



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες

**Ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την
ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I cTnI σε ασθενείς με
καρδιαγγειακά νοσήματα.**

Μαρία Κωσταρά
Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσίκαρης Βασίλειος

Ιωάννινα, 2014



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000348298





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες

**Ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την
ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I cTnI σε ασθενείς με
καρδιαγγειακά νοσήματα.**

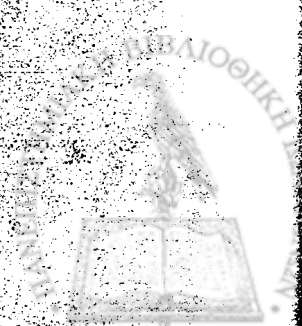
Μαρία Κωσταρά
Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσίκαρης Βασίλειος

Ιωάννινα, 2014



AQ. 816:.....520/2015...



Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβρης 2011- Δεκέμβρης 2014.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βασίλειο Τσίκαρη, ο οποίος μου ανέθεσε και το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, παρέχοντάς μου απλόχερα τη δυνατότητα και παράλληλα μοναδική ευκαιρία να διευρύνω την αντίληψη και τις γνώσεις μου στην επιστήμη της Χημείας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Νάκα Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων και κ.Γκιώκα Δημοσθένη, Λέκτορα του Τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Ιωαννίνων, για τις συμβουλές και τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΙΔΑΧ του εργαστηρίου για την βοήθειά τους κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, για τη φιλική τους συμπεριφορά και το ευχάριστο περιβάλλον κατά την παραμονή μου σε αυτό.

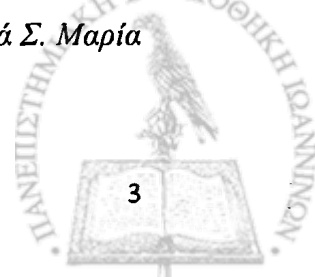
Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και μέλη της ομάδας Μπάτση Χριστίνα και Σιδηροπούλου Σοφία για την πολύτιμη και έμπρακτη βοήθειά τους όποτε αυτή τους ζητήθηκε.

Θερμότατα ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους για την κατανόηση και συμπαράστασή τους, καθώς και για το ιδιαίτερα ευχάριστο πνεύμα συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους με βοήθησαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ιωάννινα, Φεβρουάριος 2015

Κωσταρά Σ. Μαρία



Περίληψη

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου, τόσο στην Ευρώπη όσο και παγκοσμίως. Παρά την υψηλή θνησιμότητα που εμφανίζουν, είναι τα κατεξοχήν αποτρέψιμα νοσήματα. Έτσι η έγκαιρη διάγνωση τους αποτελεί επιτακτική ανάγκη όχι μόνο σε κλινικό αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο.

Η χρήση των βιοδεικτών τα τελευταία 40 χρόνια, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην πρόωμη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Οι τροπονίνες θεωρούνται εξαιρετικά ειδικοί και ευαίσθητοι βιολογικοί δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης. Αποτελούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που είναι αναπόσπαστο δομικό συστατικό τόσο των σκελετικών όσο και καρδιακών μυϊκών ιστών και συνίσταται από 3 πρωτεϊνικά μακρομόρια: την τροπονίνη I (TnI), την τροπονίνη T (TnT) και την τροπονίνη C (TnC). Αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν δείξει ότι η καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης I, cTnI αυξάνει μέσα σε 4-6 ώρες από την έναρξη του προκάριου άλγους, καθιστώντας την έναν ιδανικό βιοδείκτη για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I, cTnI σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα. Για την επίτευξη του στόχου αυτού εξειδικεύθηκαν συγκεκριμένα αντισώματα. Η εξειδίκευση αφορούσε τον καθαρισμό τους με μεθόδους όπως η χρωματογραφία συγγένειας και η διαπίδυση και την επισήμανση τους με φλουορεσκεΐνη.

Τα αντισώματα αυτά παρήχθησαν έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα επιλέχθηκε διότι η αμινοξική αλληλουχία του επιτόπου (cTnI₁₉₋₃₁), ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Επιπλέον, η ομολογία του σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Έτσι τα αντισώματα αυτά που είναι εξειδικευμένα και αναγνωρίζουν ισχυρά την τροπονίνη θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανάπτυξη ενός τεστ ELISA το οποίο θα διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και θα στηρίζεται στη χρήση ενός πρωτότυπου ισχυρού αντιγόνου και ενός μόνο επισημασμένου αντισώματος.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες

**Ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την
ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I cTnI σε ασθενείς με
καρδιαγγειακά νοσήματα.**

Μαρία Κωσταρά
Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσίκαρης Βασίλειος

Ιωάννινα, 2014





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες

**Ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την
ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I cTnI σε ασθενείς με
καρδιαγγειακά νοσήματα.**

Μαρία Κωσταρά
Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσίκαρης Βασίλειος

Ιωάννινα, 2014



Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβρης 2011- Δεκέμβρης 2014.

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βασίλειο Τσίκαρη, ο οποίος μου ανέθεσε και το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, παρέχοντάς μου απλόχερα τη δυνατότητα και παράλληλα μοναδική ευκαιρία να διευρύνω την αντίληψη και τις γνώσεις μου στην επιστήμη της Χημείας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Νάκα Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων και κ. Γκιώκα Δημοσθένη, Λέκτορα του Τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Ιωαννίνων, για τις συμβουλές και τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΙΔΑΧ του εργαστηρίου για την βοήθειά τους κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, για τη φιλική τους συμπεριφορά και το ευχάριστο περιβάλλον κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και μέλη της ομάδας Μπάτση Χριστίνα και Σιδηροπούλου Σοφία για την πολύτιμη και έμπρακτη βοήθειά τους όποτε αυτή τους ζητήθηκε.

Θερμότατα ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους για την κατανόηση και συμπαράστασή τους, καθώς και για το ιδιαίτερα ευχάριστο πνεύμα συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους με βοήθησαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ιωάννινα, Φεβρουάριος 2015

Κωσταρά Σ. Μαρία



Περίληψη

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου, τόσο στην Ευρώπη όσο και παγκοσμίως. Παρά την υψηλή θνησιμότητα που εμφανίζουν, είναι τα κατεξοχήν αποτρέψιμα νοσήματα. Έτσι η έγκαιρη διάγνωση τους αποτελεί επιτακτική ανάγκη όχι μόνο σε κλινικό αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο.

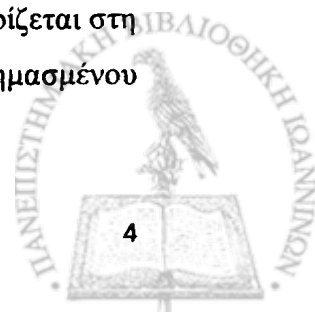
Η χρήση των βιοδεικτών τα τελευταία 40 χρόνια, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην πρόωμη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Οι τροπονίνες θεωρούνται εξαιρετικά ειδικοί και ευαίσθητοι βιολογικοί δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης. Αποτελούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που είναι αναπόσπαστο δομικό συστατικό τόσο των σκελετικών όσο και καρδιακών μυϊκών ιστών και συνίσταται από 3 πρωτεϊνικά μακρομόρια: την τροπονίνη I (TnI), την τροπονίνη T (TnT) και την τροπονίνη C (TnC). Αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν δείξει ότι η καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης I, cTnI αυξάνει μέσα σε 4-6 ώρες από την έναρξη του προκάρδιου άλγους, καθιστώντας την έναν ιδανικό βιοδείκτη για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I, cTnI σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα. Για την επίτευξη του στόχου αυτού εξειδικεύθηκαν συγκεκριμένα αντισώματα. Η εξειδίκευση αφορούσε τον καθαρισμό τους με μεθόδους όπως η χρωματογραφία συγγένειας και η διαπίδυση και την επισήμανση τους με φλουορεσκεΐνη.

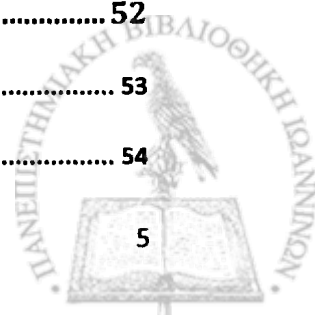
Τα αντισώματα αυτά παρήχθησαν έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα επιλέχθηκε διότι η αμινοξική αλληλουχία του επιτόπου (cTnI₁₉₋₃₁), ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Επιπλέον, η ομολογία του σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Έτσι τα αντισώματα αυτά που είναι εξειδικευμένα και αναγνωρίζουν ισχυρά την τροπονίνη θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανάπτυξη ενός τεστ ELISA το οποίο θα διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και θα στηρίζεται στη χρήση ενός πρωτότυπου ισχυρού αντιγόνου και ενός μόνο επισημασμένου αντισώματος.

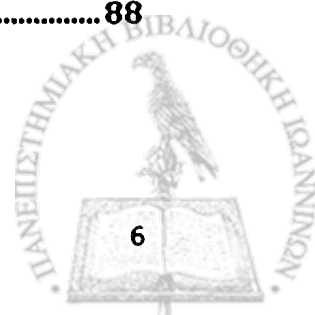


Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	7
1.1 Ανατομία της καρδιάς - Βασικά Στοιχεία	8
1.1.1 Αιμάτωση της Καρδιάς	10
1.1.2 Λειτουργία του καρδιακού μυός.....	11
1.1.3 Μικροσκοπική Δομή του καρδιακού μυός.....	11
1.1.4 Οι συσταλτές πρωτεΐνες	12
1.2 Καρδιαγγειακά Νοσήματα	14
1.3 Βιοχημικοί δείκτες στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα	18
1.4 Τροπονίνες	23
1.5 Απελευθέρωση των καρδιακών τροπονινών στην κυκλοφορία του αίματος	28
1.6 Δοκιμασίες ανίχνευσης καρδιακών Τροπονινών - Τεστ Τροπονίνης	30
1.7. Δοκιμασίες Τροπονίνης Υψηλής Ευαισθησίας	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	34
2.Ανοσοποιητικό σύστημα: Γενικά χαρακτηριστικά και βασικές Έννοιες	35
2.1 Δομή των αντισώματων	36
2.2 Μονοκλωνικά και Πολυκλωνικά Αντισώματα	40
2.3 Χαρακτηριστικά ενός “καλού” αντισώματος	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	43
3.Καθαρισμός των αντισωμάτων	44
3.1 Καθαρισμός με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων	44
3.1.1 Χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη	45
3.1.2 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.....	45
3.1.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	46
3.1.4 Χρωματογραφία Συγγένειας.....	47
3.2 Καθαρισμός αντισωμάτων με κατακρήμνιση.....	50
3.3 Καθαρισμός αντισωμάτων με διαπίδυση.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	52
4.1 Επισήμανση των αντισωμάτων	53
4.2 Είδη Φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται	54



4.3 Ανοσοενζυμική Μέθοδος-ELISA.....	56
4.3.1 Άμεση ELISA	57
4.3.2 Έμμεση ELISA	57
4.3.3 ELISA τύπου Sandwich	58
4.3.4 Συναγωνιστική ELISA.....	60
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	63
Εισαγωγή	64
5.1. Διαδικασία ανοσοποιήσεων κουνελιών.....	65
5.2 Δοκιμασία ELISA.....	66
5.3 Καθαρισμός Αντισωμάτων	69
5.4 Επισήμανση των αντισωμάτων	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο.....	74
6.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	75
6.1 Δοκιμασίες ELISA	76
6.1.1 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης όλων των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnl-(19-31)]4-OH.	76
6.1.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα αντισώματα έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnl-(19- 31)]4-OH.	77
6.1.3 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων της 2 ^{ης} καθαρισμένης με χρωματογραφία συγγένειας αιμοληψίας έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnl-(19- 31)]4-OH..	78
6.2 Καθαρισμός με τη μέθοδο της διαπίδυσης των αντισωμάτων που παρήχθησαν από τις όρνιθες με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG).	79
6.2.1 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων που παρήχθησαν από τις όρνιθες με PEG και καθαρίστηκαν με διαπίδυση	81
6.2.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα από τις όρνιθες με το αντιδραστήριο της απολιπίδωσης αντισώματα.....	82
6.2.3 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα από τις όρνιθες (με το PEG) αντισώματα.....	83
6.2.4 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της τροπονίνης από ορούς ασθενών με μυοκαρδιακή βλάβη από το πεπτίδιο FYSHSHENWPS και ακόλουθη αναγνώριση αυτής από τα παραγόμενα αντισώματα	84
6.3. Επισήμανση των αντισωμάτων	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88



Κεφάλαιο 1

Ανατομία της καρδιάς - Καρδιαγγειακά Νοσήματα - Τροπονίνες



1.1 Ανατομία της καρδιάς - Βασικά Στοιχεία

Η καρδιά, το μέγεθος της οποίας είναι λίγο μεγαλύτερο από μιας γροθιάς, είναι μια διπλή αυτόνομη μυώδης αντλία, τα επιμέρους τμήματα της οποίας συνεργάζονται αρμονικά υπό φυσιολογικές συνθήκες. Προωθεί το αίμα μέσω των μεγάλων αγγείων προς τα διάφορα μέρη του σώματος. Η δεξιά μούρα της καρδιάς λαμβάνει φλεβικό αίμα από το σώμα και το προωθεί ως αντλία μέσα στους πνεύμονες, ενώ η αριστερή λαμβάνει οξυγονωμένο αίμα από τους πνεύμονες και το στέλνει στη αορτή για να διανεμηθεί σε όλο το σώμα. Έχει τέσσερις κοιλότητες.

Αποτελείται εκατέρωθεν από τον κόλπο που παραλαμβάνει το αίμα και το προωθεί στην κοιλία, που εξωθεί το αίμα. Το τοίχωμα της καρδιάς αποτελείται κυρίως από το μυοκάρδιο, το οποίο εσωτερικά επαλείφεται από το ενδοκάρδιο και εξωτερικά περιβάλλεται από το επικάρδιο. Το μυοκάρδιο αποτελεί την κυρίως μάζα της καρδιάς. Είναι τοποθετημένη λοξά στο μέσο μεσοθωράκιο και διαθέτει βάση (οπίσθια επιφάνεια), κορυφή (κάτω δεξιό άκρο), τρεις επιφάνειες (στερνοπλευρική, διαφραγματική και πνευμονική) και τέσσερα χείλη (δεξιό, κάτω αριστερό και άνω) (Moore K et al. 1991). Χωρίζεται σε δεξιό και αριστερό ημιμόριο, εκ των οποίων το καθένα αποτελείται από έναν κόλπο και μία κοιλία.



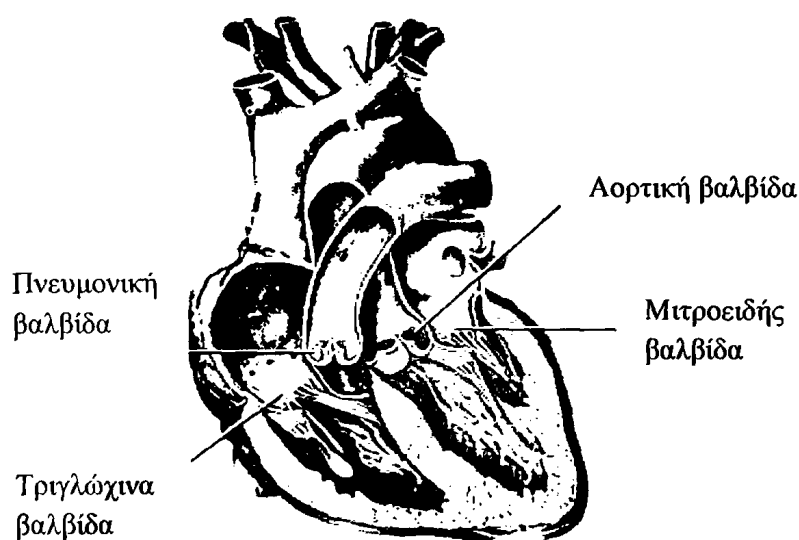
Εικόνα 1.1: Η θέση της καρδιάς στο ανθρώπινο σώμα
(Πηγή: <http://scienceillustrated.com.au/blog/medicine/fixing-hearts-with-skin-cells/>)

Μεταξύ του κόλπου και της κοιλίας σε κάθε ημιμόριο της καρδιάς βρίσκονται οι κολποκοιλιακές (AV) βαλβίδες οι οποίες επιτρέπουν τη ροή αίματος από τον κόλπο προς την κοιλία αλλά όχι από την κοιλία προς τον κόλπο. Η δεξιά βαλβίδα



ονομάζεται τριγλώχινα και η αριστερή μιτροειδής. Το άνοιγμα και το κλείσιμο αυτών των βαλβίδων είναι μια παθητική διαδικασία, η οποία προκύπτει από τις διαφορές πίεσης στις δύο πλευρές των βαλβίδων. Για να προλαμβάνεται το σπρώξιμο των AV βαλβίδων προς τα πάνω, αυτές είναι στερεωμένες σε μυϊκές προσεκβολές (θηλοειδείς μύες) των κοιλιακών τοιχωμάτων με ινώδη νήματα (τενόντιες χορδές).

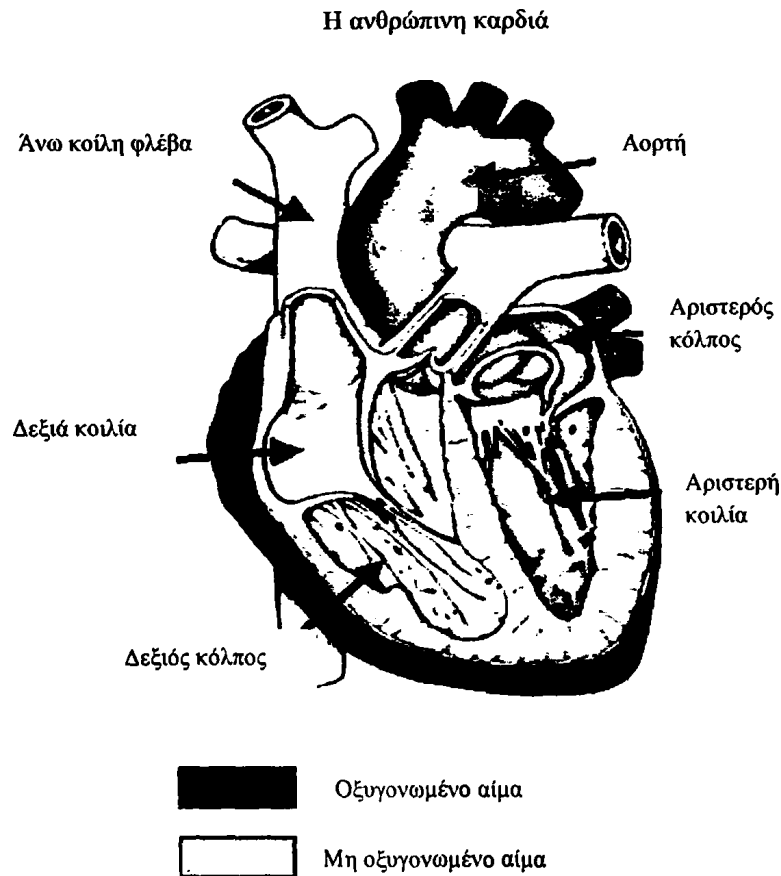
Οι θηλοειδείς μύες δεν ανοίγουν ή κλείνουν τις βαλβίδες ο ρόλος τους είναι μόνο να περιορίζουν τις κινήσεις των βαλβίδων και να εμποδίζουν την αναστροφή τους. Το άνοιγμα της δεξιάς κοιλίας προς το στέλεχος της πνευμονικής αρτηρίας και της αριστερής κοιλίας προς την αορτή ρυθμίζεται επίσης από βαλβίδες, τις πνευμονικές και αορτικές βαλβίδες αντίστοιχα. Αυτές οι βαλβίδες επιτρέπουν στο αίμα να ρέει μέσα στις αρτηρίες κατά την κοιλιακή συστολή, αλλά εμποδίζουν το αίμα να κινείται στην αντίθετη κατεύθυνση κατά την κοιλιακή χέλαση. Όπως και οι AV βαλβίδες λειτουργούν κατά έναν εντελώς παθητικό τρόπο και το αν είναι ανοιχτές ή κλειστές εξαρτάται από τη διαφορά πίεσης ανάμεσα στις δύο πλευρές τους.



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση της εντόπισης των κολποκοιλακών βαλβίδων (Πηγή: <http://bme240.eng.uci.edu/students/07s/vnguyenhoai/>)

Ένα αξιοσημείωτο γεγονός που σχετίζεται με τη λειτουργία των κολποκοιλακών βαλβίδων είναι ότι αυτές προβάλλουν μικρή αντίσταση στη ροή του αίματος. Δεν υπάρχουν βαλβίδες στα σημεία εισόδου της άνω και κάτω κοίλης φλέβας μέσα στο δεξιό κόλπο και των πνευμονικών φλεβών μέσα στον αριστερό κόλπο (Vander MD et

al. 2000). Έτσι βλέπουμε ότι η δεξιά καρδιά προωθεί το αίμα δια μέσου της πνευμονικής αρτηρίας στα πνευμονικά τριχοειδή (μικρή ή πνευμονική κυκλοφορία) και η αριστερή καρδιά προωθεί το αίμα δια μέσου της αορτής και των κλάδων της προς όλα τα όργανα του σώματος, (μεγάλη ή συστηματική κυκλοφορία) (Στεφανιάδης Χ. 2005).



Εικόνα 1.3: Η ανατομία της καρδιάς (Πηγή: <http://www.drugdevelopment-technology.com>)

1.1.1 Αιμάτωση της Καρδιάς

Η καρδιά αρδεύεται από την αριστερή και τη δεξιά στεφανιαία αρτηρία που είναι κλάδοι της ανιούσας αορτής. Πορεύονται μέσα στη στεφανιαία αύλακα και κατά την πορεία τους χορηγούν τροφικούς κλάδους για την αιμάτωση των κόλπων και των κοιλιών. Ονομάζονται “στεφανιαίες”, διότι περιβάλλουν σαν στεφάνι τη βάση των κοιλιών. Οι στεφανιαίες αρτηρίες αναδύονται από το δεξιό και αριστερό μηννοειδή κόλπο αντίστοιχα που βρίσκονται κοντά στην έκφυση της ανιούσας αορτής. Τα όρια κατανομής κάθε μίας από τις στεφανιαίες αρτηρίες είναι ασαφή. Μετά την έκφυσή

τους από την ανιούσα αορτή, φέρονται προς τα εμπρός εκατέρωθεν της έκφυσης της πνευμονικής αρτηρίας.

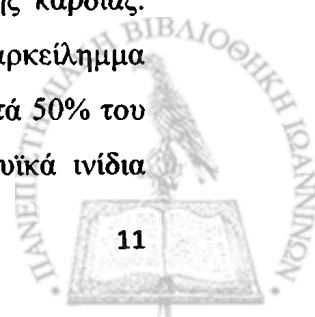
Η λειτουργική αποστολή του τρόπου έκφυσης των δύο στεφανιαίων αρτηριών είναι η αιμάτωση της ανιούσας αορτής, καθώς και οι δύο χορηγούν αγγεία αγγείων (*vasa vasorum*). Πιο συγκεκριμένα η δεξιά στεφανιαία αρτηρία και κατά σύμβαση η επικρατούσα αιματώνει το δεξιό κόλπο, τη δεξιά κοιλία και το μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Επίσης αρδεύει άλλοτε τμήμα του αριστερού κόλπου και της αριστερής κοιλίας (Moore K et al. 1991). Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία αιματώνει το μεγαλύτερο μέρος της αριστερής κοιλίας και του κόλπου και του μεσοκοιλιακού διαφράγματος.

1.1.2 Λειτουργία του καρδιακού μυός

Η καρδιά αποτελείται από δύο τύπους μυοκαρδιακών ινών: από τις ίνες του λειτουργικού (εργατικού) μυοκαρδίου, τις ερεθισματοαγωγές ίνες και από τα μη μυϊκά κύτταρα, (κύτταρα του συνδετικού ιστού, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα). Τα καρδιακά μυοκύτταρα αν και είναι ευμεγέθη και αναλογούν στο 70-75% του όγκου του μυοκαρδίου αποτελούν μόνο το 25-30% του αριθμού των κυττάρων του μυοκαρδίου που στο υπόλοιπο και μεγάλο ποσοστό (70%) απαρτίζεται από μη μυοκαρδιακά κύτταρα. Οι κολπικές και κοιλιακές μυϊκές ίνες συσπώνται με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των γραμμωτών μυϊκών ινών, με πολύ μεγαλύτερη όμως διάρκεια σύσπασης (Στεφανάδης Χ. 2005). Οι ερεθισματοαγωγές ίνες συσπώνται πολύ ασθενώς αλλά εμφανίζουν ρυθμικότητα και ποικίλου βαθμού ταχύτητα αγωγής ελέγχοντας έτσι τη ρυθμική διέγερση των διαφόρων τμημάτων του μυοκαρδίου.

1.1.3 Μικροσκοπική Δομή του καρδιακού μυός

Τα μυοκαρδιακά κύτταρα βρίσκονται σε ένα στρώμα εξωκυττάριας ουσίας που έχει σαν κύριο συστατικό της το κολλαγόνο, τη βασική δομική πρωτεΐνη της καρδιάς. Περιβάλλονται από μία σύμπλοκη κυτταρική μεμβράνη που ονομάζεται σαρκείλημα ενώ το κυτταρόπλασμά τους ονομάζεται σαρκόπλασμα. Αποτελούνται κατά 50% του όγκου τους από μυϊκά ινίδια και κατά 25-30% από μιτοχόνδρια. Τα μυϊκά ινίδια



αποτελούν ραβδόμορφους σχηματισμούς εντός του κυτταροπλάσματος που περιέχουν τις συσταλτές πρωτεΐνες του κυττάρου, με τις οποίες επιτελούνται οι κύκλοι σύσπασης – χάλασης του μυοκαρδίου. Η διάταξη των μυονηματίων σε μία κανονική σειρά από παχιά και λεπτά νημάτια (μυοσΐνης και ακτΐνης αντίστοιχα) ευθύνεται για τη γραμμωτή εμφάνιση των μυοκυττάρων στο μικροσκόπιο. Οι επαναλαμβανόμενες μονάδες κατά μήκος της μυϊκής ίνας ονομάζονται σαρκομερίδια και χωρίζονται μεταξύ τους με τις γραμμές Z (Στεφανάδης Χ. 2005).

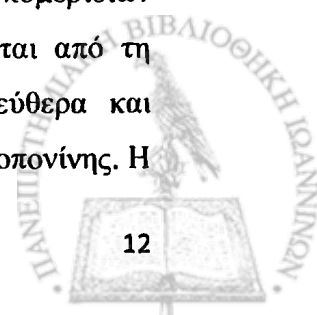
Το σαρκεΐλημα εγκολλώνεται και σχηματίζει ένα εκτενές δίκτυο σωληναρίων, τους εγκάρσιους ή T σωληνίσκους, που εκτείνουν τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου και που βρίσκονται σε γεινίαση με τμήματα του σαρκοπλασματικού δικτύου που έχει σαν βασική λειτουργία τη διαχείριση και αποθήκευση του ασβεστίου. Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των μυϊκών ινιδίων και είναι τα οργανίδια που λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή (ATP) προς ικανοποίηση των υψηλών ενεργειακών αναγκών του καρδιακού μυός.

Τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα διαφέρουν από τα κύτταρα του γραμμωτού μυός σε τρία βασικά σημεία: α) φέρουν συνήθως έναν πυρήνα στο κέντρο του κυττάρου γύρω από τον οποίο δεν παρατηρούνται μυϊκά ινίδια ενώ οι γραμμωτοί μύες έχουν πολλαπλούς πυρήνες β) διακλαδίζονται αντίθετα με τα ατρακτοειδή γραμμωτά μυοκύτταρα και γ) συνδέονται μεταξύ τους με ειδικές συνδέσεις που ονομάζονται εμβόλιμοι δίσκοι ενώ τα γραμμωτά μυοκύτταρα είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και περιβάλλονται από άφθονο συνδετικό ιστό.

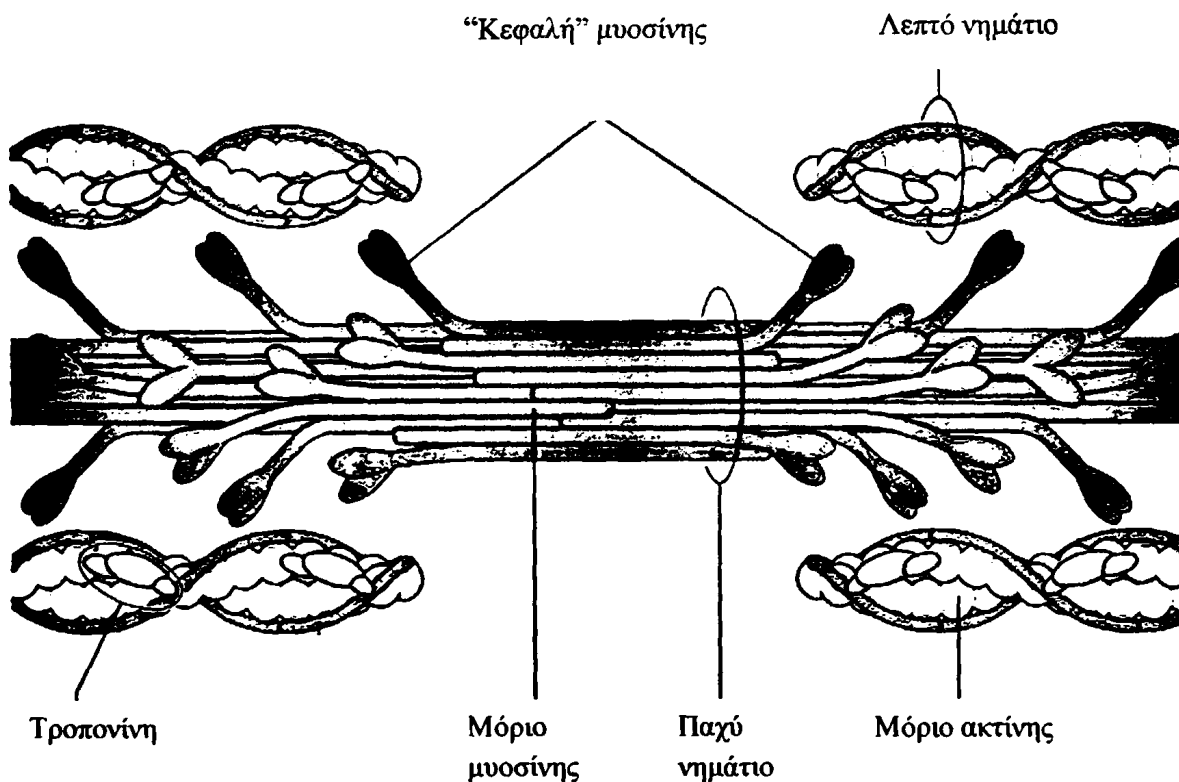
Η χαμηλή ηλεκτρική αντίσταση κατά μήκος των εμβόλιμων δίσκων επιτρέπει στα δυναμικά ενέργειας να μεταδίδονται εύκολα μέσω αυτών από κύτταρο σε κύτταρο με συνέπεια να μπορεί να θεωρηθεί το μυοκάρδιο ως λειτουργικό συγκύτιο κόλπων.

