

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών & Τεχνολογιών
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών

Ιατρική Σχολή
Λειτουργικός – Κλινικοεργαστηριακός Τομέας
Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας



Ενεργοποίηση Κυτταρικών Λειτουργιών με Χρήση
Ηλεκτρομαγνητικών Πεδίων:
Μελέτη της Λειτουργίας της Πρωτεΐνης Οξείας
Φάσης 70

Λιάπης Δημήτριος

Επιβλέπων Καθηγητής: Άγγελος Ευαγγέλου

Επιβλέπων για το ΤΒΕΤ: Ιωάννης Λεονάρδος

Ιωάννινα, Ιούνιος 2007

Περιεχόμενα

I. Πρόλογος	I
II. Περίληψη	II
III. Summary	III
IV. Εισαγωγή – Θεωρητικό Μέρος	1
V. Εισαγωγή – Σκοπός του Πειράματος	10
VI. Πειραματική Πορεία – Υλικά & Πρωτόκολλα	11
VII. Πειραματική Πορεία – Α' Σκέλος	15
VIII. Πειραματική Πορεία – Β' Σκέλος	18
IX. Πειραματική Πορεία – Γ' Σκέλος	20
X. Πειραματική Πορεία – Δ' Σκέλος	28
XI. Συζήτηση επί των Αποτελεσμάτων	29
XII. Βιβλιογραφία	34

I. Πρόλογος

Η πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών. Πρέπει να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Τομέα, καθηγητή Άγγελο Ευαγγέλου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με το να μου προσφέρει τη δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας παρόλο που δεν υπήρχε πρόβλεψη για έναν ακόμα φοιτητή και ούτε ουσιαστική οικονομική υποστήριξη από το τμήμα μου.

Χωρίς τη συνεισφορά του καθηγητή Χαράλαμπου Αγγελίδη, σε υλικό και τεχνικό επίπεδο, η εκπόνηση αυτής της πτυχιακής δεν θα ήταν δυνατή. Τον ευχαριστώ θερμά.

Κατά την δωδεκάμηνη παραμονή μου στο εργαστήριο είδα πράγματα που μετέβαλαν εντελώς την εικόνα που είχα σχηματίσει για τη Βιολογία, ένα μικρό μέρος από αυτά είναι και το θέμα της πτυχιακής αυτής. Είδα μία ερευνητική ομάδα που σκέφτεται και λειτουργεί με ανοιχτό μυαλό, χωρίς παρωπίδες, και είμαι ευγνώμων και υπερήφανος που αποτέλεσα μέρος αυτής της ομάδας. Ευχαριστώ κύριε Καρκαμπούνα, κύριε Χαβέλλα, Αποστόλη, Γιάννη και Ελένη.

Είδα όμως και μάλιστα βίωσα από πρώτο πρόσωπο την πικρία του να εργάζεσαι και να παράγεις έργο σε ελληνικό πανεπιστήμιο. Ο φθόνος, η υπεξαίρεση (υλική και πνευματική) και η δολιοφθορά δεν θα έπρεπε να υφίστανται σε ένα ακαδημαϊκό περιβάλλον. Είναι ένας από τους λόγους, ενδεχομένως ο κυριότερος, που με οδηγούν στην απόφαση να συνεχίσω τις σπουδές μου στο εξωτερικό. Ευελπιστώ κάποια μέρα να μπορώ να επιστρέψω σε ένα περιβάλλον στο οποίο τέτοια φαινόμενα αλλά και η εικόνα των αλυσίδων και των λουκέτων στα εργαστήρια και τις αίθουσες διδασκαλίας στο όνομα της πολιτικής και του «αγώνα» μίας ομάδας ατόμων να αποτελούν απλώς ανάμνηση.

Δημήτρης Λιάπης

II. Περίληψη

Η πρωτεΐνη οξείας φάσεως HSP-70 ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών με πολλαπλούς ρόλους, ένας από τους οποίους είναι η προστασία του κυττάρου από θερμικά και οξειδωτικά στρες. Είναι εξαιρετικά συντηρημένη και εμφανίζεται σε όλα τα κυτταρικά συστήματα.

Σκοπός του πειράματος και θέμα της παρούσης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων συχνοτήτων συντονισμού της εν λόγω πρωτεΐνης επάνω σε ανθρώπινα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές:

1. Καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa cells), μία καλά χαρακτηρισμένη και πολύ χρησιμοποιημένη κυτταρική σειρά.
2. Γενετικά τροποποιημένα κύτταρα HeLa στα οποία έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο της πρωτεΐνης οξείας φάσεως HSP-70. Τα κύτταρα αυτά αδυνατούν να επιβιώσουν κάτω από ήπια θερμικά και οξειδωτικά στρες.

Οι συχνότητες συντονισμού της HSP-70 ελήφθησαν από απομονωμένη καθαρή πρωτεΐνη με χρήση της πειραματικής συσκευής Multi Channel Dynamic Exciter. Η ίδια διάταξη χρησιμοποιήθηκε και για την αποθήκευση και εκπομπή των Ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε σε γενικές γραμμές είχε ως εξής: Καλλιέργειες των προαναφερθέντων κυτταρικών σειρών σε τρυβλία εκτίθεντο εντός κλωβού Faraday στα καταγεγραμμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα για προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Μετά από κάθε έκθεση ακολουθούσε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες. Μετά το πέρας των επιθυμητών σε κάθε περίπτωση εκθέσεων πραγματοποιούνταν ένα ήπιο θερμικό σοκ, 43°C για μία ώρα, με χρήση υδατόλουτρου. Εν συνεχεία οι καλλιέργειες επιστρέφονταν στην επώαση για 24 ώρες.

Για τη μελέτη της επίδρασης των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων στις στρεσαρισμένες καλλιέργειες ελήφθησαν μετρήσεις ανάπτυξης των επεξεργασμένων κυττάρων για διάστημα 6 ημερών καθώς και στατιστικές μετρήσεις ικανότητας σχηματισμού αποικίας. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν στυπώματα κατά Western ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί η παραγωγή ή μη της πρωτεΐνης οξείας φάσεως HSP-70 στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα που ανέκτησαν την ικανότητα επιβίωσης.

III. Summary

The stress protein HSP-70 belongs to a group of proteins with multiple roles, one of which is the protection of the cell from thermal or oxidative stresses. It is a highly conserved protein and appears in all cellular systems.

The purpose of this experiment and subject of this thesis is the study of the effect of electromagnetic fields comprised of resonance frequencies of the HSP-70 on human cells. Two cell lines were used:

1. Cancer cells taken from the cervix of a uterus (HeLa cells), a well characterized cell line with many applications.
2. A genetically modified HeLa cell line in which the HSP-70 gene has been silenced. These cells cannot survive under otherwise non lethal thermal or oxidative stresses.

The HSP-70 resonance frequencies were obtained from purified human HSP-70 by means of a device called Multi Channel Dynamic Exciter. The same device was used for storage and transmission of the Electromagnetic waves.

The methodology followed during the experiment in general was the following: Cultures of the aforementioned cell lines were exposed, inside a Faraday cage, to the recorded Electromagnetic waves for predetermined amounts of time. Following every exposure, the cultures were returned to the incubator for 24 hours. After completion of the exposure sessions a non lethal thermal shock was administered (43°C for 1 hour) using a waterbath. The cultures were then returned to the incubator for a recovery period of 24 hours.

In order to study the effect of the electromagnetic field on the stressed cultures, cellular growth rate calculations for a period of 6 days were obtained as well as statistical calculations of the cells' colony forming capacity. In addition, Western blots were performed in order to verify the status of the HSP-70 production in genetically modified cells that regained the capacity to survive the non lethal stress.

IV. Εισαγωγή – Θεωρητικό Μέρος

A. Πρωτεΐνες Οξείας Φάσεως:

1. Γενικά:

Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, οι Πρωτεΐνες Οξείας Φάσεως ή Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Heat Shock Proteins) εκφράζονται σε κύτταρα που εκτίθενται σε μη θανατηφόρα στρες. Αυτά, εκτός από το θερμικό στρες, μπορεί να είναι οξειδωτικά στρες, έκθεση σε βαρέα μέταλλα, μικροβιακές λοιμώξεις, παρουσία αντιβιοτικών και άλλα.

Συνθήκες που Επάγουν Εκφραση των HSPs

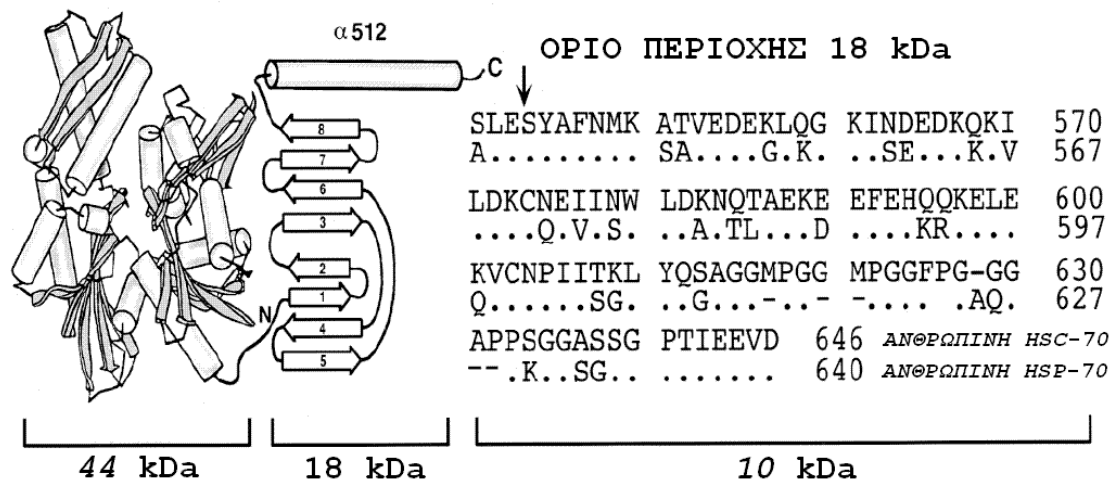
Φυσιολογίας	Παθολογικές	Περιβαλλοντικές
Κύκλος Κυτταρικής Διαίρεσης	Ιϊκή Μόλυνση	Θερμικό Σοκ
Αυξητικοί Παράγοντες	Βακτηριακή Μόλυνση	Βαρέα Μέταλλα
Κυτταρική Διαφοροποίηση	Παρασιτική Μόλυνση	Αναστολείς του Μεταβολισμού
Ιστική Ανάπτυξη	Πυρετός	Ανάλογα Αμινοξέων
Ορμονική Διέγερση	Φλεγμονή	Αιθανόλη
	Ισχαιμία	Αντιβιοτικά
	Υπερτροφία	Ακτινοβολία
	Χημικό Έγκαυμα	
	Κακοήθεια	
	Αυτοανοσία	

Ανακαλύφθηκαν αρχικώς το 1962 σε κύτταρα των σιελογόνων αδένων του οργανισμού *Drosophila melanogaster*, μετά από ολιγόλεπτη έκθεση αυτών σε θερμοκρασία 37°C. Κατά την επαναφορά τους σε φυσιολογική θερμοκρασία (25°C) παρατηρήθηκε μία μεταγραφική έξαρση στο γονιδίωμα τους συνοδευόμενη από αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 70 και 26 kDa. Αυτές οι «μυστηριώδεις» πρωτεΐνες ονομάστηκαν Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ. Έκτοτε έχει ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων πρωτεϊνών.

2. HSP 70 kDa, Μοριακή Δομή:

Οι πρωτεΐνες HSP-70 είναι εξαιρετικά συντηρημένες, εμφανίζουν 60-78% ομολογία βάσεων ανάμεσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και 40-60% με την ανάλογη πρωτεΐνη των προκαρυωτικών οργανισμών. Όλες οι πρωτεΐνες HSP-70 προσδέουν ATP.

