



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Σχεδιασμός και ανάπτυξη βιοαντιδραστηρίων κατάλληλων για την
παραγωγή ή προσομοίωση δράσεων αντιοφικού ορού**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΜΟΥΛΑΣΙΩΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

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



Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της «3ης Προκήρυξης ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για Υποψήφιους/ες Διδάκτορες» (Αριθμός Υποτροφίας: 5428)

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 1001/21-6-2019

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τσίκαρης Βασίλειος-Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη:

Μαλανδρίνος Γεράσιμος- Αν. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σγούρας Διονύσιος Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ινστιτούτο Παστέρ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-11-2020

Θέμα: «Σχεδιασμός και ανάπτυξη βιοαντιδραστηρίων κατάλληλων για την παραγωγή ή προσομοίωση δράσεων αντιοφικού ορού»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1153/19-12-2025

1. Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων Καθηγητής
2. Μαλανδρίνος Γεράσιμος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
3. Σγούρας Διονύσιος, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής, Διευθυντής Ερευνών ,ΕΙΜ, Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ
4. Λουλούδη Μαρία, Μέλος, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Τσιούρης Βασίλειος, Μέλος, Αν. Καθηγητής, Κτηνιατρική Σχολή ΑΠΘ
6. Χριστοφορίδης Σάββας, Μέλος, Καθηγητής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κούκλης Παναγιώτης, Μέλος, Αν. Καθηγητής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 29-06-2026

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Χελά Δήμητρα, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ξανθή Τουτουνζόγλου



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

Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης

E-mail: btsikari@uoi.gr

Τηλ.: +2651008383

Ιωάννινα, 29/06/2026

Προς
Το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΘΕΜΑ: «Απονομή Διδακτορικού διπλώματος στην κα. Βασιλική Μουλασιώτη»

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κα. **Βασιλικής Μουλασιώτη**, συνήλθε σε δημόσια συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις **29 Ιουνίου 2026**, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της Διατριβής με τίτλο: «**Σχεδιασμός και ανάπτυξη βιοαντιδραστηρίων κατάλληλων για την παραγωγή ή προσομοίωση δράσεων αντιοφικού ορού**». Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η Διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η επιτροπή αποφάσισε να απομείνει στην κα. **Βασιλική Μουλασιώτη** το Διδακτορικό Δίπλωμα Χημείας με βαθμό

« **ΑΡΙΣΤΑ** »

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
Επιβλέπων Καθηγητής

2. Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

GERASIMOS MALANDRINOS

30.06.2026 07:03 UTC

Ψηφιακή Βεβαίωση Εγγράφου

Μπορείτε να ελέγξετε την ισχύ του εγγράφου
σκανάροντας το QR code ή εισάγοντας τον κωδικό
στο docs.gov.gr/validate



Κωδικός εγγράφου: vPjg5HygwUP0i5ta0YKq1g

Σελίδα: 1/2

3. Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας (ΕΙΜ) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

 Digitally signed by DIONYSIOS SGOURAS
Date: 2026.06.30 09:47:11 EEST
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
HELLENIC PASTEUR INSTITUTE

4. Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

MARIA LOULOU DI
30.06.2026 07:18 UTC

5. Παναγιώτης Κούκλης, Αναπληρωτής Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

PANAGIOTIS KOUKLIS
30.06.2026 08:02 UTC

6. Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

SAVVAS
CHRISTOFORIDIS
 Digitally signed by
SAVVAS CHRISTOFORIDIS
Date: 2026.06.30 11:15:54
+03'00'

7. Βασίλειος Τσιούρης, Καθηγητής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής

Prof.
VASILEIOS TSIOURIS
30/06/2026 13:00

Ψηφιακή Βεβαίωση Εγγράφου

Μπορείτε να ελέγξετε την ισχύ του εγγράφου
σκανάροντας το QR code ή εισάγοντας τον κωδικό
στο docs.gov.gr/validate



Επιβεβαιώνεται το γνήσιο. Υπουργείο
Ψηφιακής Διακυβέρνησης / Verified by the Ministry
of Digital Governance, Hellenic Republic
20260630213903+03'00'

Κωδικός εγγράφου: vPjg5HygwUP0i5ta0YKq1g

Σελίδα: 2/2

Υπογραφή:
ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΣΙΚΑΡΗΣ
Πατρώνυμο: ΕΥΘΥΜΙΟΣ
ΑΦΜ: 041703938
Ημ. Υπογραφής: 30/06/2026 21:39:00

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και Πρωτεϊνών του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Βασίλειο Τσίκαρη, για την επιστημονική καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεχή υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ από καρδιάς για όλα όσα μου δίδαξε κατά τα χρόνια της συνεργασίας μας. Τον ευχαριστώ επίσης για τη στήριξή του στην απόφασή μου να μεταβώ στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικής της Βαλένθια στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus+, όπου είχα τη δυνατότητα να συνεργαστώ με έναν από τους κορυφαίους επιστήμονες στον τομέα των venomics, τον Δρ. Juan José Calvete, όπου είχαμε την ευκαιρία για πρώτη φορά να ξεκινήσει η πρωτεομική ανάλυση του δηλητηρίου της οχιάς της Μήλου. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που αποκόμισα από αυτή τη συνεργασία υπήρξαν ανεκτίμητες.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Προϊστάμενο της Μονάδας Εμβολίων στο Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur Δρ. Διονύση Σγούρα, Διευθυντή Ερευνών στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας για την αμέριστη βοήθεια του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής, αλλά ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της μελέτης σε ένα γνωστικό αντικείμενο που ήταν άγνωστο για εμένα τότε. Επιπλέον, τον ευχαριστώ πολύ για την παροχή του αντιοφικού ορού, διότι χωρίς την διαθεσιμότητα του δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο για την άριστη συνεργασία μας, την αμέριστη βοήθεια του για την λήψη φασμάτων NMR, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που πάντα δημιουργούσε τόσο εντός όσο και εκτός του εργαστηρίου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της διατριβής και τη συμμετοχή τους στην δημόσια υποστήριξη της.

Θα ήθελα επίσης να τον Δρ. Βασίλη Μούση, για τη βοήθεια του και το συνεχές του ενδιαφέρον κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στον Δρ. Δημήτρη Κρικοριάν, για την στήριξη του καθόλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Ξεχωριστή αναφορά θα ήθελα να κάνω στην Δρ. Ευγενία Φώτου η οποία αποτέλεσε για μένα στήριγμα τόσο επιστημονικά όσο και ηθικά σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου και ιδιαίτερα σε αυτή της εκπόνησης του διδακτορικού. Την ευχαριστώ από καρδιάς για τις χρήσιμες συμβουλές της, το αμέριστο

ενδιαφέρον της, καθώς και για τις ευχάριστες και αξέχαστες στιγμές που περάσαμε εντός και εκτός εργαστηρίου. Η βοήθεια της για μένα ήταν πολύτιμη.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους και φίλους για τη συνεργασία και την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Δήμητρα Κυριάκου για όλη την πορεία από τα προπτυχιακά έτη μέχρι και σήμερα. Ευχαριστώ επιπλέον και τους Διδάκτορες Κωσταντίνο Υψηλάντη και Αντωνία Γαρυπίδου για την πολύτιμη βοήθεια τους στην ανάλυση των φασμάτων NMR των πεπτιδίων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον υπ. Διδάκτορα Θωμά Δάφτσιο για την συλλογή και παροχή των δηλητηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η συνεισφορά του υπήρξε καθοριστική, καθώς χωρίς την παροχή των δηλητηρίων η έρευνα αυτή δεν θα μπορούσε να ξεκινήσει. Τον ευχαριστώ επίσης καθώς υπήρξε καθοριστικός παράγοντας για την γνωριμία και συνεργασία στην πορεία με τον κ. Juan José Calvete.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω και όλους τους φίλους μου για την αγάπη τους, την διαρκή στήριξή τους και για τις όμορφες και αξέχαστες στιγμές που ζήσαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, από την καρδιά μου, στους γονείς μου και στον αδερφό μου οι οποίοι βρίσκονται πάντοτε στο πλευρό μου, στηρίζοντας κάθε μου προσπάθεια με κάθε δυνατό τρόπο και ενθαρρύνοντάς με να ακολουθώ τα όνειρα και τους στόχους μου.

Βασιλική Μουλασιώτη

Αθήνα, Ιούνιος 2026

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. Δηλητηριώδεις Όφεις: Βιολογία, Τοξίνες και Μηχανισμοί Δράσης	3
1.1. Εισαγωγή.....	3
1.2. Ταξινόμηση και κατανομή των δηλητηριωδών φιδιών	3
1.3. Επιδημιολογική εικόνα σε Ευρώπη και Ελλάδα.....	4
1.4. Μηχανισμός δράσης και ιδιότητες του δηλητηρίου	5
1.5. Κατηγορίες τοξινών	7
1.5.1. Φωσφολιπάσες A_2	7
1.5.2. Μεταλλοπρωτεάσες	9
1.5.3. Σερινοπρωτεάσες	10
1.5.4. L-αμινο-οξειδάσες (LAAOs).....	11
1.5.5. CRISPs.....	11
1.5.6. Μικρά πεπτιδία και βιοδραστικά μόρια	12
1.5.7. Λεκτίνες τύπου C (Snaclecs).....	12
1.5.8. Ντισιντεγκρίνες.....	12
1.6. Έχιδνες της Ελλάδας- Τοξικολογικό προφίλ.....	13
1.6.1. <i>Vipera ammodytes</i> (κοινή οχιά).....	13
1.6.2. <i>Vipera berus</i> (Αστρίτης)	13
1.6.3. <i>Macrovipera schweizeri</i> (οχιά της Μήλου).....	14
2. Αντιοφικός ορός	15
2.1. Νέες θεραπευτικές Κατευθύνσεις	17
3. Αντισώματα και ανοσοποίηση	18
3.1. Αντιγόνο και αντίσωμα	18
3.2. Η Ανοσοσφαιρίνη IgY	19
3.2.1. Βιοχημικές ιδιότητες και σταθερότητα.....	21
3.3. Ανοσοποιήσεις.....	21
3.3.1. Δόση Αντίγονου	21
3.3.2. Ανοσοενισχυτικά	22
3.3.3. Τρόπος Χορήγησης Του Αντιγόνου.....	22
3.3.4. Διαστήματα Μεταξύ Ανοσοποιήσεων	23
3.4. Ανοσοποιήσεις Όρνιθας.....	23
3.5. Απομόνωση και καθαρισμός αντισωμάτων IgY.....	25
3.5.1. Μέθοδοι απολιπίδωσης	25
3.5.2. Μέθοδοι Καθαρισμού των IgY.....	25

4.	Ανοσοπροσδιορισμοί	29
4.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
4.1.1.	Στάδια Της Μεθόδου.....	30
4.1.2.	Τύποι ELISA.....	31
5.	Φορείς	34
6.	Πεπτιδική σύνθεση.....	36
6.1.	Αμινοξέα, Πεπτίδια και Πρωτεΐνες.....	36
6.2.	Πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS)	37
6.2.1.	Ρητίνη.....	38
6.2.2.	Προστατευτικές ομάδες.....	38
6.2.3.	Σχηματισμός Πεπτιδικού Δεσμού- Αντιδραστήρια Σύζευξης.....	38
6.2.4.	Αντίδραση Νινυδρίνης (Test Kaiser)	40
6.2.5.	Ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις.....	40
6.2.6.	Αποκοπή Πεπτιδίου από τη Ρητίνη	41
7.	Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις	42
7.1.	Θειοαιθερικός Δεσμός.....	42
7.2.	Μηχανισμός Σχηματισμού Θειοαιθερικού Δεσμού.....	42
7.3.	Παράγοντες που Επηρεάζουν τον Σχηματισμό του Θειοαιθερικού Δεσμού.	43
8.	Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων	45
8.1.	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης Φάσης (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography,RP-HPLC).....	45
8.2.	Φασματομετρία Μάζας.....	46
9.	Αντικείμενο και σκοπός	49
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
10.	Μέθοδοι, αντιδραστήρια και τεχνικές.....	55
10.1.	Σχεδιασμός πεπτιδίων	55
10.2.	Μελέτες ομολογίας και ανοσογονικότητας.....	55
10.3.	Σχεδιασμός πεπτιδικού φορέα	56
10.4.	Αντιδραστήρια	56
10.4.1.	Διαλύτες.....	56
10.4.2.	Αντιδραστήρια Σύζευξης.....	57
10.4.3.	Συσκευές και όργανα	57
10.5.	Σύνθεση πεπτιδίων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων	58
10.5.1.	Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.....	58
10.5.2.	Ιωδοακετυλίωση πεπτιδίων	59
10.5.3.	Αποκοπή πεπτιδίου από την ρητίνη.....	60

10.6.	Σχηματισμός Θειοαιθερικού Δεσμού	60
10.7.	Ταυτοποίηση και καθαρισμός.....	61
10.7.1.	Φασματοσκοπία NMR.....	61
10.8.	Σύνθεση των υλικών Sepharose-AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷ και Sepharose-PLAVB ¹²⁸⁻¹³⁷	62
10.9.	Ανοσοποιήσεις.....	63
10.9.1.	1 ^ο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων	63
10.9.2.	2 ^ο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων	64
10.9.3.	Απομόνωση Του IgY.....	64
10.10.	Καθαρισμός των IgY αντισωμάτων	65
10.10.1.	Διαπίδυση.....	65
10.10.2.	Χρωματογραφία συγγένειας.....	66
10.11.	Δοκιμασίες ELISA	66
10.11.1.	Έμμεση ELISA:.....	67
10.11.2.	ELISA sandwich:.....	68
11.	Αποτελέσματα	70
11.1.	Μελέτες ομολογίας.....	70
11.2.	Μελέτη ανοσογονικότητας των φωσφολιπασών A2	72
11.2.1.	Vipera ammodytes ammodytes.....	72
11.2.2.	Vipera berus berus	75
11.3.	Συνθέσεις πεπτιδίων και συμπλεγμάτων.....	78
11.3.1.	Σύνθεση του πεπτιδίου ICH ₂ CO-D ¹²⁸ FLC(CH ₂ NHCOCH ₃)KKESEK ¹³⁷ -NH ₂ . 78	
11.3.2.	Σύνθεση του πεπτιδίου ICH ₂ CO-S ¹²⁸ SNC(CH ₂ NHCOCH ₃)QENSDK ¹³⁷ -NH ₂ 83	
11.3.3.	Σύνθεση του συμπλέγματος Ac- [K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12- CH ₂ CO-DFLC(Acm)KKESEK)] ₄ -NH ₂	88
11.3.4.	Σύνθεση του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm;6,12-CH ₂ CO-SSNC(Acm)QENSDK)] ₄ -NH ₂	90
11.3.5.	Σύνθεση της στήλης Σεφαρόζη-AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷	91
11.3.6.	Σύνθεση της στήλης Σεφαρόζη-PLAVB ¹²⁸⁻¹³⁷	92
11.4.	Δοκιμασίες ELISA	93
11.4.1.	Ανοσοποιήσεις με το ανοσογόνο CPSOC-AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷	93
11.4.2.	Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας.....	95
11.4.3.	Ανοσοποιήσεις με το μίγμα των δύο ανοσογονικών συμπλεγμάτων	97
11.4.4.	Έλεγχος αναγνώρισης του δηλητηρίου V. ammodytes.....	98
11.4.5.	Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας.....	98
11.4.6.	Ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες δέσμευσης ομόλογων δηλητηρίων	100

11.4.7. Έλεγχος του τίτλου αντισωμάτων κατά την διάρκεια των ανοσοποιήσεων	100
11.4.8. Έλεγχος διάρκειας παραγωγής αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου	101
11.4.9. Σύγκριση του τρόπου αποθήκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων	102
11.4.10. Έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας	102
Σύνοψη- Συμπεράσματα.....	105
Περίληψη	109
Abstract	112
Βιβλιογραφία.....	114
Δημοσιεύσεις	127

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Δηλητηριώδεις Όφεις: Βιολογία, Τοξίνες και Μηχανισμοί Δράσης

1.1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας περίπου 5,4 εκατομμύρια άνθρωποι δέχονται δήγμα φιδιού κάθε χρόνο, παγκοσμίως, οδηγώντας σε περισσότερους από 100.000 θανάτους και σε περίπου 5 φορές περισσότερους ακρωτηριασμούς από οποιαδήποτε άλλη ασθένεια¹. Παρόλα αυτά, οι συνέπειες των δηγμάτων δεν είναι μόνο ιατρικές αλλά και κοινωνικοοικονομικές, καθώς πολλά θύματα παρουσιάζουν μόνιμες βλάβες και αναπηρίες οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της δυνατότητάς τους για εργασία. Το 2009 τα δηλητηριώδη δήγματα φιδιών (envenoming) συμπεριλήφθηκαν στη λίστα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας με τις παραμελημένες νόσους και τονίστηκε η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες στην έρευνα των δηλητηρίων για την παραγωγή αντιοφικού ορού ή άλλων αντιδραστηρίων.

Μέχρι σήμερα η μόνη αποδεκτή θεραπεία για την αντιμετώπιση του δήγματος δηλητηριωδών ειδών φιδιών είναι η χορήγηση αντιοφικού ορού. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, αντιοφικοί οροί έχουν δημιουργηθεί έναντι διάφορων ειδών οχιάς, ωστόσο η πλήρης γνώση, κατανόηση και αποτελεσματικότητα αυτών βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα². Επί του παρόντος, οι αντιοφικοί οροί που διατίθενται προέρχονται από το πλάσμα ανοσοποιημένων ζώων, κυρίως αλόγων³ και αποτελούνται από πολυκλωνικά αντισώματα ή Fab₂ τμήματα αυτών, τα οποία αναπτύσσονται έναντι όλων των τοξινών του δηλητηρίου, ανεξάρτητα από την κλινική τους σημασία⁴.

Προβλήματα μείζονος σημασίας μέχρι σήμερα εξακολουθούν να μην αντιμετωπίζονται, όπως η κακή σταθερότητα σε υγρή μορφή, ανεπιθύμητες ενέργειες, συχνά κακή αποτελεσματικότητα και σοβαρές δυσκολίες που σχετίζονται με την παραγωγή. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τη θεραπεία του δήγματος φιδιών ώστε να υπερκεραστούν οι περιορισμοί που υφίστανται μέχρι σήμερα έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας.

1.2. Ταξινόμηση και κατανομή των δηλητηριωδών φιδιών

Στην Ευρώπη σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση ζουν 57 είδη φιδιών τα οποία ανήκουν στις παρακάτω έξι οικογένειες: *Colubridae*, *Erycidae*, *Natricidae*, *Psammophiidae*, *Typhlopidae* and *Viperidae*. Η οικογένεια *Viperidae* σχηματίζει μια μονοφυλετική γενεαλογία δηλητηριωδών φιδιών η οποία περιλαμβάνει περίπου 350 είδη παγκοσμίως και επί του παρόντος, ταξινομούνται σε 35 γένη^{5,6}. Οι οχίες (true vipers) απαρτίζονται από περίπου 100 είδη, από τα οποία κλινικά σημαντικά είναι αυτά που ανήκουν στην οικογένεια των *Viperidae* και η οποία στην Ευρώπη αποτελείται από 14 είδη.

Από αυτά τα 14 είδη κυρίως τρία είναι υπεύθυνα για τις πιο σοβαρές περιπτώσεις περιστατικών στην Ευρώπη: η *Vipera berus*, η *Vipera aspis* και η *Vipera ammodytes*. Η *Vipera berus* προτιμά τις ψυχρές περιοχές και μπορεί να βρεθεί σε σκανδιναβικές χώρες πάνω από τον αρκτικό κύκλο και έχει την μεγαλύτερη εξάπλωση από όλα τα υπόλοιπα δηλητηριώδη φίδια στην Ευρώπη⁷. Η *Vipera aspis* η οποία χρειάζεται ήλιο και υψηλές σχετικά θερμοκρασίες απαντάται κυρίως στην βόρεια Ισπανία, την Ελβετία, την Ιταλία και την Γαλλία. Η *Vipera ammodytes* (κερασφόρος οχιά) απαντάται ευρέως στην νοτιοανατολική Ευρώπη, την νότια Ιταλία, την Αυστρία και την Τουρκία. Τα παραπάνω είδη διακρίνονται περαιτέρω σε υποείδη, στα οποία παρατηρείται σημαντική ενδοειδική ποικιλογένεση ως προς τη σύσταση και την τοξικότητα του δηλητηρίου. Η ποικιλογένεση αυτή επηρεάζει τόσο τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας όσο και την αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αντιμετώπισης⁸.

Στην Ελλάδα συνολικά απαντώνται 22 είδη φιδιών τα οποία ταξινομούνται σε τέσσερις μεγάλες οικογένειες: τις Κολουβρίδες, τους Βόες, τους Τυφλίνους και τις Έχιδνες. Από αυτά -επικίνδυνο για τον άνθρωπο -δηλητήριο φέρουν τα πέντε είδη της οικογένειας των εχιδνών. Επίσης, δηλητήριο φέρουν και δύο φίδια της οικογένειας των κολουβριδών: το *Telescopus fallax* (Αγίοφιδο) και το *Malpolon monspessulanus* (Σαπίτης) τα οποία όμως δεν θεωρούνται επικίνδυνα για τον άνθρωπο καθώς είναι οπισθόγλυφα, (τα δόντια που εγχέουν το δηλητήριο βρίσκονται στο πίσω μέρος της οδοντοστοιχίας τους) και επιπλέον το δηλητήριο τους έχει μικρή τοξικότητα.

1.3. Επιδημιολογική εικόνα σε Ευρώπη και Ελλάδα

Στην Ευρώπη, τα περιστατικά δηγήματος φιδιών είναι σαφώς λιγότερο συχνά απ' ό,τι σε τροπικές χώρες, ωστόσο παραμένουν κλινικά και επιστημονικά σημαντικά. Σύμφωνα με μελέτες οι περισσότερες περιπτώσεις δηγήματος οφείλονται σε οχίες του γένους *Vipera*^{9,10}. Μια συστηματική ανασκόπηση 78 μελετών με συνολικά 5501 περιστατικά δηγήματος του γένους *Vipera* στην Ευρώπη, έδειξε ότι το συχνότερο υπεύθυνο είδος ήταν η *Vipera berus* (63,3% των περιστατικών), ακολουθούμενη από την *V. ammodytes* (17,7%) και τέλος την *V. aspis* (11,7%)⁹. Η θνητότητα σε ευρωπαϊκό επίπεδο υπολογίζεται κάτω του 1%, ωστόσο, η νοσηρότητα παραμένει σημαντική, καθώς πολλές περιπτώσεις απαιτούν νοσηλεία.

Η επιδημιολογική εικόνα στην Ελλάδα παρουσιάζει ιδιαιτερότητες σε σύγκριση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Αν και ο συνολικός αριθμός περιστατικών παραμένει σχετικά περιορισμένος, το κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον είναι αυξημένο λόγω της παρουσίας τριών ειδών φιδιών: *Vipera ammodytes*, *Vipera berus* και *Macrovipera schweizeri*. Η *Vipera ammodytes* (κερασφόρος οχιά) αποτελεί το συχνότερα απαντώμενο και πλέον επικίνδυνο είδος, καθώς ευθύνεται για την πλειονότητα των

περιστατικών στη χώρα^{11,12}. Η *Vipera berus* απαντάται αποκλειστικά σε βόρειες περιοχές της Ελλάδας, ενώ η *Macrovipera schweizeri* περιορίζεται στα νησιά των Κυκλάδων (Μήλος, Κίμωλος, Σίφνος και Πολύαιγος), με ελάχιστα καταγεγραμμένα περιστατικά, κανένα από τα οποία δεν έχει αποβεί θανατηφόρο^{13,14}.

Μελέτες σε ελληνικά νοσοκομεία καταδεικνύουν ότι, παρότι οι θάνατοι από δήγματα είναι εξαιρετικά σπάνιοι, η νοσηρότητα είναι σημαντική και η χορήγηση αντιοφικού ορού συχνά κρίνεται απαραίτητη⁹. Παρά το μικρό ποσοστό θνησιμότητας, οι πιθανές επιπλοκές, η ανάγκη για ενδονοσοκομειακή νοσηλεία, καθώς και η πιθανότητα μόνιμης λειτουργικής αναπηρίας ή ψυχολογικών συνεπειών — όπως μετατραυματικό στρες — δικαιολογούν το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον^{9,15}. Δυστυχώς, τα διαθέσιμα επιδημιολογικά στοιχεία είναι περιορισμένα, καθώς η δήλωση δηγμάτων δεν είναι υποχρεωτική, γεγονός που δυσχεραίνει την αξιόπιστη καταγραφή, την έγκαιρη και ορθή κλινική αντιμετώπιση των περιστατικών, καθώς και τη συστηματική μελέτη της σύστασης και της τοξικότητας των δηλητηρίων.

Σε μελέτη που διεξήχθη την περίοδο 1988–2003 και περιλάμβανε 147 περιπτώσεις δήγματος από *Vipera ammodytes*, τα συχνότερα συμπτώματα ήταν έντονος τοπικός πόνος, οίδημα, εκχυμώσεις, ταχυκαρδία, λιποθυμία ή ζάλη και πυρετός. Λιγότερο συχνά αναφέρθηκαν διόγκωση των περιφερειακών λεμφαδένων, ναυτία, υπόταση και έμετος. Οι κυριότερες επιπλοκές περιλάμβαναν περιορισμό του εύρους κίνησης, θρομβοφλεβίτιδα, αιμορραγία, ραβδομύωση, οξεία νεφρική ανεπάρκεια και μείωση του επιπέδου συνείδησης⁹. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση του τότε διαθέσιμου αντιοφικού ορού European Viper Venom Antiserum® (Zagreb), αν και πραγματοποιήθηκε με καθυστέρηση, οδήγησε στην αντιμετώπιση σφαιροκυτταρικής αιμολυτικής αναιμίας που είχε εμφανιστεί ως επιπλοκή σε μία ασθενή¹⁶. Αξίζει να σημειωθεί ότι, μέχρι σήμερα, δεν έχει καταγραφεί περιστατικό δήγματος από οπισθόγλυφο φίδι στην Ελλάδα που να έχει απαιτήσει νοσηλεία.

1.4. Μηχανισμός δράσης και ιδιότητες του δηλητηρίου

Το δηλητήριο εγχέεται ενδοδερμικά ή υποδόρια και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει ενδομυϊκά ή και ενδοφλέβια. Στο σημείο του δήγματος παρατηρούνται συνήθως δύο μικρές, διακριτές οπές, οι οποίες αντιστοιχούν στους κυνόδοντες του φιδιού μέσω των οποίων εγχύθηκε το δηλητήριο. Τοπικός πόνος, συνήθως έντονος, εμφανίζεται άμεσα μετά το δάγκωμα και συνοδεύεται από ταχεία ανάπτυξη οιδήματος, το οποίο ενδέχεται να επεκταθεί πέρα από την πληγείσα περιοχή. Επιπλέον, σε σοβαρότερες περιπτώσεις καταγράφεται εμφάνιση έντονου ερυθήματος, εκχυμώσεων, φλυκταινών, καθώς και εκτεταμένη νέκρωση των μαλακών ιστών^{7,17}.

Αμέσως μετά την έγχυση, το δηλητήριο με τη δράση των υαλουρονιδασών μεταφέρεται ταχύτατα στους τοπικούς ιστούς και στη συνέχεια περνά στην συστηματική κυκλοφορία μέσω του λεμφικού συστήματος. Η μεταφορά του δηλητηρίου ενισχύεται από την μυϊκή δραστηριότητα για αυτό και ένα από τα κρίσιμα μέτρα πρώτων βοηθειών είναι η ακινητοποίηση και η ηρεμία του θύματος.

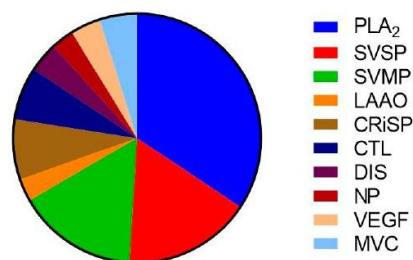
Η μεγάλη ποικιλότητα που παρουσιάζεται στα συμπτώματα μετά το δήγμα που δέχεται το θύμα σχετίζεται με διάφορους παράγοντες⁸. Ο κυριότερος παράγοντας είναι η δόση του δηλητηρίου. Περίπου το 20-25% των δηγμάτων θεωρούνται «στεγνά», δηλαδή δεν υπάρχει έγχυση δηλητηρίου. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να πηγάζει από κάποια παθολογική αιτία όπως ιογενή λοίμωξη, τραυματισμό ή κάποια άλλη φλεγμονώδη κατάσταση. Ωστόσο, στην πραγματικότητα τα περισσότερα στεγνά δήγματα προκύπτουν από σκόπιμη απόφαση του ζώου να διατηρήσει γεμάτους του αδένες του. Η συμπεριφορά αυτή σχετίζεται με την ηλικία, την απειλή που δέχεται, την διατήρηση της ενέργειας καθώς και με οικολογικούς παράγοντες. Μελέτες έχουν δείξει πως απαιτούνται περίπου 14 ημέρες για την αναπλήρωση του δηλητηρίου στους αδένες, οπότε τα ζώα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μέτρησης του δηλητηρίου¹⁸. Η ηλικία, το βάρος το σημείο δαγκώματος και η φυσική κατάσταση του θύματος αποτελούν επίσης σημαντικές παραμέτρους.

Το δηλητήριο αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μίγμα βιοδραστικών συστατικών, το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες, πεπτίδια, ένζυμα, μικρά οργανικά μόρια και ανόργανα ιόντα. Η σύνθεσή του έχει διαμορφωθεί μέσω εκατομμυρίων ετών φυσικής επιλογής, με σκοπό την ακινητοποίηση και θανάτωση του θηράματος, καθώς και την έναρξη της πέψης, μέσω αποδόμησης των ιστών αλλά και για την άμυνα απέναντι στους θηρευτές. Αποτελείται από 50-200 διαφορετικά συστατικά, τα οποία κυρίως είναι πρωτεΐνες (70-90%) με ενζυμικές και τοξικές ιδιότητες όπως υαλουρονιδάσες, πρωτεολυτικά ένζυμα και πεπτιδο-υδρολάσες¹⁹.

Η σύσταση του δηλητηρίου μεταξύ των ειδών ή και μεταξύ του ίδιου είδους, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να διαφέρει σημαντικά και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η διατροφή, το φύλο, η προσαρμογή στο τοπικό περιβάλλον και η εποχικότητα. Γενικά, οι τοξικές επιδράσεις του δηλητηρίου ταξινομούνται σε νευροτοξικές, αιμοτοξικές, καρδιοτοξικές, μυοτοξικές κ.ο.κ. με βάση το επικρατέστερο κλινικό σύμπτωμα του συγκεκριμένου δηλητηρίου²⁰. Το δηλητήριο των εχιδών είναι κυρίως αιμοτοξικό και κυτταροτοξικό αν και σε ορισμένα είδη όπως τα *V. aspis* και *V. ammodytes* εντοπίζονται και νευροτοξικά συστατικά⁷.

1.5. Κατηγορίες τοξινών

Σχεδόν σε όλα τα δηλητήρια των φιδιών οι κύριες οικογένειες τοξινών είναι οι: φωσφολιπάσες A_2 (PLA₂), μεταλλοπρωτεάσες (SVMP), σερινοπρωτεάσες (SVSP) και οι τοξίνες «τριών δαχτύλων» (3 FTX).



Εικόνα 1. Κατανομή τοξινών στο δηλητήριο των εχιδνών⁶.

1.5.1. Φωσφολιπάσες A_2

Οι φωσφολιπάσες A_2 είναι μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων αποτελούμενη από 16 ομάδες οι οποίες κατατάσσονται σε έξι κύριες κατηγορίες: τις εκκρινόμενες, τις κυτοσολικές, τις μη εξαρτώμενες από ασβέστιο, τις σχετιζόμενες με λιποπρωτεΐνες, τις λιπώδεις και τις λιποσωμικές PLA₂. Η δράση τους περιλαμβάνει την υδρόλυση των sn-2 εστερικών δεσμών των γλυκεροφωσfolιπιδίων απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα συνήθως αραχιδονικό οξύ και λυσοφωσfolιπίδια τα οποία αποτελούν πρόδρομα ισχυρών φλεγμονωδών διαμεσολαβητών^{15,21,22}. Αποτελούνται συνήθως από 120-125 αμινοξέα και περιέχουν επτά δισουλφιδικούς δεσμούς.

Σχεδόν όλες οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες (sPLA₂) διαθέτουν μία υψηλά συντηρημένη θηλιά για την δέσμευση του ασβεστίου (XCGXGG) και ένα καταλυτικό μοτίβο (DXCCXXHD). Τα δομικά αυτά στοιχεία είναι απαραίτητα για τη δέσμευση του ιόντος ασβεστίου και, κατ' επέκταση, για την εκδήλωση της ενζυμικής τους δραστηριότητας. Ωστόσο, σε πολλές PLA₂ παρατηρείται μετάλλαξη στη θέση 49 όπου το ασπαρτικό οξύ αντικαθίσταται από λυσίνη. Η συγκεκριμένη αντικατάσταση παρεμποδίζει τη δέσμευση του ασβεστίου, το οποίο είναι κρίσιμο για την καταλυτική διαδικασία, με αποτέλεσμα την απώλεια ή σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Παρόλα αυτά, η τοξικότητα των φωσφολιπασών A_2 δεν συσχετίζεται απαραίτητα με την καταλυτική τους ικανότητα. Οι μη ενζυμικά ενεργές αυτές τοξίνες διατηρούν έντονη μυοτοξική δράση και συνοδεύονται από επιπρόσθετες τοξικές επιδράσεις, παρά την έλλειψη ενζυμικής λειτουργίας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η παθοφυσιολογική δράση των PLA₂ μπορεί να ασκείται μέσω μη καταλυτικών μηχανισμών, καθιστώντας τις τοξικές ακόμη και απουσία ενζυμικής δραστηριότητας²³.

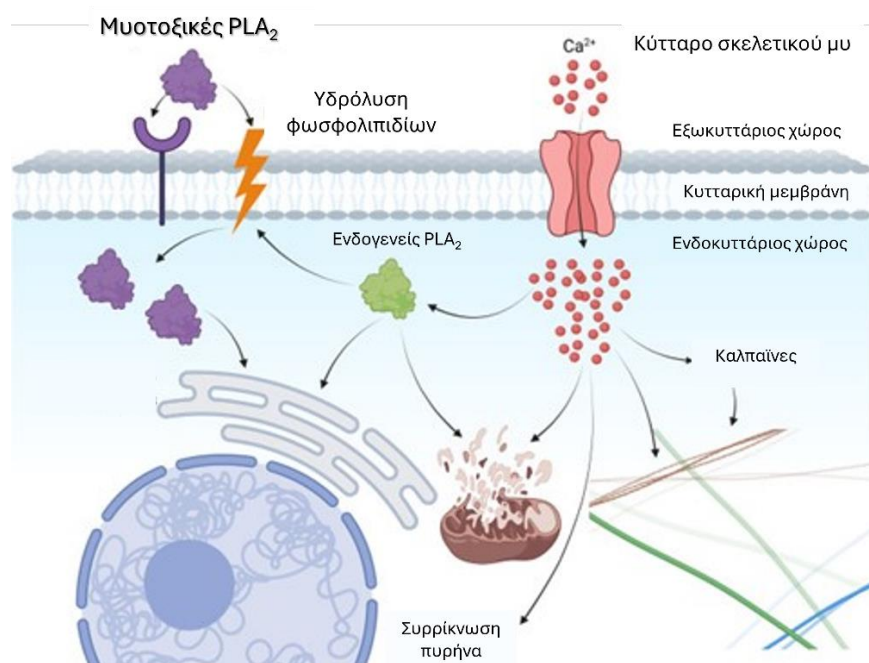
Οι φωσφολιπάσες που βρίσκονται στο δηλητήριο των φιδιών παρουσιάζουν ευρύ φάσμα τοξικών επιδράσεων όπως νευροτοξικότητα, μυοτοξικότητα, κυτταροτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα κ.α. Η ποικιλομορφία αυτή αποδίδεται στις πολλαπλές λειτουργικές θέσεις που διαθέτουν στην επιφάνεια τους καθώς και στη δυνατότητά τους να προσδένονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς²⁴. Επιπλέον, πολλές φωσφολιπάσες διαθέτουν περισσότερες από μια τοξικές ιδιότητες, για

παράδειγμα οι φωσφολιπάσες της κατηγορίας I εκδηλώνουν και νευροτοξική και μυοτοξική δράση.

1.5.1.1. Μυοτοξικές PLA₂

Στις περισσότερες περιπτώσεις δήγματος η κύρια κλινική εκδήλωση είναι η οξεία νέκρωση των σκελετικών μυών (μυονέκρωση). Ανάλογα με το είδος του δηλητηρίου οι φωσφολιπάσες αυτές μπορούν να προκαλέσουν τοπική ή συστηματική μυοτοξικότητα. Στην περίπτωση των εχιδνών, το δηλητήριο κυρίως προκαλεί τοπική μυοτοξικότητα και η βλάβη που προκαλείται περιορίζεται στο σημείο στο οποίο έγινε η έγχυση του δηλητηρίου. Ο κοινός στόχος των μυοτοξινών φαίνεται ότι είναι το σαρκείλημα (κυτταρική μεμβράνη του σκελετικού μυ), όπου οι φωσφολιπάσες καταστρέφουν την ακεραιότητα της μεμβράνης, ακολουθούμενη από ταχύτατη εισροή ιόντων ασβεστίου τα οποία με τη σειρά τους πυροδοτούν μια σειρά εκφυλιστικών γεγονότων²⁰.

Επιπρόσθετα, οι μυοτοξίνες συνδέονται στενά με τις νευροτοξίνες, καθώς και οι δύο επιτυγχάνουν παρόμοια κυτταρική βλάβη μέσω διατάραξης της μεμβράνης, της ανισορροπίας της κυτταροπλασματικής ομοιόστασης του Ca²⁺ και του κυτταρικού εκφυλισμού. Μελέτες έχουν δείξει η C-τελική περιοχή (αμινοξέα 115-129), η οποία είναι θετικά φορτισμένη και διαθέτει πληθώρα βασικών, αρωματικών, υδρόφοβων καταλοίπων, είναι η βασική δομή για την πρόκληση των μυοτοξικών επιδράσεων.

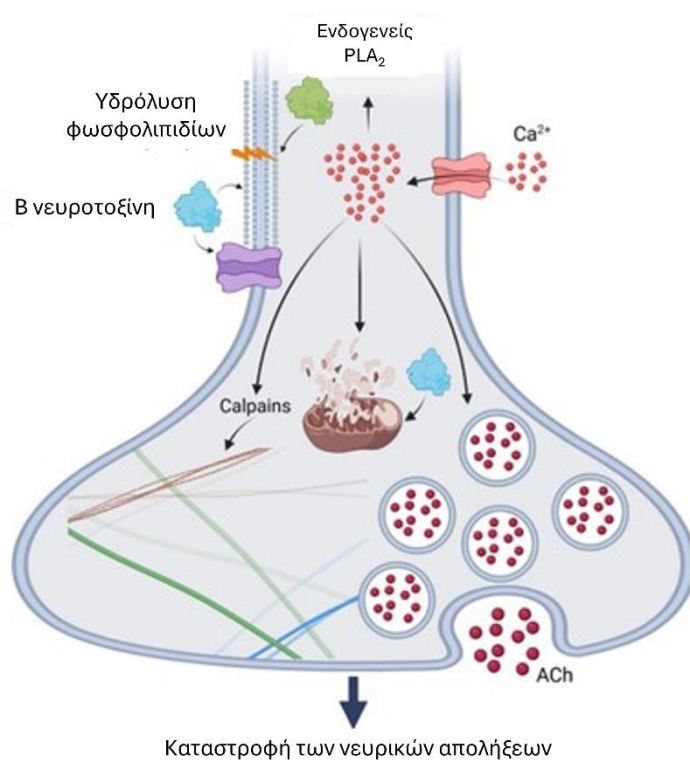


Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης μυοτοξικών PLA₂. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21800-2.00012-9>

1.5.1.2. Νευροτοξικές PLA₂

Οι νευροτοξικές PLA₂ έχουν ως στόχο της προσυναπτική μεμβράνη των κινητικών νευρώνων για αυτό και κοινώς αναφέρονται ως προσυναπτικές νευροτοξίνες ή β-νευροτοξίνες. Οι β νευροτοξίνες είναι μονομερή ή μη ομοιοπολικά σύμπλοκα που περιέχουν 2-5 υπομονάδες με τουλάχιστον μια να είναι φωσφολιπάση A₂ και υδρολύουν φωσφολιπίδια, ειδικά ανιονικά λιπίδια π.χ. φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδικό οξύ και φωσφορυλιωμένες φωσφατιδυλινοσιτόλες. Επίσης μπορούν να προσδεθούν σε ειδικές θέσεις στους ιστούς για να επιτύχουν την νευροτοξική δράση τους²⁵.

Η διατάραξη της νευρομυϊκής σύνδεσης έχει ως αποτέλεσμα την παράλυση, η οποία χαρακτηρίζεται από αποκλεισμό της εξωκυττάρωσης των συναπτικών κυστιδίων τα οποία φέρουν νευροδιαβιβαστές, την μείωση του αριθμού τους στην απόληξη του νευρικού κυττάρου, οίδημα και τέλος εκφυλισμό των μιτοχονδρίων²⁶. Στην περίπτωση των αμμοδυτοξινών οι μελέτες έχουν δείξει ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται τόσο στο N- όσο και στο C-τελικό άκρο παίζουν σημαντικό ρόλο στην κεντρική νευροτοξικότητα²⁷.



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης νευροτοξικών PLA₂.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21800-2.00012-9>

1.5.2. Μεταλλοπρωτεάσες

Οι μεταλλοπρωτεάσες του δηλητηρίου ανήκουν στην οικογένεια των ψευδαργυρο-εξαρτώμενων ενζύμων και αποτελούν μία από τις σημαντικότερες

κατηγορίες τοξινών στα δηλητήρια των οχιών. Έχουν εξελικτική προέλευση από ένζυμα τύπου ADAM/ADAMTS, με αποτέλεσμα να φέρουν υψηλή δομική ομολογία με πρωτεΐνες που φυσιολογικά εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ιστών¹⁰.

Διακρίνονται σε τρεις κύριους τύπους, PI, PII και PIII, ανάλογα με την πρωτεϊνική τους δομή και το μοριακό τους βάρος²⁸. Οι τύπου PI αποτελούνται μόνο από το καταλυτικό τμήμα, οι τύπου PII διαθέτουν επιπλέον έναν τομέα ντισιντεγκρίνης, ενώ οι τύπου PIII φέρουν επιπλέον ένα τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνη, το οποίο συμβάλλει στη δέσμευση στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και την αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Αυτή η ποικιλομορφία στη δομή εξηγεί και την ευρύτητα των βιολογικών τους δράσεων²⁹.

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των SVMPS είναι η αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και του αγγειακού ενδοθηλίου. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, ρήξη τριχοειδών αγγείων και τελικά σε εκτεταμένες αιμορραγίες^{28,30}. Εκτός από την αγγειακή βλάβη, πολλές SVMPS παρεμβαίνουν άμεσα στην αιμόσταση, καθώς κάποιες από αυτές, εμφανίζουν προπηκτική δράση, ενεργοποιώντας παράγοντες πήξης (π.χ. X, IX) και οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αιμορραγικό σύνδρομο³¹. Οι πολλαπλές αυτές επιδράσεις καθιστούν τις SVMPS ιδιαίτερα επικίνδυνες, καθώς η δράση τους είναι πολυεπίπεδη και συχνά συνεργική με άλλες τοξίνες.

Σε είδη όπως η *Vipera ammodytes* και η *Macrovipera schweizeri*, οι SVMPS αποτελούν την κυρίαρχη κατηγορία πρωτεϊνών, γεγονός που εξηγεί τη συχνή εμφάνιση εκτεταμένων αιμορραγιών και νέκρωσης ιστών μετά από δάγκωμα³¹. Επιπλέον, πρωτεωμικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η σχετική τους αφθονία μπορεί να ξεπερνά το 40% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας του δηλητηρίου²⁹.

Πέρα από την κλινική τους σημασία, οι SVMPS παρουσιάζουν και φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η ικανότητά τους να επηρεάζουν την αγγειογένεση και την κυτταρική μετανάστευση τις καθιστά πρότυπα για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων ή αντι-αγγειογενετικών θεραπειών²⁹. Ωστόσο, η ισχυρή τοξικότητά τους περιορίζει προς το παρόν τις θεραπευτικές εφαρμογές, γι' αυτό και η έρευνα εστιάζει σε τροποποιημένες μορφές ή σε συνθετικούς αναστολείς.

