

Κατά την ρύθμιση της έκφρασης της hsp70 παρατηρήθηκε ότι εξαρτάται άμεσα από την δοσολογία του εντομοκτόνου. Η έκφραση της hsp70 σε διάφορους προνυμφικούς ιστούς βρέθηκε να καθυστερεί κατά την έκθεσή τους στην μικρότερη συγκέντρωση του cypermethrin, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις (0.2, 0.5, και 50.0 p.p.m.) όπου η επαγωγή της hsp70 ήταν πιο γρήγορη. Αυτό ίσως να οφείλεται στην οξύτητα της δράσης της τοξικής ουσίας σε υψηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τις μικρότερες (Kar Chowdhuri *et al.* 1999).

Για να ερευνηθεί εάν η μείωση της έκφρασης της hsp70 κατά την έκθεση των προνυμφών σε cypermethrin έπειτα από 48 ώρες εξαρτάται από την αστάθεια του γονιδίου αναφοράς ή από την μειωμένη διαθεσιμότητα των κυττάρων πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της western hybridization. Τα αποτελέσματα έδειξαν: 1) 3.5 ± 0.4 αύξηση στην έκφραση της hsp70 παρατηρήθηκε στις προνύμφες που εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς, 2) 2.7 ± 0.2 αύξηση στην έκφραση της hsp70 στις προνύμφες όπου τους χορηγήθηκε 50.0 p.p.m.cypermethrin μετά την πάροδο 12 ωρών, 3) 1.6 ± 0.1 αύξηση στην έκφραση της hsp70 παρατηρήθηκε κατά την έκθεση σε 0.002 p.p.m.cypermethrin μετά την πάροδο 24 ωρών, 4) 0.2 μείωση στην έκφραση της hsp70 έπειτα από 48 ώρες. Ομοίως, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφραση της hsp70 έπειτα από 12 ώρες κατά την έκθεση σε συγκέντρωση 0.5 p.p.m.cypermethrin και 0.2 ± 0.05 μείωση στην έκφραση της hsp70 έπειτα από 48 ώρες.

Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν μέσω της μεθόδου της Western hybridization καθώς και της ανοσοιστοχημείας (immunocytochemistry) αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα της έκφρασης της hsp70 είναι συγκρίσιμα με αυτά που παρατηρήθηκαν σε μελέτη με την χρήση του γονιδίου αναφοράς όπου φαίνεται ότι αποκλείουν την πρώτη πιθανότητα.

Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι οι επιδράσεις των τοξικών ουσιών στην έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ πραγματοποιούνται σε συγκεκριμένους ιστούς (tissue specific) (Stringham and Candido 1994, Chapple *et al.* 1997).

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, οι υψηλές συγκεντρώσεις της τοξικής ουσίας επάγουν την έκφραση της Hsp70 πολύ γρήγορα στο γάγγλιο του εγκεφάλου σε σύγκριση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις όπου η έκφραση καθυστερείται.

Τα πυρεθροειδή είναι γνωστά για την δράση τους ως νευροτοξικές ουσίες που επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Το Cypermethrin έχει βρεθεί ότι μπορεί να αυξήσει το περιεχόμενο cGMP στον εγκεφαλο των θηλαστικών (Abassy *et al.* 1983, Ruight 1985).

Το επίπεδο της δηλητηρίασης στον εγκεφαλο επιμύων έπειτα από θεραπεία με cypermethrin έχει φανεί ότι συνδέεται με την συγκέντρωση του σκευάσματος που βρίσκεται στον εγκεφαλο ανεξάρτητα από τον τρόπο χορήγησης (Ruight 1985).

Μια από τις πιθανότητες της ταχύτατης έκφρασης της Hsp70 στο γάγγλιο του εγκεφάλου κατά την έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις της τοξικής ουσίας ίσως να είναι η παρουσία μιας κρίσιμης ποσότητας του σκευάσματος.

Επιπρόσθετα, η πιθανότητα ότι η τοξική ουσία μπορεί να επηρεάσει τις νευρικές μεμβράνες μέσω της παρέμβασης του διαύλου νατρίου όπως επίσης και των επιπέδων του cGMP, ρυθμίζοντας την έκφραση της Hsp70 δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Οι σιαλογόνοι αδένες και οι εμβρυϊκοί δίσκοι φαίνονται και αυτοί επίσης στην παρούσα μελέτη να επάγουν την Hsp70.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ευαίσθητα όργανα στόχοι των τοξικών ουσιών μπορούν να αναγνωριστούν μέσω της έκφρασης των στρες γονιδίων (Hightower 1991), και ότι η ρύθμιση των στρες πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με έναν συγκεκριμένο τρόπο. Έτσι, είναι πιθανόν η έκφραση της Hsp70 στους ιστούς της προνύμφης να αποδεικνύει ότι οι ιστοί αποτελούν ευαίσθητα όργανα κατά την έκθεση στην τοξική ουσία του cypermethrin.

Ο εντοπισμός της Hsp70 σε ιστούς της *Drosophila* μπορεί να συντελέσει ως πρώιμη προειδοποίηση ενδεχομένως της παρουσίας των τοξικών παραγόντων στο περιβάλλον.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνεται ότι η επαγωγή της έκφρασης της Hsp70 λόγω του cypermerthrin μπορεί να ανακλά το κυτοτοξικό δυναμικό του εντομοκτόνου. Η επαγωγή, η ποσοτικοποίηση και η διαφοροποίηση της έκφρασης της Hsp70 σε διάφορους ιστούς ενθαρρύνει περισσότερο την απόδειξη της χρησιμοποίησης της *Drosophila* ως χρήσιμο βιοδείκτη καθώς και την χρήση της Hsp70 ως βιοδείκτη της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

11.4 Η επαγωγή της Hsp70 διαγονιδιακή *Drosophila*: ως βιοδείκτης έκθεσης σε Phthalimide ομάδα χημικών.

Μελετήθηκε η πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί η έκφραση ενός από τα κύρια γονίδια του στρες, της hsp70, στην *Drosophila* ως βιοδείκτης ενάντια στην ομάδα χημικών της phthalimide, ο οποίος μπορεί να παρέχει πρώιμη προειδοποίηση της έκθεσης σε επικίνδυνα χημικά.

Οι phthalimides, αποτελούν ομάδα χημικών που είναι γνωστή για την μυκητοκτόνα δράση της. Ορισμένα χημικά που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι το Captan, το Captafol και το Folpet, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα για την προστασία που προσφέρουν στο φύλλωμα των καρπών καθώς και στα καλλωπιστικά φυτά.

Οι άνθρωποι εκτίθενται στα παραπάνω χημικά κατά την διάρκεια γεωργικών εργασιών ή ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών εξαιτίας των τυχών υπολλειμάτων από τον ψεκάσμο με μυκητοκτόνα.

Τέτοιου είδους εκθέσεις συντελούν σε δυσμενείς επιδράσεις σε οργανικό επίπεδο.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η έκφραση της hsp70, χρησιμοποιήθηκαν 50-60 προνύμφες της διαγονιδιακής *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg⁹ στο τρίτο προνυμφικό στάδιο (για κάθε ομάδα) στις οποίες χορηγήθηκε μέσω της διαίτας συγκεκριμένη ποσότητα των παραπάνω χημικών ξεχωριστά (0.0002, 0.002, 0.2, 2.0, 20,0 και 200.0 ppm) και σε διαφορετικό χρονικό διάστημα για 2,4,6,12,24 και 48h. Ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες στις οποίες δεν χορηγήθηκαν τα παραπάνω χημικά.

Οι προνύμφες κατά την χορήγηση των χημικών αρχικά δεν έδειξαν εμφανή σημάδια στην αλλαγή της συμπεριφοράς τους, ως απόδειξη των ενεργών συνηθειών τους (σύρσιμο, τρύπημα) εκτός μονάχα κατά την έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις του Captafol όπου παρατηρήθηκε νωθρή κίνηση.

Το Captafol (σε 200ppm), βρέθηκε να εξάγει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των μυγών εξαιτίας της καθυστέρησης της εκκόλαψης για 3 ημέρες κατά την έκθεσή τους στην υψηλότερη συγκέντρωση, και την επιμήκυνση του χρόνου ανάπτυξης.

Η επαγωγή της hsp70 σε συγκέντρωση 0.02 ppm και πάνω σε Captan, Folpet και 0.002 ppm σε Captafol αντίστοιχα αποκαλύπτει το δυναμικό αυτών των χημικών να επάγουν κυτοτοξικότητα.

Η δραστηριότητα της β-galactosidase στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μέτρηση της έκφρασης της hsp70, η οποία παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 0.002 ppm σε Captafol και σε 0.02 ppm σε Captan και σε Folpet αντίστοιχα, και αποκαλύπτει την ευαισθησία των στρες γονιδίων να εντοπίσουν την παρουσία των επικίνδυνων χημικών στους ιστούς του εκτειθέμενου οργανισμού.

Ομοίως, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των παραπάνω χημικών τα οποία δεν προκάλεσαν την δραστηριότητα της β-galactosidase ήταν 0.002 ppm για το Captan, Folpet και 0.0002ppm για το Captafol αντίστοιχα.

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε ότι υπάρχει εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της δόσης και του χρόνου αυξάνοντας έτσι την δραστηριότητα της β-galactosidase. Η έκφραση της hsp70 μας αποδεικνύει ότι συγκριτικά μεταξύ των Captan, Folpet και του Captafol ότι το περισσότερο δηλητηριώδες χημικό είναι το Captafol.

Το δυναμικό της επαγωγής της hsp70 στην διαγονιακή *Drosophila melanogaster* σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατά την έκθεση σε phthalimide χημικά στην παρούσα μελέτη μπορεί να συνδέεται α) με την εφαρμογή τους σε διάφορα είδη (E.Gibney et al. 2001), β) με την απόκρισή τους σε πολλούς στρεσογόνους παράγοντες (D. Kar Chowdhuri et al. 1999) και γ) με την υψηλά συντηρούμενη μεταξύ των φύλων σχέση με την περισσότερη προσαρμοστικότητα σε περιβαλλοντικά περιβάλλοντα.

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε τα εξής: α) ότι από τα τρία χημικά που εξετάστηκαν το Captafol είναι το περισσότερο δηλητηριώδες σκέυασμα και το Folpet το λιγότερο σύμφωνα με την επαγωγή της hsp70, β) συγκέντρωση 0.0002 ppm σε Captafol και 0.002ppm σε Captan και Folpet αντίστοιχα, μπορεί να θεωρηθεί ως το επίπεδο της συγκέντρωσης το οποίο δεν προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις (no observed adverse effect level, NOAEL) και γ) η επαγωγή της hsp70 είναι αποτελεσματική και αρκετά ευαίσθητη για να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης έκθεσης σε phthalimide ομάδα χημικών.

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω ενθαρρύνεται η πρόταση της χρησιμοποίησης της επαγωγής της hsp70 ως first tier βιοδείκτης έκθεσης καθώς προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα στον καθορισμό των επιδράσεων των πολύπλοκων χημικών στον οργανισμό και στην παρακολούθηση του περιβάλλοντος (D. Peakall, 1992, P.Mineau,1998).

11.5. Η επαγωγή της Hsp70 σε γαρίδες γλυκών υδάτων (*Macrobrachium Malcoimsonii*) κατά την έκθεσή τους σε endosulfan-carbaryl.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων endosulfan και carbaryl σε υποθησιγόνες συγκεντρώσεις 1/5 και 1/10 της LC₅₀ αντίστοιχα, στην σύνθεση της hsp70 σε διάφορους ιστούς σε δείγμα από γαρίδα *Macrobrachium malcoimsonii*.

Μεταξύ των ιστών που αναλύθηκαν (βράγχια, σκελετικός μυς και ηπατοπάγκρεας) η επαγωγή της hsp70 παρατηρήθηκε μόνο στους ιστούς των βραγχίων της γαρίδας, είτε εκτέθηκε σε υψηλές είτε σε χαμηλές υποθησιγόνες συγκεντρώσεις σε endosulfan.

Επαγωγή της σύνθεσης της hsp70 δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα παραπάνω όργανα που εξετάστηκαν, τα οποία είχαν εκτεθεί σε χαμηλές είτε σε υψηλές υποθησιγόνες συγκεντρώσεις σε carbaryl.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα παρεμβαίνουν στο υδροφιλικό κέντρο (hydrophobic core) των πρωτεϊνών, προκαλώντας έτσι την αποδιάταξη των πρωτεϊνών μέσω της έκθεσης των λιπόφιλων τμημάτων τους στο υδάτινο περιβάλλον.

Συγκεκριμένη επαγωγή της hsp70 στα βράγχια πιθανόν να συνέβη, εφόσον στις γαρίδες τα βράγχια αποτελούν δίοδο της έκθεσης σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Τέλος, η απουσία της επαγωγής της σύνθεσης της hsp70 στις γαρίδες οι οποίες εκτέθηκαν στο carbaryl αποδεικνύει ότι η επαγωγή της σύνθεσης της hsp70 εξαρτάται από τον στρεσογόνο παράγοντα.

11.6 Τα επίπεδα της Hsp70 σε πρωτογενείς επιδερμικές καλλιέργειες του Rainbow trout σε απόκριση κατά την έκθεση σε 2, 4-dichloroaniline. Ένας καινούργιος in vitro δείκτης τοξικότητας του υδρόβιου περιβάλλοντος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί η χρήση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, Hsp70 ως θνησιγόνο μέτρηση της οικοτοξικότητας καθώς και να προσδιοριστεί εάν η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 είναι ανάλογη του στρεσογόνου χημικού που εκτίθεται ο οργανισμός.

Ο παραπάνω στόχος, επιτεύχθηκε καθορίζοντας ποσοτικά τα επίπεδα της Hsp70 σε πρωτογενή καλλιέργεια rainbow trout (πέστροφα) του γένους *Oncorhynchus mykiss* (R.), από επιδερμικά κύτταρα σε απόκριση κατά την έκθεση σε 2,4-dichloroaniline (2,4-DCA). Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν υγιή, μικρής ηλικίας και βάρους 100-300gr rainbow trout (πέστροφα) του γένους *Oncorhynchus mykiss* (R.) τα οποία εκτέθηκαν σε (2,4-DCA).

Αυτή η αρωματική αμίνη χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο μέσο στην παραγωγή διάφορων φαρμακευτικών προϊόντων. Αποτελεί ακόμη ένα ευρέως διαδεδομένο ρυπογόνο του περιβάλλοντος (Kilemade and Mothersill, 2000) και αντιπροσωπεύει μια σημαντική μακροχρόνια απειλή για το υδάτινο περιβάλλον και εν συνεχεία για τον άνθρωπο εξαιτίας της χαμηλής οξείας τοξικότητάς του καθώς και λόγω της χαμηλής του υδατοδιαλυτότητας (IARC, 1982). Αυτό το καθιστά περισσότερο δύσκολο για να καθοριστούν οι βιολογικές επιδράσεις επειδή απαιτείται συχνά μακροχρόνια έκθεση για να γίνει εμφανής η τοξικότητα..

Σε καλλιέργειες επιδερμικών κυττάρων που εκτέθηκαν σε (2,4-DCA) χρησιμοποιήθηκε σε rainbow trout (πέστροφα) το hsp70 πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο ερευνήθηκε ως ένας πιθανός βιοδείκτης του περιβαλλοντικού στρες μέσω μιας ανοσοκυτοχημικής προσέγγισης.

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων στους ιχθύες χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλείο για την εξέταση της τοξικότητας επειδή παρέχουν έναν γρήγορο, αποτελεσματικό και οικονομικό τρόπο προσδιορισμού των χημικών του περιβάλλοντος. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των πρωτογενών καλλιεργειών από κυτταρικές σειρές οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα στις πρωτογενείς καλλιέργειες διατηρούν ακόμα τα διαφοροποιημένα in vivo χαρακτηριστικά τους (Mothersill et al., 1995, Iwana et al., 1999).

Η επιδερμίδα είναι αρκετά εύαλωτη, καθώς αποτελεί την μεσόφαση μεταξύ του ιχθύος και του υδρόβιου περιβάλλοντος.

Σε αυτήν την μελέτη αναπτύχθηκε ένα απλό in vitro σύστημα για την ανάλυση του κινδύνου της υδρόβιας τοξικότητας. Η διακύμανση της αραίωσης του αντισώματος ήταν ικανή για τον εντοπισμό και ποσοτικό προσδιορισμό της επαγόμενης hsp70.