Η δομή της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται από τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

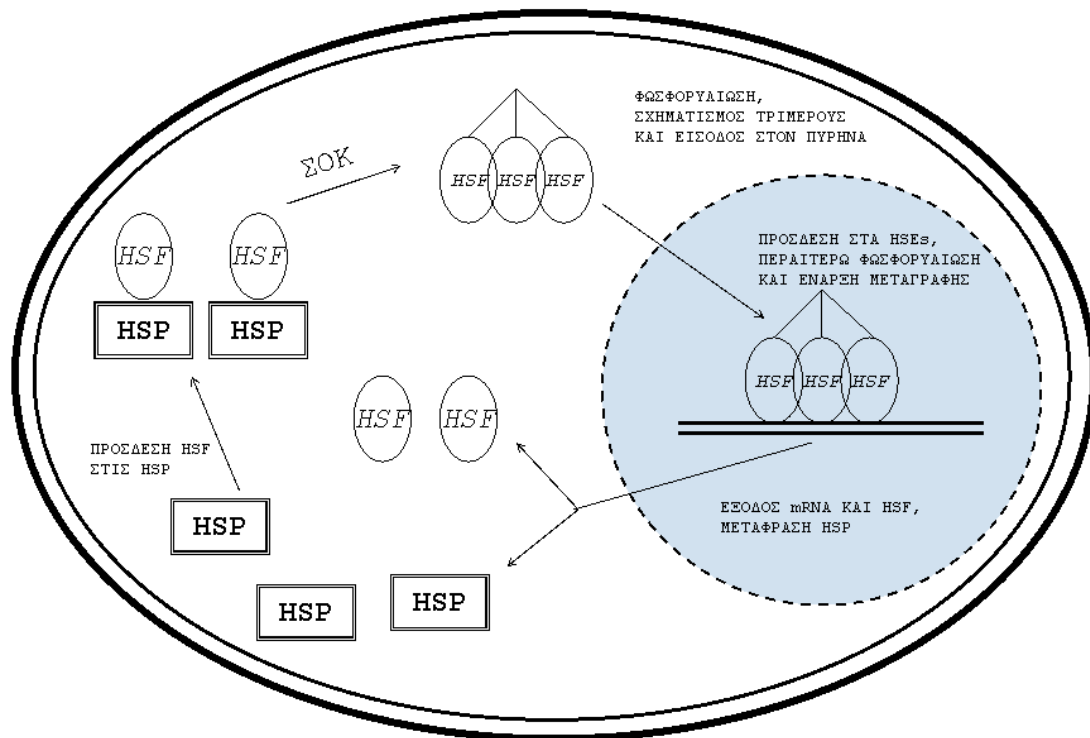


Η πρώτη περιοχή, μεγέθους 44 kDa, εμφανίζει δράση ΑΤΡάσης, η δεύτερη, μεγέθους 10 kDa, είναι η περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων και η τρίτη, μεγέθους 10 kDa, είναι ουσιαστικά αυτή στην οποία παρουσιάζεται και η διαφορά στη δομή της ενεργούς HSP-70 από το αναγνωριστικό σύμπλοκο θερμικού σοκ HSC-70 (Heat Shock Cognate – 70).

3. HSP-70, Ρύθμιση της Έκφρασης:

Η έκθεση ενός κυττάρου σε κάποια από τις προαναφερθείσες συνθήκες εκκινεί έναν μοριακό «καταρράκτη» αντιδράσεων ο οποίος οδηγεί στην υπερέκφραση της HSP-70. Ο μηχανισμός είναι κυκλικός και αυτορυθμιζόμενος.

Ο προαγωγός του γονιδίου της HSP-70 αποτελείται από πέντε περιοχές με αλληλουχία nGAAn οι οποίες ονομάζονται στοιχεία θερμικού σοκ (Heat Shock Elements, HSEs). Οι HSP-70 που βρίσκονται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μικρή συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα, φέρουν προσδεμένα μικρότερα βιομόρια που καλούνται παράγοντες θερμικού σοκ (Heat Shock Factors, HSFs). Κάτω από τις προαναφερθείσες στρεσογόνες συνθήκες αυτά αποχωρίζονται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, φωσφορυλιώνονται και σχηματίζουν τριμερείς δομές. Τα τριμερή στη συνέχεια εισέρχονται στον πυρήνα και προσδένονται στα HSEs όπου και φωσφορυλιώνονται περαιτέρω. Αυτό εκκινεί την διαδικασία μεταγραφής και μετάφρασης. Οι νεοσυντιθέμενες HSP προσδένουν τα HSFs, εφόσον δεν συνεχίζουν να επικρατούν οι στρεσογόνες συνθήκες, ώστε να ανασταλεί η έκφραση του γονιδίου. Το ακόλουθο σχήμα αναπαριστά το μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών οξείας φάσης:



4. HSP-70, Ρόλος:

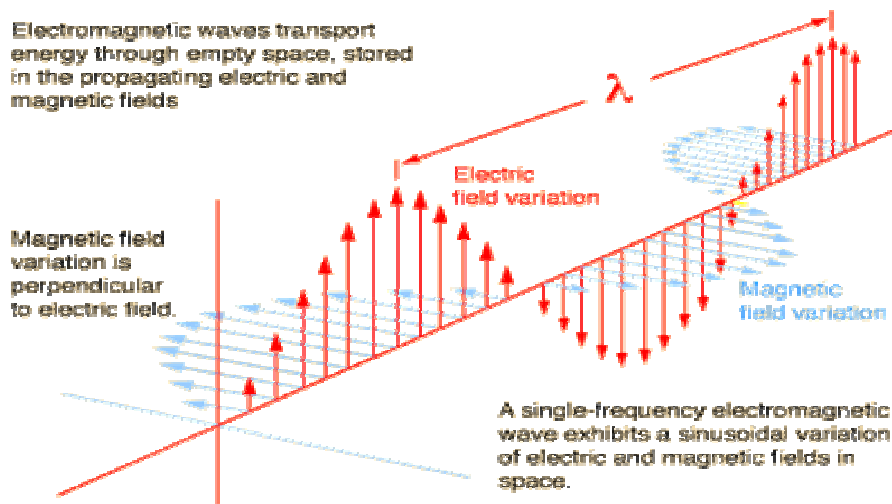
Ο κυριότερος ρόλος των HSP-70, εκτός από την προστασία του κυττάρου, είναι αυτός του μοριακού συνοδού (molecular chaperone). Τα μέλη της οικογένειας των HSP-70 συμμετέχουν σε δύο διακριτές λειτουργίες μοριακού συνοδού. Στην πρώτη αναλαμβάνουν τη μεταφορά των νεοσυντιθέμενων μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών προς μέλη της οικογένειας των HSP-60 και στη δεύτερη συμμετέχουν στην μετατόπιση πρωτεϊνών προς διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα.

B. Ηλεκτρομαγνητισμός:

1. Γενικά:

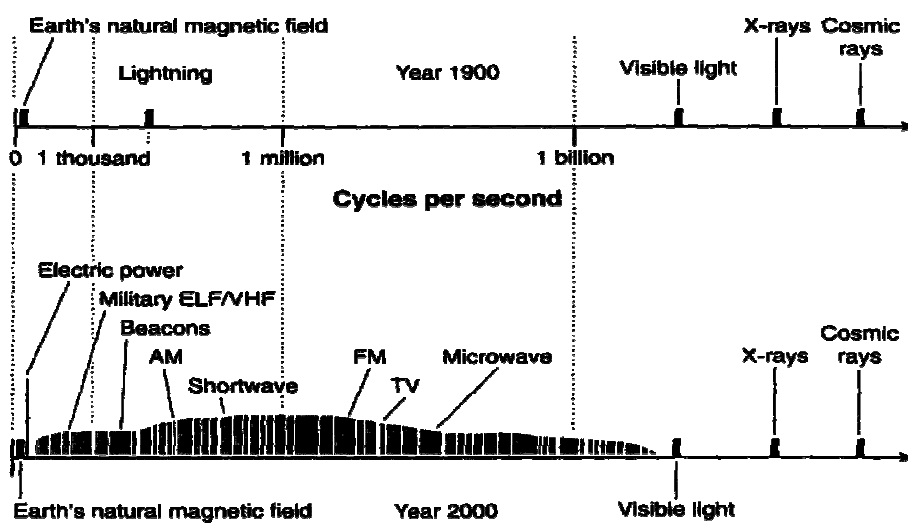
Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο είναι ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο παράγεται από φορτισμένα σωματίδια και το οποίο επηρεάζει τη συμπεριφορά φορτισμένων σωματιδίων όταν αυτά βρίσκονται εντός του πεδίου. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο εκτείνεται στο άπειρο. Οι ηλεκτρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις είναι μία από τις τέσσερις θεμελιώδεις δυνάμεις.

Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μπορεί να θεωρηθεί ως συνδυασμός ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου:



Βάσει της κλασικής Φυσικής, το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο θεωρείται ως ένα ομαλό συνεχόμενο φαινόμενο, το οποίο εκτείνεται με μία κυματοειδή συμπεριφορά. Από τη σκοπιά της κβαντικής μηχανικής όμως, το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο θεωρείται ότι δομείται από διακριτές ενεργειακές δομές, τα φωτόνια.

Η μελέτη των πιθανών αλληλεπιδράσεων των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων με βιολογικά συστήματα είναι ένας σχετικά καινούργιος κλάδος της βιολογίας, ο οποίος όμως είναι επίκαιρος και υψίστης σημασίας καθώς, στην σύγχρονη εποχή, τα πεδία στα οποία εκτίθενται όλοι οι οργανισμοί είναι πολύ περισσότερα από τα φυσικά, όπως φαίνεται στο ακόλουθο γράφημα:



Υπάρχουν πολλές επιδημιολογικές αλλά και πειραματικές έρευνες οι οποίες υποδεικνύουν ότι τα τεχνητά ηλεκτρομαγνητικά πεδία είναι σε

θέση να προκαλέσουν μια ποικιλία φαινομένων, άλλες φορές ευεργετικών και άλλες επιβαρυντικών για το εκτιθέμενο βιολογικό σύστημα.

Τα ισχυρές εντάσεως και υψηλών συχνοτήτων ηλεκτρομαγνητικά πεδία είναι σε θέση να προκαλέσουν μεταλλάξεις, ενώ μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν την πορεία της διαφοροποίησης σε καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη, τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη κακοήθων όγκων σε πειραματόζωα ή να πυροδοτήσουν σε αυτά τον μηχανισμό της απόπτωσης. Υπάρχουν ακόμη δεδομένα σύμφωνα με τα οποία τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αναγέννησης των ιστών του σώματος, όπως επίσης και ολόκληρων άκρων, τουλάχιστον σε κατώτερα ζώα.

2) Ηλεκτρομαγνητικός Συντονισμός:

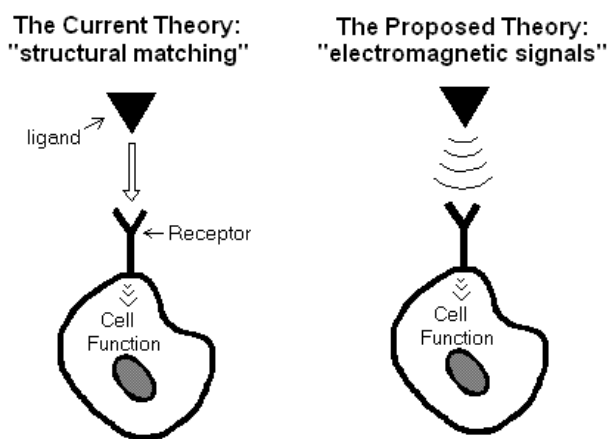
Οι δράσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων πάνω σε χημικά συστήματα φαίνεται να σχετίζονται με φαινόμενα παραγωγής και απενεργοποίησης ελευθέρων ριζών, οι οποίες αποτελούν ενδιάμεσα μόρια για την τέλεση των εν λόγω αντιδράσεων. Η μαγνητική ιδιοστροφορμή (spin) τόσο των πυρήνων των ατόμων, όσο και των ασύζευκτων ηλεκτρονίων των εξώτατων στοιβάδων του μοριακού συστήματος – στόχου αποτελεί την φυσική οντότητα που δέχεται την επιρροή του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Μέσω των φαινομένων σύζευξης, τα οποία είναι σε θέση να προκύψουν μεταξύ των κυμάνσεων του πεδίου και των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, η ενέργεια του πεδίου είναι σε θέση να μεταδοθεί στα ηλεκτρόνια πάντοτε με κβαντικό τρόπο. Αντίστοιχα φαινόμενα συμβαίνουν και με τους πυρήνες των ατόμων. Κατά τον τρόπο αυτό η επιτέλεση των χημικών αντιδράσεων διευκολύνεται. Η μαθηματική περιγραφή των φαινομένων αυτών δεν είναι εύκολη εξ αιτίας του πολύ μεγάλου πλήθους των υπολογισμών που απαιτούνται, ωστόσο δεν είναι αδύνατη. Η κατάλληλη επιλογή των εντάσεων και των συχνοτήτων των προσπιπτόντων ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, θα μπορούσε να δημιουργήσει φαινόμενα συντονισμού μεταξύ των ασύζευκτων ηλεκτρονίων ή και των πυρήνων των ατόμων του χημικού συστήματος που χρησιμοποιείται ως στόχος. Μέσω των φαινομένων του συντονισμού θα μπορούσε να υπάρξει μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων κβαντισμένης ενέργειας στο εν λόγω μοριακό σύστημα και συνεπώς ενεργοποίηση του συστήματος ώστε να διεγερθεί η χημική του δραστηριότητα και η συνακόλουθη παραγωγή χημικών αντιδράσεων. Αν η μεταφορά της ενέργειας γινόταν

μέσω ενός πεδίου διαμορφωμένου σύμφωνα με ένα χαρακτηριστικό φάσμα του μοριακού συστήματος – στόχου, τότε εξ αιτίας αυτής της διαμόρφωσης θα υπήρχε μια στοχευμένη απορρόφηση ενέργειας από τα αντίστοιχα τμήματα του μορίου – στόχου και συνεπώς μια εκλεκτική μεταφορά ενέργειας σε εκείνα τα σημεία του μορίου που είναι υπεύθυνα για το εν λόγω φάσμα.

