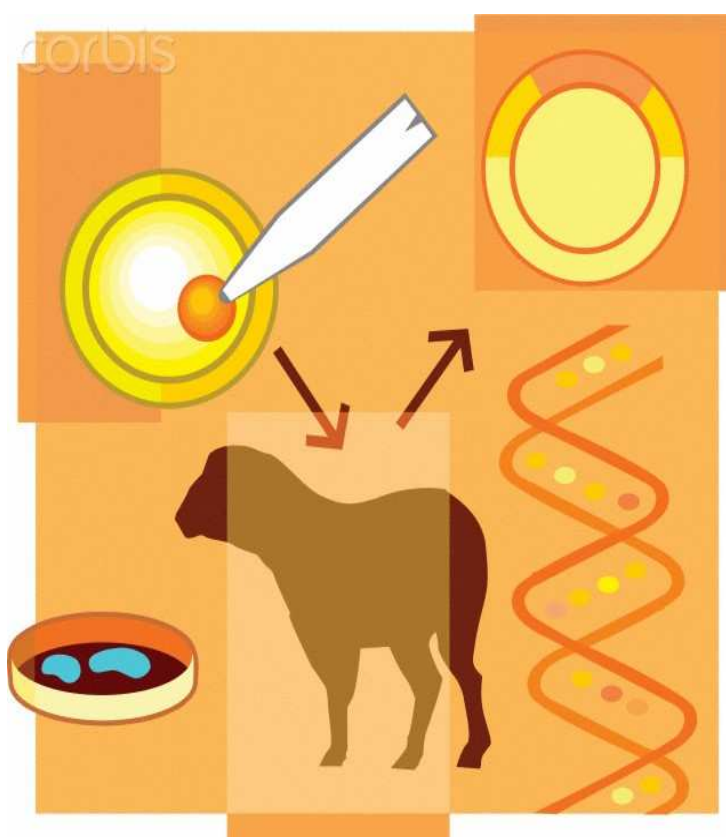




Ινσουλίνη και αυξητικοί παράγοντες IGF1 και IGF 2 στα πρόβατα



Α.Τ.Ε.Ι.Θ.

ΣΧΟΛΗ : ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ: ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΟΝΟΜΑ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ : ΣΑΜΟΥΛΛΔΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ : ΧΑΤΖΗΠΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	5
Γενικά στοιχεία για τα πρόβατα	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	10
Ινσουλίνη.....	10
2.1 Γενικά στοιχεία για την ινσουλίνη	10
2.2 Πως εντοπίστηκε η ινσουλίνη	10
2.3 Δομή της ινσουλίνης	13
2.3. Δράση της ινσουλίνης	17
2.5 Το γονίδιο της ινσουλίνης	19
2.6 Έκκριση ινσουλίνης	20
2.6.1 Έκκριση της ινσουλίνης στα πρόβατα και παράγοντες που την επηρεάζουν	23
2.6.2 Διαβητικά πρόβατα.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	26
Αυξητικοί παράγοντες IGF 1 και IGF 2.....	26
3.1 Υπόφυση.....	26
3.2 Αυξητική ορμόνη	27
3.3 Αυξητικοί παράγοντες.....	28
3.4 Ιστορικά στοιχεία για τους αυξητικούς παράγοντες IGF 1 και IGF 2.....	28
3.5 Παράγοντας IGF.....	29
3.6 IGF και παράγοντες που τον επηρεάζουν στα πρόβατα.....	31
3.7 IGF υποδοχείς.....	34
3.8 Γονίδιο IGF – I.....	38
3.9 Δεσμευτικές πρωτεΐνες των IGF (IGFBP)	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	42
Εργαστηριακή μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης και των αυξητικών παραγόντων	42
4.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού της ινσουλίνης.....	42
4.1.1 ELISA τύπου sandwich	42
4.2 Ενδεικτικοί δείκτες για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης της ινσουλίνης και των αυξητικών παραγόντων σε διαφορετικές φυλές προβάτων.....	45
4.2.1 Φαινοτυπικοί δείκτες.....	45
4.2.2 Βιοχημικοί δείκτες.....	45

4.3.3 Μοριακοί δείκτες.....	46
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ινσουλίνης και των αυξητικών παραγόντων IGF 1 και IGF 2 στα πρόβατα. Η ινσουλίνη έχει κατά βάση αναβολική δράση στους οργανισμούς και αφορά την πρόσληψη σακχάρων στον οργανισμό ενώ οι αυξητικοί παράγοντες κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο ως μήνυματοφόρα μόρια αύξησης στους οργανισμούς.

Δεδομένου ότι η εκτροφή προβάτων είναι μια ιδιαιτέρως διαδεδομένη και επικερδής κτηνοτροφική δραστηριότητα παράγοντες που σχετίζονται και επιδρούν στην ανάπτυξη των προβάτων χρίζουν ιδιαίτερης και βαρύνουσας σημασίας. Διαφορετικές φυλές ενδέχεται να εμφανίζουν διαφοροποίηση όσον αφορά την ανάπτυξη τους, την παραγωγή γάλακτος, μαλλιού κτλ. Η διερεύνηση τυχόν διαφοροποιήσεων σε γενετικό επίπεδο μεταξύ διαφορετικών φυλών, όσον αφορά την ινσουλίνη και τους IGF -1 και IGF -2 μπορεί να γίνει με την χρήση φαινοτυπικών, βιοχημικών και μοριακών δεικτών.

Στα πρόβατα ο αυξητικός παράγοντας IGF -1 φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με τον ρυθμό αύξησης των προβάτων, εμφανίζει διαφορετικές συγκεντρώσεις στα δύο φύλα με τα αρσενικά να εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ φαίνεται πως δεν εμφανίζει κάποια σημαντική επίδραση στην αναπαραγωγή των κριαριών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

Γενικά στοιχεία για τα πρόβατα

Το οικόσιτο πρόβατο (*Ovis aries*), το πιο κοινό μέλος της οικογένειας των προβάτων (*Ovis*), είναι ένα μηρυκαστικό, τετράποδο ζώο, που πιθανότατα κατάγεται από τα άγρια πρόβατα mouflon της Νότιας και Νοτιοδυτικής Ασίας. Ως πιθανότεροι πρόγονοι του σημερινού προβάτου αναφέρονται: το ουριάλ, που ζει στην Ασία, το μουφλόν της Αρμενίας, το αργκάλ και το μουφλόν της Σαρδηνίας.

Για την εξημέρωση των προβάτων υπάρχουν τεκμήρια στο Ιράκ που χρονολογούνται από το 9.000 π.Χ. Τα πρόβατα συνδέθηκαν με πολλούς πολιτισμούς, κυρίως στη Βρετανία και τη Μεσόγειο, όπου αποτελούν το πιο κοινό αντικείμενο της κτηνοτροφίας. Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς η απόδοση εισοδήματος που προσφέρουν σε σχέση με το κόστος της εκτροφής τους είναι πολύ υψηλό. Ο παγκόσμιος πληθυσμός των προβάτων υπολογίζεται γύρω στο ένα δισεκατομμύριο (Μπατίλας 2007, <http://www.livopedia.gr>)



Εικόνα 1. Πρόβατα κατά την διάρκεια βόσκησης

Η εκτροφή των προβάτων αποτελεί ένα από τα πιο παραγωγικά συστήματα στη ζωική παραγωγή. Τα πρόβατα εξακολουθούν να είναι οι μοναδικοί σχεδόν παραγωγοί μαλλιού στον κόσμο.

Δίνουν ακόμη το γάλα και το κρέας τους, που θεωρείται πολύ αξιόλογο διατροφικά προϊόν και, ιδιαίτερα στη χώρα μας, έχει μεγάλη κατανάλωση. Ακόμη το δέρμα τους, και από το λίπος του μαλλιού τους παίρνουμε τη λανολίνη, μια απ' τις πιο βασικές ύλες της βιομηχανίας των καλλυντικών.

Στην Ελλάδα, από αρχαιοτάτων χρόνων, η προβατοτροφία ήταν αρκετά διαδομένη. Η μορφή της ήταν νομαδική σε πολλές χώρες και φυσικά και στη δική μας. Η προβατοτροφία σημείωσε μεγάλη ακμή στην Ευρώπη μετά το μεσαίωνα, όταν άρχισε να υπάρχει μεγαλύτερη ζήτηση για κρέας, αλλά κυρίως όταν άρχισε ν' αναπτύσσεται ραγδαία η εριουργία.

Τα τελευταία χρόνια, όμως, άρχισε να γίνεται σε εντελώς καινούριες βάσεις. Με τη συνεχή βελτίωση και την εφαρμογή νέων μεθόδων στην εκτροφή, αυξήθηκε σημαντικά η απόδοση των προβάτων. Σήμερα υπάρχουν φυλές, που κάθε χρόνο δίνουν, κατά μέσο όρο, πάνω από 4,5 κιλά μαλλί και πρόβατα, που ζυγίζουν από 30 μέχρι και 150 κιλά ζωντανά. Ακόμη υπάρχουν βελτιωμένες φυλές, που κάθε χρόνο δίνουν πάνω από 350 χλγ/ γαλακτική περίοδο κιλά γάλα, με λιποπεριεκτικότητα που ξεπερνά το 6%.

Κυριότερες φυλές είναι: η ισπανική μερινός, που εκτρέφεται για το περίφημο μαλλί της. Στην Αυστραλία η φυλή αυτή βελτιώθηκε και παράγει εξαιρετης ποιότητας μαλλί. Η φυλή της Ν. Ζηλανδίας έχει μεγάλη απόδοση σε μαλλί, κρέας και γάλα. Φτάνει μέχρι 60 κιλά βάρος και το τρίχωμά της είναι άσπρο. Άλλη φυλή είναι η ασιατική Μουφλόν, που εκτρέφεται ως γουνοφόρο πρόβατο. Από τα μικρά τους, που τα σφάζουν 3-5 μέρες μετά τη γέννησή τους, βγάζουν γούνα πολυτελείας. Οι φυλές Ρόμνεϊ και Λίνκολν παράγουν το μακρύτερο μαλλί, που φτάνει μέχρι τα 30 εκ. Στην Αγγλία η Ντίσλεϊ, που σε 10 μήνες φτάνει τα 80-100 κιλά κρέας άριστης ποιότητας (<http://www.livepedia.gr>).

Εγχώριες φυλές είναι: η σαρακατσάνικη, η βλάχικη, η αρβανίτικη και η φυλή της Κρήτης. Επίσης η караγκούνικη, που τα ζώα της είναι μεγαλόσωμα και έχουν και καλές κρεοπαραγωγικές δυνατότητες εκτός της γαλακτοπαραγωγής. Σε δυο μήνες το αρνί φτάνει τα 13 κιλά., ενώ της Χίου είναι υψηλόγαλακτοποαραγωγική και μπορεί να φτάσει και τα 600 χλγ γαλα ανά γαλακτική περίοδο (Μπασδαγιάννη 2006) έχει επίσης υψηλό συντελεστή πολυδημίας (2,2- 2,5). Η φυλή της Ζακύνθου έχει

χαμηλότερες αποδόσεις αλλά αποτελεί μια καλή γαλακτοπαραγωγική φυλή. Άλλες ελληνικές φυλές είναι: η Καλαρύτικη, του Άργους κ.α.

Στους πίνακες 1,2 και 3 φαίνεται ο συνολικός αριθμός προβάτων που εκτρέφονταν στην Ελλάδα ανά γεωγραφική περιοχή, η παραγωγή γάλακτος και ο αριθμός των σφαγιασμένων προβάτων από 2002 μέχρι το 2006 σύμφωνα με τα δεδομένα της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας.

Πίνακας 1. Παραγωγή γάλακτος (σε κιλά) στην Ελλάδα

Έτος	2002	2003	2004	2005	2006
Γεωγραφική Θέση					
11,ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ & ΘΡΑΚΗ	53.819.082	51.869.586	63.873.411	54802791	66448727
12,ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	110.236.995	97.909.489	98132576	82452908	107036000
13,ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	51017676	46570629	52507597	56409797	57289111
14,ΘΕΣΣΑΛΙΑ	123371667	132113668	136475074	132548434	154240681
21,ΗΠΕΙΡΟΣ	126761431	127439701	113040075	99110816	130497869
22,ΙΟΝΙΑ ΝΗΣΙΑ	15661441	18888370	17450537	12264015	20006668
23,ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	158688035	162068133	155742862	154702780	167615965
24,ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	67245230	81668209	89902694	58078072	78512839
25,ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	64420792	70902383	66359850	66207738	67365831
31,ΑΤΤΙΚΗ	13817043	13983634	12046394	13576149	13118722
41,ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	39906358	43881781	45814225	44149815	47663353
42,ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	11690645	18696742	14344629	17421669	15545947
43,ΚΡΗΤΗ	107995760	122182396	123541252	124810065	128985826

Πίνακας 2. Αριθμός προβάτων στην Ελλάδα

Έτος	2002	2003	2004	2005	2006
Γεωγραφική Θέση					
11,ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ & ΘΡΑΚΗ	525.654	446.253	582.820	523.198	566.129
12,ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	839.179	755.984	835.142	763.178	881.093
13,ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	412.489	380.928	372.520	384.712	400.549
14,ΘΕΣΣΑΛΙΑ	1.180.443	1.269.076	1.192.672	1.175.319	1.234.093
21,ΗΠΕΙΡΟΣ	974.189	941.055	974.139	861.890	877.062
22,ΙΟΝΙΑ ΝΗΣΙΑ	156.047	137.820	147.151	118.912	130.459
23,ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	1.414.749	1.410.328	1.350.076	1.432.250	1.381.855
24,ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	692.702	777.198	686.018	651.091	686.735
25,ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	538.381	654.387	598.099	531.011	566.570
31,ΑΤΤΙΚΗ	123.169	104.643	111.834	105.186	104.011
41,ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	315.108	394.325	379.352	376.856	407.628
42,ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	178.849	226.724	198.226	240.858	214.855
43,ΚΡΗΤΗ	1.506.887	1.827.099	1.484.800	1.580.294	1.580.515

Πίνακας 3. Αριθμός σφαγίων

Έτος	2002	2003	2004	2005	2006
Γεωγραφική Θέση					
11,ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ & ΘΡΑΚΗ	365493	320765	446005	426630	368216
12,ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	474054	359280	474410	285508	514394
13,ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	336894	335854	310185	267001	311563
14,ΘΕΣΣΑΛΙΑ	859631	925234	970615	829688	1026486
21,ΗΠΕΙΡΟΣ	806804	678254	716081	574162	795203
22,ΙΟΝΙΑ ΝΗΣΙΑ	74614	84373	99873	81124	99315
23,ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	1073336	1006384	1033404	1252974	950308
24,ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	550183	551481	493393	484661	595250
25,ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	558484	511175	524585	476042	483929
31,ΑΤΤΙΚΗ	78236	60677	68248	61585	67446
41,ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	231528	340371	295622	333318	362643
42,ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	137142	183146	124378	179049	138388
43,ΚΡΗΤΗ	942530	1223637	1036090	1021398	1068827

Τα πρόβατα είναι εποχικά πολυοιστρικά ζώα. Έτσι στο κοπάδι, σε κάθε κριάρι πρέπει ν' αντιστοιχούν γύρω στις 30-50 προβατίνες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί κατά μέσο όρο 150 μέρες. Υπάρχουν φυλές που γεννούν μόνο ένα και πολύ σπάνια δύο μικρά, ενώ υπάρχουν φυλές που γεννούν δύο και σπάνια ένα ή περισσότερα από δύο.

Οι προβατίνες των άλλων φυλών γεννούν μόνο μια φορά το χρόνο, ενώ βιολογικά έχουν τη δυνατότητα να γεννούν σχεδόν κάθε 6-7 μήνες κάτι που εμφανίζεται μερικές φορές σε μερικές ελληνικές φυλές. Ο οίστρος στα βελτιωμένα πρόβατα εμφανίζεται απ' τον Ιούνιο μέχρι και το Σεπτέμβρη.

Ο θηλασμός των μικρών είναι ανάλογος με τη φυλή όπου ανήκουν, με τη γαλακτοπαραγωγή της μητέρας και τον τύπο της εκτροφής. Τα πρόβατα πρέπει να κουρεύονται, κυρίως στην αρχή του καλοκαιριού, όταν το μαλλί έχει το μεγαλύτερο μήκος και πριν αρχίσει να πέφτει. Το κούρεμα γίνεται με ειδικά ψαλίδια ή με ειδικές κουρευτικές μηχανές, χειροκίνητες ή και ηλεκτρικές.

Τα κατοικίδια πρόβατα γενικά δεν είναι μακρόβια. Συνήθως, σε κανονικές συνθήκες εκτροφής, ζουν 12-15 χρόνια. Σήμερα, με τον τρόπο που γίνεται η εκτροφή και με τις απαιτήσεις για απόδοση που υπάρχουν, τα πρόβατα δε φτάνουν ποτέ στην ηλικία αυτή. Μόλις το πρόβατο αρχίζει να δείχνει σημεία κάμψης στην απόδοσή του, απομακρύνεται από την εκτροφή και οδηγείται για σφαγή. Είναι εντελώς αντιοικονομική η εκτροφή προβάτων, που δεν έχουν ικανοποιητική απόδοση. (<http://www.livepedia.gr>)

Γενικά η εκτροφή προβάτων αποτελεί ένα δυναμικό κτηνοτροφικό κλάδο της χώρας. Πληροφορίες που αφορούν την ταχύτητα ανάπτυξης των προβάτων έχουν άμεση επίδραση στην απόδοση της εκτροφής του και ως εκ τούτου χρήζουν βαρύνουσας σημασίας.

Ένας τέτοιος παράγοντας σε βιοχημικό επίπεδο είναι η ινσουλίνη και οι αυξητικοί παράγοντες IGF. Στα επόμενα κεφάλαια γίνεται εκτενής αναφορά στην δομή, την λειτουργία τους και στο πως αυτές οι ουσίες επιδρούν στην αύξηση των προβάτων. Επιπλέον δίνονται στρατηγικές για την διερεύνηση του ρόλου τους στα πρόβατα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ινσουλίνη

2.1 Γενικά στοιχεία για την ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans») και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. (<http://el.wikipedia.org/wiki/insulin>)

2.2 Πως εντοπίστηκε η ινσουλίνη

Η ανακάλυψη της ινσουλίνης και του ρόλου της στο μεταβολισμό, η απομόνωσή της και η θεραπευτική χρήση της συνιστούν μια επιστημονική εποποιία, που διήρκεσε περίπου 100 χρόνια. Η διάθεση φθηνής ινσουλίνης και σε απεριόριστες πλέον ποσότητες έχει σώσει μέχρι σήμερα εκατομμύρια ασθενείς όλων των ηλικιών από τον σακχαρώδη διαβήτη (diabetes mellitus) και από τις διάφορες παράπλευρες ασθένειες που προκαλεί η νόσος αυτή, όπως και από πρόωρο θάνατο.

Η ιστορία της ινσουλίνης ξεκίνησε το 1869. Ένας φοιτητής ιατρικής του Πανεπιστημίου του Βερολίνου, ο Paul Langerhans εξετάζοντας στο μικροσκόπιο τομές παγκρεατικού ιστού εντόπισε κάποιες άγνωστες μέχρι τότε συστάδες (clusters) κυττάρων, δεν μπόρεσε όμως να διαπιστώσει τον φυσιολογικό τους ρόλο. Οι συστάδες αυτές ονομάστηκαν αργότερα νησίδια του Langerhans (Langerhans' islets) και είναι συναθροίσεις κυττάρων κάποια από τα οποία παράγουν και εκκρίνουν (μεταξύ άλλων) ινσουλίνη. Η ινσουλίνη εκκρίνεται μέσω των αιμοφόρων αγγείων απ' ευθείας στο αίμα, σε αντίθεση με τη μέχρι τότε γνωστή έκκριση παγκρεατικού υγρού (μίγμα πεπτικών ενζύμων) στο δωδεκαδάκτυλο.

Το 1889, ο Πολωνο-Γερμανός γιατρός Oscar Minkowski σε συνεργασία με τον Joseph von Mering αφαίρεσαν το πάγκρεας από ένα σκύλο για να διαπιστώσουν το ρόλο του στη διαδικασία της πέψης. Στη συνέχεια διαπίστωσαν ότι τα ούρα του σκύλου περιείχαν αφύσικα μεγάλη συγκέντρωση σακχάρου (γλυκόζης). Από το γεγονός αυτό έβγαλαν το συμπέρασμα ότι το πάγκρεας εμπλέκεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και πως θα πρέπει να σχετίζεται με τη νόσο του διαβήτη. Το 1901, ο Eugene Lindsay Opie (στο Johns Hopkins) διαπίστωσε ότι ο διαβήτης συνδέεται με τα νησίδια του Langerhans, αφού η καταστροφή τους οδηγούσε στην

εμφάνιση της νόσου. Κατά τις επόμενες δύο δεκαετίες οι γιατροί και ερευνητές σε όλο τον κόσμο προσπάθησαν να διερευνήσουν το έκκριμα των νησιδίων του Langerhans.