Η αύξηση των επιπέδων της στρες πρωτεΐνης στα πρωτογενή επιδερμικά κύτταρα ήταν δόσοεξαρτώμενη. Κατά την έκθεση σε (2,4-DCA) παρατηρήθηκε έντονα η εντόπιση της hsp70 στα νουκλεοτίδια των επιδερμικών κυττάρων. Αυτή η εργασία έδειξε την πιθανότητα της χρήσης της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και επιπλέον τον ποσοτικό προσδιορισμό ως σύστημα ανάλυσης του κινδύνου της υδρόβιας τοξικότητας.

Το γεγονός ότι τα ρυπογόνα του περιβάλλοντος όπως είναι το (2,4-DCA) επάγει εκ νέου την σύνθεση της Hsp70 σε rainbow trout (πέστροφα) και εφόσον η hsp70 είναι υπεύθυνη για την μεταφραστική δραστηριότητα στα κύτταρα απαντώντας στις διάφορες διαταραχές που συμβαίνουν στο περιβάλλον και είναι επίσης μια από τις περισσότερο υψηλά συντηρούμενες πρωτεΐνες στην βιολογία, έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εξαίρετος βιοδείκτης της ρύπανσης του περιβάλλοντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12-ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

12.1. Η επαγωγή της Hsp70 σε γαρίδες γλυκέων υδάτων (*Macrobrachium Malcolmsonii*) κατά την έκθεσή τους σε διάφορες θερμοκρασίες-εγκλιματισμός.

Στην παρούσα μελέτη, η ανώτερη θερμική ανοχή και έκφραση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (hsp70) εξετάστηκε σε γαρίδες των γλυκέων υδάτων του είδους *Macrobrachium malcolmsonii* με μικρή διάρκεια ζωής, μήκους 25-30mm, βάρους 0.8-1.0g τα οποία συλλέχτηκαν σε περίοδο 6-7 μηνών από τον Άγουστο έως τον Ιανουάριο και εγκλιματίστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες: α) σε 20°C για την Α ομάδα και β) σε 30°C για την Β ομάδα στο εργαστήριο για 30 ημέρες.

Το είδος της γαρίδας *Macrobrachium malcolmsonii* που προέρχεται από την περιοχή της Ινδίας, και διαβίει σε ποτάμια, είναι η δεύτερη μεγαλύτερη και πιο γρήγορα αναπτυσσόμενη γαρίδα των γλυκέων υδάτων (μετά την *Macrobrachium rosenbergii*) και τέλος ένα από τα περισσότερο σημαντικά και οικονομικά είδη της βιομηχανικής υδατοκαλλιέργειας.

Η απόκριση σε θερμικό σοκ ίσως να είναι ένας απαραίτητος μηχανισμός για τον οργανισμό προκειμένου να επιβιώσει από τις θερμικές διακυμάνσεις καθώς επίσης και από τα άλλα είδη των στρεσογόνων παραγόντων.

Ωστόσο, λίγες είναι οι μελέτες που αναφέρονται στην απόκριση σε θερμικό σοκ στην *Macrobrachium malcolmsonii* (Selvakumar and Geraldine, 2003), και ιδιαίτερα στην επαγωγή της hsp70 λόγω αλλαγών της θερμοκρασίας. Έτσι, η παρούσα μελέτη διεξήχθη για να καθοριστεί εάν ο εγκλιματισμός σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις (20 °C και 30 °C) προκαλεί μεταβολές στο ανώτερο όριο της θερμικής ανοχής όπως επίσης και στο δυναμικό της επαγωγής της hsp70 σε διάφορους ιστούς της *Macrobrachium malcolmsonii*.

Είναι γεγονός, ότι η θερμοκρασία έχει θεωρηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το βιολογικό σύστημα μιας οργάνωσης σε πολλά επίπεδα (Cossins and Bowler, 1987, Johnston and Bennett, 1996). Η ανώτερη θερμική ανοχή καθορίστηκε με βάση μια standard μέθοδο. Για πειράματα με πρωτεΐνες θερμικού σοκ, γαρίδες της ομάδας Α και Β εκτέθηκαν σε διάφορες αυξημένες θερμοκρασίες για 3 h η κάθε ομάδα και ακολούθησε 1h ανάκτηση του εγκλιματισμού της θερμοκρασίας. Τα ενδογενή επίπεδα της hsp70 καθορίστηκαν στα βράγχια, στην καρδιά, στο ηπατοπάγκρεας και στους ιστούς των σκελετικών μυς μέσω της Western blot ανάλυσης.

Η κρίσιμη θερμική μέγιστη θερμοκρασία (critical thermal maximum, CT_{max}) για τις γαρίδες της Α και Β ομάδας ήταν 37.7±0.27 °C και 41.41± 0.16 °C, αντίστοιχα. Επομένως, η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει ο εγκλιματισμός, επηρεάζει την θερμική ανοχή της *M. Malcolmsonii* (Herrera et al.,1998).

Η επαγωγή της hsp70 εντοπίστηκε στα βράγχια και στους ιστούς της καρδιάς και όχι στο ηπατοπάγκρεας και στους ιστούς των σκελετικών μυς, που αποδεικνύει ότι η απόκριση σε στρες διαφέρει ανάλογα με τον ιστό. Η έναρξη της επαγωγής της hsp70 στα βράγχια και στους ιστούς της καρδιάς ξεκίνησε σε θερμοκρασία 30 °C και 34 °C για την Α και Β ομάδα αντίστοιχα.

Διαφορές στην συσσώρευση των στρες πρωτεϊνών μπορεί να είναι χρήσιμες στην αναγνώριση των ιστών, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε βλάβες από συγκεκριμένους στρεσογόνους παράγοντες καθώς και στην αναγνώριση της έκτασης της βλάβης (Sanders et al.,1994).

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την επαγωγή της hsp70 (στην οποία η επαγωγή της hsp70 ήταν μέγιστη) βρέθηκε σε θερμοκρασία 34 °C και 32 °C αντίστοιχα, στα βράγχια και στους ιστούς της καρδιάς της Α ομάδας, και 38 °C και 32⁶⁰C αντίστοιχα, για την Β ομάδα.

Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο εγκλιματισμός, επηρεάζει και την ανώτερη θερμική ανοχή αλλά και την επαγωγή της hsp70 του δείγματος *Macrobrachium malcolmsonii*.

Κεφάλαιο 13

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των στρες πρωτεϊνών στην οικοτοξικολογία.

Ο μεγάλος αριθμός των επικίνδυνων χημικών και οι πολυσύνθετες αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ τους στο περιβάλλον προκαλούν συμπεράσματα που ανακλούν την βιολογική τους επιρροή. Οι αξιόλογες ήδη υπάρχουσες βιοανάλυσεις, που βασίζονται περισσότερο στην θνησιμότητα ή στην αναπαραγωγή, έχουν βρεθεί να είναι ανεπαρκείς όσον αφορά την ευαισθησία, την διάρκεια και το κόστος της ανάλυσης.

Αντίθετα, οι αλλαγές που συμβαίνουν σε βιοχημικό επίπεδο είναι συνήθως οι πρώτες απαντήσεις που εντοπίζονται όταν προκληθεί στο περιβάλλον διαταραχή. Και αυτό γιατί αυτές οι μετατροπές αντιστοιχούν σε όλες τις επιρροές σε οργανικό επίπεδο, καθώς έχουν βρεθεί να χρησιμοποιούνται ως δείκτες μόλυνσεως με μεγάλη ευαισθησία..

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν πρόσφατα αναγνωρισθεί ως ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς άμυνας οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Οι κύριες οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ταξινομούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος ως εξής:

την οικογένεια Hsp90 με μοριακό βάρος 83-90 kDa,

την οικογένεια Hsp70 με μοριακό βάρος 66-78 kDa,

την οικογένεια Hsp60 με μοριακό βάρος 54-61.05 kDa,

την οικογένεια Hsp40 με μοριακό βάρος 38-41.1 kDa και

την οικογένεια Hsp27 με μοριακό βάρος 15-30 kDa.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες μόλυνσεως για τους εξής λόγους:

- 1) επειδή αποτελούν μέρος της απάντησης της προστασίας των κυττάρων,
- 2) επειδή η σύνθεσή τους επάγεται από μεγάλο αριθμό χημικών και
- 3) επειδή είναι υψηλά συντηρούμενες σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια στα φυτά και στους ανθρώπους.

Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η απάντηση σε στρεσογόνο παράγοντα μπορεί να συμβεί ακόμα και από πολύ μικρή συγκέντρωση ρυπογόνων, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στο περιβάλλον. Ωστόσο, για τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ απαιτείται περισσότερη μελέτη προτού εφαρμοστούν ως δείκτες μόλυνσεως, όσον αφορά την κινητική και την επιμονή της απάντησης σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, την επιρροή των φυσιολογικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων (pH, ευτροφισμός κ.α.), των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθώς και της ανοχής των οργανισμών.

13.1 Οι στρες πρωτεΐνες και η ρυθμισή τους

Κάθε οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ περιέχει πολλές ισομορφές, των οποίων η σύνθεση ρυθμίζεται ανεξάρτητα. Τα κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε στρεσογόνο παράγοντα, σχετίζονται με την διατήρηση της ομοιόστασης, την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, την συσσωμάτωση καθώς και με την χρήση τους σε ρόλο μοριακού συνοδού (Hershko, 1988, Hightower, 1991, high and Stirling, 1993, Lis and Wu, 1993, Rutherford and Zuker, 1994).

Οι περισσότερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ διακρίνονται για το ρόλο τους ως μοριακοί συνοδοί, δεσμεύονται δηλαδή εφήμερα με τις πρωτεΐνες στόχους έτσι ώστε να διευκολύνουν τις διαδικασίες συγκρότησης και αναδίπλωσης. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κύτταρο παίζει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της σηματοδότησης των μονοπατιών καθώς και στον μεταγραφικό και μεταφραστικό έλεγχο (Panniers, 1994, Rutherford & Zuker, 1994).

Η σημασία τους για το κύτταρο σχετίζεται με την φυλογενετική διατήρηση μεταξύ των ισομορφών διαφορετικών οργανισμών από τα βακτήρια στα φυτά και στους ανθρώπους (Lindquist & Craig, 1988).

Είναι γεγονός, πως όταν προκαλείται στο κύτταρο πρωτεϊνική βλάβη (proteotoxicity) ορισμένες από τις επαγόμενες πρωτεΐνες θερμικού σοκ απορυθμίζονται ανάλογα με τον βαθμό του στρες/στρεσογόνου παράγοντα στον οποίο εκτίθενται (Hiranuma et al., 1993, Jungmann et al., 1993, Sato et al., 1993, Uney et al., 1993, Zafarullah et al., 1993).

Άλλες ισομορφές όπως για παράδειγμα είναι πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp72, θεωρούνται ότι συντίθενται μόνο όταν το κύτταρο εκτίθεται σε δυσμενής συνθήκες και ακόμη άλλες δείχνουν την επαγόμενη από στρες έκφραση Mizzen & Welch, 1988, Edwards et al., 1990, Che et al., 1992, Bauman et al., 1993).

Υπό αυτές τις δυσμενείς συνθήκες οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ φαίνονται να αντιτίθενται στις πρωτεοτοξικές επιρροές:

- 1) αποτρέποντας την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κρατώντας τις σε κατάσταση αναδίπλωσης ή συγκρότησης διευκολύνοντας έτσι την επιδιόρθωση και
- 2) παρακινώντας την αποικοδόμηση των μη κανονικών πρωτεϊνών.

13.2 Η ευαισθησία σε ρυπογόνα του περιβάλλοντος.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την βιοπαρακολούθηση των οργανισμών συμπληρώνοντας τις ήδη υπάρχουσες αναλύσεις οι οποίες μετρούν περισσότερο και εξειδικευμένα τους τρόπους δράσεως των τοξικών.

Ενώ, αρχικά η ρύθμιση της απόκρισης σε στρεσογόνο παράγοντα κυρίως μελετήθηκε μέσω της επαγωγής ορισμένου αριθμού πρωτεϊνών θερμικού σοκ λόγω των επαγωγέων όπως είναι η θερμότητα, τα ανάλογα των αμινοξέων, τα βαρέα μέταλλα (Morimoto et al., 1990, Nover, 1991), πρόσφατα, έγινε η αρχή να συμπεριληφθούν περισσότερα περιβαλλοντικά ρυπογόνα έτσι ώστε να μελετηθεί η ικανότητά τους να επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Sanders, 1993, de Pomerai, 1996).

Μελέτες έχουν επιδείξει την ευαισθησία της σύνθεσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Παραδείγματα στα οποία έχει διαπιστωθεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες επάγονται είναι τα εξής:

α) σε πλατυκέφαλο μικρό ψάρι του γλυκού νερού (*Pimephales promelas*) έπειτα από έκθεση σε περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις αρσενικού, χρωμίου, σε (φυτοπροστατευτικά προϊόντα) lindane και σε diazinon (Dyer et al., 1993a,b).

Ο διαφορετικός τρόπος δράσεως αυτών των χημικών ανακλάται με διαφορετικό τρόπο στον εγκέφαλο, στους γραμμωτούς μύες και στα βράγχια των ιχθύων.

β) σε θαλάσσια έμβρυα αχινών η επαγωγή της hsp70 αυξάνει όταν αυτά εκτείνονται σε χαλκό.

Η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους ιχθύες έχει περιγραφεί σε κυτταρικές σειρές, σε πρωτογενείς καλλιέργειες και σε ιστούς ολόκληρων οργανισμών (Iwama et al., 1998).

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή από την επέκταση των αποτελεσμάτων της κυτταρικής σειράς σε ολόκληρο το ψάρι καθώς οι κυτταρικές σειρές είναι μη διαφοροποιήσιμες και καρκινογενείς, και ίσως να μην παρουσιάζουν την πραγματική μεταβολική κατάσταση των κυττάρων *in vivo*. Σε αντίθεση, τα κύτταρα αρχέγονων καλλιιεργειών διατηρούν τα διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά τους και μπορούν να χαρακτηριστούν ως καλύτερα μοντέλα για την μελέτη της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Εκτός από τα πλεονεκτήματα της χρησιμότητας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στην βιοπαρακολούθηση των οργανισμών, υπάρχουν ωστόσο και ορισμένα μειονεκτήματα ή περιορισμοί της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Ο εντοπισμός μιας οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ ίσως να μην παρέχει επαρκώς πληροφορίες για την χρησιμοποίηση αυτών ως βιοδείκτες για μεγάλη ποικιλία ρυπογόνων, και αυτό γιατί διαφορετικοί παράγοντες επάγουν διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ και με διαφορετική αποδοτικότητα (de Pomerai, 1996). Επιπλέον, η πρωτεοτοξικότητα (βλάβη στις πρωτεΐνες) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των παραγόντων θερμικού σοκ (HSF) που ίσως να αποτελέσει δευτερογενή συνέπεια της τοξικολογικής βλάβης, στην οποία οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παρέχουν έναν λιγότερο ευαίσθητο βιοδείκτη σε σχέση με τις αναλύσεις που βασίζονται σε πρωταρχικό στόχο (Meyer et al., 1995, de Pomerai, 1996).

13.3 Η επίκτητη ανοχή και η βιοπαρακολούθηση

Είναι γεγονός ότι το ισχυρό θανατηφόρο θερμικό σοκ αυξάνει την ικανότητα των κυττάρων να επιβιώνουν ακολούθως από την πιο σφοδρή θερμική θεραπεία (θερμοανθεκτικότητα). Εκτός από το θερμικό σοκ, υπάρχουν και άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες οι οποίοι σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις έχουν αποδειχθεί ότι εξάγουν αντίσταση, όχι μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των παραγόντων, αλλά εναντίον όλων των άλλων πρωτεοτοξικών παραγόντων, φαινόμενο το οποίο αναφέρεται ως επίκτητη ή επαγόμενη ανοχή (Parsell & Lindquist, 1993).

Για παράδειγμα, η θερμική προ μεταχείριση του δείγματος *Daphnia magna* απέδειξε ότι μπορεί να προστατευτεί από την έκθεση σε malathion σε συγκεντρώσεις, οι οποίες υπό κανονικές συνθήκες θα ήταν θανατηφόρες (Bond & Bradley, 1995).

Η επίκτητη ή επαγόμενη ανοχή φαίνεται να συνδέεται με τα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων οικογενειών πρωτεϊνών θερμικού σοκ, ενώ άλλες οικογένειες πρωτεϊνών φαίνονται να μην σχετίζονται. Ωστόσο, διαφορετικοί οργανισμοί φαίνεται να αποκτούν ανοχή μέσω της επαγωγής διαφόρων οικογενειών των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Parsell & Lindquist, 1993).