1.5.3. Σερινοπρωτεάσες

Οι σερινοπρωτεάσες βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στο δηλητήριο των εχιδών κυρίως ως μονομερείς γλυκοπρωτεΐνες από 26 έως 67 kDa. Αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων αρκετά μελετημένη, η οποία καταλύει ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων σχετικών με τον καταρράκτη της πήξης του αίματος^{32,33}. Παρόλο που εμφανίζουν υψηλή αμινοξική ομολογία μεταξύ τους, διαφέρουν ουσιαστικά ως προς την εξειδίκευση του υποστρώματος τους και κατά συνέπεια και στην φαρμακολογική τους επίδραση.

Η επικρατούσα κατηγορία σερινοπρωτεασών στο δηλητήριο της οικογένειας Viperidae είναι οι σερινοπρωτεάσες που παρουσιάζουν παρόμοια δράση με αυτή της ανθρώπινης θρομβίνης (Thrombine-like SVSP) μετατρέποντας το ινωδογόνο σε ινώδες³⁴. Άλλες κατηγορίες σερινοπρωτεασών ενεργοποιούν παράγοντες πήξης, όπως οι V, VII και XIII, προκαλώντας υπερπηκτικότητα και επεισόδια θρόμβωσης. Επιπλέον, σημαντικό ποσοστό των SVSPs παρουσιάζει πλασμινογόνο-ενεργοποιητική δράση, προάγοντας την ινωδόλυση και συνεπώς αυξάνοντας την πιθανότητα αιμορραγίας. Αυτή η λειτουργική ποικιλότητα εξηγεί γιατί η δηλητηρίαση από οχιά μπορεί να εκδηλωθεί είτε με σοβαρές αιμορραγίες είτε με επεισόδια θρόμβωσης. Στην Ευρώπη, το δηλητήριο της *Vipera ammodytes* έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πλούσιο σε SVSPs, συμβάλλοντας στα αιμορραγικά επεισόδια που παρατηρούνται κλινικά³⁵.

Από ερευνητικής πλευράς, οι SVSPs έχουν προσελκύσει ενδιαφέρον ως πιθανά θρομβολυτικά φάρμακα. Η ομοιότητά τους με φυσιολογικά ένζυμα του αιμοστατικού συστήματος καθιστά εφικτή την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων μορφών με θεραπευτικές εφαρμογές, όπως σε οξύ έμφραγμα ή αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια²⁹. Παρόλο που οι SVMs, SVSPs και PLA₂s αποτελούν τις κυριότερες κατηγορίες τοξινών στα δηλητήρια των οχιών, δεν είναι οι μόνες με βιολογική σημασία.

1.5.4. L-αμινο-οξειδάσες (LAAOs)

Οι LAAOs καταλύουν την οξειδωτική απαμίνωση των L-αμινοξέων, παράγοντας αντίστοιχα α-κετοξέα, αμμωνία και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου, κυρίως H₂O₂, αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στις κυτταροτοξικές, προαποπτωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των LAAOs, ενώ έχει συσχετιστεί και με φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ιστική βλάβη στο σημείο του δήγματος³⁶.

1.5.5. CRiSPs

Πρόκειται για πρωτεΐνες μέσου μοριακού βάρους (~20–30 kDa), πλούσιες σε κυστεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Δομικά, τα CRiSPs χαρακτηρίζονται από δύο κύριες περιοχές: μια N-τελική PR-1 (pathogenesis-related 1) περιοχή και μια C-τελική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία θεωρείται κρίσιμη για τη βιολογική τους δραστηριότητα. Λειτουργικά, τα CRiSPs έχουν συσχετιστεί με ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις, όπως η αναστολή διαύλων ιόντων (κυρίως ασβεστίου και καλίου), η διαταραχή της λείων μυϊκών συσπάσεων και η τροποποίηση της αγγειακής διαπερατότητας, συμβάλλοντας έτσι σε τοπικές και συστηματικές ανεπιθύμητες αντιδράσεις³⁷.

1.5.6. Μικρά πεπτίδια και βιοδραστικά μόρια

Στα δηλητήρια έχουν εντοπιστεί μικρά πεπτίδια με ποικίλες δράσεις, όπως νατριουρητικά πεπτίδια, πεπτιδικοί αναστολείς ενζύμων, πεπτίδια που ενισχύουν τη δράση της βραδυκινίνης (bradykinin-potentiating peptides, BPPs) κ.α. Η υψηλή σταθερότητα και η εξειδικευμένη δράση τα καθιστούν ιδιαίτερα αποτελεσματικά στη γρήγορη πρόκληση φυσιολογικών διαταραχών στο θήραμα, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των πιθανών φαρμακολογικών και θεραπευτικών τους εφαρμογών. Συγκεκριμένα από την κατηγορία των BPPs προήλθε η ανάπτυξη του φαρμάκου captopril, ενός από τους πρώτους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης (ACE inhibitors), που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην αντιμετώπιση της υπέρτασης³⁸.

1.5.7. Λεκτίνες τύπου C (Snaclecs)

Οι λεκτίνες τύπου C είναι μη ενζυμικές πρωτεΐνες που δρουν κυρίως παρεμβαίνοντας στους μηχανισμούς αιμόστασης, μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης με υποδοχείς αιμοπεταλίων ή παράγοντες της πήξης, οδηγώντας είτε σε αναστολή είτε σε παθολογική ενεργοποίησή τους και συμβάλλοντας έτσι σε αιμορραγικές ή θρομβωτικές εκδηλώσεις³⁹.

1.5.8. Ντισιντεγκρίνες

Οι Ντισιντεγκρίνες είναι μικρά, πλούσια σε κυστεΐνη πεπτίδια ή πρωτεΐνες, που προέρχονται συχνά από πρωτεολυτική επεξεργασία μεγαλύτερων μεταλλοπρωτεασών του δηλητηρίου. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία συντηρημένων μοτίβων πρόσδεσης (όπως RGD, KGD ή MLD), τα οποία τους επιτρέπουν να δεσμεύονται σε ιντεγκρίνες της κυτταρικής επιφάνειας, κυρίως των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, διαταράσσουν την προσκόλληση κυττάρων και συμβάλλουν στην αντιπηκτική και αιμορραγική δράση των δηλητηρίων. Επιπλέον η δράση τους τα καθιστά ενδιαφέροντα μόρια στην αντικαρκινική έρευνα⁴⁰.

1.6. Έχιδνες της Ελλάδας- Τοξικολογικό προφίλ

1.6.1. *Vipera ammodytes* (κοινή οχιά)

Θεωρείται το πιο επικίνδυνο είδος της οικογένειας και το δηλητήριό του χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε μεταλλοπρωτεΐνες και φωσφολιπάσες A_2 , που προκαλούν έντονη αιμοτοξικότητα και κυτταροτοξικότητα. Σε ορισμένους πληθυσμούς έχουν περιγραφεί και νευροτοξικές ισομορφές PLA_2 (αμμοδυτοξίνες), που εξηγούν την εμφάνιση νευρολογικών συμπτωμάτων σε ένα μικρό αριθμό περιστατικών^{41,42}.



Εικόνα 4. *Vipera ammodytes*

Σε μελέτες που έχουν γίνει για τα υποείδη *V. a. transcaspica*, *V. a. montandoni*, *V. a. ammodytes* και *V. a. meridionalis* οι κύριες οικογένειες τοξινών που εντοπίστηκαν είναι: οι φωσφολιπάσες A_2 , οι μεταλλοπρωτεάσες (SVMP), οι σερινοπρωτεάσες (SVSP), αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs), L-αμινοξειδάσες (LAAOs), πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνες (CRISPs) και οι λεκτίνες Γ-τύπου (CTLs). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα προαναφερθέντα είδη η κύρια πρωτεΐνη είναι η νευροτοξική PLA_2 νιροξίνη. Η σοβαρότητα των περιστατικών σε συνδυασμό με τη συχνότητα εμφάνισης καθιστούν την *V. ammodytes* το σημαντικότερο είδος οχιάς για τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα.

1.6.2. *Vipera berus* (Αστρίτης)

Η *Vipera berus* είναι η πιο διαδεδομένη οχιά στην Ευρώπη και προκαλεί τα περισσότερα δηλητηριάσματα από οποιοδήποτε άλλο είδος του ίδιου γένους⁷. Εξαιτίας της κλινικής του σημασίας έχει μελετηθεί εκτεταμένα τόσο η σύσταση όσο και τα συμπτώματα που προκαλεί το δηλητήριο της. Το δηλητήριο εμφανίζει κυρίως πρωτεολυτικές, αιμορραγικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Σε μελέτες που έχουν



Εικόνα 5. *Vipera berus*

γίνει σε άτομα διαφορετικών περιοχών της Ευρώπης το δηλητήριο εμφανίζει ποικιλότητα όμως οι επικρατέστερες τοξίνες είναι σερινοπρωτεάσες, οι μεταλλοπρωτεάσες, τα νατριουρητικά πεπτιδία (NP), οι φωσφολιπάσες A_2 , οι πλούσιες σε κυστεΐνες εκκρινόμενες πρωτεΐνες και οι L-αμινοξειδάσες (LAAOs)³⁵

1.6.3. *Macrovipera schweizeri* (οχιά της Μήλου)

Το είδος αυτό είναι ενδημικό των νησιών της Μήλου, Πολυαίγου, Σίφνου και Κιμώλου. Εξαιτίας της περιορισμένης του εξάπλωσης δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν την πρωτεομική ανάλυση του δηλητηρίου μέχρι αυτή τη στιγμή. Τα δήγματα που προκαλούνται από τις οχιές του γένους *Macrovipera* προκαλούν σημαντικά και δυνητικά θανατηφόρα κλινικά συμπτώματα.



Εικόνα 6. *Macrovipera schweizeri*

Στην Ευρώπη παρά το ότι δεν έχουν καταγραφεί θάνατοι από δάγκωμα της *M. schweizeri*, η μελέτη του δηλητηρίου της είναι εξαιρετικά σημαντική, τόσο για την κατανόηση της εξελικτικής διαφοροποίησης των τοξινών σε απομονωμένους πληθυσμούς όσο και για την πιθανή αξιοποίησή του στη φαρμακολογία. Το δηλητήριό της, αν και δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο άλλων ειδών, φαίνεται να είναι πλούσιο σε μεταλλοπρωτεάσες και σερινοπρωτεάσες, προκαλώντας αιματολογικές διαταραχές και πιθανώς ενδοαγγειακή πήξη^{14,43}.

2. Αντιοφικός ορός

Η αρχή της παθητικής ανοσοποίησης, στην οποία βασίζεται η χρήση των αντιοφικών ορών, καθιερώθηκε στο τέλος του 19ου αιώνα από τον Albert Calmette και τον Vital Brazil, και αποτέλεσε μία από τις πρώτες μορφές ανοσοθεραπείας στην ιστορία της ιατρικής. Η εξέλιξη της ανοσοθεραπείας οδήγησε στην ανάπτυξη της μαζικής παραγωγής αντιοφικών ορών και κατέστησε δυνατή τη συστηματική και ασφαλή κλινική χρήση τους, συμβάλλοντας καθοριστικά στη μείωση της θνησιμότητας⁴⁴. Στις μέρες μας, η παραγωγή αντιοφικών ορών διέπεται από αυστηρές διεθνείς προδιαγραφές ποιότητας, οι οποίες βασίζονται στις καλές παραγωγικές πρακτικές (GMP), ενώ παράλληλα εξελίσσονται συνεχώς μέσω σύγχρονων βιοτεχνολογικών τεχνολογιών⁴⁵.

Ο αντιοφικός ορός αποτελείται από πολυκλωνικά αντισώματα ή τμήματά αυτών όπως τα $F(ab')_2$ ή Fab, τα οποία έχουν απομονωθεί από το πλάσμα ζώων – κυρίως αλόγων – που έχουν προηγουμένως ανοσοποιηθεί με δηλητήρια ενός ή περισσότερων ειδών φιδιών.

Η διαδικασία παρασκευής αντιοφικού ορού περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια. Αρχικά, συλλέγονται δηλητήρια από τα είδη-στόχους. Λόγω της σημαντικής ενδοειδικής και γεωγραφικής διαφοροποίησης στη σύνθεση των δηλητηρίων, είναι κρίσιμο τα δείγματα να αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς πληθυσμούς, ώστε να διασφαλιστεί ότι το τελικό προϊόν θα έχει διασταυρούμενη εξουδετερωτική ικανότητα^{44,46,47}. Για τον λόγο αυτό, συχνά δημιουργούνται δεξαμενές δηλητηρίων (venom pools), οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη φαινοτυπική και γεωγραφική ποικιλομορφία του εκάστοτε είδους.

Στη συνέχεια, τα δηλητήρια χορηγούνται σε μεγάλα θηλαστικά σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις, προκειμένου να προκληθεί ισχυρή ανοσολογική απόκριση έναντι των τοξινών του δηλητηρίου^{44,47}. Το πλάσμα που προκύπτει μέσω αιμοληψιών ή πλασμαφαιρέσεων περιέχει υψηλό τίτλο αντισωμάτων και υπόκειται σε σειρά διεργασιών, όπως καθίζηση με καπρυλικό οξύ, υγρή χρωματογραφία και υπερδιήθηση, προκειμένου να απομονωθούν οι επιθυμητές ανοσοσφαιρίνες και να απομακρυνθούν μη ειδικές ή πιθανώς ανεπιθύμητες πρωτεΐνες⁴⁵.

Ανάλογα με την τεχνική πέψης, παράγονται διαφορετικοί τύποι αντιοφικών ορών. Οι ολικές IgG χρησιμοποιούνται σπανιότερα σήμερα λόγω της αυξημένης πιθανότητας πρόκλησης ανοσολογικών αντιδράσεων στα θύματα. Αντίθετα, τα $F(ab')_2$ θραύσματα, τα οποία προκύπτουν από πέψη με πεψίνη, εμφανίζουν παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας (18–72 ώρες) και είναι κατάλληλα για την αντιμετώπιση της συστηματικής αιμοτοξικότητας. Ενώ παράλληλα, τα Fab τμήματα, που παράγονται μέσω παπαΐνης, κατανέμονται ταχέως στον οργανισμό αλλά αποβάλλονται γρηγορότερα (εντός 3–12 ωρών)^{47,48}.

Η κλινική χρήση των αντιοφικών ορών στην Ευρώπη επικεντρώνεται κυρίως στη θεραπεία δηγμάτων από *V. ammodytes*, *V. berus* και *V. aspis*^{7,46,47}. Εγκεκριμένα σκευάσματα όπως τα Viperfav®, Viperatab® και το European Viper Venom Antiserum® έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στη μείωση των αιμοστατικών διαταραχών και στην αντιμετώπιση του εκτεταμένου οιδήματος που προκαλείται από τα δηλητήρια των εν λόγω ειδών^{47,48}. Παράλληλα κλινικές μελέτες καταδεικνύουν ότι τα Viperfav® και Viperatab® παρουσιάζουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα, αλλά διαφοροποιούνται ως προς το προφίλ των ανεπιθύμητων ενεργειών⁴⁸.



Εικόνα 7. Σκευάσματα εμπορικών αντιοφικών ορών.
10.1080/15563650.2020.1726377

Οι κύριες ενδείξεις χορήγησης αντιοφικού περιλαμβάνουν ταχύτατη επέκταση του οιδήματος, διαταραχές της αιμόστασης (όπως παράταση του PT/aPTT, θρομβοπενία) και σοβαρά συστηματικά συμπτώματα, όπως υπόταση, καρδιακές αρρυθμίες ή νευρολογικές διαταραχές^{47,49}. Η έγκαιρη ενδοφλέβια χορήγηση του ορού θεωρείται θεμελιώδους σημασίας για την πρόληψη επιπλοκών και την ταχεία αποκατάσταση της κλινικής εικόνας του ασθενή⁴⁷.

Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, έχουν παραχθεί αντιοφικοί οροί έναντι διαφόρων εχιδνών, ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους, η σύνθεση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεπαρκώς μελετημένα για αρκετά από τα διαθέσιμα σκευάσματα². Επιπλέον, παρά τη μεγάλη τους θεραπευτική σημασία, οι αντιοφικοί οροί εμφανίζουν συχνά αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι παρενέργειες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α. τις *άμεσες αντιδράσεις υπερευαισθησίας*, οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν εντός λίγων λεπτών από την έγχυση και περιλαμβάνουν αναφυλακτικά επεισόδια, που προκύπτουν, είτε από μηχανισμούς IgE-μεσολαβούμενης ανοσοαπόκρισης, είτε από μη ειδική ενεργοποίηση του συμπληρώματος^{45,47} και β. *μεταγενέστερες αντιδράσεις* που μπορεί να εμφανιστούν μετά από 5–15 ημέρες, οι οποίες προκαλούνται από συσσώρευση ανοσολογικών συμπλεγμάτων, τα οποία δεν έχουν καθαριστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Επιπρόσθετα, σε παγκόσμιο επίπεδο εξακολουθούν να παρατηρούνται σοβαρά προβλήματα πρόσβασης σε σκευάσματα αντιοφικών ορών. Η λεγόμενη «κρίση του αντιοφικού ορού» αποδίδεται σε παράγοντες όπως, το υψηλό κόστος παραγωγής, η ανεπαρκής προσφορά και οι δυσλειτουργίες στην εφοδιαστική αλυσίδα, με συνέπεια να δημιουργούνται σοβαρές ανισότητες πρόσβασης, ιδίως σε φτωχότερες περιοχές, με σημαντικές ηθικές και κοινωνικοοικονομικές προεκτάσεις^{45,50}.

2.1. Νέες θεραπευτικές Κατευθύνσεις

Η ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τη θεραπεία του δήγματος φιδιών ώστε να υπερκεραστούν οι περιορισμοί που υφίστανται μέχρι σήμερα όπως η ασφάλεια χορήγησης και η αποτελεσματικότητα έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Η χρήση ανασυνδυασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων και νανοσωματιδίων φαίνεται να προσφέρουν καλύτερη εκλεκτικότητα^{4,44}.

Επιπλέον, μικροί μοριακοί αναστολείς τοξινών, όπως το varespladib (αναστολέας των PLA₂) και το marimastat (αναστολέας των SVMPS), δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως συμπληρωματικά θεραπευτικά μέσα⁵¹. Ενώ, άλλες μελέτες περιλαμβάνουν την παραγωγή αντισωμάτων σε πτηνά και χρήση των IgY αντισωμάτων⁵² ή την ανοσοποίηση με χημικά συντεθειμένους επιτόπους τοξινών όπου χρησιμοποιούνται λογισμικά για την πρόβλεψη και χαρτογράφηση των επιτόπων⁵³.

Παράλληλα, καινοτόμες διαγνωστικές πλατφόρμες, όπως το VipGrade, επιτρέπουν ακριβή ταυτοποίηση του υπεύθυνου είδους και καθοδηγούν τη στοχευμένη επιλογή αντιοφικού ορού, περιορίζοντας την άσκοπη ή αναποτελεσματική χορήγηση του^{54,55}.

3. Αντισώματα και ανοσοποίηση

3.1. Αντιγόνο και αντίσωμα

Ο όρος αντιγόνο αναφέρεται σε οποιαδήποτε ουσία ικανή να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα, προκαλώντας ειδική ανοσολογική απόκριση και την παραγωγή αντισωμάτων ή την ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων⁵⁶⁻⁵⁸. Με άλλα λόγια, τα αντιγόνα είναι μόρια που αναγνωρίζονται ως “ξένα” από τον οργανισμό και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τους υποδοχείς των λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στην έναρξη της ανοσολογικής διαδικασίας.

Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα αντιγόνα κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες:

1. *Εξωγενή αντιγόνα*: Πρόκειται για μόρια που εισέρχονται στον οργανισμό από το εξωτερικό περιβάλλον. Περιλαμβάνουν πρωτεΐνες ή πολυπεπτίδια ιικών και βακτηριακών προελεύσεων, τοξίνες, δηλητήρια ζώων, αλλεργιογόνα και πρωτεϊνικά συστατικά τροφών. Τα αντιγόνα αυτά αναγνωρίζονται από τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (APCs), επεξεργάζονται και παρουσιάζονται σε Τ-λεμφοκύτταρα μέσω των μορίων MHC τάξης II, ενεργοποιώντας την ειδική χυμική ανοσία^{59,60}.
2. *Ενδογενή αντιγόνα*: Αυτά τα αντιγόνα παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα του οργανισμού, συνήθως μετά από μόλυνση από ιούς ή ενδοκυττάρια παθογόνα, ή σε περιπτώσεις γενετικών ή καρκινικών μεταλλάξεων. Αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (CD8⁺) μέσω των μορίων MHC τάξης I. Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως στα αυτοάνοσα νοσήματα, ο οργανισμός αποτυγχάνει να διακρίνει τις δικές του πρωτεΐνες από τα ξένα αντιγόνα. Έτσι, φυσιολογικές δομές του σώματος αναγνωρίζονται εσφαλμένα ως αντιγονικές, οδηγώντας στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων και στην ανάπτυξη αυτοάνοσων αντιδράσεων⁶¹.

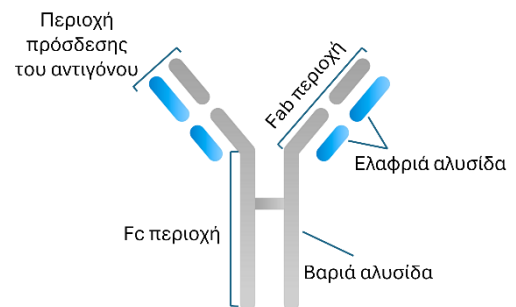
Η ικανότητα μιας ουσίας να δρα ως αντιγόνο εξαρτάται από τη χημική της φύση, τη μοριακή μάζα, την πολυπλοκότητα της δομής και τον τρόπο παρουσίασής της στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα ισχυρότερα αντιγόνα, ακολουθούμενες από τα πολυπεπτίδια και τους πολυσακχαρίτες, ενώ τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα από μόνα τους είναι συνήθως ασθενώς ανοσογόνα, εκτός αν συζευχθούν με πρωτεϊνικούς φορείς⁶².

Τα λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκειμένου να αναγνωρίσουν και να καταπολεμήσουν το ευρύ φάσμα των παθογόνων που ένα άτομο θα συναντήσει, έχουν εξελιχθεί για να αναγνωρίσουν μια πληθώρα διαφορετικών αντιγόνων από βακτήρια, ιούς και άλλους οργανισμούς που προκαλούν ασθένεια. Τα μόρια αναγνώρισης αντιγόνου των Β-κυττάρων είναι οι ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα)

(Immunoglobulins, Ig)^{56,57,63}. Οι ανοσοσφαιρίνες των θηλαστικών κατατάσσονται σε πέντε διαφορετικές τάξεις με βάση τον τύπο των βαριών αλυσίδων γ, α, δ, ε και μ σε IgG, IgA, IgD, IgE και IgM αντίστοιχα^{56,64}.

Τα αντισώματα αποτελούν βασικά μόρια της ειδικής ανοσοαπόκρισης, επιτελώντας δύο κύριες λειτουργίες. Αφενός, αναγνωρίζουν και προσδένονται ειδικά σε μόρια-στόχους παθογόνων μικροοργανισμών (αντιγόνα), και αφετέρου ενεργοποιούν κυτταρικούς και χημικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγούν στην καταστροφή του παθογόνου. Οι δύο αυτές λειτουργίες είναι στενά συνδεδεμένες με τη δομή του μορίου του αντισώματος^{57,63,65}.

Το χαρακτηριστικό σχήμα Υ του αντισώματος προκύπτει από τη διάταξη τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων: δύο βαριές αλυσίδες και δύο ελαφριές αλυσίδες. Οι βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών δεσμών, όπως και κάθε βαριά με μία ελαφριά αλυσίδα. Το τελικό μόριο περιλαμβάνει δύο πανομοιότυπες θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου, επιτρέποντας στο αντίσωμα να δεσμεύει ταυτόχρονα δύο πανομοιότυπους επιτόπους^{64,66}.



Εικόνα 8. Δομή αντισώματος IgG.

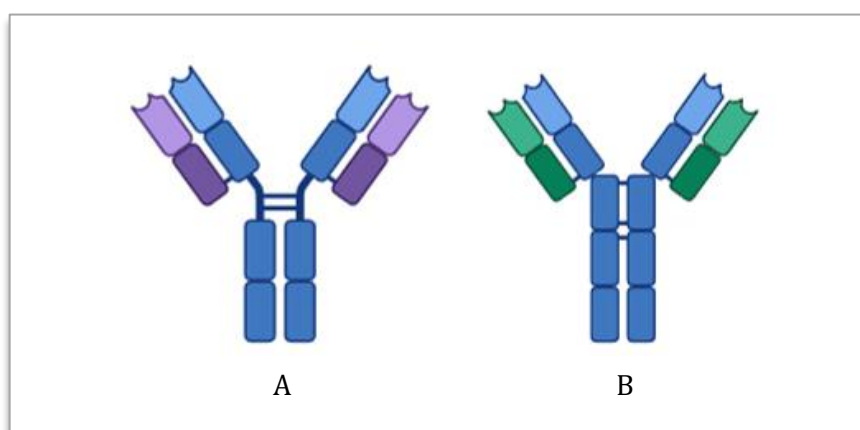
Η περιοχή του αντισώματος που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του αντιγόνου ονομάζεται μεταβλητή περιοχή (V region) διότι εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση από αντίσωμα σε αντίσωμα και βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Αντίθετα, τα τμήματα που εμπλέκονται στη μεσολάβηση των ανοσολογικών λειτουργιών, όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή η σύνδεση με κυτταρικούς υποδοχείς, παρουσιάζουν μικρή μεταβλητότητα και αποτελούν τις σταθερές περιοχές (C regions)^{56,57,66}.

3.2. Η Ανοσοσφαιρίνη IgY

Η ανοσοσφαιρίνη Y (IgY), αντιπροσωπεύει την κυρίαρχη τάξη αντισωμάτων στον ορό των πτηνών, ενώ ταυτόχρονα μεταφέρεται ενεργά στον κρόκο του αυγού, εξασφαλίζοντας παθητική ανοσία στο έμβρυο κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης⁶⁷. Με τον τρόπο αυτό, τα πτηνά αντισταθμίζουν την απουσία μητρικού θηλασμού, εξασφαλίζοντας ότι ο νεοσσός προστατεύεται από λοιμώξεις μέσω έτοιμων μητρικών αντισωμάτων. Εξελικτικά, θεωρείται ότι προέκυψε από έναν κοινό πρόγονο με τις θηλαστικές IgG και IgE, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για τη μελέτη της εξέλιξης του ανοσοποιητικού συστήματος⁵⁶. Η διπλή αυτή παρουσία αποτυπώνει τον

σημαντικό φυσιολογικό της ρόλο αλλά και την πρακτική δυνατότητα απομόνωσής της σε μεγάλες ποσότητες χωρίς επεμβατικές διαδικασίες.

Το μοριακό βάρος της IgY ανέρχεται περίπου στα 180 kDa, σημαντικά μεγαλύτερο από τα ~150 kDa της IgG⁶⁸. Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στην παρουσία τεσσάρων σταθερών περιοχών (CH1–CH4) στις βαριές αλυσίδες, έναντι τριών στις IgG. Το τμήμα Fc του IgY είναι η θέση των περισσότερων βιολογικών και ρυθμιστικών λειτουργιών και το οποίο αποτελείται από δύο πλευρικές αλυσίδες υδατανθράκων, σε αντίθεση με μια μοναδική στο IgG.



Εικόνα 9. Σε παράθεση οι ανοσοσφαιρίνες IgG (A) και IgY (B).

Ένα άλλο κρίσιμο διαφοροποιητικό χαρακτηριστικό είναι η απουσία της εύκαμπτης περιοχής. Η περιοχή αυτή στις IgG των θηλαστικών παρέχει ευκαμψία και δυνατότητα προσαρμογής κατά τη δέσμευση αντιγόνων, ενώ η απουσία της στην IgY προσδίδει μεγαλύτερη ακαμψία αλλά και αυξημένη σταθερότητα⁶⁹. Επιπλέον, η IgY διαθέτει διαφορετική κατανομή φορτίων και μεγαλύτερη υδροφοβικότητα στην Fc περιοχή, στοιχεία που επηρεάζουν τη συμπεριφορά της σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια και με το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η γλυκοζυλίωση των βαρέων αλυσίδων αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό διαφοροποίησης. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι η IgY φέρει N-γλυκάνες τύπου υψηλής μαννόζης και μικτού τύπου, με τελικές προσθήκες όπως σιαλικά οξέα και γαλακτόζη⁷⁰. Οι γλυκοσυλώσεις αυτές βελτιώνουν τη διαλυτότητα, μειώνουν τη συσσωμάτωση και προσδίδουν ανθεκτικότητα απέναντι σε πρωτεολυτικά ένζυμα, συμβάλλοντας στη σταθερότητά της.

Η ανοσοσφαιρίνη μεταφέρεται στα αυγά των ορνίθων με διάφορους τρόπους. IgA και IgM μαζί με άλλες πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ωάριο, μεταφέρονται στο λευκό του αυγού (ίχνη της τάξης των μg). Από την άλλη πλευρά, η IgY μεταφέρεται από

υποδοχείς, επομένως επιλεκτικά, σε μεγάλες ποσότητες στον κρόκο. Η συγκέντρωση IgY στον κρόκο είναι συγκρίσιμη με τη συγκέντρωση IgY στον ορό (6-13 mg/ml) ⁷¹.

3.2.1. Βιοχημικές ιδιότητες και σταθερότητα

Η IgY έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο σταθερή από την IgG σε ορισμένα πειραματικά περιβάλλοντα, αν και παρουσιάζει ευαισθησία στο χαμηλό pH και στις πρωτεάσες του γαστρεντερικού σωλήνα^{69,70}. Η σταθερότητα της μπορεί να βελτιωθεί μέσω της χρήσης σταθεροποιητικών παραγόντων, όπως η σορβιτόλη και η σουκρόζη, οι οποίες προστατεύουν τις πρωτεΐνες από αποδιάταξη κατά την αποθήκευση⁷⁰. Παράλληλα, η τεχνολογία μικροεγκλεισμού (microencapsulation) σε πολυμερή όπως η χιτοσάνη ή το αλγινικό έχει εφαρμοστεί με επιτυχία, προκειμένου να προστατευθεί η IgY από την καταστροφή στο γαστρικό περιβάλλον και να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της κατά την από του στόματος χορήγηση

3.3. Ανοσοποιήσεις

Η ανοσοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού διεγείρεται τεχνητά μέσω της χορήγησης αντιγόνων με στόχο την πρόκληση ισχυρής και ειδικής ανοσολογικής απόκρισης. Στην έρευνα και στη βιομηχανική παραγωγή αντισωμάτων, η ανοσοποίηση αποτελεί το κρίσιμο πρώτο βήμα για την απόκτηση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας έναντι ενός επιλεγμένου αντιγόνου. Η επιλογή του κατάλληλου ζώου για ανοσοποίηση εξαρτάται από το επιθυμητό είδος αντισωμάτων, την απόδοση, το κόστος και την ηθική διάσταση της διαδικασίας.

Η ανάπτυξη και η παραγωγή αντισωμάτων ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησης είναι διαδικασίες οι οποίες επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες και γι αυτό δεν είναι πάντα προβλέψιμο το αποτέλεσμα. Τουλάχιστον τέσσερις μεταβλητές επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση του ανοσοποιημένου ζώου: (1) το αντιγόνο (δόση, MB), (2) ο τύπος του ανοσοενισχυτικού, (3) το ίδιο το ζώο και (4) τα διαστήματα μεταξύ των ανοσοποιήσεων^{67,72}.

3.3.1. Δόση Αντίγονου

Η δόση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τόσο την προκύπτουσα ανοσοαπόκριση όσο και τον τίτλο των αντισωμάτων. Για την ανοσοποίηση των ορνίθων, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι συγκέντρωση αντιγόνου 0,1-1 mg είναι ευνοϊκή για την ανοσοποίηση τους. Παρόλα αυτά, για κάθε αντιγόνο, η βέλτιστη δόση που απαιτείται για μια επιτυχή ανοσοποίηση πρέπει

να δοκιμαστεί πειραματικά⁷². Κατά κανόνα, μικρότερα αντιγόνα όπως είναι τα πεπτίδια (MB κάτω από 10kDa) θα πρέπει να συνδέονται με κατάλληλους φορείς.

3.3.2. Ανοσοενισχυτικά

Η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων διευκολύνεται με τη χρήση ανοσοενισχυτικών (adjuvants) που διεγείρουν τα Β-κύτταρα. Αν και αυτή η διέγερση είναι ανεξάρτητη από το αντιγόνο και επομένως δεν είναι ειδική, το ανοσοενισχυτικό βελτιώνει το μέγεθος της ανοσοαπόκρισης^{56,57}.

Ο σκοπός εφαρμογής ενός ανοσοενισχυτικού είναι:

1. Αύξηση της συνολικής ποσότητας των αντισωμάτων
2. Μείωση της απαιτούμενης ποσότητας του αντιγόνου στις χορηγούμενες δόσεις
3. Μείωση του αριθμού των απαιτούμενων δόσεων
4. Ανοσοενίσχυση σε νεαρά και ηλικιωμένα ζώα
5. Αύξηση της ταχύτητας και της διάρκειας της ανοσοαπόκρισης
6. Πρόκληση ικανοποιητικής κυτταρικής ανοσοαπόκρισης

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες ανοσοενισχυτικών οι οποίες διαφέρουν ως προς τα χημικά χαρακτηριστικά τους, την αποτελεσματικότητά τους στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και τις δευτερογενείς παρενέργειες τους. Τα ανοσοενισχυτικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στα ζώα εφαρμόζονται ως γαλακτώματα νερού σε έλαιο. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην δημιουργία μιας «δεξαμενής» του αντιγόνου στο σημείο χορήγησης, με αργή αποδέσμευση του αντιγόνου και την διέγερση των λεμφοκυττάρων.

Σε αυτά τα γαλακτώματα το αντιγόνο είναι στην υδατική φάση, όπως για παράδειγμα στο πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Freund's Complete Adjuvant, FCA). Το FCA λογίζεται ως ο "χρυσός κανόνας" και είναι το ανοσοενισχυτικό που χρησιμοποιείται συχνότερα στην ανοσοποίηση. Είναι ένα εξαιρετικό, ισχυρό ανοσοδιεγερτικό παρέχοντας καλή ανοσοαπόκριση ακόμη και σε ασθενή αντιγόνα αλλά, δυστυχώς, αυτό το πλεονέκτημα συνδέεται με την πιθανότητα βλάβης του ιστού. Το μη πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (Freund incomplete Adjuvant, FIA) είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το FCA, αλλά οδηγεί σε λιγότερες παρενέργειες^{67,73-75}.

3.3.3. Τρόπος Χορήγησης Του Αντιγόνου

Στις όρνιθες, η ανοσοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες οδούς χορήγησης του αντιγόνου, όπως η υποδόρια, η ενδομυϊκή και η ενδοφλέβια. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος είναι η ενδομυϊκή χορήγηση, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ευκολίας εφαρμογής και της αξιόπιστης πρόκλησης ανοσολογικής απόκρισης.

Ωστόσο, συγκριτικές μελέτες μεταξύ ενδομυϊκής και υποδόριας ανοσοποίησης έχουν δείξει ότι η υποδόρια χορήγηση μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων σε σύγκριση με την ενδομυϊκή⁶⁸. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι είναι δυνατή η -από του στόματος- ανοσοποίηση, παρόλα αυτά με χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων από ότι η ενδομυϊκή χορήγηση. Τέλος, σε περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης, η παροχή του αντιγόνου πρέπει να γίνεται με αργό ρυθμό για την αποφυγή αναφυλακτικής αντίδρασης και χωρίς χρήση ανοσοενισχυτικών^{67,68}.

3.3.4. Διαστήματα Μεταξύ Ανοσοποιήσεων

Η επιτυχία μιας ανοσοποίησης εξαρτάται από αρκετές μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένων των διαστημάτων μεταξύ της πρώτης και δεύτερης αλλά και των επακόλουθων ανοσοποιήσεων. Αρκετά πρωτόκολλα προτείνουν την ανοσοποίηση ανά διαστήματα 10 ημερών, αλλά γενικά συστήνεται το διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης χορήγησης αντιγόνου να είναι τουλάχιστον 4 εβδομάδες. Αυτό αντικατοπτρίζει την ανοσολογική μνήμη, η οποία χρειάζεται χρόνο για να αναπτυχθεί. Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι συχνές ανοσοποιήσεις μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα έχουν ως αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή και όχι την ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης^{67,68}.

3.4. Ανοσοποιήσεις Όρνιθας

Οι όρνιθες έχουν αναδειχθεί ως ένα ιδιαίτερα χρήσιμο και ηθικά αποδεκτό ζωικό μοντέλο για ανοσοποιήσεις με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων. Η ανοσοποίηση των ορνίθων οδηγεί στην παραγωγή ειδικών ανοσοσφαιρινών τύπου IgY, οι οποίες όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μεταφέρονται από το αίμα στον κρόκο του αυγού⁷⁰. Η ιδιαιτερότητα αυτή επιτρέπει τη συλλογή μεγάλων ποσοτήτων ειδικών αντισωμάτων με μη επεμβατικό τρόπο, χωρίς την ανάγκη αιμοληψιών, μειώνοντας έτσι το στρες και ακολουθώντας τις αρχές της ευζωίας των ζώων (3Rs – Replace, Reduce, Refine).⁷⁶

Από οικονομική σκοπιά, η τεχνολογία IgY προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα. Το κόστος συντήρησης των ορνίθων είναι χαμηλότερο συγκριτικά με άλλα εργαστηριακά ζώα, όπως τα κουνέλια, ενώ η παραγωγικότητα τους όσον αφορά τα αντισώματα είναι συγκρίσιμη με εκείνη μεγάλων θηλαστικών, όπως τα πρόβατα και οι αίγες. Μία μόνο κότα μπορεί να παράγει ετησίως 17–35 g συνολικής IgY, εκ των οποίων περίπου το 1–10% είναι ειδικό για το χορηγημένο αντιγόνο⁷⁷.

Τα αντισώματα IgY αρχίζουν να ανιχνεύονται στον ορό και στα αυγά περίπου 10–14 ημέρες μετά την αρχική ανοσοποίηση, ενώ οι τίτλοι κορυφώνονται μετά από 4–6 εβδομάδες⁶⁹. Από εκεί και πέρα, η συλλογή των αυγών παρέχει μια σταθερή και συνεχή πηγή ειδικών αντισωμάτων, με κάθε αυγό να περιέχει 100–150 mg IgY. Το μεγάλο αυτό πλεονέκτημα διαφοροποιεί την τεχνολογία IgY από την κλασική παραγωγή IgG σε

θηλαστικά, όπου απαιτούνται συχνές αιμοληψίες και συχνά σκληρές επεμβατικές διαδικασίες⁶⁷.

Επιπλέον, η IgY δεν αλληλεπιδρά με Fc υποδοχείς θηλαστικών και επίσης εξαιτίας της εξελικτικής απόστασης των πτηνών από τα θηλαστικά, τα αντισώματα IgY δεν αλληλεπιδρούν με ρευματοειδείς παράγοντες, ούτε με πρωτεΐνες A και G, χαρακτηριστικά που μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε ορισμένες ανοσοχημικές δοκιμασίες. Σε λειτουργικό επίπεδο, η IgY δεν ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος, γεγονός που την καθιστά λιγότερο φλεγμονώδη όταν χορηγείται σε ετερόλογους οργανισμούς χαρακτηριστικό που της προσδίδει ιδιαίτερο θεραπευτικό ενδιαφέρον, ιδίως για διαγνωστικές ή παθητικές ανοσοθεραπείες στον άνθρωπο^{69,72}.

Η IgY χρησιμοποιείται ευρέως σε τεχνικές όπως η ELISA, το Western blot και η ανοσοϊστοχημεία, με ενισχυμένη ειδικότητα και χαμηλότερο background⁷⁸. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι IgY που στοχεύουν βακτηριακά αντιγόνα, όπως αυτά του *Helicobacter pylori*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαγνωστικές πλατφόρμες με εξαιρετική ευαισθησία⁷⁹. Επίσης, έχουν παραχθεί IgY αντισώματα εναντίον ιών, συμπεριλαμβανομένου του SARS-CoV-2, που μπορούν να εφαρμοστούν τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο⁸⁰. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί IgY αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένες τοξίνες, με σκοπό τη χρήση τους ως εναλλακτικά ή συμπληρωματικά μέσα στους κλασικούς αντιοφικούς ορούς. Τέλος η έρευνα επικεντρώνεται επίσης σε ανασυνδυασμένες μορφές IgY, αντισώματα όπως μονοκλωνικά αντισώματα και υβρίδια IgY-scFv, τα οποία θα μπορούσαν να συνδυάσουν την υψηλή εξειδίκευση με βελτιωμένη φαρμακοκινητική⁸¹.

Ωστόσο, παρά τα σημαντικά αυτά πλεονεκτήματα, η IgY δεν είναι απαλλαγμένη περιορισμών. Η αστάθειά της σε όξινο pH και η ευαισθησία της σε πρωτεάσες περιορίζουν τη χρήση της σε θεραπείες που απαιτούν από του στόματος χορήγηση. Ένα ακόμη εμπόδιο αποτελεί η περιορισμένη κατανόηση της φαρμακοκινητικής της IgY σε θηλαστικά και στον άνθρωπο. Η ταχεία αποβολή από την κυκλοφορία και η έλλειψη σύνδεσης με υποδοχείς Fc δυσχεραίνουν τη διατήρηση της θεραπευτικής της δράσης, και καθιστούν απαραίτητη τη διενέργεια περαιτέρω μελετών για την αξιολόγηση της συστηματικής αποτελεσματικότητάς της⁷⁷.

Παράλληλα και παρά την πρόοδο σε αυτόν τον τομέα, δεν έχει ακόμη καθιερωθεί διεθνές πρότυπο για την παραγωγή IgY. Αυτό έχει ως συνέπεια την εμφάνιση μεταβλητότητας μεταξύ εργαστηρίων, όσον αφορά τη μέθοδο καθαρισμού, την τελική καθαρότητα και τη βιοδραστικότητα των παρασκευασμάτων. Επιπλέον, η απουσία τυποποίησης αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για την ευρεία εφαρμογή της τεχνολογίας IgY σε κλινικό και διαγνωστικό επίπεδο, και υπογραμμίζει την ανάγκη για την ανάπτυξη

κοινώς αποδεκτών πρωτοκόλλων που θα διασφαλίζουν τη συγκρισιμότητα και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων⁷⁷.

3.5. Απομόνωση και καθαρισμός αντισωμάτων IgY

Μετά την ανοσοποίηση γίνεται συλλογή των αυγών και ο κρόκος διαχωρίζεται προσεκτικά από το ασπράδι. Για την αφαίρεση τυχόν υπολειμμάτων ο κρόκος ξεπλένεται με νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί όπου και διαρρηγνύεται η μεμβράνη του ώστε να απελευθερωθεί το περιεχόμενο του. Στη συνέχεια ο κρόκος συλλέγεται και γίνεται καταγραφή του όγκου του. Ακολουθεί απολιπίδωση μέσω χημικών ή φυσικών διεργασιών, που απομακρύνουν το μεγαλύτερο μέρος των λιποπρωτεϊνών.

3.5.1. Μέθοδοι απολιπίδωσης

Αραίωση με νερό χαμηλής ιονικής ισχύος (water dilution method)

Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε καθίζηση των λιποπρωτεϊνών λόγω μεταβολής της ιονικής ισορροπίας⁸² επιτρέποντας την ανάκτηση του υδατοδιαλυτού κλάσματος (**Water Soluble Fraction – WSF**) του κρόκου στο οποίο η ποσότητα του IgY αυξάνεται ενώ η ποσότητα των λιποπρωτεϊνών μειώνεται. Η μέθοδος περιλαμβάνει και τη κατάψυξη του αραιωμένου κρόκου κατά την οποία σχηματίζονται λιπιδικά συσσωματώματα τα οποία είναι εύκολο να απομακρυνθούν με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια η εκχύλιση των αντισωμάτων γίνεται με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλύματος NaCl.

Χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG Precipitation)

Η πολυαιθυλενογλυκόλη αποτελεί ένα πολυμερές του αιθυλενοξειδίου και χρησιμοποιείται για την καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών. Η πολυαιθυλενογλυκόλη 6000–8000 χρησιμοποιείται για επιλεκτική καθίζηση πρωτεϊνών, επιτυγχάνοντας απομόνωση με υψηλή καθαρότητα και σταθερότητα⁸³. Η καθίζηση με PEG είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους καθαρισμού IgY. Η σταδιακή προσθήκη PEG αυξάνει την ιονική ισχύ του διαλύματος, προκαλώντας την καθίζηση των πρωτεϊνών με ελεγχόμενο τρόπο. Με PEG 3,5–8%, απομακρύνονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ σε συγκεντρώσεις 12–13% καθιζάνουν τα IgY⁸³. Μετά την καθίζηση, το ίζημα φυγοκεντρείται και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα.