Το 1911-1912 ο ερευνητής Ernest Lyman Scott στο Πανεπιστήμιο του Σικάγου, χρησιμοποίησε εκχυλίσματα παγκρέατος σε πειραματόζωα και παρατήρησε μια μικρή μείωση του σακχάρου στα ούρα, αλλά δεν μπόρεσε να πείσει τον διευθυντή του εργαστηρίου για την σπουδαιότητα της ανακάλυψης αυτής ώστε να συνεχίσει τις προσπάθειές του. Παρόμοια αποτελέσματα είχε το 1919 και ο ερευνητής Israel Kleiner (Πανεπιστήμιο Rockefeller, ΗΠΑ), αλλά οι έρευνες εκείνη την περίοδο ήταν δύσκολο να συνεχιστούν λόγω του Α' Παγκόσμιου Πολέμου.



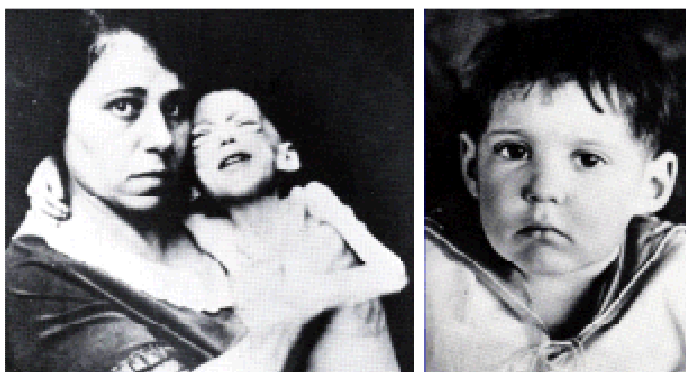
Εικόνα 2. Οι Frederck Grant banting (1891 – 1941, αριστερά) και John James Richard Macleod (1876-1935, δεξιά). Καθηγητές του Πανεπιστημίου του Toronto. Το 1923 τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel για την ανακάλυψη της ινσουλίνης.

Το 1921, ο καθηγητής Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής και Φαρμακευτικής στο Βουκουρέστι (Ρουμανία) Nicolae Paulescu υπήρξε ο πρώτος που προσπάθησε να απομονώσει την ινσουλίνη από το πάγκρεας, την οποία είχε ονομάσει παγκρεΐνη (pancrein). Ο Paulescu δημοσίευσε σχετικές εργασίες και απέκτησε πατέντα της τεχνικής του στη Ρουμανία, η οποία όμως δεν χρησιμοποιήθηκε κλινικά (<http://www.chemistrydaily.com/>)

Το 1920, ο Καναδός χειρουργός Frederick Banting μελετώντας τις εργασίες του Minkowski θεώρησε ότι η απομόνωση με εκχύλιση μια καθαρής «ουσίας» από το πάγκρεας θα μπορούσε να βοηθήσει στη ρύθμιση του σακχάρου των διαβητικών. Το 1921 ταξίδεψε στο Τορόντο για να συναντήσει τον John James Richard Macleod, καθηγητή Φυσιολογίας στο Πανεπιστήμιο του Τορόντο. Εκεί ο

Banting χρησιμοποίησε το εργαστήριο του Macleod και συνεργάστηκε στενά με τον φοιτητή του δευτέρου, Charles Best .

Με πειράματα στους σκύλους οι Banting και Best, κατάφεραν να απομονώσουν ποσότητες (ακάθαρτης) ινσουλίνης από τα νησίδια Langerhans, (την οποία ονόμασαν isletin). Με ενέσεις αυτού του εκχυλίσματος κατάφεραν να διατηρήσουν στη ζωή μια σκύλα (με το όνομα Alpha) από την οποία είχαν αφαιρέσει το πάγκρεας.



Εικόνα 3. Αριστερά παιδί που πάσχει από νεανικό διαβήτη στα πρόθυρα του θανάτου (φωτογραφία 15/12/1922). Δεξιά το ίδιο παιδί μετά από θεραπευτική αγωγή με ινσουλίνη (φωτογραφία 15/2/1923)

Το φθινόπωρο του 1921, οι Banting και Best παρουσίασαν τα αποτελέσματα στον Macleod, οποίος πρότεινε περισσότερα πειράματα και χρήση καλύτερων επιστημονικών οργάνων και τεχνικών. Τα πειράματα που ακολούθησαν είχαν μεγάλη επιτυχία και δημοσιεύθηκαν σε επιστημονικά περιοδικά. Η διαδικασία εκχύλισης της ινσουλίνης ήταν χρονοβόρα και αναγκάστηκαν να χρησιμοποιήσουν μεγάλες ποσότητες παγκρέατος εμβρύων βοοειδών με καλύτερα αποτελέσματα. Οι δυσκολίες εντοπίζονταν κυρίως στις ακαθαρσίες των εκχυλισμάτων που δημιουργούσαν πάντοτε έντονες αλλεργικές αντιδράσεις στα πειραματόζωα.

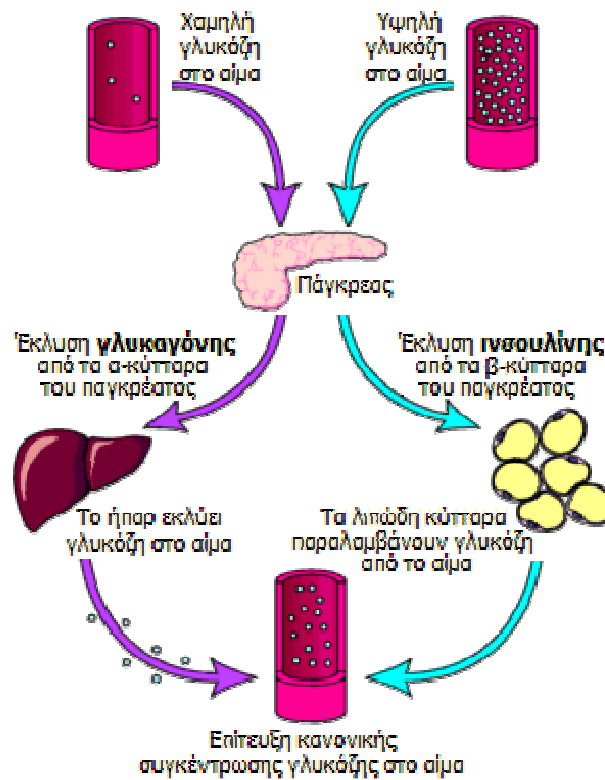
Στον καθαρισμό της ινσουλίνης ανεκτίμητη υπήρξε η συμβολή του βιοχημικού James Collip. Τα πειράματα σε ανθρώπους άρχισαν τον Ιανουάριο του 1922. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εκείνη την εποχή η διάγνωση νεανικού διαβήτη ισοδυναμούσε με θανατική καταδίκη του ασθενούς και κάθε θεραπευτική αγωγή που θα παρέτεινε τη ζωή του θα ισοδυναμούσε με ιατρικό θαύμα. Χορήγησαν ινσουλίνη στον 14χρονο διαβητικό Leonard (Lenny) Thompson, που βρισκόταν σε κόμα στο

Γενικό Νοσοκομείο του Τορόντο, αλλά επειδή η ινσουλίνη δεν ήταν πολύ καθαρή προκάλεσε έντονα αλλεργικά φαινόμενα στον ασθενή. Ο Collip εργάστηκε νυχθημερόν επί 12 ημέρες για να καθαρίσει την ινσουλίνη και η χορήγηση της επόμενη δόσης υπήρξε εξαιρετικά επιτυχής, χωρίς παρενέργειες και ρύθμισε πολύ καλά το σακχάρου του Lenny. Η γλυκόζη στο αίμα του νεαρού ασθενή από τα 520 mg/dL μειώθηκε στα 120 mg/dL. Ο Lenny, υπήρξε ο πρώτος ασθενής με νεανικό διαβήτη που επιβίωσε χάρις στην ινσουλίνη και έζησε μια φυσιολογική ζωή μέχρι τα 27 του χρόνια, οπότε πέθανε από άλλα αίτια (πνευμονία) (<http://health.howstuffworks.com/>).

Η είδηση έκανε τον γύρο όλου του κόσμου, οι νεαροί ασθενείς διαβητικοί με τους γονείς συγκεντρώνονται στο νοσοκομείο και η ομάδα Banting, Best και Collip πηγαίνουν από κρεβάτι σε κρεβάτι και χορηγούν ενέσεις ινσουλίνη με εκπληκτικά αποτελέσματα. Όλοι οι ασθενείς συνέρχονται από το διαβητικό κώμα. Η ανακάλυψη της ινσουλίνης και θεραπευτική αγωγή με ινσουλίνη των διαβητικών υπήρξε ένα από τα σημαντικότερα ιατρικά επιτεύγματα και έχει μείνει ως πρωτοφανές γεγονός στην ιστορία της θεραπευτικής ιατρικής και φαρμακολογίας. Το 1922 η μέθοδος εκχύλισης της ινσουλίνης βελτιώθηκε και άρχισε να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, αλλά ακόμη η καθαρότητά της ήταν περιορισμένη (Βαλαβανίδης 2001).

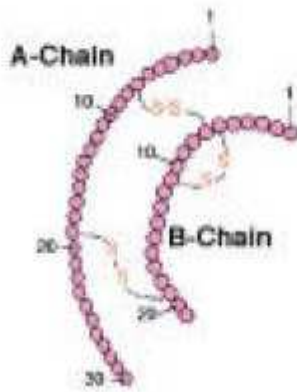
2.3 Δομή της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (M.B. 5808), που αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αλυσίδα A αποτελείται από 21 αμινοξέα ενώ η B από 30 αμινοξέα. Η ινσουλίνη μαζί με την γλυκαγόνη ρυθμίζουν τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει στα όρια (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Η ινσουλίνη πιο συγκεκριμένα παράγεται από τα β – κύτταρα των νησίδων Langerhans του παγκρέατος. Ένα αρκετά απλουστευμένο σχήμα που δείχνει τον κεντρικό ρόλο του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης παρουσιάζεται στην εικόνα 4 (Norman 2001).



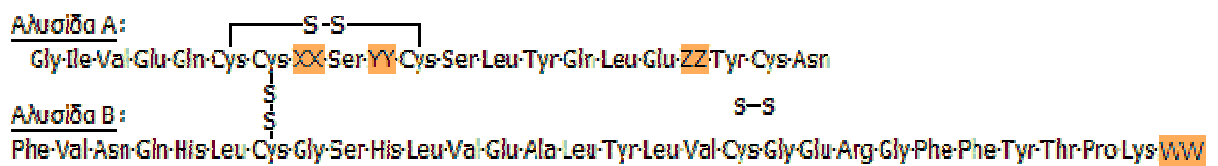
Εικόνα 4. Μηχανισμός ρύθμισης της γλυκόζης

Η ινσουλίνη συντίθεται αρχικά ως προ-προϊνσουλίνη (M.B. 11.500). στα ριβοσώματα και κόβεται στα σωματίδια Golgi μετά την παραγωγή σε προϊνσουλίνη (M.B. 9.000). Η προ-ινσουλίνη πακετάρεται σε κυστίτιδα και μετατρέπεται σε ινσουλίνη αφού αποκοπούν τα συνδετικά πεπτιδία ώσπου να συντεθούν οι δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται από τα κύτταρα με εξωκύτωση ανάλογα με την συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα και εκκρίνεται από την πυλαία φλέβα φτάνοντας άμεσα στο ήπαρ. 50% περίπου της παραγωγής της ανακυκλώνεται από το ήπαρ από την ινσουλινάση και άλλο ένα πολύ μικρό μέρος από τους νεφρούς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στο αίμα είναι μόλις λίγα λεπτά και επομένως εξαφανίζεται από τη κυκλοφορία σε 10 – 15 λεπτά. (Κουρίτα 2008)



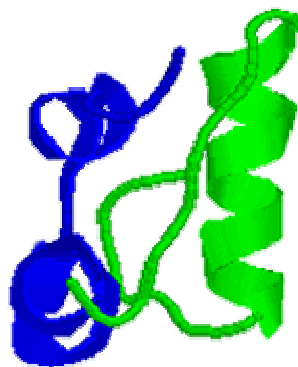
Εικόνα 5. Δομή της ινσουλίνης

Οι ινσουλίνες στα διάφορα ζώα διατηρούν ίδια τη γενική δομή και διαφέρουν μόνο ως προς λίγα αμινοξέα που καταλαμβάνουν ορισμένες θέσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (Lehringer 1982)



Εικόνα 6. Πρωτοταγής δομή της ινσουλίνης

Η τριτοταγής δομή της ινσουλίνης φαίνεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Μονομερές ινσουλίνης (βιολογικώς δραστική μορφή)

Όπως προαναφέρθηκε η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική.

Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυικά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα (adipocytes). Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (glycogen).

Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυική δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο γλυκαγόνο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία (Ι.ΑΣ.Π.Ι.Σ. 2008)

Η ινσουλίνη σε διαφορετικά ζώα έχει την ίδια βιολογική δράση καθώς και ανοσολογική συμπεριφορά (Brown et al. 1955). Τα μόρια ινσουλίνης από διαφορετικά ζώα έχουν την ίδια κρυσταλλική μορφή ενώ επιπλέον έχει βρεθεί ότι μείγμα από ινσουλίνη που προέρχονταν από διαφορετικά ζώα δρούσε σαν μια ενιαία ουσία (Lens & Evertzen, 1952). Παρόλα αυτά σε χημική μελέτη της ινσουλίνης των χοίρων και των προβάτων, έδειξε ότι ενώ η γενική δομή ήταν παροιμία βρέθηκαν διαφορές στα επιμέρους αμινοξέα (Brown et al. 1955) Οι Harfenist & Graig (1952) βρήκαν διαφορές στις συχνότητες των αμινοξέων ανά μόριο ινσουλίνης που δίνονται στον πίνακα 4. Στα υπόλοιπα αμινοξέα δεν βρέθηκε διαφορά στην συχνότητα τους.

Παρόλα αυτά οι μικρές διαφορές που έχουν βρεθεί στην δομή της ινσουλίνης δεν επηρεάζει την λειτουργία της

Πίνακας 4. Συχνότητα αμινοξέων στο μόριο της ινσουλίνης σε βοοειδή, πρόβατα και χοίρους (από Harfenist & Graig 1952)

Αμινοξέα	Βοοειδή	Πρόβατα	Χοίρος
Σερίνη	2,89	2,07	2,79
Θρεονίνη	0,97	0,96	1,77
Γλυκίνη	3,94	4,70	3,94
Αλανίνη	2,91	2,99	2,17
Βαλίνη	4,68	4,80	3,68
Ισολευκίνη	0,66	0,69	1,54

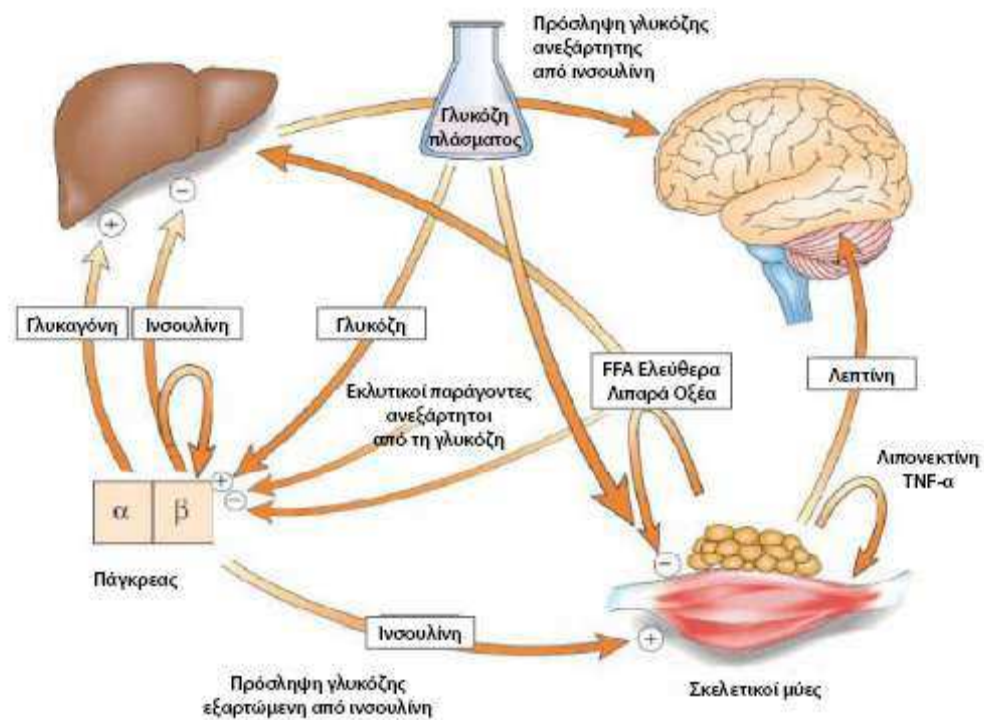
2.3. Δράση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη με αναβολική δράση και επαρκείς ποσότητες ινσουλίνης είναι απαραίτητες για φυσιολογική αύξηση. Η διεγερτική δράση της ινσουλίνης στην πρόληψη των αμινοξέων και τη σύνθεση των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες για την αύξηση και την ανάπτυξη ενός ατόμου (Vender et al 2004).

Η κύρια δράση της ινσουλίνης είναι να μειώνει το σάκχαρο στην κυκλοφορία του αίματος διευκολύνοντας την πρόσληψη της γλυκόζης από τα μυϊκά κύτταρα και τον λιπώδη ιστό καθώς και ελαττώνοντας την παραγωγή από το ήπαρ. Στο ήπαρ η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη σύνθεση λίπους και γλυκαγόνου, ενώ καταστέλλει την αποικοδόμηση του γλυκαγόνου και την παραγωγή κετονικών σωμάτων, που μπορούν να προκαλέσουν μια ασθένεια (κέτοση) αρκετά σημαντική στην εντατική εκτροφή μηρυκαστικών και ιδιαίτερα βοοειδών προσβάλλοντας μάλιστα ιδιαίτερα τα υψηλογαλακατοπαραγωγά ζώα . Στους μυς, ενισχύει την πρόσληψη την πρόσληψη γλυκόζης και αμινοξέων, τη σύνθεση γλυκαγόνου και πρωτεϊνών, ενώ στον λιπώδη ιστό ενεργοποιεί εκτός της πρόσληψης γλυκόζης και την σύνθεση τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη επίσης ενισχύει την πρόσληψη K^+ και Mg^{2+} καθώς και φωσφορικών από τα κύτταρα (μειώνοντας τα επίπεδα K^+ στο αίμα). Οι επιδράσεις αυτές είναι ταχύτερες, συμβαίνουν εντός δευτερολέπτων από την σύνδεση της ινσουλίνης με

τους υποδοχείς της. Τα επόμενα 10 – 15 λεπτά επιτελείται μεταβολή του επιπέδου δραστηριότητας πολλών ενδοκυτταρικών ενζύμων που έχουν σχέση με τον μεταβολισμό. Σε διάστημα ωρών ή ημερών επέρχονται μεταβολές στο ρυθμό μετάφρασης του αγγελιοφόρου RNA από τα ριβοσώματα για το σχηματισμό νέων πρωτεϊνών καθώς και ακόμη βραδύτερες μεταβολές στην αντιγραφή του DNA στον πυρήνα των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο η ινσουλίνη αναδιαμορφώνει ένα μεγάλο μέρος από τον ενζυμικό κυτταρικό μηχανισμό για να επιτύχει τους μεταβολικούς της στόχους.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η σύνδεση της ινσουλίνης στον ειδικό υποδοχέα της (M.B. 300.000) πάνω στην κυτταρική μεμβράνη ενεργοποιεί πολλά ,μεταβολικά γεγονότα και επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα cAMP φαίνεται να μειώνονται μετά την σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της, ωστόσο συγκεκριμένο ενδιάμεσο προϊόν δεν έχει αναγνωρισθεί. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης αποτελείται από δύο υποομάδες α οι οποίες εμφανίζουν δράση τυροσινικής κινάσης και συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Η πλήρως αυτοφωσφορυλιωμένη πλέον τυροσινική κινάση ενεργοποιεί – φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνη, κινάση σερίνης – θρεονίνης, αλλά και πρωτεϊνικές φωσφατάσες οι οποίες ελέγχουν μεταβολικά μονοπάτια που οδηγούν σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενζύμων κλειδιών (Κουρίτας 2008).