Συνεπώς η χρήση ηλεκτρομαγνητικών πεδίων διαμορφωμένων σύμφωνα με κάποιο από τα χαρακτηριστικά φάσματα μιας ουσίας (δακτυλικό αποτύπωμα), θα μπορούσε να μεταφέρει εκείνη την ορθά κβαντισμένη ενέργεια η οποία θα μπορούσε να απορροφηθεί απολύτως στοχευμένα από συγκεκριμένα τμήματα του μορίου, υποβοηθώντας την τάση τους να αντιδράσουν. Μια τέτοιου είδους μοριακή ενεργοποίηση θα ήταν απολύτως οικονομική, κβαντισμένη και συνεπώς στοχευμένη. Θα μπορούσε να προκαλέσει φαινόμενα μοριακής διέγερσης χωρίς να οδηγήσει σε υψηλή σκέδαση της μεταφερόμενης ενέργειας προς παραγωγή θερμότητας.

Είναι ευρέως γνωστή και αποδεκτή η αρχή του κλειδιού και της κλειδαριάς, που διέπει την σχέση ενός ενζύμου με το αντίστοιχο φυσιολογικό του υπόστρωμα. Η θεωρία των εξειδικευμένων υποδοχέων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την δημιουργία φαρμάκων υψηλής εκλεκτικότητας, τα οποία ως μόρια έχουν την ιδιότητα να καταλαμβάνουν τον υποδοχέα ενός βιομορίου (π.χ μιας ορμόνης) στην κυτταρική μεμβράνη ενός κυττάρου και με τον τρόπο αυτό να αποκλείουν την δράση του βιομορίου αυτού ή, στην αντίθετη περίπτωση να μιμούνται την δράση του αλλά με έναν συνεχή και συνεπώς πιο ισχυρό τρόπο.

Είναι λογικό να θεωρηθεί ότι η αλληλεπίδραση ενός βιομορίου με τον αντίστοιχο υποδοχέα του δεν είναι ολωσδιόλου μηχανικής υφής αλλά μάλλον ηλεκτρονικού χαρακτήρα, υπό την έννοια ότι είναι τα εξωτερικά μοριακά τροχιακά της εισερχόμενης ουσίας και του υποδοχέα που αλληλεπιδρούν προκειμένου να προκύψει η συγκεκριμένη βιολογική δράση. Συνεπώς η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία των οποίων η διαμόρφωση γίνεται στην βάση των φασμάτων διαφόρων βιομορίων θα μπορούσε να



δημιουργήσει ενεργοποιήσεις των μορίων που συνιστούν τους φυσιολογικούς εξειδικευμένους υποδοχείς τους.

Γ. Multi Channel Dynamic Exciter 100 v1:

Πρόκειται για μία διάταξη καταγραφής, αποθήκευσης και εκπομπής ηλεκτρομαγνητικών φασμάτων. Η διάταξη αποτελείται από τον καταγραφέα – ανιχνευτή ηλεκτρομαγνητικού συντονισμού, την γεννήτρια εκπομπής και έναν υπολογιστή στον οποίον, εκτός από τον έλεγχο της συσκευής, γίνεται και η αποθήκευση των συχνοτήτων.

Η συσκευή αποτελεί ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα γεννήτριας συχνοτήτων ημιτονικών σημάτων που λειτουργεί στην περιοχή από 0 έως 1 MHz και δίνει έξοδο σε 100 κανάλια. Τα κανάλια εξόδου είναι σε μορφή τεσσάρων καρτών με καλωδιωταινία 25 κλώνων το καθένα και μήκους ενός μέτρου. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις όμοιες διατάξεις συνδεδεμένες σειριακά, δηλαδή η μέγιστη ικανότητα εκπομπής ήταν 400 συχνότητες. Η ισχύς εξόδου ανά κανάλι είναι $8 \text{ mW} \pm 3 \text{ dB}$ και η εκπομπή μπορεί να είναι είτε συνεχής είτε παλμική. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η συνεχής λειτουργία εκπομπής.

Για την πιστοποίηση της ασφάλειας της συσκευής, προτού χρησιμοποιηθεί μετρήθηκαν οι μέγιστες εντάσεις εκπομπής του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου που αυτή παράγει από την Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας. Τα αποτελέσματα όχι μόνο βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων όπως αυτά καθορίζονται στην Κοινή Υπουργική Απόφαση των Υπουργών Ανάπτυξης, Περιβάλλοντος Χωροταξίας και Δημοσίων Έργων, Υγείας και Πρόνοιας και Μεταφορών και Επικοινωνιών (Φ.Ε.Κ., Αρ. 1105, Τεύχος Δεύτερο, 6 Σεπτεμβρίου 2000), αλλά είναι από 75 έως 78 φορές μικρότερα στην περίπτωση της έντασης ηλεκτρικού πεδίου και από 279 έως 1724 φορές μικρότερα στην περίπτωση της έντασης μαγνητικού πεδίου.

Η διάταξη σχεδιάστηκε και εξελίσσεται από τον κ. Χαβέλα και τους συνεργάτες του.



Δ. Κυτταρικές Σειρές HeLa και HeLa siRNA HSP-70:

1. HeLa:

Η HeLa είναι μία από τις πιο γνωστές και καλά χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην έρευνα. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας τα οποία απομονώθηκαν το 1951 από την καρκινοπαθή Henrietta Lacks, χωρίς η ίδια να το γνωρίζει.

Η κυτταρική σειρά HeLa χαρακτηρίζεται ως «αθάνατη» καθώς, δεδομένου ότι καλλιεργείται σε κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να διαιρείται επ' άπειρον. Διαθέτουν ενεργή τελομεράση η οποία δρα κατά την μίτωση και αποκαθιστά το μήκος των τελομερών, παρακάμπτοντας έτσι τον περιορισμό του Hayflick και εν τέλει εμποδίζοντας την γήρανση και τον θάνατο των κυττάρων.

Το γονιδίωμα των κυττάρων HeLa διαφέρει από αυτό των ανθρώπινων κυττάρων. Δημιουργήθηκε μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς από τον ανθρώπινο ιό των θηλωμάτων (HPV-18). Φέρει τέσσερα αντίγραφα του χρωμοσώματος 12 και από τρία αντίγραφα των χρωμοσωμάτων 6, 8 και 17. Στο μεγάλο χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται το γονιδίωμά τους έχει αποδειχθεί πολύ σταθερό.

Κατά τη διάρκεια ενός ήπιου θερμικού σοκ, τα κύτταρα HeLa μεταβάλλουν δραματικά την πρωτεϊνοσύνθεσή τους, όχι μόνο ποσοτικά αλλά και ως προς τα γονίδια που μεταγράφονται. Αρχικά επέρχεται μείωση του γενικού ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης κατά 20 έως 30%. Ακολούθως ε-

πάγονται τρεις κλάσεις πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η 27, η 70 και η 80. Ο ρυθμός σύνθεσης των πολυπεπτιδίων θερμικού σοκ μεγιστοποιείται 3 με 5 ώρες μετά την έναρξη του θερμικού σοκ. Για θερμικά σοκ μικρής διάρκειας όμως, τα κύτταρα HeLa επανέρχονται γρήγορα σε φυσιολογικούς ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης.

2. HeLa siRNA HSP-70:

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι δημιούργημα της επιστημονικής ομάδας του Καθηγητή Χαράλαμπου Αγγελίδη και προέρχεται από την κυτταρική σειρά HeLa. Στα κύτταρα αυτά το γονίδιο της πρωτεΐνης HSP-70 έχει σιγασθεί μέσω διαμόλυνσης με τεχνητό πλασμίδιο το οποίο φέρει μία περιοχή συμπληρωματική ως προς το mRNA της πρωτεΐνης. Το προϊόν αυτής της περιοχής καλείται μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (small interfering RNA, siRNA) και με τη μεταγραφή του ουσιαστικά προκύπτουν δίκλινα τμήματα του mRNA της HSP-70, εμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή του. Η επιτυχής σίγαση του γονιδίου έχει ελεγχθεί με πολλαπλά στυπώματα κατά Western. Τα κύτταρα αυτά, λόγω απουσίας της πρωτεΐνης HSP-70, αδυνατούν να επιβιώσουν κάτω από ήπια θερμικά ή οξειδωτικά στρες, αναπτύσσονται όμως κανονικά υπό φυσιολογικές συνθήκες.

V. Εισαγωγή – Σκοπός του Πειράματος

Σκοπός του πειράματος είναι να μελετηθεί αφενός η επίδραση της ασθενούς ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην έκφραση και δράση της πρωτεΐνης οξείας φάσης HSP-70 σε ανθρώπινα κύτταρα και αφετέρου να διερευνηθεί κατά πόσον είναι δυνατή η ενεργοποίηση αυτής της δράσης χρησιμοποιώντας συχνότητες μοριακού συντονισμού της πρωτεΐνης. Για τους σκοπούς του πειράματος επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η κυτταρική σειρά HeLa, μία καλά χαρακτηρισμένη κυτταρική σειρά που διαθέτει έναν προβλέψιμο και σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, χαρακτηριστικό που διευκολύνει τη μελέτη της απόκρισης των κυττάρων μετά από στρες. Επιπλέον, η υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με μελέτες απόκρισης των κυττάρων HeLa σε στρες είναι εκτενής.

Για το δεύτερο σκέλος του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα κύτταρα HeLa στα οποία το γονίδιο της HSP-70 έχει σιγασθεί χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένα siRNA. Η κυτταρική σειρά είναι μία προσφορά του καθηγητή Χαράλαμπου Αγγελίδη. Τα κύτταρα αυτά δεν παράγουν ανιχνεύσιμη ποσότητα πρωτεΐνης HSP-70 και αδυνατούν να επιβιώσουν κάτω από ήπια θερμικά στρες.

VI. Πειραματική Πορεία – Υλικά & Πρωτόκολλα

A. Πειραματικά Υλικά:

- Τρυβλία ιστοκαλλιέργειας 100 mm και πολυτρυβλία 24 θέσεων
- Θρεπτικά Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)
- Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS)
- Trypsin – EDTA
- Χρωστική Trypan Blue
- Χρωστική Giemsa
- Διάφορες ορολογικές πιπέτες (5, 10, 25 ml)
- Phosphate Buffered Saline
- Dimethyl Sulfoxide
- Φυγοκεντρικά σωληνάκια 15 ml
- Cryotubes
- Πιπέτες Gillson 2-20, 10-200, 100-1000 ml
- Πλάκες Neubauer

Τα κύτταρα HeLa καθώς και τα γενετικά τροποποιημένα HeLa siRNA HSP-70 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιώντας θρεπτικά μέσα DMEM εμπλουτισμένα με 10% FBS. Η συγκέντρωσή τους στα τρυβλία διατηρούνταν σε χαμηλά επίπεδα, $0,5 - 1 \times 10^6$ κύτταρα, με ανακαλλιέργειες σε τακτά χρονικά διαστήματα για την αποφυγή πρόκλησης στρες λόγω υπερπληθυσμού.

B. Πρωτόκολλα:

Ανακαλλιέργεια:

1. Αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού
2. Πλύση του τρυβλίου με 10 ml PBS
3. Κατεργασία των κυττάρων με 1 ml Trypsin – EDTA για να αποκολληθούν από το τρυβλίο
4. Προσθήκη 10 ml νέου θρεπτικού
5. Ανάδευση με χρήση αντλίας για ομογενοποίηση του κυτταρικού αιωρήματος
6. Απομάκρυνση της ανεπιθύμητης ποσότητας κυττάρων (συνήθως 90%)
7. Προσθήκη της ανάλογης ποσότητας νέου θρεπτικού.