1.1.4 Οι συσταλτές πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν τα παχιά και τα λεπτά νημάτια των σαρκομεριδίων ονομάζονται συνολικά πρωτεΐνες σύσπασης. Τα λεπτά νημάτια φέρονται από τη γραμμή Z προς το κέντρο του σαρκομερίου όπου καταλήγουν ελεύθερα και αποτελούνται κυρίως από ακτΐνη, τροπομυοσΐνη και το σύμπλεγμα της τροπονΐνης. Η



τροπομυοσίνη είναι μία λεπτή νηματοειδής ρυθμιστική πρωτεΐνη που όταν είναι συνδεδεμένη με την ακτίνη (σε κατάσταση ηρεμίας) εμποδίζει το δεσμό της ακτίνης με τη μυοσίνη. Η τροπονίνη αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την τροπονίνη C, που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του μυοκυττάρου και προάγει τις χωροταξικές μεταβολές των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση-γεφύρωση της ακτίνης με τις κεφαλές της μυοσίνης, την τροπονίνη T που δεσμεύει την τροπομυοσίνη στην τροπονίνη C και την τροπονίνη I που εμποδίζει την αλληλεπίδραση της ακτίνης με τη μυοσίνη σε συνθήκες ηρεμίας.



Εικόνα 1.4: Πρωτεΐνες σύσπασης, απεικόνιση παχίων και λεπτών νηματιών (Πηγή: <https://www.studyblue.com>)

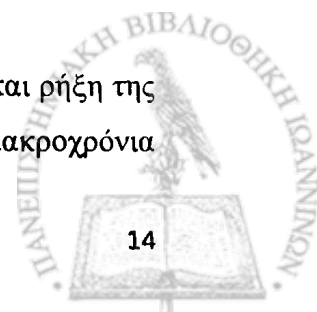
Τα παχιά νημάτια φέρονται από το κέντρο του σαρκομέριου προς τη γραμμή Z και αποτελούνται από ένα είδος πρωτεΐνης που ονομάζεται μυοσίνη. Κάθε μόριο μυοσίνης συντίθεται από δύο βαριές αλυσίδες και από δύο ζεύγη ελαφρών αλυσίδων. Η τιτίνη είναι ένα γιγάντιο πρωτεϊνικό μόριο που προσδένει το μόριο της μυοσίνης στη γραμμή Z προσφέροντας σταθερότητα στις συσταλτές πρωτεΐνες ενώ συμβάλλει

στην ελαστικότητα του καρδιακού μυός σε συγκεκριμένο έργο βράχυνσης-χάλασης. Διαταραχές των συσταλών πρωτεϊνών έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες μυοκαρδιοπάθειες.

1.2 Καρδιαγγειακά Νοσήματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, τα οποία προσβάλλουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία και περιλαμβάνουν:

- **Στεφανιαία νόσος:** Προκαλείται από στένωση των αιμοφόρων αγγείων (στεφανιαίων) που αιματώνουν τον καρδιακό μυ, κυρίως εξαιτίας εναπόθεσης λίπους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών.
- **Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο:** Πρόκειται για τη διαταραχή της εγκεφαλικής αιματικής κυκλοφορίας. Μπορεί να προκληθεί είτε από διακοπή της αιματικής ροής του εγκεφάλου (ισχαιμικό επεισόδιο), είτε από ρήξη των εγκεφαλικών αγγείων (αιμορραγικό επεισόδιο). Παράγοντες κινδύνου είναι η υψηλή αρτηριακή πίεση, η κολπική μαρμαρυγή, η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, ο διαβήτης, η διατροφή, η φυσική δραστηριότητα και η προχωρημένη ηλικία (National Diabetes Information Clearinghouse, 2005).
- **Ρευματική καρδιοπάθεια:** Πρόκειται για την καταστροφή του καρδιακού μυ και των βαλβίδων της καρδιάς, η οποία προκαλείται από άνοση αντίδραση προς τη λοίμωξη από β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο της ομάδας A, η οποία δεν αντιμετωπίστηκε θεραπευτικά (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).
- **Συγγενής Καρδιοπάθεια:** Πρόκειται για ανωμαλίες των καρδιαγγειακών δομών π.χ. μεσοκοιλιακά ή μεσοκολπικά ελλείμματα, ανωμαλίες των βαλβίδων, ανωμαλίες των καρδιακών κοιλοτήτων, οι οποίες υπάρχουν από τη γέννηση. Οφείλονται είτε σε γενετικούς παράγοντες για παράδειγμα, σύνδρομο Down, είτε σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα χρήση αλκοόλ, φαρμάκων (θαλιδομίδη, βαρφαρίνη) από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ενδομήτριες λοιμώξεις (ερυθρά), κακή θρέψη της εγκύου (χαμηλή πρόσληψη φυλλικού οξέως), συγγενική σχέση εξ' αίματος μεταξύ των γονέων (Chun JL et al. 2006).
- **Ανευρύσματα και διαχωρισμός αορτής:** Πρόκειται για διάταση και ρήξη της αορτής. Παράγοντες κινδύνου είναι: η προχωρημένη ηλικία, μακροχρόνια



υψηλή αρτηριακή πίεση, σύνδρομο Marfan, συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς, σύφιλη και άλλοι λοιμώδεις και φλεγμονώδεις παράγοντες (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

- **Εν τω Βάθει Φλεβοθρόμβωση και πνευμονική εμβολή:** Πρόκειται για απόφραξη του φλεβικού δικτύου των κάτω άκρων με θρόμβους, οι οποίοι μπορεί να αποσπαστούν και μέσω της κυκλοφορίας να καταλήξουν στον πνεύμονα. Παράγοντες κινδύνου είναι οι χειρουργικές επεμβάσεις, παχυσαρκία, κακοήθειες, κύηση, λήψη αντισυλληπτικών και θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης, μακροχρόνια περίοδος ακινησίας π.χ. ταξίδια, ομοκυστιναιμία (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).
- **Περιφερική αρτηριοπάθεια:** Πρόκειται για νόσο των περιφερικών αγγείων που αρδεύουν τα άνω και κάτω άκρα.
- **Άλλα Καρδιαγγειακά νοσήματα:** Αρτηριακή υπέρταση, όγκοι καρδιάς, εγκεφαλικά ανευρύσματα, δυσλειτουργία του καρδιακού μυ όπως για παράδειγμα η καρδιομυοπάθεια και οι βαλβιδοπάθειες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συχνότερες μορφές καρδιαγγειακής νόσου είναι η στεφανιαία νόσος και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Στεφανιαία Νόσος

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί μία από τις τρεις συχνότερες αιτίες θανάτου στις σύγχρονες δυτικές κοινωνίες. Ένας στους έξι άντρες και μία στις επτά γυναίκες στην Ευρώπη πεθαίνουν από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ποσοστό 17% των θανάτων ανδρών, ηλικίας μικρότερης των 65 ετών και 12% των θανάτων γυναικών αντίστοιχα οφείλονται σε στεφανιαία νόσο. Το συχνότερο αίτιο στεφανιαίας νόσου είναι η αθηροσκλήρυνση (αθηρωμάτωση), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αθηρωματικών πλακών στο τοίχωμα των στεφανιαίων αρτηριών, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν στένωση ή και απόφραξη του αυλού της αρτηρίας και συνεπώς ισχαιμία ή και νέκρωση του μυοκαρδίου (Steg J et al. 2012).

Για κλινικούς, θεραπευτικούς και προγνωστικούς λόγους η στεφανιαία νόσος ταξινομείται στα **οξέα στεφανιαία ή ισχαιμικά σύνδρομα** και στη **χρόνια στεφανιαία νόσο**. Το φάσμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων περιλαμβάνει την ασταθή στηθάγχη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανύψωση του τμήματος ST (NSTEMI- non-ST elevation myocardial infraction), το οξύ έμφραγμα του

μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST (STEMI- ST elevation myocardial infraction) και τον αιφνίδιο θάνατο (SCD). Οι ασθενείς με χρόνια στεφανιαία νόσο είτε παρουσιάζουν συμπτώματα που σχετίζονται με τη νόσο (στηθάγχη προσπαθείας ή σταθερή στηθάγχη) είτε είναι ασυμπτωματικοί.

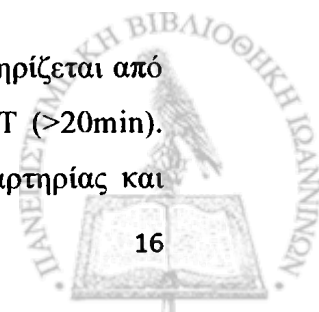
Έμφραγμα του Μυοκαρδίου

Ως έμφραγμα του μυοκαρδίου ορίζεται η μη αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη λόγω παρατεταμένης ισχαιμίας που οδηγεί σε νέκρωση του καρδιακού μυός (Law MR et al. 2002). Αποτελεί μία κλινική οντότητα με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το 50% των ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου καταλήγουν πριν φθάσουν στο νοσοκομείο. Μία πρόσφατη μεγάλη μελέτη σχετικά με την ανάσπαση ή μη του ST διαστήματος για ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου έδωσε ποσοστά θνησιμότητας ενδονοσοκομειακά, 4,5% και 1,9% αντίστοιχα (Hanssen M et al. 2012). Με την έλευση των καρδιακών βιοδεικτών και κυρίως της Τροπονίνης, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην αύξηση των επιπέδων της Τροπονίνης στον ορό ασθενών για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Thygesen K et al. 2010). Η παραδοχή του πρώτου καθολικού ορισμού για το έμφραγμα του μυοκαρδίου (δημοσιεύθηκε το 2000) και διατυπωνόταν ως εξής: τα αυξημένα επίπεδα Τροπονινών στον ορό επιβεβαίωναν τη μυοκαρδιακή νέκρωση και συνεπώς το έμφραγμα του μυοκαρδίου (Eur Heart J 2000). Οι οδηγίες αυτές επικαιροποιήθηκαν το 2007 (Thygesen K et al. 2007) για να προτείνουν τη χρήση δοκιμασιών Τροπονίνης με υψηλή ευαισθησία (Thygesen K et al. 2012). Ο τρίτος παγκόσμιος ορισμός του μυοκαρδιακού εμφράγματος περιλαμβάνει μία πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση στη διάγνωση και αναγνωρίζει την αύξηση στα επίπεδα της Τροπονίνης εν τη απουσία εμφράγματος του μυοκαρδίου.

▪ Οξεία στεφανιαία σύνδρομο με βάση τις ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις

Με βάση τα ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα οι ασθενείς με προκάρδιο άλγος διακρίνονται σε δύο κατηγορίες κλινικών συνδρόμων:

- 1. Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο με ανάσπαση τμήματος ST**, χαρακτηρίζεται από τυπικό προκάρδιο άλγος και εμμένουσα ανάσπαση τμήματος ST (>20min). Αντικατοπτρίζει πλήρη απόφραξη του αυλού της στεφανιαίας αρτηρίας και



σχεδόν πάντοτε εξελίσσεται σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος και απαιτεί πλήρη και άμεση επαναιμάτωση με πρωτογενή αγγειοπλαστική ή με θρομβολυτική θεραπεία.

- 2. Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανάσπαση τμήματος ST, χαρακτηρίζεται** από οξύ προκάρδιο άλγος χωρίς εμμένουσα ανάσπαση τμήματος ST. Εδώ τα ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα αποτελούν η παροδική ή εμμένουσα κατάσπαση του ST διαστήματος, η αναστροφή, η επιπέδωση, η ψευδοφυσιολογικοποίηση του επάρματος ST ή η απουσία παθολογικών ευρημάτων από το ηλεκτροκαρδιογράφημα. Με βάση τα επίπεδα των μυοκαρδιακών ενζύμων και κυρίως των τροπονινών (T & I) στο περιφερικό αίμα τα στεφανιαία αυτά σύνδρομα χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος αποτελούν σήμερα το 80% του συνόλου των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Το ποσοστό αυτό σταδιακά αυξάνει ενώ υποχωρεί το αντίστοιχο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων με ανάσπαση του ST (Στεφανιάδης Χ. 2005).

Παράγοντες κινδύνου

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την εκδήλωση του εμφράγματος. Είναι μία πάθηση των αρτηριών που χαρακτηρίζεται από πάχυνση του τοιχώματος του αιμοφόρου αγγείου που βρίσκεται πιο κοντά στον αυλό με: 1) μεγάλο αριθμό παθολογικών λείων μυϊκών κυττάρων, μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, 2) εναπόθεση χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών τόσο μέσα στα κύτταρα αυτά όσο και στον εξωκυττάριο χώρο και 3) πυκνά στρώματα συνδετικού ιστού στη θεμέλια ουσία των κυττάρων (Vander MD et al. 2001). Στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης εμπλέκονται πολλαπλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και το μικροπεριβάλλον των κυττάρων στις περιοχές της βλάβης. Οι παράγοντες κινδύνου που ευθύνονται για την εκδήλωση αυτής της χρονοβόρας διαδικασίας είναι είτε τροποποιήσιμοι είτε μη τροποποιήσιμοι.

Αναλυτικότερα, στους τροποποιήσιμους παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η συστηματική αρτηριακή υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία-δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η διατροφή, το κάπνισμα, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλ, η καθιστική ζωή και η παχυσαρκία. Όσον αφορά την υπερχοληστερολαιμία αξιόπιστος δείκτης για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου αποτελεί ο λόγος LDL (*Low Density Lipoprotein*) / HDL (*High Density Lipoprotein*). Όταν ο λόγος αυτός είναι

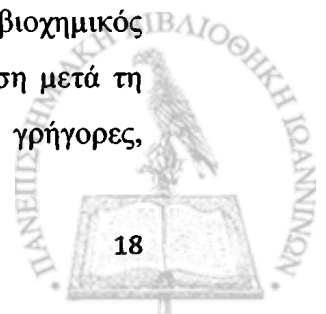
πάνω από 5 θεωρείται ότι το άτομο έχει αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου, ενώ όταν ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 2, θεωρείται ότι ο κίνδυνος είναι μικρός. Αυτό συμβαίνει διότι η LDL αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου ενώ η HDL ασκεί προστατευτική δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων (Μπούντουλας Χ. 1985). Είναι επομένως επιθυμητό να διατηρείται το κλάσμα της LDL σε χαμηλά επίπεδα και της HDL σε υψηλά επίπεδα.

Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται η ηλικία, το ανδρικό φύλο και το οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου. Δεδομένου ότι οι παράγοντες κινδύνου μπορεί να έχουν πολλαπλασιαστικά αποτελέσματα απαιτείται εξατομικευμένη προσέγγιση και εφαρμογή διαφορετικών μοντέλων για τη συνολική εκτίμηση του κινδύνου ενός ατόμου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών κυρίως λόγω των ποικίλων παραγόντων κινδύνου που προκαλούν αθηροσκλήρωση.

1.3 Βιοχημικοί δείκτες στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα

Από το 1956 που καταγράφηκε η πρώτη μέτρηση της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης στο αίμα ασθενών για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου μέχρι και σήμερα οι καρδιακοί βιοδείκτες παραμένουν απαραίτητο στοιχείο των διαγνωστικών κριτηρίων του μυοκαρδιακού εμφράγματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (Circulation 1979). Ως βιοδείκτης ορίζεται ένα χαρακτηριστικό που μετράται αντικειμενικά και αποτελεί δείκτη μιας φυσιολογικής βιολογικής διαδικασίας, μιας παθολογικής βιολογικής διεργασίας ή της φαρμακολογικής απάντησης μιας φαρμακευτικής παρέμβασης (Biomarkers Definition Working Group, NIH 1998). Η χρήση των βιοδεικτών τα τελευταία 40 χρόνια, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην πρώιμη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Η ειδικότητα, η ευαισθησία, η κινητική της απελευθέρωσης (Christenson RH et al. 2006) που αποτελούν και τα βασικά χαρακτηριστικά τους σε συνδυασμό με την κλινική χρησιμότητα τους συνεχίζουν να αυξάνονται. Ένας ιδανικός βιοχημικός δείκτης διαθέτει: καρδιακή ειδικότητα, πρώιμη και σταθερή απελευθέρωση μετά τη νέκρωση, προβλέψιμη κάθαρση και ποσοτική μέτρηση με μεθόδους γρήγορες,



οικονομικές και αποδοτικές που θα μπορούν να εφαρμοστούν στην πλειοψηφία των βιοχημικών εργαστηρίων (Saenger A et al. 2010).

Για την ανίχνευση των βιοχημικών δεικτών λαμβάνεται φλεβικό αίμα από ασθενείς που πάσχουν από προκάρδιο άλγος και για τους οποίους υπάρχει υποψία για συμπτώματα οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (Mortow DA et al. 2006). Ο βιοχημικός δείκτης που μας ενδιαφέρει θεωρείται πως απελευθερώνεται από τον καρδιακό μυϊκό ιστό που βρίσκεται κάτω από ισχαιμικό stress και για αυτό μπορεί να ανιχνευθεί στο δείγμα του αίματος (Yadom MY et al. 2011). Αύξηση στην τιμή ενός βιοδείκτη μπορεί να οδηγήσει σε πιο έγκαιρη διάγνωση, θεραπεία και καλύτερη έκβαση του ασθενούς (Mortow DA et al. 2006).

Εδραιωμένοι Βιοδείκτες

▪ Μυογλοβίνη

Η μυογλοβίνη είναι μία πρωτεΐνη της αίμης. Εντοπίζεται σχεδόν σε όλα τα μυϊκά κύτταρα αλλά η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη στον καρδιακό μυϊκό ιστό και στους σκελετικούς μύες (Rajappa M et al. 2005). Η ισχύς της είναι υψηλή και η ευαισθησία της είναι μεγάλη στο χρονικό διάστημα που ακολουθεί το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Εκεί που υστερεί, είναι στη χαμηλή ειδικότητα που οφείλεται στην παρουσία της μυογλοβίνης και στους σκελετικούς μύες. Ωστόσο η μυογλοβίνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το ηλεκτροκαρδιογράφημα και την κλινική εκτίμηση του ασθενούς.

▪ Γαλακτική αφυδρογονάση

Η γαλακτική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στον αναερόβιο μεταβολισμό και μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ (Wu AH et al. 2003). Απαντάται σχεδόν σε όλους τους ιστούς αλλά μία ισομορφή της η LD1 βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο μυοκάρδιο. Η LD1 αυξάνεται μετεμφραγματικά και όταν ο λόγος LD1/LD2 είναι μεγαλύτερος από 1.0 τότε η κατάσταση αυτή θεωρείται διαγνωστική για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η αύξηση της LD1 και η αλλαγή στο λόγο LD1/ LD2 ανιχνεύονται 8-12 ώρες μετά το έμφραγμα και φθάνουν στο μέγιστο 24-72 ώρες μετά (Leung FC et al. 1979).

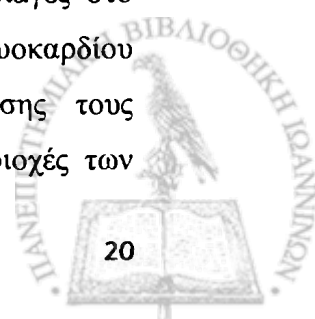
▪ **Κρεατινική κινάση (CK-MB)**

Η κρεατινική κινάση είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στη μυϊκή σύσπαση και για αυτόν το λόγο εντοπίζεται κυρίως στο μυϊκό ιστό. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, τη Μ και τη Β οι οποίες συνδυάζονται για να σχηματίσουν τις τρεις ισομορφές της: CK-BB, CK-MB & CK-MM. Η CK-MB είναι εξειδικευμένη για το μυοκάρδιο, η CK-MM για τους μύες και η CK-BB εντοπίζεται στον εγκέφαλο. Επιπλέον η CK-MB απελευθερώνεται κατά το θάνατο μυοκαρδιακών κυττάρων και όχι κατά την έναρξη της ισχαιμίας (Ishikawa Y et al. 1997). Οι μελέτες κινητικής έχουν δείξει ότι ανιχνεύεται στο αίμα 4-8 ώρες μετά την έναρξη του πόνου στο στήθος και φθάνει στο μέγιστο 24-28 ώρες μετά το έμφραγμα.

Πιο συγκεκριμένα υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό 10-30% της CK-MB που αφορά τη συνολική δραστηριότητα της CK εκφράζεται στην καρδιά. Στο μυοκάρδιο υγιών ατόμων το ποσοστό αυτό είναι <2%, ενώ σε ασθενείς με χρόνια στεφανιαία νόσο το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε >20%. Επιπρόσθετα το ποσοστό της CK-MB μπορεί να αυξηθεί από τη δημιουργία συμπλόκων με άλλα μόρια, από τραυματισμούς, από ραβδομύλυση και σε περίπτωση μυοπάθειας ή νεφρικής ανεπάρκειας. Έτσι η ανοσοχημική τεχνική ανίχνευσης της στερείται ειδικότητας και έχει μικρή προγνωστική αξία σε οξεία εμφράγματα του μυοκαρδίου.

▪ **Τροπονίνη**

Το 2000, η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Καρδιολογίας και το Αμερικάνικο Κολλέγιο Καρδιολογίας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, απαιτούνται βιοχημικές ενδείξεις της νέκρωσης και υπέδειξαν τις καρδιακές Τροπονίνες I και T ως δείκτες επιλογής (Pirioni SG et al. 2002) λόγω της ανώτερης κλινικής ευαισθησίας τους και της ειδικότητας τους για τον ιστό του μυοκαρδίου (Eur Heart 2000). Το 2012 οι οδηγίες αυτές επικαιροποιήθηκαν και σύμφωνα με αυτές, η διάγνωση για το έμφραγμα του μυοκαρδίου τίθεται όταν παρατηρείται πτώση ή και άνοδος των καρδιακών βιοδεικτών (κατά προτίμηση των τροπονινών) τουλάχιστον μίας μονάδας πάνω από το 99^ο εκατοστημόριο του ανώτερου ορίου αναφοράς (URL). Η αλλαγή αυτή στις τιμές των τροπονινών αφορά ασθενείς με ενδείξεις ισχαιμίας του μυοκαρδίου, όπως συμπτώματα, αλλαγές στο ηλεκτροκαρδιογράφημα και απεικονιστικές ενδείξεις απώλειας ζωτικού μυοκαρδίου (Thygesen K et al. 2012). Οι ανοσοχημικές διαδικασίες ανίχνευσης τους χρησιμοποιούν ειδικά αντισώματα που στοχεύουν σε συγκεκριμένες περιοχές των



Τροπονινών T & I, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική μέτρηση της απελευθέρωσης τους από το μυοκάρδιο στο αίμα.

Σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου η αύξηση των τιμών της τροπονίνης ξεκινά 4 ώρες περίπου μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Οι τιμές μπορεί να παραμείνουν αυξημένες για 2 εβδομάδες εξαιτίας της πρωτεόλυσης που συμβαίνει στη συσταλτή συσκευή. Σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανάρταση του ST παρατηρείται μία μικρή αύξηση των τιμών 48-72 ώρες μετά το επεισόδιο.

Η μεγαλύτερη ευαισθησία της τροπονίνης σε σχέση με τη CK-MB, οφείλεται στο ότι η τροπονίνη απελευθερώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι η CK-MB στο αίμα μετά από ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο. Επιπλέον οι δοκιμασίες τροπονίνης εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα από αυτές της CK-MB καθώς η CK-MB δεν εκφράζεται αποκλειστικά στην καρδιά αλλά απαντάται στο γαστρεντερικό σωλήνα, στη μήτρα των εγκύων γυναικών και στους σκελετικούς μύες.

Τελευταία έχουν αναπτυχθεί νέες δοκιμασίες ανίχνευσης που είναι 10 φορές πιο ευαίσθητες από τις μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενες και προσδίδουν προγνωστική αξία σε μελλοντικά πιθανά εμφράγματα του μυοκαρδίου (Hochholzer W et al. 2010, Bonaca M et al. 2010). Επιπλέον η τροπονίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκαταστάτης δείκτης για το σχηματισμό ενεργού θρόμβου (Okamoto K et al. 2004).

Παρόλο που η Τροπονίνη αποτελεί το βιοδείκτη επιλογής, στερείται της ευαισθησίας που είναι απαραίτητη κατά τις πρώτες ώρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου (Morozov DA et al. 2007). Οι κλινικές οδηγίες προτείνουν τη χρήση του τεστ της τροπονίνης όχι μεμονωμένα αλλά σε συνδυασμό με το ηλεκτροκαρδιογράφημα (Karras DJ et al. 2001).

▪ Μυελουπεροξειδάση

Η μυελουπεροξειδάση (Apple FS et al. 2005) είναι προϊόν της αποκοκκίωσης των λευκών αιμοσφαιρίων. Αυξήσεις στην τιμή της έχουν παρατηρηθεί ακόμη και σε δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί από στεφανιαία αρτηρία χωρίς ένοχη βλάβη. Τα επίπεδά της στη συστηματική κυκλοφορία έχει αποδειχθεί πως βοηθούν στην πρόγνωση ασθενών που εμφανίζονται στα τμήματα επειγόντων περιστατικών με



προκάρδιο άλγος, αλλά οι συγκρίσεις έχουν γίνει είτε με υψηλό όριο τιμών για την τροπονίνη είτε με μία μοναδική τιμή τροπονίνης με την εμφάνιση του ασθενούς.

▪ **Παράγοντας διαφοροποίησης της αύξησης (GDF-15)**

Ένας από τους περισσότερο υποσχόμενους βιοδείκτες είναι ο παράγοντας διαφοροποίησης της αύξησης, μέλος της υπεροικογένειας των κυτοκινών που ονομάζονται μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες-β. Ο GDF-15 απελευθερώνεται από τα μυοκαρδιακά κύτταρα μετά από ισχαιμία και βλάβη από επαναιμάτωση. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα του GDF-15 φαίνεται ότι αποτελούν ισχυρό ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα θνητότητας στον ένα χρόνο, προσφέροντας επιπρόσθετες πληροφορίες πέραν από αυτές που λαμβάνουμε από τους κλασικούς βιοδείκτες. Κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα ως δείκτες αρτηριακής βλάβης, πρόσφατα μετρήθηκαν μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και φαίνεται ότι προβλέπουν ανεξάρτητα τόσο την άμεση όσο και τη μακροπρόθεσμη έκβαση των ασθενών (Mutin M et al. 1999).

▪ **Πρωτεΐνη Α σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη (PAPP-A)**

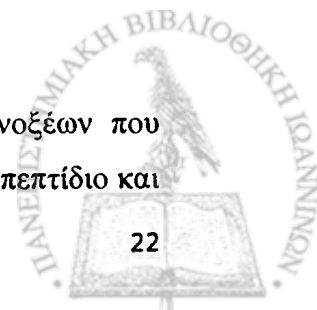
Η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων. Θεωρητικά απελευθερώνεται όταν υπάρχει νεοαγγείωση και έτσι μπορεί να είναι δείκτης ευάλωτης πλάκας. Δεν σχετίζεται με κανέναν από τους γνωστούς δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης. Σε κάποιες μελέτες φαίνεται ότι εντοπίζει τους ασθενείς που βρίσκονται σε κίνδυνο εμφάνισης συμβαμάτων. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ελεγχόμενη μέθοδος ανίχνευσής της.

▪ **C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)**

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης που παράγεται στο ήπαρ και η παραγωγή της επάγεται από την ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Δεδομένου ότι αποτελεί και δείκτη της φλεγμονής μπορεί να συμμετέχει στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Τα αυξημένα επίπεδά της είναι προγνωστικά καρδιακής ανεπάρκειας μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Έχει προταθεί η χρήση της σε ασθενείς ενδιάμεσου σταδίου για στεφανιαία νόσο, για να βοηθήσει στον καθορισμό του βαθμού της επιθετικής παρέμβασης στην κατεύθυνση της αντιμετώπισης των παραγόντων κινδύνου (Smith FC et al. 2004, Anderson L et al. 2005).

▪ **B-Νατριουρητικό πεπτίδιο (BNP)**

Το B-Νατριουρητικό πεπτίδιο είναι ένα ρυθμιστικό πεπτίδιο 32 αμινοξέων που απελευθερώνεται σε αυξημένη μυοκαρδιακή τάση. Συντίθεται ως ένα προπεπτίδιο και

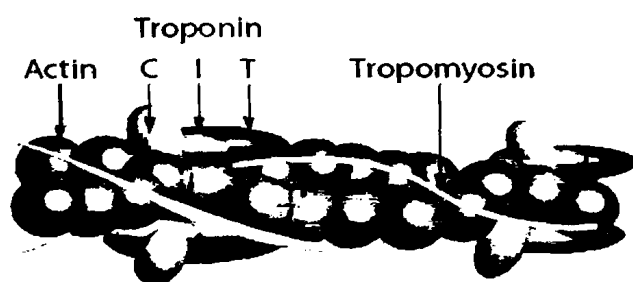


ακολουθως διασπάται στον ενεργό μεταβολίτη του από μία πρωτεάση (Clerio A et al. 2004, Apple FS et al. 2005). Επιπλέον υπάρχει μία ανοσολογική μέτρηση για το αμινο-τελικό άκρο του Β-νατριουρητικού πεπτιδίου (NT-proBNP), που ανιχνεύει την πρωτεΐνη μεταφορέα 76 αμινοξέων, η οποία μαζί με το ενεργό μόριο των 32 αμινοξέων ονομάζεται proBNP. Τόσο το BNP όσο και το NT-proBNP εμφανίζουν ποικιλία στη βιολογική τους έκφραση (Wu AH et al. 2003) έτσι ώστε μόνο ο διπλασιασμός ή ο υποδιπλασιασμός της τιμής τους να θεωρείται αξιόπιστη μεταβολή. Στα οξεία στεφανιαία σύνδρομα, αυξήσεις στις τιμές του BNP και του NT-proBNP είναι προγνωστικές για θάνατο σε όλες τις μελέτες αλλά δεν φαίνεται να σχετίζονται ικανοποιητικά με το επανέμφραγμα.