Εικόνα 8. Πρόσληψη και μεταβολισμός της γλυκόζης από τους ιστούς και η επίδραση της ινσουλίνης στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος (Ducleuzeau PH 2002)

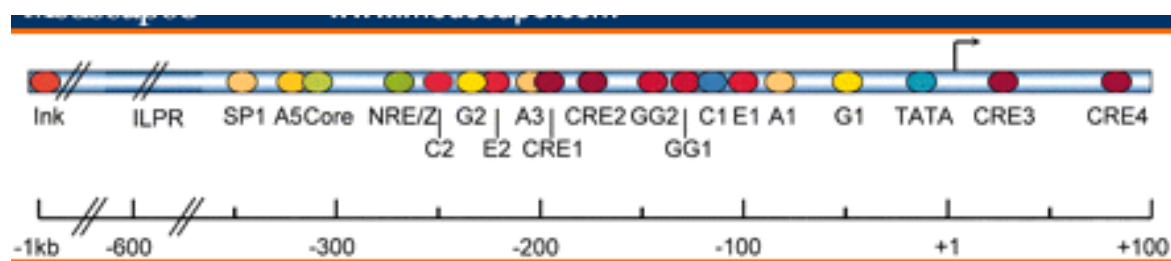
Πέρα από την γενική αναβολική της δράση, η ινσουλίνη ασκεί άμεση και συγκεκριμένη θετική αυξητική επίδραση στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στην κυτταρική διαίρεση κατά την εμβρυική ηλικία (και πιθανά στην παιδική ηλικία). Η ινσουλίνη είναι επίσης απαραίτητη για την φυσιολογική παραγωγή του IGF-I και IGF -II (Vender et al 2004).

2.5 Το γονίδιο της ινσουλίνης

Το INS τοποθετείται μεταξύ των γονιδίων της υδροξυλάσης της τυροσίνης και του IGF-II στο 11p15.5 και περιλαμβάνει πολλαπλές επαναλήψεις (Variable Number Tandem Repeats (VNTR)) οι οποίες βρίσκονται στην 5' ρυθμιστική περιοχή του INS (Jurien & Heyningen, 1990). Ο VNTR πολυμορφισμός ρυθμίζει τον μεταγραφικό ρυθμό του INS (216) και πιθανώς του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί την IGF-II (Paquette et al., 1998). Ο αριθμός των επαναλήψεων του INS VNTR βρίσκεται μεταξύ 26 και 200 και έχει τρεις κατηγορίες μεγεθών. Τα αλληλόμορφα κατηγορίας I

με την μικρότερη πολυμορφική περιοχή, με μέσο μήκος 40 επαναλήψεων. Τα αλληλόμορφα κατηγορίας II έχουν μήκος 80 επαναλήψεων, ενώ η κατηγορία III έχει ένα μέσο μήκος 157 επαναλήψεων (Bell et al. 1982). Η μεταγραφική δραστηριότητα της μεγαλύτερης πολυμορφικής περιοχής είναι μεγαλύτερη από αυτή της πιο μικρής (Kenedy et al. 1995). Σε ορισμένες μελέτες, εκτός της επίδρασης της στην ρύθμιση της έκφρασης του INS, έχουν ενοχοποιηθεί και για την παθογένεια του διαβήτη τύπου-2 (Weaver et al. 1992 , Ong et al. 1999).

Ο μεταγραφικός έλεγχος της ινσουλίνης πραγματοποιείται στην cis ρυθμιστική περιοχή που 300 – 400 μονάδες βάσεων από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (Μπαντίλας 2007). Σχηματικά ο εκκινητής της ινσουλίνης δίνεται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του εκκινητή της ινσουλίνης. Υποδεικνύονται οι βασικότερες cis περιοχές. Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό των βάσεων από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής (το σημείο με το βέλος)

2.6 Έκκριση ινσουλίνης

Όπως προαναφέρθηκε η ινσουλίνη συντίθεται ως προπροϊνσουλίνη στα ριβοσώματα του τραχέος ενδοπλασματικού δικτύου. Από αυτήν αποκόπτονται δύο ακραία τμήματα, παραγόμενης της προϊνσουλίνης, που συσκευάζεται στη συσκευή Golgi σε εκκριτικά κοκκία. Μέσα στα κοκκία το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης διασπάτε σε C- πεπτίδιο και ινσουλίνη. Ένα ποσοστό (10-15%) της προϊνσουλίνης δεν διασπάται και εκκρίνεται (εξωκυττάρωση κοκκίων) μαζί με την ινσουλίνη στην κυκλοφορία. (Καναρτζής 2009)

Ο κυριότερος παράγοντας ελέγχου στην έκκριση της ινσουλίνης είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος καθώς έχει άμεσες επιδράσεις στα β – κύτταρα του παγκρέατος. Η έκκριση της ινσουλίνης καθορίζεται από τη ρυθμιστική δράση της γλυκοκινάσης η οποία αποτελεί τον χρονοπεριοριστικό παράγοντα της

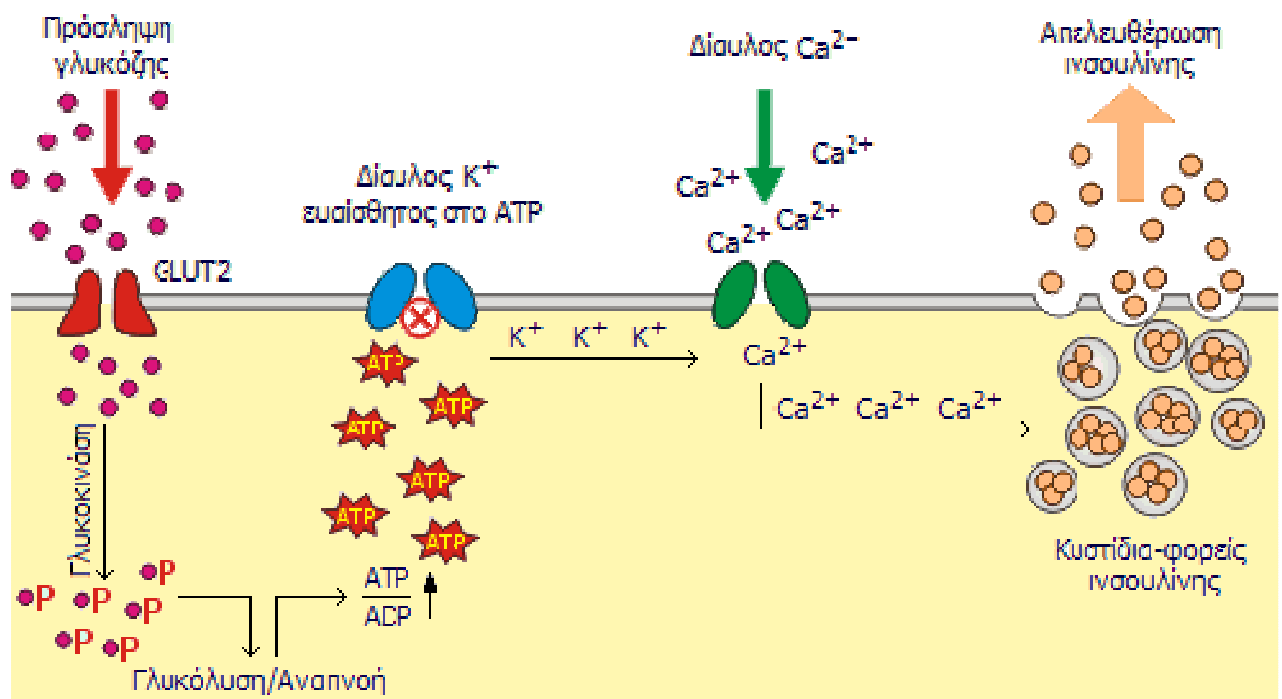
φωσφοριλίωσης της γλυκόζης στα βήτα κύτταρα που εξισορροπεί την έκκριση ινσουλίνης με την τρέχουσα συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης του ATP η οποία προκαλεί το κλείσιμο των ευαίσθητων διαύλων K^+ στην μεμβράνη των β - κυττάρων, επιφέροντας έτσι κυτταροπλασματική εκπόλωση η οποία έχει σαν αποτέλεσμα να ανοίγουν οι τασοευαίσθητοι διάλυτοι Ca^{+2} και έτσι επιτρέπεται η είσοδος ιόντων ασβεστίου εντός του κυττάρου. Η αύξηση του κυτοστολικού ασβεστίου δίνει το έναυσμα δίνει το έναυσμα μετατόπισης των ινσουλινούχων κυστιδίων (Vender et al 2004).

Πιο αναλυτικά η καλή λειτουργία του β - κυττάρου εξαρτάται από την έκκριση ινσουλίνης στο σωστό χρονικό σημείο και σε ικανά ποσοστά ανάλογα με το ερέθισμα. Το β - κύτταρο αντιδρά στο ερέθισμα με αντιστροφή του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης σε δυναμικό ενέργειας. Το τελευταίο ανοίγει εξαρτώμενος από το δυναμικό στους διαύλους ασβεστίου με συνέπεια εισροή Ca^{++} στο κύτταρο και αύξηση της συγκέντρωσης του στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση αυτή προκαλεί την εξωκυττάρωση των εκκριτικών κοκκίων ινσουλίνης. (Καναρτζής 2009)

Δύο ερεθίσματα είναι ικανά να προκαλέσουν εκπόλωση του β - κυττάρου :

A) **Η Γλυκόζη.** Παραλαμβάνεται από τους GLUT - 2 υποδοχείς και φωσφορυλιώνεται με τη δράση της γλυκοκινάσης. Η γλυκοκινάση του β κυττάρου εμφανίζει σημαντική ενζυμική δραστηριότητα δραστηριότητα σε φυσιολογικά έως μέτρια αυξημένα, αλλά όχι υπογλυκαιμικά επίπεδα γλυκόζης. Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ιδανικό αισθητήρα του β - κύτταρο στη γλυκόζη. Η 6 - P γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως μπαίνει στον κύκλο του Krebs στα μιτοχόνδρια με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP και της αναλογίας ATP/ADP. Η αύξηση αυτή κλίνει τους εξαρτώμενους από το ATP διαύλους K^+ που συντηρούν σε μεγάλο βαθμό το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου επιτρέποντας την έξοδο K^+ . Οι διάλυτοι αποτελούνται από 4 υπομονάδες της πρωτεΐνης Kir6.2 εσωτερικά και 4 υπομονάδες του υποδοχέα των σουλφονουλουριών 1 (SUR 1) στην περιφέρεια. Οι σουλφονουλουρίες συνδεόμενες με τον SUR1 κλείνουν τους διαύλους, ενώ η διαζοξίδη τους ανοίγει, υπερπολώνοντας το κύτταρο και αναστέλλοντας την έκκριση ινσουλίνης. Η συνδεση ATP - SUR1 κλείνει τους διαύλους, με αποτέλεσμα την αντιστροφή του δυναμικού τη μεμβράνης και έκλυση δυναμικού ενέργειας. Αυτό όπως έχει ήδη αναφερθεί ανοίγει τους διαύλους Ca^{++} και τελικά προκαλεί εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης. (Καναρτζής 2009)

B) Η **Αργίνη**. Είναι το ισχυρότερο εκκριταγωγό. Αποτελεί κατιόν και μεταφερόμενη μέσα στο κύτταρο μπορεί να εκλύσει δυναμικό ενέργειας ανεξάρτητα από τους διαύλους K^+ . (Καναρτζής 2009)



Εικόνα 11. Μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης από τα **β -κύτταρα** του παγκρέατος: Γλυκόζη από το αίμα μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω των μεταφορών (transporter) GLUT2. Η γλυκόζη υπόκειται σε γλυκολυτική φωσφορυλίωση και εισέρχεται στον αναπνευστικό κύκλο, ενώ παράγεται ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), στην οποία αποθηκεύεται "χημική ενέργεια" και αυξάνεται ο λόγος ATP/ADP στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση αυτή "κλειδώνει" τον διάλυλο ιόντων καλίου αποπολώνοντας την κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διάνοιξη του διαύλου ιόντων ασβεστίου και στο κύτταρο εισέρχονται ιόντα ασβεστίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου προκαλεί την εξωκυτταρική έκλυση ινσουλίνης από τα κυστίδια παρακαταθήκης της (από Βαλαβανίδης 2008).

Εκτός από την γλυκόζη του πλάσματος και την αργινίνη υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που ελέγχουν την έκκριση της ινσουλίνης. Τέτοιοι είναι η συγκέντρωση ορισμένων αμινοξέων στο πλάσμα, ορμόνες (σουλωνοτρόπο πεπτίδιο GIP) καθώς και μέσω της αυτόνομης νεύρωσης των νησίδων του Langerhans. Όλες πάντως οι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκκριση της ινσουλίνης έχουν να κάνουν με τον έλεγχο των μεταβολικών προσαρμογών (Vender et al 2004).

2.6.1 Έκκριση της ινσουλίνης στα πρόβατα και παράγοντες που την επηρεάζουν

Είναι προφανές ότι υπάρχουν ιδιαιτερότητες στην πεπτική λειτουργία των μηρυκαστικών ζώων σε σχέση με τα μονογαστρικά. Στις εκκρίσεις του παγκρέατος έχουν παρατηρηθεί διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικά είδη ζώων (Chey, 1980). Η ημερήσια παραγωγή παγκρεατικού χυμού είναι χαμηλότερη στα πρόβατα από ότι στους χοίρους, στα σκυλιά ή σε άλλα μυρκαστικά (Hill, 1961). Στη διαπίστωση αυτή έχουν οδηγηθεί και επιστήμονες που παρατήρησαν σε πειράματα ότι η παγκρεατική απόκριση στην σεκρετίνη είναι μικρότερη στα πρόβατα από ότι στα σκυλιά (Caple & Hill, 1975) όπως και το γεγονός ότι στα πρόβατα η χρήση χολεκυστοκινίνης είχε μικρή επίδραση στην έκκριση των ενζύμων και καμία επίδραση στους παγκρεατικούς χυμούς.

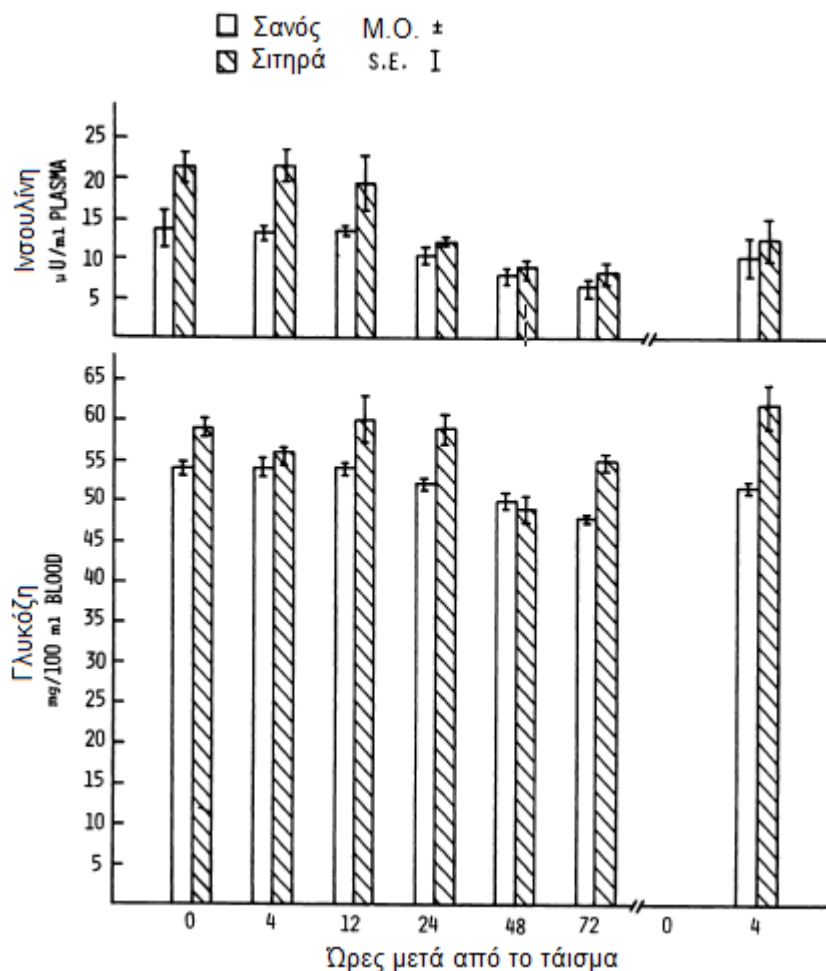
Γενικά έχει αποδειχθεί ότι η έκκριση της ινσουλίνης στα πρόβατα εξαρτάται σημαντικά από το ρυθμό διεργασιών ζύμωσης στη μεγάλη κοιλία (Ostaszewski & Barej, 1979). Επιπλέον, πειράματα από Reynolds & Health (1981) έδειξαν ότι η και τα πνευμονογαστρικά νεύρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διέγερση της παραγωγής των ενζύμων και στη ροή των παγκρεατικών εκκριμάτων των προβάτων. Μεταβολές στην κατανομή της ινσουλίνης και τα επίπεδα του γλυκαγόνου έχουν παρατηρηθεί από τους Ostaszewski & Barej 1979 που αναφέρουν ότι η αύξηση της δραστηριότητας στη μεγάλη κοιλία, εξαιτίας ζύμωσης των τροφών, μετά το τάισμα προκαλούσε διέγερση στην παγκρεατική ενδοκρινική δραστηριότητα

Ορισμένες διαφορές σχετικά με διαφορετικές φυλές προβάτων και την έκκρισης των χυμών του παγκρέατος έχουν αναφερθεί από του Caple & Health (1975) και Reynolds & Health (1981) οι οποίοι τον αποδίδουν στο δεσπόζων ρόλο του πνευμονογαστρικού νεύρου για την παραγωγή του παγκρεατικού χυμού. Πιθανώς η εξάρτηση της ινσουλίνης από το πνευμονογαστρικό νεύρο στην έκκριση του

παγκρέατος έχει αναπτυχτεί πολύ περισσότερο στα μηρυκαστικά από ότι στα μονογαστρικά ζώα.

Τα πειράματα των Harrison & Hill (1962) σχετικά με τα πρόβατα έδειξαν σχετικά σταθερό ρυθμό έκκρισης της χολής και παγκρέατος κατά τη διάρκεια της ημέρας. Παρόλα αυτά όπως ήταν αναμενόμενο παρατηρήσεις έδειξαν ότι μετά το τάισμα εμφανίζεται αύξηση του επιπέδου της ινσουλίνης στο αίμα και στο παγκρεατικό χυμό.

Η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στα επίπεδα ινσουλίνης στα πρόβατα. Οι Horino et al (1968) βρήκαν ότι ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση με λιπαρά οξέα (μικρής αλυσίδας) είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ινσουλίνης στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών αλλά όχι των μονογαστρικών ζώων. Σε μελέτη που έχει γίνει από τον Trenkle (1970) έχει βρεθεί ότι σε πρόβατα που τρέφονταν με σανό, οι συγκεντρώσεις τις γλυκόζης και της ινσουλίνης ήταν μικρότερες από ότι όταν τρέφονταν με σιτηρά (Εικόνα 12)



Εικόνα 12. Επίδραση της διατροφής στις συγκεντρώσεις της ινσουλίνης και της γλυκόζης στο πλάσμα προβάτων που τρέφονταν με δύο διαφορετικές δίαιτες.

Διάφοροι άλλοι παράγοντες όπως το είδος, η ηλικία, η φυλή, η θερμοκρασία, η γαλουχία και η εγκυμοσύνη καθώς και πιθανές ασθένειες επηρεάζουν τα επίπεδα της ινσουλίνης στα μηρυκαστικά (Jong 1979, Sasaki and Takahashi 1980, Grizard and Szczygiel 1983, McCann and Hansel 1986, Emmison et al. 1991, Başğlu et al. 1998, Sternbauer and Luthman 2002, Miao et al. 2008, Udum et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί μείωση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στα πρόβατα με την αύξηση της ηλικίας τους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ινσουλίνης έχουν βρεθεί σε πρόβατα ηλικίας 1-3 και 4-6 μηνών. Επιπλέον η συγκέντρωση της ινσουλίνης στο πλάσμα των προβάτων είναι υψηλότερη σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλότερη σε χαμηλές (Sasaki & Takahashi 1980).

