

**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας**

**Παραγωγή και Χαρακτηρισμός Εξειδικευμένων
Βιοχημικών Αντιδραστηρίων για τον Προσδιορισμό της
Καρδιακής Τροπονίνης I**

**Χριστίνα Μπάτση
Βιοχημικός**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες**

Ιωάννινα 2014



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000348297



**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας**

**Παραγωγή και Χαρακτηρισμός Εξειδικευμένων
Βιοχημικών Αντιδραστηρίων για τον Προσδιορισμό της
Καρδιακής Τροπονίνης I**

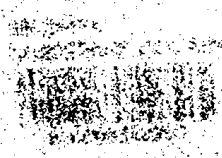
**Χριστίνα Μπάτση
Βιοχημικός**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
στις Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες**

Επιβλέπων Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης

Ιωάννινα 2014





Handwritten text, possibly a title or header, located in the upper middle section of the page.

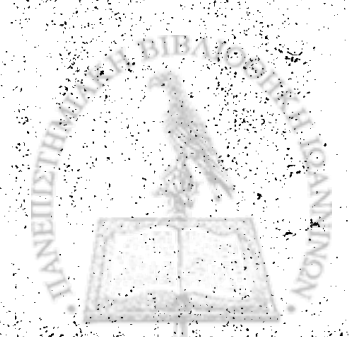
Large block of handwritten text in the middle of the page, appearing to be the main body of the document.

Handwritten text in the lower middle section of the page.

Handwritten text in the lower section of the page.

Handwritten text at the bottom of the main body.

Small handwritten text or signature at the bottom center.



Στην οικογένειά μου



ΕΠΙΘΕΤΟΝ - ΠΡΟΣΩΠΟΝ

Ονοματεπώνυμο: ...
Αριθμός: ...

Πατρώνυμο: ...
Μητρώνυμο: ...

Ημερομηνία: ...
Τόπος: ...

Fluctuat nec mergitur

Ο πατέρας μου είναι ...
Η μητέρα μου είναι ...

Ο πατέρας μου είναι ...
Η μητέρα μου είναι ...

Ο πατέρας μου είναι ...
Η μητέρα μου είναι ...

Ο πατέρας μου είναι ...
Η μητέρα μου είναι ...

Ο πατέρας μου είναι ...
Η μητέρα μου είναι ...



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 Νοέμβριος 2011 – Νοέμβριος 2014.

Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής κ. Τσίκαρης Βασίλειος στον οποίο οφείλω ευχαριστίες για την ανάθεση του θέματος της Μεταπτυχιακής Διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και τη μεταλαμπάδευση των βαθύτατων επιστημονικών του γνώσεων. Η συνεχής παρουσία του, οι ερευνητικές κατευθύνσεις και η έμπρακτη βοήθειά του κατέστησαν δυνατή την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Νάκα Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων και κ. Γκιώκα Δημοσοθένη, 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 την φιλική τους συμπεριφορά και το ευχάριστο περιβάλλον κατά την παραμονή μου σε αυτό.

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

Η συμβολή του συναδέλφου Χρήστου Παπαδόπουλου κατά τη διεξαγωγή των ανοσοποιήσεων της παρούσας διατριβής υπήρξε πολύτιμη. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για το ανιδιοτελές του ενδιαφέρον.

Θερμότατα ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους ξεκινώντας από τους παλαιότερους, Παπά Σεραφείμ, Γκεσούλη Αθηνά, Τρύπου Παρασκευή, για την κατανόηση και συμπαράστασή τους, καθώς και για το ιδιαίτερα ευχάριστο πνεύμα συνεργασίας.

Τέλος, περισσότερο από όλους ευχαριστώ τους γονείς μου για την συνεχή υποστήριξή τους, συμβάλλοντας έτσι στην περάτωση των σπουδών μου.

Ιωάννινα, Νοέμβριος 2014

Μπάτση Ε. Χριστίνα



Περίληψη

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αποτελούν μεγάλο ιατρικό αλλά και κοινωνικό πρόβλημα, καθώς κατέχουν μια από τις πρώτες θέσεις στις αιτίες θανάτου μεταξύ ανδρών και γυναικών τόσο στην Ευρώπη (Wong ND, 2014), όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, με τη χώρα μας να συγκαταλέγεται πλέον στο δυσμενή κατάλογο των χωρών που πλήττονται περισσότερο. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι συχνότερες μορφές καρδιαγγειακής νόσου είναι η στεφανιαία νόσος και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Οι τροπονίνες εισήχθηκαν στον εργαστηριακό έλεγχο, ως εξαιρετικά ευαίσθητοι βιομοριακοί δείκτες στην ανίχνευση της μυοκαρδιακής βλάβης. Αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν αποδείξει ότι η καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης I, cTnI αυξάνει μέσα σε 4-6 ώρες μετά την έναρξη του πόνου στο στήθος, καθιστώντας την ως έναν ιδανικό δείκτη για μυοκαρδιακή βλάβη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η παραγωγή αντισωμάτων για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I [cTnI]. Για την ανάπτυξη της δοκιμασίας ανίχνευσης της cTnI στον ορό του αίματος επιλέχθηκε το πεπτίδιο RRRSSNYRAYATE (Strongylis, 2008). Η επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (cTnI₁₉₋₃₁), το οποίο είναι μοναδικό και αποτελεί επέκταση των σκελετικών ισομορφών. Επιπλέον, η ομολογία της σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Χρησιμοποιώντας το επιλεγμένο πεπτίδιο στον φορέα C-SOC₄ που αναγνωρίζει την καρδιακή τροπονίνη cTnI επιχειρήθηκε η παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε δυο διαφορετικά μοντέλα ζώων, το κουνέλι και την όρνιθα. Τα παραγόμενα αντισώματα, τα οποία είναι εξειδικευμένα και με ισχυρή αναγνώριση της τροπονίνης θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανάπτυξη ενός ELISA τεστ το οποίο θα διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και θα στηρίζεται στην χρήση ενός πρωτότυπου ισχυρού αντιγόνου και ενός μόνο επισημασμένου αντισώματος.



Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1° Πρόληψη – Διαγνωστικά Μέσα – Αντιμετώπιση:

Εισαγωγή στις Καρδιαγγειακές Παθήσεις

1.1. Εισαγωγή – Το Καρδιαγγειακό Σύστημα – Ο Ρόλος και η Βιολογική Σπουδαιότητα της Καρδιάς.....	19
1.2. Καρδιαγγειακά Νοσήματα – Συμπτωματολογία	22
1.3. Αιτιολογία και Παράγοντες Κίνδυνου των Καρδιαγγειακών Παθήσεων	24
1.5. Διαγνωστικές Διαδικασίες – Βιοχημικοί Δείκτες.....	30
1.5.1. Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις.....	30
1.5.2 Αιματολογικές εξετάσεις – Βιοχημικοί Δείκτες	34
1.6. Αντιμετώπιση Καρδιαγγειακών Νοσημάτων – Θεραπευτική Αγωγή	46
1.7. Βιβλιογραφία	49

Κεφάλαιο 2° Εισαγωγή στις Ανοσοσφαιρίνες:

Δομή – Τάξεις – Ανοσοενζυμική Μέθοδος ELISA

2.1 Ανοσοσφαιρίνες.....	61
2.1.1. Δομή.....	62
2.2. Ανοσοενζυμική Μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	65
2.3. Βιβλιογραφία	70

Κεφάλαιο 3° Παραγωγή Αντισωμάτων σε Ζώα.....

3.1. Παραγωγή Αντισωμάτων σε Ζώα	75
3.2. Οι Όρνιθες στην Παραγωγή Αντισωμάτων	78



3.3. Ανοσοφαιρίνη IgY	79
3.4. Ανοσοποίηση Ζώων	80
3.4. Βιβλιογραφία	83
Σκοπός της Μελέτης.....	89
Κεφάλαιο 4^ο Παραγωγή, Απομόνωση και Ταυτοποίηση Αντισωμάτων.....	93
4.1. Εισαγωγή.....	95
4.2. Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH.....	95
4.3. Γενική Μεθοδολογία Ανοσοποιήσεων και ELISA Δοκιμασιών	100
4.3.1. Διαδικασία ανοσοποιήσεων κουνελιών.....	100
4.3.2. Διαδικασία ανοσοποιήσεων ορνίθων.....	102
4.4. Απομόνωση IgY	103
4.4.1. Απομόνωση IgY με αντιδραστήριο απολιπίδωσης.....	103
4.4.2. Απομόνωση IgY με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)	104
4.5. Δοκιμασία ELISA.....	107
4.6. Βιβλιογραφία:	109
Κεφάλαιο 5^ο Αποτελέσματα	111
5.1. Διερεύνηση της Ικανότητας Παραγωγής Αντισωμάτων έναντι του Επιτόπου Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH	113
5.2 Διερεύνηση της Ικανότητας Αναγνώρισης όλων των Παραγόμενων Αντισωμάτων έναντι του Επιτόπου Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH.....	114
5.3. Διερεύνηση της Ικανότητας Αναγνώρισης της Φυσικής Ανθρώπινης Καρδιακής Τροπονίνης από τα Παραγόμενα Αντισώματα	116
5.4. Καθαρισμός αντί Ac-SOC ₄ [cTnI-(19-31)] ₄ -OH Αντισωμάτων	117



5.5. Διερεύνηση Παραγωγής και Απομόνωσης Αντισωμάτων από τις Όρνιθες.....	119
5.5.1. Διερεύνηση απομόνωσης αντισωμάτων με τη χρήση αντιδραστηρίου απολιπίδωσης	119
5.5.2. Διερεύνηση απομόνωσης αντισωμάτων με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)	121
5.5.3. Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του επιτόπου Ac-SOC ₄ [cTnI-(19- 31)] ₄ - OH από τα παραγόμενα σε όρνιθες αντισώματα.....	124
Συμπεράσματα.....	127



Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1^ο

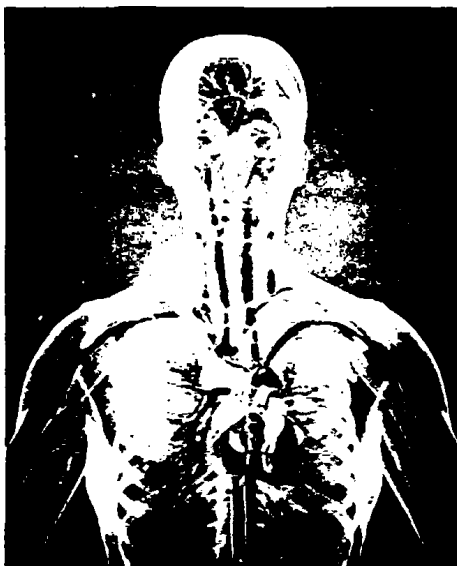
Εισαγωγή στις Καρδιαγγειακές Παθήσεις: Πρόληψη – Διαγνωστικά Μέσα – Αντιμετώπιση



1.1. Εισαγωγή – Το Καρδιαγγειακό Σύστημα – Ο Ρόλος και η Βιολογική Σπουδαιότητα της Καρδιάς

Τα κύτταρα του οργανισμού μας για να διατηρηθούν στη ζωή και να επιτελέσουν τις βιολογικές τους λειτουργίες, χρειάζονται οξυγόνο και μια πληθώρα θρεπτικών ουσιών. Ο εφοδιασμός των κυττάρων με τα απαραίτητα αυτά συστατικά γίνεται από το αίμα, το οποίο εκπληρώνει τον προορισμό του, με το να κυκλοφορεί συνεχώς μέσα στα αιμοφόρα αγγεία. Η καρδιά λειτουργεί αποκλειστικά ως αντλία, παρέχοντας την απαιτούμενη ώθηση για τη συνεχή κυκλοφορία του αίματος μέσα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία συγκροτούν το *καρδιαγγειακό σύστημα*.

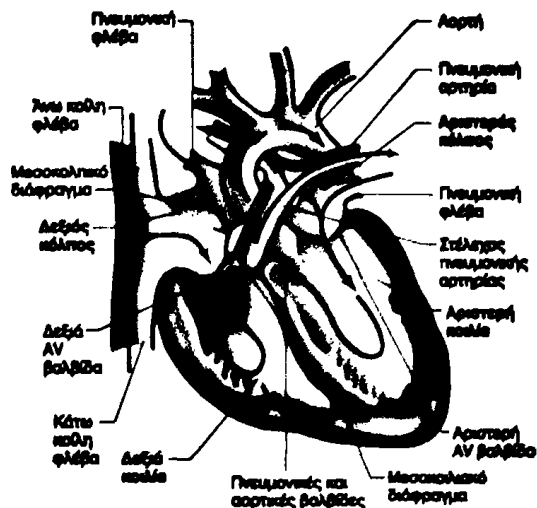
Η καρδιά είναι ένα μυϊκό όργανο που περικλείεται από έναν ινώδη σάκο, το περικάρδιο και βρίσκεται στο θώρακα. Ο στενός χώρος μεταξύ του περικάρδιου και της καρδιάς είναι γεμάτος με ένα υδατώδες υγρό το οποίο παίζει το ρόλο λιπαντικού καθώς η καρδιά μετατοπίζεται μέσα στο σάκο (Εικόνα 1.1.1).



Εικόνα 1.1.1. Η θέση της καρδιάς στο ανθρώπινο σώμα (πηγή: <http://cardionervousobesity.weebly.com/about-the-cardiovascular-system.html>).

Η ανθρώπινη καρδιά χωρίζεται σε δεξιό και αριστερό ημιμόριο, εκ των οποίων το καθένα αποτελείται από έναν κόλπο και μια κοιλία. Μεταξύ του κόλπου και της κοιλίας σε κάθε ημιμόριο της καρδιάς βρίσκονται οι κολποκοιλιακές βαλβίδες οι οποίες επιτρέπουν τη ροή αίματος από τον κόλπο στην κοιλία, αλλά όχι από την κοιλία στον κόλπο (Εικόνα 1.1.2).

Εικόνα 1.1.2. Διαγραμματική τομή της καρδιάς. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της ροής του αίματος (πηγή: Φυσιολογία του ανθρώπου, Vander A, 2001).



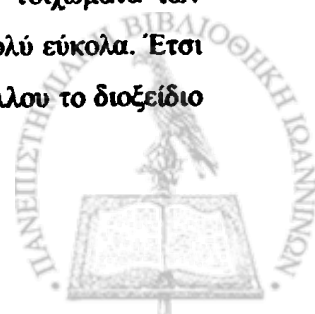
Ο κόλπος λειτουργεί κατά κύριο λόγο, ως ελαφρά υποβοηθητική αντλία για την προώθηση του αίματος προς την κοιλία. Με τη σειρά της η κοιλία προσφέρει την κύρια δύναμη για την προώθηση του αίματος μέσα από την πνευμονική ή την περιφερική κυκλοφορία (Guyton AC, 1997).

Ο σκοπός της λειτουργίας του κυκλοφορικού συστήματος, είναι η εξυπηρέτηση των αναγκών των ιστών, δηλ. η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων προς τους ιστούς, η απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού, η μεταφορά ορμονών από ένα σημείο του σώματος σε άλλο και γενικά η διατήρηση του κατάλληλου περιβάλλοντος σε όλα τα υγρά των ιστών για την άριστη διαβίωση και λειτουργία των κυττάρων.

Το κυκλοφορικό σύστημα διακρίνεται στη συστηματική κυκλοφορία και στην πνευμονική κυκλοφορία. Επειδή η συστηματική κυκλοφορία εφοδιάζει με αίμα όλους τους ιστούς του σώματος, εκτός από τους πνεύμονες, αυτή επίσης ονομάζεται περιφερική κυκλοφορία (Guyton AC, 1997).

☛ Μικρή κυκλοφορία (Πνευμονική κυκλοφορία)

Η πνευμονική αρτηρία ξεκινά από τη δεξιά κοιλία και χωρίζεται στη δεξιά και στην αριστερά πνευμονική αρτηρία, οι οποίες κατευθύνονται στους αντιστοίχους πνεύμονες. Και οι δύο αυτές αρτηρίες μετά την είσοδο τους στους πνεύμονες χωρίζονται σε τόσους κλάδους, όσοι είναι οι λοβοί του πνεύμονα. Ύστερα από μία ακόμη υποδιαίρεση, στο ύψος των πνευμονικών λοβίων, αναλύονται στα τριχοειδή αγγεία του πνεύμονα. Τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων είναι πολύ λεπτά, γι' αυτό και τα αέρια τα διαπερνούν πολύ εύκολα. Έτσι το οξυγόνο του αέρος πέρνα από τις πνευμονικές κυψελίδες στο αίμα. Εξ' άλλου το διοξείδιο



του άνθρακα αποβάλλεται από το αίμα και πέρνα στις πνευμονικές κυψελίδες για να μεταφερθεί προς τα έξω.

Μικρές φλέβες παραλαμβάνουν από τα τριχοειδή του πνεύμονα το αίμα. Οι φλέβες αυτές ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν τελικά τις πνευμονικές φλέβες, οι οποίες, ακολουθώντας τη διαδρομή των αρτηριών, φθάνουν στον αριστερό κόλπο. Η πνευμονική αρτηρία περιέχει αίμα σκοτεινόχρωμο και πλούσιο σε διοξείδιο του άνθρακα (φλεβικό αίμα), ενώ οι πνευμονικές φλέβες περιέχουν αίμα που έχει αποβάλει το διοξείδιο του άνθρακος και έχει παραλάβει το οξυγόνο. Γι' αυτόν τον λόγο, το χρώμα του είναι καθαρό ερυθρό (αρτηριακό αίμα) (Guyton AC, 1997).

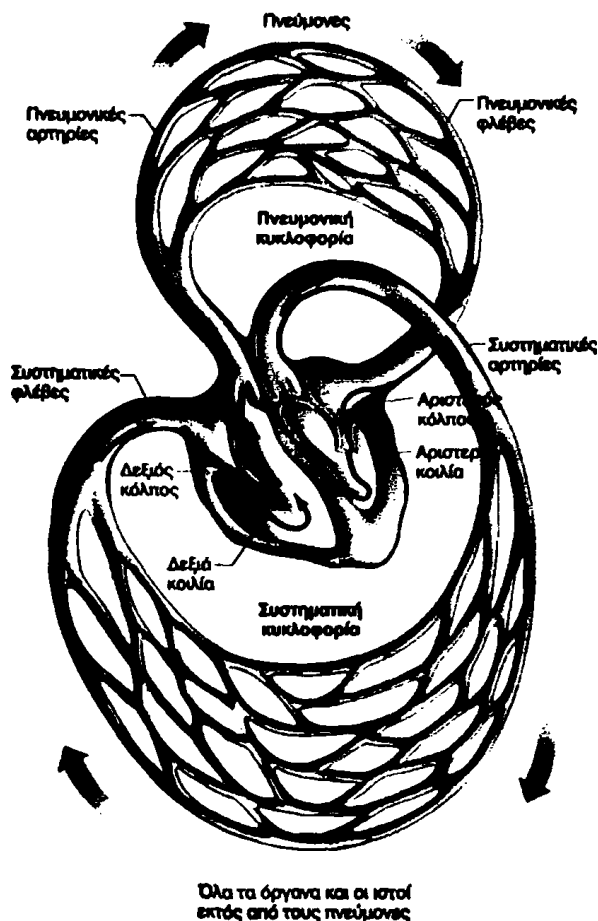
❖ **Μεγάλη κυκλοφορία (Περιφερική κυκλοφορία)**

Η αορτή από την οποία αρχίζει η μεγάλη κυκλοφορία, ξεκινά από την αριστερά κοιλία. Σχηματίζει ένα μεγάλο τόξο που κατευθύνεται προς τα πίσω και αριστερά (αορτικό τόξο). Κατεβαίνει κατακόρυφα, ακολουθώντας τη σπονδυλική στήλη, πέρνα το διάφραγμα και μπαίνει στην κοιλιακή χώρα. Στο τέλος της διαδρομής ή αορτή χωρίζεται στις δύο λαγόνιες αρτηρίες, που κατευθύνονται στα κάτω άκρα. Από την αορτή ξεκινούν διάφοροι κλάδοι, οι οποίοι μεταφέρουν το αίμα στα διάφορα όργανα. Από το αορτικό τόξο ξεκινούν οι υποκλειδίες αρτηρίες, που τροφοδοτούν με αίμα τα άνω άκρα και οι καρωτίδες αρτηρίες, που μεταφέρουν το αίμα στο κεφάλι. Από τη θωρακική αορτή αρχίζουν οι βρογχικές αρτηρίες, οι οποίες κατευθύνονται στους βρόγχους και στους πνεύμονες, οι αρτηρίες του οισοφάγου και οι μεσοπλεύριες αρτηρίες. Από την κοιλιακή αορτή εκφύονται κλάδοι που αιματώνουν το κοιλιακό τοίχωμα και τα σπλάγχνα. Κύριοι κλάδοι της κοιλιακής αορτής είναι:

- ❖ οι δύο νεφρικές αρτηρίες (δεξιά και αριστερή)
- ❖ η ηπατική αρτηρία
- ❖ η άνω μεσεντέριος αρτηρία
- ❖ η κάτω μεσεντέριος αρτηρία

Μέσα στην πύελο η κοιλιακή αορτή διακλαδίζεται στην δεξιά και αριστερή κοινή λαγόνια. Κάθε κοινή λαγόνια αρτηρία διακλαδίζεται στην έσω λαγόνια που αιματώνει την περιοχή της πυέλου και στην έξω λαγόνια που πορεύεται προς το σύστοιχο κάτω άκρο, όπου πλέον χαρακτηρίζεται ως μηριαία αρτηρία. (Vander A, 2001).





Εικόνα 1.1.3. Η συστηματική και η πνευμονική κυκλοφορία. Όπως απεικονίζεται με την ανταλλαγή του χρώματος από μπλε σε κόκκινο, το αίμα είναι πλήρως οξυγονωμένο καθώς ρέει διαμέσου των πνευμόνων και μετά χάνει κάποιο οξυγόνο (κόκκινο προς μπλε) καθώς ρέει διαμέσου των άλλων οργάνων και ιστών. Για λόγους οι αρτηρίες και οι φλέβες που αφήνουν την καρδιά και επιστρέφουν σε αυτήν απεικονίζονται σαν μονά αγγεία, ενώ στην πραγματικότητα, αυτό είναι αλήθεια μόνο για τις αρτηρίες αλλά όχι για τις φλέβες (Vander A, 2001).

1.2. Καρδιαγγειακά Νοσήματα – Συμπτωματολογία

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα σήμερα αποτελούν μεγάλο ιατρικό, αλλά και κοινωνικό πρόβλημα, καθώς κατέχουν μια από τις πρώτες θέσεις στις αιτίες θανάτου μεταξύ ανδρών και γυναικών τόσο στην Ευρώπη (Wong ND, 2014), όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, με τη χώρα μας να συγκαταλέγεται πλέον στο δυσμενή κατάλογο των χωρών που πλήττονται περισσότερο. Το επίπεδο της Δημόσιας Υγείας και της νοσηρότητας μιας κοινωνίας βρίσκεται σε άμεση σχέση με την οικονομική της ανάπτυξη και την κοινωνική της οργάνωση.

Μέχρι και σήμερα θεωρούνται μάλιστα των δυτικών κοινωνιών και αποτέλεσμα της βιομηχανοποίησης, της αστικοποίησης και της υιοθέτησης συγκεκριμένου αστικού τρόπου ζωής, όπως κάπνισμα, διατροφή (φτωχή σε φρέσκα φρούτα και φυτικές ίνες, πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά, ζάχαρη και αλάτι), έλλειψη φυσικής δραστηριότητας που συνιστούν και τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου των αντίστοιχων νοσημάτων.

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, κολπική μαρμαρυγή, υπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, διαβήτης, διατροφή, φυσική δραστηριότητα, 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 (Mackay J, 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 φολικού οξέως), συγγενική σχέση εξ' αίματος μεταξύ των γονέων (Chun JL, 2006).
- ▣ **Ανευρύσματα και διαχωρισμός αορτής:** Πρόκειται για διάταση και ρήξη της αορτής. Παράγοντες κινδύνου είναι: η προχωρημένη ηλικία, η μακροχρόνια υψηλή αρτηριακή πίεση, σύνδρομο Marfan, συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς, σύφιλη και άλλοι λοιμώδεις και φλεγμονώδεις παράγοντες (Mackay J, 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 (Mackay J, 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 μυός 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.

1.3. Αιτιολογία και Παράγοντες Κίνδυνου των Καρδιαγγειακών Παθήσεων

✦ Υπερλιπιδαιμία

Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και άλλων λιπιδίων στο αίμα είναι παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο και ευθύνονται για το 1/3 του συνόλου των καρδιαγγειακών νοσημάτων παγκοσμίως (Mackay J, 2004; Yuan G et al, 2007). Η χοληστερόλη μεταφέρεται στον οργανισμό με τη μορφή δύο ειδών λιποπρωτεϊνών:

- υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη ή HDL
- χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη ή LDL.

Η HDL δεν προκαλεί αθηροσκλήρωση, αντιθέτως έχει αντιαθηρογενείς ιδιότητες (Choi BG et al, 2006). Αντιθέτως η LDL, προκαλεί το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων, κυρίως στεφανιαίων και εγκεφαλικών, με αποτέλεσμα την παρακώλυση της αιματικής ροής στην καρδιά και στον εγκέφαλο αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (Thomson G et al, 2006).

Όπως διατυπώνεται σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες, το πρόβλημα αφορά τόσο άνδρες όσο και γυναίκες, παρόλο που οι γυναίκες προ-εμμηνοπαυσιακά έχουν συνολικά μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, διότι προστατεύονται από τα οιστρογόνα τα οποία προκαλούν αύξηση της HDL (Rossouw JE et al, 2002).



✦ **Κάπνισμα**

Ο μεγαλύτερος κίνδυνος που διατρέχει ένας καπνιστής δεν είναι μόνον η πιθανότητα να εμφανίσει καρκίνο του πνεύμονα. Στην πραγματικότητα, κινδυνεύει από τα καρδιαγγειακά νοσήματα σε πολύ υψηλότερο ποσοστό με προεξάρχοντα το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Το κάπνισμα επάγει τη νοσηρότητα της καρδιάς και των αγγείων μέσω πολλών μηχανισμών (Smith C, 2001; Biann A et al, 1998).

Προκαλεί στένωση των αγγείων και παραγωγή χοληστερίνης, η οποία προάγει την αρτηριοσκλήρωση. Με τους μηχανισμούς αυτούς, το κάπνισμα βλάπτει τη λειτουργία των στεφανιαίων αγγείων, όπως και άλλων αγγείων και οδηγεί στην εκδήλωση στεφανιαίας νόσου. Το κάπνισμα είναι ο σημαντικότερος τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Ευθύνεται για το 1/5 των καρδιαγγειακών παθήσεων παγκοσμίως και για το 30-40% του συνόλου των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο (WHO, 2008).

✦ **Παχυσαρκία**

Με βάση τα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες και στατιστικά στοιχεία του Π.Ο.Υ. και της Ε.Ε., οι άνθρωποι του πλανήτη γίνονται ολοένα πιο παχύσαρκοι.

Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες εκτίμησης της παχυσαρκίας είναι η περιφέρεια της μέσης, και ο Δείκτης Βάρους Σώματος (Body Mass Index – BMI). Ο BMI είναι ο λόγος του βάρους προς το ύψος στο τετράγωνο: [Βάρος (Kg) / Ύψος² (m)] και χρησιμοποιείται κυρίως για την ταξινόμηση των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων. Πρακτικά, κάποιος με BMI <18,5 θεωρείται ελλιποβαρής, με BMI 18.5–24.9 φυσιολογικός, με BMI > 25 θεωρείται υπέρβαρος και κάποιος με BMI > 30 θεωρείται παχύσαρκος (Flegal KM et al, 2014).

✦ **Σακχαρώδης διαβήτης**

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καθώς και το συχνότερο αίτιο ακρωτηριασμών μη τραυματικής αιτιολογίας.

Πάνω από 70 εκατομμύρια ανθρώπων στον κόσμο πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη. Η αλλαγή του τρόπου ζωής και διατροφής, καθώς και η έλλειψη σωματικής άσκησης έχουν



οδηγήσει σε αύξηση της επίπτωσης της νόσου ήδη από την παιδική ηλικία. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη, η οποία παράγεται από το πάγκρεας και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης του οργανισμού. Ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλείται όταν ο οργανισμός δεν μπορεί να παράγει επαρκή ποσότητα ινσουλίνης ή δεν μπορεί να τη χρησιμοποιήσει όπως πρέπει. Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν πολυδιψία, πολουρία, αδυναμία και ανεξήγητη απώλεια βάρους. Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη διατρέχουν τριπλάσιο κίνδυνο να προσβληθούν από ισχαιμική καρδιοπάθεια, σε σχέση με τους υγιείς (Yusuf S et al, 2001; Stuart W et al, 2006).

✦ **Αρτηριακή Υπέρταση**

Ως αρτηριακή υπέρταση ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία οι τιμές της συστολικής αρτηριακής πίεσης είναι υψηλότερες από 140 mmHg και/ή οι τιμές της διαστολικής είναι υψηλότερες από 90 mmHg. Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια πρόωρου θανάτου παγκοσμίως.

Ο επιπολασμός της νόσου τόσο στον αναπτυσσόμενο κόσμο, όσο και στον ανεπτυγμένο είναι πλέον σχεδόν ο ίδιος. Έχει εξελιχθεί σε μείζων θέμα Δημόσιας Υγείας, λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής, καθώς και της αύξησης του επιπολασμού των αιτιολογικών της παραγόντων, όπως η παχυσαρκία, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και η ανθυγιεινή διατροφή (Yusuf S et al, 2001).

✦ **Υγιεινή διατροφή – Έλλειψη φυσικής δραστηριότητας**

Η βιομηχανοποίηση, η αστικοποίηση και η ευρεία χρήση των μηχανοκίνητων μέσων μεταφοράς έχουν οδηγήσει σε ελάττωση της φυσικής δραστηριότητας, ακόμη και στις αναπτυσσόμενες χώρες, σε τέτοιο βαθμό ώστε πλέον το 60% του πληθυσμού παγκοσμίως να μην ασκείται επαρκώς (Mackay J, 2004).

Είναι παγκοσμίως γνωστό ότι διατροφή πλούσια σε λιπαρά, αλάτι, ζάχαρη και φτωχή σε φρούτα και λαχανικά αποτελεί παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Στην έκθεση του Π.Ο.Υ. «δίαιτα, φυσική δραστηριότητα και υγεία», διατυπώνεται η ανάγκη αλλαγής των διατροφικών συνηθειών σε παγκόσμια κλίμακα. Έρευνες στο χώρο της υγείας έχουν καταδείξει πόσο καθοριστικός είναι ο ρόλος της μεσογειακής διατροφής και της καθημερινής μέτριας σωματικής άσκησης στον περιορισμό της υπερχοληστερολαιμίας (Leon AS, 2002; Trichopoulos A, 2003).