Επιπλέον, η επίκτητη ανοχή μπορεί να σχετίζεται ως η προσαρμογή του οργανισμού σε διακυμάνσεις του περιβάλλοντός του. Συγκεκριμένα, οι οργανισμοί χωρίς μίσχο (φυτά, μύδια κ.α.) δείχνουν αυξημένα επίπεδα ανοχής ως μέρος της φυσιολογικής τους απάντηση στις αλλαγές των συνθηκών του περιβάλλοντος.

Εκτός, από την προσαρμογή των οργανισμών σε διακυμάνσεις του περιβάλλοντος, υπάρχει απόδειξη ότι οι οργανισμοί που αναπτύσσονται σε μολυσμένα από ρύπους περιβάλλοντα προσαρμόζονται μέσω της έκφρασης υψηλών επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Sanders & Martin, 1993). Συνεπώς, η συσσώρευση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί να προταθεί ως μέθοδο εξέτασης άγριων πληθυσμών προερχόμενοι από μολυσμένες περιοχές (Sanders & Martin, 1993).

Ωστόσο, διαφορές στις απαντήσεις των ειδών που εξετάζονται απαιτούν την χρησιμοποίηση κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς, τα οποία δεν είναι πάντοτε διαθέσιμα. Επιπρόσθετα, ορισμένοι ερευνητές διαφωνούν ότι εξαιτίας της προσαρμογής των οργανισμών σε φυσικές διακυμάνσεις των συνθηκών του περιβάλλοντος, τα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μπορεί να μην είναι τα κατάλληλα σημάδια, τα οποία αναμφίβολα αποδεικνύουν την παρουσία των ρυπογόνων (Dietz & Somero, 1994, de Pomerai, 1996).

Είναι γεγονός ότι η επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ δεν μπορεί πάντοτε να βαθμονομείται. Αποδειξη αυτής της άποψης είναι οι μελέτες (Pyza et al, 1997) που έγιναν προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ hsp70 του centipede *Lithobius mutabilis*, το οποίο συλλέχτηκε από διαφορετικές περιοχές που ήταν μολυσμένες από βαρέα μέταλλα και πιο συγκεκριμένα με ψευδάργυρο (Zn) και μόλυβδο (Pb) με άτομα του ίδιου είδους από περιοχές μη μολυσμένες, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μεταξύ των centipedes που συλλέχτηκαν από μη μολυσμένες και μολυσμένες περιοχές.

Επιπλέον, τα επίπεδα της hsp70 ήταν ίδια καθ'όλο το μήκος της μολυσμένης από βαρέα μέταλλα περιοχής.

Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η ανοχή συγκεκριμένων ειδών επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης του περιεχομένου των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, συγκεκριμένο για κάθε είδος, το οποίο διατηρήται σε εύρος ρυπογόνων συγκεντρώσεων. Ακόμη, άλλο παράδειγμα, είναι εκείνο των καβουριών του είδους (*Carcinus maenas*) τα οποία συλλέκθηκαν από πέντε διαφορετικά σημεία μιας μολυσμένης με βαρέα μέταλλα περιοχής κατά μήκος της Νοτιοδυτικής ακτής της Αγγλίας.

Οι συγκεντρώσεις των μεταλλοθειονινών στα βράγχια απέδειξαν την έκθεση των καβουριών σε χαλκό (Cu) και ψευδάργυρο (Zn) (Pedersen et al., 1997).

Σε αντίθεση, τα αυξημένα επίπεδα των μετάλλων σε ιστούς στα βράγχια δεν συνδέονται με τα αυξημένα επίπεδα της hsp70 πρωτεΐνης θερμικού σοκ. Πιθανόν, αυτό να αποδεικνύει ότι τα αυξημένα επίπεδα των μετάλλων και των μεταλλοθειονινών στα βράγχια δεν ενέχουν τοξική απειλή ή διαφορετικά ότι η απάντηση σε στρεσογόνο παράγοντα είναι τόσο παροδική ή μεταβλητή ώστε να παρέχει γνώση της έκτασης της διάσπασης της λειτουργίας των κυττάρων όταν μετρούνται ως μέρος μελέτης πεδίου (Pedersen et al., 1997).

Τέλος, ένα άλλο παράδειγμα είναι η μελέτη της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 και της hsp60 σε Ισόποδα του είδους *Oniscus asellus* σε απάντηση κατά την πολλαπλή έκθεση σε βαρέα μέταλλα. Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη hsp70 ήταν πιο ευαίσθητη σε μόλυνση από μέταλλα σε σχέση με την πρωτεΐνη hsp60. Αρχικά τα επίπεδα της hsp70 ήταν αυξημένα, μια επιπλέον όμως αύξηση των συγκεντρώσεων των μετάλλων είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων λόγω της βλάβης που προκλήθηκε στον μεταβολισμό των κυττάρων (Eckwert et al., 1991a).

Τα παραπάνω παραδείγματα, δείχνουν ενδεικτικά ορισμένα μειονεκτήματα που μπορούν να προκληθούν από την χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως βιοδείκτες

13.4. Η επιμονή της απόκρισης σε στρες

Είναι γεγονός, πως για την βιοπαρακολούθηση των οργανισμών μεγάλη σημασία έχει η παρατήρηση ότι τα αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ επάγονται από διάφορες μορφές ρυπογόνων, τα οποία εμμένουν στον οργανισμό με την πάροδο του χρόνου.

Επειδή οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ υπό κανονικές συνθήκες βρίσκονται σε ισορροπία με τις άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου είναι πιθανό πως τα αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ να διαρκούν τουλάχιστον όσο είναι και η διάρκεια της έκθεσης εώς ότου δηλαδή το ποσοστό των αποδιατασσωμένων πρωτεϊνών ή διαφορετικά των κατεστραμμένων από στρες πρωτεϊνών μειωθεί (Adams et al., 1994).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι του *Oniscus asellus* που ανήκει στην οικογένεια των Ισοπόδων του οποίου η έκθεση για τρεις εβδομάδες σε υδρόφιλα ξеноβιοτικά όπως κάδμιο (Cd), μόλυβδος (Pb) και ψευδάργυρος (Zn) είχε ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση της πρωτεΐνης Hsp70 (Köhler & Eckwert, 1997, Eckwert et al., 1997a).

Ακόμη, και έπειτα από έκθεση του *Oniscus asellus* για τρεις μήνες σε χλωριούχο κάδμιο φαίνεται ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 παραμένουν αυξημένα (Eckwert & Köhler, 1997b). Αντίθετα, η έκθεση σε λιπόφιλα οργανικά σκευάσματα όπως είναι το B(a)P και το PCB52 μπορεί να επάγει μόνο παροδικά την πρωτεΐνη hsp70 ενώ σε λιγότερο λιπόφιλα σκευάσματα όπως τα γ-HCH και PCP τα οποία είναι ικανά να αυξήσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης hsp70 για περίπου μια ή δύο εβδομάδες.

Από όλα αυτά συμπεραίνουμε ότι η επαγωγή της πρωτεΐνης hsp70 μπορεί να προταθεί ως βιοδείκτης χρόνιας έκθεσης και επίδρασης σε χημικά. Επιπλέον, για ιδιαίτερα λιπόφιλα σκευάσματα η πρωτεΐνη hsp70 μπορεί μόνο να υποδεικνύει επιδράσεις με οξεία θανατηφόρα τοξικότητα.

Αν και η επιμονή της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι απαραίτητη για την χρησιμοποίησή τους σε επί τόπου οικοτοξικολογικές μελέτες, μπορεί όμως να αποτελέσει σοβαρό μειονέκτημα για τις περιβαλλοντικές μελέτες.

Πολύ συχνά η σύνθεση της hsp70 είναι μεγαλύτερη σε απόκριση σε θερμικό σοκ από ότι σε τοξικά χημικά (Sanders, 1990). Σαν αποτέλεσμα αυτού, οποιαδήποτε απόκριση σε χημικά μπορεί να καλυφθεί από υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, τα οποία επάγονται λόγω των διακυμάνσεων που συμβαίνουν στο θερμικό περιβάλλον του οργανισμού.

13.5 Συμπέρασμα

Πολλά είναι τα χαρακτηριστικά της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη σε μια οικοτοξικολογική μελέτη. Από την μια πλευρά, εξαιτίας της κυτταρικής πρωτεϊνικής βλάβης, η απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες πιθανόν να ενσωματώνει τον συνδυασμό των επιδράσεων των διαφορετικών περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων στα κύτταρα.

Από την άλλη πλευρά, η συμμετοχή της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες σε τόσες πολλές κυτταρικές λειτουργίες κλειδιά σε συνδυασμό με την φύση της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες μεταξύ των ειδών επιτρέπει την εφαρμογή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε αναλύσεις οργανισμών. Εξαιτίας της φύσης τους, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλες για την χρησιμοποίησή τους ως υποκυτταρικοί βιοδείκτες σε οικοτοξικολογικές μελέτες.

Η μελέτη της απόκρισης των οργανισμών σε στρες είναι πιθανό να μπορεί να γίνει είτε σε mRNA ή/και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αν και η μελέτη σε mRNA επίπεδο μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα της οικοτοξικολογικής παρακολούθησης.

Αντίθετα, εφόσον οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ επάγονται και παραμένουν σε αυξημένα επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα, στις περισσότερες οικοτοξικολογικές μελέτες γίνεται χρήση των αντισωμάτων προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα η επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Διαφορές στην απόκριση και στην ποικιλία των επιπέδων των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μεταξύ των ειδών, εξαιτίας των φυσιολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων ή μιας πρόσφατης χρόνιας έκθεσης, συνιστά την χρησιμοποίηση κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς, τα οποία μπορεί να μην είναι πάντοτε διαθέσιμα.

Επιπλέον, οι αναλύσεις που βασίζονται σε μια κατηγορία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ πιθανόν να μην μπορεί να ελέγξουν την παρουσία συγκεκριμένων στρεσογόνων παραγόντων. Για τον λόγο αυτό, απαιτείται ο συνδυασμός πολλών κατηγοριών από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ που μπορεί να δώσει επαρκή αποτελέσματα σε βιοανάλυση στις περισσότερες κατηγορίες των περιβαλλοντικών ρυπογόνων.

Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την καθιέρωση της σχέσης μεταξύ της επαγωγής των πρωτεϊνών θερμικού σοκ λόγω της απόκρισης σε στρεσογόνους παράγοντες και των επιδράσεων των ρυπογόνων που εξέρχονται σε οργανικό επίπεδο και από τα οικοσυστήματα.

BIBΛIOΦΡΑΦΙΑ

Abassy, M.A., Eldefrawi, A.T. (1983). Pyrethroid action on nicotinic acetylcholine receptor/channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19, 299-308.

Abdulle R, Mohindra A, Fernando P, Heikkila JJ. (2002). *Xenopus* small heat shock proteins, Hsp30C and Hsp30D, maintain heat- and chemically denatured luciferase in a folding-competent state. *Cell Stress and Chaperones*. 7(1): 6-16.

Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein *J Neurosci*. 23: 2203-11.

Adams, M. Savino, E., Freeman, M., (1994). Timing and induction of hsp70 production in *Clamydomonas reinhardtii*. *Biologia Bratislava*. 49, 623-628.

Ait-Aissa S, Pandard P, Magaud H, Arrigo AP, Thyband E, Porcher JM. (2003). Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicol Environ Safety* 54: 92-104.

Ait-Aissa S, Porcher J, Arrigo A, Lambre C. (2000). Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145: 147-157.

Ait-Aissa, S., Porcher, J.-M., Kretz-Rémy, C., Velarde, G., Arrigo, A.-P., Lambré, C. (1999b). Induction of the hsp70 gene promoter by various anticancer drugs. *Toxicol. Vitro* 13, 651-655

Albert, A. M. (1983). Energy budgets for populations of long-lived arthropod predators (Chilopoda: Lithobiidae) in an old beech forest. *Oecologia (Berlin)* 56, 292-305.

Ali, A., Krone, P.H., Pearson, D.S. and Heikkila, J.J. (1996). Evaluation of stress-inducible hsp90 gene expression as a potential molecular biomarker in *Xenopus laevis*. *Cell Stress & Chaperones* 1, 62-69.

Allan D.J., Harmon, B.V., (1986) The morphologic categorization of cell death induced by mild hyperthermia and comparison with death induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. *Scan Electron Microsc.* 3: 1121-1133.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.

Altschuler RA, Fairfield D, Cho Y, Leonova E, Benjamin IJ, Miller JM, Lomax MI. (2002). Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness. *Audiol Neurotoxicol* 7: 152-156.

Amaral, M.D., Galego, L. and Rodrigues-Pousada, C. (1988). Stress response of *Tetrahymena pyriformis* to arsenite and heat shock: differences and similarities. *European Journal of Biochemistry* 177, 463-70.

Amici C, Rossi A, Santoro MG. (1995). Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response. *Cancer Res* 55: 4452-4457.

Amici C, Sistonen L, Santoro MG, Morimoto RI. (1992). Antiproliferative Prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6227-6231.

Amin V, Cumming DV, Latchman DS. (1996). Over-expression of heat shock Protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neurosci.Lett.* 206:45-48

Ananthan, J., Goldberg, A.L., Voellmy, R., (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232 : 522-524.

Ananthan, J., Goldberg, A.L. & Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232, 522-524.

Angelidis, Ch., Lazaridis, I., Pagoulatos, G., (1991) "Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance", *Eur. J. Biochemistry*, 199 :35-39.

Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. (1999). Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur. J. Biochem.* 259: 505-512.

Angelidis, C.E., Nova, C., Lazaridis, I., Kontoyannis, D., Kollias, G., Pagoulatos, G., (1996). Overexpression of HSP70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics* 2: 111-117.

Arica, M.Y., and Bayramoğlu, G., (2004). Cr (VI) biosorption from aqueous solutions using free and immobilized biomass of *Lentinus sajor-caju*: preparation and kinetic characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 253: 203-211.

Arrigo, A. P., and Tanguay, R. M. (1991). Expression of heat shock proteins during development in *Drosophila*. In *Results and Problems in Cell Differentiation 17 Heat Shock and Development* (L. E. Hightower and L. Nover, Eds.), pp. 106-119.

Arrigo, A.-P. and Landry, J. (1994). Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: R.I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos (eds): *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, NY, pp 335-373.

Ashburner, M. (1982). The effects of heat shock and other stress on gene activity: An introduction. In *Heat Shock from Bacteria to Man* (M. J. Schlesinger, M. Ashburner, and A. Tissieres, Eds.), pp. 1-9. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

ATSDR (1999). Toxicological Profile for Cadmium (Update). Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Baeuerle, P.L. (1991). The inducible transcription activator NF κ B: Regulation by distinct protein subunits. *Biochim, Biophys, Acta* 1072, 63-80.

Ballinger, CA., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, LJ, Yin, LY., Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol.*, 19 :4535-45.

Barnes JA, Collins BW, Dix DJ, Allen JW. (2002). Effects of heat shock protein 70 (Hsp70) on arsenite induced genotoxicity. *Environ Mol Mutagen* 40:236–242.

Barnhoorn, I.E.J., (1996). Effects of manganese on the haematology of *Oreochromis mossambicus* and the bioaccumulation of metals in *Labeo umbratus*. *Unpublished M.Sc. dissertation, Rand Afrikaans Univeristy, South Africa.*

Barnhoorn, I.E.J., (2001). Selected enzymes and heat shock protein 70 as biomarkers of pollution in the reproductive organs of freshwater fish. *Unpublished PhD. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa*

Barnham, K.J., C.L. Masters, A.I. Bush. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205-214.

Barren J. C., Lamb P. W., Wang, T. C. and Lee, T.C. (1989). Mechanisms of arsenic-induced cell transformation, *Biol. Trace Elem. Res* 21:421-429.

Bartosiewicz M, Peen S, Buckpitt A. (2001). Application of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo (a) pyrene, and trichloroethylene. *Environ Health Perspect* 109: 71–74.

Basu, N., Kennedy, C.J., and Iwama, G.K., (2002a). The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134: 655-663.

Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G., and Iwama, G.K., (2001). The effects on cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and Comparative Endocrinology* 124: 97-105.

Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M. et al. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295, 173-183.

Bauman, J.W., Liu, J., Klaassen, C.D., (1993). Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fund. Appl. Toxicol.* 21, 15-22.

Becker J, Craig EA. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones (Review). *Eur J Biochem.* 219:11–23.

Beckman R.P., Mizzen L.A., & Welch W.J. (1990) Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850-854.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469-75.