1.4 Τροπονίνες

Το μόριο της τροπονίνης είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που εδράζεται στα λεπτά νημάτια των μυοσκελετικών και μυοκαρδιακών ιστών ρυθμίζει τη σύσπαση των γραμμωτών μυών και συνίσταται από τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες (την τροπονίνη C, την τροπονίνη I, & την τροπονίνη T). Πιο συγκεκριμένα:

- Η Τροπονίνη C: (24 kd) είναι μία ασβεστιο-δεσμευτική πρωτεΐνη
- Η Τροπονίνη T: (37 kd) προσδέεται στην τροπομυοσίνη, βοηθώντας έτσι στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου της τροπονίνης με τα λεπτά νημάτια των μυϊκών κυττάρων (Potter J et al. 1995)
- Η Τροπονίνη I: (24 kd) προσδέεται στην ακτίνη μειώνοντας τη συγγένεια της Τροπονίνης C για το ασβέστιο και εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης-μυοσίνης (Perry S et al. 1999).



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση ενός λεπτού νηματίου ακτίνης με το σύμπλοκο της τροπονίνης και την τροπομυοσίνη (Πηγή: <http://www.cytoskeleton.com/tropomyosin-troponin-complex-cs-t105>)

Καθένα από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι υπεύθυνο για διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες. Από τις 3 υπομονάδες (T, I, και C), μόνο η T (cTnT) και η I (cTnI)

εκφράζονται με ειδικές ισομορφές στο μυοκάρδιο και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια στους γραμμωτούς μύες (Mueller M et al. 2013). Αντίθετα, για την τροπονίνη C δεν υπάρχει ειδική καρδιακή ισομορφή.

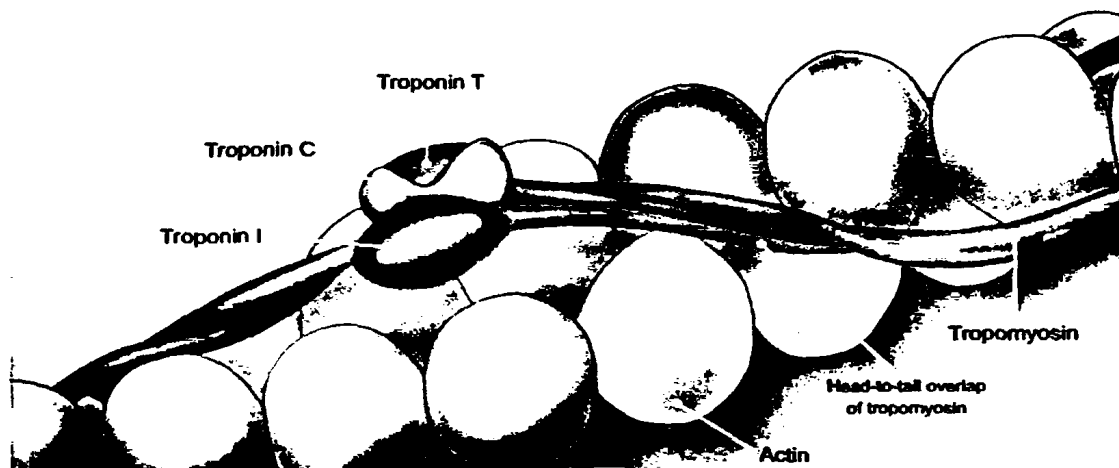
Βιολογία του Συμπλόκου

Όπως προαναφέρθηκε το σύμπλοκο της τροπονίνης (τροπονίνη C, I, & T) μαζί με την τροπομυοσίνη εδράζονται στα λεπτά νημάτια της ακτίνης και είναι απαραίτητο για την διαμεσολαβούμενη από το Ca^{2+} μυϊκή σύσπαση. Έχει αποδειχτεί ότι υπάρχουν ιστοειδικές ισομορφές για κάθε μία από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου. Ωστόσο όσον αφορά την τροπονίνη C, αυτή δεν διαθέτει ειδικότητα για τα κύτταρα του μυοκαρδίου και γι αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιείται σε διαγνωστικές δοκιμασίες για την ανίχνευση καρδιακής βλάβης (Filatov VL et al. 1999).

Υπάρχει μία καρδιακή ισομορφή της Τροπονίνης I που εντοπίζεται στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Η ισομορφή αυτή διαθέτει μία μετά-μεταφραστική αλληλουχία 32 αμινοξέων στο N-τελικό της άκρο. Η αλληλουχία αυτή σε συνδυασμό με τη μικρή ομολογία αυτής με τις άλλες ισομορφές, έχουν καταστήσει δυνατή την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με υψηλή ειδικότητα χωρίς διασταυρωτές αντιδράσεις με μη καρδιακές ισομορφές.

Η καρδιακή Τροπονίνη T κωδικοποιείται από 3 γονίδια, τα οποία μέσω του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA παράγουν μια σειρά ισομορφών με ποικίλες αλληλουχίες κοντά στην περιοχή του N-τελικού και του C-τελικού άκρου αντίστοιχα. Τα ανθρώπινα μυοκαρδιακά κύτταρα περιέχουν 4 ισομορφές της Τροπονίνης T, αλλά μόνο η μία από αυτές είναι χαρακτηριστική για τη φυσιολογική ενήλικη καρδιά. (Filatov VL et al. 1999, Anderson P et al. 1991).

Για την ισομορφή αυτή έχουν παραχθεί αντισώματα με υψηλή ειδικότητα για το N-τελικό άκρο (Babuín L et al. 2005). Έτσι οι καρδιακές Τροπονίνες (cTnTs) I & T έχουν αναδειχθεί ως οι προτιμώμενοι βιοδείκτες σε περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου (Mueller M et al. 2013)



Εικόνα 1.6: Το σύμπλοκο της Τροπονίνης στο καρδιακό μυοκύτταρο (Πηγή: <http://www.bpac.org.nz/BT/2009/December/troponin.aspx>)

▪ Τροπονίνη C

Η Τροπονίνη C προσδέεται σε ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και κωδικοποιείται από δύο γονίδια. Το ένα από αυτά κωδικοποιεί τις ισομορφές που αφορούν τη γρήγορη μυϊκή σύσπαση και εντοπίζονται αποκλειστικά στους σκελετικούς μύες και το άλλο την ισομορφή που αφορά την αργή μυϊκή σύσπαση. Οι 3 ισομορφές της παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους και έχουν χαμηλά ισοηλεκτρικά σημεία. Επίσης η Τροπονίνη C διαθέτει 4 μοτίβα με δομή έλικας-βρόχου-έλικας. Η συντηρητική αυτή δομή ονομάζεται EF-hand και περιλαμβάνει κυρίως ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το Ca^{2+} . Η πρόσδεση του Ca^{2+} στην τροπονίνη C συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στη δομή της, οι οποίες μπορούν να μεταφερθούν και στις υπόλοιπες υπομονάδες του συμπλόκου. Η Τροπονίνη C αλληλεπιδρά με την Τροπονίνη I και η ισχύς αυτής της αλληλεπίδρασης αυξάνεται με την παρουσία ιόντων Ca^{2+} (Filatov VL et al. 1999). Η Τροπονίνη C μπορεί να αλλάξει την ανασταλτική επίδραση της Τροπονίνης I. Αυτό συμβαίνει επειδή οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους και κατά την απουσία του Ca^{2+} οι «θέσεις αναστολής» της cTnI αλληλεπιδρούν με την ακτίνη ενώ με την παρουσία ασβεστίου αλληλεπιδρούν με την TnC.

▪ Τροπονίνη T

Η τροπονίνη T αλληλεπιδρά με την τροπομυοσίνη και κατέχει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μυϊκής σύσπασης. Η πρώιμη δομή της από σκελετικούς και καρδιακούς μύες πολλών ειδών θηλαστικών, πουλιών και ασπόνδυλων έχει περιγραφεί αναλυτικά στη βιβλιογραφία (Perry S et al. 1998). Στους περισσότερους μύες διαθέτει πολλές ισομορφές (Pan B et al. 1992). Ο μεγάλος αριθμός των

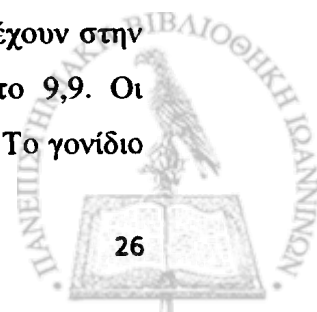
ισομορφών της εξηγείται από τα πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για την τροπονίνη T καθώς αυτά περιέχουν πολλά εξόνια που υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα. Έτσι θεωρητικά οι σκελετικοί μύες του αρουραίου θα μπορούσαν να περιέχουν 128 ισομορφές της τροπονίνης T με διαφορετική αλληλουχία σε αμινοξέα. Η διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος του πρώιμου RNA μετάγραφου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι διαφέρει ανάλογα με την προέλευση της Τροπονίνης T και εξαρτάται από το στάδιο της οντογένεσης (Filatov VL et al. 1999).

Όσον αφορά το ανθρώπινο μυοκάρδιο, η τροπονίνη T εντοπίζεται σε αυτό με τέσσερις ισομορφές, τρεις που αφορούν το έμβρυο και μία που είναι χαρακτηριστική για την καρδιά των ενηλίκων (Anderson P et al. 1995). Η επανέκφραση των εμβρυϊκών ισομορφών της κατά την ενήλικη ζωή, είτε στο επίπεδο του mRNA είτε στο επίπεδο των πρωτεϊνών, συμβαίνει στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας (Filatov VL et al. 1999). Η μεγαλύτερη ποσότητα της cTnT βρίσκεται στη συστατική συσκευή (περίπου 10mg/g ιστού) και απελευθερώνεται μέσω πρωτεολυτικής αποικοδόμησης.

Επίσης ένα ποσοστό 6-8% της ίδιας εντοπίζεται ως ελεύθερο συστατικό του κυτταροπλάσματος (Voss EM et al. 1995) και απελευθερώνεται στην περίπτωση της ισχαιμίας. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στην αιματική κυκλοφορία ανέρχεται στα 120 λεπτά (Katus HA et al. 1991) και σύμφωνα με μελέτες κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με την TnC και την cTnI αλλά και ως ελεύθερο συστατικό του κυτταροπλάσματος. Επιπλέον στα δείγματα των ασθενών εμφανίζει σταθερότητα όχι μόνο σε θερμοκρασία δωματίου (4 °C) αλλά και όταν ψύχεται και αποψύχεται (τα δείγματα δεν υφίστανται σημαντικές αλλαγές μετά από 5 κύκλους ψύξης-απόψυξης) (Apple FS et al. 2012).

▪ Τροπονίνη I

Υπάρχουν τρεις ισομορφές της Τροπονίνης I. Οι δύο από αυτές εντοπίζονται στους σκελετικούς μύες (αργής και γρήγορης μυϊκής σύσπασης) και η μία στο μυοκάρδιο. Η Τροπονίνη αυτή αποτελείται από 181-211 αμινοξικά κατάλοιπα ενώ η ισομορφή που απαντάται στο μυοκάρδιο είναι μεγαλύτερη, λόγω της ύπαρξης 30 επιπλέον αμινοξέων στο N-τελικό της άκρο. Τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα υπερέχουν στην ισομορφή αυτή και έτσι το ισοηλεκτρικό της σημείο υπολογίζεται στο 9,9. Οι ισομορφές της Τροπονίνης I κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια. Το γονίδιο



που κωδικοποιεί την ισομορφή που εντοπίζεται στο μυοκάρδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 και αποτελείται από 8 εξόνια (Filatov VL et al. 1999). Με τη γέννηση η έκφραση της ισομορφής που αφορά την αργή μυϊκή σύσπαση αναστέλλεται ενώ αυτή που εντοπίζεται στο μυοκάρδιο ενισχύεται. Με την αλλαγή αυτή επιτυγχάνεται αποκλειστική έκφραση της καρδιακής ισομορφής κατά τον ένατο μήνα της ζωής.

Το μόριο της τροπονίνης I περιέχει 2 κατάλοιπα σερίνης που φωσφορυλιώνονται *in vivo* από την πρωτεϊνική κινάση A. Η φωσφορυλίωση της cTnI αλλάζει τη διαμόρφωση της και τροποποιεί την αλληλεπίδραση της με τις άλλες τροπονίνες. Ένα μέρος της τροπονίνης I απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών φωσφορυλιωμένο (Katrukha AG et al. 1999). Η μεγαλύτερη ποσότητα της εντοπίζεται στη συσταλτή συσκευή (4-6 mg/g ιστού) και απελευθερώνεται με πρωτεολυτική αποικοδόμηση, ενώ ένα ποσοστό 2-8% βρίσκεται ελεύθερο στο κυττόςόλιο (Adams JE et al. 1993).

Οι μετρήσεις της cTnI στις ανοσολογικές δοκιμασίες επηρεάζονται από παράγοντες όπως οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (η πρωτεολυτική αποικοδόμηση, η φωσφορυλίωση (Katrukha AG et al. 1999) και η αλληλεπίδραση με άλλα μόρια (όπως η ηπαρίνη, (Katrukha AG et al. 1999) η TnC (Katrukha AG et al. 1998) και τα αυτοαντισώματα εναντίον της cTnI (Eriksson S et al. 2005)). Διάφορα μονοκλωνικά αλλά και πολυκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις ανοσολογικές δοκιμασίες παρουσιάζουν ευαισθησία στους παραπάνω παράγοντες. Για αυτό το λόγο είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται αντισώματα με ειδικότητα σε επίτοπους που εδράζονται στο κεντρικό τμήμα του μορίου της τροπονίνης καθώς οι επίτοποι αυτοί είναι πιο σταθεροί από αυτούς στις άκρες του μορίου. Επιπλέον η τροπονίνη C ανταγωνίζεται με τα αντισώματα για την πρόσδεση στην τροπονίνη I με αποτέλεσμα μόνο λίγα αντισώματα που είναι ειδικά για το κεντρικό τμήμα της cTnI να αναγνωρίζουν το σύμπλοκο cTnI-TnC.

Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η cTnI διασπάται από ενδογενείς πρωτεάσες κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής νέκρωσης στο έμφραγμα του μυοκαρδίου (Katrukha AG et al. 1997, 1998). Έτσι αρκετές ώρες μετά το προκάρδιο άλγος κυκλοφορούν στο αίμα όχι μόνο καθαρή cTnI αλλά και σύμπλοκο της ίδιας με θραύσματα από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση που προηγήθηκε. Οπότε τα αντισώματα πρέπει να

Πίνακας 1.5: Ανιχνεύσιμες μορφές τροπονινών μετά την απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία του αίματος.

Μορφές Τροπονίνης	Τροπονίνη I	Τροπονίνη T
Ελεύθερη Τροπονίνη	Χαμηλό Ποσοστό	Επικρατούσα Μορφή
Διαδικό Σύμπλοκο	Επικρατούσα Μορφή	Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα
Τριαδικό Σύμπλοκο	Χαμηλό Ποσοστό	Χαμηλό Ποσοστό
Οξειδωμένη ή Ανηγμένη μορφή	Έχουν ανιχνευθεί και οι 2 μορφές. Η αμινοξική αλληλουχία της σκελετικής τροπονίνης περιέχει 2 κυστεΐνες στις θέσεις 48 και 64	Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα
Φωσφορυλιωμένη Μορφή	Έχουν ανιχνευθεί τρεις μορφές. Η μόνο-, η δι- και η μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η αμινοξική αλληλουχία περιέχει 2 σερίνες στις θέσεις 23 και 24	Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα
Σταθερότητα	Η ελεύθερη μορφή της είναι επιρρεπής σε πρωτεόλυση	Η ελεύθερη μορφή της είναι πολύ σταθερή

(Πηγή: Labugger R. et al. 2000)

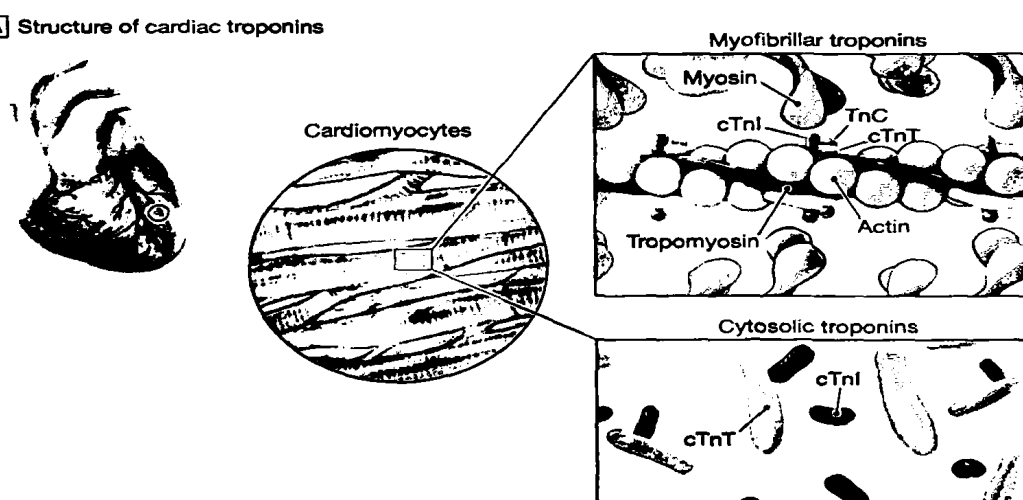
Αποδόμηση-Απέκκριση

Η απελευθέρωση των μορίων της τροπονίνης στην κυκλοφορία του αίματος διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και οδηγεί στο σχηματισμό ειδικών αυτό-αντισωμάτων (IgG σφαιρίνες) (Eriksson S et al. 2005, Frenkel D et al. 2009). Στις σχετικές μελέτες που γίνονται τα τελευταία χρόνια στον άνθρωπο, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη διερεύνηση της παρουσίας ή όχι αυτοαντισωμάτων κατά της cTnI ακόμη και σε υγιείς οργανισμούς, αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία τους είναι ένας από τους παράγοντες που υπεισέρχονται στην αιτιοπαθογένεια της ιδιοπαθούς μυοκαρδιοπάθειας του ανθρώπου (Eriksson S et al. 2005, Leuschner F et al. 2008, Adamczyk M et al. 2009).

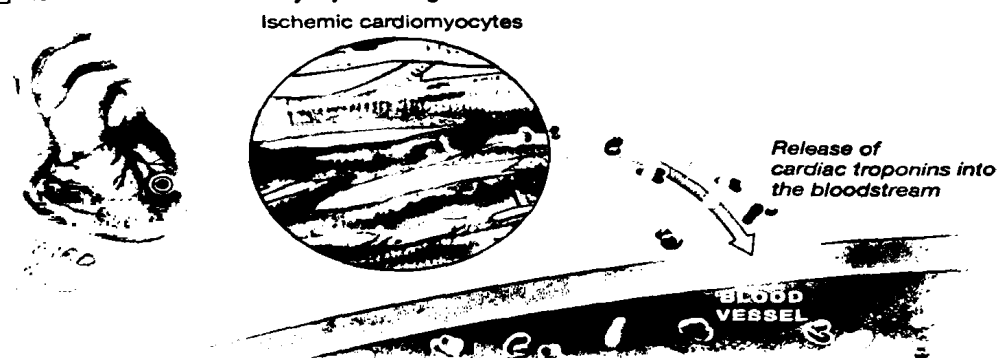
Αδιευκρίνιστος σε μεγάλο βαθμό παραμένει και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η απέκκριση των καρδιακών τροπονινών από τον οργανισμό. Πάντως, αν θεωρηθεί ότι ισχύει ότι και για τα πρωτεϊνικά μόρια με μοριακό βάρος ανώτερο των 20 kDa, η

cTnI είναι πιθανόν να αποδομείται σε όργανα και ιστούς με έντονη μεταβολική δραστηριότητα, όπως το ήπαρ και το πάγκρεας καθώς και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Στον άνθρωπο υπάρχουν ενδείξεις ότι οι καρδιακές τροπονίνες αποδομούνται και τελικά απεκκρίνονται μέσω των νεφρών (Diris J.H.C et al. 2004). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της cTnI στον ορό του αίματος έχει προσδιοριστεί μόνο στον άνθρωπο και αναφέρεται να είναι περίπου ενενήντα λεπτά (Jaffe AS et al. 1996).

A Structure of cardiac troponins



B Ischemia-induced cardiomyocyte damage



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση της δομής του συμπλόκου και της απελευθέρωσης των καρδιακών τροπονινών στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος, σε μυοκάρδιο που ισχαιμεί (Πηγή: jama.jamanetwork.com)

1.6 Δοκιμασίες ανίχνευσης καρδιακών Τροπονινών - Τεστ Τροπονίνης

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Καρδιολογίας και το Αμερικάνικο Κολλέγιο Καρδιολογίας, οι καρδιακές τροπονίνες cTnI και cTnT θεωρούνται οι βιοδείκτες επιλογής στη μυοκαρδιακή νέκρωση και στη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του

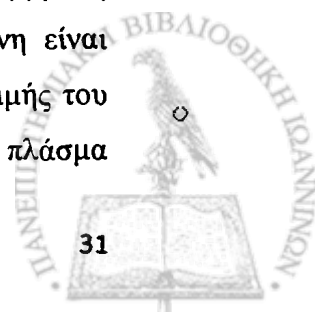
μυοκαρδίου. Οι δοκιμασίες ανίχνευσης τους έχουν εξελιχθεί με την πάροδο των χρόνων και πλέον παρέχουν αποτελέσματα υψηλής ευαισθησίας. Η διαγνωστική ευαισθησία της τροπονίνης οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία της (σε ένα μικρό βέβαια ποσοστό, της τάξης του 3-7%) στο κυτταρόπλασμα. Ανιχνεύονται στο αίμα των ασθενών με ένα απλό διαγνωστικό τεστ και σε χρόνο που δεν ξεπερνά τις 4-6 ώρες από το καρδιακό επεισόδιο και φθάνουν στη μέγιστη τιμή τους μετά από 24-48 ώρες. Το γεγονός όμως ότι η απελευθέρωση τους από το νεκρωμένο μυοκάρδιο μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο από 10-14 ημέρες, τις καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα διαγνωστικά και προγνωστικά εργαλεία.

Η ανάπτυξη βιολογικών δοκιμασιών ανίχνευσης των καρδιακών τροπονινών στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με υποψία καρδιαγγειακής νόσου, στηρίζεται στη χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων (“σύλληψης” και “ανίχνευσης”) (Adams J.E. et al. 1999), έναντι των αντιγονικών τους περιοχών ή και ολόκληρης της πρωτεΐνης (Heeschen C et al. 1998, Venge P et al. 2001, Uettwiller-Geiger D et al. 2002). Τα αντισώματα τα οποία προκύπτουν μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζωων, χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια ανίχνευσης κατά ζεύγη σε μια ανοσοενζυμική δοκιμή E.L.I.S.A (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) τύπου “sandwich”.

Το τεστ της τροπονίνης λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης που παρουσιάζει, θεωρείται σήμερα ως το πιο αξιόπιστο τεστ για τη διάγνωση, τόσο των οξέων μυοκαρδιακών εμφραγμάτων (Katus H.A. et al. 1991, Mair J et al. 1996, D’Costa M et al. 1997, Chapelle, JP. et al. 1999), όσο και άλλων ασθενειών οι οποίες όμως πιθανότατα υποκρύπτουν νέκρωση μυϊκών ιστών (Roongsritong C et al. 2004, Mahajan N et al. 2006, Jeremias A et al. 2005). Ακόμη και μια μικρή άνοδος των τιμών των τροπονινών I και T σε δείγματα αίματος ασθενών, σηματοδοτεί ανεπιφύλακτα σοβαρότατη μυοκαρδιακή βλάβη (Στρογγύλης Κ. 2008).

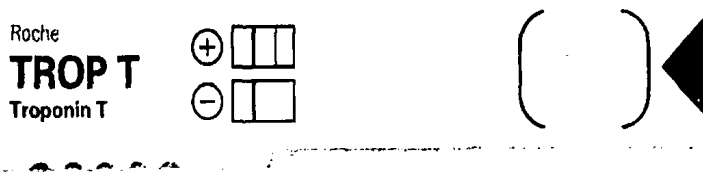
Αρχή λειτουργίας

Το τεστ τροπονίνης είναι ένα ποιοτικό, ανοσολογικό τεστ βασισμένο σε μεμβράνη για την ανίχνευση της cTnI σε πλήρες αίμα, ορό ή πλάσμα. Η μεμβράνη είναι προκαλυμμένη με αντιδραστήριο δέσμευσης στην περιοχή της γραμμής δοκιμής του τεστ. Κατά τη διάρκεια του τεστ η τροπονίνη I στο πλήρες αίμα, ορό ή πλάσμα



αντιδρά με δυο συγκεκριμένα αντισώματα anti-cTnI. Ένα από τα αντισώματα μεσολαβεί στη σύνδεση με το αντιδραστήριο δέσμευσης ενώ το άλλο είναι ετικέτα χρώματος.

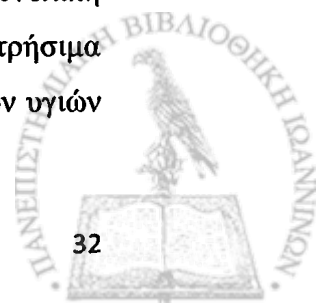
Το μίγμα μεταφέρεται προς τα πάνω στη μεμβράνη με τριχοειδή δράση. Στην περιοχή της γραμμής δοκιμής το σύμπλοκο cTnI-αντίσωμα δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο αντιδραστήριο δέσμευσης και έτσι δημιουργείται μια κόκκινη γραμμή. Η παρουσία κόκκινης γραμμής στην περιοχή δοκιμής σημαίνει θετικό αποτέλεσμα. Αν το δείγμα δεν περιέχει cTnI καμιά γραμμή δεν σχηματίζεται στην περιοχή δοκιμής, δίνοντας έτσι αρνητικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, μια κόκκινη γραμμή πρέπει να σχηματιστεί στην περιοχή ελέγχου (C) ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της cTnI στο δείγμα. Η γραμμή ελέγχου χρησιμεύει ως έλεγχος διαδικασίας και πιστοποιεί ότι έχει προστεθεί επαρκής όγκος δείγματος και η μεμβράνη έχει ενεργοποιηθεί.



Εικόνα 1.8: Τεστ Τροπονίνης (Πηγή: Denise D. Wilson - McGraw-Hill's - Manual of Laboratory and Diagnostic Tests)

1.7. Δοκιμασίες Τροπονίνης Υψηλής Ευαισθησίας

Οι δοκιμασίες Τροπονίνης έχουν εξελιχθεί με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα τα όρια ανίχνευσης να είναι 10 με 100 φορές χαμηλότερα σε σύγκριση με τις μέχρι τώρα εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες. Ένα σύγχρονο τεστ ανίχνευσης cTnI μπορεί να εντοπίσει συγκεντρώσεις της τάξης του 0.006 mcg/L, ενώ το αντίστοιχο για την cTnT ανιχνεύει συγκεντρώσεις κάτω από 0.005 mcg/L (Apple FS et al. 1999). Οι κατασκευαστές εξακολουθούν να σχεδιάζουν δοκιμασίες με ακόμη χαμηλότερα όρια (1 ng/L (0.001 mcg/L)) και μεγαλύτερη ακρίβεια. Έτσι, οι δοκιμασίες με συνολική ανακρίβεια στο 99ο εκατοστημόριο $\leq 10\%$ (συντελεστή διακύμανσης) και μετρήσιμα φυσιολογικές τιμές κάτω από το 99ο εκατοστημόριο σε τουλάχιστον 90% των υγιών



ατόμων είχαν χαρακτηριστεί ως «υψηλής ευαισθησίας» (hs) δοκιμασίες (Mueller M et al. 2013).

Στις δοκιμασίες αυτές το όριο ανίχνευσης βρίσκεται στο 0,01 ng/ml (Apple FS et al. 2005). Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η αυξημένη ευαισθησία αφορά τα χαρακτηριστικά της μεθόδου και όχι το είδος της τροπονίνης που μετράται. Επιπλέον με την πτώση των ορίων ανίχνευσης καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση των ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομα πιο γρήγορα καθώς οι κλινικοί γιατροί δεν χρειάζεται να περιμένουν 6-8 ώρες για να παραγγείλουν ένα δεύτερο τεστ τροπονίνης με αποτέλεσμα και την πιο γρήγορη ιατρική παρέμβαση.

Ωστόσο ενώ η ευαισθησία στη διάγνωση έχει αυξηθεί η ειδικότητα έχει μειωθεί και είναι πιθανό να αυξάνονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει διότι με τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης μπορεί να βρεθούν στο πλάσμα ασθενών cTnI και cTnT, που δεν πάσχουν από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο αλλά ως αποτέλεσμα παροδικής ισχαιμίας ή φλεγμονώδους μυοκαρδιακής βλάβης (Mueller M et al. 2013). Εξάλλου πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι τροπονίνες μπορεί να αυξηθούν και σε απουσία οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Στον πίνακα 1.6 παρουσιάζονται οι καταστάσεις που τα επίπεδα των τροπονινών αυξάνονται.

Πίνακας 1.6 Αίτια αυξημένης Τροπονίνης σε απουσία ισχαιμικής καρδιακής νόσου

Τραύμα στην καρδιά (συμπεριλαμβανομένων θλάσης, κατάλυσης, βηματοδότησης, καρδιομετατροπής, ενδομυοκαρδιακής βιοψίας, χειρουργείου καρδιάς)	Μυοκαρδιοπάθεια από stress
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (οξεία και χρόνια)	Σπασμός στεφανιαίων αγγείων
Αρτηριακή Υπέρταση	Φλεγμονώδεις νόσοι
Υπόταση συχνά συνοδεύει αρρυθμιών	Σήψη
Νεφρική ανεπάρκεια	Ραβδομύλυση με καρδιακή βλάβη
Βαρέως πάσχοντες, ειδικά με σακχαρώδη διαβήτη και αναπνευστική ανεπάρκεια	Στεφανιαία αγγειοπάθεια καρδιακού μοσχεύματος
Τοξικότητα φαρμάκων	Εξάντληση καρδιακών λειτουργιών
Υποθυρεοειδισμός	Πνευμονική εμβολή

(Πηγή: Κρεμαστινός Δ. Καρδιολογία, 2^η έκδοση, 2009)

Κεφάλαιο 2
**Ανοσοποιητικό σύστημα-Βασικές Έννοιες,
Αντισώματα**

2.Ανοσοποιητικό σύστημα: Γενικά χαρακτηριστικά και βασικές Έννοιες

Ο όρος ανοσία αναφέρεται στη σχετική αντίσταση του οργανισμού σε μολυσματικές νόσους (α-νοσία, immunity) και προέρχεται από το λατινικό επίθετο *immunis*, που σημαίνει ελεύθερος από φόρους ή φορτία. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει ένα πλήθος μορίων και κυττάρων με βασικό στόχο τη διάκριση μεταξύ εαυτού και ξένου. Τα τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματά του είναι η εξειδίκευση, η προσαρμογή και η μνήμη. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές στρατηγικές: Στη χυμική ανοσολογική απάντηση τα στοιχεία αναγνώρισης είναι ειδικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται αντισώματα, και παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, ενώ στην κυτταρική ανοσολογική απάντηση τα T-λεμφοκύτταρα θανατώνουν κύτταρα που φέρουν ξένες ουσίες και διεγείρουν τη χυμική απόκριση συνδράμοντας τα B-λεμφοκύτταρα, δηλαδή τα πρόδρομα των πλασματοκυττάρων (Goldsby R et al. 2007).