4 Κοινωνικοοικονομικές συνθήκες

Οι κοινωνικοοικονομικές ανισότητες αντανakλούν δυστυχώς πάντοτε τις ανισότητες υγείας που παρατηρούνται σε μια κοινωνία. Η επίπτωση της στεφανιαίας νόσου παραδοσιακά ήταν μεγαλύτερη στα υψηλότερα κοινωνικά στρώματα, καθώς η νόσος λόγω ακριβώς των αιτιολογικών παραγόντων θεωρείται «νόσος της ευμάρειας». Αυτό όμως έχει αρχίσει να αλλάζει. Στις βιομηχανικές χώρες όπως Καναδάς, Η.Π.Α., Βρετανία, παρατηρείται υψηλότερη επίπτωση της στεφανιαίας νόσου και των θανάτων από έμφραγμα του μυοκαρδίου, στις χαμηλότερες κοινωνικοοικονομικές ομάδες (The Milan Declaration, 2004). Γεγονός που ερμηνεύεται από την επίπτωση των παραγόντων κινδύνου, όπως αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, διαβήτης, που είναι υψηλότερη στις ομάδες αυτές. Σε αυτό συμβάλλει το χαμηλό ποσοστό από αυτές τις ομάδες χρήσης φαρμακευτικών σκευασμάτων, όπως για παράδειγμα αντιλιπιδαιμικά φάρμακα, καθώς και η μικρή δυνατότητα πρόσβασης σε εξελιγμένες θεραπευτικές μεθόδους.

1.4. Μέτρα Πρόληψης των Καρδιαγγειακών Νοσημάτων

Η καλύτερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων βρίσκεται στο επίπεδο της πρόληψης. Η πρόληψη αποτελεί το μεγαλύτερο όπλο κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς το 80% αυτών μπορούν να προληφθούν. Η πρόληψη διευκολύνεται σημαντικά με την επισήμανση των παραγόντων κινδύνου. Υπάρχουν παράγοντες κινδύνου οι οποίοι δεν μπορούν να αλλάξουν όπως το φύλο, η ηλικία, η κληρονομικότητα. Επιπρόσθετα, υπάρχουν παράγοντες κινδύνου οι οποίοι μπορούν να τροποποιηθούν μέσω της διατροφής ή του τρόπου ζωής και έτσι να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Παράγοντες κινδύνου που μπορεί να αλλάξουν ή να ελεγχθούν με αλλαγές στον τρόπο ζωής ή με φαρμακευτική αγωγή:

- (1). Κάπνισμα: Το κάπνισμα συσχετίζεται με περίπου τριπλάσιο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου και διπλάσιο κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου. Ακόμη σε συνδυασμό με άλλο κύριο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου (π.χ. υπέρταση, διαβήτη, υπερχοληστερολαιμία) οδηγεί σε 20πλάσιο κίνδυνο θανάτου ή εμφράγματος του μυοκαρδίου. Για όσους διακόπτουν το κάπνισμα, ο κίνδυνος μειώνεται σταδιακά για να εξομοιωθεί μετά από ορισμένα χρόνια. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας,



ένα έτος μετά τη διακοπή ο κίνδυνος στεφανιαίου νοσήματος μειώνεται κατά 50%. Σε διάστημα 15 ετών ο σχετικός κίνδυνος θανάτου από στεφανιαία νόσο προσεγγίζει αυτόν κάποιου που δεν κάπνισε ποτέ (WHO, 2008).

(2). Υψηλά επίπεδα χοληστερόλης: Ο κύριος στόχος είναι να μειωθούν αρκετά τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης έτσι ώστε να μειωθεί έτσι ο καρδιαγγειακός κίνδυνος. Μερικοί άνθρωποι διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο επειδή ήδη έχουν καρδιακές παθήσεις. Άλλοι άνθρωποι διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο για καρδιακές παθήσεις επειδή έχουν διαβήτη ή έναν συνδυασμό παραγόντων κινδύνου για καρδιακές παθήσεις. Οι παράγοντες κινδύνου που έχουν επιπτώσεις στη χοληστερόλη είναι:

- κάπνισμα
- υψηλή πίεση αίματος > 140/90
- χαμηλή HDL < 40 mg/dL
- οικογενειακό ιστορικό πρόωρης καρδιοπάθειας (στον πατέρα ή τον αδελφό < 55; στη μητέρα ή την αδελφή < 65)
- ηλικία (άνδρες > 45, γυναίκες > 55 ετών)

(The National Institutes of Health (NIH), a part of the U.S. Department of Health and Human Services)

(3). Υπέρταση: Η αυξημένη αρτηριακή πίεση αποτελεί μείζονα παράγοντα για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και αρρυθμιών, όπως η κολπική μαρμαρυγή. Η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης σε χαμηλά επίπεδα στους ασθενείς επιτυγχάνεται με υγιεινοδιαιτητικά μέτρα και όταν αυτά δεν επαρκούν, με τη χορήγηση κατάλληλης αντιυπερτασικής αγωγής. Η πρόωπη αντιμετώπιση της αρτηριακής υπέρτασης επιφέρει σημαντικά οφέλη και προστατεύει τους πάσχοντες από την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων (ελάττωση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων σε ποσοστό έως 35% και των εμφραγμάτων σε ποσοστό έως 20%) (Havranek EP, 1999).

(4). Αυξημένο σωματικό βάρος και κατανομή λίπους: Το αυξημένο σωματικό βάρος επηρεάζει τη στεφανιαία νόσο, αυξάνει την αρτηριακή πίεση και τα επίπεδα της χοληστερόλης, μειώνει την “καλή” χοληστερόλη και αυξάνει τη πιθανότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη. Ένα ακόμη στοιχείο που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιακών νοσημάτων είναι η κατανομή του λίπους, όταν το λίπος συσσωρεύεται στην κοιλιά και στη μέση (“σωσίβιο”) αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης. Ο ακρογωνιαίος λίθος για τον έλεγχο του βάρους είναι ο περιορισμός της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης

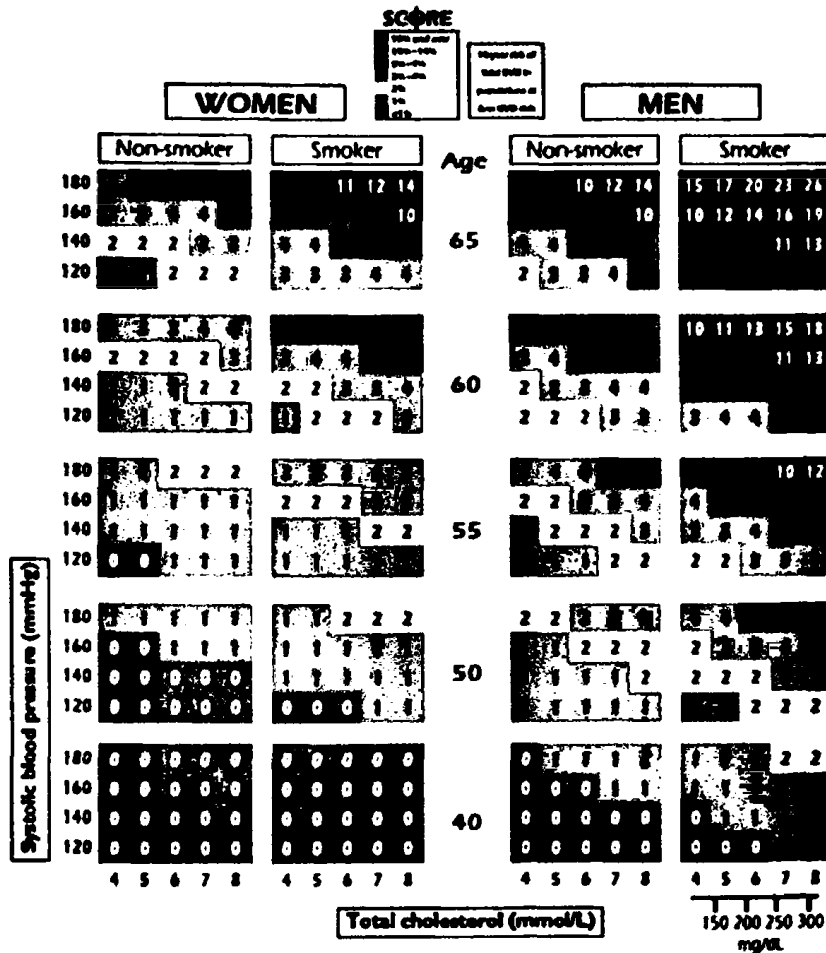


(προσλαμβανόμενες θερμίδες) και μιας μέτριας φυσικής δραστηριότητας (Stevens J et al, 2010).

- (5). Χαμηλή φυσική δραστηριότητα: Η φυσική δραστηριότητα συντελεί στη μείωση των τριγλυκεριδίων του πλάσματος, αυξάνει την καλή χοληστερόλη και βοηθάει στη μείωση του σωματικού λίπους (Yusuf S et al, 2001).
- (6). Επίπεδα σακχάρου: Η εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη (αυξημένο σάκχαρο αίματος) σχετίζεται με βλάβες των μικρού και μεσαίου μεγέθους αρτηριών του οργανισμού (μικροαγγειοπάθεια και μακροαγγειοπάθεια αντίστοιχα). Οι ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη θεωρούνται εξ' ορισμού ως υψηλού κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων, και ως τέτοιοι ωφελούνται από παρεμβάσεις σε όλους τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Σήμερα, επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (ένας δείκτης της καλής ή μη ρύθμισης σακχάρου αίματος) < 6,5% θεωρούνται σημαντικός στόχος για την προστασία των ασθενών αυτών (Stuart W, 2006).

Άτομα που έχουν περισσότερους από έναν παράγοντες κινδύνου εμφανίζουν πολλαπλάσιο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σήμερα, χάρη σε μεγάλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, υπάρχει η δυνατότητα να υπολογισθεί η πιθανότητα ένα άτομο να εμφανίσει καρδιαγγειακή νόσο με βάση τους παράγοντες κινδύνου που έχει. Με αυτό τον τρόπο ο ιατρός μπορεί να κατευθύνει με κατάλληλες συμβουλές και παρεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένου της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής (Harper C et al, 1999).





Εικόνα 1.4.4. Η Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρεία προτείνει για τον υπολογισμό του καρδιαγγειακού κινδύνου το HeartSCORE, κατάλληλα τροποποιημένο για τον ελληνικό πληθυσμό (πηγή: <http://www.eelia.gr/καρδια-και-υγεια>).

1.5. Διαγνωστικές Διαδικασίες – Βιοχημικοί Δείκτες

1.5.1. Κλινικές διαγνωστικές εξετάσεις

Η λήψη του καρδιολογικού ιστορικού με βάση τις παθοφυσιολογικές διαταραχές που προκαλούν οι διάφορες καρδιακές παθήσεις θεωρείται ουσιώδες κεφάλαιο της τελικής διάγνωσης. Μετά τη λήψη του καρδιολογικού ιστορικού, αξιολογούνται τα συμπτώματα του ασθενούς τα οποία συνδέονται με συγκεκριμένες παθοφυσιολογικές διαταραχές και ακολούθως επιβεβαιώνονται με αντικειμενικά ευρήματα της εργαστηριακής διερεύνησης (Ashley E. 2003).

Η εργαστηριακή διερεύνηση διακρίνεται σε αιματηρή και αναίμακτη ανάλογα με τη μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για την τεκμηρίωση της διάγνωσης.

Σήμερα, η τεχνολογική εξέλιξη πέτυχε να περιορίσει σημαντικά το φάσμα της αιματηρής διερεύνησης της καρδιάς.

Η αναίμακτη απεικόνιση της καρδιάς περιλαμβάνει τις εξής μεθόδους:

- ηλεκτροκαρδιογράφημα,
- συνεχής καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος (Holter),
- δοκιμασία κοπώσεως,

καθώς και τις απεικονιστικές τεχνικές:

- ακτινογραφία θώρακα,
- ηχοκαρδιογραφία,
- τομογραφία μαγνητικού συντονισμού,
- πυρηνική καρδιολογία [σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου – τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET)] (Κρεμαστινός ΔΘ, 2005).

✚ Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ)

Το ΗΚΓ είναι εξέταση που χρησιμοποιείται ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη και δίνει πολλές πληροφορίες για την ηλεκτρική δραστηριότητα και επομένως για τη λειτουργία της καρδιάς. Απεικονίζει τη λειτουργία ή τη δυσλειτουργία του συστήματος παραγωγής και αγωγής της διέγερσης (ταχυρρυθμίες – βραδυαρρυθμίες) καθώς και τις παθήσεις του μυοκαρδίου και των στεφανιαίων αρτηριών, οι οποίες επηρεάζουν την ηλεκτρική διέγερση της καρδιάς και τον τρόπο επέκτασής της στο μυοκάρδιο (υπερτροφία μυοκαρδίου, ισχαιμία και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος γίνεται πάνω σε ειδικό χαρτί που είναι τετραγωνισμένο.

✚ Συνεχής καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος (Holter)

Η συνεχής καταγραφή του καρδιογραφήματος (Holter) χρησιμοποιείται για την καταγραφή των διαταραχών του συστήματος αγωγής της διέγερσης καθώς και την καταγραφή της ισχαιμίας του μυοκαρδίου.



Η καταγραφή γίνεται από τέσσερα ηλεκτρόδια που επικολλούνται στο θώρακα του εξεταζόμενου και καταγράφουν σε ένα σύστημα κασέτας το ηλεκτροκαρδιογράφημα σε τρεις απαγωγές (Ashley E, 2003).

✦ Δοκιμασία κοπώσεως

Η δοκιμασία κοπώσεως στοχεύει κυρίως στην διερεύνηση του στεφανιαίου ασθενούς. Από παθοφυσιολογικής πλευράς σκοπός της δοκιμασίας κοπώσεως είναι η διερεύνηση τυχόν ύπαρξης δυσαναλογίας μεταξύ απαιτούμενου και προσφερόμενου O₂ στο μυοκάρδιο (Ashley E, 2003).

Κατά την πραγματοποίηση του τεστ κοπώσεως, ο ασθενής αρχίζει να περπατά πάνω στον κυλιόμενο τάπητα ενώ ανά τρίλεπτο αυξάνεται η ταχύτητα και η κλίση του τάπητα. Ταυτόχρονα καταγράφεται ηλεκτροκαρδιογράφημα 12 απαγωγών καθ' όλη τη διάρκεια της κοπώσεως και επί 10 λεπτά μετά το πέρας της.

Ένα τεστ κοπώσεως μπορεί να δείξει πιθανά σημεία και συμπτώματα της στεφανιαίας νόσου, όπως :

- ❖ Μη φυσιολογικές αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό ή την αρτηριακή πίεση.
- ❖ Δυσκολία στην αναπνοή ή πόνο στο στήθος.
- ❖ Μη φυσιολογικές αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό σας ή την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς.

✦ Ακτινογραφία θώρακος

Η ακτινογραφία θώρακος είναι η παλαιότερη απεικονιστική μέθοδος της καρδιάς και των αγγείων. Η τεχνολογική εξέλιξη με την εισαγωγή κυρίως της ήχωκαρδιογραφίας και της μαγνητικής τομογραφίας περιόρισε σημαντικά το ρόλο της ακτινογραφίας στην καθημερινή πράξη.

Σήμερα η ακτινογραφία θώρακος χρησιμοποιείται ως μέθοδος απεικόνισης προκειμένου να διερευνηθούν:

- ❖ Το μέγεθος της καρδιαγγειακής σκιάς.
- ❖ Η ενεργητική (αρτηριακή) και παθητική αιμάτωση του πνεύμονος (φλεβική στάση).
- ❖ Η εναπόθεση ασβεστίου στην περιοχή που αντιστοιχούν οι βαλβίδες της καρδιάς και στο περικάρδιο.



✦ Ηχοκαρδιογραφία

Οι υπέρηχοι είναι ήχοι με μεγάλη συχνότητα (>20,000Hz) που δεν είναι ακουστικά αντιληπτοί από τον άνθρωπο. Η συχνότητά είναι φυσικό μέγεθος το οποίο είναι αντιστρόφως ανάλογο του μήκους κύματος της εκπεμπόμενης δέσμης. Με το ηχοκαρδιογράφημα, επιτυγχάνεται η απεικόνιση της σε τομές δύο διαστάσεων (ηχοκαρδιογράφημα δύο-διαστάσεων) ή σε τρεις διαστάσεις (ηχοκαρδιογράφημα τριών- διαστάσεων, 3D). Η εξέταση είναι ανώδυνη και ασφαλής και δίνει πληθώρα πληροφοριών χρήσιμων στην επίλυση καρδιολογικών προβλημάτων όπως το Μέγεθος της καρδιάς, των καρδιακών κοιλοτήτων, των μεγάλων αγγείων, το πάχος των τοιχωμάτων της καρδιάς, την κινητικότητα της καρδιάς, τη λειτουργία των βαλβίδων, τη στεφανιαία νόσο και άλλα (Κρεμαστινός ΔΘ, 2005).

✦ Τομογραφία μαγνητικού συντονισμού

Η καρδιαγγειακή απεικόνιση με Μαγνητικό Συντονισμό (CMR) έχει εξελιχθεί σε μία σημαντική και αναντικατάστατη μη επεμβατική τεχνική για την αξιολόγηση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η CMR είναι η πλέον ακριβής και αναπαραγωγίμη τεχνική για τη μορφολογική απεικόνιση της καρδιάς λόγω της υψηλής χωροταξικής ευκρίνειας και αντίθεσης των ιστών που παρέχει.

Εκτός από την παροχή λεπτομερών πληροφοριών ανατομίας η CMR μπορεί να αξιολογήσει τη λειτουργία του μυοκαρδίου, την αιμάτωση, τη βιωσιμότητα των ιστών, τη στεφανιαία ανατομία και ροή του αίματος με ακρίβεια παρόμοια ή ανώτερη από εκείνη που παρέχεται από άλλες καθιερωμένες διαγνωστικές τεχνικές όπως η ηχοκαρδιογραφία με δοβουταμίνη, η τομογραφία εκπομπής φωτονίων (SPECT), η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET).

Επιπλέον η CMR είναι ασφαλής, μη επεμβατική τεχνική χωρίς έκθεση των ασθενών σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

Σε ότι αφορά τη στεφανιαία νόσο η αξία της CMR βασίζεται στη δυνατότητα της εξέτασης να μελετά την καρδιακή ανατομία, την καρδιακή λειτουργία, τη βιωσιμότητα των ιστών, την αιμάτωση του μυοκαρδίου και τη στεφανιαία ανατομία σε μια ενιαία ολοκληρωμένη μελέτη (Κρεμαστινός ΔΘ, 2005).



↳ Πυρηνική καρδιολογία [Σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου – Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET)]

Η πυρηνική ιατρική έχει ευρύτατη εφαρμογή στο χώρο της καρδιολογίας. Εν τούτοις στην κλινική πράξη η συμβολή της περιορίζεται ουσιαστικά στην απεικόνιση της μυοκαρδιακής αιμάτωσης και στην εκτίμηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Η ραδιοϊσοτοπική μελέτη γίνεται με γ-κάμερα η οποία σε σύνδεση με ηλεκτρονικό υπολογιστή καταγράφει τους σπινθηρισμούς ενός ραδιοϊσοτόπου το οποίο εκλεκτικά συγκεντρώνεται στο μυοκάρδιο ή τις καρδιακές κοιλότητες. Το ραδιοϊσότοπο εκπέμπει φωτόνια και γενικά ιονίζουσα ακτινοβολία καθώς ο πυρήνας του μεταβάλλεται ενεργειακά από ένα δεδομένο επίπεδο σε άλλο (Κρεμαστινός ΔΘ, 2005).

Η απεικόνιση της μυοκαρδιακής αιμάτωσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Η απεικόνιση φυσιολογικής αιμάτωσης του μυοκαρδίου υποδηλώνει ή ότι δεν υπάρχουν αθηροσκληρωτικές πλάκες που αποφράσσουν τις στεφανιαίες αρτηρίες σε ποσοστό >70% της διαμέτρου του αυλού της αρτηρίας ή εάν υπάρχουν έχει παράλληλα αναπτυχθεί παράπλευρη κυκλοφορία η οποία αποκαθιστά φυσιολογική την αιμάτωση του μυοκαρδίου. Βασικό πλεονέκτημα είναι ότι ο στεφανιαίος ασθενής μπορεί να παρακολουθείται διαχρονικά και να αξιολογείται η εξέλιξη της νόσου.

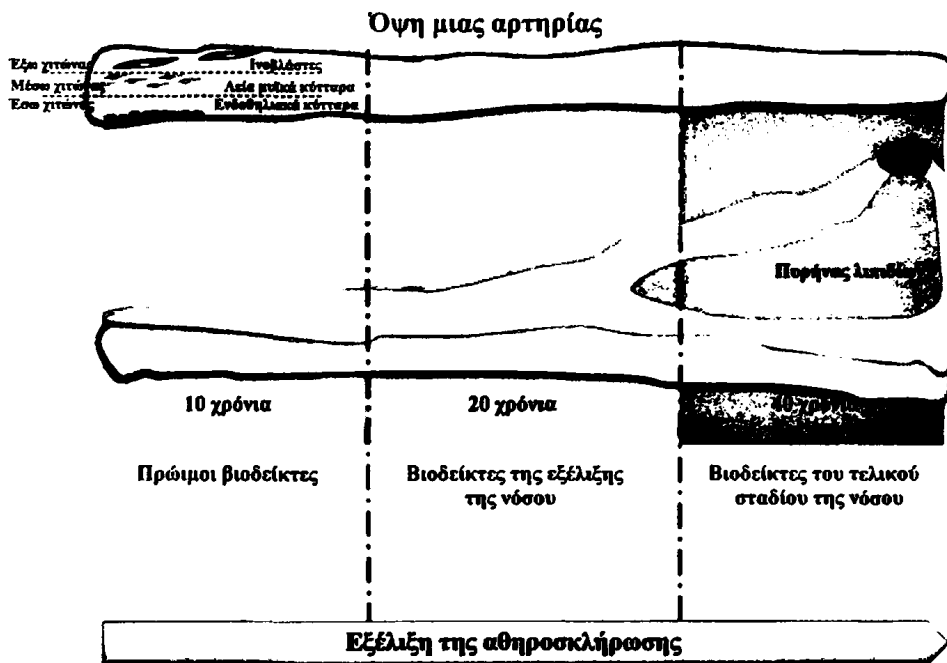
1.5.2 Αιματολογικές εξετάσεις – Βιοχημικοί Δείκτες

Η έννοια της καρδιαγγειακής συνέχειας, εισήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 1990, όταν δημιουργήθηκε μια ολιστική άποψη για την αλυσίδα των γεγονότων που συνδέει τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου με την παθολογική αναδιαμόρφωση των ιστών που οδηγεί προοδευτικά σε καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο. Η κατανόηση των αλλαγών του ιστού, ειδικά με τις νέες τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν κατά τα τελευταία 25-30 χρόνια, επέτρεψε την ανακατασκευή των γεγονότων που διαδραματίζονται εντός του ιστού και που πρέπει να παρακολουθούνται *in vivo* για να διαγνωστεί πιο αξιόπιστα και πιο νωρίς η καρδιαγγειακή νόσος (Vasiliadis et al, 2012).

Το προϊόν της εξέλιξης αυτής ήταν η εισαγωγή μιας σειράς βιοχημικών δεικτών, όπως η τροπονίνη I και T, οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως σε κλινικές για τη μέτρηση της βλάβης του μυοκαρδίου. Ωστόσο, οι βιοδείκτες που θα μπορούν να ανιχνεύσουν ειδικά προηγούμενα στάδια της καρδιαγγειακής συνέχειας πρέπει ακόμη να παραχθούν και να χρησιμοποιηθούν. Η πλειονότητα των υφιστάμενων δεικτών είναι χρήσιμοι μόνο στα τελικά



στάδια της νόσου όπου υπάρχουν λίγες επιτυχημένες επιλογές παρέμβασης. Δεδομένου ότι ένας μεγάλος αριθμός των ασθενών που βιώνουν μια παροδική υποκείμενη παθολογική ανάπτυξη πολύ πριν από τα σημάδια ή συμπτώματα καρδιαγγειακής νόσου γίνουν εμφανή, η απαίτηση για νέους δείκτες που μπορεί περιγράφουν την πρόωρη ιστό-ειδική διαδικασία αναδιαμόρφωσης οποία οδηγεί τελικά στην ασθένεια είναι εμφανής (Vasiliadis et al, 2012).



Εικόνα 1.5.2.5. Βιομοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται κυρίως στα τελικά στάδια της νόσου. (Vasiliadis et al., 2012) Δυστυχώς δεν υπάρχουν βιομοριακοί δείκτες οι οποίοι δείχνουν την εξέλιξη της παθολογικής αναδιαμόρφωσης των ιστών. Στα τελικά στάδια της νόσου όμως οι βιοδείκτες που υπάρχουν είναι η CK-MB, η μυοσφαιρίνη, η λιποπρωτεΐνη α, οι τροπονίνες I και T καθώς και το BNP.

❖ Κινάση της κρεατίνης (CK) και CK-MB

Η κινάση της κρεατίνης είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στην καρδιά, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες και σε άλλους ιστούς. Τα ένζυμα αυτά, είναι πρωτεΐνες που βοηθούν τα κύτταρα να εκτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Στα κύτταρα των μυών και της καρδιάς η κινάση της κρεατίνης είναι πολύ σημαντική για την μυϊκή σύσπαση.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικές μορφές CK, που αναφέρονται ως ισόένζυμα:

- ❖ CK-MM (βρίσκεται κυρίως στους σκελετικούς μύες και την καρδιά),
- ❖ CK-MB (βρίσκεται κυρίως στην καρδιά) και
- ❖ CK-BB (βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο).



Η μικρή ποσότητα της CK που βρίσκεται φυσιολογικά στο αίμα προέρχεται κυρίως από τους μύες. Η CK που προέρχεται από τον εγκέφαλο δεν βρίσκεται υπό κανονικές συνθήκες στο αίμα. Τα επίπεδά της στο αίμα αυξάνουν όταν τραυματίζονται κύτταρα της καρδιάς ή των μυών. Ο ιατρός μπορεί να ζητήσει μέτρηση της CK αν εμφανιστεί πόνος στο στήθος ή άλλες ενδείξεις ή συμπτώματα καρδιακού εμφράγματος. Στις πρώτες 4 ως 6 ώρες μετά το καρδιακό έμφραγμα, η συγκέντρωση της CK στο αίμα αρχίζει να αυξάνεται. Φθάνει το υψηλότερο επίπεδο σε 18 ως 24 ώρες και επιστρέφει σε κανονικά επίπεδα μέσα σε 2 ως 3 ημέρες. Η ποσότητα της CK στο αίμα αυξάνεται επίσης όταν γίνεται βλάβη σε σκελετικούς μύες (έντονη άθληση, τραυματισμοί) (Vasiliadis et al, 2012).

↳ Μυοσφαιρίνη

Η μυοσφαιρίνη είναι η πρωτεΐνη με την οποία συνδέεται το οξυγόνο στους γραμμωτούς μύες (καρδιακό και σκελετικούς). Μοιάζει με την αιμοσφαιρίνη δεδομένου ότι αποτελείται από α, β, γ και δ αλυσίδες. Αντίθετα, προς την αιμοσφαιρίνη υπάρχει μόνο ως μονομερές γι' αυτό και το μοριακό της βάρος είναι το 1/4 της αιμοσφαιρίνης. Σε αντίθεση με την αιμοσφαιρίνη δεν απελευθερώνει οξυγόνο παρά μόνο σε εξαιρετικά χαμηλή πίεση οξυγόνου. Αύξηση της συγκέντρωσης μυοσφαιρίνης στον ορό συμβαίνει έπειτα από τραύμα σε σκελετικό ή καρδιακό μυ. Οι υπάρχουσες μέθοδοι για την ανάλυση μυοσφαιρίνης δεν μπορεί να διακρίνουν εάν η μυοσφαιρίνη προέρχεται από καρδιακό ή σκελετικό μυ. Γι' αυτό και η διαγνωστική της αξία στο έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι περιορισμένη. Μικρή κάκωση σκελετικών μυών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης μυοσφαιρίνης και λανθασμένη διάγνωση εμφράγματος του μυοκαρδίου (Vasiliadis et al, 2012).

Το κύριο πλεονέκτημα της μυοσφαιρίνης ως δείκτη εμφράγματος του μυοκαρδίου έγκειται στο γεγονός ότι απελευθερώνεται πολύ νωρίς από τα κατεστραμμένα κύτταρα. Η συγκέντρωση της μυοσφαιρίνης στον ορό αυξάνεται μέσα στην πρώτη ώρα μετά την εμφάνιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου και οι τιμές κορυφώνονται μεταξύ 4–12 ωρών. Συνεπώς η μέτρηση μυοσφαιρίνης είναι χρήσιμη κατά τις πρώτες 4 ώρες μετά την έναρξη του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Διαγνωστικά ο προσδιορισμός της μυοσφαιρίνης είναι ο αποκλεισμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Έτσι εάν η συγκέντρωση μυοσφαιρίνης παραμένει αμετάβλητη εντός των φυσιολογικών τιμών μετά από πολλαπλές μετρήσεις μέσα στις πρώτες 2–4 ώρες από την εμφάνιση πόνου στο στήθος αποκλείεται με βεβαιότητα 100% το έμφραγμα του μυοκαρδίου.



✚ Λιποπρωτεΐνη α

Η Lp(a) ή αλλιώς η λιποπρωτεΐνη α, μοιάζει με την LDL (την κακή χοληστερίνη), αλλά περιέχει τη μοναδική γλυκοπρωτεΐνη apo a, η οποία είναι εξαιρετικά ομόλογη του πλασμινογόνου (μιας θρομβωτικής ουσίας). Η Lp(a) υπάρχει στις αθηρωματικές βλάβες, σε αναλογία προς τα επίπεδα του πλάσματος και έχει θεωρηθεί ότι παρέχει ένα επιπρόσθετο λειτουργικό κρίκο μεταξύ αθηροσκλήρωσης και θρόμβωσης, οφειλόμενο στην προ-αθηρογόνο (συσσώρευση στον έσω χιτώνα των αγγείων) και προθρομβωτική (ανάμειξη στην παραγωγή πλασμίνης) φύση της. Η Lp(a) αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, για αθηροσκλήρωση. Το όριο της αυξημένης Lp(a) ποικίλει ανάλογα με τη μέθοδο μέτρησης, επίπεδα όμως πάνω από 75 nmol/L θεωρούνται αυξημένα (Stubbs P et al, 1998; Morrisett JD, 2000).

✚ BNP και NT-proBNP

Επίσης γνωστό ως: Β-τύπου Νατριουρητικό Πεπτίδιο, proBNP Επιστημονική ονομασία: Εγκεφαλικό Νατριουρητικό Πεπτίδιο, N-αμινοτελικό άκρο της προορμόνης του Εγκεφαλικού Νατριουρητικού Πεπτιδίου.

Το Β-τύπου Νατριουρητικό Πεπτίδιο (BNP) είναι μια πολυπεπτιδική καρδιακή νευροορμόνη η οποία αποτελείται από 32 αμινοξέα και εκκρίνεται από μεμβρανώδη κοκκία στις καρδιακές κοιλίες, ιδιαίτερα στην αριστερή κοιλία, ως απάντηση σε επέκταση του όγκου κοιλίας και υπερφόρτωση πίεσης. Το BNP ονομάστηκε αρχικά νατριουρητικό πεπτίδιο του εγκεφάλου, και εντοπίστηκε για πρώτη φορά στον εγκεφαλο χοίρου. Υψηλά επίπεδα BNP έχουν βρεθεί σε ασθενείς με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, αριστερή κοιλιακή υπερτροφία, καρδιακή φλεγμονή, πρωτογενή πνευμονική υπέρταση, νεφρική ανεπάρκεια, ασκητική κίρρωση και συνδέεται επίσης με την προχωρημένη ηλικία. Τα επίπεδα συσχετίζονται με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και με την πρόγνωση, και έτσι βοηθούν στην ανίχνευση της παρουσίας της καρδιακής ανεπάρκειας, στο να καθορίσουν τη σοβαρότητά της, και την εκτίμηση της πρόγνωσης (Raizada A et al., 2007; Shapiro BP et al., 2003).