Beland FA, Poirier MC. (1994). DNA adducts and their consequences. In: *Methods to Assess DNA Damage and Repair: Interspecies Comparisons*, ed Tardiff RG, Lohmann PHM, Wogan GN. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 29–55.

Bennett DA, Waters MD. (2000). Applying biomarker research. *Environ Health Perspect* 108: 907-10.

Bensaude O, Bellier S, Dubois MF, Giannoni F, Nguyen VT. (1996). Heat shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. In: Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla BS, editors. *Stress Inducible Cellular Responses*. Basel: Birkhäuser, pp 119–219.

Bettencourt, B.R., Feder, F.E. & Cavicchi, S. (1999). Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53, 484-492.

Beyaer, R., Kidd, V.J., Cornelius, S., Van de Craen, M., Denecjer, G., Lahti, J.M., Gururajan, R., Vandenberghe, P. and Fiers, W., (1997). Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/ASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 272, 11694-97.

Biechinger SR, Warren JT Jr, Kuwada JY, Krone PH. (2002). Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environ Health Perspect* 110: 1041-1046.

Bierkens J, Van de Perre WV, Maes J. (1998). Effect of different environmental

Bierkens JGEA. (2000). Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153:61-72.

Bijlsma, R. & Loeschcke, V. (1997). *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Birkhäuser Verlag, Basel.

Blackburn R, Galoforo S, Berns CM, Ireland M, Cho JM, et al. (1996). Thermal response in murine L929 cells lacking alpha B-crystallin expression and alpha B-crystallin expressing L929 transfectants. *Mol. Cell. Biochem.* 155:51–60.

Blake MJ, Fagnoli J, Gershon D, and Holbrook NJ. (1991). Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and HSP70 mRNA expression in aged rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 260: R663–R667.

Bolin,C.M., R. Basha, D. Cox, N.H. Zawia, B. Maloney, D.K. Lahiri, F. Cardozo-Pelaez (2006). Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain, *FASEB J.* 20, 788-790.

Bond, J.A., Bradley, B.P., (1995).Heat-shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*.*Marine Environ.Res.* 39, 209-212.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D.D., and Green, D.R., (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, 17, 37-49.

Boyd, C.E., (2000).Water quality: An introduction. *Kluwer Academic Publishers, Boston*.

Bozidis, P., Lazaridis, I., Pagoulatos, G., Angelidis, Ch., (1998). Antibodies against mammalian DnaJs as tools for studying their chaperoning function . *Euro Cell Path*, Belfast, 2-7 May, UK.

Bradley, B.P. (1993). Are the stress proteins indicators of exposure or effect? *Marine Environmental Research* 35,85-8.

Brown CL, Luoma SN. (1995). Use of the euryhaline bivalve *Potamocorbula amurensis* as a biosentinel species to assess trace metal contamination in San Francisco Bay. *Mar Ecol Progr Ser* 124:129–42.

Brown, J.L. and Kitchin, K.T. (1996).Arsenite, but not cadmium, induces ornithine decarboxylase and heme oxygenase activity in rat liver.Relevance to arsenic carcinogenesis, *Cancer Len.*98:227-231.

Brozovic, A S. Simaga, M. Osmak (2001). Department of Molecular Genetics, Rudjer Boskovic Institute.*Neoplasma* 48:99-103

Bubliy,O.A., Loeschcke, V. & Imasheva, A.G. (2001). Genetic variation of morphological traits in *Drosophila melanogaster* under poor nutrition: isofemale lines and offspring-parent regression. *Heredity*, 86, 363-69.

Buchman TG, Cabin DE, Porter JM, and Bulkley GB. (1989).Change in hepatic gene expression after shock/resuscitation.*Surgery* 106: 283–291.

Bureau of Indian Standards. (1982). ISI Standards for Surface Water Quality for Various Uses. IS: 2296. New Delhi: Government of India.

Burton GW, Ingold KU (1989). α -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:509-513.

Cakmak I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* 146, 185-205.

Cancer: Prognostic implications. *J. Natl.Cancer Inst.* 85:570-74.

Carraway, M.S., A.J. Ghio, J.L. Taylor, C.A. (1998). Piantadosi, Induction of Ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung, *Am, J. Physiol.* 275, L583-L592.

Cardone, M.H, Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., and Frisch, S.M., (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.

Carroll S, Wood EJ. (2000). Exposure of human keratinocytes and fibroblasts in vitro to nickel sulphate ions induces synthesis of stress proteins Hsp72 and Hsp90. *Acta Derm Venereol* 80:94-97.

Casida, J.E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 34, 189-202.

Chan, L.Y., Chiu, Y., Siu, S.S., Lau, T.K., (2001). A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. *Hum. Reprod.* 16, 2390-2393.

Chapple, J.P., Smerdox, G.R. and Hawkixs, A.J.S. (1977). Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: tissue specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217, 225-235.

Cheetham ME, Jackson AP, Anderton BH. (1994). Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. *Eur J Biochem.* 226:99-107.

Cheetham, M.E., Brion, J.P., Anderson, B.H., (1992). Human homologues of the bacterial heat-shock protein DnaJ are preferentially expressed in neurons *Biochem. J.*, 284: 469-476.

Chen, Q., Yu, K., Stevens, J.L., (1992). Regulation of the cellular response by reactive electrophiles. *J. Biol.Chem.* 267, 24322-24327.

Chengfeng Xiao, Sheng Chen, Jizhao Li, Tao Hai, Qiaofa Lu, Enling Sun, Ruibo Wang, Robert M. Tanguay, and Tangchun Wu. (2002). Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. *Cell Stress & Chaperones* 7 (4), 396-402.

Chi SH, Mestrl R. (1996). Stable expression of a human HSP70 gene in rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. *Am. J. Physiol.* 270:C1017-21.

Chiang H.-L., Terlecky S.R., Plant C.P. & Dice J.F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382-385.

Chin, K.-V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1990). Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDRI) gene in human renal carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, 265 (1): 221-226.

Chirico, W., Waters, M.G., Blobel, G., (1988). 70 K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332: 805-10.

Chiti, F. C.M. Dobson (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333-366.

Ciocca DR, Fuqua SAW, Lock-Lim W, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. (1992). Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 52:3648-3654.

Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua S.A.W.(1993). Biological and clinical implications of heat shock protein (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 85:1558-1570.

Ciocca DR, Puy LA, Edwards DP et al.(1985).The presence of an estrogen-regulated protein detected by monoclonal antibody in abnormal human endometrium.*J.Clin Endocrinol Metab* 60:137-143.

Ciocca DR, Puy LA, Lo Castro G:(1986). Localization of an estrogen-responsive protein in human cervix during menstrual cycle, pregnancy, and menopause and in abnormal cervical epithelia without atypia. *Am J Obstetr Gynecol* 155: 1090-1096.

Ciocca DR, Stati AO, Amprino De Castro MM. (1990).Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 16: 243-251.

Ciocca, D.R., Green, S., Elledge, R.M., Clark, G.M., Pugh, R., Radvin, P., Lew, D., Martino, S., Osborne, C.K., (1998). Heat shock proteins hsp27 and hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4:1263-1266.

Clare, M.J. & Luckinbill, L.S. (1985). The effects of gene-environment interaction on the expression of longevity. *Heredity*, 55, 19-26.

Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok V.A., Sellins K.S., (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10: 267-293.

Collier, T.K., Anulacion, B., Stein, J.E., Goksoyr, A. and Varnashi, U. (1995). A field evaluation of Cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flat fish, *Environ. Toxicol. Chem.* 14(1):143-152.

Conroy SE, Gibson SL, Brunstrom G, Isenberg D, Luqmani Y, Latchman DS. (1995).Autoantibodies to the 90 KD heat shock protein in sera of breast cancer patients. *Lancet* 345:126-127

Cope, F.O., Wille, J.J., (1991). Carcinogenesis and apoptosis: Paradigms and paradoxes in cell cycle and differentiation in apoptosis: the molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 61-86.

Cossins, A.R. & Bowler, K. (1987). *Temperature Biology of Animals*. Chapman and Hall, New York.

Craig, E. A. (1985). The heat shock response. *CRC Crit.Rev.Biochem.* 8,239–280.

Crowther, J. R. (1995). ELISA theory and practice. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 42. Humana Press, Totowa, NJ.

Cumming DV, Heads RJ, Watson A, Latchman DS, Yellon DM. (1996). Differential protection of primary rat cardiocytes by transfection of specific heat stress proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:2343–49.

Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG. (1993). Heat-response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 87: 963–971.

Currie, S. and Tufts, B. (1997). Synthesis of stress protein 70, Hsp70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *Journal of Experimental Biology* 200, 607-14.

Dahlgaard, J., Loeschke, V., Michalak, P. & Justesen, J. (1998). Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.*, 12, 786-793.

Darasch S, Mosser DD, Bols NC, Heikkila JJ. (1988). Heat shock gene expression in *Xenopus laevis* A6 cells in response to heat shock and sodium arsenite treatments. *Biochem. Cell Biol.* 66:862-868.

David, J.R., Allemand, R., Van Herrewege, J. & Cohet, Y. (1983). Ecophysiology: abiotic factors. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (Eds Ashburnet, M., Carson, H.L. & Thompson, J.N.). Academic Press, London, pp. 105-170.

Davis, J.R. et al. (1993). Family pesticide use and childhood brain cancer. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24:87-92.

Davis, M. K. Reich, K. D. and Tikkanen, M.w. (1994). Nationwide and California occurrence studies. Special issue of environmental geochemistry and Health. Science and technology letters, In *Arsenic Exposure and Health*. W.R. Chappell C.O. Abernathy, and C.R. Cothorn, Eds. J. Vol.16. pp31-40.

De Boeck, G., De Wachter, B., Vlaeminck, A., and Blust, R., (2002). Effect of cortisol treatment and/or sub-lethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, (5): 1122-1126.

De Maio A. (1999). Heat shock proteins, facts, thoughts and dreams. *Shock* 11:1–12.

De Pomerai, D.I., (1996). Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human and Experimental Toxicology* 15,279-285.

Deane, E.E., Kelly, S.P., Lo, D.K.M., and Woo, N.Y.S., (1999). Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. *Journal of Endocrinology* 161: 413-421.

Depledge, M.H. (1994). The regional basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M.C. Fossi and C. Leonzio (eds): *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 271-295.

Depledge, M.H., (1993). The conceptual basis of the biomarker approach. *Biomarkers research and application in the assessment of environmental health*. (D.B. Peakall & R.I. Shugart (Eds)), 15-29.

Derosa CT, Stevens Y-W, Wilson JD, Ademoyero AA, Buchanan SD, Cibulas W, et al. (1993). The agency for toxic substances and disease registry's role in development and application of biomarkers in public health practice. *Toxicol Ind Health* 9(6): 979-995.

Di Giulio RT, Wasburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8: 1103.

Di Iorio PJ, Holsinger K, Schultz RJ, Hightower LE. (1996). Quantitative evidence that both Hsc70 and Hsp70 contribute to thermal adaptation in hybrids of the livebearing fishes *Poeciliopsis*. *Cell Stress Chaperones* 1:139-47

Dietz K-J, Baier M, Kramer U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, 73-97.

Dietz TJ, Somero GN. (1993). Species and tissue specific synthesis patterns for heat shock proteins HSP70 in several marine teleost fishes. *Physiol Zool* 66:863-880.

Dietz, T. (1994). Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology* 188, 333-8.

Dietz, T.J., Somero, G.N., (1994). Species and tissue-specific synthesis patterns for heat-shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes. *Physiol. Zool.* 66, 863-880.

Dillmann WH, Mestral R. (1995). Heat shock proteins in myocardial stress. *Z. Kardiol.* 4:87-90

Ding XZ, Tsokos GC, Smallridge RC, Kiang JG. (1997). Heat shock gene expression in HSP-70 and HSF1 gene-transfected human epidermoid A-431 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 167:145-52

Donnelly TJ, Sievers RE, Vissers FLJ, Welch WJ, Wolfe CL. (1992). Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion. *Circulation* 85: 769-778.

Dorner AJ, Kaufman RJ. (1994). The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals* 22:103-12.

Dorner AJ, Krane MG, Kaufman RJ. (1988). Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells. *Mol. Cell Biol.* 8:4063-70

Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ.(1992). Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 11:1563–71.

Dunlap DY, Matsumura F. (1997).Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicol Environ Saf* 3:238–244.

Dyer, S.D., Dickson, K.L., Zimmerman, E.G. and Sanders, B.M.(1993b). Tissue specific patterns of heat shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow.(*Pimephales promelas*) *Canadian Journal of Zoology* 69, 2021-7.

Dyer, S.D., Dickson, K.L., Zimmerman, E.G., (1993a).A laboratory evaluation of the use of stress-proteins in fish to detect changes in water quality. In: Landis, W.G., Hugues, J.S., Lewis, M.A. (Eds), *Environmental toxicology and risk assessment*.American Society for Testing and Materials(ASTM STP 1179), Philadelphia, pp.247-261.

Dyer,S.D., Brooks, G.L., Dickson, K.L., Sanders, B.M.,Zimmerman,E.G., (1993b).Synthesis and accumulation of stress-proteins in tissues of arsenite-exposed fathead minnows(*Pimephales promelas*).*Environmental Toxicology and Chemistry* 12,913-924.

Dyson, JE. Simmons, DM. Daniel, J., McLaughlin, JM., Quirke, P., Bird, CC., (1986). Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia.*Cell Tissue Kinet*, 19: 311-24.

Eckwert H,Alberti G,Kohler H-R (1997a).The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multible heavy metal exposure:I.Principles and toxicological assessment.*Ecotoxicology* 6:249-262.

Eckwert H,Kohler H-R (1997b).The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus*(Isopoda) field populations:variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites.*Appl Soil Ecol* 6:275-282.

Edmund B, Besselièvre PE, Schwartz M. (1976).*The Treatment of Industrial Wastes*. 2nd ed. New York: McGraw Hill.

Edwards DP, Adams DJ, McGuire WL.(1981).Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in human breast cancer cell line (MCF-7).*Breast Cancer Res Treat* 1:209-223.

Edwards, M.J., Dykes, P.J.,Dovovan, M.R.O., Merrett, V.R.,Morgan, H.E., Marks,R., (1990).Induction oh heat-shock proteins as a measure of chemical cytotoxicity.*Toxicology in vito* 4,270-276.

Eisler R. (2000). *Handbook of chemical risk assessment: Health hazards to humans,plants, and animals. Lewis Publishers, Vol. 1, 1-487.*

Elliott, M., James, X.F. and Potter, C. (1978). The future of pyrethroids in insect control. *Annual Review in Entomology*, 23, 443-469.

Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H. (1992). Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41, 229-248

Eyssen-Hernandez, R., A. Ladoux, C. Frelin, (1996). Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia, *FEBS Lett.* 382, 229-233.

Fargnoli J, Kunisada T, Fornace AJ, Schneider EL, and Olbrook NJ. (1990). Decreased expression of heat shock protein 70 RNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 846-850.

Favatiere, F., Bornman, L., Hightower, L.E., Günther, E. & Polla, B.S. (1997). Variation in bsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance. *Cell Stress Chaperones*, 2, 141-155.

Feder JH, Rossi JM, Solomon J, Solomon N, Lindquist S. (1992). The consequences of expressing Hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* 6:1402-1413

Feder ME, Cartano MV, Milos L, Krebs RA, Lindquist SL. (1996). Effect of engineering hsp70 copy number on hsp70 expression and tolerance of ecologically relevant heat shock in larvae and pupae of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 199:1837-1844.

Feder ME, Krebs RA. (1997). Ecological and evolutionary physiology of heat shock proteins and the stress response in *Drosophila*: complementary insights from genetic engineering and natural variation. In *Stress, Adaptation, and Evolution*, ed. R Bijlsma, V Loeschke, pp. 155-73. Basel: Birkhäuser

Feder ME, Krebs RA. (1998). Natural and genetic engineering of thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Am. Zool.* 38:503-17

Feder ME, Lindquist SL. (1992). Evolutionary loss of a heat shock protein. *Am. Zool.* 32:51A (Abstr.)

Feder ME, Parsell DA, Lindquist SL. (1995). The stress response and stress proteins. In: Lemasters JJ, Oliver C, editors. *Cell Biology of Trauma*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 177-191.

Feder, M. E., T. L. Karr, W. Yang, J. M. Hoekstra, and A. C. James. (1999). Interaction of *Drosophila* and its endosymbiont *Wolbachia*: Natural heat shock and the overcoming of sexual incompatibility. *Amer. Zool.* 39:363-373.

Feder, M.E. & Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61, 243-282.