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες (*immunoglobulins*), είναι πρωτεΐνες συντιθέμενες από τον οργανισμό εξαιτίας της παρουσίας μιας ξένης ουσίας μέσα σε αυτόν. Αποτελούν μια ομάδα γλυκοπρωτεϊνών που ανευρίσκονται στο πλάσμα και στα υγρά των ιστών όλων των θηλαστικών (Goldsby R et al. 2007). Εντοπίζονται πάνω στη μεμβράνη των B λεμφοκυττάρων και εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα. Αντιγόνο καλείται οποιοδήποτε ξένο μακρομόριο, ικανό να προκαλέσει το σχηματισμό του αντισώματος.

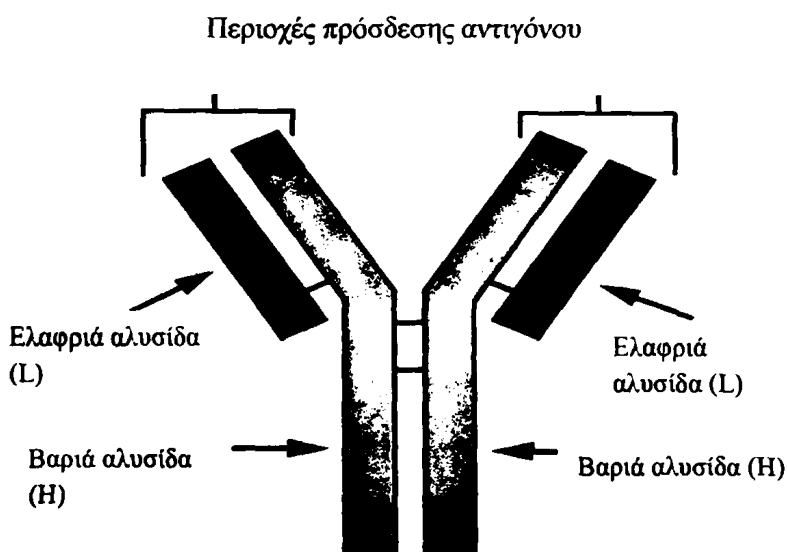
Το αντίσωμα διαθέτει ειδική συγγένεια για το αντιγόνο, προσκολλώμενο σε μια συγκεκριμένη θέση του που καλείται αντιγονικός προσδιοριστής ή επίτοπος. Ο μηχανισμός σχηματισμού των αντισωμάτων απασχόλησε αρκετά τους επιστήμονες. Τη δεκαετία του 1950 διατυπώθηκε η θεωρία της κλωνικής επιλογής που σήμερα προβάλλει ως ένα καταξιωμένο πρότυπο και διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Κάθε κύτταρο παραγωγής αντισώματος συνθέτει αντίσωμα ενός και μόνο είδους
- Κάθε κύτταρο έχει μια χαρακτηριστική αλληλουχία βάσεων στο DNA που κωδικοποιεί μια δεδομένη αλληλουχία αμινοξέων από την αλληλουχία της ανοσοσφαιρίνης, γεγονός που σημαίνει ότι η ειδικότητα κάθε αντισώματος αποτυπώνεται στην πρωτοταγή δομή του.

- Κάθε Β-κύτταρο φέρει στην επιφάνειά του μικρό αριθμό αντισωμάτων, τα οποία παίζουν ρόλο υποδοχέων συγκεκριμένης εξειδίκευσης. Με αυτά τα μόρια τα Β-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα. Κατά την ανοσολογική απόκριση η έκθεση του ξενιστή στο ξένο μόριο ενεργοποιεί τα Β-κύτταρα και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με αλληπάλληλες μιτώσεις και παράγουν κλώνους. Κατόπιν οι κλώνοι διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν τα ειδικά αντισώματα, και σε Β-κύτταρα μνήμης που εξασφαλίζουν γρήγορη ανοσολογική απάντηση στο μέλλον.

2.1 Δομή των αντισωμάτων

- Τα αντισωματικά μόρια έχουν μια κοινή δομή τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η δομή αυτή περιλαμβάνει δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (light chains L) και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (heavy chains H) με Μοριακό Βάρος 25 kDa και 50 kDa περίπου ή μεγαλύτερο αντίστοιχα. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μία από τις βαριές αλυσίδες και τα εναπομείναντα τμήματα των δύο βαριών αλυσίδων συνδέονται μεταξύ τους έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα συμμετρικό μόριο σχήματος Υ (Janeway CA et al. 2001).



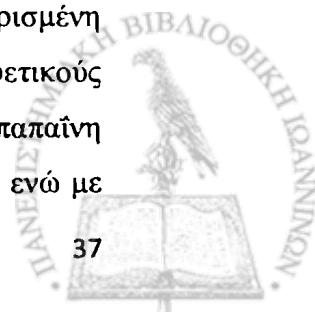
Εικόνα 2.1: Δομή αντισώματος (Πηγή <http://waynesword.palomar.edu/molecul.htm>)

Οι αλυσίδες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς και σταθεροποιούνται με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις όπως π.χ. με δεσμούς αλάτων, υδρογόνου ή

υδροφοβικούς. Παρόμοιες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δισουλφιδικές γέφυρες συνδέουν τις πανομοιότυπες βαριές και ελαφριές αλυσίδες μεταξύ τους (H-L) για να παράγουν τη βασική τετρα-αλυσιδική δομή, το διμερές (H-L)₂. Στον άνθρωπο υπάρχουν 2 τύποι ελαφριών αλυσίδων οι κ και οι λ και 5 ισοτύποι βαριών αλυσίδων οι γ, α, μ, δ και ε. Τα πρώτα 110 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής μιας ελαφριάς ή βαριάς αλυσίδας διαφέρουν πάρα πολύ ανάμεσα στα αντισώματα διαφορετικής ειδικότητας. Τα τμήματα αυτά υψηλής μεταβλητότητας ακολουθίας, ονομάζονται *μεταβλητές περιοχές* (V): V_L για την ελαφριά και V_H για τη βαριά αλυσίδα αντίστοιχα. Όλες οι διαφορές στην ειδικότητα, που εκφράζονται από διαφορετικά αντισώματα, μπορεί να προκύπτουν από τις διαφορές στις αμινοξικές ακολουθίες των μεταβλητών περιοχών (Goldsby R et al. 2007).

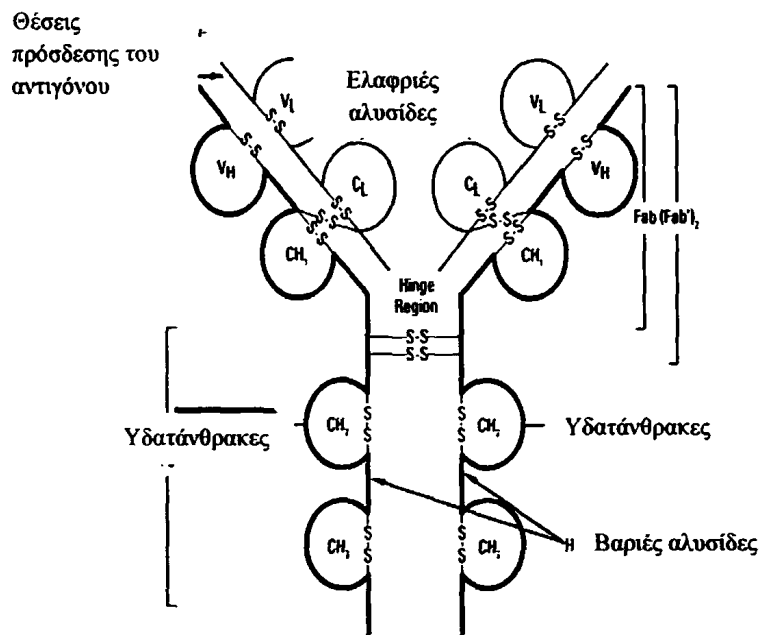
Στην πράξη, οι περισσότερες διαφορές εντοπίζονται σε περιοχές που ονομάζονται *συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές* (CDR) που βρίσκονται τόσο στις ελαφριές όσο και τις βαριές αλυσίδες που συνιστούν τις θέσεις δέσμησης αντιγόνου του ανοσοσφαιρινικού μορίου. Οι περιοχές των σχετικά σταθερών ακολουθιών που βρίσκονται μετά τις μεταβλητές περιοχές, αποτελούν τις *σταθερές περιοχές* (C): C_L για την ελαφριά και C_H για την βαριά αλυσίδα αντίστοιχα. Μέσα στις μεταβλητές περιοχές τόσο των H όσο και των L αλυσίδων, μερικά τμήματα πολυπεπτιδίων επιδεικνύουν εξαιρετική μεταβλητότητα. Αυτές είναι οι υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions, HV) για την αναγνώριση της υψηλής τους ποικιλομορφίας. Οι υπερμεταβλητές περιοχές σχηματίζουν τη θέση δέσμησης του αντιγόνου στο αντισωματικό μόριο.

Επειδή η θέση δέσμησης του αντιγόνου είναι συμπληρωματική της δομής του επιτόπου, οι περιοχές αυτές είναι γνωστές ως *συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές* (complementary determining regions, CDR). Εντοπίζονται τρεις τέτοιες περιοχές στις V επικράτειες κάθε ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας. Οι υπόλοιπες επικράτειες εμφανίζουν πολύ χαμηλότερη ποικιλομορφία και ονομάζονται *περιοχές πλαισίου* (framework regions, FR). Η αναδίπλωση των επικρατειών προκαλεί τη συσσώρευση τους στα πλέον απόμακρα άκρα του μορίου δημιουργώντας δύο αντιγονοπροσδένουσες θέσεις για κάθε τετρα-αλυσιδική μονάδα. Περιορισμένη πρωτεόλυση με ένζυμα παράγει θραύσματα του μορίου που περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς των περιοχών (Goldsby R et al. 2007). Έτσι πρωτεόλυση με παπαΐνη δίνει Fab (Fragment antigen binding) και Fc (Fragment crystalline) τμήματα, ενώ με



πεψίνη παράγονται $(Fab)_2$ τμήματα. Τα Fab τμήματα αποτελούνται από την ελαφριά αλυσίδα και από τις περιοχές VH και CH1 της βαριάς αλυσίδας, ενώ το Fc περιέχει τις CH2 και CH3 περιοχές των βαριών αλυσίδων. Το Fab τμήμα περιέχει τις ιδιότητες του αντισώματος για τη δέσμευση του αντιγόνου, την ειδικότητα και τη συγγένεια. Οι “εκτελεστικές ιδιότητες” του αντισώματος, όπως η στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ανήκουν στο κομμάτι Fc (Narciso Je et al. 2012). Το $(Fab)_2$ τμήμα αποτελείται από τις δύο ελαφριές αλυσίδες και τις VH και CH1 περιοχές των δύο βαριών αλυσίδων.

Εικόνα 2.2: Απεικόνιση των Fc και Fab τμημάτων των αντισωμάτων
(Πηγή: <http://www.piercenet.com/method/antibody-structure-classes>)



Εικόνα 2.3: Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου της IgG με τις δομικές περιοχές του
(Πηγή: <http://pubs.acs.org/cen/topstory/8148/8148notw2.html>)

Στα περισσότερα ανώτερα θηλαστικά έχουν βρεθεί 5 διαφορετικές τάξεις ανοσοσφαιρινών οι IgA, IgG, IgM, IgD & IgE. Οι ανοσοσφαιρίνες τάξης IgG διακρίνονται σε 4 υποτάξεις IgG1 (66%), IgG2 (23%), IgG3 (7%), IgG4 (4%) και οι IgA σε δύο IgA, IgA1 και IgA2. Οι υποτάξεις των ανοσοσφαιρινών φαίνεται πως έχουν προκύψει κατά τα τελευταία στάδια της εξέλιξης. Οι τάξεις διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, στο ηλεκτρικό φορτίο, στη σύνθεση των αμινοξέων και στο περιεχόμενο σε υδατάνθρακες (Roitt M et al. 2011). Το ποσό των υδατανθράκων ποικίλει από 2-3% για την IgG σε 12-14% για τις IgM, IgD & IgE. Εκτός από τις διαφορές μεταξύ των τάξεων, ακόμη και οι ανοσοσφαιρίνες της ίδιας τάξης εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια.

Οι IgA αντιπροσωπεύουν το 15-20% του ποσού των ανοσοσφαιρινών του ανθρώπινου ορού και εμφανίζονται κυρίως ως μονομερείς. Χωρίζονται σε υποτάξεις ή υπότυπους, τους IgA1 και IgA2. Γενικά οι IgA είναι οι κυρίως ανοσοσφαιρίνες στο σάλιο, το γάλα, και τις τραχειοβρογχικές και ουρογεννητικές εκκρίσεις.

Οι IgD αποτελούν το 1% της ολικής ποσότητας των αντισωμάτων, αλλά υπάρχουν σε μεγάλη ποσότητα στη μεμβράνη πολλών B-κυττάρων. Η ακριβής λειτουργία της τάξης αυτής δεν έχει διευκρινισθεί.

Οι IgE βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των βασεόφιλων και σιτευτικών κυττάρων. Πιθανόν διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανοσία έναντι παρασίτων, καθώς και σε εμφάνιση αλλεργιών, όπως το άσθμα.

Οι IgG ανοσοσφαιρίνες είναι οι κύριες ανοσοσφαιρίνες στον ορό υγιούς ανθρώπου (70-75% επί του συνόλου). Χωρίζονται στις υποτάξεις IgG1, IgG2, IgG3, και IgG4 ανάλογα με τον αριθμό των εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών αλυσίδων (ελαφριάς-βαριάς και βαριάς-βαριάς), εμφανίζονται ως μονομερείς και κατανέμονται ισότιμα μεταξύ των ενδαγγειακών και εξαγγειακών αποθεμάτων. Αποτελούν το κύριο αντίσωμα στις δευτερογενείς ανοσοποιητικές απαντήσεις.

Οι IgM αντιπροσωπεύουν το 10% των ανοσοσφαιρινών. Αποτελούν το πρώιμο αντίσωμα που παρατηρείται συχνά στις ανοσοποιητικές απαντήσεις έναντι πολύπλοκων μικροοργανισμών (Narciso Je et al. 2012).

Πίνακας 2.1.: Φυσικοχημικές Ιδιότητες Ανοσοσφαιρινών

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Μοριακός τύπος	γ_2L_2	α_2L_2	$(\mu_2L_2)_5$	δ_2L_2	ϵ_2L_2
Συντελεστής Καθίζησης (S)	6-7	7	19	7-8	8
Μοριακό Βάρος (kDa)	150	160	900	180	190
Μέση συγκέντρωση στον ορό (mg/ml)	1000	6	120	3	0.05
Χρόνος ημιζωής στον ορό (ημέρες)	23	200	5	3	2

(Πηγή: Abbas KA et al. *Basic Immunology - Functions and Disorders Of The Immune System*, 2012)

2.2 Μονοκλωνικά και Πολυκλωνικά Αντισώματα

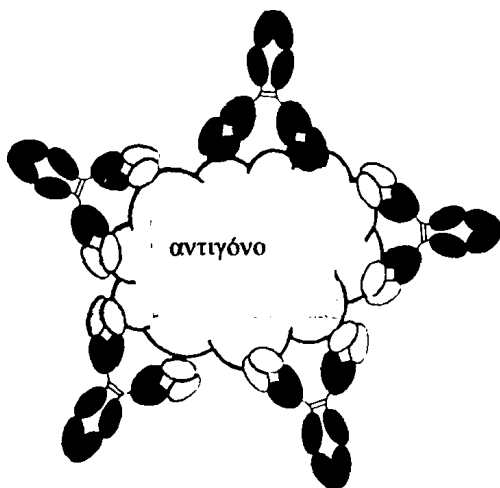
Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις μελέτες επισήμανσης, ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών IgG και σπανίως στην οικογένεια των IgM, παρασκευάζονται με ανοσοποίηση ζώων με καθαρό αντιγόνο (ολόκληρη πρωτεΐνη, πεπτίδιο, επικράτεια κλπ.) και διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα μονοκλωνικά και τα πολυκλωνικά.

Τα πολυκλωνικά αντισώματα αποτελούν ένα ετερογενές μίγμα αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στο ίδιο αντιγόνο. Προέρχονται από διαφορετικούς κλώνους Β-λεμφοκυττάρων του ζώου και διαφέρουν στις ανοσοχημικές τους ιδιότητες. Συνηθέστερα παράγονται σε κουνέλια, τα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας θεωρούνται πλέον ιδανικά, αλλά μπορούν να παραχθούν και σε άλλα θηλαστικά όπως η αίγα, ο χοίρος, το ινδικό χοιρίδιο, ο όνος και η αγελάδα.

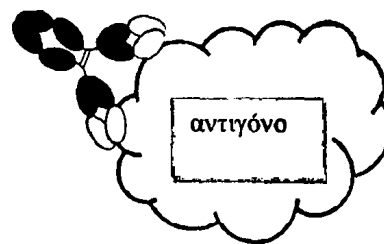
Τα **μονοκλωνικά αντισώματα** είναι ομοιογενείς πληθυσμοί ανοσοσφαιρινών που προέρχονται από ένα μοναδικό πλασματοκύτταρο με προκαθορισμένη ειδικότητα προς ένα αντιγονικό επίτοπο και δυνατότητα για *in vitro* ατέρμονα παραγωγή. Διαθέτουν παρόμοιες ανοσοχημικές ιδιότητες, παράγονται συνήθως σε ποντικούς και κουνέλια και σπανιότερα σε άλλα είδη όπως η γάτα και η καμήλα.

Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μεγάλη τους ειδικευση καθώς όταν χρησιμοποιούνται η πιθανότητα σταυρωτής αντίδρασης του αντισώματος με αντιγόνα που φέρουν επιτόπους παρόμοιους με αυτούς του υπό μελέτη αντιγόνου είναι πολύ μικρή. Αντίθετα, τα πολυκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά υψηλότερη συγγένεια και ευρύτερη δραστηριότητα όμως η πιθανότητα σταυρωτής αντίδρασης με αντιγόνα που φέρουν επιτόπους παρόμοιους με αυτούς είναι αυξημένη και επομένως, η πιθανότητα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, τα πολυκλωνικά αντισώματα έχουν το πλεονέκτημα ότι αναγνωρίζουν πιο συχνά το υπό μελέτη αντιγόνο, αφού αλληλεπιδρούν με πολλούς επιτόπους πάνω σε αυτό (Delves P.J. et al. 2011).

Πολυκλωνικό αντίσωμα



Μονοκλωνικό αντίσωμα



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση και σύγκριση πολυκλωνικών αντισωμάτων που προσδένονται στο ίδιο αντιγόνο αλλά σε διαφορετικούς επιτόπους και μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν όλα τον ίδιο επίτοπο στο αντιγόνο στόχο (Πηγή: <http://absoluteantibody.com/antibody-resources>)

2.3 Χαρακτηριστικά ενός “καλού” αντισώματος

Τα αντισώματα που είναι περισσότερο επιθυμητά για χρήση σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία και συγγένεια για το αντιγόνο στο οποίο

στοχεύουν και παράγονται σε υψηλούς τίτλους. Τα αντισώματα με αυτά τα χαρακτηριστικά προτιμώνται καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ιδιαίτερα μεγάλες αραιώσεις, στις οποίες οι ψευδώς θετικές αντιδράσεις μπορούν να αποφευχθούν. Η συγγένεια ενός αντισώματος προκύπτει από τη δύναμη της μη ομοιοπολικής πρόσδεσης του ίδιου σε μία συγκεκριμένη περιοχή του αντιγονικού μορίου (Kent U et al. 2010). Τα αντισώματα αυτά που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια, παράγονται από το ανοσοποιημένο ζώο κατά τα μεταγενέστερα στάδια της ανοσιακής απάντησης, τότε που η συγκέντρωση του αντιγόνου αρχίζει να μειώνεται. Η συγγένεια μετράται με τη σταθερά συγγένειας (K_a) και για τα “καλά” αντισώματα οι τιμές κυμαίνονται από 10^5 - 10^8 M^{-1} ανάλογα και με το αντιγόνο. Οι πιο αξιόπιστες μετρήσεις πραγματοποιούνται με τη μέθοδο της διαπίδυσης που θεωρείται κατάλληλη για αντισώματα που διαχέονται ελεύθερα στις δύο πλευρές μιας μεμβράνης διαπίδυσης.

Ο τίτλος ενός αντισώματος περιγράφει τη συγκέντρωση της ανοσοσφαιρίνης στον ορό και είναι μέτρο της μέγιστης αραιώσης στην οποία μπορεί ακόμη να ανιχνευθεί το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων μπορούν να αποκτηθούν μετά από επαναλαμβανόμενες αντιγονικές ενισχύσεις στο ζώο. Οι τίτλοι των αντισωμάτων μπορούν να προσδιοριστούν με τεχνικές όπως: η ELISA, η RIA και το Western blotting. Επιπλέον με αυτές τις μεθόδους μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα βαθμό και η ειδικότητα του αντισώματος.

Όσον αφορά τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να παρατηρηθούν συχνά σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται ως ανοσογόνα ολόκληρα πρωτεϊνικά μόρια ή ακόμη πρωτεΐνες που έχουν συζευχθεί με άλλα μόρια. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή ενός πληθυσμού αντισωμάτων που είναι ετερογενής και εμφανίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με τις προσμίξεις (Kent U et al. 2010). Τα αντισώματα αυτά θεωρείται καλό να καθαρίζονται με χρωματογραφία συγγένειας πριν χρησιμοποιηθούν σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Αντισώματα με αυξημένη ειδικότητα μπορούν να παραχθούν με τη χρήση είτε συνθετικών πεπτιδίων είτε πρωτεϊνικών τμημάτων ως αντιγόνων.

Κεφάλαιο 3
**Καθαρισμός των αντισωμάτων,
Είδη Χρωματογραφίας, Διαπίδυση**

3.Καθαρισμός των αντισωμάτων

Ο καθαρισμός των αντισωμάτων απαιτείται σε πολλές εφαρμογές αρκετών επιστημονικών πεδίων (Stec J et al. 2004). Πραγματοποιείται συνήθως με αξιοποίηση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, γεγονός που αποτελεί γενική στρατηγική καθαρισμού των βιολογικών μακρομορίων. Η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τον επιθυμητό βαθμό καθαρότητας, την ποσότητα και τη φύση του υλικού έναρξης (Layer P et al. 2000). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι διάφορες μέθοδοι χρωματογραφίας, η κατακρήμνιση και η διαπίδυση.

3.1 Καθαρισμός με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων

Η χρωματογραφία είναι μια ευρύτατα διαδεδομένη εργαστηριακή τεχνική και προσφέρεται για την ανάλυση αλλά και το διαχωρισμό σύνθετων μιγμάτων οργανικών ενώσεων. Εφευρέτης της χρωματογραφίας ήταν ο εξαιρετικά παρατηρητικός Ρώσος χημικός Μιχαήλ Σεμιόνοβιτς Τσβετ (Tswett, 1872-1919), ο οποίος κατάφερε το 1906 να ξεχωρίσει το μίγμα του εκχυλίσματος πράσινων φύλλων σε καροτένια και χλωροφύλλες, περνώντας το μέσα από μία στήλη (γυάλινο σωλήνα) γεμισμένη με κονιοποιημένη κιμωλία.

Επειδή η χρωματογράφιση ενός τέτοιου μίγματος οδήγησε σε εμφάνιση κίτρινων και πράσινων ζωνών κατά μήκος της λευκής στήλης, ο Τσβετ βάφτισε την καινούργια τεχνική χρωματογραφία. Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των χρωματογραφικών τεχνικών είναι η διανομή των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος που βρίσκονται στην χρωματογραφική στήλη μεταξύ μιας στατικής και μίας κινητής φάσης. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών του μίγματος, όπως το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία που φέρουν, το μέγεθος των μορίων, κ.α.

Συνεπώς, η κινητή φάση, διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μίγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές .



Εικόνα 3.1: Χρωματογραφικές μέθοδοι (Πηγή: <https://www.uni-ulm.de>)

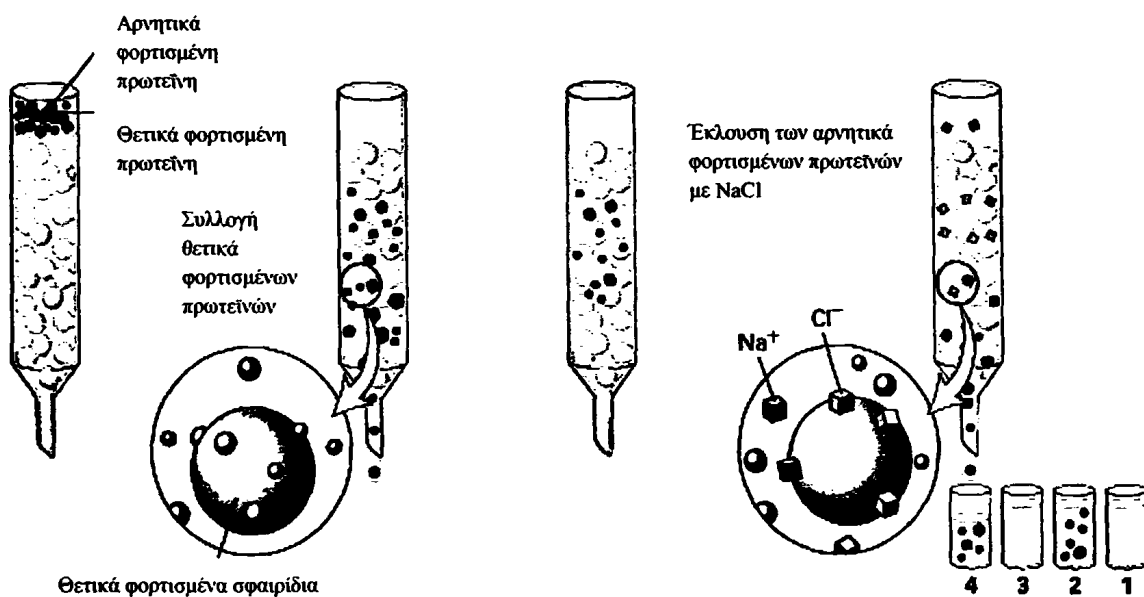
3.1.1 Χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη

Ο υδροξυ-απατίτης αποτελεί την κρυσταλλική μορφή του φωσφορικού ασβεστίου. Στην χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη οι ανοσοσφαιρίνες δένονται στη μήτρα σε pH 6,8 και εκλύονται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης από 120-300 mmol L⁻¹. Εάν απαιτούνται κλάσματα ανοσοσφαιρινών υψηλής καθαρότητας τότε η τεχνική αυτή πρέπει να συνδυάζεται με κάποια άλλη, πάλι με βάση το αρχικό υλικό (Layer P et al. 2000).

3.1.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός σε μία χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής πραγματοποιείται με αντιστρεπτή προσρόφηση ιόντων σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο προστίθεται το δείγμα και προσροφάται. Οι ουσίες που δεν συγκρατούνται από τη στήλη απομακρύνονται με προσθήκη κατάλληλου διαλύτη. Το μίγμα των συστατικών που έχουν συγκρατηθεί από τη στήλη απομακρύνονται από αυτή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ανάλογα με το φορτίο που φέρουν με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτών. Ως διάλυμα έκλυσης χρησιμοποιείται κυρίως το NaCl (Layer P et al. 2000). Επειδή οι ανοσοσφαιρίνες έχουν ένα πιο βασικό ισοηλεκτρικό σημείο από ότι οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό τους. Πρακτικά η στήλη πρέπει να πλυθεί διεξοδικά με 0.5 mol L⁻¹ HCl ή 0.5 mol L⁻¹ NaOH πριν τη χρήση της και μετά να εξισορροπηθεί με ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Layer P et al. 2000). Η μέθοδος αυτή δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την καθαρότητα των αντισωμάτων,

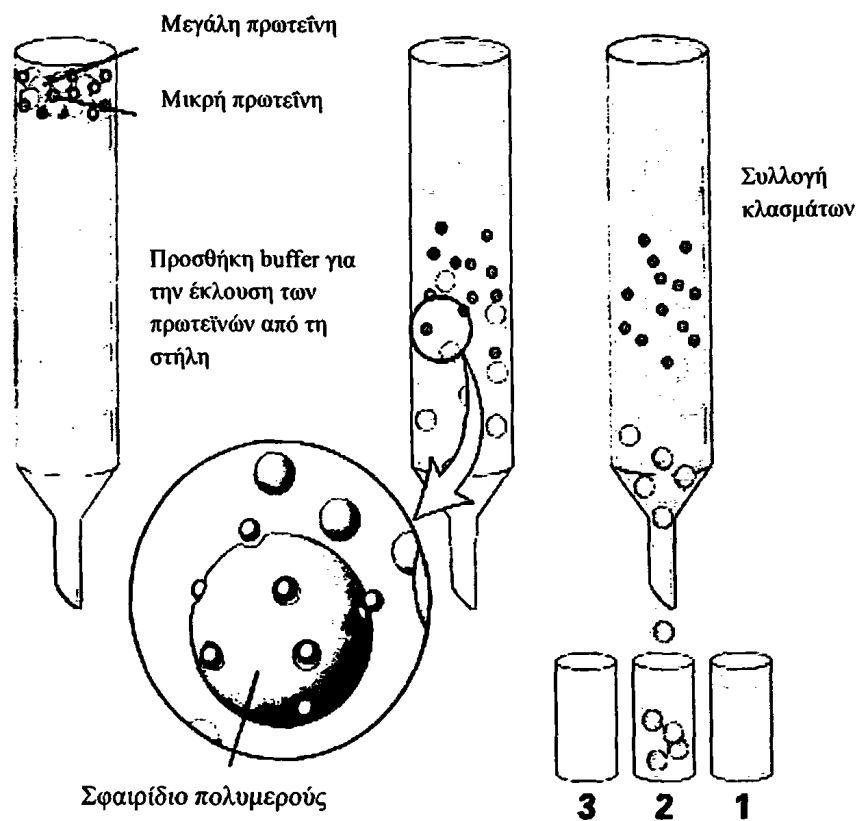
εφόσον η αρχική πηγή είναι υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας ή ασκητικό υγρό. Επιπλέον είναι οικονομική και ενδείκνυται για μεγάλες αρχικές ποσότητες.