✚ Υψηλής ευαισθησίας CRP (hs-CRP)

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από το συκώτι, με τη συγκέντρωσή της στο αίμα να αυξάνεται ταχύτατα, όταν υφίσταται ερεθισμός ή φλεγμονή στο εσωτερικό των



αιμοφόρων αγγείων. Η φλεγμονή των αγγείων προκαλεί την εναπόθεση χοληστερόλης και ασβεστίου με κίνδυνο να προκληθεί σταδιακά στένωση. Η hs-CRP (υψηλής ευαισθησίας CRP) μπορεί να μετρήσει με μεγαλύτερη ακρίβεια χαμηλότερες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, και έτσι είναι χρήσιμη στην πρόγνωση καρδιαγγειακών παθήσεων σε υγιή άτομα. Η hs-CRP μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση του κινδύνου πριν την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, εμφράγματος ή εγκεφαλικού επεισοδίου (Rosenblat J et al, 2014).

👉 Heart-Type Fatty Acid Binding Protein (H-FABP)

Πρόκειται για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία ελευθερώνεται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος μετά από καταστροφή τμήματος του μυοκαρδιακού ιστού. Το κύριο μειονέκτημά της είναι ότι δεν βρίσκεται αποκλειστικά στην καρδιά, αλλά και στους σκελετικούς μύες (σε πολύ μικρότερες ποσότητες όμως) (Rosenblat J et al, 2014)

👉 Τροπονίνες

Η τροπονίνη εντοπίζεται κυρίως στα μυϊκά ινίδια (94-97%) και σε μικρό ποσοστό (3-6%) στο κυτταρόπλασμα. Οι τροπονίνες εδράζονται στο μόριο της ακτίνης και ρυθμίζουν τη μυϊκή σύσπαση.

Ο φυσιολογικός ρυθμιστής της μυϊκής συστολής είναι το ασβέστιο. Όταν ο μυς βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας (χάλαση) το ασβέστιο συγκεντρώνεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, μια εξειδικευμένη μορφή ενδοπλασματικού δικτύου, με τη βοήθεια ενός συστήματος ενεργού μεταφοράς. Αυτή η αντλία, που ενεργοποιείται από το ATP, μειώνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτταροδιάλυμα σε επίπεδα κάτω του 1 μM. Μια νευρική ώση επιφέρει απελευθέρωση ασβεστίου από τους σάκους του σαρκοπλασματικού δικτύου με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταροδιάλυμα στο ύψος των 10 μM περίπου, γεγονός που επιφέρει τη μυϊκή συστολή.

Η δράση του ασβεστίου στην αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης γίνεται μέσω της τροπομυοσίνης και του συμπλέγματος τροπονίνης, που βρίσκονται επάνω στα λεπτά νημάτια και αποτελούν το ένα τρίτο περίπου της μάζας τους. Η τροπομυοσίνη είναι ένα ραβδί που σχηματίζεται από μια διπλή α-έλικα. Αυτή η πολύ επιμήκης πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70 kDa, είναι τοποθετημένη σχεδόν παράλληλα με τον επιμήκη άξονα των λεπτών νημάτων.

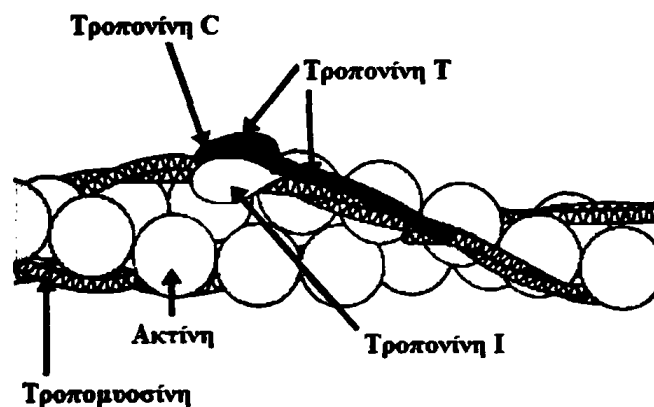


Η τροπονίνη, είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο εδράζεται στα λεπτά νημάτια των μυοσκελετικών και μυοκαρδιακών ιστών και συνίσταται από τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες:

- **Τροπονίνη I (Inhibitor):** Η τροπονίνη I (24 kDa) είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την αναστολή της ΑΤΡασης της ακτινομυοσίνης.
- **Τροπονίνη T (Tropomyosin-binding):** Η τροπονίνη T (37 kDa) αλληλεπιδρά στα λεπτά νημάτια των μυϊκών ιστών με την τροπομυοσίνη.
- **Τροπονίνη C (Calcium-binding protein):** Η τροπονίνη C (24 kDa) ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία ασβέστιο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (Gomes AV, 2002).

Καθένα από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια είναι υπεύθυνο για διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, η έναρξη της μυϊκής σύσπασης λαμβάνει χώρα με την είσοδο των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο και τη δέσμευσή τους από το ισομερές C. Το ισομερές I αποσυνδέεται από την ακτίνη αναστέλλοντας την παρεμποδιστική του δράση στην αντίδραση ακτίνης-μυοσίνης. Τέλος, το ισομερές T ρυθμίζει τη λειτουργία του όλου συστήματος μέσω της ρυθμιστικής πρωτεΐνης τροπομυοσίνης.

Εικόνα 1.5.2.6. Σχηματική παράσταση ινιδίου ακτίνης. Το σύμπλοκο της τροπονίνης ως αναπόσπαστο τμήμα των λεπτών νηματίων των μυϊκών ιστών (πηγή: <http://www.ioanninamed.gr/index.php/topics/58-laboratory-tests-microbiology/765-tropoin>).



Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το σύμπλοκο της τροπονίνης αποτελεί βασικό δομικό συστατικό τόσο των σκελετικών όσο και καρδιακών μυϊκών ιστών. Οι τροπονίνες παρουσιάζονται στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες σε διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Έτσι, για τις τροπονίνες I και T αντίστοιχα υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές, εκ των οποίων οι δύο εκφράζονται στους σκελετικούς μύες, γρήγορης και αργής μυϊκής σύσπασης (fast skeletal muscle



Troponin-IsTn, slow skeletal muscle Troponin-ssTn) και μία μόνο στο μυοκάρδιο (cardiac muscle Troponin-cTn) (Collinson PO, 2000).

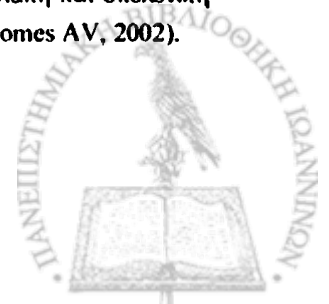
Αντίθετα, για την τροπονίνη C δεν υπάρχει ειδική καρδιακή ισομορφή. Υπάρχουν τρεις σχηματισμοί, εκ των οποίων ο πρώτος είναι αμιγώς μυοσκελετικός (skeletal muscle Troponin C-sTnC), ενώ οι άλλοι δύο (οι οποίοι είναι και 100% ομόλογοι) απαντώνται εξίσου στους δύο τύπους μυϊκών ιστών (skeletal and cardiac muscle Troponin C-cTnC) (Collinson PO et al, 2001). Παρά το γεγονός ότι οι ισομορφές των τροπονινών κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, παρουσιάζουν μεταξύ τους πολύ υψηλή ομολογία η οποία αγγίζει και το 70%. Παράλληλα, έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, κατά τη διάρκεια ενός σκελετικού ή καρδιακού μυϊκού τραυματισμού.

Τροπονίνη C

Η τροπονίνη C, το συστατικό του συμπλέγματος που είναι ευαίσθητο στο ασβέστιο, αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές. Η αμινο-τελική περιοχή και η καρβοξυτελική σφαιρική περιοχή συνδέονται με μια επιμήκη α-έλικα εννέα στρωφών. Κάθε περιοχή περιλαμβάνει δυο θέσεις σύνδεσης για το ασβέστιο. Αυτές που βρίσκονται στην καρβοξυ-τελική περιοχή έχουν υψηλή συγγένεια για το ασβέστιο, ενώ αυτές που βρίσκονται στην αμινο-τελική περιοχή έχουν χαμηλή συγγένεια. Η τροπονίνη C είναι μέλος μιας οικογένειας που δεσμεύουν ασβέστιο και παίζουν σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους.

CTnC	1	NDIYKASVEQLTEELQKNEFKAAFDIEVLGAEDGCISTRBELGKTRMILG
FTnC	1	NTQQAEARSYSSEEMIAEFKAAFDME-DADGGDLSVEELGTRMILG
CTnC	51	NKPEELQEMIDEVDEDGSGTVDFDEFLVIVIVRCYHDSKKGKSEEEISDL
FTnC	50	TRKKEELDAIIEEVDEDGSGTIIDFEFLVIVIVRCYHDSKKGKSEEEIAEC
CTnC	101	RFMFQKNADGYIDLEELKIMLQATSEETIIEDDIEELMFDGDKINNDGRIF
FTnC	100	RFIFDRNADGYIDPEIAEIFRSSHVDEEIESMFDGDKINNDGRIF
CTnC	151	DEEIEFKSE 161
FTnC	150	DEEIKMEEQ 160

Εικόνα 1.5.2.7. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης C (CTnC: καρδιακή και σκελετική τροπονίνη C αργής σύσπασης και FTnC: σκελετική τροπονίνη C γρήγορης σύσπασης) (Gomes AV, 2002).



☐ Τροπονίνη I

Η τροπονίνη I αναστέλλει την ΑΤΡάση της ακτινομοουσίνης ανάλογα με την ποσότητα ασβεστίου που βρίσκεται δεσμευμένη στη TnC. Το σύμπλοκο της τροπονίνης διευκολύνει μέσω του ασβεστίου την ενεργοποίηση της συστολής και ρυθμίζει την συσταλτική λειτουργία των γραμμωτών μυών. Γι' αυτό η τροπονίνη και η τροπομοουσίνη χαρακτηρίζονται ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

CTNI 1	MADGSSDAAREPRPAPAPIRRRSSNYRAYATEE	HAKKKSKISASRKLQLK
FTNI 1	-----	MGDEEKRNRAITARRQHLK
STNI 1	-----	MEEVERKPKITASRKLK
CTNI 51	TLLLOIAKQELEREAEERRGEEKGRALSTRCPLELAGLGF	AELODLRCRL
FTNI 20	SVMLQIAATELEKEESRREAERKONYLAEHCPPLHIPG-	SMSEVQELCKQL
STNI 20	SLMLAKAKECWQEHHEEREAERVRYLAERIPITLQTRGLSL	SALQDLCREL
		Inhibitory Region
CTNI 101	HARVDKVDDEERYDIEAKVTKNITETIADLTQKI	FDLRGKFKRPTLRRVRIS
FTNI 69	HAKIDAAEEEEKYDMEVRVOKTSKELEDMNQKLF	FDLRGKFKRPPLRRVRMS
STNI 70	HAKVEVVDDEERYDIEAKCLHNTREIKDLKLVMDLRGKFKR	PPLRRVRVS
CTNI 151	ADAMMQALLGARAKESLDLRAHLKQVKKEDTEKEN-	REVGDWKKNIDAL
FTNI 119	ADAMLKALLGSKHKVCMDLRANLKVKKEDTEKERDLR	DVGDWKKNIEEK
STNI 120	ADAMLRALLGSKHKVSMDLRANLKS	VKKEDTEKERP-VEVGDWKKNVEAM
CTNI 199	SGMEGRKKK	FES----- 210
FTNI 169	SGMEGRKKM	FESES----- 182
STNI 169	SGMEGRKKM	FDAAKSPTSQ 187

Εικόνα 1.5.2.8. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης I (CTnI: καρδιακή τροπονίνη I, FTnI: σκελετική τροπονίνη I γρήγορης σύσπασης και STnI: σκελετική τροπονίνη I αργής σύσπασης) (Gomes AV, 2002).

☐ Τροπονίνη T

Η τροπονίνη T είναι το συστατικό που αλληλεπιδρά με την τροπομοουσίνη, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μυϊκής συστολής. Συνδέεται με την τροπομοουσίνη και συμβάλλει στην θέση της επί της ακτίνης, καθώς ρυθμίζει με το υπόλοιπο του συμπλόκου της τροπονίνης τη σύσπαση των γραμμωτών μυών.



```

CTnT 1  ISDI...VVE...EEL...E...V...L...Q...E...A...D...A...E...A...T...E...T...R...A...E...D...E...E...E...
FTnT 1  -----MSD...E...V...E...Q...V...E...E...Q...Y...E...E...E...E...A...Q...E...E...E...-----E...V...Q...E...D...T...A...E...E...D...A...E...E...
STnT 1  ISDT...E...R...Q...--...E...Y...E...E...Q...P...E...E...E...A...E...E...E...E...A...P...E...E...P...-----...E...P...V...A...E...P...E...E...P...R...K...

CTnT 51  EAKEAEDGPMEE SKPKPR SFM...P...N...V...P...P...K...I...P...D...G...E...R...V...D...F...D...D...I...H...R...K...R...M...F...K...D...I...N...
FTnT 38  K-----P...R...-----P...K...L...T...A...P...K...I...P...E...G...E...K...V...D...F...D...D...I...K...K...R...I...K...D...L...M...
STnT 42  P-----S...R...P...V...V...P...P...L...I...P...P...K...I...P...E...G...E...R...V...D...F...D...D...I...H...R...K...R...M...E...K...D...L...L...

CTnT 101  ELQALTEA...H...E...N...R...K...K...E...E...E...L...V...S...L...K...D...R...I...E...R...R...A...E...R...A...E...Q...Q...R...I...R...I...E...P...E...E...R...O...N...
FTnT 70  ELQALIDSH...F...E...A...R...K...K...E...E...E...L...V...A...L...K...E...R...I...E...K...R...A...E...R...A...E...Q...Q...R...I...R...A...E...K...E...R...E...R...O...N...
STnT 77  ELQTLIDV...I...F...E...Q...R...K...K...E...E...E...L...V...A...L...K...E...R...I...E...R...R...S...E...R...A...E...Q...Q...R...E...R...T...E...K...E...R...E...R...O...A...

CTnT 151  RLAEERAR...R...E...E...E...N...R...R...K...A...E...D...E...A...R...K...K...K...A...L...S...N...M...H...F...G...G...Y...I...Q...K...Q...E...Q...T...E...R...A...S...K...
FTnT 120  RLAEKAR...R...E...E...E...D...A...K...R...R...A...E...D...D...E...K...K...K...K...A...L...S...S...M...G...--...A...N...H...S...S...Y...L...A...K...A...D...O...K...R...G...E...
STnT 127  KLAEKMR...R...K...E...E...E...E...A...K...K...R...A...E...D...D...A...K...K...K...K...V...L...S...N...M...G...--...A...H...F...G...G...Y...I...V...K...A...E...Q...K...R...G...E...

CTnT 201  RQTERE...K...K...K...K...I...L...A...E...R...R...K...V...I...A...I...D...H...L...N...E...D...Q...L...E...-----...E...K...A...P...
FTnT 168  KQIARE...M...K...K...K...K...I...L...A...E...R...R...K...P...L...N...I...D...H...I...G...E...D...K...I...P...-----...D...Y...A...P...
STnT 175  RQTGRE...M...K...V...R...I...L...S...E...R...K...K...P...L...D...I...D...Y...M...G...E...E...Q...L...P...A...R...S...A...W...L...P...P...S...Q...P...S...C...P...A...R...E...K...Q...

CTnT 235  ELWQSL...Y...N...L...E...A...E...K...F...D...L...Q...E...K...F...K...O...O...K...Y...E...I...N...V...L...R...N...R...I...N...D...N...O...H...V...S...T...R...E...-----...I...A...
FTnT 202  ELWETL...H...Q...L...E...I...D...K...F...E...F...G...E...K...L...K...R...O...K...Y...D...I...T...T...E...R...S...R...I...D...Q...O...K...H...S...K...Y...G...T...P...A...G...
STnT 225  ELSDW...T...H...Q...L...E...S...E...K...F...D...L...M...A...K...L...K...O...O...K...Y...E...I...N...V...L...Y...N...R...I...S...H...E...Q...F...R...E...G...A...G...-----...E...G...

CTnT 282  K...V...I...G...R...E...K... 288
FTnT 252  K...V...G...G...R...E...K... 258
STnT 272  R...V...G...G...R...E...K... 278

```

Εικόνα 1.5.2.9. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης T (CTnT: καρδιακή τροπονίνη T, FTnT: σκελετική τροπονίνη T γρήγορης σύσπασης και STnT: σκελετική τροπονίνη T αργής σύσπασης) (Gomes AV, 2002).

Οι τροπονίνες έχουν ισομορφές που βρίσκονται τόσο στα μυοκαρδιακά όσο και στα μυοσκελετικά κύτταρα, όμως η αναλογία μεταξύ σκελετικής και καρδιακής τροπονίνης είναι 60% για την τροπονίνη I, 90% για την T και πάνω από 90% για την C (Braunwald E, 1997). Έτσι η τροπονίνη C δεν χρησιμοποιείται ως καρδιακός δείκτης, ενώ η τροπονίνη I πλεονεκτεί ως προς την ειδικότητα σε σύγκριση με την T. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να υπάρξουν με την τροπονίνη T σε καταστάσεις όπως η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οι μυοπάθειες, η παρουσία ετεροφίλικών αντισωμάτων. Ακόμα και μικρή άνοδος των τιμών της καρδιακής τροπονίνης T (cTnT) και I (cTnI) σημαίνει μυοκαρδιακή βλάβη προσφέροντας καλύτερη ευαισθησία και απόλυτη ειδικότητα σε σύγκριση με την ισομορφή MB της κρεατινικής φωσφοκινάσης (CK-MB). Οι τροπονίνες (όπως και η CK-MB) θα βρεθούν αυξημένες σε κάθε περίπτωση μυοκαρδιακής βλάβης (π.χ. μυοκαρδίτις, καρδιοτοξικότητα από χημειοθεραπευτικά, σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονική εμβολή) και όχι μόνο σε έμφραγμα στεφανιαίας αιτιολογίας. Σε ποσοστό 20-40% των ασθενών με στηθάγχη, χωρίς



ανάσπαση του ST στο ΗΚΓφημα, θα παρατηρηθεί αύξηση της τροπονίνης. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται σήμερα ως μικροέμφραγμα ή ως ελαχίστη μυοκαρδιακή βλάβη.

Οι τροπονίνες μπορούν να μετρηθούν παρά την κλίνη του ασθενούς και στο εργαστήριο. Αν και ανάλογα με τη μέθοδο, οι φυσιολογικές τιμές ποικίλλουν, ενώ το σύνηθες όριο για τον χαρακτηρισμό μυοκαρδιακής βλάβης είναι 0,1 ng/mL και για τον χαρακτηρισμό εμφράγματος μυοκαρδίου 1,5 ng/mL.

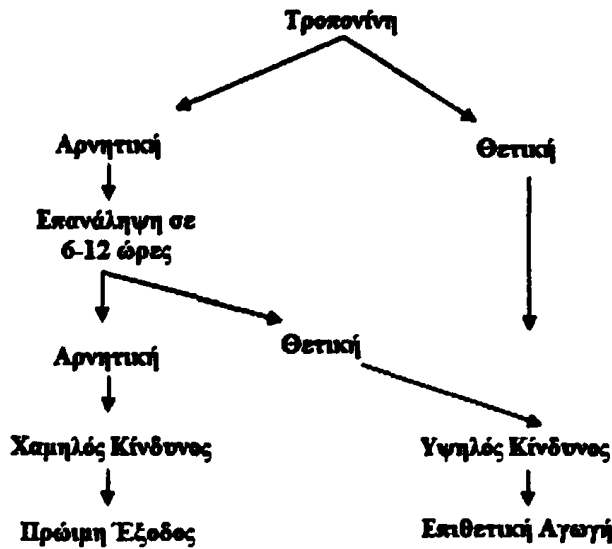
➤ Εκτίμηση πρόγνωσης στην ασταθή στηθάγχη

Η ανεύρεση αυξημένων τιμών cTnT ή cTnI σε ασθενείς με κλινική εικόνα ασταθούς στηθάγχης έχει προγνωστική αξία. Σε ασθενείς με ΗΚΓφημα χωρίς ανάσπαση ST, ακόμα και όταν η CK-MB παραμένει φυσιολογική, οι αυξημένες τιμές cTnT ή cTnI σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου, εμφράγματος και υποτροπής της ισχαιμίας (Antman EM et al, 1996). Συνήθως σε αυτούς τους ασθενείς η στεφανιογραφία αποκαλύπτει σύμπλοκες στενώσεις με παρουσία ενδοαυλικού θρόμβου. Αντίθετα, οι ασθενείς με στηθαγχικό πόνο που έχουν φυσιολογικές τιμές τροπονίνης σε δύο διαδοχικές μετρήσεις με διαφορά 4–6 ωρών (και αφού έχουν παρέλθει τουλάχιστον 6 ώρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων) αποτελούν ομάδα χαμηλού κινδύνου για εμφάνιση υποτροπών. Οι ασθενείς αυτοί μπορούν να λάβουν γρήγορα εξιτήριο ή να υποβληθούν άμεσα σε δοκιμασία κοπώσεως (Hamm CW, 1997).

Πίνακας 1.5.2.1. Χρόνος εμφάνισης τροπονινών και άλλων βιομοριακών δεικτών στο αίμα (Roseblat et al, 2012).

Δείκτης	Ισοένζυμο/ Ισομορφή	Εύρος Αναφοράς	1 ^η Ανίχνευση (μετά από MI)	Μέγιστη Απελευθέρωση	Ευαισθησία/ Εξειδίκευση
Κινάση της Κρεατίνης	CK-MB	<6U/L	4–8 ώρες	18–24 ώρες	90%/80%
Γαλακτική Αφυδρογονάση	αναλογία LD1/LD2	<1,0	8–12 ώρες	24–72 ώρες	90%/90–99%
Μυογλοβίνη	N/A	15-120 ug/L	2–4 ώρες	10–12 ώρες	99%/70%
Τροπονίνη	cTnI, cTnT	<0,08 ug/L	2–8 ώρες	18–24 ώρες	99%/99%





Σχήμα 1.5.2.1. Πρακτικός αλγόριθμος τροπονινών (πηγή: <http://www.hygeia.gr/page.aspx?p id=181>).

➤ Τέστ τροπονίνης

Το τεστ τροπονίνης, είναι ένα γρήγορο ανοσολογικό χρωματογραφικό τεστ ενός βήματος για την ποιοτική ανίχνευση της ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης I σε δείγματα πλήρους αίματος, ορού ή πλάσματος ως βοήθεια στη διάγνωση μυοκαρδιακού εμφράγματος (MI). Η καρδιακή τροπονίνη I (cTnI) είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στον καρδιακό μυ με μοριακό βάρος 22,5 kDa.

- ❖ Μετά από καρδιακό τραύμα, η cTnI απελευθερώνεται στο αίμα 4–6 ώρες μετά από την αρχή του πόνου. Ο τρόπος απελευθέρωσης της cTnI είναι παρόμοιος με του CK-MB, αλλά ενώ τα επίπεδα του CK-MB επανέρχονται στο κανονικό μετά από 72 ώρες, τα επίπεδα της cTnI παραμένουν υψηλά για 6–10 μέρες και έτσι παρέχουν μεγαλύτερο χρονικό περιθώριο ανίχνευσης καρδιακού τραύματος. Η υψηλή ειδικότητα των μετρήσεων της cTnI για την ταυτοποίηση μυοκαρδιακών βλαβών έχει αποδειχθεί σε καταστάσεις, όπως η περιχειρουργική περίοδος, μετά από μαραθώνιους και σε αμβλεία τραύματα του στήθους.
- ❖ Η απελευθέρωση της cTnI έχει διαπιστωθεί επίσης σε καρδιακές καταστάσεις διαφορετικές από οξύ μυοκαρδιακό έμφραγμα (AMI) όπως ασταθή στηθάγχη, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και ισχαιμική βλάβη λόγω χειρουργικής bypass της στεφανιαίας αρτηρίας.

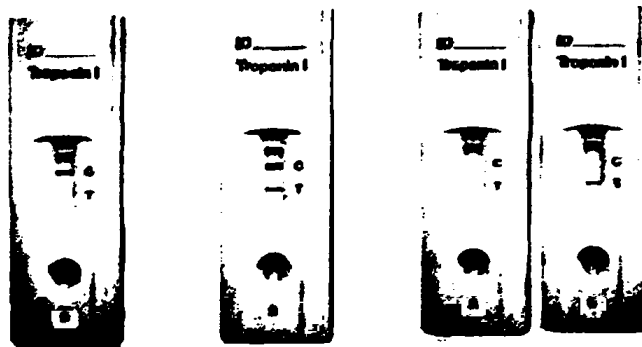
- ❖ Λόγω της υψηλής της ειδικότητας και ευαισθησίας στον μυοκαρδιακό ιστό, η cTnI έχει πρόσφατα γίνει ο πλέον προτιμητέος βιοδείκτης (biomarker) για μυοκαρδιακό έμφραγμα.

Το τεστ τροπονίνης είναι ένα απλό τεστ που χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό συζευγμένων αντισωμάτων anti-cTnI και αντιδραστήριο δέσμευσης ώστε να ανιχνεύει επιλεκτικά την cTnI σε πλήρες αίμα, ορό ή πλάσμα. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης είναι 1,0 ng/mL (Jesse RL, 2010).

► Αργή λειτουργίας

Το τεστ τροπονίνης είναι ένα ποιοτικό, ανοσολογικό τεστ βασισμένο σε μεμβράνη για την ανίχνευση του 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 δε 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 1.5.2.10. Σύγχρονα τεστ τροπονίνης (πηγή: <http://www.diagnosticsupport.gr>).

1.6. Αντιμετώπιση Καρδιαγγειακών Νοσημάτων – Θεραπευτική Αγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, παρά τις σημαντικές παρεμβάσεις που έχουν γίνει στην πρωτογενή και τη δευτερογενή πρόληψή τους, προκαλούν πολλούς θανάτους στο δυτικό κόσμο τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Μιλώντας περί καρδιαγγειακών παθήσεων πρέπει να αποσαφηνίσουμε ότι η μερίδα του λέοντος ανήκει στην αθηρωματική νόσο, την προοδευτική εναπόθεση λιπώδους περιεχομένου στο αρτηριακό τοίχωμα με στένωση του αυλού των αγγείων και μείωση της αιματώσεως των ανάλογων οργάνων (Wong ND, 2014).

Η αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων μπορεί να γίνει μέσω της πρόληψης και μέσω της νοσοκομειακής παρέμβασης.

Σε επίπεδο πρόληψης, είναι πολύ σημαντική η αλλαγή του τρόπου ζωής, η οποία μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση κύριων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Δεδομένου ότι παχυσαρκία συνδέεται άμεσα με αύξηση της VLDL-χοληστερόλης (Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη (Very Low Density Lipoprotein), της LDL-χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων καθώς και με τη μείωση της HDL-χοληστερόλης είναι σημαντικό να αυξηθεί η σωματική δραστηριότητα η οποία οδηγεί σε απώλεια βάρους και συνδέεται άμεσα με τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ. Η απώλεια βάρους έχει ακριβώς τα αντίστροφα αποτελέσματα: μείωση της VLDL και της LDL-χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και αύξηση της HDL-χοληστερόλης (Blake DH et al, 1995).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα έχει δόσοεξαρτώμενη αρνητική σχέση με τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης, ακόμη και όταν καταναλώνεται λιγότερο από ένα πακέτο την ημέρα. Γίνεται λοιπόν σαφές πως η διακοπή του οδηγεί σε αύξηση της HDL-χοληστερόλης και μείωση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου (Harper C et al, 1999). Όσον αφορά την παραδοσιακή διατροφή για τη μείωση της χοληστερόλης, αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλή πρόσληψη συνολικών και κορεσμένων λιπών και χοληστερόλης καθώς και τη μερική αντικατάσταση με μονο- και πολυακόρεστα λίπη και αυξημένες ποσότητες υδατανθράκων. Έχει αποδειχθεί ότι η μεσογειακή διατροφή συμβάλλει καταλυτικά στη μείωση της χοληστερόλης και της συχνότητας και θνητότητας των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Fenske TK, 2001). Πρωτεύουσας σημασίας είναι οι ρόλοι των στερολών των φυτών, η πρωτεΐνη σόγιας και οι σύνθετοι υδατάνθρακες. Ξεχωριστό ρόλο διαδραματίζουν και τα ω-3 λιπαρά οξέα στην αύξηση της HDL-χοληστερόλης.



Οι βασικοί τρόποι της νοσοκομειακής προσέγγισης των καρδιαγγειακών επιπλοκών είναι:

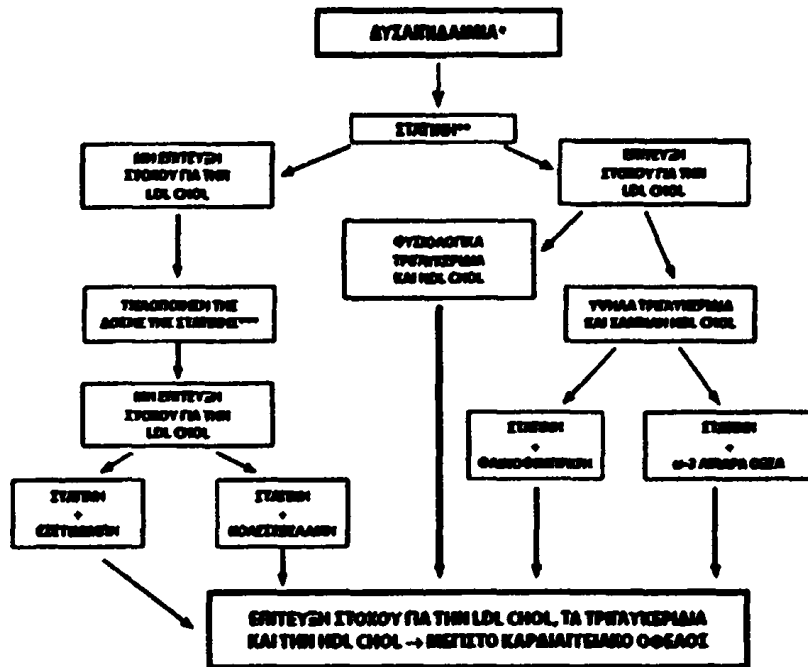
- ❖ **Συντηρητική προσέγγιση:** Περιλαμβάνει την ιατροφαρμακευτική περίθαλψη και χορήγηση στον ασθενή αντιθρομβωτικών και άλλων φαρμάκων (στατίνες). Η θρομβόλυση βασίζεται στη χορήγηση ειδικών φαρμάκων που μπορούν να διαλύσουν τους θρόμβους οι οποίοι σχηματίζονται και αποφράσσουν τα στεφανιαία αγγεία. Παράλληλα, η ανακάλυψη των στατινών θεωρήθηκε ως μια από τις σημαντικότερες επιτεύξεις της σύγχρονης ιατρικής. Οι στατίνες είναι μια ομάδα φαρμάκων που εμποδίζουν τη σύνθεση χοληστερόλης.