3.5.2. Μέθοδοι Καθαρισμού των IgY

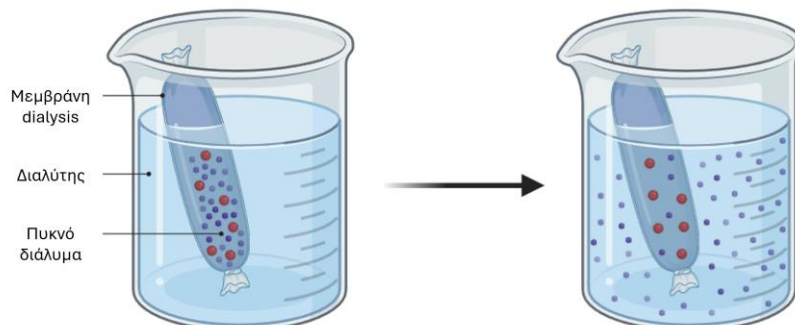
3.5.2.1. Διαπίδυση (Dialysis)

Η διαπίδυση αποτελεί μια από τις πλέον απλές και ήπιες τεχνικές καθαρισμού και απομάκρυνσης μικρών μορίων από πρωτεϊνικά διαλύματα. Η μέθοδος βασίζεται

στην επιλεκτική διάχυση ουσιών μέσα από ημιπερατή μεμβράνη (κυτταρίνη ή συνθετική)⁸⁴ η οποία επιτρέπει τη διέλευση μορίων χαμηλού μοριακού βάρους (όπως άλατα, πρωτεΐνες ή υπολείμματα PEG), ενώ συγκρατεί τα μακρομόρια, όπως τα αντισώματα IgY⁸⁵.

Το διάλυμα IgY επαναδιαλύεται σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετείται μέσα σε μεμβράνη διαπίδυσης κατάλληλου MWCO. Η μεμβράνη τοποθετείται σε μεγάλο όγκο ρυθμιστικού υπό ήπια ανάδευση. Το εξωτερικό διάλυμα αντικαθίσταται 3–5 φορές κάθε 2–3 ώρες ή καθ' όλη τη διάρκεια 24 ωρών, μέχρι να επιτευχθεί πλήρης απομάκρυνση των μικρών μορίων. Η μετακίνηση των μικρών μορίων από το εσωτερικό της μεμβράνης διαπίδυσης προς το εξωτερικό διάλυμα συνεχίζεται μέχρι την επίτευξη ισορροπίας συγκεντρώσεων⁸⁶.

Στην περίπτωση των IgY αντισωμάτων, η διαπίδυση χρησιμοποιείται ευρέως ως τελικό στάδιο καθαρισμού μετά από μεθόδους καθίζησης (π.χ. με PEG ή θειικό αμμώνιο), με στόχο την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών στο διάλυμα και την επαναφορά των αντισωμάτων σε φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. PBS). Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν επιδιώκεται η διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των IgY, καθώς δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες ή ακραίες χημικές συνθήκες⁸⁷.



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση διαπίδυσης. Τα μικρά μόρια (μπλε χρώμα) διαχέονται στο διάλυμα ενώ τα μεγάλα μόρια (κόκκινο χρώμα) συγκρατούνται στην μεμβράνη.

3.5.2.2. Χρωματογραφικές Τεχνικές

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography – IEX)

Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την απομόνωση και καθαρισμό IgY από τα εκχυλίσματα του κρόκου. Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια των πρωτεϊνών και των ιοντικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα της στήλης.

Στην περίπτωση των IgY, η πρωτεΐνη φέρει αρνητικό καθαρό φορτίο σε pH άνω του ισοηλεκτρικού της σημείου ($pI \approx 5,7$). Έτσι, συνδέεται σε ανιοντοανταλλακτικά υλικά όπως οι ρητίνες DEAE-Sepharose, Q-Sepharose ή Mono Q. Το δείγμα (WSF) «φορτώνεται» σε στήλη εξισορροπημένη με ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. Tris-HCl ή PBS, pH 8,0), όπου οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες των IgY έλκονται από τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της στήλης. Η εκλούση επιτυγχάνεται είτε με σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος (π.χ. αύξηση συγκέντρωσης NaCl), είτε με βαθμιαία μεταβολή του pH, που αποδυναμώνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Η τεχνική αυτή προσφέρει υψηλή ικανότητα φόρτωσης, αναπαραγωγιμότητα και ήπιες συνθήκες, διατηρώντας την ακεραιότητα και τη βιοδραστικότητα των IgY. Επιπλέον, επιτρέπει την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των μη-ειδικών πρωτεϊνών του κρόκου, όπως η λιποβιτελλίνη και οι φωσβιτεΐνες. Σε βελτιστοποιημένες συνθήκες, η καθαρότητα μπορεί να υπερβαίνει το 90%, ενώ η τελική απόδοση εξαρτάται από τον βαθμό απολίπανσης και το pH του δείγματος^{85,88}.

Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography)

Η χρωματογραφία συγγένειας εκμεταλλεύεται την εκλεκτική αλληλεπίδραση μεταξύ του IgY και ενός ειδικού συνδετικού μορίου (ligand) προσδεδεμένου στη στήλη. Επειδή τα IgY δεν δεσμεύονται από την πρωτεΐνη A ή G (που χρησιμοποιούνται για καθαρισμό θηλαστικών IgG), απαιτείται η χρήση ειδικών ligands με διαφορετική χημεία, όπως για παράδειγμα:

- Πρωτεΐνη L, η οποία συνδέεται με τα ελαφρά κλάσματα (VL) ορισμένων τύπων IgY, αν και όχι πάντα αποτελεσματικά.
- Στήλες με προσδεδεμένα αντι-IgY πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα, που προσφέρουν υψηλή εκλεκτικότητα αλλά αυξημένο κόστος.
- Συνθετικά μόρια, όπως κατεχολικά παράγωγα, που μιμούνται φυσικούς υποδοχείς των IgY και παρουσιάζουν σημαντική εκλεκτικότητα.

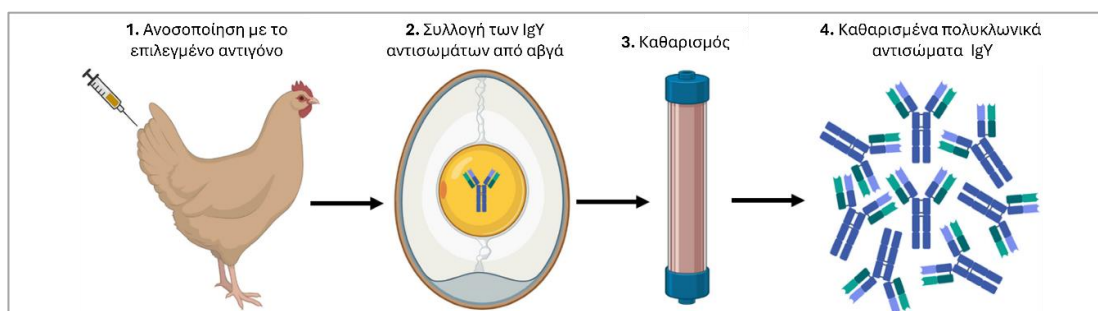
Η έκλουση γίνεται με ήπια μεταβολή του pH (π.χ. pH 2,7–3,0) ή με αύξηση της ιονικής ισχύος, χωρίς να προκαλείται αποδιάταξη των αντισωμάτων. Η χρωματογραφία συγγένειας παρέχει την υψηλότερη καθαρότητα (πάνω από 95–98%), αλλά το υψηλό κόστος των στηλών και η ανάγκη αναγέννησης περιορίζουν τη χρήση της σε αναλυτικές ή ερευνητικές εφαρμογές.

Σε πρόσφατες μελέτες έχουν αναπτυχθεί επαναχρησιμοποιήσιμες μήτρες πολυμερικής βάσης (π.χ. Sepharose 4B–CL ή Toyopearl) με προσδεδεμένα ειδικά τμήματα πρωτεϊνών που μπορούν να δεσμεύσουν τα IgY και επιτρέπουν υψηλή απόδοση και σταθερότητα μετά από πολλούς κύκλους χρήσης^{89,90}.

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Gel Filtration/Size Exclusion Chromatography – SEC)

Η SEC βασίζεται στον διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Οι πρωτεΐνες διέρχονται μέσα από πορώδεις σφαίρες γέλης (π.χ. Sephadex G-200, Superdex 200 ή Sephacryl S-300), όπου τα μεγάλα μόρια, όπως τα IgY (~180 kDa), αποκλείονται από τους μικρούς πόρους και εκκλύονται πρώτα, ενώ οι μικρότερες πρωτεΐνες καθυστερούν.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συνήθως ως τελικό στάδιο, μετά από άλλες μεθόδους καθαρισμού, για την απομάκρυνση χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών, αλάτων ή υπολειμμάτων PEG/αμμωνιακών αλάτων. Παρότι η SEC έχει χαμηλότερη ικανότητα δέσμευσης και μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης, παρέχει εξαιρετικά ήπιες συνθήκες, ιδανικές για τη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των IgY. Σε συνδυασμό με ιοντοανταλλακτική ή affinity χρωματογραφία, μπορεί να προσφέρει καθαρότητα άνω του 98%, με ελάχιστη απώλεια προϊόντος⁹¹.



Εικόνα 11. Διαδικασία παραγωγής πολυκλωνικών αντισωμάτων IgY⁷⁷.

4. Ανοσοπροσδιορισμοί

Οι ενζυμικές μέθοδοι ανοσοπροσδιορισμού ταξινομούνται σε δύο γενικές κατηγορίες ως ομογενείς και ως ετερογενείς. Στις ομογενείς μεθόδους, τα ένζυμα καθίστανται ανενεργά όταν συνδέονται στο αντιγόνο και έτσι δεν υπάρχει στάδιο (έκπλυσης) όπου τα μη προσδεμένα συστατικά να διαχωρίζονται από τα συνδεδεμένα συμπλέγματα. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την μέτρηση μορίων μικρού μοριακού βάρους όπως θεραπευτικά φάρμακα^{92,93}.

Οι ετερογενείς μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρύτερα και διαχωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες. Σε αυτές τις μεθόδους, μετά την πρόσδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα ακολουθεί ένα στάδιο έκπλυσης για να διαχωριστεί το προσδεμένο αντιγόνο από το ελεύθερο προκειμένου να παρεμποδιστεί οποιαδήποτε παρεμβολή στην μέτρηση καθώς επισημασμένο μόριο διατηρεί το αναλυτικό σήμα αμετάβλητο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μορίων μεγάλου μοριακού βάρους τα οποία διαθέτουν αρκετούς επιτόπους. Η ELISA ανήκει στις ετερογενείς μεθόδους ανοσοπροσδιορισμού και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων και διαλυτών αντιγόνων^{92,94}.

4.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι: (**α**) κυρίως, η υψηλότερη ευαισθησία της και η επαναληψιμότητά της και (**β**) η μη χρήση ραδιενέργειας, όπως στις μεθόδους RIA (*Radioimmunoassay*)^{92,95,96}.

Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η άμεση, η ELISA τύπου Sandwich και η ανταγωνιστική. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, *ImmunoSorbent*), (2) η χρήση κατάλληλων πρωτεϊνών για την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων προσρόφησης (3) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (*Enzyme-Linked*) αντισώματος, (4) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) το οποίο απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, και (5)

η έκπλυση της πλάκας μετά από κάθε στάδιο κρίνεται απαραίτητη για την απομάκρυνση όλων των συστατικών που δεν έχουν δεσμευτεί και μπορεί να προκαλέσουν παρεμπόδιση του σήματος.

4.1.1. Στάδια Της Μεθόδου

A. Πρόσδεση/Ακίνητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση)

Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεή επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω χημικού δεσμού (προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αгарόζης, πολυακρυλαμιδίου) ή μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια, μικροπλάκες: πολυστυρενίου, πολυβινυλίου ή πολυπροπυλενίου). Μειονέκτημά του δεύτερου τρόπου αποτελεί η διαφορά προσρόφησης του αντιγόνου ή αντισώματος που μπορεί να εμφανίζουν τα διαφορετικά είδη μικροπλάκων ή τα διαφορετικά πηγαδάκια της ίδιας πλάκας. Ωστόσο, η χρήση πρωτεϊνών για τον αποκλεισμό της μη ειδικής προσρόφησης και απορρυπαντικών κατά τις επωάσεις και τις εκπλύσεις καθιστούν το προαναφερόμενο πρόβλημα αμελητέο.

B. Χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος

Η χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA, σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιενέργεια για την ανίχνευση των προϊόντων. Η σύζευξη ενζύμων στα αντισώματα προβλέπει το σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει το αντιγόνο αλλά ούτε την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP), η αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου.

Γ. Χρήση χρωμογόνου υποστρώματος

Η ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος που αντιδρά με το ένζυμο, παράγοντας έγχρωμο προϊόν. Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή του κατάλληλου ενζύμου-υποστρώματος είναι: (α) η απαιτούμενη ευαισθησία, ο τύπος των απαιτούμενων οργάνων και η διαθεσιμότητά τους, (β) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και (γ) η ενζυμική δραστηριότητα να μην

επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος. Μερικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι: η P-νίτρο-φαίνυλο φωσφατάση η παράγει ένα κίτρινο χρώμα και στα 405-410 nm και το TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) το οποίο παράγει ένα μπλέ χρώμα και απορροφά στα 650 nm.

Δ. Ανίχνευση προϊόντος

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση το προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Μολονότι, η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Ο λόγος της ευρύτατης χρήσης τους είναι ότι παρέχουν: **(1)** γρήγορη οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων, **(2)** σταθερότητα του έγχρωμου προϊόντος για αρκετό χρόνο μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης και **(3)** απλή και οικονομική μέτρηση μέσω φωτομέτρησης. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (*Optical Density, OD*) των δειγμάτων.

Βασικό ρόλο στην ακρίβεια της δοκιμασίας διαδραματίζει ο χρόνος ανάπτυξης του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, ο οποίος κυμαίνεται ανάλογα με την ενζυμική δράση και την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (οξέος ή βάσης). Έτσι, η ακρίβεια βασίζεται αφενός στην προσθήκη του διαλύματος τερματισμού στην κατάλληλη χρονική στιγμή και αφετέρου στην προσθήκη σταθερού όγκου του προαναφερόμενου διαλύματος^{92,96,97}.

4.1.2. Τύποι ELISA

Άμεση ELISA

Η άμεση ELISA είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας αντιγόνων μεγάλου μοριακού βάρους. Η επιφάνεια της πλάκας επιστρώνεται απευθείας με το αντιγόνο ή το αντίσωμα και στη συνέχεια ένα ενζυμικά επισημασμένο αντίσωμα ή αντιγόνο καθιστά ικανή την μέτρηση. Η δοκιμασία είναι επωφελής καθώς η πιθανότητα λάθους είναι μικρή λόγω της εφαρμογής ενός μικρότερου αριθμού σταδίων σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ELISA⁹⁴.

Έμμεση ELISA

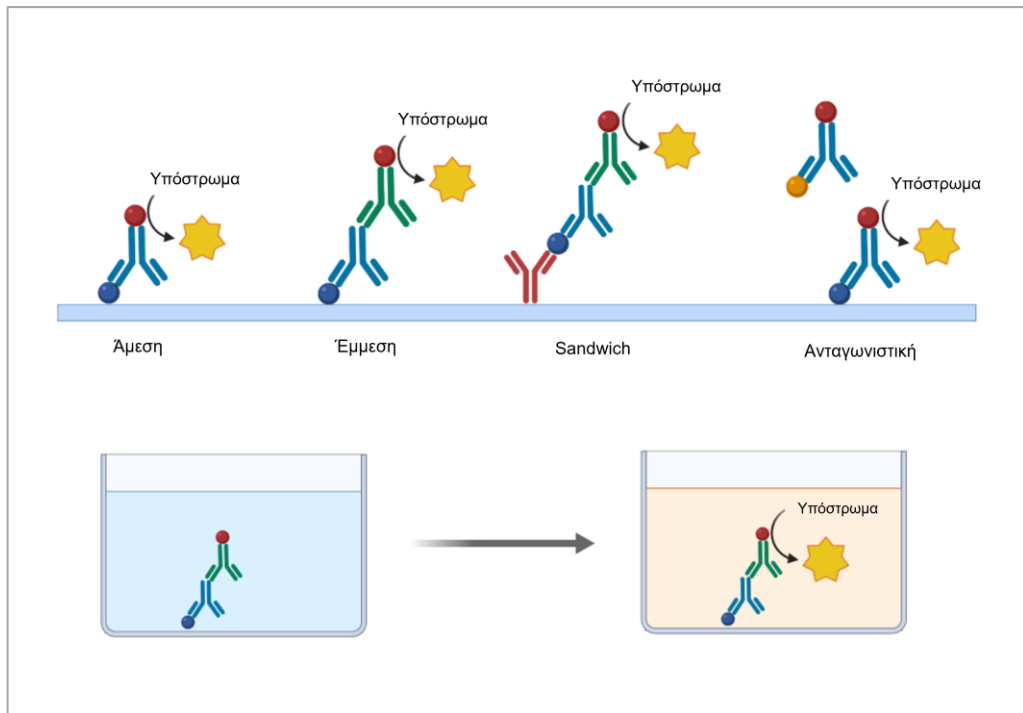
Η έμμεση μέθοδος ELISA παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία δεδομένου ότι χρησιμοποιεί επισημασμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αλληλεπιδρά με ένα πρωτογενές αντίσωμα. Η ποσότητα του ενζύμου που θα προσκολληθεί στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο "αντιγόνο-αντίσωμα-ενζυμοσυζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα" είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό εξέταση αντισώματος στο βιολογικό υγρό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν τίτλος αντισώματος. Η παραλλαγή αυτή εφαρμόζεται για: (α) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λοιμογόνων παραγόντων, όπως ο ιός HIV, (β) προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ή ανοσοποίηση ζώων, (γ) ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, (δ) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αλλεργιογόνων και (ε) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, όπως στην περίπτωση της λείσμανιάσης^{93,94,96}.

ELISA SANDWICH

Η ELISA τύπου Sandwich χαρακτηρίζεται από τη χρήση δύο διαφορετικών αντισωμάτων: το αντίσωμα σύλληψης και το αντίσωμα ανίχνευσης. Κάθε αντίσωμα είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο έναντι του επιτόπου ενός αντιγόνου και ο προσδιορισμός βρέθηκε ότι είναι πιο κατάλληλος για αντιγόνα που έχουν δύο επιτόπους. Η ποσότητα του δευτέρου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Καθώς η σχετική πρωτεΐνη βρίσκεται κολλημένη μεταξύ δύο αντισωμάτων η μέθοδος καλείται sandwich. Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργιών^{95,97}.

Ανταγωνιστική ELISA

Οι ανταγωνιστικές ELISA χαρακτηρίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεά επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση στο αντίσωμα. Το αντιγόνο σε διαλυτή μορφή αναμειγνύεται με περίσσεια ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος. Το μείγμα συνεπιάζεται με το ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια αντιγόνο, σε συνθήκες που επιτρέπουν να αναπτυχθεί ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου και του διαλυτού αντιγόνου για την πρόσδεση με το αντίσωμα. Η ενζυμική αντίδραση είναι μέγιστη απουσία του διαλυτού αντιγόνου και μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσής του⁹⁸.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των διάφορων τύπων ELISA.

5. Φορείς

Τα μικρού μήκους συνθετικά πεπτιδία είναι ικανά να μιμηθούν γραμμικούς και, σε ορισμένες περιπτώσεις, διαμορφωτικούς επίτοπους πρωτεϊνών. Χάρη σε αυτή την ικανότητα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοπροσδιορισμούς στερεάς φάσης ή ως ανοσογόνα στη θέση πολύπλοκων φυσικών αντιγόνων, τα οποία συχνά είναι δύσκολο να απομονωθούν και να παρασκευαστούν σε επαρκείς ποσότητες. Έχει αποδειχθεί ότι τέτοιοι συνθετικοί επίτοποι είναι ικανοί να προκαλέσουν την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων⁹⁹.

Ωστόσο, λόγω του μικρού τους μοριακού μεγέθους, τα πεπτιδία δεν διαθέτουν εγγενή ανοσογονικότητα και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να προκαλέσουν επαρκή ανοσολογική απόκριση χωρίς κατάλληλη ενίσχυση. Για να καταστούν αποτελεσματικά ανοσογόνα, πρέπει να συζευχθούν με έναν πρωτεϊνικό φορέα, όπως η αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) ή η αιμοκυανίνη, που λειτουργούν ως ισχυροί φορείς ανοσοδιέγερσης^{73,100}. Παρ' όλα αυτά, η σύζευξη με φυσικούς πρωτεϊνικούς φορείς ενέχει σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η παραγωγή ανοσολογικής απόκρισης εναντίον του ίδιου του φορέα, η απώλεια της διαμόρφωσης του επιτόπου, ή ακόμη και μεταβολές των βιολογικών ιδιοτήτων του πεπτιδίου. Επιπλέον, ένας μεμονωμένος πεπτιδικός επίτοπος αντιπροσωπεύει συνήθως μικρό μόνο τμήμα της πρωτεΐνης και μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία περιορισμένου αριθμού ειδικών αντισωμάτων.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω περιορισμών, έχουν αναπτυχθεί συνθετικοί φορείς, οι οποίοι προσφέρουν μεγαλύτερη ευελιξία και καθορισμένη δομή. Ο σχεδιασμός ενός τέτοιου φορέα στοχεύει στην ταυτόχρονη παρουσίαση επιτόπων B και T κυττάρων, προκειμένου να επιτευχθεί ισχυρή και ειδική ανοσολογική απόκριση. Ιδιαίτερη σημασία έχει η γεωμετρία και το μήκος των αντιγονικών τμημάτων που προσδένονται στον φορέα, καθώς τα B-κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα με βάση τη διαμόρφωση τους στον χώρο. Συστήματα όπως το Multiple Antigen Peptide System (MAPs), που βασίζεται σε διακλαδισμένες πολυλυσίνες, και το Template-Assembled Synthetic Protein (TASP) έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως τεχνητοί φορείς για την ενίσχυση της ανοσογονικότητας των συνθετικών πεπτιδίων.

Μια άλλη κατηγορία συνθετικών φορέων είναι οι Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers – SOCn), οι οποίοι διαθέτουν προκαθορισμένη δευτεροταγή δομή. Ο βασικός στόχος του σχεδιασμού τους είναι η δημιουργία ενός σταθερού τρισδιάστατου σκελετού, που επιτρέπει στα προσδεδεμένα πεπτιδία να τοποθετούνται σε καθορισμένο προσανατολισμό και να διατηρούν τη φυσική τους δομή. Η κανονικότητα της δευτεροταγούς δομής του φορέα εξασφαλίζει τη σταθερότητα και ανεξαρτησία των επιτόπων, αποτρέποντας ανεπιθύμητες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ή με το ίδιο το υπόστρωμα. Έτσι, η αναγνώριση από τα αντισώματα ή η επεξεργασία από τα ανοσοκύτταρα είναι πιο αποτελεσματική, οδηγώντας σε ισχυρότερες και πιο εξειδικευμένες ανοσολογικές αποκρίσεις¹⁰¹.

Οι φορείς SOCn περιλαμβάνουν ως δομικό συστατικό το αμινοξύ α-άμινο ισοβουτυρικό οξύ (Aib), ένα τετραυποκατεστημένο ανάλογο της αλανίνης, γνωστό για την ικανότητά του να σταθεροποιεί ελικοειδείς διαμορφώσεις εξαιτίας των στερικών παρεμποδίσεων των δύο μεθυλομάδων του στο άτομο του α-άνθρακα. Επιπλέον, επειδή το Aib δεν απαντάται φυσικά, τα πεπτίδια που το περιέχουν εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην πρωτεολυτική διάσπαση¹⁰². Ένας χαρακτηριστικός φορέας, ο SOCn-I, βασίζεται στο επαναλαμβανόμενο μοτίβο (-Lys-Aib-Gly-): η λυσίνη παρέχει το σημείο πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου μέσω της πλευρικής αμινομάδας της, ενώ η γλυκίνη επιλέγεται για τον μικρό στερεοχημικό της όγκο.

Σε συνέχεια του SOCn-I, σχεδιάστηκε ο φορέας CPSOC (Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂), με στόχο τη σύζευξη βιοδραστικών πεπτιδίων ή φαρμάκων μέσω σχηματισμού θειοαιθερικών ή δισουλφιδικών δεσμών. Στην περίπτωση αυτή, η κυστεΐνη αντικατέστησε τη γλυκίνη, προκειμένου να μπορεί να γίνει ο επιθυμητός θειοαιθερικός ή δισουλφιδικός δεσμός^{103,104}.

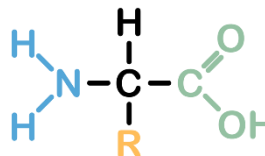
Τα SOCn συμπλέγματα έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπία ¹H-NMR (π.χ. COSY, NOESY), η οποία έδειξε ότι οι φορείς διατηρούν την ελικοειδή τους δομή ακόμη και μετά την πρόσδεση των πεπτιδικών επιτόπων. Το σημαντικότερο εύρημα είναι ότι οι προσδεδεμένοι επίτοποι παραμένουν τοπολογικά ανεξάρτητοι, χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα, διατηρώντας την «ενεργή» τους διαμόρφωση. Αυτή η ιδιότητα εξασφαλίζει καλύτερη αναγνώριση από τα αντισώματα σε ανοσοχημικές τεχνικές και αποτελεσματική παρουσίαση στα ανοσοκύτταρα, οδηγώντας σε ισχυρή και ειδική ανοσολογική απόκριση.

Πλήθος βιολογικών μελετών έχουν καταδείξει ότι τα SOC/CPSOC-συμπλέγματα λειτουργούν επιτυχώς τόσο ως αντιγονικά υποστρώματα σε διαγνωστικές ανοσοχημικές μελέτες όσο και ως ανοσογόνα σε πειράματα ανοσοποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν: (α) την ανάπτυξη αξιόπιστων και επαναλήψιμων διαγνωστικών δοκιμασιών υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, και (β) την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν όχι μόνο τα συνθετικά σύμπλοκα, αλλά και τις αντίστοιχες φυσικές πρωτεΐνες, επιβεβαιώνοντας έτσι τη λειτουργική μίμηση των επιτόπων^{105–109}.

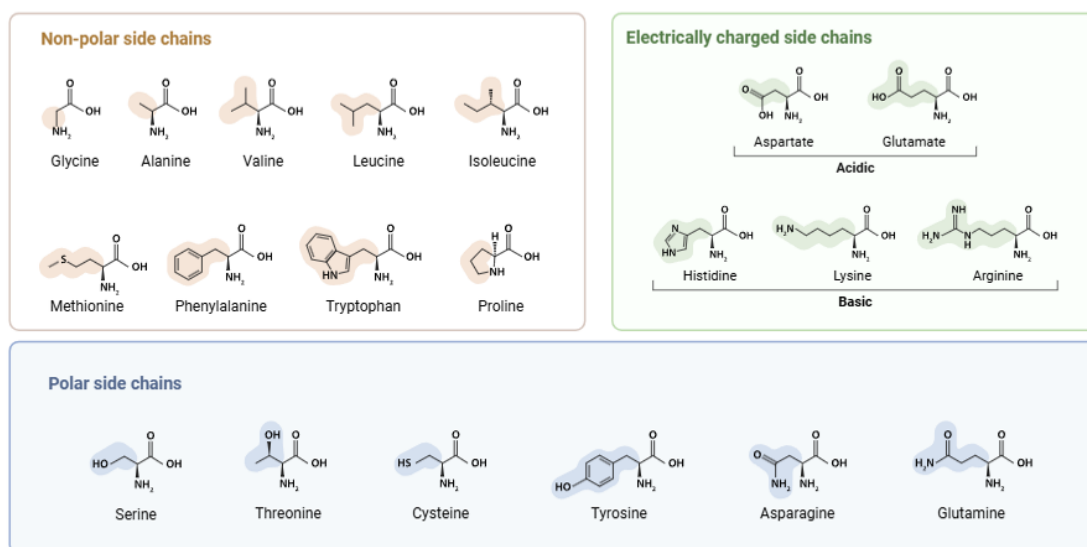
6. Πεπτιδική σύνθεση

6.1. Αμινοξέα, Πεπτίδια και Πρωτεΐνες

Τα αμινοξέα είναι α-άμινο καρβοξυλικά οξέα, τα οποία αποτελούν τις θεμελιώδεις δομικές μονάδες των πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Κάθε αμινοξύ διαθέτει έναν ασύμμετρο α-άνθρακα που φέρει μια αμινομάδα ($-\text{NH}_2$), μια καρβοξυλομάδα ($-\text{COOH}$), ένα άτομο υδρογόνου και μία πλευρική αλυσίδα R, που καθορίζει τη φυσικοχημική και βιολογική συμπεριφορά του. Ανάλογα με τη φύση της ομάδας R, τα αμινοξέα διακρίνονται σε βασικά, όξινα και ουδέτερα, ενώ στη φύση απαντώνται συνολικά είκοσι (φυσικά αμινοξέα). Με βάση την παράπλευρη αλυσίδα τους, τα αμινοξέα ταξινομούνται σε όξινα, βασικά, ουδέτερα, αρωματικά, θειούχα, μονο-καρβοξυλικά, υδρόξυ-αμινοξέα και ένα ίμινο οξύ¹¹⁰.



Εικόνα 13. Γενικός τύπος αμινοξέων.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση των αμινοξέων.

Λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας όξινων και βασικών λειτουργικών ομάδων, τα αμινοξέα είναι αμφολύτες. Ο βαθμός ιονισμού τους μεταβάλλεται με το pH: σε όξινο περιβάλλον ($\text{pH} \approx 1$) η $-\text{COOH}$ παραμένει μη-ιονισμένη, ενώ η $-\text{NH}_2$ πρωτονιώνεται· αντιστρόφως, σε αλκαλικό ($\text{pH} \approx 11$) η $-\text{COOH}$ αποπρωτονιώνεται και η $-\text{NH}_2$ παραμένει ουδέτερη. Σε ενδιάμεσο pH επικρατεί η διπολική μορφή χαρακτηριστική του ισοηλεκτρικού σημείου (pI). Από στερεοχημική σκοπιά, όλα τα φυσικά αμινοξέα, εκτός της γλυκίνης, είναι οπτικά ενεργά και απαντούν σε L ή D μορφές ενώ στις φυσικές πρωτεΐνες απαντώνται αποκλειστικά τα L-αμινοξέα¹¹⁰.

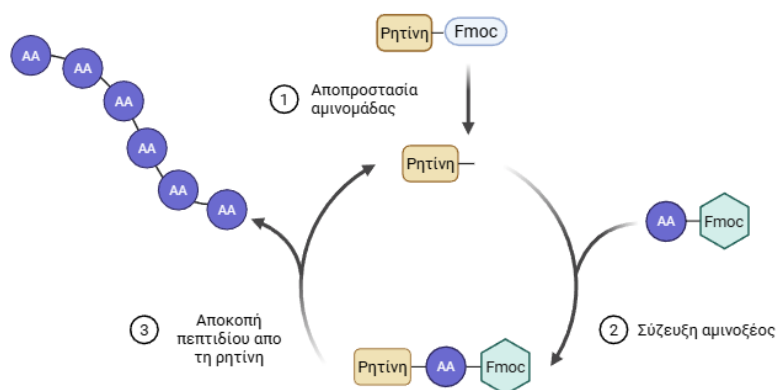
Ο πεπτιδικός δεσμός (αμιδικός δεσμός) σχηματίζεται όταν η α-αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στην ενεργοποιημένη α-καρβοξυλομάδα ενός άλλου, με απώλεια ενός μορίου νερού¹¹¹. Η ενεργοποίηση αυτή καθίσταται αναγκαία, καθώς ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού είναι ενδόθερμος (≈ 4 kcal/mol) και απαιτεί εξωτερική παροχή χημικής ενέργειας.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες των L. Pauling και R. Corey έδειξαν ότι ο πεπτιδικός δεσμός έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού με μήκος περίπου 1,32 Å, γεγονός που τον καθιστά επίπεδο και περιορίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον άξονά του^{112,113}. Επιτρέπονται μόνο περιστροφές γύρω από τους δεσμούς Cα–C και Cα–N, με αποτέλεσμα την ύπαρξη δύο ισομερών διαμορφώσεων, cis και trans. Η trans μορφή είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκότερη κατά 2 kcal/mol και επομένως κυριαρχεί στις φυσικές πρωτεΐνες, με εξαίρεση την προλίνη, η οποία μπορεί να υιοθετήσει και τις δύο μορφές¹¹⁴.

6.2. Πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS)

Στη SPPS, το πρώτο αμινοξύ συνδέεται σε αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη), πάνω στο οποίο πραγματοποιούνται διαδοχικά όλα τα στάδια επιμήκυνσης: αποπροστασία, σύζευξη και εκπλύσεις. Καθ' όλη τη διαδικασία το πεπτίδιο παραμένει δεσμευμένο στη ρητίνη, ενώ τα παραπροϊόντα απομακρύνονται εύκολα μέσω εκπλύσεων. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, ακολουθεί η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η τελική αποπροστασία των πλευρικών ομάδων.

Οι δύο κύριες στρατηγικές προστασίας κατά την SPSS, είναι η Fmoc/tBu και η Boc/Bzl^{115,116}. Η προτιμάται λόγω των πιο ήπιων συνθηκών που απαιτούνται για την απομάκρυνση του πεπτιδίου από την ρητίνη και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων.



Εικόνα 15. Πορεία πεπτιδικής σύνθεσης με Fmoc/tBu στρατηγική.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να διογκώνουν επαρκώς τη ρητίνη, να προάγουν την ενεργοποίηση και την ακυλίωση και να περιορίζουν τη ρακεμοποίηση. Συνήθως χρησιμοποιούνται DMF και DCM, που συνδυάζουν πολικότητα και καλή διαλυτότητα¹¹⁷.

6.2.1. Ρητίνη

Η ρητίνη πρέπει να είναι χημικά αδρανής, αδιάλυτη στους διαλύτες της αντίδρασης και να διογκώνεται επαρκώς, ώστε να επιτρέπει την ομοιόμορφη πρόσβαση των αντιδραστηρίων. Επίσης, πρέπει να διαθέτει ικανοποιητική πυκνότητα σημείων πρόσδεσης και ομοιόμορφο μέγεθος κόκκου, να σχηματίζει σταθερό αλλά εκλεκτικά αποσπώμενο δεσμό με το πρώτο αμινοξύ και να επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνσή της μετά τη σύνθεση¹¹⁸. Κλασικά παραδείγματα περιλαμβάνουν τη Merrifield resin (χλωρομεθυλοπολυστερένιο), καθώς και τις σύγχρονες Wang, Rink Amide και PEG-ρητίνες (TentaGel, ChemMatrix)¹¹⁶.

6.2.2. Προστατευτικές ομάδες

Οι προστατευτικές ομάδες ανάλογα με την ομάδα που προστατεύουν διακρίνονται σε N^α-άμινο-προστατευτικές (Fmoc, BOC) και σε προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων. Η προστασία της αμινομάδας είναι αναγκαία για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Η Fmoc προστασία προτιμάται διότι είναι σταθερή στις συνθήκες σύζευξης, αφαιρείται ήπια με διάλυμα πιπεριδίνης (20% σε DMF), είναι συμβατή με οξεισώσιμες ρητίνες και επιτρέπει την ταυτοποίηση απομακρυνσης ή μη με το τεστ νινυδρίνης (Kaiser test)^{119–121}. Παράλληλα, οι πλευρικές αλυσίδες προστατεύονται με ομάδες σταθερές στις συνθήκες αποπροστασίας της Fmoc, ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Οι ομάδες αυτές απομακρύνονται συνήθως στο στάδιο της τελικής αποκοπής.

6.2.3. Σχηματισμός Πεπτιδικού Δεσμού- Αντιδραστήρια Σύζευξης

Για τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές μέθοδοι, όπως τα χλωρίδια, τα αζίδια, οι ανυδρίτες, οι ενεργοί εστέρες και τα αντιδραστήρια σύζευξης. Στη σύγχρονη SPPS κυριαρχεί η χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης, που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ενεργοποίηση και σύζευξη του αμινοξέος, επιταχύνοντας τη διαδικασία και ελαχιστοποιώντας τη ρακεμοποίηση^{122,123}.

6.2.3.1. Καρβοδιϊμίδια

Τα καρβοδιϊμίδια, όπως το dicyclohexylcarbodiimide (DCC) και το diisopropylcarbodiimide (DIC), συγκαταλέγονται στα κλασικά αντιδραστήρια ενεργοποίησης που χρησιμοποιούνται ευρέως στην πεπτιδική σύνθεση. Μεταξύ αυτών, το DIC υπερτερεί του DCC, καθώς η αντίστοιχη ουρία που παράγεται είναι ευδιάλυτη και απομακρύνεται ευκολότερα από το μίγμα της αντίδρασης, σε αντίθεση με το DCC, το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό δυσδιάλυτων υποπροϊόντων και δυσχεραίνει τα στάδια καθαρισμού.

Κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης σχηματίζεται ως κύριο ενδιάμεσο η Ο-ακυλοισουουρία. Το ενδιάμεσο αυτό είναι χημικά δραστικό, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις, όπως η αναδιάταξη προς Ν-ακυλοουρία και στην πρόκληση ρακεμοποίησης των αμινοξέων. Η προσθήκη 1-υδροξυ-βενζοτρίαζολίου (HOBt) συμβάλλει καθοριστικά στον περιορισμό αυτών των φαινομένων, καθώς οδηγεί στον σχηματισμό ενός σταθερότερου ενεργού εστέρα. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η πιθανότητα μετατόπισης $O \rightarrow N$, βελτιώνεται η χημειοεκλεκτικότητα της αντίδρασης και αυξάνεται η συνολική απόδοση της σύζευξης^{124–126}

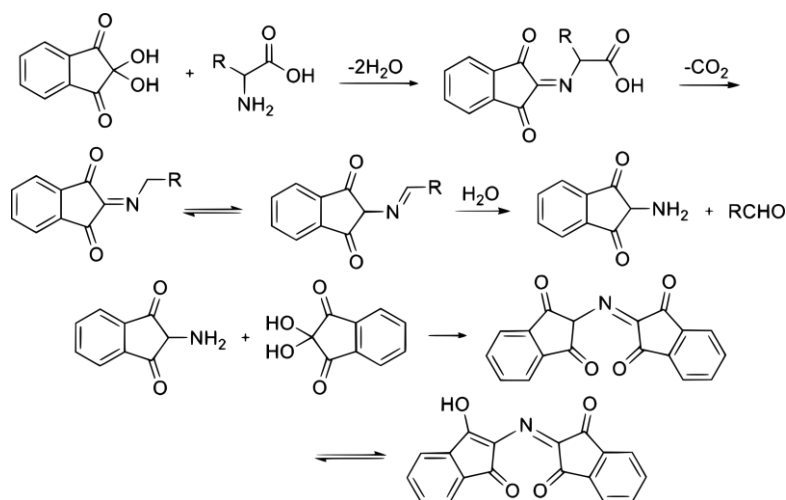
6.2.3.2. Φωσφονικά και Ουρονικά Παράγωγα

Τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα δρουν ως αντιδραστήρια ενεργοποίησης των καρβοξυλικών ομάδων των αμινοξέων μέσω σχηματισμού υψηλής ενέργειας ενδιάμεσων, διευκολύνοντας τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Τα ουρονικά αντιδραστήρια (π.χ. HBTU, HATU, TBTU) περιέχουν κατιονικά σύμπλοκα τετραμεθυλουρονίου, τα οποία αντιδρούν με το καρβοξυλικό οξύ σχηματίζοντας αρχικά ένα ενεργοποιημένο ουρονικό ενδιάμεσο που μετατρέπεται ταχέως σε ενεργό εστέρα, παρουσία βάσης. Τα ενδιάμεσα αυτά είναι ιδιαίτερα δραστικά έναντι των αμινομάδων, επιτρέποντας ταχεία πυρηνόφιλη προσβολή και σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, ενώ παράλληλα περιορίζουν τη ρακεμοποίηση μέσω αποφυγής σχηματισμού Ο-ακυλοισουουρίας.

Τα φωσφονικά παράγωγα, όπως το PyBOP, ενεργοποιούν το καρβοξυλικό άκρο μέσω σχηματισμού φωσφονικού ενδιάμεσου υψηλής ενέργειας, το οποίο οδηγεί επίσης στη δημιουργία ενεργού εστέρα τύπου OBt. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από αυξημένη χημειοεκλεκτικότητα και μειωμένη τάση για παράπλευρες αντιδράσεις^{125,127}.

6.2.4. Αντίδραση Νινυδρίνης (Test Kaiser)

Η αντίδραση νινυδρίνης αποτελεί έναν απλό, ευαίσθητο έλεγχο για την ανίχνευση ελεύθερων αμινομάδων. Το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα υποδηλώνει την παρουσία μη συζευγμένων ομάδων. Η δοκιμή βελτιώνεται με τη χρήση KCN, φαινόλης και πυριδίνης, που αυξάνουν την ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος^{121,128,129}.



Εικόνα 16. Μηχανισμός αντίδρασης νινυδρίνης

6.2.5. Ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις

Κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι δυνατόν να εμφανιστούν ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση και τη χημική καθαρότητα του τελικού προϊόντος. Μεταξύ των συχνότερων φαινομένων συγκαταλέγονται η ρακεμοποίηση, ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου και ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης.

Η ρακεμοποίηση προκύπτει είτε μέσω αποπρωτονίωσης του στερεογονικού άνθρακα των αμινοξέων είτε μέσω σχηματισμού ενδιάμεσων δομών αζλακτόνης, οδηγώντας σε απώλεια της χειρομορφικής καθαρότητας του πεπτιδίου¹³⁰.

Ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου παρατηρείται συχνά σε πεπτιδικές αλληλουχίες που περιέχουν ασπαρτικό οξύ ή ασπαραγίνη και σχετίζεται με κυκλοποίηση της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να περιοριστεί αποτελεσματικά με την κατάλληλη προστασία των πλευρικών ομάδων, όπως η χρήση προστατευτικών ομάδων τύπου *tert*-butyl (tBu), καθώς και με τον έλεγχο και τη μείωση του χρόνου αποπροστασίας^{126,131}.

Ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης εμφανίζεται κυρίως στα αρχικά στάδια της σύνθεσης, ιδιαίτερα σε διπεπτιδικά ενδιάμεσα μετά την αποπροστασία της N-τελικής ομάδας, και οδηγεί σε κυκλοποίηση και απώλεια υλικού από τη ρητίνη. Η εμφάνιση της αντίδρασης αυτής μπορεί να περιοριστεί με τη χρήση κατάλληλων ρητινών, οι οποίες

παρέχουν αυξημένη στερεοχημική παρεμπόδιση και μειώνουν την πιθανότητα ενδομοριακής κυκλοποίησης.

6.2.6. Αποκοπή Πεπτιδίου από τη Ρητίνη

Η τελική αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη (ή μη) απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων καθορίζονται από τον τύπο της ρητίνης και τη στρατηγική σύνθεσης. Στη στρατηγική Fmoc/tBu, η αποκοπή πραγματοποιείται σε όξινες συνθήκες με τριφθοροξικό οξύ (TFA).

Κατά την αποκοπή, σχηματίζονται δραστικά ενδιάμεσα (κυρίως καρβοκατιόντα) από τη διάσπαση ορισμένων προστατευτικών ομάδων, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες δευτερογενείς αντιδράσεις (π.χ. αλκυλιώσεις ευαίσθητων πλευρικών αλυσίδων, τροποποιήσεις αρωματικών κατάλοιπων ή αναδιατάξεις). Για τον περιορισμό αυτών των φαινομένων χρησιμοποιούνται “μόρια-παγίδες” (scavengers), όπως ανισόλη, φαινόλη, τριισοπροπυλοσιλάνιο (TIS) και θειολικές ενώσεις, οι οποίες δεσμεύουν τα καρβοκατιόντα, βελτιώνοντας την καθαρότητα και τις αποδόσεις του τελικού προϊόντος¹³². Παράλληλα, η επιλογή και η αναλογία των scavengers στο διάλυμα αποκοπής αποτελεί κρίσιμο πρακτικό σημείο, καθώς διαφοροποιείται ανάλογα με τη σύσταση του πεπτιδίου (π.χ. παρουσία Trp, Met, Cys, Tyr) και την ευαισθησία του σε οξείδωση ή ανεπιθύμητες αλκυλιώσεις.