Feder, M.E., Roberts, S.P. & Bordelon, A.C. (2000). Molecular thermal telemetry of free-ranging adult *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*, 123, 460-465.

Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla BS. (1996). *Stress-Inducible Cellular Responses*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. 512 p.

Feige U, Polla S. (1995). Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experientia* 50: 979-986.

Feldman DE, Frydman J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol.* 10: 26-33

Fernando P, Heikkila JJ. (2000). Functional characterization of *Xenopus* small heat shock protein, Hsp30C: the carboxyl end is required for stability and chaperone activity. *Cell Stress and Chaperones.* 5(2): 148-159.

Ferraniri M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. (1992). Unusual expression and localization of heat shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 51: 613-619.

Fink AF. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79:425-449.

Fischbach, M., Sabbioni, E., Bromley, P., (1993). Induction of the human growth hormone gene placed under human hsp70 promoter control in mouse cells: a quantitative indicator of metal toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 9, 177-188.

Forbat, I.N. and J.D. Skehan. (1992). Health effects of organophosphate sheep dips. *Brit. Med. J.* 305:1502-1503.

Fossi, M.C. and Leonzio, C. (1994) *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Freeman, B.C., Myers, M.P., Schumacher, Morimoto, R.I., (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with Hdj-1. *EMBO J.*, 14, 2281-92.

Fraústo J.J.R., da Silva, R.J.P. Williams. (1993). *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press, Oxford, pp. 536-552.

Frick, T.W. et al. (1987). Effects of insecticide, diazinon, on pancreas of dog, cat and guinea pig. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 7:1-11.

Gabai V.L., Meriin, A.B., Mosser, D.D., Caron, A.W., Rits, S., Shifrin, V.I., Sherman, M.Y., (1997). Hsp70 prevents activation of stress Kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 272: 18033-18037.

Galea-Lauri J, Latchman DS, Katz DR. (1996). The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. *Exp. Cell Res.* 226:243-54

Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR. (1996). Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide:a possible role in immunopathology.J. Immunol. 157:4109-18

Gaugler R, Wilson M, Shearer P. (1997). Field release and environmental fate of a transgenic entomopathogenic nematode.Biol. Control 9:75-80

Gauley J, Heikkila JJ. (2006). Examination of the expression of the heat shock protein gene,hsp110, in *Xenopus laevis* cultured cells and embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 145(2) :225-234.

Gebaver M, Zeiner M, Gerhing U. (1997). Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. FEBS Lett. 417: 109-113.

Gehring, W.J. & Wehner, R. (1995). Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 2994-2998.

Georgopoulos, C., Welch, W.J., (1993). "Role of the major heat shock proteins as molecular chaperons", *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 601-634.

Georing, P.L., Kish, C.L., Fisher, B.R. (1993). Stress protein synthesis induced by cadmium-cysteine in rat-kidney. *Toxicology* 85, 25-39

Gething MJ, ed. (1997).Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts. Oxford, UK: Oxford Univ. Press

Gething, M. & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45.

Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y,Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med.* 184:2399-404.

Ghotbi Kohan, K. and Morgan, W.A. (2007).International Journal of Environmental Research, Vol 1, No 4, pp.290-295.

Gibbs, A.G., Perkins, M.C. & Markow, T.A. (2003). No place to hide: microclimates of Sonoran Desert *Drosophila*. *J. Thetmal Biol.*, 28, 353-362.

Gibney,E., J. Gault, J. Williams. (2001). the use of stress proteins as a marker of sub-lethal toxicity: induction of heat shock protein 70 by 2-isobutyl piperidine and transition metals at sub-lethal concentrations. *Bio-marker* 6, 204-217.

Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, Sapolsky R, Steinberg G, Hu B, Yenari MA. (2004). Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol.* 207: 3213-3220.

Gimenez-Conti IB, Slaga TI (1993). The hamster cheek pouch carcinogenesis model. *I Cell Biochem* 17(Suppl F):83-90.

Giritch A, Ganal M, Stephan UW, Baumlein H. (1998). Structure, expression and chromosomal localization of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Molecular Biology* 37,701-714.

Goering, P.L.(1993). Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology* 14, 45-60.

Goldsbrough P. (2000). Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: Terry N, Banuelos G, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, 221-233.

Gomez CE, Contento L, Carsen AE. (2001). Toxicity tests to assess pollutants removal during wastewater treatment and the quality of receiving waters in Argentina. *Environ Toxicol* 16:217-224.

Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Young DS. (1994). Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clin Chem* 40(7): 1360-1362.

Graves, J.D., Gotoh, Y., Draves, K.E., Ambrose, D., Han, D.K.M., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E.A., and Krebs, E.G., (1998). Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase MstI. *EMBO J.*, 17 , 2224-2234.

Greenwald P, Kelloff GC, Boone CW, McDonald SS (1995). Genetic and cellular changes in colorectal cancer: proposed targets of chemopreventive agents. *Cancer Epidemiol Biomark & Prev* 4:691-702.

Gregersen, N., Bolund, L. & Bross, P. (2003). Protein misfolding, aggregation and degradation in disease. *Methods. Mol. Biol.*, 232, 3-16.

Gregersen, N., Bross, P., Andresen, B.S., Pedersen, C.B., Corydon, T.J. & Bolund, L. (2001). The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 24, 189-212.

Gurd, F.R.N., P.E. Wilcox. (1956). Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and amino acids, *Adv. Protein Chem.* 11, 311-427.

Guven, K., Duce, J.A., De Pomerai, D.I., (1994). Evaluation of a stress-inducible transgenic nematode strain for rapid aquatic toxicity testing. *Aquat. Toxicol.* 29, 119-137.

Guyton A.C., and Hall, J.E., (1997). *Human physiology and mechanisms of disease*. 6th Edition. *W.B. Saunders Company*.

Haasch, M.L., Prince, R., Wejksnora, P.J., Cooper, K.R. and Lech, J.J. (1993) Caged and wild fish: induction of hepatic Cytochrome P-450 (CYPIAI) as an environmental biomarker. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 885-895.

Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M. and Stegeman, J.J. (1993) Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquat. Toxicol.* 26: 185-208.

Haiti, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580(211).
Henschel A, Burton L, Morgalies L, and Smith JE. (1969). An analysis of the deaths in St. Louis during July 1966. *Am J Public Health Nations Health* 59: 2232-2240.

Halle, A. and D.D. Sloas. (1987). Percutaneous organophosphate poisoning. *South. Med. J.* 80:1179-1181.

Hall J.L., (2001). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. School of Biological Sciences, University of Southampton.

Hamer DH. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55, 913-951.

Hamm JT, Wilson BW, Hinton DE. (1998). Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost *Oryzias latipes*. *Neuro Toxicol* 19(6):853-70.

Han MY, Park YM. (1997). Reduced protein denaturation in thermotolerant cells by elevated levels of HSP70. *Korean J. Pharmacol.* 32:433-44

Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G. (1997). A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo(a)pyrene and (6)-anti-benzo(a)pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 390: 179-188.

Hansen, J.J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N. et al. (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.*, 70, 1328-1332.

Harrison JD, Jones JA, Ellis IO, Morris DL. (1986). Oestrogen receptor D5 antibody is an independent negative prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer* 78:334-336.

Hartley J, Cairney JWG, Meharg A.A. (1997). Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant and Soil* 189, 303-319.

Hashmi S, Hashmi G, Glazer I, Gaugler R. (1998). Thermal response of *Heterorhabditis bacteriophora* transformed with the *Caenorhabditis elegans* hsp70

Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM.(1994). Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.*26:695–99

Heads RJ, Yellon DM, Latchman DS.(1995). Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:1669–78

Heath R.G.M., and Claassen, M., (1999). An overview of the pesticide and metal

Heath, A.G. (1991). Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 100. Vol. 3: p. 559-565.

Heckathorn, S. A., G. J. Poeller, J. S. Coleman, and R. L. Hallberg. (1996b). Nitrogen availability and vegetative development influence the response of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and heat-shock protein content to heat stress in *Zea mays* L. *Int. J. Plant Sci.* 157:588-595.

Heckathorn, S. A., G. J. Poeller, J. S. Coleman, and R.L. Hallberg. (1996a). Nitrogen availability alters patterns of accumulation of heat stress-induced proteins in plants. *Oecologia* 105:413-418.

Hei.T.K. , Liu, S. X. and Waldren, C. (1998). Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8103-8107.

Heidelberger C. (1975). Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem* 44: 79–121.

Heikkila JJ, Ovsenek N, Krone PH. (1987a). Examination of heat shock protein mRNA accumulation in early *Xenopus laevis* embryos. *Biochim. Cell Biol.* 65: 87-94.

Henle KJ, Jethmalani SM, Li L, Li GC. (1997). Protein glycosylation in a heat resistant rat fibroblast cell model expressing human HSP70. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:26–32

Hercus, M.J., Loeschcke, V. & Rattan, S.I.S. (2003). Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology*, 4, 149-156.

Herrera, F.D., Uribe, E.S., Ramirez, L.F.B., Mora, A.G. (1998). Critical thermal maxima and minima of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae). *J. Therm. Biol.* 23,381-385.

Hershko, A., (1988). Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* 263, 15237-15240.

High, S., Stirling, C.J., (1993). Protein translocation across membranes: common themes in divergent organisms. *TIBS* 3,335-339.

Hightower LE, Guidon PT. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat shock(stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 138: 257–266.

Hightower, L.E.(1991)Heat shock, stress proteins,chaperones, and proteotoxicity.*Cell* 66:191-201.

Hiranuma,K.,Hirata, K., Abe,T., Matsuno, K.,Hirano, H.,Suzuki,K., Higashi,K., (1993).Induction of mitochondrial chaperonin,hsp60, by candmium in human hepatoma cells.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*194,531-536.

Hochachka, P. W. and G. N. Somero. (1984). *Biochemical adaptation*. Princeton University Press,Princeton.

Hoffman DJ, Heinz GH, Krynitsky AJ.(1989).Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings. *J Toxicol Environ Health* 27: 263.

Hoffmann, A.A. & Merilä, J. (1999). Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends Ecol. Evol.*, 14, 96-101.

Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, New York.

Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. (1997b). *Extreme Environmental Change and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Hofmann GE, Somero GN. (1996). Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*:evidence from the heatshock response and protein ubiquitination.*Mar. Biol.* 126:65–75

Hofmann, G.E. and Somero, G.N.(1995). Evidence of protein damage at environmental temperatures-seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and HSP70 in the intertidal mussel *Mytilus Trossulus*. *Journal of Experimental Biology* 198, 1509-18.

Hogson E, Levi PE.(1994). *Introduction to Biochemical Toxicology*. 2nd ed. Appleton and Lange, Connecticut.

Hohfeld J, Cyr DM, Patterson C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* 2:885-90. Review.

Hu.H., (2005). Heavy metal poisoning, in: D.L. Kasper et al. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th ed., McGraw-Hill, New York, pp. 2577-2580.

Hubel A, Krobitch S, Horauf A, Clos J. (1997). The *Leishmania major* Hsp100 isrequired chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol. Cell. Biol.* 17:5987–95

Huey, R.B. & Berrigan, D. (2001). Temperature, demography, and ectotherm fitness. *Am. Nat.*, 158, 204-210.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, Jr. P. M. and Bergman, H.L. (1992) *Biomarkers - Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Hulka BS, Margolin BH (1992). Methodological issues in epidemiologic studies using biologic markers. *Am J Epidemiol* 135:200-209.

Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J. (1991). Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res.* 51:245–252 *Annu. Rev.*

Hutter JJ, Mestril R, Tam EK, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL. (1996). Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation* 94:1408–11

Huttermann A, Arduini I, Godbold DL. (1999). Metal pollution and forest decline. In: Prasad NMV, Hagemeyer J, eds. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, 253-272.

IARC. (1984). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 34, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC. (1987). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs*, vols. 1-42, International Agency for Research for Cancer, Lyon, France.

IARC. (1989). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 46, Diesel and Gasoline Engine Exhausts and some Nitroarenes, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC. (1999). International Agency for Research on Cancer, Re-evaluation of some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide, in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 71, Lyon, pp. 43-108.

IARC. IARC (1982). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Aniline and Aniline Hydrochloride*: Lyon. Vol 27. pp 39-61. 2

Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., Yoneda, Y. (1992). Antibodies against 70-KD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* 119, 1047-1061.

Indranil Mukhopadhyay, Aamir Nazir, D. K. Saxena, and D. Kar Chowdhuri. (2003). *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*. Volume 17, Number 5.

Indranil Mukhopadhyay, Daya Krishna Saxena, and Debapratim Kar Chowdhuri. (2003). Volume 111, Number 16, *Environmental Health Perspectives*

Inge Werner, Stephen L. Clark, David E. Hinton (2003). Biomarkers aid understanding of aquatic organism responses to environmental stressors. *California Agriculture*, Volume 57, Number 4.

Ireland MP. (1978). Heavy metal binding properties of earthworm chloragosomes. *Acta Biol Acad Sci Hung*. 29:385–394

Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., and Vijayan, M.M., (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8: 35-56.

Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R. B., Ackerman, P.A. *Amer Zool* (1999). 39, 901-909.

Iwaya K, Hitoshi T, Fujita S, Suzuki M, and Hirohashi S. (1995). Natural state of mutant p53 protein and hsp70 in breast cancer tissues. *Lab Invest* 72: 707-714.

Jaattela, M., Wissing, D., Bauer, P.A., and Li, G.C., (1992). Major heat shock protein 70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.*, 11, 3507-3512.

Jaattela M, Wissing D. (1993). Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of selfprotection. *J. Exp. Med.* 177:231–36.

Jaattela M. (1995). Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse hsp70/hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273, 3679-3686.

Jaattela M. (1999). Escaping Cell Death: Survival Proteins in cancer (Minireview). *Experimental Cell Research*, 248: 30-43.

Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki T., Egeblad, M., (1998). Hsp70 exerts its antiapoptotic function downstream of caspase-3-like proteases *EMBO J.*, 17: 6124-6134.
Jentschke G, Godbold DL. (2000). Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* 109, 107-116.

Jayanthika B. Wijeweera, A. Jay Gandolfi, Alan Parrish and R. Clark Lantz. (2000). Sodium Arsenite Enhances AR-1 and NF- κ B DNA Binding AND Induces Stress Protein Expression in Precision-Cut Rat Lung Slices. Department of Cell Biology and Anatomy and College of Pharmacy.

Jessen-Eller, K., Picozza, E. and Crivello, J.F. (1994) Quantitation of metallothionein mRNA by RT-PCR and chemiluminescence. *Biotechniques* 17 (5): 962-973.

Joel L. Schwartz, (2000). *BIOMARKERS AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHEMOPREVENTION OF ORAL CARCINOGENESIS*. Howard University, College of Dentistry, Department of Oral Maxillofacial Pathology, Washington.

Johan G.E.A. Bierkens (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. Flemish Institute for Technological Research VITO. Boeretang 200,2400 Mol,Belgium.

Jacobs M, Andersen JB, Kontinen V, Sarvas M. (1993). The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated in vivo by Hsp70.Mol. Cell Biol. 13:5427–38

John W. Bauman, Jie Liu and Curtis D., Klaassen. (1993). Production of metallothionein and Heat Shock Proteins in response to metals.Fundam.Appl. Toxicol.21, 15-22.

Jones TS, Liang AP, Kilbourne EM, et al. (1982). Morbidity and mortality associated with the July 1980 heat wave in St Louis and Kansas City, Mo. JAMA 247: 3327–3331.

Jöötelö M and Wissing D.(1993). Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection.J Exp Med 177: 231–236.

Jungmann, J., Reins, H-A., Schobert, C., Jentsch, S., (1993).Resistance to canmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis.Nature 361,369-371.

Juvirich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. (1992).Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. Science 255: 1243-1245.

Kägi,J.H.R., H.-J. Hapke. (1984). Biochemical interactions of mercury, cadmium and lead, in: J.O. Nriagu (Ed.), Changing Metal Cycles and Human Health, Dahlem Konferenzen, Springer, Berlin, pp. 237-250.

Kar Chowdhuri, D., Saxena, D.K. and Viswanathan, P.X., (1999) Effect of hexachlorohexane (HCH), its isomers and metabolites on Hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63, 15-25.

Karin M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, J.Biol.Chem 270:16483-16486.

Karin M.Len Z.-G. And Zandi E. (1997).AP-1 function and regulation.Curr.,Opn., Biol 9:240-246.

Karlseder J, Wissing D, Holzer G, Orel L, Sliutz G, et al. (1996). Hsp70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest.Biochem. Biophys. Res. Commun.220:153–59

Karunanithi S, Barclay JW, Brown IR, Robertson RM, Atwood AL. (2002). Enhancement of presynaptic performance in transgenic *Drosophila* overexpressing heat shock protein Hsp70. *Synapse* 44:8–14.