Η χορήγηση στατινών ελαττώνει σημαντικά την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα, καθώς και την ολική θνητότητα (οι στατίνες αποτελούν τη μόνη κατηγορία χρονίως χορηγούμενων φαρμάκων που ελαττώνουν την ολική θνητότητα και όχι μόνο τη θνητότητα που σχετίζεται με την πάθηση για την οποία χορηγούνται).

Οι στατίνες είναι τα πλέον ισχυρά φάρμακα στη μείωση της LDL-C, αλλά λιγότερο δραστικά στη μείωση των τριγλυκεριδίων και την αύξηση της HDL. Τα φάρμακα αυτά δρουν ως αναστολείς της αναγωγάσης του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλικού συνενζύμου A (HMG-CoA reductase), που αποτελεί το τελικό και χωρίς επιστροφή βήμα για τη σύνθεση της χοληστερόλης στο σημείο όπου το HMG-CoA μετατρέπεται σε μεβαλονικό οξύ (mevalonate). Οι στατίνες δρουν έτσι σε ένα πρώιμο στάδιο της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, αναστέλλοντας τη σύνθεση του μεβαλονικού, του οποίου η διαθέσιμη ποσότητα παίζει ρόλο στο ρυθμό της σύνθεσης της χοληστερόλης. Η προκύπτουσα μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στα ηπατικά κύτταρα από τη δράση των στατινών πυροδοτεί την αύξηση της έκφρασης των ηπατικών υποδοχέων της LDL-C, με αποτέλεσμα να αυξάνει η απόσυρση της LDL-C και των πρόδρομων μορφών αυτής από την κυκλοφορία. Τα είδη των στατινών που είναι σήμερα διαθέσιμα είναι η ατορβαστατίνη, η φλουβαστατίνη, η πραβαστατίνη, η λοβαστατίνη, η σιμβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη (Elisaf M et al, 2014).

Η επιλογή του φαρμάκου και η δοσολογία του εξαρτώνται από την ποσοστιαία μεταβολή της LDL χοληστερόλης που είναι απαραίτητη για την επίτευξη των στόχων της αγωγής (σχήμα), καθώς και από τις άλλες συνυπάρχουσες παθήσεις. Η υπολιπιδαιμική αγωγή είναι θεραπεία εφόρου ζωής και έχει ιδιαίτερη σημασία η συμμόρφωση των ασθενών στην αγωγή.





Σχήμα 1.6.2. Αλγόριθμος φαρμακευτικής θεραπευτικής προσέγγισης ασθενών με δυσλιπιδαιμία (Elisaf M et al, 2014).

❖ **Επεμβατική προσέγγιση:** Περιλαμβάνει την αγγειογραφία και τη χειρουργική επέμβαση ανάλογα με την εξέλιξη του ασθενούς. Η αγγειοπλαστική είναι μια αναίμακτη τεχνική της επεμβατικής καρδιολογίας που στοχεύει στη διάταση της στενωμένης στεφανιαίας αρτηρίας με τη βοήθεια ειδικού μπαλονιού. Σε περιπτώσεις που η διάνοξη της στενωμένης αρτηρίας δεν είναι ικανοποιητική μπορεί να τοποθετηθεί και μια ενδοαυλική πρόθεση (μεταλλικό stent).

Συμπερασματικά η αποτελεσματικότερη μέθοδος αντιμετώπισης καρδιαγγειακών παθήσεων παραμένει η πρόληψη. Παρά τις τεχνολογικές εξελίξεις και τις αποκαλύψεις νέων φαρμακευτικών ουσιών το μεγαλύτερο όφελος προς τον γενικό πληθυσμό και τους πάσχοντες από καρδιαγγειακή νόσο παραμένει η τροποποίηση των παραγόντων κινδύνου που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επίσης, η συνοδός φαρμακευτική αγωγή όπως κρίνεται σκόπιμη ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κάθε ασθενούς και όταν ενδείκνυται η διατέλεση επεμβατικών ή καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων, μπορεί επιπλέον να βελτιώσει σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης ασθενών με καρδιαγγειακή νόσο.

1.7. Βιβλιογραφία

Adamcova M, Sterba M, Simunek T, Potacova A, Popelova O, Gersl V. Myocardial regulatory proteins and heart failure. *Eur J Heart Fail.* (2006), 8(4):333–42

Adams JE III, Bodor GS, vila-Roman VG. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation.* (1993), 88(1): 101–6

Anagnostopoulos C, Bax JJ, Nihoyannopoulos P, van der Wall E. Noninvasive Imaging of Myocardial Ischemia. Springer-Verlag London Limited, (2006), ISBN-10: 1846280273

Antman EM, et al. Cardiac specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* (1996), 335: 1342-1349

Ashley E, Niebauer J. Cardiology Explained (Remedica Explained), 2003

Biann A, Devine C, Naser S. & McCollum CN. The influence of acute smoking in leukocytes, platelets, and the endothelium. *Atherosclerosis.* (1998), 141, pp. 133-139

Blake DH, Triplett LC. Management of hypercholesterolemia. *Am Fam Physician.* (1995), 51:1157–1166

Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature,* (2002), 417,750

Braunwald E. Heart Disease, 5th edition. Saunders, Philadelphia, PA, (1997), 1202- 1204

Choi BG, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *MtSinai J Med.* (2006), 73:691–701

Chun JL. Congenital Heart Disease. (2006), Medline Plus Medical Encyclopedia

Collinson PO. Cardiac markers into the new millennium. *Ann. Clin. Biochem.*(2000), 37,109

Collinson, PO, Chamberlain L. Cardiac markers in the diagnosis of acute coronary syndromes. *Curr. Cardiol. Rep.* (2001),3, 280

Collinson P, Gaze D, Thokala P, Goodacre S. Randomised Assessment of Treatment using Panel Assay of Cardiac markers - Contemporary Biomarker Evaluation (RATPAC CBE). *Health Technol Assess.* (2013), 17(15):1-122.



De Luca G, van't Hof AW, de Boer MJ, Ottervanger JP, Hoorntje JC, Gosselink AT. Time-to-treatment significantly affects the extent of ST-segment resolution and myocardial blush grade in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Eur. Heart J.* (2004), 25, 1009

Elisaf M, Pitsavos C, Liberopoulos E, Tziomalos K, Athyros V. Updated guidelines of the Hellenic Society of Atherosclerosis for the diagnosis and treatment of dyslipidemia-2014. *Hellenic Journal of Atherosclerosis.* (2014), 5(3):151–163

Fenske TK. Lipid lowering updates 2001. Aggressive new goals. *Can Fam Physician.* (2001), 47:303–309

Flegal KM, Kit BK, Graubard BI. Body Mass Index Categories in Observational Studies of Weight and Risk of Death, *Am. J. Epidemiol.* (2014), 180,(3):288-96

Fukuda N, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S. Titin and troponin: central players in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Curr Cardiol Rev.* (2009), 5(2):119–24

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* (2001), 104, 503

Gomes AV, Potter JD, Szczesna-Cordary D. The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* (2002); 54:323–333

Gomes AV, Guzman G, Zhao J, Potter JD. Cardiac Troponin T Isoforms Affect the Ca²⁺ Sensitivity and Inhibition of Force Development. *The Journal of Biological Chemistry.* (2002), 277,3541-3549

Grybauskienė R, Karčiauskaitė D, Braždžionytė J, Janėnaitė J, Bertašienė Z, Grybauskas P. Brain natriuretic peptide and other cardiac markers predicting left ventricular remodeling and function two years after myocardial infarction *Medicina (Kaunas).* (2007), 43:(9)

Guyton AG, Hall JE. Φυσιολογία του ανθρώπου και μηχανισμοί των νόσων. Έκτη έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις “Γρηγόριος Παρισιάνος”, (1997)

Hamm CW, et al. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N Engl J Med.* (1997), 337: 1648-1653



Harper C, Jacobson TA. New perspectives of the management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *Arch Intern Med.* (1999), 159:1049–1057

Havranek EP. Primary prevention of CHD: Nine ways to reduce risk. *Am Fam Physician.* (1999), 59:1455–1463

Health and Consumer Affairs Council Meeting on Employment and Social Policy, 2006

Heeschen C, et al. Troponin concentrations for risk stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. *Lancet.* (1999), 354: 1757-1762

Hedges JR, Young GP, Henkel GF, Gibler WB, Green TR, Swanson JR. Early CK-MB elevations predict ischemic events in stable chest pain patients. *Acad Emerg Med.* (1994), 1(1):9–16

Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation.* (2003), 108(7):833–8

Huff MW. Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol.* (2003), 10 SupplA:26A-32A

Iskandrian AE, Garcia EV. Nuclear Cardiac Imaging, Principles & Applications. 4th edition, Oxford University Press Inc. (2008), ISBN-13: 978-0-19-531119-8

Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. *It's time for a change to a troponin standard.* *Circulation* (2000), 102:1216–20

Jesse RL. On the relative value of an assay versus that of a test: a history of troponin for the diagnosis of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* (2010), 55:2125–2128

Jurlander B, Clemmensen P, Wagner GS, Grande P. Very early diagnosis and risk stratification of patients admitted with suspected acute myocardial infarction by the combined evaluation of a single serum value of cardiac troponin-T, myoglobin, and creatine kinase MB(mass). *Eur Heart J.* (2000), 21(5):382–9

Kambayashi Y, Nakao K, Mukoyama M, et al. Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium 37. *FEBS Lett.* (1990), 259(2):341–5



Kannel WB, Hazards, risks, and threats of heart disease from the early stages to symptomatic coronary heart disease and cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther.* (1997), 11, 199 [review]

Kim LJ, Martinez EA, Faraday N, et al. Cardiac troponin I predicts short-term mortality in vascular surgery patients. *Circulation.* (2002), 106(18):2366–71

Κρεμαστινός ΔΘ. Καρδιολογία, Επίτομη Κλινική Καρδιολογία, 2005, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη

Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *MedSci Sports Exerc.* (2002), 33:502–515

Lewandowski K, Chen A, Januzzi J. Cardiac markers for myocardial infarction. A brief review. *Am J Clin Pathol.* (2002), 118 Suppl: S93–9

Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* (1995), 91, 2844

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* (2002), 420, 868

Libby P. & Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* (2006), 48, 33–46

Libby P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complication of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* (2009), 50, S352–s357

Libby P, Ridker PM & Hansson GK From Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* (2011), 473, 317–325

Lowenthal A, Camacho B, Lowenthal S, et al Usefulness of B-Type Natriuretic Peptide and N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide as Biomarkers for Heart Failure in Young Children With Single Ventricle Congenital Heart Disease, *J Am J Cardiol* (2012), 109:866-872

Mackay J, Mensah G. Atlas of Heart Disease and Stroke, 2004

McCullough PA, Nowak RM, McCord J. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation.* (2002), 106:416-22



McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* (1999), 84:9–20

McDonough JL, Van Eyk JE. Developing the next generation of cardiac markers: disease-induced modifications of troponin I. *Prog Cardiovasc Dis.* (2004), 47:207–16

Menge T, Hartung HP, Stüve O. Statins—a cure all for the brain? *Nature Reviews Neuroscience.* (2005), 6, 325-331

Morrisett JD. The role of lipoprotein[a] in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* (2000), 2(3):243–50

Morrow DA, et al. Cardiac troponin I for stratification of early outcomes and the efficacy of enoxaparin in unstable angina: a TIMI 11B substudy. *J Am Coll Cardiol.* (2000), 36: 1812-1817

Morrow DA. Chapter in: Cardiovascular biomarkers : pathophysiology and disease management. Humana Press, 2006

Mosca L, Grundy SM, Judelson D, et al. Guide to Preventive Cardiology for Women. AHA/ACC Scientific Statement Consensus panel statement. *Circulation.* (1999), 99,(18):2480-4

Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, et al. Summary of the American Heart Association's evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004), 24(3):394-6

Muehlschlegel JD, Perry TE, Liu KY, et al. Troponin is superior to electrocardiogram and creatinine kinase MB for predicting clinically significant myocardial injury after coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J.* (2009), 30(13):1574–83

National Diabetes Information Clearinghouse, 2005

Neaton J, Blackburn H, Jacobs D, Kuller L, Lee DJ, Sherwin R, Shih J, Stamler J. & Wentworth D. Serum cholesterol levels and mortality findings for men screened in the multiple risk factor intervention trial. Multiple risk factor intervention trial research group. *Arch Intern Med.* (1992), 152, pp. 1490-1500



Newby LK, Storrow AB, Gibler WB, et al. Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: The chest pain evaluation by creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study. *Circulation*. (2001), 103(14):1832–7

Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *NEJM*. (2005), 352, 29

Πατσιλινάκος Σ, και συν. Η κλινική αξία του CK-MB, της τροπονίνης και των άλλων καρδιακών δεικτών στη σημερινή διαγνωστική και θεραπευτική. Νεότερα δεδομένα. *Καρδιά και Αγγεία* (1999), IV: 527-533

Raizada A, Bhandari S, Khan MA, et al. Brain type natriuretic peptide (BNP)- a marker of new millennium in diagnosis of congestive heart failure. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. (2007), 22:4–9

Rosenblat J., Angela Zhang, Thomas Fear, Biomarkers of myocardial infarction: past, present and future. *UWOMJ*. (2012), 81:1

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. (2002), 288:321–333

Shave R, Baggish A, Keith GK, Wood M, Scharhag J, Whyte G, Gaze D. Thompson PD Exercise-Induced Cardiac Troponin Elevation Evidence, Mechanisms, and Implications, *MD Journal of the American College of Cardiology*. (2010), Vol. 56, No. 3

Shapiro BP, Chen HH, Burnett JC Jr, Redfield MM. Use of plasma brain natriuretic peptide concentration to aid in the diagnosis of heart failure. *Mayo Clin Proc*. (2003), 78(4):481–6

Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development*. (2004), 14,1

Smith C. & Fiscer TH. Particulate and vapour phase constituents of cigarettes mainstream smoke and risk of myocardial infraction. *Atherosclerosis* (2001), 158, pp. 257-267



Solaroa RJ, Rosevearb P, Kobayashia T. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* (2008), 369(1): 82–87

Stevens J, Katz EG, Huxley RR. Associations between gender, age and waist circumferenceAssociations between gender, age and WC. *European Journal of Clinical Nutrition.* (2010), 64, 6-15

Stuart W, Smellia A. Hypertriglyceridemia in diabetes. *Br MedJ.* (2006), 333:1257–1260

Stubbs P, Seed M, Lane D, Collinson P, Kendall F, Noble M. Lipoprotein(a) as a risk predictor for cardiac mortality in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* (1998), 19(9):1355–64

Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS. Statins and Cognition: A Systematic Review and Meta-analysis of Short- and Long-term Cognitive Effects, *Mayo Clin Proc.* (2013), 88(11):1213-21

Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Brain natriuretic peptide- 32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* (1988), 155(2):726–32

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* (1988), 332(6159):78–81

Takeda S, Yamashita A, Maeda K, and Maeda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2⁺)-saturated form. *Nature.* (2003), 424, (6944): 35–4

The Milan Declaration: Positioning Technology to Serve Global Heart Health (2004). 5th International Heart Health Conference, available online at: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/media/en/cvd_milan_declaration.pdf

Thomson G, Morrel J, Wilson P. Dyslipidaemia in clinical practice. 2nd Ed. Informa Healthcare, (2006), London

Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation.* (2007), 116(22):2634–53



Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* (2003), 348:2599–2608

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

Varga EA, Sturm AC, Misita CP; Moll S, Homocysteine and MTHFR Mutations Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease. *Circulation.* (2005), 111:e289-e293

Vassiliadis E, Barascuk N, Didangelos A, Karsdal MA. Novel Cardiac-Specific Biomarkers and the Cardiovascular Continuum. *Biomarker Insights.* (2012), 7 45–57

Wackers FJT, Bruni W, Zaret BL. Nuclear Cardiology, The Basics. 2nd edition, Humana Press Inc, (2008). eISBN 978-1-59745-262-5

Wilkinson JM, Grand RJ. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature.* (1978), 271(5640):31–5

WHO. Guidelines for the assessment and management of total cardiovascular risk. Geneva: World Health Organization; 2007. Prevention of Cardiovascular Disease

WHO (2008). WHO European Action Plan for food and Nutrition Policy 2007-2012. WHO Regional office for Europe, Denmark

Wingo PA, Calle EE, McTiernan A. How does breast cancer mortality compare with that of other cancers and selected cardiovascular diseases at different ages in U.S. women? *J Womens Health Gen Based Med.* (2000), 9(9):999-1006

Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology, *Nature Reviews Cardiology* (2014), 11, 276–289

Wu JC, Bengel FM, Gambhir SS. Cardiovascular Molecular Imaging. *Radiology,* (2007)

Wu AH, Jaffe AS. The clinical need for high-sensitivity cardiac troponin assays for acute coronary syndromes and the role for serial testing. *Am Heart J.* (2008), 155(2):208-14.

Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: Its etiology, effects and treatment. *CMAJ* (2007), 176:1113–1120



Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigo J, Lisheng A, INTERHEART Study Investigators, Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART Study): case-control study. *The Lancet*. (2004), 364, pp. 937-952

Yusuf S, Ounpuu S. & Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part 1: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors and impact of urbanization. *Circulation*. (2001), 104, pp. 2746-2753

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/index.html



Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 2^ο

Εισαγωγή στις Ανοσοσφαιρίνες:

Δομή – Τάξεις – Ανοσοενζυμική Μέθοδος ELISA



2.1 Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι τα ειδικά για αντιγόνα προϊόντα των Β-κυττάρων και η παραγωγή αντισωμάτων ως απόκριση σε λοίμωξη αποτελεί την κύρια συμβολή των Β-κυττάρων στην ειδική ανοσία. Τα αντισώματα υπήρξαν τα πρώτα εκ των μορίων, τα οποία συμμετέχουν στην ειδική ανοσολογική αναγνώριση. Επιπλέον σχηματίζουν συλλογικώς μια οικογένεια πρωτεϊνών πλάσματος γνωστών ως ανοσοσφαιρίνες των οποίων ο βασικός κατασκευαστικός λίθος που ονομάζεται πτυχή ή περιοχή ανοσοσφαιρίνης, χρησιμοποιείται σε ποικίλλες μορφές σε πολλά μόρια του ανοσολογικού συστήματος καθώς και άλλων συστημάτων βιολογικής αναγνώρισης.

Με τη σύνδεση αντιγόνου αντισώματος το ανοσοποιητικό σύστημα επιδιώκει την εξουδετέρωση της δράσης των ανεπιθύμητων τοξινών και διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών που φέρουν στην επιφάνειά τους το συγκεκριμένο αντιγόνο. Παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, τα οποία είναι προϊόν διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων. Μόλις το κατάλληλο Β-λεμφοκύτταρο, του οποίου οι μεμβρανικοί υποδοχείς ταιριάζουν με το συγκεκριμένο αντιγόνο, έλθει σε επαφή με αυτό, ευαισθητοποιείται, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρο, το οποίο εξειδικεύεται στην παραγωγή της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Η διαδικασία αυτή απαιτεί και την ενεργητική συμμετοχή των βοηθητικών/επαγωγικών Τ-λεμφοκυττάρων. Η πρώτη επαφή του οργανισμού με το αντιγόνο επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, αλλά τα αντισώματα παράγονται σε σχετικά μικρές ποσότητες (ευαισθητοποίηση).

Με τη δεύτερη επαφή του οργανισμού με το συγκεκριμένο αντιγόνο, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να παράγει τα αντισώματα γρηγορότερα και σε μεγαλύτερες ποσότητες (Janeway, 1996).

Το μόριο του αντισώματος έχει δυο ξεχωριστές λειτουργίες. Η μία είναι να συνδέεται ειδικώς με μόρια του παθογόνου το οποίο έχει απάγει την άνοση απόκριση και η δεύτερη να στρατολογήει άλλα κύτταρα και μόρια ώστε να καταστρέψουν το παθογόνο αφότου το παθογόνο προσκολληθεί σε αυτό. Αυτές οι λειτουργίες διαχωρίζονται δομικώς στο μόριο του αντισώματος του οποίου ένα μέρος αναγνωρίζει ειδικώς το αντιγόνο, ενώ το υπόλοιπο εξασφαλίζει τους δραστικούς μηχανισμούς που θα το εξουδετερώσουν.



2.1.1. Δομή

Όλα τα αντισώματα αποτελούνται από τέσσερις αλυσίδες πολυπεπτιδίων και για όλες τις πρωτεΐνες αυτού του είδους χρησιμοποιείται ο γενικός όρος ανοσοσφαιρίνες. Οι ανοσοσφαιρίνες συμβολίζονται με τα γράμματα Ig (Immunoglobulins, Ig). Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης έχει μια βασική δομή που μοιάζει με το γράμμα «Υ». Αποτελείται από συνδυασμό δύο βαριών αλυσίδων (heavy, H) και δύο ελαφρών αλυσίδων (light, L). Οι αλυσίδες αυτές ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Υπάρχουν 5 διαφορετικοί τύποι βαριάς αλυσίδας που συμβολίζονται με τα γράμματα γ, α, μ, δ και ε. Οι προκύπτουσες ανοσοσφαιρίνες συμβολίζονται αντίστοιχα ως IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Κάθε τάξη ανοσοσφαιρίνης συμμετέχει διαφορετικά στην ανοσολογική απάντηση.

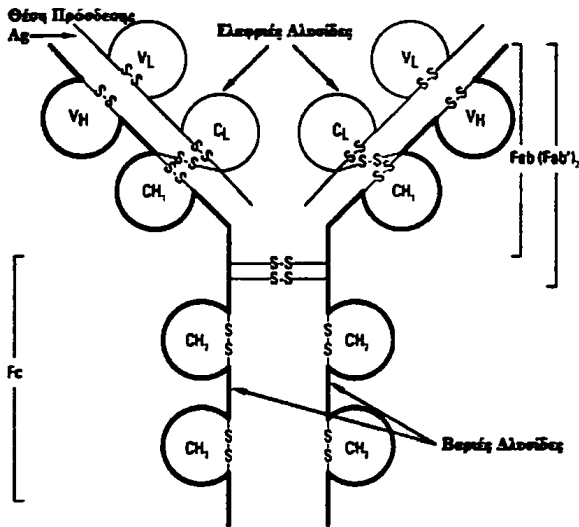
Η ελαφρά αλυσίδα μπορεί να είναι δύο τύπων είτε κ, είτε λ. Δεν έχει ανακαλυφθεί καμία διαφορά λειτουργίας των αντισωμάτων με ελαφρές αλυσίδες λ από εκείνων με ελαφρές αλυσίδες κ. Η αναλογία των δυο τύπων ελαφράς αλυσίδας ποικίλλει από είδος σε είδος. Στον ποντικό η αναλογία κ:λ είναι 20:1, ενώ στον άνθρωπο είναι 2:1 και στα βοοειδή 1:20. Είναι πιθανόν αυτές οι διαφορές να αντανακλούν μεταβολή στους αριθμούς των γονιδίων κ και λ της μεταβλητής περιοχής σε κάθε είδος (Janeway CA, 1996).

Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης διακρίνουμε μια μεταβλητή περιοχή στην οποία συμμετέχουν τμήματα των ελαφρών και των βαριών αλυσίδων καθώς και μια σταθερή περιοχή, στην οποία συμμετέχουν επίσης τμήματα των ελαφρών και των βαριών αλυσίδων. Η μεταβλητή περιοχή (variable region) ή περιοχή V, είναι η περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου και ποικίλει ευρέως μεταξύ των μορίων αντισωμάτων. Η σταθερή περιοχή (constant region) ή περιοχή C, εξασφαλίζει τις δραστηριότητες του ανοσολογικού συστήματος δεν έχει την ίδια ποικιλομορφία. Η περιοχή αυτή χρησιμεύει για τη σύνδεση με μεμβρανικούς υποδοχείς κυττάρων, αλλά και για τη σύνδεση με συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος.

Η αξιοθαύμαστη ετερογένεια των μορίων του αντισώματος οφείλεται σε έναν εξαιρετικώς εξειδικευμένο μηχανισμό μέσω του οποίου τα γονίδια του αντισώματος, που εκφράζονται σε οποιοδήποτε δεδομένο κύτταρο, συγκεντρώνονται σε αναδιατάξεις του DNA, κατά τις οποίες ενώνονται δυο ή τρία διαφορετικά τμήματα γονιδίων, ώστε να σχηματιστεί ένα γονίδιο μεταβλητής περιοχής κατά τη διάρκεια αναπτύξεως του Β-κυττάρου. Στην αναδιάταξη του DNA που ακολουθεί αυτό το γονίδιο μεταβλητής περιοχής μπορεί να προσκολληθεί σε οποιοδήποτε γονίδιο σταθερής περιοχής και έτσι να παράγει αντισώματα οποιασδήποτε εκ των πέντε τάξεων.

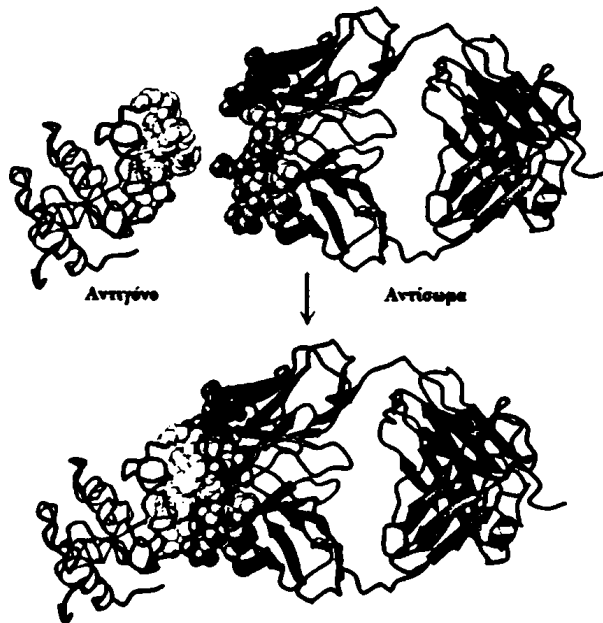


Τα Β-κύτταρα δεν εκκρίνουν αντισώματα εάν δεν διεγερθούν από το ειδικό αντιγόνο το οποίο αναγνωρίζουν με μόρια ανοσοσφαιρίνης που επικάθονται στη μεμβράνη τους, τα οποία χρησιμεύουν ως υποδοχείς αντιγόνων. Η σύνδεση των αντιγόνων με αυτούς τους υποδοχείς επιφανείας είναι ένα κρίσιμο βήμα για την διέγερση του Β-κυττάρου προς πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε κύτταρο που εκκρίνει αντισώματα.



Εικόνα 2.1.1.1. Σχηματική αναπαράσταση των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες αποτελούνται από συνδυασμό δύο βαριών αλυσίδων (heavy, H) και δύο ελαφρών αλυσίδων (light, L). Οι αλυσίδες αυτές ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (πηγή: <http://www.piercenet.com/method/antibody-structure-classes>).

Εικόνα 2.1.1.2. Αλληλεπίδραση αντιγόνου αντισώματος. Ένα αντιγόνο, στην προκειμένη περίπτωση λυσοζύμη, συνδέεται στην άκρη της Fab περιοχής ενός αντισώματος. Η άκρη του αντισώματος και το αντιγόνο έχουν συμπληρωματικό σχήμα, επιτρέποντας σε ένα μεγάλο τμήμα της επιφάνειας να δεσμευτεί (Stryer L, 2002).



2.1.2. Τάξεις

Η ανοσοσφαιρίνη IgG είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη στο αίμα. Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του αίματος σχηματίζει στο ηλεκτροφόρημα το έπαρμα γ. Για το λόγο αυτό συνηθίζεται να αποκαλείται και γ-σφαιρίνη. Περνάει τον πλακούντα και μέσω αυτής μεταβιβάζεται η παθητική ανοσία από τη μητέρα στο κύημα. Συμμετέχει ενεργά στη δευτερογενή απάντηση στο συγκεκριμένο αντιγόνο, αφού έχει προηγηθεί η ευαισθητοποίηση. Υπάρχουν τέσσερις υποτάξεις της IgG στον άνθρωπο, οι IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Οι διάφορες υποτάξεις είναι διαφορετικές λειτουργικά, δεσμεύονται σε διαφορετικούς υποδοχείς και εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες στην άνοση απόκριση.

Η ανοσοσφαιρίνη IgA είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη των εκκρίσεων των βλεννογόνων, όπου ο οργανισμός έρχεται σε άμεση επαφή με τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος. Ανιχνεύεται στο σάλιο, στους βλεννογόνους του αναπνευστικού, στο κοιλικό υγρό κ.α. Τα μόρια της IgA σχηματίζουν κυρίως διμερή, με τη βοήθεια μιας ξεχωριστής αλυσίδας πολυπεπτιδίων 15 kDa που ονομάζεται αλυσίδα J.

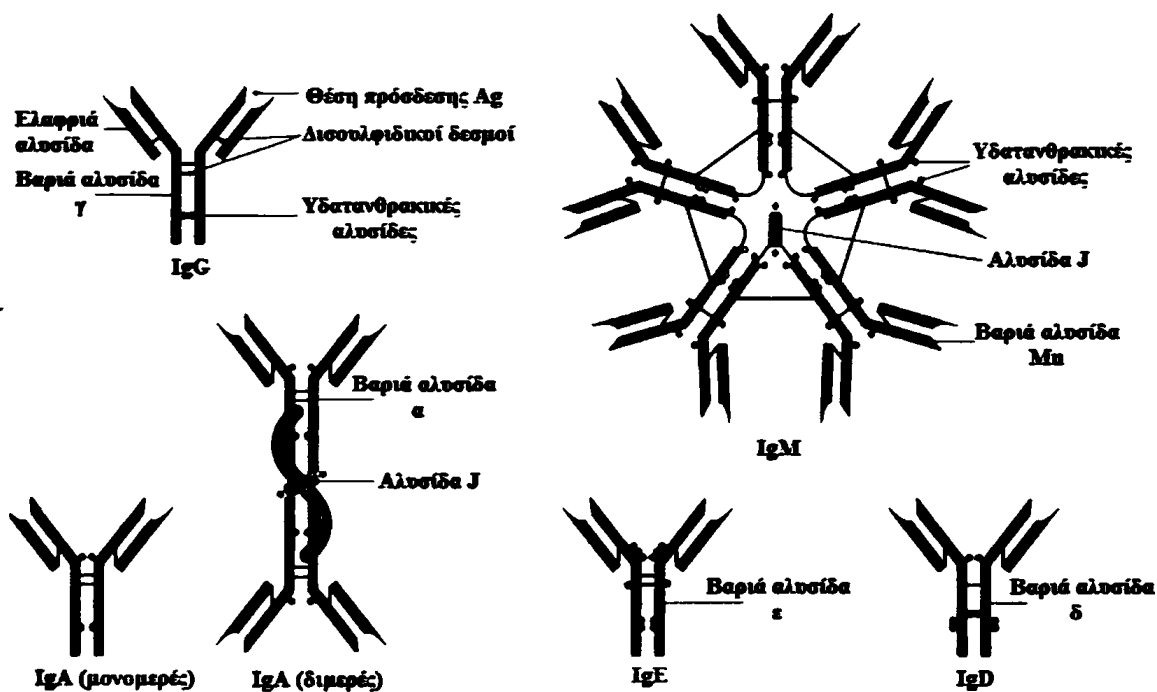
Η ανοσοσφαιρίνη IgM, διαχωρίστηκε από την IgG όταν ανακαλύφθηκε στο κλάσμα της μακροσφαιρίνης (εξ ου και IgM) του ορού το οποίο καθιζάνει ταχύτερα από το IgG κατά την υπερφυγοκέντρωση. Συμμετέχει στην πρώτη επαφή του οργανισμού με το συγκεκριμένο αντιγόνο και σταδιακά δίνει τη θέση της στην IgG. Η παρουσία της σε αυξημένες ποσότητες ερμηνεύεται ως πρόσφατη λοίμωξη από μικροοργανισμό στον οποίο δεν είχε προηγηθεί ευαισθητοποίηση. Τα μόρια της IgM σχηματίζουν κυρίως πενταμερή, με τη βοήθεια μιας ξεχωριστής αλυσίδας πολυπεπτιδίων 15 kDa που ονομάζεται αλυσίδα J. Ο πολυμερισμός των μορίων ανοσοσφαιρίνης θεωρείται σπουδαίος στη σύνδεση του αντιγόνου με επαναλαμβανόμενους και συνδεδεμένους μεταξύ τους επιτόπους (Janeway CA, 1996)

Η ανοσοσφαιρίνη IgD ανακαλύφθηκε ως προϊόν μυελώματος, ενός όγκου που παράγει αντισώματα. Η IgD εκφράζεται συγχρόνως με την IgM στην επιφάνεια ώριμων αθών (μη διεγερμένων) B-λεμφοκυττάρων. Η λειτουργία της δεν είναι επαρκώς γνωστή, αλλά σε επίπεδο έκφρασης της IgM και της IgD σε αναπτυσσόμενα B κύτταρα συσχετίζεται με την εξάλειψη των B-κυττάρων που εκφράζουν αυτοδραστικά αντισώματα.