Μετά την ολοκλήρωση της αποκοπής, το μίγμα διηθείται για την απομάκρυνση της ρητίνης ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών και το πεπτίδιο ανακτάται συνήθως με καταβύθιση εν ψυχρώ σε διαιθυλαιθέρα. Τέλος, εκχυλίζεται σε υδατικό διάλυμα οξέος και λυοφιλοποιείται.

7. Χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις

7.1. Θειοαιθερικός Δεσμός

Ο θειοαιθερικός δεσμός αποτελεί μια από τις σημαντικότερες χημειοεκλεκτικές μεθοδολογίες σύνδεσης, με ευρύτατες εφαρμογές στη σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνών, μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής και στη μόνιμη πρόσδεση βιοδραστικών μορίων σε συνθετικούς φορείς^{133–135}. Ο σχηματισμός του δεσμού αυτού προκύπτει μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης μεταξύ μιας σουλφιδρυλομάδας ($-SH$) και μιας αλογονοακετυλομάδας (XCH_2CO-)^{133,136}. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να λάβει χώρα είτε ενδομοριακά, όταν οι δύο ομάδες βρίσκονται στο ίδιο μόριο, οδηγώντας στον σχηματισμό κυκλικών πεπτιδίων, είτε διαμοριακά, όταν συμμετέχουν διαφορετικά μόρια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαμοριακού θειοαιθερικού δεσμού, χρήσιμου στη σύνθεση πεπτιδικών ή πρωτεϊνικών μορίων.

7.2. Μηχανισμός Σχηματισμού Θειοαιθερικού Δεσμού

Ο σχηματισμός του θειοαιθερικού δεσμού πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης μιας C-τελικής σουλφιδρυλομάδας (όπως εκείνης της κυστεΐνης ή ενός τροποποιημένου C-τελικού άκρου) με την N-τελική αλογονοακετυλομάδα μιας άλλης πεπτιδικής αλληλουχίας.

Η αντίδραση ακολουθεί μηχανισμό πυρηνόφιλης υποκατάστασης δεύτερης τάξης (SN_2). Το θειολικό ανιόν ($-S^-$), προερχόμενο από την αποπρωτονίωση της σουλφιδρυλομάδας, προσβάλλει πυρηνόφιλα τον μεθυλενικό άνθρακα της αλογονοακετυλομάδας, προκαλώντας αποχώρηση του αλογονιδίου και σχηματισμό του νέου δεσμού C–S, με ταυτόχρονη απελευθέρωση HX ^{133,135–137}. Τα θειολικά ανιόντα είναι από τα ισχυρότερα γνωστά πυρηνόφιλα, γεγονός που εξηγεί τις υψηλές αποδόσεις των SN_2 αντιδράσεων αυτής της κατηγορίας¹³⁶.

Η ιωδοακετυλίωση πραγματοποιείται συνήθως σε στερεή φάση, όπου οι υπόλοιπες δραστικές ομάδες του πεπτιδίου (όπως $-OH$ και $-SH$) είναι προστατευμένες, ώστε να αποτραπούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις¹³⁸. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η εκλεκτική εισαγωγή της ιωδοακετυλομάδας στο επιθυμητό τμήμα. Υπάρχουν διάφορες συνθετικές οδοί για την παρασκευή των ιωδοακετυλο-πεπτιδίων, οι οποίες εξαρτώνται από τον τύπο ρητίνης, τον επιθυμητό σύνδεσμο και τις συνθήκες αποπροστασίας¹³⁹.

Η αντίδραση διεξάγεται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση και σε αδρανή ατμόσφαιρα (π.χ. άζωτο ή αργό), ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των σουλφιδρυλομάδων και ο σχηματισμός ανεπιθύμητων διμερών παραπροϊόντων. Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος, η αντίδραση

τερματίζεται με ρύθμιση του pH σε όξινο περιβάλλον, γεγονός που σταθεροποιεί τον σχηματιζόμενο θειοαιθερικό δεσμό.

7.3. Παράγοντες που Επηρεάζουν τον Σχηματισμό του Θειοαιθερικού Δεσμού

Το pH

Ο σχηματισμός του θειοαιθερικού δεσμού ευνοείται σε ήπια αλκαλικό περιβάλλον (pH 7–9), όπου προάγεται η αποπρωτονίωση του –SH και αυξάνεται η συγκέντρωση του θειολικού ανιόντος^{134,138}. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης απελευθερώνεται οξύ, το οποίο μπορεί να μεταβάλει το pH, επομένως απαιτείται συνεχής ρύθμιση της τιμής του.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση του pH, καθώς η αποπρωτονίωση της σουλφιδρυλομάδας οδηγεί στον σχηματισμό περισσότερων θειολικών ανιόντων ($-S^-$), τα οποία είναι πιο δραστικά πυρηνόφιλα και έτσι επιταχύνεται η πυρηνόφιλη προσβολή στον άνθρακα του αλογονοακετυλίου. Αντίθετα, σε pH μικρότερα του 7 η αντίδραση επιβραδύνεται σημαντικά, ενώ σε pH μεγαλύτερα του 9 αυξάνεται ο κίνδυνος οξειδωσης και διμερισμού του πεπτιδίου μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών γεφυρών ($-S-S-$). Ως εκ τούτου, το βέλτιστο pH για τη διαδικασία θεωρείται περίπου το 8.

Το Πυρηνόφιλο

Τα θειολικά ανιόντα της κυστεΐνης είναι εξαιρετικά δραστικά πυρηνόφιλα – περίπου 7–8 φορές δραστικότερα από τις αντίστοιχες υδροξυλομάδες– και έτσι επιτυγχάνουν πολύ υψηλές αποδόσεις στις αντιδράσεις υποκατάστασης. Αντιθέτως, η παρουσία ογκωδών υποκαταστατών στον άνθρακα που φέρει το αλογόνο μειώνει σημαντικά τον ρυθμό της αντίδρασης^{133,136}.

Η Αποχωρούσα Ομάδα

Όσο πιο εύκολα απομακρύνεται το αλογονίδιο, τόσο πιο γρήγορος είναι ο σχηματισμός του θειοαιθέρα. Οι καλύτερες αποχωρούσες ομάδες είναι εκείνες που σταθεροποιούν αποτελεσματικότερα το αρνητικό φορτίο του σχηματιζόμενου ανιόντος. Δεδομένου ότι το ιώδιο είναι το μεγαλύτερο από τα κοινά αλογόνα, η ιωδομάδα αποτελεί την πιο δραστική αποχωρούσα ομάδα, ακολουθούμενη από το βρώμιο και το χλώριο. Έτσι, τα ιωδοακετυλο-παράγωγα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη δραστικότητα και ταχύτερη κινητική^{136,137}.

Ο Διαλύτης

Οι πολικοί μη πρωτικοί διαλύτες, όπως το ακετονιτρίλιο (CH_3CN) και το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), ενισχύουν σημαντικά την πυρηνόφιλη δραστηριότητα και συνεπώς την ταχύτητα σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού. Αντίθετα οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες (όπως νερό, μεθανόλη, αιθανόλη) δεν είναι κατάλληλοι επειδή σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πυρηνόφιλο, το επιδιαλυτώνουν και μειώνουν την ενεργότητα του θειολικού ανιόντος, οδηγώντας σε επιβράδυνση της αντίδρασης^{137,139}.

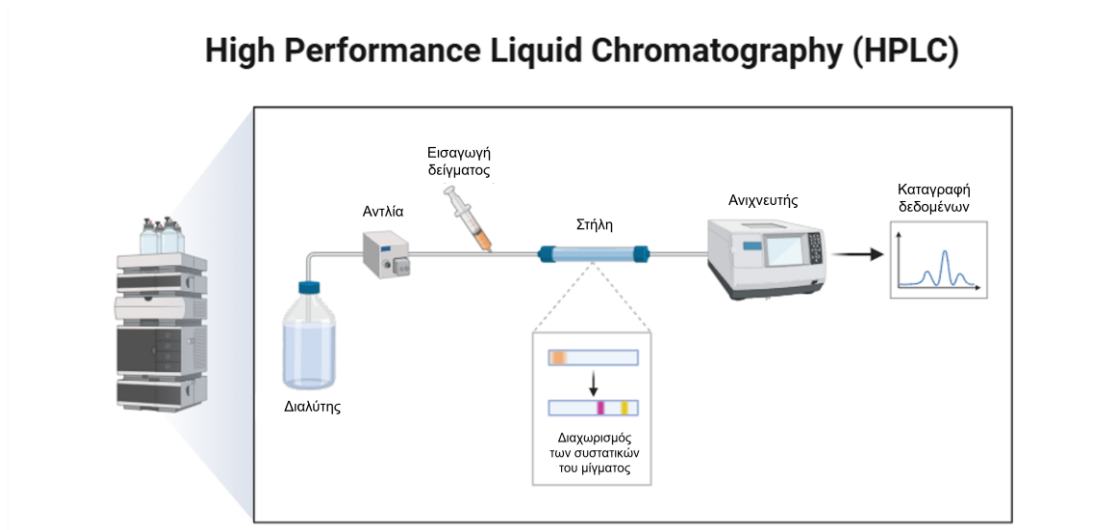
8. Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων

8.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης Φάσης (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)

Η Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Υγρής Φάσης (HPLC) αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές και διαδεδομένες τεχνικές για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση βιομορίων. Μεταξύ των διαφορετικών μορφών HPLC, η Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reverse Phase HPLC, RP-HPLC) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανάλυση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και συστατικών βιολογικών μειγμάτων, λόγω της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και ευαισθησίας της¹⁴⁰. Η RP-HPLC στηρίζεται στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του δείγματος και των μη πολικών ομάδων της στατικής φάσης. Οι στήλες RP-HPLC είναι συνήθως πυριτικής φύσης, συνδεδεμένη με αλειφατικές ανθρακικές αλυσίδες, όπως C₁₈, C₈ ή C₄, με την C₁₈ να είναι η συχνότερη επιλογή στην ανάλυση πεπτιδίων και τοξινών¹⁴¹.

Η κινητή φάση αποτελείται από πολικό διαλύτη (συνήθως νερό με ρυθμιστικό, π.χ. 0.1% TFA) και οργανικό διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη). Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, η αναλογία των διαλυτών μεταβάλλεται βαθμιαία (gradient elution), αυξάνοντας το ποσοστό του οργανικού διαλύτη ώστε να εκλουστούν σταδιακά συστατικά διαφορετικής υδροφοβικότητας. Ο χρόνος κατακράτησης (retention time) κάθε συστατικού είναι χαρακτηριστικός και εξαρτάται από τη σχετική του πολικότητα¹⁴². Για τον καθαρισμό των πεπτιδίων οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι: 1. H₂O/0,1% TFA 2. CH₃CN/0,1% TFA. Η χρήση του TFA πλεονεκτεί σε σύγκριση με τα υπόλοιπα οξέα στα παρακάτω: α) Έχει χαμηλό σημείο ζέσης και απομακρύνεται εύκολα β) Απορροφά σε χαμηλά μήκη κύματος γ) Είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο οξύ στην HPLC με πολύ καλά αποτελέσματα.

Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης θα πρέπει να αποφεύγονται οι βασικές συνθήκες, γιατί σε αλκαλικό pH το υλικό πλήρωσης της στήλης καταστρέφεται. Για την ανίχνευση των εκλουόμενων προϊόντων χρησιμοποιούνται συνήθως οι ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας σταθερού ή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Στην περίπτωση των πεπτιδίων η ανίχνευση γίνεται στα 214-220 nm (το μέγιστο της απορρόφησης του πεπτιδικού δεσμού) και στα 254 nm ανιχνεύονται τα αμινοξέα που φέρουν αρωματικές ομάδες.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

8.2. Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry – MS) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές της σύγχρονης επιστήμης, με ευρύτατη εφαρμογή στη χημεία, τη βιοχημεία, τη φαρμακευτική, την τοξικολογία και τη βιοτεχνολογία. Η φασματομετρία μάζας επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της μάζας, της χημικής σύστασης και της δομής μορίων, μέσω της μέτρησης της αναλογίας μάζας προς φορτίο (m/z) των ιονισμένων σωματιδίων^{143,144}.

Η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, η ταχύτητα και η δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης την καθιστούν αναντικατάστατο εργαλείο στη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, όπως οι πρωτεΐνες, τα πεπτιδία και τα δηλητήρια ζώων¹⁴⁴.

Η διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά στάδια:

1. Ιονισμός: τα μόρια του δείγματος μετατρέπονται σε θετικά ή αρνητικά ιόντα.
2. Ανάλυση μάζας: τα ιόντα επιταχύνονται σε ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και διαχωρίζονται ανάλογα με το m/z .

3. Ανίχνευση: τα διαχωρισμένα ιόντα προσπίπτουν σε ανιχνευτή (π.χ. ηλεκτροπολλαπλασιαστή), ο οποίος μετατρέπει τα σήματα σε ηλεκτρικό ρεύμα και δημιουργεί το φάσμα μάζας¹⁴⁵.

Τεχνικές ιονισμού

Η επιλογή της μεθόδου ιονισμού εξαρτάται από τη φύση του δείγματος και τον σκοπό της ανάλυσης. Οι πιο κοινές τεχνικές είναι:

- Electron Impact (EI): εφαρμόζεται σε πτητικές οργανικές ενώσεις, προκαλώντας ιονισμό μέσω σύγκρουσης με ηλεκτρόνια.
- Electrospray Ionization (ESI): ήπια τεχνική που μετατρέπει υγρά δείγματα σε ιονισμένα σταγονίδια υπό υψηλή τάση· ιδανική για πεπτίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες¹⁴⁶.
- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): χρησιμοποιεί παλμικό λέιζερ και μήτρα για τον ιονισμό μεγάλων βιομορίων με ελάχιστο κατακερματισμό.
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI): κατάλληλη για σχετικά μικρά, μη πολικά μόρια σε υγρά διαλύματα.

Στη βιοχημεία και πρωτεωμική, οι τεχνικές ESI και MALDI είναι οι πιο δημοφιλείς, καθώς επιτρέπουν την ανάλυση μεγάλων βιομορίων χωρίς αποδιάταξη ή αποδόμηση των μορίων^{146,147}.

Αναλυτές μάζας

Μετά τον ιονισμό, τα παραγόμενα ιόντα εισάγονται στον αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται βάσει του λόγου m/z . Ο λόγος m/z υπολογίζεται από τον τύπο:

$\frac{m}{z} = m + \frac{nH^+}{n}$ όπου **m**: μοριακή μάζα, **n**: αριθμός θετικών φορτίων, **H⁺**: μάζα του πρωτονίου.

Η επιλογή αναλυτή εξαρτάται από τις απαιτήσεις της ανάλυσης (ευαισθησία, ανάλυση, ταχύτητα, ακρίβεια).

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι αναλυτών είναι οι εξής:

- Quadrupole: χρησιμοποιεί τέσσερις ράβδους που δημιουργούν εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο, επιτρέποντας την επιλογή συγκεκριμένου εύρους m/z .
- Time-of-Flight (TOF): μετρά τον χρόνο πτήσης των ιόντων· όσο ελαφρύτερο το ιόν, τόσο μικρότερος ο χρόνος.

- Ion Trap και Orbitrap: παγιδεύουν τα ιόντα και υπολογίζουν το m/z μέσω ταλαντώσεων·προσφέρουν υψηλή ανάλυση και ακρίβεια.
- Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR): προσφέρει εξαιρετικά υψηλή διακριτική ικανότητα και ακρίβεια, χρησιμοποιείται σε εξειδικευμένες πρωτεωμικές αναλύσεις¹⁴⁸.

9. Αντικείμενο και σκοπός

Στην Ευρώπη τρία είδη φιδιού του γένους *Vipera* (*V. berus*, *V. aspis* και *V. ammodytes*) είναι υπεύθυνα για τα πιο σοβαρά περιστατικά δηγματος. Πιο συγκεκριμένα, η ευρωπαϊκή οχιά μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές, όπως εκτεταμένο πρήξιμο που μπορεί να εξαπλωθεί στον κορμό, αναφυλαξία, καρδιαγγειακό σοκ, νευροτοξικότητα και διαταραχή της πήξης του αίματος. Η αντιμετώπιση δηγματος στους ασθενείς, γίνεται με την ενδοφλέβια χορήγηση αντιοφικού ορού και μέχρι σήμερα αποτελεί την μόνη αποτελεσματική θεραπεία. Επί του παρόντος, οι αντιοφικοί οροί που διατίθενται προέρχονται από το πλάσμα ανοσοποιημένων ζώων, κυρίως αλόγων και αποτελούνται από πολυκλωνικά αντισώματα ή Fab₂ τμήματα αυτών, τα οποία αναπτύσσονται έναντι όλων των τοξινών του δηλητηρίου, ανεξάρτητα από την κλινική τους σημασία. Αυτό έχει ως συνέπεια οι ασθενείς, σε πολλές περιπτώσεις, να έρχονται αντιμέτωποι με σοβαρές παρενέργειες.

Η κατάσταση στην Ελλάδα είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, διότι υπάρχει δυσκολία εύρεσης αντιοφικών ορών η οποία έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές ελλείψεις στα νοσοκομεία. Πολλές ευρωπαϊκές εταιρείες έχουν σταματήσει την παραγωγή τους, με αποτέλεσμα το κόστος του αντιοφικού ορού να έχει εκτοξευθεί τα τελευταία χρόνια και ο κίνδυνος παντελούς έλλειψης αντιοφικών ορών, χαρακτηρίζεται άμεσος. Η παραγωγή ενός αντιοφικού ορού ο οποίος θα χαρακτηρίζεται από άμεση διαθεσιμότητα, προσβασιμότητα και προσιτή τιμή είναι επιτακτικής ανάγκης.

Η ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τη θεραπεία του δηγματος φιδιών ώστε να υπερκεραστούν οι περιορισμοί που υφίστανται μέχρι σήμερα έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Αρκετές προσεγγίσεις έχουν γίνει από την επιστημονική κοινότητα για εύρεση νέων κατάλληλων τεχνικών όπως α) ανασυνδιασμένα ανθρώπινα ή χιμαιρικά αντισώματα β) φυσικούς ή συνθετικούς αναστολείς των ενζυματικών συστατικών γ) νανοσωματίδια. Επίσης άλλες μελέτες περιλαμβάνουν την παραγωγή αντισωμάτων σε πτηνά και χρήση των IgY αντισωμάτων ή την ανοσοποίηση με χημικά συντεθειμένους επιτόπους τοξινών όπου χρησιμοποιούνται λογισμικά για την πρόβλεψη και χαρτογράφηση επιτόπων.

Επιπλέον σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι το δηλητήριο των φιδιών είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών, πεπτιδίων, ενζύμων κ.α. και είναι γνωστό ότι η τοξικότητα του δεν είναι αποτέλεσμα όλων των συστατικών του. Οι PLA₂ οι οποίες εντοπίζονται στο δηλητήριο των περισσότερων φιδιών, αποτελούν από τις πιο θανατηφόρες τοξίνες και πιθανά συνιστούν έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για παραγωγή αντιοφικού ορού ευρέως φάσματος.

Έχοντας λάβει λοιπόν υπόψιν τα δεδομένα για την τεχνολογία του αντιοφικού ορού και την ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων παραγωγής του, αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτελεί ο ορθός σχεδιασμός και η ανάπτυξη κατάλληλων αντιδραστηρίων τα οποία μπορούν να επάγουν εξειδικευμένη δράση έναντι τοξινών εχιδνών, με στόχο να επεκταθεί η χρήση τους στην παραγωγή χαμηλού κόστους και άμεσης διαθεσιμότητας αντιοφικών ορών ή στην ανάπτυξη κατάλληλων τεχνολογιών απομάκρυνσης των τοξινών από το αίμα των ασθενών.

Ο σχεδιασμός της μελέτης βασίστηκε στους παρακάτω άξονες: 1.Τη χρήση μόνο κλινικά σημαντικών τοξινών-αντιγόνων για ανοσοποίηση 2. Την παραγωγή αντισωμάτων έναντι τοξινών με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία 3. Τη μείωση ανεπιθύμητων παρενεργειών που προκαλούνται λόγω της φύσης των IgG αντισωμάτων. 4. Τις αρχές της ευζωίας των ζώων (3Rs – Replace, Reduce, Refine)

Για την επίτευξη του σκοπού της διδακτορικής διατριβής εφαρμόστηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

1. Βιβλιογραφική μελέτη για την επιλογή της κατάλληλης τοξίνης από το δηλητήριο των εχιδνών και εύρεση των αμινοξικών αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων για τα είδη εχιδνών που αφορά η παρούσα διατριβή (*V. Ammodytes*, *V. Berus*).
2. Μελέτη για την εύρεση των κατάλληλων επιτόπων των φωσφολιπασών A₂ των εχιδνών με σκοπό τη μέγιστη δυνατή ομολογία μεταξύ των φωσφολιπασών της οικογένειας των εχιδνών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω διάφορων υπολογιστικών προγραμμάτων για το προφίλ αντιγονικότητας, υδροφιλικότητας, επιφανειακής προσβασιμότητας και ευκαμψίας της αμινοξικής αλληλουχίας των τοξινών.
3. Σύνθεση των επιλεγμένων επιτόπων σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu στρατηγική.
4. Σύνθεση ανοσογονικών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής. Πραγματοποιήθηκε πρόσδεση των συντεθειμένων πεπτιδίων, σε κατάλληλο πεπτιδικό φορέα ο οποίος μπορεί να προβάλλει τους επιτόπους για επαγωγή καλύτερης ανοσολογικής απόκρισης καθώς και μεγαλύτερη αναγνώριση του επιτόπου από το αντίσωμα κατά την προσρόφηση στο στερεό υπόστρωμα.
5. Παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων μέσω ανοσοποίησης ορνίθων με τα ανοσογονικά συμπλέγματα. Πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις τόσο μονοδύναμες (μεμονωμένα ανοσογόνα), όσο και πολυδύναμες (μίγμα ανοσογόνων).
6. Ανάπτυξη κατάλληλων υλικών για τον καθαρισμό των αντισωμάτων (Sephacrose-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και Sepharose-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷)

7. Ανάπτυξη δοκιμασιών ELISA για τον προσδιορισμό της ικανότητας εξουδετέρωσης των δηλητηρίων ομόλογων αλλά και ετερόλογων ειδών εχιδνών (*V. Ammodytes*, *M. Xanthina*, *M. Schweizeri*).

Πίνακας 1. Πεπτίδια και υλικά που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Πεπτίδια/υλικά	Σύντηξη
ICH ₂ CO-D ¹²⁸ FLC(CH ₂ NHCOCH ₃)KKESEK ¹³⁷ -NH ₂	CPSOC (3,9-Acm; 6,12-AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷)
ICH ₂ CO-S ¹²⁸ SNC(CH ₂ NHCOCH ₃)QENSDK ¹³⁷ -NH ₂	CPSOC (3,9-Acm; 6,12-PLAVB ¹²⁸⁻¹³⁷)
CH ₃ CO-[K-Aib-C(3,9-CH ₂ CONH ₂)] ₄ -NH ₂	CPSOC(3,9-Acm)
CH ₃ CO-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH ₂ CO-D ¹²⁸ FLC(Acm)KKESEK ¹³⁷)] ₄ -NH ₂	CPSOC (3,9-Acm; 6,12-AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷)
CH ₃ CO-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH ₂ CO-S ¹²⁸ SNC(Acm)QENSDK ¹³⁷)] ₄ -NH ₂	CPSOC (3,9-Acm; 6,12-PLAVB ¹²⁸⁻¹³⁷)
Sepharose-CH ₂ CO- D ¹²⁸ FLC(Acm)KKESEK ¹³⁷	Sepharose- AtxA ¹²⁸⁻¹³⁷
Sepharose-CH ₂ CO- S ¹²⁸ SNC(Acm)QENSDK ¹³⁷	Sepharose- PLAVB ¹²⁸⁻¹³⁷

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. Μέθοδοι, αντιδραστήρια και τεχνικές

10.1. Σχεδιασμός πεπτιδίων

Η επιλογή των πεπτιδικών επιτόπων προς σύνθεση έγινε με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων τα οποία θα έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τόσο ομόλογα όσο και ετερόλογα δηλητήρια εχιδνών. Τα πεπτιδικά ανάλογα συντέθηκαν με βάση: (1) Βιβλιογραφικά δεδομένα για τις ιδιότητες των τοξινών του δηλητηρίου των εχιδνών βάσει των οποίων οι φωσφολιπάσες A_2 αποτελούν από τις πιο επικίνδυνες τοξίνες και μπορούν να αποτελέσουν στόχο για παραγωγή αντιοφικού ορού ευρέως φάσματος, (2) Τη μέγιστη δυνατή ομολογία μεταξύ των φωσφολιπασών A_2 της οικογένειας των εχιδνών ώστε να υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, (3) Την ελάχιστη δυνατή ομολογία μεταξύ φωσφολιπασών ανθρώπου και εχιδνών, (4) Την υδροφιλικότητα, την επιφανειακή προσβασιμότητα και την αντιγονικότητα τους (5) Βιβλιογραφικά δεδομένα για τις ιδιότητες κάθε τμήματος της αλληλουχίας των φωσφολιπασών A_2 .

10.2. Μελέτες ομολογίας και ανοσογονικότητας

Για την παραγωγή κατάλληλων αντισωμάτων έναντι των PLA_2 πραγματοποιήθηκαν μελέτες ομολογίας τόσο μεταξύ των ειδών της ίδιας οικογένειας (ομόλογοι οργανισμοί) όσο και μεταξύ των επιλεγμένων φωσφολιπασών με αντίστοιχες ετερόλογων εχιδνών. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι BLASTP και FASTA^{149–158} οι οποίοι λειτουργούν με βάση υπολογιστικά προγράμματα, συγκρίνοντας την πρωτοταγή δομή των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

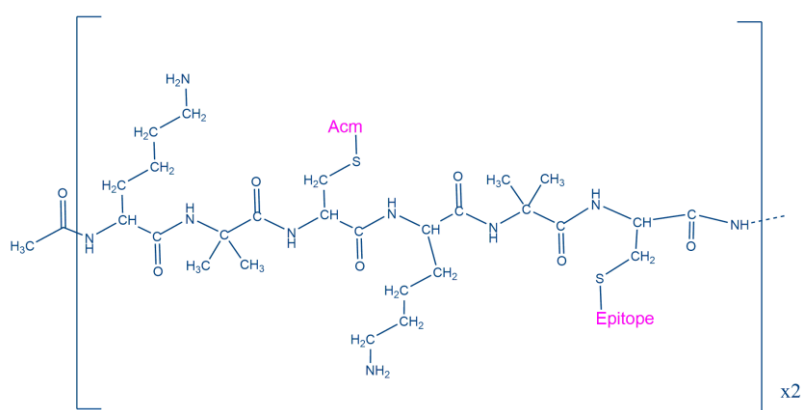
Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων πρόβλεψης αντιγονικότητας¹⁵⁹, τα οποία επιτρέπουν τον εντοπισμό των ανοσογονικών περιοχών μιας πρωτεΐνης, βασιζόμενα σε:

1. δεδομένα υδροφιλικότητας, που έχουν προκύψει από τους χρόνους κατακράτησης πεπτιδίων σε HPLC¹⁶⁰,
2. την επιφανειακή προσβασιμότητα^{161,162},
3. την κλίμακα ευελιξίας, δηλαδή την κινητικότητα των επιμέρους τμημάτων της πρωτεΐνης¹⁶³,
4. την ανοσογονικότητα των 20 φυσικών αμινοξέων^{164–166},
5. τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, με έμφαση στην ικανότητα σχηματισμού β-στροφών¹⁶⁷,
6. τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων και τη συχνότητα με την οποία απαντώνται σε πειραματικά τεκμηριωμένους επίτοπους¹⁶⁸,

7. το μοντέλο Markov σε συνδυασμό με τη μέθοδο κλίμακας τάσης, που επιτρέπουν την πρόβλεψη της θέσης γραμμικών επιτόπων Β-κυττάρων^{169–171}, καθώς και τον αλγόριθμο Random Forest¹⁷², προσαρμοσμένο ώστε να διαχωρίζει επιτοπικά και μη επιτοπικά αμινοξέα βάσει κρυσταλλικών δομών¹⁷³, μέσω του οποίου προβλέπονται επίτοποι Β-κυττάρων από ακολουθίες πρωτεϊνών.

10.3. Σχεδιασμός πεπτιδικού φορέα

Λόγω του μικρού μήκους των συνθετιμένων πεπτιδίων χαρακτηριστικό που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανοσολογική απόκριση, απαραίτητη ήταν η πρόσδεση τους σε κατάλληλο φορέα. Για τον σκοπό αυτό, τροποποιήθηκε ο πεπτιδικός φορέας CPSOC ο οποίος είχε αναπτυχθεί προηγουμένως στο ερευνητικό εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και Πρωτεϊνών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων οδηγώντας στον σχεδιασμό του φορέα CPSOC(3,9-Acm). Η συγκεκριμένη τροποποίηση προέκυψε λόγω της δυσκολίας πρόσδεσης τεσσάρων επιτοπικών αντιγράφων, με αποτέλεσμα ο φορέας CPSOC(3,9-Acm) να φέρει προστατευτική ακεταμιδομεθυλομάδα σε δύο από τις τέσσερις κυστεΐνες του, ενώ οι υπόλοιπες δύο παραμένουν διαθέσιμες για την πρόσδεση των αντίστοιχων επιτόπων



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση του φορέα CPSOC(3,9-Acm)

10.4. Αντιδραστήρια

10.4.1. Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια της σύνθεσης του πεπτιδίου είναι τα εξής:

- Διχλωρομεθάνιο (DCM, >99.9% Fisher Scientific)
- Διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF >99.9% Fluka) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων κατά τα στάδια των εκπλύσεων της πεπτιδορηνίτης. Φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος.

- Τριφθοροξικό οξύ (TFA 99% Sigma–Aldrich) για την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και την απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων κι των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων.
- Πιπεριδίνη (99% Fluka) για την αποπροστασία της Fmoc ομάδας.
- Διαιθυλαιθέρας (>99.8% Sigma – Aldrich) για την καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη.
- Εξάνιο (n-hexane LAB-SCAN) που χρησιμοποιείται κατά την απομάκρυνση του τριφθοροξικού οξέος σε περιστροφικό εξατμιστήρα.
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN >99.9% LAB-SCAN) κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου.
- Τριίσοπρόπυλοσιλάνιο (TIS 99% Fluka) ως μόριο παγίδα για την δέσμευση των καρβοκατιόντων που προκύπτουν κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη.
- Ιωδοξικό οξύ (ICH_2COOH) για την ιωδοακετυλίωση των πεπτιδίων.

10.4.2. Αντιδραστήρια Σύζευξης

- ❖ DIC, Fluka
- ❖ HBTU, G.L Biochem
- ❖ HOBt (βοηθητικό πυρηνόφιλο), G.L Biochem
- ❖ HATU, G.L Biochem
- ❖ TBTU, G.L Biochem

Για την παρασκευή του διαλύματος του Test Kaiser χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Νινυδρίνη (Sigma-Aldrich)
- Αιθανόλη (Fisher Scientific)
- KCN
- Φαινόλη
- DIPEA, Merck

10.4.3. Συσκευές και όργανα

- ♦ Η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο αντιδραστήρα (vessel) ο οποίος τοποθετήθηκε σε περιστροφικό αναδευτήρα.
- ♦ Για την συμπύκνωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός ξηραντήρας (flash evaporator).
- ♦ Για την παραλαβή στερεών προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η συσκευής λυοφυλιοποίησης.
- ♦ Για καλύτερη διαλυτοποίηση των δειγμάτων έγινε χρήση Vortex.

- ♦ Για τη λήψη φασμάτων μάζας και την ταυτοποίηση του Μοριακού Βάρους των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε το ESI-MS.
- ♦ Ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική ή/και παρασκευαστική RP-HPLC, ενώ η καθαρότητά τους ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC.

10.5. Σύνθεση πεπτιδίων και ανοσογονικών συμπλεγμάτων

10.5.1. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Rink Amide [4-(2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ)-φαινοξυ] με αρχική υποκατάσταση 0,58 mmol ελεύθερων αμινομάδων/g ρητίνης¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Τα αμινοξέα προστέθηκαν στον πεπτικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα με προστατευμένες τις παράπλευρες αλυσίδες τους (Πίνακες 1, 2) .

Πίνακας 2. Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στην σύνθεση του πεπτιδίου από την φωσφολιπάση A2 της V. Ammodytes.

<i>Fmoc</i> προστατευμένα αμινοξέα	<i>Μοριακό Βάρος</i>
<i>Glu(OtBu)-OH</i>	425,5
<i>Lys(Boc)-OH</i>	468,5
<i>Ser(tBu)-OH</i>	383,4
<i>Leu-OH</i>	131,2
<i>Asp(OtBu)-OH</i>	411,5
<i>Phe-OH</i>	384,4
<i>Cys(Acm)-OH</i>	414,5

Πίνακας 3. Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στην σύνθεση του πεπτιδίου από την φωσφολιπάση A2 της V. Berus.

<i>Fmoc</i> προστατευμένα αμινοξέα	<i>Μοριακό Βάρος</i>
<i>Glu(OtBu)-OH</i>	425,5
<i>Lys(Boc)-OH</i>	468,5
<i>Ser(tBu)-OH</i>	383,4
<i>Asn(Trt)-OH</i>	569,7
<i>Asp(OtBu)-OH</i>	411,5
<i>Gln(Trt)-OH</i>	610,7
<i>Cys(Acm)-OH</i>	414,5

Η πειραματική πορεία για την σύνθεση των επιθυμητών πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε ως εξής: Αρχικά προστέθηκε η ρητίνη σε vessel και ακολούθησε διόγκωση των κόκκων της ρητίνης με τους διαλύτες έκπλυσης: DMF/DCM/DMF (1x 15'/1x15'/1x15'). Στη συνέχεια έλαβε χώρα η αποκοπή της N^α-Fmoc προστατευτικής ομάδας της ρητίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνη/DMF και έκπλυση με τους διαλύτες DMF/DCM/DMF (3 x 1'). Για την ταυτοποίηση της απομάκρυνσης της N^α-Fmoc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων, με το test Kaiser. Για το test, τοποθετήθηκαν ελάχιστοι κόκκοι σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν μερικές σταγόνες των διαλυμάτων: (1) 2ml KCN 0,001M σε 100ml πυριδίνη, (2) 5g νινυδρίνης σε 100ml αιθανόλης, (3) 400mg φαινόλης σε 100ml αιθανόλης. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε σε υδρόλουτρο (100°C) για 30". Εμφάνιση μπλε κόκκων πιστοποιεί την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων (θετικό test Kaiser).

Η σύζευξη των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το DIC παρουσία HOBt σε αναλογία αμινοξύ/HOBt/DIC/ρητίνη: 3/3/3/1. Και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο σύζευξης το DIEA σε αναλογία αμινοξύ/ HOBt/DIPEA/ρητίνη:3/3/6/1. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το μίγμα DMF, DCM σε αναλογία 1:1. Το Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ, το DIC και το HOBt, προστίθονταν στο μίγμα DMF/DCM και πραγματοποιούνταν ανάδευση για 20' σε παγόλουτρο (στην περίπτωση του DIPEA δεν απαιτείται παραμονή σε παγόλουτρο). Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό προστίθετο στο vessel και αναδευόταν για περίπου 3 ώρες. Για την ταυτοποίηση της σύζευξης του αμινοξέος στη ρητίνη πραγματοποιούνταν Test Kaiser, στο οποίο δεν αναμενόταν χρωματισμός των κόκκων της ρητίνης (αρνητικό test). Σε περίπτωση που το Test Kaiser ήταν θετικό, ακολουθούσε επανάληψη της σύζευξης του αμινοξέος με το DIC ή με κάποιο ουρονικό παράγωγο. Η αποπροστασία της N^α προστατευτικής ομάδας των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνη σε DMF για 1x2' και 1x10'. Στην περίπτωση που στην πεπτιδική αλυσίδα έχει γίνει προσθήκη του γλουταμινικού οξέος η κατεργασία με πιπεριδίνη έλαβε χώρα ως εξής: 1x2', 1x4' και 1x2' για την αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων. Με τον ίδιο τρόπο ακολούθησε η προσθήκη των υπόλοιπων αμινοξέων μέχρι την σύνθεση της επιθυμητής πεπτιδικής αλυσίδας. Μετά την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέος η ρητίνη συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα κενού μέχρι τη λήψη σταθερού βάρους.

10.5.2. Ιωδοακετυλίωση πεπτιδίων

Από την συνολική ποσότητα της πεπτιδορητίνης που συλλέχθηκε, ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε για ιωδοακετυλίωση. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκοπή της

προστατευτικής ομάδας Fmoc με διάλυμα 20% πιπεριδίνη/ DMF και έκπλυση με τους διαλύτες DMF/DCM/DMF (3 x 1'). Στη συνέχεια, η ιωδοακετυλίωση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ιωδοξικού οξέος (ICH_2COOH) παρουσία DIC ως αντιδραστήριου σύζευξης σε αναλογία $\text{ICH}_2\text{COOH}/\text{DIC}/\text{ρητίνη}$: 10/10/1. Ως διαλύτης της αντίδρασης επιλέχθηκε το μίγμα DCM/DMF σε αναλογία 1:1. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε vessel το οποίο είχε καλυφθεί με αλουμινόχαρτο λόγω της παρουσίας ιωδίου και η αντίδραση διήρκησε περίπου 3 ώρες. Στη συνέχεια έλαβε χώρα το test Kaiser, το οποίο όμως στην περίπτωση των ιωδοακέτυλο-πεπτιδίων δεν δίνει πάντα αξιόπιστα αποτελέσματα, πιθανότατα λόγω ευαισθησίας της ιωδοακέτυλο ομάδας στη θέρμανση. Για το λόγο αυτόν το διάλυμα της ιωδοακετυλίωσης προστέθηκε εκ νέου στο vessel και η αντίδραση αφέθηκε overnight.

10.5.3. Αποκοπή πεπτιδίου από την ρητίνη

Μετά την ιωδοακετυλίωση, η πεπτιδορητίνη συλλέχθηκε σε ποτήρι ζέσης αφού είχε ξηραθεί με διαθυλαθειθέρα, και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα μέχρι σταθερού βάρους. Το τελικό στάδιο ήταν η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Η αποκοπή πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με TFA, DMB και TIS. Η πεπτιδορητίνη και το διάλυμα αποκοπής μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η σφαιρική φιάλη ήταν καλυμμένη με αλουμινόχατο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης καθώς υπάρχει I_2 το οποίο είναι φωτοευαίσθητο.

Μετά το τέλος της αντίδρασης το διάλυμα διηθήθηκε σε κωνική φιάλη κενού και έγινε έκπλυση της σφαιρικής με DCM/εξάνιο (1:1). Το διάλυμα που προέκυψε μεταφέρθηκε ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε εξάτμιση στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι να ληφθεί ελαιώδες προϊόν και να απομακρυνθεί το TFA. Στη συνέχεια προκειμένου να καταβυθιστεί το πεπτίδιο έγινε προσθήκη παγωμένου αιθέρα στο διάλυμα και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη για τουλάχιστον 1,5 ώρα. Το πεπτίδιο διηθήθηκε με εκπλύσεις παγωμένου αιθέρα και παραλήφθηκε με προσθήκη οξικού οξέος 2N. Στο διάλυμα προστέθηκε νερό και τοποθετήθηκε στην συσκευή λυοφυλιοποίησης. Το στερεό προϊόν συλλέχθηκε για να ακολουθήσει ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του με κατάλληλες τεχνικές.

10.6. Σχηματισμός Θειοαιθερικού Δεσμού

Ο θειοαιθερικός δεσμός πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, και σχηματίστηκε μεταξύ των ιωδοακετυλιωμένων πεπτιδίων και του ολιγοπετιδικού φορέα που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, CPSOC

(3,9 Åcm). Αρχικά το ιωδοακετυλιωμένο πεπτιδίο τοποθετήθηκε σε μία μικρή σφαιρική φιάλη και διαλύθηκε σε μίγμα H_2O/ACN (1:1) και το pH ρυθμίστηκε με DIPEA ($pH \approx 8$). Στη συνέχεια η φιάλη καλύφθηκε με ειδικό πλαστικό επίθεμα διαμέσου του οποίου διοχετευόταν αέριο άζωτο ώστε να επιτευχθούν αδρανείς συνθήκες. Σταδιακά σε μικρές ποσότητες και ανά 20' περίπου, προστέθηκε ο φορέας και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες σκότους, ώστε να προστατευθούν τα φωτοευαίσθητα ιωδοανάλογα.

Η αντίδραση τερματίστηκε στις 4 περίπου ώρες, οξινίζοντας το διάλυμα με την προσθήκη φορμικού οξέος ($pH \approx 3$). Το διάλυμα συλλέχθηκε ποσοτικά σε φιαλίδιο λυοφυλιοποίησης και τοποθετείται στη συσκευή λυοφυλιοποίησης. Αφού ληφθεί το προϊόν σε στερεή μορφή, καθαρίζεται με RP-HPLC ημιπαρασκευαστική και τα προκύπτοντα κλάσματα ταυτοποιούνται με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Τέλος, ακολουθεί ξανά λυοφυλιοποίηση ώστε να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν σε στερεή μορφή.

10.7. Ταυτοποίηση και καθαρισμός

Η ταυτοποίηση και ο καθαρισμός των τελικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε με Orbitrap MS και ημιπαρασκευαστική ή παρασκευαστική RP-HPLC αντίστοιχα. Για τον καθαρισμό των πεπτιδίων καθώς και των συμπλεγμάτων, το σύστημα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν H_2O (0,1%TFA) / CH_3CN (0,1%TFA) για 30'. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό με ημιπαρασκευαστική και παρασκευαστική RP-HPLC ήταν η C18 Discovery 25cm x 10mm, 5μm και η C18 Interchrom 25cm x 21,2 mm αντίστοιχα. Η ταχύτητα ροής ήταν 20 ml/min για την παρασκευαστική και 5 ml/min για την ημιπαρασκευαστική. Ο έλεγχος της καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC και στήλη Supelco C18 Discovery 25cm x 10mm, 5μm με το σύστημα έκλουσης διαλυτών που αναφέρθηκε παραπάνω, ταχύτητα ροής 1ml/min. Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε ήταν 214 nm.

Η ταυτοποίηση τόσο των πεπτιδίων όσο και των συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω HR-ESI-MS (Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL™). Για την ανάλυση τα πεπτιδία καθώς και τα συμπλέγματα διαλύθηκαν σε $H_2O/0,1\%$ φορμικό οξύ σε συγκέντρωση 2ppm.

10.7.1. Φασματοσκοπία NMR

Τα πειράματα NMR για τα πεπτιδικά ανάλογα πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker Avance σε συχνότητα 500,13 MHz. Πραγματοποιήθηκαν τόσο 1D όσο και 2D πειράματα (1H , $^1H-^1H$ TOCSY, $^1H-^1H$ COSY, $^1H-^1H$ NOESY) σε διάλυμα $H_2O:D_2O$ 9:1 (v/v), σε συγκέντρωση 5 mM και θερμοκρασία $T = 298$ K. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το λογισμικό Topspin 4.2.

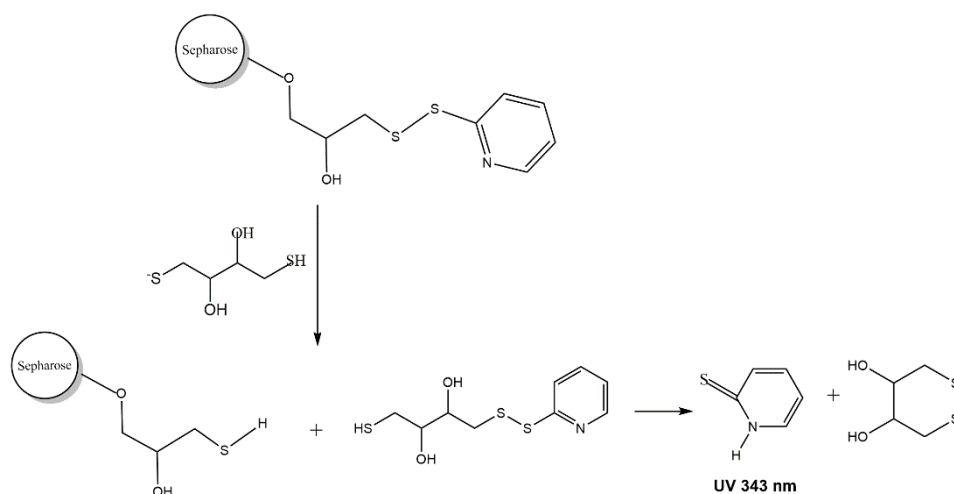
10.8. Σύνθεση των υλικών Sepharose-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και Sepharose-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷

Στάδιο 1ο – Απομάκρυνση της θειοπυριδινικής ομάδας

Η σεφαρόζη (Thiopropyl Sepharose 6B) μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon και αφέθηκε να διογκωθεί σε απιονισμένο νερό, σε αναλογία 200 mL/g υλικού, μέχρι την πλήρη απόκτηση της χαρακτηριστικής μορφής gel. Το υπερκείμενο νερό απομακρύνθηκε και η διαδικασία διόγκωσης επαναλήφθηκε συνολικά πέντε φορές, με χρονικό διάστημα 5 λεπτών μεταξύ των επαναλήψεων, ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης ενυδάτωση του υλικού.