Εικόνα 3.2: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Πηγή: <http://www.pha.jhu.edu>)

3.1.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Ο διαχωρισμός στη χρωματογραφική στήλη μοριακής διήθησης πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος των μορίων του προς ανάλυση μίγματος. Πιο συγκεκριμένα, το πληρωτικό υλικό της στήλης διαθέτει πόρους διαφόρων μεγεθών. Στους πόρους εγκλωβίζονται και περιπλανώνται τα μόρια του προς ανάλυση μίγματος, καθυστερώντας να απομακρυνθούν από τη στήλη. Όσο μικρότερο είναι το προς ανάλυση μόριο, τόσο περισσότερο παραμένει στους πόρους του πληρωτικού υλικού, και κατά συνέπεια, τόσο αργότερα εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη. Αντίθετα, τα μεγάλα μόρια δε μπορούν να χωρέσουν στους πόρους του πληρωτικού υλικού, οπότε και εκλύονται γρηγορότερα. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη με βάση το μέγεθός τους και το σχήμα τους (Layer P et al. 2000). Χρησιμοποιείται κυρίως για τον καθαρισμό της IgM και είναι καλό να συνδυάζεται με άλλες μεθόδους εάν απαιτείται η λήψη αντισωμάτων υψηλής καθαρότητας.



Εικόνα 3.3: Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Πηγή: <http://www.pha.jhu.edu>)

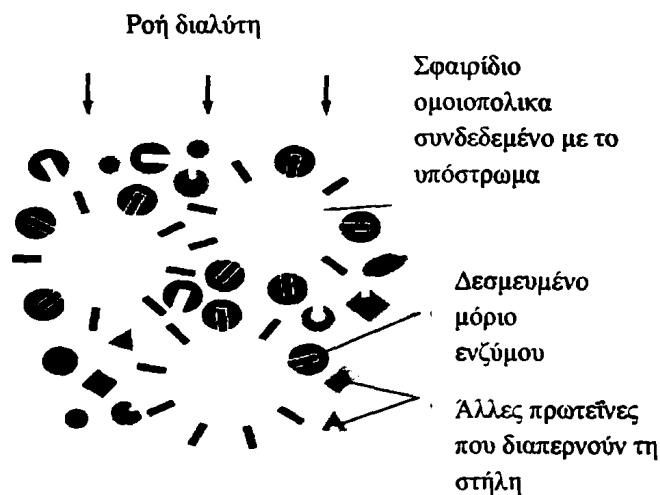
3.1.4 Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών. Η πρώτη πρωτεΐνη που εφαρμόστηκε ήταν η α-αμυλάση το 1910 (Wu M et al. 2003). Ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως τεχνική το 1968 από τον Meir Wilchek και τους συνεργάτες του (Wilchek M et al. 1968). Βασίζεται στη μοριακή αναγνώριση και η αποτελεσματικότητά της στον καθαρισμό των αντισωμάτων, σχετίζεται με την ικανότητά αυτών να αναγνωρίζουν ειδικά έναν προσροφητή συγγένειας. Αυτός αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο πρόσδεμα και τη μήτρα που δένεται το πρόσδεμα (Huse K et al. 2002). Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ειδικότητα και τα αντισώματα που λαμβάνονται είναι συνήθως υψηλής καθαρότητας (Layer P et al. 2000). Επιπλέον αποτελεί μέθοδο ενός βήματος. Τα μόρια που συνδέονται με τις ανοσοσφαιρίνες ανήκουν σε τρεις βασικές ομάδες:

- 1) τη βακτηριακή πρωτεΐνη A ή G
- 2) τα ειδικά αντιγόνα και

3) τα μονοειδικά αντισώματα που προορίζονται για τους επιτόπους των ανοσοσφαιρινών.

Στην χρωματογραφία συγγένειας τα δείγματα που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες επωάζονται σε μήτρα, η οποία αποτελείται από ένα συνδετικό μόριο της ανοσοσφαιρίνης ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε χάντρες χρωματογραφίας. Τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται με πλύσιμο και οι ειδικά συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες εκλύονται με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Τα κλάσματα που λαμβάνονται θεωρείται απαραίτητο να ελέγχονται για την ύπαρξη ανοσοσφαιρίνης με ειδικό ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας στα 280 nm.



Εικόνα 3.4: Αρχή Μεθόδου- Χρωματογραφίας συγγένειας (Πηγή: *Molecular Biology of the cell*, 4th edition)

▪ Χρωματογραφία συγγένειας που χρησιμοποιεί ακινητοποιημένη πρωτεΐνη G ή A

Η πρωτεΐνη G και η πρωτεΐνη A είναι συστατικά των τοιχωμάτων των κυττάρων του *Staphylococcus aureus* και του *Streptococcus spp.* Έχουν και οι δύο αυτές πρωτεΐνες υψηλή συγγένεια για το τμήμα Fc της IgG αλλά προσδένονται σε διαφορετικές υποτάξεις της IgG που ανήκουν και σε διαφορετικά είδη. Πιο συγκεκριμένα ενώ η πρωτεΐνη G προσδέεται σε όλες τις IgG υποτάξεις που ανήκουν στο είδος του ανθρώπου και του ποντικού, η πρωτεΐνη A εμφανίζει μικρή μόνο δεσμευτική ικανότητα για την ανθρώπινη Ig3 και την προερχόμενη από τον ποντικό Ig1. Έτοιμη προς χρήση μήτρα με ακινητοποιημένη πρωτεΐνη G ή A είναι πλέον εμπορικά

διαθέσιμη και οι πληροφορίες σχετικά με τις δεσμευτικές ικανότητες αυτών των πρωτεϊνών μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία (Layer P et al. 2000).

▪ **Χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένου αντι-αντισώματος**

Στη μέθοδο αυτή τα ακινητοποιημένα μόρια είναι οι IgGs που στοχεύουν στην αναγνώριση βαριών ή ελαφριών Ig αλυσίδων. Χρησιμοποιώντας αντισώματα διαφόρων ειδικοτήτων είναι εφικτό να απομονωθούν ολόκληρες ανοσοσφαιρίνες (χρησιμοποιώντας αντι-κ και αντι-λ αλυσίδες), ειδικοί Ig επίτοποι (χρησιμοποιώντας αντι-μ, γ, δ & ε αλυσίδες) και IgG υποτάξεις (χρησιμοποιώντας αντι-γ1, γ2, γ3 ή γ4 αλυσίδες). Η αλληλεπίδραση μεταξύ ακινητοποιημένης και στοχοποιημένης πρωτεΐνης είναι μια αλληλεπίδραση τύπου αντιγόνου αντισώματος (Layer P et al. 2000). Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί μεγάλες ποσότητες ρητίνης, πολλά ακινητοποιημένα αντισώματα και ότι μπορεί στα βιολογικά υγρά να περιέχονται και άλλες πρωτεΐνες εκτός από την IgG.

▪ **Χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση ακινητοποιημένου αντιγόνου**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή καθώς θεωρείται ιδανική για τον καθαρισμό μονοειδικών αντισωμάτων τα οποία προέρχονται από ορούς ανοσοποιημένων ζώων. Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωματογραφία ανοσο-συγγένειας καθώς βασίζεται στην ειδική αναγνώριση αντιγόνου-αντισώματος. Το πλεονέκτημα της βασίζεται στο ότι μπορεί να μας παρέχει ένα συγκεκριμένο αντίσωμα από ένα μίγμα ανοσοσφαιρινών με διαφορετικές ειδικότητες (Layer P et al. 2000).

Αρχή της μεθόδου

Αρχικά παρασκευάζεται ένα ανοσοαπορροφητικό στερεάς φάσης. Αυτό είναι το αντιγόνο συζευγμένο ομοιοπολικά σε ένα αδρανές υπόστρωμα (π.χ. διασυνδεδεμένα σφαιρίδια δεξτράνης). Στη συνέχεια το ανοσοαπορροφητικό τοποθετείται σε μία στήλη και το μείγμα των αντισωμάτων διέρχεται μέσα από αυτή υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το εναντίον του αντιγόνου αντίσωμα συνδέεται με τη στήλη ενώ τα ασύνδετα αντισώματα ξεπλένονται. Στη συνέχεια η στήλη εκλούεται για την απόκτηση του συνδεδεμένου αντισώματος χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Το διάλυμα αυτό διασπά το δεσμό αντιγόνου αντισώματος.

Πίνακας 3.1: Βιομόρια που μπορούν να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας

1. Αντισώματα και αντιγόνα	7. Ιοί & Φάγοι
2. Ένζυμα και αναστολείς	8. Κύτταρα
3. Ρυθμιστικά ένζυμα	9. Γενετικά τροποποιημένες πρωτεΐνες
4. Τρανσαμινάσες	10. RNA & DNA (γονίδια)
5. Υποδοχείς	11. Ορμόνες που προσδέονται σε πρωτεΐνες
6. Δευδρογονάσες	12. Βιταμίνες που προσδέονται σε πρωτεΐνες

(Πηγή: Wilchek M., Chaiken A.H. 1968)

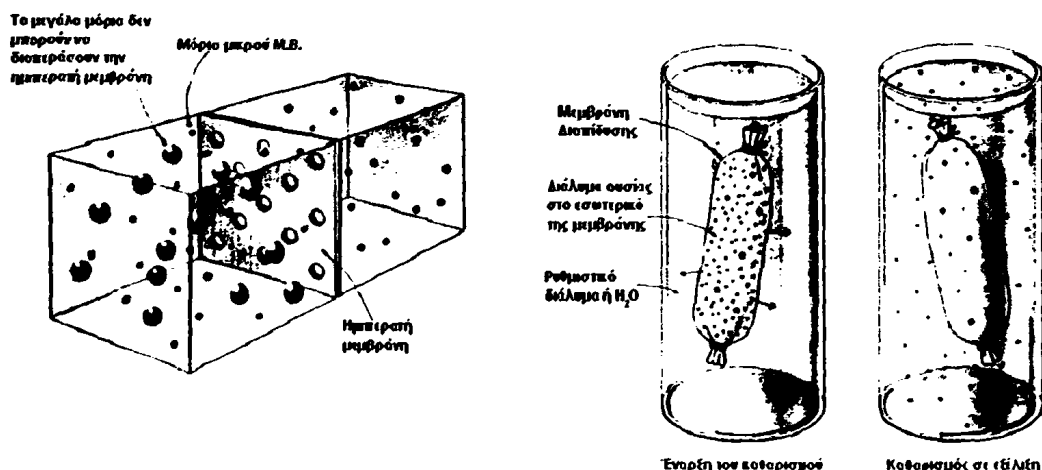
3.2 Καθαρισμός αντισωμάτων με κατακρήμνιση

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών στο νερό και κυρίως των Igs βασίζεται κυρίως στην ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ πολικών ή ιοντισμένων ομάδων και των μορίων του νερού. Αυτό υποβοηθάται και από τη διατήρηση των υδρόφοβων ομάδων που δεν αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού, στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Επιπλέον η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται και από τη θερμοκρασία. Οποιοσδήποτε εξωτερικός παράγοντας ικανός να τροποποιήσει τους δεσμούς υδρογόνου ή να μειώσει τη μέση υδροφιλικότητα θα μειώσει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών και θα οδηγήσει στην κατακρήμνισή τους. Επειδή κάθε πρωτεΐνη έχει τις δικές της ξεχωριστές φυσικοχημικές ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές κατακρήμνισης για την απομόνωση αντισωμάτων. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν: α) την κατακρήμνιση με χρήση αιθανόλης, β) την κατακρήμνιση με τη χρήση θειικού αμμωνίου και γ) την κατακρήμνιση με τη χρήση καπρυλικού οξέος.

3.3 Καθαρισμός αντισωμάτων με διαπίδυση

Η διαπίδυση είναι μία ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Η διαπίδυση, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών μορίων από μεγάλα μακρομόρια διαμέσου μεμβράνης εκλεκτικής διαπερατότητας. Βρίσκει κυρίως εφαρμογή στο διαχωρισμό μορίων από διαλύματα τα οποία περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση αλάτων. Το διάλυμα που πρόκειται να υποστεί διαπίδυση τοποθετείται σε σωλήνα που σφραγίζεται με την ειδική μεμβράνη διαπίδυσης και βυθίζεται σε δοχείο με συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα μικρά διαλυτά μόρια έρχονται σε ισορροπία μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Η κίνηση των μικρών διαλυτών μορίων ακολουθείται από κίνηση του διαλύτη προς την αντίθετη κατεύθυνση. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά κατασκευασμένες, ώστε οι πόροι που διαθέτουν να εμποδίζουν τη μετακίνηση μορίων που υπερβαίνουν κάποιο συγκεκριμένο μοριακό βάρος. Έτσι το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης θα πρέπει να είναι πολύ μικρότερο από το μακρομόριο ενδιαφέροντος (Στρογγύλης Κ. 2008).

Μεθοδολογία Διαπίδυσης



Εικόνα 3.5: Απεικόνιση της μεθόδου της διαπίδυσης (Πηγή: Στρογγύλης Κ. 2008)

Κεφάλαιο 4

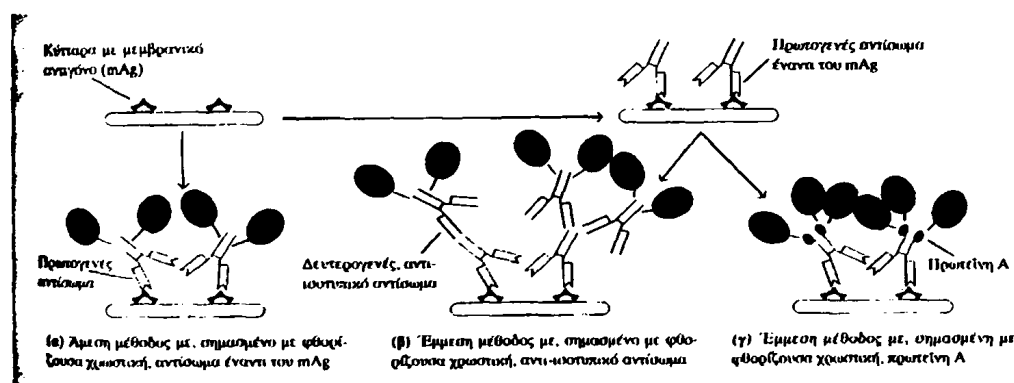
Επισήμανση των Αντισωμάτων Η ανοσοενζυμική μέθοδος E.L.I.S.A

4.1 Επισήμανση των αντισωμάτων

Η χρήση ειδικών αντισωμάτων επισημασμένων με φθορίζουσα χρωστική για τον εντοπισμό ουσιών σε ιστούς επινοήθηκε από τον A. H. Coons και τους συνεργάτες του το 1955 (Coons & Kaplan 1950, Coons A.H. et al. 1955). Ένα επισημασμένο αντίσωμα μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε το ίδιο όταν βρίσκεται σε μίγμα με άλλα μόρια αλλά και το ειδικό για αυτό αντιγόνο, λόγω της υψηλής μεταξύ τους συγγένειας. Υπάρχουν δύο μέθοδοι επισήμανσης, η άμεση και η έμμεση.

Στην άμεση επισήμανση, το σήμα προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Στην έμμεση μέθοδο, το μη επισημασμένο αντίσωμα συνδέεται με το αντιγόνο και το σύμπλεγμά τους αναγνωρίζεται από ένα δευτερογενές αντι-αντίσωμα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομακρύνονται με πλύσιμο τα μη συνδεδεμένα αντισώματα. Το αντίσωμα το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο ονομάζεται πρωτογενές. Το αντίσωμα αυτό είναι επισημασμένο μόνο στην άμεση και όχι στην έμμεση επισήμανση.

Η άμεση επισήμανση πλεονεκτεί στο ότι είναι πιο γρήγορη ως μέθοδος και στο ότι οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του δευτερογενούς αντισώματος, εξαλείφονται. Ωστόσο παρέχει μικρή ενίσχυση σήματος και η ανοσοδραστικότητα του πρωτογενούς αντισώματος μπορεί να μειωθεί ως αποτέλεσμα της επισήμανσης. Όσον αφορά την έμμεση επισήμανση, στη μέθοδο αυτή αυξάνεται η ευαισθησία καθώς το κάθε πρωτογενές αντίσωμα περιέχει αρκετούς επιτόπους που αναγνωρίζονται από το δευτερογενές επισημασμένο αντίσωμα, επιτρέποντας και την ενίσχυση του σήματος. Όμως ως μέθοδος είναι πιο χρονοβόρα και επίσης μπορεί να προκύψουν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με το δευτερογενές αντίσωμα.



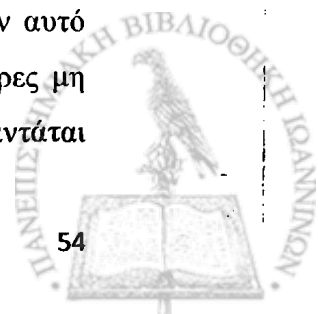
Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων στην άμεση και την έμμεση επισήμανση (Πηγή: *Immunocytochemical methods and protocols*)

4.2 Είδη Φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται

Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι εξής: η **φλουορεσκεΐνη**, η **φυκοερυθρίνη**, το **κόκκινο του Τέξας** και η **ροδαμίνη**. Οι χρωστικές αυτές διαφέρουν στις οπτικές τους ιδιότητες, όπως η πυκνότητα, η περιοχή του φάσματος στην οποία απορροφούν και ο φθορισμός. Η επιλογή της χρωστικής εξαρτάται από την τεχνική που θα εφαρμόσουμε. Για μέγιστη ευαισθησία στην πρόσδεση χρησιμοποιείται η φλουορεσκεΐνη επειδή επιτυγχάνει μεγάλη απόδοση. Εάν ο προσδέτης θα χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το μικροσκόπιο φθορισμού, τότε συνίσταται η χρήση της ροδαμίνης καθώς εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία για τα περισσότερα μικροσκόπια και λιγότερο φωτοαποχρωματισμό σε σύγκριση με τη φλουορεσκεΐνη. Το κόκκινο του Τέξας είναι μια κόκκινη χρωστική με φάσμα που συμπίπτει ελάχιστα με αυτό της φλουορεσκεΐνης, οπότε οι δύο αυτές χρωστικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές που απαιτούνται παραπάνω από ένα χρώματα. Η φυκοερυθρίνη είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 240 kDa, είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτή και προέρχεται από τα κυανοβακτήρια και τα ευκαρυωτικά φύκια. Χρησιμοποιείται κυρίως στην κυτταρομετρία ροής αλλά και σε ανοσολογικές δοκιμασίες.

Οι θειόλες και οι αμίνες είναι οι δύο ομάδες οι οποίες απαντώνται στα βιομόρια και μπορούν να τροποποιηθούν αξιόπιστα σε υδατικά διαλύματα. Πρακτικά όλες οι πρωτεΐνες έχουν κατάλοιπα λυσίνης και οι περισσότερες διαθέτουν ένα ελεύθερο αμινοτελικό άκρο. Η ε-αμινοομάδα της λυσίνης είναι βασική και μπορεί να αντιδράσει με ακυλιωτικούς παράγοντες. Η συγκέντρωση της ελεύθερης βάσεων μορφής των αλειφατικών αμινών σε pH κάτω από 8,5 είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Ωστόσο η κινητική των ακυλιωτικών αντιδράσεων των αμινών, με ισοθειοκυανικά και εστέρες είναι ισχυρά pH εξαρτώμενη. Παρά το γεγονός ότι οι αντιδράσεις ακυλίωσης πρέπει να πραγματοποιούνται σε pH πάνω από 8,5, οι ακυλιωτικοί παράγοντες κατακρημνίζονται με την παρουσία νερού, με το ποσοστό της κατακρήμνισης να αυξάνει με την αύξηση του pH. Έτσι τιμές pH 8,5-9,5 θεωρούνται συχνά ιδανικές για την τροποποίηση των λυσινών.

Τα αντισώματα που θα επισημανθούν θεωρείται καλό να είναι καθαρά, όταν αυτό είναι δυνατό. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει λιγότερος θόρυβος και μικρότερες μη ειδικές-μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις. Το πιο σημαντικό πρόβλημα που απαντάται



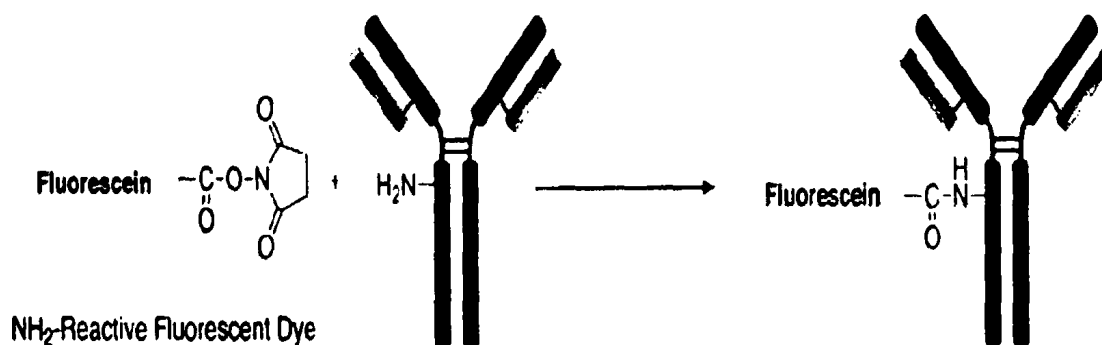
στα πειράματα επισήμανσης είναι η λιγότερη ή η περισσότερη από την επιθυμητή σήμανση αντίστοιχα. Όμως αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με απλές μετρήσεις της απορρόφησης.

▪ Φλουορεσκεΐνη

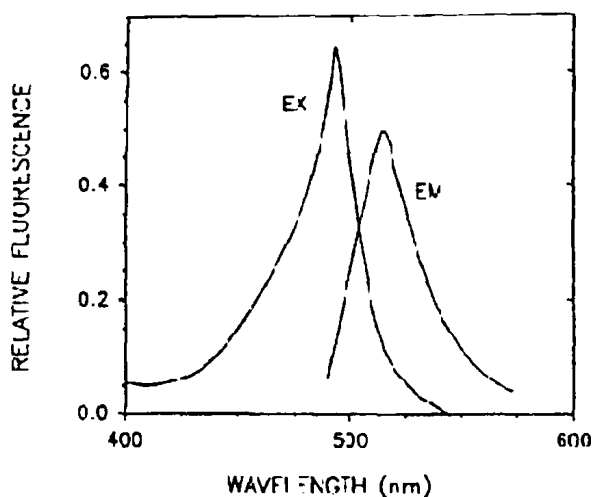
Η φλουορεσκεΐνη αποτελεί μία οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ευρύτατα για διαδικασίες ανοσοφθορισμού. Απορροφά μπλε φως (490nm) και εκπέμπει έντονο κίτρινο-πράσινο φθορισμό (517nm). Η αποτελεσματικότητά της στη μικροσκοπία ανοσοφθορισμού καθιερώθηκε από το 1950 μέσα από τις εργασίες του Albert Coons και των συνεργατών του.

Η εκτομή πράσινου χρώματος από την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) αποδείχθηκε να δίνει ισχυρό σήμα, το οποίο διαχωρίζεται αρκετά καλά από το μπλε χρώμα που παράγουν λόγω του αυτοφθορισμού τους τα κύτταρα. Η συνεχόμενη χρήση της φλουορεσκεΐνης από τότε επιβεβαιώνει τη χρησιμότητά της. Η πρόσδεση της σε ένα αντίσωμα μειώνει την κβαντική απόδοση του στο μισό (από 0.85 σε 0.5-0.3). Ωστόσο η προσδεμένη στο αντίσωμα φλουορεσκεΐνη παρέχει καλή πυκνότητα φθορισμού και αυτό ενισχύεται από το μικρό της μέγεθος και την υδροφιλικότητά της. Η χρωστική αυτή είναι ευαίσθητη στις αλλαγές του pH και το μέγιστο του φθορισμού της επιτυγχάνεται σε pH: 8,0-9,0.

Τελευταία έχουν βρεθεί και άλλα φθοριοχρώματα που φαίνεται να ξεπερνάνε κάποιους περιορισμούς της φλουορεσκεΐνης, όπως η BODIPY FL, η Oregon Green 488 και η Alexa 488.



Εικόνα 4.2: Παρουσίαση της επισήμανσης αντισώματος με τη φλουορεσκεΐνη (Πηγή: <http://www.dojindo.com/store/p/60-Fluorescein-Labeling-Kit-NH2.html>)



Εικόνα 4.3: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του παραγώγου φλουορεσκεΐνης DTAF (Πηγή: *Immunocytochemical methods and protocols*)

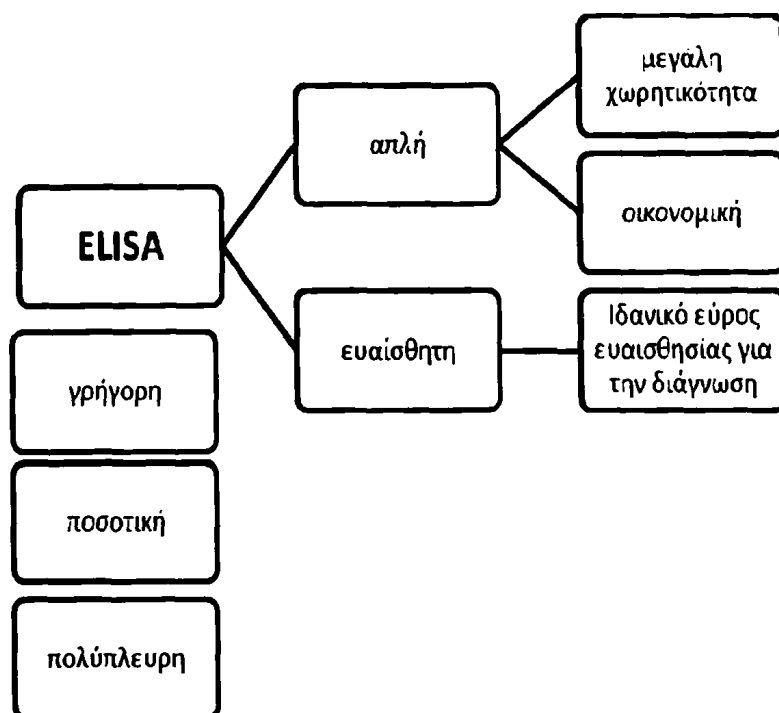
4.3 Ανοσοενζυμική Μέθοδος-ELISA

Η E.L.I.S.A (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) είναι μία τεχνική στην οποία, ένα ένζυμο που αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα και παράγει ένα έγχρωμο προϊόν, συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα αντιγόνο στόχο (Gan SD et al. 2013). Εάν υπάρχει αντιγόνο τότε το σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου θα δεσμευθεί σε αυτό και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας το χρωμοφόρο προϊόν. Επομένως η παρουσία του χρωμοφόρου προϊόντος καθορίζει την ύπαρξη του αντιγόνου.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην ELISA είναι η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση και η β-γαλακτοσιδάση. Όπως στην επισήμανση, έτσι και στην ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο πολυκλωνικά όσο και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα πολυκλωνικά πλεονεκτούν στο ότι αναγνωρίζουν ένα μίγμα επιτόπων του αντιγόνου και παρουσιάζουν ανεκτικότητα στις μικρές αλλαγές στη φύση του μορίου του αντιγόνου (Stryer L et al. 2002). Ωστόσο παρουσιάζουν μεταβλητή συγγένεια και ορισμένες φορές είναι απαραίτητο να υποστούν εκτεταμένες διαδικασίες καθαρισμού για την αποφυγή διασταυρωτών αντιδράσεων.

Έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός παραλλαγών ELISA, επιτρέποντας τον ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό είτε του αντιγόνου είτε του αντισώματος. Κάθε τύπος ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοτικά για την ανίχνευση της παρουσίας του αντισώματος ή του αντιγόνου.

Παρακάτω θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στην άμεση ELISA, στην έμμεση ELISA στην ELISA τύπου sandwich και στη συναγωνιστική ELISA.



Εικόνα 4.4: Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηριστικών της ELISA (Πηγή: *The ELISA Guidebook* (Ιδία επεξεργασία))

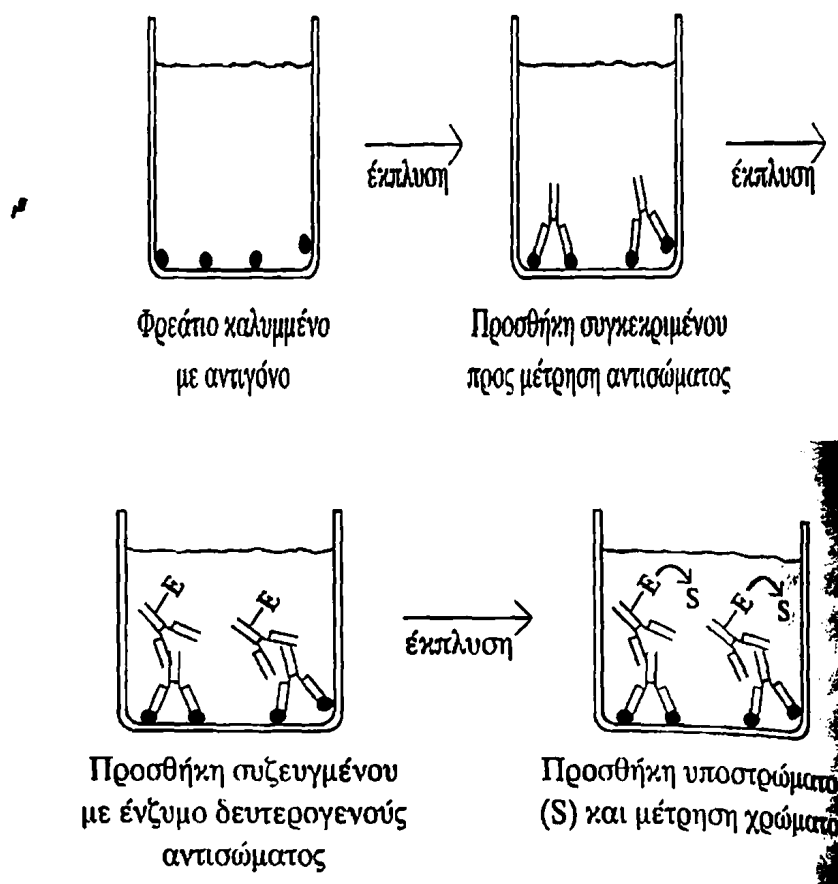
4.3.1 Άμεση ELISA

Η άμεση ELISA είναι η πιο απλή τεχνική που μπορεί να ακολουθηθεί. Το αντίσωμα ή το αντιγόνο έρχεται σε επαφή με μία στερεά φάση και στη συνέχεια αντιδρά άμεσα με ένα αντιγόνο ή αντίσωμα αντίστοιχα το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη (Stryer L et al. 2002).