Η ανοσοσφαιρίνη IgE αναγνωρίστηκε ως το παθογόνο αντίσωμα, ή «αντιδρασίνη» (reagin), στον ορό ασθενών που υπέφεραν από σοβαρές αλλεργίες. Η IgE έχει υποδοχείς για τη σύνδεση με τη μεμβράνη των βασεόφιλων και των μαστοκυττάρων (ή σιτευτικών



κυττάρων). Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα έκκρισης ισταμίνης, μόλις η ανοσοσφαιρίνη συνδεθεί με το αντίστοιχο αντιγόνο. Οι ποσότητες της ανοσοσφαιρίνης IgE είναι αυξημένες σε άτομα σε ατοπικά νοσήματα, δηλαδή σε νοσήματα αλλεργικής αιτιολογίας. Στις περιπτώσεις αυτές τα συμπτώματα οφείλονται στην ανεξέλεγκτη παραγωγή και έκκριση ισταμίνης. Η ανοσοσφαιρίνη IgE αυξάνει επίσης και σε άτομα με παρασιτικά νοσήματα.



Εικόνα 2.1.2.3. Σχηματική αναπαράσταση των ανοσοσφαιρινών. Οι IgM και IgA συντίθεται συνήθως σε πολυμερή. Στην παραπάνω απεικόνιση η IgM σχηματίζει πενταμερές, όπου τα μονομερή διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια μιας ξεχωριστής αλυσίδας πολυπεπτιδίων 15 kDa που ονομάζεται αλυσίδα J. Η IgA σχηματίζει διμερές όπου τα μονομερή διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια μιας ξεχωριστής αλυσίδας πολυπεπτιδίων 15 kDa που ονομάζεται αλυσίδα J. (πηγή: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/8_9defenses/9_outline.htm).

2.2. Ανοσοενζυμική Μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Η ELISA, κύριος εκπρόσωπος των ανοσοενζυμικών αναλυτικών μεθόδων, αποτελεί μία μέθοδο η οποία, στηριζόμενη στην εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος, επιτρέπει τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ουσιών που κατά



την πειραματική διαδικασία κατέχουν το ρόλο αντιγόνου. Η υλοποίηση μίας τέτοιας δοκιμής προϋποθέτει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Η δοκιμασία ELISA είναι μία από τις πιο ευαίσθητες ανοσολογικές τεχνικές. Το τυπικό εύρος ανίχνευσης για μια ELISA είναι 0.1 έως 1 fmole ή 0.01 ng έως 0.1 ng, με την ευαισθησία να εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης του αντισώματος-αντιγόνου. Επιπλέον, ορισμένα υποστρώματα, όπως εκείνα που αποδίδουν ενισχυμένη χημειοφωταύγεια ή σήμα φθορισμού, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων (Walker JM, 2001).

Τα δεδομένα της ELISA αναλύονται τυπικά γραφικά με οπτική πυκνότητα vs λογαριθμική συγκέντρωση. Γνωστές συγκεντρώσεις του αντιγόνου που χρησιμοποιούνται για να παράγουν πρότυπη καμπύλη και στη συνέχεια, τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των αγνώστων δειγμάτων σε σύγκριση με την γραμμικό τμήμα της πρότυπης καμπύλης. Αυτό μπορεί να γίνει απ' ευθείας πάνω στη γραφική παράσταση με την καμπύλη ή λογισμικό εξαρτήματος, το οποίο βρίσκεται συνήθως σε αναγνώστες πλάκα ELISA.

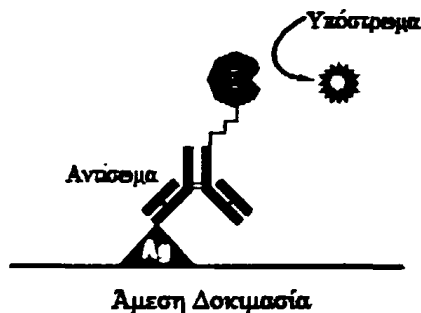
Η διαδικασία ανίχνευσης και αξιολόγησης της παρουσίας ενός αντιγόνου στο εκάστοτε δείγμα είναι η εξής:

Σε πρώτο στάδιο, το δείγμα με έναν άγνωστο αριθμό αντιγόνων ακινητοποιείται πάνω σε μία στερεή βάση/πλάκα. Έπειτα προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα ανίχνευσης για το είδος των αντιγόνων του δείγματος σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένο με ένα ένζυμο ή μπορεί να ανιχνευθεί με τη σειρά του από ένα δευτερεύον αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο, η πλάκα πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού ώστε να απομακρυνθούν τυχούσες πρωτεΐνες ή αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, προστίθεται στην πλάκα ένα ενζυματικό υπόστρωμα για να παραγεί ένα ορατό σήμα, το οποίο υποδεικνύει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Το σήμα αυτό είναι συνήθως η αλλαγή χρώματος του υποστρώματος.

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες, που αναλύονται παρακάτω, οι οποίες στηρίζονται στην ίδια αρχή και διαφοροποιούνται από τη σειρά με την οποία προστίθενται στην ειδική πλάκα πολυστυρολίου τα αντισώματα και το αντιγόνο.

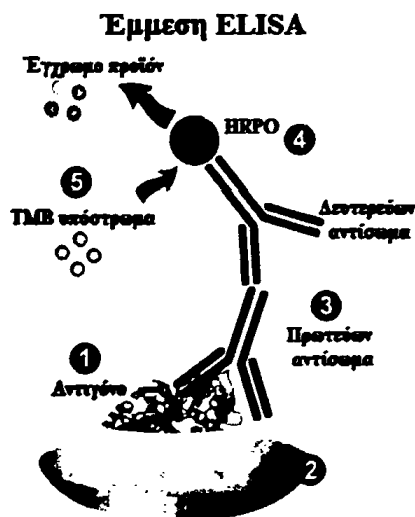


- **Άμεση (Direct) δοκιμασία ELISA**, η οποία αποτελεί την απλούστερη τεχνική ELISA. Το αντίσωμα ή το αντιγόνο έρχεται σε επαφή με μια στερεά φάση και αντιδρά με ένα αντιγόνο ή αντίσωμα που φέρει ένα ένζυμο δείκτη (Walker JM, 2001).



Εικόνα 2.2.4. Σχηματική απεικόνιση της άμεσης δοκιμασίας ELISA. (πηγή: <http://www.rajaha.com/elisa-test-what-principle-types/>)

- **Έμμεση (Indirect) δοκιμασία ELISA**, η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων αντι-αντιγόνων. Τα αντιγόνα είναι και πάλι άμεσα συνδεδεμένα στη στερεά φάση και τα αντισώματα που αναπτύσσονται σε ένα συγκεκριμένο είδος, αντιδρούν με τα αντιγόνα αυτά. Οποιοδήποτε συνδεδεμένο αντίσωμα ανιχνεύεται με προσθήκη αντι-ορού που φέρει ένα ένζυμο δείκτη (Walker JM, 2001).

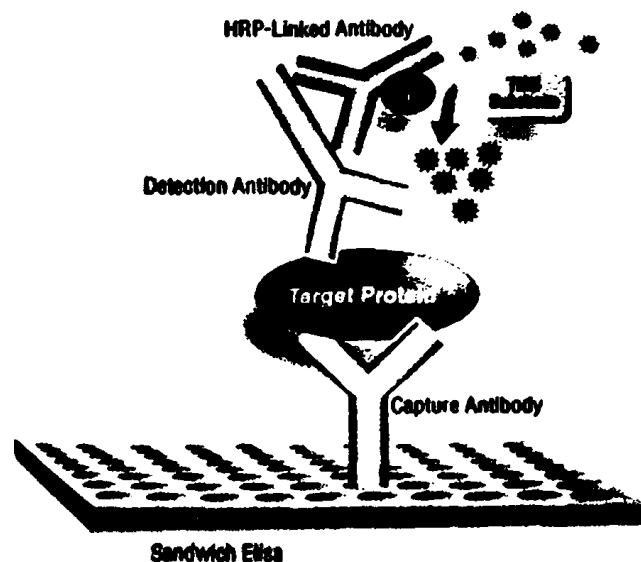


Εικόνα 2.2.5. Σχηματική απεικόνιση της έμμεσης δοκιμασίας Elisa (πηγή: <http://www.leinco.com/includes/templates/LeincoCustom/images/IndirectElisa.gif>).

- **ELISA τύπου sandwich**, η οποία αποτελεί την πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο Elisa. Το αντιγόνο συνδέεται με δυο αντισώματα, το αντίσωμα δέσμευσης και το αντίσωμα ανίχνευσης.

Στην ELISA αυτή, γίνεται αρχικά επίστρωση των κελίων (coating) με ένα ειδικό, για το προς ανίχνευση αντιγόνο αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό (1^ο αντίσωμα). Η δέσμευση γίνεται συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το πολυστυρόλιο. Οι ελεύθερες θέσεις στα κελία δεσμεύονται με μια κοινή πρωτεΐνη, συνήθως αλβουμίνη ορού βόως (BSA), για την αποφυγή στα επόμενα στάδια μη ειδικών αντιδράσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με τα δείγματα τα οποία περιέχουν την προς ανάλυση ουσία (αντιγόνο), ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

Ακολουθεί το στάδιο της ανίχνευσης με τη χρήση ενός αντισώματος ειδικού για το ίδιο αντιγόνο, για άλλο όμως επίτοπο, (2^ο αντίσωμα), το οποίο μπορεί να είναι και συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο, όπως υπεροξειδάση, ή βιοτίνη. Εάν το (2^ο αντίσωμα) δεν είναι σεσημασμένο ακολουθεί επώαση με το 3^ο αντίσωμα, σεσημασμένο με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος. Εάν το (2^ο αντίσωμα) είναι σεσημασμένο με ένζυμο ακολουθεί κατευθείαν η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος, ενώ εάν είναι σεσημασμένο με βιοτίνη ακολουθεί επώαση με στρεπταβιδίνη, σεσημασμένη με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος (Gan SD, 2013).



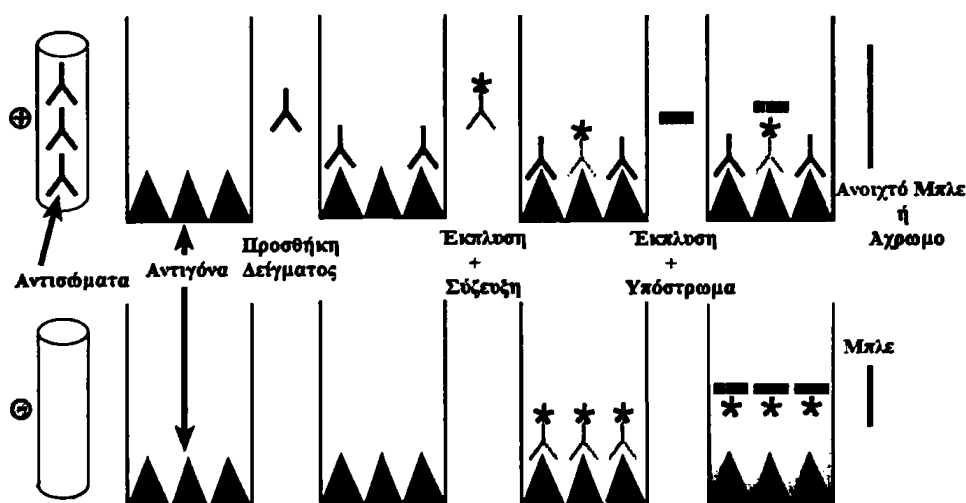
Εικόνα 2.2.5. Σχηματική αναπαράσταση της ELISA τύπου Sandwich (πηγή: <http://www.eiaab.com/info/detail/46>).

- **ELISA συναγωνιστικού τύπου.** Το βασικό χαρακτηριστικό της συναγωνιστικού τύπου ELISA είναι η διαδικασία της ανταγωνιστικής αντίδρασης μεταξύ του

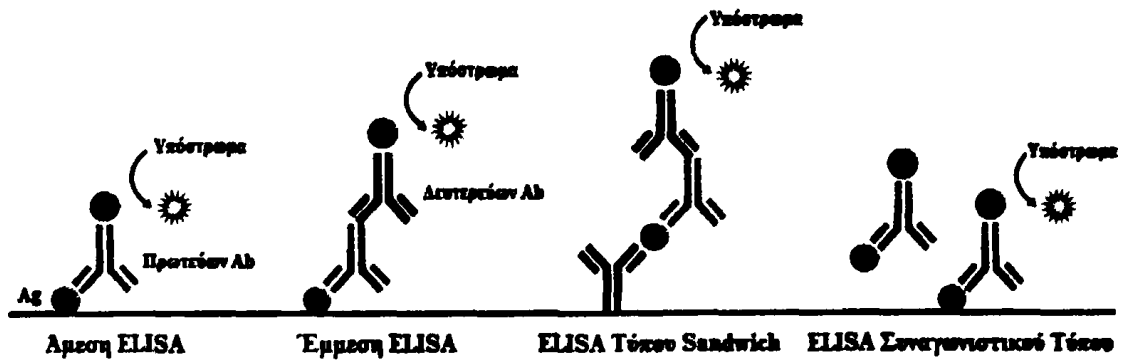
αντιγόνου του δείγματος και του αντιγόνου δεσμεύεται στα φρεάτια μιας πλάκας με το πρωτογενές αντίσωμα.

Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας, το πρωτογενές αντίσωμα επωάζεται με το αντιγόνο του δείγματος και τα προκύπτοντα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου προστίθεται στα φρεάτια που έχουν επικαλυφθεί με το ίδιο αντιγόνο. Μετά από μια περίοδο επώασης, κάθε μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται. Όσο περισσότερο αντιγόνο στο δείγμα, τόσο περισσότερο πρωτογενές αντίσωμα θα δεσμεύεται με το αντιγόνο του δείγματος. Ως εκ τούτου, θα υπάρξει μια μικρότερη ποσότητα του πρωτογενούς αντισώματος που διατίθενται για να συνδεθεί με το αντιγόνο που επικαλύφτηκε στο φρεάτιο. Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένα ένζυμο προστίθεται, ακολουθούμενο από ένα υπόστρωμα για να δημιουργηθεί ένα χρωμογόνο ή φθορίζον σήμα. Απουσία χρώματος δείχνει την παρουσία του αντιγόνου στο δείγμα (Gan SD, 2013).

Τα κύρια πλεονέκτημα της ELISA συναγωνιστικού τύπου είναι η υψηλή ευαισθησία της σε πολύπλοκα μίγματα αντιγόνου, δεδομένου ότι το αντιγόνο δεν απαιτεί καθαρισμό πριν από τη μέτρηση και η ευελιξία καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης (Dobrovol'skaia E et al, 2006).



Εικόνα 2.2.7. Σχηματική απεικόνιση της ELISA συναγωνιστικού τύπου (πηγή: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/competitive-elisa>).



Εικόνα 2.2.8. Σχηματική απεικόνιση των δοκιμασιών Elisa (πηγή: www.abnova.com/support/resources/ELISA.asp).

2.3. Βιβλιογραφία

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

Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 8e, 2014

Avrameas S, Guilbert B. Enzyme-immunological determination of proteins with the aid of immunoadsorbants and enzyme-labeled antigens. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* (1971), 273:2705-2707

Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol.* (1971), 1:394-396

Balsam J, Ossandon M, Bruck HA *et al.* Low-cost technologies for medical diagnostics in low-resource settings. *Expert Opin Med Diagn.* (2013), 7:243-55

Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology.* (2010), 10, 345-352

David G. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nature Reviews Immunology.* (2002), 2, 60-65

De La Rica R, Stevens MM. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology.* (2012), 7, 821-824



Dobrovolskaia E, Gam A, Slater JE. Competition enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture. *Clin Exp Allergy*. (2006) 36:525–30

Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. (1971), 8 (9): 871–4

Firestein GS. Mechanisms of inflammation and tissue repair. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012:chap 47

Γερμένης ΕΑ. Ιατρική ανοσολογία, (2000), Εκδόσεις Παπαζήσης

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

Gavin P, Dunn C, Koebel M, Robert D. Schreiber Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*. (2006), 6, 836-848

Goronzy JJ, Weyand CM. The innate and adaptive immune systems. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; (2012):chap 44

Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br. J. Anaesth*. (2014), 112 (2): 213-216

Griffin JFT, Spittle E, Rodgers CR, Liggett S, Cooper M, Bakker D, Bannantine JP. Immunoglobulin G1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease in Red Deer (*Cervus elaphus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. (2005), 12 (12): 1401–1409

Janeway CA, Travers P. Immunobiology – The Immune System in Health and disease. 1996

Lequin R . Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem*. (2005), 51 (12),2415–8

Mariani M, Luzzi E, Proietti D et al. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the levels of serum antibody to *Haemophilus influenzae* type b. *Clin Diagn Lab Immunol*. (1998), 5,667–74



Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu. Rev. Immunol.* (2006), 24, 467–496

Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nature Biotechnology.* (2007), 25, 1265-1275

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Immunology Provides Important Techniques with Which to Investigate Proteins Biochemistry. *5th edition Biochemistry.* (2002), 5th edition

Van Weemen BK. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters.* (1971), 15,(3), 232–236

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

Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.* (1960), 39,1157–75



Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 3^ο

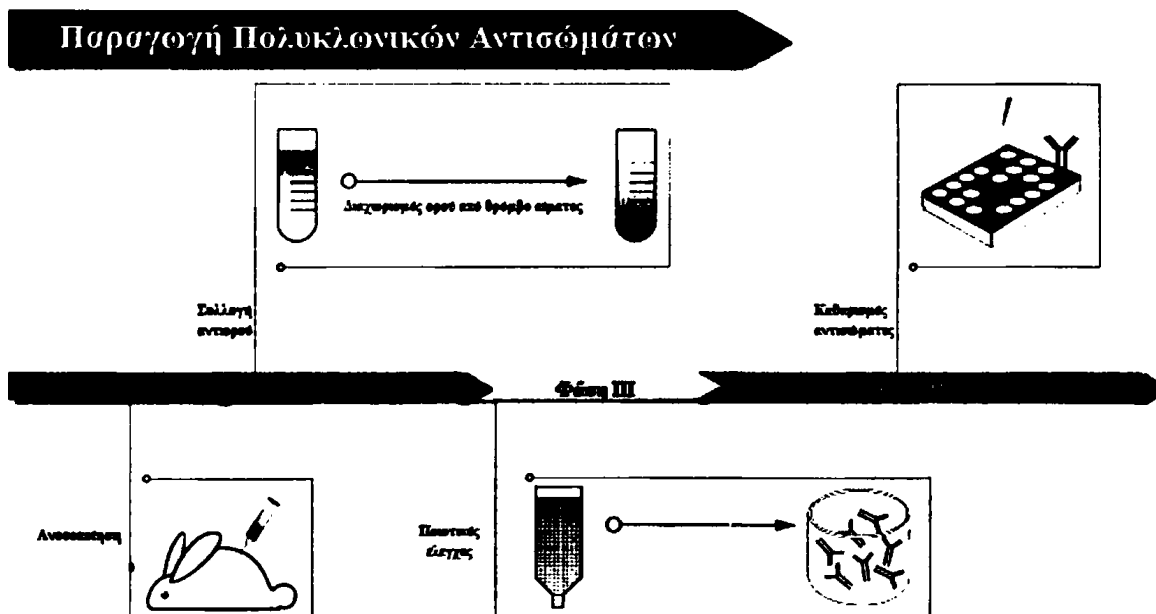
Παραγωγή Αντισωμάτων σε Ζώα



3.1. Παραγωγή Αντισωμάτων σε Ζώα

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, κάθε είδος αντισώματος παράγεται από έναν ειδικό κλώνο κυττάρων πλάσματος μετά την διαφοροποίησή τους από τα Β-λεμφοκύτταρα. Μετά την είσοδο ενός αντιγόνου στον οργανισμό, αυτοί οι κλώνοι πολλαπλασιάζονται και παράγουν σημαντικές ποσότητες του ειδικού αντισώματος. Τα αντισώματα αυτά, παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες σύνδεσης απέναντι σε έναν μεγάλο αριθμό φυσικών και συνθετικών ουσιών. Η επαγωγή για την παραγωγή αντισωμάτων μιας ανοσολογικής απόκρισης είναι γνωστή ως *ανοσοποίηση* (Janeway CA et al, 1996).

Ένας μεγάλος αριθμός σύγχρονων διαγνωστικών και θεραπευτικών τεχνολογιών βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων, όπως π.χ. η ραδιοανοσολογική μέθοδος, η ανοσοραδιομετρική μέθοδος, η ανοσοενζυμική μέθοδος κ.α. Τα αντισώματα για αυτές τις τεχνικές μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες με την έγχυση αντιγόνων σε πειραματόζωα. Τα παραγόμενα αντισώματα, ονομάζονται πολυκλωνικά και θα πρέπει στη συνέχεια να καθαριστούν, επειδή άλλες ουσίες στην αρχική πηγή μπορεί να παρεμποδίσουν την διαδικασία ανίχνευσης.



Εικόνα 3.1.1. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής πολυκλωνικών αντισωμάτων σε κουνέλι. Μετά την ένεση του αντιγόνου, απομονώνεται ορός από το αίμα του ζώου, ο οποίος περιέχει τα αντισώματα. Σε δεύτερη φάση τα αντισώματα αυτά καθαρίζονται με χρωματογραφία συγγένειας και στο τέλος ελέγχεται η καθαρότητά τους. (πηγή: <http://biossusa.com/store/products/services/custom-polyclonal-antibody-production.html>).

Σε αντίθεση με τα πολυκλωνικά αντισώματα, τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται συνήθως σε ποντικό. Η ανοσοποίηση ακολουθείται από απομόνωση διακριτών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων, καθένας εκ των οποίων παράγει ένα μόνο αντίσωμα με την ίδια μοριακή δομή, ειδικότητα και συγγένεια το οποίο αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο επίτοπο.

Η παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων, γίνεται με σύντηξη σπληνικών κυττάρων ποντικού, στον οποίο νωρίτερα έχει γίνει ένεση συγκεκριμένου αντιγόνου, με κύτταρα προερχόμενα από μυέλωμα (κακοήθεια του μυελού). Με τη σύντηξη αυτή παράγονται υβριδικά κύτταρα, που έχουν πάρει από τα σπληνικά κύτταρα την ικανότητα να παράγουν αντισώματα, ενώ από τα κύτταρα του μυελώματος την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται και να διατηρούνται σε κυτταρική σειρά (αθάνατα κύτταρα).

Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μεγάλη τους ειδικευση καθώς όταν χρησιμοποιούνται η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης του αντισώματος με αντιγόνα που φέρουν επιτόπους παρόμοιους με αυτούς του υπό μελέτη αντιγόνου είναι πολύ μικρή (Janeway CA et al, 1996).

Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων (pAbs), είναι το κουνέλι, καθώς είναι εύκολο στο χειρισμό του και η λήψη αίματος από το αυτί του ζώου είναι σχετικά απλή. Τέλος, για τις περισσότερες εφαρμογές παράγει επαρκή ποσότητα υψηλού τίτλου και υψηλής συγγένειας αντισώματα (Stills HF, 1994). Μια τυπική αφαίμαξη από ένα κουνέλι μπορεί να δώσει περίπου 250mg πολυκλωνικών αντισωμάτων (pAbs).

Κατά τη διάρκεια την επιλογής του πειραματόζωου, θα πρέπει να εξεταστούν οι παρακάτω παράγοντες:

1. Η ποσότητα του αντισώματος που πρέπει να παραχθεί (μεγαλύτερα ζώα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες αντισωμάτων).
2. Η φυλογενετική σχέση μεταξύ των ειδών από τα οποία προέρχεται το πρωτεϊνικό αντιγόνο και τα είδος που θα χρησιμοποιηθεί για να παράγει τα αντισώματα.
3. Η σκοπούμενη χρήση από τα αντισώματα (π.χ. σε μία ELISA, το αντίσωμα που δεσμεύεται με το αντιγόνο θα πρέπει να προέρχεται από ένα διαφορετικό είδος από το δευτερεύον αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί στην επόμενο βήμα της δοκιμασίας) (Clark A, 2002).



Είναι επίσης σημαντικό να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα για τη μείωση της πιθανότητας αποστήματος στις θέσεις της ένεσης, και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προς άλλα αντιγόνα στο ανοσοποιητικό σύστημα των κουνελιών τα οποία μπορεί στο παρελθόν να έχουν αντιμετωπίσει.

Οι όρνιθες χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή αντισωμάτων. Το προϊόν IgY, είναι για σχεδόν όλες τις χρήσεις ισοδύναμο με τις ανοσοσφαιρίνες κατηγορίας IgG των θηλαστικών. Οι όρνιθες είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα, καθώς τα πολυκλωνικά αντισώματα pAbs μπορούν να απομονωθούν από τον κρόκο του αυγού, αφαιρώντας την αναγκαιότητα για τη συλλογή του αίματος. Η χρήση των όρνιθων μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει μια μείωση της χρήσης ζώων, καθώς παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες αντισωμάτων σε σχέση με τα τρωκτικά (Schade et al, 1996; Bollen et al, 1997). Τυπικά, από τους κρόκους αυγών μιας μόνο όρνιθας, θα μπορούσαν να απομονωθούν πάνω από 250mg pAb (Erhard MH et al, 2000). Σε γενικές γραμμές, οι όρνιθες είναι ισχυροί παραγωγοί αντισωμάτων και η ανοσολογική τους αποκρισιμότητα είναι παρόμοια με εκείνη των θηλαστικών. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονίσουμε οι όρνιθες δεν είναι κατάλληλες για όλες τις εφαρμογές, καθώς απαιτούνται και κατάλληλες εγκαταστάσεις για τη στέγαση των πειραματόζωων.

Τέλος, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους μπορούν επίσης να αντιδράσουν με διαφορετικό τρόπο, λόγω της γενετικής ποικιλότητας στην παρουσίαση του αντιγόνου στο μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας και στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της ανοσολογικής απόκρισης (Hanly WC et al, 1995; Coligan JE et al, 1997).

Παραδοσιακά, τα θηλυκά ζώα είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στην παραγωγή pAb. Τα θηλυκά ζώα είναι γενικά πιο εύκολα στο χειρισμό τους καθ' ότι είναι πιο υπάκουα, λιγότερο επιθετικά στην κοινωνική αλληλεπίδραση και συνεπώς μπορούν να ομαδοποιηθούν με μεγαλύτερη επιτυχία. Αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ανδρογόνα μπορούν ελαφρώς να αμβλύνουν την απόκριση αντισώματος, δεν υπάρχουν επιτακτικοί επιστημονικοί λόγοι για τη μη χρήση αρσενικών ζώων. Η ανοσολογική κατάσταση του ανοσοποιημένου ζώου μπορεί επίσης να καθορίσει το αποτέλεσμα της διαδικασίας του εμβολιασμού. Νέα ενήλικα πειραματόζωα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και για κάθε ανοσοποίηση με διαφορετικό αντιγόνο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζώα. Τα ανοσοποιημένα κοτόπουλα, θα πρέπει να είναι σε ηλικία ωστοκίας τη στιγμή που θα αρχίσει η ανοσοποίηση (Clark A et al, 2002).



Πίνακας 3.1.1. Προτεινόμενες ηλικίες πειραματόζων τα οποία θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων (Clark A, 2002)

Πειραματόζωο	Χρόνος
Ποντικός	6 εβδομάδες
Επίμυς	6 εβδομάδες
Κουνέλι	3 μήνες
Χοίρος	3 μήνες
Όρνιθα	3-5 μηνών
Κατσίκα	6-7 μήνες
Πρόβατο	7-9 μήνες

3.2. Οι Όρνιθες στην Παραγωγή Αντισωμάτων

Το 1893, ο Klempereger περιέγραψε για πρώτη φορά ένα πείραμα στο οποίο αποδεικνύεται ότι η ανοσοποίηση όρνιθας προκάλεσε τη μεταφορά των ειδικών αντισωμάτων (Ab) εντός του κρόκου αυγού. Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα δεν υπήρξε επιστημονική εφαρμογή αυτής της γνώσης, έως τη στιγμή που άρχισε να συζητάτε σοβαρά η ηθική ανησυχία για την διαβίωση των ζώων. Από τη δεκαετία του 1980, τα αντισώματα κρόκου αυγού (IgY Abs) έχουν βρει μια ευρύτερη εφαρμογή, πιθανώς και λόγω της διαθεσιμότητας αντιδραστηρίων για τον καθαρισμό, την απομόνωση και την ιχνηθέτηση των παραγόμενων IgY αντισωμάτων.

Το 1996, το Ευρωπαϊκό Κέντρο για την Επικύρωση Εναλλακτικών Μεθόδων (ECVAM) συνέστησε τη χρήση της IgY αντί της IgG θηλαστικού, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο πόνος που προκαλείται από την επεμβατική δειγματοληψία (Schade R et al, 1997). Από το ίδιο κέντρο, παρέχονται επίσης πληροφορίες σχετικά με τις πρακτικές πτυχές της εκτροφής των ωοτόκων ορνίθων, την ανοσοποίηση των ζώων, τη χρήση των ανοσοενισχυτικών και τις μεθόδους απομόνωσης. Το 1999, η IgY τεχνολογία εγκρίθηκε ως μια εναλλακτική μέθοδο για υποστήριξη της καλής μεταχείρισης των ζώων από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της ελβετικής κυβέρνησης (Κτηνιατρικό Γραφείο Ομοσπονδιακό Ανοπ, 1999). Εν τω μεταξύ, πολυάριθμες δημοσιεύσεις έχουν αναφερθεί σε πολλές πτυχές της IgY τεχνολογίας όπως για παράδειγμα, την εκτροφή των κοτόπουλων, την μεταφορά της IgY, τον καθαρισμό, τη χρήση τους στη διάγνωση, την θεραπεία και την προφύλαξη. (Schade R et al, 2005).