Κρυοσυντήρηση:

1. Αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού
 2. Πλύση του τρυβλίου με 10 ml PBS
 3. Κατεργασία των κυττάρων με 1 ml Trypsin – EDTA για να αποκολληθούν από το τρυβλίο
 4. Προσθήκη 10 ml PBS
 5. Ανάδευση με χρήση αντλίας για ομογενοποίηση του κυτταρικού αιωρήματος
 6. Μεταφορά του αιωρήματος σε φυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκέντρηση για 5 min στις 3000 στροφές
 7. Αναρρόφηση του υπερκειμένου
 8. Ομογενοποίηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml FBS εμπλουτισμένο με 10% DMSO
 9. Μεταφορά του αιωρήματος σε cryotubes
 10. Μεταφορά των κυττάρων στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες
- ** . Για κρυοσυντήρηση πέραν των 3 μηνών μεταφορά στους -270°C

Σπορά σε πολυτροβλία:

1. Αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού.
2. Πλύση του τριβλίου με 10 ml PBS.
3. Κατεργασία των κυττάρων με 1 ml Trypsin – EDTA για να αποκολληθούν από το τριβλίο.
4. Προσθήκη 10 ml νέου θρεπτικού.
5. Ανάδευση με χρήση αντλίας για ομογενοποίηση του κυτταρικού αιωρήματος.
6. Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων στο αιώρημα με χρήση πλάκας Neubauer.
7. Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αιωρήματος σε κάθε θέση του πολυτροβλίου ούτως ώστε ο αριθμός των κυττάρων να ανέρχεται σε 20.000.
8. Συμπλήρωση με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού ούτως ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε θέση να ανέρχεται σε 1 ml.

Μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης από πολυτροβλίο.

1. Αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού από τις επιθυμητές θέσεις.
2. Πλύση των θέσεων με 1 ml PBS.
3. Κατεργασία των κυττάρων με 250 μl Trypsin – EDTA για να αποκολληθούν από το τριβλίο.
4. Προσθήκη 250 μl PBS και ανάδευση για ομογενοποίηση του κυτταρικού αιωρήματος.
5. Προσθήκη 500 μl Trypan blue (τελικός όγκος σε κάθε θέση 1 ml) και αναμονή 5 λεπτών.
6. Υπολογισμός του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε κάθε θέση με χρήση πλάκας Neubauer. Τα κύτταρα που έχουν βαφτεί από τη χρωστική είναι νεκρά ή αποπτωτικά και δεν προσμετρώνται.

Colony Forming Capacity:

1. Σπορά μικρής ποσότητας των επιθυμητών κυττάρων σε τριβλίο και διατήρηση στην καλλιέργεια μέχρι να σχηματισθούν αποικίες (συνήθως 10 μέρες).
2. Αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού.
3. Πλύση του τριβλίου με 10 ml PBS.
4. Προσθήκη 10 ml μίγματος Μεθανόλης – Οξικού οξέος 3:1.
5. Τοποθέτηση του τριβλίου στους -18°C για 10 min.
6. Αναρρόφηση του μίγματος και τοποθέτηση του τριβλίου σε θερμοκρασία δωματίου ανοιχτό μέχρι να στεγνώσει τελείως.
7. Προσθήκη 10 ml χρωστικής Giemsa αραιωμένη με θερμό νερό βρύσης σε αναλογία 1:10.
8. Μετά από 30 min αναρρόφηση της χρωστικής και πλύσιμο του τριβλίου με νερό.

Non-Lethal Heat Shock:

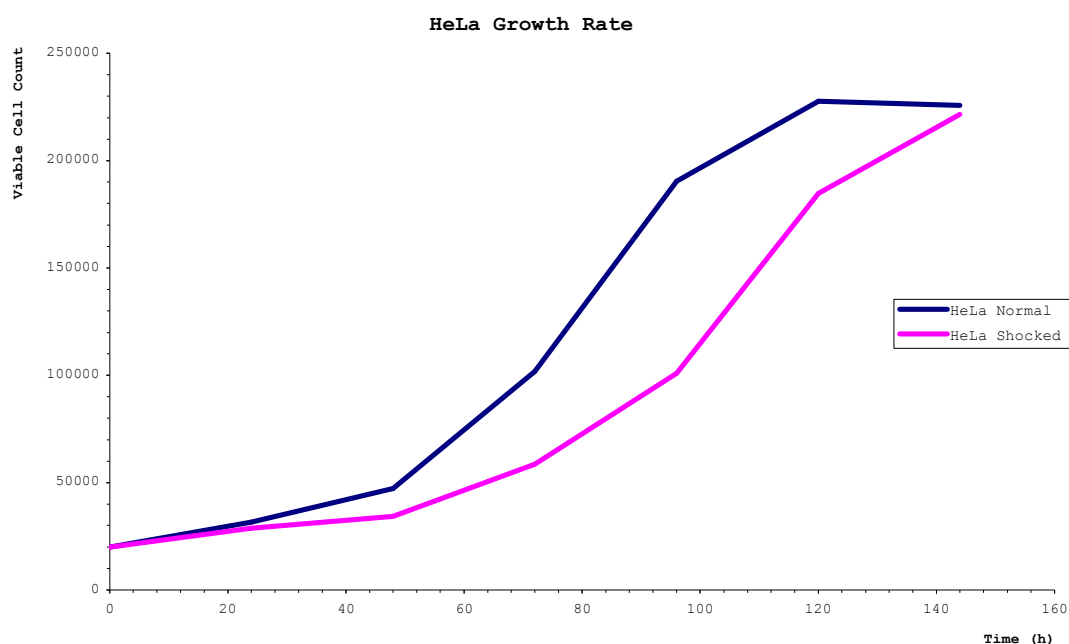
1. Σφράγισμα των τριβλίων με Parafilm.
2. Εμβάπτισμα σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο και επιβεβαιωμένο στους $43^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 60 min.
3. Αφαίρεση του Parafilm και επιστροφή στην επώαση για 24 h.

VII. Πειραματική Πορεία – Α' Σκέλος

A. Εκτέλεση:

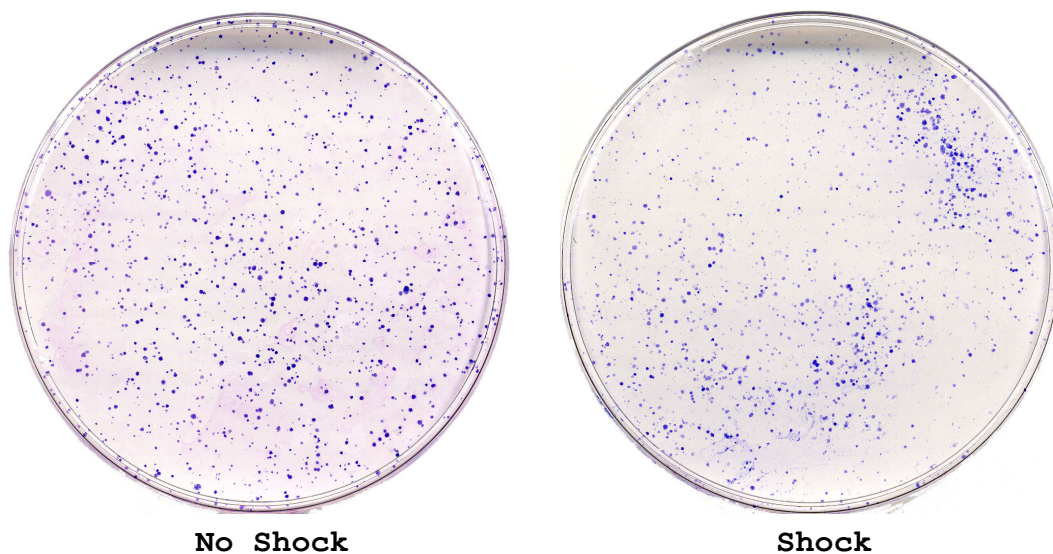
Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, σε αυτό το σκέλος του πειράματος μελετήθηκε η επίδραση ενός ασθενούς ηλεκτρομαγνητικού πεδίου στην έκφραση και λειτουργία των πρωτεϊνών οξείας φάσης των κυττάρων κάτω από ήπια θερμικά στρες. Η μελέτη γίνεται συγκρίνοντας αφενός τις καμπύλες ανάπτυξης των καλλιέργειών σε σχέση με τις καλλιέργειες ελέγχου και αφετέρου συγκρίνοντας τα ποσοστά σχηματισμού αποικιών των προαναφερθέντων καλλιέργειών.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του ήπιου θερμικού σοκ χωρίς να έχει προηγηθεί οποιαδήποτε έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, με σκοπό να αναδειχθεί η φυσική προσαρμογή των κυττάρων στο στρες. Στο ακόλουθο γράφημα παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων πριν και μετά από θερμικό στρες.



Στο γράφημα φαίνεται καθαρά η καθυστέρηση στην ανάπτυξη των στρεσαρισμένων κυττάρων, τα οποία εισέρχονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης (log phase) περίπου 24 ώρες αργότερα από τα μη στρεσαρισμένα. Στα κύτταρα αυτά η παραγωγή της HSP-70 είναι αυξημένη. Οι ανωτέρω μετρήσεις επιβεβαιώνονται από τη συγκριτική μέτρηση της ικανότητας

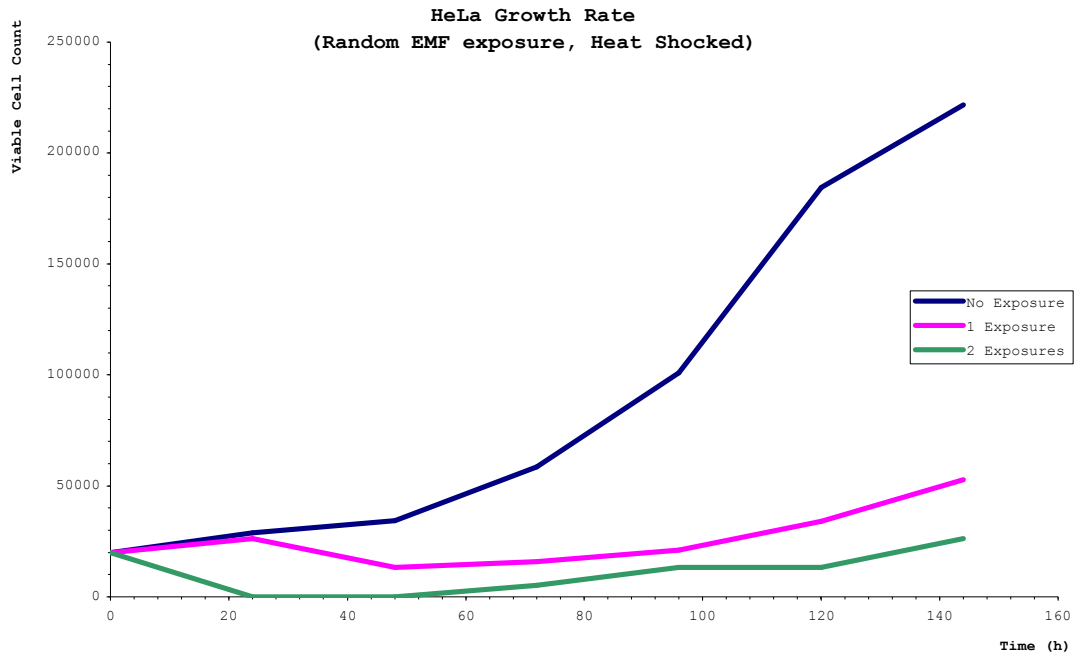
σχηματισμού αποικίας. Η εικόνα των αποικιών μετά από χρώση είναι η ακόλουθη:



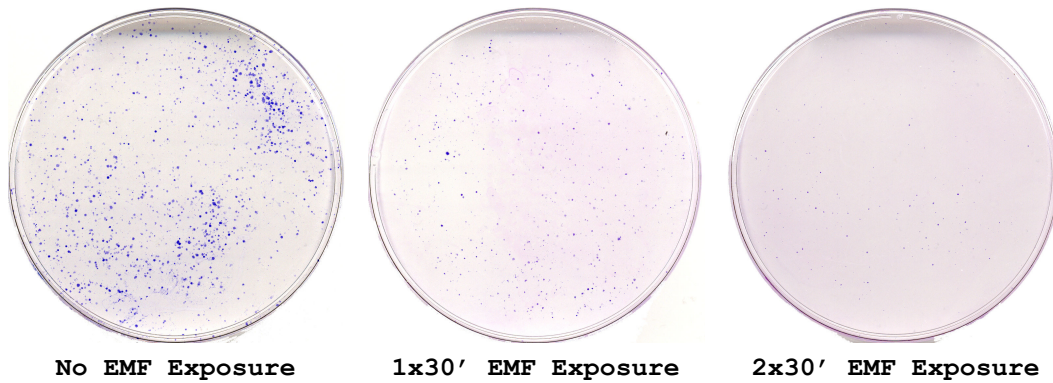
Στη συνέχεια, υγιείς καλλιέργειες εκτέθηκαν σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο χαμηλής έντασης χρησιμοποιώντας τυχαία φάσματα. Για την διασφάλιση της τυχειότητας η επιλογή των συχνοτήτων έγινε χρησιμοποιώντας γεννήτρια τυχαίων αριθμών. Το φάσμα αποτελείται από 200 συχνότητες και όλες βρίσκονται στο εύρος των Χαμηλών Συχνοτήτων (Low Frequency). Ο χρόνος έκθεσης είναι 30 λεπτά. Οι καλλιέργειες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, η πρώτη εκτέθηκε μία φορά και η δεύτερη δύο φορές. Μετά από κάθε έκθεση οι καλλιέργειες επωάζονταν για 24 ώρες προτού υποβληθούν σε θερμικό σοκ.

B. Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ανάπτυξης και ικανότητας σχηματισμού αποικιών, σε σύγκριση με αυτά των καλλιεργειών που δεν εκτέθηκαν στο πεδίο, είναι τα ακόλουθα:



HeLa Colony Forming Capacity Assay



Τόσο στις μετρήσεις ανάπτυξης όσο και στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται καθαρά η αρνητική επιρροή της έκθεσης σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία, παρόλη την ιδιαίτερα χαμηλή έντασή τους. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά.

VIII. Πειραματική Πορεία – Β' Σκέλος

Σκοπός αυτού του σκέλους είναι να διερευνηθεί το κατά πόσον η έκθεση των καλλιέργειών σε ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συχνοτήτων συντονισμού της HSP-70 μπορεί να διεγείρει και να ενισχύσει τη δράση της πρωτεΐνης. Για τους σκοπούς του πειράματος αρχικά ελήφθησαν συχνότητες συντονισμού της HSP-70 από δείγμα καθαρής πρωτεΐνης με χρήση της συσκευής Multi Channel Dynamic Exciter 100, όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή. Χρησιμοποιήθηκαν 334 συχνότητες στο εύρος των χαμηλών συχνοτήτων.

A) Εκτέλεση:

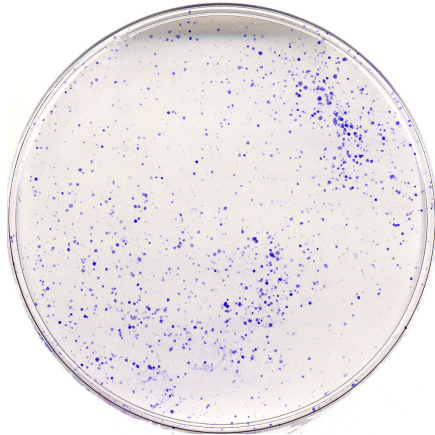
Καλλιέργειες κυττάρων HeLa εκτέθηκαν στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο συντονισμού της HSP-70 για 30 λεπτά και στη συνέχεια επεστράφησαν στην επώαση για 24 ώρες. Ακολούθησε ήπιο θερμικό σοκ όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις ($43 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 60 λεπτά). Μετά από 24 ώρες επώασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν, μετρήθηκαν και πραγματοποιήθηκαν σπορές για τον υπολογισμό της ικανότητας σχηματισμού αποικιών.

Η πειραματική διαδικασία είναι όμοια με τη μελέτη της δράσης του τυχαίου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, με τη διαφορά ότι σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται συχνότητες συντονισμού της πρωτεΐνης HSP-70. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν για 30 λεπτά στο πεδίο και μετά από 24ωρη επώαση, πραγματοποιήθηκε ήπιο θερμικό σοκ. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υπολογίστηκε η ικανότητα σχηματισμού αποικιών.

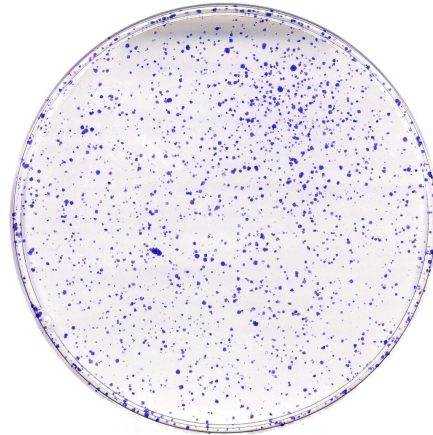
B) Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα, σε σύγκριση με αυτά των μη εκτεθειμένων καλλιιεργειών, είναι τα ακόλουθα:

HeLa Colony Forming Capacity Assay



HeLa Cells, Heat Shocked



**HeLa Cells, Exposed,
Heat Shocked**

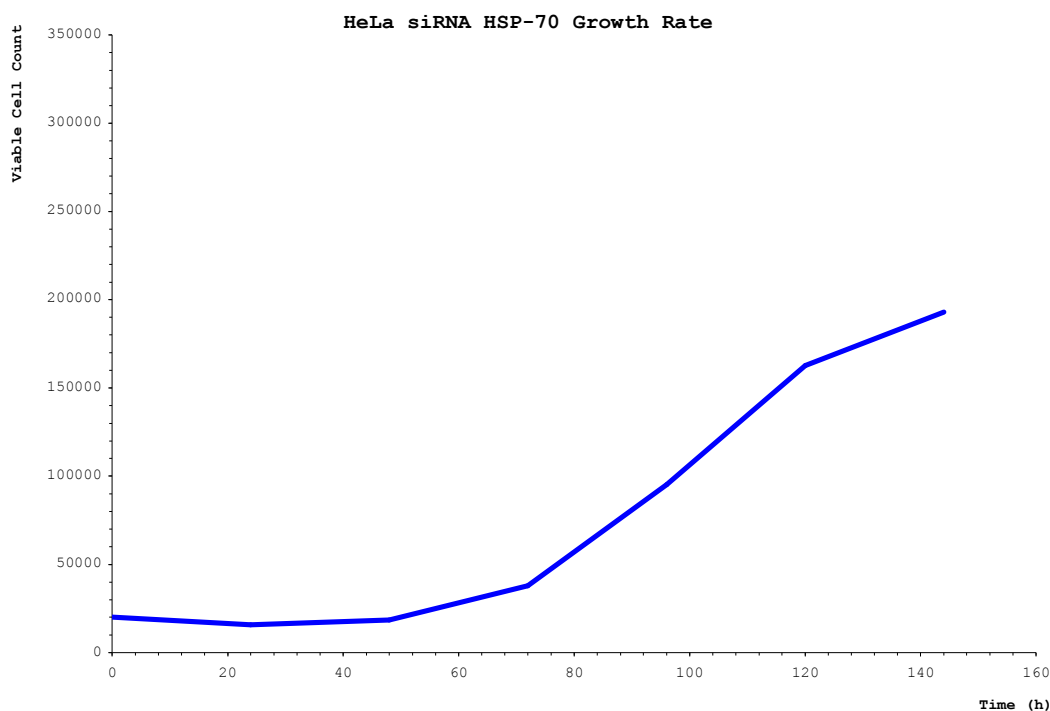
Είναι προφανές ότι η έκθεση σε συχνότητες συντονισμού της πρωτεΐνης ενισχύει την προστατευτική της δράση, καθώς το ποσοστό σχηματισμού αποικιών όχι μόνο είναι υψηλότερο από τα μη εκτεθειμένα κύτταρα αλλά είναι και συγκρίσιμο με αυτό των καλλιιεργειών που δεν έχουν υποστεί θερμικό σοκ.

ΙΧ. Πειραματική Πορεία – Γ' Σκέλος

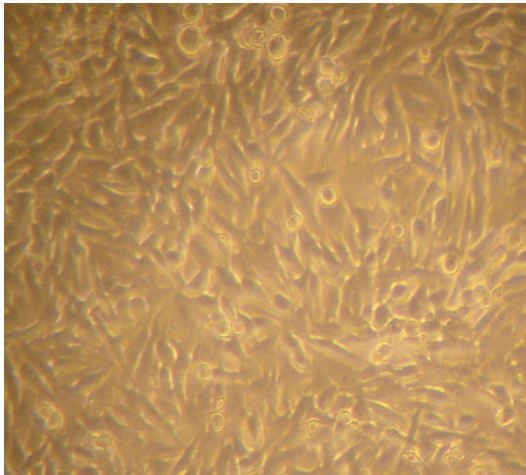
Σκοπός αυτού του σκέλους είναι να διερευνηθεί η δυνατότητα μίμησης της δράσης της πρωτεΐνης HSP-70 με χρήση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος συντονισμού της όταν αυτή απουσιάζει εντελώς από το κύτταρο.

A) Εκτέλεση:

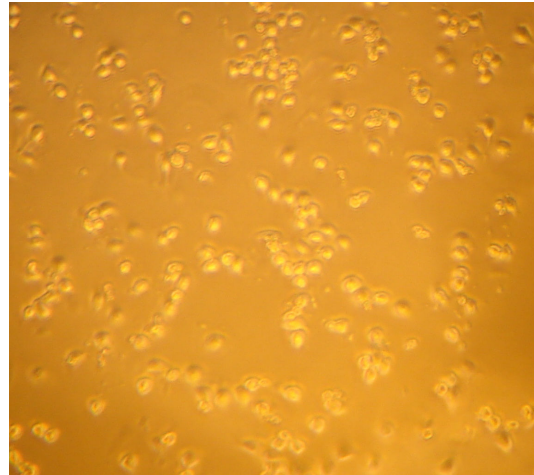
Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa siRNA HSP-70. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανάπτυξης και ικανότητας σχηματισμού αποικιών και παράλληλα ελέγχθηκε η ικανότητα επιβίωσης ενός ήπιου θερμικού σοκ ακολουθώντας το προαναφερθέν πρωτόκολλο. Τα αποτελέσματα είναι τα ακόλουθα:



Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αναμενόμενα εμφανίζει χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, παραμένοντας στη lag phase για 72 ώρες, καθώς η έλλειψη της HSP-70 δυσχεραίνει την προσαρμογή τους μετά από σοκά. Επιπλέον διαπιστώθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι τα κύτταρα αυτά αδυνατούν να επιβιώσουν μετά από ήπιο θερμικό σοκ. Η εικόνα στο μικροσκόπιο πριν και μετά από το σοκ ήταν η ακόλουθη:



HeLa siRNA HSP-70 before thermal shock.
(20x Magnification)



HeLa siRNA HSP-70 after thermal shock.
(20x Magnification)

Διακρίνεται χαρακτηριστικά η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τριβλίου. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 100%.

Αφού διαπιστώθηκε ότι πράγματι από την κυτταρική σειρά απουσιάζει η πρωτεΐνη HSP-70 και ότι αδυνατούν να επιβιώσουν ένα ήπιο θερμικό σοκ, οι καλλιέργειες χωρίστηκαν σε ομάδες και εκτέθηκαν στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

	30' x 1	30' x 2	30' x 3
Control Group 1	✘	✘	✘
Control Group 2	✓	✓	✘
HSP-70 Exposed Group	✓	✓	✓

Η πρώτη ομάδα ελέγχου δεν εκτέθηκε σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, απλώς τοποθετούνταν εντός του κλωβού Faraday με την γεννήτρια σβηστή για τα ανάλογα χρονικά διαστήματα. Για να αποδεικνύεται όμως ότι το πιθανώς θετικό αποτέλεσμα οφείλεται μόνο στις συγκεκριμένες συχνότητες συντονισμού της HSP-70 και όχι σε άλλους παράγοντες που αφορούν τη συσκευή εκπομπής, δημιουργήθηκε η δεύτερη ομάδα ελέγχου η οποία εκτέθηκε για τα ίδια χρονικά διαστήματα σε τυχαία επιλεγμένες συχνότητες, ιδίου φάσματος με τις συχνότητες συντονισμού.

Όπως και προηγουμένως, μετά από κάθε έκθεση ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες.