4.3.2 Έμμεση ELISA

Με την έμμεση ELISA μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά ένα αντίσωμα. Ορός ή κάποιο άλλο δείγμα που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα, προστίθεται σε φρεάτιο μικροτιτλοδότησης που είναι επικαλυμμένο με το αντιγόνο και αφήνεται να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο αντιγόνο του φρεατίου. Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων μορίων του πρωτογενούς αντισώματος με εκπλύσεις, η παρουσία αντισώματος δεσμευμένου στο αντιγόνο ανιχνεύεται με την προσθήκη συζευγμένου

με αντίσωμα δευτερογενούς αντι-ισοτυπικού αντισώματος (Ab₂), το οποίο δεσμεύεται στο πρωτογενές αντίσωμα (Stryer L et al. 2002). Τα ελεύθερα μόρια Ab₂ απομακρύνονται με εκπλύσεις και στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης μετράται με ειδικούς φασματοφωτομετρικούς μετρητές πλακών, που μπορούν να μετρήσουν την απορρόφηση από όλα τα φρεάτια μιας πλάκας 96 θέσεων σε δευτερόλεπτα. Η έμμεση ELISA είναι η μέθοδος που επιλέγεται για την ανίχνευση της παρουσίας αντισωμάτων στον ορό έναντι του ιού της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV), του υπεύθυνου παράγοντα του AIDS.



Εικόνα 4.5: Έμμεση ELISA-Αρχή της μεθόδου (Πηγή : Stryer L et al. 2002)

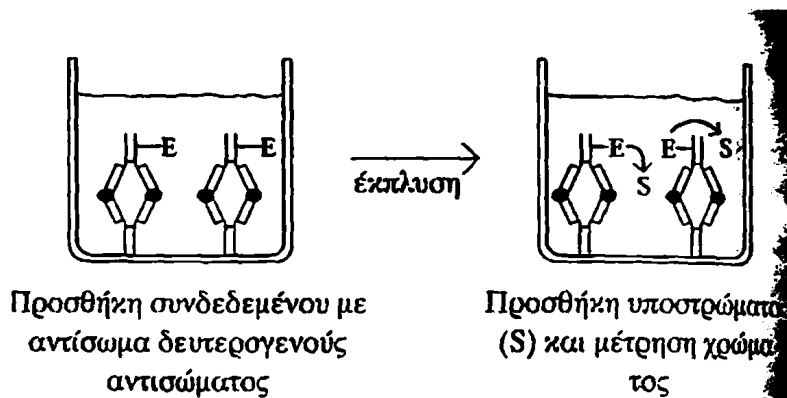
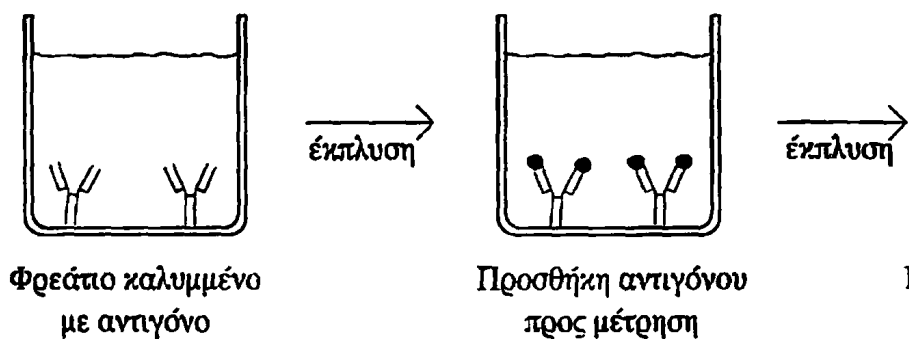
4.3.3 ELISA τύπου Sandwich

Η μορφή αυτή της ELISA θεωρείται η πιο εξειδικευμένη και η πιο ευαίσθητη. Στην τεχνική αυτή το αντιγόνο συνδέεται με δύο αντισώματα, το αντίσωμα δέσμευσης και

το αντίσωμα ανίχνευσης. Μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους τύπους, την άμεση και την έμμεση.

Στην άμεση μορφή, τοποθετείται σε φρεάτιο μικροτιτλοδότησης το αντίσωμα αντί για το αντιγόνο. Στη συνέχεια προστίθεται ένα δείγμα που περιέχει αντιγόνο και αφήνεται να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά την έκπλυση του φρεατίου, ένα δευτερογενές συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα με ειδικότητα έναντι διαφορετικού επιτόπου του αντιγόνου προστίθεται και αφήνεται να αντιδράσει με το δεσμευμένο αντιγόνο. Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων δεσμευμένων αντισωμάτων με έκπλυση, προστίθεται το υπόστρωμα και μετράται το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης.

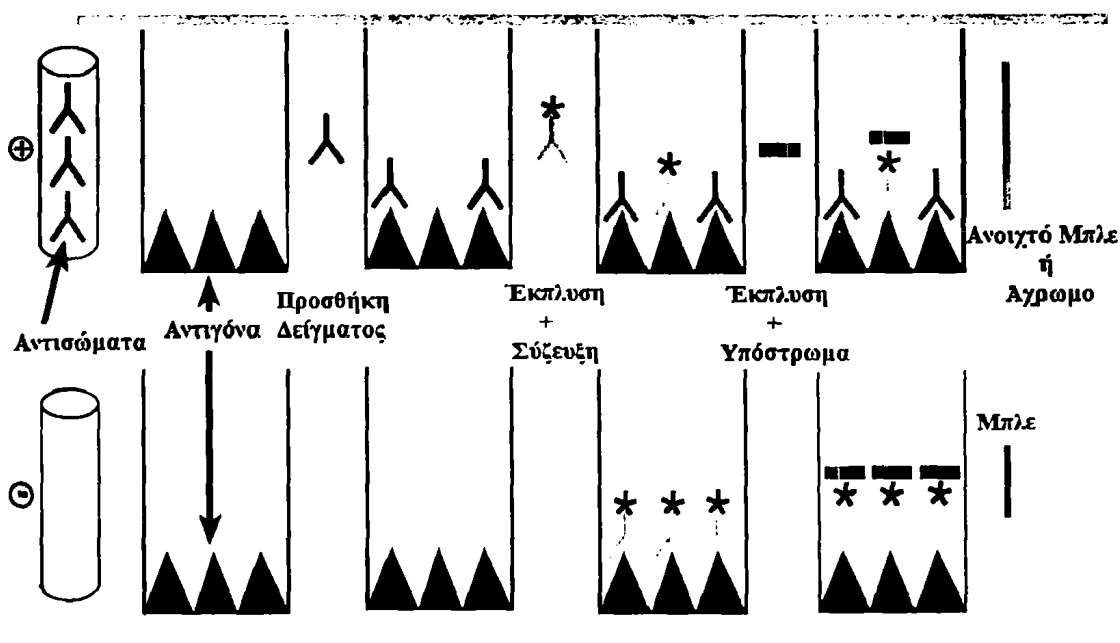
Στην έμμεση ELISA το αντίσωμα ανίχνευσης είναι από διαφορετικό ζωικό είδος από το αντίσωμα δέσμευσης



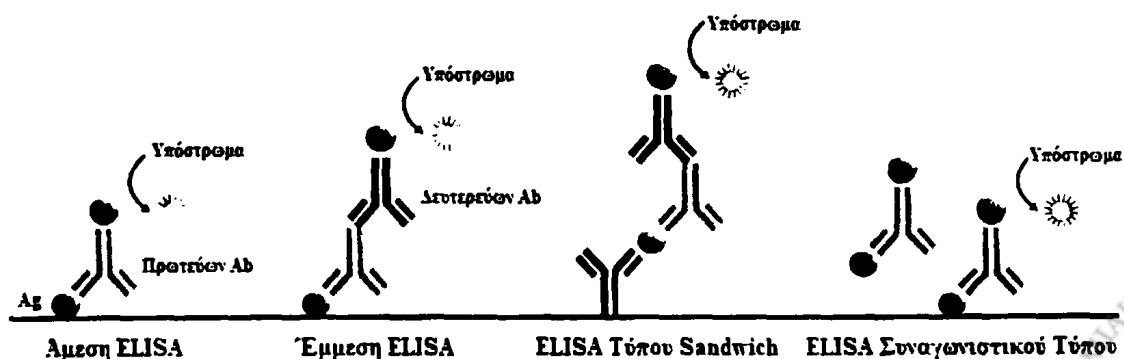
Εικόνα 4.6: ELISA τύπου sandwich-Αρχή της μεθόδου (Πηγή : Stryer L et al. 2002)

4.3.4 Συναγωνιστική ELISA

Η ELISA αυτού του τύπου, μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση, αντιγόνου ή αντισώματος. Στη συναγωνιστική ELISA δύο αντιδρώντα (αντιγόνα ή αντισώματα) προσπαθούν να συνδεθούν με ένα τρίτο. Στην τεχνική αυτή το αντίσωμα αρχικά επωάζεται σε διάλυμα με δείγμα που περιέχει το αντιγόνο. Το μίγμα αντιγόνου-αντισώματος προστίθεται στη συνέχεια σε φρεάτιο μικροτιτλοδότησης επικαλυμμένο με αντιγόνο. Προστίθεται συζευγμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα με ειδικότητα έναντι του ισοτύπου του πρωτογενούς αντισώματος προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα του κύριου αντισώματος δεσμευμένου στο φρεάτιο όπως και στην έμμεση ELISA. Στη συναγωνιστική δοκιμασία όμως όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο αρχικό δείγμα τόσο χαμηλότερη είναι η απορρόφηση.



Εικόνα 4.7: Η συναγωνιστική ELISA (Πηγή: <http://www.elisa-antibody.com>)



Εικόνα 4.8: Απεικόνιση όλων των μεθόδων ELISA (Πηγή: <http://www.abnova.com>)

Σκοπός της μελέτης



Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών και μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου, τόσο στην Ευρώπη όσο και παγκοσμίως (Wong N.D. et al, 2014). Παρά την υψηλή θνησιμότητα που εμφανίζουν, είναι τα κατεξοχήν αποτρέψιμα νοσήματα. Έτσι η έγκαιρη διάγνωση τους αποτελεί επιτακτική ανάγκη όχι μόνο σε κλινικό αλλά και σε ερευνητικό επίπεδο.

Η χρήση των βιοδεικτών τα τελευταία 40 χρόνια, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην πρόωμη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I, cTnI σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένα αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά παρήχθησαν με ανοσοποιήσεις σε πειραματόζωα και μάλιστα σε δύο διαφορετικά μοντέλα ζώων (στο κουνέλι και στην όρνιθα, (Μπάτση Χ. 2014)). Στη συνέχεια καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και διαπίδυση και επισήμανθηκαν με φλουορεσκεΐνη.

Οι ανοσοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC4[cTnI-(19-31)]4-OH. Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα επιλέχθηκε διότι η αμινοξική αλληλουχία (RRRSSNYRAYATE) του επιτόπου (cTnI19-31), ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Επιπλέον, η ομολογία του σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της cTnI.

Τα αντισώματα αυτά που αναγνωρίζουν ισχυρά την τροπονίνη θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανάπτυξη και τη βελτίωση μιας δοκιμασίας ELISA η οποία θα διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και θα στηρίζεται στη χρήση ενός πρωτότυπου ισχυρού αντιγόνου και ενός μόνο επισημασμένου αντισώματος.

Κεφάλαιο 5
Πειραματικό Μέρος

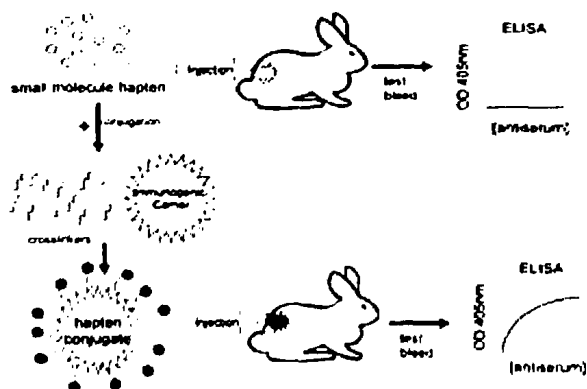


Εισαγωγή

Έχει αποδειχθεί ότι η πρόσδεση γραμμικών επιτόπων στον τετραμερή ολιγοπετιδικό φορέα SOC₄, έχει συμβάλει στην ενίσχυση της ανοσογονικότητάς τους, αλλά και της σταθερότητας των εν λόγω επιτόπων έναντι διαφόρων μηχανισμών αποικοδόμησης (πεπτιδάσες). Έχει παράλληλα δειχθεί ότι τα αντισώματα που αναπτύσσονται (μετά από ανοσοποιήσεις πειραματόζωων) από τα ανοσογονικά αυτά συμπλέγματα, αναγνωρίζουν εξίσου καλά τόσο τα μακρομόρια από τα οποία προήλθαν, όσο και τα ελεύθερα γραμμικά πεπτίδια. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι ο φορέας SOC επάγει την παραγωγή υψηλών τίτλων αντισωμάτων, απολύτως έναντι των πεπτιδικών αντιγόνων που φέρει, αποτελώντας ένα ιδανικό υπόστρωμα για ισχυρές και εξειδικευμένες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Πιο συγκεκριμένα, οι ανοσοποιήσεις των πειραματόζωων (κουνέλια) με το ανοσογονικό συμπλέγμα της παρούσας έρευνας, διεξήχθησαν με τη βοήθεια του συναδέλφου κ. Χρήστο Παπαδόπουλου, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η απομόνωση των αντισωμάτων καθώς και τα ELISA πειράματα που ακολούθησαν και ο προκαταρκτικός καθαρισμός των παραχθέντων αντισωμάτων, εκτελέστηκαν και ολοκληρώθηκαν στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στις επόμενες παραγράφους γίνεται αναλυτική περιγραφή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των ανοσοποιήσεων καθώς και των ELISA πειραμάτων.



Εικόνα 5.1: Απεικόνιση διαδικασίας ανοσοποιήσεων κουνελιών (<http://www.abcam.com/primary-antibodies/developing-custom-rabbit-monoclonal-antibodies-against-small-molecule-haptens>)

(Πηγή:



5.1. Διαδικασία ανοσοποιήσεων κουνελιών

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ανοσοποιήθηκαν λευκά θηλυκά κουνέλια ράτσας Νέας Ζηλανδίας, με το ανοσογονικό συμπλέγμα **Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]4-OH**. Το πρωτόκολλο των ανοσοποιήσεων που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Πριν την έναρξη των ανοσοποιήσεων πραγματοποιήθηκε μια πρώτη αιμοληψία των κουνελιών και οι οροί που συλλέχθηκαν (μετά από φυγοκέντρηση), αποτέλεσαν τους ορούς “μάρτυρες” (preimmune) για τις δοκιμασίες ELISA που εκτελέστηκαν στη συνέχεια.
2. Κατά την πρώτη ανοσοποίηση τα ανοσογονικά συμπλέγματα κατεργάστηκαν με το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund’s Adjuvant) και τα γαλακτώματα που σχηματίστηκαν ενέθηκαν στα αντίστοιχα κουνέλια, στο σύνολό τους υποδόρια (2-3 εκχύσεις)
3. Μετά από περίπου 20 μέρες (ανάλογα με την περίπτωση), πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες αιμοληψίες των ανοσοποιημένων πλέον κουνελιών. Κατά τη διάρκεια των αιμοληψιών τα αίματα παρέμειναν για περίπου 30 λεπτά σε συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 στροφές για 10 λεπτά (2 φορές). Οι οροί που συλλέχθηκαν αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.
4. Από τη δεύτερη ανοσοποίηση και στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με το εκάστοτε ανοσογονικό σύμπλεγμα και το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (Incomplete Freund’s Adjuvant, IFA). Αντίστοιχα, έπειτα από 2-3 περίπου εβδομάδες πραγματοποιήθηκε και η δεύτερη αιμοληψία.
5. Στη συνέχεια διεξήχθησαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ανοσοποιήσεων και αιμοληψιών, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Πίνακας 5.1 Ανοσοποιήσεις κουνελιών

1^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη: Pre Immune Ανοσοποίηση: 1,5 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Complete Freud Adjuvant (CFA)
16^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0.75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
23^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη: 1^η Αιμοληψία
34^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη: 2^η Αιμοληψία Ανοσοποίηση: 0.75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
49^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0.75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
56^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη: 3^η Αιμοληψία
70^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0.75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
77^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη: 4^η Αιμοληψία
92^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0.75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μl H ₂ O και 750μl Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
100^η ημέρα	Αιμοληψία (15-20 ml) Ένδειξη 5^η Αιμοληψία
107^η ημέρα	Αιμοληψία (15–20 mL) Ένδειξη: 6^η Αιμοληψία

5.2 Δοκιμασία ELISA

Ακολούθησε μια σειρά από ELISA δοκιμασίες, με στόχο τον πλήρη χαρακτηρισμό των παραχθέντων αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι δοκιμασίες περιελάμβαναν:

- τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των παραχθέντων αντισωμάτων από τα αντίστοιχα ανοσογονικά συμπλέγματα,
- τη μελέτη του ανταγωνισμού μεταξύ πεπτιδικών μακρομορίων και γραμμικών επιτόπων για τα αντίστοιχα παραχθέντα αντισώματα, με στόχο τη διερεύνηση της δοσοεξαρτώμενης εξειδίκευσης των πρώτων έναντι των τελευταίων

- και τέλος τη μελέτη της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής και σκελετικής τροπονίνης από τα ειδικά αντισώματα των παραχθέντων αντιορών

Βήμα 1ο: Επίστρωση των ανοσογονικών συμπλεγμάτων (Coating)

Τα πεπτιδικά μακρομόρια επιστρώθηκαν σε πλακίδια ELISA των 96 φρεατίων (NUNC), σε συγκέντρωση 5μg/ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,2M Na₂CO₃-NaHCO₃, pH=9,6 (100μl/φρεάτιο). Ακολούθησε επώαση 24ώρου στους 4⁰C, ώστε να λάβει χώρα η επαρκής προσρόφηση των αντιγόνων στη στερεή επιφάνεια των πλακιδίων. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκπλύσεις των πλακιδίων, με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος (αποβουτυρωμένο, Regilait) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffer Saline) (w/v), pH=7,4 (4 φορές x 200μl/well και 1 x 400μl/well).

Βήμα 2ο: Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης (Blocking)

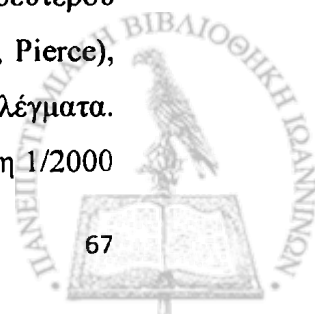
Η κάλυψη της στερεής επιφάνειας των πλακιδίων από τα μόρια επίστρωσης, είναι αποδεδειγμένα αρκετά μικρότερη της μέγιστης δυνατής. Για το λόγο αυτό έλαβε χώρα έμφραξη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης, κατόπιν επώασης με διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v), pH=7,4 (200μl/φρεάτιο) υπό ανάδευση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν οι απαραίτητες εκπλύσεις των πλακιδίων με το αντίστοιχο διάλυμα γάλακτος (4 φορές x 200μl/well και 1 x 400μl/well).

Βήμα 3ο: Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος

Η αλληλεπίδραση των προσροφημένων (στην επιφάνεια των πλακιδίων) ανοσογονικών συμπλεγμάτων με τα παραχθέντα αντισώματα, επετεύχθη κατόπιν επώασης με τους αντίστοιχους ορούς των ανοσοποιημένων κουνελιών, σε αραιώσεις από 1/100 έως 1/5000 (v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο). Τα πλακίδια μεταφέρθηκαν σε συνθήκες συντήρησης (4 ⁰C), περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση 24ώρου. Ακολούθησαν σχολαστικές εκπλύσεις των πλακιδίων (4 φορές x 200μl/well και 1 x 400μl/well).

Βήμα 4ο: Προσθήκη υποστρώματος αντί-αντισώματος

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την προσθήκη ενός δεύτερου επισημασμένου με υπεροξειδάση αντισώματος (goat anti-rabbit IgG (H+L), Pierce), το οποίο αναγνωρίζει και προσκολλάται στα εκάστοτε προσροφημένα συμπλέγματα. Η επώαση με το συγκεκριμένο αντι-αντίσωμα πραγματοποιήθηκε σε αραιώση 1/2000



(v/v), σε διάλυμα 3% σκόνης γάλακτος/PBS (w/v) pH=7,4, (100μl/φρεάτιο), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση και αυτού του σταδίου, διεξήχθησαν οι απαραίτητες για τη συνέχεια εκπλύσεις των πλακιδίων με PBS (4 φορές x 200μl/well και 1 x 400μl/well).

Βήμα 5ο: Ενζυμική αντίδραση

Η μέτρηση της ενζυμικής δράσης των παραπάνω συμπλεγμάτων, δηλαδή ο ποσοτικός προσδιορισμός των ειδικών για τα αντιγόνα αντισωμάτων, έγινε με τη χρήση του ειδικού υποστρώματος, της 3,3',5,5'-τετραμέθυλο βενζιδίνης (TMB substrate kit, Pierce) (100μl/φρεάτιο). Αρχικά επιστρώθηκαν 50 μl/well διαλύματος A και ακολούθησε γρήγορη επίστρωση του διαλύματος B (50 μl/well). Η αντίδραση έλαβε χώρα για 6-8 λεπτά σε σκότος και διακόπηκε (μετά την ολοκλήρωσή της) με διάλυμα θεικού οξέος 2M. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, έχει την ιδιότητα να δίνει διαλυτά και έγχρωμα προϊόντα ενζυμικής αντίδρασης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο ακριβείς μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (O.D.). Οι μετρήσεις των ELISA δοκιμασιών πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο SIRIO-S (SEAC-RADIM) στα 450nm.

Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή του διαλύματος Coating Buffer CO_3^{2-} (PH=9.6)

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζουμε τα εξής: 1,59 gr Na_2CO_3 , 2.93 gr $NaHCO_3$, 0.20 gr NaN_3 και τα διαλύουμε σε H_2O (τελικός όγκος 1 lt).

Παρασκευή διαλύματος PBS:

160 gr $NaCl$, 4 gr KCl , 4gr KH_2PO_4 , 24 gr $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ διαλύονται σε 2 lt H_2O και ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να είναι 7,2

Παρασκευή υποστρώματος TMB

Διάλυμα A (Peroxidase Substrate TMB): Αραίωση με H_2O 1:1

Διάλυμα B (Peroxide Solution H_2O_2): Αραίωση με H_2O 1:1 (Thermo Scientific)

Παρασκευή διαλύματος του αντιγονικού πεπτιδίου (stock solution)

1 mg πεπτιδίου διαλύεται σε 1 ml H_2O και αποθηκεύεται στην κατάψυξη

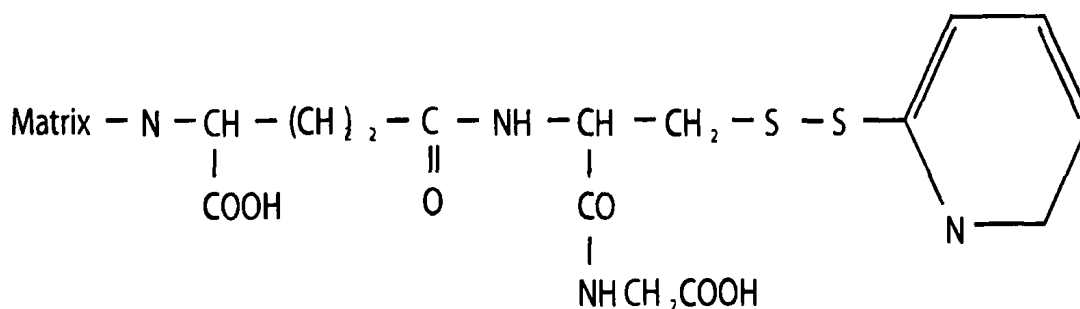
5.3 Καθαρισμός Αντισωμάτων

Ο καθαρισμός των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απόκτηση αντισωμάτων υψηλής καθαρότητας και μεγαλύτερης ειδικότητας. Ο καθαρισμός τους πραγματοποιήθηκε με δύο ξεχωριστές μεθόδους. Για τα αντισώματα που παρήχθησαν από τις ανοσοποιήσεις των κουνελιών χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία συγγένειας ενώ για τα αντισώματα που παρήχθησαν από τις ανοσοποιήσεις των ορνίθων ακολουθήθηκε η μέθοδος της διαπίδυσης.

5.3.1 Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας εφαρμόστηκε για τον καθαρισμό των αντισωμάτων που εμφάνισαν τους υψηλότερους τίτλους. Τα αντισώματα αυτά προέρχονταν από την 2^η και την 3^η αιμοληψία. Παρακάτω αναλύονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν.

Η μήτρα (matrix) που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Activated Thiol Sepharose 4B, η οποία αντιδρά με διαλύτες που περιέχουν ομάδες θειόλης για το σχηματισμό δισουλφιδίων. Η αντίδραση αυτή αποτελεί τη βάση της χρωματογραφίας συγγένειας και μία διαδικασία ακινητοποίησης βιομορίων που περιέχουν θειόλες. Η χημική της δομή απεικονίζεται στο σχήμα 5.1.3:



Εικόνα 5.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής της μήτρας (matrix) που χρησιμοποιήθηκε

Αρχικά, προετοιμάστηκαν η μήτρα και η στήλη για την έναρξη της διαδικασίας της χρωματογραφίας. Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

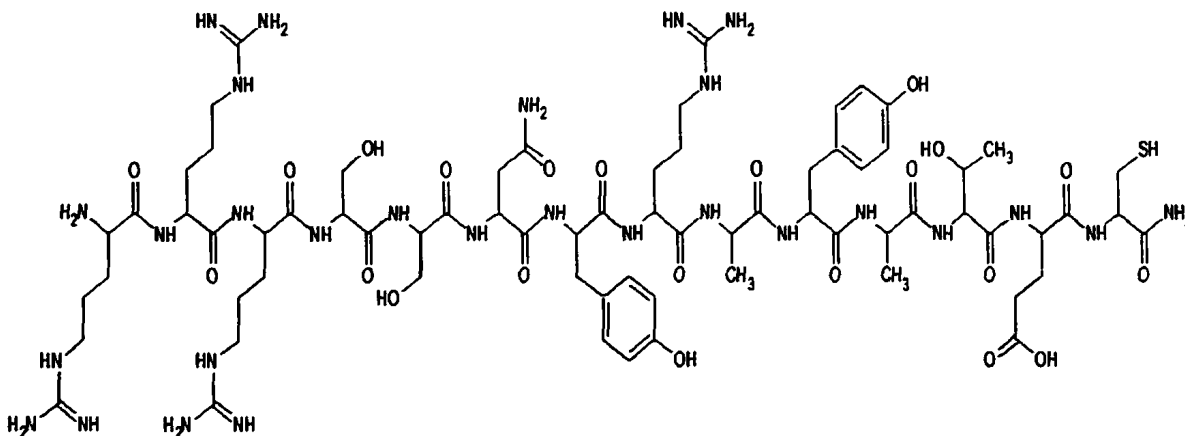
1. Η μήτρα και το Binding Buffer τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να εξισορροπηθούν.

2. Έπειτα ζυγίζεται η ποσότητα του Matrix που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί (0,2518 g λυοφιλοποιημένης σκόνης) και επαναιωρείται σε απεσταγμένο νερό.
3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση για περίπου 15 λεπτά με απεσταγμένο νερό σε χωνί με ηθμό (50 mL απεσταγμένο H₂O/0,2518g Matrix) και ταυτόχρονα η στήλη εξισορροπείται με Binding buffer.
4. Μόλις η στήλη εξισορροπείται, κλείνει η έξοδος και αφήνεται με μια μικρή ποσότητα Binding Buffer.
5. Τέλος προστίθεται Binding Buffer στο χωνί με τη μήτρα, ώστε να δημιουργηθεί πάλι εναιώρημα και μεταφέρεται στη στήλη ποσοτικά .
6. Έπειτα η στήλη αφήνεται σε ηρεμία.

Ακολούθησε η πρόσδεση του πεπτιδίου

Το πεπτίδιο που προσδέθηκε στη στήλη και χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο είναι το ακόλουθο: cTnI-(19-31)-Cys-NH₂

H-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Asn-Tyr-Arg-Ala-Tyr-Ala-Thr-Glu-Cys-NH₂



Molecular Formula = C₇₀H₁₁₄N₂₈O₂₂S

Formula Weight = 1731.89356

Εικόνα 5.2: Σχηματική απεικόνιση της χημικής δομής του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε

Αρχικά υπολογίζεται η μάζα (mg) 1 μmol πεπτιδίου με βάση τον τύπο: $n = m / MB$, όπου MB=1731,9 και n=1 μmol, οπότε $m=1731,9 \mu\text{g}=1.7319 \text{ mg}$ πεπτιδίου. Στη συνέχεια ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα του πεπτιδίου που ήταν 2,01 mg για 1 ml

matrix, διαλύεται σε Binding buffer (V=1 ml) και αφήνεται για 2 ώρες σε επαφή με τη μήτρα.

Στη συνέχεια η στήλη ξεπλένεται με Binding buffer και λαμβάνονται κλάσματα όγκου ίσου με τον όγκο του μέσου. Ελέγχεται με φασματοσκοπία UV αν στα κλάσματα υπάρχει 2-θειοπυριδόνη. Μετά από τη διαδικασία αυτή προστίθεται 20% αιθανόλη στη στήλη και δατηρείται στους 4 °C.