Στη συνέχεια, το gel φυγοκεντρήθηκε στα 3000 g για 5 λεπτά στους 10 °C και το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε προσεκτικά με πιπέτα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αναδιασπορά του gel σε διάλυμα 1% (w/v) DTT σε 0,3 M NaHCO₃, το οποίο περιείχε 1 mM EDTA (pH 8,4) [Διάλυμα 1], σε επαρκή ποσότητα ώστε να καλύπτεται πλήρως το υλικό. Το εναιώρημα αφέθηκε υπό συνεχή ήπια ανάδευση για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να ολοκληρωθεί η απομάκρυνση της θειοπυριδινικής ομάδας.

Μετά το πέρας της επώασης, το gel φυγοκεντρήθηκε εκ νέου (3000 g, 10 λεπτά, 10 °C) και το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε. Ακολούθησε αναδιασπορά και



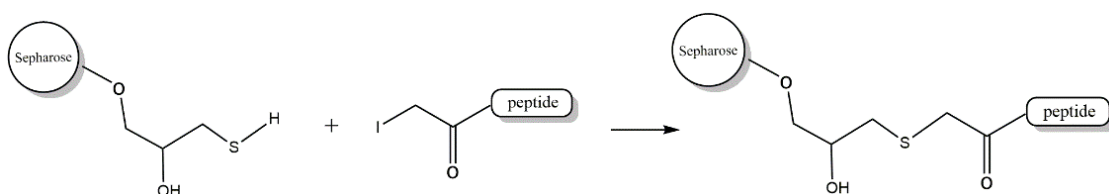
Εικόνα 19. Η αντίδραση της thiopropyl sepharose 6B με το DTT και σχηματισμός της 2-θειοπυριδόνης.

έκπλυση του gel με διάλυμα 0,1 M CH₃COOH, το οποίο περιείχε 0,5 M NaCl και 1 mM EDTA [Διάλυμα 2], σε αναλογία 400 mL διαλύματος ανά g σεφαρόζης. Η επιτυχία της αντίδρασης επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία UV στα 343 nm, μέσω της ανίχνευσης του σχηματισμού του προϊόντος 2-θειοπυριδόνη.

Στάδιο 2ο – Σύζευξη του πεπτιδίου IAc-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ ή IAc-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷ στη σεφαρόζη

Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου, το gel εκπλύθηκε με διάλυμα 0,05 M Tris buffer που περιείχε 5 mM EDTA (pH 8,5) [Διάλυμα 3], σε όγκο ίσο με 15 × Vστήλης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος έκπλυσης.

Στη συνέχεια, προστέθηκε το πεπτίδιο IAc-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ ή IAc-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷ στη σεφαρόζη το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί στο Διάλυμα 3 σε τελική συγκέντρωση 5 mg/mL. Το μίγμα επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύζευξη του πεπτιδίου με τη σεφαρόζη. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, το gel εκπλύθηκε εκ νέου με το Διάλυμα 3 (5 × Vστήλης), ώστε να απομακρυνθεί τυχόν μη δεσμευμένο πεπτίδιο. Το τελικό προϊόν αποθηκεύτηκε στο διάλυμα έκπλυσης στους 4 °C έως την περαιτέρω χρήση του.



Εικόνα 20. Αντίδραση σύζευξης του ιωδοακετυλιωμένου πεπτιδίου στη σεφαρόζη.

10.9. Ανοσοποιήσεις

Τα πεπτιδικά συμπλέγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση ορνιθων ακολουθώντας τα παρακάτω δύο πρωτόκολλα. Πριν την πρώτη ανοσοποίηση, και στα δύο πρωτόκολλα, έγινε συλλογή αυγών τα οποία αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες για τις δοκιμασίες ELISA που πραγματοποιήθηκαν στην συνέχεια.

10.9.1. 1^ο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων

Η ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκε σε μία όρνιθα χρησιμοποιώντας το σύμπλεγμα CPSOC(3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK).

1. Κατά την πρώτη ανοσοποίηση το ανοσογονικό συμπλέγμα κατεργάστηκε με το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA) και η ανοσοποίηση έγινε ενδομυϊκά σε τέσσερα σημεία του στήθους του ζώου. Συγκεκριμένα 0,3 mg του ανοσογόνου διαλύθηκαν σε 1 ml CFA και νερού σε αναλογία 1:1. Μετά την πρώτη ανοσοποίηση και μόλις η όρνιθα παρήγαγε αυγά αυτά συλλέχθηκαν.

2. 21 ημέρες αργότερα πραγματοποιήθηκε η δεύτερη ανοσοποίηση με τη χρήση του ατελούς ανοσοενισχυτικού του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA). Η ανοσοποίηση έγινε με 0,1 mg του ανοσογόνου σε 1 ml IFA και νερού σε αναλογία 1:1. Μετά από μερικές ημέρες συλλέχθηκαν τα αυγά.
3. Δεκαπέντε ημέρες μετά τη δεύτερη ανοσοποίηση ακολούθησε τρίτη ανοσοποίηση, η οποία πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο.
4. Έπειτα από ένα μήνα πραγματοποιήθηκε μια ενισχυτική τέταρτη δόση με τον τρόπο που είχε πραγματοποιηθεί η πρώτη ανοσοποίηση.
5. Τέλος, μετά από 15 μήνες πραγματοποιήθηκε και μια αναμνηστική ανοσοποίηση με δόση 1mg/ml.

10.9.2. 2^ο πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων

Η ανοσοποίηση έγινε σε ένα ζώο χρησιμοποιώντας μίγμα των δύο ανοσογονικών συμπλεγμάτων CPSOC (3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK) και CPSOC (3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENSDK).

1. Κατά την πρώτη ανοσοποίηση τα ανοσογονικά συμπλέγματα κατεργάστηκαν με το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA) και η ανοσοποίηση έγινε ενδομυϊκά σε τέσσερα σημεία του στήθους του κοτόπουλου. Συγκεκριμένα 0,3 mg μίγματος των δύο ανοσογονικών συμπλεγμάτων διαλύθηκαν σε 1 ml CFA και νερού σε αναλογία 1:1. Μετά την πρώτη ανοσοποίηση και μόλις η όρνιθα παρήγαγε αυγά αυτά συλλέχθηκαν.
2. Στη συνέχεια, 21 ημέρες μετά την πρώτη ανοσοποίηση, πραγματοποιήθηκε η δεύτερη ανοσοποίηση με το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA). Η ανοσοποίηση έγινε με 0,1 mg των πεπτιδικών αναλόγων τα οποία διαλύθηκαν σε 1 ml IFA και νερού σε αναλογία 1:1. Μετά από μερικές ημέρες συλλέχθηκαν τα αυγά.
3. Δύο εβδομάδες αργότερα ακολούθησε τρίτη ανοσοποίηση, η οποία πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο.
4. Έπειτα, από δύο περίπου μήνες χορηγήθηκε μια ενισχυτική τέταρτη δόση σύμφωνα με τον τρόπο που είχε πραγματοποιηθεί η πρώτη ανοσοποίηση.
5. Τέλος μετά από 15 μήνες πραγματοποιήθηκε μια αναμνηστική ανοσοποίηση με δόση 1mg/ml.

10.9.3. Απομόνωση Του IgY

Για την απομόνωσης του IgY από τον κρόκο αυγού χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο¹⁷⁷:

- ♦ Το κέλυφος των αυγών ραγίζεται προσεκτικά και ο κρόκος μεταφέρεται σε ένα ειδικό κουτάλι και πλένεται με νερό προκειμένου να απομακρυνθεί όσο δυνατόν περισσότερο ασπράδι.
- ♦ Ο κρόκος μεταφέρεται προσεκτικά πάνω σε ένα διηθητικό χαρτί και με κυκλικές κινήσεις απομακρύνονται τα υπολείμματα του ασπραδιού.
- ♦ Με μια βελόνα, διαρρηγνύεται η μεμβράνη του κρόκου προκειμένου να απελευθερωθεί το εσωτερικό του και να μεταφερθεί σε πλαστικό σωλήνα (falcon) των 50 ml. Καταγράφεται ο όγκος. Προστίθεται διάλυμα PBS (pH 7,2) σε όγκο διπλάσιο του κρόκου ($V_{\text{PBS}} = 2V_{\text{κ}}$) και μετά προστίθεται 3,5% PEG (Polyethylene Glycol) 6000 κονιοποιημένο επί του συνολικού όγκου.
- ♦ Ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος και χρήση Vortex για 30'' και φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).
- ♦ Το υπερκείμενο, που θα πρέπει να είναι διαυγές, διηθώντας το με πτυχωτό ηθμό, αποχύνεται σε νέο δοκιμαστικό κύλινδρο και καταγράφεται ο όγκος του.
- ♦ Προστίθεται 8,5% PEG 6000 επί του όγκου που καταγράφηκε.
- ♦ Ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος και χρήση Vortexer για 30'' και φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).
- ♦ Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται σε 1ml PBS με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και Vortexer.
- ♦ Προστίθεται επιπλέον PBS μέχρι τελικό όγκο 10ml. Προστίθεται 12% PEG 6000 ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος και χρήση Vortex για 30'' και φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).
- ♦ Απορρίπτεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα διαλύεται σε τελικό όγκο 1,2 ml PBS.

10.10. Καθαρισμός των IgY αντισωμάτων

10.10.1. Διαπίδυση

Τα αντισώματα που απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν στη συνέχεια με τη μέθοδο της διαπίδυσης για την απομάκρυνση μη σχετικών πρωτεϊνών, αλάτων ή και τυχόν υπολειπόμενου PEG 6000 στο διάλυμα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ημιπερατή μεμβράνη (cutoff 50kDa), τα άκρα της έκλεισαν προσεκτικά ώστε να μην υπάρχουν διαρροές και η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε νερό και μαγνητάκι. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 ώρες και έπειτα το εξωτερικό διάλυμα απορρίφθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε αφήνοντας την ανάδευση για 24 ώρες και έπειτα για ακόμη 2 ώρες. Τέλος η μεμβράνη ανοίχτηκε προσεκτικά και το περιεχόμενο παραλήφθηκε με τη χρήση πιπέτας και τοποθετήθηκε σε Eppendorf για αποθήκευση στους -20°C ή για λυοφιλίωση.

10.10.2. Χρωματογραφία συγγένειας

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα:

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

Το τροποποιημένο gel σεφαρόζης τοποθετήθηκε σε ειδικό πλαστικό σωλήνα με ηθμό και εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μέσω πέντε διαδοχικών εκπλύσεων διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος με διήθηση.

Στη συνέχεια, 1 mg λυοφιλοποιημένου αντισώματος διαλύθηκε σε 1 mL του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος προστέθηκε στο gel και αφέθηκε να αλληλεπιδράσει υπό στατικές συνθήκες, ακολουθούμενο από διήθηση. Η διαδικασία φόρτωσης επαναλήφθηκε συνολικά πέντε φορές, ώστε να μεγιστοποιηθεί η πρόσδεση του αντισώματος στο gel. Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης, το διάλυμα απομακρύνθηκε με διήθηση και συλλέχθηκε σε κατάλληλο σωλήνα τύπου Falcon, ενώ αμέσως η στήλη εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης όγκου ίσου με πέντε φορές τον όγκο της στήλης (5 × V στήλης). Ακολούθως, προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης και τα εκλούόμενα κλάσματα συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά Eppendorf, τα οποία περιείχαν αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου της στήλης, ώστε να επιτευχθεί άμεση εξουδετέρωση του όξινου pH. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με ρυθμό ροής 1 mL/min.

Μετά την ολοκλήρωση της έκλουσης, η στήλη εκπλύθηκε εκ νέου με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (5 × V στήλης) και αποθηκεύτηκε στους 4 °C σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 20% (v/v). Τα κλάσματα αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5 (v/v) και η συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm.

10.11. Δοκιμασίες ELISA

Μετά την ολοκλήρωση των ανοσοποιήσεων αναπτύχθηκαν δοκιμασίες ELISA, με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα καθώς και έναντι των διαθέσιμων δηλητηρίων εχιδνών. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα στάδια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις δοκιμασίες ELISA.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ELISA:

- Coating Buffer: 1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 και 0,20 g NaN_3 σε 1 L H_2O (pH 9.6)
- Stock PBS (10x) : 160 g NaCl , 4 g KCl , 4 g KH_2PO_4 , 24g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ σε 2 L H_2O (pH 7.2)
- Διάλυμα PBS: 1/10 v/v αραιώση του Stock PBS (10x)
- Διάλυμα 3% (w/v) σκόνη γάλακτος σε PBS (διάλυμα έκπλυσεων)
- Stock ανοσογονικού συμπλέγματος: 1 mg συμπλέγματος διαλύθηκε σε 1 ml H_2O
- Διάλυμα A: Peroxidase Substrate TMB/ H_2O (1:1, v/v)
- Διάλυμα B: Peroxide Solution $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v)
- Διάλυμα H_2SO_4 2M: 54 ml πυκνού H_2SO_4 αραιώθηκαν με 446 ml H_2O . Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε γυάλινο μπουκάλι (RT)

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ανάλογα με τον τύπο ELISA ήταν τα εξής:

10.11.1. Έμμεση ELISA:

Στάδιο 1°: Επίστρωση του τρυβλίου (Coating)

Το τρυβλίο (NUNC), επιστρώθηκε είτε με τα ανοσογονικά συμπλέγματα είτε με ένα από τα διαθέσιμα δηλητήρια, διαλυμένα σε PBS (100μl/ well). Ακολούθησε επώαση 2 ώρες στους 37°C. Μετά τη ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκπλύσεις, με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος σε PBS (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 2°: Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης (Blocking)

Το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος σε PBS (200μl/ well), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα έκπλυσης (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 3°: Προσθήκη αντισώματος

Προσθήκη των αντίστοιχων αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τον κρόκο αβγών ανοσοποιημένης όρνιθας, σε διάφορες αραιώσεις, σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) (100μl/ well). Ακολούθησε επώαση 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα έκπλυσης (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 4°: Προσθήκη επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (anti-chicken IgG)

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την προσθήκη ενός δεύτερου επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (anti-chicken IgG (H+L)). Η επώαση με το συγκεκριμένο αντι-αντίσωμα πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες στους 37°C. Μετά την ολοκλήρωση και αυτού του σταδίου, διεξήχθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις.

Στάδιο 5°: Ενζυμική αντίδραση

Η μέτρηση της ενζυμικής δράσης, έγινε με τη χρήση του ειδικού υποστρώματος, της 3,3',5,5'-τετραμέθυλο βενζιδίνης (TMB substrate kit, Pierce) (100μl/well). Η αντίδραση έλαβε χώρα για περίπου 10 λεπτά σε σκοτάδι και τερματίστηκε με διάλυμα θειικού οξέος 2M. Οι μετρήσεις των ELISA δοκιμασιών πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο στα 450nm.

10.11.2. ELISA sandwich:

Στάδιο 1°: Επίστρωση του τρυβλίου (Coating)

Το τρυβλίο (NUNC), επιστρώθηκε με αντιοφικό ορό διαλυμένο σε PBS (100μl/well). Ακολούθησε επώαση 2 ώρες στους 37°C. Μετά τη ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκπλύσεις, με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος σε PBS (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 2°: Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης (Blocking)

Το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος σε PBS (200μl/well), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα έκπλυσης (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 3°: Προσθήκη δηλητηρίου

Προσθήκη των αντίστοιχων διαθέσιμων δηλητηρίων σε διάφορες αραιώσεις, σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) (100μl/well). Ακολούθησε επώαση 2 ώρες στους 37 °C. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα έκπλυσης (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 4°: Προσθήκη αντισωμάτων

Προσθήκη των αντίστοιχων αντισωμάτων που απομονώθηκαν από τον κρόκο αβγών ανοσοποιημένης όρνιθας, σε διάφορες αραιώσεις, σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) (100μl/well). Ακολούθησε επώαση 2 ώρες στους 37 °C..

Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα έκπλυσης (5 φορές: 4x200 μl, 1x400 μl).

Στάδιο 5°: Προσθήκη επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (anti-chicken IgG)

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την προσθήκη ενός δεύτερου επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (anti-chicken IgG (H+L)). Η επώαση με το συγκεκριμένο αντι-αντίσωμα πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες στους 37 °C. Μετά την ολοκλήρωση και αυτού του σταδίου, διεξήχθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις.

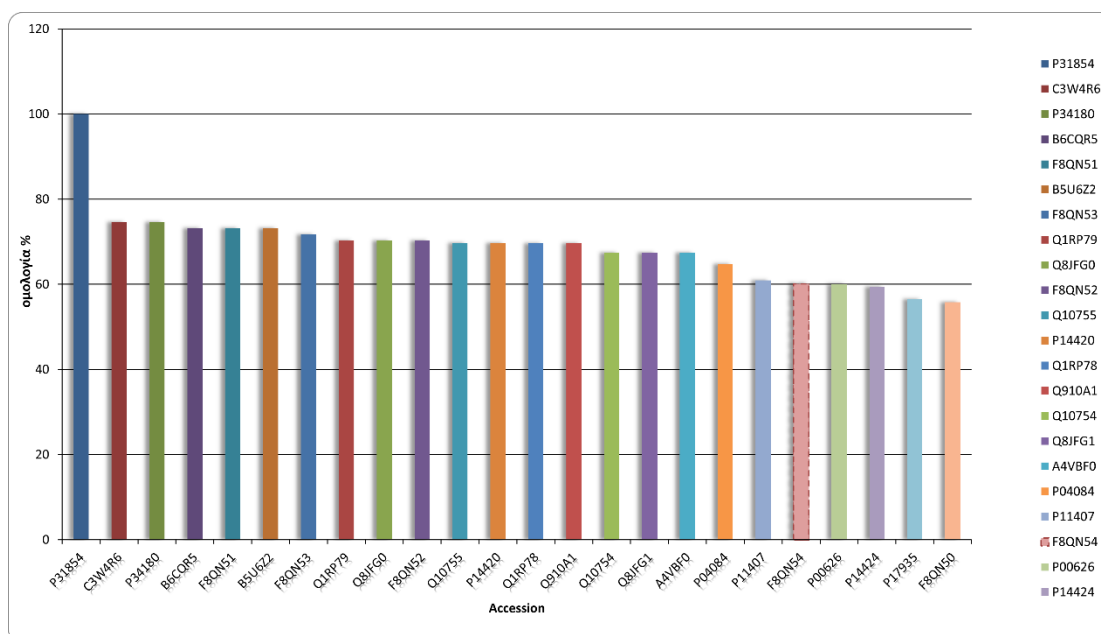
Βήμα 6°: Ενζυμική αντίδραση

Η μέτρηση της ενζυμικής δράσης, έγινε με τη χρήση του ειδικού υποστρώματος, της 3,3',5,5'-τετραμέθυλο βενζιδίνης (TMB substrate kit, Pierce) (100μl/well). Η αντίδραση έλαβε χώρα για περίπου 10 λεπτά σε σκοτάδι και τερματίστηκε με διάλυμα θειικού οξέος 2M. Οι μετρήσεις των ELISA δοκιμασιών πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο στα 450nm.

11. Αποτελέσματα

11.1. Μελέτες ομολογίας

Από τις μελέτες ομολογίας των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των φωσφολιπασών μέσω του fasta blast αλγορίθμου προέκυψε ότι η φωσφολιπάση A₂ της *V. berus* (P31854) παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες της οικογένειας, στις περισσότερες περιπτώσεις σε ποσοστό άνω του 60% (Εικόνα 21). Αντίστοιχα, η φωσφολιπάση A2 της *V. ammodytes* (P00626) εμφανίζει επίσης υψηλή ομολογία με σχεδόν όλες τις φωσφολιπάσες και σε αρκετές περιπτώσεις άνω του 70% (Εικόνα 22). Επιπλέον, η ομολογία μεταξύ των φωσφολιπασών της *V. Berus* και της *V. Ammodytes* ανέρχεται στο 60% (Εικόνα 23).

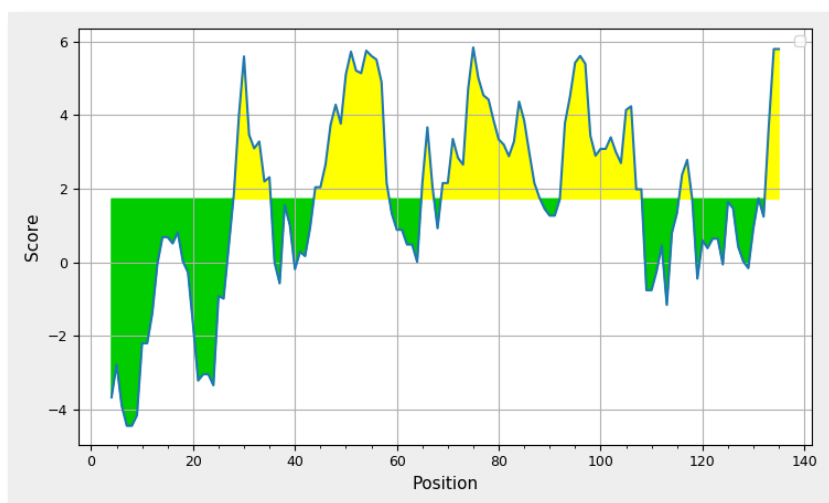


Εικόνα 21. Συστοίχιση της φωσφολιπάσης της *V. Berus* (P 31854) με τις υπόλοιπες φωσφολιπάσες της οικογένειας.

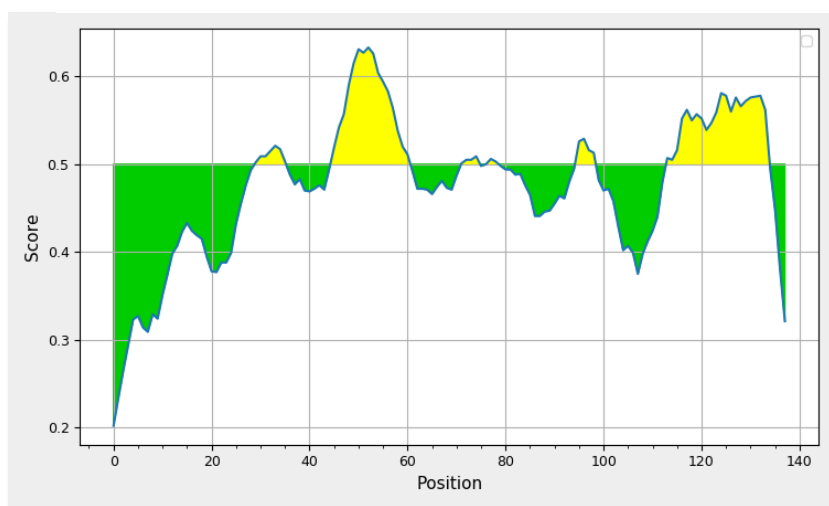
11.2. Μελέτη ανοσογονικότητας των φωσfolιπασών A2

Στις εικόνες 25-30 παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν τα προφίλ αντιγονικότητας, υδροφιλικότητας, επιφανειακής προσβασιμότητας, ευελιξίας και δευτεροταγούς δομής των φωσfolιπασών A₂ των επιλεγμένων εχιδνών *Vipera ammodytes ammodytes* και *Vipera berus berus*.

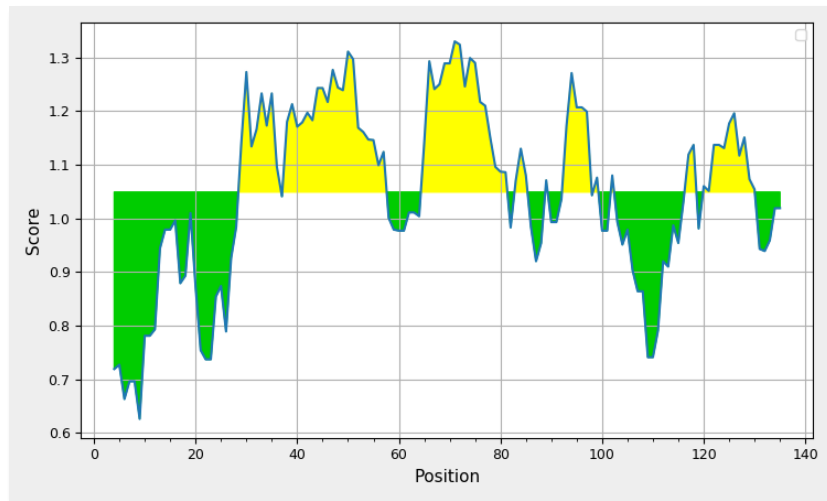
11.2.1. *Vipera ammodytes ammodytes*



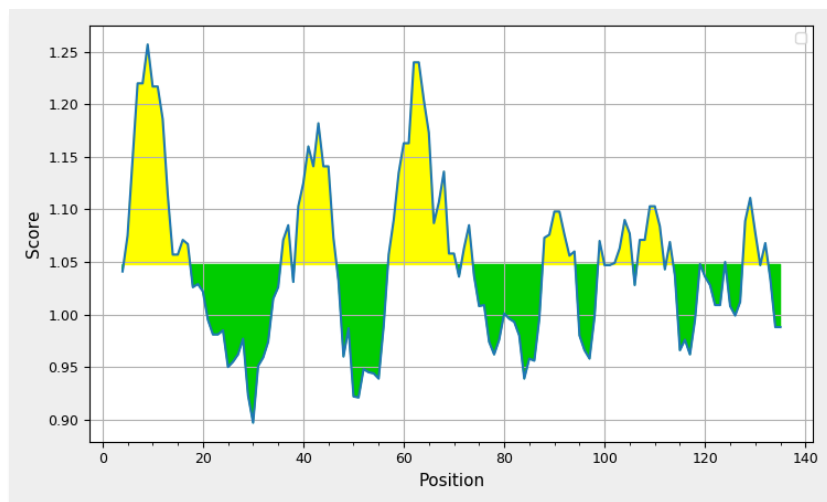
Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση του προφίλ υδροφιλικότητας της AtxA.



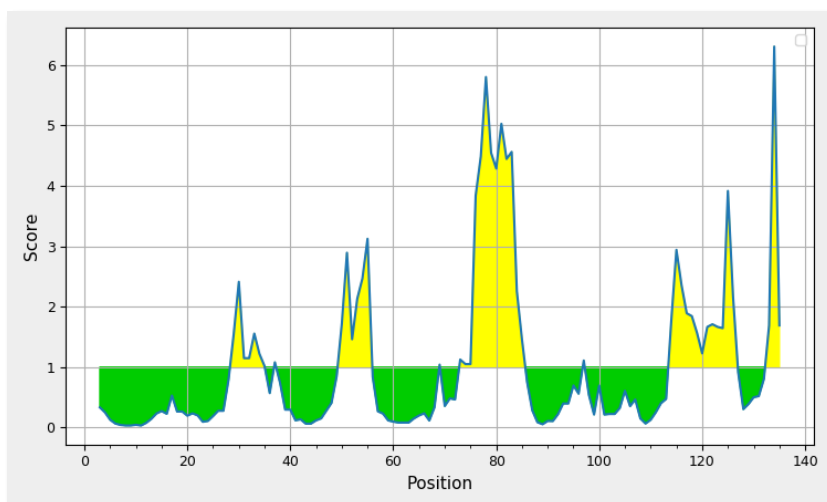
Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών γραμμικών επιτόπων της AtxA . (Μέθοδος: Beripred Linear Epitope Prediction 2.0).



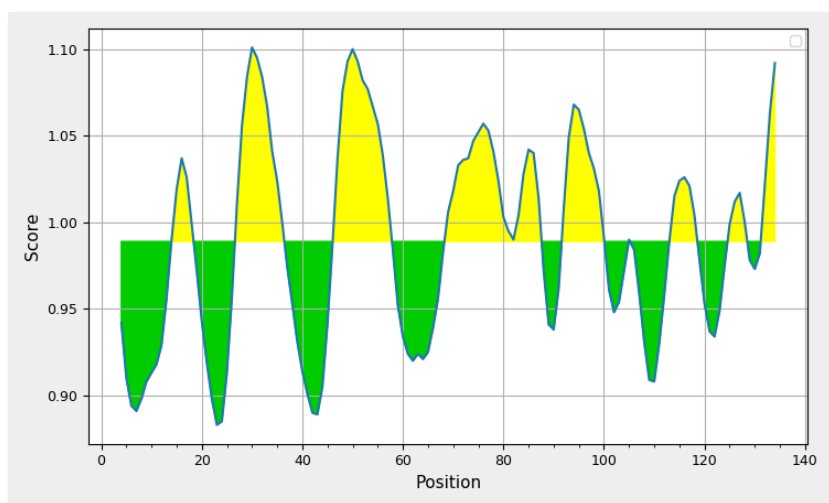
Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών που μπορούν να εμφανίσουν δομή β- στροφής της AtxA. (Μέθοδος Chou/Fasman)



Εικόνα 29. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της AtxA. Μέθοδος: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity.



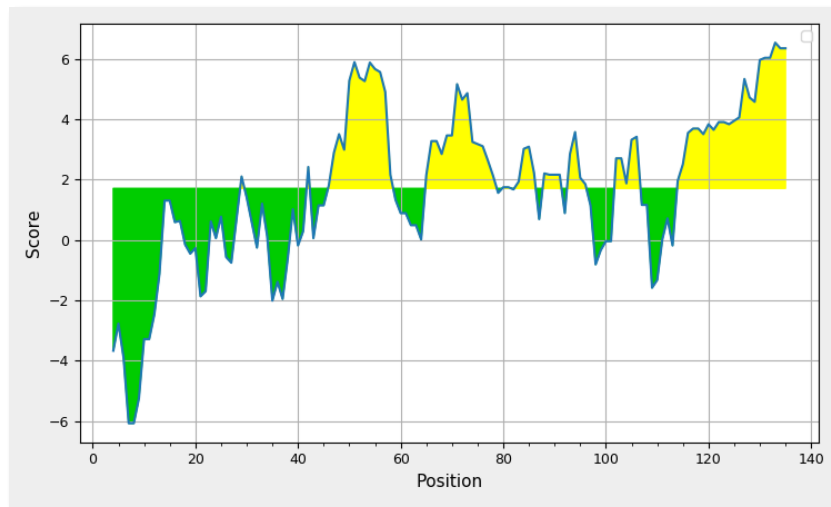
Εικόνα 27. Σχηματική παρουσίαση των επιφανειακά προσβάσιμων περιοχών της AtxA. (Μέθοδος: Emini Surface Accessibility Prediction).



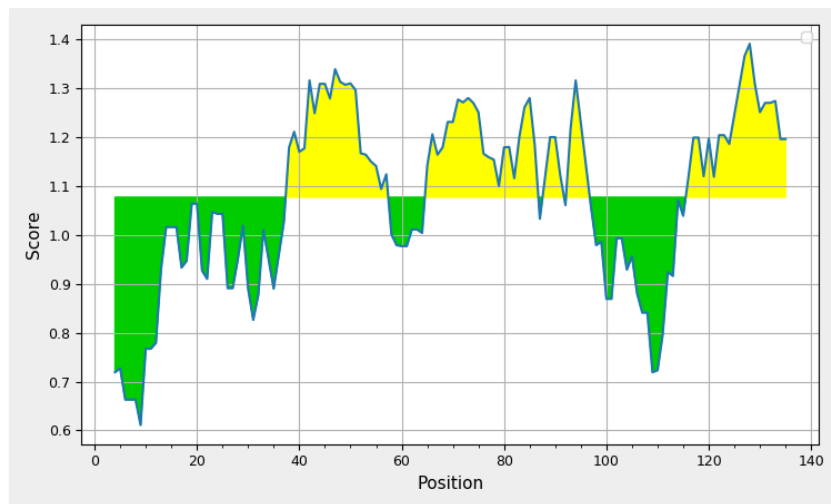
Εικόνα 30. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών κινητικά ευέλικτων περιοχών της AtxA. Μέθοδος: Karplus Chain flexibility.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, από τις υπολογιστικές μεθόδους, η αλληλουχία της πρωτεΐνης που επιλέχθηκε προς σύνθεση είναι η D¹²⁸FLCKKESEK¹³⁷ και όπως φαίνεται από τις Εικόνες 25-30 εμφανίζει αρκετά καλή υδροφιλικότητα και ευκαμψία καθώς και αρκετά καλή αντιγονικότητα και επιφανειακή προσβασιμότητα.

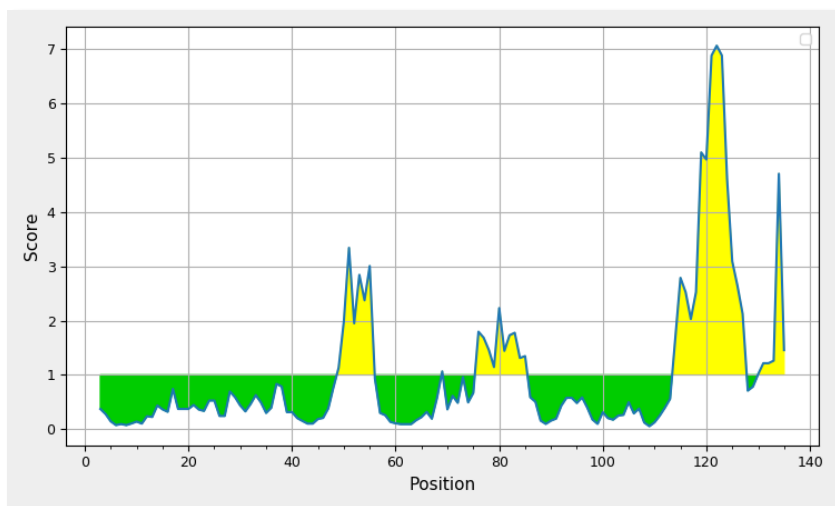
11.2.2. *Vipera berus berus*



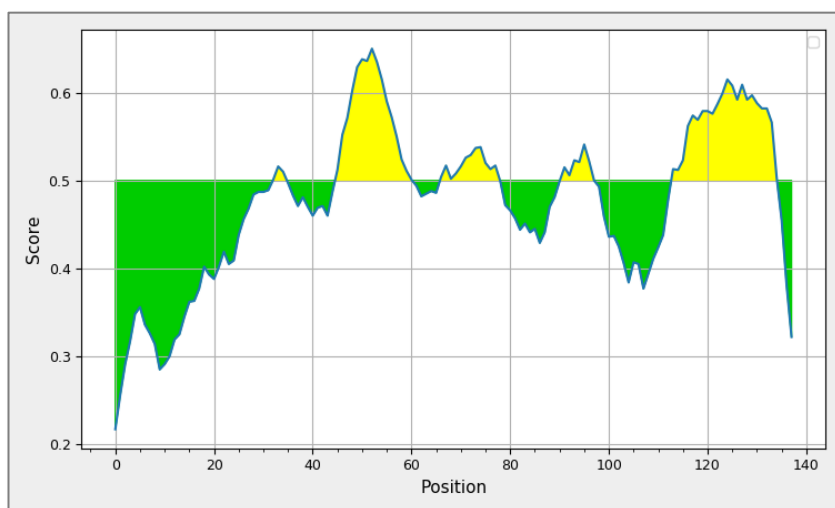
Εικόνα 31. Σχηματική απεικόνιση του προφίλ υδροφιλικότητας της φωσφολιπάσης A₂ της Pla2Vb



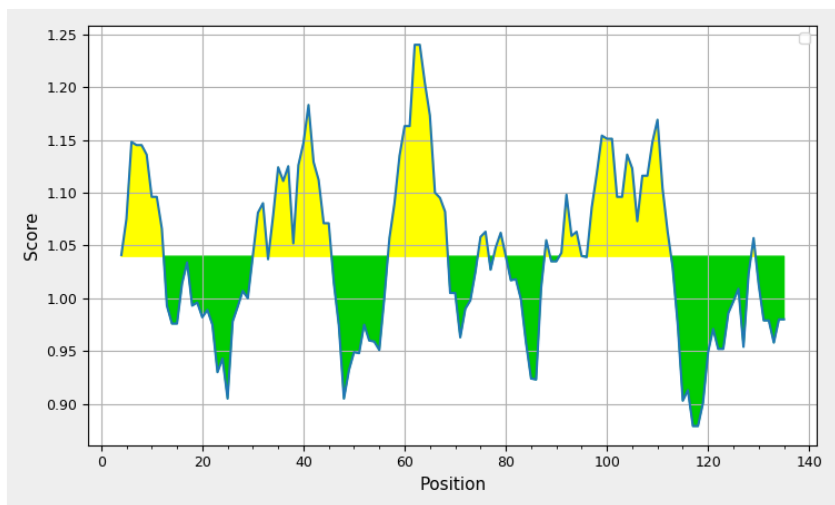
Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών που μπορούν να εμφανίσουν δομή β-στροφής της Pla2Vb. (Μέθοδος Chou/Fasman).



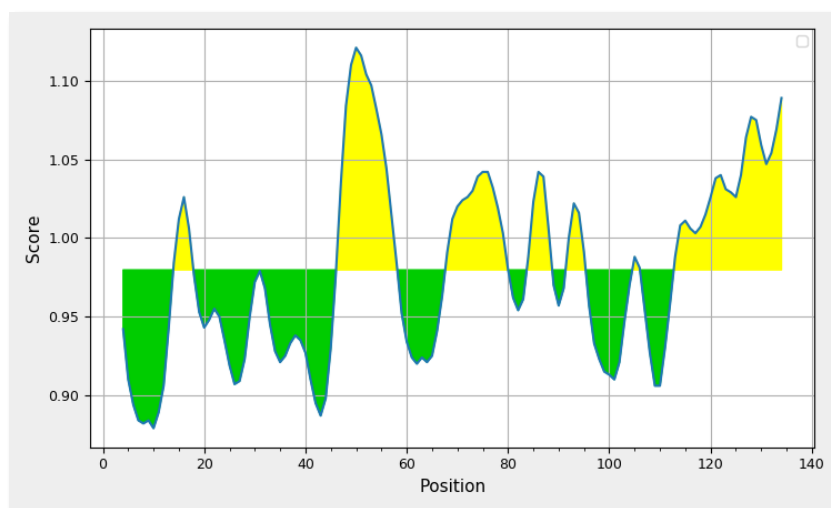
Εικόνα 33. Σχηματική παρουσίαση των επιφανειακά προσβάσιμων περιοχών της Pla2Vb. (Μέθοδος: Emini Surface Accessibility Prediction)..



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών γραμμικών επιτόπων της Pla2Vb. (Μέθοδος: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0).



Εικόνα 35. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών αντιγονικών περιοχών της Pla2Vb. Μέθοδος: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity



Εικόνα 36. Σχηματική παρουσίαση των πιθανών κινητικά ευέλικτων περιοχών της Pla2Vb. Μέθοδος: Karplus Chain flexibility.

Από τα αποτελέσματα των υπολογιστικών μεθόδων η αλληλουχία που επιλέχθηκε από την φωσφολιπάση A_2 της *V. berus* είναι η εξής: $S^{128}SNCQENSDK^{137}$. Όπως φαίνεται από τις Εικόνες 31-36 η αλληλουχία εμφανίζει υψηλή επιφανειακή προσβασιμότητα, ευελιξία και ευκαμψία ενώ η αντιγονικότητα της δεν αναμένεται υψηλή.

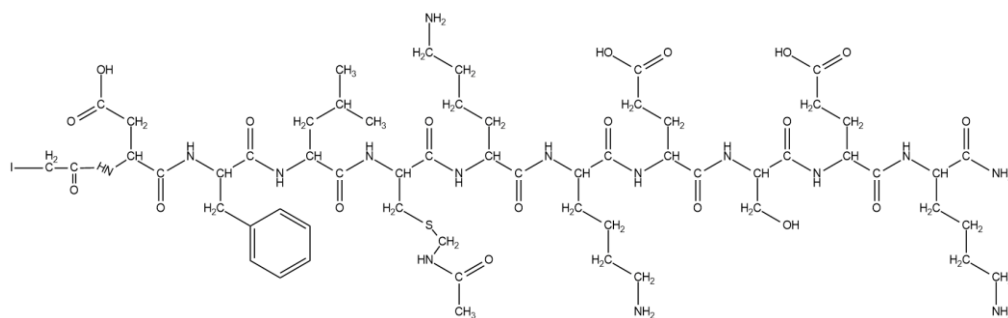
11.3. Συνθέσεις πεπτιδίων και συμπλεγμάτων

11.3.1. Σύνθεση του πεπτιδίου $\text{ICH}_2\text{CO-D}^{128}\text{FLC}(\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3)\text{KKESEK}^{137}\text{-NH}_2$

Στην Εικόνα 37 φαίνεται η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης AtxA και η περιοχή που επιλέχθηκε για τη σύνθεση του πεπτιδίου $\text{IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH}_2$ του οποίου ο συντακτικός τύπος παρουσιάζεται την Εικόνα 38. Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται την παράγραφο 10.5. Για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών: TFA/TIS/ H_2O (95/2,5/2,5, v/v/v). Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε σε 72%.



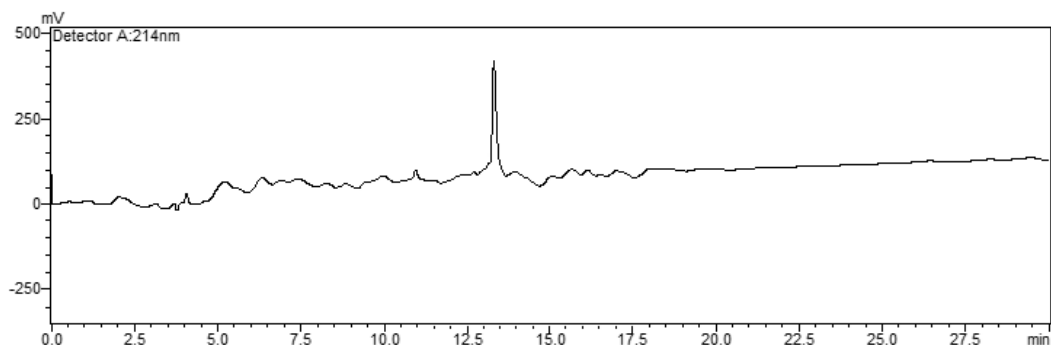
Εικόνα 37. Τρισδιάστατη δομή της AtxA. Σημειωμένη στον κόκκινο κύκλο φαίνεται η επιλεγμένη περιοχή προς σύνθεση.



Εικόνα 38. Συντακτικός τύπος του πεπτιδίου $\text{ICH}_2\text{CO-D}^{128}\text{FLC}(\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3)\text{KKESEK}^{137}\text{-NH}_2$

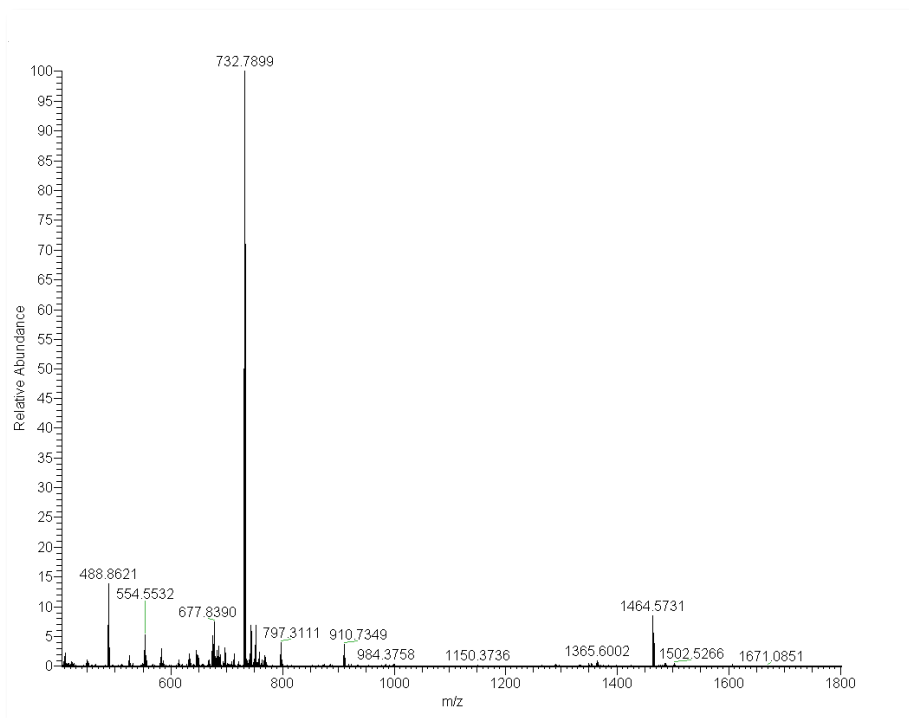
Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρατίθεται στην Εικόνα 39 όπου φαίνεται η καθαρότητα του πεπτιδίου. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πεπτίδιο ήταν το εξής: (A) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$ και (B)

CH₃CN/0,1%TFA με γραμμική μεταβολή από (A) 80/ (B) 20 σε (A) 30/ (B) 70 για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 39%.