2.6.2 Διαβητικά πρόβατα

Σε πειράματα που έχουν γίνει βρέθηκε ότι ενώ η ενδοστομαχική σίτιση σε υγιή πρόβατα προκαλούσε μια προσωρινή αύξηση του όγκου των εκκρίσεων στο πάγκρεας στα διαβητικά πρόβατα αυτή δεν ήταν αναποτελεσματική. Γενικά σε διαβητικά πρόβατα η ροή του χυμού του παγκρέατος είναι πολύ μειωμένη και έχει βρεθεί ότι αποκαθίσταται εν μέρη μετά από την χορήγηση ινσουλίνης.

Γενικά αλλαγές στην συγκέντρωση της ινσουλίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή χυμού του παγκρέατος. Ο διεγερτικός ρόλος της ινσουλίνης έχει εξηγηθεί από τους Korc, et al. (1978) και Korc et al. (1981). Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα η ινσουλίνη διεγείρει άμεσα τις ενζυμικές πρωτεΐνες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί αναλυτικά στο κεφάλαιο που περιγράφεται η δράση της ινσουλίνης, η ινσουλίνη έχει διεγερτικές επιπτώσεις στο αναβολικό μεταβολισμό των ζώων και των ανθρώπων (Brockman 1978, Latimer et al. 2003, Fischbach 2004, Aronoff et al. 2004, Chatterjea, 2004, Chatterjea and Shinde 2005) και έχει βρεθεί πως όταν γίνεται ένεση ινσουλίνης στα ζώα η σύνθεση των λιπιδίων εντείνεται.

Επιπλέον ο Saito et al (1980) βρήκε ότι η ινσουλίνη ενίσχυε τη θεχολευστοκινίνη σε πάγκρεας που είχε απομονωθεί από αρουραίους και είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση στη συγκέντρωση τόσο των παγκρεατικών υγρών όσο και της αμυλάσης. Σε πειράματα που έχουν γίνει για την θεραπεία διαβητικών προβάτων με

χορήγηση ινσουλίνης είχε σαν αποτέλεσμα να αποκατασταθεί η λιπάση αλλά όχι η αμυλάση. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι η ενδοφλέβια χρήση ινσουλίνης στα πρόβατα βρέθηκε ότι προκαλεί μεγαλύτερη τόνωση στην ινσουλίνη από ότι η ένεση με βουτυρικό, προπιονικό οξύ και γλυκόζης (Trenkle 1970). Γενικά τα μηρυκαστικά αποκρίνονται λιγότερο στην χορήγηση ινσουλίνης από ότι τα μη μηρυκαστικά (Grizard & Szczygiel 1983, Sternbauer & Luthman 2002)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αυξητικοί παράγοντες IGF 1 και IGF 2

3.1 Υπόφυση

Η υπόφυση θεωρείται ο σημαντικότερος ενδοκρινής αδένας γιατί με την έκκριση της ρυθμίζει τη λειτουργία τριών περιφερειακών αδένων, το θυρεοειδή, του φλοιού των επινεφριδίων και των γονάδων και έχει δράση σε πολλούς μεταβολικούς στόχους. Η υπόφυση αποτελεί μικρό ωοειδές μόρφωμα το οποίο κρέμεται από την κάτω επιφάνεια του εγκεφάλου με ένα στέλεχος το οποίο συνδέεται με τον υποθάλαμο και ονομάζεται μίσχος της υπόφυσης. Βρίσκεται στη βάση του κρανίου και προστατεύεται από την οστέινη θήκη του σφηνοειδούς οστού, το εφίπιο (Μπατρινός, 1999).

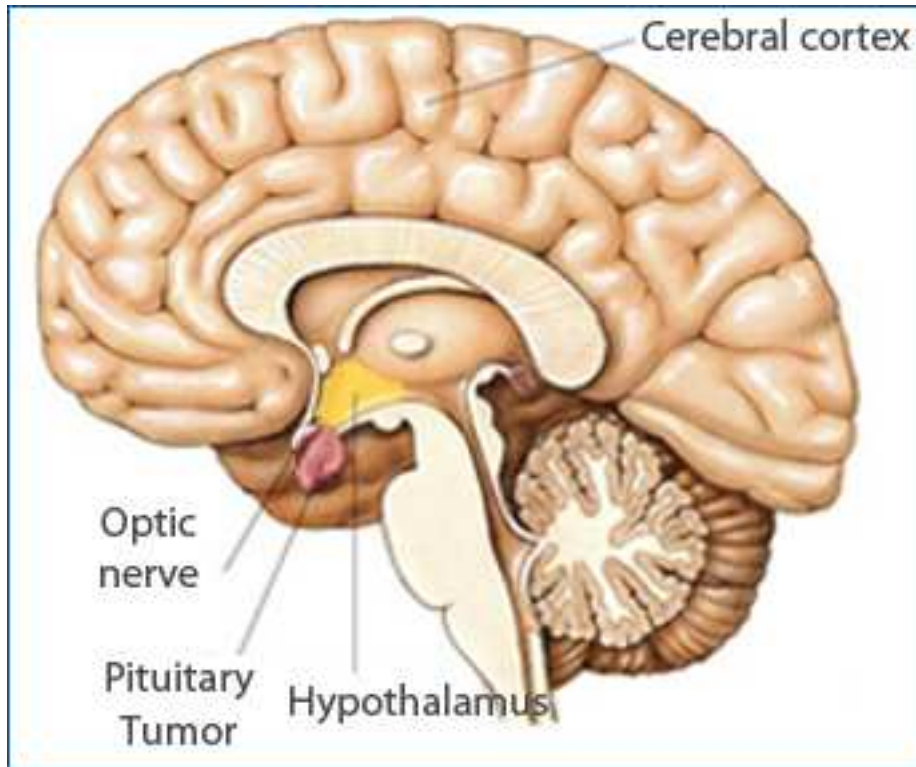
Η υπόφυση αποτελείται από δύο κύρια τμήματα : την αδενουπόφυση και την νευροϋπόφυση με διαφορετική εμβρυολογική προέλευση, ιστολογική υφή και λειτουργία (Χαρσούλης 1998). Η αδενουπόφυση αποτελεί το 75% του βάρους του αδένος και προέρχεται από προεκβολή του έξω βλαστικού δέρματος, γνωστού ως θύλακας του Rathke, ενώ η νευροϋπόφυση προέρχεται από νευρικά κύτταρα.

Η αδενουπόφυση αποτελείται από τρεις λοβούς : τον πρόσθιο λοβό, το διάμεσο λοβό και τη χοανική μοίρα. Ο διάμεσος λοβός είναι υποτυπώδης στον άνθρωπο και αποτελείται από μια μικροσκοπική σχισμή. Η χοανική μοίρα αποτελεί προέκταση του πρόσθιου λοβού κατά μήκος του μίσχου της υπόφυσης και αποτελείται από γοναδοτρόπα, φλοιοτρόπα και θυρεοειδοτρόπα κύτταρα. Η νευροϋπόφυση περιλαμβάνει το μέσο έπαρμα του υποθαλάμου, τη χοάνη ή μίσχο και τον οπίσθιο λοβό (Χαρσούλης 1998).

Οι ορμόνες της αδενουπόφυσης υπό την επίδραση υποθαλαμικών ορμονών συντίθενται από πέντε διαφορετικές ομάδες εκκριτικών κυττάρων :

1. Τα σωματοτρόπα τα οποία εκκρίνουν την αυξητική ορμόνη (GH)
2. Τα γοναδοτρόπα που εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες (LH, FSH)
3. Τα λακτοτρόπα κύτταρα τα οποία εκκρίνουν την προλακτίνη (PRL)

4. Τα θυρεοειδοτρόπα κύτταρα τα οποία εκκρίνουν την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH).
5. Τα κορτικοτρόπα κύτταρα τα οποία εκκρίνουν τη φλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH) (Μπατρινός 1999, Ντούμα 2006)



Εικόνα 13. Υπόφυση

3.2 Αυξητική ορμόνη

Η αυξητική ορμόνη (σωματοτροπίνη), οι ορμόνες του θυρεοειδούς (θυρεοειδικές ορμόνες), η τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα είναι οι βασικότερες ορμόνες που επηρεάζουν την αύξηση. Από αυτές η σωματοτροπίνη είναι η κυριότερη ορμόνη που ρυθμίζει την ανάπτυξη μετά την γέννηση. Η κυριότερη δράση της είναι η έμμεση επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης σε πολλούς ιστούς στόχους. Συγκεκριμένα η αυξητική ορμόνη προάγει την επιμήκυνση των ιστών διεγείροντας την ωρίμανση και την κυτταρική διαίρεση των χονδροκυττάρων στους επιφυσιακούς δίσκους. Με αυτό τον μηχανισμό διεγείρεται συνεχώς ο συζευκτικός χόνδρος και έτσι παρέχεται υλικό για τον σχηματισμό οστού (Vender et al 2004)

3.3 Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν οικογένειες εκκρινόμενων μορίων τα οποία συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς και ενεργοποιούν αλληλουχίες διαβίβασης μοριακών εντολών απαραίτητων στην ανάπτυξη των οργανισμών. Ο αριθμός των οικογενειών των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους είναι μικρός δεδομένου του σημαντικού τους ρόλου. Κατά την διάπλαση του οργανισμού καθοδηγούν τους διαφόρους τύπους κυττάρων ώστε να πολλαπλασιαστούν, να διαφοροποιηθούν και να οργανωθούν σε κυτταρικές σειρές ειδικές για κάθε ιστό. Οι οδοί διαβίβασης των μοριακών σημάτων (εντολών) του οποίους ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες είναι πολύ λίγες και συνεπώς η κυτταρική αντίδραση στην ίδια μοριακή εντολή είναι διαφορετική εξαρτώμενη από την φύση του κυττάρου – δέκτη (Καλύβα 2010).

3.4 Ιστορικά στοιχεία για τους αυξητικούς παράγοντες IGF 1 και IGF 2

Είχε παρατηρηθεί από διάφορους επιστήμονες ότι αρουραίοι με εκτομή της υπόφυσης παρουσίαζαν μειωμένη σύνθεση της θεμέλιας ουσίας των χόνδρων η οποία επανερχόταν σε φυσιολογικό επίπεδα με την χορήγηση αυξητικής ορμόνης (GH). Το 1957 οι Salmon & Daughaday διατύπωσαν την υπόθεση ότι αυξητική ορμόνη δρα στους σκελετικούς ιστούς προκαλώντας την έκφραση ενός άλλου μορίου που ονομάστηκε σωματομεδίνη, η οποία δρα στον χόνδρο της επιφυσιακής πλάκας για να διεγείρει την επιμόκηση των οστών (Καλύβα 2010).

Μεταγενέστερες μελέτες, από τον Froesch και τους συνεργάτες του (1963), ανακάλυψαν κι άλλους παράγοντες του ορού με μεταβολικές δράσεις που μοιάζουν της ινσουλίνης οι οποίες δεν εξουδετερώνονται με αντισώματα εναντίον της ινσουλίνης ενώ οι Dulak & Termin (1973) απέδειξαν ότι οι σχετικές ουσίες μπορούν να διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καλλιέργειες ιστού. Η απομόνωση και ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής των μορίων αυτών από τους Rinderknecht & Humbel (1978) έδειξε ότι δυο συγγενή πολυπεπίδια με μοριακό βάρος 7,5 kDa ήταν υπεύθυνα για τις προαναφερθείσες βιολογικές δραστηριότητες. Λόγω της δομής και λειτουργικής τους ομοιότητας με την ινσουλίνη ονομάστηκαν ινσουλινικοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs) και για την ακρίβεια IGF – I και IGF – II. Ο Klapper και οι συνεργάτες του (1983) ανακάλυψαν ότι ο IGF - I είναι ένα πολυπεπίδιο αποτελούμενο από 70 αμινοξέα που ρυθμίζεται από την υπόφυση και ήταν αυτό που παλιότερα ονομάζονταν σωματομεδίνη ενώ οι Marquardt και οι συνεργάτες του

(1981) ανακάλυψαν ότι ο IGF – II αποτελείται από 67 αμινοξέα και ισοδυναμεί με τον παράγοντα που προκαλούσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις καλλιέργειες ιστών (Καλύβα 2010).

3.5 Παράγοντας IGF

Η αυξητική ορμόνη διεγείρει την κυτταρική διαίρεση όχι άμεσα αλλά έμμεσα με τη μεσολάβηση χημικών μηνυμάτοφόρων μορίων, των οποίων η σύνθεση και η απελευθέρωση προκαλείται από την αυξητική ορμόνη. Το μόριο αυτό λέγεται ινσουλινομημητικός παράγοντας (IGF - I). Υπό την επίδραση της αυξητικής ορμόνης ο IGF – I εκκρίνεται από το ήπαρ εισέρχεται στο αίμα και δρα ως ορμόνη. Επιπλέον η αυξητική ορμόνη διεγείρει την έκκριση του IGF - I από πολλούς άλλους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των οστών, στις θέσεις όμως αυτές ο IGF – I δρα ως αυτοκρινής ή παρακρινής παράγοντας. Ο τρόπος με το οποίο η αυξητική ορμόνη και ο IGF αλληλεπιδρούν είναι ο εξής :

1. Η αυξητική ορμόνη διεγείρει τα πρόδρομα κύτταρα των χονδροκυττάρων (προχονδροκυτταρικά) και / ή τα νέα σε ηλικία διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα στους συζευκτικούς δίσκους για να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα.
2. Κατά την διάρκεια αυτής της διαφοροποίησης τα κύτταρα ξεκινούν να εκκρίνουν IGF - I και ταυτόχρονα να απαντούν στα ερεθίσματα του IGF - I.
3. Ο IGF – I ενεργεί τότε ως αυτοκρινής ή παρακρινής παράγοντας και διεγείρει την κυτταρική διαίρεση των υπό διαφοροποίηση, χονδροκυττάρων.

Και στα πρόβατα πιο συγκεκριμένα αρκετά εργαστηριακά πειράματα έχουν δείξει ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ του παράγοντα IGF -1 και την ανάπτυξη τους (Olsen et al., 1981; Roberts et al., 1990; Hegarty et al., 2006). Διάφοροι ερευνητές έχουν βρει συσχέτιση μεταξύ του αυξητικού παράγοντα IGF I και τον χαρακτηριστικών αύξησης τους (Olsen et al., 1981; Roberts et al., 1990; Hegarty et al., 2006). Οι Afolayan & Fogarty (2008) μελέτησαν τα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα IGF 1 στο πλάσμα των νεαρών προβάτων από 30 διαφορετικούς προγόνους. Η συγκέντρωση του IGF 1 συσχετίστηκε με την πρόσληψη τροφής, τη σύσταση του σώματος, την ποσότητα του μαλλιού. Στα αποτελέσματα τους βρήκαν ότι υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του IGF 1 στο πλάσμα και

της πρόσληψης τροφής. Θετική ήταν επίσης η συσχέτιση της μυϊκής σύστασης των προβάτων με την συγκέντρωση του IGF 1 ενώ αρνητική ήταν η συσχέτιση με την ποσότητα λίπους στα πρόβατα. Μεταξύ της ποσότητας μαλλιού στα πρόβατα και της συγκέντρωσης IGF 1 δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Δεδομένου ότι τα πρόβατα αυτά προέρχονταν από διαφορετικούς απογόνους ενδέχεται να υπάρχει γονιδιακή διαφοροποίηση όσον αφορά την παραγόμενη ποσότητα IGF -1 και ενδεχομένως η επιλογή ατόμων με χαμηλή ποσότητα IGF να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση της εκτροφής τους.

Στα πρόβατα οι Gluckman et al. (1983) παρατήρησαν ότι η οι συγκεντρώσεις IGF 1 είχαν θετική συσχέτιση με το βάρος και το μέγεθος που γεννιόταν τα πρόβατα. Επιπλέον οι Olsen et al. (1981) αναφέρουν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της IGF 1 στο αίμα και στην αύξηση του βάρους των προβάτων.

Ο IGF - I, είναι επίσης απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και ειδικότερα για την σωστή ωρίμανση του νευρικού συστήματος του εμβρύου (Vender et al 2004). Στα κυοφορούντα πρόβατα έχει βρεθεί πειραματικά ότι ο περιορισμός της αύξησης του πλακούντα έχει σαν αποτέλεσμα μικρότερες συγκεντρώσεις IGF-1 στο έμβρυο αλλά δεν υπήρχε μεταβολή στην έκφραση του IGF-1 και IGF-2 mRNA (Kind et al. 1995). Επιπλέον έχει γίνει η υπόθεση ότι η απάντηση του εμβρύου στην ελλιπή λειτουργία του πλακούντα περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση των καρδιακών IGF-1R και IGF -2 R γονιδίων η οποία σε αρκετές περιπτώσεις διατηρείται και στη μεταγενέστερη ζωή του προβάτου με αποτέλεσμα την καρδιομυϊκή υπερτροφία (Afolayan & Fogarty, 2008).

Αντίθετα η έκκριση του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα – II (IGF – II), είναι ανεξάρτητη της αυξητικής ορμόνης. Ο IGF – II είναι βασικό μιτογόνο κατά την ενδομήτρια ζωή και συνεχίζει να εκκρίνεται καθόλη την διάρκεια της ζωής, αλλά η λειτουργία του μετά την γέννηση είναι άγνωστη (Μανζτώρου 2005).

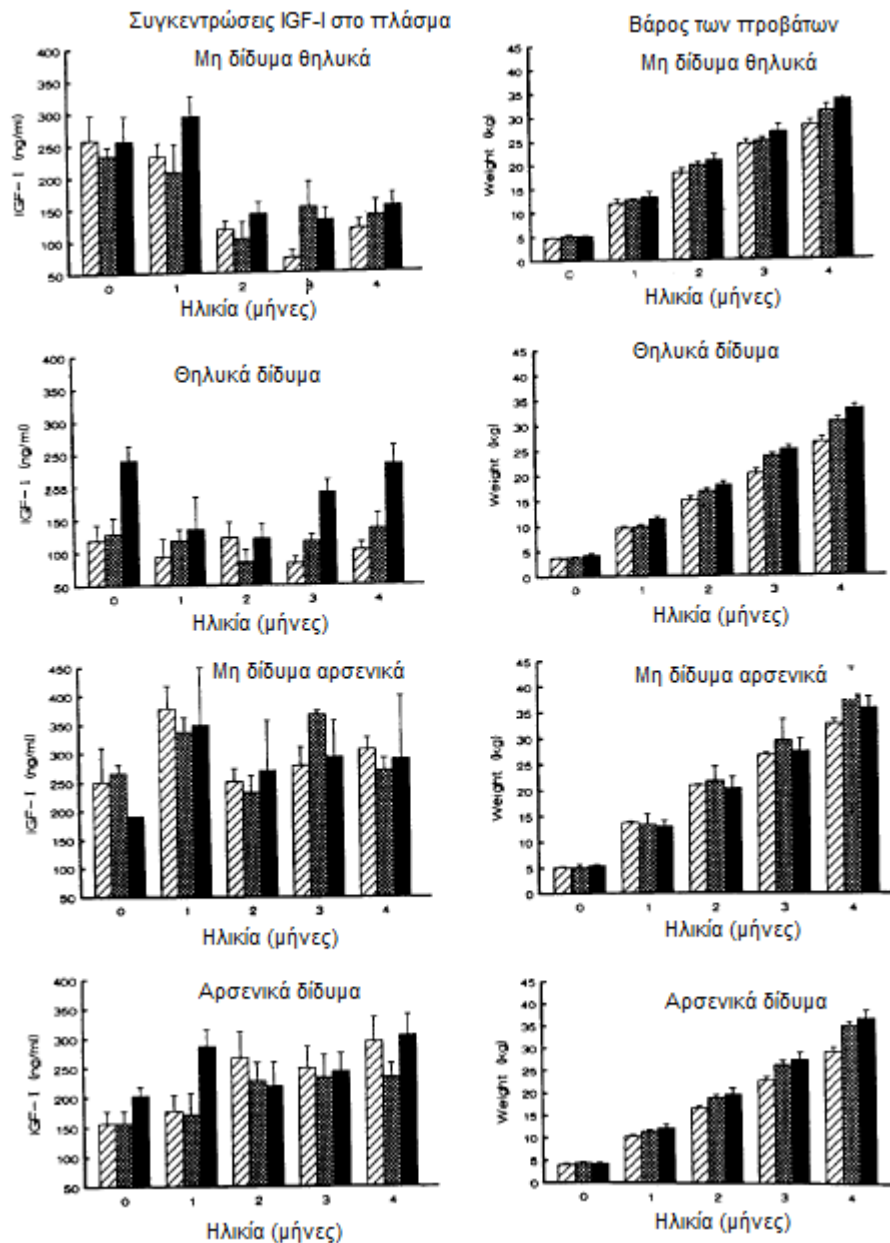
Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προηγούμενα φαίνεται ότι ο IGF 1 θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο φυσιολογικό δείκτη που θα βοηθούσε στον έλεγχο και την επιλογή των ζώων σε νεαρή ηλικία δεδομένου ότι ο IGF1 είναι ορμόνη που επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη. Σε αυτό συντελεί και το ότι μπορεί να μετριέται σχετικά εύκολα σε νεαρά ζώα και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφτούν μελλοντικές επιδόσεις, ειδικά για γνωρίσματα της παραγωγής που είναι δύσκολο να μετρηθούν με ακρίβεια όπως π.χ η αποδοτικότητα των ζωοτροφών (Bunter et al., 2005).