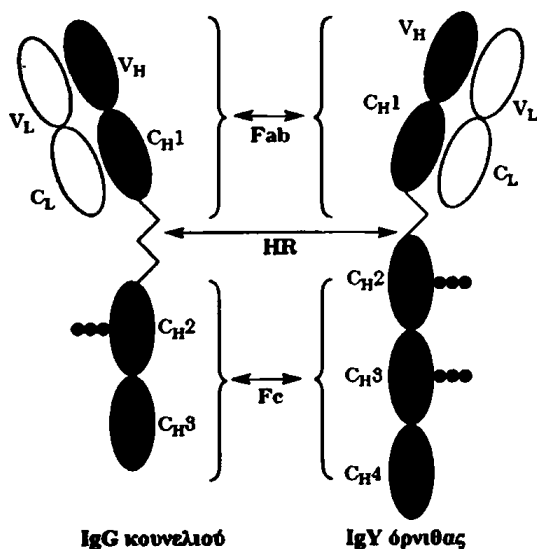
3.3. Ανοσοφαιρίνη IgY

Η γενική δομή του μορίου της IgY, που αποτελείται από δύο ελαφρές και δύο βαριές αλυσίδες, είναι συγκρίσιμη με εκείνη των ανοσοσφαιρινών των θηλαστικών. Η βαριά αλυσίδα υποδεικνύεται από το ελληνικό γράμμα Υ ή υ και περιέχει μία μεταβλητή περιοχή και τέσσερις σταθερές περιοχές. Το μοριακό βάρος της ανοσοσφαιρίνης βρέθηκε με φασματομετρία μάζης να είναι 167,25 kDa (το μοριακό βάρος της IgG είναι περίπου 160 kDa) (Sun S et al, 2001).

Η ελαφριά αλυσίδα, αποτελείται από μία μεταβλητή και μία σταθερή περιοχή και έχει μοριακό βάρος 18,66 kDa. Η βαριά αλυσίδα έχει ένα μοριακό βάρος 65,105 kDa και το θραύσμα Fab έχει ένα μοριακό βάρος 45,359 kDa. Επίσης η IgY περιέχει δύο υδατάνθρακες πλευρικές αλυσίδες, σε αντίθεση με μόνο μια που περιέχει η IgG.

✦ Φυσικοχημικές παραμέτροι της IgY.

Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της IgY είναι στην περιοχή από 5,7 έως 7,6 ενώ εκείνο της IgG βρίσκεται μεταξύ 6,1 και 8,5 (Sun S et al, 2001; Davalows-Pantoja L et al, 2000). Το πιο υδρόφοβο ήμισυ του μορίου του αντισώματος (Ab) είναι το θραύσμα Fc. Δεδομένου ότι το θραύσμα Fc από το IgY είναι μεγαλύτερο από εκείνο της IgG, το IgY μόριο είναι πιο υδρόφοβο από IgG. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να είναι χρήσιμη για την επίτευξη μιας σταθερής προσρόφηση του IgY επάνω σε σωματίδια λάτεξ (Davalows-Pantoja L et al, 2000).



Εικόνα 3.3.2. Σχηματική απεικόνιση της μοριακής δομής της ανοσοσφαιρίνης IgG κουνελιού και της IgY όρνιθας. V: μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας (V_L) και βαριάς αλυσίδας (V_H); C: σταθερή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας (C_L) και της βαριάς αλυσίδας (C_{H1}). Οι κουκίδες απεικονίζουν τις υδατανθρακικές αλυσίδες (Schade R et al, 2005).

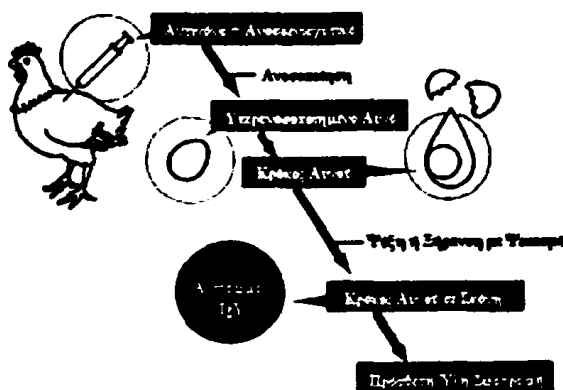


3.4. Ανοσοποίηση Ζώων

Η ανάπτυξη και παραγωγή αντισωμάτων, ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησης δεν είναι πολύ προβλέψιμη. Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις μεταβλητές που επηρεάζουν την άνοση απόκριση του ανοσοποιημένου κοτόπουλου:

- ❖ το αντιγόνο (δόση, MB),
- ❖ τον τύπο του εκδόχου που χρησιμοποιείται,
- ❖ την οδό της εφαρμογής και
- ❖ το ίδιο το ζώο (όπως συνθήκες εκτροφής, η ηλικία, φυλής, επίδραση στην ικανότητα αυγό τοποθέτηση) (Schade R et al, 2005).

Εικόνα 3.3.1. Σχηματική απεικόνιση παραγωγής αντισωμάτων IgY σε όρνιθα. Μετά την ανοσοποίηση του ζώου, απομονώνεται ο κρόκος του αυγού όπου υπάρχουν τα αντισώματα IgY και στη συνέχεια ακολουθεί η απομόνωση και ο καθαρισμός τους (Marcq C et al, 2013).



✚ Δόση του αντιγόνου

Όσον αφορά τη δόση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για ανοσοποίηση, αυτή μπορεί να επηρεάσει τόσο την προκύπτουσα ανοσοαπόκριση και όσο και τον τίτλο των παραγόμενων αντισωμάτων (Schade R et al, 2005). Πολύ καλά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με συγκεντρώσεις αντιγόνου που κυμαίνονται μεταξύ 10 μg και 1 mg, σε συνολικό όγκο 1 mL ανοσοενισχυτικού (Mahn K, 1998). Η χορήγηση του αντιγόνου θα πρέπει να γίνει σε τέσσερα διαφορετικά σημεία στο στήθος του ζώου, τα οποία σημεία θα πρέπει να απέχουν το μέγιστο μεταξύ τους (Larsson et al, 1998). Για κάθε αντιγόνο, η βέλτιστη δόση που απαιτείται για μια επιτυχής ανοσοποίηση πρέπει να δοκιμαστεί πρώτα πειραματικά. Ως γενικός κανόνας, ισχύει ότι μικρότερα αντιγόνα όπως πεπτίδια (μοριακό βάρος κάτω από 10 kDa) θα πρέπει να συνδέονται με φορείς (όπως για παράδειγμα, αλβουμίνη βόειου ορού ή αιμοκυανίνη).



✦ Χρήση εκδόχου – ανοσοενισχυτικού

Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι φτωχά ή καθόλου ανοσογονικές όταν χορηγούνται από μόνες τους. Για την ύπαρξη ισχυρών ανοσολογικών αποκρίσεων, απαιτείται σχεδόν πάντοτε η ένεση του αντιγόνου σε ένα μείγμα που είναι γνωστό ως ενισχυτής. Ενισχυτής είναι κάθε συστατικό που επάγει την ανοσογονικότητα ουσιών που είναι αναμειγμένες με αυτό.

Τα ανοσοενισχυτικά χρησιμοποιούνται για περίπου 80 χρόνια από τότε που ο Ramon (Ramon G, 1925) έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη απόκριση αντι-τοξίνης στις τοξίνες του τετάνου και της διφθερίτιδας όταν χορηγηθεί μαζί με άλλα υλικά. Τα επόμενα χρόνια υπήρξε μια ραγδαία ανάπτυξη στους τύπους των ανοσοενισχυτικών και αρκετά από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για εμβολιασμό των ανθρώπων. Παρόλα αυτά, πολλά από τα ανοσοενισχυτικά που έχουν βρεθεί δεν χρησιμοποιήθηκαν τελικά εξαιτίας της αυξημένης τοξικότητας και των παρενεργειών που προκαλούσαν (Rajesh K, 1995).

Υπάρχουν πολλά πρόσθετα, τα οποία διαφέρουν στα χημικά χαρακτηριστικά τους, την αποτελεσματικότητά τους, στην τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και τις δευτεροβάθμιες παρενέργειες στα εμβολιασμένα ζώα. Το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (FCA) παραμένει το πιο αποτελεσματικό ανοσοενισχυτικό (Olbrich C et al, 2002), αλλά δυστυχώς, αυτό το πλεονέκτημα συνδέεται με την δραστηριότητά του να βλάπτει τους ιστούς. Το μη πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (FIA) είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το FCA, αλλά οδηγεί σε χαμηλότερες παρενέργειες όταν αναμιγνύεται προσεκτικά για να παραχθεί ένα κατάλληλο κολλοειδές γαλακτώμα (Calzado EG, 2003).

Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην δημιουργία μιας «δεξαμενής» του αντιγόνου στο σημείο χορήγησης, με αργή αποδέσμευση του αντιγόνου και την διέγερση των λεμφοκυττάρων. Κάποιες από τις παρενέργειες των ανοσοενισχυτών είναι φλεγμονώδη φαινόμενα και έλκη στα σημεία χορήγησης. Διάφορα γαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί με διαφορετικά φυσικά έλαια με σκοπό την μείωση της τοξικότητας και αύξηση της σταθερότητας και της αποτελεσματικότητας. Διάφορα γαλακτώματα, έλαιο σε νερό και νερό σε ελαιώδη φάση έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να είναι εξίσου ισχυρά όσο το FIA, αλλά πιο σταθερά, λιγότερο ιξώδη και να χορηγούνται πιο εύκολα (Freud J, 1956; Woodard LF et al, 1985; Kimura Jet al, 1978; Petrovsky N et al, 2004).



Πίνακας 3.3.2. Οι συνθηθέστεροι ανοσοενισχυτές και η χρήση τους (Janeway CA, Travers P, 1996).

Ενισχυτές που επαυξάνουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις

Όνομα	Σύσταση	Μηχανισμός δράσης
Ατελές ενισχυτικό του Freud	Εναιώρημα ελαίου σε νερό	Βραδεία απελευθέρωση αντιγόνου, αυξημένη πρόσληψη από τα μακροφάγα
Πλήρες ενισχυτικό του Freud	Εναιώρημα ελαίου σε νερό με νεκρά μυκοβακτηρίδια	Βραδεία απελευθέρωση αντιγόνου, αυξημένη πρόσληψη από τα μακροφάγα, συνενεργοποιητών στα μακροφάγα
Ενισχυτικό του Freud με μουραμυλπεπτίδιο (ΜΔΠ)	Εναιώρημα ελαίου σε νερό με ΜΔΠ ένα συστατικό των μυκοβακτηριδίων	Βραδεία απελευθέρωση αντιγόνου, αυξημένη πρόσληψη από τα μακροφάγα, συνενεργοποιητών στα μακροφάγα
Υδροξείδιο του αλουμινίου	Γέλη υδροξειδίου του αλουμινίου	Βραδεία απελευθέρωση αντιγόνου, αυξημένη πρόσληψη από τα μακροφάγα

✦ **Ένεση αντιγόνου**

Η πλέον κοινή οδός για ένεση αντιγόνου σε όρνιθες είναι η ενδομυϊκή (i.m.) οδός. Εκτεταμένες μελέτες (Schwarzkopf et al, 2000) αποδείξανε ότι η υποδόρια χορήγηση αντιγόνου επιφέρει εξίσου καλά αποτελέσματα σε σχέση με την ενδομυϊκή. Αν επιλεγεί η ενδοφλέβια διαδρομή ως οδός χορήγησης, τότε δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ανοσοενισχυτικά (Calzado EG et al, 2003). Ωστόσο, η ενδοφλέβια ένεση (χωρίς ανοσοενισχυτικό) θα πρέπει να διεξάγεται πολύ αργά (περίπου 500 μL επί 15 λεπτά) για να αποφευχθεί μια αναφυλακτική αντίδραση.

✦ **Διάστημα μεταξύ εμβολιασμών**

Η επιτυχία μιας ανοσοποίησης εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένου και των διαστημάτων μεταξύ της πρώτης, δεύτερης αλλά και των μετέπειτα ανοσοποιήσεων. Πολλά πρωτόκολλα ανοσοποίησης είναι διαθέσιμα, με συστάσεις ανοσοποιήσεων, τις ημέρες 0, 14 και 28 (Tini M et al, 2002; Tu YY et al, 2001) ή μία φορά την εβδομάδα για 7 συνεχόμενες εβδομάδες (Calzado EG et al, 2003). Αρκετοί συγγραφείς προτείνουν ανοσοποίηση σε διαστήματα 10 ημερών, αλλά η γενική σύσταση αναφέρει ότι το διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ένεσης αντιγόνου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 εβδομάδες. Αυτό αντανakλά την ανοσολογική μνήμη, η οποία χρειάζεται χρόνο για να αναπτυχθεί (Janeway CA et al, 2002). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εφαρμογή των συχνών εμβολιασμών σε μικρό χρονικό χρόνο οδηγεί μαζί με την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης σε κατάθλιψη (Calzado EG et al, 2003).



Πίνακας 3.3.3. Συνοπτική παρουσίαση των μεθόδων ανοσοποίησης.

	Δόση, όγκος και μεσοδιάστημα μεταξύ εμβολιασμών	
Αντιγόνο	0,1-1 mg	
Ανοσοενισχυτικό	FIA ¹	0,1-0,25 mL
	PCLS ²	250 µg
	FCA ³	0,1-0,25 mL
Τρόπος χορήγησης	Όγκος	0,5-1 mL
	Μεσοδιάστημα	4-8 εβδομάδες
	Αριθμός	2
	Τρόπος	Ενδομυϊκά,υποδόρια

^{1/3} FCA/FIA= Πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (Complete Freund's Adjuvant)/ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund (Incomplete Freund's Adjuvant)

²PCLS= Pam₃Cys-Ser(Lys)₄ (Schade R et al, 2005)

3.4. Βιβλιογραφία

Alkan SS. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews Immunology*. (2004), 4, 153-156

Anonn. Fachgerechte und Tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren. *Bundesamt für Veterinärwesen*. (1999), Switzerland, Richtlin. Tierschutz 3.04, 3097 Liebefeld-Bern

Bollen LS, Hau J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. *In Vivo (Brooklyn)*. (1997), 11, 395-398

Carlander D, Wilhelmson M, Larsson A. Limited day to day variation of IgY levels in eggs from individual laying hens. *Food Agric. Immunol*. (2001), 13, 87-92

Carlander D, Wilhelmson M, Larsson A. Immunoglobulin Y levels in egg yolk from three chicken genotypes. *Food Agric. Immunol*. (2003),15, 35-40

Calzado EG, Marino EC, Chavez TS, Vazquez EL, Ochoa ZC, Schade R. Extraction of a monospecific Coombs-reagent from chicken eggs. *ALTEX*. (2003), 20, 21-25



Clark A, Befus D, O'Hashi P, Hart F, Schunk F, Fletch A, Griffin G. Canadian Council on Animal Care, *guidelines on: antibody production*, 2002

Cook ME, Trott DL. IgY- immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. *World's Poult. Sci. J.* (2010), 66, 215-225

Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, *et al.* (eds.) *Current Protocols in Immunology*. (1997), Baltimore

Csera L, Gladkiha IA, Hädge D, Ambrosius H. X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunol. Lett.* (1982), 4, 15-19

Dávalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Hidalgo-Alvarez R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* (2000), 11, 657-673

Dávalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Hidalgo-Álvarez R. Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2001), 20, 165-175 (2001)

De Meulenaer B, Huyghebaert A.. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. *Food Agric. Immunol.* (2001), 13, 275-288

Dohms JE, Saif YM, Bacon WL. Studies on metabolism and concentrations of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poult. *Am. J. Vet. Res.* (1978), 39, 1466-1471 (1978)

Erhard MH. *et al.* The humoral immune response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages. *Altern. Lab. Anim.* (2000), 28, 699-705

Erhard MH, Mahn K, Schmidt P. *et al.* Evaluation of various immunization procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg yolk antibodies. *Alternatives to Laboratory Animals*. (2000), 28, 63-80

Fölsch DW. Grundlegende ethologische und ökologische Aspekte für die Haltung von Haustieren. speziell von Hühnern. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* (1990), 97, 217-264

Freund J. The mode of action immunological adjuvants. *Adv Tuberc Res.* (1956), 7:50-5



Gross WB, Siegel PB. Genetic-environmental interactions and antibody response in chickens to two antigens. *Avian Dis.* (1990), 34, 843–847

Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* (1995), 37, 93-118

Hlinak A, Schade R, Bartels T, Ebner D. Das Huhn als Versuchstier und Quelle spezifischer Dotterantikörper. Erfahrungen zur Haltung, Immunisierung und Legeleistung. *Tierarztl. Umsch.* (1996), 51, 402–408

Hlinak A, Schade R. Possibilities of keeping laying-hens to obtain antibodies. *Chick. Egg Yolk Antibodies, Prod. Appl. IgY Technol.* (ed. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak C. Staak) (2001), 9–24

Hommel U, Behn I. in *Forsch. ohne Tierversuche* (2000), 263–268

Jackson LR, Fox JG. Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *Institute for Laboratory Animal Research Journal.* (1995),37(3),141-152

Janeway CA, Travers P. Immunobiology – The Immune System in Health and disease. 1996

Jungbäck C, Finkler H. Anmerkungen zur Bodenhaltung von Hühnern zu Versuchszwecken. *Tierarztl. Umsch.* (1998), 53, 303–308

Kim M. et al., Egg yolk antibody and its application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* (2000), 5, 79-83

Kimura J, Nariuchi H, Watanabe T, Matuhasi T, Okayasu I, Hatakeyama S. Studies on the adjuvant effect of water-in-oil-in-water emulsion in sesame oil. I. Enhanced and persistent antibody formation by antigen incorporated into the water-in-oil-in-water emulsion. *Jpn J. Exp. Med.* (1978), 48: 149–52

Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie.* (1893), 31, 356–382

Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique.* (1959), 238

Larsson, A., Carlander, D. & Wilhelmsson, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food and Agricultural Immunology.* (1998), 10, 29–36



Lösch U. How do the antibodies get into the chicken egg? *ALTEX* (1996),13, 15–17

Lösch U, Schraner I, Wanke R, Jürgens L. The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. Ser. B* (1986),33, 609–619

Mahn, K. (1998). *Etablierung eines Immunisierungsschemas für Legehennen*. Veterinary Medicine, Doctoral Thesis, University of Munich. 110pp, Munich, Germany: University of Munich

Marcq, C.; Théwis, A.; Portetelle, D.; Beckers, Y. Refinement of the production of antigen-specific hen egg yolk antibodies (IgY) intended for passive dietary immunization in animals. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* (2013), 17, 3 pp. 483-493

Mohammed SM. *et al.* Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*. (1998), 4, 115–25

Morrison SL, Mohammed MS, Wims LA, Trinh R, Etches R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.* (2002),38, 619–625

Narat M. Production of antibodies in Chickens. *Food Technol Biotechnol.* (2003), 41, 3, 259-267

Noll F, Lutsch G, Bielka H. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. *Immunol. Lett.* (1982),4, 117–123

Olbrich C, Müller RH, Tabatt K, Kayser O, Schulze C, Schade R. Stable biocompatible adjuvants — a new type of adjuvant based on solid lipid nanoparticles: a study on cytotoxicity, compatibility and efficacy in chicken. *ATLA* (2002), 30,443–458

Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, Dixon FJ. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* (1962),89, 272–278

Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends, *Immunology and Cell Biology.* (2004) 82, 488–496

Rajesh KG, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects, *Vaccine*, (1995), Vol. 13, No. 14, pp. 1263-1276



Ramon, G. Bull. Soc. Cenfr. Med. Vet. 1925, 101, 227-234

Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* (1974), 4, 521–523

Sasse, M. *Experimente zur Induktion, Präparation und Charakterisierung aviärer vitelliner Antikörper gegen Endotoxine verschiedener gramnegativer Bakterien.* (1998), 140

Schade R. Hlinak A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX* (1996),13, 5–9

Schade, R. *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *Altern. Lab. Anim.* (1996), 24, 925–934

Schade R, Gutierrez Calzado E, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo H Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA.* (2005),33, 1–26

Scharmann W, Tiergerechte Haltung von Legehennen unter Laborbedingungen. *Tierlaboratorium* (1994),19, 67–71

Schwarzkopf C, Staak C, Behn I, Erhard M. Immunisation. In *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY Technology* (ed. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak & C. Staak), (2000), pp. 25–64. Berlin, Germany, Heidelberg

Shimizu M. *et al.* Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1992), 56, 270–274

Stewart-Tull DES. (ed.) *The Theory and Practical Application of Adjuvants.* (1995), 392 pp. New York NY: Wiley

Stills HF. Polyclonal Antibody Production. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*, 2nd Edn. (eds. P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer). (1994). Pp. 435-448. San Diego CA: Academic Press

Stills HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* (2005), 46, 280-293.



Stills HF. Polyclonal antibody production. *In: Suckhow M.A., Stevens KA, Wilson RP, eds. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster and other rodents.* Oxford, UK: Elsevier Inc., (2012), 259-274

Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2001),15, 708–712

Tan SH. et al., A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. *J. Immunol. Methods.* (2012), 380, 73-76

Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassman M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology — A Molecular and Integrative Physiology.* (2002), 131, 569–574

Tu Y-Y, Chen C-C, Chang H-M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. *Food Research International* (2001), 34, 783–789

Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* (1995),16, 392–398

Woodard LF, Jasman RL. Stable oil-in-water emulsions: preparation and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine*, (1985), 3: 57–61

Woolley JA, Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J. Immunol. Methods* (1995), 178, 253–265

Yamamoto H, Watanabe H, Sato G, Mikami T. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jpn. J. Vet. Res.* (1975),23, 131–140



Σκοπός της Μελέτης



Τα καρδιαγγειακά νοσήματα στοιχίζουν κάθε χρόνο τη ζωή εκατομμυρίων ανθρώπων παγκοσμίως, παρόλο που έχουν γίνει σημαντικά βήματα προόδου τόσο σε διαγνωστικό όσο και σε θεραπευτικό επίπεδο τις τελευταίες δεκαετίες. Η πιο κοινή μορφή καρδιακής πάθησης και η πρώτη αιτία θανάτων στις ανεπτυγμένες χώρες θεωρείται η χρόνια στεφανιαία νόσος, στην οποία η αθηρωματική πλάκα αποφράζει τις στεφανιαίες αρτηρίες και παρακωλύει την αιμάτωση του μυοκαρδίου (με επακόλουθο τη στηθάγχη) ή ρήγνυται αιφνιδίως και προκαλεί την πλήρη απόφραξη αρτηρίας (οξύ στεφανιαίο επεισόδιο – έμφραγμα του μυοκαρδίου).

Οι τροπονίνες εισήχθηκαν στον εργαστηριακό έλεγχο, ως εξαιρετικά ευαίσθητοι βιομοριακοί δείκτες στην ανίχνευση της μυοκαρδιακής βλάβης. Αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν αποδείξει ότι η καρδιακή ισομορφή της τροπονίνης I, cTnI αυξάνει μέσα σε 4-6 ώρες μετά την έναρξη του πόνου στο στήθος, καθιστώντας την ως έναν ιδανικό δείκτη για μυοκαρδιακή βλάβη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή αντισωμάτων για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης δοκιμασίας ELISA για την ανίχνευση της cTnI. Για την ανάπτυξη της δοκιμασίας ανίχνευσης της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I [cTnI] στον ορό του αίματος επιλέχθηκε το πεπτίδιο **RRRSSNYRAYATE** (Strongylis,2008). Η επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας στηρίχθηκε στο γεγονός ότι ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (cTnI₁₉₋₃₁), το οποίο είναι μοναδικό και αποτελεί επέκταση των σκελετικών ισομορφών. Επιπλέον, η ομολογία της σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή.

Χρησιμοποιώντας το επιλεγμένο πεπτίδιο στον φορέα C-SOC₄ που αναγνωρίζει την καρδιακή τροπονίνη cTnI πραγματοποιήθηκε η παραγωγή, η απομόνωση και ο καθαρισμός των πολυκλωνικών αντισωμάτων της τάξης IgG σε δυο διαφορετικά μοντέλα ζώων, το κουνέλι και την όρνιθα.



Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4^ο

Παραγωγή, Απομόνωση και Ταυτοποίηση Αντισωμάτων



4.1. Εισαγωγή

Έχει αποδειχθεί ότι η πρόσδεση γραμμικών επιτόπων στον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC_4 , 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 στο εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Ιατρική Σχολή) και η ανάπτυξη του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(19-31)}]_4\text{-OH}$, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεής φάσης, από τον κ. Στρογγύλη Κωνσταντίνο στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στις επόμενες παραγράφους γίνεται αναλυτική περιγραφή όλων των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν α) κατά τη διεξαγωγή των ανοσοποιήσεων στα κουνέλια και τις όρνιθες, β) κατά την απομόνωση των παραγόμενων αντισωμάτων καθώς και γ) των ανοσοενζυμικών δοκιμασιών ELISA.

4.2. Σύνθεση του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(19-31)}]_4\text{-OH}$

Η ανάπτυξη του ανοσογονικού συμπλέγματος $\text{Ac-SOC}_4[\text{cTnI-(19-31)}]_4\text{-OH}$ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεής φάσης, σε 9-φλουορένυλο-μεθυλοξυκαρβόνυλο-γλύκικο-π-βενζυλόξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη (Fmoc-Gly-Wang ρητίνη). Αρχικά συντέθηκε ο τετραμερής ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC_4 (Σχήμα 4.2.1.1). Χρησιμοποιήθηκαν 3,5g Fmoc-Gly-Wang με αρχική υποκατάσταση 0,75 mmol/g ρητίνης ($3,5 \text{ g} \times 0,75 \text{ mmol/g} = 2,63 \text{ mmol}$ πεπτιδίου), ενώ στη συνέχεια έλαβε χώρα μείωση της αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης, με στόχο την ελαχιστοποίηση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που αναμένεται να υπάρξουν, λόγω του



μεγάλου μεγέθους αλλά και της περίπλοκης διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής του πεπτιδικού μακρομορίου. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιελάμβανε την απομάκρυνση της N^α-Fmoc προστατευτικής ομάδας με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v), για 20min. Τον έλεγχο ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων (τεστ Kaiser) ακολούθησε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Fmoc-Aib-OH, με στόχο της επίτευξη της επιθυμητής τελικής υποκατάστασης της ρητίνης (0,75 → 0,2-0,25 mmol/g ρητίνης). Μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης και τις απαραίτητες εκπλύσεις, ένα τμήμα της πεπτιδορητίνης μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού προς ξήρανση. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν δύο δείγματα (10-15 mg), τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου και κατεργάστηκαν (υπό ανάδευση) με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v) για 30min. Αποτέλεσμα της παραπάνω κατεργασίας ήταν η αποκοπή της Fmoc ομάδας και ο σχηματισμός παραγώγου του φουλβενίου, ο ποσοτικός προσδιορισμός του οποίου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία UV στα 300,6nm όπου και απορροφά. Η τελική υποκατάσταση της ρητίνης υπολογίστηκε στα 0,22mmol/g ρητίνης (δηλ. 3,5 g × 0,22 mmol/g = 0,77mmol) με βάση τον παρακάτω τύπο:

A: μέγιστη απορρόφηση στα 300,6 nm

V: όγκος κατά στην τελική αραιώση (mL)

υποκατάσταση (mmol/g) = (A×V)/(ε×m×l)

ε: συντελεστής μοριακής απορρόφησης

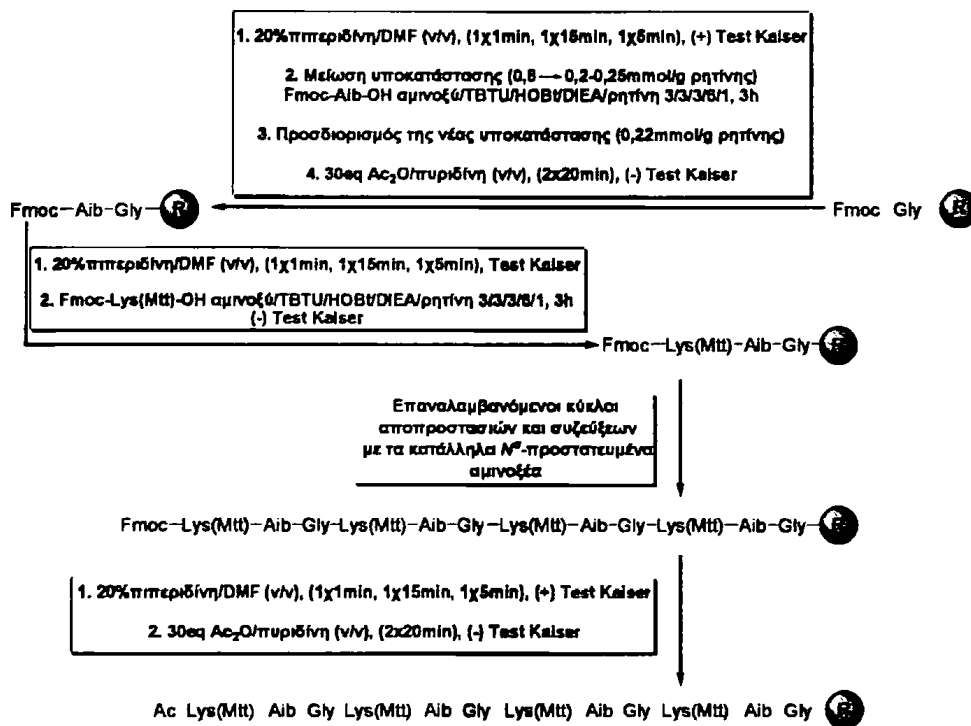
l: μήκος της κυψελίδας (cm)

m: μάζα της πεπτιδορητίνης (g)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση των εναπομεινάντων ελεύθερων αμινομάδων, ενώ τον έλεγχο ολοκλήρωσης της αντίδρασης (τεστ Kaiser) ακολούθησε η απομάκρυνση της N^α-Fmoc προστατευτικής ομάδας του Aib, με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v). Με παρόμοιο τρόπο, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύζευξης του επόμενου κατά σειρά αμινοξέος Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Το επιθυμητό μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας του τετραμερούς φορέα SOC₄ επετεύχθη μετά από διαδοχικούς κύκλους συζεύξεων με τα κατάλληλα N^α-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα και αποπροστασιών των αντίστοιχων N^α-Fmoc προστατευτικών τους ομάδων. Τα N^α-Fmoc-παράγωγα των αμινοξέων προενεργοποιούνταν με το αντιδραστήριο TBTU, παρουσία HOBt και DIEA για 10min, με τον σχηματιζόμενο εστέρα να προστίθεται στο μείγμα της αντίδρασης. Το N-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας του φορέα ακετυλιώθηκε και στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού προς ξήρανση, όπου και



αφέθηκε μέχρις ότου σταθεροποιηθεί το βάρος της, διαδικασία απαραίτητη για τον υπολογισμό της απόδοσης σύνθεσης του φορέα ($\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 87,5\%$).