B) Αποτελέσματα:

α) 1^η Ομάδα Ελέγχου:

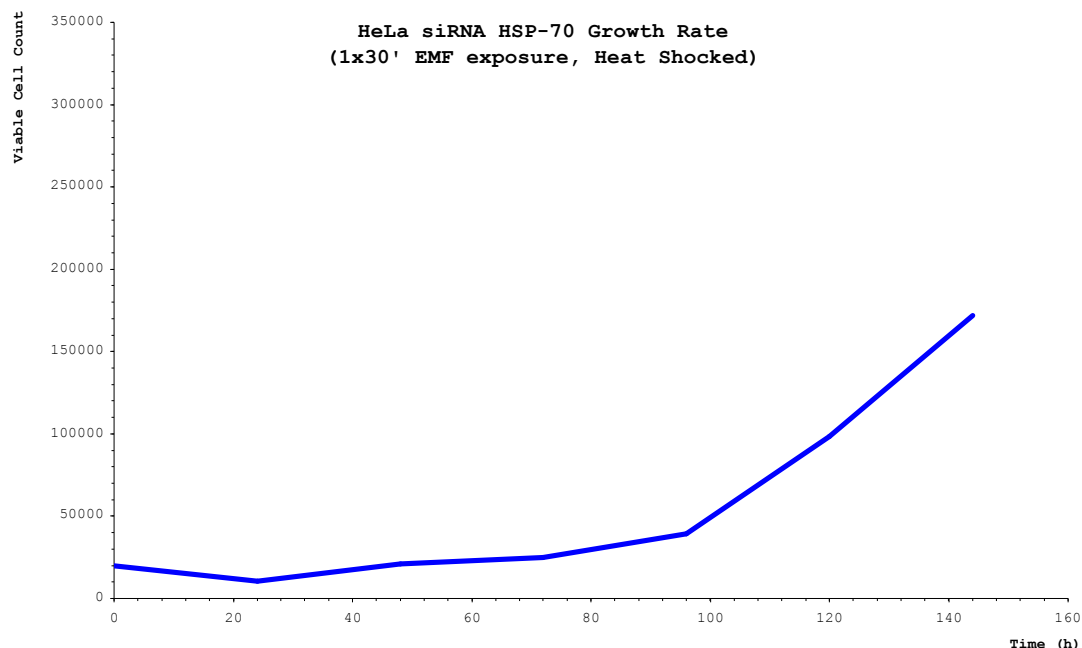
Όπως αναμενόταν, τα κύτταρα αδυνατούσαν να επιβιώσουν μετά από ήπιο θερμικό σοκ. Η απλή τοποθέτηση των καλλιιεργειών εντός του κλωβού δεν επέφερε καμία αλλαγή στις ιδιότητές τους. Ποσοστό θνησιμότητας 100%.

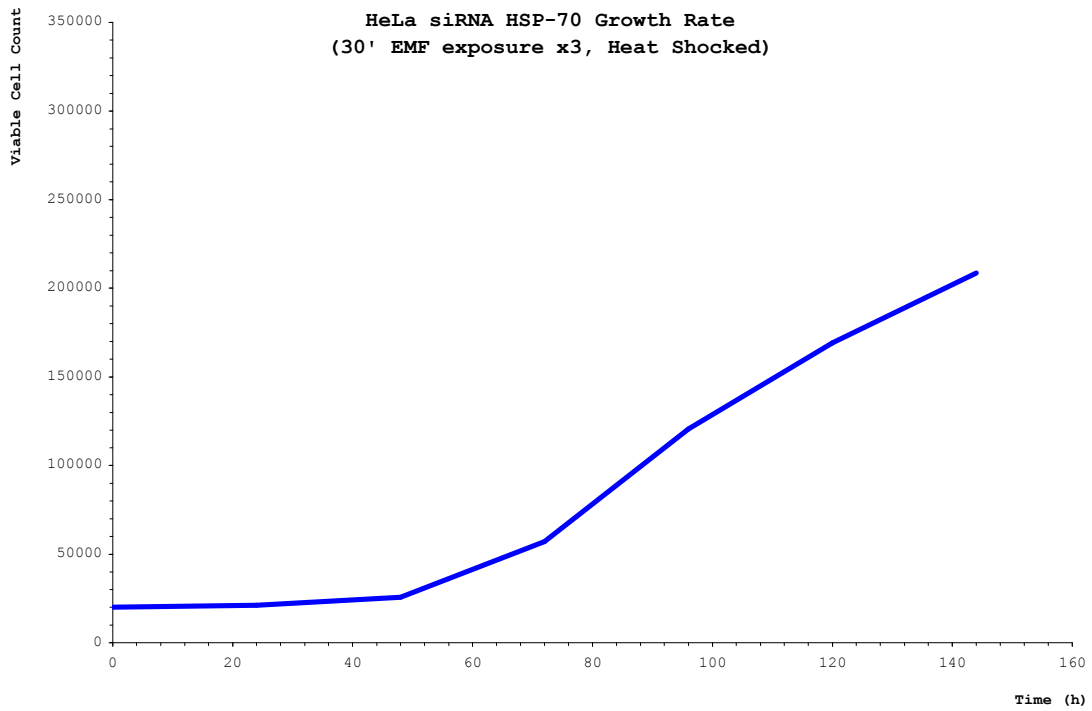
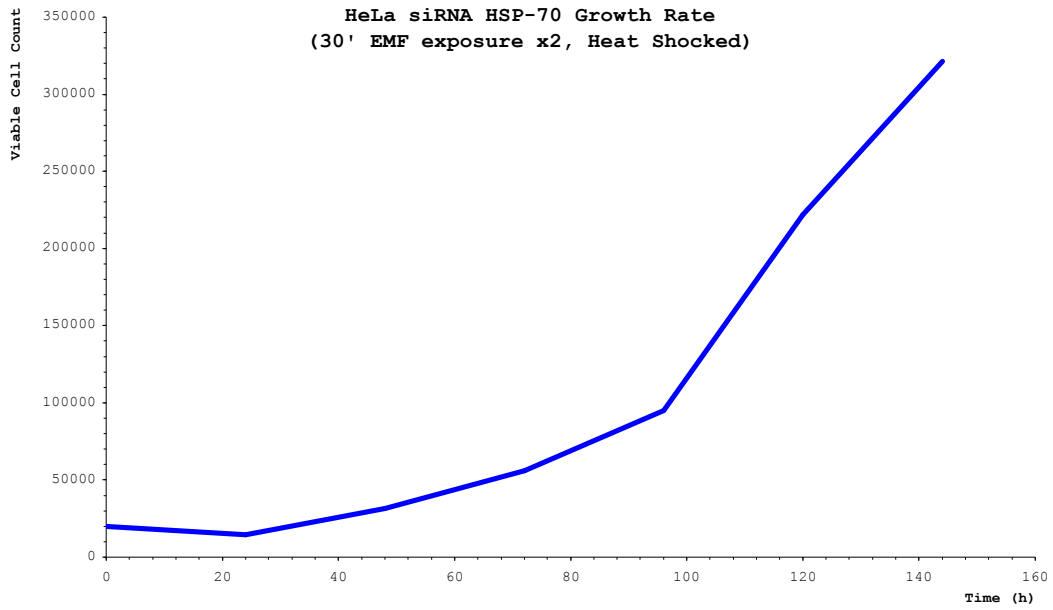
β) 2^η Ομάδα Ελέγχου:

Τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα με αυτά της πρώτης ομάδας ελέγχου. Η έκθεση σε τυχαία επιλεγμένες συχνότητες δεν επέφερε καμία αλλαγή στις υπό μελέτη ιδιότητες των κυττάρων. Ποσοστό θνησιμότητας 100%.

γ) Ομάδα εκτεθειμένη σε συχνότητες συντονισμού της HSP-70:

Υψηλά ποσοστά επιβίωσης, στατιστικώς σημαντικά και συγκρίσιμα με αυτά της κανονικής κυτταρικής σειράς HeLa. Αναλυτικότερα:



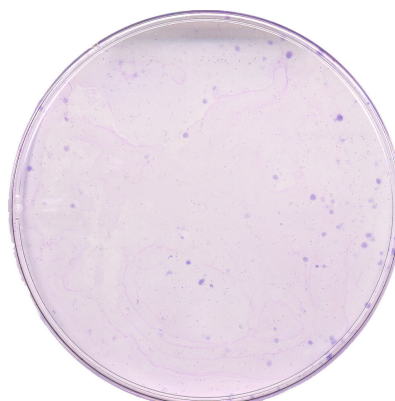


Οι ανωτέρω μετρήσεις κυτταρικής ανάπτυξης επιβεβαιώνονται από τις μετρήσεις της ικανότητας σχηματισμού αποικιών:

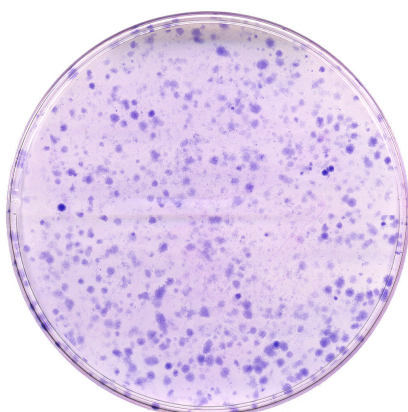
HeLa siRNA HSP-70 Colony Forming Capacity Assay



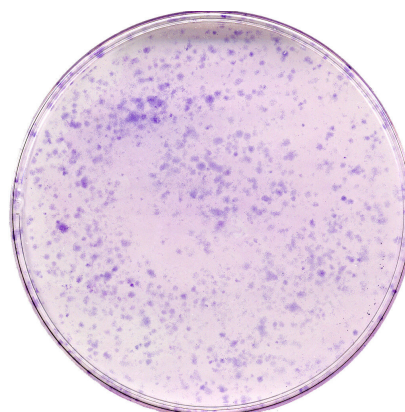
No EMF exposure



30' EMF x1 exposure

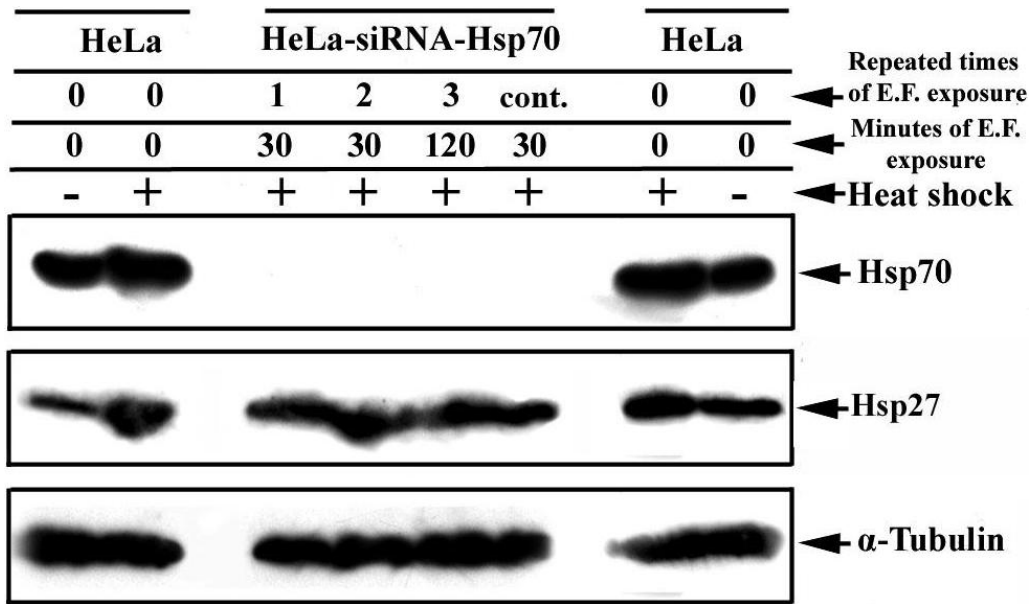


30' EMF x2 exposure



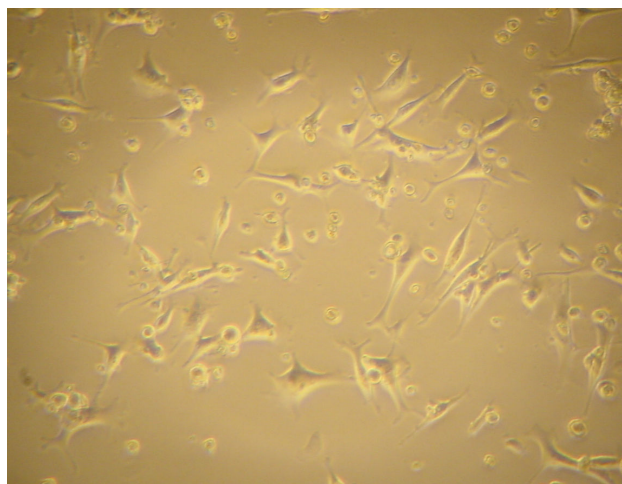
30' EMF x3 exposure

Παράλληλα με τις μετρήσεις ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε και στύπωμα κατά Western. Όπως φαίνεται και στο αποτέλεσμα, από τα κύτταρα συνεχίζει να απουσιάζει η πρωτεΐνη HSP-70.