3.6 IGF και παράγοντες που τον επηρεάζουν στα πρόβατα

Οι Medrano & Bradford το 1991 μελέτησαν τις διαφορές της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στο αίμα προβάτων από σειρές προβάτων που προέρχονταν από διαφορετικούς προγόνους. Τα πρόβατα αυτά βρίσκονταν στο στάδιο του απογαλακτισμού. Οι συγκεντρώσεις αυτές εξετάστηκαν και ως προς το φύλο αλλά και ως το αν τα άτομα πρόβατά είχαν γεννηθεί μόνα τους ή ως δίδυμα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στην εικόνα 20. Στη δεξιά στήλη δίνεται επίσης και το μέσο μέγεθος για κάθε σειρά.

Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι στα πρόβατα υπάρχει διαφορά στην συγκέντρωση του IGF 1 παράγοντα ανάμεσα στα αρσενικά και θηλυκά άτομα. Η συγκέντρωση του IGF 1 παράγοντα στα αρσενικά ήταν της τάξης του 1,5 με 2 φορές μεγαλύτερη. Ανάλογες διαφορές στην συγκέντρωση IGF 1 ανάμεσα στα αρσενικά και θηλυκά άτομα έχουν βρεθεί και από άλλους ερευνητές (Roberts et al. 1990, Morel et al 1991, Medrano & Bradford 1991).

Παρόλα αυτά όμως διαφορές στην συγκέντρωση της IGF 1 μεταξύ των διαφορετικών σειρών δεν προέκυψαν.



Εικόνα 14. Αριστερά : Μέσο όρος και τυπικό σφάλμα της συγκέντρωσης του IGF 1 στο πλάσμα. **Δεξιά :** Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα βάρους. Ο διαφορετικός χρωματισμός της κάθε μπάρας στο σχεδιάγραμμα αντιστοιχεί σε πρόβατα που προέρχονταν από διαφορετικούς προγόνους

Γενικά έχει αναφερθεί ότι η κληρονομικότητα όσον αφορά τα επίπεδα της συγκέντρωσης της IGF-1 είναι μέτρια στα πρόβατα και αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από άλλους μη κληρονομικούς παράγοντες όπως η ποιότητα των ζωοτροφών και η άπαχος διατροφή (Blair et al., 2002). Γενικά η έκκριση και η δραστηριότητα

του IGF μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφική κατάσταση του ατόμου και από πολλές άλλες ορμόνες εκτός της αυξητικής (π.χ οιστρογόνα).

Άλλοι μη γενετικοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα της IGF - 1 στο πλάσμα είναι η ηλικία των προβάτων (Roberts et al. 1990, Morel et al. 1991) όπως προαναφέρθηκε το φύλο όπου έχουν βρεθεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις IGF1 στα αρσενικά πρόβατα (Roberts et al., 1990, Morel et al., 1991, Medrano and Bradford, 1991) καθώς και η θερμοκρασία και η υγρασία αλλά θα πρέπει να αναφερθεί πως αυτές οι δύο τελευταίες παράμετροι σχετίζονται και επηρεάζουν την ποσότητα πρόσληψης τροφής (Holland et al. 1988, Sarko et al. 1994)

Παρά τον μικρό βαθμό κληρονομικότητας έχει αναφερθεί πως υπάρχουν ορισμένες δυνατότητες για γενετική βελτίωση όσον αφορά την συγκέντρωση της IGF 1 π.χ. με την επιλογή ατόμων που βρίσκονται σε νεαρά στάδια (λίγο μετά τον απογαλακτισμό) Blair et al., 2002

Πέρα από την δράση της IGF στην ανάπτυξη των προβάτων έχει αναφερθεί ότι κατέχει σημαντικό ρόλο και στον έλεγχο της αναπαραγωγή τους δεδομένου ότι εμπλέκεται στην σεξουαλική ωρίμανση και λειτουργία των όρχεων και των ωοθηκών (Holly, 2004). Ποιο συγκεκριμένα ο IGF -1 και GH αλληλεπιδρούν με τις ορμόνες της υπόφυσης που ρυθμίζουν την αναπαραγωγική και τη σεξουαλική λειτουργία (Spiterigrech & Nieschlag, 1992).

Η IGF-1 επηρεάζει πολλές λειτουργίες στους όρχεις συμπεριλαμβανομένης και της προώθησης της σύνθεσης της τεστοστερόνης στα κύτταρα Leydig (Lin et al, 1986) καθώς και στην σπερμογονία (Soder et al 1992). Επιπλέον ο IGF -1 που παράγεται από τα κύτταρα Sertoli διεγείρει την σύνθεση γάλατος (Grootegoed, 1988) την μεταφορά της γλυκόζης (Oonk et al., 1989) καθώς και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Borlard et al. 1984).

Αν και η παραγωγή IGF-1 ρυθμίζεται κυρίως από την έκκριση της αυξητικής ορμόνης έχει επίσης αποδειχτεί ότι τοπικά διεγείρεται και από την ορμόνη FSH η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της λειτουργίας των γονάδων (Cailleu et al., 199).

Οι Park et al. 2010 εξέτασαν κριάρια με υψηλές (> 150 ng/ml) (Α σειρά) και χαμηλές συγκεντρώσεις (< 80 ng/ml) (Β σειρά) IGF 1 αντίστοιχα. Σε κάθε κριάρι πήραν δείγμα σπέρματος με ηλεκτροδιέγερση 4 φορές σε διάστημα 12 μηνών. Επιπλέον για τέσσερα ζώα από κάθε ομάδα έγιναν μετρήσεις mRNA για τον IGF 1

και τον IGF 1 υποδοχέα στους όρχεις και στο ήπαρ. Στο αίμα μετρήθηκε η ποσότητα του IGF 1 της ινσουλίνης και τη τεστοστερόνης.

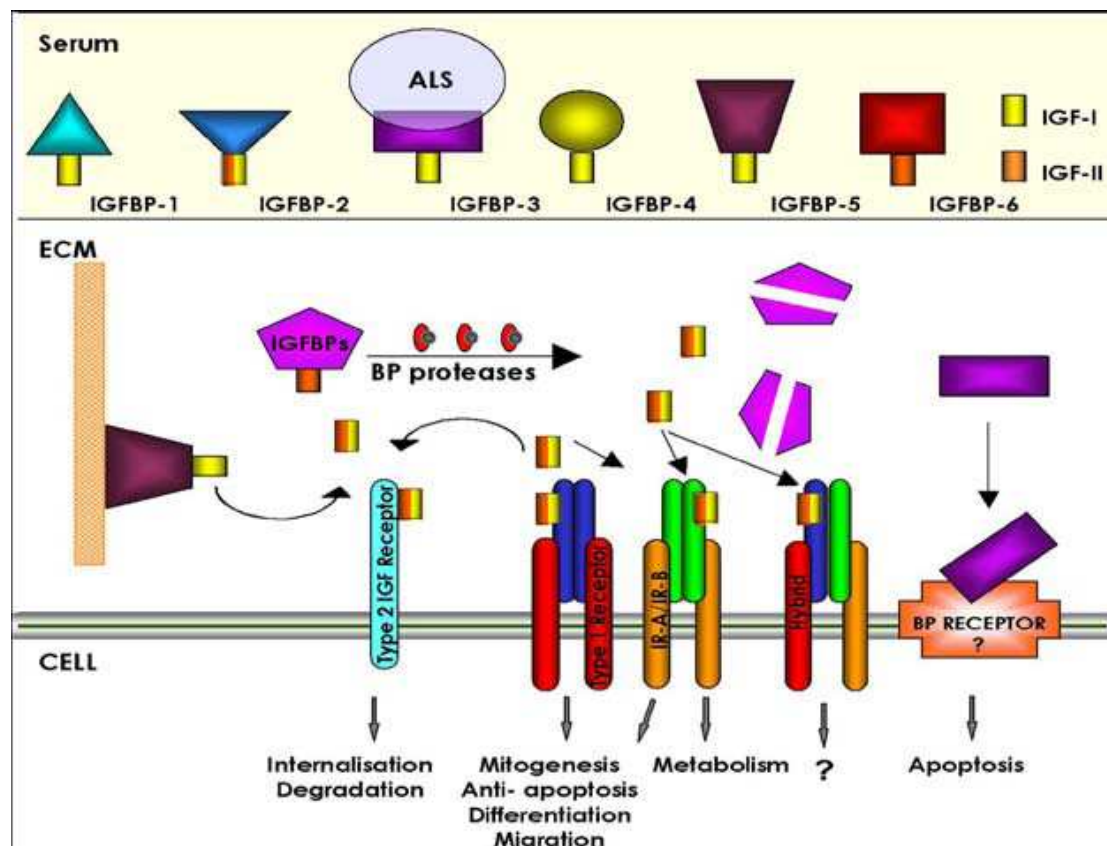
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προαναφερθέντες μετρήσεις οι συγκεντρώσεις mRNA στο ήπαρ στα κριάρια της σειράς A ήταν μεγαλύτερες από αυτά της B σειράς ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο αντίστοιχο mRNA των όρχεων. Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης ήταν μεγαλύτερες στα πρόβατα της A σειράς ενώ δεν διέφεραν οι συγκεντρώσεις τεστοστερόνης. Επίσης δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στις δύο σειρές όσων αφορά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον για την IGF-1 και τον IGF-1 υποδοχέα βρέθηκε αντίστροφη συσχέτιση των συγκεντρώσεων τους στους όρχεις και στο ήπαρ. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως η τεστοστερόνη στα κριάρια μπορεί να μην επηρεάζεται από τον IGF-1 και επιπλέον η ρύθμιση του συστήματος IGF-1 μπορεί να διαφέρει και να είναι αυτόνομη στο ήπαρ και στους όρχεις αντίστοιχα κατά την περίοδο της αναπαραγωγής.

3.7 IGF υποδοχείς

Η μιτωτική δραστηριότητα των IGF – I και IGF – II εξαρτάται από ειδικούς υποδοχείς που ονομάζονται IGF – R. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από γλυκοπρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης των κυττάρων και μέλη της οικογένειας των τυροσίνη – κινάση υποδοχέων (Stull 2003).

Η μιτογόνος επίδραση του IGF-I και του IGF-II μεσολαβείται κατά κύριο λόγο μέσω πρόσδεσης στον IGF-I υποδοχέα (IGF-IR), ενώ οι επιδράσεις της ινσουλίνης μετά από πρόσδεση με τον δικό της ειδικό υποδοχέα (IR). Μεταξύ των δύο συστημάτων υπάρχει έντονη επικοινωνία, όχι μόνο λόγω της σημαντικής δομικής ομοιότητας μεταξύ των IGF μορίων και της ινσουλίνης αλλά και μεταξύ του IGF-IR και του IR. Και οι δύο υποδοχείς IGF-IR και IR είναι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας και μέλη των υποδοχέων κινασών τυροσίνης (LeRoith et al. 1995; Nakae et al. 2001). Οι IGFs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον IR, με μικρότερη, ωστόσο, συγγένεια σε σχέση με την ινσουλίνη. Ο IGF-II δεσμεύεται στον IR με μεγαλύτερη συγγένεια σε σύγκριση με τον IGF-I, αλλά συνδέεται με τον IGF-IR με παρόμοια συγγένεια σε σχέση με τον IGF-I (Juul 2003). Οι IGF-I, IGF-II και η ινσουλίνη μετά την πρόσδεση τους στον υποδοχέα IGF-IR ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μεταγωγικά μονοπάτια που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την μετανάστευση και προστατεύουν από την απόπτωση. Αρχικοί στόχοι φωσφορυλίωσης του IGF-IR

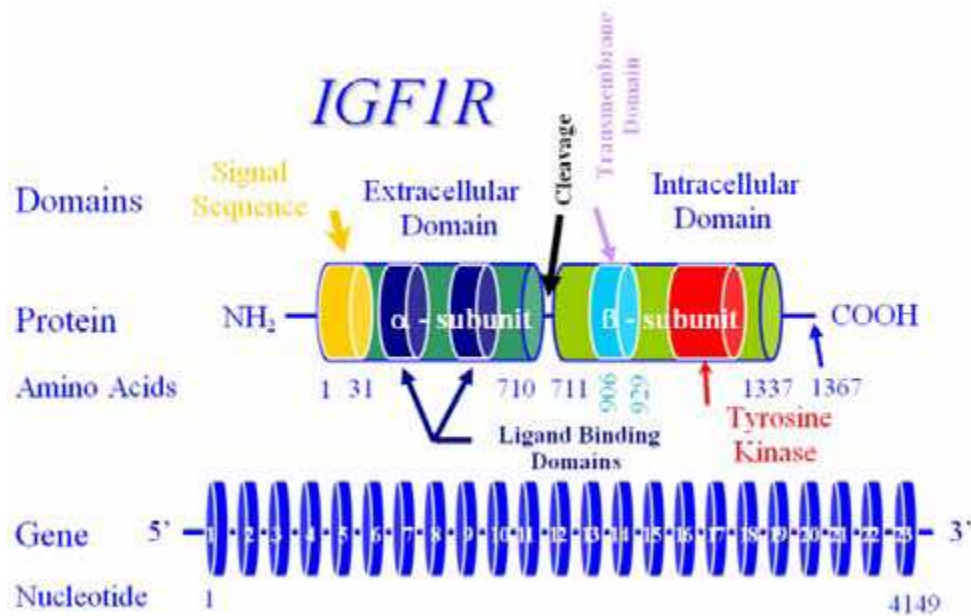
είναι οι IRS πρωτεΐνες, ενώ προς τα κάτω σηματοδοτικά μόρια είναι η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη 3-κινάση, AKT, TOR, S6 κινάση και η MAP κινάση (Εικόνα 15) (Denley et al. 2005).



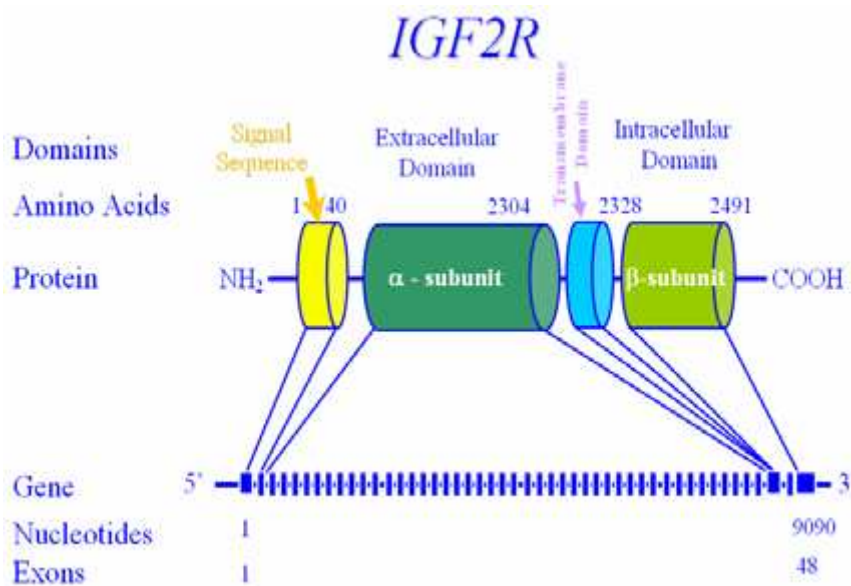
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση του IGF συστήματος. Το IGF σύστημα συνίσταται από τους υποδοχείς (IGF-IR, δύο IR ισομορφές, IGF-IR:IR υβρίδια και IGF-IIR), τα πεπτίδια (IGF-I, IGF-II και ινσουλίνη) και έξι αυξημένης συγγένειας IGFBPs. Οι IGFs κυκλοφορούν κυρίως ως IGF:IGFBP-3:ALS σύμπλεγμα. Η απελευθέρωση των IGFs από τις IGFBPs συμβαίνουν μετά από IGFBP πρωτεόλυση ή πρόσδεση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Οι IGFBPs μπορούν επίσης να δρουν ανεξάρτητα του IGF εισερχόμενες στο κύτταρο μέσω απροσδιόριστων ακόμη υποδοχέων. Ο IGF-IIR ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητα του IGF-II (Denley et al. 2005).

Ο IGF-IR είναι μια ετεροτετραμερής πρωτεΐνη η οποία συνίσταται από δύο α υπομονάδες που διαπερνούν την μεμβράνη και δύο ενδοκυττάρια β υπομονάδες. Οι α υπομονάδες περιέχουν τις θέσεις που προσδέεται ο IGF-I και συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι β υπομονάδες περιέχουν μια διαμεμβρανική περιοχή, μια θέση πρόσδεσης ATP και μια περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης, η οποία συνιστά τον μηχανισμό μετάδοσης σήματος για τον υποδοχέα (Cohen 2006). Το IGF-1R

γονίδιο χαρτογραφείται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 15 (Werner & Maor 2006).



Εικόνα 16. Δομή και μετάφραση των IGF-IR.



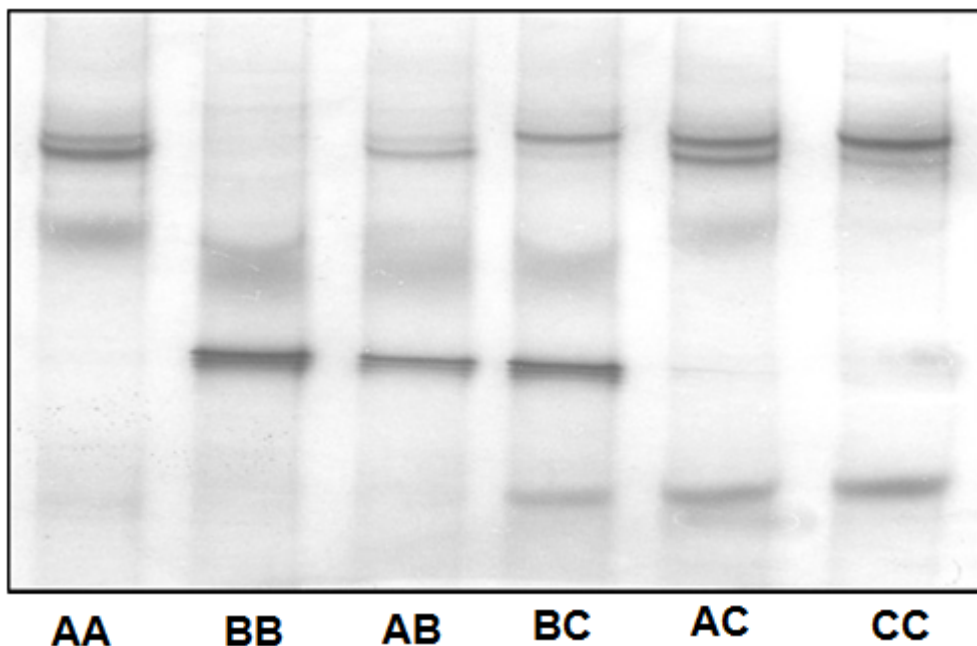
Εικόνα 17. Δομή και μετάφραση των IGF-IR.

Ο IGF-II έχει τον δικό του ειδικό υποδοχέα, IGF-IR, που είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία δεν έχει ενδογενή δραστηριότητα σηματοδότησης. Δρα ως αρνητικός ρυθμιστής αφού λειτουργεί ως παράγοντας κάθαρσης για τον IGF-II μέσω εσωτερίκευσης και αποικοδόμησης της κυτταρικής επιφάνειας που έχει

συνδεθεί ο IGF-II. Δεν φέρει δομική ομολογία με τον IGF-IR και μπορεί να προσδεθεί ο IGF-II, και η 6-P μαννόζη καθώς επίσης και το ρετινοϊκό οξύ, ενώ ο IGF-I προσδέεται με σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια και η ινσουλίνη δεν προσδέεται καθόλου (Nielsen 1992).