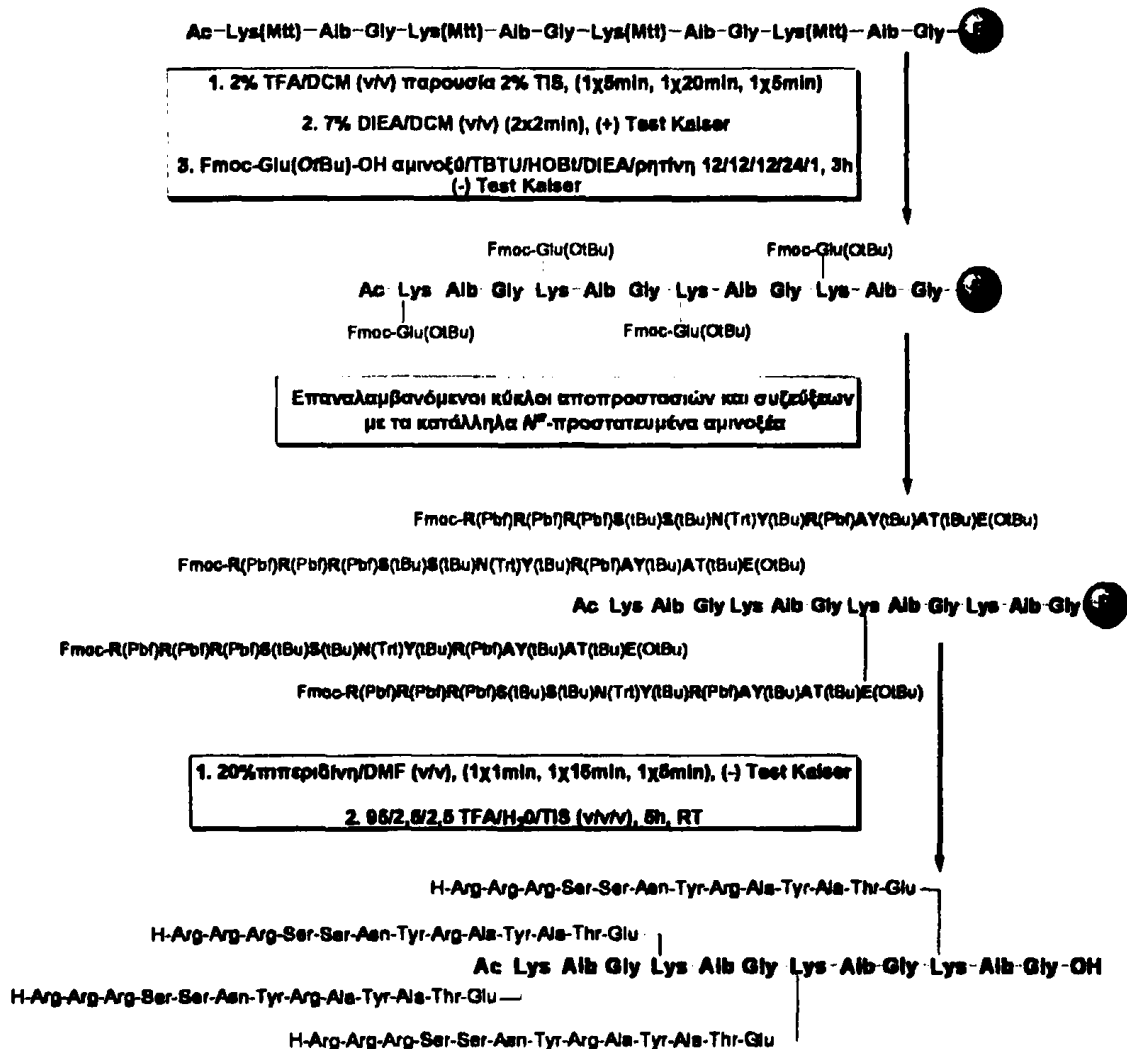


Σχήμα 4.2.1. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC4, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

Στη συνέχεια, ελήφθη κατάλληλη ποσότητα πεπτιδορητίνης για τη ταυτόχρονη βήμα προς βήμα σύνθεση των τεσσάρων αντιγράφων του επιτόπου 19-31, της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I (Σχήμα 4.2.1.2). Αρχικά οι N^ε-Mtt προστατευτικές ομάδες των τεσσάρων λυσινών του φορέα, απομακρύνθηκαν μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα 2% TFA/DCM (v/v) παρουσία 2% TIS (συνολικά για 30min). Ακολούθησε εξουδετέρωση των σχηματισθέντων TFA-αλάτων με διάλυμα 7% DIEA/DCM (v/v) (2x2min) και ο ποιοτικός προσδιορισμός ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων. Τα αμινοξέα του επιτόπου εισήχθησαν ως N^ε-Fmoc-παράγωγα, ενώ οι διαδοχικές αντιδράσεις συζεύξεων στην πεπτιδορητίνη πραγματοποιήθηκαν με την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε εκ νέου σε ξηραντήρα κενού και στη συνέχεια υπολογίστηκε η απόδοση σύνθεσης, πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη ($\alpha_{\text{σύνθεσης}} = 57,5\%$). Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με την αποκοπή όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων



των αμινοξέων του, μετά από κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με διάλυμα 95/2,5/2,5 TFA/H₂O/TIS (v/v/v), για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας και έπειτα από λυοφιλοποίηση του διαλύματος του πεπτιδίου (2N CH₃COOH), υπολογίστηκε η απόδοση του συγκεκριμένου σταδίου σε $\alpha_{\text{αποκοπή}} = 95,7\%$.



Σχήμα 4.2.2. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του μακρομοριακού συμπλέγματος Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/t-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας.

Το πεπτιδίιο υποβλήθηκε αρχικά σε προκαταρκτικό καθαρισμό με την μεθοδολογία της διαπίδωσης έναντι νερού, κάνοντας χρήση της ημιπερατής μεμβράνης Dialysis με cutoff μοριακών βαρών <3500 Da. Μετά από 4 ανανεώσεις του εξωτερικού διαλύματος (απιονισμένο H₂O) στη διάρκεια ενός 24 ώρου, το θεωρητικά απαλλαγμένο από παραπροϊόντα μοριακού βάρους <3500 Da περιεχόμενο της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και από την

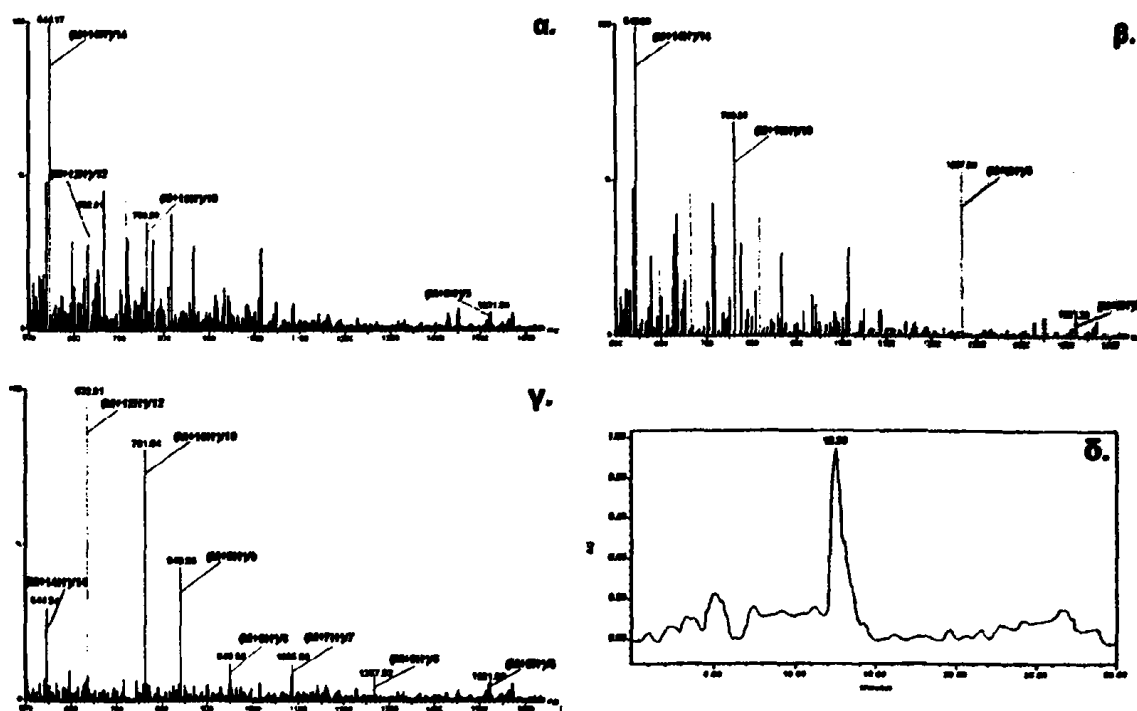


ποσότητα του στερεού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η αντίστοιχη απόδοση καθαρισμού ($\alpha_{\text{Dialysis}} (<3500 \text{ Da}) = 74,0\%$). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης, για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C_{18} Discovery, 25 cm x 10 mm. Χρησιμοποιήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης (gradient) (A) $H_2O/0,1\%TFA$ και (B) $CH_3CN/0,1\% TFA$, με τη βαθμίδωση των διαλυτών τελικά να διαμορφώνεται από A/B: 95/5 ($t=0$) σε A/B: 50/50 ($t=30\text{min}$). Η ταχύτητα ροής του συστήματος καθορίστηκε στα 20ml/min, ενώ η ανίχνευση έλαβε χώρα στα 214 nm. Ακολούθησε συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων, ενώ από την ποσότητα του στερεού καθαρού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε $\alpha_{\text{HPLC}} = 24,2\%$. Ο έλεγχος της καθαρότητας του ανοσογονικού συμπλέγματος $Ac-SOC_4[cTnI-(19-31)]_4-OH$ πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC. Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα της αναλυτικής παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Διαλύτες	(A) $H_2O/0,1\% TFA$ (B) $CH_3CN/0,1\% TFA$
Βαθμιδωτό Πρόγραμμα Έκλουσης Διαλυτών (Gradient)	A/B: 95/05 ($t=0$) \rightarrow A/B: 50/50
Ταχύτητα Ροής του Συστήματος Έκλουσης	1 mL/min
Χρόνος Έκλουσης	30 min
Χρόνος Κατακράτησης (Retention Time, R_t)	12,3 min

Η καθαρότητα του επιθυμητού προϊόντος πιστοποιήθηκε και με φασματοσκοπία μάζας +ESI. Στο Σχήμα 4.2.1.3, παραθέτουμε τα φάσματα μάζας +ESI του πεπτιδικού μακρομορίου στα διάφορα στάδια σύνθεσης και καθαρισμού του, καθώς και την αναλυτική HPLC του απομονωμένου καθαρού τελικού προϊόντος (Strongylis K, 2008).





Σχήμα 4.2.3. Φάσματα μάζας +ESI (α. ακάθαρμο προϊόν πεπτιδικής σύνθεσης, β. μετά από Dialysis καθαρισμό, γ. μετά από HPLC καθαρισμό) και χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC (δ.) του απομονωμένου καθαρού μακρομορίου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH.

4.3. Γενική Μεθοδολογία Ανοσοποιήσεων και ELISA Δοκιμασιών

4.3.1. Διαδικασία ανοσοποιήσεων κουνελιών

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ανοσοποιήθηκαν λευκά θηλυκά κουνέλια ράτσας Νέας Ζηλανδίας, με το ανοσογονικό σύμπλεγμα 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 1^η 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 1^η 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 σύνολο 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 2^η 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 2^η αιμοληψία.
5. Στη συνέχεια διεξήχθησαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ανοσοποιήσεων και αιμοληψιών, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων 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: 0,75 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μL H ₂ O και 750 μL 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: 0,75 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μL H ₂ O και 750 μL Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
49^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0,75mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μL H ₂ O και 750 μL Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
56^η ημέρα	Αιμοληψία (15–20 mL) Ένδειξη: 3 ^η Αιμοληψία
70^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0,75 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 750 μL H ₂ O και 750 μL Incomplete Freud Adjuvant (IFA)
77^η ημέρα	Αιμοληψία (15–20 mL) Ένδειξη: 4 ^η Αιμοληψία
92^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 0,75 mg 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



4.3.2. Διαδικασία ανοσοποιήσεων ορνίθων

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ανοσοποιήθηκαν όρνιθες σε ωτόκα ηλικία, με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Το πρωτόκολλο των ανοσοποιήσεων που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Πριν την ανοσοποίηση των ορνίθων συλλέχθηκαν δυο αυγά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα “μάρτυρες” (preimmune) για τις δοκιμασίες ELISA που εκτελέστηκαν στη συνέχεια.
2. Την ημέρα 0, πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανοσοποίηση και το ανοσογονικό σύμπλεγμα που χρησιμοποιήθηκε κατεργάστηκε με το πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund [Complete Freund's Adjuvant (CFA)]. Συγκεκριμένα, ενέθηκε στα πειραματόζωα αντιγόνο σε συγκέντρωση 1.0 mg διαλυμένο σε 500μL H₂O και 500μL Complete Freund Adjuvant (CFA). Η χορήγηση του αντιγόνου έγινε ενδομυϊκά σε τέσσερα διαφορετικά σημεία στο στήθος του πειραματόζωου. Στη συνέχεια ακολούθησαν ανοσοποιήσεις την ημέρα 10, 20 και 30 χρησιμοποιώντας ως ανοσοενισχυτικό το ατελές ανοσοενισχυτικό του Freund [Incomplete Freund Adjuvant (IFA)].
3. Με την ολοκλήρωση των ανοσοποιήσεων, άρχισε και η συλλογή των αυγών τα οποία περιείχαν και τα αντίστοιχα αντισώματα.

Πρωτόκολλο ανοσοποιήσεων ορνίθων

0^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 1,0 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 500 μL H ₂ O και 500μL Complete Freund Adjuvant (CFA)
10^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 1,0 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 500 μL H ₂ O και 500μL Incomplete Freund Adjuvant (IFA)
20^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 1,0 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 500 μL H ₂ O και 500μL Incomplete Freund Adjuvant (IFA)
30^η ημέρα	Ανοσοποίηση: 1,0 mg πεπτιδίου διαλυμένο σε 500 μL H ₂ O και 500μL Incomplete Freund Adjuvant (IFA)



4.4. Απομόνωση IgY

4.4.1. Απομόνωση IgY με αντιδραστήριο απολιπίδωσης

Η απομόνωση των αντισωμάτων έγινε με τη χρήση δυο αντιδραστηρίων, εκ των οποίων το πρώτο είναι το αντιδραστήριο απολιπίδωσης για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες από τα λιπίδια, ενώ το δεύτερο είναι το αντιδραστήριο καθίζησης να απομονωθεί επιλεκτικά το κλάσμα IgY (Kit Thermo Scientific Pierce Chicken IgY).

Η απομόνωση των αντισωμάτων με αυτή τη διαδικασία έχει βελτιστοποιηθεί για να μπορούν να ανακτηθούν συνολικά περίπου 100 mg καθαρής IgY από φρέσκους κρόκους αυγού κατάλληλα ανοσοποιημένων ορνίθων. Το προκύπτον πολυκλωνικό IgY είναι επαρκώς καθαρό για άμεση χρήση σε πολλές διαδικασίες ανοσοανίχνευσης ή μπορεί εύκολα να καθαριστεί με χρωματογραφία συγγένειας έναντι του ειδικού αντιγόνου.

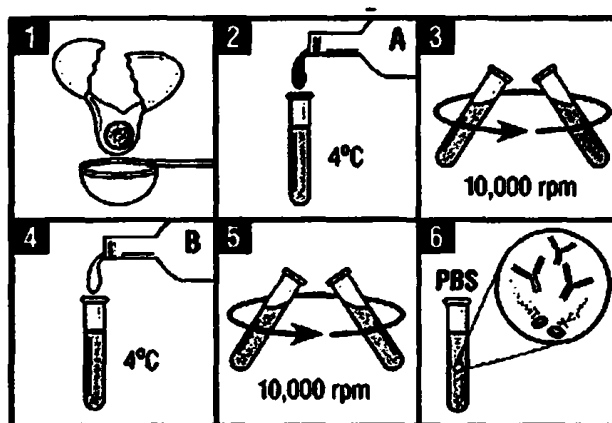
- ❖ Το κέλυφος των αυγών ραγίζεται προσεκτικά και ο κρόκος μεταφέρεται σε ένα ειδικό «κρόκο κουτάλι», προκειμένου να απομακρυνθεί όσο δυνατόν περισσότερο ασπράδι.
- ❖ Ο κρόκος μεταφέρεται προσεκτικά πάνω σε ένα διηθητικό χαρτί και με κυκλικές κινήσεις απομακρύνονται τα υπολείμματα του ασπραδιού.
- ❖ Με ένα ρύγχος πιπέτας, τρυπάμε το δέρμα του κρόκου προκειμένου να απελευθερωθεί το εσωτερικό του και να μεταφερθεί σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρωσης.
- ❖ Σημειώνουμε τον όγκο του κρόκου (V1) και προσθέτουμε αντιδραστήριο απολιπίδωσης ίσο με το πενταπλάσιο του όγκου του κρόκου ($V2=5 \times V1$).
- ❖ Ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος, επώαση στους 4°C για 24 ώρες, καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση στους 4°C για 15 λεπτά (10.000 rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο)
- ❖ Το υπερκείμενο, που θα πρέπει να είναι διαυγές, μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό κύλινδρο και προστίθεται ίσος όγκος αντιδραστηρίου καθίζησης (V3).
- ❖ Ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος, επώαση στους 4°C για 24 ώρες, καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση στους 4°C για 15 λεπτά (10.000 rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο).



- ❖ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται όγκος PBS ίσος με τον όγκο του κρόκου (V1).

Στη συνέχεια προσδιορίζουμε την συγκέντρωση της IgY φωτομετρικά: 50μL από το δείγμα της απομονωμένης IgY αναμειγνύονται με 950 μL PBS, τοποθετούνται σε κυψελίδα διαμέτρου 1 cm και φωτομετρώνται στα 280 nm. Για την μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση (mg/mL) χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Συγκέντρωση IgY (mg/mL)} = (A_{280}/1,4) \times 20$$



Εικόνα 4.4.1.4. Περίληψη πρωτοκόλλου για την απομόνωση της IgY: Οι κρόκοι και τα ασπράδια χωρίζονται (1), προστίθεται αντιδραστήριο απολιπίδωσης (2), ακολουθεί φυγοκέντρηση (3), και διαχωρισμός των αντισωμάτων από τα στερεά λιπίδια. Στη συνέχεια, προστίθεται αντιδραστήριο καθίζησης IgY (4), που ακολουθείται από φυγοκέντρηση για την κατακρήμνιση της IgY (5). Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, η απομονωμένη ανοσοσφαιρίνη IgY διαλύεται σε PBS (6).

Pierce Chicken IgY Purification Kit, Formulation: Multi-component kit

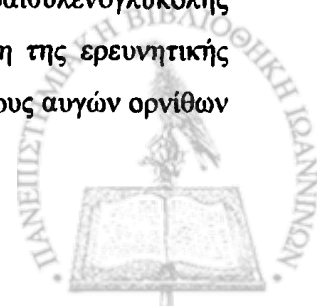
Sufficient For: Purifying chicken IgY from 5 egg yolks

Kit Contents: Delipidation Reagent, 500mL, IgY Precipitation Reagent, 500mL, Egg Separator, 1 separator

Παρασκευή διαλύματος PBS: 160 g NaCl, 4 g KCl, 4g KH₂PO₄, 24 g Na₂HPO₄×2H₂O διαλύονται σε 2 L H₂O και ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να είναι 7,2.

4.4.2. Απομόνωση IgY με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

Η απομόνωση της ανοσοσφαιρίνης IgY, έγινε με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης PEG. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, βασίστηκε στην δημοσίευση της ερευνητικής ομάδας του Polson (1980), η οποία απομόνωσε αντισώματα από τους κρόκους αυγών ορνίθων



που είχαν ανοσοποιηθεί με μία ποικιλία ιών των φυτών με την χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Μία συγκέντρωση της τάξης 3,5% του πολυμερούς προκαλεί τον διαχωρισμό των λιπιδίων και της βιτελλίνης και στη συνέχεια η IgY καταβυθίζεται με 12% PEG. Ο τίτλος των απομονωμένων αντισωμάτων φαίνεται να παραμένει σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά την παύση της πορείας του εμβολιασμού.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- ❖ Το κέλυφος των αυγών ραγίζεται προσεκτικά και ο κρόκος μεταφέρεται σε ένα ειδικό «κρόκο κουτάλι», προκειμένου να απομακρυνθεί όσο δυνατόν περισσότερο ασπράδι.
- ❖ Ο κρόκος μεταφέρεται προσεκτικά πάνω σε ένα διηθητικό χαρτί και με κυκλικές κινήσεις απομακρύνονται τα υπολείμματα του ασπραδιού.
- ❖ Με ένα ρύγχος πιπέτας, τρυπάμε το δέρμα του κρόκου προκειμένου να απελευθερωθεί το εσωτερικό του και να μεταφερθεί σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρωσης.
- ❖ Σημειώνουμε τον όγκο του κρόκου (V1) και προσθέτουμε PBS ίσο με δύο φορές τον όγκο του κρόκου αυγού και αναμιγνύουμε καλά [$\Sigma(V1+V2)$]. Εν συνεχεία προσθέτουμε 3,5% PEG 6000 (σε γραμμάρια επί του συνολικού όγκου) και αφήνουμε τα δείγματα για 10 min σε ένα κυλιόμενο αναμικτήρα σε θερμοκρασία 4°C. Αυτό το βήμα της διαδικασίας εκχύλισης χωρίζει το εναιώρημα σε δύο φάσεις. Μία φάση που αποτελείται από «τα στερεά του κρόκου και τις λιπαρές ουσίες (Polson et al, 1980) και μια υγρή φάση που περιέχει IgY και άλλες πρωτεΐνες.
- ❖ Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm). Το υπερκείμενο (V3) αποχύνεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα αφού πρώτα διηθηθεί με πτυχωτό ηθμό.
- ❖ Προστίθενται 8,5% PEG 6000 σε γραμμάρια (υπολογίζεται σύμφωνα με τον νέο όγκο του υπερκείμενου) στο σωλήνα, και αφήνουμε τα δείγματα για 10 min σε ένα κυλιόμενο αναμικτήρα στους 4°C. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).
- ❖ Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα διαλύεται προσεκτικά σε 1 ml PBS με τη βοήθεια ενός γυάλινου ραβδιού. PBS προστίθεται σε ένα τελικό όγκο 10 ml (V4). Το διάλυμα αναμιγνύεται με 12% PEG 6000 (1,2 γραμμάρια).



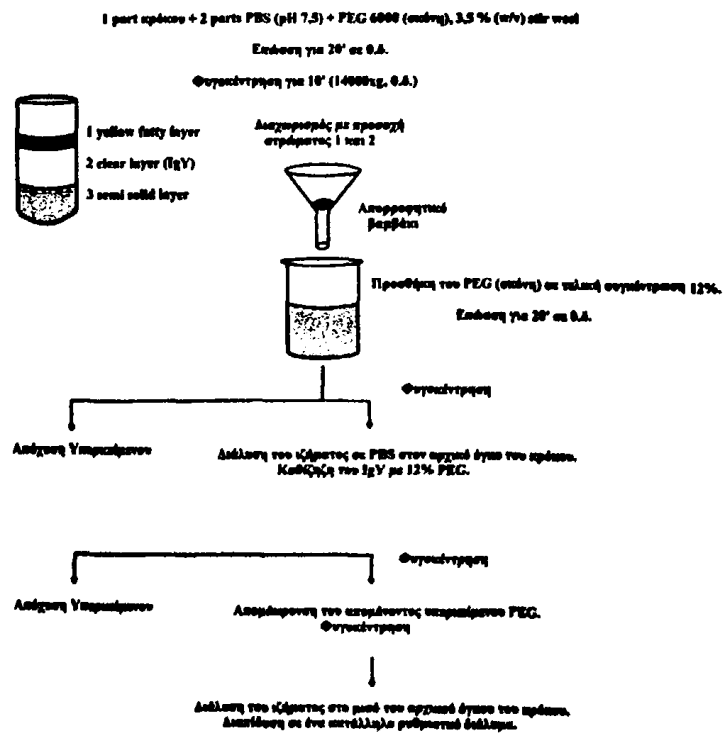
- ❖ Αφήνουμε τα δείγματα για 10 min σε ένα κυλιόμενο αναμικτήρα στους 4°C. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στους 4°C για 20 λεπτά (10.000 rpm).
- ❖ Το ίζημα διαλύεται προσεκτικά σε 800 μl PBS (γυάλινο ραβδί και δίνη). Στη συνέχεια μεταφέρουμε (με πιπέτα) το εκχύλισμα σε νέα σωληνάριο, ξεπλύνουμε τον αρχικό σωλήνα με 400 μL PBS και το προσθέτουμε στο νέο (V5).

Στη συνέχεια προσδιορίζουμε την συγκέντρωση της IgY φωτομετρικά: 50μL από το δείγμα της απομονωμένης IgY αναμειγνύονται με 950 μL PBS, τοποθετούνται σε κυψελίδα διαμέτρου 1 cm και φωτομετρώνται στα 280 nm. Για την μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση (mg/mL) χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Συγκέντρωση IgY (mg/mL)} = (A_{280}/1,33) \times 20$$

PEG 6000 (Aldrich Chemistry)

Παρασκευή διαλύματος PBS: 160 g NaCl, 4 g KCl, 4g KH₂PO₄, 24 g Na₂HPO₄×2H₂O διαλύονται σε 2 L H₂O και ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να είναι 7,2.



Σχήμα 4.4.2.5. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας απομόνωσης της ανοσοσφαιρίνης IgY (Pauly D. et al, 2011).



4.5. 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 τη 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 μεγίστης 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°C), 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 την 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 θειικού 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.

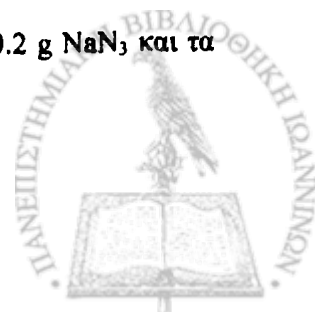
📌 Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή διαλύματος του αντιγονικού πεπτιδίου (stock solution)

1 mg πεπτιδίου διαλύεται σε 1 ml H₂O και αποθηκεύεται στην κατάψυξη

Παρασκευή του διαλύματος Coating Buffer CO₃²⁻ (pH 9.6)

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζουμε τα εξής: 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃ και τα διαλύουμε σε H₂O (τελικός όγκος 1 L).



Παρασκευή διαλύματος PBS

160 g NaCl, 4 g KCl, 4g KH₂PO₄, 24 g Na₂HPO₄×2H₂O διαλύονται σε 2 L H₂O και ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να είναι 7,2.

Παρασκευή υποστρώματος TMB

Διάλυμα A (Peroxidase Substrate TMB): Αραίωση με H₂O 1:1

Διάλυμα B (Peroxide Solution H₂O₂): Αραίωση με H₂O 1:1 (Thermo Scientific)

4.6. Βιβλιογραφία:

Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J Vis Exp.* (2011), 51, 3084

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

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



Κεφάλαιο 5^ο

Αποτελέσματα



5.1. Διερεύνηση της Ικανότητας Παραγωγής Αντισωμάτων έναντι του Επιτόπου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή, διερευνήθηκε η παραγωγή των αντισωμάτων έναντι του επιτόπου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Ο συγκεκριμένος επίτοπος επιλέχθηκε διότι η αμινοξική του αλληλουχία ανήκει στο N-τελικό άκρο της καρδιακής ισομορφής της τροπονίνης I. Επιπλέον, η ομολογία της σε σχέση με το σύνολο των σκελετικών τροπονινών δεν ξεπερνά το 33%, ενώ παρουσιάζεται και ως πιθανή ανοσογονική περιοχή Έτσι τα αντισώματα έναντι αυτού παρουσιάζουν ισχυρή αναγνώριση για την καρδιακή ισομορφή της Τροπονίνης I.

Συνοπτικά, στο πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 6 φορές το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH, ενώ διεξήχθησαν και οι αντίστοιχες σε αριθμό αιμοληψίες, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία των ανοσοποιήσεων ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 4.2.1.

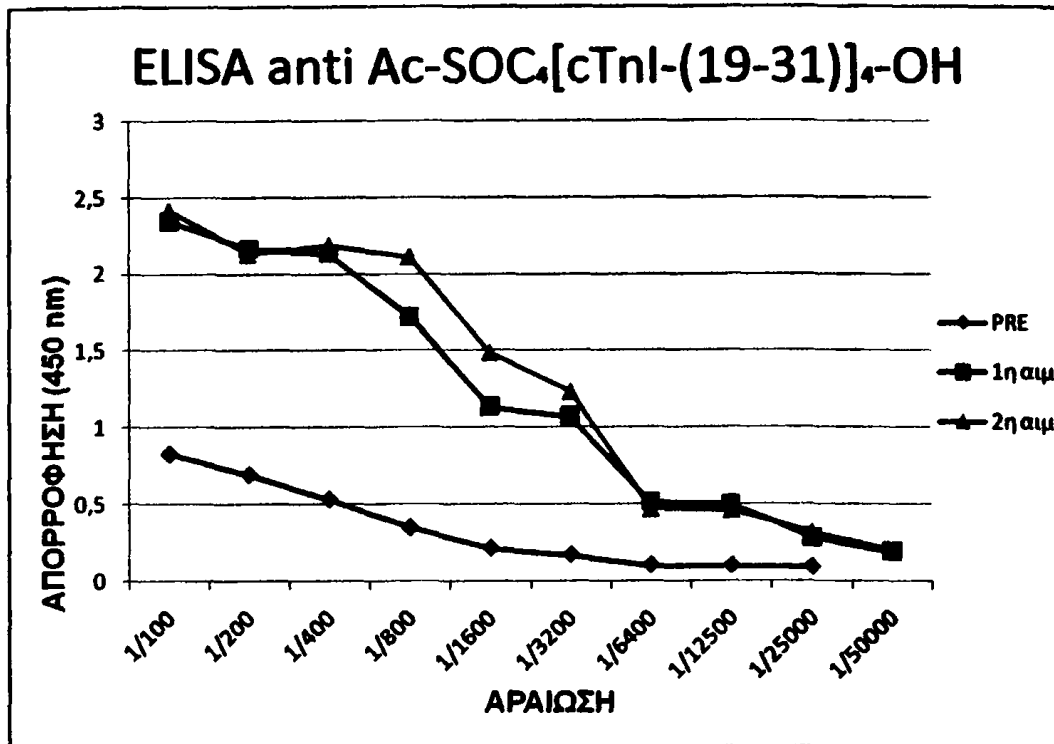
Αρχικά αναπτύχθηκε μία δοκιμασία ELISA με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής αντισωμάτων (σε διαφορετικές αραιώσεις ορών) από το αντίστοιχο ανοσογονικό σύμπλεγμα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραγωγή αντισωμάτων από τα πειραματόζωα, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία με τους αντιορούς από τις πρώτες αιμοληψίες. Όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία, ανάμεσα στις μεταβλητές που επηρεάζουν την άνοση απόκριση του ανοσοποιημένου πειραματόζωου είναι και το ίδιο το ζώο (Clark et al, 2002).