Εικόνα 39. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου ICH₂CO-D¹²⁸FLC(CH₂NHCOCH₃)KKESEK¹³⁷-NH₂

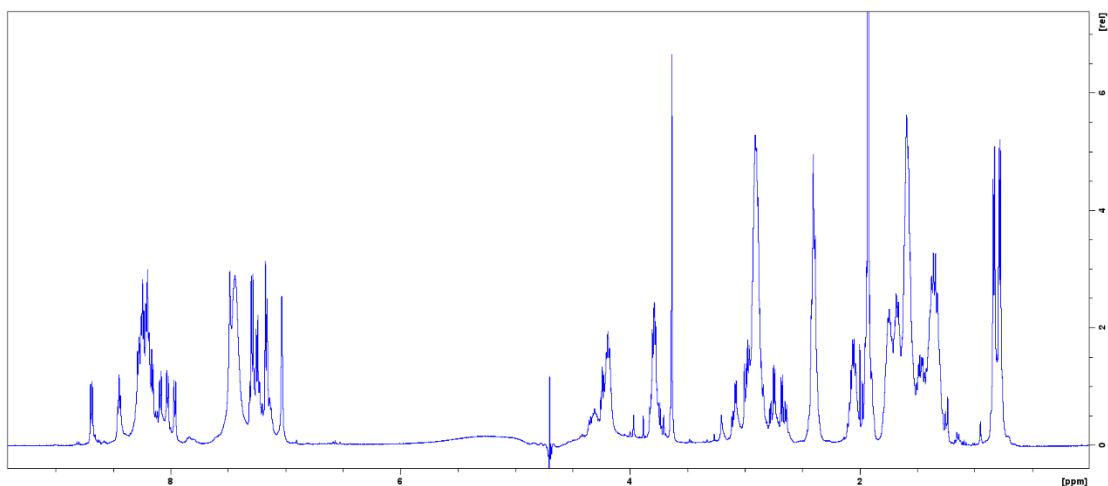
Το φάσμα μάζας ελήφθη όπως αναφέρεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 40 όπου διακρίνονται τα μοριακά ιόντα με Μοριακά Βάρη: 1) 1464,57Da, που αντιστοιχεί στο [M+1H⁺]/1, 2) 732,78Da, που αντιστοιχεί στο [M+2H⁺]/2, και 3) 488,86 που αντιστοιχεί στο [M+3H⁺]/3.



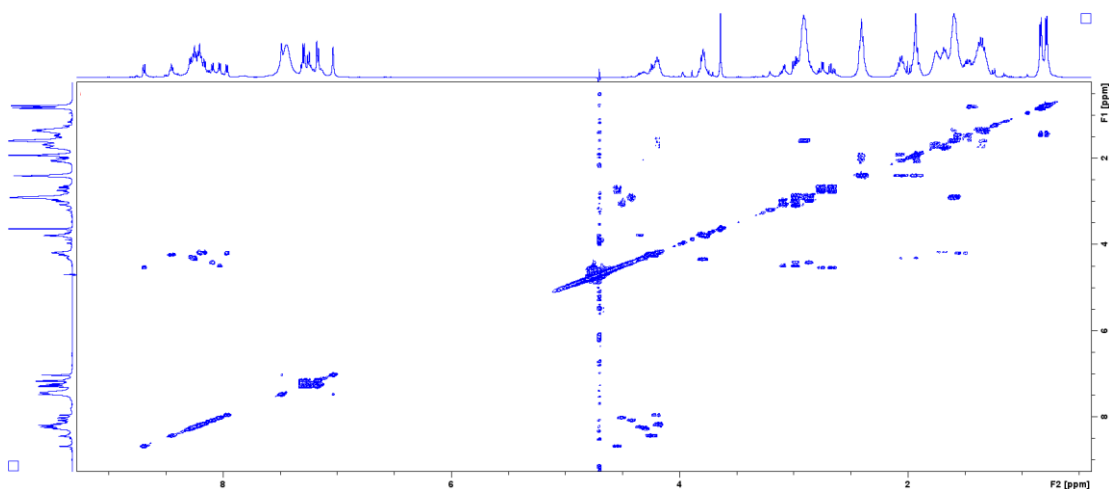
Εικόνα 40. Φάσμα μάζας του πεπτιδίου ICH₂CO-D¹²⁸FLC(CH₂NHCOCH₃)KKESEK¹³⁷-NH₂. Υπολογισθέν μοριακό βάρος: 1464,43, ευρεθέν 1464,57.

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις ¹H (δ, ppm) του επιτόπου IAC-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂ παρατίθενται στον Πίνακα 3. Τα 1D και 2D φάσματα NMR παρουσιάζονται στις Εικόνες 41-44.

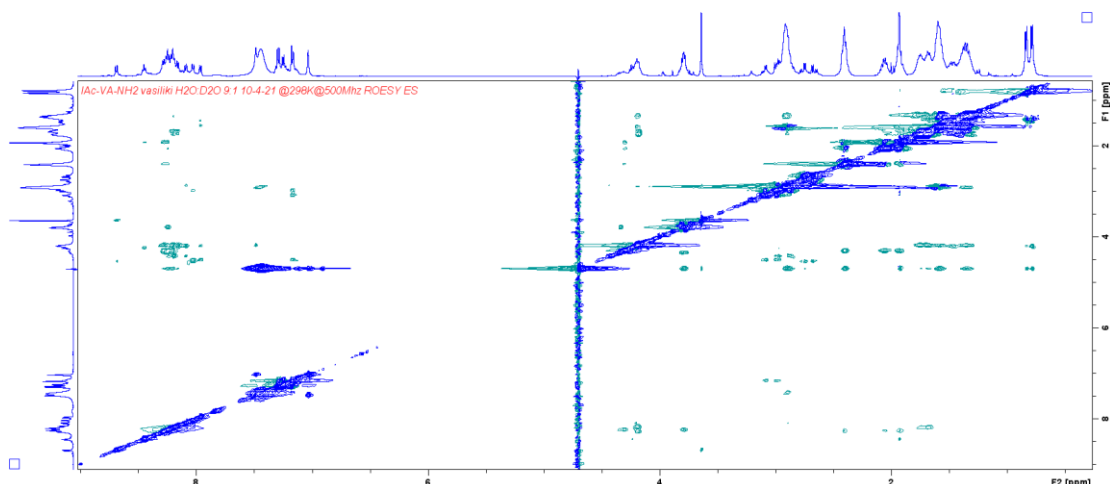
Η ανάλυση του NOESY φάσματος δείχνει ότι το πεπτιδίο δεν υιοθετεί συγκεκριμένη διαμόρφωση, καθώς δεν παρατηρούνται σήματα NOE χαρακτηριστικά δευτεροταγούς διαμόρφωσης, ούτε μεταξύ πρωτονίων απομακρυσμένων αμινοξέων. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων, όπως της λυσίνης, και πρωτονίων απομακρυσμένων αμινοξέων.



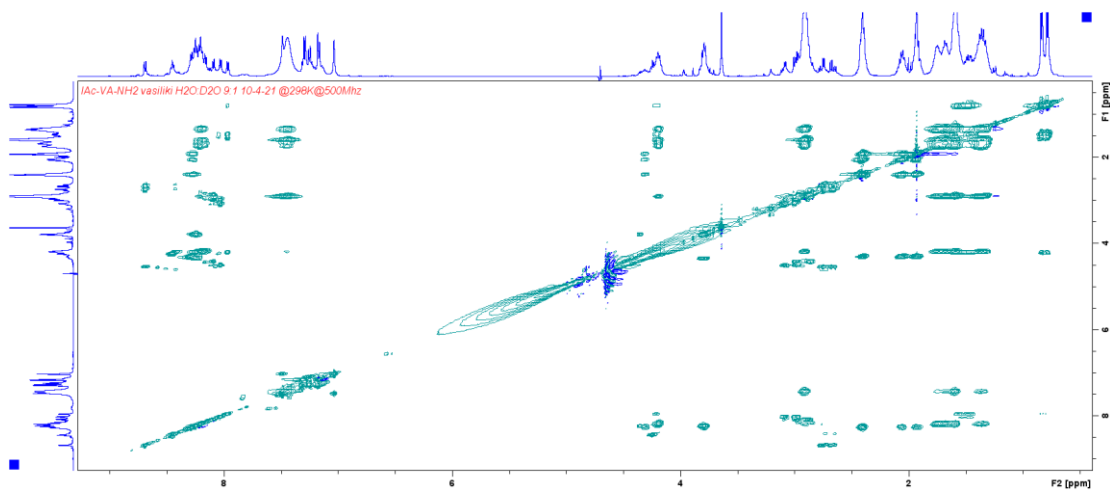
Εικόνα 41 Φάσμα NMR ^1H του πεπτιδίου IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1 (v/v).



Εικόνα 42. Φάσμα NMR ^1H ^1H COSY του πεπτιδίου IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1 (v/v).



Εικόνα 43. Φάσμα NMR ^1H ^1H NOESY του πεπτιδίου IAc-DFLC_(Acm)KKESEK-NH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1 (v/v).



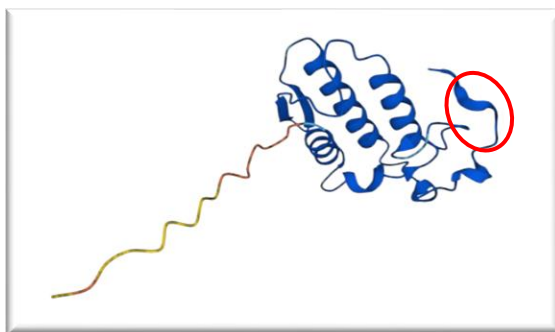
Εικόνα 44. Φάσμα NMR ^1H ^1H TOCSY του πεπτιδίου IAc-DFLC_(Acm)KKESEK-NH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1 (v/v).

Πίνακας 4. Χημικές μετατοπίσεις του πεπτιδίου IAc-DFLC_(AcM)KKESSEK-NH₂.

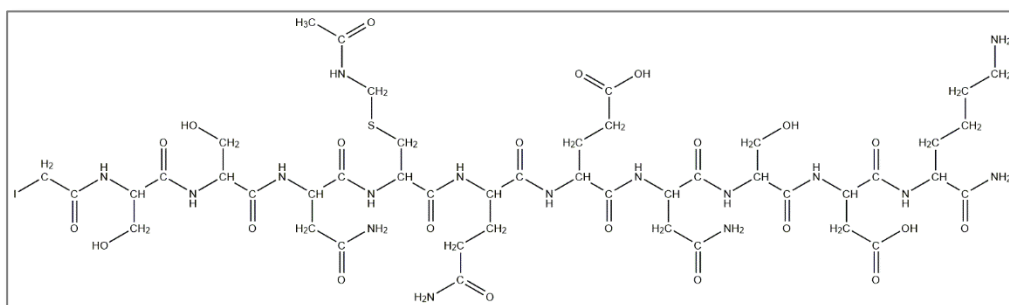
	α H	β H	γ H	γ CH ₂	δ CH ₂	δ CH ₃	ϵ CH ₂	ϵ NH ₃ / OH	H1 (phe)	H2 (phe)	H2 (phe)	NH
ICH ₂ CO	n.o											
Asp	4.54	2.73 2.64						n.o				8.69
Phe	4.24	2.99 3.09							7.16	7.28	7.24	8.43
Leu	4.23	1.57 1.59	1.63			0.83 0.78						8.45
Cys	4.41	2.88										8.09
CH ₂ NHC OCH ₂ - (Cys)		4.18 4.19				1.93						8.17
Lys1	4.18	1.75		1.35	1.59		2.92	7.43				8.18
Lys2	4.19	1.74		1.36	1.59		2.91	7.43				8.20
Glu	4.31	2.07 1.93	2.40					n.o				8.25
Ser	4.35	3.79						n.o				8.21
Glu	4.29	2.05 1.93	2.40					n.o				8.24
Lys3	4.20	1.74		1.35	1.59		2.90	n.o				7.96

11.3.2. Σύνθεση του πεπτιδίου $\text{ICH}_2\text{CO-S}^{128}\text{SNC}(\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3)\text{QENS DK}^{137}\text{-NH}_2$

Στην Εικόνα 45. φαίνεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου $\text{IAC-SSNC}(\text{Ac})\text{QENS DK-NH}_2$. Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 10.5 Για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών: $\text{TFA/TIS/H}_2\text{O}$ (95/2,5/2,5, v/v/v). Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε σε 70%.

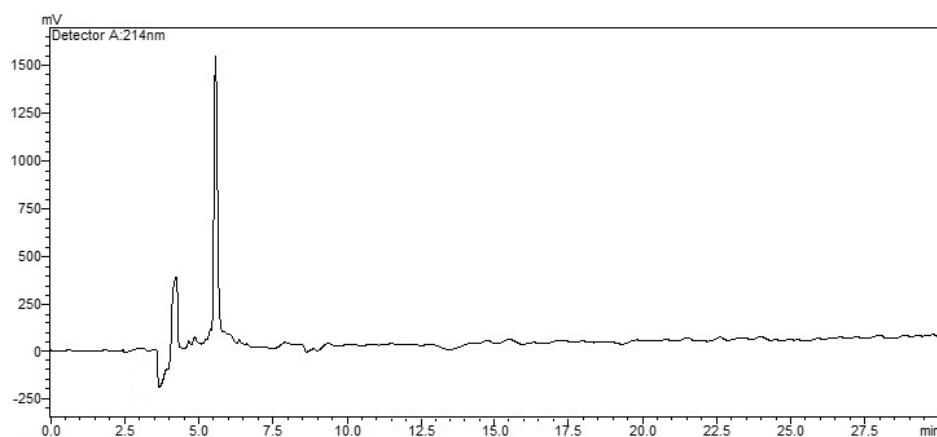


Εικόνα 45. Τρισδιάστατη δομή της Φωσφολιπάσης A2 της V. Berus. Σε κόκκινο κύκλο σημειώνεται το τμήμα της πρωτεΐνης που επιλέχθηκε προς σύνθεση.



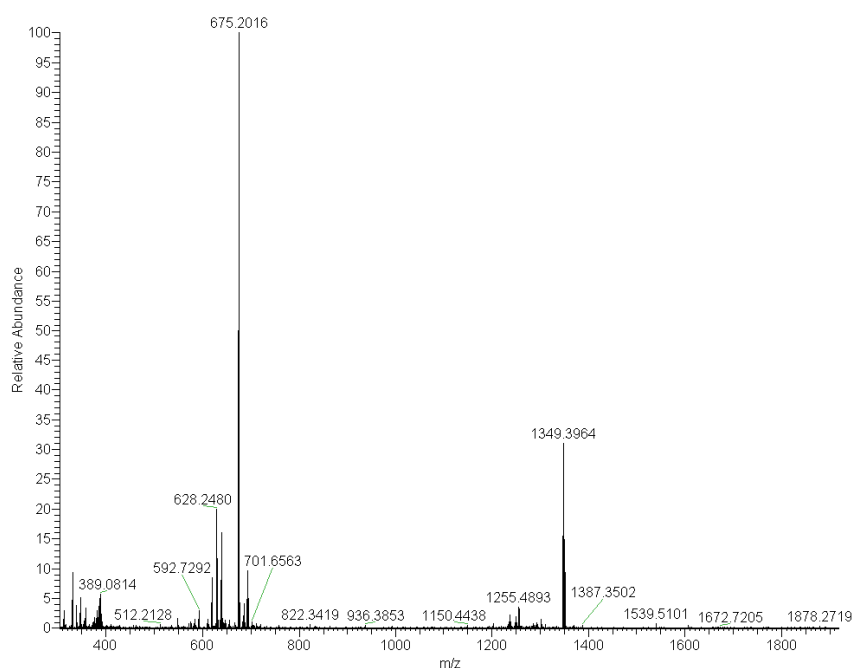
Εικόνα 46. Συντακτικός τύπος του πεπτιδίου $\text{ICH}_2\text{CO-D}^{128}\text{FLC}(\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3)\text{KKESEK}^{137}\text{-NH}_2$.

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 48. Το σύστημα έκλουσης (A) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$ και (B) $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%\text{TFA}$ είχε γραμμική μεταβολή από (A) 95/ B) 5 σε (A) 60/ (B) 40 για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού ήταν 50% .



Εικόνα 48. Αναλυτική RP-HPLC του πεπτιδίου IAc-S¹²⁸SNC_(Acm)QENSDK¹³⁷-NH₂.

Το φάσμα μάζας ελήφθη όπως αναφέρεται στην παράγραφο 10.6 και παρατίθεται στην Εικόνα 47, όπου διακρίνονται στις τιμές 1) 1349,4 και 2) 675,20 τα μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν στο μονοφορτιακό και διφορτιακό κατιον αντίστοιχα.

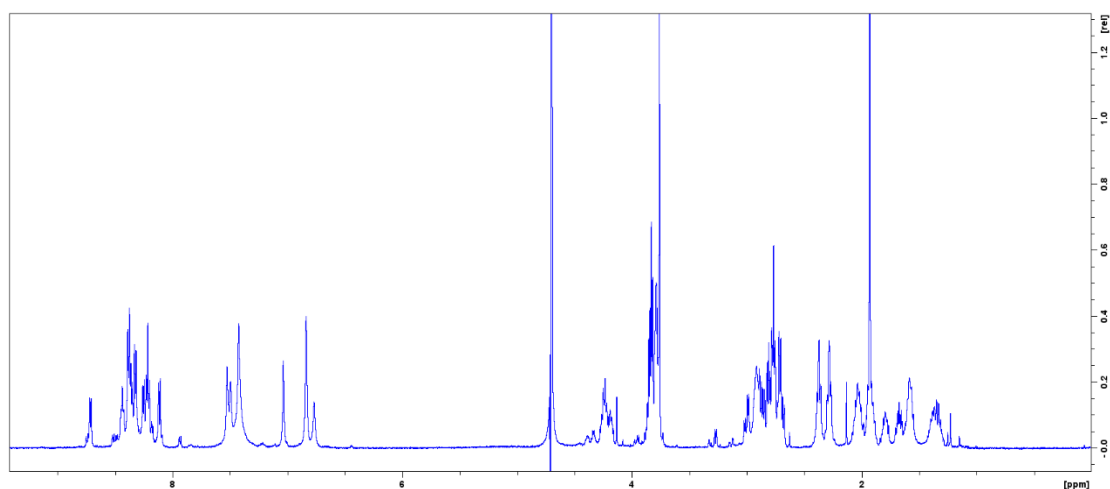


Εικόνα 47. Φάσμα μάζας του πεπτιδίου ICH₂CO-D¹²⁸FLC(CH₂NHCOCH₃)KKESEK¹³⁷-NH₂. Υπολογισθέν μοριακό βάρος: 1349,12, ευρεθέν 1349,40.

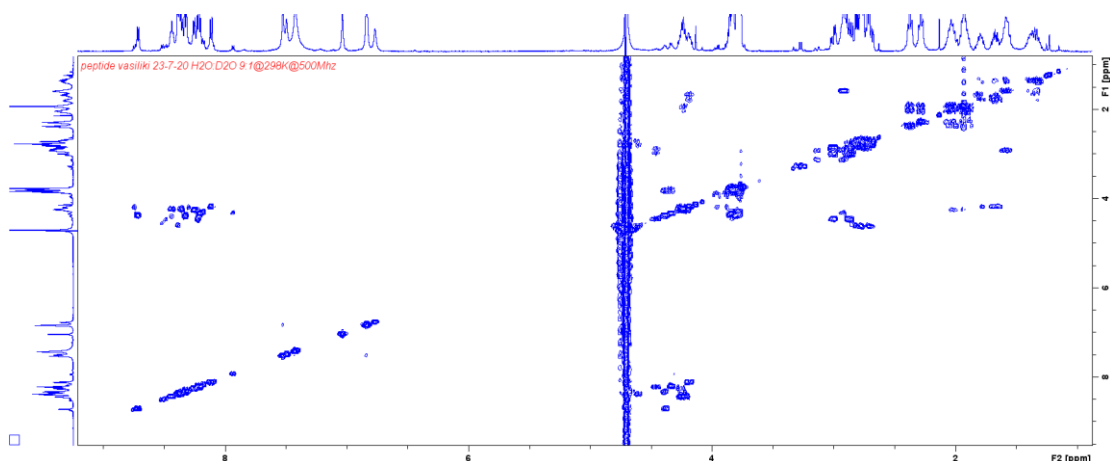
Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις ¹H (δ, ppm) του επιτόπου IAc-D¹²⁸FLC(Acm)KKESEK¹³⁷-NH₂ παρατίθενται στον Πίνακα 4. Τα 1D και 2D φάσματα NMR παρουσιάζονται στις Εικόνες 49-52.

Η ανάλυση του NOESY φάσματος δείχνει ότι το πεπτίδιο δεν υιοθετεί συγκεκριμένη διαμόρφωση, καθώς δεν παρατηρούνται σήματα NOE χαρακτηριστικά

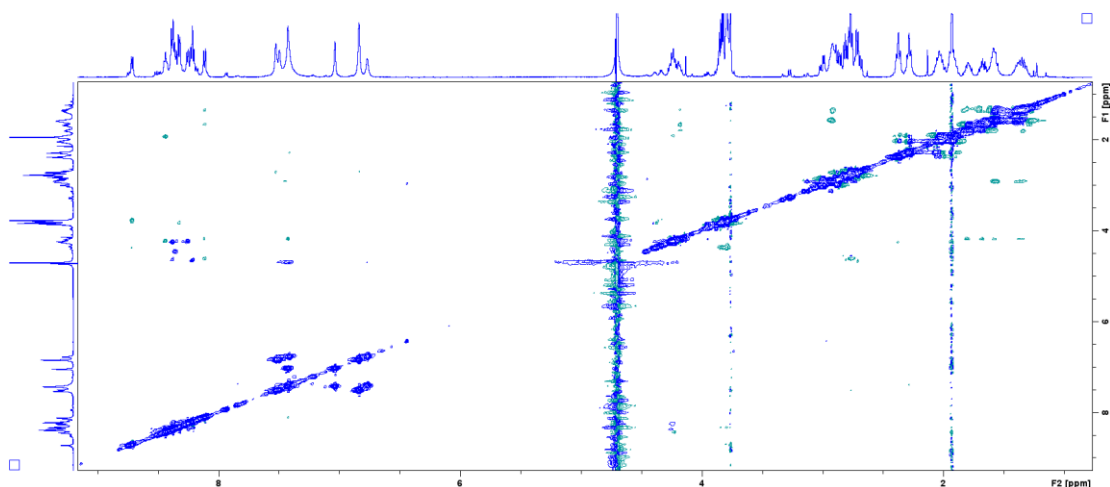
δευτεροταγούς διαμόρφωσης ούτε μεταξύ πρωτονίων απομακρυσμένων αμινοξέων. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων, όπως της λυσίνης, και πρωτονίων απομακρυσμένων αμινοξέων.



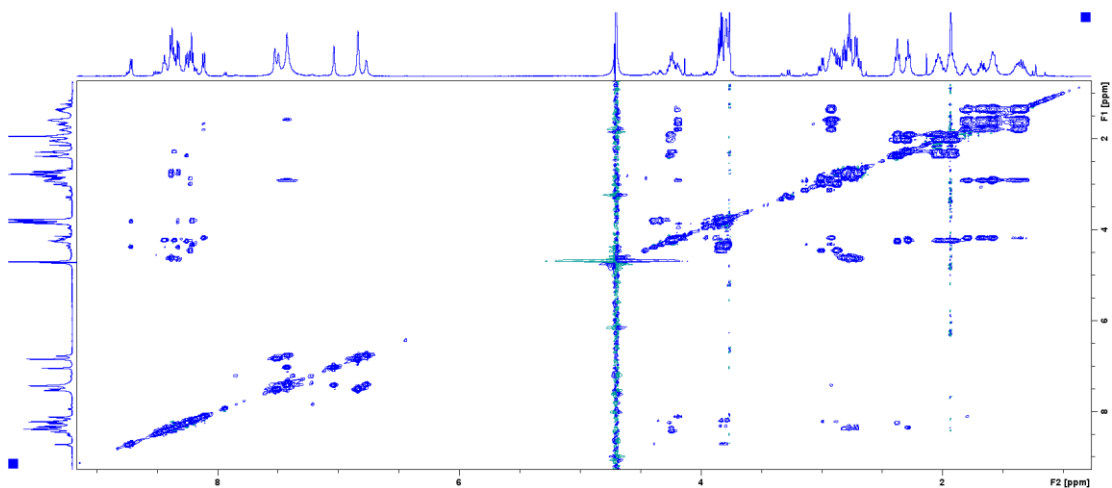
Εικόνα 49. Φάσμα NMR ^1H του πεπτιδίου IAc-S $^{128}\text{SNC(Acm)QENSDK}^{137}\text{-NH}_2$ σε διάλυμα $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v).



Εικόνα 50. Φάσμα NMR ^1H ^1H COSY του πεπτιδίου IAc-S $^{128}\text{SNC(Acm)QENSDK}^{137}\text{-NH}_2$ σε διάλυμα $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v).



Εικόνα 51. Φάσμα NMR. ^1H ^1H NOESY του πεπτιδίου IAc-S $^{128}\text{SNC(Acm)QENSDK}^{137}\text{-NH}_2$ σε διάλυμα $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v).



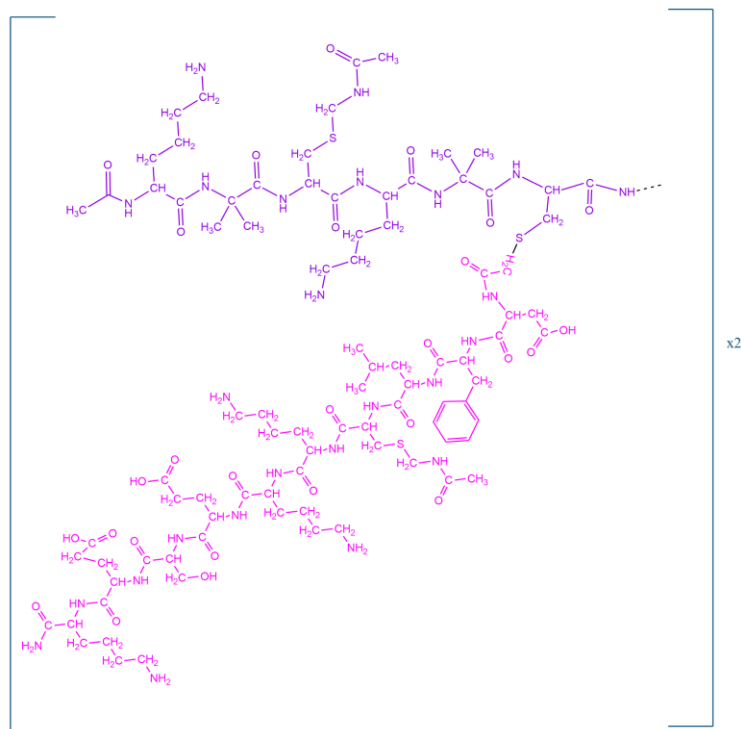
Εικόνα 52. Φάσμα NMR ^1H ^1H TOCSY του πεπτιδίου IAc-S¹²⁸SNC(Acm)QENS DK¹³⁷-NH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1 (v/v).

Πίνακας 5. Χημικές μετατοπίσεις του πεπτιδίου IAc-S¹²⁸SNC(Acm)QENSDK¹³⁷-NH₂

	αH	βH	γH	γCH₂	CONH₂	δCH₂	δCH₃	εCH₂	εNH₃/ OH	NH
ICH₂CO	n.o									
er1	4.38	3.83							n.o	8.71
Ser2	4.38	3.82							2.77	8.32
Asn1	4.24	2.29, -			7.04(cis) 7.41(trans)					8.36
Cys	4.41	2.85								8.44
CH₂NH COCH₂- (Cys)	4.48						n.o			8.22
Gln	4.23	1.92	2.30		7.03(cis) 7.41(trans)					8.36
Glu	4.26	1.92 2.01	2.39						n.o	8.26
Asn2	4.60	2.75 2.85			n.o					8.38
Ser3	4.46	3.84							n.o	8.46
Asp	4.61	2.70							n.o	8.37
Lys	4.19	1.68		1.35		1.58		2.79	7.42	8.11

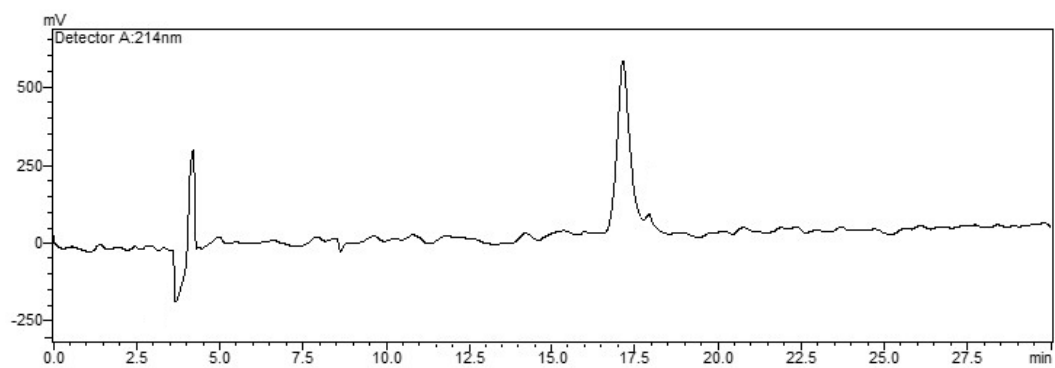
11.3.3. Σύνθεση του συμπλέγματος Ac- [K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12- CH₂CO-DFLC(Acm)KKESEK)]4-NH₂.

Στην Εικόνα 53 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδικού συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK). Η σύνθεση του επιτεύχθηκε με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.5.4. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίσθηκε στο 70%.



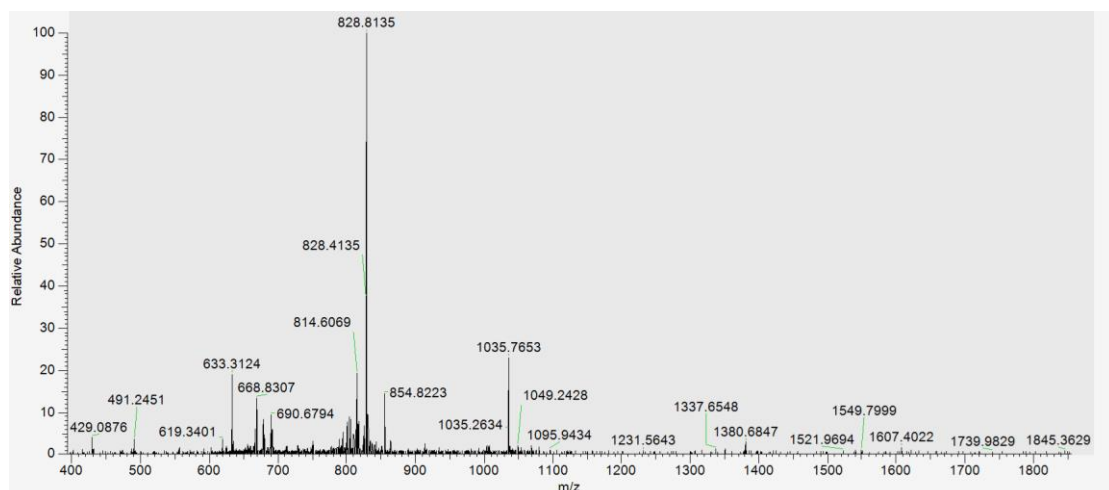
Εικόνα 53. Συντακτικός τύπος του Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-D¹²⁸FLC(Acm)KKESEK¹³⁷)]4-NH₂

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 54 . Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού υπολογίσθηκε σε 11%.



Εικόνα 54. Αναλυτική RP-HPLC του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-D¹²⁸FLC(Acm)KKESEK¹³⁷)]₄-NH₂.

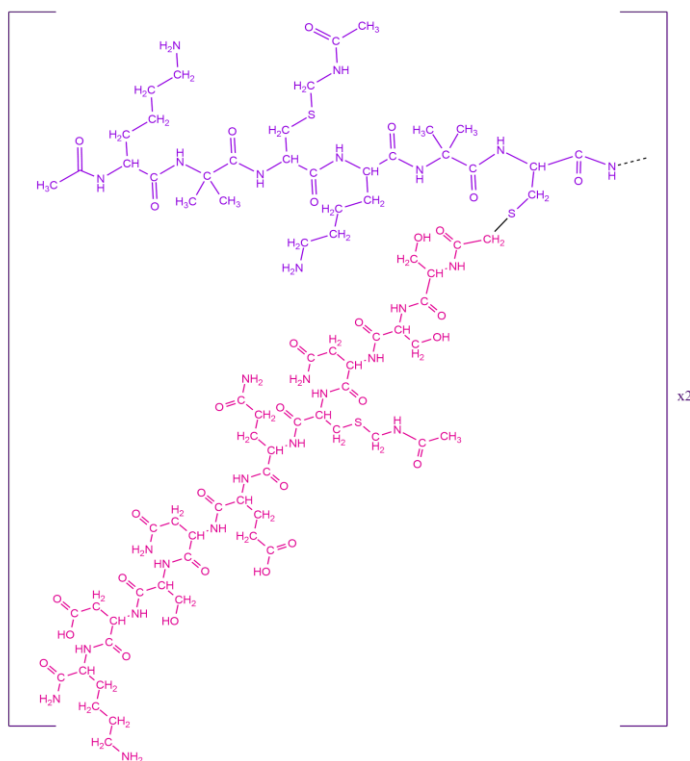
Το φάσμα μάζας ελήφθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 55, όπου διακρίνονται στις τιμές (1) 1035,76 και (2) 828,81 τα μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν στο τετρα-φορτιακό και πεντα-φορτιακό κατιον αντίστοιχα.



Εικόνα 55. Φάσμα μάζας του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-D¹²⁸FLC(Acm)KKESEK¹³⁷)]₄-NH₂. Υπολογισθέν μοριακό βάρος: 4139,93, ευρεθέν:4139,07.

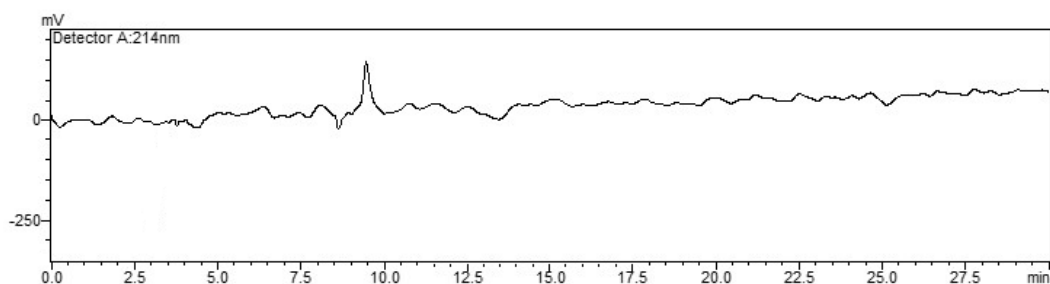
11.3.4. Σύνθεση του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm;6,12-CH₂CO-SSNC(Acm)QENS DK)]₄-NH₂

Στην Εικόνα 56 απεικονίζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδικού συμπλέγματος CPSOC(3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENS DK)). Η σύνθεση του επιτεύχθηκε με χημειοεκλεκτική αντίδραση θειοαιθερικού δεσμού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.5.4 . Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε ίση με 64%.



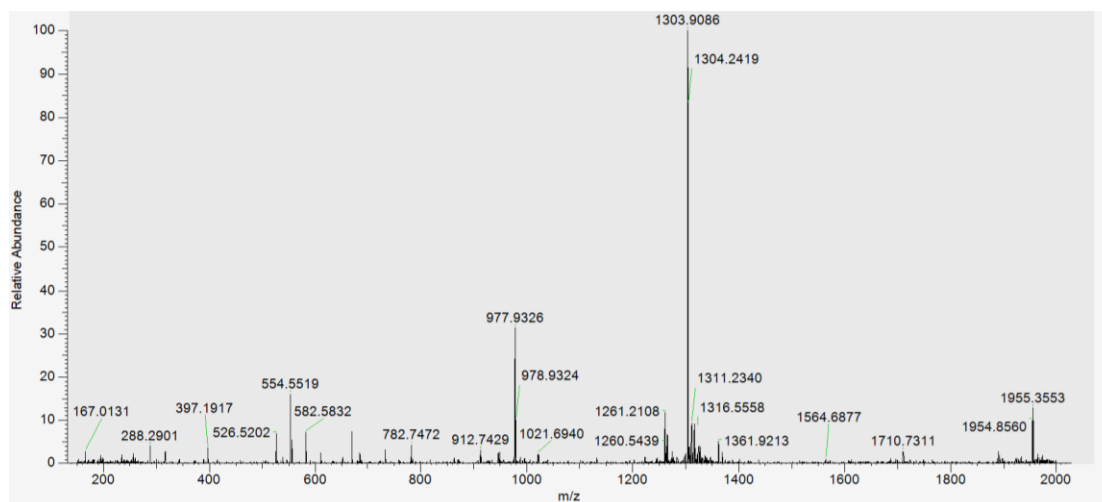
Εικόνα 56. Συντακτικός τύπος του πεπτιδικού συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENS DK)]₄-NH₂.

Το χρωματογράφημα της αναλυτικής RP-HPLC HPLC ελήφθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 57. Το σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1%TFA και (B) CH₃CN/0,1%TFA είχε γραμμική μεταβολή από (A) 90/ (B) 10 σε (A) 60/ (B) 40 για 30 min. Η απόδοση καθαρισμού υπολογίστηκε σε 15%.



Εικόνα 57. Αναλυτική RP-HPLC του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENS DK)]₄-NH₂.

Το φάσμα μάζας ελήφθη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.6 και παρουσιάζεται στην Εικόνα 58, όπου διακρίνονται στις τιμές (1) 1955,35 (2) 1303,91 και (3) 977,93 τα μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν στο διφορτιακό, τριφορτιακό και τετρα-

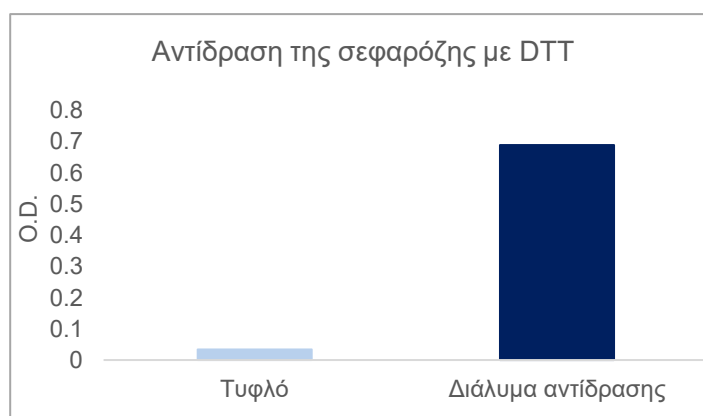


Εικόνα 58. Φάσμα μάζας του συμπλέγματος Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENS DK)]₄-NH₂. Υπολογισθέν μοριακό βάρος: 3909.33, Ευρεθέν:3908.71.

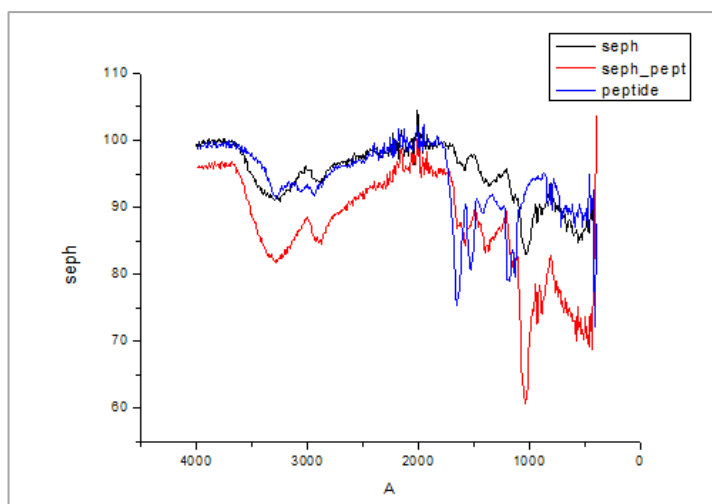
φορτιακό κατιον αντίστοιχα.

11.3.5. Σύνθεση της στήλης Σεφαρόζη-AtA¹²⁸⁻¹³⁷

Η πρόσδεση του πεπτιδίου στην Thioropryl Sepharose 6B, περιγράφεται στην παράγραφο 10.7. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους στα 343nm όπου απορροφά η 2-θειοπυριδόνη, προϊόν που πιστοποιεί την επιτυχή αντίδραση και τον σχηματισμό ελευθέρων θειολομάδων στην επιφάνεια της ρητίνης. Επιπλέον, μετά την πρόσδεση του πεπτιδίου στην ρητίνη το υλικό ελέγχθηκε και με φασματοσκοπία IR (στερεού), συγκρίνοντας τις δονήσεις τάσεις με εκείνες της αρχικής ρητίνης και του πεπτιδίου πριν από την αντίδραση (Εικόνα 60).



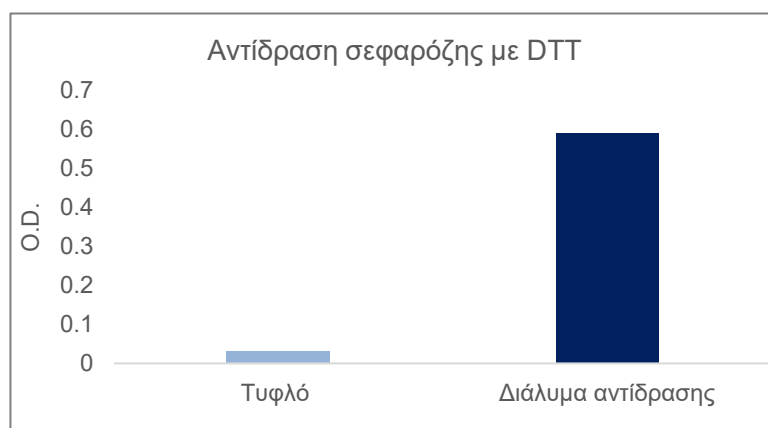
Διάγραμμα 1. Απορρόφηση του διαλύματος από την αναγωγή της σεφαρόζης με DTT προς σχηματισμό 2- θειοπυριδόνης.



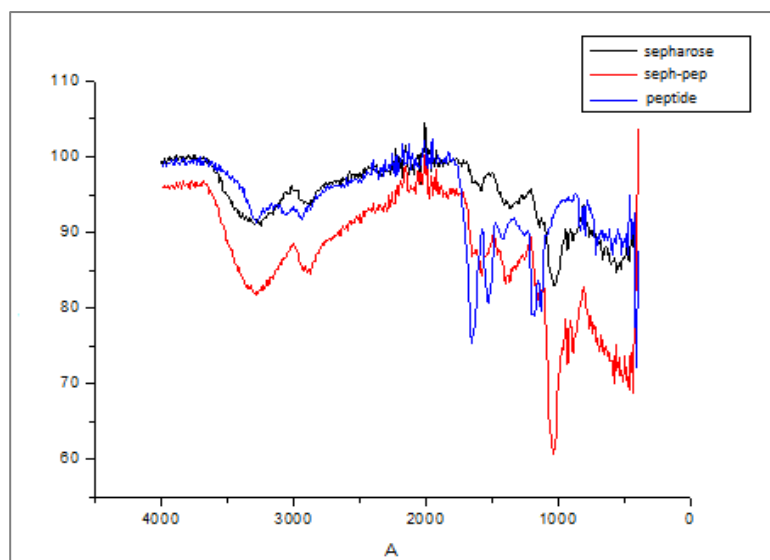
Εικόνα 59. Φάσμα στερεού IR της σεφαρόζης (μαύρο), του πεπτιδίου (μπλε) και της σεφαρόζης-πεπτιδίου AtA¹²⁸⁻¹³⁷ (κόκκινο).