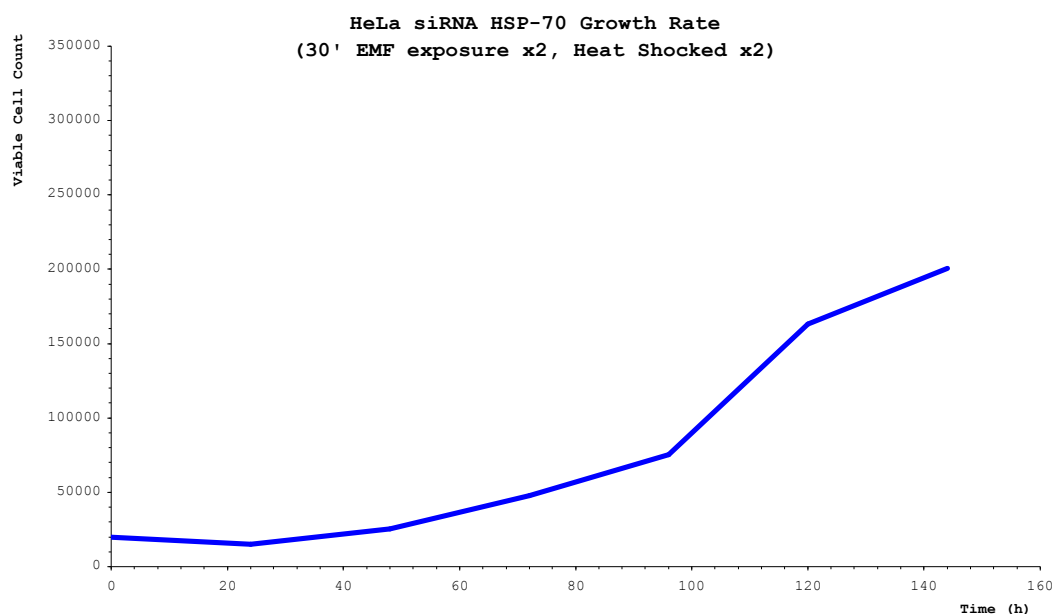
Οι σειρές 1 και 2 είναι οι καλλιέργειες που εκτέθηκαν για ένα και δύο 30λεπτα αντίστοιχα. Η σειρά 3 είναι μία καλλιέργεια που εκτέθηκε δοκιμαστικά τρεις φορές για δύο ώρες κάθε φορά και η τέταρτη σειρά μία καλλιέργεια που αναπτύχθηκε δοκιμαστικά κάτω από συνεχείς εκθέσεις, σε μία προσπάθεια να ποσοτικοποιηθεί το φαινόμενο, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Όλες οι σειρές έχουν επιβιώσει μετά από ήπιο θερμικό σοκ.

Στην ακόλουθη εικόνα απεικονίζονται εκτεθειμένα κύτταρα HeLa siRNA HSP-70 μετά από θερμικό σοκ. Είναι εμφανής η επιβίωση:

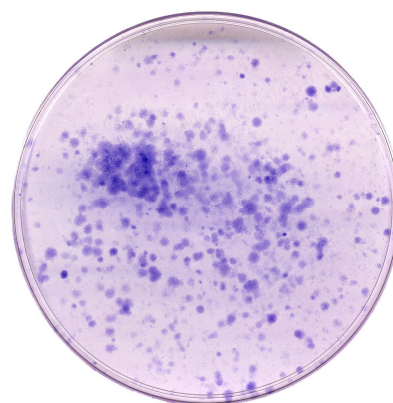


Συμπληρωματικά Πειράματα:

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, η κυτταρική σειρά που εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης είναι αυτή που εκτέθηκε στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο δύο φορές. Αυτή επιλέχθηκε για να μελετηθεί το κατά πόσον η επίκτητη ικανότητα επιβίωσης συνεχίζει να υφίσταται και σε επόμενες κυτταρικές γενεές. Τα κύτταρα, μετά το πρώτο ήπιο θερμικό σοκ καλλιιεργήθηκαν για 48 ώρες (2 γενεές) και ακολούθησε δεύτερο θερμικό σοκ και συλλογή των κυττάρων για μετρήσεις, όπως και προηγουμένως. Τα αποτελέσματα είναι τα ακόλουθα:



Τα κύτταρα διατηρούν την επίκτητη ιδιότητα, η οποία όμως αρχίζει να εξασθενεί. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς σε ανάλογο πείραμα, με την ίδια συσκευή εκπομπής, η επίκτητη ιδιότητα είχε διατηρηθεί έως και επτά γενεές με φθίνουσα όμως πορεία.



30' EMF exposure x2
Heat Shocked x2

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας, η πλήρης έκφραση των επίκτητων ιδιοτήτων στις κυτταροκαλλιέργειες επέρχεται 48 ώρες μετά την έκθεση στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση στην περίπτωση των κυττάρων HeLa siRNA HSP-70 σχεδιάστηκε το ακόλουθο πείραμα: Καλλιέργειες εκτέθηκαν στο φάσμα συντονισμού της HSP-70 για χρονικό διάστημα 30 λεπτών, όπως και προηγουμένως, αλλά χωρίστηκαν σε ομάδες βάσει του χρόνου επώασης προτού υποβληθούν σε θερμικό σοκ. Ελέγχθηκαν οι χρόνοι επώασης 2, 24 και 48 ωρών.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ικανότητας σχηματισμού αποικιών είναι τα εξής:

HeLa siRNA HSP-70 Colony Forming Capacity Assay



Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία του εργαστηρίου. Και στις τρεις περιπτώσεις ο χρόνος έκθεσης στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο είναι ο ίδιος. Παρόλα αυτά τα ποσοστά επιβίωσης αυξάνονται εκθετικά όσο μεγαλώνει ο χρόνος επώασης των καλλιιεργειών μετά την έκθεση. Το ποσοστό επιβίωσης στην περίπτωση της επώασης για χρονικό διάστημα 48 ωρών προσεγγίζει αυτό των μη στρεσαρισμένων κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι αυτός είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη έκφραση των επίκτητων ιδιοτήτων που προσδίδει το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο.

Χ. Πειραματική Πορεία – Δ' Σκέλος

Σκοπός του τρίτου πειραματικού σκέλους είναι η μελέτη της δυνατότητας ανίχνευσης μίας πρωτεΐνης σε μία καλλιέργεια χρησιμοποιώντας το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα συντονισμού αυτής και τη διάταξη Multi Channel Dynamic Exciter. Στην προκειμένη περίπτωση μελετάται η δυνατότητα ανίχνευσης της πρωτεΐνης HSP-70.

A. Εκτέλεση:

Για τις ανάγκες του πειράματος σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε ένα διπλό τυφλό τεστ. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων HeLa καθώς και κυττάρων HeLa siRNA HSP-70. Για τον έλεγχο της καθαρότητας των καλλιεργειών, εκτός από οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο, πραγματοποιήθηκαν και ήπια θερμοικά σοκ. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες αριθμήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν. Στα φυγοκεντρικά σωληνάκια αναγράφονταν μόνο ένας αύξων αριθμός. Η αντιστοίχιση των αριθμών με τον κυτταρικό τύπο καταγράφηκε, τοποθετήθηκε σε σφραγισμένο φάκελο και παραδόθηκε σε τρίτο ερευνητή ο οποίος ανέλαβε τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ανίχνευσης που του παρέδωσε ο χειριστής του μηχανήματος. Δηλαδή δεν εμπλεκόταν ποτέ ίδιο πρόσωπο σε διαφορετικά πειραματικά στάδια ώστε να μην τίθεται ζήτημα μεροληψίας.

B. Αποτελέσματα:

Το ποσοστό επιτυχούς ανίχνευσης ήταν 100%. Η συσκευή κατέγραφε συντονισμό στις συχνότητες αναφοράς της HSP-70 μόνο στα σωληνάκια που περιείχαν καλλιέργειες κυττάρων HeLa.

XI. Συζήτηση επί των Αποτελεσμάτων

Α' Σκέλος:

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι ακόμα και πολύ χαμηλής έντασης ηλεκτρομαγνητικά πεδία μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Η αρνητική αυτή επίδραση φαίνεται να είναι συσσωρευτική, καθώς η επανάληψη της έκθεσης, μετά από 24 ώρες, οδήγησε σε περαιτέρω μείωση της κυτταρικής προστασίας.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από παρόμοιου σχεδιασμού πείραμα το οποίο πραγματοποιήθηκε επάνω σε έμβρυα πουλερικών:

TABLE I. Continuous or Repeated Exposures to ELF-EMFs Decrease Protection Against Hypoxia/Re-Oxygenation Stress

ELF exposure timing (60 Hz, 8 μ T)	Control % survival \pm SEM (# embryos)	ELF-EM % survival \pm SEM (# embryos)	N (reps)	P value*
30 min (one time only, Day 4) [†]	24.1 \pm 4.1 (87)	44.9 \pm 6.0 (78)	9	< 0.01
Continuous (4 days)	66.2 \pm 6.3 (65)	40.6 \pm 3.4 (64)	8	< 0.01
Continuous + 8 μ T ELF noise	66.2 \pm 6.3 (65)	72.0 \pm 6.4 (50)	8	0.548
60 min twice daily (4 days total)	53.0 \pm 5.2 (168)	38.1 \pm 3.0 (160)	16	< 0.01
30 min twice daily (4 days total)	50.9 \pm 6.7 (57)	26.5 \pm 6.7 (49)	7	< 0.05
20 min twice daily (4 days total)	34.8 \pm 7.0 (69)	35.2 \pm 5.6 (71)	8	1.0
30 min once daily (4 days total)	47.5 \pm 6.7 (122)	35.0 \pm 2.8 (117)	13	0.068

*P values calculated by Fisher's exact test.

[†]Upregulation positive control.

Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι ο συνεχής «βομβαρδισμός» του ανθρώπινου οργανισμού από πολλαπλά ηλεκτρομαγνητικά πεδία (πυλώνες υψηλής τάσης, ασύρματες τηλεπικοινωνίες κλπ.) αποδεικνύεται ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την υγεία.

Β' Σκέλος:

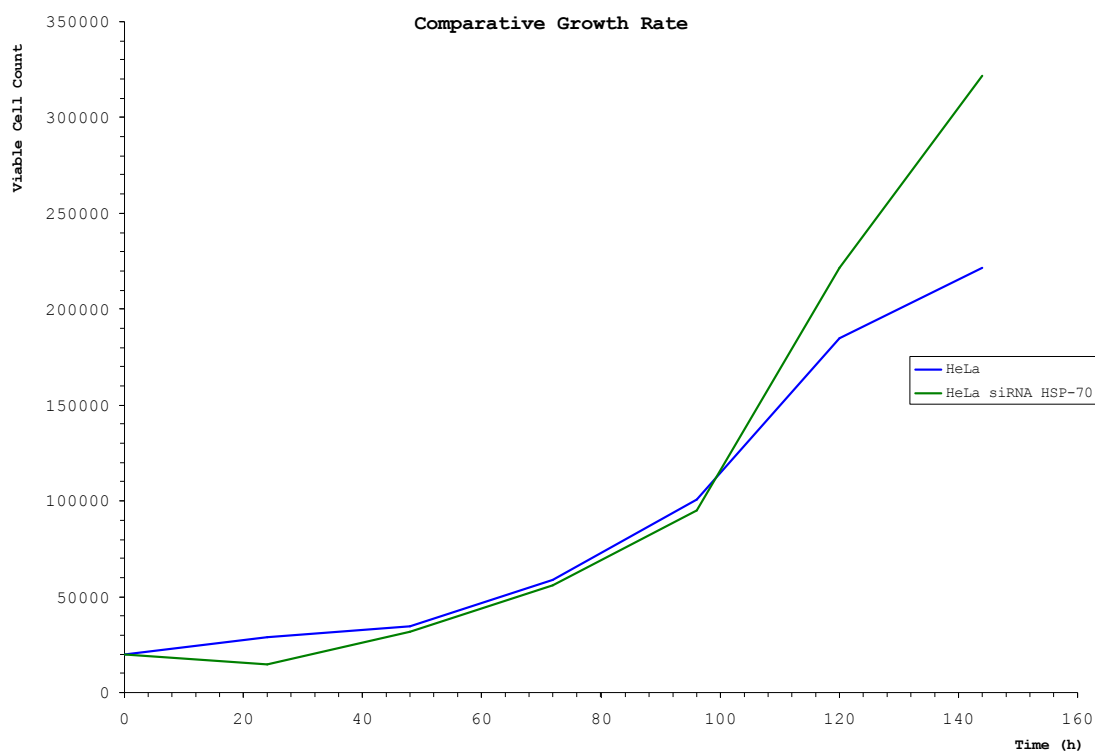
Το πεδίο στο οποίο εκτέθηκαν οι καλλιέργειες έχει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά, όσον αφορά την ένταση και το εύρος των συχνοτήτων, με το πεδίο του Α' Σκέλους. Η μοναδική διαφορά εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι συχνότητες που αποτελούν το φάσμα σε αυτήν την περίπτωση είναι καταγεγραμμένες συχνότητες συντονισμού του βιομορίου της HSP-70.