Kerr, J.F.R., Winterford , C.M., and Harmon , B.V., (1994). Apoptosis significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73, 2013-2026.

Kerr, J.F.R.,Wyllie,A.H.,and Currie, A.R. (1972).Apoptosis: a basic biological Phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*,26,239-257.

Keyse, S.M., L.A. Applegate, Y. Tromvoukis, R.M. Tyrrell, (1990). Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* 10, 4967-4969.

Keyse, S.M. R.M. Tyrrell, (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 99-103.

Khan NA, Sotelo J. (1989). Heat shock stress is deleterious to CNS cultured neurons microinjected with anti-HSP70 antibodies. *Biol. Cell* 65:199-202

Khazaeli, A.A., Tatar, M., Pletcher, S.D. & Curtsinger, J.W. (1997). Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *J. Gerontol.*, 52A, B48-B52.

Kiang, J.G., and Tsokos, G.C., (1998). Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacological Ther.* Vol. 80, (2): 183-201

Kilemade, M.F., Mothersill, C. (2000). *Environ Tox Chem*, 19, 2093-2099.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B. Schilling TF. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.

Klaassen, C.D. and Stacey, N.H. (1987). Metals, hepatocytes and toxicology. In the *Isolated Hepatocyte: Use in Toxicology and Xenobiotic Biotransformation* (E.J. Rauckman and G.M. Padilla, Eds), pp.159-187. Academic Press, New York.

Köhler, H.R. & Eckwert, H. (1997). The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure. 2. Joint toxicity and transfer to field situations. *Ecotoxicology*, 6, 263-274.

Köhler, H.R., Belitz, B., Eckwert, H., Adam, R., Rahman, B. & Tronteli, P. (1998). Validation of hsp70 stress gene expression as a marker of metal effects in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata): correlation with demographic parameters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 2246-2253.

Köhler, H.R., Tribskorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P. & Alberti, G. (1992). The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 334-338.

Köhler, H.R., Zanger, M., Eckwert, H. & Einfeldt, I. (2000). Selection favours low Hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.*, 13, 569-582.

Köhler, H.R., C. Knodler, M. Zanger. (1999). Divergent Kinetics of the hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, HCH, PCP): suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 179-185.

Koishi M, Hosokawa N, Sato M, Nakai A, Hirayoshi K, et al. (1992). Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Jpn. J. Cancer Res.* 83:1216-22.

Kojimo, T., S. Tsuda, Y. Shirasu. **(1992)**. Noncholinergic mechanisms underlying the acute lethal effects of P=S type organophosphorus insecticides in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 54(3):529-533.

Kontogeorgos G. Kovacs **K**, Asa SL. **(1995)**. Heat-Shock-stress-response proteins in Endocrine Pathology. *Endocr Pathol* 6: 3-11.

Kohan, K.G. and Morgan, W.A., **(2005)**. Are stress proteins in bacteria suitable biomarker for biomonitoring of environmental pollution? (MSc Project, University of East London, UK).

Kosnett.M.J., **(2007)**. Heavy metal intoxication and chelators, in: B.G. Katzung (Ed.), *Basic and Clinical Pharmacology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, pp. 945-957.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A., **(2003)**. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51, 69-75.

Krebs RA, Feder ME. **(1997)**. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperones* 2:60–71

Krebs RA, Feder ME. **(1998)**. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: How much is enough and when is more too much? *J. Insect Physiol.*44:1091–1101

Krebs, R. A. and B. R. Bettencourt. **(1999)**. Evolution of thermotolerance and variation in the heat shock protein, Hsp70. *Amer. Zool.* 39:910-919.

Kregel KC, Tipton CM, and Seals DR.**(1990)**. Thermal adjustments to nonexertional heat stress in mature and senescent Fischer344 rats. *J Appl Physiol* 68: 1337–1342.

Kregel KC. **(2002)**.Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance.*J Appl Physiol* 92:2177–2186.

Kretz-Remy, C., Arrigo, A.-P., **(1994)**. The kinetics of HIV-I long terminal repeat transcriptional activation resembles those of hsp 70 promoter in heat-shock treated HeLa cells. *FEBS Lett.* 351, 191-196.

Kristensen, T.N., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. **(2002)**. Inbreeding affects Hsp70 expression in two species of *Drosophila* even at benign temperatures. *Evol. Ecol. Res.*, 4, 1209-1216.

Kultz, D. (1996). Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat-shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells.*American Journal of Physiology. Cell Physiology* 40, C1181-93.

Kurelec, B. **(1992)** The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22(1): 23-43.

Kutskova IUA, Mamon LA. **(1996)**. Consequences of exposure to extreme conditions in somatic cells of *Drosophila melanogaster* under conditions of disturbed synthesis of heat shock proteins.*Genetika* 32:1406–16

Kwak, HJ, Jun, CD., Pac, HO., Yoo, JC., Choi, BM., Na, YG., Park, RK., Chung, HT., Park, WY., Seo, JS.,**(1998)**. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control,

differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol* 187: 1-12.

Lacroix, A., and Hontela, A., (2003). A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquatic Toxicology* 67: 13-21.

Lakhotia SC, Prasanth KV.(2002).Tissue- and development specific induction and turnover of hsp70 transcripts from loci 87A and 87C after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 205:345–358.

Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* 109:7–15

Lang L, Miskovic D, Fernando P, Heikkila JJ. (1999). Spatial pattern of constitutive and heat shock-induced expression of the small heat shock protein gene family hsp30, in *Xenopus laevis* tailbud embryos. *Dev Genet.* 25(4): 365-374.

Lansing, E., Justesen, J. & Loeschke, V. (2000). Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Thermal Biol.*, 25, 443-450.

Lau S, Patnaik N, Sayen MR, Mestril R. (1997). Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation* 96:2287–94

Lauter, N. & Doebley, J. (2002). Genetic variation for phenotypically invariant traits detected in teosinte: implications for the evolution of novel forms. *Genetics*, 160, 333-342.

Lauwerys R. (1991). Occupational Toxicology. In: Casarett and Doulls Toxicology. The basic Science of Poisons.40 ed. Eds. M Amdur, J Doull, C Klaassen. Pergamon, New York.

Lauwerys RR. (1993). Introduction. In: Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. 20 ed. Ed. RR Lauwerys, P Hoet. Lewis, USA, pp. 1-13.

Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J. (1993). Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J. Biol. Chem.* 268:3420–29

Lazaris, A.C., Chatzigianni, E.B., Panoussopoulos, D., Tzimas, G.N., Davaris, P.S., Golematis, B.C. (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res. Treat.* 43:43-51.

Lee JH, Hubel A, Schoffl F. (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* 8:603–12

Lee JH, Schoffl F. (1996). An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Gen. Genet.* 252:11–19

- Lee YJ, Curetty L, Hou ZZ, Kim SH, Kim JH, Corry PM. (1992). Effect of pH on quercetin-induced suppression of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1121–28.
- Lee YJ, Kim D, Hou ZZ, Curetty L, Borrelli MJ, Corry PM. (1993). Alteration of heat sensitivity by introduction of hsp70 or anti-hsp70 in CHO cells. *J. Therm.Biol.* 18:229–36
- Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T., and Williams, L.T., (1997). Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94,13642–647.
- Lee, R.E. & Denlinger, D.L. (1991). *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York.
- Lenardo M.J. and Baltimore, D. (1989). NF κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control, *Cell* 58:227-229.
- Lennon, s.v., Martin, S.J., Cotter, T.J., (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24 :203-214.
- Leppä S, Sistonen L. (1997). Heat Shock response - Pathophysiological implications. *Ann Med* 29:73-78.
- Lewis, S., May, S., Donkin, M.E. and Depledge, M.H.(1998).The influence of copper and heatshock on the physiology and cellular stress response of *Enteromorpha intestinalis*.*Marine Environmental Research* 46, 421-425.
- Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL, Lee WM. (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 88:1681–85.
- Li GC, Nussenzweig A. (1996).Thermotolerance and heat shock proteins: Possible involvement of ku autoantigen in regulating Hsp70 expression.In: Feige U, Morimoto RI,Yahara I, Polla BS, editors. *Stress Inducible Cellular Responses*.Basel: Birkhäuser, pp 121–137.
- Li GC. (1985). Elevated levels of 70,000-dalton heat shock protein in transiently thermotolerant Chinese hamster fibroblasts and in their stable heat-resistant variants. *Int J Radiat Oncol BiolPhys* 11: 165–177.
- Lin, G.R., Weng, C.F., Wang, J.I., and Hwang, P.P., (1999). Effects of cortisol on ion regulation in developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae on seawater adaptation. *Physiological and Biochemical Zoology* 72, (4): 397-404.
- Lindquist S. The heat shock response. (1986).*Annu Rev Biochem* 55:1151–1191.
- Lindquist, S. (1993). Autoregulation of the heat-shock response. In *Translational Regulation of Gene Expression 2* (J. Ilan, Ed.), pp. 279–320. Plenum Press, New York.
- Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins.*Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677

Liou SN, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC. (1997). Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 158:5668-75

Lippman SM, Heyman RA, Kurie JM, Brenner SE, Hong WK (1995). Retinoids and chemoprevention. Clinical and basic studies. *J Clin Oncol* 22(Suppl):851-873.

Lis, J., Wu, C., (1993). Protein traffic on the heat-shock promoter: parking, stalling and trucking along. *Cell* 74,1-4.

Lithgow GJ, Kirkwood TB. (1996). Mechanisms and evolution of aging. *Science* 73: 80s.

Liu, X., Zou, C., Slaughter, C., and Wang, X., (1997). DFF, a heteromeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89, 175-184.

Liu RY, Li X, Li L, Li GC. (1992). Expression of human hsp70 in rat fibroblasts enhances cell survival and facilitates recovery from translational and transcriptional inhibition following heat shock. *Cancer Res.* 52:3667-73

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-157.

Loeschcke, V., Krebs, R.A. & Barker, J.S.F. (1994). Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*. *Biol. J. Linnean Soc.*, 52, 83-92.

Lofroth, G. and Ames, B. N. (1978). Mutagenicity of inorganic compounds in *Salmonella typhimurium*: arsenic, chromium and selenium. *Mutat, Res.* 53:65-66.

Love S and King RJB. (1994). A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 69: 743-748.

Lukacs KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. (1993). Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J. Exp. Med.* 178:343-48

Lukacs KV, Nakakes A, Atkins CJ, Lowrie DB, Colston MJ. (1997). In vivo gene therapy of malignant tumours with heat shock protein-65 gene. *Gene Ther.* 4:346-50

Lundebye, A.-K., Langston, W.J. and Depledge, M.H. (1996). Stress proteins and condition index as biomarkers of tributyltin exposure and effect in mussels. *Ecotoxicology* 5, 1-10.

Luning K.G., (1966). *Drosophila* test in pharmacology. *Nature* 209, 84-86.

Lynn S., Gurr, J.-R. Lai, H.-T., and Jan K.-Y. (2000). NAD(P)H oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 86:514-519.

Lynn S., Lai, H.T., Gurr, J.R., and Jan K.Y. (1997). Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* 12:353-358.

Macario AJL, Lange L, Ahring BK, De Macaraio EYC. (1999). Stress genes and proteins in the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 923-967.

Macnair, M.(1997).The evolution of plants in metal-contaminated environments. In: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution* (Eds Bijlsma, R. & Loeschcke, V.). Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 4-24.

Mailhos C, Howard MK, Latchman DS. (1994). Heat shock proteins hsp90 and hsp70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death. *J. Neurochem.* 63:1787-95

Majewski, M.S. and P.D. Capel. (1995). *Pesticides in the atmosphere: Distribution, trends, and governing factors.* Chelsea, MI: Ann Arbor Press, Inc. Pp.78-80.

Mamon LA, Kutsikova YA. (1993).The role of the heat-shock proteins in recovery of high temperature induced damages of mitotic chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetika* 29:604-12

Marber MS, Latchman DS, Walker JM, yellon DM. (1993). Cardiac stress protein elevation 24h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264-1272.

Marber MS, Mestril R, Chi S-H, Sayen R, Yellon YM, and Dillman WH.(1995). Overexpression of the rat inducible 70-kDa heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95: 1446-1456.

Marschner H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edn. London: Academic Press.

Martin E. Feder. (1999).Organismal, Ecological, and Evolutionary Aspects of Heat-Shock Proteins and the Stress Response: Established Conclusions and Unresolved Issues. *AMER. ZOOL.*, 39:857-864.

Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. (1997).Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96:4343-48

Marty GD, Nunez JM, Lauren DJ, Hinton DE. (1990). Age-dependent changes in toxicity of N-nitroso compounds to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Aquat*

Matin, M.A., K. Husain, and S.N. Khan. (1990).Modification of diazinon-induced changes in carbohydrate metabolism by adrenalectomy in rats.*Biochem. Pharmacol.* 30:1781-1786.

Matz, J.M., Lavoie K.P., Epstein, P.N. & Blake, M.J. (1996a). Thermoregulatory and heat-shock protein response deficits in cold-exposed diabetic mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 39, R525-R532.

Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmer, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C. and Rattner, B.A. (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. In: R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. and H.L. Bergman (eds): *Biomarkers - Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 5-85.

McCarthy, J.F. and Shugart, L.R. (1990) Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

MCGuire WL, Dressler LG, Sledge GW, et al.(1986). An estrogen- regulated protein in normal and malignant endometrium. *J Steroid Biochem* 24:155-159.

McMichael AI (1994). "Molecular epidemiology": a new pathway or new traveling companion. *Am J Epidemiol* 140:1-11.

Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP.(1995). Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J. Immunol.* 154:363–74.

Mestrl R, Chi SH, Sayen MR, O'Reilly K, Dillmann WH.(1994). Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J. Clin. Invest.* 93:759–767

Mestrl R, Giordano FJ, CondeAG, Dillmann WH. (1996). Adenovirus-mediated gene transfer of a heat shock protein 70(hsp 70i) protects against simulated ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:2351–58

Mestrl, R., Chi, S.-H., Sayen, R. and Dillman, W. H. (1994). Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein, HSP70 gene and its expression during ischemia/hypoxia and heat shock. *Biochemical Journal* 298, 561-9.

Meyer, U., Schweim, P., Fracella, F., Rensing, L., (1995). Close correlation between heat-shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 979-984.

Meyskens FL (1992). Biomarker intermediate endpoints and cancer prevention. *J Natl Cancer Inst Mongr* 13:1 77-181.

Mine, M., Okumura, Y., Ichimaru, M., Nakamura, T. & Kondo, S. (1990). Apparently beneficial effects of low to intermediate doses of A-bomb radiation on human lifespan. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 1035-1043.

Minois, N. (2000). Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology*, 1, 15-29.

Minowada G, Welch WJ. (1995). Clinical implications of the stress response. *J Clin Investig* 95: 3–12.

Mitchell-Olds, T. & Knight, C.A. (2002). Evolution: chaperones as buffering agents. *Science*, 296, 2348-2349.

Mizzen, L.A., Welch, W.J., (1998). Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.* 106, 1105-1116.

Monnet-Tschudi, F M.G. Zurich, C. Boschat, A. Corbaz, P. Honegger. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases, *Rev. Environ. Health* 21, 105-117.

Moore, M.N., Kohler, A., Lowe, D.M. and Simpson, M.G. (1994) An integrated approach to cellular biomarkers in fish. In: M.C. Fossi and C. Leonzio (eds): *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 171-197.

Morgan AJ, Morgan JE, Turner M, Winters C, and Yarwood A. (1993). Metal relationship of earthworms. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, ed Dallinger R, Rainbow PS. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 333–358.

Morimoto RI, Tissières A, and Georgopoulos C. (1994). *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Morimoto, R. I., Tissières, A., and Georgopoulos, C. (1994). *Heat Shock Proteins: Structure, Function and Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Morimoto, R.I., Jolly, C., Satyal, S., Mathew, A., Shi, Y. & Kitagawa, K. (1999). Molecular chaperones and the heat shock response. *Br. J. Cancer*, 80, S18.

Morimoto, R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990). In "Stress Proteins in Biology and Medicine ", R.I., Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos, Eds Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, pp: 1-36, p.450.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17:5317–27

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 20:7146-59.

Mosser, D.D., N.G. Theodorakis, R.I. Morimoto (1988). Coordinate changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells, *Mol. Cells, Mol. Cell. Biol.* 8, 4736-4744.

Mothersill, C., Lyng, F., Lyons, M., Cottell, D. J. (1995). *Fish Biol* 46, 1011-1025.

Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit selfassembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U SA* 97: 7841–7846.