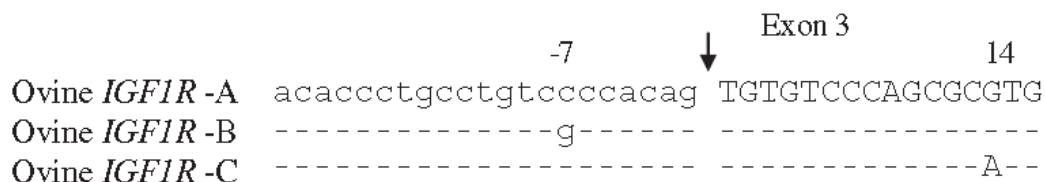
Υπάρχουν δύο ισομορφές του IR: η κλασική ισομορφή (IR-B) που ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης, εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, μυϊκό και λιπώδη ιστό και έχει χαμηλή συγγένεια για τους IGFs, καθώς και η ισομορφή B του υποδοχέα, που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 11, εκφράζεται στους εμβρυϊκούς ιστούς και σε κάποιους όγκους και στον οποίο προσδέεται ο IGF-II με αυξημένη συγγένεια για να προάγει τον πολλαπλασιασμό και για να παρέχει προστασία από την απόπτωση (Riedemann & Macaulay 2006). Επιπρόσθετα, λειτουργικοί υποδοχείς υβριδίων μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ του IGF-IR και του IR-A ή IR-B, χωρίς να είναι σαφής ο ρόλος στους στις κυτταρικές αποκρίσεις (Denley et al. 2005).

Από τα προηγούμενα προκύπτει πως ο υποδοχέας IGF διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην δράση της ινσουλίνης και του αυξητικού παράγοντα η οποία εκφράζεται στους αναπαραγωγικούς ιστούς και στα αναπαραγωγικά όργανα καθώς και σε άλλα κύτταρα διαφόρων ζώων (Chandrashekar & Bartke 2003) ενώ επιδρά σε ένα μεγάλο φάσμα βιολογικών διεργασιών όπως ο μεταβολισμός υδρογονανθράκων και λιπιδίων, κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, επιβίωση (Richardson et al. 2004, Sepp-Lorenzino, 1998) και τη γήρρανση (Tatar et al. 2003, Bonkowski et 2006). Παρόλα αυτά λίγα είναι γνωστά για τον πολυμορφισμό του γονιδίου IGFIIR. Σε μελέτη (Byun et al 2008) που έγινε με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε DNA προβάτων βρέθηκαν ότι αυτό το γονίδιο αποτελούταν από συνδυασμούς τριών αλληλομόρφων που καθορίζουν ομόζυγους και ετερόζυγους γενότυπους (Εικόνα 18)



Εικόνα 18. Έξι πρόβατα με διαφορετικό συνδιασμό αλληλόμορφων για το γονίδιο IGFIR.

Η αλληλουχία αυτών των γονιδίων στο ιντρόνιο 2 και εξόνιο 3 δίνονται στην εικόνα 18.



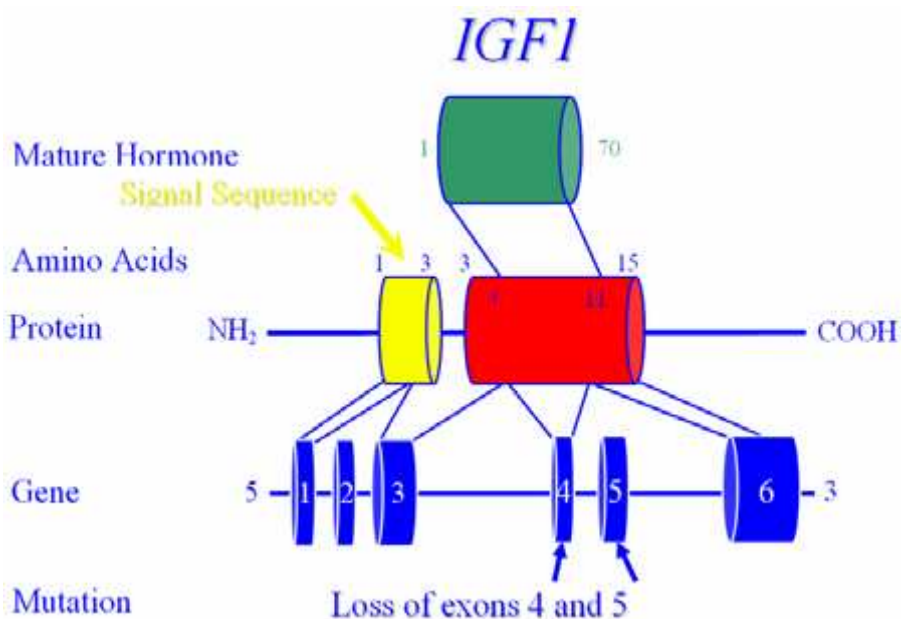
Εικόνα 18. Αλληλουχία 3 αλληλόμορφων γονιδίων για τον υποδοχέα IGFIR στα πρόβατα.

3.8 Γονίδιο IGF – I

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον IGF – I έχει αποδειχθεί ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 και αποτελείται από 6 εξόνια. Τα πρώτα 1 -2 εξόνια εαντιστοιχούν σε μη μεταφρασμένες περιοχές. Το εξόνιο 3 είναι υπεύθυνο για τους Β δεσμούς του μορίου του παράγοντα ενώ το εξόνιο 4 είναι για τους δεσμούς C, A, και D (Mullis 2005).

Το IGF-I γονίδιο εκτείνεται περίπου 95Kb στο DNA του ανθρώπου και περιλαμβάνει έξι εξόνια (Εικόνα 11). Τα εξόνια 1 και 2 κωδικοποιούν εναλλακτικά

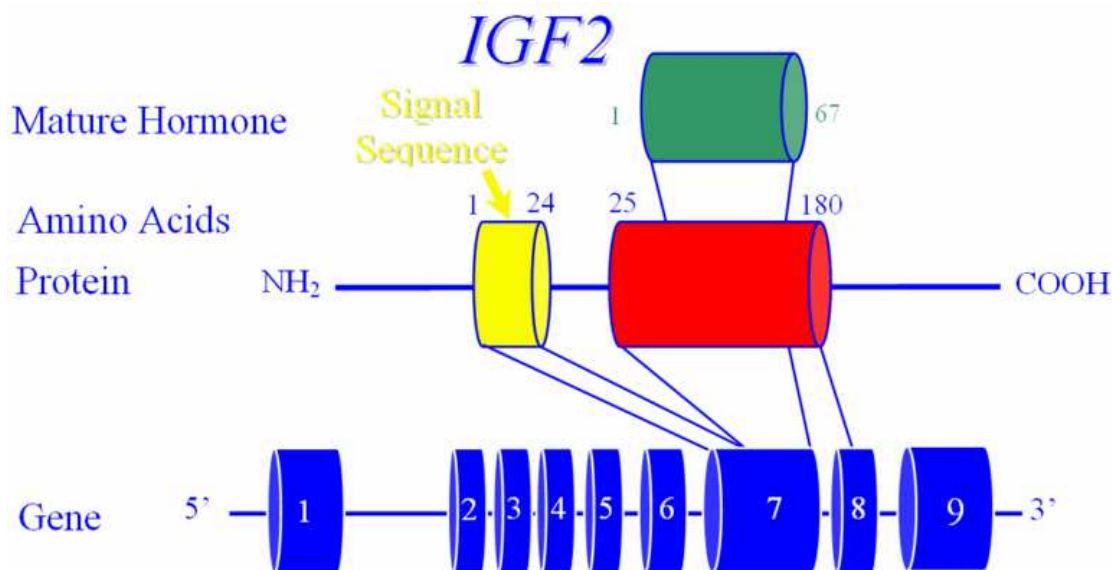
σηματοδοτικά πεπτίδια ξεκινώντας από αρκετές θέσεις έναρξης μεταγραφής. Τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν το υπόλοιπο του σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide), το υπόλοιπο του ώριμου IGF-I μορίου και μέρος του ουραίου πεπτιδίου (trailer peptide). Τα εξόνια 5 και 6 κωδικοποιούν εναλλακτικά μέρη του ουραίου πεπτιδίου (με αποτέλεσμα τις IGF-IA και IGF-IB μορφές) καθώς και 3' αμετάφραστες αλληλουχίες με πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Το IGF-I γονίδιο του ανθρώπου χαρτογραφείται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 12. Πολλαπλά είδη mRNA υπάρχουν για το IGF-1, και αυτό δηλώνει αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου, καθιστώντας δυνατή την ιστοειδική έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφών καθώς επίσης και οντογενετική και ορμονική ρύθμιση. Τα επίπεδα του IGF-I ποικίλλουν δραματικά στους ιστούς και στον ορό και ρυθμίζονται οντογενετικά όπως επίσης από πολλαπλές ορμόνες και θρεπτικούς παράγοντες. Η GH είναι προεξέχων μεταγεννητικό ερέθισμα για την παραγωγή του IGF-I (Cohen 2006).



Εικόνα 19. Δομή και μετάφραση των IGF-I

Ο IGF-II συνίσταται από 67 αμινοξέα και η πρωταρχική αλληλουχία είναι υψηλά συντηρημένη. Χωρίζεται σε A, B, C, D περιοχές, όπου η C περιοχή είναι ανάλογη του συνδετικού πεπτιδίου της προϊνσουλίνης. Η αλληλούχιση του cDNA του IGF-II δείχνει ότι το πρόδρομο μόριο του proIGF-II (preproIGF-II) συνίσταται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 24 καταλοίπων, 67 αμινοξέα που περιλαμβάνουν το

ώριμο πεπτίδιο και 89 αμινοξέα της καρβοξυτελικής επέκτασης που ορίζεται ως E-πεπτίδιο (Εικόνα 20). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον preproIGF-II είναι στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο της ινσουλίνης και μεταγράφεται στον ίδιο προσανατολισμό. Χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 11, εκτείνεται 30kb στο χρωμοσωμικό DNA και συνίσταται από 9 εξόνια. Τα εξόνια 7-8 και 234 νουκλεοτίδια του εξονίου 9 παρέχουν την κωδικοποιούσα περιοχή για το ανθρώπινο preproIGF-II (Nielsen 1992).

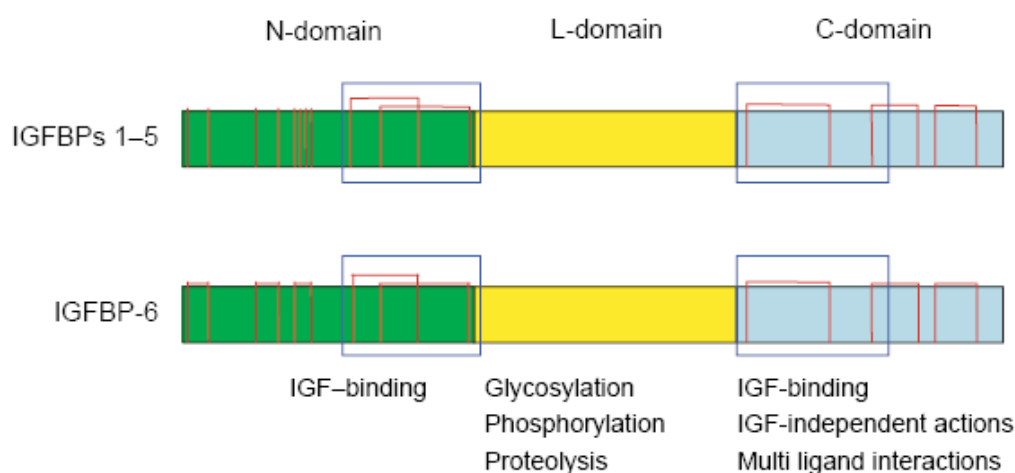


Εικόνα 20. Δομή και μετάφραση των IGF-II

3.9 Δεσμευτικές πρωτεΐνες των IGF (IGFBP)

Η αλληλεπίδραση των IGF μορίων (IGF-I και IGF-II) με την οικογένεια των IGF υποδοχέων μπορεί να ρυθμίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά από αυξημένης συγγένεια πρόσδεση στο εξωκυττάριο υγρό με μια οικογένεια έξι ειδικών IGFBPs (IGFBP-1 έως 6) (Εικόνα 21), που έχουν διαφορετική συγγένεια για τον IGF-I και IGF-II (Denley et al. 2005). Κάθε IGFBP περιλαμβάνει 216-289 αμινοξέα που οργανώνονται σε τρία τμήματα με περίπου ίσο μέγεθος, με τις αμινοτελικές (N-) και καρβοξυτελικές (C-) περιοχές να είναι συνδεδεμένες με έναν «συνδέτη» L-τμήμα (Εικόνα 21) (Bach et al. 2005). Οι IGFBP-1 έως 6 έχουν μεγάλη ομοιότητα στην πρωτοταγή τους δομή (ομοιότητα περίπου 30 έως 40%), με τον μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή. Συντηρημένο δομικό χαρακτηριστικό και των έξι IGFBPs είναι ο αυξημένος αριθμός κυστεϊνών (16-20

κυστεΐνες), συγκεντρωμένες στο αμινοτελικό άκρο και σε μικρότερη έκταση στο καρβοξυτελικό άκρο (Baxter et al. 1998).



Εικόνα 21. Δομική οργάνωση των IGFBPs. Οι IGFBPs έχουν τρεις περιοχές, κάθε μία από τις οποίες συνεισφέρει στις ιδιότητες τους. Οι κυστεΐνες σημειώνονται ως κόκκινες κάθετες γραμμές, ενώ οι δισουλφιδικοί δεσμοί ως κόκκινες οριζόντιες γραμμές. Οι περιοχές των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τμημάτων που συμμετέχουν στην πρόσδεση των IGFs εσωκλείονται σε μπλε κουτιά (Bach et al. 2005).

Οι IGFBPs αναστέλλουν τις δράσεις των IGF *in vivo* και *in vitro* αποτρέποντας την δέσμευση των IGF στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, αλλά κάποιοι επίσης ενισχύουν τις δράσεις των IGF σε ορισμένες καταστάσεις. Παρόλο που οι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλληλεπίδραση των IGFBPs με περικυτταρικά μόρια, όπως πρωτεογλυκάνες, μπορεί να ενισχύσει τις δράσεις των IGF, παρέχοντας IGF απόθεμα κοντά στους IGF-I υποδοχείς. Η μείωση της συγγένειας για δέσμευση στους IGFs, όταν οι IGFBPs δεσμεύονται σε πρωτεογλυκάνες, μπορεί να συνεπάγεται απελευθέρωση των IGFs για να συνδεθούν με τους υποδοχείς τους (Bach et al. 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Εργαστηριακή μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης και των αυξητικών παραγόντων

4.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού της ινσουλίνης

Για την μελέτη των επιδράσεων του αυξητικού παράγοντα στα πρόβατα παίρνετε δείγμα αίματος για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ινσουλίνης. Στη συνέχεια γίνεται προσπάθεια οι υπολογισθείσες συγκεντρώσεις συσχετιστούν με διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να προκύψει κάποιο πρότυπο συσχέτισης της συγκέντρωσής της ινσουλίνης με παραμέτρους αύξησης

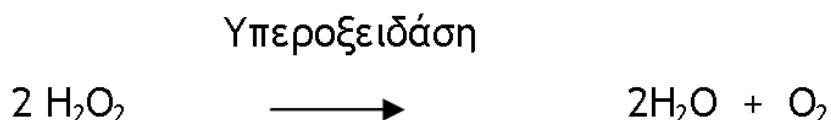
Το αίμα συλλέγεται με μια σύριγγα τοποθετείτε σε ειδικούς ογκομετρικούς σωλήνες και γίνεται φυγοκέντρηση του δείγματος. Στην συνέχεια με μια πιπέτα τοποθετείτε σε δοχείο και καταψύχετε στους -20°C για συντήρηση. Ο προσδιορισμός της ινσουλίνης στα δείγματα μπορεί να γίνει με την μέθοδο ELISA τύπου sandwich.

4.1.1 ELISA τύπου sandwich

Στην ELISA αυτή, γίνεται αρχικά επίστρωση των κελίων (coating) με ένα ειδικό, για το προς ανίχνευση αντιγόνο, αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό (1ο (A) αντίσωμα). Η δέσμευση γίνεται συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το πολυστυρόλιο. Οι ελεύθερες θέσεις στα κελία δεσμεύονται με μια κοινή πρωτεΐνη, συνήθως αλβουμίνη ορού βοός (BSA), για την αποφυγή στα επόμενα στάδια μη ειδικών αντιδράσεων (Γιαννακούδη 2008).

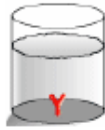
Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με τα δείγματα τα οποία περιέχουν την προς ανάλυση ουσία (αντιγόνο), ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Στην ίδια ακριβώς διαδικασία, καθώς και στις ίδιες συνθήκες χρόνου και ακολουθεί το στάδιο της ανίχνευσης με τη χρήση ενός αντισώματος ειδικού για το ίδιο αντιγόνο, για άλλο όμως επίτοπο, (1ο (B) αντίσωμα), το οποίο μπορεί να είναι και συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο, όπως υπεροξειδάση, ή βιοτίνη. Εάν το 1^ο (B) αντίσωμα δεν είναι σημασμένο ακολουθεί επώαση με το 2ο αντίσωμα, σημασμένο με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος. Εάν το 1ο (B) αντίσωμα είναι σημασμένο με ένζυμο ακολουθεί κατευθείαν η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος, ενώ εάν είναι σημασμένο με βιοτίνη ακολουθεί επώαση με στρεπταβιδίνη, σημασμένη με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος (Εικόνα 19).

Η χρωμοαντίδραση, η οποία είναι κοινή σε όλα τα είδη ELISA που χρησιμοποιήθηκαν, αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης, δηλαδή του H₂O₂, και μιας χρωμογόνου ουσίας που είναι η ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD). Από τη διάσπαση του H₂O₂ παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο οξειδώνει την OPD προς ένα διαλυτό έγχρωμο παράγωγο με μέγιστο μήκος κύματος 492nm (Γιαννακούδη 2008).



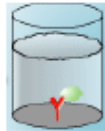
Λόγω της ευαισθησίας της OPD στο φως η χρωμοαντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, με προσθήκη ίσου όγκου 2N διαλύματος H₂SO₄, ακολουθεί φωτομέτρηση σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA στα 492nm. Όλα τα δείγματα (και το πρότυπο) δοκιμάζονταν εις διπλούν και εν συνεχεία υπολογίζονταν ο μέσος όρος της απορρόφησης του καθενός, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του περιεχόμενου αντιγόνου. Με βάση την απορρόφηση της πρότυπης ποσότητας του αντιγόνου υπολογίζεται η ποσότητα του αντιγόνου ανά κελί. Από όλα τα δείγματα αφαιρούνταν ο μέσος όρος της απορρόφησης ενός δείγματος «τυφλού», που περιείχε μόνο, ίση με το δείγμα, ποσότητα του θρεπτικού υλικού του μέσου καλλιέργειας (Γιαννακούδη 2008).

1. Δέσμευση του 1^{ου} (A) αντισώματος στο κελίο



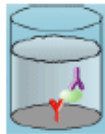
2. Έκπλυση

3. Επώαση με δείγμα που περιέχει το αντιγόνο



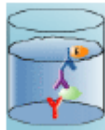
4. Έκπλυση

5. Επώαση με το 1^ο (B) αντίσωμα



6. Έκπλυση

7. Επώαση με το 2^ο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο



8. Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάπτυξη του χρώματος

Εικόνα 22. Βήματα μεθόδου ELISA

4.2 Ενδεικτικοί δείκτες για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης της ινσουλίνης και των αυξητικών παραγόντων σε διαφορετικές φυλές προβάτων

Όπως γίνεται προφανές από τα προηγούμενα κεφάλαια η ποσότητα και η δράση της ινσουλίνης και των IGF στους εκάστοτε οργανισμούς μπορεί να διερευνηθεί σε τρία διαφορετικά επίπεδα. Συγκεκριμένα σε γενετικό επίπεδο που αφορά την έκφραση των γονιδίων της ινσουλίνης και των IGF σε βιοχημικό επίπεδο που αφορά την συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στο αίμα και σε μορφολογικό επίπεδο που αφορά αλλαγές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (π.χ μέγεθος ζώου).

Για την διερεύνηση τυχόν γενετικών διαφοροποιήσεων μεταξύ των φυλών όσον αφορά την ποσότητα ινσουλίνης και IGF παραγόντων μπορεί να γίνει με την χρήση γενετικών δεικτών που αντανακλούν την γενετική διαφοροποίηση των ζώων. Οι γενικές αρχές των γενετικών δεικτών και της εφαρμογής τους δίνονται στη συνέχεια.