Σε αυτήν την περίπτωση όχι απλώς δεν αναστέλλεται η προστατευτική λειτουργία της πρωτεΐνης, αλλά ενισχύεται σημαντικά. Τα ποσοστά επιβίωσης των εκτεθειμένων κυττάρων μετά από θερμικό στρες ξεπερνούν κατά πολύ αυτά των μη εκτεθειμένων και προσεγγίζουν αυτά

των μη στρεσαρισμένων καλλιιεργειών. Δεδομένου ότι η προστατευτική δράση της HSP-70 έχει μεγάλη σημασία ειδικά σε καταστάσεις ασθένειας (βλέπε πίνακα στην εισαγωγή), αυτή η ήπια μη επεμβατική μέθοδος μπορεί ενδεχομένως να έχει και κλινική εφαρμογή.

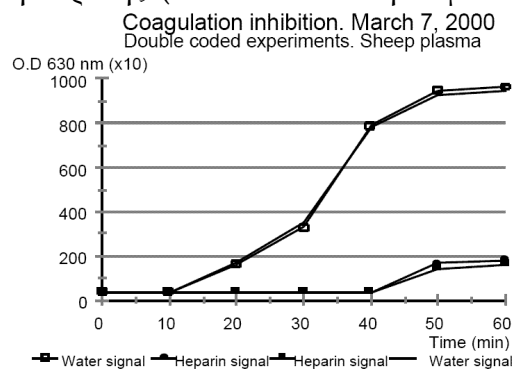
Γ' Σκέλος

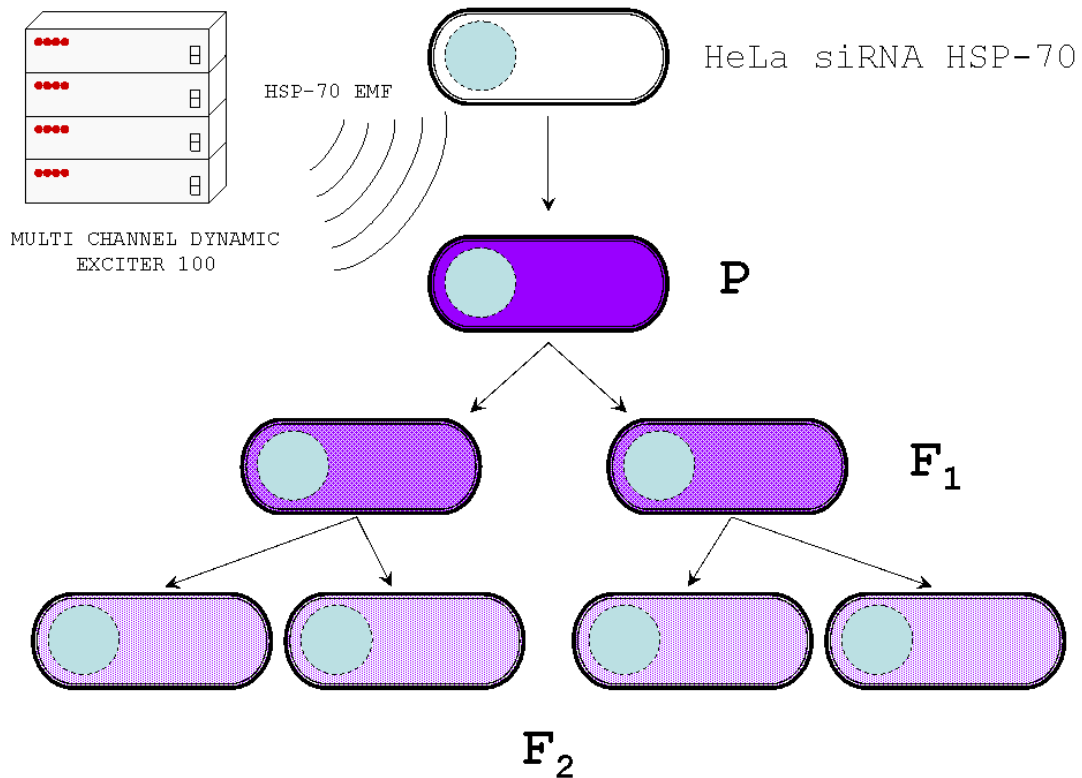
Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτού του σκέλους είναι δύσκολη. Επαναλαμβανόμενα στυπώματα κατά Western πριν και κατά τη διάρκεια των πειραμάτων επιβεβαίωσαν το αναμενόμενο, ότι δηλαδή τα κύτταρα συνεχίζουν να μην εκφράζουν την πρωτεΐνη HSP-70, σε ανιχνεύσιμο τουλάχιστον βαθμό, καθώς συνεχίζουν να φέρουν το πλασμίδιο με το siRNA. Είναι εκπληκτικό το γεγονός ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ρυθμός ανάπτυξης των εκτεθειμένων HeLa siRNA HSP-70 μετά από θερμικό σοκ ξεπερνά αυτόν των φυσιολογικών HeLa, όπως φαίνεται στο ακόλουθο συγκριτικό γράφημα:



Είναι επίσης αδιαμφισβήτητο ότι η επίκτητη ικανότητα επιβίωσης ενός ήπιου θερμικού στρες οφείλεται αποκλειστικά στις συχνότητες συντονισμού της HSP-70. Οποιαδήποτε άλλη επιρροή έχει αποκλειστεί από τη χρήση δύο ομάδων ελέγχου. Η πλήρης έκφραση των επίκτητων ιδιοτήτων που μεταδίδονται από το πεδίο απαιτεί 48 ώρες. Ο μηχανισμός μετάδοσης της ιδιότητας της πρωτεΐνης και ειδικότερα ο μηχανισμός μεταβίβασης της επίκτητης ιδιότητας σε επόμενες γενεές παραμένει μέχρι στιγμής άγνωστος.

Υπάρχει μία θεωρία, η οποία στηρίζεται και από πειράματα, για το μηχανισμό δράσης και μετάδοσης της ηλεκτρομαγνητικής πληροφορίας. Σε αυτήν, το μέσο διάδοσης και αποθήκευσης του μεταδιδόμενου σήματος είναι το νερό. Συγκεκριμένα, μία παρόμοιας φιλοσοφίας διάταξη με αυτήν του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας χρησιμοποιήθηκε για να εκπέμψει συχνότητες συντονισμού της ηπαρίνης (ένα πολύ συνηθισμένο αντιπηκτικό φάρμακο) σε καθαρό νερό. Το εκτεθειμένο αυτό νερό είχε την ικανότητα να αναστέλλει την πήξη του αίματος, απέκτησε δηλαδή τις ιδιότητες της ηπαρίνης, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα. Οπότε, στην περίπτωση ενός κυττάρου, το ενδοκυττάριο υγρό, το κυτταρόπλασμα, θα μπορούσε να παίζει αυτόν το ρόλο. Κατ'επέκτασιν μπορούν να ερμηνευθεί και το φαινόμενο μεταβίβασης της επίκτητης ιδιότητας σε επόμενες γενεές. Το «ενεργοποιημένο» κυτταρόπλασμα κατά την μίτωση μοιράζεται ανάμεσα στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Το φαινόμενο μεταβίβασης βαίνει με φθίνουσα πορεία γιατί, καθώς συνεχίζονται οι κυτταρικές διαιρέσεις, το ενεργοποιημένο κυτταρόπλασμα διαμοιράζεται ανάμεσα στα θυγατρικά κύτταρα και πρακτικά ελαττώνεται η συγκέντρωσή του. Η θεωρία αυτή είναι γνωστή ως το φαινόμενο μνήμης του νερού (Water Memory Effect). Το ακόλουθο σχήμα αναπαριστά το φαινόμενο:





Μία δεύτερη θεωρία, που μπορεί να ερμηνεύσει το φαινόμενο, βασίζεται στην ενεργοποίηση απειροελάχιστων ποσοτήτων του υπό μελέτη βιομορίου. Στην συγκεκριμένη περίπτωση πρέπει να ληφθεί ως δεδομένο ότι στα κύτταρα HeLa siRNA HSP-70 η αναστολή λόγω του siRNA δεν είναι απόλυτη (100%), απλώς οι παραγόμενες HSP-70 είναι σε μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Η θεωρία αυτή στηρίζεται από άλλα πειράματα του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας, στα οποία παρασκευάστηκαν διαλύματα χημειοθεραπευτικών συμπλόκων σε συγκεντρώσεις 10^{-18} M. Τα διαλύματα δεν παρουσίαζαν δράση κατά την χορήγηση σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά μετά από έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά φάσματα συντονισμού των συμπλόκων, εμφάνισαν σημαντική δράση, ανάλογη με διαλύματα πολύ μεγαλύτερων συγκεντρώσεων. Παρατηρείται δηλαδή ένα φαινόμενο συνέργειας, το οποίο ενδεχομένως να ισχύει και στην περίπτωση της HSP-70. Η υπόθεση αυτή όμως δεν ερμηνεύει ικανοποιητικά το φαινόμενο μεταβίβασης της επίκτητης ιδιότητας σε επόμενες γενεές.

Ανεξάρτητα από τον ακριβή μηχανισμό δράσης, το φαινόμενο αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω, καθώς η μετάδοση μίας επιθυμητής ιδιότητας με ήπιο μη επεμβατικό τρόπο μπορεί να έχει αναρίθμητες εφαρμογές, στην έρευνα, στη βιομηχανία αλλά και στην κλινική πράξη.

Δ' Σκέλος:

Το ποσοστό επιτυχούς ανίχνευσης της συσκευής ήταν 100%. Η ικανότητα εντοπισμού ενός βιομορίου σε ένα τόσο μικρό δείγμα καθιστά αυτήν την μέθοδο ιδιαίτερα ευαίσθητη. Η ευαισθησία της συσκευής συγκρίνεται με αυτήν των πιο σύγχρονων μοριακών τεχνικών, όπως της ανοσοϊστοχημείας και του στυπώματος κατά Western.

Δεδομένης της ταχύτητας ανίχνευσης και κυρίως του πρακτικά μηδενικού κόστους λειτουργίας της συσκευής, η μέθοδος αυτή αξίζει να εξελιχθεί καθώς μπορεί να βρει πολυάριθμες εφαρμογές στον τομέα της διαγνωστικής, ακόμα και σε μη εργαστηριακές συνθήκες.

XII. Βιβλιογραφία

1. Juliann G. Kiang* and George C. Tsokos, **“Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology”**
Pharmacol. Ther. Vol. 80, No. 2, pp. 183–201, 1998
2. Andrea Di Carlo, Nicole White et al, **“Chronic Electromagnetic Field Exposure Decreases HSP70 Levels and Lowers Cytoprotection”**
Journal of Cellular Biochemistry 84:447±454 (2002)
3. Jacques Benveniste and Didier Guillonnet, **“QED and Digital Biology”**
Rivista di Biologia / Biology Forum 97 (2004), pp. 169-172.
4. Jacques Benveniste and Didier Guillonnet, **“Research Advances”**
Newsletter 2001.1, DigiBio Laboratory, Paris
5. Dick D. Mosser,* Antoine W. Caron, **“Role of the Human Heat Shock Protein hsp70 in Protection against Stress-Induced Apoptosis”**
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Sept. 1997, p. 5317–5327
6. Λήμματα από την Wikipedia:
 - a. **HeLa Cell Line**
 - b. **Electromagnetic Field**
 - c. **HSP-70**
7. Spiros Karkabounas, George Skarpelis et al, **“Electromagnetic Signals of Nerve Growth Factor May Induce Differentiation of Rat Pheochromocytoma Cells (PC-12)”**
Επιστημονική Ανακοίνωση (Poster)
8. Ιωάννης Βεργινάδης, Ιωάννης Ζελοβίτης et al, **“In Vitro Αντικαρκινική Δράση ενός Συμπλόκου του Κασσιτέρου με Μερκαπτοنيκοτινικό Οξύ: Συνέργεια Δράσης με Στατικό Ηλεκτρομαγνητικό Πεδίο Χαμηλής Έντασης”**
Επιστημονική Ανακοίνωση (Poster)
9. Angelidis CE, Lazaridis I et al, **“Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance”**
Eur J Biochem. 1991 Jul 1;199(1):35-9.
10. Athanasiou A, Karkambounas S et al, **“The effect of pulsed electromagnetic fields on secondary skin wound healing: An experimental study.”**
Bioelectromagnetics. 2007 May 7;28(5):362-368
11. Schlesinger, Ashburner, Tissieres, **“Heat Shock: From Bacteria to Man”**, *Cold Spring Harbor Laboratory*