Απομόνωση των Αντισωμάτων

Για την απομόνωση των αντισωμάτων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Αρχικά η στήλη εξισορροπήθηκε με το διάλυμα έκπλυσης (wash buffer). Στη συνέχεια ο ορός που επρόκειτο να προστεθεί σε αυτή, αραιώθηκε με το Starting Buffer. Αφού πραγματοποιήθηκε η αραιώση ο ορός προστέθηκε στη στήλη και αυτό επαναλήφθηκε για 5 φορές. Έπειτα η στήλη ξεπλύθηκε με το Wash Buffer και αργότερα τα αντισώματα εκλούστηκαν με το Elution Buffer. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν είχαν όγκο ίσο με τον όγκο του μέσου (V=5 ml) και το pH εξισορροπήθηκε με το Alkaline Buffer. Τέλος η στήλη ξεπλύθηκε με το Buffer. Η στήλη φυλάχθηκε στους 4 °C με διάλυμα 20% αιθανόλης και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ELISA.

Παρασκευή Διαλυμάτων

- Binding Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 1.211g Tris, 0.292g NaCl, 0.0037g EDTA, διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 7,0
- Wash Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 0.605g Tris, 1.17g NaCl, 0.0037g EDTA, διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 7,0
- Starting Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 0.605g Tris, 1.17g NaCl, 0.0037g EDTA, 47.55μg Leupetin, 3483.88μg PMSF, 68.589μg Pepstatin διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 7,0
- Elution Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 0.750g γλυκίνη διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 2,5

- Alkaline Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 12.11g Tris διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 8,5
- Buffer: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες, 0.242g Tris, 0.292g NaCl οι οποίες στη συνέχεια διαλύθηκαν σε H₂O (τελικός όγκος 250ml) και ρυθμίστηκαν έτσι ώστε το pH να είναι 7,4.

5.3.2 Διαπίδυση

Η μέθοδος της διαπίδυσης εφαρμόστηκε στα αντισώματα που παρήχθησαν από τις όρνιθες με τη χρήση του PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) για την επίτευξη μεγαλύτερης καθαρότητας. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο αναλύονται παρακάτω.

- Λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της μεμβράνης θεωρήθηκε απαραίτητη η χρήση γαντιών πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Με την έναρξη του πειράματος έγινε λήψη ενός τμήματος της μεμβράνης, μεγαλύτερο από αυτό που χρειαζόταν (περίπου 15-20 cm). Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η cellu Sep T3, regenerated cellulose tubular membrane, με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: cut off Μοριακού Βάρους 12.000-14.000 kDa, wall thickness: 50μm.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη εμποτίζεται με απεσταγμένο νερό προκειμένου να ανοίξει. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για 5-10 λεπτά έτσι ώστε η μεμβράνη να διατηρηθεί καθ'ολη τη διάρκεια της διαδικασίας υγρή .
- Έπειτα δημιουργείται ένας κόμπος με κλωστή στην μία άκρη της μεμβράνης και ακολούθησε η δημιουργία και ενός δεύτερου για την παροχή μεγαλύτερης ασφάλειας, προκειμένου να αποφευχθεί η διαρροή υγρού από τους κόμπους. Αφού οι κόμποι δημιουργήθηκαν η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε PBS και ξεκίνησε η φόρτωση των δειγμάτων-αντισωμάτων στη μεμβράνη με πιπέτα pasteur. Πραγματοποιείται εκ νέου έλεγχος για διαρροή και δημιουργείται νέος κόμπος στην ελεύθερη πλευρά της μεμβράνης.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 2 L. Στην ογκομετρική φιάλη είχε τοποθετηθεί ένας μαγνήτης έτσι ώστε η μεμβράνη να περιστρέφεται μέσα στην ογκομετρική φιάλη. Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω σε μία μαγνητική πλάκα ανάδευσης.

- Κατά την πρώτη μισή ώρα μετά την τοποθέτησή της μεμβράνης στην ογκομετρική φιάλη πραγματοποιείται έλεγχος του τρόπου και τον ρυθμού περιστροφής της. Στη συνέχεια μετά από χρονικό διάστημα δύο ωρών το PBS ανανεώνεται με καινούριο και αφήνεται στη φιάλη όλη τη διάρκεια της νύχτας.
- Την επόμενη μέρα η μεμβράνη απομακρύνεται από την ογκομετρική φιάλη και το περιεχόμενό της αφαιρείται με μία πιπέτα Pasteur. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της τοποθετείται σε eppendorfs και τα αντισώματα ελέγχονται με φωτομέτρηση στα 280 nm και διατηρούνται σε aliquots στους -20°C .

5.4 Επισήμανση των αντισωμάτων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επισήμανση των αντισωμάτων περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- Αρχικά διαλύθηκε η ποσότητα του αντισώματος που επρόκειτο να επισημανθεί (1mg) σε 50 mM όξινου ανθρακικού νατρίου με $\text{pH}=8.5$ και συγκέντρωσης 10mg/ml.
- Στη συνέχεια διαλύθηκαν 0.5 mg NHS-fluorescein σε 0.5 ml DMSO, με ταυτόχρονη προστασία από το φως. Αυτό επιτεύχθηκε με την κάλυψη όλων των σκευών που χρησιμοποιήθηκαν με αλουμινόχαρτο.
- Έπειτα πάλι με προστασία από το φως προστέθηκαν προσεκτικά 50 με 100 μl NHS-fluorescein στο διάλυμα του αντισώματος με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε το διάλυμα αφέθηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου η αντίδραση να ολοκληρωθεί.
- Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης πραγματοποιείται φωτομέτρηση του αντισώματος (στα 280 nm και στα 495 nm) για να ελεγχθεί αν έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεση του φθοριοχρώματος στο αντίσωμα. Όταν ο λόγος της απορρόφησης κυμαίνεται από 0,3-0,5 τότε αυτό υποδηλώνει αναλογία τεσσάρων με επτά μορίων φλουορεσκεΐνης ανά μόριο αντισώματος.

Κεφάλαιο 6^ο
Αποτελέσματα



6.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε η εξειδίκευση των αντισωμάτων που παρήχθησαν έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα επιλέχθηκε διότι η αμινοξική του αλληλουχία ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Επιπλέον, η ομολογία του σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Παραγωγή των αντισωμάτων

Η παραγωγή των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πειραματόζωων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Οι ανοσοποιήσεις των κουνελιών με τον αντιγονικό επίτοπο cTnI-(19-31) πραγματοποιήθηκαν με χρονική διαφορά μίας ή δύο εβδομάδων, στο εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και δεύτερο μοντέλο ζώου το οποίο ήταν η όρνιθα. Όπως και στο κουνέλι έτσι και στην όρνιθα πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις με τον αντιγονικό επίτοπο cTnI-(19-31). Τα αντισώματα απομονώθηκαν με δύο μεθόδους. Έτσι ακολουθήθηκε ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο απολιπίδωσης και μια διαδικασία κατακρήμνισης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) (Polson A et al. 1960) προκειμένου να βρεθεί η καταλληλότερη από τις δύο για την απομόνωση των αντισωμάτων από τις όρνιθες.

Καθαρισμός των αντισωμάτων.

Αφού ολοκληρώθηκε η παραγωγή των αντισωμάτων ακολούθησε ο καθαρισμός τους. Ο καθαρισμός των προερχόμενων από τα κουνέλια αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ενώ στα παραγόμενα από τις όρνιθες αντισώματα εφαρμόστηκε η μέθοδος της διαπίδωσης.

ELISA δοκιμασίες και επισήμανση των αντισωμάτων.

Παράλληλα με την παραγωγή των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμασίες ELISA για να διερευνηθεί εάν τα παραγόμενα αντισώματα αναγνώριζαν τον επίτοπο έναντι του οποίου παρήχθησαν αλλά και την ανθρώπινη καρδιακή τροπονίνη. Τέλος ακολούθησε η επισήμανση με φλουορεσκεΐνη αντισωμάτων που είχαν παραχθεί από τις όρνιθες. Η φλουορεσκεΐνη αποτελεί μία οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ευρύτατα. Προσδένεται στο αντίσωμα με τη δημιουργία αμιδικού δεσμού. Απορροφά μπλε φως και εκπέμπει κίτρινο πράσινο φθορισμό.



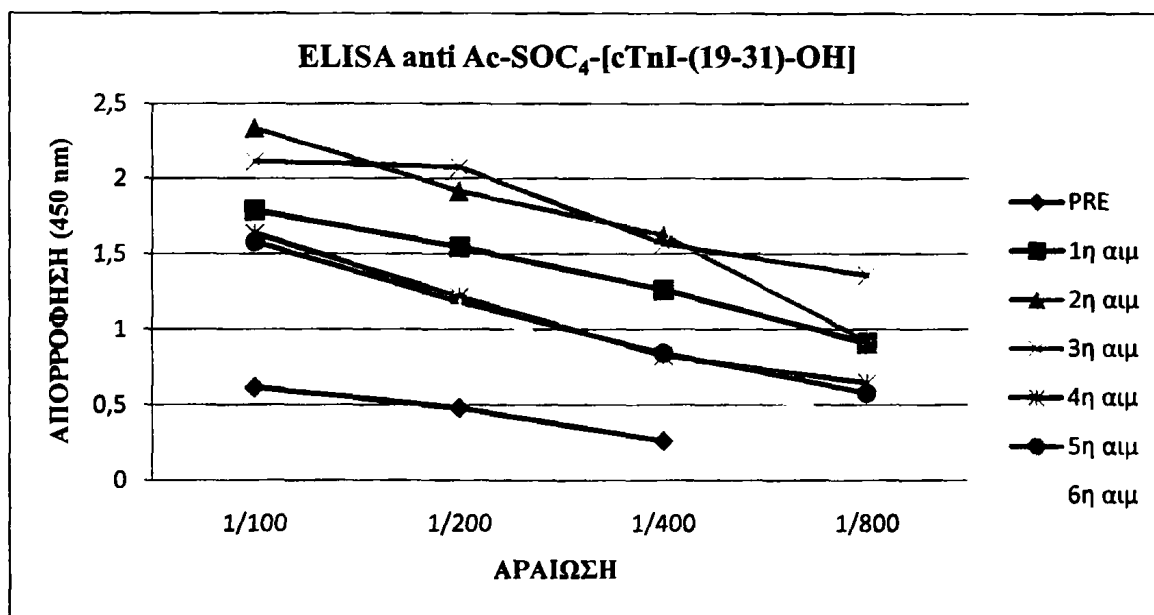
6.1 Δοκιμασίες ELISA

6.1.1 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης όλων των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος $Ac-SOC_4[cTnI-(19-31)]4-OH$.

Με την ολοκλήρωση των ανοσοποιήσεων των κουνελιών έπρεπε να διερευνηθεί εάν αναγνώριζαν όλα τα αντισώματα τον αντιγονικό επίτοπο έναντι του οποίου στόχευαν για να συμπεράνουμε κατά πόσο οι ανοσοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν επιτυχείς.

Για το σκοπό αυτό επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με τον επίτοπο $cTnI-(19-31)$ σε συγκέντρωση $5\mu g/ml$ και πάντα σε διπλά φρεάτια.

Στη συνέχεια επιστρώθηκαν οι οροί από τις αιμοληψίες: πριν την ανοσοποίηση (PRE), την 1^η έως και την 6^η αιμοληψία. Στη δοκιμασία αυτή επιστρώθηκαν οι οροί με ένα εύρος αραιώσης από 1/100 έως 1/800. Επιλέχθηκε να μην χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αραιώσεις δεδομένου ότι οι τίτλοι των αντισωμάτων σε αυτές τις αραιώσεις θα ήταν πολύ χαμηλοί.

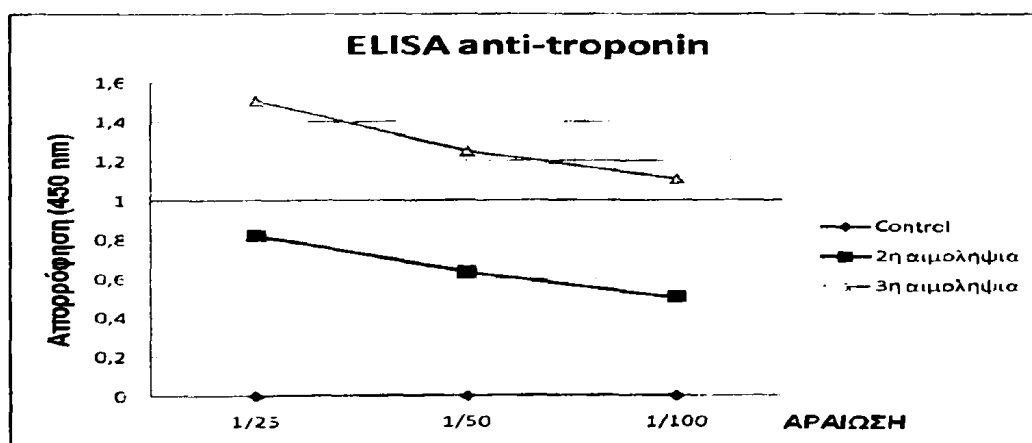


Σχήμα 6.1: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα $Ac-SOC_4[cTnI-(19-31)]4-OH$. Με μπλέ χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού "μόρτυρα" (preimmune), ενώ με κόκκινο, πράσινο, μώβ, τρκουάζ, πορτοκαλί και γαλάζιο οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης έως και της έκτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, η παραγωγή των αντισωμάτων ήταν επιτυχής, δεδομένου ότι οι τίτλοι αντισωμάτων στις αιμοληψίες μετά την ανοσοποίηση είναι πολύ υψηλότεροι σε σχέση με τους τίτλους αντισωμάτων πριν από αυτήν. Επιπλέον απεικονίζεται και ο υψηλότερος τίτλος αντισωμάτων στην 3^η αιμοληψία με τον τίτλο να πέφτει στις επόμενες αιμοληψίες, 4^η έως 6^η.

6.1.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα αντισώματα έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]4-OH.

Αφού διαπιστώθηκε ότι τα αντισώματα που παρήχθησαν από τις ανοσοποιήσεις των κουνελιών αναγνωρίζουν τον επίτοπο έναντι του οποίου στόχευαν, πραγματοποιήθηκε μία διερευνητική ELISA αναγνώρισης της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης επιστρώθηκε σε πλακίδιο ELISA και πάντα σε διπλά φρεάτια, σε συγκέντρωση 0,14 ng/ml. (Human Cardiac Markers Plus Control LT, Biograd). Στη συνέχεια επιστρώθηκαν οι οροί από την 2^η και 3^η αιμοληψία με ένα εύρος αραιώσης από 1/25 έως 1/100. Επιλέχθηκε να επιστρωθούν οι οροί από αυτές τις αιμοληψίες, δεδομένου ότι σε αυτούς παρατηρήθηκαν οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων.



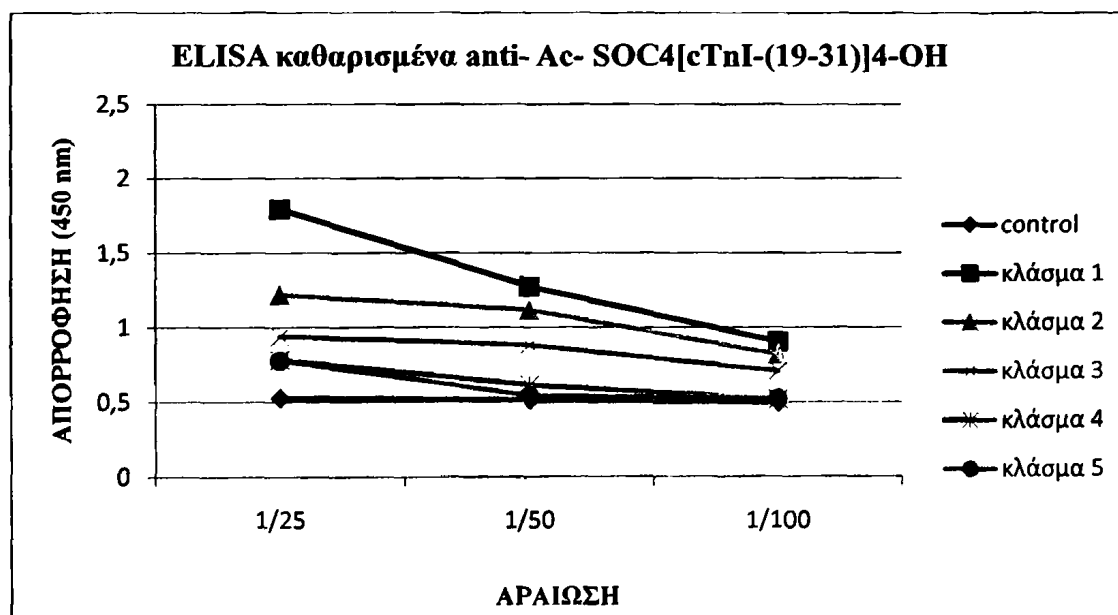
Σχήμα 6.2: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]4-OH. Με μπλέ χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του ορού "μάρτυρα" (preimmune), ενώ με κόκκινο και πράσινο, η απορρόφηση των αντισωμάτων της δεύτερης και τρίτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, οι υψηλές απορροφήσεις στα δείγματα των αιμοληψιών σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, αποδεικνύουν ότι τα παραγόμενα αντισώματα αναγνωρίζουν ισχυρά τη φυσική ανθρώπινη πρωτεΐνη (cTnI).

6.1.3 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων της 2^{ης} καθαρισμένης με χρωματογραφία συγγένειας αιμοληψίας έναντι του συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]4-OH

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας για τον καθαρισμό των παραχθέντων αντισωμάτων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη μοριακή αναγνώριση και η αποτελεσματικότητα της στον καθαρισμό των αντισωμάτων σχετίζεται με την ικανότητά αυτών να αναγνωρίζουν ειδικά έναν προσροφητή συγγένειας.

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων της 2^{ης}, καθαρισμένης με χρωματογραφία συγγένειας αιμοληψίας, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με τον επίτοπο cTnI-(19-31) σε συγκέντρωση 5μg/ml και πάντα σε διπλά φρεάτια. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν τα κλάσματα του ορού (1^ο έως και 5^ο) που παρήχθησαν από τη χρωματογραφία σε αραιώσεις 1/25 έως 1/100.



Σχήμα 6.3: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του καθαρισμού των anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]4-OH} αντισωμάτων της 2ης αιμοληψίας. Από τις τιμές των απορροφήσεων διαπιστώνεται η ύπαρξη των πλέον καθαρών αντισωμάτων στο 1^ο κλάσμα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, ο καθαρισμός των αντισωμάτων της 2^{ης} αιμοληψίας θεωρείται επιτυχής δεδομένου ότι οι υψηλότερες απορροφήσεις εμφανίζονται στο 1^ο κλάσμα και εμφανίζουν πτωτική τάση στα υπόλοιπα κλάσματα 2^ο, 3^ο, 4^ο και 5^ο αντίστοιχα, με το 5^ο κλάσμα να εμφανίζει τη χαμηλότερη απορρόφηση. Επιπλέον οι απορροφήσεις των κλασμάτων εμφανίζουν σαφώς υψηλότερες τιμές από αυτές του ορού μάρτυρα.

6.2 Καθαρισμός με τη μέθοδο της διαπίδυσης των αντισωμάτων που παρήχθησαν από τις όρνιθες με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγωγής αντισωμάτων από όρνιθες με τη χρήση PEG, θεωρείται απαραίτητο τα παραγόμενα αντισώματα να καθαριστούν με τη μέθοδο της διαπίδυσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών μορίων από μεγάλα μακρομόρια διαμέσου μεμβράνης εκλεκτικής διαπερατότητας. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομάκρυνση των μορίων που δημιουργούν διασταυρωτές αντιδράσεις και προκαλούν πρόβλημα στις τιμές των απορροφήσεων.

Παρακάτω παρατίθενται δύο πίνακες. Ο ένας αφορά τα αντισώματα πριν τον καθαρισμό τους και ο άλλος τα αντισώματα αφού σε αυτά είχε εφαρμοστεί η διαπίδυση. Παρατίθενται και οι δύο πίνακες προκειμένου να γίνει σύγκριση των τιμών των απορροφήσεων και των συγκεντρώσεων πριν και μετά τον καθαρισμό τους.

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται τα αποτελέσματα πριν τον καθαρισμό των αντισωμάτων.

Πίνακας 6.1: Απορροφήσεις και συγκεντρώσεις των αντισωμάτων πριν τη διαπίδυση

A/A	Απορρόφηση	mg /ml	A/A	Απορρόφηση	mg /ml
1	0,545	8,20	9	0,315	4,74
2	0,263	3,95	10	0,279	4,20
3	0,279	4,20	11	0,325	4,89
4	0,300	4,50	12	0,312	4,70

A/A	Απορρόφηση	mg /ml	A/A	Απορρόφηση	mg /ml
5	0,525	7,90	13	0,275	4,14
6	0,297	4,47	14	0,297	4,47
7	0,301	4,53	15	0,345	5,20
8	0,400	6,01	16	0,319	4,80

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα μετά τη διαπίδυση. Η διαπίδυση εφαρμόστηκε διερευνητικά σε κάποια από τα δείγματα των αντισωμάτων.

Πίνακας 6.2: Απορροφήσεις και συγκεντρώσεις των αντισωμάτων μετά τη διαπίδυση

A/A	Απορρόφηση	mg /ml
Δείγμα 1°	0.454	6.82
Δείγμα 2°	0.234	3.50
Δείγμα 3°	0.280	4.21
Δείγμα 4°	0.267	4.01
Δείγμα 5°	0.435	6.54
Δείγμα 6°	0.289	4.34
Δείγμα 7°	0.277	4.16
Δείγμα 8°	0.395	5.93

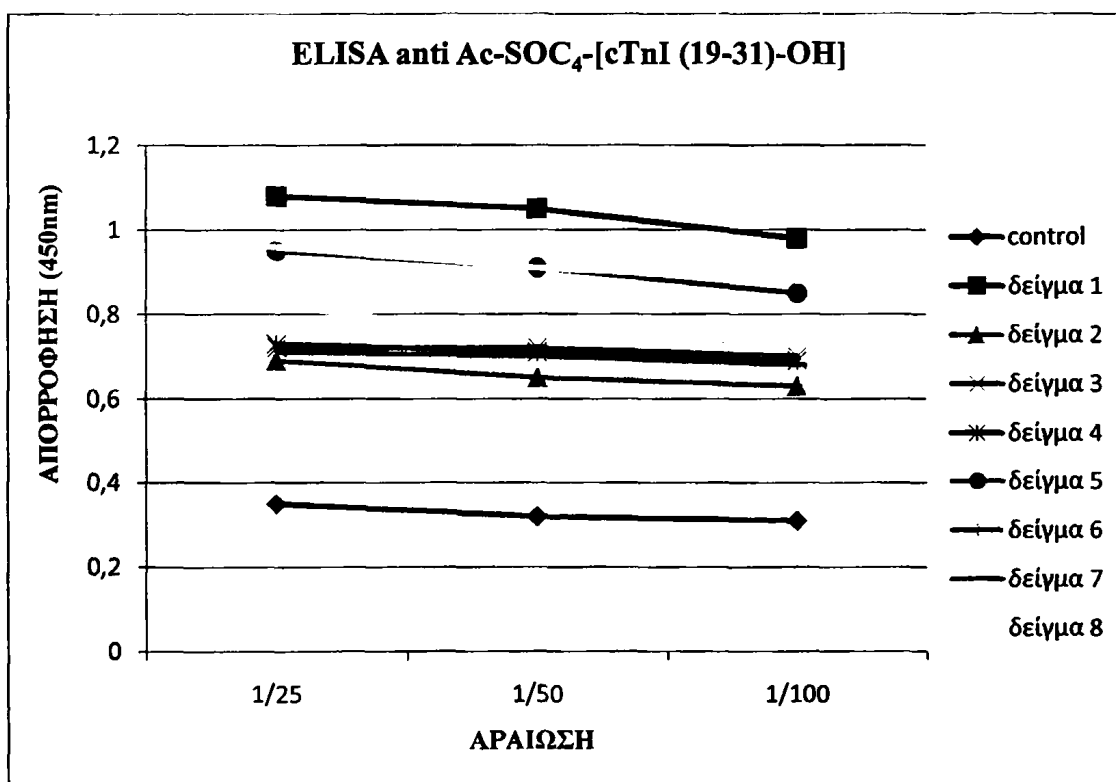
Παρουσίαση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων που παρήχθησαν με PEG μετά τον καθαρισμό τους με διαπίδυση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντισωμάτων έγινε φωτομετρικά στα 280 nm. $\text{Συγκέντρωση IgY (mg/ml)} = (A_{280}/1.33) \times 20$

Παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων μετά τον καθαρισμό με διαπίδυση παρουσιάζουν παρόμοιες ή και λίγο χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις τιμές πριν τον καθαρισμό.

6.2.1 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων που παρήχθησαν από τις όρνιθες με PEG και καθαρίστηκαν με διαπίδυση

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων που καθαρίστηκαν με διαπίδυση, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με τον επίτοπο cTnI-(19-31) σε συγκέντρωση 5μg/ml και πάντα σε διπλά φρεάτια.

Στη συνέχεια επιστρώθηκαν τα δείγματα που έχουν υποστεί καθαρισμό με διαπίδυση σε αραιώσεις από 1/25εώς 1/100.



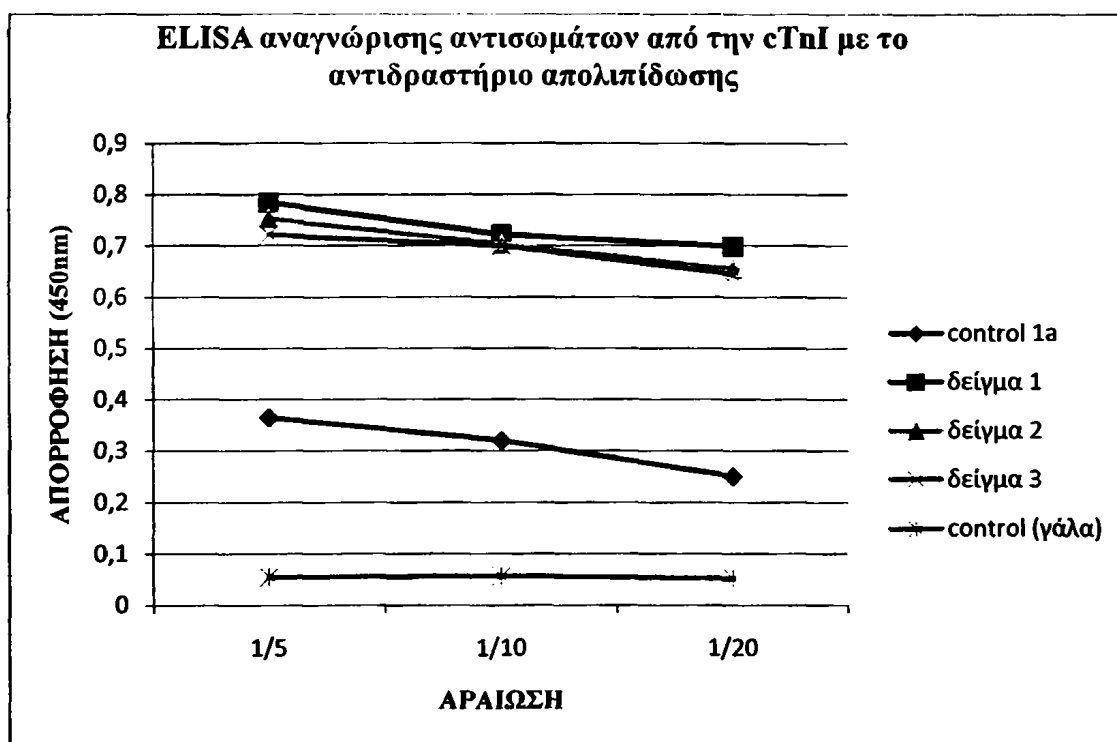
Σχήμα 6.4: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου, ενώ με κόκκινο, πράσινο, μώβ, τirkουάζ, πορτοκαλί και γαλάζιο, καφέ και λαχανί τα δείγματα των αντισωμάτων που έχουν καθαριστεί με διαπίδυση.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα η παραγωγή και ο καθαρισμός των αντισωμάτων από τις όρνιθες με PEG θεωρείται επιτυχής καθώς οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι σαφώς υψηλότεροι από αυτούς του δείγματος ελέγχου.

6.2.2 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα από τις όρνιθες με το αντιδραστήριο της απολιπιδώσης αντισώματα

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης επιστρώθηκε η cTnI σε πλακίδιο ELISA και πάντα σε διπλά φρεάτια, σε συγκέντρωση 0,14 ng/ml. (Human Cardiac Markers Plus Control LT, Biorad).

Στη συνέχεια επιστρώθηκαν δείγματα των αντισωμάτων που παρήχθησαν από τις όρνιθες με το αντιδραστήριο της απολιπιδώσης (κιτ) με ένα εύρος αραιώσης από 1/5 έως 1/20. Επιπλέον επιστρώθηκαν φρεάτια από κρόκους αυγών μη ανοσοποιημένης όρνιθας ως δείγμα ελέγχου και φρεάτια με σκέτο γάλα επίσης ως δείγμα ελέγχου.

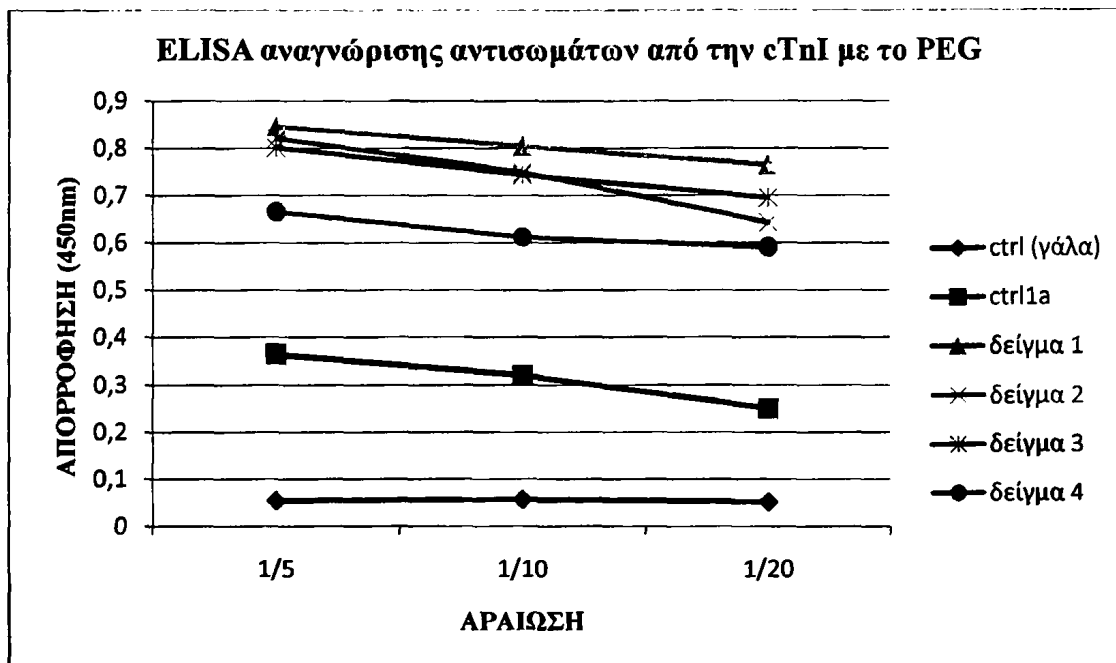


Σχήμα 6.5: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων αναγνώρισης της cTnI από τα παραγόμενα από τις όρνιθες αντισώματα. Με μπλέ χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (μη ανοσοποιημένη όρνιθα) με τirkουάζ χρώμα το δεύτερο δείγμα ελέγχου (σκέτο γάλα), ενώ με κόκκινο, πράσινο και μωβ η απορρόφηση των αντισωμάτων από τις όρνιθες που παρήχθησαν με το αντιδραστήριο της απολιπιδώσης (κιτ), σε διαφορετικές αραιώσεις.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα τα αντισώματα που παρήχθησαν με το αντιδραστήριο της απολιπιδώσης αναγνωρίζουν τη φυσική ανθρώπινη καρδιακή τροπονίνη σε ικανοποιητικό βαθμό.