11.3.6. Σύνθεση της στήλης Σεφαρόζη-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷

Η πρόσδεση του πεπτιδίου στην Thiopropyl Sepharose 6B, περιγράφεται στην παράγραφο 10.7. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους στα 343nm όπου απορροφά η 2-θειοπυριδόνη προϊόν που επιβεβαιώνει την επιτυχή αντίδραση και τον σχηματισμό ελευθέρων θειολομάδων στην επιφάνεια της ρητίνης. Μετά την πρόσδεση του πεπτιδίου στην ρητίνη το υλικό ελέγχθηκε επιπλέον με φασματοσκοπία IR (στερεού), συγκρίνοντας τις δονήσεις τάσεις με εκείνες της αρχικής ρητίνης και του πεπτιδίου πριν από τη σύζευξη, επιβεβαιώνοντας τον επιτυχή σχηματισμό του υλικού (Εικόνα 62).



Διάγραμμα 2. Απορρόφηση του διαλύματος από την αναγωγή της σεφαρόζης με DTT προς σχηματισμό 2-θειοπυριδόνης.



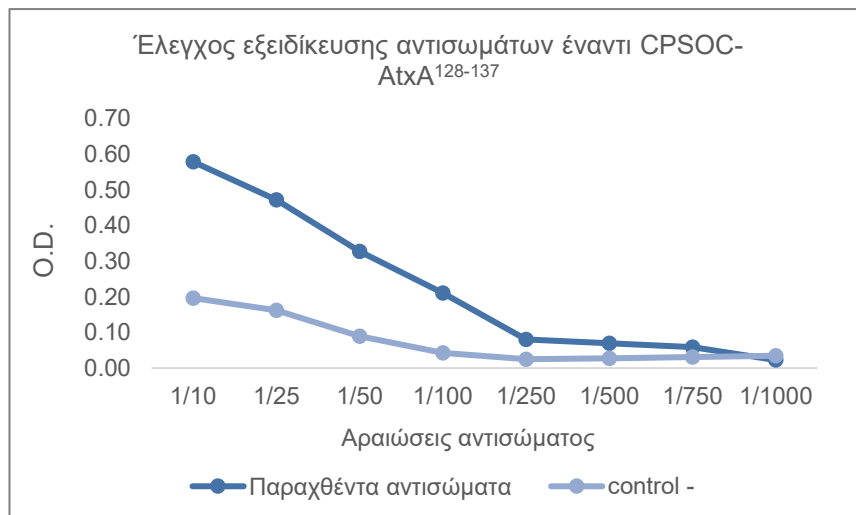
Εικόνα 60. Φάσμα στερεού IR της σεφαρόζης (μαύρο), του πεπτιδίου (μπλε) και της σεφαρόζης-πεπτιδίου PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷ (κόκκινο)

11.4. Δοκιμασίες ELISA

11.4.1. Ανοσοποιήσεις με το ανοσογόνο CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷

11.4.1.1. Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷

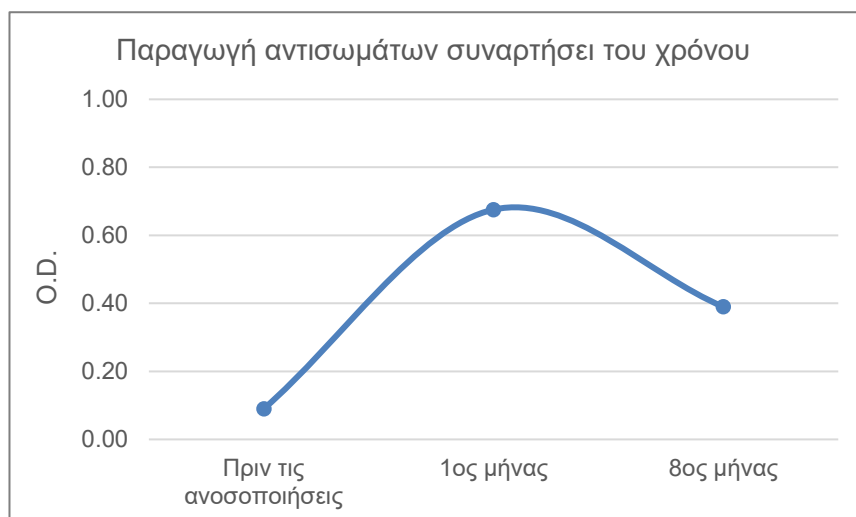
Στο πρώτο στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκαν έμμεσες δοκιμασίες ELISA με σκοπό να διερευνηθεί εάν τα παραχθέντα αντισώματα εμφανίζουν εξειδίκευση έναντι του επιτόπου AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ με τον οποίο είχαν πραγματοποιηθεί οι ανοσοποιήσεις. Για την δοκιμασία αυτή το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ επιστρώθηκε στο τρυβλίο σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα παραχθέντα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/10 έως 1/1000. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από την ίδια όρνιθα πριν τις ανοσοποιήσεις. Στο Διάγραμμα 3 διαπιστώνεται ότι τα αντισώματα εμφανίζουν εξειδίκευση για το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ ωστόσο ο τίτλος που προκύπτει από την μονοδύναμη ανοσοποίηση δεν φαίνεται να είναι τόσο υψηλός.



Διάγραμμα 3. Σχηματική παράσταση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷

11.4.1.2. Έλεγχος διάρκειας παραγωγής αντισωμάτων

Μετά την τελευταία ανοσοποίηση, συνεχίστηκε η συλλογή των αυγών για να εξεταστεί η διάρκεια παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων. Το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸ επιστρώθηκε σε συγκέντρωση 5 µg/ml και τα αντισώματα σε αραιωση 1/100. Το Διάγραμμα 4 δείχνει ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸ συνέχισε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα σε ικανοποιητικό τίτλο, έως και οχτώ μήνες μετά από την τελευταία ανοσοποίηση.



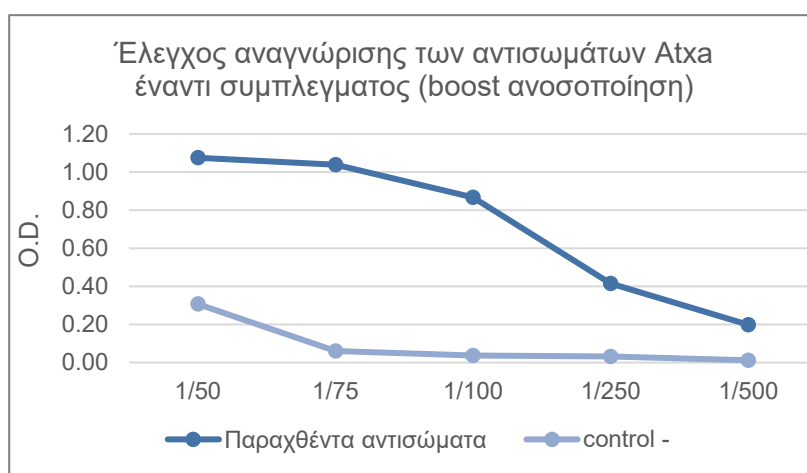
Διάγραμμα 4. Σχηματική παρουσίαση της χρονικής διάρκειας παραγωγής αντισωμάτων μετά την τελευταία ανοσοποίηση.

11.4.1.3. Επαναληπτική ανοσοποίηση με ενισχυτική δόση

Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι: (1) Ο αρχικός τίτλος των αντισωμάτων που προέκυψαν από την ανοσοποίηση με τον έναν μόνο επίτοπο δεν ήταν αρκετά υψηλός

και (2) Ο τίτλος άρχισε να πέφτει μετά τον 8^ο μήνα πραγματοποιήθηκε μια ενισχυτική δόση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.8.1.

Ακολούθησε έμμεση ELISA για τον έλεγχο του τίτλου των αντισωμάτων. Για την δοκιμασία αυτή το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ επιστρώθηκε στο τρυβλίο σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα παραχθέντα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/50 έως 1/500. Από το Διάγραμμα 5 διαπιστώνεται ότι τα αντισώματα εμφάνισαν υψηλότερο τίτλο για το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ σε σχέση με την αρχική ανοσοποίηση.

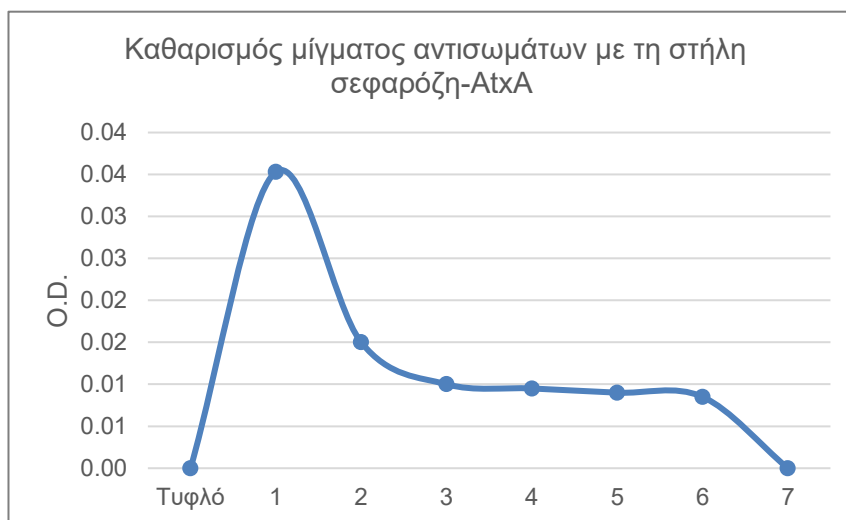


Διάγραμμα 5. Σχηματική παρουσίαση του τίτλου των αντισωμάτων μετά την ενισχυτική δόση.

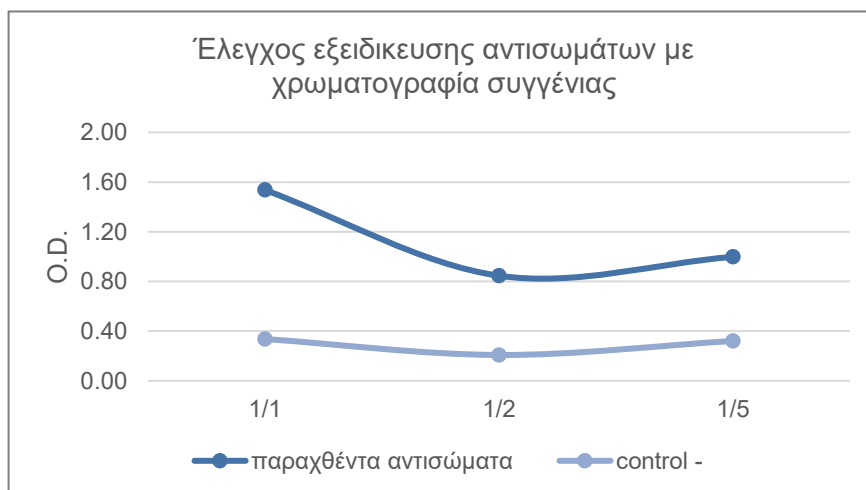
11.4.2. Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας

Τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας τη στήλη σεφαρόζη-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷. Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τον καθαρισμό των αντισωμάτων με τη στήλη σεφαρόζη-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷. Σύμφωνα με το διάγραμμα τα εξειδικευμένα αντισώματα έναντι του επίτοπου cTnI19-31 εκλούστηκαν κυρίως στο 1^ο κλάσμα.

Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA, για τον έλεγχο της εκλεκτικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στον επίτοπο AtxA¹²⁸⁻¹³⁷. Το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ επιστρώθηκε στο τρυβλίο σε συγκέντρωση 5 µg/ml, ενώ το πρώτο κλάσμα που προέκυψε από τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε σε αραιώσεις από 1/1 έως 1/5. Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, τα οποία δείχνουν ότι τα καθαρισμένα αντισώματα με χρωματογραφία συγγένειας παρουσιάζουν εξειδίκευση για το ανοσογονικό σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷.



Διάγραμμα 6 . Σχηματική παρουσίαση των κλασμάτων που ελήφθησαν μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας.

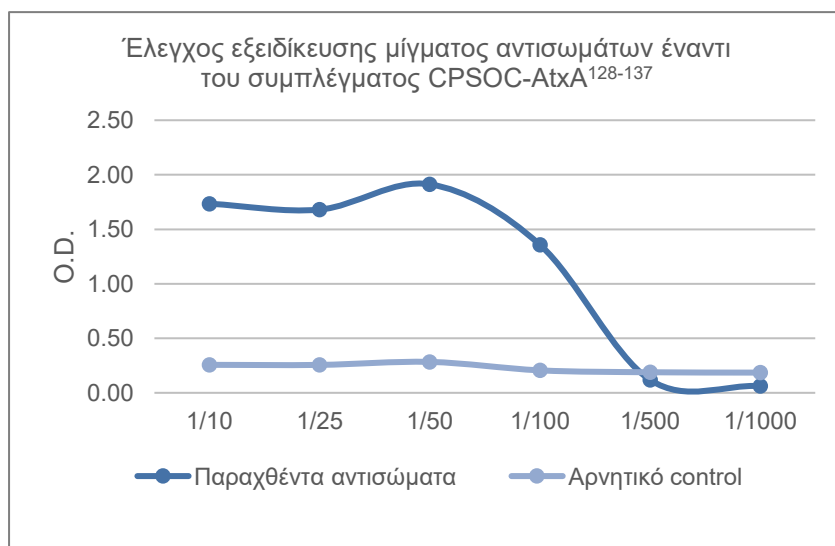


Διάγραμμα 7. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷.

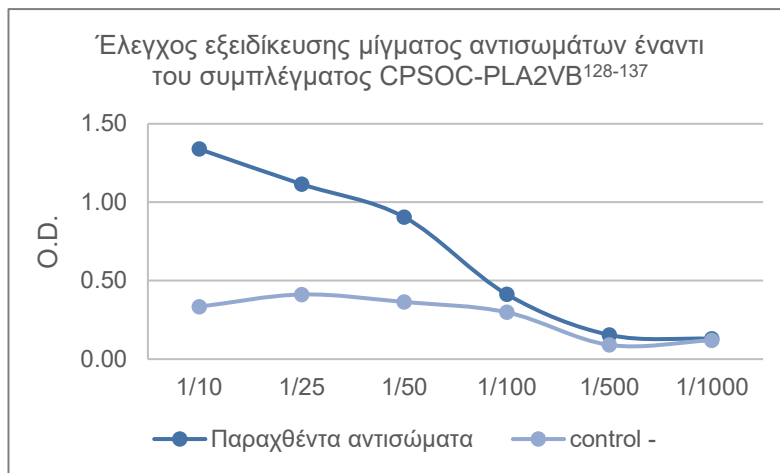
11.4.3. Ανοσοποιήσεις με το μίγμα των δύο ανοσογονικών συμπλεγμάτων

11.4.3.1. Εξειδίκευση αντισωμάτων έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και CPSOC-PLA2VB¹²⁸⁻¹³⁷

Για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του μίγματος των ανοσογονικών συμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκαν έμμεσες δοκιμασίες ELISA. Για την δοκιμασία αυτή τα ανοσογονικά συμπλέγματα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και CPSOC-PLA2VB¹²⁸⁻¹³⁷ επιστρώθηκαν στο τρυβλίο σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα παραχθέντα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/10 έως 1/1000. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από τις ίδια όρνιθα πριν τις ανοσοποιήσεις. Στα Διαγράμματα 8,9 φαίνεται ότι παρήχθησαν εξειδικευμένα αντισώματα έναντι και των δύο επιτόπων. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι τα αντισώματα έναντι του CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ εμφανίζουν υψηλότερο τίτλο σε σχέση με τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του CPSOC-PLA2VB¹²⁸⁻¹³⁷.



Διάγραμμα 8. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷



Διάγραμμα 9. Σχηματική παρουσίαση της εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του ανοσογονικού συμπλέγματος CPSOC-PLA2VB¹²⁸⁻¹³⁷

11.4.4. Έλεγχος αναγνώρισης του δηλητηρίου *V. ammodytes*

Για τον έλεγχο της αναγνώρισης του δηλητηρίου *V. ammodytes* από τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των ανοσογόνων, πραγματοποιήθηκαν έμμεσες δοκιμασίες ELISA. Για την δοκιμασία αυτή το δηλητήριο *V. ammodytes* επιστρώθηκε στο τρυβλίο σε συγκέντρωση 1μg/ml και τα παραχθέντα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/250 έως 1/1000. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα αντισώματα από τις ίδια όρνιθα πριν τις ανοσοποιήσεις. Από το Διάγραμμα 10 εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα εξειδικευμένα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν ολόκληρο το δηλητήριο.



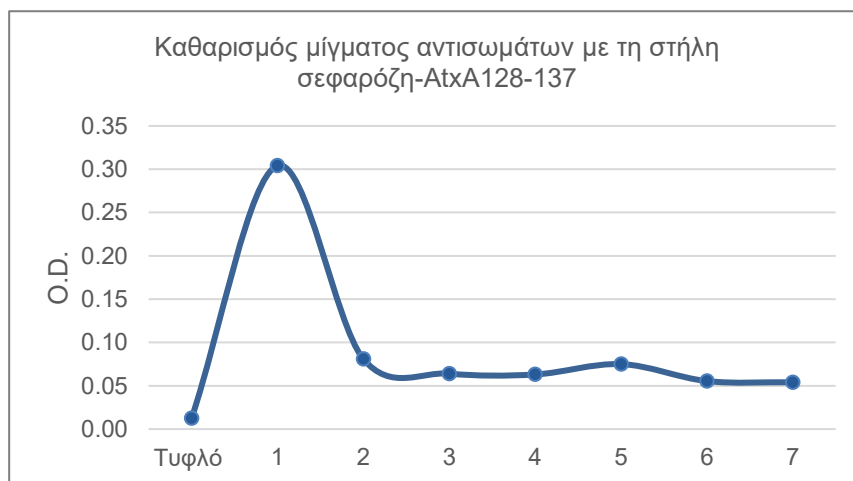
Διάγραμμα 10. Σχηματική παρουσίαση της αναγνώρισης του δηλητηρίου από τα παραχθέντα αντισώματα.

11.4.5. Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων καθαρισμένων με χρωματογραφία συγγένειας

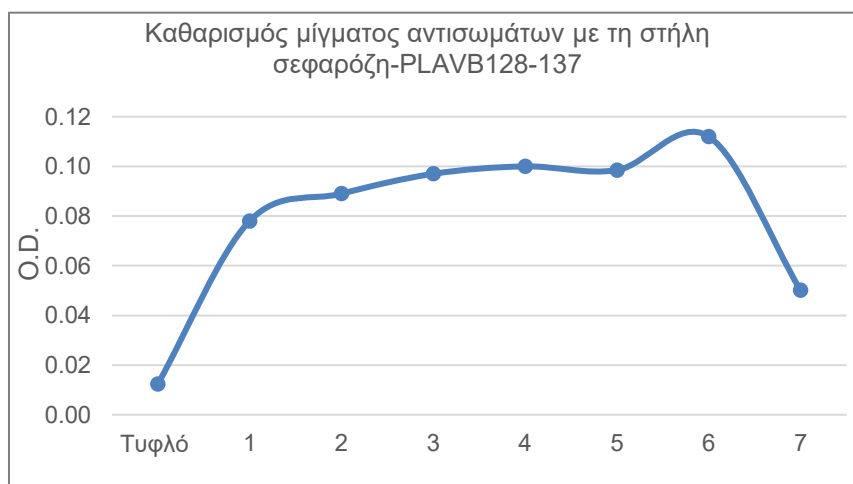
Τα αντισώματα που προέκυψαν από το μίγμα των ανοσογόνων καθαρίστηκαν αρχικά με τη στήλη σεφαρόζη-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και στη συνέχεια καθαρίστηκαν και με τη στήλη σεφαρόζη-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷. Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της

φωτομέτρησης των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τον καθαρισμό των αντισωμάτων με τη στήλη σεφαρόζη- AtxA¹²⁸⁻¹³⁷. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι τα εξειδικευμένα αντισώματα εντοπίζονται στο 1^ο κλάσμα.

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των κλασμάτων που συλλέχθηκαν έπειτα από τον καθαρισμό των αντισωμάτων με τη στήλη σεφαρόζη-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷. Σύμφωνα με το διάγραμμα στον καθαρισμό με την δεύτερη στήλη φαίνεται τα εξειδικευμένα αντισώματα να εντοπίζονται κυρίως στο 6^ο κλάσμα αν και οι απορροφήσεις είναι αρκετά χαμηλές.



Διάγραμμα 11. Σχηματική παρουσίαση της απομόνωσης εξειδικευμένων αντισωμάτων με τη στήλη σεφαρόζη- AtxA¹²⁸⁻¹³⁷.



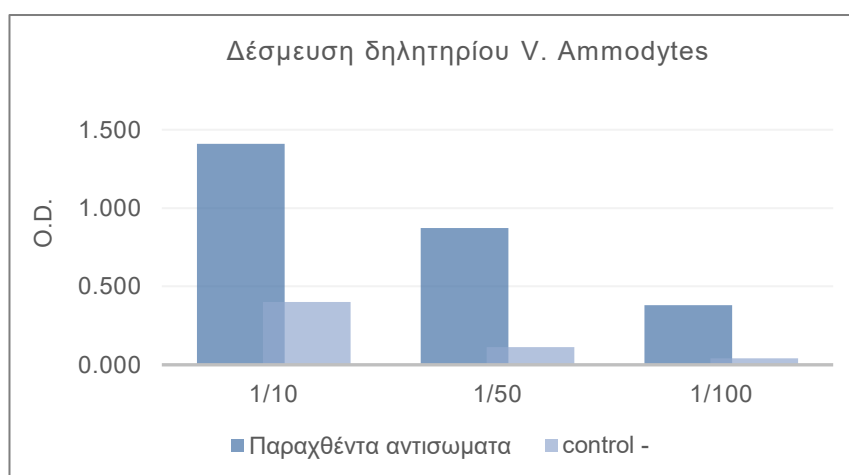
Διάγραμμα 12. Σχηματική παρουσίαση της απομόνωσης εξειδικευμένων αντισωμάτων με τη στήλη σεφαρόζη- PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷.

Ακολούθησαν δοκιμασίες έμμεσης ELISA και για τον έλεγχο της εκλεκτικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στον επίτοπο PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷. Τα αποτελέσματα όμως που προέκυψαν δεν είναι αξιολογήσιμα και για αυτό τον λόγο δεν παρουσιάζονται στην διατριβή.

11.4.6. Ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες δέσμευσης ομόλογων δηλητηρίων

11.4.6.1. Έλεγχος εξειδίκευσης των αντισωμάτων έναντι του δηλητηρίου *V. ammodytes*

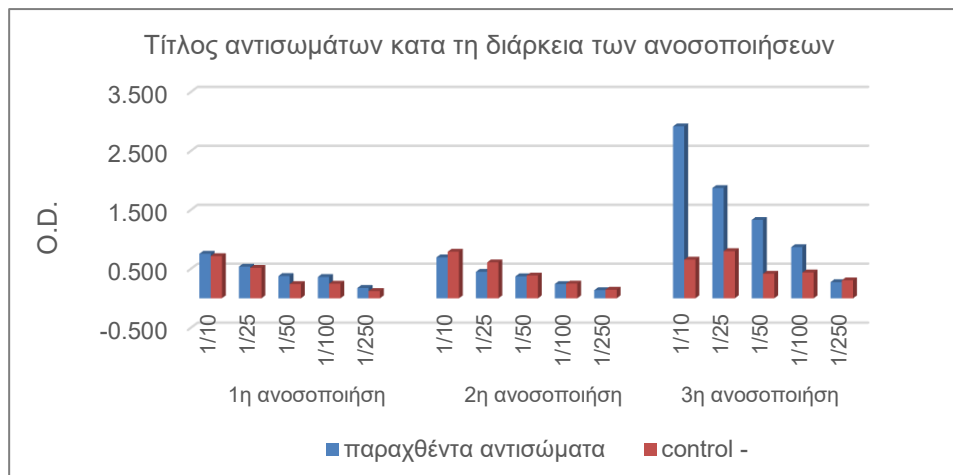
Σε αυτό το στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκαν ανοσοδοκιμασίες ELISA τύπου sandwich. Στο τρυβλίο επιστρώθηκε αντιοφικός ορός σε αραιώση 1/2500 και 1/10000, στη συνέχεια το δηλητήριο *V. ammodytes* σε συγκέντρωση 1 µg/ml και 0,5 µg/ml, έπειτα τα αντισώματα έναντι του μίγματος επιτόπων σε αραιώση από 1/10 έως 1/100 και τέλος το anti-IgY*HRP (IgG). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα από την ίδια όρνιθα πριν τις ανοσοποιήσεις. Από το Διάγραμμα 11 φαίνεται ότι τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος των δύο επιτόπων αναγνωρίζουν το δηλητήριο του *V. Ammodytes* και δεσμεύονται ειδικά.



Διάγραμμα 13. Σχηματική παράσταση της δέσμευσης του δηλητηρίου *V. Ammodytes* από το μίγμα των παραχθέντων αντισωμάτων

11.4.7. Έλεγχος του τίτλου αντισωμάτων κατά την διάρκεια των ανοσοποιήσεων

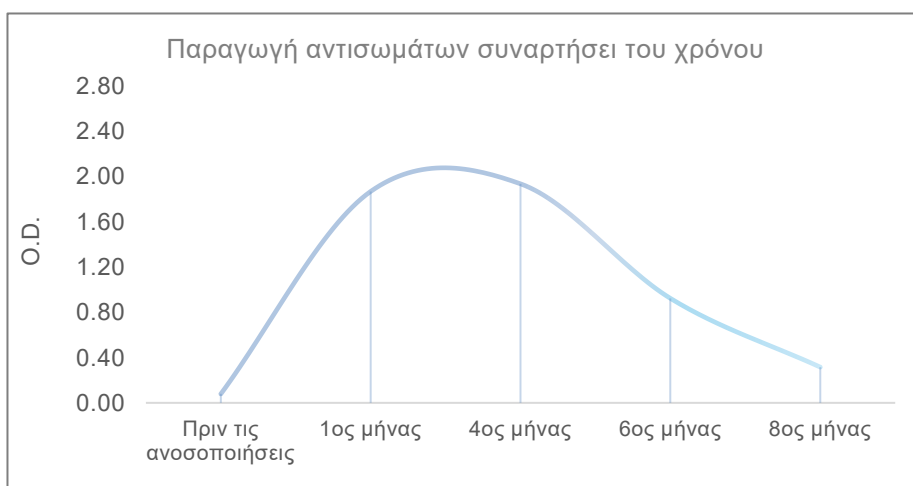
Κατά τη διάρκεια των ανοσοποιήσεων γινόταν έλεγχος του τίτλου των εξειδικευμένων αντισωμάτων με έμμεση ELISA. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 14 ο τίτλος των εξειδικευμένων αντισωμάτων αυξάνεται κατά την τρίτη ανοσοποίηση. Ωστόσο, επειδή ο τίτλος μετά την τρίτη ανοσοποίηση δεν ήταν αρκετά υψηλός για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοποίηση με μια ενισχυτική δόση.



Διάγραμμα 14. Σχηματική παρουσίαση του τίτλου των αντισωμάτων στις τρεις δόσεις ανοσοποίησης.

11.4.8. Έλεγχος διάρκειας παραγωγής αντισωμάτων συναρτήσει του χρόνου

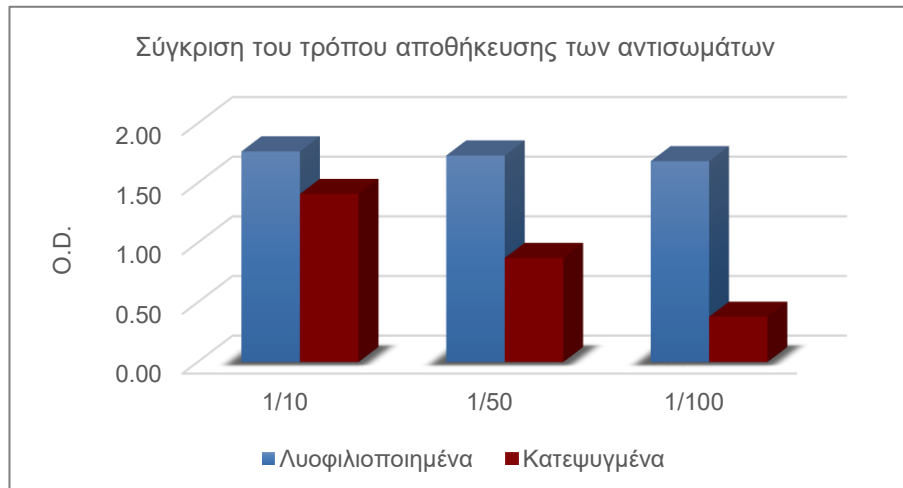
Μετά την τελευταία ανοσοποίηση, συνεχίστηκε η συλλογή των αυγών για να εξεταστεί η διάρκεια παραγωγής εξειδικευμένων αντισωμάτων. Τα ανοσογονικά σύμπλεγμα CPSOC-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και CPSOC-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷ επιστρώθηκαν σε συγκέντρωση 5 μg/ml και τα αντισώματα σε αραίωση 1/100 του αρχικού stock. Το Διάγραμμα 15 δείχνει ότι η όρνιθα που ανοσοποιήθηκε με το μίγμα των ανοσογονικών συμπλεγμάτων συνέχισε να παράγει εξειδικευμένα αντισώματα σε ικανοποιητικό τίτλο έως και οχτώ μήνες μετά από την τελευταία ανοσοποίηση.



Διάγραμμα 15. Σχηματική παράσταση της χρονικής διάρκειας παραγωγής των αντισωμάτων μετά την τελευταία ανοσοποίηση.

11.4.9. Σύγκριση του τρόπου αποθήκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων

Από τις δοκιμασίες ELISA που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αντισώματα αποθηκευμένα στους -20°C σε διάλυμα και σε λυοφιλοποιημένη μορφή μέχρι και 19 μήνες μετά την αποθήκευση από το Διάγραμμα 16 διαπιστώνεται ότι τα λυοφιλοποιημένα αντισώματα διατηρούν υψηλότερο τίτλο σε σχέση με τα κατεψυγμένα σε μορφή διαλύματος.



Διάγραμμα 16. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου αποθήκευσης των παραχθέντων αντισωμάτων.

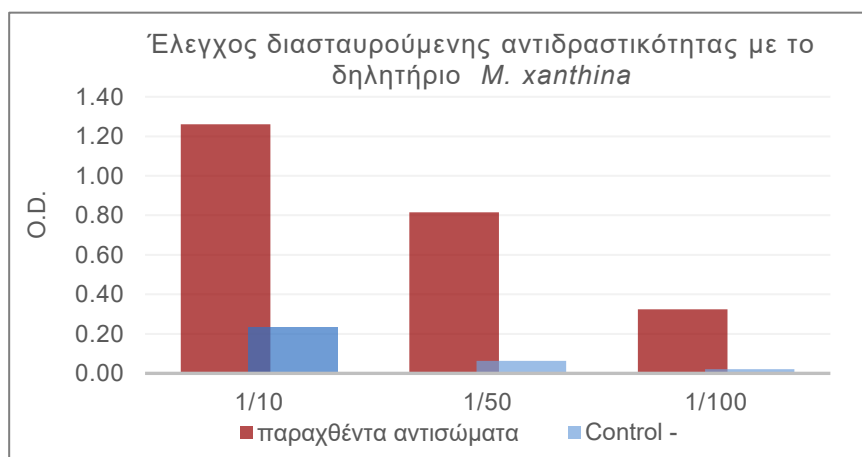
11.4.10. Έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας

11.4.10.1. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι του δηλητηρίου της *Montivipera xanthina*

Τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των δύο επιτόπων ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν ετερόλογα δηλητήρια εχιδνών. Για την ανάλυση αυτή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της ELISA τύπου sandwich. Στο

τρυβλίο επιστρώθηκε αντιοφικός ορός σε αραιώση 1/2.500 στη συνέχεια το δηλητήριο σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml και τα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/10 έως 1/100 του αρχικού stock.

Στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζεται η δραστικότητα έναντι του δηλητηρίου *Montivipera xanthina*. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα αντισώματα είναι ικανά να αναγνωρίσουν το ετερόλογο δηλητήριο της *M. xanthina* που ανήκει στην οικογένεια των έχιδνών.

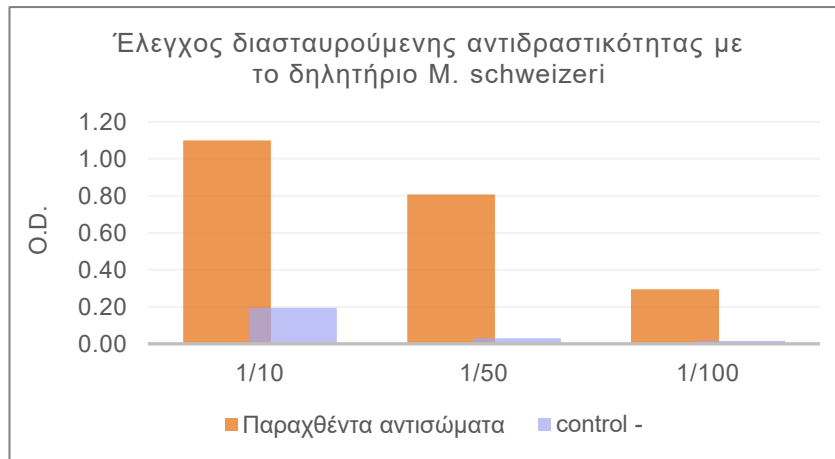


Διάγραμμα 17. Σχηματική παρουσίαση της αναγνώρισης του δηλητηρίου της *M. xanthina*.

11.4.10.2. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι του δηλητηρίου της *Macrovipera schweizeri*.

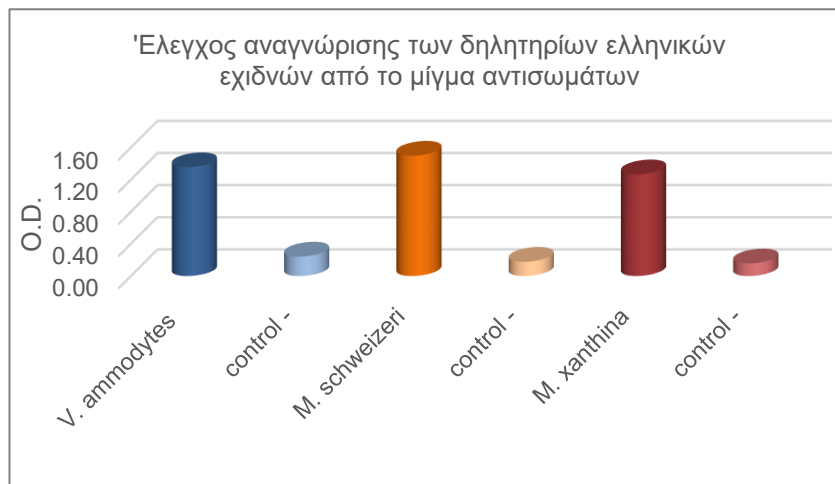
Τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των δύο επιτόπων ελέγχθηκαν επιπλέον και για την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και το δηλητήριο της *Macrovipera schweizeri*. Για την ανάλυση αυτή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της ELISA τύπου sandwich. Στο τρυβλίο επιστρώθηκε αντιοφικός ορός σε αραιώση 1/2.500 στη συνέχεια το δηλητήριο σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml και τα αντισώματα σε αραιώσεις από 1/10 έως 1/100 του αρχικού stock.

Στο Διάγραμμα 18 παρουσιάζεται η δραστικότητα έναντι του δηλητηρίου *Macrovipera schweizeri*. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα αντισώματα είναι ικανά να αναγνωρίσουν και το συγκεκριμένο δηλητήριο έχιδνας που απαντάται στη χώρα μας.



Διάγραμμα 18. Σχηματική παρουσίαση της αναγνώρισης του δηλητηρίου της *M. schweizeri*.

Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ELISA για την αναγνώριση ολόκληρων των δηλητηρίων από τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος ανοσογόνων. Όπως διαπιστώνεται τα αντισώματα είναι ικανά να αναγνωρίσουν και τα τρία δηλητήρια εχιδνών.



Διάγραμμα 19. Σχηματική παράσταση της αναγνώρισης των δηλητηρίων ελληνικών ειδών εχιδνών από τα παραχθέντα αντισώματα

Σύνοψη- Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν πεπτιδία και πεπτιδικά συμπλέγματα για την ανάπτυξη κατάλληλων αντιδραστηρίων, τα οποία μπορούν να επάγουν εξειδικευμένη δράση έναντι τοξινών, με στόχο να επεκταθεί η χρήση τους στην παραγωγή χαμηλού κόστους και άμεσης διαθεσιμότητας αντιοφικών ορών ή στην ανάπτυξη κατάλληλων τεχνολογιών απομάκρυνσης των τοξινών από το αίμα των ασθενών.

Ο σχεδιασμός της μελέτης βασίστηκε στους παρακάτω άξονες:

1. Την επιλογή και σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων και του φορέα ανοσογόνων με σκοπό την ανάπτυξη ανοσογονικών συμπλεγμάτων.

Το στάδιο αυτό υλοποιήθηκε μέσω συγκριτικής ανάλυσης της ομολογίας των αλληλουχιών των φωσφολιπασών A_2 των εχιδνών. Η μελέτη αυτή είχε ως στόχο την μέγιστη δυνατή ομολογία μεταξύ των φωσφολιπασών της οικογένειας των εχιδνών, ώστε τα παραχθέντα αντισώματα να μπορούν να αναγνωρίσουν και να δεσμεύσουν και φωσφολιπάσες A_2 ετερόλογων ειδών εχιδνών.

Οι επιλεγμένες αλληλουχίες αξιολογήθηκαν ως προς την αντιγονικότητα, την υδοφιλικότητα, την ευελιξία, την επιφανειακή προσβασιμότητα, την δευτεροταγή δομή καθώς και την θέση και συχνότητα εμφάνισης επιτόπων. Σκοπός της μελέτης ήταν η επιλογή πεπτιδικών τμημάτων με ευκολία σύνθεσης και ικανότητα να παράγουν υψηλού τίτλου αντισώματα.

Επιπλέον, ο σχεδιασμός του ολιγοπεπτιδικού φορέα έγινε με σκοπό την εύκολη πρόσδεση των επιτόπων σε αυτόν. Για την συγκεκριμένη μελέτη ο φορέας CPSOC που είχε αναπτυχθεί προηγουμένως στο εργαστήριο τροποποιήθηκε κατάλληλα. Η συγκεκριμένη τροποποίηση προέκυψε λόγω της δυσκολίας πρόσδεσης τεσσάρων επιτοπικών αντιγράφων, με αποτέλεσμα ο φορέας CPSOC(3,9-Acm) να φέρει προστατευτική ακεταμιδομεθυλομάδα σε δύο από τις τέσσερις κυστεΐνες του, ενώ οι υπόλοιπες δύο παραμένουν διαθέσιμες για την πρόσδεση των αντίστοιχων επιτόπων. Με αυτόν τον τρόπο συντέθηκαν τα συμπλέγματα: 1. Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH₂CO-DFLC(Acm)KKESEK)]₄-NH₂ και 2. Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH₂CO-SSNC(Acm)QENSDK)]₄-NH₂ μέσω θειοαιθερικού δεσμού.

Οι περιοχές των φωσφολιπασών A_2 που επιλέχθηκαν προς σύνθεση με βάση τις προηγούμενες παραμέτρους ήταν οι εξής:

A. Η επιλογή της περιοχής D¹²⁸FLCKKESEK¹³⁷ της Αμμοδυτοξίνης Α στηρίχθηκε τόσο στις μελέτες ομολογίας όσο και σε βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι το C-τελικό άκρο παίζει σημαντικό ρόλο στην δράση των φωσφολιπασών. Σε μελέτη

με παρόμοια αλληλουχία αποδείχτηκε ότι τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι αυτής κατάφεραν να εξουδετερώσουν το αντίστοιχο δηλητήριο.

B. Η αλληλουχία S¹²⁸SNCQENSDK¹³⁷ της φωσφολιπάσης A₂ της V. berus επιλέχθηκε με βάση τις μελέτες ομολογίας και από τις υπολογιστικές μελέτες βρέθηκε ότι έχει αρκετά καλή υδροφιλικότητα, υψηλή επιφανειακή προσβασιμότητα, ευελιξία και ευκαμψία.

Τα πεπτίδια και τα αντίστοιχα συμπλέγματα τους συντέθηκαν με επιτυχία και οι αποδόσεις σύνθεσης ήταν αρκετά υψηλές ενώ οι αποδόσεις καθαρισμού ικανοποιητικές.

2. Τις ανοσοποιήσεις των ζώων

Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκαν οι όρνιθες για την παραγωγή αντισωμάτων καθώς προσφέρουν πολλαπλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα πειραματόζωα. Η ανοσοσφαιρίνη IgY επιτρέπει την μη επεμβατική απομόνωση των αντισωμάτων προσφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην ευζωία των ορνίθων. Επιπλέον η παραγωγικότητα τους όσον αφορά τα αντισώματα είναι συγκρίσιμη με εκείνη μεγάλων θηλαστικών και εξαιτίας της εξελικτικής απόστασης των πτηνών από τα θηλαστικά, τα αντισώματα IgY μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε ο ανοσοχημικές δοκιμασίες.

Οι ανοσοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά πρωτόκολλα. Στο πρώτο η όρνιθα ανοσοποιήθηκε με ένα ανοσογονικό σύμπλεγμα [CPSOC(3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK] με συγκέντρωση 0,3 mg/ml για την πρώτη ανοσοποίηση, 0,1 mg/ml για τις επόμενες δύο ανοσοποιήσεις και με 0,3 mg/ml για την τέταρτη ανοσοποίηση. Ύστερα από 15 μήνες ακολούθησε και μια αναμνηστική δόση με 1 mg/ml. Κατά το δεύτερο πρωτόκολλο η όρνιθα ανοσοποιήθηκε με μίγμα δύο ανοσογόνων [CPSOC (3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK) και CPSOC (3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENSDK)] και οι συγκεντρώσεις καθώς και ο αριθμός των ανοσοποιήσεων που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο ίδιος με το πρώτο πρωτόκολλο.

Και οι δύο όρνιθες εμφάνισαν ανοσολογική απόκριση με ικανοποιητικούς τίτλους μετά την τέταρτη ανοσοποίηση. Πιο αναλυτικά, η όρνιθα η οποία ανοσοποιήθηκε με το μίγμα των δύο ανοσογόνων εμφάνισε υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων σε σχέση με την όρνιθα η οποία ανοσοποιήθηκε με το ένα μόνο ανοσογονικό σύμπλεγμα.

3. Την απομόνωση και τον καθαρισμό των αντισωμάτων

Η απομόνωση των αντισωμάτων έγινε με την απομάκρυνση των λιπιδίων του κρόκου και εκχύλιση των IgY με τη χρήση της πολυαιθυλενογλυκόλης. Ακολούθησε ο καθαρισμός των αντισωμάτων με (1) διαπίδυση, χρησιμοποιώντας ημιδιαπερατή μεμβράνη και (2) χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας δύο υλικά: Sepharose-AtxA¹²⁸⁻¹³⁷ και Sepharose-PLAVB¹²⁸⁻¹³⁷, με σκοπό την εξειδικευμένη πρόσδεση των IgY

ανοσοσφαιρινών στους αντίστοιχους επιτόπους (IAc-*AtxA*¹²⁸⁻¹³⁷ και IAc-*PLAVB*¹²⁸⁻¹³⁷). Για τη σύνθεση αυτών των υλικών, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης, τα οποία έφεραν στην επιφάνειά τους τη θειοπρότυλ-ομάδα. Έτσι, με κατάλληλες αντιδράσεις τα πεπτίδια IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂ και IAc-SSNC(Acm)QENSDK-NH₂ προσδέθηκαν στη σεφαρόζη.

Η απομόνωση των αντισωμάτων και η εξειδίκευσή τους έναντι των επιλεγμένων ανοσογόνων ελέγχθηκαν με δοκιμασίες έμμεσης ELISA. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα από τις όρνιθες πριν τις ανοσοποιήσεις. Τα αποτελέσματα των ανοσοδοκιμασιών έδειξαν ότι υπάρχει εξειδίκευση των παραχθέντων αντισωμάτων για τα ανοσογονικά συμπλέγματα Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH₂CO-DFLC(Acm)KKESEK)]₄-NH₂ και Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-CH₂CO-SSNC(Acm)QENSDK)]₄-NH₂. Το μίγμα ανοσογόνων οδήγησε σε αντισώματα υψηλότερου τίτλου σε σχέση με την ανοσοποίηση με το ένα αντιγονικό σύμπλεγμα όπως αναμενόταν. Ειδικότερα, η όρνιθα η οποία ανοσοποιήθηκε με το μίγμα εμφάνισε υψηλότερο τίτλο για το σύμπλεγμα CPSOC (3,9-Acm; 6,12-DFLC(Acm)KKESEK) έναντι του συμπλέγματος CPSOC (3,9-Acm; 6,12-SSNC(Acm)QENSDK).