4.2.1 Φαινοτυπικοί δείκτες

Οι φαινοτυπικοί δείκτες αναφέρονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά που μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά όπως το χρώμα, το μέγεθος οι διαστάσεις του σώματος κ.α. τα χαρακτηριστικά αυτά και κατά επέκταση και οι δείκτες αυτού επηρεάζονται από το περιβάλλον. Έτσι π.χ. στα πρόβατα ο ρυθμός αύξησης μια φυλής δεν εξαρτάται μόνο από την γενετική σύσταση της φυλής αλλά και από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες που υπάρχουν κατά την εκτροφή του.

4.2.2 Βιοχημικοί δείκτες

Οι δείκτες αυτοί βασίζονται στους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων. Παρότι κατά την δεκαετία του 60 οι μελέτες βασίζονταν στην μελέτη πρωτεϊνών όπως των αιμοσφαιρινών και των τρανσφερινών, η προσοχή αργότερα στράφηκε στα ένζυμα (ενζυμική ποικιλότητα). Μεγάλο βήμα αποτέλεσε και η ανακάλυψη της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε άμυλο (Smithies 1955) και των ιστοχημικών τεχνικών χρώσης (Hunter & Market 1957).

Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης είναι ότι τα ένζυμα που αποτελούνται από μια ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες η οποία με την σειρά της συνιστάται από μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων που αντανάκλα την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA του αντίστοιχου γενετικού τύπου. Συνεπώς οι ενζυμικές διαφορές παρουσιάζουν γενετική αιτιολογία. Επιπλέον τα ένζυμα εκφράζονται ως

συνυπερέχοντες χαρακτήρες, γεγονός που επιτρέπει την εμφάνιση όλων των αλληλόμορφων που υπάρχουν στο γενετικό τόπο (Harris & Hopkinson 1976).

Όμως το μέγεθος της γενετικής ποικιλότητας που υπάρχει π.χ. σε ένα πληθυσμό ή σε ένα είδος, είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που αναδεικνύεται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης (Αποστολίδης et. al. 1999).

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη μοριακή τους μάζα. Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες κινούνται με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μέσα από τους πόρους μιας πηκτής. Η πηκτή παρασκευάζεται συνήθως με το συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N-μεθυλενοδισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), σε αναλογία 29:1 w/w. Το bis-ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει γέφυρες μεταξύ των πολυμερών του ακρυλαμιδίου, που είναι απλές αλυσίδες. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα τρισδιάστατο πλέγμα με πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού.

4.3.3 Μοριακοί δείκτες

4.3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Στα μέσα του 1980, ο Kary Mullis πρότεινε μία μέθοδο για την αντιγραφή γονιδίων που ονόμασε "PCR" (polymerase chain reaction). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δύναται να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός ενός μεμονωμένου γονιδίου σε εκατομμύρια αντίγραφα του. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μικρά κομμάτια του DNA δημιουργούνται με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων γνωστών ως Tag DNA πολυμεράσες, οι οποίες προσθέτουν συμπληρωματικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) σε ένα κομμάτι του DNA γνωστό ως βάση ή πρότυπο "template". Η Taq DNA πολυμεράση έχει απομονωθεί από ειδικό βακτήριο, που απαντά σε θερμές πηγές, το *Thermus aquaticus*. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει θερμοαντοχή και για αυτό το λόγο αντέχει σε θερμοκρασίες που απαιτούνται για το διαχωρισμό των ελίκων της διπλής έλικας του DNA. Πρόσφατες, εμπορικά διαθέσιμες Taq πολυμεράσες απομονώνονται από ειδικό βακτήριο *E coli*, που φέρει το γονίδιο για το συγκεκριμένο ένζυμο. Μικρότερα τμήματα του DNA, που ονομάζονται "primers" ή εκκινητές ή αφετηρίες, χρησιμοποιούνται ως «εναρκτήριοι θέσεις» για την Taq πολυμεράση. Τα primers είναι κατασκευασμένα, μικρά ολιγομερή τμήματα DNA, συνήθως μήκους μεταξύ 15 και 30 νουκλεοτιδίων,. Κατασκευάζονται γνωρίζοντας ή υποθέτοντας

μικρές ακολουθίες DNA συμπληρωματικές προς τα άκρα του γονιδίου, το οποίο θα πολλαπλασιασθεί *in vitro*. Η PCR αποτελείται από τρία βασικά βήματα, μετουσίωσης, σύνδεσης των εκκινητών, επιμήκυνσης ή επέκτασης, τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 ή 40 κύκλους (Stirling & Barlett, 2003). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα ειδικό αυτόματο θερμοκυκλοποιητή, το οποίο μπορεί να αυξάνει και να ελαττώνει τη θερμοκρασία του μίγματος σε σύντομο χρονικό διάστημα (γρήγορη θερμική εναλλαγή (Samarah 2009)).

1. Μετουσίωση (Denaturation) στους >94°C:

Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης η διπλή έλικα ανοίγει στις δύο επιμέρους έλικες DNA, και όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις διακόπτονται (για παράδειγμα η επιμήκυνση από έναν προηγούμενο κύκλο).

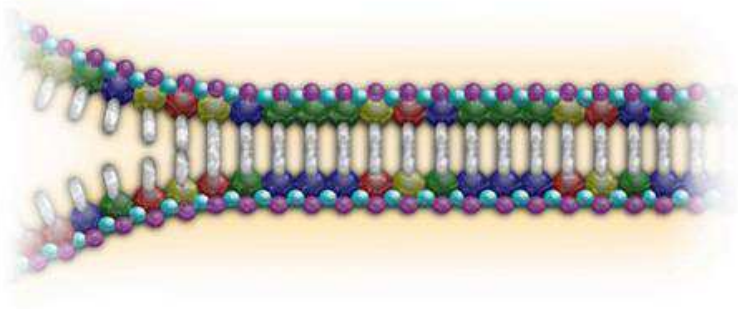
2. Σύνδεση ή υβριδισμός των εκκινητών (Annealing) περίπου στους 54-55°C:

Τα primers παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα που οφείλεται στην τυχαία κίνηση κατά Brown. Συνεχώς, λόγω της τυχαίας κίνησης των primers μονής αλύσου σχηματίζονται και διασπώνται ασθενείς ιοντικοί δεσμοί με τη μονή αλυσίδα της βάσης του DNA. Στην περίπτωση που η ακολουθία των primers ταιριάζει με αυτή της μονής αλύσου του DNA οι δεσμοί είναι πιο σταθεροί, διαρκούν περισσότερο, με αποτέλεσμα η περιοχική διπλή έλικα που σχηματίζεται να αποτελεί το κατάλληλο υπόστρωμα για την πολυμεράση να δράσει και κατά συνέπεια να ξεκινήσει την αντιγραφή αυτού του τμήματος του DNA. Όταν σχηματίζονται οι πρώτες βάσεις, οι ιοντικοί δεσμοί μεταξύ του DNA προτύπου και των εκκινητών, είναι τόσο δυνατοί που δεν διασπώνται πλέον εύκολα.

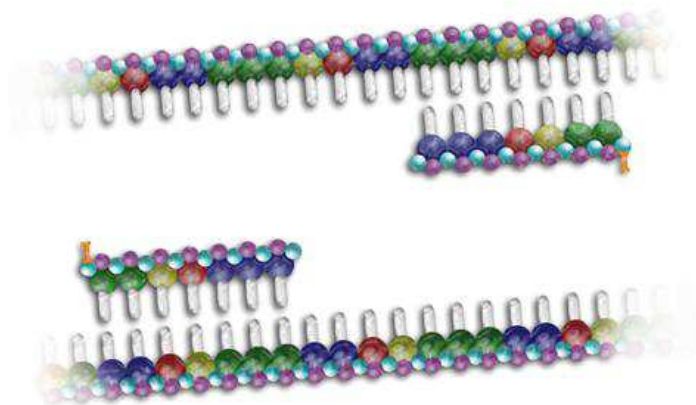
3. Επιμήκυνση - σύνθεση καινούργιου κλώνου (Extension) 72°C :

Η θερμοκρασία αυτή είναι η κατάλληλη για τη δράση της πολυμεράσης. Οι λίγες και σταθερές βάσεις που προστέθηκαν στα primers παραμένουν στις θέσεις τους λόγω των δεσμών. Αντίθετα, τα primers που βρίσκονται σε θέσεις που δεν ταιριάζουν συμπληρωματικά με την αλυσίδα του DNA απομακρύνονται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και δεν επιμηκύνουν σε εκείνο το σημείο το κλάσμα. Οι βάσεις (συμπληρωματικές του προτύπου DNA) συνδέονται στο primer στο 3' άκρο (εφόσον η πολυμεράση επιμηκύνει προσθέτοντας dNTP's από το 5' στο 3' άκρο, διαβάζοντας τη βάση του DNA από το 3' προς το 5' άκρο).

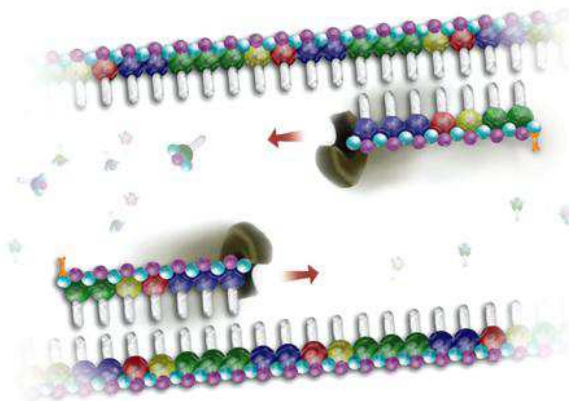
Επειδή και οι δύο αλυσίδες αντιγράφονται κατά τη διάρκεια της PCR, παρατηρείται μία εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου. Ξεκινώντας έτσι με ένα αντίγραφο του επιθυμητού γονιδίου, μετά τον πρώτο κύκλο θα έχουμε δύο αντίγραφα, μετά από δύο κύκλους 4 αντίγραφα, μετά από 3 κύκλους 8 αντίγραφα και ούτω κάθε εξής. (Stirling & Barlett, 2003)



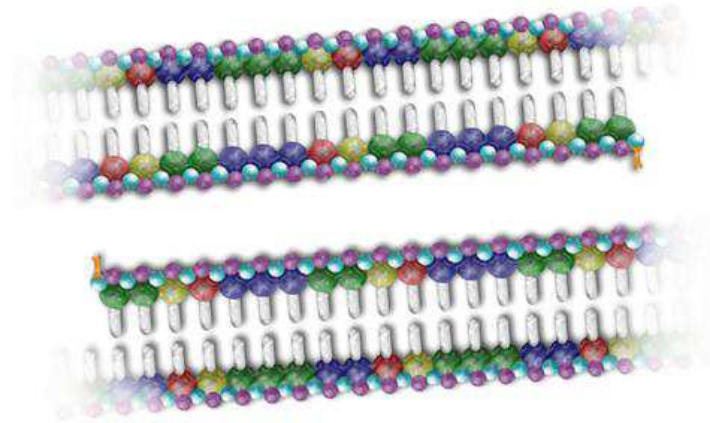
Εικόνα 23. Μετουσίωση της διπλής έλικας



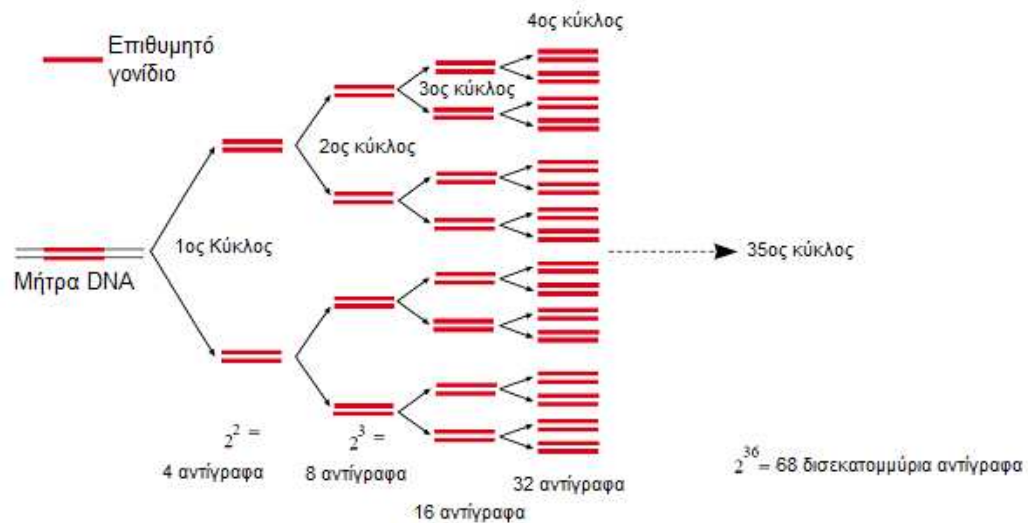
Εικόνα 24. Σύνδεση ή υβριδισμός των εκκινητών



Εικόνα 25. Επιμήκυνση - σύνθεση καινούργιου κλώνου



Εικόνα 26. Τέλος επιμήκυνσης



Εικόνα 27. Εκθετικός πολλαπλασιασμός των αντιγράφων της PCR (από Andy Vierstraete 1999 <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

4.3.3.2 Επώαση με ειδικά ένζυμα περιορισμού (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

Η RFLP είναι μία παραλλαγή στην ακολουθία του DNA του γενόματος που μπορεί να ανιχνευτεί με τη διάσπαση του DNA σε μικρότερα κομμάτια με τη βοήθεια των ενζύμων περιορισμού και εν τέλει με την ανάλυση του μεγέθους των τελικών κλασμάτων σε πηκτή ηλεκτροφόρησης. Τέτοιες παραλλαγές προκαλούνται από

μεταλλάξεις που δημιουργούν ή καταργούν θέσεις αναγνώρισης για αυτά τα ένζυμα. Η ανάλυση RFLP αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη γονιδιακή χαρτογράφηση, για την εντόπιση γονιδίων γενετικά κληρονομούμενων νόσων, για τον προσδιορισμό κινδύνου εμφάνισης μίας κληρονομούμενης ασθένειας, για το γενετικό αποτύπωμα και τέλος για το τεστ πατρότητας.

Τα ένζυμα περιορισμού, είναι ενδονουκλεάσες, ειδικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις νουκλεοτιδίων, οι οποίες αποτελούνται από 4 με 6 νουκλεοτίδια, γνωστά και ως «θέσεις αναγνώρισης» των ενζύμων αυτών. Για να μπορέσει η ενδονουκλεάση περιορισμού να διασπάσει και τις δύο έλικες του διπλού DNA, οι θέσεις πρέπει να είναι ως αντικατοπτρικές εικόνες ή αλλιώς παλλίνδρομες (διαβάζονται το ίδιο από αριστερά προς τα δεξιά και το αντίστροφο). Για παράδειγμα, το παλλίνδρομο που αναγνωρίζεται από το Eco R1 είναι η ακολουθία GAATTC στη μία έλικα DNA και η αντίστοιχη ακολουθία CTTAAG στην άλλη. Εάν αλλάξει η ακολουθία αυτή κατά μία βάση, το ένζυμο δεν θα διασπάσει το DNA στη συγκεκριμένη θέση. Αυτές οι φυσικά εμφανιζόμενες διαφορές, που ονομάζονται πολυμορφισμοί στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων, σε ειδικές θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών, οδηγεί στη δημιουργία κλασμάτων DNA διαφορετικού μήκους, τα οποία αναφέρονται και ως RFLP.

Μετά την επώαση με τα ένζυμα περιορισμού, το επωασμένο DNA μεταφέρεται σε μία πηκτή και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Στη πηκτή υπό την επήρεια του ηλεκτρικού ρεύματος, τα κλάσματα DNA μεταναστεύουν ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.. Η μετανάστευση είναι ανάλογη με το αντίστροφο του μήκους κλάσματος. Κατά συνέπεια, μικρότερα κλάσματα μεταναστεύουν μακρύτερα καθώς κινούνται στη πηκτή από μεγαλύτερα (Εικ. 28). Διάφορα γενετικά νοσήματα ανιχνεύονται με την ανάλυση RFLP συμπεριλαμβανομένου και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η νόσος προκαλείται από μία σημειακή μετάλλαξη: αντικατάσταση θυμίνης από αδενίνη. Η μετάλλαξη εμφανίζεται σε ένα σημείο της ακολουθίας του DNA που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού MstII στα άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο. Η ανάλυση RFLP από ένα άτομο που πάσχει από δρεπανοκυτταρική αναιμία θα περιλαμβάνει μία μακριά μπάντα αντί για δύο μικρότερες, εφόσον δεν θα υφίσταται διάσπαση από το ένζυμο περιορισμού MstII (<http://www.bio.davidson.edu>).

Βήμα 1ο Πέψη : τα ενισχυμένα τμήματα DNA (από την PCR) κόβονται (▲) από το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού όπου υπάρχει μια συγκεκριμένη ακολουθία

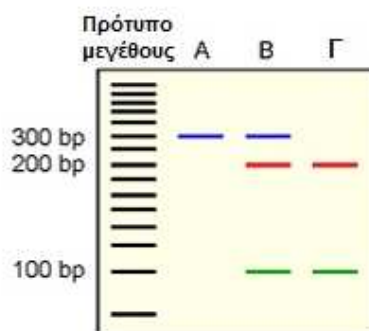


Τρία είναι τα πιθανά αποτελέσματα



Βήμα 2ο Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης

Το μέγεθος των κλασμάτων του DNA καθορίζει την απόσταση που θα μετακινηθεί στο πήκτη. Μικρά κομμάτια θα μετακινηθούν σε μεγαλύτερη απόσταση από ό,τι τα μεγαλύτερα



Step 3: Interpretation. Περίπτωση Α. Κανένα αντίγραφο της αλληλουχίας στόχος
Περίπτωση Β. Ετερόζυγο στην αλληλουχία στόχο
Περίπτωση Γ. Ομόζυγο στην αλληλουχία στόχο

Εικόνα 28. σχηματικό διάγραμμα βημάτων της RFLPs

4.3.3.3 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs)

Πρόκειται για θραύσματα DNA που ενισχύονται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας μικρού μέγεθος (συνήθως 10) εκκινητές, τα λεγόμενα δεκαμερή, τυχαίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων. Τα ενισχυμένα κομμάτια διαχωρίζονται μέσω ηλεκτοφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Οι τυχόν πολυμορφισμοί του υλικού διακρίνονται με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου ως παρουσία ή απουσία ζωνών. Η

ευκολία στην χρήση τους έχει καταστήσει από τους πιο δημοφιλείς μοριακούς δείκτες. Το κύριο πλεονέκτημα της RAPD είναι ότι είναι γρήγορη και εύκολη στην χρήση της. Επίσης δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα προτύπου DNA (συνήθως 5 – 50 ng ανά αντίδραση), ούτε γνώση της αλληλουχίας του εφόσον αυτή είναι τυχαία. Επιπροσθέτως, βρίσκονται σε αφθονία και τυχαίως καταναμημένα στο γονιδίωμα. Μειονέκτημα αποτελεί η χαμηλή επαναληψιμότητα της μεθόδου καθώς και η αναγκαιότητα χρήσης καθαρού DNA υψηλού μοριακού βάρους. Επιπλέον πρέπει να λαμβάνονται μέτρα προστασίας για αποφυγή επιμόλυνσης του DNA διότι οι μικροί αλλά τυχαίοι εκκινητές μπορούν να δώσουν ενίσχυση σε DNA Πολλών οργανισμών. (Spooner et. al 2005).

Τέλος τα RAPD είναι κυρίαρχοι δείκτες μη μπορώντας έτσι να ξεχωρίσουν την ομοζυγωτία από την ετεροζυγωτία (Ferguson et. al. 1998, Spooner et. al 2005). Η ικανότητα αναπαραγωγής των RAPD εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες. Αυτοί είναι το ένζυμο, ο εκκινητής, ο θερμοκυκλοποιητής και οι συνθήκες που γίνονται οι κύκλοι, όπως είναι ο αριθμός των κύκλων και η θερμοκρασία υβριδισμού (Yuzbasioglou et. al. 2006).