6.2.3 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τα παραγόμενα από τις όρνιθες (με το PEG) αντισώματα

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης επιστρώθηκε η cTnI σε πλακίδιο ELISA και πάντα σε διπλά φρεάτια, σε συγκέντρωση 0,14 ng/ml. (Human Cardiac Markers Plus Control LT, Biorad)

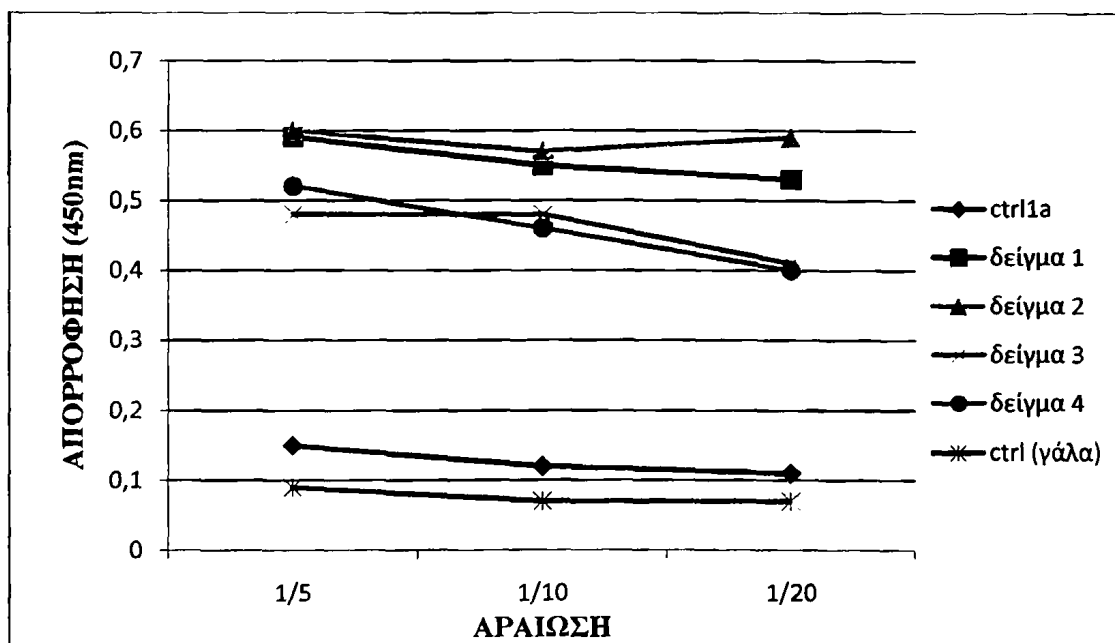


Σχήμα 6.6: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων αναγνώρισης της cTnI από τα παραγόμενα από τις όρνιθες αντισώματα. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (μη ανοσοποιημένη όρνιθα) με τirkουάζ χρώμα το δεύτερο δείγμα ελέγχου (σκέτο γάλα), ενώ με κόκκινο, πράσινο και μωβ η απορρόφηση των αντισωμάτων από τις όρνιθες που παρήχθησαν με το PEG και καθαρίστηκαν με διαπίδυση, σε διαφορετικές αραιώσεις. Επιπλέον με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του αντισώματος που έχει παραχθεί με PEG αλλά δεν καθαρίστηκε με διαπίδυση.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα αντισώματα που παρήχθησαν από το PEG και καθαρίστηκαν με διαπίδυση αναγνωρίζουν τη φυσική ανθρώπινη καρδιακή τροπονίνη. Επιπλέον η τροπονίνη αναγνωρίζεται και από το αντίσωμα που δεν έχει καθαριστεί αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τα καθαρισμένα με διαπίδυση αντισώματα.

6.2.4 Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της τροπονίνης από ορούς ασθενών με μυοκαρδιακή βλάβη από το πεπτιδίο FYSHSHENWPS και ακόλουθη αναγνώριση αυτής από τα παραχθέντα αντισώματα

Για τη διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του πεπτιδίου FYSHSHENWPS, (το οποίο έχει προταθεί ως ισχυρός προσδέτης της cTnI, Σιδηροπούλου Σ. 2014) από την τροπονίνη I σε ορούς ασθενών, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με το πεπίδιο σε συγκέντρωση 5μg/ml και πάντα σε διπλά φρεάτια. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν οι οροί των ασθενών (στους οποίους η τιμή της cTnI ήταν >100 ng/ml) σε αραιώσεις 1/5 έως 1/20. Έπειτα για τη διερεύνηση της αναγνώρισης της cTnI από τα παραγόμενα αντισώματα επιστρώθηκαν δείγματα των αντισωμάτων στο ίδιο εύρος αραιώσεων 1/5-1/20.



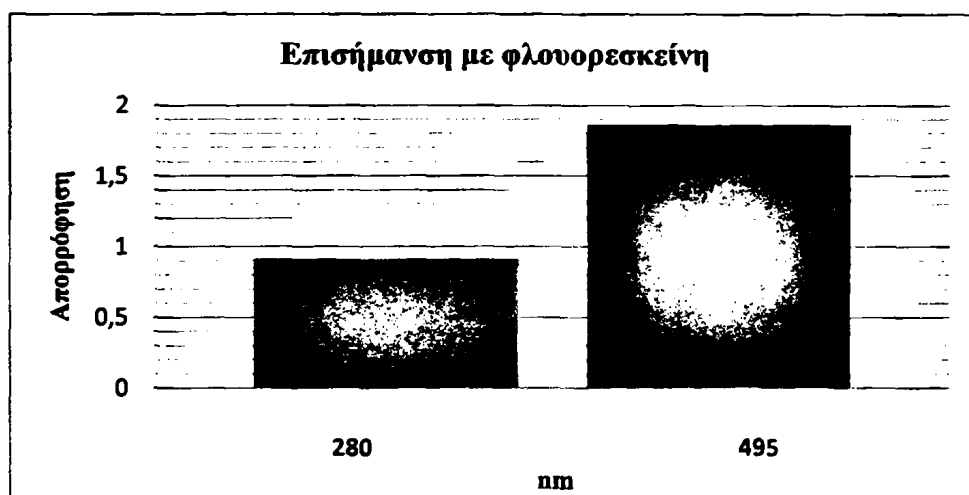
Σχήμα 6.7: Γραφική απεικόνιση της αναγνώρισης της cTnI από ορούς ασθενών από το πεπίδιο FYSHSHENWPS και από τα παραγόμενα αντισώματα. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (μη ανοσοποιημένη όρνιθα) με τirkουάζ χρώμα το δεύτερο δείγμα ελέγχου (σκέτο γάλα), ενώ με κόκκινο πράσινο μωβ και πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση των ορών των ασθενών και των αντισωμάτων που παρήχθησαν με το αντιδραστήριο απολιπίδωσης και το PEG.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα αντισώματα που παρήχθησαν από τις όρνιθες αναγνωρίζουν την cTnI σε ορούς ασθενών με μυοκαρδιακή βλάβη και η cTnI

αναγνωρίζει το πεπτιδίο FYSHSHENWPS. Αυτό αποδεικνύεται από τους τίτλους των αντισωμάτων οι οποίοι παρόλο που δεν είναι ιδιαίτερα υψηλοί έχουν μεγάλη διαφορά από τις απορροφήσεις των δειγμάτων ελέγχου. Για την απόκτηση υψηλότερων τίτλων απαιτείται η βελτιστοποίηση των συνθηκών (χρόνοι επώασης, συγκεντρώσεις δειγμάτων κ.α.). Ωστόσο τα αποτελέσματα που έχουμε είναι ενθαρρυντικά για την τελειοποίηση μιας οικονομικής και κατάλληλης για εμπορική χρήση, καινοτόμου δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της cTnI στη διάγνωση των καρδιαγγειακών παθήσεων.

6.3. Επισήμανση των αντισωμάτων

Η επισήμανση του αντισώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φλουορεσκεινης. Η φλουορεσκεινη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φθοριόχρωμα εύχρηστο, αποτελεσματικό και οικονομικό. Οι φωτομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η επισήμανση του αντισώματος που παρήχθησε από τις όρνιθες με ανοσοποίηση με το σύμπλεγμα Ac-SOC4[cTnI-(19-31)]4-OH έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα όπως φαίνεται στο σχήμα 6.7.



Σχήμα 6.7: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της επισήμανσης των παραγόμενων αντισωμάτων. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η απορρόφηση στα 495 nm και με μπλε χρώμα στα 280 nm.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως η επισήμανση ήταν επιτυχής, καθώς ο λόγος των απορροφήσεων μεταξύ 280nm και 495nm υπολογίζεται στο 0,5. Όταν ο λόγος των απορροφήσεων βρίσκεται μεταξύ 0,3-1,0 τότε έχουν προσδεθεί 3 με 7 μόρια φλουορεσκεινης ανά μόριο αντισώματος (Hermanson J.R et al. 1996).

Συμπεράσματα



Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε η εξειδίκευση των αντισωμάτων που είχαν παραχθεί έναντι του επιτόπου [cTnI (19-31) (RRRSSNYRAYATE)] ο οποίος ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I και θεωρείται πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Επιπλέον διερευνήθηκε η αναγνώριση της ανθρώπινης καρδιακής ισομορφής της Τροπονίνης I από τα αντισώματα αφού είχαν υποστεί καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας και διαπίδυση. Από τα αποτελέσματα που έχουμε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η αναγνώριση είναι πιο ισχυρή στην περίπτωση των καθαρών αντισωμάτων.

Παράλληλα μελετήθηκε η αναγνώριση της τροπονίνης σε ορούς ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου από τα αντισώματα και αποδείχθηκε πως και σε αυτή την περίπτωση τα αντισώματα αναγνώριζαν την τροπονίνη.

Η διαδικασία της επισήμανσης αποδείχθηκε επίσης επιτυχής και τα επισημασμένα αντισώματα αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι μπορούμε να έχουμε εξειδικευμένα αντισώματα με εύκολο και οικονομικό τρόπο τα οποία εάν χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά δίνουν τη δυνατότητα ανάπτυξης εναλλακτικών ELISA τεχνικών, για τη βελτίωση των δοκιμασιών ανίχνευσης της καρδιακής ισομορφής της ανθρώπινης τροπονίνης cTnI για την έγκαιρη διάγνωση καρδιαγγειακών παθήσεων (π.χ. έμφραγμα μυοκαρδίου).

Η προτεινόμενη από εμάς δοκιμασία, στηρίζεται στη χρήση ενός πρωτότυπου αντιγονικού πεπτιδικού συμπλέγματος που αναγνωρίζει την cTnI, το οποίο μπορεί να παραχθεί σχετικά οικονομικά και σε μεγάλες ποσότητες και ενός εξειδικευμένου επισημασμένου αντισώματος που παράγεται εξίσου εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Η διαφοροποίηση με τα χρησιμοποιούμενα σήμερα στην κλινική πράξη τεστ, είναι ότι δεν απαιτείται η χρήση δυο διαφορετικών αντισωμάτων και ενός αντι-αντισώματος γεγονός που καθιστά το τεστ αυτό σημαντικά καινοτόμο, πιο απλό, αλλά και πιο οικονομικό.

Βιβλιογραφία

Abbas KA, Lichtman HA. *Basic Immunology - Functions and Disorders of The Immune System*, 4 edition 2012

Adams JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, DelmezJA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS. *Cardiac troponin I: a marker with high specificity for cardiac injury*. *Circulation* (1993);88:101– 6.

Adams, J.E. *Clinical application of markers of cardiac injury: basic concepts and new considerations*. *Clinica Chimica Acta*, (1999), 284, 12

Adamczyk M., Brashear R.J., Mattingly P.G. *Letters to the editor*. *Clinical Chemistry* (2009) 55:8.

Alfonso F, Canales E, Aleong G. *Spontaneous coronary artery dissection diagnosis: diagnosis by optical coherence tomography*. *Eur Heart J*.(2009); 30:385.

Almeda FQ, Barkatullah S, Kavinsky CJ. *Spontaneous coronary artery dissection*. *Clin Cardiol* (2004); 27:377–80.

Amersham Pharmacia Biotech, *Antibody Purification Handbook*

Anderson L. *Candidate-based proteomics in the search for biomarkers cardiovascular disease*. *J Physiol*. (2005); 263:23-60

Apple FS, Sharkey SW, Hoelt P, et al. *Prognostic value of serum cardiac troponin I and T in chronic dialysis patients: a 1-year outcomes analysis*. *Am J Kidney Dis*. (1997) Mar; 29(3):399-403. PMID: 9041216

Apple FS, Wu AH, Mair J et al. *Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome*. *Clin Chem*. (2005); 51:810-24

Apple FS, Parvin CA, Buechler KF, Christenson RH, Wu AHB, Jaffe AS. *Validation of the 99th percentile cutoff independent assay imprecision (CV) for cardiac troponin monitoring for ruling out myocardial infarction*. *Clin Chem*. (2005); 51:2198 –2200.

Arnold JR, West NE, Van Gaal WJ, Karamitos TD, Banning AP. *The role of intravascular ultrasound in the management of spontaneous coronary artery dissection*. *Cardiovasc Ultrasound* (2008); 6:24

Bonaca M, Scirica B, Sabatine M, et al. *Prospective evaluation of the prognostic implications of improved assay performance with a sensitive assay for cardiac troponin I*. *J Am Coll Cardiol* (2010);55:2118–2124

Borcuk AC, van Hoeven KH, Factor SM. *Review and hypothesis: the eosinophil and peripartum heart disease (myocarditis and coronary artery dissection) – coincidence or pathogenetic significance* *Cardiovasc Res*. (1997); 33:527–32.

Chapelle, J.P. *Cardiac troponin I and troponin T: recent players in the field of myocardial markers*. *Clin. Chem. Lab. Med.*, (1999), 37, 11



Chun JL. Congenital Heart Disease. (2006), Medline Plus Medical Encyclopedia
Coons AH & Kaplan MH *Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.* J Exp Med. (1950) 91(1):1-13.

Coons AH, Leduc EH & Connolly JM. *Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit.* J Exp Med. (1955) Jul 1;102(1):49-60

Christenson RH, Azzazy HME. *Biomarkers of myocardial necrosis: past present, and future:* 3-25

Crowther R John , *The ELISA Guidebook*, Methods In Molecular biology, 2nd Edition, Humana Press

Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB *Selective enzyme purification by affinity chromatography.* Proc Natl Acad Sci U S A 61: 636-643 Cutler R. Paul, *Protein Purification Protocols*, Methods In Molecular biology, (1968) 2nd Edition, Humana Press

Cutler R. Paul, *Protein Purification Protocols*, Methods In Molecular biology, 2nd Edition, Humana Press

Delves PJ, Martin SJ, Burton DR & Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology* Ed. Wiley (2011)

Diris J.H.C., Hackeng C.M., Kooman J.P., Pinto Y.M., Hermens W.T., van Dicijen-Visser M.P. *Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients.* Journal of the American Heart Association, (2004) 109:23-25

D'Costa, M., Fleming, E., Patterson, M.C. *Cardiac troponin I for the diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department.* Am. J. Clin. Pathol., (1997), 108, 550

Eriksson S, Halenius H, Pulkki K, Hellman J, Pettersson K. *Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies.* Clin Chem (2005); 51:839-47.

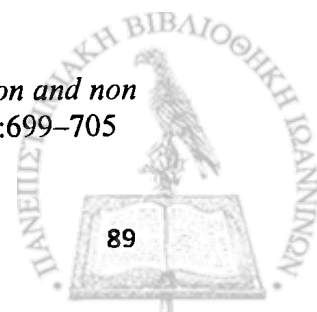
Eriksson S., Hellman J., Pettersson K. *Autoantibodies against cardiac troponins.* The New England Journal of Medicine. (2005).352(1):98-100

Frenkel D., Pachori A.S., Zhang L., Dembinsky-Valkin A., Farfara D., Petrovic-Stojkovic S., Dzau V.J., Weiner H.L. *Nasal vaccination with troponin reduces troponin specific T-cell responses and improves heart function in myocardial ischemia-reperfusion injury.* International Immunology, (2009) 1-13

Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay *Journal of Investigative Dermatology.* (2013), 133, e12

GE Healthcare, *Affinity Chromatography, Principles and Methods*

Hanssen M, Cottin Y, Khalife K, et al. *French registry on acute ST-elevation and non ST-elevation myocardial infarction 2010.* FAST-MI 2010. Heart (2012); 98:699-705



Harlow E, Lane D *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1988)

Hayes SN. *Spontaneous coronary artery dissection (SCAD): new insights into this not-so-rare condition*. Tex Heart Inst J. (2014); 41:295–98. Almafragi A, Convens C, Heuvel PV. Spontaneous healing of spontaneous coronary artery dissection. *Cardiol J*. (2010); 17:92–5.

Heeschen, C., Goldmann, B.U., Moeller, R.H., Hamm, C.W. *Analytical performance and clinical application of a new rapid assay for the detection of serum cardiac troponin I* *Clin. Chem.*, (1998), 44, 1925

Heeschen, C., Deu, A., Langenbrink, L., Goldmann, B.U., Hamm, C.W. *Analytical and diagnostic performance of troponin assays in patients suspicious for acute coronary syndromes*. *Clin. Biochem.*, (2000), 33, 359

Hermanson J.R., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, (1996)

Hochholzer W., Morrow DA, Giugliano RP. *Novel biomarkers in cardiovascular disease*. *Am Heart J* (2010): 60(4):583--594.

Huse K., Bohme H-J., Scholz G., Review article, *Purification of antibodies by affinity chromatography*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (2002) 51, 217-231

Jaffe A.S. *Elevations in Cardiac Troponin Measurements: False False-Positives. The Real Truth*. *Cardiovascular Toxicology*, (2001) 01: 87–92.

Jeremias, A., Gibson, C.M. *Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded*. *Ann. Intern. Med.*, (2005), 142, 786

Jo Erika T. Narciso, Iris Diana C. Uy, April B. Cabang, Jenina Faye C. Chavez, Juan Lorenzo B. Pablo, Gisela P. Padilla-Concepcion, Eduardo A. Padlan *Anatomy of the antibody molecule: a continuing analysis based on highresolution crystallographic structures*, *Philippine Science Letters*, Vol 5., No 1., (2012)

Innova Biosciences, *Guide to Antibody Labeling and Detection*, July (2010)

Karras DJ, Kane DL. *Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction*. *Emerg Med Clin North Am* (2001);19(2):321-37

Katrukha A, Bereznikova A, Filatov V, Esakova T. *Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum*. *Clin Chem Lab Med* (1999); 37:1091–5.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, EsakovaTV, Kolosova V, Pettersson K, et al. *Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection*. *Clin Chem* (1998); 44:2433–40.

Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, PetterssonK, Lovgren T, Severina ME, et al. *Troponin I is released in bloodstream of patients with acutemyocardial infarction not in free form but as complex*. *Clin Chem* (1997); 43:1379–85



Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. *Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction*. Am J Cardiol (1991); 67:1360–7.

Katus, H.A., Remppis, A., Neumann, F.J. *Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction*. Circulation, (1991), 83, 902

Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, et al. *Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography*. J Am Coll Cardiol.(2007); 50:933–9.

Labugger, R., Organ, L., Collier, C., Atar, D., Van Eyk, J.E. *Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction*. Circulation, (2000), 102, 1221

Layer P. Schneider, J.-D. Tissot, M. A. Duchosal, *Essential Guides for Isolation/Purification of Immunoglobulins*, Academic Press (2000)

Law MR, Watt HC, Wald NJ, et al. *The underlying risk of death after myocardial infarction in the absence of treatment*. Arch Intern Med (2002); 162:2405–10

Leung Fc., Handerson Ar., *Thin layer agarose electrophoresis of lactate dehydrogenase isozymes in serum: a note on the method of reporting and on the lactate dehydrogenase isoenzyme--1/isoenzyme--2 ratio in acute myocardial infarction*. Clin Chem (1979) ;25:209--211

Leuschner F., Li J., Goser S., Reinhardt L., Ottl R., Bride P., Zehelein J., Pfitzer G., Remppis A., Giannitsis E., Katus H.A., Kaya Z. *Absence of autoantibodies against cardiac troponin I predicts improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction*. European Heart Journal, (2008). 29:1949-55

Lorette C. Javois, *Immunocytochemical Methods and Protocols*, Methods in Molecular biology, 2nd Edition, Humana Press

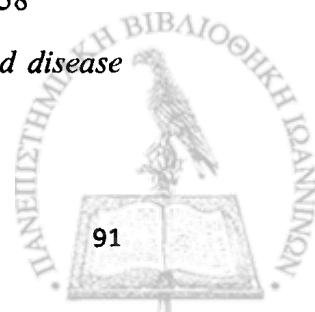
Mahajan, N., Mehta, Y., Rose, M., Shani, J., Lichstein, E. *Elevated troponin level is not synonymous with myocardial infarction*. Int. J. Cardiol., (2006), 111, 442

Mair J., Genser, N., Morandell, D., Maier, J., Mair, P., Lechleitner, P., Calzolari, C., Larue, C., Ambach, E., Dienstl, F., Pau, B., Puschendorf, B. *Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction*. Clinica Chimica Acta, (1996), 245, 19

Mianbin Wu, Xuewan Wang, Zhengyu Zhang, Rutao Wang, *Isolation and Purification of Bioactive Proteins from Bovine Colostrum*, Department of Chemical and Biological Engineering Zhejiang University China

Missov E., Calzolari C., Pau B.. *Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure*. Journal of the American Heart Association, (1997) 96:2953-2958

Morrow DA. Chapter in: *Cardiovascular biomarkers: pathophysiology and disease management*. Humana Press, c2006.



Mutin M, Canavy I, Blann A et al, *Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infraction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells.* Blood. (1999);93:2951-8

Nakane K. Paul, Pierc GB , *Enzyme-Labeled Antibodies: Preperation and Application for the localization of antigens, J Histochem Cytochem* (1966) 14: 929

Nakane K. Paul, Pierce GB *Enzyme-labeled antibodies; preparation and localization of antigens. J Histochem Cytochem .* (1966) 14:929–931

Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation* (1979); 59: 607 – 609.

Okamatsu K, Takano M, Sakai S, Ishibashi F, Uemura R, Takano T, Mizuno K. *Elevated troponin T levels and lesion characteristics in non-ST-elevation acute coronary syndromes.* Circulation (2004); 109:465–470

Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay *Practical Immunology, Fourth Edition,* Blackwell Science

Pan, B. S., and Potter, J. D. Two genetically expressed troponin T fragments representing alpha and beta isoforms exhibit functional difference (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 23052-23056.

Paraskevaïdis S, Theoflogiannakos EK, Chatzizisis YS, Mantziari L, Economou F, Ziakas A, et al. *Spontaneous dissection of right coronary artery manifested with acute myocardial infarction.* Open Cardiovasc Med J.2010; 4:178–80.

Perry, S. V. The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, (1979), 7,593

Perry, S.V. *Troponin I: Inhibitors or facilitators.* Mol.Cell. Biochem., (1999), 190, 9

Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun.* (1980), 9:(5),475-93

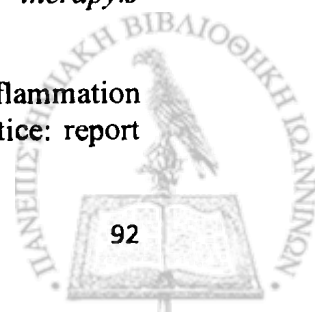
Priori SG, Aliot E, Blümstrom--Lundqvist C, et al. *Task foice on sudden cardiac death,* European Society of Cadiology. *Europace* (2002) Jan; 4(1):13-18.

Roongsritong, C., Warraich, I., Bradley, C. *Common causes of troponin elevations in the absence of acute myocardial infarction: incidence and clinical significance.* Chest, (2004), 125, 1877

Saenger A. *A tale of two biomarkers: the use of troponin and CK--MB in contemporary practice.* Clin Lab Sci (2010); 23(3):134--40.

Shamloo BK, Chintala RS, Nasur A, Ghazvini M, Shariat P, Diggs JA, et al. *Spontaneous coronary artery dissection: aggressive vs. conservative therapy.* *J Invasive Cardiol.* (2010);22:222–8.

Smith FC et al, 2004, Anderson JL, CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the clinical practice discussion group. *Circulation* (2004);110:e550-3



Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, Van't Hof A, Widimsky P, Zahger D. *ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*. (2012) Oct; 33(20):2569-619.

Steg PG, James S, Harrington RA, Ardissino D, Becker RC, Cannon CP, Emanuelsson H, Finkelstein A, Husted S, Katus H, Kilhamn J, Olofsson S, Storey RF, Weaver WD, Wallentin L; PLATO Study Group. *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with ST-elevation acute coronary syndromes intended for reperfusion with primary percutaneous coronary intervention: A Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial subgroup analysis*. *Circulation*. (2010) Nov 23; 122(21):2131-41.

T.H The, T.E. W. Feltkamp, *Conjugation of Fluorescein to Antibodies*, *Immunology*, (1970), 18, 865

The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. *Myocardial infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. *Eur Heart J* (2000); 21:1502–13

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. *Third universal definition of myocardial infarction*. *Eur Heart J* (2012); 33:2551–67

Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. *Universal definition of myocardial infarction*. *Eur Heart J* (2007); 28:2525–38

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. *Third universal definition of myocardial infarction*. *Eur Heart J* (2012); 33: 2551 – 2567

Tweet MS, Hayes SN, Pitta SR, Simari RD, Lerman A, Lennon RJ, et al. *Clinical features, management, and prognosis of spontaneous coronary artery dissection*. *Circulation*. (2012); 126:579–88

Rajappa M, Sharma A. *Biomarkers of cardiac injury: an update*. *Ang* (2005); 56(6):677--91

Uettwiller-Geiger, D., Wu, A.H., Apple, F.S., Jevans, A.W., Venge, P., Olson, M.D. *Multicenter evaluation of an automated assay for troponin I*. *Clin. Chem.*, (2002), 48, 869 [64] Cardiac Markers Panel, HyTest

Yadom MY, *Acute coronary syndrome clinical presentations and diagnostic approaches in the emergency department*. *Emerg Med Clin North Am* (2011);29 (4):689-97

Vander, A. *Φυσιολογία του ανθρώπου, Τόμος II, Όγδοη έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης* (2001)



Vanzetto G, Berger-Coz E, Barone-Rochette G, Chavanon O, Bouvaist H, Hacini R, et al. *Prevalence, therapeutic management and medium-term prognosis of spontaneous coronary artery dissection: results from a database of 11,605 patients.* *Eur J Cardiothorac Surg.* (2009); 35:250–4.

Venge, P., Lindahl, B., Wallentin, L. *New generation cardiac troponin I assay for the access immunoassay system.* *Clin. Chem.*, (2001), 47, 959

Venge P., Lagerqvist, B., Diderholm, E., Lindahl, B., Wallentin, L. *Clinical performance of three cardiac troponin assays in patients with unstable coronary artery disease (a FRISC II substudy).* *Am. J. Cardiol.*, (2002), 89, 1035

Voss EM, Sharkey SW, Gernert AE, Murakami MM, Johnston RB, Hsieh CC, Apple FS. *Human and canine cardiac troponin T and creatine kinase-MB distribution in normal and diseased myocardium. Infarct sizing using serum profiles.* *Arch Pathol Lab Med* (1995);119:799–806.

Walker JM. *The ELISA Guidebook, Methods in Molecular Biology*, 2001

Waller BF. *Nonatherosclerotic coronary heart disease.* In: Fuster V, Walsh RA, Harrington RA, editors. *Hurst's the heart.* 13th ed. New York: McGraw-Hill; (2011) pp. 1257–86.

Wu AHB. *Cardiac Markers.* Humana Press, (2003)

White HD. *Pathobiology of troponin elevations: Do elevations occur with myocardial ischemia as well as necrosis?* *J Am Coll Cardiol* (2011); 57:2406–8.

Xin-He Y, Cheng-Jian Y, Yan J, Xin X, Jia-Ning C, Zhen-Jie Y, et al. *A successful emergency management of spontaneous coronary artery dissection and review of literature.* *Am J Emerg Med.* (2013); 31:1156.e1–3.

Roitt, Brostoff, Male, *Ανοσολογία* Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 6^η έκδοση

Richard Goldsby, Thomas Kindt, Barbara Osborne, Janis Kubby, *Ανοσολογία* Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Βιοχημεία Τόμοι I&II* Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Καλιαμπάκος Σ.Χ. *Οξεία Στεφανιαία σύνδρομα.* Εκδ., Παρισιάνος, Αθήνα, (2004).

Κρεμαστινός ΔΘ. *Καρδιολογία, Επίτομη Κλινική Καρδιολογία,* , Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη (2005)

Στεφανάδης Χρ. *Παθήσεις Της καρδιάς.* Εκδ., Πασχαλίδης, Αθήνα, (2005)

Στρογγύλης Κωνσταντίνος «Μελέτη και ανάπτυξη αντιδραστηρίων ανίχνευσης δεικτών διάγνωσης καρδιαγγειακών παθήσεων». Διδακτορική Διατριβή, (2008)

Χανιώτης Φ, Χανιώτης Δ. *Νοσολογία--Παθολογία.* Τόμος Γ' Εκδ., Λίτσας, Αθήνα, (2002)