Muchowski, I., Nazir, A., Mahmood, K., Saxena, D.K., Das, M., Khanna, S.K. and Kar Chowdiuri D. (2002), Toxicity of argemone oil: effect on hsp70 expression and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ)Bg⁹. *Cell Biology and Toxicology*, 18, 1-11.

Mueller WEG, Koziol C, Kurelec B, Dapper J, Batel R, Rinkevich B. (1995). Combinatory effects of temperature stress and nonionic organic pollutants on stress protein (hsp70) gene expression in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:1203–1208

Mukhopadhyay I, Saxena DK, Kar Chowdhuri D. (2002b). Toxicity of cypermethrin: hsp70 as a biomarker of response in transgenic *Drosophila*. *Biomarkers* 7: 501-510.

Mukhopadhyay, I., A. Nazir, K. Mahmood, D.K. Saxena, M. Das, S.K. Khanna, D. Kar Chowdhuri. (2002). Toxicity of argemone oil: effect on hsp70 expression and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg⁹. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 1-11.

Mukhtar H, Das M, Del Tito BJ, Bickers DR (1984). Protection against 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenesis in BALB/C mice by ellagic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 119:751-757.

Muller M, Gauley J, Heikkila JJ. (2004). Hydrogen peroxide induces heat shock protein and Waisberg, M., P. Joseph, B. Hale, D. Beyersman. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology* 192, 95-117.

Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Maller E, Meier T, Wilmanns W. (1995). A stress-inducible 72-kDAA heat shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumors but not in normal cells. *Int J Cancer* 61: 272-279.

Murata, M., P. Gong, K. Suzuki, S. Koizumi (1999). Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes, *J. Cell. Physiol.* 180, 105-113.

Mineau, P., (1998). Biomarkers: are there linkages to ecological effects? in: J.J. Cech Jr., B.W. Wilson, D.G. Crosby (Eds.), *Multiple Stresses in Ecosystems*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, PP.91-99.

Nadeau D, Corneau S, Plante I, Morrow G, Tanguay RM. (2001). Evaluation for Hsp70 as a biomarkers of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones* 6:153-163.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

Nakano M, Mann DL, Knowlton AA. (1997). Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. *Circulation* 95:1523-31

Nakata N, Kato H, Kogure K. (1993). Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. *NeuroReport* 4:695-98

Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T. (1998). Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev.* 22:549-55.

Nazir A., Mukhopadhyay I., Saxena, D.K and Kar Chowdhuri D. (2001). Chlorpyrifos induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ) Bg⁹. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 443-449.

Nepple, B.B. and Bachofen, R. (1997). Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiology Letters* 153, 173-80

Neumann D, Lichtenberger O, Gunther D, Tschiersch K, Nover L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360-367.

- Niedzwiecki, A., Kongpachith, A.M. & Fleming, J.E. (1991). Aging affects expression of 70 kDa heat shock protein in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 266, 9332-9338.
- Njemini R, Lambert M, Demanet C, Kooijman R, Mets T. (2007). Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging. *Biogerontology*. 8(3): 353-364.
- Norry F.M. & Loeschcke, V. (2002). Temperature-induced shifts in associations of longevity with body size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 56, 299-306.
- Norry F.M. & Loeschcke, V. (2003). Heat-induced expression of a molecular chaperone decreases by selecting for long-lived individuals. *Exp. Gerontol.*, 38, 673-681.
- Nover L. (1984). *Heat Shock Response of Eukaryotic Cells*. Berlin: Springer.
- Nover L.(1991).*The Heat Shock Response*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 5–344.
- Nover, L., (1991).*Heat-shock Response*,CRC Press, Boca Raton, p.50
- Nowak TS Jr, Bond U, Schlesinger MJ. (1990). Heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia. *J Neurochem*. 54(2): 451-458.
- Odukoya O, Shklar G (1982). Two phases of carcinogenesis in hamster buccal pouch. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 54:547-552.
- Oestereich W, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osbourne CK, and Fuqua SAW(1993). The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 53:4443-4448.
- Oh S., Iwahori, A., Kato, S. (1993). Human cDNA encoding DnaJ protein homologue *Biochim. Biophys. Acta* 1174, 114-116.
- Ohyama, H., Yamada, T, Ohkawa, A., Watanabe, I. (1985).Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. *Radiat Res*.1985 101:123-30.
- Page DL (1994). The epidemiology of tumor markers in breast cancer management: prognostic markers.*Cancer Epidemiol Biomark & Prev* 3:101-104
- Palleros DR, Welch WJ, Fink AL. (1991). Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 5719-5723.
- Panniers, R.(1994).Translational control during heat-shock. *Biochimie* 76,737-747.
- Parrish ,A.R.Zheng X.H., Turney, k.d. Younis, H.S. and Gandolfi, A.J. (1999).Enhanced transcription factor DNA-binding and gene expression induced by arsenate in renal slices.*Toxicol.Sei* 50:98-105
- Parsell DA, Lindquist S.(1996).Heat Shock proteins and stress tolerance. In: Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla, BS editors. *Stress Inducible Cellular Responses*. Basel:

Parsell, D.A. & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27, 437-496.

Parsell, D.A. & Lindquist, S. (1994). Heat shock proteins and stress tolerance. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (eds Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 457-494.

Parsons, P.A. (2000). Hormesis: an adaptive expectation with emphasis on ionizing radiation. *J. Appl. Toxicol.*, 20, 103-112.

Peakall D., (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators* Chapman & Hall, London.
Pedersen SN, Lundebye AK, Depledge MH.(1997). Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat Toxicol* 37:183–200.

Pelgrom, S.M.G.J., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M, and Wendelaar Bonga, S.E., (1995). Effects of combined waterborne Cd and Cu exposure on ionic composition and plasma cortisol in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 111C: 227-235.

PinderLCV.(1986).Biology of fresh water Chironomidae. *Ann.Rev.Entomol.*31:1-23.

Pinhasi-Kihmi O, Michalowitz D, Ben-Zeen A, and Oren M. (1986). Specific interactions between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature* 320: 182-185.

Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC.(2002). Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma* 52: 611–617.

Plumier JC, Krueger AM, Currie RW, Kontoyiannis D, Kollias G, Pagoulatos GN. (1997). Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* 2:162–167

Plumier JC, Ross BM, CurrieRW, Angelidis CE, Kazlaris H, et al. (1995). Transgenic mice expression of the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin.Invest.* 95:1854–1869

Pockley, A.G. (2003). Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 362, 469-476

Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C, and Cossarizza A. (1996). Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6458–6463.

Pope, C.A. III, (1996). Adverse health effects of air pollution in a nonsmoking population, *Toxicology* 111, 149-155

Prahalad,A.K J.A. Ross, G.B. Nelson, B.C. Roop, L.C. King, S. Nesnow, M.J. Mass, (1997). Dibenzo [a,l] pyrene induced DNA adduction, tumorigenicity, and Ki-ras oncogene mutations in stain A/J mouse lung, *Carcinogenesis* 18, 1955-1963.

Pratt WB.(1990) Interaction of hsp90 with steroid receptors: organising some diverse observations and presentation of the newest concepts. *MolCell Endocrinol* 74: C69-C76.

Prentø P.(1987). Distribution of 20 enzymes in the mid-gut region of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., with particular emphasis on the physiological role of the chloragoc tissue. *Comp Biochem Physiol.*87A:135–142.

Prentø P.(1994).Uptake and long-time storage of natural and synthetic dyes by earthworm chloragocytes: in vivo and in vitro investigations. *Comp Biochem Physiol.* 109A:805–816.

Prescott G.J., G.R. Cohen, R.A. Elton, F.G. Fowkes, R.M. Agius, (1998). Urban air pollution and cardiopulmonary ill health: a 14.5 year time series study, *Occup. Environ. Med.* 55, 697-704.

Puy LA, LO Castro G, Olcese JE, et al. (1989)Analysis of a 24kDa protein in the human uterine cervix during abnormal growth. *Cancer* 64: 1067-1073.

Pyza E, Mak P, Kramarz P, Laskowski R. (1997). Heat-shock proteins (Hsp70) as biomarkers in ecotoxicological studies.*Ecotoxicol. Environ. Safety* 38:244–251

Queitsch, C., Sangster, T.A. & Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417, 618-624.

Radlowska M, Pemp K, Owiak J. (2002). Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ Int* 27: 605-608.

Rattan, S.I.S. (1998). Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45, 753-760.

Raynal, N.J., Hontela, A., and Jumarie, C., (2005). Cadmium uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout and yellow perch. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140: 374-382.

Reed, JC.(1997).Bcl-2 family proteins: Role in dysregulation of apoptosis and chemoresistance in cancer, In apoptosis and cancer (Martin, SJ., Ed.) Karger Landes System, Basel.

Reed, R.H. and Moffat, L.(1983). Copper toxicity and copper tolerance in *Enteromorpha compressa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 69, 85-103.

Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ.(1988). Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242:433–36

Rie Uenishi, Pengfei Gong ,Kaoru Suzuki, Shinji Koizumi (2006) Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways.Department of Health Effects Research, National Institute of Industrial Health, 6-21-1,Nagao, Tama-ku, Kawasaki 214-8585,Japan.

Ritossa F. (1962).A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*; *Experientia.* 18: 571.573

Roberts, S.P. & Feder, M.E. (1999). Natural hyperthermia and expression of the heat shock protein Hsp70 affect developmental abnormalities in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*, 121, 323-329.

- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. (1993). Plant metallothioneins. *Biochemical Journal* 295, 1-10.
- Rocket JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 65:229–239.
- Rodriguez E, Sreekantaiah C, Chaganti RSK (1994). Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res* 54:3398-3406.
- Rollet E, Lavoie JN, Landry J, Tanguay RM. (1992). Expression of *Drosophila*'s 27 kDa heat shock protein into rodent cells confers thermal resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:116–20
- Rossmann T.G., Stonem D., Molina M. and Troll, W. (1980). Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.* 2:371-379.
- Roth DA, Taylor HE, Domagalski J, et al. (2001). Distribution of inorganic mercury in Sacramento River water suspended colloidal sediment material. *Arch Environ Contam*
- Rothman N, Stewart WF, Schulte PA (1995). Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer Epidemiol Biomark & Prev* 4:301-311.
- Rowley, B., M. Monestier (2005). Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity, *Mol. Immunol.* 42, 833-838.
- Rude, C, P. Markers, and M. Døssing. (1984). Pulmonary oedema following absorption of an insecticide, brought over the counter, through the skin. *Ugeskr Laeger* 146:2400-2401.
- Rudiger S, Buchberger A, Bukau B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* 4: 342-349.
- Ruight, G.S.F. (1985), Pyrethroids. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 12., edited by G.A. Kerkut and L. I. Gilbert (New York: Pergamon Press), pp.183-262.
- Rutherford, S.L., Zuker, C.S., (1994). Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* 79,1129-1132.
- Rutherford, S.L. & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396, 336.
- Rutherford, S.L. (2003). Between genotype and phenotype: Protein chaperones and evolvability. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 263-274.
- Ryan JA, Hightower LE. (1996). Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. See Ref. 9, pp.411–424
- Ryan, J.A. and Hightower, L.E. (1994) Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(8): 1231-1240

Sainis, I., Angelidis, C., Pagoulatos, G., Lazaridis I. (1994). The hsc70 gene which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family FEBS Letters 355: 282-286.

Salt DE, Kato N, Kramer U, Smith R D, Raskin I. (2000). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: Terry N, Banuelos G, eds. Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC, 189-200.

Salt DE, Smith R D, Raskin I. (1998). Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49, 643-668.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.(editors). (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 18.47-18.75.

Samet, J.M., F. Dominici, F.C. Curriero, I. Coursac, S.L. Zeger, (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987-1994, N.Engl. J. Med. 343, 1742-1749.
shock transcription factor in vivo. EMBO J. 16:2452-62

Sandeep K. Sharma, Pierre Goloubinoff, Philipp Christen.(2008).Biochemical and Biophysical Research Communications (372),341-345.

Sanders, B. (1990) Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (eds): Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp165-192.

Sanders, B.M. & Dyer, S.D. (1994). Cellular stress-response. Environ. Toxicol. Chem., 13, 1209-1210

Sanders, B.M., (1993).Stress-proteins in aquatic organisms:An environmental perspective.Crit.Rev.Toxicol.23,49-75.

Sanders, B.M., Martin, L.S., Howe, S.R., Nelson, W.G., Hegre, E.S., Phelps, D.K. (1994). Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. Toxicol. Appl. Pharmacol. 125, 206-213.

Sanders, B.M., Martin, L.S.,(1993).Stress-proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples.Science Total Environ.139/140,459-470.

Santoro MG, Garaci E, Amici C. (1989). Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8407-8411.

Sato K, Saito H, Matsuki N. (1996).HSP70 is essential to the neuroprotective effect of heat-shock. Brain Res. 740:117-23.

Sato, H.,Ishii,T.,Sugita,Y.,Tateishi,N.,Bannai,S.,(1993).Induction of a 23 kDa stress-protein by oxidative and sulfhydryl-reactive agents in mouse peritoneal macrophages.Biochem.Biophys.Acta 1148,127-132

Schat H, Llugany M, Bernhard R. (2000). Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. In: Terry N, Banuelos G, eds. Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC, 171-188.

Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E. (1994). An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* 6:1899–909.

Schlesinger MJ.(1990).Heat shock proteins (Minireview).*J Biol Chem.*265:12111–12114

Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A. (1982).Heat Shock: From Bacteria to Man. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Schlesinger MJ. (1986).Heat shock proteins: The search for functions.*J Cell Biol* 103:321–325.

Schroder HC, Batel R, Hassanein HM, Lauenroth S, Jenke H, Simat T, Steinhart H, Muller WE.(2000). Correlation between the level of potential biomarker, heat shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*:A field study in the North Sea and English Channel.*Mar Environ Res* 49:201–215

Schwartz IL (1993a). The clinical control of tumor cell growth through the action of carotenoids, retinoids,and tocopherols. In: Symposium on adjuvants and cancer treatment. Quillan P, Williams SM, editors.Arlington Heights, IL: Cancer Research Foundation,pp. 173-233.

Schwartz IL (1993b). In vitro biological methods for determination of carotenoid activity. *Meth Enzymol* 214:226-256.

Schwartz IL (1996b). The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effect on tumor cell growth. *J Nutr* 126(Suppl): 1221 S-1227S.

Schwartz IL (1999). Nutrition and head and neck and lung cancers. In: Nutrition oncology. Heber D, Ho K, editors. New York: Plenum Press, pp. 421-445.

Schwartz JL (1994). Molecular and biochemical control of tumor growth following treatment with carotenoids or tocopherols. In: Nutrition and cancer prevention and treatment. Prasad K, Santamaria RM, editors. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 287-316.

Schwartz JL (1996a). The inhibition of oral carcinogenesis through the induction of programmed cell death (abstract). *Cancer Res* 56:631a.

Schwartz JL, Antoniadis DZ, Zhao S (1992a). Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of antioxidants and prooxidants.*NY Acad Sci* 1228:262-279.

Schwartz JL, Tanaka I, Khanadkar V, Herman TS, Teicher BA (1992b). 3-carotene and/or vitamin E as modulators of alkylating agents in SCC-25 human squamous carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 29:207-213.

Scott R. Blechinger, James T. Warren, Jr.,John Y. Kuwada and Patrick H. Krone, (2002).Developmental Toxicology of Cadmium in Living Embryos of a Stable Transgenic Zebrafish Line. Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of Michigan ,USA.

Selvakumar, S., Geraldine, P. (2003). Thermal modulation of pyruvate metabolism in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* : the role of lactate dehydrogenase. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 149-157.

Selvakumar, S.,P. Geraldine, S.Shanju and T. Jayakumar. (2000). Stressor- specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcoimsonii* (H. Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. Department of Animal Science, Bharathidasan Yniversity.

Semenza JC, Rubin CH, Falter KH, Selanikio JD, Flanders WD, Howe HL, and Wilhelm JL. (1996). Heat-related deaths during the July 1995 heat wave in Chicago. *N Engl J Med* 335: 84–90.

Seymour L, Bezwoda WR, Meyer K. (1990). Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of p24 predicts for response to treatment and duration of survival. *Cancer* 66:2390-2394.

Sherman, M.Y. & Goldberg, A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29, 15-32.

Sherrer LC, Dalman FC, Massa E, et al. (1990). Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex. *J Biol Chem* 265: 21397-21400.

Shi, Y. & Thomas, J.O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2186-2192.

Shin DM, Hittelman WN, Hong WK (1994a). Biomarkers in upper aerodigestive tract tumorigenesis: a review. *Cancer Epidemiol Biomark & Prev* 3:687-709.