Για το σκοπό αυτό, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH σε συγκέντρωση 5μg/mL και πάντα σε διπλά φρεάτια. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν οι οροί από τις αιμοληψίες: πριν την ανοσοποίηση (PRE), την 1^η και 2^η αιμοληψία. Στην δοκιμασία αυτή επιστρώθηκαν οι οροί με ένα εύρος αραιώσης από 1/100 έως 1/50000.

Όπως προκύπτει από το παρακάτω γράφημα, ο αντιορός anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH} παρουσιάζει μια εξειδικευμένη συγγένεια για το πεπτιδικό μακρομόριο Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH από το οποίο και προήλθε.





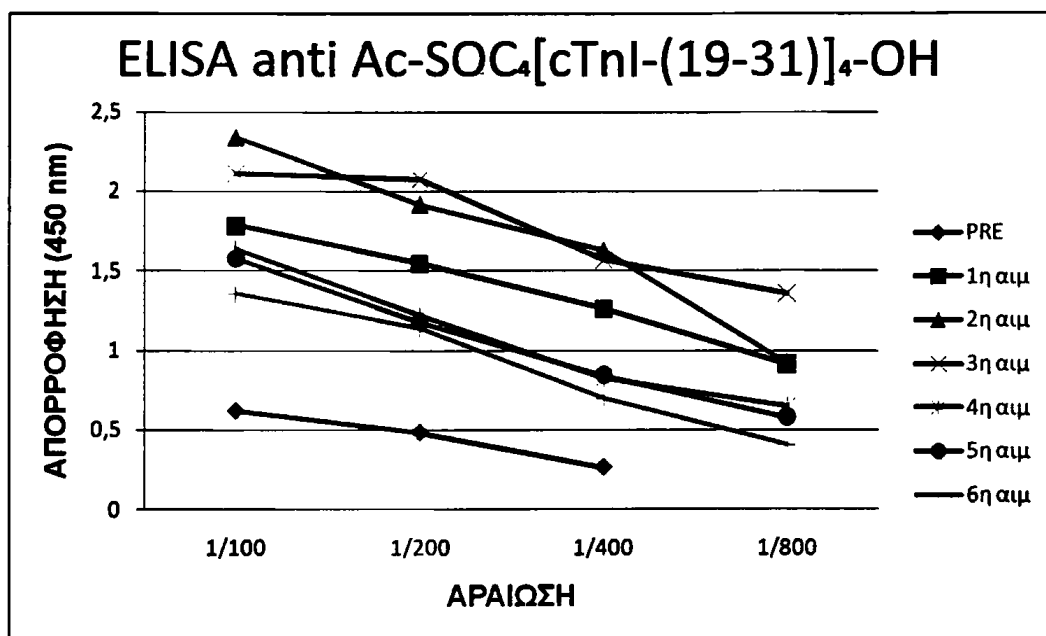
Σχήμα 5.1.1. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού “μάρτυρα” (preimmune), ενώ με κόκκινο και πράσινο, οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης και δεύτερης αιμοληψίας αντίστοιχα, 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 2^η αιμοληψία σε σχέση με την 1^η, κάτι που ερμηνεύεται λόγω της συνεχής ανοσοποίησης, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.1.

5.2 Διερεύνηση της Ικανότητας Αναγνώρισης όλων των Παραγόμενων Αντισωμάτων έναντι του Επιτόπου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH

Για την διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής και αναγνώρισης όλων των αντισωμάτων, δλδ. και από τις έξι συνολικά αιμοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με τον επίτοπο Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH σε συγκέντρωση 5μg/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. Στην δοκιμασία αυτή επιστρώθηκαν οι οροί με ένα εύρος αραιώσης από 1/100 έως 1/800 πάντα σε διπλά φρεάτια. Επιλέχθηκε να μην χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αραιώσεις δεδομένου ότι οι τίτλοι των αντισωμάτων σε αυτές τις αραιώσεις θα ήταν πολύ χαμηλοί, όπως φάνηκε από την προηγούμενη δοκιμασία.



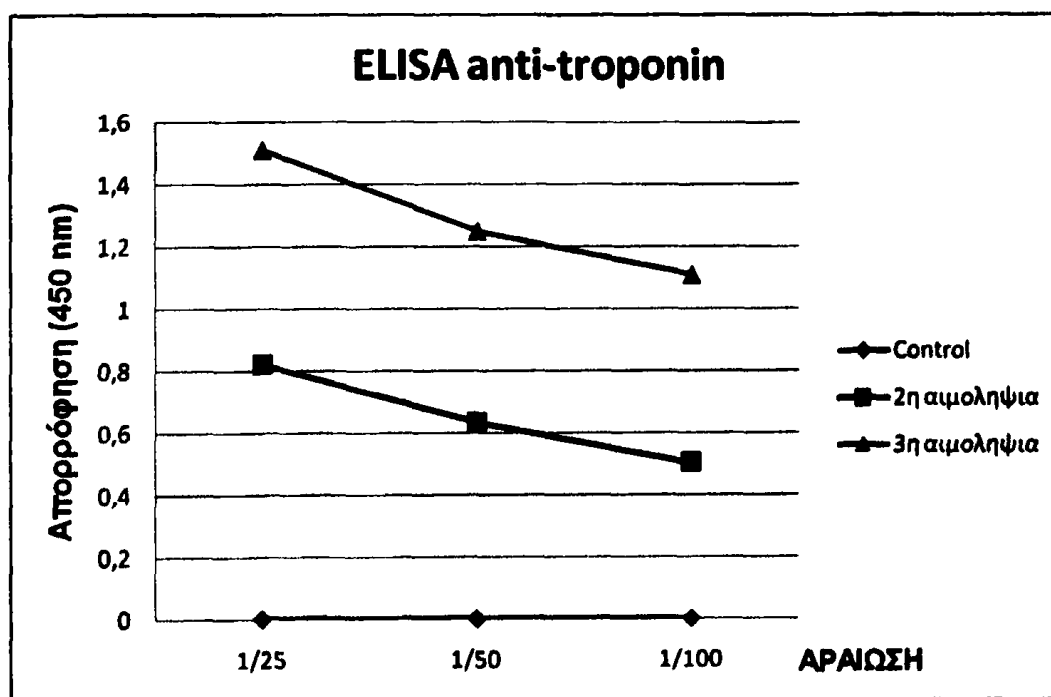
Σχήμα 5.2.2. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων του ορού “μάρτυρα” (preimmune), ενώ με κόκκινο, πράσινο, μωβ, τουρκουάζ, πορτοκαλί και γαλάζιο οι τίτλοι αντισωμάτων της πρώτης έως και της έκτης αιμοληψίας αντίστοιχα, σε διαφορετικές αραιώσεις ορού.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, η παραγωγή των αντισωμάτων ήταν επιτυχής, αφού οι τίτλοι αντισωμάτων στις αιμοληψίες μετά την ανοσοποίηση είναι πολύ υψηλότεροι σε σχέση με τους τίτλους αντισωμάτων πριν από αυτήν. Οι αντιοροί anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH} παρουσιάζουν μια εξειδικευμένη συγγένεια για το πεπτιδικό μακρομόριο Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH από το οποίο και προήλθαν. Επιπλέον απεικονίζεται και ο υψηλότερος τίτλος αντισωμάτων στην 3^η αιμοληψία με τον τίτλο να πέφτει στις επόμενες αιμοληψίες, 4^η έως 6^η.

5.3. Διερεύνηση της Ικανότητας Αναγνώρισης της Φυσικής Ανθρώπινης Καρδιακής Τροπονίνης από τα Παραγόμενα Αντισώματα

Για την διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης της φυσικής ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης από τους αντιορούς anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} επιστρώθηκε σε πλακίδιο ELISA και πάντα σε διπλά φρεάτια, με τροπονίνη σε συγκέντρωση 0,14 ng/mL (Human Cardiac Markers Plus Control LT, Biorad).

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων δοκιμασιών, επιλέχθηκαν οι οροί από τη 2^η και 3^η αιμοληψία, επειδή σε αυτούς παρατηρήθηκαν οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν στο πλακίδιο ELISA με ένα εύρος αραιώσης από 1/25 έως 1/100 πάντα σε διπλά φρεάτια.



Σχήμα 5.3.3. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH. Με μπλε 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 (1^η, 2^η) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (PRE), αποδεικνύουν οι αντιοροί anti-{Ac-SOC₄[cTnl-(19-31)]₄-OH} αναγνωρίζουν ισχυρά την φυσική ανθρώπινη πρωτεΐνη.



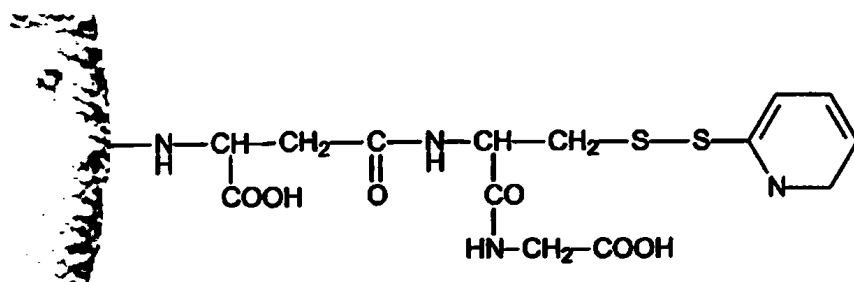
5.4. Καθαρισμός αντί Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH Αντισωμάτων

Στη συνέχεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των anti-{Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH} αντισωμάτων. Με βάση τις προηγούμενες διαδικασίες και τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν οι αντιοροί από την 3^η αιμοληψία. Σκοπός του καθαρισμού των αντισωμάτων ήταν το καθαρό πλέον αντίσωμα να χρησιμοποιηθεί, τόσο σε χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις, όσο και στην ανάπτυξη μιας ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISA τύπου sandwich, ως αντίσωμα σύλληψης ή και ανίχνευσης.

Ο καθαρισμός των αντισωμάτων έγινε με χρωματογραφία συγγένειας, από την συνάδελφο Κωσταρά Μαρία και η αναλυτική περιγραφή παρουσιάζεται στην μεταπτυχιακή της διατριβή.

Κατά την χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού, όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον δεσμευτή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσοφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσοφημένο μακρομόριο εκλούεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.

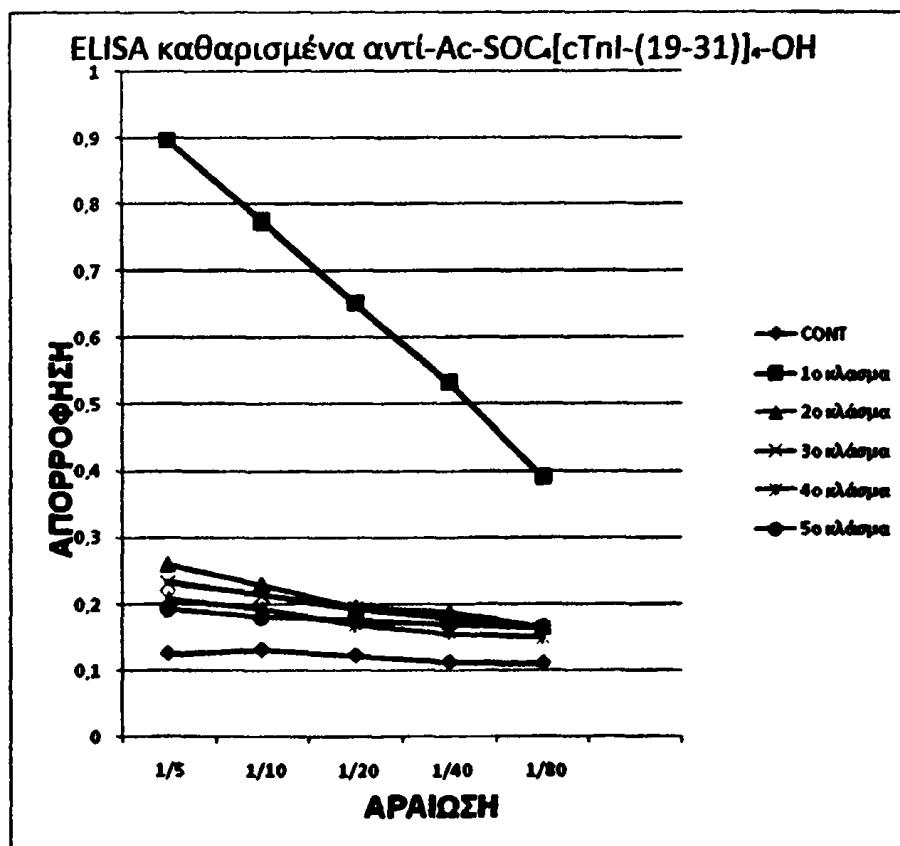
Στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, ο καθαρισμός των αντισωμάτων έγινε με ακινητοποιημένο το αντιγόνο cTnI-(19-31)-Cys-NH₂ ως πρόσδεμα συγγένειας, επειδή υπάρχει ειδική αναγνώριση αντιγόνου από το αντίσωμα, ενώ ως υλικό πλήρωσης χρησιμοποιήθηκε η ενεργοποιημένη θειολοσεφαρόζη 4B.



Σχήμα 5.4.4. Απεικόνιση της χημικής δομής του υλικού πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης.

Συνοπτικά, τα δείγματά μας που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες επωάστηκαν σε μήτρα, η οποία αποτελείται από ένα συνδετικό μόριο της ανοσοσφαιρίνης ομοιοπολικά συνδεδεμένο με χάντρες χρωματογραφίας. Τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνθηκαν με πλύσιμο και οι ειδικά συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες εκλούστηκαν με τη χρήση ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά την έκλυση, στα κλάσματα που λήφθηκαν ακλούθησε έλεγχος ύπαρξης ανοσοσφαιρινών με ανιχνευτή υπερύδους ακτινοβολίας (UV) στα 280 nm.

Μετά τον καθαρισμό, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία ELISA με σκοπό τον προσδιορισμό του κλάσματος στο οποίο βρίσκονται τα καθαρά πλέον αντισώματα. Σε πλακίδιο ELISA επιστρώθηκε το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH σε συγκέντρωση 5μg/ml και πάντα σε διπλά φρεάτια. Στη συνέχεια ακολούθησε η επίστρωση των κλασμάτων με ένα εύρος αραιώσης από 1/5 έως 1/80.



Σχήμα 5.4.5. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων του καθαρισμού των αντι-{Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH} αντισωμάτων της 3^{ης} αμιοληψίας. Από τις τιμές των απορροφήσεων διαπιστώνεται η ύπαρξη των καθαρών πλέον αντισωμάτων στο 1^ο κλάσμα.

Όπως αποτυπώνεται στο γράφημα, τα καθαρά πλέον αντισώματα, απομονώθηκαν στο 1^ο κλάσμα και με αυτά μπορούμε να προχωρήσουμε στην ανάπτυξη της δοκιμασίας ELISA.



5.5. Διερεύνηση Παραγωγής και Απομόνωσης Αντισωμάτων από τις Όρνιθες

5.5.1. Διερεύνηση απομόνωσης αντισωμάτων με τη χρήση αντιδραστηρίου απολιπίδωσης

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης, διερευνήθηκε η παραγωγή αντισωμάτων σε ένα διαφορετικό μοντέλο πειραματόζωων. Για το σκοπό αυτό, ανοσοποιήθηκαν όρνιθες με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Συνοπτικά, στο πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 4 φορές το ανοσογονικό σύμπλεγμα, τις ημέρες 0, 10, 20, 30 και στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή των αυγών για την απομόνωση των αντισωμάτων. Η διαδικασία των ανοσοποιήσεων ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 4.2.2.

Η απομόνωση της ανοσοσφαιρίνης IgY έγινε με τη χρήση αντιδραστηρίου απολιπίδωσης, όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.3.1

Πίνακας 5.5.1.1. Στον πίνακα απεικονίζονται οι ποσότητες σε mL των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση της IgY. mL κρόκου: ο όγκος του κρόκου που χρησιμοποιήθηκε. mL αντιδραστηρίου απολιπίδωσης. mL υπερκείμενου όπου βρίσκονται τα αντισώματα IgY. mL αντιδραστηρίου καθίζησης και ο όγκος του PBS, όπου απομονώθηκαν τελικά τα αντισώματα.

a/a	mL κρόκου	mL αντιδραστηρίου απολιπίδωσης	mL υπερκείμενου	mL αντιδραστηρίου καθίζησης	mL IgY σε PBS
1	7.5	37.5	38	38	7.5
2	10	50	40	40	10
3	10	50	45	45	10
4	10	50	40	40	10
5	10	50	40	40	10
6	8	40	40	40	8
Control 1a	10	50	40	40	10
Control 1b	10	40	38	38	10

Στη συνέχεια, ακολούθησε φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των απομονωμένων αντισωμάτων όπως αυτός περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.1.

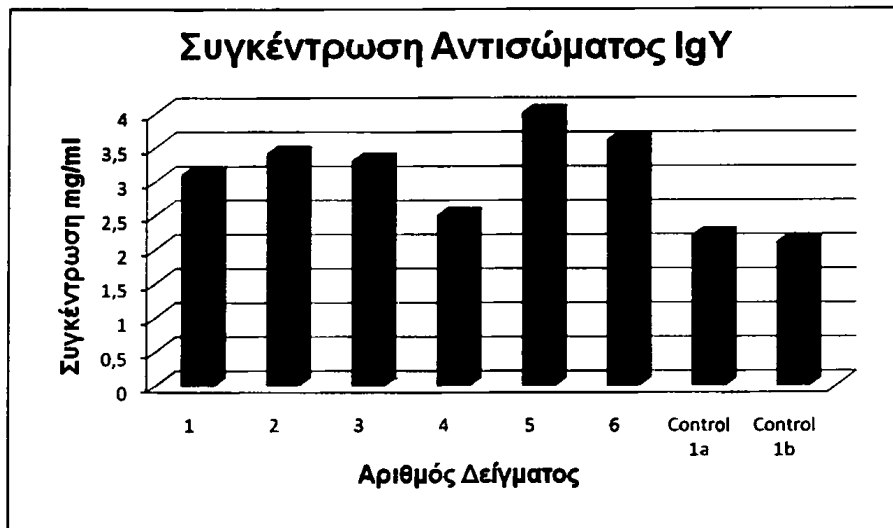


Πίνακας 5.5.1.2. Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων ανα δείγμα. Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων έγινε φωτομετρικά στα 280 nm. Και η συγκέντρωση υπολογίστηκε βάση της εξίσωσης: $IgY (mg/mL) = (A_{280}/1,4) \times 20$

Δείγμα	Απορρόφηση	mg/ml	mg ολικής IgY
I	0,220	3,1	23,2
	0,239	3,4	34
	0,231	3,3	33
	0,173	2,5	25
	0,280	4,0	40
	0,250	3,6	28,8
Control 1a	0,155	2,2	22
Control 1b	0,147	2,1	21

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, η απομόνωση των αντισωμάτων ήταν επιτυχής και συγκέντρωση που υπολογίστηκε βρίσκεται εντός των ορίων που δίνει το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε (3-7 mg/mL καθαρότητας 90%). Η χαμηλή τιμή του δείγματος 4 οφείλεται στο γεγονός ότι το υπερκείμενο δεν ήταν διαυγές το οποίο σημαίνει πως δεν απομακρύνθηκαν επαρκώς τα λιπίδια.

Στα δείγματα ελέγχου, control 1a και control 1b, παρατηρούμε μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση αντισωμάτων, κάτι που μπορεί να ερμηνευτεί με το γεγονός ότι τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να είχαν αναπτύξει αντισώματα έναντι σε άλλους παράγοντες, στους οποίους εκτέθηκαν.



Σχήμα 5.5.1.6. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της παραγωγής και απομόνωσης των αντισωμάτων IgY με τη χρήση αντιδραστηρίου απολιπίδωσης.

5.5.2. Διερεύνηση απομόνωσης αντισωμάτων με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)

Στη συνέχεια των πειραμάτων, διερευνήθηκε η απομόνωση της IgY με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Για το σκοπό αυτό, ανοσοποιήθηκαν όρνιθες με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Συνοπτικά, στο πειραματόζωο ενέθηκε συνολικά 4 φορές το ανοσογονικό σύμπλεγμα, τις ημέρες 0, 10, 20, 30 και στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή των αυγών για την απομόνωση των αντισωμάτων. Η διαδικασία των ανοσοποιήσεων ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 4.2.2.

Η απομόνωση της ανοσοσφαιρίνης IgY έγινε με τη χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Συνοπτικά, μία συγκέντρωση της τάξης 3,5% του πολυμερούς προκάλεσε τον διαχωρισμό των λιπιδίων και στη συνέχεια η IgY καταβυθίστηκε με 12% PEG. Η όλη διαδικασία, περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.3.2.

Στον πίνακα που ακολουθεί, παραθέτονται αναλυτικά οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας και για κάθε ένα από τα αυγά ξεχωριστά.

Πίνακας 5.5.2.3. Στον πίνακα απεικονίζονται οι ποσότητες σε mL των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση της IgY. Όγκος του κρόκου που χρησιμοποιήθηκε (V1), όγκος του PBS (V2) που προστέθηκε, τα γραμμάρια PEG που προστέθηκαν σε κάθε στάδιο, ο όγκος του υπερκείμενου (mL υπερκείμενου) όπου βρίσκονται τα αντισώματα IgY. Η αναλυτική διαδικασία, περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.2.

a/a	V1 mL (κρόκος)	V2 mL (PBS)	PEG 3,5% (g)	mL υπερκείμενου	PEG 8,5% (g)	PBS	PEG 12% (g)
1	13	39	1,37	25	2,12	10	1,2
2	12	36	1,26	24	2,04	10	1,2
3	12	36	1,26	25	2,12	10	1,2
4	11	33	1,16	23	1,96	10	1,2
5	11	33	1,16	23	1,96	10	1,2
6	12	36	1,26	26	2,21	10	1,2
7	12	36	1,26	26	2,21	10	1,2
8	11	33	1,16	23	1,96	10	1,2
9	12	36	1,26	25	2,12	10	1,2
10	10	30	1,4	25	2,12	10	1,2
11	10	30	1,4	27	2,3	10	1,2
12	10	30	1,4	26	2,21	10	1,2
13	10	30	1,4	25	2,12	10	1,2
14	10	30	1,4	22	1,87	10	1,2
15	10	30	1,4	23	1,96	10	1,2
16	10	30	1,4	23	1,96	10	1,2

Στη συνέχεια, ακολούθησε φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των απομονωμένων αντισωμάτων όπως αυτός περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.2.



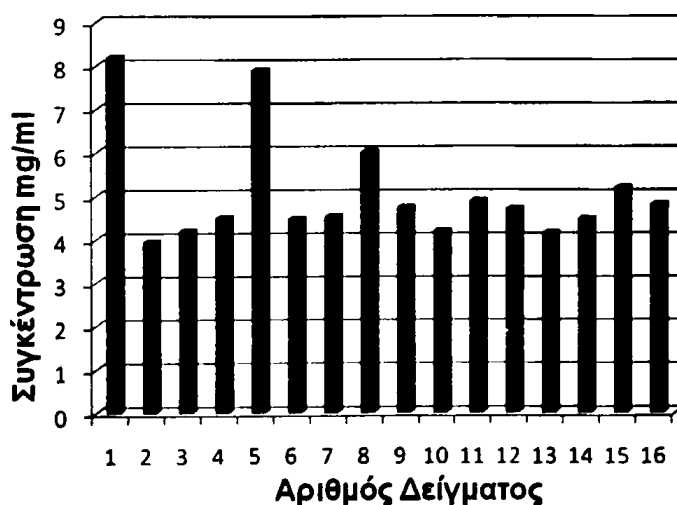
Πίνακας 5.5.2.4. Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων ανα δείγμα. Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων έγινε φωτομετρικά στα 280 nm. Και η συγκέντρωση υπολογίστηκε βάση της εξίσωσης: $IgY (mg/ml) = (A_{280}/1.33) \times 20$.

α/α	Απορρόφηση	mg/mL	α/α	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
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

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, η απομόνωση των αντισωμάτων ήταν επιτυχής και συγκέντρωση που υπολογίστηκε βρίσκεται εντός των ορίων που δίνει το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε (4–8 mg/mL ανοσοσφαιρίνης IgY).

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, τα απομονωμένα αντισώματα θα πρέπει να καθαριστούν με διαπίδυση πριν τη χρήση τους σε δοκιμασία ELISA.

Συγκέντρωση αντισώματος IgY



Σχήμα 5.5.2.7. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της παραγωγής και απομόνωσης των αντισωμάτων IgY, με τη χρήση PEG.

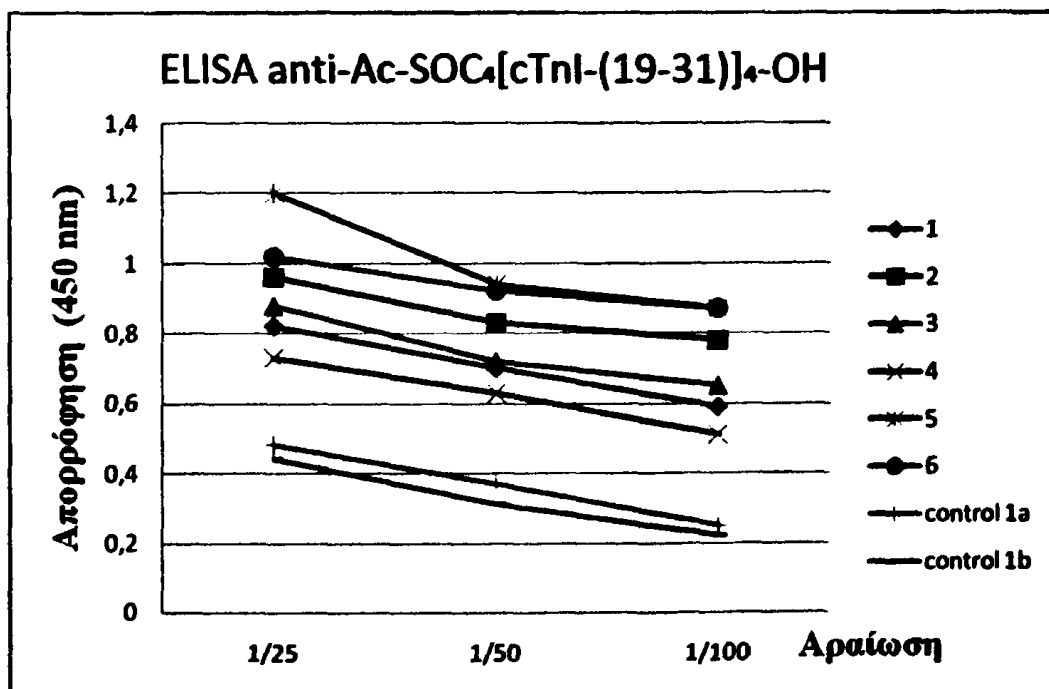


5.5.3. Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του επιτόπου Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH από τα παραγόμενα σε όρνιθες αντισώματα.

Για την διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του επιτόπου από τα παραγόμενα αντισώματα, επιστρώθηκε πλακίδιο ELISA με τον επίτοπο Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH σε συγκέντρωση 5μg/mL και πάντα σε διπλά φρεάτια.

Στη συνέχεια επιστρώθηκαν δείγματα από κρόκους αυγών που περιείχαν καθαρή IgY η οποία απομονώθηκε με αντιδραστήριο απολυτίδωσης. Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν αυτά τα αντισώματα, γιατί είναι υψηλής καθαρότητας, της τάξης των 90% και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία, χωρίς να απαιτείται καθαρισμός με διαπίδυση.

Τα δείγματα επιστρώθηκαν με ένα εύρος αραιώσης από 1/25 έως 1/100 και πάντα σε διπλά φρεάτια. Επιστρώθηκαν τα δείγματα 1 έως 6 καθώς και δυο δείγματα ελέγχου, το control 1a, control 1b. Τα δείγματα ελέγχου, προέρχονται από ζώα που δεν ήταν ανοσοποιημένα.



Σχήμα 5.5.3.8. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανοσοποίησης με το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH. Με γαλάζιο και ροζ χρώμα παρουσιάζονται οι τίτλοι αντισωμάτων των δειγμάτων “μάρτυρα” (control), ενώ με μπλε, κόκκινο, πράσινο, μωβ, τουρκουάζ και πορτοκαλί οι τίτλοι αντισωμάτων των δειγμάτων, σε διαφορετικές αραιώσεις.



Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, οι υψηλές απορροφήσεις αποδεικνύουν ότι τα παραγόμενα αντισώματα αναγνωρίζουν ισχυρά το ανοσογονικό σύμπλεγμα Ac-SOC₄[cTnI-(19-31)]₄-OH από τον οποίο παρήχθησαν. Τα δείγματα ελέγχου control 1a και control 1 b, παρόλο που έχουν μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση αντισωμάτων δεν παρουσιάζουν υψηλή τιμή απορρόφησης. Αυτό αποδεικνύει ότι τα αντισώματα που απομονώθηκαν από αυτά τα ζώα, προήλθαν από την επαφή των ζώων με άλλους ανοσογόνους παράγοντες.



Συμπεράσματα



Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης εξειδικευμένων αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της καρδιακής τροπονίνης I.

Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε η κατάλληλη αμινοξική αλληλουχία της καρδιακής ισομορφής της ανθρώπινης τροπονίνης [cTnI (19-31) (RRRSSNYRAYATE)] προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως ανοσογόνο για την παραγωγή των αντίστοιχων εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Για την παραγωγή των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά μοντέλα ζώων, το κουνέλι και η όρνιθα. Από τα δυο αυτά μοντέλα ζώων, εστίασαμε το ερευνητικό μας ενδιαφέρον στις όρνιθες, καθώς τα πολυκλωνικά αντισώματα (pAbs) μπορούν να απομονωθούν εύκολα από τον κρόκο του αυγού, αφαιρώντας έτσι την αναγκαιότητα για τη συλλογή του αίματος. Η χρήση των ορνίθων αντιπροσώπευσε επίσης μια μείωση της χρήσης ζώων, καθώς παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες αντισωμάτων σε σχέση με τα κουνέλια (Schade et al, 1996; Bollen et al, 1997).

Η απομόνωση στη συνέχεια των παραγόμενων αντισωμάτων, έγινε με την χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Μία συγκέντρωση της τάξης 3,5% του πολυμερούς προκαλεί τον διαχωρισμό των λιπιδίων και στη συνέχεια η IgY καταβυθίζεται με 12% PEG. Ο τίτλος των απομονωμένων αντισωμάτων παραμένει σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά την παύση της πορείας του εμβολιασμού.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, απέδειξαν πως είναι εφικτό να παραχθούν με σύντομο, οικονομικό και αναίμακτο τρόπο αρκετά μεγάλες ποσότητες των επιθυμητών αντισωμάτων. Η συνδυαστική χρήση τους, προσφέρει 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 και ενός επισημασμένου αντισώματος που παράγεται εξίσου εύκολα σε μεγάλες ποσότητες. Η διαφοροποίηση με τα χρησιμοποιούμενα σήμερα στην κλινική πράξη τεστ, είναι ότι δεν απαιτείται η χρήση δυο διαφορετικών αντισωμάτων και ενός αντί-αντισώματος.



Τέλος, τα αντισώματα αυτά ύστερα από κατάλληλο καθαρισμό, προσφέρονται επίσης για την απομόνωση αλλά και τον καθαρισμό καρδιακών τροπονινών από ορούς ασθενικών πληθυσμών.