4.3.3.4 Δείκτες AFLP

Ο όρος AFLP προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων Amplified Fragment Length Polymorphism, που μεταφράζεται ως Πολυμορφισμός Μήκους Πολλαπλασιασμένων Τμημάτων. Βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει από τον περιορισμό του γενωμικού DNA με κάποιο περιοριστικό ένζυμο και στον διαχωρισμό των τμημάτων σε πηκτική ακρυλαμίδου και χρώση ασημιού ή ραδιενέργειας. Η τεχνική αυτή προσφέρει τα πλεονεκτήματα των RAPD, και επιπλέον, είναι πιο αξιόπιστη και προκύπτουν περισσότεροι δείκτες σε σχέση με τα RAPD. Παράλληλα όμως παρουσιάζουν και τα μειονεκτήματα των RAPD, εμφανίζουν σχέση κυριαρχίας στην κληρονομισιμότητα. Επιπλέον, η μέθοδος είναι πιο δαπανηρή και πιο επικίνδυνη όταν χρησιμοποιείται ραδιενέργεια (Staub et al, 1996).

4.3.3.5 Μικροδορυφόροι

Μια άλλη κατηγορία γενετικών δεικτών είναι και οι μικροδορυφόροι, γνωστοί και ως SSR (Simple Sequence Repeats). Οι δείκτες αυτοί, αποτελούνται από

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν μήκος συνήθως 2-5 βάσεων και ο πολυμορφισμός προκύπτει από διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων.

Πλεονεκτήματα των δεικτών αυτών είναι η απλότητα στην εφαρμογή , η συγκυριαρχία στην κληρονόμηση και η παρουσία μεγάλου πολυμορφισμού. Μειονέκτημα τους είναι η εκτεταμένη έρευνα που απαιτείται για την εφαρμογή τους σε ένα νέο είδος (Staub et al, 1996).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η εκτροφή προβάτων αποτελεί ένα δυναμικό κτηνοτροφικό κλάδο της χώρας. Πληροφορίες που αφορούν την αύξηση των προβάτων έχουν άμεση επίδραση στην απόδοση της εκτροφής του και ως εκ τούτου χρήζουν βαρύνουσας σημασίας.
- Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα και για αυτό είναι απαραίτητη για την αύξηση και την διατήρηση του οργανισμού
- Ο κυριότερος παράγοντας ελέγχου στην έκκριση της ινσουλίνης είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος καθώς έχει άμεσες επιδράσεις στα β – κύτταρα του παγκρέατος.
- Η ινσουλίνη σε όλα τα ζώα έχει την ίδια βιολογική δράση και οι διαφορές στην δομή της ανάμεσα σε διαφορετικά είδη έγκειται στην μικρή απόκλιση της συχνότητα εμφάνισης ορισμένες αμινοξέων
- Η ινσουλίνη παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans»).
- Στα πρόβατα σημαντικό ρόλο για την έκκριση της ινσουλίνης διαδραματίζουν ο ρυθμός διεργασιών ζύμωσης στη μεγάλη κοιλία και το πνευμονογαστρικό νεύρο. Σημαντικό ρόλο στα επίπεδα ινσουλίνης στα πρόβατα έχει και η διατροφή τους, η ηλικία, η φυλή, η γαλουχία, η θερμοκρασία, η εγκυμοσύνη και οι ασθένειες.
- Στα διαβητικά πρόβατα η παραγωγή ινσουλίνης καθώς και η απόκριση των παγκρεατικών υγρών σε αυτή, μετά στο αίμα είναι μειωμένες σε σχέση με υγιή πρόβατα. Η ενδοφλέβια χορήγηση ινσουλίνης σε διαβητικά πρόβατα έχει αποκαθιστά εν μέρει τις μεταβολικές λειτουργίες των προβάτων.
- Ο ινσουλινομημιτικός παράγοντας (IGF - I) είναι μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας υπό την επίδραση της αυξητική ορμόνης. Ο IGF-1 έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ανήλικων ατόμων ενώ συνεχίζει να έχει αναβολικές επιδράσεις στα ενήλικα άτομα.
- Διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του IGF-1 στο πλάσμα των προβάτων η ηλικία, το φύλο, η διατροφή, η θερμοκρασία, η υγρασία. Η

κληρονομικότητα όσον αφορά τα επίπεδα συγκέντρωσης του IGF-1 στα πρόβατα είναι μέτρια. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί πως υπάρχουν ορισμένες δυνατότητες για γενετική βελτίωση στις συγκεντρώσεις IGF-1 με την επιλογή ατόμων που βρίσκονται σε νεαρά στάδια.

- Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ινσουλίνης στο αίμα των προβάτων μπορεί να γίνει με την μέθοδο ELISA τύπου sandwich. Για διερεύνηση πιθανού προτύπου διαφοροποίησης ανάμεσα στις διαφορετικές φυλές προβάτων όσον αφορά την ινσουλίνη και τους αυξητικούς παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν φαινοτυπικοί, βιοχημικοί και μοριακοί δείκτες με τους τελευταίους να είναι οι πιο αξιόπιστοι. Χαρακτηριστικοί τέτοιοι δείκτες είναι η PCR, RFLPs, RAPD, ALFP, καθώς και η χρήση μικροδορυφόρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Afolayan R. A. & Fogarty, N.M. 2008. Fetal growth restriction and the programming of heart growth and cardiac insulin-like growth factor 2 expression in the lamb. *J Anim Sci* .86:2068-2075.

Aronoff, SL., Berkowitz, K., Shreiner B. & Want, L. 2004. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr* 17(3):183–189.

Bach LA, Headey SJ, Norton RS. 2005. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab* 16: 228-234

Başğlu, A., Sevinc, M. & Ok, M .(1998) Peri and postparturient concentrations of lipid lipoprotein insulin and glucose in normal dairy cows. *Tr J Vet Animal Sci* 22:141–144

Baxter RC, Binoux MA, Clemmons DR, Conover CA, Drop SL, Holly JM, Mohan S, Oh Y, Rosenfeld RG (1998) Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3213

Bell, GI., Selby, M.J, & W. J. Rutter, 1982. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences,” *Nature*, 295 :5844, 31–35.

Brockman, RP. 1978. Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminant—a review. *Can Vet J* 19:55–62

Brown H., Sanger, F. & Kitai, R. 1955. The structure of pig and sheep insulin. *Biochem J*. August; 60(4): 556–565.

Blair, H. T., S. N. McCutcheon, B. H. Breier, and P. D. Gluckman. 2002. Correlated response in lamb birthweight following about 5 generations of selection for high or low plasma IGF-1. Communication No. 19-04, pages 417–420 in *Proc. 7th*

World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, France. INRA, Montpellier, France.

Bliss., M 1986. Who discovered Insulin ? NIPS, 1: 31 – 36

Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, Al Regaiey KA & Bartke A. 2006. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. Proc Natl Acad Sci USA. 103:7901–5.

Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C.L., Blinderman, L.A., Massague, J., Hall, P.F., Czech, M.P., 1984. The actions of insulin-like growth factor-I and factor-II on cultured Sertoli cells. Endocrinology 114, 240–246.

Bunter, K. L., S. Hermesch, B. G. Luxford, H. U. Graser, & R. E. Crump. 2005. Insulin-like growth factor-I measured in juvenile pigs is genetically correlated with economically important performance traits. Aust. J. Exp. Agric. 45:783–792.

Byun. S.O., Zhou, H. & Hickford, J.G.H. 2008. Polymorphism of the ovine insulin – like growth factor I receptor (IGFIR) gene. Molecular and Cellular Probes 22 : 131–132

Caple, J. W. & Health, T. L. 1975. Biliary and pancreatic secretion in sheep: their regulation and roles. In Digestion and Metabolism in the Ruminant, ed. MCDONALD, J. W. & WARNER, A. C. J., pp. 91-100.

Chandrashekar, V. & Bartke, A. 2003. The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. Reprod Biol. 3:7–28.

Chatterjea MN (2004) Text book of biochemistry for dental/nursing/ pharmacy students. Jaypee, New Delhi.

Chatterjea, MN. & Shinde, R. 2005. Text book of medical biochemistry, 6th edn. Jaypee, New Delhi.

Chey, W. Y. 1980. Gastrointestinal hormones and pancreatic, biliary, and intestinal secretions. In *Gastrointestinal Hormones*, ed. GLASS, B. J., pp. 565-586. New York: Raven Press.

Cohen P, 2006. Overview of the IGF-I system. *Horm Res* 65 Suppl 1: 3-8

Γιαννακούδη Μ., 2008. Η ανταγωνιστική δράση του αναπτυξιακού παράγοντα μετασχηματισμού – β1 (TGF – β1) στην επαγομένη από ιντερλευκίνη IL – 1β παραγωγή της μεταλλοπρωτεΐνάσης -1 (MMP 1) από ινοβλάστες ανθρώπου, εξαρτάται από την προέλευση των ινοβλαστών και πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Πανεπιστήμιο Πατρών. Διδακτορική Διατριβή. 212 σελ.

Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 421-439

Emmison N, Agius L, Zammit VA (1991) Regulation of fatty acid metabolism and gluconeogenesis by growth hormone and insulin in sheep hepatocyte cultures, Effects of lactation and pregnancy. *Biochem J* 274:21–26

Fischbach, F. 2004. *A manual of laboratory and diagnostic tests*, 7th edn. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore

Ghckman, D., J. J. Johnson-Bmtt, I. H. Butler, B. W. Edgar and T. R. *Gum*. 1983. Studies of insulin-& in umbilical cord blood. *Clin. Endocrinol.* 19:405.

Grizard, J, Szczygiel, M. 1983. Plasma insulin and insulin kinetics in growing sheep, influence of age and diet. *Reprod Nutr Dev* 23 (2A):245–257

Jong AD, 1979. Regulation of insulin and glucagon secretion in goats. *Ann Rech Vet* 10 (213) : 240–243.

Juul A (2003) Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 13: 113-170

Junien C., and V.v., Heyningen, 1990. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 55: 1–4, 153–169, 1990.

Harfenist, J. E. & Craig L.C., 1952. The molecular weight of insulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (12), pp 3087–3089

Harrison, F. A. & Hill, K. J. 1962. Digestive secretions and the flow of digesta along the duodenum of the sheep. *Journal of Physiology* 162, 225-243.

Hegarty, R. S., J. R. McFarlane, R. Banks, and S. Harden. 2006. Association of plasma metabolites and hormones with the growth and composition of lambs as affected by nutrition and sire genetics. *Aust. J. Agric. Res.* 57:683–690.

Hill, K. J. 1961. Digestive secretion in the ruminant. In *Digestive Physiology and Nutrition of the Ruminant*, ed. LEVIS, D., pp. 48-58. London: Butterworths

Holland, M. D., K. L. Hossner, J. D. Tatum, M. E. King, H. S. Mauck, and K. G. Odde. 1988. Serum insulin-like growth factor I profiles in beef heifers with single and twin pregnancies. *J. Anim. Sci.* 66:3190–3196.

Horino, M., L. J. Machlin, F. Hertelendy and D. M. Kipnis 1968 Effect of short-chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. *Endocrinology* 83: 118.

Holly, J., 2004. *Biology of IGF-I: physiology of the IGF system*. Novartis Foundation, 19–35.

Καλύβα Μ., 2010. Ο ρόλος του μεταπρατικού αυξητικού παράγοντα β1 (TGF – β1) στην πολυφική επανόρθωση. Διδακτορική διατριβή . ΑΠΘ. 224 σελ.

Καναρτζής Κ.,2009. Μοριακοί μηχανισμοί έκκρισης ινσουλίνης από το β-κύτταρο. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 22, 2 : 94 – 97, 2009.

Kennedy, G.C., German, M. S, & W. J. Rutter, 1995. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nature Genetics*, 9 : 3, 293–298.

Kind KL, Owens JA, Robinson JS, Quinn KJ, Grant PA, Walton PE, Gilmour RS & Owens PC (1995). Effect of restriction of placental growth on expression of IGFs in fetal sheep: relationship to fetal growth, circulating IGFs and binding proteins. *J Endocrinol* **146**, 23–34.

Κούριτας Κ., 2008. Επιδράσεις της ινσουλίνης και των ινσουλινοειδών αυξητικών παραγόντων (IGF) στη διακίνηση του υπεζωκοτικού υγρού στο πρόβατο και στον άνθρωπο. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. 187 σελ.

Korc, M., Iwamoto, Y., Sankaran, H., Williams, J. A. & Goldfine, J. D. 1981. Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. I. Stimulation of protein synthesis. *American Journal of Physiology* 240, G56-62.

Korc, M., Sankaran, H., Wong, K. Y., Williams, J. A. & Goldfine, J. D. 1978. Insulin receptors in isolated mouse pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 84, 293-299.

Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW (2003) Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: Clinical pathology, 4th edn. Iowa state press, USA

Lens J, & Eevertzen A. 1952. The difference between insulin from cattle and from pigs. *Biochim Biophys Acta*. Mar ;8(3):332–338

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr., 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163.

Lin, T., Haskell, J., Vinson, N., Terracio, L., 1986. Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig-cell steroidogenesis in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137, 950–956.

Μαντζώρου Ι., 2005. Η επίδραση του παράγοντα IGF – I στην επούλωση της αναστόμωσης τους παχέος εντέρου σε επιμύες υπό κορτιζονοθεραπεία. Διδακτορική Διατριβή. Α.Π.Θ. 153 σελ.

Miao ZG, Wang LJ, Xu ZR, Han XY, Qoan HZ, Li GW (2008) Age-related changes of serum leptin, insulin, IGF-I and thyroid hormones levels in growing Jinhua and Landrace gilts. *J Anim Feed Sci* 17:548–558

McCann, JP., Hansel, W. 1986. Relationship between insulin and glucose metabolism and pituitary—ovarian functions in fasted heifers. *Bio Rep* 34:630–641

Μπασδαγιάννη Ζ., 2006. Συμβολή στην προώθηση της γενετικής βελτίωσης του προβάτου στην Ελλάδα : Αξιοποίηση ελέγχου γαλακτοπαραγωγής προβατίνων φυλής Χίου. Διδακτορική Διατριβή. Κτηνιατρική σχολή Α.Π.Θ

Μπατρίνος Μ., Σύγχρονη Ενδοκρινολογία. Ιατρικές εκδόσεις. Πασχαλίδη 72 – 74, 1999, ΑΘΗΝΑ.

Medrano, J. F., and G. E. Bradford. 1991. Growth performance and plasma insulin-like growth factor-I concentrations in sheep selected for high weaning weight. *J. Anim. Sci.* 69:1912–1918.

Morel, P. C. H., H. T. Blair, S. N. McCutcheon, B. H. Breier, and P. D. Gluckman. 1991. Responses to divergent selection for plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in sheep. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 51:417–422.

Mullis, P.E., 2005. Genetic Control of Growth. *Eur. J. Endocrinol*, 152 : 11 – 31.

Nakae J, Kido Y, Accili D (2001) Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22: 818-835

Nielsen FC. 1992. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4: 257-290

Olsen, R P., P. I. Wangsness, w. H. Pation and R J. Martin. 1981. Relationship of serum somatomedin-like activity and fibroblast proliferative activity with age and body weight gain in sheep. *J. Anim. Sci.* 5263.

Ong, K.K.L., Phillips, D.I., Fall, C., 1999. The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nature Genetics.* 21, 3 : 262–263.

Oonk, R.B., Grootegoed, J.A., 1988. Insulin-like growth-factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 55, 33–43.

Oonk, R.B., Jansen, R., Grootegoed, J.A., 1989. Differential effects of folliclestimulating- hormone, insulin, and insulin-like growth factor-I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *Journal of Cellular Physiology* 139, 210–218.

Ostaszewski, P. & Barej, W. 1979. Influence of rumen fermentation rate on glucagon and insulin blood levels. *Annales de Recherches Veterinaires* 10 (23), 385-387.

Paquette, J., Giannoukakis N., Polychronakos, C., Vafiadis, P., & C. Deal, 1998. The INS 5_ variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans, *Journal of Biological Chemistry*, 273 : 23, 14158–14164.

Reynolds, J. & Heath, T. (1981). Non-parallel secretion of pancreatic enzymes in sheep following hormonal or vagal stimulation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 66A, 495-500.

Richardson, A, Liu, F., Adamo, M.L., Van Remmen, H. & Nelson, J.F. 2004. The role of insulin and insulin-like growth factor-I in mammalian ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 18:393–406.

Riedemann J, & Macaulay VM. 2006 IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer* 13 Suppl 1: S33-43

Roberts, C. A., S. N. McCutcheon, H. T. Blair, P. D. Gluckman, and B. H. Breier. 1990. Developmental patterns of plasma insulinlike growth factor-I concentrations in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:457–464.

Saito, A., Williams, J. A. & Kanno, T. 1980. Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *Journal of Clinical Investigation* 65, 777-782.

Samarah F, Athanasiou-Metaxa M, Vavatsi-Christaki N. 2007. Genetic modulators of sickle cell disease. *Aristotle University Medical Journal.* 34(2): 25-35.

Sarko, T. A., M. D. Bishop, and M. E. Davis. 1994. Relationship of air temperature, relative humidity, precipitation, photoperiod, wind speed and solar radiation with serum insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in Angus beef cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11:281–290.

Sasaki, Y. & Takahashi, H. 1980) Insulin secretion in sheep exposed to cold. *J Physiol* 306:323–335.

Sepp-Lorenzino L. 1998. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:235–53.

Soder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M., 1992. Insulin-like growth-factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic-acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology* 131, 2344–2350.

Spooner G., Pignone D., 2001. Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. *Euphytica* 120 : 301 -307.

Staub J. E., Serquen F. C. and M. Gupta 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31(5): 729- 741.

Sternbauer, K., Luthman, J. 2002. Insulin sensitivity of heifers on different diets. *Acta Vet Scand* 43:107–114

Stirling D & Bartlett JM. 2003. *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Human Press Inc. 1st edition.

Stull, M.A., 2003. Wood TL Expression of IGFs, IGF – IR and IGFbps in the normal mammary gland and breast. *Breast Dis.* 17 : 15 – 26.

Tatar M, Bartke A, Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science.* 299:1346–50.

Trenkle, A., 1970. Effects of short - chain fatty acids, feeding, fasting and type of diet on plasma insulin levels in sheep. *The Journal of Nutrition.* 100 : 1323 – 1330.

Udum CD, Cetin M, Balci F, Gunes N, Hecer C (2008) Effects of plasma insulin, glucose and NEFA concentrations of feeding frequency during long term in lambs. *J Biol Environ Sci* 2(5):45–51

Vender, Sherman, Luciano, *Φυσιολογία του ανθρώπου : Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης : Γελαδάς, Μ., Τσακόπουλος, Μ. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*

Werner H & Maor S. 2006. The insulin-like growth factor-I receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends Endocrinol Metab* 17: 236-242

Weaver, J.U., Kopelman, P.G., & Hitman, G. A., 1992. Central obesity and hyperinsulinaemia in women are associated with polymorphism in the 5' flanking region of the human insulin gene *European Journal of Clinical Investigation*. 22, 4 : 265–270.

Χαρσούλης Φ. 1988. Κλινική Ενδοκρινολογία. University Press Studio.Θεσσαλονίκη

Yuzbasioglu E., Ozcan S., Acik L. 2006. Analysis of genetic relationships among Turkish and breeding lines of *Lens culinaris* Mestile using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53 : 507 – 514.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

Μπαντίλας – Γλιαρμής Α. 2007. Η ιστορία της ινσουλίνης (http://www.iatronet.gr/article.asp?art_id=3425)

Medscape 2006. Insulin gene expression. (http://www.medscape.com/viewarticle/551642_2)

Norman J. 2001. Normal Regulation of Blood Glucose: The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia. (<http://www.endocrineweb.com/conditions/diabetes/normal-regulation-blood-glucose>)

Ιδεώδες Ασκληπιακό Πάρκο Ιατρικής Σχολής (Ι.ΑΣ.Π.Ι.Σ.). 2008. "Γλυκαγόνη". <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=219>

Lehringer L.A., 1982. "Aminoacids sequence of insulin". (http://www.indulgedfurries.com/petdiabetes/insulin_sequence.htm)

Ελληνική ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια (<http://www.livepedia.gr/index.php/%CE%A0%CF%81%CF%8C%CE%B2%CE%B1%CF%84%CE%BF>)

<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%99%CE%BD%CF%83%CE%BF%CF%85%CE%BB%CE%AF%CE%BD%CE%B7>

http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Nicolae_Paulescu

<http://health.howstuffworks.com/medicine/medication/history-of-insulin.htm>

Βαλαβανίδης Θ. 2008. Η χημική ένωση του μήνα
http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_insulin.htm

Bio.davidson.edu (2001). *RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism*. Retrieved September 5, 2008, from the Davidson College Web site: <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/RFLP.html>.

Andy Vierstraete 1999 <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>