Silbergeld EK, Davis DL. (1994). Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem* 40 (7), 1363-1367.

Singh S, Poulson R, Wright NA, Sheppard MC, Langman MJS. (1997). Differential expression of oestrogen receptor and oestrogen inducible genes in gastric mucosa and cancer. *Gut* 40: 516-520.

Slavotinek, A.M. & Biesecker, L.G. (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet.*, 17, 528-535.

Snoeckx, L.H.E.H. Cornelussen, R.N., van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S. & van der Vusse, G.J. (2001). Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 81, 1461-1497.

Soimasuo MR, Werner I, Villalobos A., Hinton DE. (2001). Cytochrome P450 1A1 and stress protein induction in early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to trichloroethylene (TCE) soot and different fractions. *Biomarkers* 6(2):133–45.

Solomon JM, Rossi JM, Golic K, Mc-Garry T, Lindquist S. (1991). Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heat-Annu. *Rev. Physiol.* 1999.61:243-282

Somero, G. N. (1995). Proteins and temperature. *Ann.Rev. Physiol.* 57:43-68.

Sorensen, J.G. & Loeschcke, V. (2001). Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J. Insect Physiol.*, 47, 1301-1307.

Sorensen, J.G. & Loeschcke, V.(2002a). Decreased heat-shock resistance and down-regulation of Hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*.*Funct. Ecol.*, 16,379-384.

Sorensen, J.G., Dahlgaard, J. & Loeschcke, V. (2001). Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Funct. Ecol.*, 15, 289-296.

Sorensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J. & Loeschcke, V. (1999). Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas*, 131, 155-164.

Söti C, Csermely P. (2002). Chaperones come of age. *Cell Stress Chaperones* 7: 186–190.

Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A, Hartmann A. (1996). Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol Lett* 88: 91–98

Spellman, F.R., (1998). The science of water: Concepts and applications. *Technomic Publishers Co. Inc.*, p. 157-206.

Stege GJ, Kampinga HH, Konings AW.(1995). Heat-induced intranuclear protein aggregation and thermal radiosensitization.*Int. J. Radiat. Biol.* 67:203–9.

South African rivers. *Water Research Commission; Report no. 428/1/99.*

Stieb,D.M., S. Judek, R.T. Burnett, (2002). Meta-analysis of time-series studies of air pollution and mortality: effects of gases and particles and the influence of cause of death, age, and season, *J. Air Waste Manage. Assoc.* 52, 470-484.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. and Van Veld, P.A. (1992) Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. In: R.J. Huggett, R.A. Kimerie, P.M. Mehrle, Jr. and H.L. Bergman (eds): *Bio-markers - Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp235-335.

Steinert, S.A. and Pickwell, G.V.(1993). Induction of HSP70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. *Marine Environmental Research* 35, 89-93.

Stringham, E.G. and Candido, E.P.M. (1994).Transgenic hsp16-lacZ strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress.*En-Studies on biomonitoring methods for ecological risk assessment of chemical substances. In Report of special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan, (1999).*pp 3-10.

Sun, W., V.M.M. & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1577, 1-9.

Stenersen J. (1984).Detoxication of xenobiotics by earthworms (Minireview). *Comp Biochem Physiol.* 78C:249–252.

Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, Ichikawa H, Shirakura R, Matsuda H. (1997). In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat. *J. Clin. Invest.* 99:1645–50.

Swanson GM, Ward AJ (1995). Recruiting minorities into clinical trials: toward a participant-friendly system. *I Natl Cancer Inst* 87:1747-1759.

Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC. (1997). BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* 16:4887-96.

Tatsuya Yoshimi, Kozue Minowa, Natalie K., Karouna- Reñiré, Chiharu Watanabe, Yoshio Sugaya, and Takashi Miura.(2001).Laboratory of Environmental Molecular Physiology, School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science.

Tatar, M., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. (1997). Chaperoning extended life. *Nature*, 390, 30.

Teh SJ, Clark SL, Brown CL, et al. (1999).Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of contaminant exposure and effect in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*). *Biomarkers* 4(6):497–509.

Teicher B, Schwartz IL, Holden SA, Ara G, Northey D (1994). In vivo modulation of several anti-cancer agents by beta-carotene. *Cancer Chemother Pharmacol* 34:235-241.

Terlecky, S.R., Chiang, H.-L., Olson, T.J., Dice, J.F. (1992). Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-KDa heat- shock cognate protein. *J. Biol. Chem.* 267, 9202-9209.

Tetu B, Brisson J, Huot J. (1995).Prognostic significance of heat shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 36:93-97.

Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL. (1995).Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* 20:456–59.

Thomas SR, Lengyel JA. (1986).Ecdysteroid regulated heat shock gene expression during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Biol* 115:434-438.

Tokiwa,H Y. Ohnishi, (1986). Mutagenicity and Carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17, 23-60.

Tomsett AB, Thurman DA. (1988). Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant, Cell and Environment* 11, 383-394.

Trautinger F, Kokesch C, Herbacek I, Knobler RM, Kindas-Mugge I. (1997).Overexpression of the small heat shock protein, hsp27, confers resistance to hyperthermia, but not to oxidative stress and UV-induced cell death, in a stably transfected squamous cell carcinoma cell line. *J. Photochem. Photobiol.* 39B:90–95

Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Muller, E.F., (1997). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior:

are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress. Recov.* 6, 57-73.

Trotter, E.W., Kao, C.M.F., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G.A. & Gray, J.V. (2002). Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 277, 44817-44825.

Tsuboi N, Ishikawa M, Tamura Y, Takayama S, Tobioka H, Matsuura A, Hirayoshi K, Nagata K, Sato N, Kikuchi K. (1994). Monoclonal antibody specifically reacting against 73-kilodalton heat shock cognate protein: possible expression on mammalian cell surface. *Hybridoma* 13: 373-381.

Tursman, D., Duman, J. G., and Knight, C. A. (1994). Freeze tolerance adaptations in the centipede, *Lithobius forficatus*. *J. Exp. Zool.* 268, 347-353.

Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, et al. (2000). Effects of arsenic, cadmium, chromium and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 168: 79-90.

U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1996). Toxicological profile for diazinon. Atlanta, GA, Aug. p.82.

U.S. EPA. Office of Pesticide Programs. Health Effects Div. (1998). Tox Oneliner: Diazinon. Washington, DC, Aug. 10. pp. 23.

U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. (1998). Review of diazinon incident reports. Memo from J. Blondell, Health Effects Div., to T. Leighton, Health Effects Div. p. 49.

Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., and Crosta, G.F., (2005). Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicology in Vitro*.

US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. (2005). "Report on Carcinogens" (11th Ed.,

U.S. EPA. (1999). Quantitative usage analysis for diazinon. Washington, DC, Jan. 29. www.epa.gov/pesticides/op.

U.S. Geological Survey. (1998). Pesticides in storm runoff from agricultural and urban areas in the Tuolumne River basin in the vicinity of Modesto, California. Water Resources Investigations Report 98-4017, National Water Quality Assessment Program. Sacramento, CA. 17 p.

Uney JB, Staley K, Tyers P, Sofroniew MV, Kew JN. (1994). Transfection with hsp70i protects rat dorsal root ganglia neurones and glia from heat stress. *Gene Ther.* 1:S65.

Uney, J.B., Anderton, B.H., Thomas, S.M., (1993). Changes in heat-shock protein 70 and ubiquitin mRNA levels in C1300 N2A mouse neuroblastoma cells following treatment with iron. *J. Neurochem.* 60, 659-665

Ulmasov, H.A., Karaev, K.K., Lyashko, V.N. & Evgenev, M.B. (1993). Heat-shock response in camel (*Camelus dromedarius*) blood-cells and adaptation to hyperthermia. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 106, 867-872.

Vallee B.L., D.D. Ulmer (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead, *Annu. Rev. Biochem.* 41, 91-128.

Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ. (1996). Cancer risk evaluation. In: *Toxicology. Principles and applications*. Ed. RJM Niesink, J de Vries, MA Hollinger. CRC, New York.

Van den Ijssel PR, Overkamp P, Knauf U, Gaestel M, de Jong WW. (1994). Alpha A-crystallin confers cellular thermoresistance. *FEBS Lett.* 355:54–56

Vargas-Roig, L.M., Gago, F.E., Tello, O., Aznar, J.C., and Ciocca, D.R. (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer* 73, 468-475.

Varo I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, Lopez FJ, Navarro JC. (2002). Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: Study of protein Hsp70 as biomarker of sub-lethal stress in fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 42:229–235.

Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, Meplan C, Hainaut P, Polla BS, Weksler B. (2001). Effects of tobacco smoke and benzo(a)pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am J Physiol* 280: H1293–H1300.

Vedel, G.R. and Depledge, M.H. (1995). Stress-70 levels in gills of *Carcinus maenus* exposed to copper. *Marine Pollution Bulletin* 31(1-3), 84-6.

Velazquez, J. M., and Lindquist, S. (1984). Hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmatic storage during recovery. *Cell* 36, 655–662.

Vezyraki, P., Kalfakakou V., and Evangelou A. (2000). Atrial-natriuretic peptide (ANP), Thyroid hormones's relation to plasma and heart calcium and magnesium concentration of wistar rats exposed to cold and hot ambient *Biol Trace Elem Res* 73 (3): 163-173.

Vezyraki, P., Kalfakakou V., Papagiannis, I., and Evangelou A. (1999). Atrial natriuretic peptide (ANP) relation to plasma and heart Zn²⁺ concentrations of wistar rats exposed to cold and hot ambient. *Biol Trace Elem Res* 67 (3): 215-223. 607).

Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., and Iwama, G.K., (1996). Metabolic responses associated with confinement stress in *Tilapia*: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. 116C: 89-95.

- Vile G.F, R.M. Tyrrell, (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet. A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin, *J. Biol. Chem.* 268, 14678-14681.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB. (1996). Biomarkers. In: Principles of Ecotoxicology. Ed. CH Walker, SP Hopkin, RM Sibly y Peakall DB. Taylor and Francis, London, pp. 175-194.
- Walker C.H. and Hopkins, S.P. (2003). Principals of ecotoxicology 2nd. Ed. 23-132.
- Wallner K, Li GC. (1986). Adriamycin resistance, heat resistance and radiation response in Chinese hamster fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 829-833.
- Wang G, Klostergaard J, Khodadadian M, Wu J, Wu TW, et al. (1996). Murine cells transfected with human Hsp27 cDNA resist TNF-induced cytotoxicity. *J. Immunother. Emphasis Tumor. Immunol.* 19:9-20
- Wang K, Spector A. (2000). Alpha-crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat-shock proteins to renature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner. *Eur J. Biochem.* 267(15): 4705-4712.
- Washburn BS, Moreland JJ, Slaughter AM, Werner I, Hinton DE, Sanders BM. (2002). Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 21:557-560.
- Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M. (1997). Dziwanowska Z BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 349:1137-41.
- Wecker, L., R. Mrak, and W.-D. Dettbarn. (1985). Evidence of necrosis in human intercostal muscle following inhalation of an organophosphate insecticide. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 6:171-175.
- Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Teshigawara K, Uchida A. (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP)70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 40:73-78
- Weigel, S., Kuhlmann, J., Huhnerfuss, H., (2002). Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibrinic acid, caffeine, and DEET in the North Sea. *Sci. Total. Environ.* 295, 131-141.
- Weisburger J.H., (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health, *Mutat. Res.* 506-507, 9-20.
- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J. (1995). Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5, 245-251
- Welch WJ. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081.

Welte MA. (1994). Thermotolerance in *Drosophila* embryos: the role of hsp70 and the basis for a specific phenocopy. Ph.D. thesis. Univ. Chicago. 230 pp

Welte, M.A., Tetrault, J.M., Dellavalle, R.P. & Lindquist, S. (1993). A new method for manipulation transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Curr. Biol.*, 3, 842-853.

Werner I, Deanovic LA, Connor V, et al. (2000). Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Environ Toxicol Chem* 19(1):215–27

Werner I, Hinton D. (1999). Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): Is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers* 4:473–484.

Werner I, Hinton DE. (2000). Spatial profiles of hsp70 proteins in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*) in northern San Francisco Bay may be linked to natural rather than anthropogenic stressors. *Mar Environ Res* 50(1-5):379–84.

Werner I, Koger CS, Hamm JT, Hinton DE. (2001). Ontogeny of the heat-shock protein, hsp70 and hsp60, response and developmental effects of heat-shock in the teleost, medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci* 8(1):13–30.

Werner, I. & Nagel, R. (1997). Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipodes exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and flouranthene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2393-2403.

Westerfield M. (1995). *The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*, Eugene, OR: University of Oregon Press.

Wheeler, J. C., Bieschke, E. T., and Tower, J. (1995). Muscle-specific expression of *Drosophila* hsp70 in response to aging and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10408–10412.

Wheeler, J.C., King, V. & Tower, J. (1999). Sequence requirements for upregulating expression of *drosophila* hsp70 transgenes during aging. *Neurobiol. Aging*, 20, 545-553.

Whitesell L, Cook P. (1996). Stable and specific binding of heat shock protein90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Mol. Endocrinol.* 10:705–12

Wignarajah, S., and Phillipson, J. (1977). Numbers and biomass of centipedes (Lithobiomorpha: Chilopoda) in a *Betula-Alnus* woodland in N.E. England. *Oecologia* (Berlin) 31, 55–66.

Wilkinson, C.F. and Brattsten, L.B. (1972), Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. *Drug Metabolism Review*, 1, 153-177.

Williams RS, Thomas JA, Fina M, German Z, Benjamin IJ. (1993). Human heat shock protein (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J Clin Invest* 92:503–508.

Williams, J. H., Farag, A. M., Stansbury, M. A., Young, P. A., Bergman, H. L., and Petersen, N. S. (1996). Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1324–1328.

Williams, G.T. R.I. Morimoto (1990). Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter elements independent of rotational alignment, *Mol. Cell. Biol.* 10, 3125-3136

Wischmeyer PE, Musch MW, Madonna MB, Thisted R, Chang EB. (1997). Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am. J. Physiol.* 272:G879–84.

Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G.G., and Jaattela M. (1997). Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5073-77.

Wissing D, Jaattela M. (1996). HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.* 12:125–38

Wu C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:441-469.

Wu T, Chen S, Sun Y, et al. (2001a). Presence of antibody against the inducible Hsp71 in patients with acute heat-induced illness. *Cell Stress Chaperones* 6: 113–120.

Wu T, Tanguay RM, Wu Y, He H, Xu D, Feng J, Shi W, Zhang G. (1996). Presence of antibodies to heat stress proteins and its possible significance in workers exposed to high temperature and carbon monoxide. *Biomed Environ Sci* 9: 370–379.

Wu T, Yuan Y, Wu Y, He H, Zhang G, Tanguay RM. (1998). Presence of antibodies to heat stress proteins in workers exposed to benzene and in patients with benzene poisoning. *Cell Stress Chaperones* 3: 161–167.

Wu, B.J., Kingston, R.E., and Morimoto, R.I. (1986). Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 629-633.

Wyatt S, Mailhos C, Latchman DS. (1996). Trigeminal ganglion neurons are protected by the heat shock proteins hsp70 and hsp90 from thermal stress but not from programmed cell death following nerve growth factor withdrawal. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39:52–56.

Wynder EL, Bross II, Feldman RM (1957). A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* 10:1300-1323.

Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Wick G. (1999). Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation* 100: 1169–1174.

Yamada, H., S. Koizumi (2002). DNA microarray analysis of human gene expression induced by a non-lethal dose of cadmium, *Ind. Health* 40, 159-166.

Yu, Z., Magee, W. E., and Spotila, J. R. (1994). Monoclonal antibody ELISA test indicates that large amount of constitutive hsp-70 is present in salamanders, turtle and fish. *J. Therm. Biol.* 19, 41-53.

Yongcan G, Zhenzhong W, Youmei Z, Xiaoyang M. (1998). Bioconcentration effects of heavy metal pollution in soil on the mucosa epithelia cells ultrastructure injuring of the earthworm's gastrointestinal tract. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60:280-284.

Zafarullah, M., S., Gedamu, L., (1993). Basal and inducible expression of metallothionein and heat-shock protein 70 genes in bovine articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 208, 371-377.

Zenk MH. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179, 21-30.

Zhao, Q., Wang, J.H., Levichkin, I.V., Stasinopoulos, S., Ryan, M.T. & Hoogenraad, N.J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.*, 21, 4411-4419.

Zhou J, Goldsbrough PB. (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *The Plant Cell* 6, 875-884.

Zwiener, R.J. and C.M. Ginsburg. (1988). Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children. *Pediat.* 81: 121-126.

Zychlinsky A., Prevost, M.C., Sansonetti, P. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-168.