Τα αντισώματα που παρήχθησαν ελέγχθηκαν για το χρονικό διάστημα που οι όρνιθες είναι ικανές να παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι και οι δύο όρνιθες παρήγαγαν αντισώματα σε ικανοποιητικό τίτλο μέχρι και 8 μήνες μετά την τελευταία ανοσοποίηση. Επιπλέον τα αντισώματα ελέγχθηκαν και για την δραστικότητα τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, τόσο σε μορφή διαλύματος όσο και λυοφιλοποιημένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αντισώματα διατήρησαν την δραστικότητα τους μέχρι και 19 μήνες μετά την αποθήκευση με τα αντισώματα σε μορφή σκόνης να διατηρούν υψηλότερο τίτλο, σε σχέση με τα αντισώματα σε μορφή διαλύματος.

Τα παραχθέντα αντισώματα καθαρίστηκαν επιπλέον και με χρωματογραφία συγγένειας. Τα αποτελέσματα από τον καθαρισμό με τη στήλη Sepharose-*AtxA*¹²⁸⁻¹³⁷ σε ανοσοδοκιμασίες ELISA έδειξαν ότι εμφανίζουν εξειδίκευση έναντι του επιτόπου IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού με τη στήλη Sepharose-*PLAVB*¹²⁸⁻¹³⁷ δεν ήταν αξιολογήσιμα οπότε δεν έχουν συμπεριληφθεί στη διατριβή.

4. Την αναγνώριση ολόκληρου δηλητηρίου

Το τελικό στάδιο της μελέτης ήταν ο έλεγχος της αναγνώρισης ολόκληρων των δηλητηρίων εχιδών. Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ELISA έδειξαν ότι τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι του μίγματος των ανοσογόνων είναι ικανά να δεσμεύουν και τα τρία δηλητήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη τα οποία προέρχονται από τα παρακάτω είδη: *V. Ammodytes*, *M. xanthina* και *M. schweizeri*. Αυτό

σημαίνει ότι υπάρχει και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των δηλητηρίων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι επιτόπιοι είναι προσβάσιμοι στα δηλητήρια και η μεταξύ τους ομολογία όπως είχε προβλεφθεί αρκετά υψηλή.

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

1. Τα πεπτιδικά ανάλογα και τα ανοσογονικά συμπλέγματα συντέθηκαν χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία και ήταν υψηλής καθαρότητας.
2. Παρήχθησαν υψηλού τίτλου αντισώματα και εξειδικευμένα έναντι των επιτόπων IAc-DFLC(Acm)KKESEK-NH₂ και IAc-SSNC(Acm)QENSDK-NH₂
3. Υψηλότερου τίτλου ήταν τα αντισώματα έναντι του μίγματος ανοσογόνων.
4. Τα αντισώματα από διαπίδυση είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό για την αναγνώριση των δηλητηρίων.
5. Τα ανοσογονικά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό των αντισωμάτων σε στήλη με χρωματογραφία συγγένειας.
6. Τα αντισώματα από όρνιθες (IgY) είναι κατάλληλα εργαλεία για ανάπτυξη ανοσοδοκιμασιών και είναι σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα.
7. Επιβεβαιώνεται η αποτελεσματικότητα του συνθετικού φορέα CPSOC(3,9-Acm) για την παραγωγή αντισωμάτων και την ανάπτυξη δοκιμασιών ELISA.
8. Τα αντισώματα που παρήχθησαν έναντι των φωσφολιπασών μπορούν να αναγνωρίσουν ολόκληρο το δηλητήριο των εχιδνών τόσο ομόλογων όσο και ετερόλογων ειδών.

Μελλοντικές προοπτικές

1. Διερεύνηση της λειτουργικής ικανότητας των παραγόμενων αντισωμάτων να εξουδετερώνουν τη βιολογική δράση των δηλητηρίων *in vitro* και *in vivo*.
2. Η επέκταση της στρατηγικής σε μεγαλύτερο αριθμό επιτόπων από διαφορετικές τοξίνες (π.χ. μεταλλοπρωτεάσες, σερινοπρωτεάσες) που θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυδύναμων ανοσογόνων με ευρύτερο φάσμα δράσης.
3. Αξιοποίηση των παραγόμενων αντισωμάτων τα οποία θα μπορούν να δράσουν στοχευμένα με υψηλή δραστικότητα, για την παραγωγή ενός αντιοφικού ορού, είτε εναλλακτικά, για την χρήση τους σε κατάλληλες τεχνολογίες απομάκρυνσης των τοξινών από το αίμα των ασθενών.

Περίληψη

Τα δηλητηριώδη φίδια αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την δημόσια υγεία παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε περιοχές με αυξημένη επίπτωση δηγμάτων και περιορισμένη πρόσβαση σε εξειδικευμένη ιατρική περίθαλψη. Ειδικότερα, τα δήγματα της οικογένειας *Viperidae* προκαλούν σοβαρές τοπικές και συστηματικές βλάβες, όπως αιμορραγίες, νέκρωση ιστών, νευροτοξικότητα, μυοτοξικότητα και διαταραχές της αιμόστασης, οδηγώντας συχνά σε μόνιμες αναπηρίες ή ακόμη και σε θάνατο. Η βασική θεραπευτική προσέγγιση παραμένει η χορήγηση αντιοφικών ορών, οι οποίοι παράγονται κυρίως μέσω ανοσοποίησης μεγάλων θηλαστικών με ολόκληρο δηλητήριο. Ωστόσο, οι συμβατικοί αντιοφικοί οροί παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος παραγωγής, η περιορισμένη διαθεσιμότητα, καθώς και η πιθανότητα σοβαρών ανεπιθύμητων αντιδράσεων.

Οι φωσφολιπάσες A_2 (PLA₂s) αποτελούν μία από τις σημαντικότερες οικογένειες τοξινών των εχιδνών, καθώς συμμετέχουν σε ποικίλους μηχανισμούς, όπως η νευροτοξικότητα, η μυοτοξικότητα, η κυτταροτοξικότητα και η φλεγμονώδης απόκριση. Η υψηλή βιολογική τους σημασία, σε συνδυασμό με τη διατήρηση συντηρημένων περιοχών μεταξύ διαφορετικών ειδών εχιδνών, τις καθιστούν ιδανικούς μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη εξειδικευμένων αντισωμάτων ευρέος φάσματος.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο ορθολογικός σχεδιασμός, η σύνθεση και η ανοσολογική αξιολόγηση συνθετικών πεπτιδικών επιτόπων προερχόμενων από φωσφολιπάσες A_2 δηλητηρίων εχιδνών, με στόχο την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι τοξινών και τη μελλοντική αξιοποίησή τους, είτε στην ανάπτυξη αντιοφικών ορών νέας γενιάς, είτε σε τεχνολογίες απομάκρυνσης τοξινών από το αίμα ασθενών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ομολογίας μεταξύ των φωσφολιπασών A_2 των ειδών της οικογένειας των εχιδνών και στη συνέχεια μεταξύ των ειδών *Vipera ammodytes ammodytes* και *Vipera berus berus*, καθώς και συγκρίσεις με ανθρώπινες φωσφολιπάσες A_2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή ομολογία μεταξύ των φωσφολιπασών των εχιδνών (>60–70%) και χαμηλή ομολογία με τις αντίστοιχες ανθρώπινες πρωτεΐνες (<35%), γεγονός που υποστηρίζει τη δυνατότητα εκλεκτικής ανοσολογικής στόχευσης χωρίς σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με ανθρώπινες PLA₂.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν υπολογιστικές μελέτες αντιγονικότητας, υδροφιλικότητας, επιφανειακής προσβασιμότητας, ευκαμψίας, ευελιξίας και δευτεροταγούς δομής, με σκοπό την επιλογή κατάλληλων γραμμικών B-κυτταρικών επιτόπων. Από τις αναλύσεις αυτές επιλέχθηκαν δύο πεπτιδικοί επίτοποι προς σύνθεση:

το πεπτίδιο D¹²⁸FLCKKESEK¹³⁷ από την Αμμοδυτοξίνη Α της *Vipera ammodytes* και το πεπτίδιο S¹²⁸SNCQENSDK¹³⁷ από τη φωσφολιπάση Α₂ της *Vipera berus*. Ακολούθως, τα πεπτίδια συντέθηκαν με τη μέθοδο στερεάς φάσης (SPPS), καθαρίστηκαν με RP-HPLC και χαρακτηρίστηκαν με φασματομετρία μάζας και φασματοσκοπία NMR. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την επιτυχή σύνθεση και την υψηλή καθαρότητα των πεπτιδίων, ενώ η ανάλυση NMR έδειξε ότι δεν υιοθετούν σταθερή τρισδιάστατη διαμόρφωση σε διάλυμα.

Για την ενίσχυση της ανοσογονικότητας, τα πεπτίδια συζεύχθηκαν με τον συνθετικό πεπτιδικό φορέα CPSOC(3,9-Acm), ο οποίος τροποποιήθηκε κατάλληλα ώστε να επιτρέπει ελεγχόμενη πρόσδεση των επιτόπων μέσω χημειοεκλεκτικού θειοαιθερικού δεσμού. Με τον τρόπο αυτό συντέθηκαν επιτυχώς τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα CPSOC (3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK) και CPSOC (3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENSDK) και ακολούθησαν ανοσοποιήσεις ορνίθων για την παραγωγή IgY αντισωμάτων, τόσο με μεμονωμένο ανοσογόνο όσο και με μίγμα των δύο ανοσογονικών συμπλεγμάτων.

Η επιλογή των ορνίθων για την παραγωγή αντισωμάτων βασίστηκε στα σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνολογίας IgY, όπως η μη επεμβατική απομόνωση αντισωμάτων από τον κρόκο του αυγού, η υψηλή παραγωγικότητα και η μειωμένη πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε ανοσοχημικές δοκιμασίες. Η απομόνωση των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο της πολυαιθυλενογλυκόλης 6000, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός με διαπίδυση και χρωματογραφία συγγένειας, με χρήση εξειδικευμένων στηλών σεφαρόζης στις οποίες είχαν προσδεθεί οι συντεθειμένοι επίτοποι.

Οι ανοσοδοκιμασίες ELISA έδειξαν ότι παρήχθησαν εξειδικευμένα αντισώματα ικανοποιητικού τίτλου. Σαφώς υψηλότερο τίτλο εμφάνισαν τα αντισώματα στην περίπτωση ανοσοποίησης με το μίγμα των δύο ανοσογόνων έναντι της μονοδύναμης ανοσοποίησης. Επιπλέον, οι όρνιθες συνέχισαν να παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα με ικανοποιητική δραστηριότητα έως και οκτώ μήνες μετά την τελευταία ανοσοποίηση, ενώ όσον αφορά την αποθήκευσή τους η λυοφιλοποιημένη μορφή παρουσίασε σημαντικά καλύτερη σταθερότητα σε σύγκριση με την αποθήκευση σε διάλυμα.

Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα αποτέλεσε η δυνατότητα των παραχθέντων αντισωμάτων να αναγνωρίζουν όχι μόνο τα συνθετικά ανοσογόνα αλλά και ολόκληρα φυσικά δηλητήρια εχιδνών. Συγκεκριμένα, τα αντισώματα τόσο έναντι του μεμονωμένου ανοσογόνου όσο και του μίγματος αναγνώρισαν επιτυχώς το δηλητήριο της *Vipera ammodytes*. Επιπλέον τα παραχθέντα αντισώματα έναντι του μίγματος εμφάνισαν και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι των δηλητηρίων των ειδών *Montivipera xanthina* και *Macrovipera schweizeri*, γεγονός που επιβεβαιώνει την προσβασιμότητα

καθώς και την υψηλή συντήρηση των επιλεγμένων επιτόπων στις αντίστοιχες φωσφολιπιδίες.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή αποδεικνύει ότι ο σχεδιασμός συνθετικών πεπτιδικών επιτόπων φωσφολιπιδίων A_2 και κατά συνέπεια τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή εξειδικευμένων και λειτουργικών αντισωμάτων με δυνατότητα αναγνώρισης ομόλογων και ετερόλογων δηλητηρίων εχιδνών. Κατά συνέπεια, η στρατηγική αυτή μπορεί να θέσει τις βάσεις για την ανάπτυξη εργαλείων νέας γενιάς, χαμηλότερου κόστους, υψηλότερης εξειδίκευσης και ευρύτερης διαθεσιμότητας.

Abstract

Venomous snakes constitute a major global public health concern, particularly in regions with a high incidence of snakebite envenoming and limited access to specialized medical care. Envenomation by members of the family *Viperidae* can induce severe local and systemic effects, including hemorrhage, tissue necrosis, neurotoxicity, myotoxicity, and hemostatic disturbances, often resulting in permanent disability or death. The primary therapeutic approach remains the administration of antivenoms, which are traditionally produced by immunizing large mammals with whole venom. However, conventional antivenoms present significant limitations, including high production costs, limited availability, and the risk of severe adverse reactions.

Phospholipases A₂ (PLA₂s) represent one of the most important toxin families in viper venoms, as they are involved in multiple pathological mechanisms, including neurotoxicity, myotoxicity, cytotoxicity, and inflammatory responses. Their high biological relevance, combined with the presence of conserved regions among different viper species, makes them attractive molecular targets for the development of broad-spectrum, toxin-specific antibodies.

Within this context, the aim of the present doctoral dissertation was the rational design, synthesis, and immunological evaluation of synthetic peptide epitopes derived from viper venom phospholipases A₂, with the objective of generating toxin-specific antibodies and exploring their future application either in the development of next-generation antivenoms or in toxin-removal technologies for the extracorporeal treatment of envenomed patients.

Initially, homology studies were conducted among PLA₂s from various viper species, followed by detailed comparisons between *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera berus berus* PLA₂s, as well as with human PLA₂ homologues. The results revealed a high degree of sequence homology among viper PLA₂s (>60–70%) and low similarity to the corresponding human proteins (<35%), supporting the feasibility of selective immunological targeting with minimal risk of cross-reactivity against human PLA₂s.

Subsequently, computational analyses of antigenicity, hydrophilicity, surface accessibility, flexibility, mobility, and secondary structure were performed to identify suitable linear B-cell epitopes. Based on these analyses, two peptide epitopes were selected for synthesis: D128FLCKKESEK137 from Ammodytoxin A of *Vipera ammodytes* and S128SNCQENSDK137 from the PLA₂ of *Vipera berus*. The peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis (SPPS), purified by RP-HPLC, and characterized by mass spectrometry and NMR spectroscopy. The results confirmed the

successful synthesis and high purity of both peptides, while NMR analysis indicated that they do not adopt a stable three-dimensional conformation in solution.

To enhance immunogenicity, the peptides were conjugated to the synthetic peptide carrier CPSOC(3,9-Acm), which was appropriately modified to allow controlled attachment of the epitopes through a chemoselective thioether bond. This strategy led to the successful synthesis of the immunogenic constructs CPSOC(3,9-Acm;6,12-DFLC(Acm)KKESEK) and CPSOC(3,9-Acm;6,12-SSNC(Acm)QENSDK). These conjugates were subsequently used for chicken immunization, both individually and as a mixture, for the production of IgY antibodies.

Chickens were selected for IgY antibody production due to the well-established advantages of IgY technology, including non-invasive antibody collection from egg yolks, high productivity, and a reduced likelihood of false-positive results in immunochemical assays. Antibodies were isolated using the polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) precipitation protocol, followed by purification through dialysis and affinity chromatography using Sepharose-based columns coupled with the synthetic epitopes. ELISA assays demonstrated the successful production of specific antibodies with satisfactory titers. Significantly higher antibody titers were obtained following immunization with the mixture of the two immunogens compared with single-immunogen immunization. Furthermore, immunized chickens continued to produce specific antibodies with satisfactory activity for up to eight months after the final immunization. Regarding storage stability, the lyophilized antibody preparations exhibited substantially greater stability than antibodies stored in solution.

A particularly important finding was the ability of the generated antibodies to recognize not only the synthetic immunogens but also whole native viper venoms. Specifically, antibodies raised against both the individual immunogens and the immunogen mixture successfully recognized *Vipera ammodytes* venom. Moreover, antibodies generated against the immunogen mixture exhibited cross-reactivity with venoms from *Montivipera xanthina* and *Macrovipera schweizeri*, confirming both the accessibility and the high conservation of the selected epitopes within the corresponding phospholipases A₂.

In conclusion, this dissertation demonstrates that the rational design of synthetic phospholipase A₂ peptide epitopes and their corresponding immunogenic constructs can lead to the generation of specific and functional antibodies capable of recognizing both homologous and heterologous viper venoms. Consequently, this strategy may provide the foundation for the development of next-generation antivenom-related tools characterized by lower production costs, higher specificity, and broader accessibility.

Βιβλιογραφία

- [1] World Health Organisation. Snakebite envenoming.
- [2] Lamb T, de Haro L, Lonati D, Brvar M, Eddleston M. Antivenom for European *Vipera* species envenoming. *Clin Toxicol.* 2017;55(6):557-568. doi:10.1080/15563650.2017.1300261
- [3] Knudsen C, Ledsgaard L, Dehli RI, Ahmadi S, Sørensen CV, Laustsen AH. Engineering and design considerations for next-generation snakebite antivenoms. *Toxicon.* 2019;167:67-75. doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.005
- [4] Silva A, Isbister GK. Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(2):537-546. doi:10.1042/BST20190739
- [5] Alencar LRV, Quental TB, Grazziotin FG, Alfaro ML, Martins M, Venzon M, et al. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;105:50-62. doi:10.1016/j.ympev.2016.07.029
- [6] Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel).* 2017;9(9). doi:10.3390/toxins9090290
- [7] Paolino G, Di Nicola MR, Pontara A, Didona D, Moliterni E, Mercuri SR, et al. *Vipera* snakebite in Europe: a systematic review of a neglected disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2020;34(10):2247-2260. doi:10.1111/jdv.16722
- [8] De Haro L, Boels D. European snakes. In: *Critical Care Toxicology: Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient.* Springer International Publishing; 2017:2441-2452. doi:10.1007/978-3-319-17900-1_80
- [9] Frangides CY, Koulouras V, Kouni SN, Tzortzatos G V., Nikolaou A, Pneumáticos J, et al. Snake venom poisoning in Greece. Experiences with 147 cases. *Eur J Intern Med.* 2006;17(1):24-27. doi:10.1016/j.ejim.2005.10.001
- [10] Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, et al. Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function. *Toxicon.* 2005;45(8):1063-1074. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.024
- [11] Valakos E, Pafilis P, Sotiropoulos K, Lymberakis P, Maragou P, Foufopoulos J. *The Amphibians and Reptiles of Greece.*; 2008.
- [12] Knudsen C, Laustsen AH. Tropical Medicine and Infectious Disease Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. doi:10.3390/tropicalmed3020000

- [13] Mebert K. *Vipera schweizeri*: distribution, ecology and conservation. *Herpetol Notes*. 2011;4(2):47-52.
- [14] Schulte L, Damm M, Avella I, Uhrig L, Erkoc P, Schiffmann S, et al. Venomics of the milos viper (*Macrovipera schweizeri*) unveils patterns of venom composition and exochemistry across blunt-nosed viper venoms. *Front Mol Biosci*. 2023;10. doi:10.3389/fmolb.2023.1254058
- [15] Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003;42(8):827-840. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.002
- [16] Liapis K, Charitaki E, Psaroulaki A. Case report: Spherocytic hemolytic anemia after envenomation by long-nosed viper (*Vipera ammodytes*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;101(6):1442-1445. doi:10.4269/ajtmh.19-0611
- [17] Riccardo Di Nicola M, Vittorio Pozzi A, Avella I, Mezzadri S, Paolino Di Nicola G, San Raffaele Hospital I, et al. Taxonomy, biology and natural history of the Milos viper *Macrovipera schweizeri* (Werner, 1935): literature review and observations on autumnal activity and importance of residual pools (Serpentes, Viperidae).
- [18] Pucca MB, Knudsen C, Oliveira IS, Rimbault C, Cerni FA, Wen FH, et al. Current Knowledge on Snake Dry Bites. *Toxins (Basel)*. 2020;12(11). doi:10.3390/toxins12110668
- [19] Warrell DA. Snake bite. *The Lancet*. 2010;375(9708):77-88. doi:10.1016/S0140-6736(09)61754-2
- [20] Gopalakrishnakone P, Inagaki H, Vogel CW, Mukherjee AK, Rashed T, Rahmy. *Snake Venoms*. 1st ed. Springer Dordrecht; 2017. doi:https://doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1
- [21] Montecucco C, Rossetto O. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci*. 2000;6:266-270.
- [22] Ojeda PG, Ramírez D, Alzate-Morales J, Caballero J, Kaas Q, González W. Computational studies of snake venom toxins. *Toxins (Basel)*. 2018;10(1). doi:10.3390/toxins10010008
- [23] Ghazaryan NA, Ghulikyan L, Kishmiryan A, Andreeva T V., Utkin YN, Tsetlin VI, et al. Phospholipases a2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2015;1848(2):463-468. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.037

- [24] Xiao H, Pan H, Liao K, Yang M, Huang C. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. *Biomed Res Int.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/6592820
- [25] Harris JB, Scott-Davey T. Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins (Basel).* 2013;5(12):2533-2571. doi:10.3390/toxins5122533
- [26] Šribar J, Kovačič L, Oberčkal J, Ivanušec A, Petan T, Fox JW, et al. The neurotoxic secreted phospholipase A2 from the *Vipera a. ammodytes* venom targets cytochrome c oxidase in neuronal mitochondria. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-018-36461-6
- [27] Rouault M, Rash LD, Escoubas P, Boilard E, Bollinger J, Lomonte B, et al. Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: The N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry.* 2006;45(18):5800-5816. doi:10.1021/bi060217r
- [28] María Gutiérrez J, Rucavado A. Snake Venom Metalloproteinases: Their Role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage.; 2000.
- [29] Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.
- [30] Casewell NR, Wagstaff SC, Harrison RA, Renjifo C, Wüster W. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol Biol Evol.* 2011;28(9):2637-2649. doi:10.1093/molbev/msr091
- [31] Georgieva D, Risch M, Kardas A, Buck F, Von Bergen M, Betzel C. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *vipera ammodytes meridionalis*. *J Proteome Res.* 2008;7(3):866-886. doi:10.1021/pr070376c
- [32] Latinović Z, Leonardi A, Koh CY, Kini RM, Bakija AT, Pungertar J, et al. The procoagulant snake venom serine protease potentially having a dual, blood coagulation factor v and X-activating activity. *Toxins (Basel).* 2020;12(6). doi:10.3390/toxins12060358
- [33] Kalogeropoulos K, Treschow AF, Auf Dem Keller U, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM, et al. Protease activity profiling of snake venoms using high-throughput peptide screening. *Toxins (Basel).* 2019;11(3). doi:10.3390/toxins11030170
- [34] Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon.* 2005;45(8):1115-1132. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.020

- [35] Di Nicola MR, Pontara A, Kass GEN, Kramer NI, Avella I, Pampena R, et al. Vipers of Major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*. 2021;453. doi:10.1016/j.tox.2021.152724
- [36] Costa TR, Burin SM, Menaldo DL, de Castro FA, Sampaio S V. Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2014;20(1). doi:10.1186/1678-9199-20-23
- [37] Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*. 2004;44(3):227-231. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.023
- [38] Ferreira Sh. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965;24(1):163-169. doi:10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x
- [39] Clemetson KJ. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon*. 2010;56(7):1236-1246. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.011
- [40] Ann Mclane M, Marcinkiewicz C, Vijay-kumar S, Wierzbicka-patynowski I, NIEWIARO ws TK. Minireview. Viper Venom Disintegrins and Related Molecules (44322).; 1998.
- [41] Leonardi A, Sajevec T, Pungercar J, Krijazaj I. Comprehensive Study of the Proteome and Transcriptome of the Venom of the Most Venomous European Viper: Discovery of a New Subclass of Ancestral Snake Venom Metalloproteinase Precursor-Derived Proteins. *J Proteome Res*. 2019;18(5):2287-2309. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00120
- [42] Ivanović SR, Rešetar Maslov D, Rubić I, Mrljak V, Živković I, Borozan N, et al. The Venom of *Vipera ammodytes ammodytes*: Proteomics, Neurotoxic Effect and Neutralization by Antivenom. *Vet Sci*. 2024;11(12). doi:10.3390/vetsci11120605
- [43] Avella I, Schulte L, Damm M, Wüster W, Vilcinskis A, Lüddecke T. Haemostasis-altering effects of Milos viper (*Macrovipera schweizeri*) venom. *Toxicology in Vitro*. 2025;107. doi:10.1016/j.tiv.2025.106081
- [44] Alshalah A, Williams DJ, Ferrario A. From fangs to antidotes: A scoping review on snakebite burden, species, and antivenoms in the Eastern Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(7). doi:10.1371/journal.pntd.0012200
- [45] Habib AG, Brown NI. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*. 2018;150:115-123. doi:10.1016/j.toxicon.2018.05.009

- [46] Dobaja Borak M, Babić Ž, Caganova B, Grenc D, Karabuva S, Kolpach Z, et al. Viper envenomation in Central and Southeastern Europe: a multicentre study. *Clin Toxicol.* 2023;61(9):656-664. doi:10.1080/15563650.2023.2273761
- [47] Di Nicola MR, Crevani M, Avella I, Cerullo A, Dorne JLCM, Paolino G, et al. A Guide to the Clinical Management of Vipera Snakebite in Italy. *Toxins (Basel).* 2024;16(6). doi:10.3390/toxins16060255
- [48] Boels D, Hamel JF, Le Roux G, Labadie M, Paret N, Delcourt N, et al. Snake bites by European vipers in Mainland France in 2017–2018: comparison of two antivenoms Viperfav® and Viperatab®. *Clin Toxicol.* 2020;58(11):1050-1057. doi:10.1080/15563650.2020.1726377
- [49] Maffè S, Paffoni P, Facchini E, Bergamasco L, Prenna E, Ariotti S, et al. Venom-induced myocarditis: An unusual case attributable to Vipera aspis bite. *Toxicon.* 2024;250:108104. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.108104
- [50] Kallel H, Pujo JM, Houcke S, Resiere D. Inequalities in access to antivenom: An ethical issue in the management of snakebite envenoming. *Toxicon.* 2024;247:108030. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.108030
- [51] Silva GM da, Chowdhury A. Enhancing snakebite management: The role of small molecule therapeutics in complementing antivenom strategies. *Toxicon.* 2024;249:108081. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.108081
- [52] Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOPT, Guedes MIF. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:293-303. doi:10.1016/j.intimp.2019.05.015
- [53] Gómez-Betancur I, Gogineni V, Salazar-Ospina A, León F. Perspective on the therapeutics of anti-snake venom. *Molecules.* 2019;24(18). doi:10.3390/molecules24183276
- [54] Knudsen C, Jürgensen JA, Føns S, Haack AM, Friis RUW, Dam SH, et al. Snakebite Envenoming Diagnosis and Diagnostics. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.661457
- [55] Claudet I, Germain H. VipGrade® electronic clinical tool: retrospective evaluation on a paediatric cohort of European viper bites. *Clin Toxicol.* 2024;62(11):726-732. doi:10.1080/15563650.2024.2418388
- [56] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 10th ed. Elsevier; 2023.
- [57] Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology.* 10th ed. Garland Science; 2022.
- [58] Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology.* 9th ed. Elsevier; 2021.
- [59] Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby Immunology.* 8th ed. W.H. Freeman; 2019.

- [60] Delves PJ, al. et. Antigens and antigen presentation. *New England Journal of Medicine*. 2020;382:383-392. doi:10.1056/NEJMra1805102
- [61] Rose NR, Mackay IR. *The Autoimmune Diseases*. 6th ed. Academic Press; 2023.
- [62] Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;145(2):471-486. doi:10.1016/j.jaci.2019.12.988
- [63] Chen Y, Yin S, Li X. The structural basis of antibody–antigen recognition. *Front Immunol*. 2020;11:1182. doi:10.3389/fimmu.2020.01182
- [64] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and effector functions: From structure to immunology. *Front Immunol*. 2019;10:112. doi:10.3389/fimmu.2019.00112
- [65] Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: Antibody effector functions in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(1):46-61. doi:10.1038/nri.2017.106
- [66] Wang Y. Structural insights into immunoglobulin architecture and function. *Trends Immunol*. 2021;42(8):693-708. doi:10.1016/j.it.2021.06.003
- [67] Schade R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review. *Biotechnol Adv*. 2005;23(6):519-573.
- [68] Zhang WW. The use of adjuvant systems in vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(3). doi:10.1128/CMR.00036-17
- [69] Carlander D. Avian IgY antibody: in vitro and in vivo. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;70(3-4):325-334.
- [70] Spillner E. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*. 2012;40(5):313-322.
- [71] Erhard, Riidiger, Schade Irene BM, Staak, Andreas Hlinak C. *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application IgY -Teehnology*.
- [72] Dias da Silva W, Tambourgi D V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;135(3-4):173-180.
- [73] Harlow D, Lane E. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory; 1985.
- [74] Herbert WJ. The mode of action of mineral-oil adjuvants on antibody production in mice. *Immunology*. 1968;14:301-318.
- [75] Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001;19:2666-2672.
- [76] Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3(1):163-182. doi:10.1146/annurev-food-022811-101137

- [77] Tabll AA. Monoclonal IgY antibodies: advancements and limitations. *Front Immunol.* 2024;12:696003.
- [78] Lee L, Samardzic K, Wallach M, Frumkin LR, Mochly-Rosen D. Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.696003
- [79] Deng S, Luo X, Du Y, Elbaiomy RG, He W, Guo R, et al. Immunoglobulin Y antibodies against colonization-related genes block the growth and infection of *Helicobacter pylori*. *Front Immunol.* 2025;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1582250
- [80] Qi X, Zhao S, Huang Q, Wang Y, Pei Q, Chen Y, et al. Preparation and application of specific chicken yolk antibodies in detecting *Brucella*. *Front Vet Sci.* 2025;12. doi:10.3389/fvets.2025.1552097
- [81] Yakhkeshi S, Isah MB, Sadeghi-Abandansari H, Zhang X. Advances in IgY antibody dosage form design and delivery strategies: Current status and future perspective. *Int J Biol Macromol.* 2025;300. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.140291
- [82] Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol Invest.* 1990;19(3):253-258.
- [83] Hatta H. Extraction of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Poult Sci.* Published online 1993.
- [84] Mohan MS. Characterization and purification of egg yolk antibodies (IgY). *Food Agric Immunol.* 2020;31(3):227-242.
- [85] Akita EM, Nakai S. Production and purification of IgY from egg yolk by water dilution. *J Immunol Methods.* 1993;160:207.
- [86] Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 9th ed. Cambridge University Press; 2021.
- [87] Pauly D. IgY technology: Extraction and purification of chicken antibodies. *Journal of Visualized Experiments.* Published online 2011. doi:10.3791/3084
- [88] Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. *Dev Comp Immunol.* 1989;13(3):273-279.
- [89] De Meulenaer B. Affinity purification of chicken IgY: A comparison of matrix ligands. *J Immunol Methods.* 2001;248(1-2):133-141.
- [90] Wu J. Synthetic affinity ligands for IgY purification. *Journal of Chromatography B.* 2020;1141:122012.
- [91] Akita EM, Nakai S. Size-exclusion chromatography for IgY purification. *Food Agric Immunol.* 1992;4:309-318.
- [92] Crowther JR. The ELISA Guidebook. 2nd ed. Springer; 2009.
- [93] Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005;51(12):2415-2418. doi:10.1373/clinchem.2005.051532

- [94] Wild D. The Immunoassay Handbook. 4th ed. Elsevier; 2013.
- [95] Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques: An overview. *J Immunol Methods*. 1992;150(1-2):5-21. doi:10.1016/0022-1759(92)90061-W
- [96] Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and ELISA. *Clinical Laboratory Medicine*. 2013;33(1):1-15. doi:10.1016/j.cll.2012.10.001
- [97] Hnasko R, Hnasko G. The ELISA: Fundamentals and New Developments. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1318:1-25. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5_1
- [98] Sakamoto S, Putalun W. Enzyme-linked immunosorbent assay for small molecules using competitive format. *J Immunol Methods*. 2018;456:1-6. doi:10.1016/j.jim.2018.02.013
- [99] Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Panou-Pomonis E. Artificial Carriers: A Strategy for Constructing Antigenic/Immunogenic Conjugates. *Curr Top Med Chem*. 2006;6:1715-1735.
- [100] Walter G. Production and use of antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods*. 1986;88:149-161.
- [101] Alexopoulos C, Sakarellos-Daitsiotis M. Synthetic carriers: SOCn-I and SOCn-II as an innovative and multifunctional approach. *Curr Med Chem*. 2005;12:1469-1479.
- [102] Bindra V, Kuki A. Conformational preferences of oligopeptides rich in alpha-aminoisobutyric acid. *Int J Pept Protein Res*. 1994;44:539-548.
- [103] Tsikaris V, Sakarellos C. Concept and design of sequential oligopeptide carriers (SOC). *Biopolymers*. 2002;38(3):291-294.
- [104] Papadopoulos C, Fotou E, Moussis V, Ntoyhaniari A, Zografou S, Maltabe V, et al. Intracellular targets: A multiple cargo transporting molecule. *Journal of Peptide Science*. 2021;27(11). doi:10.1002/psc.3359
- [105] Routsias JG, Dotsika E, Touloupi E, Papamattheou M, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, et al. Autoimmune study reference (Exact title unavailable). *J Autoimmun*. 2003;21:17.
- [106] Sotiriadou SC, Remoundos KP, Katsikas MC, Tzinia AK, Tsikaris V, Sotiropoulou SJ. Study in *J. Biol. Chem. Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:13980.
- [107] Vlachoyiannopoulos T, Petrovas C, Tzioufas AG, Alexopoulos C, Guialis A, Nakopoulou L, et al. Autoimmune study. *J Autoimmun*. 2000;14:53.
- [108] Krikorian D, Panou-Pomonis E, Voitharou C, Sakarellos C. Peptide conjugate study. *Bioconjug Chem*. 2005;16:812.

- [109] Yiannaki S, Vlachoyiannopoulos PG, Manousakis MN, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Tzioufas AG, et al. Autoimmune study. Clin Exp Immunol. 2000;121:551.
- [110] Moss J. Basic terminology of stereochemistry. Pure and Applied Chemistry. 1996;68:2193.
- [111] Greenstein JP, Winitz M. Chemistry of the Amino Acids. Wiley; 1961.
- [112] Pauling L, Corey RB. The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1951;37:205.
- [113] Pauling L, Corey RB. Two hydrogen-bonded spiral configurations of the polypeptide chain. J Am Chem Soc. 1950;72:5349.
- [114] Creighton TE. An empirical approach to protein conformation stability and flexibility. Biopolymers. 1983;22:49-58.
- [115] Chen H, Horváth C. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. J Chromatogr A. 1995;705(1):3-20.
- [116] Fujii T, Inagaki Y, Mitsutsuka Y. Surface ionization mass spectrometry of biomolecules: amino acids, purine bases, alkaloids. Int J Mass Spectrom Ion Process. 1993;124(1):45-52.
- [117] Albericio F (Ed.). Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide . 1st ed.; 2000.
- [118] Martin FG, Albericio F. Solid Supports for the Synthesis of Peptides: From the First Resin Used to the Most Sophisticated in the Market. 2009;26:8028.
- [119] Albericio F, Isidro-Llobet A, Mercedes A. Amino Acid-Protecting Groups. Published online 2009:2455-2504.
- [120] Sheppard RC. The fluorenylmethoxycarbonyl group in solid-phase synthesis. Journal of Peptide Science. 2003;9(9):545-552.
- [121] Cooks G, Kaiser RE. Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. American Chemical Society; 1990.
- [122] A AQ. MS Detection with the AQA for LC and IC Using Atmospheric Pressure Ionization Techniques.; 2001.
- [123] Finnigan RE. Quadrupole mass spectrometers: From development to commercialization. Anal Chem. 1994;66(19):969A-975A.
- [124] Fara MA, Díaz-Mochón JJ, Bradley M. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptoids and labelled peptides. Tetrahedron Lett. 2006;47(6):1011-1014.
- [125] Carpino LA, El-Faham A. The diisopropylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly. Tetrahedron. 1999;55(22):6813-6830.

- [126] Subirós-Funosas R, El-Faham A, Albericio F. Aspartimide formation in peptide chemistry: Occurrence, prevention strategies and the role of N-hydroxylamines. *Tetrahedron*. 2011;67(45):8595-8606.
- [127] Coste J, Le-Nguyen D, Castro B. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-products. *Tetrahedron Lett*. 1990;31(2):205-208.
- [128] Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase peptide synthesis. *Anal Biochem*. 1970;34(2):595-598.
- [129] Sarin VK, Kent SBH, Tam JP, Merrifield RB. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem*. 1981;117(1):147-157.
- [130] Sandhya K, Ravindranath B. A protocol for racemization-free loading of Fmoc-amino acids to Wang resin. *Tetrahedron Lett*. 2008;49(15):2435-2437.
- [131] Kostidis S, Stathopoulos P, Chondrogiannis NI, Sakarellos C, Tsikaris V. Aspartyl methyl ester formation via aspartimide ring opening. *Tetrahedron Lett*. 2003;44(48):8673-8676.
- [132] Stathopoulos P, Papas S, Tsikaris V. C-terminal N-alkylated peptide amides from Rink amide resin linker decomposition. *Journal of Peptide Science*. 2006;12(3):227-232.
- [133] Tam JP. Thioether bond formation in peptide chemistry: mechanisms and applications. *J Am Chem Soc*. 1988;110:1635-1640.
- [134] Dawson PE, Kent SBH. Chemical ligation and the formation of thioether-linked peptides. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:923-960.
- [135] Chalker JM, Bernardes GJL, Davis BG. A mild and selective method for iodoacetyl–thiol conjugation. *Chemical Communications*. 2011;47:228-230.
- [136] Hermanson GT. Maleimide and iodoacetyl-based thiol reactions. *Bioconjug Chem*. 1995;6:342-358.
- [137] Spokoiny AM, Zou Y, Ling JJ. Thiol–halide SN2 reactions in peptide science. *Journal of Peptide Science*. 2013;19:356-365.
- [138] Dawson R, Melnyk O. Iodoacetylation in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*. 2006;47:8583-8587.
- [139] Barany G, Merrifield RB. Peptide synthesis via thiol-based ligation chemistry. *Chem Rev*. 1980;80:111-177.
- [140] Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 4th ed. Wiley; 2021.
- [141] Kazakevich Y, Lobrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. 2nd ed. Wiley; 2019.

- [142] Swartz ME, Krull IS. Analytical method development and validation for RP-HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2012;35(20):2921-2950. doi:10.1080/10826076.2012.708836
- [143] Gross JH. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 3rd ed. Springer; 2017.
- [144] Dass C. *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*. Wiley; 2020.
- [145] Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis*. 7th ed. Cengage Learning; 2018.
- [146] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2016;537(7620):347-355. doi:10.1038/nature19949
- [147] Zhang Z. Recent advances in biological mass spectrometry and proteomics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2023;165:117055. doi:10.1016/j.trac.2023.117055
- [148] Nair DG. Peptide sequencing by tandem mass spectrometry. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 2576. ; 2023:85-103.
- [149] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-410.
- [150] Altschul SF, Gish W. Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* 1996;266:460-480.
- [151] Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 2005;272:5101-5109.
- [152] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-3402.
- [153] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W5-W9.
- [154] Lipman DJ, Pearson WR. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* (1979). 1985;227:1435-1441.
- [155] Pearson WR. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98.
- [156] Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:2444-2448.
- [157] Pearson WR. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms. *Genomics*. 1991;11:635-650.
- [158] Papadopoulos JS, Agarwala R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*. 2007;23:1073-1079.

- [159] Antibody Epitope Prediction. IEDB Analysis Resource. Available at: <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>. .
- [160] Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 1986;25:5425-5432.
- [161] Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*. 1979;277:491-492.
- [162] Emini EA, Hughes J V, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985;55:836-839.
- [163] Karplus PA, Schulz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*. 1985;72:212-213.
- [164] Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett*. 1985;188:215-218.
- [165] Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:3824-3828.
- [166] Pettersson I. Methods of epitope mapping. *Mol Biol Rep*. 1992;16:149-153.
- [167] Chou PY, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978;47:45-148.
- [168] Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990;276:172-174.
- [169] Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006;2:2.
- [170] Ponomarenko J V, Bourne PE. Antibody-protein interactions: Benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct Biol*. 2007;7.
- [171] Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci*. 2006;15:2558-2567.
- [172] Ho TK. Random decision forests. *Proc Int Conf Doc Anal Recognition, ICDAR*. 1995;1:278-282.
- [173] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:W24-W29.
- [174] Pires DAT, Bemquerer MP, Do Nascimento CJ. Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Res Ther*. 2014;20:53-69.
- [175] Papas S. Synthesis and antitumor activity of peptide-paclitaxel conjugates. *J Pept Sci*. 2007;13:662-671.

- [176] Papadopoulos C. Intracellular targets: A multiple cargo transporting molecule. J Pept Sci. Published online 2021:1-12. doi:10.1002/psc.3359
- [177] Staak C. Isolation of IgY from Yolk.; 2001. doi:10.1007/978-3-662-04488-9_4

Δημοσιεύσεις

1. Ioannis Sarrigeorgiou, Christiana Bregou, Apostolos Patsias, Evgenia Fotou, **Vasiliki Moulasioti**, Constantinos Tellis, Vassilios Moussis, Vasileios Tsiouris, Vassilios Tsikaris, Demokritos Tsoukatos, Peggy Lymberi. Natural Antibodies Quantitative and Qualitative Profiles as Biomarkers to Differentiate Free-Range and Conventional Broiler Chicks. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*. 9 (2026): 59-66.
2. **Moulasioti, V.**, Fotou, E., Moussis, V., Tsikaris, V. Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-SSNC(Acm)QENSDK)]₄-NH₂ (2024) MolBank, 2024 (4), art. no. M1900. DOI: 10.3390/M1900
3. **Moulasioti, V.**, Fotou, E., Moussis, V., Tsikaris, V. Ac-[K-Aib-C(3,9-Acm; 6,12-DFLC(Acm)KKESEK)]₄-NH₂ (2024) MolBank, 2024 (4), art. no. M1887. DOI: 10.3390/M1887
4. Tellis, C., Sarrigeorgiou, I., Tsinti, G., Patsias, A., Fotou, E., **Moulasioti, V.**, Kyriakou, D., Papadami, M., Moussis, V., Boti, M.-E., Tsiouris, V., Tsikaris, V., Tsoukatos, D., Lymberi, P. Pasture vs. Coop: Biomarker Insights into Free-Range and Conventional Broilers (2024) *Animals*, 14 (21), art. no. 3070 . DOI: 10.3390/ani14213070
5. Fotou, E., **Moulasioti, V.**, Papadopoulos, G.A., Kyriakou, D., Boti, M.-E., Moussis, V., Papadami, M., Tellis, C., Patsias, A., Sarrigeorgiou, I., Theodoridis, A., Lymberi, P., Tsiouris, V., Tsikaris, V., Tsoukatos, D. Effect of Farming System Type on Broilers' Antioxidant Status, Performance, and Carcass Traits: An Industrial-Scale Production Study (2024) *Sustainability (Switzerland)*, 16 (11), art. no. 4782. DOI: 10.3390/su16114782
6. Fotou, E., **Moulasioti, V.**, Kyriakou, D., Boti, M.-E., Moussis, V., Papadami, M., Tellis, C., Patsias, A., Sarrigeorgiou, I., Papadopoulos, G.A., Lymberi, P., Tsiouris, V., Tsikaris, V., Demokritos, T. Effect of dietary supplementation with oregano oil premix on the antioxidant status, performance, and meat quality in slow-growth broiler chickens (2024) *Italian Journal of Animal Science*, 23 (1), pp. 1741-1751. DOI: 10.1080/1828051X.2024.2425740
7. Sarrigeorgiou, I., Stivarou, T., Tsinti, G., Patsias, A., Fotou, E., **Moulasioti, V.**, Kyriakou, D., Tellis, C., Papadami, M., Moussis, V., Tsiouris, V., Tsikaris, V., Tsoukatos, D., Lymberi, P. Levels of Circulating IgM and IgY Natural Antibodies in Broiler Chicks: Association with Genotype and Farming Systems (2023) *Biology*, 12 (2), art. no. 304. DOI: 10.3390/biology12020304

8. Fotou, E., **Moulasioti, V.**, Angelis, I., Tsiouris, V., Patsias, A., Tellis, C., Moussis, V., Boti, M.E., Tsoukatos, D. Influence of dietary olive paste flour on the performance and oxidative stress in chickens raised in field conditions (2021) Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 72 (3), pp. 3239-3248. DOI: 10.12681/JHVMS.28520

